

ИНСТИТУТ ЗА ТЕХНОЛОГИЈУ НУКЛЕАРНИХ
И ДРУГИХ МИНЕРАЛНИХ СИРОВИНА са п.о.

Број 4/109
19.05.2015. год.
Београд
Булевар Франшеа Енерес бр. 86, пошт. фах 390

Naučnom veću ITNMS-a

Beograd

Predmet: Pokretanje postupka za validaciju i verifikaciju tehničkog rešenja

U skladu sa procedurom QMS, IP 19, Izrada i postupak validacije i verifikacije tehničko-tehnoloških rešenja, obraćamo se Naučnom veću Instituta za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina (ITNMS) sa molbom da, prema Pravilniku o postupku i načinu vrednovanja i kvantitativnom iskazivanju naučnoistraživačkih rezultata istraživača (Sl.glasnik RS, 38/08), pokrene postupak za validaciju i verifikaciju tehničkog rešenja, kategorije M 82 – Novi materijal, pod nazivom: Aflaproduct – visoko efikasni adsorbent mikotoksina.

Autori:

Dr Aleksandra Daković, naučni savetnik
Dr Mirjana Stojanović, naučni savetnik
Prof. dr Zvonko Gulišija, naučni savetnik
Prof dr Vera Dondur, redovni prof
Dr Milan Kragović, naučni saradnik
Marija Marković, istraživač saradnik

Za recenzente predlažemo:

1. Prof. dr Časlav Lačnjevac, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu,
2. dr Radmila Pivić naučni savetnik, Institut za zemljište, Beograd.

Beograd, 19.05.2015.

Podnositelj zahteva:


Dr Aleksandra Daković

**НАУЧНО ВЕЋЕ
ИНСТИТУТА ЗА ТЕХНОЛОГИЈУ НУКЛЕАРНИХ
И ДРУГИХ МИНЕРАЛНИХ СИРОВИНА**

Франше д' Еперае 86, Београд

Број:13/1-5

21. 05. 2015. године

На основу члана 40 Статута Института за технологију нуклеарних и других минералних сировина, Научно веће Института је, на седници одржаној 21. 05. 2015. године донело

ОДЛУКУ

Покреће се поступак за валидацију и верификацију техничког решења под називом *Афлапротект – високо ефикасни адсорбент микотоксина* аутора др Александре Даковић, научног саветника, др Мирјане Стојановић, научног саветника, Проф. др Звонко Гулишића, научног саветника, Проф др Вере Дондур, редовног професора, др Милана Краговића, научног сарадника и Марије Марковић, истраживача сарадника, и бирају рецензенти Проф. др Часлав Лачњевац, Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду и др Радмила Пивић, научни саветник, Институт за земљиште, Београд.

ПРЕДСЕДНИК НАУЧНОГ ВЕЋА

Мирољуб Сокић
доктор техничких наука
виши научни сарадник



**Naučnom veću Instituta za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina,
Beograd**

Predmet: Recenzija tehničkog rešenja

Odlukom Naučnog veća Instituta za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina br13/1-5 od 21.5.2015. godine imenovana sam za jednog od recenzenta tehničko-tehnološkog **rešenja „AflaProtect-Visoko efikasni adsorbent mikotoksina“** (kategorija M82) autora: dr A. Daković, dr Z. Gulišija, dr M. Stojanović, Prof. dr V. Dondur, dr M. Kragović, M. Marković.

Na osnovu toga dajem,

Mišljenje recenzenta

Tehničko rešenje „**AflaProtect–Visko efikasni adsorbent mikotoksina**“ dostavljeno je u tekstualnom dokumentu na 17 strana i sadrži 7 slika i 7 tabela. Rešenje sadrži teorijski i eksperimentalni deo, zaključak i na kraju rešenja navedena je korišćena literatura.

Teorijski deo sadrži pet poglavlja (1.1-1.5). U **Uvodnom delu** objašnjeno je šta su mikotoksini, kako se sintetišu, gde se nalaze i koji uslovi pogoduju njihovom razvoju. Ukazano je na značaj uklanjanja aflatoksina B1 i na porobleme koji mogu nastati konzumiranjem hrane koja je kontaminirana ovim toksinom. U nastavku su nabrojane metode koje se uglavnom koriste sa ciljem rešavanja problema uklanjanja mikotoksina i opisane najvažnije osobine mineralnih adsorbenata (zeolita i bentonita) koji se u tu svrhu mogu koristiti. Kao **Predmet i Cilj ispitivanja** navedeno je ispitivanje prirodne nemetalične mineralne sirovine – bentonita iz ležišta Šipovo u Republici Srpskoj i razvijanje tehnološkog postupka izdvajanja koncentrat montmorilonita sa ciljem dobijanja proizvoda AflaProtect-visoko efikasnog adsorbenta mikotoksina, naročito aflatoksina B1 prisutnih u stočnoj hrani. U poglavlju **Dosadašnji pregled stanja** je ukazano da se u našoj zemelji u svrhu uklanjanja aflatoksina B1 iz stočne hrane uglavnom koriste proizvodi na bazi prirodnog zeolita za koje je poznato da imaju nizak koeficijent adsorpcije aflatoksina B1 ali i ukazano na potrebu veće upotrebe proizvoda na bazi bentonita koji zbog većeg broja aktivnih mesta za vezivanje aflatoksina B1 ima i znatno veću efikasnost. U delu u kom je opisana **Biznis ideja** naveden je veliki tržišni potencijal koji otvara mogućnost uspešnog plasmana krajnjeg proizvoda ovog tehničkog rešenja kao i zarade. Navedena je računica po kojoj bi celokupni troškovi investicije, koja uključuje proizvodnju i distribuciju proizvoda, bili pokriveni za manje od godinu dana.

Eksperimentalni deo tehničkog rešenja takođe sadrži pet poglavlja (2.1-2.5) koja se odnose se na **Definisanje postupka za dobijanje visoko efikasnog adsorbenta mikotoksina**. U poglavlju **Definisanje karakteristika minerala neophodnih za efikasnu adsorpciju aflatoksina B1**, su na osnovu detaljnog i sveobuhvatnog pregleda literature definisani i tabelarno prikazani parametri koji su neophodni da bi bentonit mogao da se razmatra kao potencijalni adsorbent aflatoksina. Za definisanje parametara korišćene su rendgenska i infracrvena spektroskopska analiza, određivanje veličine čestica i koeficijenta adsorpcije mikotoksina izraženog u mol/kg, zatim kapaciteta

katjonske izmene, pH i prisustva organskog ugljenika. U poglavlju **Karakterizacija polaznog materijala – rovnog bentonita** urađena je detaljna karakterizacija polazne mineralne sirovine pri čemu su u tehničkom rešenju navedeni rezultati određivanja hemijskog sastava, sadržaja teških metala, kapaciteta katjonske izmene, rendgenske i termijske analize. U poglavlju **Izdvajanje koncentrata minerala montmorilonita** opisano je da je koncentracijom na centrifugi izdvojena je klasa $<10 \mu\text{m}$ koja u suštini predstavlja koncentrat montmorilonita. Na ovako dobijenom proizvodu urađena je kompletna mineraloška i fizičko-hemijska karakterizacija koncentrata minerala montmorilonita pri čemu su u Tehničkom rešenju dati rezultati određivanja hemijskog sastava, sadržaja teških metala, sadržaja i vrste izmenljivih katjona i kapaciteta katjonske izmene, zatim rezultati rendgenske (XRPD) i termijske (DTA/TGA) analize. Ispitivanja su pokazala da se nakon izdvajanja koncentrata montmorilonita hemijski sastav i ukupni kapacitet katjonske izmene ne menjaju značajnije u odnosu na polazni uzorak bentonita, ali da je sadržaj teških metala u dobijenom koncentratu montmorilonita niži u odnosu na polaznu mineralnu sirovinu. Rendgenskom analizom je pokazan niži sadržaj kalcita i kvarca u dobijenom koncentratu montmorilonita u odnosu na polazni bentonit. Niži sadržaj kalcita u dobijenom koncentratu montmorilonita je potvrđen i rezultatima termijske analize, odsustvom endotermnom pika sa maksimumom 742°C koji potiče od prisustva karbonata. U poglavlju **Eksperimenti uklanjanja aflatoksina B1 u in vitro i in vivo uslovima** navedeni su rezultati ispitivanja uklanjanja aflatoksina B1 na polaznom bentonitu i koncentratu montmorilonita. Ispitivanja u *in vitro* uslovima su pokazala da oba adsorbenta imaju visok koeficijent adsorpcije aflatoksina B1, kao i da pH sredine ne utiče na adsorpciju ovog toksina. Dobijeno je da je maksimalan adsorpcioni kapacitet koncentrata montmorilonita za vezivanje aflatoksina B1 93.3 mg/g čime je pokazana njegova visoka efikasnost u uklanjanju aflatoksina B1. *In vivo* eksperimenti su urađeni u Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, Animal Science Department, University of Missouri, Columbia, Missouri, USA. Ispitivanja su uzrađena na ukupno 180 muških brojlera. Rezultati su pokazali da i bentonit i koncentrat montmorilonita imaju visoku efikasnost u ublažavanju toksičnih efekata aflatoksina B1. Ukazano je da u slučaju da sirovina nije zadovoljavajućeg kvaliteta (sadržaj montmorilonita, sadržaj teških metala) neophodno je njeno prečišćavanje, što se može ostvariti razvijenim postupkom koji je prikazan u narednom poglavlju **Definisanje tehnološkog postupka proizvodnje visoko efikasnog adsorbenta mikotoksina**.

Na osnovu detaljnog pregleda Tehničkog rešenja pod naslovom „**AflaProtect-Visoko efikasni adsorbent mikotoksina**“ konstatujem sledeće:

Tekst je pisan jasno i tehnički razumljivo. Rešenje daje značajan doprinos u primeni novih materijala kao dodataka stočnoj hrani u cilju ublažavanja delovanja aflatoksina B1, odnosno poboljšanja zdravstvenog stanja životinja i povećanju prirasta pa samim tim i proizvodnji zdravobezbedne hrane.

Na osnovu svega navedenog, predlažem Naučnom Veću ITNMS-a iz Beograda da prihvati tehničko rešenje pod naslovom „**AflaProtect-Visoko efikasni adsorbent mikotoksina**“ autora dr A. Daković, dr Z. Gulišija, dr M. Stojanović, Prof. dr V. Dondur, dr M. Kragović, M. Marković.

U Beogradu, 12.11.2015.

Pivio Radnila

Dr Radnila Pivić, naučni savetnik

Naučnom veću Instituta za tehnologiju
nuklearnih i drugih mineralnih sirovina
Franše d'Eparea 86, 11000 Beograd

Predmet: RECENZIJA TEHNIČKOG REŠENJA

Podaci o tehničkom rešenju:

NAZIV TEHNIČKOG REŠENJA	„AflaProtect - Visko efikasni adsorbent mikotoksina“
Autori	1. Dr Aleksandra Daković, naučni savetnik ITNMS 2. Prof. Dr Zvonko Gulišija, naučni savetnik ITNMS 3. Dr Mirjana Stojanović, naučni savetnik ITNMS 4. Prof. Dr Vera Dondur, redovan profesor, Fakultet za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu 5. Dr Milan Kragović, naučni saradnik ITNMS 6. Marija Marković, istraživač saradnik ITNMS
Kategorija/oblast	M82, novi materijal
Rezultati projekta	451-03-2802-IP Tip1/142, Visoko efikasni adsorbent mikotoksina
Rukovodilac projekta	Prof. Dr Vera Dondur, redovan profesor, Fakultet za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu
Nosilac realizacije projekta	Institut za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina, Beograd, ITNMS
Korisnik	„Extra Mimark“, Beograd
Recenzent	Prof. dr Časlav Lačnjevac, Poljoprivredni fakultet, Univerziteta u Beogradu Recenzent je imenovan odlukom Naučnog veća ITNMS br. 13/1-5 od 21.5.2015. godine

Mišljenje recenzenta

Tehničko rešenje „AflaProtect–Visko efikasni adsorbent mikotoksina“, autora A. Daković, Z. Gulišija, M. Stojanović, V. Dondur, M. Kragović i M. Marković, ispunjava sve kriterijume za priznavanje i svrstavanje u kategoriju **M82, novi materijal**, a u skladu sa Pravilnikom o postupku i načinu vrednovanja i kvantitativnom iskazivanju naučnoistraživačkih rezultata istraživanja, Sl. Gl. 38/2008.

Obrazloženje recenzenta:

Tehničko rešenje „AflaProtect–Visko efikasni adsorbent mikotoksina“ dostavljeno je u tekstualnom dokumentu u vidu elaborata na 17 strana, poseduje 7 tabela i 7 slika. Rešenje je rezultat rada na projektu 451-03-2802-IP Tip1/142, „Visko efikasni adsorbent mikotoksina“ čiji je nosilac realizacije Institut za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina iz Beograda, rukovodilac Prof. dr Vera Dondur, a koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, RS, (2014-2015). Naručilac ispitivanja je firma „Extra

Mimark“, Beograd, koja je prihvatile tehničko rešenje za primenu.

U dostavljenoj dokumentaciji je kroz pet poglavlja teorijskog razmatranja (1.1-1.5) detaljno i jasno ukazano na značaj i probleme koje mikotoksi mogu da izazovu, istaknut je predmet i cilj istraživanja, prikazan je dosadašnji pregled stanja i data biznis ideja. U drugom delu, poglavlja 2.1-2.5, detaljno su opisani postupci i ispitivanja koja treba primeniti kako bi se dobio visoko efikasni adsorbent mikotoksina, navedeni rezultati *in vitro* i *in vivo* ispitivanja uklanjanja aflatoksina B1 i na kraju definisan i postupak za dobijanje proizvoda kao novog aditiva stočnoj hrani. Na kraju rešenja dati su zaključak i navedena korišćena literatura.

Ova ispitivanja su prikazana kroz:

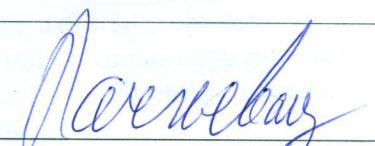
- Definisanje karakteristika minerala neophodnih za efikasnu adsorpciju aflatoksina B1, čime su postavljeni jasni kriterijumi koji definišu tip mineralne sirovine i minimalni kvalitet koji adsorbent treba da ima da bi mogao da se koristi kao suplement stočnoj hrani u svojstvu adsorbenta aflatoksina.
- Karakterizaciju polazne mineralne sirovine, pri čemu su ispitivanja rađena na bentonitu iz ležišta u Šipovu u Republici Srpskoj.
- Izdvajanje koncentrata minerala montmorilonita iz polazne mineralne sirovine i njegove detaljne karakterizacije.
- Prikaza rezultata ispitivanja uklanjanja aflatoksina B1 u *in vitro* i *in vivo* uslovima.
- Definisanje tehnološkog postupka proizvodnje visoko efikasnog adsorbenta mikotoksina.

Dobijeni rezultati su pokazali:

- Ukažano je da kvalitet mineralne sirovine može da varira od ležišta do ležišta, pa i u samom ležištu, tako da i sadržaj osnovnog minerala u sirovini može biti značajno različit. Iz tog razloga potrebno je konstantno proveravati njihov kvalitet.
- U slučaju da sirovina nije zadovoljavajućeg kvaliteta (sadržaj montmorilonita, sadržaj teških metala) neophodno je njeno prečišćavanje.
- Razvijen je postupak za izdvajanje koncentrata montmorilonita, novog proizvoda za ublažavanje štetnih efekata mikotoksina, naročito aflatoksina B1.
- *In vitro* eksperimenti su pokazali visoku efikasnost koncentrata montmorilonita u uklanjanju aflatoksina B1.
- *In vivo* eksperimenti urađeni u laboratoriji u inostranstvu su pokazali da i bentonit i koncentrat montmorilonita imaju visoku efikasnost u ublažavanju toksičnih efekata aflatoksina B1. Takođe, ukažano je da efikasnost odgovarajućeg adsorbenta osim u *in vitro* uslovima, mora biti ispitana i u *in vivo* uslovima. U slučaju da sirovina nije zadovoljavajućeg kvaliteta (sadržaj montmorilonita, sadržaj teških metala) neophodno je njeno prečišćavanje, što se može ostvariti razvijenim postupkom koji je prikazan u ovom tehničkom rešenju.

Dobijeni rezultati prikazani u ovom tehničkom rešenju daju originalni naučno-istraživački doprinos u oblasti dobijanja i primene novih materijala koji se kao aditivi dodaju stočnoj hrani sa ciljem uklanjanja mikotoksina, a pre sve aflatoksina B1, odnosno, u svrhu dobijanja zdravstveno bezbedne hrane.

U Beogradu, 10. 11. 2015.


Prof. dr Časlav Lačnjevac



EXTRA MIMARK d.o.o.

PREDUZEĆE ZA PROIZVODNJU, INŽENJERING I PROMET

11070 Beograd, Marka Čelebonovića 17/1, Tel: 011/318 28 51, mob: 063/840 95 35, e-mail: mimark@open.telekom.rs
Matični broj: 06189792 • Šifra delatnosti 2041 • PIB: SR100134620 • PDV: 135135502

**Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije,
Beograd
Nemanjina 22-26**

Predmet: Validacija i verifikacija tehničko tehnološkog rešenja, M82, AflaProtect - Visoko efikasni adsorbent mikotoksina

Kao rezultat projekta **451-03-2802-IP Tip1/142**, „Visoko efikasni adsorbent mikotoksina“ čiji je nosilac realizacije Institut za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina iz Beograda (ITNMS), rukovodilac Prof. dr Vera Dondur, koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije (2014-2015), osvojeno je tehničko-tehnološko rešenje kategorije M 82 – novi materijal (Sl.Gl.38/2008), pod nazivom:

“AflaProtect - Visoko efikasni adsorbent mikotoksina”

Autora :

1. Dr Aleksandra Daković, naučni savetnik, ITNMS
2. Prof. Dr Zvonko Gulišija, naučni savetnik, ITNMS
3. Dr Mirjana Stojanović, naučni savetnik, ITNMS
4. Prof. Dr Vera Dondur, redovan profesor, Fakultet za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu
5. Dr Milan Kragović, naučni saradnik, ITNMS
6. Marija Marković, istraživač saradnik, ITNMS

Tehničko rešenje opisuje postupke i ispitivanja koja treba primeniti kako bi se dobio visoko efikasni adsorbent mikotoksina i definiše postupak za dobijanje proizvoda kao novog aditiva stočnoj hrani. Na osnovu rezultata prikazanih konstatujemo da je osvojen:

- Postupak dobijanja proizvoda na bazi prirodnog bentonita, AflaProtect, visoko efikasnog adsorbenta mikotoksina, a pre svega aflatoksina B1 iz stočne hrane.

- Analizom dobijenih rezultata predstavljenih u ovom tehničkom rešenju može se izvesti zaključak da bi primenom proizvoda AflaProtect efekti upotrebe vrlo brzo bili vidljivi na farmama kroz poboljšanje zdravstvenog stanja životinja, smanjenje broja obolelih i uginulih životinja, kao i povećanju prirasta životinja. Na taj način doprinelo bi se poboljšanju ekonomске situacije na farmama kao i povećanju proizvodnje zdravstveno bezbedne hrane i posredno poboljšalo zdravstveno stanje ljudi.
- Na osnovu jednostavnog tehnološkog postupka prečišćavanja polazne mineralne sirovine i dobijanja ovog proizvoda kao i visoke efikasnosti uklanjanja aflatoksina B1 koja je potvrđena u ovom tehničkom rešenju može se zaključiti da proizvod AflaProtect može naći praktičnu primenu u uklanjanju mikotoksina prisutnih u stočnoj hrani i biti adekvatna zamena proizvodima koji se danas u tu svrhu najčešće upotrebljavaju.

Ostvareni rezultati istraživanja daju originalni naučno-istraživački doprinos u oblasti dobijanja i primene novih materijala koji se kao aditivi dodaju stočnoj hrani sa ciljem uklanjanja mikotoksina, a pre sve aflatoksina B1. Na osnovu toga konstatujemo da tehničko rešenje **“AflaProtect - Visoko efikasni adsorbent mikotoksina”** ima potencijal šire primene u funkciji dobijanja zdravstveno bezbedne hrane, pa je iz predhodno opisanog, kompanija **Extra Mimark, Beograd**, zainteresovana da, kako na domaćem tržištu, tako i u regionu, uloži napor da plasira dobijeni proizvod AflaProtect, kao aditiv stočnoj hrani.

Beograd, 10.11.2015. god.



Direktor
Milan Marić

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Milan Marić", positioned next to the company stamp.



РЕПУБЛИКА СРБИЈА
Завод за интелектуалну својину
Београд, Кнегиње Љубице 5

ИСПРАВА О ЖИГУ
Регистарски број 69287

Подносиоцу пријаве за признање индивидуалног жига

ИНСТИТУТ ЗА ТЕХНОЛОГИЈУ НУКЛЕАРНИХ И
ДРУГИХ МИНЕРАЛНИХ СИРОВИНА
Булевар Франша д'Епереа бр. 86, Београд, RS

признат је индивидуални жиг по пријави жига број Ж- 2014-1671 поднетој 6.11.2014. године, са правом првенства од 6.11.2014. године, за знак

AFLA/PROTECT

класификација фигуративних елемената:

25.05.01; 27.05.17; 27.05.24

који чине боје: сива, бела, а који се односи на робу, односно услуге наведене у овој исправи, из класа:

5

Жиг је уписан у регистар жигова 16.6.2015. године, и налази се у важности до 6.11.2024. године.

По истеку времена за које је регистрован, жиг се уплатом таксе може продужити за наредни период од 10 година заштите, неограничени број пута.

Ова исправа издата је на основу члана 30. Закона о жиговима („Службени гласник РС“, бр. 104/09 и 10/13) 16.6.2015. године.

Носилац жига ослобођен је плаћања таксе према одредбама члана 18. Закона о републичким административним таксама („Сл. гласник РС“, бр. 43/2003, 51/2003 – испр., 61/2005, 101/2005 – др. Закон, 5/2009, 54/2009, 50/2011, 70/2011 – усклађени дин. изн., 55/2012 – усклађени дин. изн. и 93/2012).



Списак роба и услуга за које је жиг признат

Кл. 5: ветеринарски препарати; дијететски додаци за животиње.



ИНСТИТУТ ЗА ТЕХНОЛОГИЈУ НУКЛЕАРНИХ
И ДРУГИХ МИНЕРАЛНИХ СИРОВИНА са.п.о.

Број 4/301

19. 11. 2015 год.

Београд
Булевар Франше д'Епереа бр. 66, пошт. фах 390

Izjava

Ovom izjavom potvrđujem da je tehničko-tehnološko rešenje, pod nazivom: „**AflaProtect - Visoko efikasni adsorbent mikotoksina**“, kategorije M82 – novi materijal, autora:

1. Dr Aleksandra Daković, naučni savetnik ITNMS,
2. Prof. Dr Zvonko Gulišija, naučni savetnik ITNMS,
3. Dr Mirjana Stojanović, naučni savetnik ITNMS,
4. Prof. Dr Vera Dondur, redovan profesor, Fakultet za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu,
5. Dr Milan Kragović, naučni saradnik ITNMS,
6. Marija Marković, istraživač saradnik ITNMS,

Rezultat inovacionog projekta **451-03-2802-IP Tip1/142 „Visko efikasni adsorbent mikotoksina“** čiji je nosilac realizacije Institut za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina (ITNMS) iz Beograda, a koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (2014-2015). Svi autori tehničkog rešenja su i saradnici na projektu.

U Beogradu, 19. 11. 2015.

Rukovodilac inovacionog projekta

Prof. dr Vera Dondur

**НАУЧНО ВЕЋЕ
ИНСТИТУТА ЗА ТЕХНОЛОГИЈУ НУКЛЕАРНИХ
И ДРУГИХ МИНЕРАЛНИХ СИРОВИНА**

Франше д' Епереа 86, Београд

Број:13/6-4

27. 11. 2015. године

На основу Правилника о верификацији и валидацији техничко-технолошких решења и процедуре ИП 19 Израда и поступак верификације и валидације техничко-технолошких решења, Научно веће Института за технологију нуклеарних и других минералних сировина, на седници одржаној **27. 11. 2015.** год., донело је

ОДЛУКУ

Да се резултат истраживачког рада "*Афлапротект – високо ефикасни адсорбент микотоксина*" који је проистекао као резултат рада на Пројекту финансијаним од стране МПНТР

451-03-2802-ИП Тип 1/42

Назив пројекта:

ВИСОКО ЕФИКАСНИ АДСОРБЕНТ МИКОТОКСИНА,

аутора:

1. др Александре **Даковић**, научног саветника, ИТНМС, Београд,
2. др Мирјане **Стојановић**, научног саветника, ИТНМС, Београд,
3. Проф. др Звонка **Гулишије**, научног саветника, ИТНМС, Београд,
4. Проф др Вере **Дондур**, редовног професора, Факултет за физичку хемију, Београд
5. др Милана **Краговића**, научног сарадника, ИТНМС, Београд, и
6. Марије **Марковић**, истраживача сарадника, ИТНМС, Београд,

верификује као техничко решење према индикаторима научне компетентности М 82 – (нов материјал), у складу са Правилником о поступку и начину вредновања и квантитативном исказивању научноистраживачких резултата истраживача (Сл. гласник РС бр. 38/2008), а након усвајања рецензија Проф. др Часлава **Лачњевца**, Пољопривредни факултет, Универзитета у Београду и др **Радмиле Пивић**, научни саветник, Институт за земљиште, Београд.

Коначну одлуку о верификацији доноси надлежни Матични научни одбор МПН Р Србије.

Доставити:

- руководиоцу Пројекта,
- аторима,
- архиви НВ.



Autori:

1. Dr Aleksandra Daković, naučni savetnik ITNMS
2. Prof. Dr Zvonko Gulišija, naučni savetnik ITNMS
3. Dr Mirjana Stojanović, naučni savetnik ITNMS
4. Prof. Dr Vera Dondur, redovan profesor, Fakultet za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu
5. Dr Milan Kragović, naučni saradnik ITNMS
6. Marija Marković, istraživač saradnik ITNMS

TEHNIČKO-TEHNOLOŠKO REŠENJE**-NOVI PROIZVOD-****AflaProtect - Visoko efikasni adsorbent mikotoksina****Beograd, 2015**

Sadržaj:

1. TEORIJSKA RAZMATRANJA.....	3
1.1. Uvod.....	3
1.2. Predmet ispitivanja.....	4
1.3. Cilj ispitivanja.....	4
1.4. Dosadašnji pregled stanja.....	5
1.5. Biznis ideja.....	5
2. DEFINISANJE POSTUPKA ZA DOBIJANJE VISOKO EFIKASNOG ADSORBENTA MIKOTOKSINA.....	6
2.1. Definisanje karakteristika minerala neophodnih za efikasnu adsorpciju aflatoksina B1.....	6
2.2. Karakterizacija polaznog materijala – rovnog bentonita.....	7
2.2.1. Određivanje hemijskog sastava, sadržaja teških metala i kapaciteta katjonske izmene.....	7
2.2.2. Mineraloški sastav polaznog bentonita.....	7
2.2.3. Termijska (DTA/TG) analiza polaznog bentonita.....	8
2.3. Eksperimentalni rad.....	9
2.3.1. Izdvajanje koncentrata minerala montmorilonita.....	9
2.3.2. Određivanje hemijskog sastava, sadržaja teških metala i kapaciteta katjonske izmene.....	9
2.3.3. Mineraloški sastav koncentrata montmorilonita.....	10
2.3.4. Termijska (DTA/TG) analiza koncentrata montmorilonita.....	10
2.4. Eksperimenti uklanjanja aflatoksina B1 u <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> uslovima.....	11
2.4.1. <i>In vitro</i> adsorpcija aflatoksina B1.....	11
2.4.2. <i>In vivo</i> adsorpcija aflatoksina B1.....	13
2.5. Definisanje tehnološkog postupka proizvodnje visoko efikasnog adsorbenta mikotoksina.....	15
Zaključak.....	16
Literatura.....	17

**TEHNIČKO REŠENJE JE REZULTAT PROJEKTA 451-03-2802-IP Tip1/142 ,
»Visoko efikasni adsorbent mikotoksina«**

RUKOVODILAC PROJEKTA	Prof. Dr VERA DONDUR, redovan profesor, Fakultet za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu
ORGANIZACIJA KOORDINATOR	I HIS, Naučno tehnološki park, Zemun A.D. Beograd
ORGANIZACIJE UČESNICI	Institut za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina, Beograd, ITNMS
ORGANIZACIJA KORISNIK	„Extra Mimark“, Beograd
TRAJANJE PROJEKTA	2014-2015 Finansiran od strane MINISTARSTVA PROSVETE, NAUKE I TEHNOLOŠKOG RAZVOJA, REPUBLIKE SRBIJE

1. TEORIJSKA RAZMATRANJA

1.1. Uvod

Mikotoksi su sekundarni metaboliti pojedinih vrsta gljiva i obično se nalaze na zrnastim hranivima kao što su kukuruz, pšenica, grašak, suncokret, soja, kikiriki itd. U organizam životinja ili ljudi mogu dozpeti konzumiranjem zagađene hrane, gde mogu izazvati različite akutne ili hronične bolesti. Mikotoksi koji su najčešće prisutni u stočnoj hrani su aflatoksi, ohratoksi, zearalenon, trihoteceni i fumonizini.

Aflatoksi su veoma toksični kumarinski derivati koje uglavnom biosintetišu *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*. Najvažniji mikotoksi iz ove grupe su aflatoksi B1, B2, G1, G2, M1 i M2. Aflatoksi B2 i G2 su dihidroderivati aflatoksina B1 i G1, dok su aflatoksi M1 i M2 su dihidroderivati aflatoksina B1 i B2 i izlučuju se mlekom, urinom i fecesom. Aflatoksine gljive biosintetišu u na velikom broju supstrata, kao što su semena uljarica, žita i njihovi proizvodi, koštičavo voće, suptropsko voće, začini. Najčešće se nalaze u proizvodima koji nisu dovoljno osušeni posle žetve ili tokom skladištenja pri relativno visokim temperaturama. Za biosintezu aflatoksina optimalna temperatura je 30 °C i relativna vlažnost između 88 i 95%. Pri temperaturama nižim od 13 °C i višim od 42 °C aflatoksi se ne stvaraju. Ipak pokazuju veliku stabilnost na uticaj visokih temperatura (razgrađuju se na temperaturi višoj od 250 °C), na promene koncentracije vodonikovih jona kao i na UV i gama zračenje. Aflatoksinima je ranijih godina uglavnom bila zaražena ljudska i stočna hrana u tropskim i subtropskim podržjima. Međutim, poslednjih godina ovi toksi se sve češće nalaze u hrani i hranivima u zemljama Evrope, uključujući i Srbiju. Iz ove grupe mikotoksina aflatoksin B1 je najjači kancerogen, a slede G1, B2 i G2. Kod sisara aflatoksi prouzrokuju akutne aflatoksoze, koje se manifestuju pre svega oštećenjem jetre, mada mogu biti oštećeni i bubrezi, pluća i slezina. Takođe, aflatoksi su snažni teratogeni, mutageni i embriotoksični agensi. Zbog velike toksičnosti i negativnim efektima koje izazivaju, letalna doza aflatoksina (LD) za životinje je veoma niska i varira od 0,3 do 10 mg/kg telesne mase (TM). Kuiper-Gudman je ustanovio tolerantni dnevni unos od 0,15 ng/kg TM za aflatoksin B1 i 0,20 ng/kg TM za aflatoksin M1.

Problem uklanjanja mikotoksina je veoma aktuelan kada su u pitanju hrana i zdravlje kako ljudi tako i životinja. U literaturi postoje brojne metode detoksifikacije hrane koje uključuju fizičko odvajanje (separaciju), termalnu inaktivaciju, iradijaciju, mikrobiološku degradaciju, kao i tretman različitim hemikalijama. Većina ovih metoda su samo delimično efikasne, kao i nedovoljno ekonomski isplative. Takođe, dugi niz godina najekonomičniji pristup u detoksifikaciji hrane kontaminirane mikotoksinima je baziran na osvajanju novih efikasnih mineralnih adsorbenata koji se dodaju kao aditivi stočnoj hrani u određenoj koncentraciji. Njihova uloga je da adsorbiju mikotoksine u digestivnom traktu životinja i na taj način smanje njihovu biodostupnost, a samim tim i toksičnost. Od mineralnih adsorbenata, najčešće se koriste prirodni alumosilikati kao što su zeolit (čiji je osnovni mineral klinoptilolit) i prirodni bentonit (čiji je osnovni mineral montmorilonit). Ovi adsorbenti imaju sposobnost da za sebe vežu, odnosno hemisorbuju, određene mikotoksine. U zavisnosti od vrste adsorbenta, aktivna mesta mogu biti locirana u međuslojnim kanalima, na bazalnim ravnima na površini i ili unutar slojeva, i na ivicama minerala. Kapacitet vezivanja i stabilnost nagrađenih kompleksa su značajno različiti za različite mikotoksine, a osobine izmenljivih katjona minerala značajno utiču na indeks adsorpcije različitih mikotoksina.

Bentonit je nemetalična mineralna sirovina, glina, koja nastaje razlaganjem vulkanskih tufova. Osnovni mineral u bentonitskoj glini je mineral montmorilonit. Komercijalni bentoniti obično sadrže iznad 60% minerala montmorilonita. Bentonit, kao sirovina, se koristi u velikim količinama u različitim industrijskim oblastima, uglavnom oplemenjen, jer u prirodi postoji samo ograničen broj vrsta bentonita, koji se u sirovom stanju mogu direktno koristiti. Računa se da se u svetu godišnje iskoristi/upotrebi oko 7.000.000 tona oplemenjenog bentonita, a najveći deo bentonita koristi se za: peletizaciju rude gvožđa (35%), livarstvo (25%), isplake kod bušenja (20%), i u industrijama - prehrambena, farmaceutska, pesticidna, građevinska itd. (20%). Zbog niske cene, dotupnosti u ogromnim količinama u mnogim delovima sveta, kao i jednostavnih postupaka modifikacije, bentonit i dalje nalazi sve širu praktičnu primenu. Modifikacijom bentonita katjonima metala, organskim katjonima i ili aminima, kao i interkalacijom ili oblaganjem ovih minerala sa oksihidroksidima gvožđa i aluminijuma, je moguće dobiti materijale, pogodne za adsorpciju širokog spektra zagađivača: prirodnih voda, industrijskih otpadnih voda, u poljoprivrednoj proizvodnji i prehrambenoj industriji, kao i u stočnoj hrani. Za postizanje što veće efikasnosti u uklanjanju zagađivača je od posebne važnosti i sadržaj osnovnog minerala u primjenjenoj mineralnoj sirovini, jer od njega zavisi i broj aktivnih centara za vezivanje zagađivača, pa je i predmet ovog tehničkog rešenja razvijanje postupka izdvajanja koncentrata montmorilonita iz bentonita kao polazne mineralne sirovine.

Literatura je data na kraju teksta.

1.2. Predmet ispitivanja

Predmet tehničkog rešenja je ispitivanje prirodne nemetalične mineralne sirovine – bentonita iz ležišta Šipovo u Republici Srpskoj i razvijanje tehnološkog postupka izdvajanja koncentrat montmorilonita sa ciljem dobijanja proizvoda Aflaprotect koji je visoko efikasan adsorbent mikotoksina, naročito aflatoksina B1 prisutnih u stočnoj hrani.

1.3. Cilj ispitivanja

Osnovni cilj predloženog tehničkog rešenja je definisanje tehnološkog postupka proizvodnje novog materijala, na bazi prirodne nemetalične mineralne sirovine – bentonita, sa visokim sadržajem osnovnog minerala, montmorionita, namenjenom efikasnom uklanjanju mikotoksina, naročito aflatoksina B1, prisutnih u stočnoj hrani. Visoka efikasnost uklanjanja mikotoksina i jednostavan postupak pripreme materijala, omogućili bi zamenu niza trenutno dostupnih nedovoljno efikasnih materijala na tržištu. Pored toga, definisanje optimalnih

karakteristika proizvoda omogućće postavljanje parametara neophodnih za kontrolu kvaliteta, u dužem vremenskom periodu, što bi rezultiralo i preciznom doziranju proizvoda u zavisnosti od koncentracije prisutnog aflatoksina B1 u stočnoj hrani što nije slučaj kod proizvoda koji se kod nas trenutno upotrebljavaju. Pored definisanja mineraloških, tehnoloških i fizičkohemijskih karakteristika proizvoda, jasno je definisan i maksimalan kapacitet adsorpcije mikotoksina, a dobijeni rezultati će doprineti postavljanju temelja nacionalne regulative u ovoj oblasti, koja trenutno ne postoji.

Primena dobijenog proizvoda doprineće poboljšanju zdravstvenog stanja životinja i povećanju prirasta pa samim tim i proizvodnji zdravo-bezbedne hrane, konkurentne na domaćem i međunarodnom tržištu uz poboljšanje ekonomске situacije na farmama.

U svrhu ostvarivanja cilja preduzete su aktivnosti koje se mogu podeliti u nekoliko faza. **Prva faza** istraživanja obuhvatila je definisanje karakteristika minerala neophodnih za efikasnu adsorpciju aflatoksina B1 i karakterizaciju polazne mineralne sirovine. U **drugoj fazi** urađeno je izdvajanje koncentrata minerala montmorilonita i njegova detaljna fizičkohemijska karakterizacija. U **trećoj fazi** istraživanja urađeni su eksperimenti uklanjanja aflatoksina B1 u *in vitro* i *in vivo* uslovima kao i definisanje maksimalnog kapaciteta adsorpcije aflatoksina B1 i u **četvrtoj fazi** definisan je tehnološki postupak proizvodnje adsorbenta mikotoksina na bazi bentonita sa visokim sadržajem montmorilonita.

1.4. Dosadašnji pregled stanja

U svetu, a i u našoj zemlji, kao adsorbenti mikotoksina se najčešće koriste nemetalične mineralne sirovine (alumosilikatni minerali). Zbog razlika u strukturi, različiti minerali imaju različitu efikasnost adsorpcije aflatoksina B1. Najvećim delom, proizvodi koji se kod nas upotrebljavaju su na bazi prirodnog zeolita. Prirodni zeoliti, međutim, poseduju aktivne centre za adsorpciju aflatoksina B1 samo na površini minerala, tako da imaju nizak kapacitet adsorpcije ovog toksina. I pored toga u Srbiji postoji veliki broj privrednih subjekata koji se bave proizvodnjom i prodajom proizvoda na bazi zeolita za adsorpciju mikotoksina: Macrolife, Zeo Link, I-Zeolit doo, Patent Co, Vinfeed doo, Biochem doo Balkan, Censone tech, Gebi doo, Farm Commerc, itd. Sa druge strane proizvodi na bazi prirodne nemetalične mineralne sirovine – bentonita iako poseduju veći broj aktivnih centara dostupnih za adsorpciju ovog toksina, pa prema tome i veću efikasnost, u Srbiji još uvek nisu dovoljno u upotrebi.

1.5. Biznis ideja

Potrebe za efikasnim i ekonomski prihvatljivim adsorbentima mikotoksina kod proizvođača hrane za životinje, kao i na farmama su svakodnevne. Kako su mikotoksini sve više prisutni u stočnoj hrani, bez efikasnih adsorbenata mikotoksina ne može da se dobije zdravo bezbedna hrana.

Potencijalni korisnici našeg proizvoda jesu svi veliki i mali proizvođači hrane za životinje, kao i farme u Srbiji. Pored ovih korisnika, u Srbiji je zvanično registrovano 490.000 gazdinstava, pa će prodaja našeg proizvoda biti usmerena i na individualne proizvođače.

U Srbiji postoji velika potražnja za adsorbentima mikotoksina. Na primer, poslednjih godina, i pored niskog kapaciteta adsorpcije aflatoksina godišnja prodaja zeolita je iznosila i do 7.000 tona/godišnje. Ovakav tržišni potencijal otvara mogućnost uspešnog plasmana našeg proizvoda, kao i zarade. Naime, ukoliko bi se ustanovio plasman našeg materijala definisanih karakteristika i visokog kapaciteta adsorpcije aflatoksina, postepeno bi se smanjila upotreba zeolita, što bi, zajedno sa nižom cenom, značajno doprinelo poboljšanju ekonomске situacije na farmama, a proizvodi bi zadovoljili kvalitet međunarodnih i domaćih tržišta. Tako bi se primenom ovog proizvoda smanjio broj obolelih životinja (svinja, živine, junadi, itd.), smanjila uginuća životinja, kao i povećao prirast. Takođe bi se sprečilo nagomilavanje rezidua

mikotoksina u organima i tkivima životinja, kao i pojava njihovih metabolita u proizvodima, što bi pozitivno uticalo i na zdravlje ljudi. Kako se i u regionu javljaju slični problemi u vezi sa kontaminacijom stočne hrane, pozitivni rezultati primene našeg proizvoda na farmama i gazdinstvima u Srbiji, bi otvorili mogućnost plasmana u zemlje okruženja.

Preporuka proizvođača adsorbenata je da se zeolit dodaje stočnoj hrani u količini 0,2 % preventivno, a u slučaju kontaminacije u količini 0,5 %. Preporuka za naš proizvod je od 0,5 do 1 % u stočnoj hrani. Trenutna ponuda na tržištu je takva da se proizvod na bazi zeolita prodaje po ceni od 1,5 €/kg. Planirana prodajna cena našeg proizvoda bi bila 1€/kg, što znači da bi na tržištu bili konkurentniji i sa cenom i sa kvalitetom proizvoda.

U prvoj fazi proizvodilo bi se 530.000 kg godišnje našeg proizvoda za tržište, što predstavlja godišnji prihod od 530.000 €. Isto tako analize pokazuju da bi troškovi proizvodnje iznosili oko 0,6 €/kg, odnosno u prvoj godini ukupno 318.000 €. Razlika u predviđenim prihodima i troškovima proizvodnje bi bila dovoljna da omogući pokrivanje investicionih, marketinskih i drugih troškova kao i zaradu zaposlenih i dobit od oko 10%. Drugim rečima, celokupni troškovi investicije bili bi pokriveni za manje od godinu dana.

2. DEFINISANJE POSTUPKA ZA DOBIJANJE VISOKO EFIKASNOG ADSORBENTA MIKOTOKSINA

2.1. Definisanje karakteristika minerala neophodnih za efikasnu adsorpciju aflatoksina B1

Visoka efikasnost alimosilikatnog minerala montmorilonita u uklanjanju mikotoksina, uključujući i aflatoksine je u literaturi veoma dobro opisana. Takođe, opisane su i procedure kojima se ove osobine mogu još više naglasiti. Međutim, najveći problem kod upotrebe prirodnih mineralnih sirovina, uključujući i bentonit u čijem obliku se nalazi montmorilonit, je to što njihov kvalitet može da varira iz ležišta do ležišta kao i u okviru jednog istog ležišta. Pored toga, u Srbiji ne postoji jasni kriterijumi koji definišu tip mineralne sirovine i minimalni kvalitet koji adsorbent treba da ima da bi mogao da se koristi kao suplement stočnoj hrani. Iz tog razloga najpre su na osnovu detaljnog i sveobuhvatnog pregleda literature definisani parametri koji su neophodni da bi bentonit mogao da se razmatra kao potencijalni adsorbent aflatoksina. Definisani parametri navedeni su u tabeli 1.

Tabela 1. Definisani parametri neophodni da bi bentonit mogao da se razmatra kao potencijalni adsorbent mikotoksina

Metoda ispitivanja	Opis	Maksimalno bodova
Rendgenska analiza	Dominantno prisustvo smektičkih minerala	30
Kapacitet adsorpcije dobijen iz Langmirove adsorpcione izoterme	Kapacitet adsorpcije aflatoksina B1 $\geq 0,30 \text{ mol/kg}$	30
Kapacitet adsorpcije dobijen iz Langmirove adsorpcione izoterme	$0,20 \leq \text{Kapacitet adsorpcije aflatoksina B1} \leq 0,30 \text{ mol/kg}$	20
Kapacitet katjonske izmene	$\geq 70 \text{ meq}/100\text{g}$	
Veličina čestica	-60+35 μm -35+20 μm -20+0 μm	10 5 0
Infracrvena spektroskopska analiza (FTIR)	Pojava spektralne linije Mg i/ili Fe	Za svaku spektralnu liniju 5
pH	$\text{pH} < 5$ i $\text{pH} > 9$	-5
Prisustvo organskog ugljenika	$> 0,25 \%$	-5

2.2. Karakterizacija polaznog materijala – rovnog bentonita

2.2.1. Određivanje hemijskog sastava, sadržaja teških metala i kapaciteta katjonske izmene

Kao polazna sirovina u ovim ispitivanjima korišćen je bentonit iz ležišta Šipovo u Republici Srpskoj. Na datom uzorku najpre je urađeno određivanje hemijskog sastava i sadržaja teških metala. Ispitivanja su urađena na atomskom apsorpcionom spektrometru Perkin Elmer Analyst 300, dok je silicijum određen gravimetrijski. Rezultati ispitivanja su prikazani u tabelama 2 i 3.

Tabela 2. Rezultati određivanja hemijskog sastava rovne sirovine

	Sadržaj, %								
	K ₂ O	Na ₂ O	Al ₂ O ₃	SiO ₂	CaO	MgO	Fe ₂ O ₃	TiO ₂	G.Ž.*
Polazni bentonit	0,38	0,16	25,04	49,24	5,07	1,57	5,67	0,84	11,99

*G.Ž. – gubitak žarenjem

Tabela 3. Rezultati određivanja sadržaja teških metala u rovnoj sirovini

	Sadržaj, ppm					
	Cd	Cr	Ni	Pb	Cu	Zn
Polazni bentonit	3,50	61,89	59,89	89,84	31,94	95,33

Kapacitet katjonske izmene određen adsorpcijom metilen plavog iznosi KKI=64,1 meq/100g, dok su sadržaj i vrsta izmenljivih katjona određeni sa 1M NH₄Cl. Koncentracije izmenljivih katjona određene su na atomskom apsorpcionom spektrofotometru Perkin Elmer Analyst 300.

Vrsta izmenljivih katjona: meq/100g uzorka

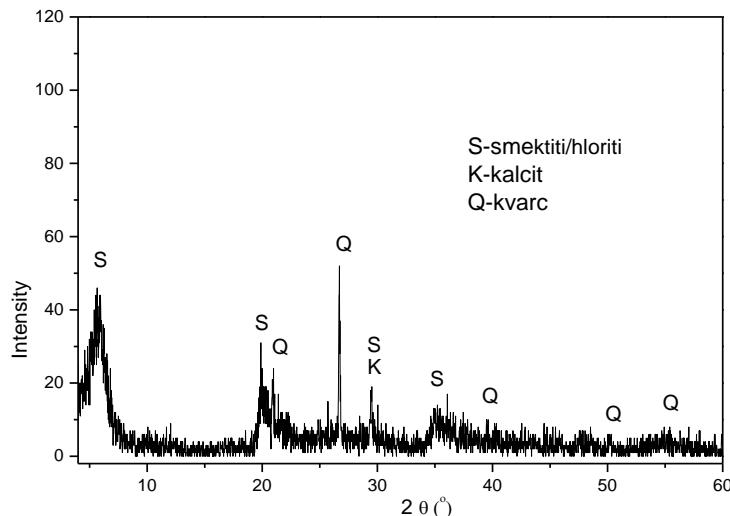
Ca	Mg	Na	K	Σ
67,5	26,3	1,3	1,7	96,8

Dobijeni rezultati su pokazali da je kod polazne rovne sirovine dominantan jon u izmenljivom položaju jon kalcijuma. Ukupan kapacitet katjonske izmene iznosi 96,8 meq/100g.

2.2.2. Mineraloški sastav polaznog bentonita

Rendgenska difrakciona analiza korišćena je za određivanje i praćenje faznog sastava uzoraka. Uzorci su analizirani na rendgenskom difraktometru marke "PHILIPS", model PW-1710, sa zakriviljenim grafitnim monohromatorom i scintilacionim brojačem. Inteziteti difraktovanog CuK α rendgenskog zračenja ($\lambda=1,54178\text{\AA}$) mereni su na sobnoj temperaturi u intervalima $0,02^\circ 2\theta$ i vremenu od 0,50 s, a u opsegu od 4° do $60^\circ 2\theta$. Rendgenska cev je bila opterećena sa naponom od 40 kV i struji 30 mA, dok su prorezi za usmeravanje primarnog i difraktovanog snopa bili 1° i 0,1 mm. Dobijeni difraktogram prikazan je na slici 1.

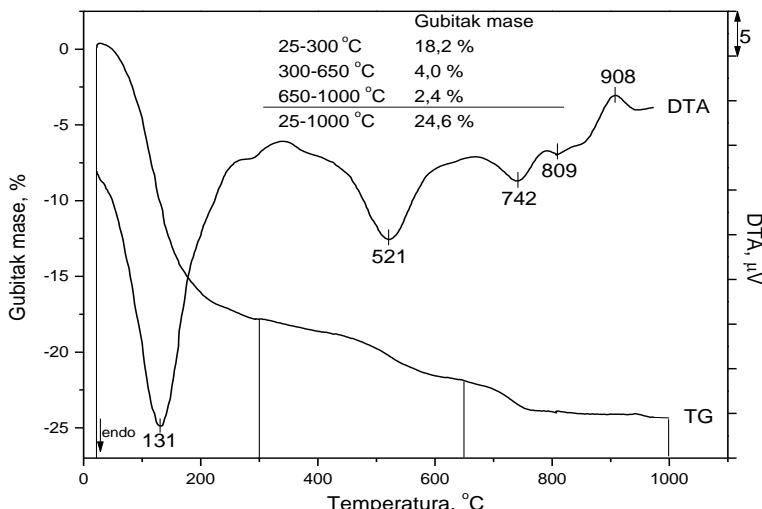
Mineralni sastav ispitivanog uzorka je sledeći: smektičke gline/hloriti, kvarc i kalcit. Najzastupljeniji minerali u uzorku su smektički minerali/hloriti, dok su kvarc i kalcit znatno manje prisutni. Ispitivanja su pokazala i da je stepen kristaliniteta polaznog bentonita nizak. Refleksija smektitita je $15,10\text{ \AA}$.



Slika 1. Difraktogram praha uzorka polaznog bentonita.

2.2.3. Termijska (DTA/TG) analiza polaznog bentonita

Termijska analiza polaznog bentonita urađena je na uređaju NETZSCH 409 EP. Uzorak je termijski tretiran u temperaturskom opsegu od 20 do 1000 °C pri brzini zagrevanja od 10 °C/min. Dobijeni dijagrami (DTA-diferencijalno termijska analiza i TG-termogravimetrijska analiza) prikazani su na slici 2.



Slika 2. Dijagrami termijske DTA/TG analize polaznog bentonita.

Na DTA krivoj polaznog bentonita prikazanoj na slici 2 uočava se endoterman pik sa maksimumom na 131 °C koji potiče od dehidratacije. Za prirodni bentonit ovaj proces je praćen gubitkom mase od 18,2 % u temperaturskom intervalu od 25-300°C na TG dijagramu. Endotermni pik koji potiče od dehidroksilacije minerala montmorilonita na DTA krivoj pokazuje maksimum na 521 °C. Ovaj proces je praćen gubitkom mase od 4,0 % u temperaturskom intervalu od 300 do 650 °C. Endotermni pik sa maksimumom na 742°C koji je praćen gubitkom mase od 2,4 % u temperaturskom intervalu od 650 do 1000 °C potiče od sagorevanja karbonata. Endotermno egzotermni pikovi sa maksimumima na 809 i 908 °C su karakteristični za bentonit i potiču od fazne transformacije i nisu praćeni značajnjom promenom mase.

2.3. Eksperimentalni rad

2.3.1. Izdvajanje koncentrata minerala montmorilonita

Iz rovne sirovine, polaznog bentonita izdvojen je koncentrat montmorilonita. Koncentracijom na centrifugi izdvojena je klasa $<10 \mu\text{m}$ koja u suštini predstavlja koncentrat montmorilonita. Na ovako dobijenom proizvodu urađena je kompletna mineraloška i fizičko-hemijska karakterizacija koncentrata minerala montmorilonita. Ova ispitivanja su obuhvatila hemijsku analizu, određivanje sadržaja izmenljivih katjona i kapaciteta katjonske izmene, rendgensku (XRPD), termijsku (DTA/TGA) i infracrvenu spektroskopsku analizu (FTIR), određivanje granulometrijskog sastava i određivanje teksturalnih osobina, ali će samo neki od rezultata biti prikazani. Nakon urađene karakterizacije na ovako dobijenom proizvodu urađena su ispitivanja adsorpcije aflatoksina B1 u *in vitro* i *in vivo* uslovima.

2.3.2. Određivanje hemijskog sastava, sadržaja teških metala i kapaciteta katjonske izmene

Na datom uzorku najpre je urađeno određivanje hemijskog sastava i sadržaja teških metala. Ispitivanja su urađena na atomskom apsorpcionom spektrometru Perkin Elmer Analyst 300, dok je silicijum određen gravimetrijski. Rezultati ispitivanja su prikazani u tabelama 4 i 5.

Tabela 4. Rezultati određivanja hemijskog sastava koncentrata montmorilonita

	Sadržaj, %								
	K ₂ O	Na ₂ O	Al ₂ O ₃	SiO ₂	CaO	MgO	Fe ₂ O ₃	TiO ₂	G.Ž.*
Koncentrat minerala	0,33	0,04	25,87	49,26	2,59	1,70	5,76	0,76	13,10

*G.Ž. – gubitak žarenjem

Tabela 5. Rezultati određivanja sadržaja teških metala u koncentratu montmorionita

	Sadržaj, ppm					
	Cd	Cr	Ni	Pb	Cu	Zn
Koncentrat minerala	2,00	50,00	40,00	45,00	27,50	104,00

Dobijeni rezultati su pokazali da je sadržaj teških metala (kadmijuma, hroma, nikla, olova, bakra) u dobijenom koncentratu montmorilonita niži u odnosu na polaznu mineralnu sirovину.

Kapacitet katjonske izmene koncentrata montmorilonita, određen adsorpcijom metilen plavog, je veći u odnosu na polazni bentonit i iznosi KKI=84,4 meq/100g.

Sadržaj i vrsta izmenljivih katjona određeni su sa 1M NH₄Cl.

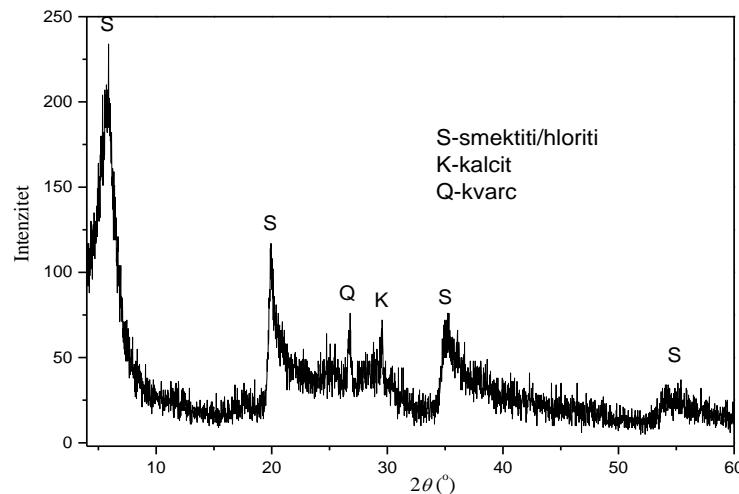
Vrsta izmenljivih katjona: meq/100g uzorka

Ca	Mg	Na	K	Σ
65,0	29,2	1,0	1,4	96,6

Dobijeno je da je dominantno izmenljivi jon kalcijum, kao i da je ukupan kapacitet katjonske izmene koncentrata montmorilonita približno isti kao i kapacitet katjonske izmene rovne sirovine i iznosi 96,6 meq/100g.

2.3.3. Mineraloški sastav koncentrata montmorilonita

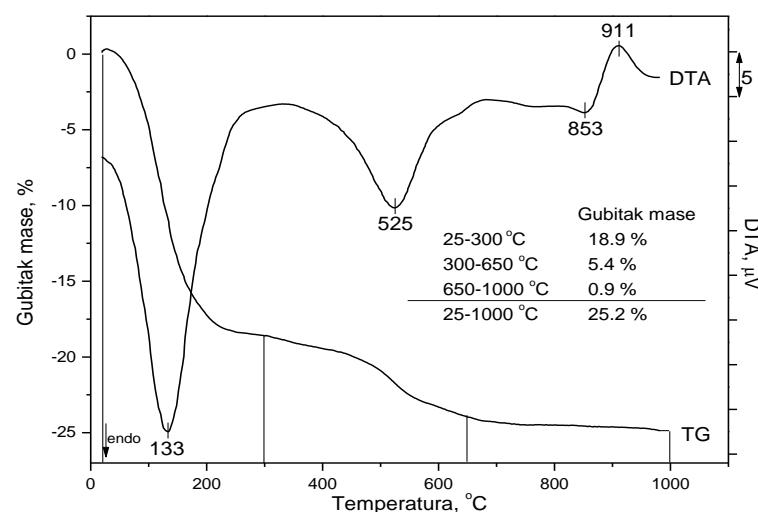
Mineralni sastav ispitivanog uzorka je: smektičke gline/hloriti, kvarc i kalcit. Najznačajnije su prisutni smektički minerali, dok su kvarc i kalcit prisutni u u tragu. Rendgenskom analizom je pokazan niži sadržaj kalcita i kvarca u dobijenom koncentratu montmorilonita u odnosu na polazni bentonit, što i jeste bio cilj primjenjenog postupka dobijanja proizvoda. Stepen kristaliniteta je nizak, (001) refleksija smektičita je 15,66 Å. Difraktogram ispitivanog uzorka dat je na slici 3.



Slika 3. Difraktogram praha uzorka koncentrata montmorilonita.

2.3.4. Termijska (DTA/TG) analiza koncentrata montmorilonita

Na DTA krivoj koncentrata montmorilonita prikazanoj na slici 4 uočavaju se endotermni pikovi karakteristični za montmorilonit. Endotermni pik sa maksimumom na 133 °C koji potiče od dehidratacije i je praćen gubitkom mase od 18,9 % u temperaturskom intervalu od 25-300°C. Endotermni pik koji potiče od dehidroksilacije minerala montmorilonita na DTA krivoj ispitivanog uzorka pokazuje maksimum na 525 °C. Ovaj proces je praćen gubitkom mase od 5,4 % u temperaturskom intervalu od 300 do 650 °C.



Slika 4. Dijagrami termijske DTA/TG analize koncentrata montmorilonita.

Nakon izdvajanja koncentrata montmorilonita endotermni pik sa maksimumom na 742°C koji potiče od sagorevanja karbonata koji se javlja kod rovnog bentonita kod

ispitivanog uzorka nije registrovan. Endotermno egzotermni pikovi sa maksimumima na 853 i 911 °C koji su karakteristični za bentonit i potiču od fazne transformacije i nisu praćeni značajnjom promenom mase (0,9 % u temperaturskom intervalu od 650 do 1000°C).

2.4. Eksperimenti uklanjanja aflatoksina B1 u *in vitro* i *in vivo* uslovima

2.4.1. *In vitro* adsorpcija aflatoksina B1

Pre ispitivanja u *in vivo* uslovima, neophodno je ispitati efikasnost adsorpcije svakog adsorbenta u *in vitro* uslovima. Najpre je preliminarno uporedno je ispitana efikasnost polaznog (rovnog) bentonita i dobijenog koncentrata montmorilonita za adsorpciju aflatoksina B1, u *in vitro* uslovima.

Da bi se što više približili uslovima *in vivo*, u kojima se vrši adsorpcija mikotoksina na adsorbentima, eksperimenti adsorpcije aflatoksina B1 su izvođeni u elektrolitu pripremljenom od neorganskih komponenti prisutnih u želudačnom soku životinja na pH 3 i 6,5. Za ispitivanje je korišćena polazna koncentracija aflatoksina B1 od 2 ppm, dok je sadržaj čvrste faze bio 1 mg/10 ml. Koncentracije aflatoksina B1, u rastvoru, pre i posle adsorpcije na dobijenim materijalima, su određivane metodom tečne hromatografije (HPLC). Preliminarni rezultati adsorpcije aflatoksina B1 na rovnom bentonitu i koncentratu montmorilonita prikazani su u tabeli 6.

Tabela 6. Rezultati adsorpcije aflatoksina B1 na polaznom bentonitu i koncentratu montmorilonita

	Indeks adsorpcije aflatoksina B1, %	
	pH 3	pH 6,5
Polazni bentonit	93,3	94,3
Koncentrat minerala	95,3	94,1

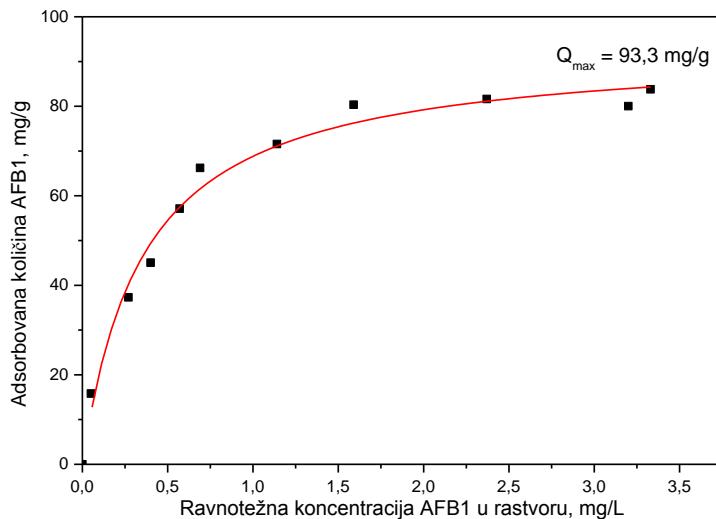
Rezultati pokazuju da je i kod rovnog bentonita i kod montmorilonita adsorpcija aflatoksina B1 visoka, kao i da pH sredine ne utiče na adsorpciju ovog toksina.

Kod proizvoda, koji se kod nas najčešće nalaze na tržištu, za uklanjanje mikotoksina, kao dokaz visoke adsorpcije mikotoksina, u *in vitro* uslovima, je najčešće prikazan procenat (indeks) adsorpcije (%), tako da je prema deklaraciji, proizvod efikasan ukoliko je indeks adsorpcije 100%. Međutim, kod ovih proizvoda obično nisu definisani uslovi pod kojima je dobijen visok indeks adsorpcije. Na primer, nije definisana početna koncentracija toksina u rastvoru, kao i količina čvrste faze u suspenziji (odnosno odnos toksin:adsorbent) na osnovu kojih bi se procenila efikasnost adsorpcije. Iz tog razloga urađeni su eksperimenti određivanja maksimalnog adsorpcionog kapaciteta koncentrata montmorilonita. Za ispitivanje je korišćena polazna koncentracija aflatoksina B1 u intervalu od 0,4 ppm (20mg/g) do 8 ppm (400 mg/g), dok je sadržaj čvrste faze bio 0,2 mg/10 ml. Koncentracije aflatoksina B1, u rastvoru, pre i posle adsorpcije na dobijenim materijalima, su određivane metodom tečne hromatografije (HPLC). S obzirom da je pokazano da efikasnost uklanjanja aflatoksina B1 ne zavisi od pH sredine, dobijena je izoterma samo na pH 3 a rezultati su prikazani na slici 5.

Rezultati prikazani na slici 5 su fitovani prema Langmirovom adsorpcionom modelu pri čemu je dobijen visok koeficijent slaganja ($R^2=0,978$). Iz Langmirove adsorpcione izoterme dobijeno je da je maksimalan adsorpcioni kapacitet koncentrata montmorilonita za vezivanje aflatoksina B1 93,3 mg/g. Za maksimalnu polaznu koncentraciju aflatoksina B1 (400 mg/g), indeks adsorpcije toksina u procentima (%) izračunat po sledećoj formuli:

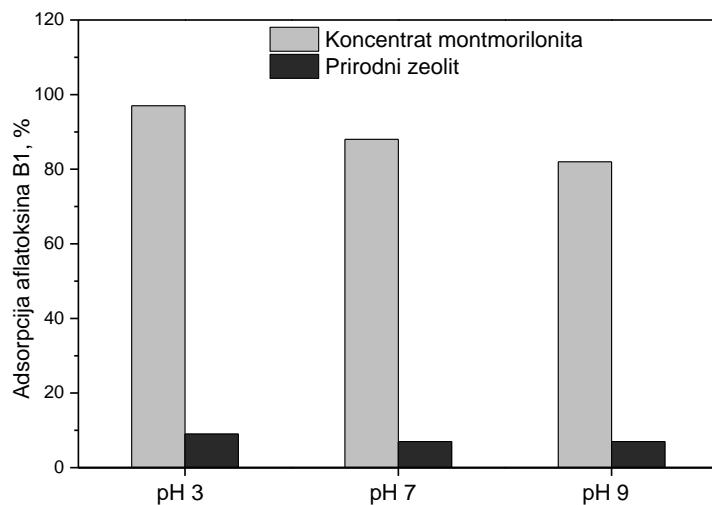
$$\text{Indeks adsorpcije} = 100 \cdot (C_o - C)/C_o$$

gde je C_0 – polazna koncentracija aflatoksina B1, a C – ravnotežna koncentracija aflatoksina B1 u elektrolitu, nakon adsorpcije je iznosio 44 %. Dobijeni rezultati u *in vitro* uslovima su pokazali da je dobijeni proizvod visoko efikasni adsorbent aflatoksina B1.



Slika 5. Adsorpcija aflatoksina B1 na koncentratu montmorilonita.

Pored ovih ispitivanja urađeno je i poređenje efikasnosti uklanjanja aflatoksina B1 upotrebom prirodnog zeolita (na bazi kojeg se danas uglavnom prodaju proizvodi namenjeni uklanjanju ovih toksina) i na koncentratu montmorilonita. Ispitivanja su urađena u *in vitro* uslovima pri polaznoj koncentraciji aflatoksina od 4 ppm i sadržaju čvrste faze od 0,1 mg/ml, pri pH 3, 7 i 9. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 6.



Slika 6. Poređenje efikasnosti koncentrata montmorilonita i prirodnog zeolita u uklanjanju aflatoksina B1.

Dobijeni rezultati su pokazali da efikasnost koncentrata montmorilonita iznosi 97 % za pH 3, 88 % za pH 7 i 82 % za pH 9 i da je oko deset puta veća u odnosu na prirodni zeolit čija je efikasnost 9 % za pH 3, i 7 % za pH 7 i 9. Takođe, razlike u efikasnosti se ne menjaju značajnije sa promenom pH sredine.

2.4.2. *In vivo* adsorpcija aflatoksina B1

Eksperimenti su urađeni u Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, Animal Science Department, University of Missouri, Columbia, Missouri, USA. Eksperiment je obuhvatio ispitivanje efikasnosti koncentratamontmorilonita na ublažavanje toksičnih efekata aflatoksina B₁ kod brojlera. Da bi uporedili rezultate, ogled je urađen i sa rovnim bentonitom. Ogled je izveden na ukupno 180 muških brojlera koji su bili podeljeni u 6 grupa po 30 životinja (6X5) u podnom sistemu gajenja sa odgovarajućim zoohigijenskim procedurama. Brojleri u eksperimentu su hranjeni i pojenci (ad libitum).

Ogled je organizovan u 6 grupa i to:

1. Grupa je hranjena komercijalnom hranom na bazi kukuruza i soje bez dodataka aflatoksina B1 i adsorbenta (kontrolna).
2. Grupa brojlera koja je hranjena komercijalnom hranom sa dodatkom 0,5% bentonita
3. Grupa brojlera koja je hranjena komercijalnom hranom sa dodatkom 0,5% koncentrata montmorilonita
4. Grupa koja je hranom dobijala 2 ppm aflatoksina B1
5. Grupa koja je hranjena sa 2 ppm aflatoksina B1 uz dodatak 0,5% bentonita
6. Grupa koja je hranjena sa 2 ppm aflatoksina B1 uz dodatak 0,5% koncentrata montmorilonita

Tokom tri nedelje eksperimentalnog perioda praćeni su proizvodni rezultati (konzumacija, telesna masa brojlera i iz ovih parametara je izračunata konverzija hrane) brojlera kontrolne i eksperimentalnih grupa. Rezultati su prikazani u tabeli 6.

Tabela 7: Rezultati ispitivanja efikasnosti bentonita i koncentrata montmorilonita u *in vivo* uslovima

Eksperimentalna grupa	Početna telesna masa, (g)	Konzumacija hrane, (g)	Telesna masa, (g)	Konverzija hrane, (g/g)
1	37,50	987	739	1,34
2	37,43	1034	760	1,36
3	37,43	974	706	1,39
4	37,53	806	579	1,40
5	37,47	967	701	1,39
6	37,47	941	693	1,36

Najbolje rezultate konzumacije hrane 21. dan ogleda ostvarili su brojleri grupe koji su hranom dobijali i bentonit i koncentrat montmorilonita bez dodataka aflatoksina. Najlošiju konzumaciju ostvarila je grupa koja je hranom dobijala samo 2 ppm aflatoksina B1. Veoma dobar rezultat konzumacije hrane ostvarila je i grupa koja je hranom uz aflatoksin B1 dobijala i 0,5% oba adsorbenta.

Posmatrajući TM brojlere 21. dana ogleda može se zaključiti da su grupe koje su hranom dobijale samo AFB1 imale statistički značajno niže TM u odnosu na brojleve kontrolne i oglednih grupa koje su hranom dobile 0,5% bentonita i koncentrata montmorilonita. Takođe se mora naglasiti da je ogledna grupa koja je hranom uz 2 ppm AFB1 dobijala i 0,5% bentonita i koncentrata montmorilonita imala signifikantno višu telesnu masu u odnosu na grupu koja je uz hranu dobijala i AFB1.

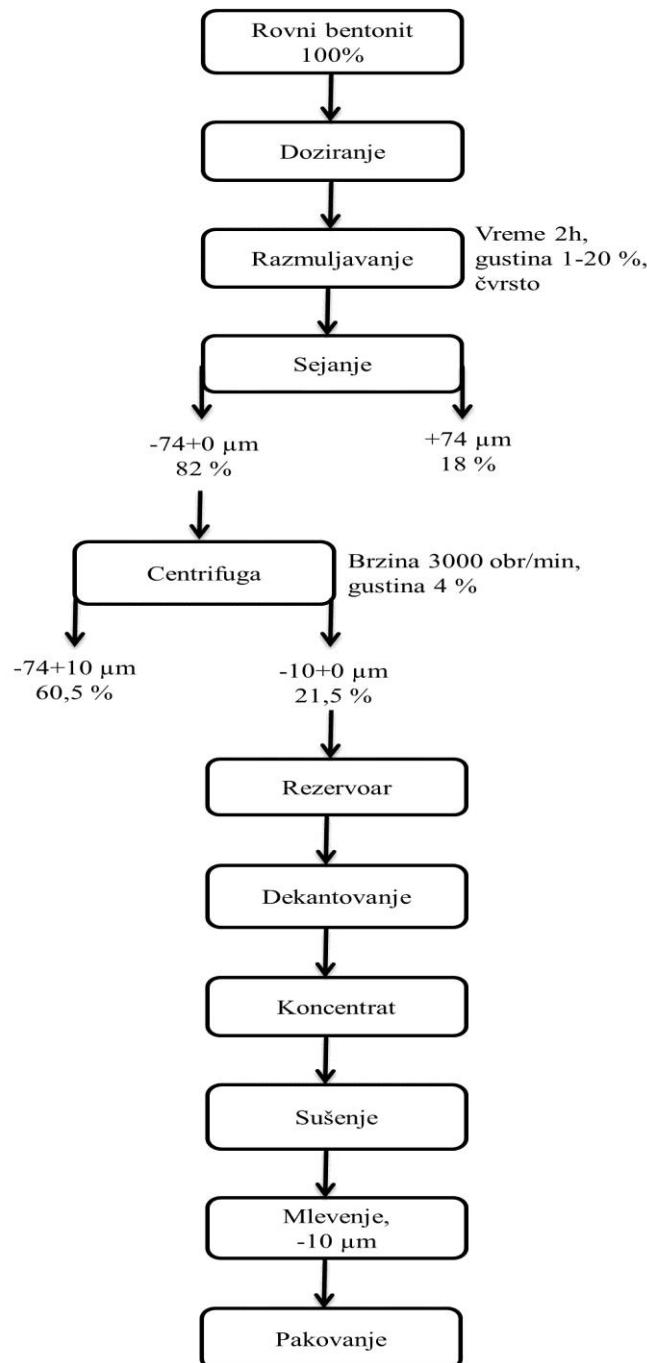
Posmatrajući konverziju hrane kao pokazatelja uspešnosti tova 21. dana ogleda može se zaključiti da su najbolju konverziju ostvarili brojleri kontrolne grupe. Rezultati konverzije

hrane 21. dana ogleda kod grupa koje su hranom dobijale samo AFB1 su bili najlošiji, dok grupa koja je dobijala i AFB1 uz dodatak adsorbenata ostvarila veoma dobar rezultat. Rezultati su ukazali da i bentonit i koncentrat montmorilonita su pokazali efikasnost u ublažavanju toksičnih efekata aflatoksina B1.

Dobijeni rezultati su samo potvrdili činjenicu, da efikasnost odgovarajućeg adsorbenta osim u in vitro uslovima, mora da se ispita i u in vivo uslovima, odnosno da ukoliko je adsorbent efikasan u in vitro uslovima ne znači da će biti efikasan u in vivo uslovima. Tako, koncentrat montmorilonita pored znatno višeg kapaciteta adsorpcije u in vitro uslovima, nije se pokazao značajno više efikasan u in vivo uslovima. Međutim, ipak posebna pažnja mora da se obrati na sadržaj teških metala, koji je u rovnom bentonitu značajno viši nego u koncentratu montmorilonita, pa je neophodno bilo prečišćavanje sirovine. Već je istaknuto da kvalitet mineralne sirovine može da varira od ležišta do ležišta, pa i u samom ležištu, tako da i sadržaj osnovnog minerala u sirovini može da bude značajno različit. Zato kod proizvoda za adsorpciju aflatoksina je potrebno da se stalno provera njihov kvalitet. U slučaju da sirovina nije zadovoljavajućeg kvaliteta (sadržaj montmorilonita, sadržaj teških metala) neophodno je njeni prečišćavanje. U sledećem poglavlju dajemo postupak za izdvajanje koncentrata montmorilonita, novog proizvoda za ublažavanje štetnih efekata mikotoksina, naročito aflatoksina B1.

2.5. Definisanje tehnološkog postupka proizvodnje visoko efikasnog adsorbenta mikotoksina

Na osnovu laboratorijskih ispitivanja, i na osnovu provere kvaliteta dobijenog proizvoda – koncentrata montmorilonita, u *in vitro* i *in vivo* uslovima, definisan je postupak za dobijanje ovog proizvoda kao novog aditiva stočnoj hrani. Na slici 7 je dat proizvodni tok dobijanja proizvoda AflaProtect¹.



Slika 7. Šema dobijanja proizvoda AflaProtect-a, visoko efikasnog adsorbenta mikotoksina.

¹ Prema prijavi žiga broj ž-2014-1671 podnetoj 6.11.2014. godine priznat je individualni žig AflaProtect. Žig je upisan u registar žigova 16.6.2015. godine, zaveden pod registracionim brojem 69287 i nalazi se u važnosti do 6.11.2024. godine.

Dobijanje proizvoda u laboratorijskim i poluindustrijskim uslovima je izvršeno metodama pripreme mineralnih sirovina. Karakterizacija rovne sirovine i koncentrata montmorilonita, obavljena je u Laboratorijama za fizičko hemijska ispitivanja, mineraloška ispitivanja, kao i hemijska ispitivanja u Institutu za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina (ITNMS). Metode koje obuhvataju ova ispitivanja su: metode pripreme i koncentracije ne metaličnih mineralnih sirovina, rendgenska analiza (XRPD), termijska analiza, infracrvena spektroskopska analiza, određivanje hemijskog sastava i sadržaja teških metala, određivanje kapaciteta katjonske izmene, određivanje teksturalnih osobina, određivanje pH suspenzije. Eksperimenti adsorpcije mikotoksina aflatoksina B1 u *in vitro* i *in vivo* uslovima na koncentratu montmorilonita su urađeni na *University of Missouri, Columbia, USA*, sa kojom ITNMS na ovoj problematiki sarađuje dugi niz godina.

Zaključak

- U ovom tehničkom rešenju definisan je tehnološki postupak proizvodnje novog materijala, na bazi prirodne nemetalične mineralne sirovine – bentonita, sa visokim sadržajem osnovnog minerala, montmorionita, namenjenom efikasnom uklanjanju mikotoksina, naročito aflatoksina B1, prisutnih u stočnoj hrani.
- Urađena detaljna karakterizacija polazne mineralne sirovine i krajnjeg proizvoda pokazala je da je primjenjeni tehnološki postupak dobijanja novog materijala dovoljno dobar da omogući prečišćavanje polazne mineralne sirovine i poboljšaju njegove karakteristike.
- Eksperimenti urađeni u *in vitro* uslovima su pokazali da je dobijeni proizvod Aflaprotect visoko efikasan adsorbent aflatoksina B1. Naime, prikazani rezultati su pokazali da je maksimalni adsorpcioni kapacitet dobijenog proizvoda 93,3 mg/g što je veći kapacitet u odnosu na kapacitet polaznog bentonita. Takođe urađeni eksperimenti poređenja efikasnosti proizvoda Aflaprotect i prirodnog zeolita koji se danas najčešće koristi u svrhu uklanjanja aflatoksina B1 iz stočne hrane su pokazali da je Aflaprotect znatno efikasniji u uklanjanju aflatoksina u odnosu na prirodnji zeolit.
- Pored ispitivanja u *in vitro* urađena su i ispitivanja u *in vivo* uslovima. Eksperimenti su urađeni u Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, Animal Science Department, University of Missouri, Columbia, Missouri, USA. Ispitivana je efikasnost koncentrata montmorilonita u ublažavanju toksičnih efekata aflatoksina B1 na ukupno 180 muških brojlera. Da bi uporedili rezultate, ogled je urađen i sa rovnim bentonitom. Ispitivanja su pokazala da koncentrat montmorilonita pored znatno višeg kapaciteta adsorpcije u *in vitro* uslovima, nije pokazao značajno višu efikasnost *in vivo* uslovima, odnosno potvrđena je činjenica, da efikasnost odgovarajućeg adsorbenta osim u *in vitro* uslovima, mora da se ispita i u *in vivo* uslovima, odnosno da ukoliko je adsorbent efikasan u *in vitro* uslovima ne znači da će biti efikasan u *in vivo* uslovima. Međutim, zbog značajno nižeg sadržaja teških metala kod finalnog proizvoda u odnosu na rovni bentonit za praktičnu primenu je od posebnog značaja neophodno je prečistiti polaznu mineralnu sirovinu.
- Na osnovu jednostavnog tehnološkog postupka prečišćavanja polazne mineralne sirovine i dobijanja proizvoda Aflaprotect koji je prikazan u ovom tehničkom rešenju kao i visoke efikasnosti uklanjanja aflatoksina B1 koja je potvrđena u *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima može se zaključiti da dobijeni proizvod Aflaprotect može naći praktičnu primenu u uklanjanju mikotoksina prisutnih u stočnoj hrani i biti adekvatna zamena proizvodima koji se danas u tu svrhu najčešće upotrebljavaju.

Literatura:

- [1] A. Daković, M. Tomašević-Čanović, V. Dondur, G.E. Rottinghaus, V. Medaković, S. Zarić, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 46, 2005, 20-25
- [2] Y. Deng, M. Szczerba, Applied Clay Science, 54, 2011, 26-33
- [3] S.D. Kocić-Tanackov, G. R. Dimić, Hemijska industrija 67, 2013, 639-653
- [4] L.D. Park, E.C. Ayala, S.E. Guzman-Perez, R. LopezGarcia, S. Trujillo,in: K.C. Winter (Ed.), Food Toxicology: Microbial Toxins in Foods: Algal, Fungal and Bacterial, CRC Pres, Boca Raton- London- Washington, 2000, pp. 15–20
- [5] A.C. Pappas, E. Tsiplakou, M. Georgiadou, C. Anagnostopoulos, A.N. Markoglou, K. Liapis, G. Zervas, Applied. Clay Science, 99, 2014, 48-53
- [6] S.L. Lemke, S.E. Ottinger, K. Mayura, C.L. Ake, K. Pimpkdee, N. Wang, T.D. Phillips, Animal feed Science and Technology, 93, 2001, 17-29
- [7] M. Miraglia, H.J.P. Marvin, G.A. Kleter, P. Battilani, C. Brera, E. Coni, F. Cubadda, L. Croci, B. De Santis, S. Dekkers, L. Filippi, R.W.A. Hutjes, M.Y. Noordam, M. Pisante, G. Piva, A. Prandini, L. Toti, G.J. van den Born, A. Vespermann, Food and Chemical Toxicology, 47, 2009, 1009-1021
- [8] J.B. Dixon, I. Kannewischer, M.G. Tenorio Arvide, A.L. Barrientos Velazquez, Applied Clay Science 40 (2008) 201–208;
- [9] R. D. Miles, P. R. Henry, Poultry Science Association, Inc. (2007), 412-419;
- [10] A. Marroquin-Cardona, Y. Deng, J.F. Taylor, C.T. Hallmark, N.M. Johnson, T.D. Phillips, Food Additives and Contaminants, 26 (2009), 733–743;
- [11] E. M. Binder, Animal Feed Science and Technology, 133 (2007) 149–166;
- [12] W. L. Bryden, Animal Feed Science and Technology, 173 (2012), 134-158;
- [13] Y. Deng, L. Liu, A. L. Barrientos Velazquez, J. B. Dixon, Clays and Clay Minerals, 60 (2012), 374–386.