Hranidbeni načini ublažavanja djelovanja aflatoksina kukuruza na mliječne krave

Dežić, Marijana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:617257

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

HRANIDBENI NAČINI UBLAŽAVANJA DJELOVANJA AFLATOKSINA KUKURUZA NA MLIJEČNE KRAVE

DIPLOMSKI RAD

Marijana Dežić

Zagreb, rujan, 2019.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Diplomski studij:

Hranidba životinja i hrana

HRANIDBENI NAČINI UBLAŽAVANJA DJELOVANJA AFLATOKSINA KUKURUZA NA MLIJEČNE KRAVE

DIPLOMSKI RAD

Marijana Dežić

Mentor:
Prof.dr.sc. Darko Grbeša

Zagreb, rujan, 2019.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Marijana Dežić**, JMBAG 0178102340, rođena 18.07.1995. u Tuzli, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

HRANIDBENI NAČINI UBLAŽAVANJA DJELOVANJA AFLATOKSINA KUKURUZA NA MLIJEČNE KRAVE

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

_____
Potpis studenta / studentice

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Marijana Dežić**, JMBAG 0178102340, naslova

HRANIDBENI NAČINI UBLAŽAVANJA DJELOVANJA AFLATOKSINA KUKURUZA NA MLIJEČNE KRAVE

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	Prof.dr.sc. Darko Grbeša	mentor	_____
2.	Prof.dr.sc. Krešimir Salajpal	član	_____
3.	Izv.prof.dr.sc. Antun Kostelić	član	_____

Zahvala

Ovime zahvaljujem svom mentoru prof.dr.sc. Darku Grbeši što je uvijek bio na raspolaganju tijekom pisanja mog diplomskog rada i što mi je pomogao uvijek kada je trebalo. Također, zahvaljujem mentoru što mi je kroz predavanja tijekom školovanja prenio svoje znanje.

Zahvaljujem se i mojoj široj obitelji koja me uvijek podržavala u mojim željama i ciljevima.

Najveću zahvalnost, za sve postignuto, pripisujem mojim roditeljima i sestri koji me podržavaju u sretnim, a još više u tužnim trenutcima. Bez vas, dragi moji, ništa ne bi bilo moguće, jer ste mi dali krila kako bih dostigla svoje ciljeve.

Posebna zahvalnost ide mom dečku Borisu koji je bio cijelo vrijeme uz mene i uvijek mi slao poruke podrške prije ispita te mu je najvažnije bilo da ja ostvarim svoje snove.
Ljubavi uspjeli smo!

Veliko hvala i njegovoj obitelji koja mi je pružila podršku u trenutcima dok sam bila daleko od svoje obitelji i doma.

Još jednom, veliko HVALA svima!

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Cilj rada 2

2. Aflatoksini kukuruza 3

2.1. Opće značajke aflatoksina 3

2.2. Vrste *Aspergillus* plijesni i aflatoksina 4

2.2.1. Načini djelovanja na mliječne krave 4

2.2.2. Pogodni uvjeti za razvoj *Aspergillus* plijesni 5

2.2.3. Ublažavanje pojave aflatoksina na polju, skladištu i smjesi 6

2.2.4. Prevencija pojave toksičnih djelovanja aflatoksina 7

2.3. Svojstva aflatoksina 8

2.3.1. Aflatoksin B_1 8

2.3.2. Aflatoksin M_1 9

2.4. Zakonska regulativa 9

3. Kukuruz u hranidbi mliječnih krava 11

3.1. Zrno kukuruza u hranidbi mliječnih krava 11

3.2. Silaža kukuruza u hranidbi mliječnih krava 12

4. Hranidbeni načini ublažavanja djelovanja aflatoksina 14

4.1. Anogranski vezači 14

4.1.1. Gline 14

4.1.2. Aluminosilikat 16

4.1.3. Bentoniti 16

4.1.4. Zeoliti 17

4.1.5. Hidriratizirani natrij, kalcij-aluminosilikati 17

4.1.6. Daijtomejska (kremena) zemlja 17

4.2. Organski vezači 18
4.2.1. Polimeri glukomanana stanične stijenke kvasca 18
4.2.2. Aktivni ugljen 19
4.2.3. Polivinilpolipirolidin 19
4.2.4. Klorofilin 19
4.2.5. Mikronizirana neprobavljiva vlakna 19
4.2.6. Kolestiramin 20
4.3. Organske kiseline 20
4.3.1. Sorbinska kiselina 20
4.3.2. Propionska kiselina 21
4.3.3. Benzenska kiselina 22
4.3.4. Limunska kiselina 22
4.3.5. Humične kiseline 23
4.4. Biološke metode 23
4.4.1. Enzimatska razgradnja aflatoksina 23
4.4.2. Antifungalni antibiotik Natamicin 25
4.4.3. Biljke i/ili začinsko bilje 25
4.4.4. Eterična ulja 26
4.4.5. Metilksantini 26
4.5. Ostali načini 26
5. Zaključak 28
6. Literatura 29
Životopis 39

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Marijana Dežić**, naslova

HRANIDBENI NAČINI UBLAŽAVANJA DJELOVANJA AFLATOKSINA KUKURUZA NA MLIJEČNE KRAVE

Aflatoksini su jedna od najvećih prijetnji u proizvodnji hrane za životinje zbog sve veće rasprostranjenosti i nemogućnosti potpunog uklanjanja već samo ublažavanja njihove pojave u kukuruzu i negativnog djelovanja na mliječne krave. U ovom revijalnom radu prikazana su svojstva toksikogenih *Aspergillus* plijesni koje proizvode aflatoksine na kukuruzu, uvjeti koji pogoduju razvoju toksinogenih plijesni, svojstva plijesni, metode ublažavanja s naglaskom na hranidbena uklanjanja aflatoksina.U literaturnom pregledu prikazani su znastveni rezultati djelovanja organskih vezača (glina), anorganskih vezača (aktivni ugljen), organskih kiselina (propionska) te biološki načini (enzimatska razgradnja aflatoksina).
Ublažavanje pojave i djelovanja aflatoksina na mliječne krave upotrebom aditiva daje promjenljive rezulate te su potrebna daljnja istaživanja kako bi se utvrdilo točno djelovanje.

Ključne riječi: aflatoksini, kukuruz, načini ublažavanja, mliječne krave

Summary

Of the master's thesis – student **Marijana Dežić,** entitled

THE FEED WAYS TO DECREASE EFFECTS OF CORN AFLATOXINS IN DAIRY COWS

Aflatoxins are one of the biggest threats in the feed production because of the increasing prevalence and the impossibility of completely removing but only reducing their occurrence in corn and negative effect on dairy cows. In this review toxigenic properties of *Aspergillus* molds that produce aflatoxins in corn are shown, conditions that officiate development of toxinogenic mold, molds properties, methods of reducing with emphasis on nutritional removal aflatoxins. The literature review presents the scientific results of the action of organic binders (clay), inorganic binders (activated carbon), organic acids (propionic) and biological methods (enzymatic degradation of aflatoxin).
Mitigating the occurrence and effect of aflatoxins on dairy cows by using additives shows variable results and will need further research to determine the exact effect.

Keywords: aflatoxins, corn, mitigating ways, dairy cows

1. Uvod

Hranidba može činiti od 50 do 70% od ukupnih troškova na farmama i zbog toga je jedna od najvažnijih grana u stočarstu i kao takva predstavlja temelj svakog stočarstva. Cilj hranidbe je osigurati dovoljan unos hranjivih tvari na dnevnoj razini kako bi se zadovoljile potrebe životinja (uzdržne i/ili proizvodne). Skoro svako krmivo pored hranjivih sadrži i nepoželjne tvari koje narušavaju proizvodnju i mogu sadržavati štetne tvari koje narušavaju ne samo proizvodnju već i zdravlje domaćih životinja. Među štetnim tvarima na najzastupljenijim krmivima u obroku, energetskim i proteinskim, javljaju se sekundarni proizvodi gljiva - mikotoksini i to sve češće zbog klimatskih promjena. Danas je poznato preko 500 mikotoksina i sa njima je zaraženo 25% svjetske proizvodnje žitarica, a među njima su najtoksičniji aflatoksini.

Aflatoksini su sekundarni metaboliti *Aspergillus* plijesni i nekih drugih vrsta gljivica, ali i jedni od glavnih uzročnika pojave negativnih učinaka ili bolesti kod životinja i ljudi. Razlog tome leži u njihovoj širokoj rasprostranjenosti i zastupljenosti skoro na svim kontinentima svijeta. Poznato je da aflatoksini imaju niz negativnih djelovanja poput kancerogenosti, mutagenosti, teratogenosti, narušavanje imuniteta i sl. Veliki problem predstavlja i njihova velika otpornost, ali i mogućnost pojave u bilo kojem segmentu lanca „od polja do krmnog stola“.

U našem klimatskom podneblju aflatoksini se, među žitaricama, najčešće javljaju u proizvodnji kukuruza posebno za vrijeme visokih temperatura i sušnih razdoblja tijekom polinacije kukuruza. Naime, kako je kukuruz najvažnija žitarica u hranidbi mliječnih krava, bitno je preventivno djelovati na razvoj plijesni u polju i skladištu te smanjiti učinke aflatoksina preko njihovog razaranja ili odstranjivanja iz probavnog sustava mliječnih krava. Kukuruzna krma može se naći u obliku silaže cijele biljke ili siliranog klipa ili zrna, te u obliku suhog zrna na krmnom stolu mliječnih krava. Najveću opasnost predstavlja aflatoksin B_1 (AFB_1), zbog toga što posjeduje izrazito kancerogena svojstva te vrlo štetno djeluje na jetru.

Budući da su plijesni široko rasprostranjene, kontaminacija krmiva njihovim toksinima ne može se potpuno izbjeći, a ne postoji učinkovit način za potpunu eliminaciju aflatoksina B_1 iz kukuruzne krme i metabolizma krave, zbog čega se on u obliku aflatoksina M_1 (AFM_1) izlučuje u mlijeko (Peraica i sur., 2014). Izlučeni AFM_1 predstavlja veliki problem u proizvodnji mlijeka i mliječnih proizvoda, jer te proizvode konzumiraju ljudi.

Među metodama ublažavanja pojave aflatoksina u mlijeku su i hranidbene metode koje na jeftin i učinkovit način odstranjivaju aflatoksin B1 iz probavnog sustava mliječnih krava. Nekoliko je hranidbenih metoda, jedna grupa je dodavanje određenih enzima, kompetitivnih istovrsnih sojeva plijesni koji smanjuju koncentraciju aflatoksina u obroku, a druga grupa su vezači (adsobensi), kao što su određene gline, kojima se odstranjuju aflatoksini putem fecesa te se smanjuje njegov ulazak u metabolizam krave i izlučivanje u mlijeku.

1.1. Cilj rada

Cilj rada bio je na osnovu pregleda dosadašnjih literatura utvrditi koji su hranidbeni načini i koji su njihovi učinci u ublažavanju negativnog djelovanje aflatoksina kukuruznih krmiva na mliječne krave, odnosno njihovu proizvodnju, zdravlje i reprodukciju te svesti koncentraciju u mlijeku u zakonom dopuštene koncentracije.

2. Aflatoksini kukuruza

Zdravstvena ispravnost hrane za ljude i životinje (krme) je preduvjet njihovog korištenja u Europskoj uniji (EU). Među javnozdravstvenim opasnostima značajno mjesto zauzimaju mikotoksini koji su sekundarni proizvodi metabolizma nekoliko vrsta plijesni. Istraživanja su pokazala da se mikotoksini javljaju u prehrambenim proizvodima pod djelovanjem određenih uvjeta, te je procijenjeno da više od 50% proizvoda može biti kontaminirano mikotoksinima (Turner i sur., 2009). Među njima najistaknutiji su aflatoksini zbog globalne rasprostranjenosti, ali i pojave u bilo kojem dijelu proizvodnje, prerade, transporta, skladištenja te konzumacije proizvoda. Proizvodi koji su najčešće kontaminirani sa aflatoksinima su određene žitarice i njihovi nusproizvodi, uljarice i nusproizvodi te kikiriki, sjeme pamuka i sl.

2.1. Opće značajke aflatoksina

Riječ „Aflatoksin“ se sastoji od triju riječi: „A“ – rod *Aspergillus*, „fla“ – flavus i „toksin“ – otrov. Aflatoksini stvaraju velike gubitke u proizvodnji i skladištenju kukuruza jer se kontaminiranim kukuruzom u koncentracijama iznad dopuštenih ne smiju hraniti životinje. Krmivima, pa tako i kukuruzom, koji sadrže manje od dopuštenih koncentracija aflatoksina smiju se hraniti životinje, ali i uz dodavanje tvari koje u konačnici onemogućuju ili smanjuju na zakonski prihvatljivu koncentraciju aflatoksina u mlijeku krava. Brojni su problemi u ublažavanju pojave aflatoksina u krmi i izbacivanju iz probavnog sustava mliječne krave. Primjera radi, jedna od teškoća u otklanjanju aflatoksina je njegova točkasta i neravnomjerna raspodjela u zrnju kukuruza (Slika 2.1.1.) koja otežava njegovo otkrivanje u kukuruzu pa se u praksi često događa da „nema“ aflatoksina u kukuruzu, ali ga ima u mlijeku. Naime, u mlijeku se aflatoksin ravnomjerno izlučuje pa ga je lako otkriti.



Slika 2.1.1. *Aspergillus* plijesni na klipovima kukuruza
Izvor: Gary Munkvold, Iowa State University Plant Pathology

2.2. Vrste *Aspergillus* plijesni i aflatoksina

Aspergillus spp. su kserofitne plijesni koje broje oko 250 priznatih vrsta četiri su glavne koje imaju veliku proizvodnju toksina. Aflatoksine najčešće i u najvećoj mjeri proizvode toksikogeni sojevi *Aspergillus flavus* te sojevi *Aspergillus parasiticus* koji su poznati po tome što proizvode najtoksičniju vrstu aflatoksina. *Aspergillus flavus* ima izrazito kancerogena svojstva, dok *Aspergillus parasiticus* spada u najtoksičniju vrstu aflatoksina. Rjeđe se spominju još i *Aspergillus nomius* i *Aspergillus bombycis*. *A. flavus* je vrsta koju karakteriziraju brzo rastuće žuto-zelene kolonije. Kako navode Abbas i sur. (2005), vrste poput *A. flavus* i *A. parasiticus* mogu se pronaći u tlu skoro u cijelome svijetu.

Aflatoksini se dijele u dvije skupine „B“ i „G“, koje predstavljaju obojenje aflatoksina pod ultraljubičastim svjetlom. Brojevi označavaju njihovu relativnu migracijsku udaljenost na tankoslojnoj kromatografskoj ploči. Ukoliko alfatoksini daju plavo obojenje („Blue“) tada spadaju u skupine B_1 i B_2. Nadalje, ako daju zeleno („Green“) obojenje spadaju u skupine G_1, dok zeleno-plavo obojenje spada u G_2 skupinu. Zatim, aflatoksin M_1 daje plavo-ljubičasto obojenje. Uz ove aflatoksine postoje i mnogi drugi, no, nisu toliko uobičajeni.

2.2.1. Načini djelovanja na mliječne krave

Metabolizam aflatoksina kod preživača zbiva se u jetri i izlučuje se putem žuči. Poznato je da aflatoksin B_1 povećava ukupne potrebe za proteinima kod goveda. Nakon što životinja konzumira hranu koja je kontaminirana aflatoksinom B_1 u jetri dođe do njegove biološke razgradnje u aflatoksin M_1 (Hussein i Brasel, 2001.). Aflatoksin M_1 se izlučuje kroz mliječnu žlijezdu te se nalazi u mlijeku, ali i mliječnim proizvodima. Također, zbog izlučivanja kroz mliječnu žlijezdu opasan je i za sisajuću mladunčad.

U istraživanima je utvrđeno da aflatoksini imaju negativan učinak i na bubrege te mogu djelovati na pojavu bolesti bubrega. Međutim, najopasniju prijetnju predstavlja kancerogenost aflatoksina i to posebno aflatoksina B_1, jer je to najpotencijalnija kancerogena tvar u prirodi. Spol i dob životinja igraju bitnu ulogu kod osjetljivosti na aflatoksin B_1, jer su mužjaci više osjetljiviji kao i mlađe dobne kategorije.

Gubitak apetita, smanjena konverzija i pad prirasta su glavni simptomi kroničnog trovanja aflatoksinima. Pri kroničnom izlaganju aflatoksinima dolazi i do smanjene proizvodnje i reprodukcijske učinkovitosti, loše razgradnje hrane te apsorbcije, anemije i žutice. Anemija je popraćena modricama na koži koje nastaju kao rezultat potkožnih krvarenja. U popratne znakove trovanja spadaju: gubitak sluha, gubitak težine, gruba dlaka te blagi proljev. Uslijed negativnog utjecaja na reprodukcijski sustav najčešće dolazi do abnormalnog trajanja ciklusa i tu se radi o izrazito kratkom ili dugom trajanju ciklusa. Od ostalih simptoma javljaja se slabljenje imunosustava, loše opće zdravstveno stanje jedinke, anoreksija, teturanje, drhtavica, probavne smetnje, a u nerijetkim situacijama može doći do

prolapsa rektuma. Treba napomenuti da uz brojne negativne zdravstvene učinke, aflatoksini mogu doveti i do pobačaja te smrti.

Kancerogenost se očituje i kada se kroz dulje vrijeme konzumiraju manje količine hrane koja je kontaminirana sa aflatoksinima. Samim time tu su još i rezultati iz prijašnjih istraživanja koja dokazuju da toksično djelovanje uzrokuje dugogodišnje probleme s jetrom, nekrozu te karcinom jetre (hepatocelularni karcinom) i u nekim dijelovima svijeta sinergistički djeluje s hepatitisom B (Van Egmond, 1989). Postoje i istraživanja koja opisuju proces vezivanja aflatoksina s DNA što se smatra početnim korakom u stvaranju karcinoma jetre. Aflatoksini se mogu skladištiti i u mišićnom tkivu životinja.

2.2.2. Pogodni uvjeti za razvoj *Aspergillus* plijesni

Neke plijesni mogu proizvesti aflatoksine još na samom polju za vrijeme nepovoljnih uvjeta, ali i za vrijeme skladištenja uslijed povišene temperature i vlage koje povoljno djeluju na njihov rast i razvoj (Schuster i sur., 1993). Povećanje kontaminacije hrane mikotoksinima u posljednje vrijeme, ali i ono u skoroj budućnosti znatno se pripisuje globalom zatopljenju, odnosno povećanju temperatura za 2-4^{0}C (Garrett i sur., 2006) u razdoblju vegetacije biljaka, sve učestalijoj izmjeni vremenskih ekstrema, to jest sušnih i vrućih razdoblja sa izrazito kišnim razdobljima, pa i poplavama. Bebber i sur. (2013) su izvijestili da se biljni patogeni organizmi i ostale štetočine kreću prema polovina brzinom od 2,7km/ godišnje, što je usko povezano s klimatskim promjenama. Naime, životni ciklus svih mikroorganizama, uključujući i mikotoksigene plijesni, ovise o dva glavna čimbenika: dostupnost vode i temperatura. Glavni čimbenici uz još neke od sporednih (vlaga, klima, kukci i ostale štetočine, fungicidi) utječu na sporulaciju, klijanje spora, rast i razvoj plijesni i proizvodnju toksina. Kao što je već ranije spomenuto, globalno zatopljenje i suša uzrokuju sve češću zarazu kukuruza kserofitima koji rastu i u uvjetima pomanjkanja vlage i visokih temperatura, a među njih se ubrajaju *Aspergillus flavus* i *parasiticus* plijesni. Ove plijesni u razdoblju suše i sa njom povezanih visokih temperatura u vrijeme cvatnje i nalijevanja zrna proizvode aflatoksin B1 (Schmidt-Heydt i sur., 2008 i 2009). Kserofitne gljivice su one koje bujaju u predjelima s višim temperaturama i manjim oborinama. Kukuruz, kikiriki i pistacije su posebno podložni kontaminaciji plijesnima u razdoblju visokih vrućina i suše, jer ti uvjeti dovode do pucanja ili cijepanja zaštitnog omotača. Visoka koncentracija mikotoksina u žitaricama ovisi i o broju kišnih dana i dana kada je vlažnost zraka iznad 75%, ali postoji i mogućnost snižavanja koncentracije mikotoksina kada su temperature niže od 12˚C ili više od 32˚C (Schaafsma i sur., 2007). Optimalni raspon vanjskih temperatura za rast *A. flavus* se kreće između 19 i 35˚C, dok je optimalna temperatura za proizvodnju aflatoksina 28-30^{0}C. *Aspergillus* plijesni rastu na niskoj vlazi čak kada je aktivitet vode (a_w) manji od 0.73, a pogodan a_w za proizvodnju aflatoksina je od 0.83 (Sanchis i Magan, 2004). Dodatno, porast koncetracije ugljik dioksida u zraku pogoduje rastu *Aspergillus* plijesni.

Minimalni udio relativne vlage za razvoj aflatoksina u hrani je oko 5%, a temperatura se kreće između 25 i 30˚C. Žitarice s povišenim udjelom škroba, kao što su kukuruz, riža, ječam i sirak, imaju nešto višu vlagu (18 do 18,5%) od dozvoljene te su podložni kontaminiranju aflatoksinima. Međutim, do kontaminacije *A.flavus* plijesnima dolazi i zbog nepravilnog posliježetvenog postupanja sa zrnjem, odnosno nedovoljnim procesom skidanja vlage sušenjem. Smatra se kako je 13% vlažnosti zrna kukuruza optimalno za dugotrajnije skladištenje u silosima. Česta pogreška je spremanje kukuruza sa 15% vlage, u svrhu postizanja uštede zanemaruje se dosušivanje na 13% vlage. Spremanje kukuruza sa 15% vlage povećava opasnost od pojave tzv. džepova u uskladištenoj masi u kojima se razvijaju plijesni odnosno proizvode mikotoksini. Utjecaj vlage na rast i razvoj plijesni je manji od utjecaja temperature. Kukuruzu, kao jaroj žitarici, vegetativni rast traje kroz najsušnije doba u godini što dodatno pogoduje razvoju aflatoksina. Stres suše na biljke djeluje kroz smanjenje prirodne obrane od infekcija, smanjuje se aktivnost vode tla što posljedično smanjuje rast i aktivnost bakterija, ameba i kompetitivnih gljiva dok djeluje poticajno na rast kserofilnih plijesni poput *Aspergillus flavus i A. parasiticus* (Pitt i Hocking, 2009). Također, stres uzrokovan sušom povećava proizvodnju prolina u biljkama (Barnett i Naylor, 1966), a prolin djeluje na povećanu proizvodnju aflatoksina (Payne i Hagler, 1983.).

Aflatoksini se nalaze i na žetvenim ostacima pa se u monokulturi kukuruza prenose sa jedne generacije na druge. Rast gljivica i proizvodnja toksina u prirodnim supstratima ovise o mnogim čimbenicima poput: vrste gljivica, vrste supstrata, sadržaju vlage, temperaturi, sadržaju minerala i dr. (Molina i Giannuzzi, 2002; Ribeiro i sur., 2006; Schmidt-Heydt i Geisen, 2007).

Zbog klimatskih promjena očekuje se povećanje biomase usjeva, odnosno, biljaka domaćina na kojima će se dodatno povećati inokulacija plijesni. Pokazalo se i da ekstremni sušni periodi, dezertifikacija te varijacije suhih i mokrih razdoblja znatno utječu na rast mikotoksigenih gljivica. Utvrđeno je i da razvoj novih sojeva mikotoksina koji formiraju neočekivane toksine mogu biti pod utjecajem promjena u okolišu.

Povećanim brojem kukaca na usjevima povećava se i broj ptica koje se njima hrane te bi se time još više oštetilii usjevi. Tijekom istraživanja utvrđeno je da će povišena temperatura i suša smanjiti dostupnost vode, a samim time i produktivnost usjeva na jugu Europe. Prema IPCC-u (2014) u sjevernoj Europi se očekuje porast količine dnevnih padalina.

2.2.3. Ublažavanje pojave aflatoksina na polju, skladištu i smjesi

Agrotehničke mjere u polju kao što su plodosmjena, navodnjavanje, gnojidba, suzbijanje korova, odabir primjerenog hibrida i druge smanjuju zaraženost kukuruza toksinogenim sojevima *Aspergillus* plijesni (Grbeša i sur., 2014). Druge plijesni koje proizvode aflatoksine kao što su *Aspergillus nomius*, *Aspergillus bombycis, Aspergillus niger* i drugi javljaju se rjeđe u kukuruzu.

Kao što je prikazano u Tablici 2.2.3.1. postoji nekoliko metoda za ublažavanje rasta aflatoksina i razvoja njihovih plijesni, a metode se mogu podijeliti na fizikalne, kemijske i biološke .

Tablica 2.2.3.1. Metode za uklanjanje aflatoksina iz hrane

FIZIKALNE METODE	KEMIJSKE METODE	BIOLOŠKE METODE
Čišćenje	Djelovanje kemijskih spojeva	Korištenje bakterija
Toplinska obrada	Ozonizacija	Korištenje kvasaca
Zračenje		Netoksični *Aspergillus* sojevi
Adsorpcija		

Izvor: M. Jalili (2015)

Koncetracija aflatoksina je nekoliko desetaka puta veća u prašini i ostatcima biljke kukuruza pa čišćenja propuhivanjem ukljanjaju prašinu, ljuskice i proizvode na kojima su se razvile plijesni i aflatoksini. Isto tako izlomljena te oštećena i štura zrna sadrže više toksina od cjelovitih zrna pa centrfugiranje ili druga vrsta sortiranja na temelju gustoće zrna smanjuje koncentraciju aflatoksina u uskladištenom kukuruzu. Druge metode odstranjivanja su skupe za primjenu na kukuruzu i koriste se u odstranjivanju toksina iz hrane za ljude. Tako se za odstranjivanje aflatoksina iz orašca koristi ispiranje i ljuštenje vanjskog omotača zrnja. Neki mikotoksini, ali ne i aflatoksin, se mogu djelomično inaktivirati toplinskom obradom u koju spadaju kuhanje, prženje, tostiranje i parenje. Danas se za odstranjivanje brojnih mikotoksina i osobito aflatoksina najčešće koriste adsorbensi koji na sebe vežu aflatoksine u probavnom sustavu krava i izbacju ih balegom. Kemijske metode su vrlo učinkovite, ali njihov nedostatak je izazivanje reakcija pri kojima se mogu osloboditi još toksičniji spojevi ili se upotrebljeni kemijski spojevi mogu naći kao rezidue u hrani. Sve se više okreće biološkim metodama i njihovim upotrebama u prevenciji od rasta plijesni i proizvodnje aflatoksina.

2.2.4. Prevencija pojave toksičnih djelovanja aflatoksina

Kako navode Grbeša i sur. (2014) mikroorganizmi buraga mogu razoriti 98-99% aflatoksina unesenih hranom. Problem se javlja ukoliko dođe do acidoze, kao jednog od metaboličkih poremećaja kod mliječnih krava, pri čemu dolazi do pada pH buraga ispod 5.8 te taj proces povisuje apsorpciju aflatoksina sa 1.7% na 6-10%. Naime, kako velike količine aflatoksina negativno djeluju na sintezu proteina, ali i na djelovanje vitamina preporučuje se dodavati veće količine proteina i vitamina u hranu za životinje. Najčešće dodavani vitamini u smjesama su vitamin A i vitamin E. Dok je kod proteina bitan udio metabolizirajućeg proteina te on treba biti veći od 12% u suhoj tvari, a pri tome treba još voditi računa o udjelu limitirajućih aminokiselina kao što su metionin i lizin (Grbeša i sur., 2014). Dobra praksa

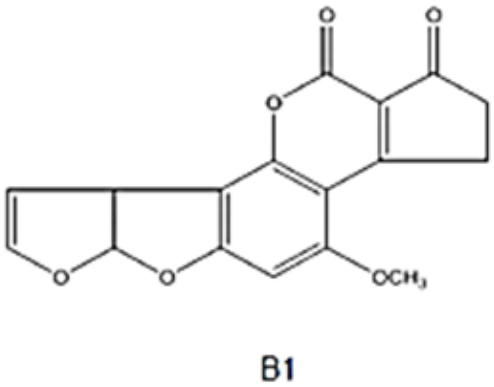
menadžmenta farme temelji se na izbjegavanju stresa kod životinja, jer je to čimbenik koji utječe na pojavu sekundarnih infekcija koje djejuju na pojavu i razvoj aflatoksikoza.

2.3. Svojstva aflatoksina

Molekulske formule aflatoksina se sastoje od atoma ugljika, vodika i kisika. Iako su sličnih molekulskih formula ipak se razlikuju po broju određenih atoma u spoju. Na osnovu kemijske strukture karakteristična je osjetljivost laktonskog prstena u alkalnoj hidrolizi. Aflatoksini su razgradljivi u reakcijama s amonijakom ili natrij hipokloritom. Bitno je napomenuti kako su aflatoksini slabo topljivi u vodi, a netopljivi su u nepolarnim otapalima. Umjereno topljivi su u polarnim organskim otapalima kao što su kloroform i metanol dok su potpuno topljivi u dimetilsulfoksidu. Aflatoksini su nestabilni spojevi pod ultraljubičastim svjetlom, u prisutnosti kisika ili sredstava za oksidaciju. Također, nestabilni su ukoliko se nalaze u pH sredini koja je niža od 3 ili viša od 10.

2.3.1. Aflatoksin B_1

Aflatoksin B_1 klasificiran je u grupu 1 kao jedna od najkancerogenijih tvari od strane Međunarodne agencije za istraživanje karcinoma (IARC). Skup bolesti koje uzrokuju aflatoksini nazivaju se aflatoksikoze te se javljaju i kod životinja i kod ljudi. Toksični učinci AFB_1 mogu se razlikovati u razini izloženosti te samom trajanju izloženosti (Diaz i Murcia, 2011). Shim i suradnici (2007) navode kako je AFB_1 jedno od najvažnijih pitanja koji se postavljaju u sigurnosti hrane u svijetu. Prema kemijskoj strukturi (Slika 2.3.1.1.) karakteristična je osjetljivost laktonskog prstena u alkalnoj hidrolizi te su razgradljivi u reakcijama s amonijakom ili natrij hipokloritom.



B1

Slika 2.3.1.1. Kemijska struktura aflatoksina B_1

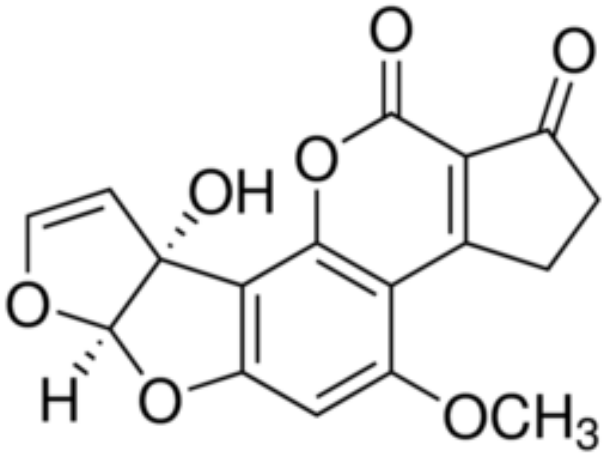
Izvor: prilagođeno iz Feddern i sur. (2013)

2.3.2. Aflatoksin M_1

Kao što je prethodno spomenuto, nakon što mliječne krave konzumiraju obrok koji je kontaminiran sa AFB_1 u jetri dođe do njegove biološke razgradnje u aflatoksin skupine M_1 (AFM_1). AFM_1 je četiri-hidroksi derivat (Slika 2.3.2.1.) AFB_1 te se izlučuje kroz mliječnu žlijezdu. Javlja se i kod ljudi zbog toga što se nalazi i u proizvodima poput mlijeka, mlijeka u prahu, jogurta, sireva i sl. Predstavlja veliku opasnost za zdravlje ljudi posebno, jer mliječne proizvode uglavnom konzumiraju djeca i starije osobe koji se smatraju osjetljivijima na negativne utjecaje AFM_1 (Sadia i sur., 2012).

Aflatoksine ne razaraju ni visoke temperature (< 160^0C) pa toplinska obrada kako krme (tostiranje, ekspandiranje, peletiranje itd.) tako i mlijeka i mliječnih proizvoda (pasterizacija) ne smanjuju njegovu koncentraciju u mlijeku (Raters i Matissek, 2009).

Količine AFM_1 mogu se razlikovati od životinje do životinje, od dana do dana kao i od jedne mužnje do druge (Martins i Martins, 2000).



Slika 2.3.2.1. Kemijska struktura aflatoksina M_1

Izvor:
https://www.google.com/search?q=aflatoxin+m1&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj9ioW4tKPkAhVvoosKHW8nC-MQ_AUIESgB&biw=1517&bih=675#imgrc=qFNagxMwNc7VLM:, pristupljeno: 27.08.2019.

2.4. Zakonska regulativa

Više od tristo mikotoksina je identificirano, ali oko njih dvadeset može biti prirodno prisutno u hrani. Veliki problem s mikotoksinima je njihovama nehomogena raspodjela u proizvodima i hrani. Zbog toga je Europska komisija uspostavila metode uzorkovanja za službenu kontrolu razine mikotoksina u hrani (No 519/2014, No 401/2006). Tijekom 2008.god. došlo je do povećanja razine aflatoksna za oko 28% te općenito mikotoksina za oko 23%. Kako bi se zaštitilo zdravlje ljudi i životinja više od 100 nacija utvrdilo je maksimalne

dozvoljene vrijednosti aflatoksina u prehrambenim proizvodima (Wu i Guchu, 2012). Poznato je da u prirodi postoji preko 400 vrsta mikotoksina, a jedino su za njih pet zakonom određene najviše dopuštene količine u hrani za ljude i životinje (NN 118/07 i 80/2010). Rizik od pojave aflatoksikoza kod ljudi posebno je visok u zemljama gdje ne postoje propisi za maksimalne dopuštene razine aflatoksina i gdje se ne provode kontrole na poljoprivrednim usjevima (Shephard, 2003).

Zbog toga je Europska unija (EU) zakonskim propisima odredila gornju dozvoljenu granicu AFB_1 i AFM_1 u hrani. Time bi se sprječili štetni utjecaji i posljedično veliki gospodarski problemi, stalna kontrola u hrani i hrani za životinje te sprječavanje kontaminacije toksinima od velikog su značaja širom svijeta (Peraica i sur., 2014; Pleadin i sur., 2014).

Europski parlament (2003) je zakonski odredio maksimalno dozvoljene razine aflatoksina u hrani za životinje zbog izrazite hepatotoksičnosti aflatoksina. Maksimalno dopuštena gornja granična vrijednost aflaktoksina u krmivima, dopunskim i kompletnim krmnim smjesama za junad, ovce, koze, perad i svinje iznosi 20 ppb-a, odnosno 0.02 mg/kg, u kompletnim smjesama za mliječne krave 5 ppb-a, odnosno 0.005 mg/kg i u smjesama za telad i janjad do 10 ppb-a, odnosno 0.01 mg/kg (Europska komisija, 2003). Najviša dopuštena koncentracija aflatoksina M1 u mlijeku i mliječnim proizvodima je relativno niska u EU (20 ppt) za razliku od drugih zemalja gdje može biti i do deset puta veća.

3. Kukuruz u hranidbi mliječnih krava

Kukuruz spada u žitarice te se uzgaja na najvećim površinama u svijetu, odnosno na preko 197 milijuna ha te se proizvodi u količinama od preko 1 milijarde i 134 milijuna tona (FAOSTAT, 2017). Iste godine u Europi na nešto više od 17 i pol milijuna ha proizvelo se oko 110 milijuna tona kukuruza (FAOSTAT, 2017). Republika Hrvatska proizvodi oko 2 milijuna tona godišnje te zauzima 10. mjesto na listi 28 zemalja članica EU po ukupnoj godišnjoj proizvodnji kukuruza (Grbeša, 2016). Smatra se da od ukupne svjetske proizvodnje kukuruza oko 67% se koristi u animalnoj proizvodnji, odnosno kao hrana za životinje čime se podmiruje oko 33% energetskih i 13% proteinskih potreba sveukupne animalne proizvodnje (Grbeša, 2016).

Povećana otpornost na fizička oštećenja hibrida sa većim udjelom caklavog endosperma pozitivno se očituje u smanjenju loma zrna tijekom njegove manipulacije čime se smanjuje opasnost od razvoja plijesni (Bútron i sur., 2009). Valja napomenuti kako su oštećena zrna u procesu manipulacije nakon žetve, odnosno ona oštećena djelovanjem insekata na polju ili u skladištu (Pitt, 2004: Teller i sur., 2012), kao i štura zrna, najpogodniji supstrat za razvoj plijesni i posljedično proizvodnju mikotoksina tijekom skladištenja. Selekcijom kukuruza na povećani udio caklavog endosperma i deblji perikarp, povećava se otpornost na zarazu mikotoksinima (Hoenisch i Davis, 1994), dok su McMillian i sur. (1987) uočili pozitivnu korelaciju između varijeteta kukuruza sa zatvorenom komušinom i povećane otpornosti na kontaminaciju aflatoksinom u dvije od tri godine istraživanja.

3.1. Zrno kukuruza u hranidbi mliječnih krava

Zrno kukuruza energijom je najbogatija žitarica koja se uzgaja u Europi. Odlikuju ga najbolja konzumacija, zatim najviši sadržaj energije u formi škroba i ulja, linolne kiseline, karotenoida i fenola među žitaricama. Endosperm u građi zrna kukuruza zauzima oko 83%, a sastoji se prvenstveno od škroba (86-89%) (Grbeša, 2016). Škrob kukuruza najvažniji je (50-75%) sastojak hrane i glavni izvor energije visoko proizvodnih krava u Hrvatskoj. Škrob je bitan i kao glavni i najbogatiji izvor energije za mikrobe buraga, jer mliječne krave energiju dobivaju iz hlapljivih masnih kiselina (HMK) stvorenih fermentacijom škroba u predželucima. Škrob u hrani visoko mliječnih krava nalaz se u udjelu od 25-30% i najzastupljeniji je sastojak obroka. Optimalna koncentracija fermentirajućeg škroba je između najviših 22% i najmanjih 16% u visoko mliječnih krava (Grbeša, 2016).

Kukuruz u odnosu na potrebe životinja sadržava malo proteina (8-9%) lošega aminokiselinskog sastava, jer se sastoji od više nebitnih (54%) nego bitnih (46%) aminokiselina (Grbeša, 2016). Najveći dio (70%) proteina kukuruza čini zein koji je siromašan bitnim aminokiselinama, osobito lizinom i triptofanom.

Kukuruz sadrži dosta ulja (3,6%) za razliku od ostalih žitarica poput pšenice, ječma i tritikale. U zrnu kukuruza najviše je ulja smješteno u klici (82,6%), pa endospermu (15,4%) i

najmanje u omotaču (2%) (Grbeša, 2016). Pored toga zrnje kukuruza sadrži u prosjeku oko 1,5% šećera.

Zrno kukuruza je karakteristično po tome što sadržava najmanje vlakana među žitaricama te je to jedan od razloga njegove visoke probavljivosti, konzumacije i energetske vrijednosti. Kada se gledaju frakcije vlakana, zrno sadržava najviše (9,07%) NDF koji se sastoji od 6,2% hemiceluloze i 2,78% ADF (celuloza + lignin). Vlakna kukuruznog zrna sadržavaju dvostruko više hemiceluloze (%NDF - %ADF) od celuloze (%ADF - %ADL) (Grbeša, 2016). Sadržaj lignina u zrnu je vrlo mali (0,34%), a njime je najbogatiji vrh kukuruza.

Prosječna neto energetska vrijednost (NEL) standardnog zrna kukuruza (12% vlage) za proizvodnju mlijeka je 7.52 MJ/kg što znači da se po sadržaju neto energije iz jednog kilograma kukuruza može proizvesti 2.32 kg mlijeka kada krave dobiju sve ostale hranjive tvari u potrebnoj količini (Grbeša, 2016)

Glavni nedostaci kukuruza su nizak sadržaj proteina, esencijalnih aminokiselina lizina i triptofana, minerala te sklonost infestacijama mikotoksigenim plijesnima. Pljesniva i insektima oštećena zrna imaju smanjen udio energije kao i ostalih hranjivih tvari.

3.2. Silaža kukuruza u hranidbi mliječnih krava

Voluminozna krmiva su glavna komponenta obroka mliječnih krava. Silaža cijele biljke kukuruza je najzastupljenije voluminozno krmivo u hrani mliječnih krava u RH. U prosjeku, silaža kukuruza čini oko polovine suhe tvari voluminoznog dijela obroka visokomliječnih krava i služim im kao izvor energije (škrob i vlakna) te učinkovitih (efektivnih) vlakana (vlakna). Silaža kukuruza u prosjeku sadrži 25-35% škroba, 45–55% vlakana (neutralnih detergent vlakana) i 6,5 MJ NEL u kg suhe tvari te je komplementarna nadopuna silaže trava i mahunarki. Dodatno, cijela biljka kukuruza sadrži malo proteina (6-8%) i pepela, ali dosta šećera (5-10%) te se lako silira i daje silažu dobrih fermentacijskih svojstava (Grbeša, 2016).

Glavni problem siliranja cijele biljke kukuruza je istiskivanje zraka pa se smatra da je optimalna suha tvar za siliranje cijele biljke kukuruza je 32–35%, dužina sječke 1-2 cm (Slika 3.1.2.1.), dobro gaženje i pokrivanje te primjereno izuzimanje silaže. Ukoliko masa za siliranje sadrži više suhe tvari od 40 -45% i dužu sječku od 2 cm, teško se istiskuje iz nje zrak i nakon otvaranja u nju brzo prodire zrak (kisik) što pogoduje razvoju gljivica koje „jedu“ mliječnu kiselinu što pogoduje razvoju *Aspergillus* i *Pencillium* plijesni i produkciju njihovih toksina (Grbeša i sur., 2016).

Silaža kukuruza energijom je najbogatije silirano voluminozno krmivo našeg podneblja. Škrob je glavni izvor energije i zrna (77,5%) i silaže kukuruza (45,0%) pa sve što utječe na njegov sadržaj i iskoristivost određuje energetsku vrijednost kukuruza.



Slika 3.1.2.1. Primjerena sječka zelene mase cijele biljke kukuruza

Izvor:
https://www.google.com/search?q=corn+silage&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjozcqtt6PkAhWsxIsKHbhaAM4Q_AUIESgB&biw=1517&bih=675#imgrc=VB_r8aEEGsYFLM:, pristupljeno: 27.08.2019.

4. Hranidbeni načini ublažavanja djelovanja aflatoksina

Dosada su proučavane brojne metode i načini kako bi se smanjio utjecaj djelovanja aflatoksina u probavnom sustavu životinja. Također, ispitivana je i njihova efikasnost u procesima inaktivacije ili smanjenja djelovanja aflatoksina. Galvano i sur. (2001) navode kako se prilikom ublažavanja ulaska mikotoskina u metabolizam životinje najčešće koriste aditivi u vidu vezača (adsorbenata). Određenim aditivima u hrani smatraju se tvari koje imaju sposobnost vezivanja na površinu drugih tvari pri čemu ne dolazi do kemijskih reakcija i kao takve koriste se u svrhu smanjenja apsorbcije aflatoksina iz gastrointestinalnog trakta (Diaz i sur., 2004). Ovakve tvari, također, mogu zaštititi životinju od toksičnih djelovanja AFB_1 (Ramos i sur., 1996).

Skoro pa je nemoguće spriječiti kontaminaciju krmiva s aflatoksinima. Postoje tri mogućnosti kojima bi se izbjegli štetni učinci aflatoksina (1) prevencija proizvodnje aflatoksina u predžetvenoj fazi, (2) detoksikacija aflatoksina iz kontaminirane hrane i poljoprivrednih proizvoda te (3) inhibicija apsorbcije aflatoksina u probavnom traktu nakon konzumacije kontaminirane hrane. Međutim, prve dvije metode su teško izvedive i sve se više pokušava djelovati na osnovu inhibicije.

Zbog toga, sve se više koriste hranidbene metode koje dodavanjem vezača i sličnih tvari djeluju u rješavanju tog problema. Umješavanje aditiva koji vežu na sebe mikotoksine u krmnim smjesama ili obrocima prije hranjenja i/ili ih vežu u probavnom traktu su najčešća i najraširenija metoda odstranjivanja mikotoksina, odnosno sprečavanja njihovog ulaska u metabolizam i preko njega u proizvode životinja (Avantaggiato i sur., 2007., Phillips i sur., 2008). Aditivi bi trebali:

1. vezati mikotoksine na sebe ili ih
2. razoriti u optimalnim uvjetima kiselosti, vlažnosti, temperature u probavnom sustavu te
3. odstraniti putem brže probave i pasaže hrane (bentonit).

Kao što je već spomenuto nema metode niti aditiva koji bi bio jednako učinkovit u odstranjivanju svih prirodno prisutnim mikotoksina na jednom krmivu pa se uvijek mora naglasiti uspješnost aditiva u odstranjivanju pojedine vrste i količine mikotoksina.

4.1. Anogranski vezači

Kod anorganskih vezača specifično je to što najčešće vežu samo jedan toksični spoj, jer kako navode Ramos i Hernandez (1997) anorganski vezači najčešće vežu aflatoksine, ali ne i većinu mikotoksina.

4.1.1. Gline

Gline su silikatni minerali koji se dijele na prirodne (klinoptiloliti) i sintetske zeolite (zeolit A), bentonite i sintetske hidratizirane natrij, kalcij - aluminosilikate (HSCAS) i druge.

Pročišćene gline imaju električni naboj koji odgovara električnom naboju aflatoksina te na taj način vežu 80-90% aflatoksina. Što je viša razina aflatoksina tada potrebna razina pročišćene gline raste sa 0,5 na 2,5 kg/t hrane. Generalno se može reći da su gline specifične za aflatoksine, ali ne i za *Fusarium* toksine. Unos gline oralnim putem kod mliječnih krava smanjuje toksičnost aflatoksina iz kontaminiranih obroka. Utvrđeno je i da suplementi na bazi gline koji se dodaju u hranu mliječnih krava daju mlijeko koje ima manje od 3,5% mliječne masti.

Kaoliniti, smektiti i kloriti su skupine silikata ili materijali na bazi gline. Smektiti imaju široku komercijalnu upotrebu, jer je u dosadašnjim istraživanjima utvrđeno kako apsorbiraju teške metale, bakterije i toksične antinutritivne tvari, kao što su aflatoksini (Trckova i sur., 2004). Montmoriloniti su klasa smektitne skupine gline koji imaju troslojnu struktura koja omogućava unutarnju apsorbciju monovalentnih i dvovalentnih iona.

Maki i sur. (2016a) objavili su slično istaživanje s tim da su oni koristili poboljšanu verziju, odnosno, kalcij montmorilonit. Rezultati su pokazali da kalcij montmorilonit smanjuje koncentraciju AFM_1 u mlijeku od 1,07% na 0,52%. Sulzberger i sur. (2017) proveli su istraživanje u kojem su koristili glinu. Došli su do saznanja da je koncentracija AFM_1 bila niža ($P<0,0001$) kod krava koje su hranjene obrocima koji su sadržavali određene koncentracije gline u obrocima kako je prikazano u Tablici 4.3.1.1. Rezultati su dobiveni nakon dodavanja aflatoksina u količini od 100g/kg dnevnog unosa suhe tvari (ST). Dnevni unos ST izračunat je na osnovu dnevnih unosa tijekom tri dana prije početka pokusa.

Tablica 4.3.1.1. Koncentracije aflatoksina u mlijeku, urinu, fecesu i buražnom soku

	POS	0,5%	1%	2%	C
AFM_1(µg/kg)					
Mlijeko	0.43	0,35	0,30	0,25	0,00
Mlijeko (18d)	0,80	0,58	0,58	0,47	0,00
Urin	0,50	8,60	4,38	5,51	0,01
AFB_1 (µg/kg)					
Feces	2,78	1,79	1,52	1,48	0,16
Buražni sok	0,10	0,05	0,02	0,02	0,003

Izvor: prilagođeno iz Sulzberger i sur., 2017.

*POS – obroci koji nisu sadržavali glinu, ali su sadržavali aflatoksine

*C – obroci koji nisu sadržavali niti glinu niti aflatoksine

* mlijeko 18 dana (18 d), uzorci koji su analizirani nakon sakupljenih uzoraka mlijeka tijekom osamnaest dana za svaki period hranidbe

Kroz pokus utvrđeno je da se povećavanjem udjela gline u obrocima smanjuje koncentracija AFM_1. Kod krava u C pokusnoj grupi uočeno je kako je koncentracija AFM_1 u urinu niža nego kod krava iz POS grupe. Uzorci fecesa i buražnog soka kod krava koje su konzumirale obroke koji su sadržavali glinu imali su nižu koncentraciju AFB_1 nego kod krava koje čija hranidba nije sadržavala glinu.

4.1.2. Aluminosilikat

Aluminosilikati spadaju u grupu negativno nabijenih spojeva čija mrežasto-kavezna struktura privlači katione (pozitivno nabijene čestice) aflatoksina, aminokiselina, vitamina i minerala. Phillips (1999) navodi da su aluminosilkati visokoselektivni vezači aflatoksina te slabo vežu druge mikotoksine. Problem predstavlja činjenica da su efektivni u velikim količinama (1-5%), a često sadržavaju otrovne dioksine te teške metale.

4.1.3. Bentoniti

Bentoniti su spojevi koji se uglavnom sastoje od montmorilonita koji imaju svojstvo bubrenja. Natrij bentonit, kalcij bentonit, kalij bentonit, magnezij bentonit, organofilni (modificirani) bentonit i dr. su jedni od najkvalitetnijih vezača aflatoksina i dodaju se u hranu za životinje. Bentoniti imaju izmjenjive katione u svojim strukturama te neka istaživanja upućuju na dobro vezivanje aflatoksina, a neka na loše. Dodavanje u hranu oko 1,2% natrij bentonita smanjuje koncentraciju aflatoksina M1 u mlijeku za oko 50-65%, dok je isti udjel kalcij bentonita lošiji vezač te smanjuje koncentraciju aflatoksina tek za oko 31%. Bentonit smanjuje apsorpciju aflatoksina sa 3% na 2,2%. Preporučuje se, ovisno od udjela aflatoksina u obroku i trajanja hranjenja krava sa njime da obrok umjerene kontaminacije < 5 mikrograma/kg sadrži 20-50 g bentonita po kravi dnevno (Grbeša i sur., 2014). Neki od bentonita proučavani su i kod drugih vrsta životinja te je u istraživanju kojeg je proveo Döll sa sur. (2005) zaključeno da organofilni modificirani montmoriloniti ne vežu zearalenol i deoksinivalenol u probavilu peradi i svinja.

Kisseli i sur. (2012) su u svom istaživanju koristili proizvod Astra-Ben 20 (AB-20) (Prince Agri Products, Inc.,Quincy, IL,USA) koji je natrijev bentonit. Natrijev bentonit je filosilikat koji ima kristalnu mikrostrukturu koja omogućava apsorbciju aflatoksina. U tom istaživanju utvrđeno je da AB-20 veže 98% AFB_1 u in vitro pokusima. Nadalje, utvrdili su da smanjuje i koncentraciju AFM_1 za 60,4% in vivo za vrijeme kada su krave u laktaciju bile hranjene s 227g AB-20/d po kravi. Kasnije su izvijestila da je proizvodnja AFM_1 bila smanjena za 48,9% kada je kravama davan bilo koji eksperimentalni hranidbeni dodatak u koncentraciji od 100g/d po kravi. Rezultati koje su dobili potvrdili su dotadašnje rezultate iz istraživanja koje je proveo Diaz sa svojim suradnicima (2004) te Stroud (2006) koji su došli do zaključka da ovaj dodatak hrani za životinje snižava koncentraciju AFM_1 kod Holstein krava u laktaciji. Razlike u učinkovitosti ispitivanih hranidbenih aditiva koji su korišteni da bi se smanjila koncentracija AFM_1 mogu biti povezane sa sastavom aditiva te njihovom učinkovitošću.

4.1.4. Zeoliti

Zeoliti su vulkanski negativno nabijeni aluminosilikati (SiO_4^{4-} i AlO_4^{5-}) koji mogu biti prirodnog ili sintetskogu porijekla. Utvrđeno je da postoji 45 vrsta i 120 varijanti što prirodnih što umjetnih zeolita koji se jako razlikuju po biološkim svojstvima. No, poznato je kako imaju otvorenu trodimenzionalnu kristalnu šuplju strukturu koja je sastavljena od aluminijevih, silicijevih i kisikovih atoma u čijim šupljinama (porama) se nalaze molekule vode. Mrežasta struktura sastoji im se od pozitivno nabijenih čestica Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} koje se zamjenjuju sa pozitivno nabijenim aflatoksinima. Teoretski, zeoliti vežu na sebe štetne spojeve koji se nalaze u hrani, zatim, vežu i štetne produkte koji nastaju tijekom probave te ih fecesom izlučuju u okolinu. Utvrđeno je da jako promjenljivo vežu aflatoksine pa treba biti oprezan sa njihovim dodavanjem u obrok krava. Tomašević-Canević i sur. (2003) navode kako zeoliti, u pravilu slabo vežu manje polarne spojeve kao što su *Fusarium* toksini. Također, utvrdili su da modificirani zeoliti *in vitro* vežu aflatoksine, zearalenon, ohratoksin, deoksinivalenol.

4.1.5. Hidriratizirani natrij, kalcij-aluminosilikati

Hidriratizirani natrij, kalcij-aluminosilikati (HSCAS) dobivaju se iz prirodnih zeolita i najviše su korišteni adsorbensi aflatoksina. HSCAS imaju negativno nabijena mjesta na koja se vežu aflatoksini. Ramos i Hernandez (1997) su naveli da HSCAS slabo ili nikako vežu zearalenol, ohratoksin i trihitocene. Zbog toga što ih je potrebno staviti u hranu u visokim koncentracijama od 0,5-2%, mora se smanjiti udjel energetskih krmiva u smjesama. Phillips (1999) navodi da je korištenje HSCAS-a u obrocima jednostavan i vrlo efikasan proces pri čemu on djeluje kao enterosorbent te čvrsto i selektivno veže na sebe aflatoksine u probavnom sustavu životinja. Pored toga, smanjuje njihovu biodostupnost i povezana toksična djelovanja. Kroz istaživanja došlo se do zaključka da je dikarbonilni sustav aflatoksina esencijalan da bi se na njega čvrsto vezao HSCAS. Rezultati su uputili i na to da aflatoksin može reagirati s česticama gline na više mjesta. Postoje određeni rizici prilikom primjene u hranidbi te se treba još testirati.

4.1.6. Daijtomejska (kremena) zemlja

Daijtomejska (kremena) zemlja prirodna je silikatna sedimentna stijena. Nastaje taloženjem skeletnih ostataka (frustula) dijatomeja, zatim, mikroskopskih jednostaničnih vodenih biljaka kao što su alge kremenjašice. Utvrđeno je tokom istraživanja na peradi da je uspješna u vezivanju aflatoksina.

4.2. Organski vezači

U metodama gdje se koriste organski vezači toksina najčešće se koriste proizvodi na bazi kvasca. Kako bi se dobili što bolji rezultati bitna je primjena tvari koje prirodno poboljšavaju zdravlje i fiziologiju životinja. Prema Europskoj uniji (2009) vezači se smatraju vrstom aditiva te su na osnovu toga stručnjaci iz Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA) proučavali djelotvornost i biološke učinke koje mogu izazvati vezači kod životinja. Pored anorganskih vezača i organskih vezača na bazi kvasca (mananooligosaharidi) koriste se još: aktivni ugljen, polivinilpolipirolidin, klorofilin, kolestiramin, brašno lucerne, mikronizirana neprobavljiva vlakna i dr. Organski vezači, u odnosu na anorganske, učinkovito vežu više mikotoksina te se razgrađuju u gnoju i ne sadrže teške metale i dioksine kao što je to slučaj sa aluminosilikatnim adsorbensima.

4.2.1. Polimeri glukomanana stanične stijenke kvasca

Polimeri glukomanana stanične stijenke kvasca (GMA) su organski vezači mikotoksina koji potječu iz sojeva *Saccharomyces cerevisiae*. Predloženi mehanizam djelovanja, u ovoj kategoriji hranidbenih aditiva, je interakcija između glukanskog dijela stanične stjenke i mikotoksina (Yiannikouris i sur. 2003; 2004). Pretpostavlja se da su D-glukani (sdrže ih glukomanani) sastojak stjenke kvasca koji veže *Fusarium* mikotoksine, aflatoksin, ohratoksin te „silažne“ mikotoksine (Dawson i sur., 2001; Chowdhury i Smith, 2004; Jouney, 2007) i da djeluju kod svih vrsta domaćih životinja (Devegowda i sur., 1994). Devegowda i sur. (1996) navode kako se čini da su GMA učinkoviti i pri visokim koncentracijama alfatoksina, jer vežu preko 60%, a često i 95% prisutnog aflatoksina. Za razliku od anorganskih veziva koja se uključuju u obrok 1-3%, GMA se daju u malim količinama (0,05%). Pa se tako mananooligosaharidi tvrtke Alltech daju u prvih tjedan dana 30, nakon toga 20, a zatim koji se 20 g/d po kravi. Za razliku od anorganskih vezača polimeri glukana ne sadrže teške metale i dioksine, jer ih ne smiju sadržavati kao niti jedan od ostalih aditiva.

U istaživanju koje je proveo Kissell sa sur. (2012) korišten je modificirani proizvod glukomanana pod nazivom MTB-100® (Alltech, Inc., Nicholasville, KY, USA) koji je u drugim zemljama poznat i kao Integral® ili Mycosorb®. Kroz 2004. i 2006. godinu komercijalno su bile dostupne dvije formulacije, a to su MTB100®-2004 i MTB100®-2006. Diaz i sur. (2004) došli su do zaključka da MTB-100 veže 96,6% AFB_1 u in vitro pokusima te da smanjuje koncentraciju AFM_1 za 59% in vivo i to u slučajevima kada su Holstein krave u laktaciji bile hranjene sa 10g MTB-100 /d po kravi. Naknadno su izvijestili da MTB-100 ne snižava koncentraciju AFM_1 u in vivo istaživanjima. Tokom prijašnjih istraživanja korišten je i Lallemand® (Milwaukee, WI, USA) proizvod okarakteriziran kao spoj ekstrakta stanične stjenke kvasca i aluminoslikata.

Dok su u većini slučajeva anorganski aditivi specifični za jedan mikotoksin i to uglavnom aflatoksin, organski aditivi, osobito GMA, vežu više toksina. Jedna od dodatnih prednosti je to što se dodaju u malim količinama te ne vežu hranjive tvari. Visoka cijena GMA je njihov glavni nedostatak. Poznato je kako se danas sve više koriste različite kombinacije mješavina tvari kao što je mješavine GMA sa jednim anorganskim adsorbensom (bentonit) uz to se dodaju mikotoksin razarajućim enzimimi i/ili mikroorganizmi.

Provedeno je i nekoliko istraživanja kod svinja i peradi u kojima se došlo do zaključka kako je i kod ovih vrsta došlo do učinkovitog sprečavanja toksičnosti iz hrane koja je sadržavala aflatoksine. Naime, i u tim istraživanjima koristili su se proizvodi na bazi neprobavljivih oligosaharida koji su derivati dobiveni iz stanične stjenke kvasaca.

4.2.2. Aktivni ugljen

Aktivni ugljen je korišten za ublažavanje intoksikacije kod životinja uključujući i one koje uzrokuju mikotoksikoze. Aktivni ugljen je visoko adsorptivni prah koji se upotrebljava u liječenju ozbiljnih intoksikacija. Dobiva se pirolizom organske tvari što daje veliku površinu maloj masi. Većina aktivnog ugljena na tržištu ima milijune otvorenih pora između atoma ugljena pa gram ima površinu od 500 do 3500 m^2 (Huwing i sur., 2001). Isto tako pokazao se uspješan u uklanjanju visokih doza aflatoksina (Edrington i sur., 1997). Učinak dvije vrste aktivnog ugljena pri udjelu od 2% u suhoj tvari obroka mliječnih krava pokazao je suprotne učinke. Jedan se pokazao visoko, a drugi potpuno neučinkovit u smanjenju količine aflatoksina M1 u mlijeku. Smith i Girish (2012) navode da se aktivni ugljen malo koristi kao vezač u hranidbi životinja zbog izrazito različitog vezanja aflatoksina, potencijalnog vezanja hranjivih tvari (sitetskih vitamina i aminokiselina) i stvaranja zacrnjenih smjesa.

4.2.3. Polivinilpolipirolidin

Kemijski inertan spoj bogat unakrsno povezanim polivinilpirolidonima (PVP) naziva se polivilinpolipirolidin (PVPP). PVPP je lagan prašak koji veže atmosfersku vodu u količini koja odgovara postotku od 40% od njegove težine. Poznato je kako visoki adsorpcijski kapacitet formira hidrirani omotač oko čestica PVPP koje privlače polarne čestice aflatoksina B1, ali ne i deoksinivalenola. Thalib (1995) navodi kako udjel od 0,5 g/kg hrane veže na sebe 50 µg aflatoksina B1.

4.2.4. Klorofilin

Klorofilin je vodotopljivi pripravak klorofila zelenih biljaka i dobro veže aflatosin. Dashwood i sur. (1998) navode da smjesa klorofilina i kitosana (poliglukozamin) stvara netopljivi, solima sličan materijal koji dobro veže policikličke tvari kao što je aflatoksin B_1.

4.2.5. Mikronizirana neprobavljiva vlakna

Mikronizirana neprobavljiva vlakna dobivena su od neprobavljivih vlakana. Najčešće se dobivaju iz ljuske i perikarpa pšenice, ječma, zobi, graška ili iz ligninom bogatih vlakna lucerne. Tu se još mogu pronaći i vlakna iz pulpe jabuke i drugih sirovina. Mikronizirana neprobavljiva vlakna su vrlo mala i dolaze u praškastom obliku. Veličina njihovih čestica je oko 100 mikrona. Sastoje se od celuloze, hemiceluloze i lignina. Vlakna imaju sposobnost vezanja mikotoksina i tako sprečavaju njihovu apsorpciju. Izgleda da mikronizirana vlakna

lucerne mogu vezati T-2 toksin, zearalenon i ohratoksin, ali ne mogu aflatoksin B_1. Audia i sur. (2009) izvijestili su da vlakna pšenice u količini od 1% u hrani značajno smanjuju nepovoljne učinke ohratoksina u svinja. Učinkovitost mikroniziranih neprobavljivih vlakana ovisi o njihovoj koncentraciji u hrani, ali i o afinitetu prema mikotoksinima. U većini slučajeva moraju se dodavati u većim količinama u hranu i to u koncentacijama koje su veće od 1%.

4.2.6. Kolestiramin

Kolestiramin je, kao i PVPP, polimer koji učinkovito veže na sebe nekoliko vrsta mikotoksina. Tokom dosadašnjih istraživanja, utvrđeno je da veže zearalenon, fumonisine i ohratoksin, međutim, zbog njegove visoke cijene upitno je njegovo korištenje u hranidbi životinja (Bauer, 1994; Avantaggiato i sur., 2003).

4.3. Organske kiseline

Organske kiseline su spojevi koji nose osobine kiselina te se mogu dobiti iz prirodnih izvora kao što su grožđe, rajčica, naranča, limun i sl. Iako su slabijeg djelovanja od anorganskih kiselina, svoju ulogu pronalaze i u smanjivanju negativnog djelovanja aflatoksina. Organske kiseline, kao što cu octena, propionska i maslačna mogu nastati i u procesima fermentacije biljne mase tijekom siliranja (konzerviranja). Izgleda da su sorbinska, propionska i benzojeva organska kiselina uz sorbinske soli najučinkovitije u ovoj kategoriji u sprječavanju rata plijesni i posljedično smanjenoj koncetraciji mikotoksina u obroku. Zbog topljivosti, okusa i niske toksičnosti, organske kiseline kratkog lanca, koriste se kao konzervansi protiv plijesni. Različite kiseline imaju i različit stupanj djelovanja koji je u većini slučajeva uvjetovan s pH vrijednošću. Organske kiseline koje nastaju iz pravilno silirane biljne mase (mliječna, mravlja, octena, propionska, maslačna) imaju antifungalno djelovanje (Schmidt i Kung, 2010; Crowley i sur., 2013).

4.3.1. Sorbinska kiselina

U posljednih nekoliko godina upotreba sorbinske kiseline i sorbata je vrlo opsežna. Sorbinska kiselina je nezasićena kiselina koja je dozvoljena u upotrebi kao konzervans u hrani. Prirodno se javlja u bobicama jarebike, no, mogu se dobiti i sintetički. Najveći učinak pokazala je kada je pH vrijednost ispod 5. Nedostatak sorbinske kiseline je u ograničenoj topljivost u vodi te se zbog toga koristi kalijeva sol koja ima veću topljivost. Poznato je da kalijev sorbat učinkovito smanjuje proizvodnju plijesni za oko 0,10 do 0,15%. Kroz dosadašnja istraživanja utvrđeno je da sorbinska kiselina i kalijev sorbat djeluju na povećavanje stabilnosti niza proizvoda (žitarice, maslac, mlijeko, meso i sl.) prilikom skladištenja.

4.3.2. Propionska kiselina

Propionska kiselina i njeni derivati (propionati) su vrlo upotrebljive tvari koje se koriste kao preventiva za rast plijesni. Ona je uljasta tekućina koja ima neugodan miris. Miješa se s vodom te je topljiva u eteru, alkoholu i kloroformu. U prehrambenoj industriji često se koristi u obliku kalcijevih ili natrijevih soli. Poznato je da su propionati vrlo efikasni u inhibiranju rasta plijesni te je to jedan od razloga zašto se najviše koristi u pekarskoj industriji. Kroz nekoliko prijašnjih istraživanja utvrđeno je da propionska kiselina ima učinke i u očuvanju žitarica. Sauer i Burroughs (1974) su izvijestili kako su natrijev propionat i propionska kiselina učinkovitiji u očuvanju kukuruza od kalcijevog propionata. Paster (1979) je, također, izvijestio da propionska kiselina može biti učinkovitija od kalcijevog propionata prilikom kontrole razine gustoće gljivica u hrani u kojoj je rod *Aspergillus* bio dominantan.

Bandelin (1958) je utvrdio kako je potrebno oko 0,06 do 0,08% propionske kiseline pri pH 5,0 da bi se inhibiralo nekoliko vrsta plijesni, uključujući i *A. niger*. Nadalje, Herting i Drury (1974) su proučavali relativne antifungalne aktivnosti hlapljivih masnih kiselina (HMK) i došli su do zaključka da je propionska kiselina učinkovito sredstvo u borbi protiv gljivica. Kasnije su izvijestili da su HMK fungicidno sredstvo koje se može koristiti na kukuruzu koji je bio cijepljen s *A.flavus*, *Penicillum* i *Fusariom sporotrichides*. Vandergraft i sur. (1975) Inkubirali su kukuruz i *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* i *P. vridicatum* te zaključili da 1% propionske kiseline preventira rast gljivica u istoj mjeri koliko i aflatoksin i ohratoksin iz plijesni nakon dvadesetdevet tjedana skladištenja.

Masimango i sur. (1979) proučavali su učinak propionske kiseline i kalcijevog propionata prilikom proizvodnje aflatoksina *A. flavus* i uočili su inhibiciju od 52,3 % i 49,2% koristeći 1% i 0,5% propionske kiseline. Kako prikazuje Tablica 4.2.2.1., kalcijev propionat je manje učinkovit te pokazuje inhibitorno djelovanje od 33.1% ukoliko mu je koncentracija bila 1%, a pri koncentracijama 0,5 i 0,1% ne pokazuje učinak. Iako je propionska kiselina vrlo povoljna, njeno djelovanje je ograničeno samo na hranu koja je kiselog karaktera, jer u neutralnom ili mediju blizu neutralnog ona ne pokazuje nikakvu učinkovitost. Najveća negativna strana propionske kiselina je neukusnost koju daje hrani.

Tablica 4.2.2.1. Utjecaj nekoliko inhibitora na proizvodnju aflatoksina A. flavus koje rast na kukuruznoj krupici

	Koncentracije		
	1%	0,5%	0,1%
	% inhibicije		
Kalijev sorbat	96,5	58,5	6,5
Sorbenska kiselina	97,1	57,8	10,2
Kalcijev propionat	33,1	-	-
Propionska kiselina	52,3	49,2	-
Natrijev benzoat	23,2	-	-
Benzenska kiselina	23,6	-	-

Izvor: Ray i Bullerman (1982)

4.3.3. Benzenska kiselina

Benzenska kiselina se, također, koristi u prehramneboj industriji. Ona je kristalna tvar bijele boje te je slabo topljiva u hladnoj vodi, dok se u toploj vodi njena topljivost povećava. Njezina sol, natrijev benzoat, je vrlo dobro topljiva u vodi te se u prirodi može javiti u slobodnom obliku ili kombiniranim formama, no, najčešće kao derivati benzojeve kiseline (natrijev benzoat). Učinkovitost benzenske kiseline i natrij benzoata ovisi o mediju u kojem se nalaze te su najdjelotvorniji u neutralnom pH (pH 7,0). Najviše se koriste kao antimikotici u hrani, ali upotreba im ne smije prelaziti više od 1% u hrani.

Uraih i sur. (1977) proučavali su djelovanje benzenske kiseline i natrij benzoata na biosintezu aflatoksina te su otkrili da se proizvodnja aflatoksina značajno smanjila. Oni su utvrdili je redukcija proizvodnje aflatokisna proporcionalna povećanju količine benzojeve kiseline ili natrijevog benzoata, jer na razini od 8mg/ml (0,8%) nije uočena nikakva razina aflatoksina. Masimango i sur. (1979) izvijestili su da u koncentraciji od 1% benzojeva kiselina i natrijev benzoat uzrokuju inhibiciju od 23,6% ii 23,2% u proizvodnji *A. flavus*-a.

4.3.4. Limunska kiselina

Limunska kiselina ($C_6H_8O_7$) je trobazična organska kiselina koja se nalazi u mnogim vrstama voća. Bijele je boje i ima kristalnu strukturu te se vrlo lako otapa u vodi. Najčešće se dobiva industrijski iz limuna ili fermentacijom šećera pomoću plijesni *A. niger*. Iz prethodnih istraživanja utvrđeno je da dodavanjem otopine limunske kiseline u krmne smjese može se djelovati na detoksikaciju aflatoksina. U rezultatima iz istaživanja kojeg su proveli Mendez-Albores i sur. (2006) zaključeno je da dodavanje 1N vodene otopine limunske kiseline u krmne smjese za pačiće smanjuje negativne učinke na jetri. Rezultati, koji su se radili na osnovi aktivnosti transaminaza u serumu, su pokazali da kiselina značajno sprječava negativno djelovanje aflatoksina na dnevni prirast. Također, značajno je bila smanjena i težina histoloških ozlijeda koje su izazvane toksinima. Test mutagenosti je pokazao kako zakiseljenja smjesa koja sadrži AFB_1 ne pokazuje mutagenu aktivnost u onolikoj mjeri koliko pokazuje smjesa koja je kontaminirana s AFB_1, ali u koju nije dodana limunska kiselina.

Zaključeno je da otopina limunske kiseline značajno smanjuje pojavu negativnih posljedica koje su uzrokovane toksičnošću, kancerogenošću ili mutagenošću. Razlog tome može biti povezan s promjenama u strukturi molekule aflatoksina tijekom djelovanja kiseline, kao što su istaknuli Mendez-Albores i sur. (2005). Utvrđeno je da limunska kiselina, unatoč pozitivnim djelovanjima na smanjenje negativnih utjecaja aflatoksina, treba biti još dodatno ispitana i na drugim životinjama.

4.3.5. Humične kiseline

Humične kiseline su kiseline koje nastaju tijekom razgradnje organske tvari. Tijekom nekih istaživanja utvrđeno je da imaju sposobnost vezivanja drugih molekula. Kako navodi Van Rensburg i sur. (2006) derivat humične kiseline poznatiji kao oksihumat pokazuje visoki afinitet vezanja aflatoksina u in vitro otopinama. Također, poznato je da oksihumat u tovu pilića ublažava utjecaj visokih doza aflatoksina te pozitivno djeluje na zdravlje i rast pilića. No, kao i kod nekih drugih tvari koje se mogu koristiti u smanjenju djelovanja aflatoksina potrebno je dodatno istražiti kolika je sposobnost vezanja toksina. Naime, treba utvrditi kolika je učinkovitost i kod drugih vrsta domaćih životinja u ublažavanju nepovoljnih učinaka.

4.4. Biološke metode

Biološke metode koriste biološke važne mikroorganizme, kao što su kvasci, bakterije mliječne kiseline, bifidobakterije i dr. kako bi se inhibirao rast plijesni i/ili smanjila proizvodnja aflatoksina. Mikroorganizmi koji se upotrebljavaju u biološkim metodama su svi oni koji vežu na sebe ili razaraju pojedine mikotoksine, a uz njih mogu se dodati netoksične plijesni te mikotoksin razarajući enzimi. Neki od inhibitora aflatoksina mogu inhibirati rast plijesni za oko 70%.

4.4.1. Enzimatska razgradnja aflatoksina

Ciegler i sur. (1966) izvijestili su da oko 1000 mikroorganizama ima sposobnost razgradnje ili transformiraja AFB_1 i aflatoksina G_1. U smanjenju proizvodnje aflatoksina i njihovih štetnih učinaka koriste se mikroorganizmi kao što su: bakterije, aktinomicete, kvasci, plijesni i alge. Bakterije mliječne kiseline, propiobakterije, bifidobakterije te kvasci vežu na sebe ili posjeduju enzime koji razgrađuju aflatoksine i neke *Fusarium* plijesni (Yoon i Baeck, 1999; El-Nezami i sur., 2002). Poznato je da aflatoksine razaraju sljedeće bakterije: *Flavobacterium aurantiacum* B-184, *Nocardia corynebacteroides, Nocardia asteroides* IFM 8*, Mycobacterium fluoranthenivorans sp. nov. Rhodococcus erythropolis*. Tejada-Castaneda i sur. (2008) navode kako se mogu dodavati sojevi plijesni iz *roda Aspergillus,* ali samo oni koji ne proizvode aflatoksine (npr. *Aspergillus niger*) i druge filamentozne gljive (npr. *Eurotium herbariorum, Rhizopus* sp.) koje tada vrše biotransformaciju aflatoksina. Poznato je da neke bakterije na sebe fizički vežu zeralenon, deoksinivalenol i diacetoksiscirpenol.

Bakterije mliječne kiseline (BMK) koriste se u proizvodnji fermentacijskih mliječnih proizvoda. Njihova glavna uloga je u proizvodnji organskih kiselina kao što je mliječna s kojom se produljuje trajanje proizvoda pri čemu dolazi i do promjene organoleptičkih svojstava. Na osnovu dosadašnjih istaživanja poznato je kako BMK inhibiraju rast plijesni te da se do neke mjere mogu vezati za molekulu aflatoksina.

Odabrani sojevi koji se koriste u prehrambenoj industriji sadrže dvanaest sojeva *Lactobacillus*-a, pet *Bifidobacteria* i tri soja *Lactococcus*-a. Pomoću ovih sojeva iz otopina može se vezati između 5,6 i 59,7% AFB_1. Peltonen i sur. (2001) izvijestili su da su *Lactobacillus* sojevi vezali između 17,3 i 59,7% AFB_1, zatim, *Bifidobacterium* vezali su između 18,0 i 48,7% AFB_1, a *Lactococcus* veže između 5,6 do 41,1%. Tijekom istaživanja odabrana su dva soja *L. amylovorus*-a (CSCC 5160 I CSCC 5197) i jedan *L. rhamnosus* (Lc ⅓) za daljna istaživanja, jer su uklonili više od 50% AFB_1 (59,7%, 57,8%, 54,6%). Bakterijsko vezivanje AFB_1, od ovih sojeva, bilo je brzo te je više od 50% vezano unutar 72 sata inkubacije koja je prethodno trajala 24h s temperaturom od 37˚C, što je prikazano u Tablici 4.4.1.1. Problem je u tome što su ovakva vezivanja reverzibilna te se AFB_1 može otpustiti nakon vodenog ispiranja.

Tablica 4.4.1.1. Utjecaj perioda inkubacije na vezivanje AFB_1 sojevima *Lactobacillus*-a

% vezanog[1] AFB_1 po sojevima	Period inkubacije (h)			
	0	24	48	72
Lb. amylovorus CSCC 5160	52.6 (1.6)	59.7 (3.2)	68.6 (0.9)*	73.2 (1.1)*
Lb. amylovorus CSCC 5197	66.5 (1.5)	57.8 (2.5)*	72.4 (3.9)	63.7 (3.1)
Lb. rhamnosus Lc ⅓	76.9 (1.7)	54.6 (2.5)*	57.9 (1.4)*	56.6 (0.1)*

Izvor: Peltonen i sur. (2001).

[1] - svaka vrijednost značila je ± (standardna devijacija) iz trostrukog testa
*- upućuju na značajniju razliku ($P<0,05$) u vezivanju između sojeva usporedno sa 0h

Karunarate (1990) je izvijestio da se *Lacktobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus* i *L. planatarum* mogu koristiti u prevenciji rasta plijesni i/ili u njihovoj razgradnji. Od plijesni dodaju se: *Aspergillus niger, Eurotium herbariorum, Rhizopus sp.*, te plijesni poput *A. flavus i A. parasiticus* koje su značajne po tome što ne proizvode aflatoksine. Smith i Girish (2012) navode kako se pored netoksičnih plijesni danas koristite enzimi izolirani iz *Rhizopus stolonifer* i *Aspergillus fumigatus* koji sprečavaju stvaranje mikotoksina u skladištima. Uspješnost u razaranju zearalenona i ohratoksina pokazali su deaktivirani kvasci *Trichosporon mycotoxinivorans* MTV 115 koji su izolirani iz crijeva termita.

Za proces enzimatske razgradnje aflatoksina potrebno je izolirati enzime ili cijele enzimatske sustave koji mogu degradirati aflatoksine u netoksični ili manje toksični spoj. Korištenje mikroorganizama u razgradnji aflatoksina u hrani ili hrani za životinje se sve više upotrebljava. Uklanjanje aflatoksina uključuje fizičko vezivanje toksina, vjerojatno, na staničnu stijenku bakterija ili neku od komponenti stanične stijenke (El-Nezami i sur., 1998; Haskaed i sur., 2001). Ovakav način razgradnje može imati određene nedostatke npr. organizam ne bi dovoljno iskoristio hranu za prirast, ali može doći i do otpuštanja nepoželjnih spojeva.

Disovza i Brackett (1998) ispitivali su ulogu metalnih iona (Cu^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+},Co^{2+}) kako bi se utvrdilo da li imaju ikaku ulogu u enzimatskom sustavu koji su uključeni u razgradnju AFB_1 pomoću *Flavobacterium auratiacum.* Kroz prijašnja istaživanja utvrđeno je da i laktoperoksidaza može biti korištena u enzimatskoj razgradnji aflatoksina.

4.4.2. Antifungalni antibiotik Natamicin

U prevenciji rasta plijesni i proizvodnje aflatoksina korišteni su i neki drugi proizvodi poput antifungalnog antibiotika Natamicina (Pimaracin). Natamicin je prirodno sredstvo za konzerviranje s fungicidnim djelovanjem i vrlo je djelotvoran u sprečavanju rasta plijesni i proizvodnje aflatoksina čak i pri niskim koncentracijama. Djeluje protiv mnogih poznatih gljivica koje uzrokuju kvarenje hrane. Poznato je da natamicin inhibira više sojeva roda *Penicillium*. Posebno je pogodan za površinsku primjenu na proizvodima kao što su sirevi i kobasice.

4.4.3. Biljke i/ili začinsko bilje

Biljke ili njihovi derivati, kao što su neke komponente eteričnih ulja ili začinsko bilje mogu se koristiti u snižavanju razine ili djelovanja toksina. Korištena su i prirodna ulja timjana (Kumar i sur., 2008) te limunske trave (Bankole i Joda, 2004). Proučavanjem nekih drugih biljka kroz istaživanja utvrđeno je da mogu smanjiti djelovanje aflatoksina u nekim kulturama u Aziji. Nadalje, koriste se i biljni ekstrakti koji štite jetru od mikotoksina, posebno od aflatoksina. Neke od (začinskih) biljaka poput: klinčića, cimeta, senfa i origana inhibiraju proizvodnju mikotoksina. Ekstrakti luka i češnjaka, također, su djelovali na smanjenje rasta raznih gljivica tokom istaživanja. Bachmann (1961) navodi da je cimet bio učinkovit kod inhibicije rasta rodova *Alternaria*, *Penicillium* i *Aspergillus*. Uz to otkio je da klinčić i piment imaju neka antifungalna svojstva, ali ne u količini koju ima cimet. Nadalje, prema Bullermanu i sur. (1977) ulja cimeta i klinčića potiskuju rast plijesni *A. parasiticus*, a samim time i proizvodnju afatoksina.

Hitokoto i sur. (1978) proučavali su učinke trinaest biljnih lijekova i sedam komercijalnih suhih začina u rastu i proizvodnji toksina na nekoliko toksičnih *Aspergillus* sojeva. Došli su do zaključka da je cimet u prahu bio najdjelotvorniji inhibitor. Nadalje, otkriveno je kako klinčić, sjemenke anisa i piment u potpunosti smanjuju rast gljivica, dok većina ostalih inhibira samo proizvodnju toksina. Ukoliko se dodaje menta u koncentraciji višoj od 5% te kumin u koncentraciji višoj od 10% dolazi do inhibiranja proizvodnje aflatoksina. Azzouz (1981) je proučavao kako nekolicina začina djeluju na toksične sojeve *Aspergillus*-a i *Penicillium*-a te je utvrdio da koncentracija klinčića, senfa, cimeta, pimenta,

češnjaka i origana od 2% u „YES“ agaru u potpunosti inhibira rast. Poznato je da i agar, koji se dobiva kuhanjem biljaka, djeluje protiv proizvodnje toksina.

Muškatni oraščić ima malu učinkovitost kao konzervans čak u velikim količinama. Kumarin, prirodni sastojak hrane, nudi kemijsku zaštitu od AFB_1 (Goeger i sur., 1998). Kumarin je kemijski spoj intenzivnog mirisa i okusa te se često nalazi u hrani ili se nalazi u cimetu kao njegova prirodna komponenta. Neke vrste povrća su pokazale zanimljiv učinak.

4.4.4. Eterična ulja

Eterična ulja naranče i limuna, imaju određena antifungalna svojstva. Subba i sur. (1967) izvijestili su da je narančino ulje u koncentraciji od 2000 ppm (0,2%) bilo dovoljno da se potpuno inhibira rast *A. flavus* i *A. niger*. Zatim, Alderman i Marth (1976) su ispitali kako ulje limuna i naranče djeluje na *A. flavus* i otkrili su da citrusna ulja koja su dodavana u ekstraktne medije (sok grejpa, glukozni-kvasac) u koncentraciji od 3000 do 3500 ppm (0,3 do 0,35%) uspješno potisnuli proizvodnju aflatoksina. Narančino ulje u koncentraciji od 7000 ppm (0,7%) uveliko snižava rast plijesni i proizvodnju aflatoksina, no, ovaj postupak nije dovolljno istražen.

Sarbhoy i sur. (1978) su utvrdili da eterična ulja mente (*Menta arvenis* i *Menta piperita)* fungicidno djeluju na *A. flavus* i *A. fumigatus* u koncenraciji od 11000 ppm (1,1%).

4.4.5. Metilksantini

Metilksantini su spojevi koji se pojavluju u prirodi (kofein, teofilin) te inhibiraju rast i proizvodnju *A. parasiticus*-a u koncentraciji od oko 0,1% i više. Ostrow i Lynch (1976) izvijestili su da kofein u koncentraciji od 1% može inhibirati određene gljivice uključujući *Rhizopus* i *Penicillum*. Također, Buchanan i Fletcher (1987) utvrdili su da spoj teofilin inhibira proizvodnju aflatoksina kod *A. parasiticus* u koncentraciji od 8mg za 54%.

4.5. Ostali načini

Od ostalih načina mogu se koristiti fenolni antioksidansi, jer je kroz nekoliko istraživanja utvrđeno da imaju antimikrobno djelovanje. Učinkovito djelovanje antioksidanata u sprječavanju razvoja plijesni dokazano je u nekoliko istraživanja (Jayashree i Subramanyam, 2000). Fenolni antioksidansi, posebno (BHA), inhibiraju toksične plijesni u koncentraciji od oko 0,025% i više. Nadalje, topljivi fenoli koji se nalaze u zrnu kukuruza

poput ferulične, kafeične, salicilne kiseline i drugih, inhibiraju razvoj *Fusarium graminearum* plijesni i tvorbu trihotecena (Bakan i sur., 2003), te kontroliraju rast i razvoj *A. flavus* i *parasiticus* plijesni na kukuruzu (Grbeša i sur., 2014).

Chang i Branen (1975) prvi su opisali antifungalna svojstva butilhidroksianisola (BRA), koji je sintetski dobijen antioksidans. Otkrili su kako je BRA u mediju glukoznih soli u koncentraciji od 1000 ppm (0,1%) inhibirao razvoj spora *A. Parasiticus*-a i te je u koncentraciji od ≥250 ppm (0,025) inhibirao rast micela *A. Parasiticus*-a. Naime, izvijestili su da BRA može učinkovito djelovati samo u velikim dozama u borbi protiv gljivica dok u malim dozama može stimulirati proizvodnju aflatoksina. U Europskoj uniji je zabranjena upotreba BRA, ali se koristi u Sjedinjenim Američkim Državama.

U ostale načine može se dodati i upotreba klora čiji au antimikrobni utjecaji dobro poznati. Kurtzman i Hesseltine (1970) su utvrdili da većna mikrooranizama koji se uobičajno nalaze na pšenici nisu bili u mogućnosti izdržati izloženost kloru u konncentraciji od 5 ppm/ 1 minutu. Međutim, jedna polovica spora *P. eyelopium*, *P. urticae* i *P. citrium* su preživjeli tokom te izloženosti, ali nije bilo preživjelih organizama nakon izlaganja na 25 ppm/ 1 min.

Ver Kuilen i Marth (1960) proučavali su sporicidalno djelovanje hipoklorita na konidije (spore) *A. Parasiticus*-a te su otkrili da su konidije osjetljivije na hipoklorit kada je pH vrijednost 5,6 ili 7 nego kada je pH 8. Oni su, također, utvrdili da inaktivacija ovisi i o temperaturi, jer su naveli da nije bilo nikakvog otpora kada je temperatura bila 40˚C na pH 8.

5. Zaključak

Aflatoksini, sekundarni metaboliti *Aspergillus* plijesni i nekih drugih vrsta gljivica su jedni od uzročnika smanjenje proizvodnje, smanjene otpornosti te pojave aflatoksikoza kod mliječnih krava i ljudi. Problem predstavlja njihova široka rasprostranjenost i zastupljenost skoro na svim kontinentima svijeta. Utvrđeno je da aflatoksini imaju niz negativnih djelovanja poput kancerogenosti, mutagenosti, narušavanje imuniteta i sl. Veliki problem predstavlja i njihova velika otpornost, ali i skoro nemoguće sprječavanje kontaminacije proizvoda. Aflatoksine najčešće i u najvećoj mjeri proizvode toksikogeni sojevi *Aspergillus flavus* te sojevi *Aspergillus parasiticus* koji su poznati po tome što proizvode najtoksičniju vrstu aflatoksina.

Među žitaricama na pojavu aflatoksina najosjetljviji je kukuruz. Najkoncentriranije enrgetsko krmivo je zrno kukurza među koncetratnim i silaža kukuruza među voluminoznim krmivama tipičnim za mliječne krave. Uz visok i stabilan prinos zrno i silaža kukuruza su najzastupljenija krmiva obroka visokomliječnih krava te njihova kontaminacija aflatoksinom ima veliki utjecaj na proizvodnju i zdravlje mliječnih krava te pojavu i koncentraciju aflatoksina M_1 u mlijeku.

U metodama ublažavanja pojave aflatoksina u mlijeku su i hranidbene metode koje predstavljaju jeftiniji i učinkovitiji način odstranjivanja aflatoksina iz probavnog sustava mliječnih krava. Nekoliko je hranidbenih metoda u kojima se koriste: organski vezači (aktivni ugljen, mikronizirana neprobavljiva vlakna, polimeri glukomanana stanične stijenke kvasca), anorganski vezači (bentoniti, zeoliti, aluminosilikati), organske kiseline (limunska, propionska, sorbinska, humične) te neke od bioloških metoda. Biološke metode se uglavnom zasnivaju na enzimatskoj razgradnji aflatoksina dodavanjem određenih enzima, ali i dodavanjam kompetitivnih istovrsnih sojeva plijesni koji smanjuju koncentraciju aflatoksina.

Kao potpora organizmu u ublažavanju nepovoljnih učinaka aflatoksina koriste se dobra hranidbena praksa, dodaju se antioksidansi te tvari koje potpomažu metabolizam jetre. Isto tako, istražuje se i mogućnost cijepljenja domaćih životinja.

6. Literatura

1. Abbas H.K., Weaver M.A., Zablotowicz R.M., Horn B.W. i Shier W.T. (2005). Relationships between aflatoxin production and sclerotia formation among isolates of Aspergillus section Flavi from the Mississippi Delta. European Journal of Plant Pathology 112: 283–287.

2. Abbas H.K., Wilkinson J.R., Zablotowicz R.M., Accinelli C., Abel C.A. i Weaver M.A. (2009). Ecology of Aspergillus flavus, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. Toxin Reviews. 28 (2-3): 142-153.

3. Alderman G. G. i Marth E. H. (1976). Inhibition of growth and aflatoxin production of Aspergillus parasiticus by citrus oils. Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 160: 353-358.

4. Audia N., Callu, P., Grosjean F., Larondelle Y. (2009). Effectiveness of mycotoxins sequestration activity of micronized wheat fiber on distribution of achratoxin A in plasma, liver and kidney of piglets fed a naturally contaminated diet. Food Chem Technol. 47:1485-1489.

5. Avantaggiato G., Havenaar R., Visconti A. (2003). Assessing the zearalenone-binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic in vitro gastrointestinal model. Food and Chemical Toxicology, 41: 283-1290.

6. Avantaggiato G., Havenaar R., Visconti A. (2007). Assessment of the multimycotoxin-binding effecacy of a carbon/aluminosilicate-based product in an *in vitro* gastrointestinal model. J. Agric Food Chem. 55: 4810-4819.

7. Azzouz M.A. (1981). The inhibitory effects of herbs, spices, and other plant materials on mycotoxigenic molds. Ph.D. Thesis. University of Nebraska, Lincoln, NE.

8. Bachmann F. M. (1961). The inhibiting action of certain spices on the growth of microorganisms. J. Indust. Eng. Chern. 8: 620-623.

9. Bandelin F. J. (1958). The effect of pH on the efficiency ofvarious mold inhibiting compounds. J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed. 47: 691-694.

10. Bakan B. (2003). Dehydrodimers of Ferulic Acid in Maize Grain Pericarp and Aleurone: Resistance Factors to Fusarium graminearum. Dostupno na: https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.6.712.

11. Bankole S.A., Joda A.O. (2004). Effect of lemon grass (Cymbopogon citratus Stapf) powder and essential oil on mould deterioration and aflatoxin contamination of meion seeds (Colocynthis citrullus L.). Afr J Biotechnol. 3: 52–59.

12. Barnell N.M., i Naylor A.W. (1966). Amino acid and protein Meabolism in Bermuda Grass During water stress. American society for Microbiology.

13. Bauer J. (1994). Moglichkeiten zur Entgiftung mykotoxin-haltiger Futtermittel. Monatshefte fur Veterinar medizin. 49: 175-181.

14. Bebber D., Ramotowski M.A.T., Gurr S.J. (2013). Crop pests and pathogens move polewards in a warming world. Nature climate change. 3: 985–988.

15. Brown R.I., Cotty P.J. i Cleveland T.E. (1991). Reduction in Aflatoxin Content of Maize by Atoxigenic Strains of Aspergillus flavus. Journal of Food Protection. 54(8): 623-626.

16. Buchanan R. L. i Fletcher A. M. (1978). Methylxanthine inhibition of aflatoxin production. J. Food Sci. 43: 654-655.

17. Bullerman L. B., Lieu F. Y. i Seier S. A. (1977). Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnarnic aldehyde and eugenol. J. Food Sci. 42: 1107-1108, 1116.

18. Chang H. C. i Branen A. L. (1975). Antimicrobial effects of butylated hydroxyanixole (BHA). J. Food Sci. 40: 349-351.

19. Chowdhury S.R., Smith T.K. (2004). Effects of feeding blends of grains naturally-contaminated with Fusarium mycotoxins on performance and metabolism of laying hens. Poult. Sci. 83: 1849-1856.

20. Ciegler A., Lillehoj E.B., Peterson R. E. i Hall H. H. (1966)a . Microbial detoxification of aflatoxin. Appl. Microbiol. 14(6) 934-939.

21. Crowley S., Mahonya J., van Sinderena D. (2013). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. Trends in Food Science & Technology 33: 93-109.

22. Dashwood T., Negishi R., Hayatsu H., Breinholt V., Hendricks J., Bailey G. (1998). Chemopreventive properties of chlorophylls toward aflatoxin B1:a review of the antimutagenicity and anticarcinogenicity data in rainbow trout. Mutat. Res. 399: 245-514.

23. Dawson K.A., Evans J., Kudupoje M. (2001). Understanding the adsorption characteristics of yeast cell wall preparations associated with mycotoxin binding. In: Lyons, T.P., Jacques, K.A. (Eds.), Science and Technology in the Feed Industry. Nottingham University Press. Str. 169–181.

24. Diaz D. E., Hagler W. M. Jr., Blackwelder J. T., Eve J. A., Hopkins B. A., Anderson K. L., Jones F. T., Whitlow L. W. (2004).: Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. Mycopathologia. 157: 233– 241.

25. Diaz G.J. i Murcia H.W. (2011). Biotransformation of aflatoxin B1 and its relationship with the differential toxicological response to aflatoxin in commercial poultry species. In Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology. Guevara-Gonzalez R G, ed. Intech Europe, Rijeka, Croatia: Croatia InTech. Str. 3–21.

26. Döll S., Gericke S., Dänicke S., Raila J., Ueberschar K.H., Valenta H., Schnurrbusch U., Schweigert F.J., Flachowsky G. (2005). The efficacy of a modified aluminosilicate as a detoxifying agent in *Fusarium* toxin contaminated maize containing diets for piglets. J Anim Physiol Anim Nutr (Berlin). 89:342-358.

27. Dorner Joe W., J. Cole Richard i Wicklow Donald T. (1999). Aflatoxin Reduction in Corn Through Field Application of Competitive Fungi. Journal of Food Protection.

28. Edrington T.S., Kubena L.F., Harvey R.B., Rottinghaus G.E. (1997). Influence of a superactivated charcoal on the toxic effects of aflatoxin or T-2 toxin in growing broilers. Poult. Sci. 76: 1205–1211.

29. El-Nezami H., P. Kankaanpa S. Salminen, and J. Ahokas. 1998a. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. Food Chem. Toxicol. 36: 321–326.

30. El-Nezami H., Polychronaki N., Samlminen S., Mykkänen H. (2002). Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade Lactobacillus strains with zearalenone and its derivative alpha zearalenol. Applied and Envionmental Microbiology. 68: 3545-3549.

31. FAO, 2017. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. Dostupno na: < http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC >. Pristupljeno: 04.09.2019.

32. Feddern V., Dors G.C., de C. Tavernari F., Mazzuco H., Cunha A. Jr., Krabbe E.L., Scheuermann G.N. (2013). Aflatoxins Importance on Animal Nutrition. Aflatoxins – Recent Advances and Future Prospeds. 8: 171-195.

33. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Dostupno na: < http://www.fao.org/faostat/en/#data >. Pristupljeno: 04.09.2019.

34. Galvano F., Piva A., Ritieni A., Galvano G. (2001). Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. J. Food Prot. 64: 120–131.

35. Garrett K.A., Dendy S.P., Frank E.E., Rouse M.N., Travers S.E. (2006). Climate change effects on plant disease: genome to ecosystems. Ann. Rev. Phytopathol. 44: 489–509.

36. Goeger D. E., Anderson K. E., and Hsie A. W. (1998) Coumarin chemoproection against aflatoxinB1 induced gene mutation in a mammalian cell system: a species

difference in mutagen activation and protection with chick embryo and rat liver S9. Environ. Mol. Mutagen 32(1): 64–74.

37. Grbeša D. (2016.). Hranidbena svojstva kukuruza. BC Institut. Zagreb.

38. Grbeša D., Duvnjak M., Kljak K. (2014). Ublažavanje pojave mikotoksina u krmi i njihovih učinaka na životinje. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb.
39. Haskard C. A., El-Nezami H. S., Kankaanpa P. E. , Salminen S. i J. T. Ahokas (2001). Surface binding of aflatoxin B_1 by lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3086–3091.

40. Herting D. C. i Drury E. E. (1974). Antifungal activity of volatile fatty acids on grains. Cereal Chern. 51: 74-83.

41. Hitokoto H., Morozumi S., Wauke T., Sakai S. i Ueno I. (1978). Inhibitory effects of condiments and herbal drugs on the growth and toxin production of toxigenic fungi. Mycopathologia 66: 161-165.

42. Hoenisch R. W. i Davis R. M. (1994). Relationship between kernel pericarp thickness and susceptibility to Fusarium ear rot in field corn. Plant Dis. 78: 517-519.

43. Hussein S.H. i Brasel J.M. (2001). Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology. 167(2): 101-134.

44. Huwig A., Freimund S., Käppeli O., Dutler H. (2001). Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. Toxicol. Lett. 122: 179–188.

45. IPCC (2014). Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. IPCC Report 2014.

46. Jalili Maryam (2015). A Review on Aflatoxins Reduction in Food. Iranian Journal of Health, Safety & Environment. 3(1): 445-459.

47. Jayashree T., Subramanyam C. (2000). Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by Aspergillus parasiticus. Free Radic. Biol. Med. 29: 981–985.

48. Jouney J.P. (2007). Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxinsin feeds. *Animal Feed Sci. and Techn*. 37: 342–362.

49. K. Peltonen, H. El-Nezami, C. Haskard, J. Ahokas, S. Salminen (2001). Aflatoxin B_1 Binding by Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. J. Dairy Sci. American Dairy Science Association. 84:2152–2156.

50. Karunaratne A., Wezenberg E. i Bullerman L. B. (1990). Inhibition of mold growth and aflatoxin production by Lactobacillus sp. J. Food Prot. 53: 230–234.

51. Ketney O., Santini A. i Oancea S (2017). Recent aflatoxin survey data in milk and milk products. International Journal of Dairy Technology. 70: 1-12.

52. Kissell L., Davidson S., Hopkins B. A., Smith G. W. i Whitlow L. W. (2013). Effect of experimental feed additives on aflatoxin in milk of dairy cows fed aflatoxin-contaminated diets.Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 97: 694–700.

53. Kumar A., Shukla R., Singh P., Prasad C.S., Dubey N.K. (2008). Assessment of Thymus vulgaris L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation Toxin Reviews Downloaded from informahealthcare.com by University of Auckland on 10/15/14 For personal use only of food commodities. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 9: 575–580.

54. Kurtzman C. P . i Hesseltine C. W. (1970). Chlorine tolerance of microorganisms found in wheat and flour. Cereal Chern. 47: 244-246.

55. Maki C. R., Thomas A. D., Elmore S. E., Romoser A. A., Harvey R. B., Ramirez-Ramirez H. A. i Phillips T. D. (2016a). Effects of calcium montmorillonite clay and aflatoxin exposure on dry matter intake, milk production, and milk composition. J. Dairy Sci. 99: 1039–1046.

56. Martins M. L., i Martins H. M. (2000). Aflatoxin M1 in raw and ultra high temperature-treated milk commercialized in Portugal. Food Additives and Contaminants. 17: 871–874.

57. Masimango N., Ramaut J. L. i Remade J. (1979). Contribution a I' etude du role des additifs chimiques dans Ia lutte contre I' aflatoxine. Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires. 33(4): 116-123.

58. McMillian W.W., Widstrom N.W., Wilson D.M. (1987). Impact of husk type and species of infesting insects on afatoxin contamination in preharvest corn at Tifton, Georgia. Journal of Entomological Science 22: 307±310.

59. Mendez-Albores A., Ar ´ ambula-Villa G., Loarca-Pi ´ na M.G.F., Casta ˜ no-Tostado E., Moreno-Martınez E. (2005). Safety and efficacy evaluation of aqueous citric acid to degrade B-aflatoxins in maize. Food Chem. Toxicol. 43 (2): 233–238.

60. Mendez-Albores A., Del Rio-Gracia J.C., Moreno-Martinez E. (2006). Decontamination of aflatoxin duckling feed with aqueous citric acid treatment. Animal Feed Science and Technology. 135: 249-262.

61. Mishra H. N. i Chitrangada Das (2003). A Review on Biological Control and Metabolism of Aflatoxin Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 43(3): 245–264.

62. Molina M. i Giannuzzi L. (2002). Modelling of aflatoxin production by Aspergillus parasiticus in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. Food Research International 35: 585–394.

63. Ostrow D. H. i Lynch D. L. (1976). The inhibition of some clinically important fungi by caffeine. Microbios Lett. 3: 217-220.

64. Paster N., Barkai-Golan R. i Calderon M. (1979). Methyl bromide fumigation for the control of Aspergilli and Penicillia in stored grains. Ann. Appl. Bioi. 92: 313-321.

65. Paynee G.A. i Hagler W.M. Jr. (1983). Effect of specific amino acids on growth and aflatoksin production by Aspergillus parasiticus and aspergillus flavus in defined media. American Society for Microbiology.

66. Peltonenk K., El-Nezami H., Haskard C., Ahokas J. i Salminen S. (2001). Aflatoksin B_1 Binding by Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. Journal of Dairy Science. 84(10): 2152-2156.
67. Peraica, M., Rašić, D., Gluščić, V. (2014). Utjecaj aflatoksina na zdravlje ljudi. Glasilo biljne zaštite. 14(4): 310-316.

68. Phillips T. D. (1999). Dietary clay in the chemoprevention of aflatoxin-induced disease. Toxicol. Sci. 52: 118–126.

69. Phillips T.D., Afriyie-Gyawu E., Williams J., Huebner H., Ankrah N.A., Ofori-Adjei D., Jolly P., Johnson N., Taylor J., Marroquin-Cardona A., Xu L., Tang L., Wang J.S. (2008). Reducing human exposure to aflatoxin through the use of clay: a review. Food Addit. Contam. 25: 134–145.

70. Pitt J. I. (2004). Biocontrol of aflatoxins in peanuts. Meeting themycotoxin menace. Wageningen, Netherlands: Wageningen Academic Publishers. Str. 141-152.

71. Pitt J. I., Hocking A. D. (2009). Fungi and food spoilage (3rd ed.). New York: Springer.

72. Pleadin J., Frece J., Markov K. (2014). Aflatoksini - Onečišćenje, učinci i metode redukcije. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*. 9(3-4): 75-82.

73. Ramos A. J., Fink G. J., Hernandez J. (1996). Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of nonnutritive adsorbent compounds. Journal of Food Protection 59: 631–641.

74. Ramos A.J., Hernandez E. (1997). Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: a review. Anim Feed Sci Technol, 65: 197-206.

75. Raters M. I Matissek R. (2009). quantitation of Polycyclic aromatic Hydrocarbons (PAH4) in Cocoa and Chocolate Samples by an HPLC-FD Method. https://doi.org/10.1021/jf5028729.

76. Raters M., Matissek R. (2008). Thermal stability of aflatoxin B1 and ochratoxin A. Mycotoxin Research 24: 130-134.

77. Ray L. Lisa i Bullerman B. L. (1982). Preventing Growth of Potentially Toxic Molds Using Antifungal Agents Jounu1l of Food Protection. 45 (10): 953-963.

78. Ribeiro G.F., Corte-Real M. i Johansson B. (2006). Characterization of DNA damage in yeast apoptosis induced by hydrogen peroxide, acetic acid, and hyperosmotic shock. Mol Biol Cell 17: 4584–4591.

79. Sadia A., Jabbar M.A., Deng Y. I sur. (2012). A survey of aflatoxin M1 in milk and sweets of Punjab, Pakistan. Food Control 26: 235–240.

80. Sanchis, V, Magan, N. (2004). Environmental conditions affecting mycotoxins. In: Magan, N., Olsen, M., eds. Mycotoxins in food: detection and control. Abington, Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd and CRC PressLLC. .p.174–189.

81. Sarbhoy A. K ., Varshney I. L., Maheshwari M. L. i Saxena D. B. (1978). Efficacy of some essential oils and their constituents on few ubiquitous molds. Zbl. Bakt. II. Abt., Bd. 133(S): 732-735.

82. Sauer D. B. i Burroughs R. (1974). Efficacy of various chemicals as grain mold inhibitors. Trans. Am. Soc. Agr. Eng. 17: 557-559.

83. Sauer F. (1977). Control of yeasts and molds with preservatives. Food Techno!. 31(2): 66-67.

84. Schaafsma A., Hooker D.C. (2007). Climatic models to predict occurrence of Fusarium toxins in wheat and maize. International Journal of Food Microbiology. 119:116–125.

85. Schmidt R. J., Kung L., Jr. (2010). The effects of Lactobacillus buchneri with or without a homolactic bacterium on the fermentation and aerobic stability of corn silages made at different locations. Journal of Dairy Science. 93: 1616-1624.

86. Schmidt-Heydt M. and Geisen R. (2007). Gene expression as an indication for ochratoxin A biosynthesis in Penicillium nordicum Mycotox Res 23: 13–21

87. Schmidt-Heydt M. ,Magan, N., Geisen., R. (2008) Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes in relation to abiotic factors.FEMS Microbiology Letters. 284:142–149.

88. Schmidt-Heydt, M., Abdel-Hadi, A.,Magan, N, Geisen, R. (2009). Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of A.flavus in relation to various

combinations of water activity and temperature. International Journal of Food Microbiology. 135:231–237..

89. Shepherd G.S. (2003). Aflatoxin and food safety: recent African perspectives. Journal of Toxicology 22: 267–286.

90. Shim W.B., Yang Z.Y., Kim J.S. i sur. (2007). Development of immunochromatography strip-test using nanocolloidal gold-antibody probe for the rapid detection of aflatoxin B1 in grain and feed samples. Journal of Microbiology and Biotechnology 17: 1629–1637.

91. Shotwell O.L. (1997). Aflatoxin in Corn. Journal of the American Oil Chemists Society. 54(3): 216A- 224A.

92. Smith J.K., Girish C.K. (2012). Prevention and control of animal feed contamination by mycotoxins and reduction of their adverse effects in livestock. In: Animal Feed Contamination. Ed. Fink-Gremmels, J., Woodhead Publishing Limited. Cambridge, UK. str. 326-351.

93. Smith J.K., Girish C.K. (2012). Prevention and control of animal feed contamination by mycotoxins and reduction of their adverse effects in livestock. In: Animal Feed Contamination. Ed. Fink-Gremmels, J., Woodhead Publishing Limited. Cambridge, UK. Str. 326-351.

94. Stroud J. S. (2006). The effect of feed additives on aflatoxin in milk of dairy cows fed aflatoxin-contaminated diets. Disseration, North Carolina State University.

95. Subba M. S., Soumithri T. C. i Rao R. S. (1967). Antimicrobial action of citrus oils. I. Food Sci. 32: 225-227.

96. Sulzberger S. A., Melnichenko S. I Cardoso F. C. (2017). Effects of clay after an aflatoxin challenge on aflatoxin clearance, milk production, and metabolism of Holstein cows. J. Dairy Sci. 100: 1856–1869

97. Tejada-Castaneda Z.I., Avila-Gonzalez E., Casaubon-Huguenin M.T., Cervantes-Olivares R.A., Vasquez-Pelaez C., Hernandez-Baumgarten E.M., Moreno-Martinez E. (2008). Biodetoxification of aflatoxin-contaminated chick feed. Poultry Science. 87: 1569-1576.

98. Teller R.S., Schmidt R.J., Whitlow L.W., Kung Jr., L. (2012). Effect of physical damage to ears of corn before harvest and treatment with various additives on the concentration of mycotoxins, silage fermentation, and aerobic stability of corn silage. J. Dairy Sci. 95: 1428–1436.

99. Thalib A. (1995). Detoxification of aflatoxin in feed with a binder of polyvinylpolypyrrolidone. J Ilmiah Penelitian Ternak Klepu (Indonesia). 1: 43-48.

100. Tomašević-Canović M., Dakovic A., Rottinghaus G., Matijasevic S., Duricic M. (2003). Surfactant modified zeolites: new efficient adsorbents for mycotoxins. Micro Mes Mater. 61: 173-180.

101. Trckova M., Matlova L., Dvorska L. i Pavlik I. (2004). Kaolin, bentonite, and zeolites as feed supplements for animals: Health advantages and risks. Vet. Med. Czech. 49: 389–399.

102. Turner N.W., Subrahmanyam S. i Piletsky S.A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. Analytica Chimica Acta 632: 168–180.

103. Uraih N., Cassity T. R. i Chipley J. R. (1977). Partial characterization of the mode of action of benzoic acid on aflatoxin biosynthesis. Can. I. Microbial. 23: 1580-1584.

104. Van Rensburg C.E.J., Van Ryssen J.B.J., Casey N.H., Rottinghaus G. (2006). In Vitro and In Vivo Assessment of Humic Acid as an Aflatoxin Binder in Broiler Chickens. Poultry Science. 85: 1576-158.

105. Vandegraft E. E., Hesseltine C. W. i Shotwell0. L. (1975). Grain preservatives: effect on aflatoxin and ochratoxin production. Cereal Chern. 52: 79-84.

106. Ver Kuilen S. D. i Marth E. H. (1980). Sporicidal action of hypochlorite on conidia of Aspergillus parasiticus. J. Food Prot. 43: 784-788.

107. Wu F. i Guclu H. (2012). Aflatoxin regulations in a network of global maize trade. PLoS ONE 7 e45151.

108. Yiannikouris A., Andre G., Buleon A., Jeminet G., Canet I., Francois J., Bertin G., Jouany J. P. (2004). Comprehensive conformational study of key interactions involved in zearalenone complexation with b-D-glucan. Biomacromolecules 5: 2176–2185.

109. Yiannikouris A., Poughon L., Cameleyre X., Dussap, C., Francois J., Berting G. Jouany J. P. (2003). A novel technique to evaluate interactions between Saccharomyces cerevisiae cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. Biotechnology Letters 25: 783–788.

110. Yoon Y., Baeck Y.J. (1999). Aflatoxin binding and antimutagenic activities of Bifidobacterium bifidum HY strains and their genotypes. Koeran Journal of Dairy Science. 21: 291-298.

111. (519/2014) CRE. Commission Regulation (EU) No 519/2014 of 16 May 2014 amending Regulation (EC) No 401/2006 as regards methods of sampling of large lots, spices and food supplements, performance criteria for T-2, HT-2 toxin and citrinin and screening methods of analysis. In: Communities CoTE (ed). Official Journal of the European Union; 2014:L 147/29-/43. [75]

112. (401/2006) CRE. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. In: Communities CoTE (ed). Official Journal of the European Union; 2006:L 70/12– 70/34.

Životopis

Marijana Dežić je rođena u Tuzli, Bosna i Hercegovina, 18.07.1995. Završila je Opću gimnaziju u JU KŠC „Sv. Franjo“ u Tuzli. Govori dva strana jezika Engleski (razina C1) te Njemački (razina B1). Izvrsno poznaje rad na računalu, posebno u MS Office sustavu. Tijekom osnovne i srednje škole išla je na literaturne i likovne sekcije. Izuzetna je ljubiteljica umjenosti te i sama slika. Voli rad s djecom. Odrasla je na obiteljskoj farmi te obožava životinje i od malih nogu se brine za njih.