

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Anamarija Romac

7101/PT

**Vežanje AFM₁ iz mlijeka liofiliziranim stanicama
bakterija mliječne kiseline**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: Prof.dr.sc. *Ksenija Markov*

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za Biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Vežanje AFM₁ iz mlijeka liofiliziranim stanicama bakterija mliječne kiseline

Anamarija Romac, 0058206994

Sažetak:

Mikotoksini su sekundarni metaboliti toksikotvornih plijesni te su česti kontaminanti raznih prehrambenih proizvoda. Pojava aflatoksina M₁, vrlo otrovnog mikotoksina u mlijeku, prijetnja je zdravlju potrošača, osobito maloj djeci te dovodi do ekonomskih gubitaka zbog kontaminiranog mlijeka. Zbog navedenih činjenica traže se nove strategije za sprječavanje onečišćenja i štetnih djelovanja AFM₁. S ciljem razvijanja sigurne i praktične metode dekontaminacije, u ovom radu provedena su istraživanja s izoliranim sojevima bakterija mliječne kiseline u liofiliziranom obliku kojima je ispitana sposobnost vezanja AFM₁ u umjetno kontaminiranom mlijeku. Svi liofilizirani sojevi, živi ili termički tretirani vežu AFM₁, no žive stanice pokazuju veću sposobnost vezanja AFM₁ pa je tako najveći postotak vezanja AFM₁ postignut upotrebnom *Lactobacillus rhamnosus* KM i iznosi 92% nakon 4 sata.

Ključne riječi: (*aflatoksin M₁, bakterije mliječne kiseline, liofilizacija, mlijeko*)

Rad sadrži: 23 stranice, 7 slika, 2 tablice, 59 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof.dr.sc. Ksenija Markov

Pomoć pri izradi: Željko Jakopović, mag.ing.preh.ing.

Datum obrane: rujan, 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department for Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Binding of AFM₁ from milk by freeze-dried lactic acid bacteria

Anamarija Romac, 0058206994

Abstract:

Mycotoxins are secondary metabolites of toxic molds and are common contaminants of various food products. The appearance of aflatoxin M₁, a very toxic mycotoxin in milk is a threat to the health of consumers, especially young children and leads to economic losses due to contaminated milk. Because of the stated facts, new strategies for the prevention of pollution and harmful effects of AFM₁ are required. In order to develop a safe and practical decontamination method, this paper investigated binding effects of isolated lactic acid bacteria strains in lyophilized form on AFM₁ in artificially contaminated milk. All lyophilized strains, live or heat treated bind AFM₁, but live cells exhibit greater ability to bind AFM₁, so the highest percentage of AFM₁ binding was achieved using *Lactobacillus rhamnosus* KM and amounts 92% after 4 hours.

Keywords: (*aflatoxin M₁, lactic acid bacteria, lyophilisation, milk*)

Thesis contains: 23 pages, 7 figures, 2 tables, 59 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Ph.D. Ksenija Markov, Full professor

Technical support and assistance: Željko Jakopović, B.Sc.

Defence date: September, 2018.

Izrada ovog završnog rada omogućena je uz sredstva Hrvatske zaklade za znanost u sklopu projekta IP-2016-06-4306.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. MIKOTOKSINI	3
2.1.1. Aflatoksini	4
2.1.2. Aflatoksin M ₁	5
2.2. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE	6
2.3. LIOFILIZACIJA	7
2.4. VEZANJE AFM ₁	9
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1. MATERIJALI	10
3.1.1. Mikroorganizmi	10
3.1.2. Podloga za uzgoj mikroorganizama	10
3.1.3. Mikotoksin	11
3.1.4. Sirovina	11
3.1.5. Aparatura	11
3.1.6. Pribor	11
3.2. METODE RADA	12
3.2.1. Priprema uzoraka	12
3.2.2. Određivanje koncentracije AFM ₁ u mlijeku HPLC metodom	12
4. REZULTATI I RASPRAVA	14
5. ZAKLJUČCI	20
6. LITERATURA	21

1. UVOD

Plijesni su vrlo česti kontaminanti krmiva i krmnih smjesa, a pritom tvore toksične sekundarne metabolite – mikotoksine. Među mikotoksinima aflatoksini (AF) predstavljaju skupinu jednih od najtoksičnijih mikotoksina. Aflatoksini su hepatotoksični, karcinogeni, imunosupresivni sekundarni metaboliti plijesni roda *Aspergillus* (najčešće *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*) koji zahvaćaju usjeve poput kukuruza, riže, čili papričica, suncokretovih sjemenki, kikirikija i sličnih namirnica koje konzumiraju životinje. Od preko dvadeset poznatih aflatoksina i njihovih derivata, najpoznatiji su: B₁, B₂, G₁ i G₂ od kojih je najtoksičniji aflatoksin B₁. Nakon što je dokazano da kao produkt biološke pretvorbe aflatoksina B₁ (AFB₁) u mliječnim žlijezdama sisavaca hranjenih krmom koja je sadržavala spomenuti aflatoksin B skupine, nastaje aflatoksin M₁ (AFM₁), postoji zabrinutost oko ulaska mikotoksina u prehrambeni lanac čovjeka, ne samo kroz žitarice i proizvode od žitarica već i kroz meso, jaja, mlijeko i mliječne proizvode („carry over“ efekt) (Markov i sur., 2013; Giovati i sur., 2015; Pleadin i Kovačević, 2016). Aflatoksin M₁, hidrosilirani metabolit aflatoksina B₁, relativno je stabilna molekula u sirovim i obrađenim mliječnim proizvodima i ne može se inaktivirati toplinskim tretmanima poput pasterizacije ili sterilizacije (Govaris i sur., 2002). AFM₁ izlučuje se u mlijeku sisavaca, ali i putem izmeta i mokraće. AFM₁ dokazano uzrokuje akutne i kronične mikotoksikoze, a njegova prisutnost u mlijeku i mliječnim proizvodima posljedično predstavlja sve veću opasnost obzirom da, čak i ako se konzumiraju male količine, kroz neko vrijeme može ozbiljno ugroziti zdravlje (IARC, 2002). Izloženost mikotoksinima je neizbježna, a kako bi se ona smanjila na najmanju moguću mjeru, koriste se razne metode smanjenja kontaminacije mikotoksina. Iako su razvijene različite fizikalne i kemijske metode dekontaminacije, sve je veći interes za razvojem efikasnijih, ekonomičnijih i za okoliš prihvatljivijih metoda (Giovati i sur., 2015). Teži se razvoju bioloških metoda koje se provode pod blagim uvjetima, bez štetnih kemikalija i bez gubitka nutritivne vrijednosti proizvoda (Hassan i sur., 2015; Yang i sur., 2017). Raznim istraživanjima dokazano je da mikroorganizmi mogu reducirati ili u potpunosti ukloniti mikotoksine u hrani i krmi. Posebice su značajne bakterije mliječne kiseline (prvenstveno iz roda *Lactobacillus* i *Lactococcus*) budući da se koriste u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda kao starter kulture, produžuju trajnost proizvoda te su prihvaćene kao bezopasne za ljudsko zdravlje, odnosno dodijeljen im je GRAS (*eng.* Generally Recognized As Safe) status (Markov i sur., 2010). Problemi nastaju kada se komercijalne starter kulture koje se upotrebljavaju u mliječnoj industriji, a koje vežu AFM₁ natječu s autohtonom mikroflorom proizvoda mijenjajući tako njegova svojstva. Stoga je u ovom radu istražen utjecaj BMK

izoliranih iz tradicionalnih mliječnih proizvoda, u liofiliziranom obliku, na smanjenje koncentracije AFM₁ u mlijeku.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MIKOTOKSINI

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni koji induciraju akutne i kronične toksične učinke kod ljudi i životinja (IARC, 1993; 2002). Predstavljaju skupinu stabilnih kemijskih spojeva različite strukture i različitog biološkog djelovanja (Markov i sur., 2010; HAH, 2013), a do danas je otkriveno oko četristo vrsta mikotoksina, od čega su najznačajniji kontaminanti hrane aflatoksini (aflatoksin B₁, aflatoksin M₁), okratoksini (okratoksin A, okratoksin B), zearalenon (ZEA), fumonizini (fumonizin B₁, fumonizin B₂), trihoteceni (T-2 toksin) i patulin (PAT) (HAH, 2013; Hassan i sur., 2015; Varsha i Napoothiri, 2016). Do biosinteze mikotoksina dolazi pri određenim okolišnim uvjetima (prikladna relativna vlažnost, temperatura, sadržaj kisika) te u ovisnosti o fizičkom oštećenju supstrata i prisutnosti plijesni (Sassahra i sur., 2005; Pleadin i sur., 2014; Medina i sur., 2014). Mikotoksini su opasni zbog visoke toksičnosti u malim količinama i odsutnosti senzorskog upozorenja prilikom konzumacije hrane kontaminirane mikotoksinima (Markov i sur., 2010; Markov i sur., 2013).

Glavni izvor mikotoksina kod ljudi su žitarice poput kukuruza, pšenice, ječma, zobi i proizvodi na bazi žitarica te orašasti plodovi, ali i proizvodi životinjskog podrijetla uslijed sekundarnog onečišćenja plijesnima koje produciraju mikotoksine (Pleadin i sur., 2014). Na tvorbu mikotoksina prije i nakon žetve žitarica uvelike utječu klimatski uvjeti, a onečišćenje usjeva mikotoksinima povezuje se s visokim temperaturama okoliša, oštećenjima usjeva posredovanjem insekata te duljim sušnim razdobljima (Payne, 1998; Pleadin i sur., 2014).

Prisutnost mikotoksikogenih plijesni i/ili mikotoksina u hrani predstavlja značajnu opasnost za zdravlje ljudi, ali i veliki ekonomski problem (Čvek i sur., 2012) zbog utjecaja na kvalitetu proizvoda i ekonomičnost procesa proizvodnje (Šutić i Banina, 1979).

Mikotoksini su važni onečišćivači okoliša, a gutanjem, udisanjem ili dodiranjem i malih količina mikotoksina može doći do razvoja opasnih bolesti, nazvanih mikotoksikoze (Markov i sur., 2013). Veće doze mikotoksina uzrokuju akutna trovanja, dok dugotrajni unos manjih količina rezultira estrogenim, imunosupresivnim ili karcinogenim učincima (Pepeljnjak i sur., 2008).

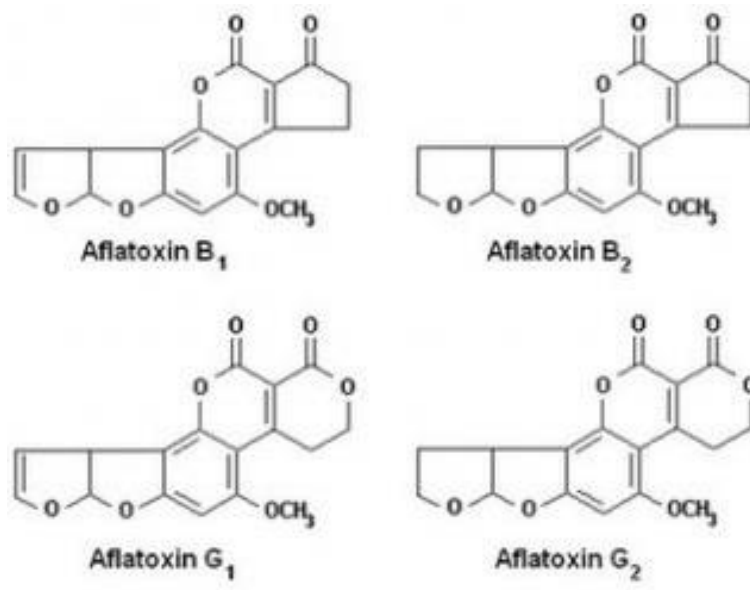
Aflatoksini su genotoksične kancerogene tvari, stoga je potrebno ograničiti ukupni sadržaj aflatoksina u hrani (zbroy aflatoksina B₁, B₂, G₁ i G₂) kao i pojedinačni sadržaj aflatoksina B₁ koji je daleko najtoksičniji sastojak. Najviše dopuštene količine mikotoksina

($\mu\text{g}/\text{kg}$ jestivog dijela namirnice) u hrani i hrani za životinje u RH propisane su Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 146/12).

2.1.1. Aflatoksini

Aflatoksini su najznačajniji mikotoksini i predstavljaju osnovu za njihovo istraživanje. Riječ je o heterocikličkim, sekundarnim metabolitima plijesni *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* (Milićević i sur., 2014; Duraković i Duraković, 2000), ali sintetizira ih i ograničen broj sojeva plijesni iz roda *Fusarium* i *Penicillium* (Dalić i sur., 2010; Varsha i Napoothiri, 2016). Aflatoksini su otkriveni drugom polovicom 20. stoljeća nakon smrti preko 100 000 komada peradi na farmama purana Velikoj Britaniji, uz nekrozu jetre kao uzrok smrti. Kako do tada nije poznata takva bolest, nazvana je „X bolešću purana“ (Pleadin i sur., 2014). Analizom kikirikijevog brašna korištenog za prehranu purana, izolirana je plijesan *Aspergillus flavus* i otkriven je do tada nepoznat spoj, koji pod UV svjetlom fluorescira plavo. Prema nazivu plijesni iz koje je prvotno izoliran, toksin je imenovan aflatoksinom (Lanchester i sur., 1961).

Aflatoksini su definirani kao derivati difurokumarina zbog čega i fluoresciraju, a stabilni su pri visokim temperaturama, dobro su topljivi u etanolu i metanolu, a veoma se dobro otapaju u kloroformu (Goldblatt, 1969). Poznato je preko trideset vrsta aflatoksina, a najpoznatiji su oni označeni prema fluorescenciji pod UV svjetlom: B₁ i B₂ (B - *eng.* blue, plavo) te G₁ i G₂ (G – *eng.* green, zeleno) (slika 1). Osim njih poznati su još i aflatoksin M₁ i M₂ (izolirani iz mlijeka, *eng.* milk). Najčešće prisutan, a pritom i najtoksičniji aflatoksin je aflatoksin B₁ (AFB₁) (Sezer i sur., 2013; Giovati i sur., 2015). Ciljni organ djelovanja aflatoksina je jetra, no aflatoksini nisu toksični samo za jetru nego imaju i druge neželjene učinke kao što su imunosupresivnost, mutagenost, teratogenost i karcinogenost (HAH, 2014). Budući da su aflatoksini termostabilni te se tijekom prerade hrane njihova količina tek neznatno smanjuje, važno je spriječiti njihovo nastajanje (Peraica i sur., 2014).



SLIKA 1. Strukturne formule aflatoksina B₁, B₂, G₁ i G₂ (Anonymus1)

Najveći stupanj akumulacije aflatoksina odvija se u tkivima u kojima se vrši njegova biotransformacija, a to su jetra i bubrezi (Leeson i Summers, 1995). Putem žuči se izlučuje oko 60%, a manji dio mokraćom i mlijekom u obliku metabolita M₁, P₁ i Q₁ ili u obliku njihovih konjugata (Sinovec i Resanović, 2005). U suprotnosti s mnogim mikotoksinima, aflatoksini moraju biti biološki transformirani prije nego što izazovu reakciju u živom organizmu. Kao rezultat biotransformacije, stvara se derivat AFB₁, aflatoksin B₁-2,3-epoksid, koji je visoko reaktivni metabolit i koji reagira s nukleofilnim mjestima u makromolekulama (Wild i Hall, 2000; Turner i sur., 2003).

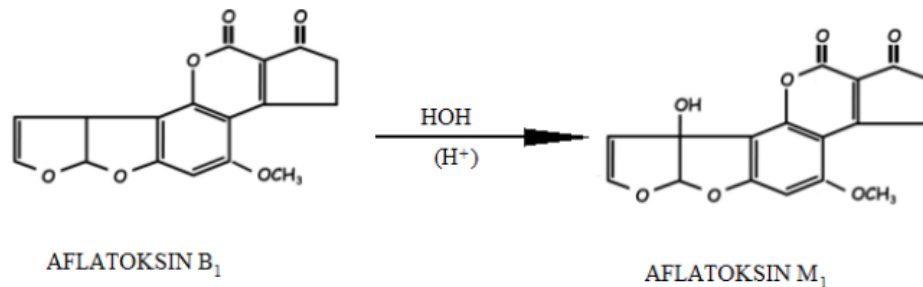
Akutno trovanje aflatoksinima naziva se aflatoksikoza i nastaje konzumiranjem izrazito kontaminirane hrane gdje se dnevni unos aflatoksina mjeri u miligramima pa su stoga dosta rijetke. Mnogo veći problem predstavlja kronično izlaganje aflatoksinima koje dovodi do karcinoma jetre.

2.1.2. Aflatoksin M₁

Aflatoksini M₁ i M₂ su dihidroderivati aflatoksina B₁ i B₂, a izlučuju se u mlijeku, mokraći i stolici kao produkti metabolizma aflatoksina B₁ i B₂ (Markov i sur., 2010; Peraica i sur., 2014).

AFM₁, metabolit AFB₁, produkt je biološke pretvorbe u mikrosomima jetre (slika 2), a izlučuje se u mlijeko kroz mliječne žlijezde sisavaca hranjenih krmom koja je sadržavala

spomenuti aflatoksin B skupine (Zdolec i sur., 2006). Aflatoksin M₁ je svakako najvažniji aflatoksin kada je riječ o toksičnosti aflatoksina s implikacijama na zdravlje ljudi (Gorelick, 1990) zbog mogućnosti izlučivanja prilikom laktacije kod životinja i žena (EFSA, 2004) te je svrstan u grupu 2B karcinogena (IARC, 2002). Mnogi istraživači su objavili da postoji linearna veza između količine AFM₁ u mlijeku i AFB₁ u krmivu (Kamkar, 2008).



SLIKA 2. Hidroksilacija aflatoksina B₁ u organizmu krave (Markov, 1991)

Zbog svog afiniteta prema proteinima mlijeka, AFM₁ može biti prisutan i u mliječnim proizvodima, a koncentracija AFM₁ ovisi o samom proizvodnom procesu pripreme mliječnih proizvoda, o vrsti proizvoda, udjelu vode i konačnom proizvodu. AFM₁ je relativno stabilna molekula u sirovim i obrađenim mliječnim proizvodima i ne može se inaktivirati toplinskim tretmanima poput pasterizacije za vrijeme obrade sira (Govaris i sur., 2002).

Koncentracija AFM₁ u sirovom mlijeku, termički obrađenom mlijeku i mlijeku za proizvodnju mliječnih proizvoda u zemljama članicama EU pa tako i u Republici Hrvatskoj, ne smije prelaziti 0,05 µg/L (EC, 2006) dok je najveća dozvoljena koncentracija u SAD-u 0,5 µg/L (FDA, 2005).

2.2. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline su skupina bakterija koje kao glavni produkt fermentacije ugljikohidrata proizvode mliječnu kiselinu. U njih se ubrajaju bakterije rodova *Streptococcus*, *Pediococcus* i različite vrste rodova *Lactobacillus*. S obzirom na konačni produkt fermentacije, bakterije mliječne kiseline dijele se na homofermentativne i heterofermentativne. Heterofermentativne, naspram homofermentativnih, osim mliječne kiseline proizvode i druge

produkte poput ugljikovog dioksida i etanola, a takve vrste su uglavnom bakterije iz roda *Leuconostoc* i neke vrste *Lactobacillus* roda (Frece i Markov, 2016).

Zbog svoje duge upotrebe bez štetnih utjecaja na ljudsko zdravlje imaju GRAS (*eng.* Generally Recognized As Safe) status prema Američkoj agenciji za hranu i lijekove (FDA, 2005), odnosno QPS (Qualified Presumption of Safety) status prema regulativi Europske Unije (Frece i Markov, 2016).

Bakterije mliječne kiseline predstavljaju jedinstvenu skupinu koja se u obliku čistih kultura koristi u proizvodnji, očuvanju i produljenju trajnosti fermentiranih proizvoda. Biosintezom mnogih antimikrobnih metabolita, bakterije mliječne kiseline inhibiraju rast mikotoksikogenih plijesni (Schnürer i Magnusson, 2005; Muñoz i sur., 2010; Varsha i Napoothiri, 2016), a mnoge imaju i potencijal interakcije s mikotoksinima.

Bakterije koje se koriste kao starter kulture u proizvodnji mliječnih proizvoda, mogu imati ulogu u smanjenju količine aflatoksina u hrani i krmivu (Markov i sur., 2010). Istraživanja koja se provode već više od tri desetljeća, pokazala su sposobnost vezanja aflatoksina pomoću BMK adhezijom za površinu stanične stijenke bakterije (Muñoz i sur., 2010; Hassan i sur., 2015). Stoga se primjenjuju kao alternativa fizikalnim i kemijskim metodama kontrole rasta plijesni. BMK koje posjeduju antifungalna svojstva prema mikotoksikogenim plijesnima obuhvaćaju rodove *Lactococcus* i *Lactobacillus*, a u manjoj mjeri i rodove *Pediococcus* te *Leuconostoc* (Dalié i sur., 2010).

2.3. LIOFILIZACIJA

Liofilizacija je jedinstveni postupak sušenja namirnice u zamrznutom stanju, a koristi se za očuvanje mikroorganizama i preferirana je metoda za skupljanje kultura diljem svijeta u ovlaštenim institucijama, poput Američke zbirke mikroorganizama „American Type Culture Collection“ (ATCC) ili Belgijske zbirke mikroorganizama „Belgian Coordinated Collection of Microorganisms“ (BCCM). Tehnološke operacije koje obuhvaća postupak liofilizacije odnose se prvenstveno na zamrzavanje i sublimaciju vode iz zamrznutog materijala (Lovrić, 2003).

Liofilizirani materijal omogućuje lako rukovanje te jeftin i lak transport. Kako bi se osigurala dovoljna količina stanica nakon liofilizacije za dugoročno skladištenje i oporavak stanica za daljnje uspješno razmnožavanje soja, preporuča se liofiliziranje koncentriranih kultura oko 10^7 stanica po gramu (Morgan i sur., 2006).

Proces liofilizacije temelji se na sublimaciji, koja je podijeljena u tri faze; smrzavanje te dvije faze sušenja. Stanice se prvo smrzavaju na vrlo niskim temperaturama (primjerice -196 °C) te se zatim suše sublimacijom pod vakuumom (Santvarangkna i sur., 2007). Većina stanica se inaktivira u fazi smrzavanja tako da 60-70% stanica koje prežive smrzavanje mogu preživjeti fazu dehidratacije. Tijekom smrzavanja, formiranje izvanstaničnog leda uzrokuje povećanje izvanstanične osmolalnosti, tako da čim se formira led izvan stanice počinje dehidratacija stanice.

Postoje dva tipa smrzavanja, sporo smrzavanje i brzo smrzavanje. Tijekom sporog smrzavanja proces postepene dehidratacije stanica, uslijed stvaranja leda izvan stanica uzrokuje veliku štetu stanice, dok brzim smrzavanjem možemo izbjeći efekte razaranja i smanjivanja stanica (Fowler i Toner, 2005). Brzina hlađenja, odnosno smrzavanje, ovisi o dvije osnovne varijable, a to su: pokretna sila, koja rezultira iz temperaturnog gradijenta, tj. razlike temperature između proizvoda i rashladnog medija; otpor prijenosu topline koji ovisi o sastavu, odnosno svojstvima proizvoda, njegovim dimenzijama (debljini), brzini strujanja rashladnog medija, stupnju kontakta između proizvoda i rashladnog medija itd.

Također, postoje dva načina smrzavanja uzoraka prije sušenja: unutar komore liofilizatora preko ohlađenih polica ili mikroorganizam može biti smrznut prije unošenja u liofilizator. Smrzavanje unutar liofilizatora uzrokuje sporo formiranje ledene strukture kristala, koji mogu uzrokovati oštećenja krhkih staničnih membrana, a ne mogu se oporaviti nakon sušenja, što uzrokuje smanjenje stope preživljavanja. S druge strane, jedna od najpogodnijih metoda zamrzavanja bioloških stanica je smrzavanje u tekućem dušiku, koja prvo uključuje smrzavanje mikroorganizma, a zatim unošenje zamrznutog mikroorganizma u liofilizator.

Dokazano je da s površinom stanice raste i mogućnost oštećenja membrane što je posljedica stvaranja kristalića leda pa su tako enterokoki, koji imaju male sferične stanice, izdržljiviji prilikom liofilizacije od, na primjer laktobacila koji imaju veće štapićaste stanice (Fonesca i sur., 2000). Uklanjanje međustanične vode bakterijskih stanica sušenjem uzrokuje oštećenje površinskih proteina, stanične stijenke te stanične membrane. Međustanična voda igra važnu ulogu u stabiliziranju strukturne i funkcionalne cjelovitosti bioloških makromolekula kroz različite tipove slabih veza, uključujući one koje su prisutne u staničnoj stijenci i staničnoj membrani (Brennan i sur., 1986). Kako bi se postigli optimalni rezultati tijekom sušenja mikroorganizama, važno je fokusirati se na minimalizaciju oštećenja lipidnog dvosloja te RNA i DNA. Brojni zaštitni agensi dodaju se u medij za sušenje prije liofilizacije kako bi se učinkovitije zaštitila fiziološka aktivnost mikroorganizma tijekom dehidratacije. Kao zaštitni agensi, najčešće se koriste obrano mlijeko u prahu, proteini sirutke, trehaloza, saharoza,

glukoza, laktoza i polimeri poput dekstrana i polietilen glikola (Morgan i sur., 2006). Postotak preživljavanja bakterijskih stanica nakon liofilizacije ovisi o velikom broju faktora, uključujući soj mikroorganizma i učinkovitost zaštitnih agensa tijekom liofilizacije.

2.4. VEZANJE AFM₁

Uvjeti postizanja uspješne dekontaminacije uključuju: inaktivaciju mikotoksina transformacijom u netoksične produkte, uništavanje micelija i spora plijesni da se spriječi tvorba novih toksina, zadržavanje nutritivne vrijednosti hrane i krmiva, minimalne promjene fizikalnih svojstava sirovine te proces mora biti ekonomski isplativ tj. izvediv u smislu da bi trošak dekontaminacije trebao biti manji od vrijednosti kontaminirane robe. Postoje tri mogućnosti da se izbjegnu štetni učinci onečišćenja hrane i hrane za životinje uzrokovani mikotoksinima, a to su prevencija kontaminacije, dekontaminacija i inhibicija apsorpcije mikotoksina iz konzumirane hrane u probavni trakt. Kada se kontaminacija ne može spriječiti, primjena dekontaminacije je obavezna, a jedan od najjednostavnijih načina je fizikalno uklanjanje kontaminiranog zrna ručnom selekcijom, što se najčešće ne primjenjuje obzirom na dugotrajnost procesa. Djelomično uklanjanje mikotoksina može se postići suhim čišćenjem žita, a obzirom da ih je većina termostabilna, uobičajeni toplinski postupci uklanjanja nisu od bitnog utjecaja (Bata i Lasztity, 1999).

U brojnim istraživanjima, detoksifikaciju, odnosno inaktivaciju mikotoksina u onečišćenom krmivu, pokušalo se postići gama zračenjem, toplinskom inaktivacijom, fizičkim odjeljivanjem, razgradnjom mikrobne flore te različitim kemijskim postupcima (Piva i sur., 1995., Rustom 1997).

Biološke metode dekontaminacije uključuju korištenje sredstava za apsorpciju te mikroorganizme i enzime. Od mikroorganizama koji prevode toksični spoj u manje toksičan oblik, a ponekad ga uz nazočnost određenog enzima i razgrade, uključene su neke bakterije, posebice iz skupine bakterija mliječne kiseline, bifidobakterija i propionibakterija u hrani, s ciljem smanjenja koncentracije mikotoksina. Određene bakterije, zbog osobitosti stanične stijenke, mogu vezati mikotoksine te se stvoreni kompleks bakterija-mikotoksin izlučuje fecesom (Rimar, 2017). Brojnim istraživanjima dokazana je mogućnost vezanja aflatoksina pomoću bakterija mliječne kiseline. Tako su na primjer, Markov i sur. (2010.) dokazali da izolat *L. delbruecki* S1 kao i standard *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 imaju sposobnost smanjenje koncentracije AFM₁ u mlijeku za više od 50% tijekom 48 sati.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Mikroorganizmi

Bakterijske kulture *Lactobacillus plantarum* SM1, *Lactobacillus plantarum* KM, *Lactobacillus paracasei* KM, *Lactobacillus rhamnosus* KM te *Lactococcus lactis* 5MS1 dobivene iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, korištene su kao testni mikroorganizmi za određivanje vezanja AFM₁ u mlijeku. Kulture su čuvane u MRS bujonu (de Man-Rogosa-Sharpe, Biolife, Milano, Italija) pri temperaturi od 4°C do izvođenja pokusa.

3.1.2. Podloga za uzgoj mikroorganizama

Za uzgoj bakterijskih kultura korišten je MRS bujon, a sam uzgoj bakterijskih kultura proveden je u laboratorijskim uvjetima pri 37°C tijekom 72 sata.

MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) bujon sastava: (g/L)

• pepton	10
• mesni ekstrakt	10
• kvašćev ekstrakt	5
• glukoza	20
• tween 80	1
• MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,1
• MnSO ₄ × 7H ₂ O	0,05
• natrijev-acetat	5

- u destiliranoj vodi pH vrijednost podloge je 6,5
- sterilizacija pri 121 °C kroz 15 min

3.1.3. Mikotoksin

Standard AFM₁ nabavljen je od LGC Promochem (Leeds, UK). Radna otopina AFM₁ pripremljena je razrjeđivanjem standarda, 0.5 µg/mL u acetonitrilu do 0.05 µg/mL i pohranjena na 4 °C do izvođenja pokusa.

3.1.4. Sirovina

Kao sirovina za određivanje vezanja AFM₁ korišteno je trajno mlijeko, s 2.8% mliječne masti kupljeno u lokalnoj trgovini. Mlijeko u prahu, s 10% mliječne masti korišteno je kao krioprotektor.

3.1.5. Aparatura

- termostat (Sutjeska, Beograd)
- autoklav (Sutjeska, Beograd)
- vibromikser EV-102 (Tehtnica, Železniki)
- tehnička vaga (Sartorius, Njemačka)
- vodena kupelj (INKOLAB, Hrvatska)
- centrifuga (Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka)
- centrifuga s hlađenjem (Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka)
- liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus (Christ GmbH, Osterode, Njemačka)
- HPLC Agilent 1100 (Agilent, Santa Clara, CA, SAD)

3.1.6. Pribor

- Erlenmeyer tikvice 500 mL
- Petrijeve zdjelice ø 10 cm
- mikrobiološke epruvete 18 × 180 mm
- mikropipete 100 i 1000 µL Justor 100G (Sartorius, Njemačka)
- kivete 10 i 50 mL
- penicilinke s gumenim čepovima 10 mL

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema uzoraka

Odabrane bakterijske kulture, prethodno čuvane u MRS bujonu na 4 °C, uzgojene su naciepljivanjem u 3 x 5 mL MRS bujona i inkubirane na 30 °C tijekom 24 sata. Svaki bakterijski soj je zatim naciepljen u 25 mL MRS bujona i inkubiran na 37 °C tijekom 24 sata. Centrifugiranjem sakupljena je biomasa porasla u aseptičkim uvjetima na sobnoj temperaturi, zatim isprana 3 puta s 5 mL sterilne deionizirane vode i suspendirana u sterilnoj deioniziranoj vodi te podijeljena u dvije skupine. Prvu skupinu čine žive stanice BMK, drugu mrtve (termički tretirane) tretiranjem pri temperaturi od 100 °C kroz 60 minuta u laboratorijskoj vodenoj kupelji. Serijom decimalnih razrjeđenja određen je broj živih stanica, brojanjem poraslih kolonija na MRS agaru (Biolife, Milano, Italija) do koncentracije od 10⁸ CFU/mL. Stanice BMK odvojene su centrifugiranjem na 3000 x *g* tijekom 10 minuta i pripremljene u količini od 1 mg biomase/mL. Bakterijska biomasa dobivena centrifugiranjem pripremljena je za liofilizaciju suspendiranjem u 1 mL 10%-tnog obranog mlijeka, zatim podijeljena u alikvote po 1,5 mL i smrznuta na -20 °C preko noći. Korišten je liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus (Christ GmbH, Osterode, Njemačka) pri temperaturi od -55 °C tijekom 24 sata.

Uzorcima mlijeka kojima nije dokazana koncentracija AFM₁ dodane su liofilizirane žive stanice (0,5 %) i termički tretirane liofilizirane (1mg/mL) stanice te aflatoksin M₁ do konačne koncentracije od 0,50 µg/L uzorka. Uzorci s bakterijama i AFM₁ su potom inkubirani na 4 °C te su sakupljeni nakon 0., 2., 4. i 24. sata inkubacije kako bi se HPLC tehnikom odredila količina nevezanog AFM₁.

3.2.2. Određivanje koncentracije AFM₁ u mlijeku HPLC metodom

Za određivanje koncentracije AFM₁ u mlijeku kao prikladna potvrdna metoda korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC; eng. High Performance Liquid Chromatography). HPLC metoda se općenito odlikuje visokom osjetljivošću i velikom sposobnosti razlučivanja analita.

Prije HPLC analize, uzorci su pročišćeni imunoafinitetnim kolonama (Vicom) uz dodatak 10 mL PBS pufera. Brzina protoka nije prelazila 3mL/min. Nakon ispiranja kolona s 10 mL destilirane vode i sušenja u vakuumu, AFM₁ je eluiran s 4 mL acetonitrila. Prikupljeni eluat uparen je u struji dušika. Koncentracija preostalog AFM₁ u uzorcima, određena je na Agilent

1100 HPLC uređaju (Agilent, Santa Clara, CA, SAD), opremljenim s CSI-6150 vakuum isparivačem, Agilent pumpom (model G 1310 A9) te fluorescentim detektorom valnih duljina eksitacije i emisije 365 odnosno 455 nm. Odvajanje je provedeno na Synergi Polar koloni (150x3,0 mm, 4 μ m) (Agilent). Mobilna faza (voda/acetonitril, 60/40, v/v) eluirana je pri protoku 0,5 mL/min, a vrijeme retencije AFM₁ bilo je 3,5 min. Parametri validacije prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Parametri validacije HPLC metode

Parametar	Kriterij prihvatljivosti	Rezultati
Selektivnost	Informacija ^b	Zadovoljava
Iskorištenje	0,005 μ gkg ⁻¹ \Rightarrow informacija ^b	57,0 %
	0,01 μ gkg ⁻¹ \Rightarrow informacija ^b	58,9 %
	0,05 μ gkg ⁻¹ \Rightarrow informacija ^b	79,1%
	> 0,05 μ gkg ⁻¹ \Rightarrow 70 do 110 % ^a	102%
Preciznost - preciznost mjerenja	RSD \leq 20% ^c	1,92%
Linearnost	$k \geq 0,999$ ^b	0,999
Granica detekcije	$\leq 1/3\text{MDK}$ (0,017 μ gkg ⁻¹) ^b	0,0025 μ gkg ⁻¹
Granica kvantifikacije	$\leq 1/2\text{MDK}$ (0,025 μ gkg ⁻¹) ^b	0,005 μ gkg ⁻¹

^a prema Uredbi komisije (EZ) br. 401/2006 o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani

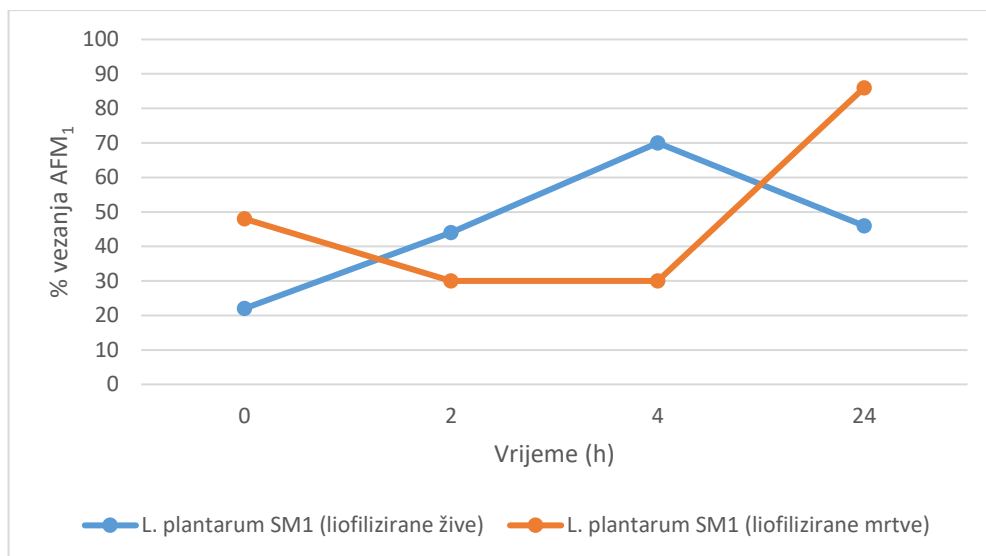
^b prema rezultatima validacijskih eksperimenata

^c Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (NN 02/05)

4. REZULTATI I RASPRAVA

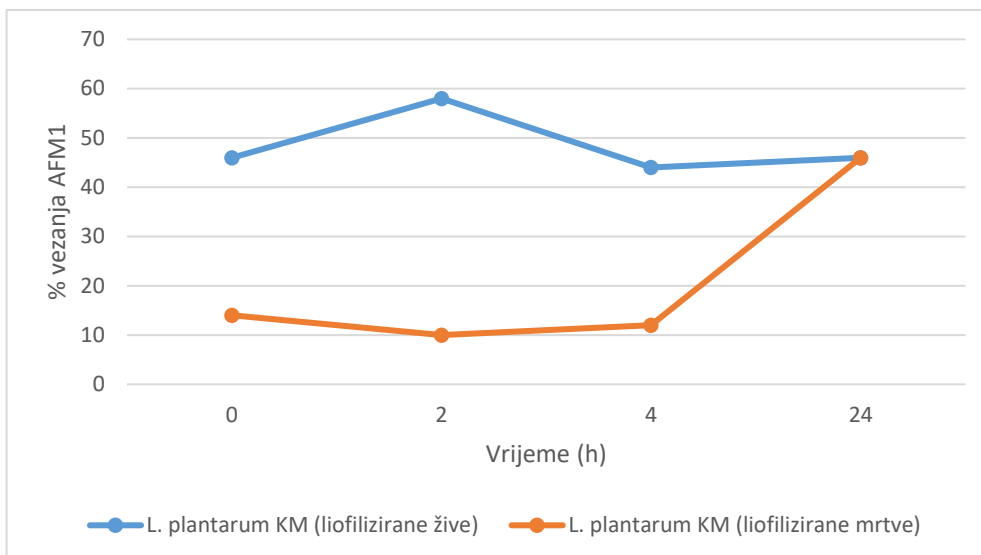
Odabranim sojevima BMK određena je sposobnost vezanja AFM₁ u mlijeku. Prilikom provođenja eksperimenata korištene su liofilizirane žive stanice te liofilizirane mrtve (termički tretirane) stanice BMK. Na slikama 3-7 prikazani su dobiveni rezultati vezanja AFM₁ u mlijeku s odabranim bakterijskim kulturama, dok je u tablici 2 prikazan raspon koncentracija AFM₁ u mlijeku tijekom 24 sata inokuliranom s liofiliziranim živim stanicama te liofiliziranim mrtvim (termički tretiranim) stanicama BMK.

Na slici 3 prikazan je %-tak vezanja AFM₁ liofiliziranim živim i mrtvim stanicama bakterije *L. plantarum* SM1 u ovisnosti o vremenu inkubacije.



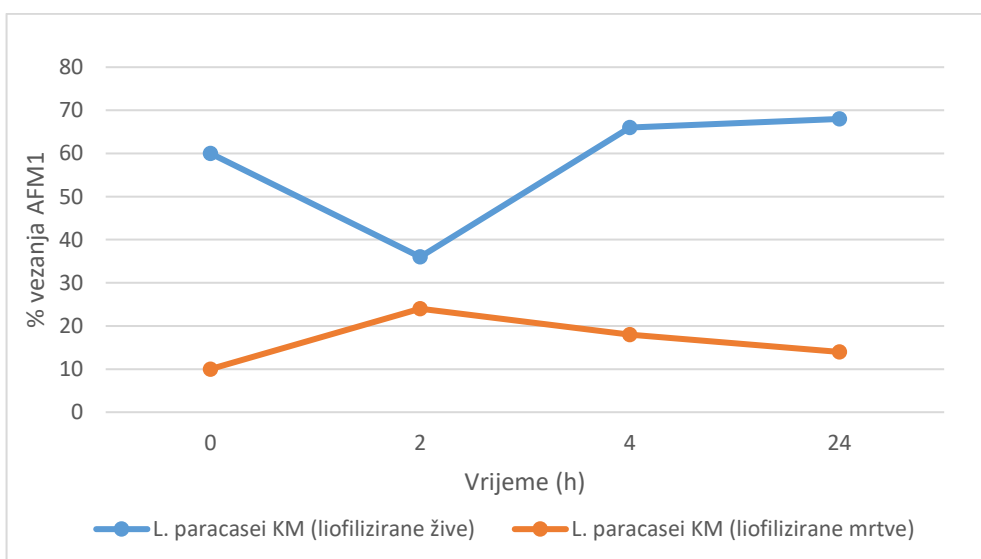
Slika 3. Vezanje AFM₁ liofiliziranim živim i mrtvim stanicama bakterije *L. plantarum* SM1

Dobiveni rezultati pokazuju kako su žive stanice *L. plantarum* SM1 imale najveći postotak vezanja AFM₁ (70%) nakon 4 sata inkubacije, dok su mrtve stanice pokazale najveći postotak nakon 24 sata inkubacije koji je bio veći i iznosio 86%. Mrtve tj. termički tretirane stanice *L. plantarum* SM1 pokazale su slabije vezanje u usporedbi sa živim stanicama nakon 2. i 4. sata inkubacije, međutim pokazale su se mnogo djelotvornijima u 0. satu i nakon 24 sata.



Slika 4. Vežanje AFM₁ liofiliziranim živim i mrtvim stanicama bakterije *L. plantarum* KM

Iz rezultata prikazanih na slici 4 vidljivo je da su termički tretirane stanice *L. plantarum* KM pokazale mnogo manji postotak vezanja aflatoksina M₁ u usporedbi sa živim stanicama, osim u 24. satu inkubacije kada su i žive i mrtve stanice vezale 46% AFM₁. Najveći postotak vezanja od 58% postignut je kod 2. sata inkubacije sa živim stanicama ovog soja.

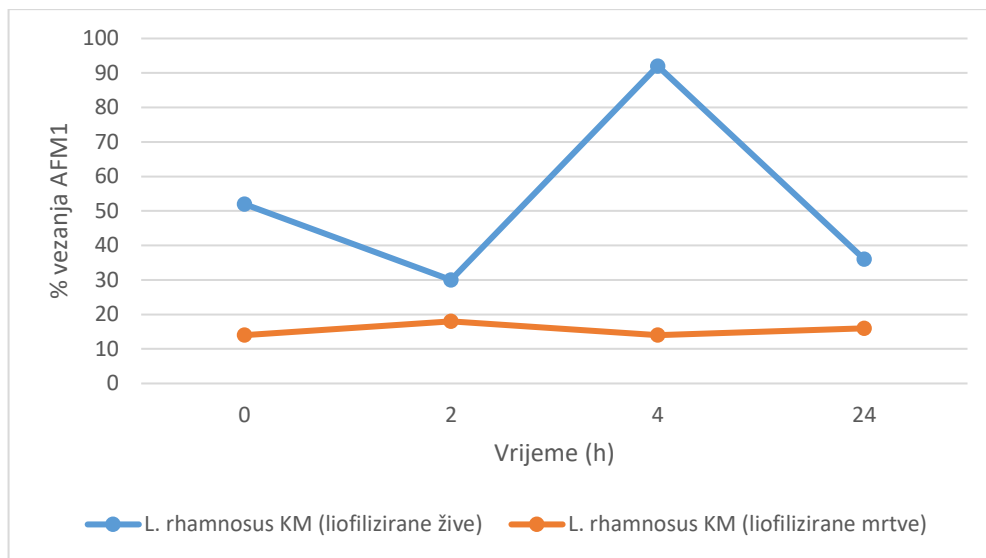


Slika 5. Vežanje AFM₁ liofiliziranim živim i mrtvim stanicama bakterije *L. paracasei* KM

Bakterijski soj *L. paracasei* KM pokazuje puno veću sposobnost vezanja aflatoksina M₁ s živim stanicama u odnosu na mrtve i pokazuje najveći postotak vezanja nakon 24. sata u

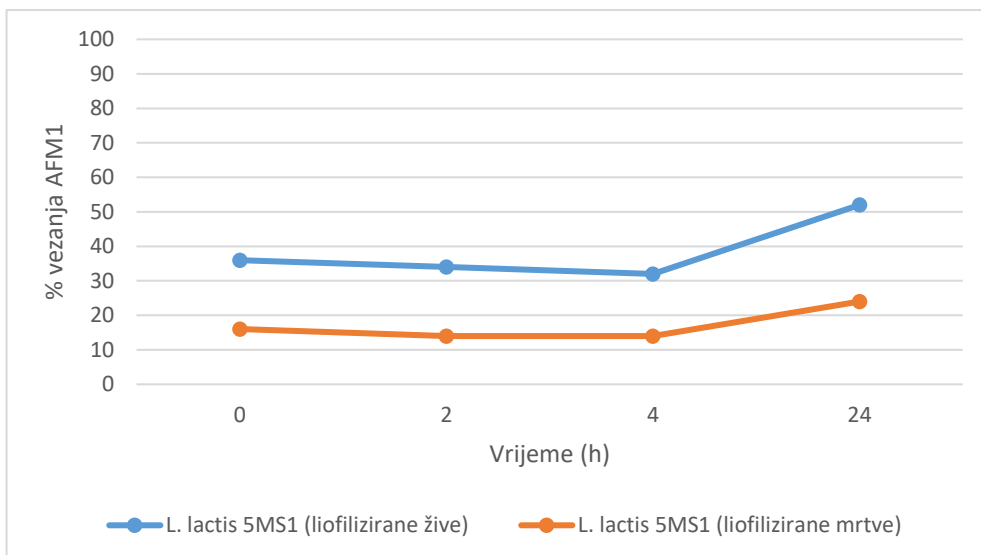
iznosu od 68%, a nešto manji nakon 4. sata u iznosu od 66%. Najveći postotak vezanja aflatoksina M₁ mrtvim stanicama soja *L. paracasei* KM postignut je nakon 2. sata i iznosio je tek 24% (slika 5).

Slika 6 prikazuje vezanje AFM₁ iz umjetno kontaminiranog mlijeka tijekom 24 sata uzgoja bakterijskom kulturom *L. rhamnosus* KM.



Slika 6. Vezanje AFM₁ liofiliziranim živim i mrtvim stanicama bakterije *L. rhamnosus* KM

Mrtve stanice soja *L. rhamnosus* KM pokazuju znatno slabiju sposobnost vezanja aflatoksina M₁ u usporedbi sa živim stanicama, a pokazale su se najefikasnijima nakon 2. sata s postignutih 18%. Suprotno tome, žive stanice su pokazale veliku sposobnost vezanja nakon 4. sata inkubacije pa tako imaju najveći postotak vezanja AFM₁ u iznosu od 92%, iako u ostalim vremenima inkubacije pokazuju puno manju sposobnost vezanja (52%, 30% i 36% u nultom satu, 2. odnosno 24. satu inkubacije), što je i dalje znatno više od mrtvih stanica ovog soja.



Slika 7. Vežanje AFM₁ liofiliziranim živim i mrtvim stanicama bakterije *L. lactis* 5MS1

L. lactis 5MS1 bakterijski soj pokazuje donekle kontinuirane rezultate tijekom vremena inkubacije, odnosno postotak vežanja AFM₁ termički tretiranih i živih stanica slijedi sličnu liniju trenda. Tijekom cijelog vremena inkubacije, žive stanice imaju veći postotak vežanja AFM₁ za otprilike 20%, a najviše je AFM₁ vezano nakon 24. sata u iznosima od 52 i 24%, živim odnosno termički tretiranim stanicama (slika 7).

U tablici 2 prikazan je raspon koncentracija nevezanog AFM₁ nakon tretmana liofiliziranim živim i mrtvim stanicama odabranih BMK tijekom 24 sata trajanja pokusa.

Tablica 2. Koncentracija AFM₁ (μg/L) u prisutnosti BMK tijekom 24 sata

Soj Tretman	Raspon koncentracija AFM ₁ (μg/L)	
	Liofilizirane žive stanice	Liofilizirane mrtve (termički tretirane stanice)
<i>L. plantarum</i> SM1	0,15-0,39	0,07-0,35
<i>L. plantarum</i> KM	0,21-0,28	0,27-0,45
<i>L. paracasei</i> KM	0,16-0,32	0,38-0,45
<i>L. rhamnosus</i> KM	0,04-0,35	0,41-0,43
<i>L. lactis</i> 5MS1	0,24-0,34	0,38-0,42

Rezultati iz tablice 2. pokazuju kako je najveći udio aflatoksina M₁ zaostao prilikom tretiranja mlijeka s liofiliziranim mrtvim stanicama bakterijske kulture *L. rhamnosus* KM, što je u skladu s rezultatima na slici 6. Najveći postotak vezanja aflatoksina M₁ postignut je upotrebom liofiliziranih živih stanica u usporedbi s mrtvima, izuzev *L. plantarum* SM1 što je vidljivo na slici 5.

Dobiveni rezultati prikazuju veći postotak vezanja AFM₁ u odnosu na rad Pierides i sur. (2000), kod kojih je postotak vezanja AFM₁ za žive stanice *Lactobacillus* sojeva iznosio 18,3 do 53,8% u vremenu inkubacije od 15-16 sati. Slične rezultate vezanja, ali za AFB₁, dobili su Peltonen i sur. (2001) ispitivanjem 15 sojeva BMK. Dosada nije zabilježen slučaj u kojem su rezultati vezanja AFM₁ veći u usporedbi s AFB₁, a to su potvrdili Pierides i sur. (2000) budući da se raspon vezanja AFB₁ pomoću BMK kretao od 75,3 do 76,1%. Manji postotak vezanja AFM₁ može biti posljedica dodatne -OH skupine u molekuli AFM₁ što rezultira povećanom polarnošću molekule. Budući da je hidrofilnija, molekula AFM₁ ima tendenciju zadržavanja u vodenim otopinama. Sposobnost vezanja AFM₁ u otopini jedinstvena je značajka svakog soja bakterije mliječne kiseline (Pierides i sur., 2000).

U istraživanju Kabaka i Vara (2008) pokazalo se da je kapacitet vezanja AFM₁ dodatkom *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* sojeva u rekonstituiranom mlijeku u rasponu od 7,85 do 25,94% te 12,85 do 27,31% za žive odnosno za termički tretirane bakterije tijekom inkubacije od 4 sata. Iako mehanizam djelovanja BMK na aflatoksin M₁ još nije razjašnjen, Lahtinen i sur. (2004) su zaključili kako su dvije glavne komponente na koje se aflatoksin veže, polisaharidi stanične stijenke te peptidoglikan i njemu srodni spojevi, dok su Shetty i Jespersen (2006) potvrdili da se mikotoksini vežu odnosno uklanjaju prijanjanjem na komponente stanične stijenke, umjesto kovalentnim vezanjem ili metaboliziranjem kao i da mrtve stanice ne gube sposobnost vezanja mikotoksina.

Rezultati istraživanja dobiveni u ovom radu pokazuju da *Lactobacillus* vrste vežu od 22-92 % AFM₁ (slike 3-6), a slične rezultate su dobili i El-Nezami i sur. (1998) koji su dokazali vezanje AFM₁ od 50±1% do 65±2% liofiliziranim živim stanicama.

Elgerbi i sur. (2006) su ispitivali sposobnost 8 sojeva BMK i 4 soja bifidobakterija za uklanjanje aflatoksina M₁ iz mlijeka i fosfatnog pufera. Uklanjanje toksina iz UHT mlijeka pokazalo se veće uz primjenu BMK u usporedbi s bifidobakterijama. Od bakterija mliječne kiseline, *Lactobacillus bulgaricus* bio je najučinkovitiji, uklonivši 80,5% AFM₁ iz UHT mlijeka, zatim *Lactobacillus plantarum* uklanjajući 73% aflatoksina M₁. *Lactobacillus* sojevi uklonili su aflatoksin M₁ u rasponu od 64,0-80,5%, *Lactococcus* sojevi 46,0-68,5% i *Bifidobacterium*

sojevi između 67,0 i 72,5% AFM₁ iz mlijeka, što ukazuje na potrebu za daljnjim ispitivanjima interakcija između različitih sojeva BMK i AFM₁.

Iz rezultata prikazanih na slici 3, vidljivo je da mrtve stanice bakterije *L. plantarum* SM1 vežu 86% AFM₁, što je u suglasnosti s istraživanjima Bovo i sur. (2013) koji su dobili veći postotak vezanja AFM₁ za mrtve stanice nego za žive, koristeći *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* sojeve u umjetno kontaminiranom obranom mlijeku i PBS puferu.

Obzirom da korištenje BMK kao starter kultura ili probiotičkih kultura značajno ovisi o primjenjenim tehnologijama očuvanja, primjena liofilizacije pokazala se kao korisnom u pogledu održivosti i aktivnosti bakterija. Carvalho i sur. (2004) tako su primijetili kako zamrzavanjem osušeni pripravci pokazuju prednosti u odnosu na pripravke načinjene drugim tehnikama u smislu dugoročnog očuvanja.

5. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata istraživanja može se zaključiti:

1. Termički tretirane liofilizirane stanice bakterija mliječne kiseline imaju manju sposobnost vezanja AFM₁ u umjetno kontaminiranom mlijeku u odnosu na žive liofilizirane stanice, s jednim izuzetkom, *L. plantarum* SM1 koji je vezao 86% AFM₁ nakon 24 sata.
2. Sposobnost vezanja AFM₁ bakterijama mliječne kiseline u umjetno kontaminiranom mlijeku ovisi o vremenu izloženosti mlijeka bakterijama, ali i korištenom soju.
3. Liofilizirane žive stanice bakterije *L. rhamnosus* KM pokazale su najveći postotak vezanja AFM₁, nakon 4 sata inkubacije.

6. LITERATURA

1. Anonymus1 (2018) Aflatoksini, <<https://oehha.ca.gov/chemicals/aflatoxins>> Pristupljeno 30.8.2018.
2. Bata A., Lasztity R. (1999) Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms, *Trends in Food Science & Technology* **10**: 223-228.
3. Bovo F., Franco L., Rosim R., Trindade C., Oliveira C. (2014) The Ability of *Lactobacillus rhamnosus* in Solution, Spray-dried or Lyophilized to Bind Aflatoxin B1. *Journal of Food Research* **3** (2): 35-43.
4. Brennan M., Wanismail B., Johnson M.C., Ray B. (1986) Cellular Damage in Dried *Lactobacillus acidophilus*, *Journal of Food Protection* **49** (1): 47-53.
5. Carvalho A.S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F.X., Gibbs P. (2004) Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria, *International Dairy Journal* **14**: 835-847.
6. Čvek D., Markov K., Frece J., Friganović M., Duraković L., Delaš F. (2012) Adhesion of Zearalenone to the Surface of Lactic Acid Bacteria Cells, *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **7**: 49-52.
7. Dalić D.K.D., Deschamps A.M., Richard-Forget F. (2010) Lactic acid bacteria - Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review, *Food Control* **21**: 370-380.
8. Duraković S. i Duraković L. (2000) Specijalna mikrobiologija, Durieux, Zagreb.
9. EC (2006) Commission Regulation 1881/2006 of 19 December setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* **364**: 5-24.
10. EFSA, (2004) Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed, *The European Food Safety Authority Journal* **39**: 1-27
11. Elgerbi, A.M., Aidoo, K.E., Candlish, A.A.G., Williams, A.G. (2006) Effects of lactic acid bacteria and bifidobacteria on levels of aflatoxin M1 in milk and phosphate buffer. *Milchwissenschaft* **61** (2): 197-199.
12. FDA (2005) se. 527.400 whole milk, low fat milk, skim milk – Aflatoxin M1 (CPG 7106.10) FDA/ORA Compliance Policy Guides.
13. Fonseca F., Béal C., & Corrieu G. (2000) Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage, *Journal of Dairy Research* **67** (1): 83-90.

14. Fowler A. i Toner M. (2005) Cryo-injury and Biopreservation, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1066** (1): 119-135.
15. Frece J., Markov K. (2016) Autochthonous starter cultures U: Fermented Meat Products: Health Aspects, (Zdolec, N., ured.), In Book series: *Food biology*, R.C. Ray (Editor), CRC Taylor & Francis
16. Giovati, L., Magliani, W., Ciociola, T., Santinoli, C., Conti, S., & Polonelli, L. (2015) AFM1 in milk: physical, biological, and prophylactic methods to mitigate contamination, *Toxins* **7** (10): 4330-4349.
17. Goldblatt L.A. (1969) Aflatoxin scientific background, control and implication, Academic Press, New York - London
18. Gorelick, N.J. (1990) Assesment for aflatoxin: I. Metabolism of aflatoxin B1 by different species. *Risk Analysis* **10**: 539-559
19. Govaris A., Roussi V., Koidis P.A., Botsoglou N.A. (2002): Distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of yoghurt. *Food Additives & Contaminants* **19** (11): 1043-1050.
20. HAH (2013) Što su mikotoksini?, HAH - Hrvatska agencija za hranu, <<https://www.hah.hr/sto-su-mikotoksini/>> Pristupljeno 26.3.2018.
21. Hassan Y.I., Zhou T., Bullerman L.B. (2015) Sourdough lactic acid bacteria as antifungal and mycotoxin-controlling agents. *Food Science and Technology International* **22**: 79-90.
22. IARC, International Agency for Research on Cancer (1993) Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans* **56**: 245–395.
23. IARC, International Agency for Research on Cancer (2002) Aflatoxins. Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans **82**, 171. Lyon, France: World Health Organization.
24. IARC, International Agency for Research on Cancer (2002) Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. IARC In IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans **82**: 301–366. Lyon, France: WHO.
25. Kabak, B., Var, I. (2008) Factors affecting the removal of aflatoxin M1 from food model by Lactobacillus and Bifidobacterium strains. *Journal of Environmental Science and Health* **43**: 617-624.
26. Kamkar, A. (2005): A study on the occurrence of aflatoxin M1 in Iranian Feta cheese. *Food Control* **16**: 593-600.

27. Lahtinen, S. J., Haskard, C. A., Ouwehand, A. C., Salminen, S. J., Ahokas, J. T. (2004) Binding of aflatoxin B₁ to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Additives and Contaminants* **21**: 158-164.
28. Lanchester M.C., Jenkins F.P., Philip J.L (1961) Toxicity Associated with Certain Samples of Groundnuts, *Nature*, **192**: 1095.
29. Leeson, S., Summers, J. (1995) Poultry metabolic disorders and mycotoxins. Univ. Books, Guelph, Canada
30. Lovrić T. (2003) Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva, 212-226.
31. Markov K. (1991) Rast plijesni i biosinteza aflatoksina B₁ i okratoksina A u prisutnosti odabranih antimikrobnih agenasa, Magistarski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
32. Markov, K., Frece, J., Čvek, D., Lovrić, N., & Delaš, F. (2010) Aflatoksin M₁ u sirovom mlijeku i vezanje aflatoksina pomoću bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **60**: 244-251.
33. Markov, K., Pleadin, J., Bevardi, M., Vahčić, N., Sokolić-Mihalak, D., & Frece, J. (2013). Natural occurrence of aflatoxin B₁, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food control* **34** (2): 312-317.
34. Medina A., Rodriguez A., Sultan Y., Magan N. (2014) Climate change factors and *Aspergillus flavus*: effects on gene expression, growth and aflatoxin production, *World Mycotoxin Journal* **8** (2) Aflatoxins in maize and other crops: 135-257.
35. Milićević D., Nedeljković-Trailović J., Mašić Z. (2014) Mikotoksini u lancu ishrane – analiza rizika i značaj za javno zdravstvo. *Tehnologija mesa* **55**: 22–38.
36. Morgan C. A., Herman N., White P. A., & Vesey G. (2006). Preservation of microorganisms by drying; a review. *Journal of Microbiological Methods* **66**(2): 183–193.
37. Muñoz R., Arena M.E., Silva J., González S.N. (2010) Inhibition of mycotoxin-producing *Aspergillus nomius* VSC 23 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Microbiology* **41**: 1019-1026.
38. Payne G. A. (1998) Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops. U: Sinha K.K., Bhatnagar D. (ed.), *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. Marcel Dekker, Inc, New York: 279-306.
39. Peltonen, K., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J., Salminen, S. (2001) Aflatoxin B₁ binding by dairy strains of lactic acid bacteria and Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science* **84**: 2152-2156.

40. Pepeljnjak S., Cvetnić Z., Šegvić Klarić M. (2008) Okratoksin A i zearalenon: Kontaminacija žitarica i krmiva u Hrvatskoj (1977-2007) i utjecaj na zdravlje životinja i ljudi. *Krmiva* **50**: 147-159.
41. Peraica M., Rašić D., Gluščić V. (2014) Utjecaj aflatoksina na zdravlje ljudi. *Glasilo biljne zaštite* **4**: 310-316
42. Pierides M., El-Nezami H., Peltonem K., Salminen S., Ahokas J. (2000) Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M1 in a food model. *Journal of Food Protection* **63**: 645-650.
43. Piva G., Galvano F., Pietri A., Piva A. (1995.) Detoxification methods of aflatoxins. A review. *Nutrition Research* **15**: 767-776.
44. Pleadin J., Frece J., Markov K. (2014) Croatian Journal of Food Technology, *Biotechnology and Nutrition* **9** (3-4): 75-82.
45. Pleadin J. i Kovačević D. (2016) Kemijske opasnosti u mesu i mesnim proizvodima u prehrambenom lancu od farme do potrošača. *MESO: prvi hrvatski časopis o mesu* **18**: 436.
46. Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (2012), Narodne novine **146** (NN 146/12)
47. Rimar H. (2017) Korištenje mikrobioloških preparata u suzbijanju aflatoksina, Diplomski rad, 15-22.
48. Rustom I. Y. S. (1997) Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry* **59**: 57-67.
49. Santivarangkna C., Wenning M., Foerst P., Kulozik U. (2007) Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying, *Journal of Applied Microbiology* **102** (3): 748-756 Research 67(1): 83–90.
50. Sassahara M., Pontes Netto D., Yanaka E.K. (2005) Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Paraná state, *Food and Chemical Toxicology* **43** (6): 981-984.
51. Schnürer J., Magnusson J. (2005) Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology* **16**: 70-78.
52. Sezer Ç., Güven A., Bİlge Oral N., Vatanserver L. (2013) Detoxification of aflatoxin B1 by bacteriocins and bacteriogenic lactic acid bacteria. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* **37**: 594-601.
53. Shetty, H. i Jespersen, L. (2006) *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents, *Trends in Food Science & Technology* **17**: 48–55.

54. Sinovec Z. i Resanović R. (2005) Mikotoksini u hrani za životinje – rizik po zdravlje ljudi. *Tehnologija mesa* **46** (1-2): 39-44.
55. Šutić M., Banina A. (1979) Promene bakterija mlečne kiseline pod uticajem aflatoksina B1 i značaj za proizvodnju. *Mljekarstvo* **29**: 106-111.
56. Turner P. C., Moore S. E., Hall A. J., Prentice A. M., Wild C. P. (2003) Modification of immune function through exposure to dietary aflatoxin in Gambian children. *Environmental Health Perspectives* **111**(2): 217-220.
57. Varsha K.K., Napoothiri K.M. (2016) Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures. *Food Control* **69**: 61-64.
58. Wild C. P., Hall A. J. (2000) Primary prevention of hepatocellular carcinoma in developing countries. *Mutation Research* **462**: 381-393.
59. Zdolec, N., Hadžiosmanović, M., Kozačinski, L., Cvrtila, Ž., Filipović, I. (2006): Ostatci biološki štetnih tvari u mlijeku. *Mljekarstvo* **56** (2): 191-202.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



ime i prezime studenta