

## Znanstveno izvješće o procjeni izloženosti s obzirom na konzamaciju mliječnih proizvoda s povišenim NDK vrijednostima za aflatoksin M1

### Uvod

Mikotoksini mogu izazvati niz štetnih učinaka na ljude i životinje (karcinogenost, imunotoksičnost, probavne smetnje, neurotoksičnost, hepatotoksičnost, nefrotoksičnost, reproduktivna i razvojna toksičnost, i dr.), pri čemu često mogu istovremeno djelovati na različite načine i na više ciljnih mjesta u organizmu, što ovisi o samoj tvari, dozi i vremenu izloženosti.

Toksični učinci mikotoksina počeli su se znatnije proučavati od 1960. godine kada je akutno otrovanje aflatoksinom, poznato kao "X bolest pura", uzrokovalo uginuće 100.000 purića u Engleskoj uslijed akutne nekroze jetre i hiperplazije žučnih kanala. S identifikacijom i izolacijom aflatoksina 1960. g. započeo je znanstveni rad na otkrivanju više od 400 danas poznatih toksičnih sekundarnih metabolita plijesni, od kojih samo njih 20-30, prema obimu pojavnosti i toksičnom učinku na zdravlje ljudi i životinja, ima medicinski, nutritivni, ekološki i gospodarski značaj (Jakić-Dimić i sur., 2010).

### PROCJENA RIZIKA

#### 1. Identifikacija opasnosti

##### 1.1. Aflatoksini

Aflatoksini su najpoznatiji i najtoksičniji mikotoksini. Prvi puta su opisani u Engleskoj 1960. godine (Prasanna i sur., 1975, Hussein i Brasel, 2001). Tvore ih neki sojevi plijesni roda *Aspergillus*. Za rast im pogoduju temperature od 26 do 38 °C i sadržaj vlage veći od 18%. Aflatoksini su metabolički produkti plijesni *Aspergillus flavus* i *A. parasiticus* koje ih sintetiziraju već u polju, kao i tijekom žetve te skladištenja i prerade žitarica, pri temperaturi između 24 i 35<sup>0</sup> C i vlažnosti iznad 7% (10% u ventiliranom prostoru) (Williams i sur. 2004). *Aspergillus flavus* sintetizira aflatoksine B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> na žitaricama poput kukuruza, dok *Aspergillus parasiticus* može sintetizirati aflatoksine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub> na uskladištenim uljaricama (Diener i Davis, 1996, Valpotić i Šerman, 2006).

Aflatoksini su kao prirodni fluorescirajući spojevi, derivati kumarina, vidljivi u UV-spektru pri valnoj duljini od 365 nm. Imena aflatoksina B i G bazirana su upravo na njihovim fluorescentnim svojstvima;

B za plavu (*blue*) i G za zelenu (*green*) fluorescenciju (Prasanna i sur., 1975). Termostabilni su i u prirodnom stanju vezani su uz proteine koji ih štite od vanjskih utjecaja (Kiermeier i Hemmerich, 1974, Marth i Dole, 1979). Fotosenzibilni su u slobodnom stanju i osjetljivi na alkalne i kisele otopine, topivi su u organskim otapalima (alkohol, aceton, kloroform), a gotovo netopljivi u vodi (Mann i sur., 1967). Dokazana je kontaminacija žitarica, proizvoda na bazi žitarica, ali i mesa i iznutrica svinja i peradi te jaja (Ožegović i Pepeljnjak, 1995, Richard, 2007, Husain i sur., 2010).

### 1.1. 1. Aflatoksin B<sub>1</sub>

U skupini aflatoksnina najtoksičniji je aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) (Domijan i Peraica 2010). Ciljni organ toksičnog djelovanja AFB<sub>1</sub>-a je jetra, a izraženost promjena ovisna je o dozi, dužini izloženosti, životinjskoj vrsti, uzgoju i uhranjenosti. Uz akutni i kronični toksični učinak, aflatoksini imaju imunosupresivno, mutageno, teratogeno i karcinogeno djelovanje. Otrovanje s velikim dozama AFB<sub>1</sub>-a može imati smrtni ishod, subletalne doze uzrokuju kronično otrovanje, a kronična izloženost niskim dozama uzrokuje maligne tumore, prvenstveno primarni karcinom jetre. AFB<sub>1</sub> inhibira sintezu DNA, polimerazu RNA ovisnu o DNA, sintezu glasničke RNA i sintezu proteina. Međunarodna agencija za istraživanje raka (International Agency for Research on Cancer – IARC) ocijenila je da ima dovoljno dokaza da su aflatoksini B<sub>1</sub> iz prirodnih izvora karcinogeni i uvrstila ih je u 1. skupinu karcinogena (IARC 2002).

Plijesni koje proizvode aflatoksine nalaze se posvuda te u zemljama u razvoju kontaminiraju osnovne namirnice kao što su riža, kukuruz, kasava, orasi, kikiriki i začini. Kontaminacija tim plijesnimama moguća je između 40<sup>o</sup> sjeverne i 40<sup>o</sup> južne širine ako su namirnice loše pohranjene i nedovoljno osušene, no kontaminacija aflatoksinima ovisna je o klimi (Cotty i Jaime-Garcia 2007).

Biološka aktivnost aflatoksina ovisi o njegovom metaboliziranju pa različita osjetljivost životinjskih vrsta ovisi o tome koji se dio apsorbirane doze metabolizira nekim od mogućih putova. Nepovoljan učinak aflatoksina je najviše izražen kod peradi (patke > brojleri > nesilice), a potom kod svinja. Na aflatoksine vrlo su osjetljive i ribe, pri čemu se javljaju blijede škrge, oslabljeno zgrušavanje krvi, anemija, smanjen rast ili pad tjelesne mase. AFB<sub>1</sub> aktiviraju monooksigenaze ovisne o citokromu P450 čime nastaju hidroksilirani derivati kao i visoko reaktivni egzo-epoksid koji se veže na DNA pri čemu nastaju AFB<sub>1</sub>-DNA-adukti (Guengerich 2003). Količina AFB<sub>1</sub>-DNA-adukata veća je u jetri nego u drugim organima i u korelaciji je s dozom kao i s osjetljivošću pokusne ili domaće životinje na hepatokarcinogenezu (Hengstler i sur. 1999).

### 1.1.2. Aflatoksin M1

Aflatoksin B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> se u mliječnim žlijezdama sisavaca metaboliziraju u tijelu životinje u aflatoksin M1 i M2, te izlučuju u mliječnim žlijezdama te se mogu naći u mlijeku i mliječnim proizvodima (Diener i Davis, 1996; Valpotić i Šerman, 2006; Knežević, 2007). Budući da je stabilan

tijekom pasterizacije i sterilizacije mlijeka zadržava se i u mliječnim proizvodima (Cavaliere i sur., 2006).

Sa stajališta toksičnosti AFM1 ovaj je toksin od strane IARC je klasificiran u Grupu 2B kao tvar sa mogućim karcinogenim učinkom za ljude (IARC, 1993). Učestala prisutnost AFM1 u mlijeku i mliječnim proizvodima, značajan unos ove vrste proizvoda te toksičnost i karcinogenost AFM1 doveli su do uspostave najviših dozvoljenih koncentracija u mlijeku od strane Europske Komisije od 0,05 µg/kg (European Commission Regulation, 2006.) i Codex Alimentarius na razinu od 0,05 do 0,5 µg/kg (Codex Alimentarius Commission, 2001).

## 2. Karakterizacija opasnosti

### 2.1. Aflatoksikoze

Aflatoksikoze se mogu definirati kao trovanja uzrokovana aflatoksinima (Janssen i sur., 1997). Dijeje se na perakutne, akutne, subakutne i kronične. Perakutno trovanje uzrokuje kolaps i smrt već nekoliko sati nakon uzimanja zatrovane hrane. Akutni i subakutni oblici javljaju se nakon uzimanja kontaminirane hrane kao hepatotoksikoza i nefrotoksikoza. Patomorfološko otrovanje obilježava bljedoća jetre s mozaičnim nekrozama parenhima i hemoragijom, dok je u bubrezima prisutan glomerulonefritis. Kronična aflatoksikoza odlikuje se kongestijom jetre sa jako izraženim simptomima nekroze, hemoragije i proliferacijom epitelijskih stanica žučovoda (Ožegović i Pepeljnjak, 1995).

AFM<sub>1</sub> je karcinogen za životinje, te se procjenjuje da je karcinogen za ljude, ali sa znatno nižim potencijalom nego AFB<sub>1</sub> (van Egmond i Speijers, 1990).

## 3. Procjena izloženosti

### 3.1. AFM1 u mlijeku

Aflatoksin B1 i B2 se u mliječnim žlijezdama sisavaca metaboliziraju u tijelu životinje u aflatoksin M1 i M2, te izlučuju u mliječnim žlijezdama te se mogu naći u mlijeku i mliječnim proizvodima (Knežević, 2007; Diener i Davis, 1996; Valpotić i Šerman, 2006).

AFM1 može se dokazati u mlijeku 12 do 24 sata nakon konzumacije aflatoksinom B1, a najviše se razine dostižu nakon nekoliko dana. Nakon prestanka unosa AFB1 u organizam, koncentracija aflatoksina M1 se smanjuje unutar 72 sata do količine kada se više ne može dokazati.

Ukoliko je razina aflatoksina M1 u mlijeku veća od dopuštene proizvod se ne smije koristiti za prehranu ljudi, niti za proizvodnju mliječnih proizvoda (Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani NN 146/2012.)

**a. AFM1 u siru**

Prilikom proizvodnje sira koji se proizvodi od mlijeka kontaminiranog AFM1, vrlo je vjerojatno kako će količine ovog toksina postati veće u konačnom proizvodu u odnosu na količine koja se nalazi u mlijeku. Navedeno bi se moglo objasniti sposobnošću vezanja AFM1 na kazeine i povećavanje udjela suhe tvari.

Afinitet AFM1 je ispitan ne samo na tim proteinima, nego i na raznim drugima koji su prisutni u sirutki budući da se pokazalo kako se veće količine ovog toksina mogu naći u frakcijama bogatima proteinima.

AFM1 prisutan je sa 40-60% ukupnog iznosa AFM1 u sirutki u odnosu na iznos prisutan umlijeku. Međutim, ovaj postotak može također biti i veći, između 70% i 74% ili niži, između 17% i 27%. Ovaj široki raspon AFM1 distribucije nakon proizvodnje sira može biti posljedica različitih čimbenika. Specifičnost proizvodnih procesa, ovisno o vrsti sira, također može utjecati na AFM1 distribuciju, i u tvrdih i u mekih sireva.

Određena istraživanja provedena su na mlijeku krava hranjenih aflatoksinom B1 koje je zatim obrađeno na nekoliko načina te su uzorci mlijeka liofilizirani, evaporirani, sušeni na valjcima i sprej-sušeni te korišteni za proizvodnju sira. Liofilizirano i evaporirano mlijeko i svježi sir su pripremljeni od pasteriziranog mlijeka. Proizvodi su mjereni na udio aflatoksina M1 tankoslojnom kromatografijom.

Kemijska analiza pokazala je da obrada mlijeka smanjuje udio aflatoksina M1, te da korištenje više temperature, dovodi do manje količine prisutnog aflatoksina. Tako se i stvarno smanjenje razina aflatoksina dogodilo u liofiliziranom i sprej-sušenom mlijeku. Nakon izrade skute od kontaminiranog mlijeka, aflatoksin M1 je nađen u sirutki, ali ne i u samom siru.

Provedena su razna straživanja na nekoliko vrsta sireva, s ciljem utvrđivanja stabilnost AFM1 tijekom zrenja i skladištenja.

Fremy i sur. (1990) i Dragacci i sur. (1995) izvijestili su da su koncentracije AFM1 u Camembert siru veća na početku nego kasnije nakon vremena zrenja. Ovi rezultati su sukladni rezultatima Govaris i sur. (2001). Međutim, nisu sukladni s izvješćima ranijih studija koje ukazuju na različito ponašanje AFM1 u raznim drugim vrstama sireva. Dakle, u Camembert i Tilsit (Kiermeier i Buchner 1977), Cheddar (Brackett i Marth 1982a) i Brick (Bracketti sur., 1982) sirevima pohranjenim na 3, 6,5 i 14 mjeseci, koncentracija mikotoksina povećala se tijekom rane faze zrenja da bi se nakon toga smanjila do svoje početne koncentracije na početku zrenja. S druge strane, koncentracija AFM1 u parmezanu bila je visoka na početku zrenja, te se smanjila do petog mjeseca i onda polako povećavala do desetog mjeseca skladištenja (Brackett i Marth 1982 b). Nasuprot tome, koncentracija AFM1 u Mozzarella siru ostala je gotovo konstantna tijekom skladištenja 4,5 mjeseca (Brackett i Marth, 1982b).

Ovi različite koncentracije AFM1u raznim sirevima mogu biti rezultat nekoliko čimbenika kao što su toplinska obrada (Brackett i Marth1982c, Yousef i Marth 1989), proteoliza (Brackett i Marth 1982c,

Brackett i sur. 1982, Yousef i Marth, 1989), izloženost kontaminiranog mlijeka svjetlu (Yousef i Marth 1989), a posebice neadekvatna metoda analize (Yousef i Marth, 1989).

### 3.3. AFM1 u jogurtu

Prilikom proizvodnje jogurta i ostalih vrsta fermentiranih proizvoda dolazi do znatnog snižavanja pH medija te istraživanja pokazuju da dolazi do značajnog smanjenja koncentracije AFM1 u odnosu na koncentraciju koja je bila u kontaminiranom sirovom mlijeku.

Mnogi mikroorganizmi, uključujući bakterije, kvasce, plijesni, aktinomicete i alge mogu ukloniti ili smanjiti količine aflatoksina u hrani i krmu. Među tim mikroorganizmima, bakterije mliječne kiseline (BMK) predstavljaju jedinstvenu skupinu koja se naširoko koristi u proizvodnji i očuvanju fermentiranih proizvoda. Bakterije mliječne kiseline (BMK) su prirodno prisutne u raznoj hrani, gdje produžuju trajnost proizvoda, što je doprinijelo da budu prihvaćene kao bezopasne za ljudsko zdravlje. BMK koje se koriste u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda kao starter kulture, mogu imati ulogu u smanjenju količine aflatoksina u hrani i krmivu.

U istraživanjima mnogih autora (Haskard i sur., 2001; Peltonen i sur., 2001; Colak, 2007) dokazano je vezanje aflatoksina s pomoću bakterija mliječne kiseline. Uz dokaze o korisnoj aktivnosti BMK, sposobnost vezanja aflatoksina im daje značajan potencijal za primjenu u funkcionalnoj hrani (Frece i sur., 2009).

Istraživanja također dokazuju da su ustanovljene veće količine AFM1 u uzorcima mlijeka sakupljenim tijekom zime nego, onih sakupljenim tijekom ljeta (Panariti, 2001; Lopez i sur., 2003; Montagna i sur., 2008; Bilandžić i sur., 2010). Razina kontaminacije AFM1 tijekom zimskog perioda veća je, što se može objasniti time da su zimi krave hranjene krmom koja može biti kontaminirana mikotoksinima, a do kontaminacije može doći u polju prije ili tijekom žetve/košnje, u transportu, te tijekom uskladištenja. Vjerojatnost za kontaminaciju krmiva plijesnima/mikotoksinima odnosi se na zemljopisno podrijetlo, kao i na klimatske uvjete (oscilacija temperature i vlage u različitim godišnjim dobima). Smatralo se da uvezena stočna hrana iz tropskih i subtropskih područja uglavnom predstavlja opasnost od aflatoksina, ali podaci mnogih autora osporili su ovu pretpostavku (Bakirci, 2001.; Panariti, 2001.; Pietri i Diaz, 2003; Colak, 2007; Godič-Torkar i Vengušt, 2008; Montagna i sur., 2008; Ghanem i Orfi, 2009).

Može se zaključiti da određene vrste BMK koje se koriste u mliječnim proizvodima mogu ponuditi novi način uklanjanja AFM1 iz mlijeka. Ti prirodni izolati BMK iz spontanijih fermentacija mogli bi se koristiti kao specifične starter kulture, nakon fenotipske i genotipske karakterizacije, te predstavljati mogući izvor novih antimikrobnih metabolita. Osim toga, interes za primjenu BMK i njihovih antimikrobnih metabolita u prevenciji kvarenja i produženju trajnosti hrane koja je svježeg okusa, bogata nutrijentima i vitaminima, minimalno prerađena i bio-konzervirana jedan je od najvećih izazova prehrambene industrije danas (Markov i sur., 2009; Frece i sur., 2010). Istraživanjem upotrebe standardnog soja *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 i izolata *L. delbrueckii* S1 bakterije imaju sposobnost uklanjanja znatne

količine mikotoksina (iznad 50 %), te se njihovim dodavanjem kao starter kultura u mlijeko može smanjiti rizik od kontaminacije AFM1 i na taj način kontaminirano mlijeko može zadovoljiti zahtjeve Pravilnika o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 146/2012). Stoga bi uklanjanje mikotoksina iz mliječnog matriksa mogao biti jedan od kriterija pri izboru sojeva bakterija kao starter kultura u mliječnoj industriji (Markov i sur., 2010).

### 3.4. Procjena izloženosti s obzirom na faktore prijenosa u mliječne proizvode

Tablica izračuna povećanja unosa AFM1 za predložene vrijednosti NDK i kroz 30 dana za 50% povećane iste vrijednosti

	količina AFM1 u mliječnim proizvodima $\mu\text{g}/\text{kg}$ - a	prosječna konzumacija - b	unos AFM1 po osobi dnevno - c	količina AFM1 u mliječnim proizvodima $\mu\text{g}/\text{kg} + 50\%$ - d	unos AFM1 po osobi dnevno (uz 50% povećanje NDK)- e	unos AFM1 po kilogramu t.m. - f	unos AFM1 po kilogramu t.m. uz 50% povećanje - g	prosječni dnevni unos po kg t.m. izražen u vremenu od jedne godine - h	% povećanja unosa AFM1 na godišnjem nivou (za 50% povećan NDK kroz 30 dana) - i	% povećanja - m
mlijeko	0,05	170	0,0085	0,05	0,0085	0,000110	0,000110	0,000110	0	
jogurt	0,1	130	0,013	0,15	0,0195	0,000169	0,000253	0,000176	3,95	
mazivi sirevi	0,25	20,08	0,00502	0,4	0,008032	0,000065	0,000104	0,000068	4,70	
tvrdi sirevi	0,45	24,39	0,0109755	0,45	0,0109755	0,000143	0,000143	0,000143	0,00	
							Ukupna izloženost - j	0,000497	2,04	
	I – vidi legendu									
mlijeko	0,05	170	0,0085	0,05	0,0085	0,000110	0,000110	0,000110	0	0
jogurt	0,07	130	0,0091	0,1	0,013	0,000118	0,000169	0,000122	3,40	30,39
mazivi sirevi	0,1	20,08	0,002008	0,15	0,003012	0,000026	0,000039	0,000027	3,95	60,31
tvrdi sirevi	0,25	24,39	0,0060975	0,4	0,009756	0,000079	0,000127	0,000083	4,70	41,70

- a - količina AFM1 u mliječnim proizvodima  $\mu\text{g}/\text{kg}$  – NDK za proizvod kako je predložen od nadležnog tijela
- b - prosječna konzumacija – na temelju studije o prehrabnim navikama populacije od 18 do 65 godine u RH
- c – unos AFM1 po osobi dnevno
- d - količina AFM1 u mliječnim proizvodima  $\mu\text{g}/\text{kg} + 50\%$  - privremeno povećanje određeno kroz vrijeme od 30 dana
- e - unos AFM1 po osobi dnevno (uz 50% povećanje NDK)
- f - unos AFM1 po kilogramu t.m. – izračunato na temelju prosječne mase ispitanika iz studije o prehrabnim navikama populacije od 18 do 65 godine u RH koja iznosi 77 kg
- g - unos AFM1 po kilogramu t.m. uz 50% povećanje kroz 30 dana
- h - prosječni dnevni unos po kg t.m. izražen u vremenu od jedne godine. Vrijeme od jedne godine obuhvatilo je vrijeme unosa od 335 dana kada su unošeni proizvodi kod kojih koncentracija nije prelazila predloženi NDK i od 30 dana izloženosti proizvodima kod kojih je NDK bio povećan za 50%
- i – u postotku (%) izraženo povećanje na godišnjem nivou za vrijeme unosa od 335 dana kada su unošeni proizvodi kod kojih koncentracija nije prelazila predloženi NDK i od 30 dana izloženosti proizvodima kod kojih je NDK bio povećan za 50%
- j - ukupna izloženost predpostavlja povećanje dnevnog unosa pod uvjetom konzumacije svih obrađenih mliječnih proizvoda i mlijeka
- k - ukupna izloženost predpostavlja povećanje dnevnog unosa pod uvjetom konzumacije svih obrađenih mliječnih proizvoda i mlijeka
- l - Procjena izloženosti za AFM1 u proizvodima prema NDK na temelju izračuna prema tehnološkom procesu proizvodnje – općenito (bez tehnoloških vrijednosti dostavljenih od predstavnika mljekarske industrije)
- m - % povećanja vrijednosti koje su određene na 1. Sastanku operativnog tima 05. 03. 2013. i onih koje su u Hrvatska agencija za hranu izračunate prema tehnološkim procesima i vrijednostima za suhu tvarsireva propisanih Pravilnikom o sirevima i proizvodima od sireva (NN 20/09)



Sukladno preporučenim NDK vrijednostima, koje su navedene u prvom dijelu tablice (za jogurt 0,1 µg/kg; za sirne namaze i polutvrdi sir 0,25 µg/kg; za tvrde sireve 0,45 µg/kg), te 50%-tnom povećanju NDK vrijednosti za spomenute proizvode u vremenu od 30 dana, na godišnjoj razini došlo bi do minimalnog povećanja unosa AFM1 iz mlijeka i mliječnih proizvoda od 2,04 do 4,70%.

Ovaj izračun temelji se na pretpostavci izloženosti maksimalno dozvoljenoj NDK vrijednosti za AFM1 za mlijeko kod osoba od 18 do 65 godina uz prosječnu dnevnu konzumaciju mlijeka od 170 g, jogurta 133 g, svježeg sira i namaza 20,08 g te tvrdog sira 24,39 g.

Prosječni dnevni unos po kg tjelesne težine izražen u vremenu od jedne godine obuhvatio je vrijeme unosa od 335 dana kada su unošeni proizvodi kod kojih koncentracija nije prelazila predloženi NDK i 30 - dnevna izloženost proizvodima kod kojih je NDK bio povećan za 50% pokazuje da za pojedinačni unos mlijeka i mliječnih proizvoda nije došlo do povećanja izloženosti u odnosu na prosječnu izloženost stanovnika u EU – 0,00022 (JECFA, 2001), dok bi u najgorem mogućem slučaju, što znači da se istovremeno unesu i mlijeko svi mliječni proizvodi sa povišenim vrijednostima, izloženost bi bila oko 2 puta veća (0,000497). Treba naglasiti da je ovaj povećani unos prikazan najgorim scenarijem, još uvijek pet puta manji od unosa AFM1 putem mliječnih proizvoda u slučaju kad je njegova koncentracija u mlijeku 0,5 µg/kg, kako je dozvoljeno u nekim zemljama svijeta, a sukladno zaključcima JECFA-e iz 2001.

Uzimajući u obzir predložene vrijednosti može se očekivati da konzumacija navedenih proizvoda tijekom 30 dana neće imati štetan učinak na zdravlje potrošača.

U donjem dijelu tablice dani su izračuni i za gore navedene preporuke temeljem kojih se vidi kao bi se u slučaju predloženih NDK vrijednosti od strane Hrvatske agencije za hranu u odnosu na NDK vrijednosti predložene od strane nadležnog tijela, unos AFM1 na godišnjoj razini smanjio, ovisno o proizvodu, 30 -60%.

Predložene NDK vrijednosti za mliječne proizvode i 30-dnevni unos 50% povećanih vrijednosti NDK trebalo bi revidirati nakon najviše 6 mjeseci u skladu s tehnološkim procesima mliječnih proizvoda za koje dajemo sljedeće prijedloge:

1. Na temelju informacije od predstavnika mliječne industrije kako se u **fermentirane proizvode** dodaje 3-4% mlijeka u prahu i uz pretpostavku kako je mlijeko koje se koristi u izradi tog proizvoda imalo najvišu dozvoljenu koncentraciju AFM1 od 0,05 µg/kg, te kako je mlijeko od kojeg je napravljeno mlijeko u prahu također imalo NDK tj. 0,05 µg/kg AFM1 predlaže se NDK za **jogurte (fermentirane proizvode) 0,07 µg/kg.**

$$0,05 \times 0,96 \text{ (udio mlijeka)} + 0,5 \times 0,04 \text{ (udio mlijeka u prahu)} = 0,068 \text{ približno } 0,07 \text{ µg/kg AFM1}$$

2. Sukladno Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva (NN 20/09) **svježi sirevi** imaju udio suhe tvari od 18 do 20%. Udio suhe tvari u mlijeku se kreće od 9 do 12% što znači kako faktor pretvorbe može biti od 1,58x za mlijeko s 12% suhe tvari do 2,1x za mlijeko s 9% suhe tvari tj. **NDK vrijednost za svježi sir bi se kretao od 0,08 do 0,11 µg/kg AFM1.**
3. Sukladno Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva (NN 20/09) **tvrdi sirevi** imaju udio suhe tvari (bez masti) od 44 do 51%. Udio suhe tvari u mlijeku se kreće oko 9 % što znači kako faktor pretvorbe može biti 5,2x tj. **NDK za tvrdi sir bi se kretalo 0,26 µg/kg AFM1.**

Dani prijedlozi Hrvatske agencije za hranu u skladu su sa faktorima pretvorbe koje je predložio Njemački institut za procjenu rizika (BfR) koji za jogurt iznosi 1,0 – 1,1 puta; za svježi sir 2,5 – 3,0 puta, a za tvrdi sir 3,0 – 8,0 puta.

U svojem znanstvenom mišljenju iz 2004. godine EFSA napominje da je 2003. godine u Italiji zabilježen neuobičajeno visok udio uzoraka mlijeka koji su sadržavali više od dozvoljene koncentracije AFM<sub>1</sub> uslijed visoke kontaminacije lokalno uzgojenog kukuruza (EFSA, 2004b). Modeliranjem je procijenjeno da kontaminacija krmiva kod dozvoljene koncentracije može dovesti do pojačanog prelaska AFM<sub>1</sub> u mlijeko zbog nekoliko specifičnih značajki mliječnih krava, iako praktična iskustva pokazuju da se to jako rijetko događa. Preporuka EFSA-e je, stoga, redoviti monitoring krmnih smjesa, kukuruza i njegovih proizvoda, naročito ukoliko je uzgojen u suptropskim krajevima uz primjenu opsežnih agrotehničkih mjera koje utječu na smanjenje rasta plijesni i sintezu aflatoksina, te monitoring mlojeka.

#### 4. Karakterizacija rizika

Pojavnost AFM<sub>1</sub> u kravljem mlijeku i mliječnim proizvodima nije neuobičajena stoga je potrebno mlijeko i mliječne proizvode kontinuirano kontrolirati točnim i pouzdanim analitičkim metodama kako bi se utvrdila njegova prisutnost.

S obzirom na predložene NDK vrijednosti za AFM<sub>1</sub> u mliječnim proizvodima, te njihovo 50%-tno povećanje tijekom 30 dana, na godišnjoj razini, može se očekivati da konzumacija navedenih proizvoda neće imati štetan učinak na zdravlje potrošača te se stoga može smatrati da je rizik zanemariv.

Prateći preporuke EFSA-e dane u znanstvenom mišljenju iz 2004., potrebno je provoditi redoviti monitoring krmnih smjesa, kravljeg mlijeka te kukuruza i njegovih proizvoda, naročito ukoliko je uzgojen u suptropskim krajevima uz primjenu opsežnih agrotehničkih mjera koje utječu na smanjenje rasta plijesni i sintezu aflatoksina.

Treba naglasiti da mikotoksin AFB<sub>1</sub> bude u što nižim koncentracijama u hrani za životinje primjenom ispravnih i strogo kontroliranih načina skladištenja te čuvanja, kao i kontinuiranom i pravovremenom kontrolom hrane za životinje što je ispravan način utjecanja na smanjenje koncentracije AFM<sub>1</sub> u mlijeku, i posljedično mliječnim proizvodima.

## ZAKLJUČAK

Sukladno preporučenim NDK vrijednostima, koje su navedene u prvom dijelu tablice (za jogurt 0,1 µg/kg; za sirne namaze i polutvrđi sir 0,25 µg/kg; za tvrde sireve 0,45 µg/kg), te 50%-tnom povećanju NDK vrijednosti za spomenute proizvode u vremenu od 30 dana, na godišnjoj razini došlo bi do minimalnog povećanja unosa AFM1 iz mlijeka i mliječnih proizvoda od 2,04 do 4,70%.

Prosječni dnevni unos po kg tjelesne težine izražen u vremenu od jedne godine obuhvatio je vrijeme unosa od 335 dana kada su unošeni proizvodi kod kojih koncentracija nije prelazila predloženi NDK i 30 - dnevna izloženost proizvodima kod kojih je NDK bio povećan za 50% pokazuje da za pojedinačni unos mlijeka i mliječnih proizvoda nije došlo do povećanja izloženosti u odnosu na prosječnu izloženost stanovnika u EU – 0,00022 (JECFA, 2001), dok bi u najgorem mogućem slučaju, što znači da se istovremeno unesu i mlijeko svi mliječni proizvodi sa povišenim vrijednostima, izloženost bi bila oko 2 puta veća (0,000497).

S obzirom na predložene NDK vrijednosti za AFM1 u mliječnim proizvodima, te njihovo 50%-tno povećanje tijekom 30 dana, na godišnjoj razini, može se očekivati da konzumacija navedenih proizvoda neće imati štetan učinak na zdravlje potrošača te se stoga može smatrati da je rizik zanemariv.

## LITERATURA

- Applebaum, R. S.; Brackett, R. E.; Wiseman, D. W.; & Marth, E. H. (1982). Aflatoxins: toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products. *Journal of Food Protection*, No. 45, pp. (752-777)
- Bakirci, I. (2001). A study on the occurrence of aflatoxin M1 in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Control*, No. 12, pp. (45-51)
- Bhat R.V., Krishnamachari K.A.V.R. (1977): Follow-up study of aflatoxic hepatitis in parts of western India; *Indian J Med Res* 66: 55-58.
- Bilandžić, N.; Varenina, I.; & Solomun, B. (2010). Aflatoxin M1 in raw milk in Croatia. *Food Control*, No. 21, pp. (1279–1281)
- Brackett, R. E.; Applebaum, R. S.; Wiseman, D. W.; & Marth, E. H. (1982) Fate of aflatoxin M1 in brick and limburger-like cheese. *Journal of Food Protection*, 45, pp. (553-556)
- Brackett, R. E.; & Marth, E. H. (1982a). Fate of aflatoxin M1 in Cheddar cheese and in process cheese spread. *Journal of Food Protection*, No. 174, pp. (549-552)
- Brackett, R. E.; and Marth, E. H. (1982b). Fate of aflatoxin M1 in parmesan and mozzarella cheese. *Journal of Food Protection*, No. 45, pp. (597-600)
- Brackett, R. E.; & Marth, E. H. (1982c). Fate of aflatoxin M1 in Cheddar cheese and in process cheese spread. *Journal of Food Protection*, No. 174, pp. (549-552)
- Cavaliere, C., Foglia, P., Pastorini, E., Samperi, R., Lagana, A. (2006): Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk Comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources; *Journal of Chromatography A* 1101: 69 – 78
- Centers for Disease Control and Prevention (2004): "Outbreak of aflatoxin poisoning- Eastern and Central Provinces, Kenya, January-July 2004"; *Morbidity and Mortality Weekly Report* 53, 790-793.
- Codex Alimentarius Commission. (2001). Comments submitted on the draft maximum level for aflatoxin M1 in milk. Codex committee on food additives and contaminants 33rd session. The Netherlands: Hague
- Colak, H. (2007): Determination of Aflatoxin M1 Levels in Turkish White and Kashar Cheeses Made of Experimentally Contaminated Raw Milk. *Journal Of Food And Drug Analysis* 15 (2), 163-168.
- Cotty P.J, Jaime-Garcia R. (2007): Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination; *Internat J Food Microbiol* 119;109-115.
- Diener, U. i Davis, N. (1996): Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*; *Phytopathol.* 56: 390-393

- Domijan A.M., Peraica M. (2010): Carcinogenic mycotoxins; U: Charlene A. McQueen, Comprehensive Toxicology, vol. 14, Elsevier, Oxford Academic Press, 125-137.
- Dragacci, S., Gleizes, E., Fremi, J. M. and Candlish, A. A. G. (1995) Use of immunoaffinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M1 in cheeses. Food Addit. and Contam. 12: 59-65.
- European Commission. (2006). Commission regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006. Official Journal of the European Union, L364, 5e24.
- European Food Safety Authority: 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; EFSA Journal 39:1-27, 2004b
- Frece, J., Kos, B., Svetec, I.K., Zgaga, Z., Beganović, J., Leboš, A., Šušković, J. (2009): Synbiotic effect of *Lactobacillus helveticus* M92 and prebiotics on the intestinal microflora and immune system of mice. Journal of Dairy Research 76, 98-104.
- Frece, J., Markov, K., Kovačević, D. (2010): Određivanje autohtone mikrobne populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu. Meso XII (2), 92-98.
- Fremy, J. M.; Roiland, J. C.; & Gaymard, A. (1990). Behavior of aflatoxin M1 during camembert cheese making. Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology, No. 10, pp. (95–98)
- Ghanem, I., Orfi, M. (2009): Aflatoxin M1 in raw, pasteurized and powdered milk available in the Syrian market. Food Control 20 (6), 603-605.
- Godič-Torkar, K., Vengušt, A. (2008): The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. Food Control 19 (6), 570-577.
- Guengerich F.P. (2003): Cytochrome P450 oxidations in the generation of reactive electrophiles: epoxidation and related reactions; Arch Biochem Biophys 409, 59-71.
- Haskard, C.A., El-Nezami, H.S, Kankaanpää, P.E., Salminen, S., Ahokas, J.T. (2001): Surface Binding of Aflatoxin B1 by Lactic Acid Bacteria. Applied and Environmental Microbiology 67 (7), 3086-3091.
- Hengstler J.G., van der Burg B., Steinberg P., Oesch F. (1999): Interspecies differences in cancer susceptibility and toxicity; Drug Metabol Rew 31: 917-970.
- Husain, Z., Khan, M. Z., Khan, I., Javed, M., Saleemi, K., Mahmood, S., Asi M. R. (2010): Residues of aflatoxin B1 in broiler meat: Effect of age and dietary aflatoxin B1 levels; Food and Chemical Toxicology 48: 3304-3307
- Hussein, S. H. i Brasel, J. M. (2001): Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals; Toxicology 167: 101-134

- IARC, International Agency for Research on Cancer (1993). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 56. pp. 19e23
- Jakić-Dimić, D., Nešić, K., Savić, B., Kečkeš, J., Pisinov, B. (2010): Prisustvo plesni u hrani za ishranu živine i utjecaj kontaminenata na zdravstveno stanje; XIV Međunarodni simpozijum „Tehnologija hrane za životinje“, 19-21. oktobar 2010, Novi Sad. Zbornik radova, 107-113
- Janssen, M.M.T., Put, H.M.C. i Nout, M.J.R. (1997): Natural toxins. In: De Vries, J.: Food Safety and Toxicity. CRC Press LCC, Florida (Chapter II)
- Kensler T.W., Groopman J.D. (1997): Carcinogen mycotoxins. U: Bowden GT, Fischer SM (eds.) Comprehensive Toxicology. Elsevier Vol. 12, Chap. 12, Chemical Carcinogens and Anticarcinogens, 201-223.
- Kiermeier, F. i Hemmerich, K. (1974): Influence of light on watery aflatoxin B1 solutions; Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 155: 81-84
- Klein P.J., Buckner R., Kelly J., Coulombe R.A. Jr. (2000): Biochemical basis for the extreme sensitivity of turkey to aflatoxin B1; Toxicol Appl Pharmacol 165: 45-52.
- Knežević, Z. (2007): Kontaminacija hrane organskim štetnim tvarima, Hrvatski časopis za javno zdravstvo, 9 (3)
- Krishnamachari K.A.V.R., Bhat R.V., Nagarajan V., Tilak T.B.G. (1975): Hepatitis due to aflatoxicosis; Lancet 1061-1063.
- Lopez, C. E. L.; Ramos, L. L.; Ramadan, S. S.; & Bulacio, L. C. (2003). Presence of aflatoxin M1 in milk for human consumption in Argentina. Food Control, No. 14, pp. (31-34)
- Mann, G., Coifer, L. i Dollear, F. (1967): Effect of heat on aflatoxins in oilseed meals; J. Agric. Food Chem. 15: 1090-1092
- Markov, K., Frece, J., Čvek, D., Delaš, F. (2009): Listeria monocytogenes i drugi kontaminanti u svježem siru i vrhnju domaće proizvodnje s područja grada Zagreba, Mljekarstvo 59 (3), 225-231
- Markov Ksenija, Jadranka Frece, Domagoj Čvek, Nikolina Lovrić, Frane Delaš (2010) Aflatoksin M1 u sirovom mlijeku i vezanje aflatoksina pomoću bakterija mliječne kiseline. Mljekarstvo 60 (4), 244-251 (2010)
- Marth, E. i Dole, M. (1979.): Update on molds: degradation of aflatoxin; Food tehnol. 33: 81-87
- McGlynn K.A., London W.T. (2005): Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma; Best Practice Res Clin Gastroenterol 19: 3-23.
- Montagna, M.T., Napoli, C., De Giglio, O., Iatta, R., Barbuti, G. (2008): Occurrence of Aflatoxin M1 in Dairy Products in Southern Italy. International Journal of Molecular Sciences 9 (12), 2614-2621

Ngindu A., Johnson B.K., Kenya P.R., Ngira J.A., Ocheng D.M., Nandwa H., Omondi T.N., Jansen A.J., Ngare W., Kaviti J.N., Gatei D., Siongok T.A. (1982): Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in Kenya; *Lancet* 1346-1348.

Ožegović, L. i Pepeljnjak, S. (1995): Mikotoksikoze, Školska knjiga, Zagreb

Panariti, E. (2001): Seasonal variations of aflatoxin M1 in the farm milk in Albania. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 52 (1), 37-41.

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 (10), 2152-2156.

Pietri, A., Diaz, G. (2003): Personal communication, Faculty of Agriculture UCSC, Piacenza, Italy.

Prasanna, H., Gupta, S., Viswanathan, L., Venkitasubramanian, T. (1975): Fluorescence changes of aflatoxin B1 and G1; *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 159: 319-322

Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 146/2012)

Pravilnik o sirevima i proizvodima od sireva (NN 20/09)

Richard, J. L. (2007): Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview. *International Journal of Food Microbiology* 119: 3 – 10

Russo, J.R., i Yanong, R.P.E. (2002): *Molds in Fish Feeds and Aflatoxicosis*. University of Florida IFAS Extension.

Valpotić, H. i Šerman, V. (2006): Utjecaj mikotoksina na zdravlje i proizvodnost svinja; *Krmiva* 48: 33-42.

Van Egmond, H. i Speijers, G. (1990): Food contaminants, naturally occurring toxicants in foodstuffs; *Mycotoxins, Food Laboratory News* 20: 38-45

Williams J.H., Phillips T.D., Jolly P.E. Stiles J.K. Jolly C., Aggarwal D. (2004): Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions; *Am J Clin Nutr* 80: 1106-1122.

Yousef, A. E., & Marth, E. H. (1989). Stability and degradation of aflatoxin M1. In H.P. Van Egmond, *Mycotoxins in dairy products*, pp. (127-161), London: Elsevier.