



## PREGLEDNI RAD / REVIEW

# Aflatoksini - Onečišćenje, učinci i metode redukcije

Jelka Pleadin<sup>1\*</sup>, Jadranka Frece<sup>2</sup>, Ksenija Markov<sup>2</sup><sup>1</sup>Dr. sc. Jelka Pleadin, dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica, Hrvatski veterinarski institut, Savska cesta 143, 10 000 Zagreb<sup>2</sup>Dr. sc. Jadranka Frece, dipl. ing. biotehnol., izvanredni profesor, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb<sup>2</sup>Dr. sc. Ksenija Markov, dipl. ing. biotehnol., izvanredni profesor, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb**Sažetak**

Plijesni roda *Aspergillus* među najčešćim su uzročnicima kvarenja hrane i hrane za životinje, a u nepovoljnim uvjetima mogu proizvesti mikotoksine kao toksične sekundarne metabolite. Aflatoksini su skupina mikotoksina koji često onečišćuju različite žitarice, među kojima najčešće kukuruz, a ulaskom u prehrambeni lanac uslijed ishrane životinja onečišćenim krmivom, mogu biti prisutni i u hrani životinjskog podrijetla. Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) svrstava aflatoksine u humane karcinogene skupine 1A, a sa stajališta zdravstvene ispravnosti, jedan od najvažnijih mikotoksina je aflatoksin B1. Zbog snažnog karcinogenog, teratogenog i mutagenog djelovanja, čiji su učinci u ljudi i životinja u ovisnosti o razini i trajanju izlaganja, prisutnost aflatoksina B1 u hrani i hrani za životinje potrebno je potpuno spriječiti ili zadržati na najnižoj mogućoj razini. Kako prisutnost aflatoksina može biti opasna po zdravlje ljudi i životinja, u cilju sprječavanja štetnih učinaka, ali i posljedičnih gospodarskih problema velikih razmjera, stalna kontrola u hrani i hrani za životinje od velikog su značaja širom svijeta. U cilju proizvodnje zdravstveno ispravne hrane potreban je kontinuirani razvoj novih metoda za detekciju aflatoksina i redukciju onečišćenja kao i sustavna provedba monitoringa na reprezentativnom broju uzoraka hrane i hrane za životinje.

**Ključne riječi:** aflatoksini, aflatoksin B1, hrana i hrana za životinje, onečišćenje, učinci u organizmu, redukcija**Summary**

Moulds of the genus *Aspergillus* are among the most common causes of food and feed spoilage, producing mycotoxins as toxic secondary metabolites in adverse conditions. Aflatoxins are a group of mycotoxins that often contaminate a variety of grains, usually maize, and which from contaminated animal feedstuff can enter into the food chain and to be present in food of animal origin. International Agency for Research on Cancer (IARC) classified aflatoxins in group 1A as carcinogens for humans. From the standpoint of health and safety, one of the most important mycotoxins is aflatoxin B1. Because of its strong carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects, whose effects in humans and animals depend on the level and duration of exposure, the presence of this contaminant in food and feed should be avoided completely or to be kept as low as possible. How the presence of aflatoxin can be dangerous for humans and animals health, in order to prevent adverse effects, and consequent economic problems of large-scale, permanent control of food and feed is of great importance worldwide. In order to achieve safe food production, continuous development of new methods for the detection and reduction of aflatoxin contamination, as well as the systematic monitoring on a representative number of samples of food and feed, are required.

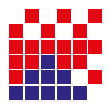
**Keywords:** aflatoxins, aflatoxin B1, food and feed, contamination, effects in the body, reduction**Uvod**

Na polju, ali i tijekom skladištenja, može doći do onečišćenja žitarica plijesnima koje proizvode toksične kemijske spojeve mikotoksine. Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni koji induciraju akutne i kronične toksične učinke kod ljudi i životinja (IARC, 1993). Glavni izvor mikotoksina kod ljudi su žitarice i proizvodi na bazi žitarica te orašasti plodovi, ali i proizvodi životinjskog podrijetla uslijed sekundarnog onečišćenja plijesnima koje produciraju mikotoksine. Stupanj onečišćenja pri tom značajno ovisi o mikroklimatskim uvjetima (sadržaju vlage u proizvodu, relativnoj vlažnosti zraka, temperaturi, pH vrijednosti i supstratu) koji mogu pogodovati rastu plijesni i sintezi mikotoksina. Pri tom odsutnost vidljivih plijesni u hrani općenito ne znači nužno da nisu prisutni mikotoksini.

Ova skupina kemijskih spojeva u značajnoj mjeri ugrožava zdravstvenu ispravnost hrane i hrane za životinje te predstavlja rizik po zdravlje ljudi i životinja. Onečišćenje poljoprivrednih proizvoda mikotoksinima, budući da uzrokuje velike ekonomske gubitke, ima negativan utjecaj na gospodarstvo

zahvaćene regije, prvenstveno zemalja u razvoju u kojima se strategija sprječavanja rasta plijesni u razdoblju žetve i tijekom skladištenja usjeva uglavnom primjereno niti ne provodi (Rustom, 1997). S ciljem sprječavanja onečišćenja suvremenu proizvodnju zdravstveno ispravnih i kvalitetnih proizvoda potrebno je temeljiti na načelima "od farme do stola", HACCP (*eng.* Hazard analysis and critical control points) sustavu odnosno analizi opasnosti, prevenciji i kontroli kritičnih točaka te uklanjanju potencijalnih opasnosti u tehnološkom postupku proizvodnje (Asefa i sur. 2011).

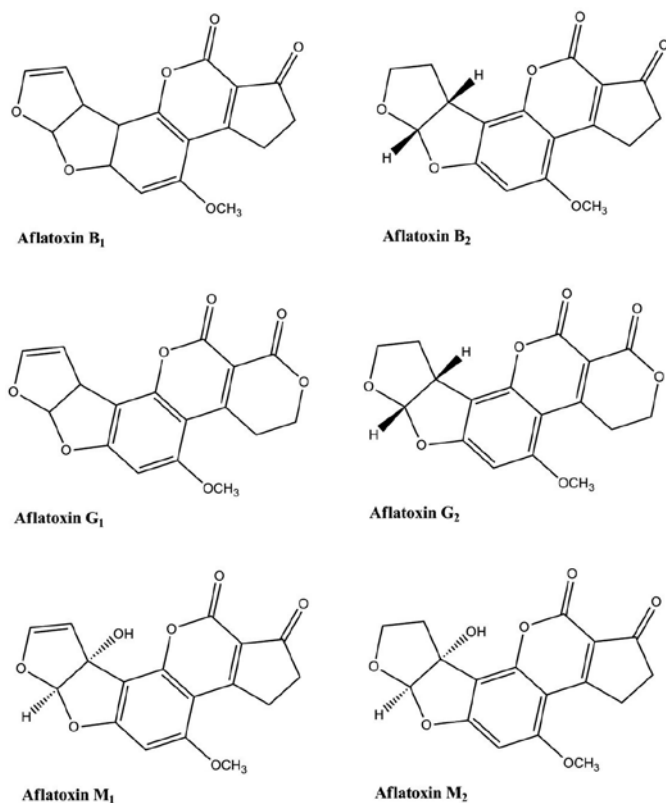
Žitarice kao što su kukuruz, pšenica, ječam i zob značajno su zastupljene ne samo u prehrani ljudi već su od značaja i za industrijsku preradu hrane i hrane za životinje. Konzumacija žitarica uravnotežuje prehranu osiguravajući unošenje niskog udjela masti te daje niz drugih prednosti, prvenstveno ukoliko se zrnje žitarica konzumira neoljušteno. Žitarice su ujedno i čest izvor onečišćenja, posebice mikotoksina, jer pri temperaturi i vlazi koje pogoduju sintezi mikotoksina mogu postati njihov izvor, i to prije i/ili za vrijeme trajanja žetve, pri ručkovanju, otpremi i skladištenju. Među najznačajnijim miko-



toksinima, kojima se u zadnja tri desetljeća posvećuje velika pozornost, su aflatoksini.

Proučavanje aflatoksina (slika 1) započinje nakon ugibanja više od 100 000 mladih purana na peradarskim farmama Engleske, pri čemu je utvrđeno da se uginuće peradi može dovesti u vezu s hranidbom krmnom smjesom koja je sadržavala brazilski kikiriki onečišćen aflatoksinom (Goldblatt, 1969). Poznato je da aflatoksine proizvode vrste iz roda *Aspergillus*, i to *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*. Riječ je o visokotoksičnim, izrazito teratogenim i karcinogenim spojevima, koji u ljudskom i životinjskom organizmu ujedno djeluju i imunosupresijski, te izazivaju akutne i kronične toksične učinke (Eaton i Gallagher, 1994; Massey i sur., 1995; EFSA, 2004; Meggs, 2009). Među njima najznačajniji je aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) koji predstavlja naj snažniji hepatokarcinogen poznat u sisavaca, a Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC; eng. International Agency for Research on Cancer) svrstava ga u karcinogene 1. skupine (IARC, 1993).

U dokumentu EFSA (eng. European Food Safety Authority) iz 2013. godine, baziranom na prikupljenim analitičkim podacima o aflatoksinima u hrani tijekom razdoblja 2007.-2012., navodi se potreba daljnjeg prikupljanja podataka o pojavnosti aflatoksina u žitaricama i proizvodima na bazi žitarica te namirnicama životinjskog podrijetla, na reprezentativnom broju uzoraka. Nadalje, s obzirom na različitost u provedbi kontrola i dostupnosti podataka o onečišćenju aflatoksinima, dokument ukazuje na potrebu usklađivanja izvješćivanja o utvrđenim razinama ovog toksina na nivou svih europskih zemalja (EFSA, 2013).



**Slika 1.** Kemijske strukture glavnih predstavnika aflatoksina (Delaš, 2010)

**Figure 1.** Chemical structure of the main representatives of aflatoxins (Delaš, 2010)

## Izloženost aflatoksinima kroz prehrambeni lanac

Organizacija za hranu i poljoprivredu (FAO; eng. Food and Agriculture Organization) procijenila je da je, na globalnoj razini, 25% usjeva u konačnici namijenjenih prehrani ljudi ili hranidbi životinja onečišćeno mikotoksinima. Pri tom aflatoksini, zbog njihove izrazite toksičnosti i učestale prisutnosti u brojnim žitaricama te namirnicama životinjskog podrijetla, predstavljaju najveći rizik u prehrambenom lancu (Scholthof, 2003), budući da onečišćena krmiva koje se koriste u hranidbi životinja sa farmi predstavljaju glavni izvor AFB<sub>1</sub> (Huwing i sur., 2001; Gareis and Wolff, 2000). Do onečišćenja sa AFB<sub>1</sub> može doći tijekom žetve, transporta i skladištenja žitarica i proizvoda, kao i prilikom neprimjerenog rukovanja usjevima nakon žetve (Alonso i sur., 2011).

Aflatoksini su stabilni kemijski spojevi koje postupci prerade hrane uglavnom ne mogu uništiti, a s obzirom da su žitarice čest izvor AFB<sub>1</sub> posljedično su onečišćeni i gotovi proizvodi na bazi žitarica. Međutim, onečišćenje aflatoksinima ponekad je i neizbježno, što nameće potrebu za uvođenjem pogodnih postupaka prerade hrane i hrane za životinje kojima bi se mogao inaktivirati toksin. Kukuruz se kao žitarica uzgaja u najvećem dijelu svijeta i učestalo koristi u prehrani ljudi i životinja te predstavlja poseban problem (Lewis, 2005). Zbog njegove nutritivne vrijednosti, temeljem dopuštenih vrijednosti, većih od najvećih dopuštenih količina (NDK) aflatoksina u hrani za životinje u odnosu na hranu, veliki udio svjetske proizvodnje kukuruza namijenjen je upravo hranidbi životinja.

Imajući u vidu činjenicu da je u dijelovima svijeta u kojima vlada tropska ili suptropska klima rizik od onečišćenja AFB<sub>1</sub> općenito prepoznat kao visok, dominantan je nadzor nad AFB<sub>1</sub> u krmivima kao što su kukuruz, pogače kikirikija i suncokreta, ekstrahirani kopar, gluten podrijetlom iz kukuruza, rižine posije, sjeme pamuka, ljuske palme i sojino zrnje, uvozenim iz trećih zemalja, za koje je utvrđeno da su glavni izvori AFB<sub>1</sub>. U nekim zemljama svijeta utvrđena je izrazito onečišćenje lokalno uzgojenoga kukuruza, korištenog u krmivima u hranidbi životinja sa farmi za proizvodnju hrane, sa značajno povišenim razinama AFB<sub>1</sub> u odnosu na propisane (EFSA, 2004; Pleadin i sur., 2014; Pleadin i sur., 2015).

U brojnim zemljama svijeta utvrđeno je onečišćenje mliječnih proizvoda, sjemena pamuka, ječma, zrnja soje, peletirane pšenice, ljuski kikirikija te krmiva na bazi kukuruza i sirka (Decastelli i sur., 2007; Sassahara i sur., 2005). Kada je riječ o muznoj stoci, problem se ne svodi samo na obolijevanje životinja i proizvodne gubitke, nego i na činjenicu da se u mlijeku životinja hranjenih krmivom onečišćenim sa AFB<sub>1</sub> može nalaziti njegov metabolički produkt AFM<sub>1</sub>, što može ugroziti zdravlje ljudi koji te proizvode konzumiraju (Boudra i sur., 2007; Veldman i sur., 1992; Prandini i sur., 2009). Općenito, literaturni podaci ukazuju da su ljudi izloženi AFB<sub>1</sub>, bilo izravnom konzumacijom onečišćene hrane, bilo neizravno konzumacijom proizvoda životinjskoga podrijetla (npr. mlijeka i jaja) podrijetlom od životinja koje su konzumirale onečišćeno krmivo (Rustom, 1997; Bennett i Klich, 2009; Markov i sur., 2013).

## Uvjeti nastanka i mjere prevencije

Najznačajnije aflatoksinogene vrste plijesni su *A. flavus* i *A. Parasiticus*. *A. flavus* nastanjuje zračne dijelove biljke (listovi, cvijet) i proizvodi aflatoksine skupine B, dok se *A. para-*

*siticus* nalazi na dijelovima biljke bliže tlu i proizvodi aflatoksinine i B i G skupine. Na tvorbu mikotoksina prije i nakon žetve žitarica uvelike utječu klimatski uvjeti, a onečišćenje usjeva aflatoksinima povezuje sa visokim temperaturama okoliša, oštećenjima usjeva posredovanjem insektima te duljim sušnim razdobljima (Payne, 1998; Dorner, 2008; Pleadin i sur., 2014).

Onečišćenje *Aspergillus* vrstama može se javiti i prije i poslije žetve, dok je onečišćenje plijesnima iz roda *Fusarium učestalija u razdoblju prije žetve* (Abramson, 1998). Veliko onečišćenje plijesnima javlja se u toplim i vlažnim tropskim i subtropskim područjima, najčešće kod kukuruza (Widstrom, 1996). Stupanj vlage u zrnu žitarica poglavito ovisi o vlažnosti usjeva u trenutku žetve, o učestalosti i učinkovitosti sušenja usjeva, njihovu provjetranju i miješanju prije i nakon uskladištenja te o reakcijama metabolizma kukaca i mikroorganizama prisutnih u uskladištenom zrnju (Bryden, 2012).

Sušni uvjeti i visoke temperature tijekom rasta i berbe kukuruza, potiču rast *Aspergillus* vrsta, a time i proizvodnju AFB<sub>1</sub>, uz optimalnu temperaturu u rasponu 25 do 42 °C (Santini, 2005). Upravo takvi vremenski uvjeti, zabilježeni tijekom 2012. godine u Republici Hrvatskoj, bili su uzrokom pojave onečišćenja kukuruza i krmnih smjesa za goveda sa AFB<sub>1</sub> te posljedično i mlijeka sa AFM<sub>1</sub> sa farmi mliječnih goveda (Pleadin i sur., 2014; Bilandžić i sur., 2014; Pleadin i sur., 2015). Također, visoke temperature i sušna razdoblja pogoduju kolonizaciji raznih insekata i dovede do pucanja i oštećenja zrna kukuruza, dodatno omogućavajući sintezu toksina.

Ranija istraživanja ukazuju na to da pojavnost onečišćenja sa AFB<sub>1</sub> u značajnoj mjeri ovisi o regiji u kojoj se žitarice uzgajaju (Rustom, 1997; Reddy i sur., 2009). Utvrđeno je da na stvaranje aflatoksina u različitim biološkim materijalima utječu čimbenici poput vrste supstrata, sadržaja vlage u supstratu, prisutnosti aflatoksikogenih plijesni, prisutnosti mineralnih tvari te mehaničkog oštećenja zaštitne ovojnice zrna (Viquez i sur., 1994). Općenito, usjevi uskladišteni dulje od nekoliko dana potencijalni su izvori rasta plijesni, a time i nastanka mikotoksina (Turner i sur., 2009), a na prvom mjestu podložnosti onečišćenju aflatoksinima su kukuruz i proizvodi od kukuruza (Groopman i Donahue, 1988).

Genetički inženjering i razvoj hibridnih sorti otpornih na infekciju različitim sojevima plijesni iz roda *Aspergillus* (Widstrom, 1996) vjerojatno predstavljaju nove načine smanjenja onečišćenja aflatoksinima u razdoblju prije žetve, barem kada su u pitanju neke vrste žitarica. Kontrolu nad usjevima podložnih onečišćenju sa AFB<sub>1</sub> u razdoblju nakon žetve moguće je postići kontrolom nad čimbenicima koji utječu na rast plijesni, primjerice, uspostavljanjem kontrole nad udjelom i aktivnošću vode, temperaturom okoline, plinovima u atmosferi te uporabom insekticida ili konzervansa. Pri skladištenju zrnja žitarica i orašastih plodova pozornost je poglavito potrebno usmjeriti na održavanje aktiviteta vode na razini nižoj od one koja pospješuje rast plijesni (IARC, 2002). Rizik od oštećenja zaštitne ovojnice i posljedičnog stvaranja AFB<sub>1</sub> moguće je smanjiti ubiranjem samo onih usjeva u čijem zrnju sadržaj vlage iznosi približno 24% (Prandini i sur., 2009).

## Učinak mikotoksina u ljudi i životinja

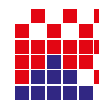
Životinje se razlikuju po svojoj osjetljivosti uslijed izlaganja aflatoksinima, a toksični učinci, poznati pod nazivom

aflatoksikoze, ovise o trajanju i razini izloženosti, putu ulaska aflatoksina u organizam, čimbenicima okoliša, starosti te zdravstvenom i nutritivnom statusu životinje (Leeson i sur., 1995; FDA, 2002). Kada je riječ o ljudima, do izlaganja AFB<sub>1</sub> poglavito dolazi putem konzumacije onečišćene hrane, primjerice žitarica, kikirikija, sirka, kopra i riže, indijskoga oraščića, lješnjaka, oraha, pistacija i badema (Busby i Wogan, 1984; Abdel-Gawad i Zohri, 1993; Mahoney i Rodriguez, 1996). Toksičnost AFB<sub>1</sub> očituje se i kroz djelovanje njegova metabolita AFM<sub>1</sub>, prvi put utvrđenoga u mokraći čovjeka tijekom istraživanja etiologije raka jetre uzrokovanoga AFB<sub>1</sub> (Campbell i sur., 1970).

Nelson i sur. (1993) opisali su mikotoksikoze koje nastaju zbog konzumacije krmiva onečišćenih mikotoksinima. Preživvači, kao što su goveda i ovce, u pravilu su otporniji na mikotoksine od većine drugih životinja, posebice svinje, zbog toga što mikroba flora buraga preživvača omogućava proces detoksikacije. Ova spoznaja temelji se na rezultatima istraživanja koja su pokazala da flora buraga može prevesti više mikotoksina u metabolite, koji pri uobičajenoj razini izlaganja imaju manji toksični potencijal od izvornog spoja ili su čak biološki neaktivni (Kiesling i sur., 1984).

Kako je onečišćenje hrane životinjskog podrijetla i krmiva aflatoksigenim plijesnima i njihovim toksinima vrlo učestala, toksični učinci AFB<sub>1</sub> na zdravlje životinja bilježe se diljem svijeta (FAO, 2004). U ljudi i stoke AFB<sub>1</sub> može uzrokovati karcinom jetre i drugih organa, kako je to neosporno dokazano u nekoliko životinjskih vrsta, pri čemu su prvi simptomi gubitak apetita i gubitak na tjelesnoj masi (Busby i Wogan, 1984; Eaton i Gallagher, 1994). Ostale bolesti koje se povezuju s izloženosti ljudi AFB<sub>1</sub> uključuju hepatitis i fibrozu jetre, sporiji rast kod djece i Reyev sindrom. Istraživanja načina djelovanja AFB<sub>1</sub> otkrila su njegov inhibicijski učinak na replikaciju DNA i RNA te na sintezu proteina. U suprotnosti s mnogim mikotoksinima, aflatoksini moraju biti biološki transformirani prije nego što izazovu reakciju u živom organizmu. Kao rezultat biotransformacije, stvara se derivat AFB<sub>1</sub>, aflatoksin B<sub>1</sub>-2,3-epoksid, koji je visoko reaktivni metabolit i koji reagira s nukleofilnim mjestima u makromolekulama (Wild i Hall, 2000; Turner i sur., 2003). Više je istraživača suglasno da je AFB<sub>1</sub> toksičniji za mladunčad (IARC, 1993; Vainio i sur., 1994). U brojnim je dijelovima svijeta uočeno da je u osoba inficiranih virusom hepatitisa B, AFB<sub>1</sub> glavni etiološki čimbenik odgovoran za razvoj hepatocelularnoga karcinoma (Wild i Hall, 2000).

Kronična ingestija AFB<sub>1</sub> ima različite štetne učinke, kao što su veća podložnost bolestima, gubitak spolne moći te, kada je riječ o muznoj stoci, opadanje količine i kvalitete mlijeka. U životinja uzgajanih u svrhu proizvodnje mesa koje su konzumirale onečišćeno krmivo, ingestija AFB<sub>1</sub> rezultira značajnim opadanjem kvalitete mesa (Bonomi i sur., 1994), smanjenom konzumacijom krmiva ili potpunim odbijanjem hrane životinja, smanjenom apsorpcijom hranjivih tvari, metaboličkim poremećajima, smanjenjem sintezom bjelancevina te supresijom endokrinoga i imunološkoga sustava. Akutna intoksikacija često je smrtonosna kako u ljudi, tako i u stoke. U životinja sa farmi može se javiti teška i iznenadna anoreksija, konvulzije, odbijanje hrane, gubitak na tjelesnoj masi, diskoloracija jetre, smanjenje broja snijetih jaja, smanjenje brzine energetske pretvorbe te onečišćenje mlijeka. Uz to, konzumirano krmivo gubi



svoju uobičajenu hranidbenu vrijednost i učinkovitost, što do-  
vodi do usporavanja rasta stoke (Waliyar i sur., 2007).

## Zakonodavstvo u Europskoj uniji

Od otkrića aflatoksina 60.-tih godina prošloga stoljeća, u brojnim su zemljama svijeta stupili na snagu propisi kojima se potrošače nastoji zaštititi od njihovih opasnih učinaka, s obzirom da isti mogu onečistiti različite kategorije hrane. Pri definiranju najvećih dopuštenih količina (NDK; *eng.* Maximum Permitted Levels MPLs) u hrani i hrani za životinje uzimaju se u obzir brojni čimbenici, a značajnu ulogu ima i raspoloživost znanstveno utemeljenih podataka koji mogu poslužiti kao uporište za procjenu rizika, primjerice raspoloživost toksikoloških podataka, podataka o konzumaciji, podataka o razini i raspodjeli mikotoksina u proizvodima koje konzumiraju ljudi ili se koriste u hranidbi životinja te podataka o analitičkoj metodologiji koja se koristi u njihovom određivanju. Gospodarski čimbenici također imaju utjecaja na definiranje graničnih razina AFB<sub>1</sub> propisanih zakonodavstvom u svakoj pojedinoj državi (FAO/WHO, 2008). U usporedbi s drugim dijelovima svijeta, Europska unija (EU) ima najposebnije i najtemeljnije razrađene propise koji definiraju NDK za AFB<sub>1</sub> u različitim vrstama hrane i hrane za životinje. Uz to, brojne države (kandidati za članstvo u EU) također su donijele propise kojima se regulira prisutnost ovih mikotoksina u hrani i hrani za životinje, uključujući sve stavke iz trenutno važećih propisa na području EU.

Metode uzorkovanja i analize koje nadležna tijela trebaju provoditi u svrhu kontrole razina aflatoksina propisane su Uredbom Komisije broj 401/2006, izmijenjenom i dopunjenom

**Tablica 1.** *Općenito sigurne najveće dopuštene količine AFB<sub>1</sub> u hrani i hrani za životinje (Uredba Komisije 1881/2006 i 165/2010; Direktiva Komisije 2003/100/EC)*

**Table 1.** *Generally safe maximum levels of AFB<sub>1</sub> in food and feed (Commission Regulation 1881/2006 and 165/2010; Commission Directive 2003/100/EC)*

Hrana / hrana za životinje	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)
Hrana namijenjena prehrani ljudi Kukuruz i žitarice kao krmiva u proizvodnji hrane za životinje	20
Kukuruz i žitarice za uzgoj rasplodne junadi, svinja i peradi	100
Kukuruz i žitarice za ishranu svinja	200
Kukuruz i žitarice za uzgoj tovne junadi, svinja i peradi	300

Uredbom Komisije EU broj 178/2010. Time se osigurava ujednačenost kriterija koja nadležna tijela diljem EU primjenjuju pri uzorkovanju istih proizvoda te poštivanje određenih metodoloških kriterija kao što su iskorištenje i preciznost analitičke metode koja se primjenjuje u njihovom određivanju. NDK za aflatoksine u hrani, uključujući posebno razinu AFB<sub>1</sub> te ukupnu razinu aflatoksina, propisane su Uredbom Komisije EU broj 1881/2006 te dodatno Uredbom Komisije broj 165/2010.

NDK za AFB<sub>1</sub> u krmivima, trenutno važeće u državama članicama EU i propisane Direktivom Komisije 2003/100/EC

te izmjenom i dopunom 2002/32/EC, značajno se razlikuju od onih propisanih u drugim državama svijeta. Spomenutom Direktivom definirane su NDK po vrstama krmiva i krmnih smjesa dok se propisima nekih država u ovom kontekstu navodi više graničnih vrijednosti u ovisnosti o svrsi za koju će se krmivo koristiti. Imajući u vidu nastanak AFM<sub>1</sub> iz AFB<sub>1</sub> u mlijeku i mliječnim proizvodima, sa stajališta ljudskoga zdravlja najstroži kriterij za AFB<sub>1</sub> primjenjuje se na krmiva namijenjena ishrani muzne stoke (NDK= 5 µg/kg). Najveće dopuštene razine koje se smatraju općenito sigurnim u hrani i hrani za životinje navedene su u tablici 1.

U Republici Hrvatskoj se putem Državnog programa monitoringa rezidua i Državnog plana službenih kontrola i monitoringa hrane za životinje, Ministarstva poljoprivrede, provodi nadzor onečišćenja ovim mikotoksinima u različitim materijalima te se utvrđene količine interpretiraju u skladu sa NDK propisanim zakonodavstvom u RH odnosno EU te sukladno limitu detekcije primijenjene analitičke metode.

## Analitičke metode za određivanje aflatoksina

U svrhu određivanja aflatoksina koriste se različite orijentacijske (*screening*) i potvrdne analitičke metode, a koje se nadalje mogu podijeliti na kvalitativne i kvantitativne. Orijentacijske metode uključuju analitičke postupke za koje se može na dokumentirani sljedivi način pokazati da su vrjednovane te da im je na razini koncentracije od interesa postotak lažno negativnih rezultata manji od 5%. Od orijentacijskih metoda u određivanju mikotoksina najčešće se koristi imunoenzimska (ELISA) metoda (Perši, 2012).

Razvoj ELISA metode omogućio je provedbu brzih, ponovljivih i osjetljivih analitičkih metoda, pogodnih i za određivanje aflatoksina. Literaturni podaci ukazuju da kada je riječ o određivanju aflatoksina, ELISA ima brojne prednosti pred drugim analitičkim metodama. Te se prednosti poglavito odnose na brzinu izvedbe metode, mogućnost analize velikog broja uzoraka u kratkom razdoblju, visoku specifičnost, jednostavnost, nisku cijenu koštanja i korištenje neškodljivih reagensa (Pestka, 1994; Zheng i sur., 2005; Goryacheva i sur., 2007; Ayejuyo i sur., 2011). Kvaliteta ELISA kitova međutim može varirati od proizvođača do proizvođača, a postoje razlike i u različitim serijama kitova istog proizvođača.

Druge metode određivanja aflatoksina uključuju tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC; *eng.* High Performance Liquid Chromatography), plinsku kromatografiju (GC; *eng.* Gas Chromatography), tekućinsku kromatografiju/masenu spektrometriju (LC/MS; *eng.* Liquid Chromatography/Mass Spectrometry), odnosno plinsku kromatografiju/masenu spektrometriju (GC/MS; *eng.* Gas Chromatography/Mass Spectrometry). Ove metode za razliku od orijentacijskih iziskuju korištenje sofisticirane laboratorijske opreme (Xiang i sur., 2006; Krska i sur., 2008; Rahmani i sur., 2009; Stephard i sur., 2011).

HPLC metoda se odlikuje visokom djelotvornošću, visokom osjetljivošću i velikom sposobnosti razlučivanja (Herzallah, 2009; Peiwu i sur., 2011). Suvremena analitika uvelike se oslanja na HPLC u okviru koje se, ovisno o kemijskoj strukturi različitih sastojaka koriste različiti adsorbensi. Najčešće korišteni HPLC detektori su fluorescentni detektori (FLD), a u posljednjem desetljeću često se kombinira i sa masenom spek-

trometrijom (MS) (Li i sur., 2009). MS omogućava izrazito točnu i specifičnu detekciju, pri čemu ograničavajuće čimbenike predstavljaju visoka cijena potrebne opreme te složenost postupaka ekstrakcije i odjeljivanja te detekcije i kvantifikacije ovih spojeva (Turner i sur., 2009). U određivanju mikotoksina rjeđe su zastupljene metode kapilarne elektroforeze te metode s biosenzorima kojima se isti određuju prema intenzitetu fluorescencije.

Prema Pravilniku o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (N. N. 2/05) prikladne potvrdne metode za određivanje mikotoksina su i LC i GC uz dokazivanje IR spektrometrijskom detekcijom, LC-full-scan DAD, 2-D TLC-full scan UV/VIS, LC-UV/VIS te GC-elektron apsorpcijska detekcija (Perši, 2012). U tablici 2. prikazane su prednosti i nedostaci pojedinih metoda koje se primjenjuju u određivanju mikotoksina, ujedno i aflatoksina.

### Metode redukcije aflatoksina

Zbog činjenice da prisutnost plijesni i/ili mikotoksina u hrani može biti opasna po ljudsko zdravlje i predstavljati gospodarski problem enormnih razmjera sve je veći naglasak na razvoj metoda redukcije mikotoksina kojima bi se omogućila proizvodnja zdravstveno ispravne hrane. Metode nadzora nad zdravstvenom ispravnošću hrane u ovom području, moguće je svrstati u dvije kategorije: (1) metode sprječavanja onečišćenja plijesnima i rasta plijesni i (2) metode detoksikacije onečišćenih proizvoda (Riley i Norred, 1999; Mishra i Das, 2003). Primijenjena metoda redukcije AFB<sub>1</sub> treba učinkovito inaktivirati ili u potpunosti ukloniti mikotoksin ne narušavajući pritom nutritivna i tehnološka svojstva proizvoda i ne stvarajući reaktivne toksične produkte (López-García i Park, 1998).

Rast plijesni na različite načine moguće spriječiti i prije i nakon žetve. Metode redukcije mogu se podijeliti na kemijske, biološke i fizikalne (Kabar i sur., 2006). Istraživanja

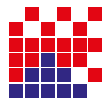
posvećena metodama inaktivacije AFB<sub>1</sub> u onečišćenoj hrani i krmivima pokazuju da je onečišćenje u razdoblju prije žetve moguće smanjiti primjerenim sušenjem zrna, te sortiranjem i skladištenjem usjeva, čime se ograničava rast aflatoksigenih plijesni. Međutim, jedinstvena metoda koja bi bila jednako djelotvorna za sve supstrate ipak ne postoji. Učinkovitost metoda inaktivacije AFB<sub>1</sub> ovisi o brojnim parametrima, primjerice o svojstvima hrane i krmiva, njihovu sastavu i sadržaju vlage te o razini onečišćenja. U pojedinim istraživanjima, detoksikaciju, 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 redukcije mikotoksina temelje se na uporabi različitih mikroorganizama, uključujući bakterije, kvasce i plijesni, koji mogu metabolizirati i inaktivirati aflatoksin, pri čemu je najdjelotvorniji *Flavobacterium aurantiacum*. Biosintezu aflatoksina inhibiraju i bakterije mliječne kiseline *Bacillus subtilis*. Pokazalo se da proces industrijske fermentacije ne dovodi do razgradnje aflatoksina, no dokazano je da se nakon destilacije u alkoholnoj frakciji ne nalazi toksin te da se obično aflatoksini koncentriraju u tropu. Kada se onečišćeni proizvod koristi u procesu fermentacije, važno je utvrditi u koju će svrhu onečišćeni nusprodukti u konačnici biti upotrijebljeni. Specifični spoj koji se pokaže učinkovitim dekontaminantom, obično je i s biološkoga stajališta i sa stajališta isplativosti bolje dodati izravno. U literaturi se navodi da je učinkovitost bioloških metoda koje su pokazale mogućnost dekontaminacije, obično ovisna o specifičnim spojevima koje proizvode odabrani mikroorganizmi (Waliyar i sur., 2007), kompeticiji za nutritivne tvari potrebne za stvaranje toksina, stvaranju anti-aflatoksigenih metabolita koje proizvode koegzistirajući mikroorganizmi. Istraživanja ukazuju na to da određeni sojevi plijesni, uključujući i *A. parasiticus*, razgrađuju AFB<sub>1</sub>, vjerojatno posredstvom peroksidaza (Lopez-Garcia i Park, 1998).

**Tablica 2.** Prednosti i nedostaci pojedinih metoda u određivanju mikotoksina (Perši, 2012)

**Table 2.** Advantages and disadvantages of different methods in determining mycotoxins (Perši, 2012)

Metoda	Prednosti	Nedostaci
TLC	jednostavna, brza i jeftina <i>screening</i> metoda; mogućnost simultanog određivanja više mikotoksina; dobra osjetljivost metode za aflatoksine i okratoksin A	slaba osjetljivost metode (za neke mikotoksine); slaba preciznost metode; kvantitativna metoda samo kad se primjenjuje densitometar
GC	simultano određivanje više mikotoksina; dobra osjetljivost metode; mogućnost automatizacije (autoempler); potvrdna metoda (MS detektor)	skupa oprema; potrebni koraci derivatizacije; nelinearna kalibracijska krivulja; <i>carry over</i> efekti; varijacije u reproducibilnosti i repetibilnosti
HPLC	dobra osjetljivost, selektivnost i repetabilnost metode; mogućnost automatizacije (autoempler); kratko vrijeme trajanja analiza; dostupnost službenih analitičkih metoda	skupa oprema; potrebni koraci derivatizacije
LC/MS	simultano određivanje više mikotoksina; dobra osjetljivost i potvrdna metoda (LC/MS/MS); ne zahtijeva derivatizacijske korake	vrlo skupa oprema; osjetljivost se oslanja na tehnicu ionizacije
ELISA	jednostavna priprema uzoraka; jeftina oprema visoke osjetljivosti; simultano određivanje više mikotoksina; pogodna kao <i>screening</i> metoda; limitirajuća uporaba organskih otapala	<i>cross</i> reaktivnost sa srodnim mikotoksinima; mogućnost lažno pozitivnih / negativnih rezultata; zahtijeva potvrdnu metodu
Brzi testovi	brze i jednostavne metode; ne zahtijevaju skupu opremu; limitirajuća uporaba organskih otapala; pogodni za <i>screening</i>	<i>cross</i> reaktivnost sa srodnim mikotoksinima; mogućnost lažno pozitivnih/negativnih rezultata; slaba senzitivnost



Inaktivacija AFB<sub>1</sub> fizikalnim metodama uključuje ekstrakciju pomoću otapala, adsorpciju te toplinsku inaktivaciju ili inaktivaciju ozračivanjem. Razine AFB<sub>1</sub> u uskladištenim namirnicama moguće je smanjiti fizikalnim metodama kakve su kolorno sortiranje, flotacija i sortiranje prema gustoći, blanširanje i prženje. Ozračivanje hrane postaje metoda široke komercijalne primjene kojom se postiže sterilnost prehrambenih proizvoda (Diehl, 1990). Gama zračenje uporabljeno u svrhu sterilizacije je postupak prolaska energije velike prodrone moći kroz različite materijale, koje pri tom uzrokuje izravno oštećenje DNA putem ionizacije te nastanak mutacija i smrt pojedinih stanica. U literaturi se mogu naći brojna izvješća o povećanom, smanjenom ili pak nepromijenjenom intenzitetu sinteze mikotoksina nakon ozračivanja plijesni u različitim uvjetima. Stručni odbor FAO/IAEA/WHO ukazao je da ozračivanje bilo koje hrane prosječnom ukupnom dozom do 10 kGy, s toksikološkog, nutritivnog odnosno mikrobiološkog stajališta ne predstavlja opasnost za ljudsko zdravlje (WHO, 1991) te je Europska zajednica 1999. godine odobrila ovu dozu kao maksimalnu prosječnu dozu koju ozračena hrana smije apsorbirati.

Uporaba kemikalija u svrhu inaktivacije, vezivanja ili uklanjanja aflatoksina uključuje propionsku kiselinu, amonijak, bakreni sulfat, benzojevu kiselinu, limunsku kiselinu i neke druge kemikalije koje reagiraju s aflatoksinima (Gowda i sur., 2004). Ovi spojevi prevode AFB<sub>1</sub> u manje toksične i mutagene spojeve, kakvi su kiseline, lužine, oksidansi, bisulfiti i plinovi. Ukoliko je odobreno, razine AFB<sub>1</sub> u namirnicama namijenjenim hranidbi životinja moguće je reducirati korištenjem agensa kao što su adsorptivne gline te amonizacijom. Amonizacija je jedini proces kemijske inaktivacije koji se pokazao učinkovitim u razaranju AFB<sub>1</sub> u sjemenu pamuka i pogači od pamukova sjemena, kikirikiju i pogači od kikirikija te kukuruza (Park i sur., 1988; Park i Price, 2001). Glavna svrha amonizacije je uklanjanje AFB<sub>1</sub> iz krmiva namijenjenih hranidbi krava muzara (IARC, 2002). Kemijske metode redukcije AFB<sub>1</sub> u načelu se smatraju nepraktičnim i nepoželjnim, zbog uvjeta tlaka i temperature pri kojima se reakcije provode, škodljivosti uslijed stvaranja toksičnih ostataka te negativnog utjecaja na nutritivna, senzorska i funkcionalna svojstva proizvoda (Rustom, 1997). Stoga su do danas odobrene isključivo za korištenje u svrhu smanjenja prisutnosti AFB<sub>1</sub> u krmivima.

## Zaključak

AFB<sub>1</sub> je mikotoksin koji u ljudi i životinja ima snažno karcinogeno, teratogeno i mutageno djelovanje, a njegov učinak je u ovisnosti o razini i trajanju izlaganja. Zbog izrazite toksičnosti, onečišćenje hrane i hrane za životinje sa AFB<sub>1</sub> potrebno je u potpunosti spriječiti ili zadržati na najnižoj mogućoj razini. U cilju proizvodnje zdravstveno ispravne hrane, te sprječavanja gospodarskih problema velikih razmjera koje onečišćenje sa AFB<sub>1</sub> može uzrokovati, potreban je kontinuirani razvoj i primjena suvremenih metoda u njegovoj detekciji i redukciji onečišćenja, kao i sustavna provedba državnih monitoringa na reprezentativnom broju uzoraka hrane i hrane za životinje.

## Literatura

Abdel-Gawad K. M., Zohri A. A. (1993) Fungal flora and mycotoxins of six kinds of nut seeds for human consumption in Saudi Arabia. *Mycopathologia*, 124, 55-64.

Abramson D. (1998) Mycotoxin formation and environmental factors. U: Sinha K. K., Bhatnagar D. (ed): *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, str. 255-277. Marcel Dekker, Inc, New York, USA.

Alonso V. A., González Pereyra M. L., Armando M. R., Dogi C. A., Dalcero A. M., Rosa C. A. R., Chiacchiera S. M., Cavaglieri L. R. (2011) Silage contribution to aflatoxin B1 contamination of dairy cattle feed, U: *Aflatoxins - Detection, Measurement and Control*, Torres-Pacheco I. (ed.) ISBN: 978-953-307-711-6, InTech, Dostupno na: <http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-detection-measurement-and-control/silagecontribution-to-aflatoxin-b1-contamination-of-dairy-cattle-feed>. Pristupljeno: 01.07.2014.

Asefa D.T., Kure C.F., Gjerde R.O., Langsrud S., Omer M.K., Nesbakken T., Skaar I. (2011) A HACCP plan for mycotoxigenic hazards associated with dry-cured meat production processes. *Food Control*, 22, 831-837.

Ayejuyo O. O., Olowu R. A., Agbaje T. O., Atamenwan M., Osundiya M. O. (2011) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of aflatoxin B1 in groundnut and cereal grains in Lagos, Nigeria. *Research Journal of Chemical Sciences*, 1(8), 1-5.

Bennett J. W., Klich M. (2009) Mycotoxins. *Encyclopedia of Microbiology* (Third Edition), str. 559-565.

Bilandžić N., Božić Đ., Đokić M., Sedak M., Solomun Kolanović B., Varenina I., Cvetnić Ž. (2014) Assessment of aflatoxin M1 contamination in the milk of four dairy species in Croatia. *Food control*, 43, 18-21.

Bonomi A., Quarantelli A., Mazzali I., Cabassi E., Corradi A., Lecce R., Ubaldi A., Fusari A., Chizzolini A. (1994) Effects of aflatoxins B1 and G1 on productive efficiency, meat yield and quality in fattening pigs (experimental contribution). *Journal of Food Science and Nutrition*, 23, 251-277.

Boudra H., Barnouin J., Dragacci S., Morgavi D. P. (2007) Aflatoxin M1 and ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 90(7), 3197-3201.

Bryden W. L. (2012) Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, 173, 134-158.

Busby W. F., Wogan G. N. (1984) Aflatoxins. U: Searle, C.E. (ed.): *Chemical carcinogens*, str. 945-1136. American Chemical Society, ISBN 0841208697, Washington, D.C., USA.

Campbell T. C., Caedo J. P., Bullatto J. J., Salamet L., Engel R. W. (1970) Aflatoxin M1 in human urine. *Nature* (London), 227, 403-404.

Commission Directive 2003/100/EC of 31 October 2003 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed. *Official Journal of the European Union*, L 285/33.

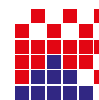
Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 364/5.

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. *Official Journal of the European Union*, L 70/12.

Commission Regulation (EU) No 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Official Journal of the European Union*, L 50/8.



- Commission Regulation (EU) No 178/2010 of 2 March 2010 amending Regulation (EC) No 401/2006 as regards groundnuts (peanuts), other oilseeds, tree nuts, apricot kernels, liquorice and vegetable oil. *Official Journal of the European Union*, L 52/32.
- Decastelli L., Lai J., Gramaglia M., Monaco A., Nachtmann C., Oldano F., Ruffè M., Sezian A., Bandirola C. (2007) Aflatoxins occurrence in milk and feed in Northern Italy during 2004–2005. *Food Control*, 18, 1263–1266.
- Delaš F. (2010) Mikrobni toksini U: Hengl. B. (ed): *Ke-mijske i fizikalne opasnosti u hrani*, str. 31-49. Hrvatska agencija za hranu, Osijek, Hrvatska.
- Diehl J. F. (1990) Safety of Irradiated Foods, Diehl J. F. (ed) str 145-179. Marcel Dekker, New York, USA.
- Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. *Official Journal of the European Communities*, L 140/10.
- Dorner J. W. (2008) Management and prevention of mycotoxins in peanuts. *Food Additives and Contaminants Part A*, 25, 203-208.
- Eaton D. L., Gallagher E. P. (1994) Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 34, 135-172.
- European Food Safety Authority (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. Request N° EFSA-Q-2003-035. *The EFSA Journal*, 39, 1-27.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2013) Technical Report. Aflatoxins (sum of B1, B2, G1, G2) in cereals and cereal-derived food products, Supporting Publications 2013: EN-406, Parma, Italy.
- FAO (2004) Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food Nutr. Pap., 1.
- FAO/WHO (2008) Animal Feed Impact on Food Safety; Report of the FAO/WHO Animal Expert Meeting, FAO Headquarters, Food and agriculture organization of the united nations, Rome.
- FDA (2002). Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. FDA/CFSAN Bad Bug Book Aflatoxins, U.S. Food & Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition.
- Gareis M., Wolff J. (2000) Relevance of mycotoxin contaminated feed for farming animals and carryover of mycotoxins in food of animal origin. *Mycoses*, 43, 79-83.
- Goldblatt L. (1969) Aflatoxin: Scientific Background, Control, and Implications, Academic Press, New York.
- Goryacheva Y., De Saeger S., Eremin S. A., Van Peteghem C. (2007) Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: evolution from single to multiple analyte screening: a review. *Food Additives and Contaminants*, 24, 1169-1183.
- Gowda N. K. S., Malathi V., Suganthi R. U. (2004) Effect of some chemical and herbal compounds on growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. *Animal Feed Science and Technology*, 116, 281-291.
- Groopman J. D., Donahue K. F. (1988) Aflatoxin, a human carcinogen: determination in foods and biological samples by monoclonal antibody affinity chromatography. *Journal of AOAC International*, 71, 861-867.
- Herzallah S. M. (2009) Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chemistry*, 114(3), 1141–1146.
- Huwing A., Freimund S., Käppeli O., Dutler H. (2001) Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, 122, 179–188.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (1993) Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans Vol. 56, str. 245–395. IARC Lyon France: World Health Organization.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (2002) Aflatoxins. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Vol. 82, str. 171–300. IARC, Lyon, France: World Health Organization.
- Kabar B., Dobson A. W., War I. (2006) Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 593–619.
- Kiessling K. H., Pettersson H., Sandholm K., Olsen M. (1984) Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Applied of Environmental Microbiology*, 47, 1070-1073.
- Krska R., Schubert-Ulrich P., Molinelli A., Sulyok M., McDonald S., Crews C. (2008) Mycotoxin analysis: an update. *Food Additives and Contaminants Part A*, 25, 152-163.
- Leeson S., Diaz G. J., Summers J. D. (1995) Poultry metabolic disorders and mycotoxins. University Books, ISBN 0-9695600-1-1, Guelph, Canada.
- Lewis L., Onsongo M., Njapau H., Schurz-Rogers H., Luber G., Kieszak S., Nyamongo J., Backer L., Dahive A., Misore A., DeCock K., Rubin C., and the Kenya Aflatoxicosis Investigation Group (2005) Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya, *Environmental Health Perspectives*, 113(12), 1763–1767.
- Li P., Zhang Q., Zhang W., Zhang J., Chen X., Jiang J., Xie L., Zhang D. (2009) Development of a class-specific monoclonal antibody-based ELISA for aflatoxins in peanut. *Food Chemistry*, 115(1), 313–317.
- Lopez-Garcia R., Park D. L. (1998) Management of mycotoxin hazards through post-harvest procedures. U: Bhatnagar D., Sinha K. K. (ed): *Mycotoxins in agriculture and food safety*, Chapter 9. New York, Marcel Dekker.
- Mahoney N. E., Rodriguez S. B. (1996) Aflatoxin variability in pistachios. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1197–1202.
- Markov K., Pleadin J., Bevardi M., Vahčić N., Sokolić-Mihalek D., Frece J. (2013) Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control*, 34, 312-317.
- Massey T. E., Stewart R. K., Daniels J. M., Ling L. (1995) Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B1 carcinogenicity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 208, 213-227.
- Meggs W. J. (2009) Epidemics of mold poisoning past and present. *Toxicology of Industrial Health*, 25(9-10), 571-576.



- Mishra H. N., Das C. (2003) A review on biological control and metabolism of aflatoxin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(3), 245–264.
- Nelson P. E., Desjardins A. E., Plattner R. D. (1993) Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. *Annual Review of Phytopathology*, 31, 233 – 252.
- Park D. L., Lee L. S., Price R. L., Pohland A. E. (1988) Review of the decontamination of aflatoxins by ammoniation: Current status and regulation. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 71, 685–703.
- Park D. L., Price W. D. (2001) Reduction of aflatoxin hazards using ammoniation. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 171, 139–175.
- 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.
- Peiwu L., Zhang Q., Zhang D., Xiaoxia G., Liu D. X., Fang S., Wang X., Zhang W. (2011). Aflatoxin Measurement and Analysis, Aflatoxins - Detection, Measurement and Control, Torres-Pacheco I. (ed.), ISBN: 978-953-307-711-6, InTech, Dostupno na: <http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-detection-measurement-and-control/aflatoxin-measurement-and-analysis>. Pristupljeno: 16.06.2014.
- Perši N. (2012) Ostaci okratoksina A u sirovinama i proizvodima od svinjskog mesa nakon subkroničnog tretmana. Doktorski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Hrvatska.
- Pestka J. J. (1994) Application of immunology to the analysis and toxicity assessment of mycotoxins. *Food and Agricultural Immunology*, 6, 219-234.
- Piva G., Galvano F., Pietri A., Piva A. (1995) Detoxification methods of aflatoxins. A review. *Nutrition Research*, 15, 767-776.
- Pleadin J., Vulić A., Perši N., Škrivanko M., Capek B., Cvetnić Ž. (2014). Aflatoxin B1 occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. *Food Control*, 40, 286-291.
- Pleadin J., Vulić A., Perši N., Škrivanko M., Capek B., Cvetnić Ž. (2015). Annual and regional variations of aflatoxin B1 levels seen in grains and feed coming from Croatian dairy farms over a 5-year period. *Food Control*, doi: 10.1016/j.foodcont.2014.07.017, in press.
- Prandini A., Tansini G., Sigolo S., Filippi L., Laporta M., Piva G. (2009) On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 984-991.
- Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (N.N. br. 02/05)
- Rahmani A., Jinap S., Soleimany F. (2009) Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 202-251.
- Reddy K. R. N., Abbas H. K., Abel C. A., Shier W. T., Oliveira C. A. F., Raghavender C. R. (2009) Mycotoxin contamination of commercially important agricultural commodities. *Toxin Reviews*, 28, 154-168.
- Riley R. T., Norred W. P. (1999) Mycotoxin prevention and decontamination. Corn – a case study. Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins, Tunis, Tunisia, 11.
- Rustom I. Y. S. (1997) Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, 59, 57-67.
- Sassahara M., Netto D. P., Yanaka E. K. (2005) Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Parana state. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 981-984.
- Santin E. (2005) Mould growth and mycotoxin production. U: *Mycotoxin blue book*. str. 225-234 Nottingham, University Press, United Kingdom.
- Scholthof K.-B. G. (2003) One foot in the furrow: linkages between agriculture, plant pathology, and public health. *Annual Review of Public Health*, 24, 153–174.
- Stephard G. S., Berthiller F., Burdaspal P., Crews C., Jonker M. A., Krska R., MacDonald S., Malone B., Maragos C., Sabino M., Solfrizzo M., Van Egmond H. P., Whitaker T. (2011) Developments in mycotoxin analysis: an update for 2009-2010. *World Mycotoxin Journal*, 4, 3-28.
- Turner N. W., Subrahmanyam S., Piletsky S. A. (2009) Analytical methods for determination of mycotoxins. *Analytica Chimica Acta*, 632, 168-180.
- 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.
- Vainio H., Heseltine E., Wilbourn J. (1994) Priorities for future IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *Environmental Health Perspectives*, 102, 590.
- Veldman A., Meijs J. A. C., Borggreve G. J., Heeres van der Tol J. J. (1992) Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. *Animal Production*, 55, 163-168.
- Viquez O. M., Castell Perez M. E., Shelby R. A., Brown G. (1994) Aflatoxin contamination in corn samples due to environmental conditions, aflatoxin-producing strains, and nutrients in grain grown in Costa Rica. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2551-2555.
- Waliyar F., Ravinder Reddy Ch., Alur A. S., Reddy S. V., Reddy B. V. S., Reddy A. R., Rai K. N., Gowda C. L. L. (2007) Management of Grain Mold and Mycotoxins in Sorghum. Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 32.
- WHO (1991) Food Irradiation. A Technique for Preserving and Improving the Safety of Food. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Widstrom N. W. (1996) The aflatoxin problem with corn grain. *Advances in Agronomy*, 56, 219-280.
- Wild C. P., Hall A. J. (2000) Primary prevention of hepatocellular carcinoma in developing countries. *Mutation Research*, 462, 381-393.
- Xiang Y., Liu Y., Lee M. L. (2006) High performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1104 (1-2), 198–202.
- Zheng Z., Humphrey C. W., King R. S., Richard J. L. (2005) Validation of an ELISA test kit for the detection of total aflatoxins in grain and grain products by comparison with HPLC. *Mycopathologia*, 159, 255–263.