

DOI: 10.7251/VJRS1302253M

UDK 615.918:637.12

Т. Марковић,¹ М. Зеленовић, Н. Митровић, В. Кадирић, Б. Иванић, З. Берић,² Ј. Лучић³

КОНВЕРЗИЈА АФЛАТОКСИНА Б1 ИЗ СТОЧНЕ ХРАНЕ У М1 АФЛАТОКСИН МЛИЈЕКА И МОГУЋНОСТИ ЊЕНЕ РЕДУКЦИЈЕ

Кратак садржај

Афлатоксини су група микотоксина које као секундарне метаболите синтетишу гљивице *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*. Најчешће се контаминирају кукуруз, кикирики, сјеме памука, али могу бити присутни и на пашњачким травама и неадекватно припремљеној силажи. Постоји неколико типова афлатоксина: Б1, Б2, Г1, Г2, М1 и М2. За млекарску производњу најважнији је Б1 токсин у сточној храни јер се у организму краве метаболише у афлатоксин М1, који је доказано токсичан и потенцијално канцероген за људе. Максимална дозвољена концентрација М1 афлатоксина у сировом млијеку по европским стандардима је 0, 05 µг/кг, док је дозвољена вриједност укупног афлатоксина у храни за музне краве 0, 005 мг/кг (5 ппб). Посебно је истакнута могућност редукције садржаја афлатоксина у хранивима, смањење ресорпције у дигестивном тракту преживара и смањење концентрације М1 токсина у млијеку.

Кључне ријечи: афлатоксини, сточна храна, млијеко, деконтаминација.

Т. Marković,¹ М. Zelenović, N. Mitrović, V. Kadirić, Z. Đerić,² J. Lučić³

CONVERSION OF AFLATOXIN B1 FROM FEED IN AFLATOXIN M1 OF MILK AND THE POSSIBILITY OF ITS REDUCTION

Abstract

Aflatoxins are a group of mycotoxins synthesized by fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* as secondary metabolites. Commonly contaminate corn,

¹ Ветеринарски завод д. о. о. „Теолаб“, Дворови, Бијељина.

² Агенција за сигурност хране, Мостар.

³ Пољопривредно-медицинска школа Брчко.

peanuts, cotton seed, but may be present on the pasture grass and inadequately prepared silage. There are several types of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2. For dairy production B1 toxin in feed is the most important because the cow organism metabolizes him into aflatoxin M1, which has been proven toxic and potentially carcinogenic to humans. Maximum allowable concentration of aflatoxin M1 in milk by European standards is 0.05 mg / kg, while the total allowed value of aflatoxin in feed for dairy cows 0.005 mg / kg (5 ppb). Especially is emphasized the possibility of reducing the aflatoxin content in the feed, reducing the absorption in the digestive tract of ruminants and reducing the concentration of toxin M1 in milk.

Keywords: aflatoxin, feed, milk, decontamination.

УВОД

Афлатоксини су микотоксини од највећег значаја за млекарску индустрију. Производе их гљивице *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*, док су недавна истраживања показала да су *Aspergillus tamarisii*, *Aspergillus nomisus* и *Aspergillus pseudotamarisii* такође афлатоксин продукујуће (Kurtzman и сар., 1987; Goto и сар., 1997; Ito и сар., 2001). Највећи број микотоксина налази се на зрну биљака гајених у сушним условима, али могу бити присутни и на пашњачким травама и понекад у сијену. Афлатоксини су најчешће присутни у кукурузном зрну, сјемену памука, кикирикију и понекад у сојином зрну. Неадекватно спремљена кукурузна силажа може садржати значајне количине афлатоксина. Постоји неколико врста афлатоксина: Б1, Б2, Г1, Г2, М1 и М2. Име су добили на основу боје којом флуоресцирају након озрачивања. Због доказане канцерогености ових материја како за људе,

тако и за животиње, неопходан је њихов стални мониторинг у храни. Према нашем правилнику, потпуна крмна смијеша за исхрану крава музара не смије садржати више од 0,005 мг/кг (5 ппб) укупног афлатоксина, док је за М1 афлатоксин у млијеку горња граница 0,05 µг/кг (ппб). Амерички критеријуми су блажи и дозвољавају 0,02 мг/кг (20 ппб) афлатоксина у потпуној смијешци за краве музаре и 0,5 ппб (µг/кг) М1 токсина у млијеку.

СУДБИНА АФЛАТОКСИНА У ОРГАНИЗМУ КРАВЕ

Биолошки ефекат микотоксина на организам животиње зависи од количине токсина унесеног храном и дужине конзумирања такве хране. Након конзумације хранива контаминираним афлатоксином Б1, краве почињу излучивати афлатоксин М1 млијеком након 12–24 часа, док се максималне

концентрације у млијеку постижу тек за неколико дана. Након престанка конзумације контаминираних хране, потребно је да прође три дана да би концентрација афлатоксина пала на недетектибилан ниво (van Egmond, 1989). Код преживара, за разлику од моногастричних животиња, не долази до губитка апетита ако је храна контаминирана микотоксинима. Доза афлатоксина од 13 мг/дан није утицала на унос хране код млијечних крава (Applebaum и сар., 1982). Екстремно високе дозе афлатоксина од 50 до 150 мг/дан (од 3 до 9 мг/кг хране) дате у болусу са желатинозном капсулом доводе до значајног пада у козумацији хране због дигестивних и метаболичких поремећаја које изазивају овако високе дозе (Mertens и Watt, 1977). Исти аутори су показали да прашина у сувим хранивима заједно са присуством буђи и спора доводи до пада палатабилности хране код преживара.

Различити подаци су добијени у погледу руминалне биодеградације афлатоксина Б1. Једни аутори су запазили значајан пад иницијалне концентрације Б1 након инкубације са руминалним соком (Engel и Hagemester, 1978), док други нису добили сигнификантне резултате (Kiessling и сар., 1984). Због чињенице да су метаболити афлатоксина Б1, као што су афлатоксикол и афлатоксин М1, детектовани у румену (Trucksess и сар., 1983), Auerback и сар. (1998б) тражили су ове метаболите када се афлатоксин Б1

in vitro инкубира са руминалним соком. Они су потврдили да афлатоксикол настаје из означеног Б1 афлатоксина дејством руминалне флоре, али нису успјели да нађу афлатоксин М1. Ови аутори су поставили претпоставку да афлатоксин М1 из румена настаје трансформацијом афлатоксина Б1 у јетри и да у румену доспијева преко румино-хепатичне рециркулације. Због чињенице да је биодеградација афлатоксина Б1 у румену ниска, и да је токсичност афлатоксикола приближно иста токсичности нативног токсина, нема јасних доказа о детоксификацији афлатоксина у румену преживара. Као липофилна једињења мале молекулске масе афлатоксини се ресорбују дифузним транспортом. Главно мјесто метаболизма и детоксикације афлатоксина је јетра. У јетри се афлатоксини оксидишу у јако реактивне молекуле, способне да везују критичне молекуле у ћелији као што су нуклеинске киселине и функционални протеини и на тај начин утичу на малигну трансформацију. Афлатоксин М1 настаје у јетри хидроксилацијом афлатоксина Б1. Други афлатоксини М серије нађени су у млијеку и вјероватно потичу из јетре: М2, ГМ1, ГМ2, М2а, ГМ2а. За мљекарску производњу од највећег значаја је афлатоксин М1 због његове доказане токсичности. Од укупне количине унесеног афлатоксина Б1 у јетри се конвертује и излучи млијеком мање од 3% (0,3%–2,2% (Stoloff, 1979; Paterson и сар., 1980)). Према најновијим истраживањима, постоји повезаност између

мљечности крава и конверзије Б1 афлатоксина у М1 млијека. Тако, код крава које имају производњу млијека мању од 35 кг/дан конверзија је 2,5%, док је код крава са производњом већом од 35 кг/дан конверзија 5,4% (Britzi и сар., 2013).

У току биотрансформације афлатоксина, у јетри долази до озбиљних оштећења, што потврђује промјена нивоа јетриних ензима у серуму (табела 1). Због велике метаболичке ак-

тивности, јетра високомлијечних крава је често у лошем стању, што је чини осјетљивом на токсине. Новија истраживања су показала да афлатоксин Б1 и његов метаболит афлатоксикол индукују хепатокарциногенезу код животиња и људи. Према међународној агенцији за истраживање рака (IARC), афлатоксин М1 је класификован у Б2 групу као агенс са токсичношћу и могућом канцерогеношћу за људе.

Табела 1. Дисфункција јетриних ензима код афлатоксикозе преживара

Лактат дехидрогеназа	повећање	Ray и сар. (1986)
Аспартат трансминаза	повећање	Ray и сар. (1986), Buonaccorsi и сар. (1981), Atroshi и сар. (2000)
Укупни билирубин	повећање	Ray и сар. (1986), Lynch и сар. (1972)
Триодтиронин	повећање	Applebaum и Marth (1983)
Албумин, фибриноген	смањење	Buonaccorsi и сар. (1981)
Протромбин, псеудохолинестераза		Buonaccorsi и сар. (1981)
В-липопротеини	смањење	Buonaccorsi и сар. (1981)
Глутамат оксалацетат трансминаза	повећање	Helferich и сар. (1986)
Сорбитол дехидрогеназа	повећање	Helferich и сар. (1986)

ЕФЕКАТ АФЛАТОКСИНА НА ПРОДУКТИВНОСТ МЛИЈЕЧНИХ ГРЛА И РЕЗИДУЕ У МЛИЈЕКУ

Акутна афлатоксикоза са дневном дозом од 50 до 150 мг афлатоксина доводи до наглог пада уноса хране и продукције млијека са повећањем процента млијечне масти (Mertens и

Watt, 1977). Дневна доза од 13 мг непречишћеног афлатоксина Б код крава у средини лактације узрокује смањење производње млијека, али нема знакова поремећаја здравственог стања код посматраних крава. Стадо музних крава које је добијало кукуруз контаминиран са 120 µг/кг (120 ппб) афлатоксина у трајању од једне године је имало значајан пад произво-

дње млијека, удружен са репродуктивним и здравственим проблемима (Guthrie и Beddel, 1979). Аутори су забиљежили повећање производње млијека за 28% три недјеље након уклањања контаминираног кукуруза из оброка. Британски аутори Jones и Ewart (1979) пратили су стадо од 140 музних крава које су добијале оброк који је садржао брашно кикирикија контаминирано афлатоксином Б1, Б2, Г1 и Г2. Концентрација Б1 токсина у укупном obroку је била око 0, 02 мг/кг (20 ппб), што је данас максимална дозвољена концентрација афлатоксина у obroку за краве музаре у САД-у. Након три дана од уклањања брашна кикирикија из оброка, дошло је до престанка дијареје, док је продукција млијека благо порасла у наредних 5–8 дана. Тјелесна кондиција крава је такође поправљена. Међутим, у поређењу са контролном групом крава које никада нису добијале храну контаминирану са афлатоксином, краве из експеримента са брашном кикирикија се нису опоравиле у потпуности.

Као што је већ наведено, код крава конверзија афлатоксина из хране у млијеко варира и креће се од 0,3% до 5,4%. Користећи С14 – обиљежени афлатоксин, Helferich и сар. (1986) су мјерили ниво излучивања афлатоксина код коза. Од укупно унесене дозе афлатоксина храном, млијеком је излучено 1,05%, 30,9% урином и 52,3% фецесом. Након 120 часова од уношења афлатоксина, кумулативни прела-

зак његових метаболита у млијеко крава је приближно 1%. Узимајући ову вриједност као фиксну, максимална дозвољена концентрација афлатоксина у obroку за краве музаре је 5 мг/кг (5 ппб) по европским стандардима.

МЕТОДЕ РЕДУКЦИЈЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ АФЛАТОКСИНА У ХРАНИ ЗА МУЗНЕ КРАВЕ И МЛИЈЕКУ

Због чињенице да су афлатоксини секундарни метаболити гљивица, прије свега *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*, први корак борбе је смањење нивоа контаминације у пољу. Постоји неколико стратегија за смањење контаминације микотоксинима у пољу, а данас је у развијеним земљама најраширенији метод хемијски третман усјева фунгицидима, алтернативне методе су гајење генетски модификованих биљака или класично укрштање у циљу стварања биљака отпорних на контаминацију гљивицама (Brown и сар., 1999). Након вршидбе, биљке треба чувати у одговарајућим складишним условима. Ови услови подразумијевају садржај влаге у биљкама мањи од 13% и релативну влажност ваздуха мању од 50 процената (Jay, 1992).

У сврху смањења концентрације афлатоксина, храна се може третирати прије давања животињама. Третман памуковог сјемена контаминираног афлатоксином са 1,5% амонијаком и

10% воде у трајању од 21 дан редукује ниво афлатоксина М1 у млијеку 85%–90% (Price и сар., 1982; Ewaidah, 1984) или у месу животиња (Allam и сар., 1999). Третман хране са 61% водоник-пероксидом и накнадним загријавањем на 80 °С у трајању од 30 минута је дало приближно сличне резултате као амонијак (Allam и сар., 1999). Оксидативну деградацију и детоксификацију озоном тестирали су McKenzie и сар. (1997). Додатак 4% калцијум-хидроксида и 0,5% параформалдехида при притиску од 2 атмосфере у трајању од 20 минута у аутоклаву редуковао је садржај афлатоксина са 401 на 29,5 µг/кг (Piva и сар., 1985). Зрачење сировог млијека артефицијално контаминираног афлатоксином М1 ултравиолетним зрацима у трајању од 20 минута на 25 °С смањило је ниво токсина за 60,7% (Yousef, 1986). Додавање 0,5% водоник-пероксида у млијеко послјешује третман ултравиолетним зрацима пошто је смањење концентрације М1 токсина 89,1%. Третмани амонијаком, водоник-пероксидом, ултравиолетним зрацима и озоном значајно редукују садржај афлатоксина у хранивима, али због техничких разлога нису нашли примјену у комерцијалној производњи хране.

Веома различити подаци су добијени када се тестирала осјетљивост афлатоксина М1 из млијека на третман високим температурама. Purchase и сар. (1972) тестирали су неколико топлотних третмана на сма-

њење концентрације афлатоксина у млијеку. Најефикаснијим се показало спреј-сушење пошто је садржај афлатоксина М1 у млијеку снижен за 86%. Стерилизација је дала смањење од 81%, сушење на ваљцима 75%, сушење на ваљцима при сниженом притиску 64%, евапорација 61%, пастеризација на 80 °С у трајању 45 секунди 61%, пастеризација на 72 °С у трајању од 45 секунди 45% и пастеризација на 62 °С у трајању од 30 минута 32%. Choudhary и сар. (1998) дошли су до резултата да стерилизација на 121 °С у трајању од 15 минута умањује проценат М1 афлатоксина за 12,21%, док кување млијека умањује садржај М1 афлатоксина за 14,50%. Bakirci (2001) је дошао до резултата да пастеризација снижава ниво М1 токсина у млијеку за 7,62%, док је Devenci (2007) дошао до резултата да пастеризација занемарљиво редукује ниво афлатоксина М1. Други аутори су пак дошли до резултата да је афлатоксин М1 отпоран на температуре пастеризације и стерилизације (Van-Egmond и сар., 1977; Wiseman и Marth, 1983; Yousef и Marth, 1989; Govaries, 2001). Анализе вршене у ветеринарском заводу „Теолаб“ показале су да температура пастеризације од 65 °С у трајању од 30 минута не инактивише афлатоксин М1 у млијеку. Такође је потврђено да замрзавање млијека на -20 °С у трајању од три дана не инактивише М1 токсин. Евидентно је да истраживања новијег датума показују да топлотни третмани имају мало или нимало утицаја на разградњу М1 афла-

токсина, што би се могло приписати прецизнијим методама детекције које се користе у новије вријеме.

Због компликованости претходно наведених метода редукције, за сточаре је тренутно најприхватљивије додавање адсорбенса. Ове материје селективно везују микотоксине у дигестивном тракту, спречавајући њихову ресорпцију и посљедичне негативне ефекте. Phillips и сар. (1988) демонстрирали су да хидратисани натријум-калцијум-алуминосиликат успјешно везује афлатоксин и спречава његову ресорпцију. Такође је експериментисано са бентонитом, анјон размјењивим смолама, катјон размјењивим смолама, активним угљем и каолином. Као задовољавајући адсорбент се показао модификовани (естерификовани) ћелијски зид квасаца (Dewegowda и сар., 1988; Evans и Dawson, 2000; Firmin и сар., 2011). Према њиховим подацима, 0,05% глукомана у оброку везује 58%–75% афлатоксина у широком рН опсегу. Лактобацили, бифидобактерије и пропионобактерије су адсорбавали и до 80% афлатоксина Б1 у *in vitro* и *in vivo* условима (El Nezami и сар., 1998; Ahokas и сар., 1998; Pierides и сар., 2000). Активни угаљ додат храни у концентрацији 0,25% нема ефекта на концентрацију М1 афлатоксина у млијеку (Diaz и сар., 2004). На тржишту Босне и Херцеговине најдоступнији су препарати на бази зеолита, који се додају у сточну храну у концентрацији од 0,2% до 0,5%. Ниже концентрације се

додају у превентивне сврхе док се више користе када је храна контаминирана токсинима. Ове материје спадају у групу природних алуминосиликата, потпуно су нетоксични за животиње и имају способност да вежу токсине и друге штетне материје у своју јонску решетку. Тако везани токсини не могу да се ресорбују у дигестивном тракту и животиње их излучују изметом заједно са самим солима. Када се упореди цијена препарата на бази зеолита са потенцијалним бенефитима, њихова употреба је сасвим оправдана у свакодневној сточарској производњи. Ипак, због разлике у квалитету ових препарата, исте је потребно набављати од поузданих произвођача који имају доказе о њиховом квалитету.

ЗАКЉУЧАК

Имајући у виду високе критеријуме за максималну дозвољену концентрацију афлатоксина М1 у сировом млијеку, намеће се потреба за кориштењем квалитетних компоненти при производњи хране за музне краве. Да би се ово остварило, потребна је добра производна пракса у току цијелог циклуса производње сировог млијека, с обзиром на то да су могућности за смањење концентрације афлатоксина М1 већ присутног у млијеку јако дискутабилне. Потребно је умањити могућност за контаминацију на пољу, у току жетве, транспорта и чувања сточне хране. Неопходно је вршити контролне прегледе улазних компоненти на садржај афлатоксина Б1. С обзиром на то да постоје задовољава-

јуће методе за редукцију афлатоксина Б1 у крмивима, као и да постоје могућности смањења његове ресорпције у дигестивном тракту животиња, исте је потребно увести као рутинске поступке у производњи сировог млијека. Не мање важан разлог за увођење ових поступака је заштита здравља музних крава, јер је доказано да високе концентрације афлатоксина Б1 у крмиви-ма негативно утичу на здравствено стање музних грла. Утицај ниских концентрација Б1 токсина и његов кумулативни ефекат у дужем временском периоду тек треба испитати. Препорука Светске здравствене организације за садржај афлатоксина М1 у млијеку је смањење испод дозвољених граница, са тежњом ка производњи млијека без афлатоксина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Britzi M., Friedman S., Miron J., Solomon R., Cuneah O., Shimshoni J. A., Ashkenazi R., Armer S., Shlosberg A (2013): *Cary-Over of Aflatoxin M1 in High Yielding Israeli Cows in Mide and Late-Lactation*, Toxins (Basel). January; 5: 173–183.
2. Code of Practice for the Reduction of Aflatoxin B1, in Raw Materials and Supplemental Feedingstuffs for Milk Producing Animals, Cac/Rcp 45-1997.¹
3. Chase L. E., Brown D. L., Bergstrom G. C., Murphy S. C (2013): *Aflatoxin M1 in milk, Dairy Nutrition Fact Sheet*, January, 2013 Revised.
4. Diaz D., Hagler W. J., Blackwelder J., Eve J., Hopkins B., Anderson K., Jones F., Whitlow L. (2004): *Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed*, Mycopatologia 157: 233–41.
5. Firmin S., Morgavi D., Yiannikouris A., Boudra H (2011): *Effectiveness of modified yeast cell wall extracts to reduce aflatoxin B1 absorption in dairy ewes*, J Dairy 94: 5611-9. doi: 10.3168/jds.2011-4446.
6. Jouany, J. P. (2001) The impact of mycotoxins on performance and health of dairy cattle. In: *Science and Technology in the Feed Industry, Proceedings of Alltech's 17th Annual Symposium*. Nottingham University Press (Ed. T. P. Lyons and K. A. Jacques), UK, pp. 191-224.
7. Mohammadi, H. (2001): "A review of aflatoxin M₁, milk, and milk products," in *Aflatoxins—Biochemistry and Molecular Biology*, chapter 19, InTech, Rijeka, Croatia
8. Pathirana U. P. D., Wimalasiri K. M. S., Silva K. F. S. T., Gunarathne S. P. (2010): *Investigation of Farm Gate Cow Milk for Aflatoxin M₁*, Tropical Agricultural Research 21: 119–125.
9. Pennington A. J., Aflatoxin M₁ in Milk
http://www.uaex.edu/Other_Areas/publications/PDF/FSA-4018.pdf