

¹ MILAN J. ADAMOVIĆ² SNEŽANA T. JOVANOVIĆ² OGNJEN D. MAČEJ¹ ALEKSANDRA S. DAKOVIĆ² SLOBODAN S. STANKOVIĆ¹ Institut za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina, Beograd² Poljoprivredni fakultet, Zemun

UDK 637.146.3:637.047:549.67

U radu je dat prikaz rezultata ispitivanja efikasnosti adsorpcije aflatoksina M_1 i M_2 u jogurtu korišćenjem prirodnog i modifikovanog zeolita (klinoptilolita). Ispitivane su dve doze prirodnog i modifikovanog zeolita (0, 2 i 0, 6 %) sa i bez dodatka natrijum kazeinata. Utvrđeno je da oba adsorbenta imaju visok stepen adsorpcije aflatoksina M_1 i M_2 u jogurtu. Njihova efikasnost je bila veća bez dodatka natrijum kazeinata, pri čemu je modifikovani zeolit dao povoljnije rezultate (>80%). Povećana doza (0,6 %) oba adsorbenata u odnosu na manju dozu (0,2%) imala je i veću efikasnost adsorpcije aflatoksina M_1 i M_2 . Nisu primećeni tragovi taloženja adsorbenta u jogurtu. Dalje ispitivanje i usavršavanje ovog postupka adsorpcije može da doprinese većem izboru alternativnih rešenja u zaštiti potrošača od mikotoksina.

Cljučne reči: mleko • jogurt • aflatoksini M_1 , M_2 • adsorbenti • zeolit

UVOD

Mleko je najkvalitetniji izvor hranljivih materija i predstavlja nezamenljivu hranu, pogotvo za najmlađe i najstarije pripadnike ljudske populacije. To je razlog više da se njegovom kvalitetu i higijenskoj ispravnosti, u svakom pogledu, mora posvetiti posebna pažnja. Njegov kvalitet zavisi od niza faktora. Među njima poseban značaj imaju kvalitet hrane kojom se životinje hrane, higijena muže, čuvanja mleka i način transporta do mljare. Higijenski neispravna hrana naj-

češće je kontaminirana plesnima koje proizvode sekundarne metabolite mikotoksine. Većina od ovih plesni proizvode jedan, a najčešće dva ili tri mikotoksina.

Plesni roda *Aspergillus*, odnosno njegove vrste *A. flavus*, *A. parasiticus* i *A. niger* biosintetišu izuzetno toksične mikotoksine (aflatoksin B_1 , B_2 , G_1 , G_2) koji prouzrokuju simptome karakteristične za aflatoksikoze – slab prirast, mršavljenje i pad mlečnosti, poremećaje varenja hrane, nervne poremećaje, oštećenja krvnih sudova i druge vrste poremećaja. Aflatoksin i njegovi metaboliti izazivaju i oštećenje DNK, mutaciju gena i hromozomske anomalije (Whitlow i Hagler, 2004; Sinovec i sar., 2003; Mašić i sar., 2003a). Aflatoksini B_1 i B_2 izlučuju se u mleko krava u vidu aflatoksina M_1 i M_2 . Od količine hranom unesenog aflatoksina B_1 i B_2 , od 0,3-6,2% konvertuje se u aflatoksin M_1 i M_2 (Patterson et al., 1980; Creppy 2002; Lopez et al., 2001; Neal et al., 1998; Roussi et al., 2003). Njegovo izlučivanje mlekom iz organizma počinje nekoliko sati nakon unošenja i traje 4-5 dana. Aflatoksin M_1 i M_2 su svrstani u supstance sa mogućim karcinogenim dejstvom na ljude (Henry, 2001).

EU je propisala dozvoljene količine ovog mikotoksina u mleku i mlečnim proizvodima koje iznose 0,05 μg za odrasle i 0,025 μg za decu. Iste vrednosti za ovaj mikotoksin dozvoljene su i u našoj zemlji (Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama, Sl. List SRJ br. 5. 1992). Pored aflatoksina, određene vrste plesni iz roda *Aspergillus* (*A. Fumigatus* i dr.) biosintetišu mikotoksine ohratoksin A, verukologen, fumitremorgone i peniterm.

Problem prisustva mikotoksina u stočnoj hrani, a time i u mleku, može da bude izraženiji u zimskim mesecima kada se krave hrane isključivo konzervisanom i duže vreme uskladištenom hranom koja je podložna razvoju plesni, a time i kontaminaciji mikotoksinima. Analizom mleka na šest farmi utvrđeno je prisustvo aflatoksina M_1 u mleku svih šest farmi (Yordanova et al., 2004). Prosečna koncentracija toksina u mleku po farmi kretala se od 0,01–0,08 $\mu\text{g/L}$, dok je na jednoj koncentracija toksina bila iznad Pravilnikom dozvoljene vrednosti. Maksimalno pronađena količina aflatoksina M_1 u mleku bila je na dve farme iznad Pravilnikom dozvoljenih vrednosti (0,06 odnosno 0,16 μg). Plesni roda *Aspergillus* često se nalaze u silaži. Pogodna je okolnost da preživari, govoda ovce i koze, enzimiziraju mikroorganizama buraga mogu da izvrše delimičnu razgradnju mikotoksina (oko 50%) i na taj način umanje štetne efekte njihovog delovanja. Međutim, u oskudnijim uslovima ishrane i kada je kvalitet hrane slabiji, njihova brojnost i raznovrsnost je manja, a time umanjena i njihova sposobnost da svojim enzimima izvrše delimičnu razgradnju mikotoksina (Mašić i sar., 2003b; Adamović i sar., 2005).

Borba protiv mikotoksina u savremenoj poljoprivrednoj proizvodnji počinje na nivju. Ona podrazumeva pravilnu plodosevu, optimalne rokove radova, dobru zaštitu biljaka, korišćenje zdravog semena, stvaranje otpornijih genotipova biljaka na razvoj plesni, uništavanje štetočina, sprovođenje adekvatne tehnologije siliranja i skladištenja hrane, korišćenje sredstva protiv razvoja plesni i druge oblike zaštite hrane. Fizički tretmani kontaminirane hrane obuhvataju

Adresa autora:
Dr Milan Adamović, ITNMS,
Franshe D'Eperea 86, Beograd
m.adamovic@itnms.ac.yu

dejstvo temperature, mikrotalasa, gama i UV zraka i adsorpciju materijalima koji imaju veliku sposobnost jonske izmene. Većina mikotoksina je termički izuzetno stabilna, podnose visoke temperature (aflatoksin M_1 i M_2 preko 250°C), te termički tretman hrane nema veći značaj. Hemijskim putem mikotoksini se mogu delimično eliminisati (npr. uticaj amonijaka), što nije poželjno s obzirom na nepotpun efekat, mogućnost ostataka hemikalije u hrani i promene ukusa hrane. Jedan od podesnijih postupaka dekontaminacije proizvoda kontaminiranih mikotoksinima je njihova biodegradacija pomoću bakterija (bakterije mlečne kiseline kao starter kulture, *Flavobacterium aurantiacum* B-184) i procesom fermentacija pomoću kvasaca (*Candida intermedia*, sojevi *Saccharomyces* (Sedej i Škrinjar 2003, Bata i Lasztity, 1999). U tom smislu postignuti su veoma varijabilni, rezultati efikasnosti dekontaminacije proizvoda (od 18-46%).

Korišćenje adsorbenata na bazi zeolita u obrocima za krave kontaminiranim mikotoksinima, dalo je veoma ohrabrujuće rezultate. Zeoliti su hidratizirani aluminosilikati alkalnih i zemnoalkalnih katjona, koji poseduju beskonačnu trodimenzionalnu kristalnu strukturu. Karakterišu se sposobnošću da gube ili primaju vodu i da izmenjuju neke od svojih katjona bez većih promena strukture. Zahvaljujući tim osobinama velika je mogućnost njihove modifikacije, a samim tim i dobijanja adsorbenata ciljnih karakteristika sa veoma visokim afinitetom prema većem broju mikotoksina (Tomašević i sar., 1993; i Tomašević i sar., 2000).

Pri korišćenju prirodnog zeolita (Minazel) u obrocima krava u količini od 0,5% smeše, utvrđena je veoma visoka efikasnost adsorpcije metabolita zearalenona u mleku, iznad 92% (Nešić i sar 2003.). Slično tome pri korišćenju modifikovanog prirodnog zeolita (Minazel Plus) u obrocima jagnjadi (0,2 i 0,5%) utvrđeno je, pri manjoj dozi delimično, odnosno pri većoj dozi potpuno eliminisanje zearalenona u mišićima i jestivim organima (Stojšić i sar., 2004.).

Cilj ovog rada je bio da, u laboratorijskim uslovima, ispita efikasnost adsorpcije aflatoksina M_1 i M_2 u jogurtu različitim dozama prirodnog i modifikovanog zeolita (0,2 i 0,6 %) sa i bez dodatka natrijum kazeinata.

MATERIJAL I METOD RADA

Za proizvodnju jogurta korišćeno je obrano mleko sa farmi iz predela Srema. Za starter kulturu korišćena je koncen-

trovana DVS ABT-5 kultura (Christian Hansen, Danska). Priprema jogurta obavljena je u laboratoriji Poljorivrednog fakulteta, Zemun. Kao adsorbenti mikotoksina korišćeni su prirodni i modifikovani zeoliti proizvedeni u Institutu za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina, Beograd. Posle obavljene fermentacije (na 42°C i pH 4,6) izvršeno je rashlađivanje i razbijanje koaguluma, a potom napravljene dve varijante jogurta, sa dodatkom 0,2 % natrijum kazeinata i bez dodatka natrijum kazeinata. U svakoj od navedenih varijanti jogurta napravljene su po četiri podvarijante.

U prve dve podvarijante dodat je prirodni zeolit u količini od 0,2, odnosno 0,6%, a u druge dve podvarijante jogurta dodat je modifikovani zeolit u istim količinama (0,2 odnosno 0,6%).

Pored navedenih varijanti i podvarijanti jogurta napravljene su i dve slepe probe, jedna sa dodatkom natrijum kazeinata bez adsorbenta, a druga bez natrijum kazeinata i bez adsorbenta. U sve varijante jogurta, uključujući i slepe probe, dodat je aflatoksin M_1 i M_2 u količini od 1 mg/l. Plan ogleđa prikazan je u tabeli 1. Modifikovani zeolit dobijen je modifikacijom površine zeolitskog minerala klinoptilolita sa dugolančanim kvaternarnim aminom. Veličina čestica oba adsorbenta bila je ispod 0,1 mm (Tomašević-Čanović i sar., 2000).

Uzorci jogurta držani su u frižideru 14 dana, nakon čega su utvrđene analize prisustva mikotoksina, pH i ocena taloženja adsorbenta. Sve analize su rađene u pet ponavljanja. Utvrđivanje koncentracije aflatoksina M_1 i M_2 u jogurtu obavljeno je pomoću HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) u Institutu za toksikologiju Vojnomedicinske akademije, Beograd.

Tabela 1. PLAN OGLEDJA
Table 1. EXPERIMENTAL PLAN

Adsorbent / Adsorbent	Doza adsorbenta (%) / Amount of adsorbent (%)
Sa dodatkom natrijum kazeinata / With addition of sodium caseinate	
Prirodni zeolit / Natural zeolite	0,2
	0,6
Modifikovani zeolit / Modified zeolite	0,2
	0,6
Kontrola / Control	0,0
Bez dodatka natrijum kazeinata / Without addition of sodium caseinate	
Prirodni zeolit / Natural zeolite	0,2
	0,6
Modifikovani zeolit / Modified zeolite	0,2
	0,6
Kontrola / Control	0,0

REZULTATI ISTRAŽIVANJA I DISKUSIJA

Oba ispitivana adsorbenta, prirodni i modifikovani zeolit, imali su visok stepen adsorpcije aflatoksina M_1 i M_2 u jogurtu (tabela 2). Zapaženo je da je efikasnost adsorpcije, oba adsorbenta bila veća bez dodatka natrijum kazeinata. Veća doza (0,6%) oba adsorbenata u odnosu na manju dozu (0,2%) imala je veću efikasnost adsorpcije aflatoksina M_1 i M_2 (tabela 2). Tako, bez prisustva natrijum kazeinata, kod nemedifikovanog zeolita, dodatog u količini 0,2%, efikasnost adsorpcije aflatoksina M_1 i M_2 u jogurtu iznosi 66,30% i 63,80%, dok kod modifikovanog zeolita, dodatog u istoj količini efikasnost adsorpcije ispitivanih toksina iznosi 65,20% i 64,80%. Sa povećanjem sadržaja adsorbenta (0,6%), bez prisustva natrijum kazeinata, kod nemedifikovanog zeolita, dodatog u istoj količini efikasnost adsorpcije ispitivanih toksina iznosi 82,40% i 80,10%.

Tokom 14 dana praćenja promena u jogurtu nisu utvrđeni tragovi taloženja adsorbenta, što je posledica dobrog viskoziteta jogurta i izuzetno sitnih čestica adsorbenta i njihove polarnosti.

ZAKLJUČAK

Oba adsorbenta, prirodni i modifikovani zeolit, imali su visok stepen adsorpcije aflatoksina M_1 i M_2 u jogurtu. Njihova efikasnost je bila veća bez dodatka natrijum kazeinata pri čemu je modifikovani zeolit dao povoljnije rezultate (>80%). Povećana doza (0,6 %) oba adsorbenta u odnosu na manju dozu (0,2%) imala je i veću efikasnost adsorpcije aflatoksina M_1 i M_2 . Nisu primećeni tragovi taloženja adsorbenta u jogurtu.

Tabela 2. EFIKASNOST ADSORPCIJE AFLATOKSINA M₁ I M₂ U JOGURTU (%)
Table 2. ADSORPTION OF AFLATOXINS M₁ AND M₂ IN YOGURT (IN %)

Adsorbent / Adsorbent	Doza adsorbenta (%) Amount of adsorbent (%)	Indeks adsorpcije (%) / Adsorption index (%)	
		Aflatoksin M ₁	Aflatoksin M ₂
Sa dodatkom natrijum kazeinata / With addition of sodium caseinate			
Prirodni zeolit / Natural zeolite	0,2	64,20	65,30
	0,6	72,40	75,60
Modifikovani zeolit / Modified zeolite	0,2	62,30	61,80
	0,6	74,80	72,70
Kontrola / Control		8,40	1,80
Bez dodatka natrijum kazeinata / Without addition of sodium caseinate			
Prirodni zeolit / Natural zeolite	0,2	66,30	63,80
	0,6	76,80	78,20
Modifikovani zeolit / Modified zeolite	0,2	65,20	64,80
	0,6	82,40	80,10
Kontrola / Control		5,50	6,70

Uz daljnje ispitivanje i usavršavanje ovaj postupak adsorpcije može da posluži kao jedno od alternativnih rešenja u zaštiti potrošača od štetnog uticaja mikotoksina.

LITERATURA

- Adamović M., Bočarov-Stančić Aleksandra, Dorđević Nenad, Daković Aleksandra, Adamović Ivana: Mycotoxins in the silage – causes of creating protection from acting. *Matica srpska. Proceedings for natural sciences*, Novi Sad. (2005), No 108., 51-58.
- Bata A., Laszity R: Detoxification of mycotoxin contaminated feed by microorganisms. *Trends Food Sci. Techn.*, (1999), Vol. 10, 6-7, 223-228.
- Creppy E.E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe, *Toxicol. Lett.*, (2002), Vol. 127, 1-3, 19-28.
- Henry S., Whitaker T., Kabbani I., Bowers J., Park D., Price W., Bosch F., Penington J., Verger P., Yoshizawa T., van Egmond H., Jonker M., Cocker K.: Aflatoksin M1, Safety evaluation of certain mycotoxins in food, *FAO Food and Nutrition paper*, (2001), 1-102, 74.
- Lopez C., Ramos L., Ramadan S., Bulacio L., Perez J.: Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated, *International Journal of Food Microbiology*, (2001), Vol. 64., 1-2., 211-215.
- Mašić, Z., Aleksandra Bočarov-Stančić, Sinovec Z., Sandra Đilas, Adamović, M: Mikotoksini u hrani za životinje u Republici Srbiji. X simpozijum »Tehnologija hrane za životinje«, (sa međ. učešćem) (2003 a), 290-298. Vrnjačka Banja.
- Mašić Z., Adamović M., Đilas Sandra, Mihajlev Ž.: Mikotoksini u patofiziologiji ishrane goveda. *Veterinarski glasnik*, (2003 b), Vol. 57., No 3-4., 191-200.
- Neal G., Eaton D., Judah D., Verma A.: Metabolism and Toxicity of Aflatoksin M1 and B1 in Human-Derived in vitro Systems, *Toxicology and Applied Pharmacology*, (1998), Vol. 151., 152-158.
- Nešić S., Grubić G., Adamović M., Aleksandra Bočarov-Stančić, Aleksandra Daković: Uticaj mineralnog adsorbenta »Minaze!« na smanjenje rezidua zearalenona i njegovih metabolita u mleku krava. *Zbornik naučnih radova*, (2003), Vol. 9., br 1., 317-322.
- Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama, (1992), *Sl. List SRJ* br. 5.
- Patterson D.S.P., Glancy E. M., Roberts B. A.: The carry over of aflatoxin M1 into the milk of cows fed rations containing a low concentration of aflatoxin B1. *Food Cosmet. Toxicol.*, (1980), 18, 35-37.
- Roussi V., Govaris A., Varagouli A., Botso-glou N. : Occurrence of Aflatoksin M1 in raw and market milk commercialized in Greece: *Food Additives and Contaminants*, (2003), Vol. 20., No. 3., 863-868.
- Sedej Ivana, Škrinjar Marija: Aflatoksini u mleku i mlečnim proizvodima - prisustvo i mogućnosti dekontaminacije. *Prehrambena industrija*, (2003), Vol. 14. No 1-2, 138-141.
- Sinovec Z., Resanović Radmila, Sinovec Snežana: Presence, effects and prevention of mycotoxicosis. *Biot. in animal husbandry*, (2003), Vol.19., 5-6., 345-356.
- Stojšić D., Stojković M., Daković A, Adamović M., Tomašević-Čanović M.: Efficacy of organozeolite to ameliorate the toxic effects zearalenone in lambs. *Acta veterinaria*, (2004), Vol. 54, No. 1., 53-62.
- Tomašević-Čanović Magdalena, Dumić M., Olivera Vukićević, Rajić I., Palić T.: Mineralni adsorber mikotoksina kao dodatak stočnoj hrani, postupak za njegovu proizvodnju pre radom zeolitnog tufa. (1993) Patent P- 683
- Tomašević-Čanović Magdalena, Dumić M., Olivera Vukićević, Aleksandra Daković, Milošević S., Avakumović Đ., Rajić I.: Organski modifikovani klinoptilolitsko hejlanditski tuf, organomineralni adsorbent mikotoksina - postupak za proizvodnju i primenu, (2000), Patent P-838.
- Yordanova P., Ribarova FF., Vladimirov : Aflatoxin M1 u sirovom mleku iz različitih područja Bugarske. *Eko-konferencija, Zbornik radova*, Novi Sad, (2004), 327-332.
- Whitlow L.W., Hagler W.M. (2004.): The top ten most frequently asked questions about mycotoxins, cattle and dairy food products, *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries*, (2004), Nottingham University Prees, 231-253.

ABSORPTION OF MYCOTOXINS (AFLATOXIN M₁ AND M₂) IN YOGURT BY ABSORBENTS BASED ON NATURAL AND MODIFIED ZEOLITES

¹Milan J. Adamović, ²Snežana T. Jovanović, ²Ognjen D. Mačej, ¹Aleksandra S. Daković,
²Slobodan S. Stanković,

¹Institute for technology of nuclear and other mineral materials, Belgrade,

²Faculty of Agriculture, Zemun

Symmary

Ways of milk contamination with mycotoxins, harmful effects of mycotoxins, as well as the possibilities for decontamination of mycotoxin contaminated milk are presented in this paper. The research results of efficacy of absorption of aflatoxins M₁ and M₂ in yogurt by natural and modified zeolite (clinoptilolite) are presented. In laboratory conditions, two amounts of both absorbents (0,2 and 0,6%), with and without addition of sodium caseinate were applied. It was determined that both absorbents had high efficiency for aflatoxin M₁ and M₂ absorption. The efficiency was higher without addition of sodium caseinate, and absorption of both aflatoxins was slightly higher on modified zeolite. Compared with lower amount of absorbents (0,2%), the higher amount of both adsorbents (0,6%) showed higher adsorption of aflatoxin M₁ and M₂. The sedimentation of absorbents in yogurt was not observed. The constant control, the prevention of contamination of milk with mycotoxins during the production process, together with utilization of absorbents, may be the an alternative way of food protection against the harmful effects of mycotoxins.

Key words: milk • yogurt • aflatoxins M₁ and M₂ • absorbents • zeolite