

MEDICINSKI FAKULTET

Željka Pavlek

UTJECAJ PRIRODNIH MIKOFIKSATORA NA KVALITETU
MLIJEKA KONTAMINIRANOG AFLATOKSINOM M1

Doktorski rad

Rijeka, 2025

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

Željka Pavlek

UTJECAJ PRIRODNIH MIKOFIKSATORA NA KVALITETU
MLIJEKA KONTAMINIRANOG AFLATOKSINOM M1

Doktorski rad

Mentori rada:

Izv.prof.dr.sc.Jasna Bošnjir, dipl.san.ing.

prof. prim.dr.sc.Vanja Tešić, dr.med

Rijeka, 2025

UNIVERSITY OF RIJEKA

FACULTY OF MEDICINE

Željka Pavlek

THE INFLUENCE OF NATURAL MYCOTOXIN BINDERS ON
THE QUALITY OF MILK CONTAMINATED WITH AFLATOXIN
M1

Doctoral thesis

Mentors:

Izv.prof.dr.sc.Jasna Bošnir, dipl.san.ing.

prof. prim.dr.sc.Vanja Tešić, dr.med

Rijeka, 2025

Mentori rada:

Izv.prof.dr.sc.Jasna Bošnjir, dipl.san.ing.

prof. prim.dr.sc.Vanja Tešić, dr.med

Doktorski rad obranjen je dana _____ na Medicinskom fakultetu
Sveučilišta u Rijeci pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Rad ima listova

Zahvala

Želim zahvaliti svim dragim ljudima koji su na bilo koji način pridonijeli izradi ove doktorske disertacije. Prije svega svojoj mentorici prof.dr.sc. Jasni Bošnjir, koja mi je bila izuzetna podrška na svakom koraku od ideje do realizacije, hvala na svakom savjetu, konstruktivnoj kritici, hvala na znanju koje je bez zadržke dijelila i vremenu koje je poklonila za ostvarenje mojih ideja. Zahvaljujem i sumentorici prof. Vanji Tešić koja je uvijek našla riječi podrške i ohrabrenja.

Hvala kolegama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, koji su pridonijeli svojim znanjem i elanom u dijelu eksperimentalnog dijela disertacija.

Posebna zahvala Dr.sc Anti Radočaju sa Medizinische Hochschule Hannover što je svojim znanjem i trudom pridonio statističkoj obradi rezultata ove disertacije.

Hvala dragim kolegama iz Nastavnog zavoda za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar, kolegama sa Službe za zdravstvenu ekologiju, Odjela za analitičke tehnike, koji su sudjelovali u provođenju eksperimentalnog dijela disertacije. Svakom pojedinom kolegi s Odjela za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu hrane, hvala vam na pomoći i podršci uvijek je sve lakše uz dobre ljude. Veliko hvala mom šefu i prijatelju dr.sc. Dariu Lasiću, prije svega na razumijevanju, podršci u izradi ove disertacije te znanju koje je uvijek sa mnom nesebično dijelio.

Hvala..

Mojoj najboljoj prijateljici Ani koja samnom dijeli svaku emociju, dobre i loše dane.

Mom Zvonimiru što me čuje i u tišini, mojoj prekrasnoj djeci Ivani i Stipici, vi ste esencija i radost mog života, ostvarili ste moje snove, sada sanjajte svoje snove da bi ste ih živjeli.

I na kraju najveće hvala mojim roditeljima Veliki i Ivanu, na bezuvjetnoj ljubavi, potpori kroz cijeli život, koji su mi omogućili da uvijek idem naprijed da ne posustanem u teškim trenucima jer su oni uvijek tu uz mene.

„Upućuj dijete prema njegovu putu, pa kad i ostari, neće odstupiti od njega“
(Izreke 22,6)

Sažetak

Cilj istraživanja: Pojava aflatoksina AFM1 u mlijeku, osim što dovodi do velikih ekonomskih gubitaka zbog zbrinjavanja kontaminiranog mlijeka, predstavlja i veliku opasnost za zdravlje ljudi, osobite male djece. Cilj ovoga rada bio je ispitati efikasnost vezivanja AFM1 iz namjerno kontaminiranog mlijeka upotrebom beta-glukana iz kvasca (0,005% i 0,01%), beta-glukana iz zobi (0,005% i 0,01%), te bakterijama mliječne kiseline BMK (žive i mrtve), u nultom, drugom, četvrtom i dvadesetčetvrtom satu vezivanja. Također, cilj rada bio je ispitati i utjecaj vezivanja na količinu nutrijenata, energetske vrijednost, količinu mikronutrijenta, te vitamina A, D, E i K. **Materijali i metode:** Istraživanje je provedeno na komercijalnom kravljem mlijeku s 2,8% m.m., a kao mikofiksatori korištene su bakterije mliječne kiseline (BMK), te komercijalni beta-glukan iz kvasca i iz zobi. Za identifikaciju i kvantifikaciju AFM1 korišten je vezan sustav tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (LC-MS/MS). Gravimetrijske i titrimetrijske metode korištene su za određivanje količine nutrijenata. Mikronutrijenti (Ca, Mg, K, Na) određivani su vezanim sustavom induktivno spregnute plazme i spektrometrije masa (ICP-MS), a količine vitamina A, D, E i K određivane tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). **Rezultati:** Nakon provedenih analitičkih postupaka i statističke obrade podataka, rezultati ukazuju da odabrani biološki mikofiksatori imaju dobar afinitet prema vezivanju AFM1 već u nultom satu vezivanja, a da najveći afinitet vezivanja imaju beta-glukani iz zobi (92,4%) te BMK-žive (91,6%), a istovremeno imaju relativno nizak učinak na vezivanje nutrijenata, mikronutrijenata i ispitivanih vitamina. **Zaključak:** Korištenjem mikofiksatora u namjerno kontaminiranom mlijeku ne dolazi do većih odstupanja u količinama nutrijenta i mikronutrijenata u odnosu na njihove vrijednosti prije početka tretmana, osim kod vitamina A kada se kao mikofiksator koristi beta-glukan iz zobi (0,005% i 0,01%), beta-glukan iz kvasca (0,01%), te BMK žive, te beta-glukan iz kvasca (0,005%) i BMK mrtve kod vezivanja vitamina E. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na činjenicu da se svi organski mikofiksatori mogu preporučiti za uklanjanje AFM1 iz mlijeka, budući da su sva odstupanja u granicama prihvatljivosti, te se mlijeko može smatrati i dalje zdravstveno ispravnom namirnicom za prehranu ljudi i/ili životinja.

Ključne riječi: Aflatoksin M1; Mikronutrijenti; Mikofiksatori; Mlijeko; Nutijenti.

SUMMARY

Objectives: The occurrence of aflatoxin AFM1 in milk, in addition to leading to large economic losses due to the disposal of contaminated milk, also poses a great danger to human health, especially young children. The aim of this work was to examine the effectiveness of binding AFM1 from intentionally contaminated milk using beta glucan from yeast (0.005% and 0.01%), beta glucan from oats (0.005% and 0.01%), and lactic acid bacteria BMK (alive and dead), in the zero, second, fourth and twenty-fourth hour of binding. Also, the aim of the work was to examine the impact of binding on the amount of nutrients, energy value, the amount of micronutrients, and vitamins A, D, E and K. **Materials and methods:** The study was conducted on commercial cow's milk with 2.8% m.m., and lactic acid bacteria (LAB), and commercial beta-glucan from yeast and oats were used as mycofixators. A coupled liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) system was used for identification and quantification of AFM1. Gravimetric and titrimetric methods were used for determination of nutrient amounts. Micronutrients (Ca, Mg, K, Na) were determined by coupled inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), and the amounts of vitamins A, D, E and K were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). **Results:** After the analytical procedures and statistical data processing, the results indicate that the selected biological mycofixants have a good affinity for AFM1 binding already at the zero hour of binding, and that beta glucans from oats (92.4%) and LAB-live (91.6%) have the highest binding affinity, and at the same time they have a relatively low effect on the binding of nutrients, micronutrients and tested vitamins. **Conclusion:** The use of mycofixers in intentionally contaminated milk does not result in major deviations in the amounts of nutrients and micronutrients compared to their values before the start of treatment, except for vitamin A when beta glucan from oats (0.005% and 0.01%), beta glucan from yeast (0.01%), and live LAB are used as mycofixers, and beta glucan from yeast (0.005%) and dead LAB when binding vitamin E. The results of this study indicate that all organic mycofixers can be recommended for removing AFM1 from milk, since all deviations are within the limits of acceptability, and milk can still be considered a healthy food for human and/or animal consumption. **Keywords:** Aflatoxin M1; Mycotoxin binders; Micronutrients; Milk; Nutrients.

Sadržaj

1	UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1	SIGURNOST I KVALITETA HRANE	1
1.2	MIKOTOKSINI KAO KONTAMINANTI HRANE I HRANE ZA ŽIVOTINJE	3
1.2.1	Aflatoksini	7
1.2.1.1	Aflatoksin M1	7
1.3	MIKOFIKSATORI	9
1.3.1	Beta-glukan (β -glukan)	11
1.3.2	Bakterije mliječne kiseline (BMK)	13
1.4	MLIJEKO I NJEGOVA NUTRITIVNA SVOJSTVA	14
1.4.1	Nutrijenti	16
1.4.1.1	Bjelančevine	16
1.4.1.2	Masti	16
1.4.1.3	Ugljikohidrati	17
1.4.2	Mikronutrijenti	18
1.4.2.1	Kalcij (Ca)	18
1.4.2.2	Magnezij (Mg)	19
1.4.2.3	Natrij (Na)	19
1.4.2.4	Kalij (K)	20
1.4.2.5	Fosfor (P)	20
1.5	VITAMINI	21
1.5.1	Vitamin A	21
1.5.2	Vitamin D	22
1.5.3	Vitamin E	23
1.5.4	Vitamin K	24
2	CILJ ISTRAŽIVANJA	25
3	MATERIJALI I METODE	26
3.1	MATERIJALI	26
3.1.1	Uzorci	26
3.1.2	Mikroorganizmi	26
3.1.3	Hranjive podloge za bakterije mliječne kiseline (BMK)	27
3.1.4	Kemikalije	27
3.1.5	Instrumenti	30
3.1.6	Pribor	32
3.2	METODE	33
3.2.1	Beta-glukani i priprema otopine	33
3.2.2	Priprema standardne otopine AFM1	33
3.2.3	Izolacija i identifikacija izolata BMK	33
3.2.4	Određivanje AFM1 kombiniranom metodom tekućinske kromatografije - spektrometrije masa (LC-MS/MS)	34
3.2.5	Određivanje suhe tvari	37
3.2.6	Određivanje pepela spaljivanjem	37
3.2.7	Određivanje ukupnog sadržaja masti u mlijeku prema Gerhart-u	37
3.2.8	Određivanje količine dušika (bjelančevina) metodom po Kjeldahlu	38

3.2.9	Određivanje ukupnih ugljikohidrata.....	40
3.2.10	Izračun energetske vrijednosti	40
3.2.11	Određivanje fruktoze, glukoze, saharoze i laktoze	40
3.2.12	Određivanje vitamina A, D, E i K tekućinskom kromatografijom visoke djelotovitosti (HPLC)	41
3.2.13	Određivanje fosfora spektrofotometrijski.....	42
3.2.14	Vezivanje mikronutrijenata pomoću BMK	43
3.2.15	Vezivanje mikronutrijenata pomoću beta-glukana iz kvasca i beta-glukana iz zobí	44
3.2.16	Određivanje kalcija, kalija, natrija, magnezija vezanim sustavom inudktivno spregnute plazme i spektrometrije masa (ICP-MS).....	44
3.3	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	47
4	REZULTATI	49
4.1.	REZULTATI VEZIVANJA AFM1 SA ODABRANIM MIKOFIKSATORIMA	49
4.2	REZULTATI UTJECAJA VEZIVANJA AFM1 SA ODABRANIM MIKOFIKSATORIMA NA NUTRITIVNI SASTAV MLIJEKA I ENERGETSKU VRIJEDNOST	51
4.3	REZULTATI UTJECAJA VEZIVANJA AFM1 SA ODABRANIM MIKOFIKSATORIMA NA MIKRONUTRIJENTE U MLIJEKU.....	56
4.4	REZULTATI UTJECAJA VEZIVANJA AFM1 SA ODABRANIM MIKOFIKSATORIMA NA VITAMINE TOPIVE U MASTIMA	61
5	RASPRAVA	81
5.1	UTJECAJ ODABRANIH MIKOFIKSATORA NA VEZIVANJE AFM1 IZ MLIJEKA	81
5.2	UTJECAJ ODABRANIH MIKOFIKSATORA NA VEZIVANJE NUTRIJENATA IZ MLIJEKA I ENERGETSKU VRIJEDNOST MLIJEKA.....	84
5.3	UTJECAJ ODABRANIH MIKOFIKSATORA NA VEZIVANJE MIKRONUTRIJENATA IZ MLIJEKA	90
5.4	UTJECAJ ODABRANIH MIKOFIKSATORA NA VEZIVANJE VITAMINA TOPIVIH U MASTIMA	96
6	ZAKLJUČAK	103
7	LITERATURA	106

1 UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1 SIGURNOST I KVALITETA HRANE

Osigurati dovoljno sigurne i kvalitetne hrane i prehrambenih proizvoda svim svojim stanovnicima, jedan je od najvažnijih ciljeva politike sigurnosti hrane u Europskoj uniji (EU), a sve kako bi se zaštitilo zdravlje ljudi i interesi potrošača, te omogućilo uspješno djelovanje jedinstvenog tržišta koje je nastalo ukidanjem granica između zemalja članica (EU) [1].

U tu svrhu Europska unija uvodi jedinstveni pristup sigurnosti hrane „od polja do stola” čime se želi osigurati visoka razina sigurnosti svih prehrambenih proizvoda na tržištu EU-a u svim fazama proizvodnje i distribucije, bilo da su proizvedeni u EU-u ili su uvezeni iz zemalja koje nisu države članice EU-a. Velika pozornost pridaje se i znanstvenim istraživanjima, te doprinosu znanstvenika u području sigurnosti hrane, a ukazuju se i na probleme vezane za financiranje znanstvenih istraživanja unutar zemalja članica s obzirom na to da sve zemlje nemaju jednake mogućnosti u provođenju istraživanja zbog financijskih ograničenosti [2].

Politika sigurnosti hrane EU uređena je člankom 168. (javno zdravlje) i člankom 169. (zaštita potrošača) Ugovora o funkcioniranju Europske unije [3], a ima za cilj zaštititi potrošače, istovremeno jamčeći nesmetan rad jedinstvenog tržišta. Strategija „od polja do stola” dio je europskog zelenog plana koji ima za cilj osigurati Europsku uniju klimatski neutralnom do 2050. godine [4]. Ta je strategija okvir koji postavlja političke ciljeve i inicijative osmišljene kako bi prehrambeni sustav Europske unije postao održiviji i ekološki prihvatljiviji. Bavi se sigurnosnim aspektima koji pokrivaju primarnu proizvodnju, higijenske uvjete u preradi hrane, pakiranje i označavanje kao i službene kontrole hrane te usklađenosti hrane s propisima koji garantiraju njezinu sigurnost [5]. Sigurnost hrane u EU regulirana je zakonskim propisima kojih se trebaju pridržavati sve članice kako bi se osiguralo slobodno kretanje hrane i hrane za životinje unutar zajednice. Osnovni zakonski propis koji regulira navedeno područje usvojen je od strane EU parlamenta i Vijeća 2022. godine kojim se utvrđuju opća načela i zahtjevi zakona o hrani i hrani za životinje i predstavlja okvir za razvoj zakonodavstva o hrani i

hrani za životinje kako na razini cijele EU tako i na nacionalnoj razini. Njime je i uspostavljena Europska agencija za sigurnost hrane koja kao neovisno tijelo daje znanstvena mišljenja i znanstvene savjete EU parlamentu i Vijeću, te Sustav brzog uzbuđivanja za hranu i hranu za životinje (*Rapid alert system for food and feed - RASFF*) [6]. Unutar navedenog propisa, važnu kariku u sigurnosti hrane predstavlja praćenje njezine sljedivosti kroz čitav prehrambeni lanac, a osobito ako se utvrdi da su hrana ili hrana za životinje neispravni, odnosno štetni za konzumiranje. Praćenje sljedivosti potrošačima pruža točne informacije određenim proizvodima, olakšava povlačenje neispravne hrane s tržišta, te daje podatke o kretanju proizvoda i sirovina iz kojeg je sastavljen od zemlje proizvođača do one koja proizvod stavlja na tržište. Na tržište se mogu staviti samo zdravstveno ispravni proizvodi, odnosno oni koji udovoljavaju kriterijima za mikrobiološke i kemijske kontaminante a koji su regulirani posebnim propisima [7,8].

Kemijski kontaminanti hrane čine veliku skupinu spojeva koji mogu kontaminirati hranu u bilo kojem djelu njezinog puta od polja do stola. Među navedene spojeve ubrajaju se i mikotoksini kao produkti toksikogenih plijesni koje se mogu razviti na određenim vrstama hrane i hrane za životinje, te lučiti mikotoksine štetne za njihovo zdravlje [9].

Kvaliteta hrane je pojam koji se odnosi na različita područja i zahtjeve kojima proizvodi moraju udovoljiti kako bi bili u skladu s proizvođačkim specifikacijama i očekivanjima potrošača. Kako bi zaštitila kvalitetu hrane, EU putem mjera za poboljšanje higijenskih uvjeta u proizvodnji hrane, strogih pravila (označavanja hrane, propisa o zdravlju i dobrobiti životinja, kontroli rezidua pesticida, aditiva, informiranja potrošača o hranjivim vrijednostima), osigurava da sustav kontrole kvalitete hrane bude na visokom stupnju [10 -13].

1.2 MIKOTOKSINI KAO KONTAMINANTI HRANE I HRANE ZA ŽIVOTINJE

Dosadašnja istraživanja nedvojbeno ukazuju na činjenicu da je pojava plijesni u hrani i u sirovinama namijenjenim za proizvodnju hrane, utvrđena već tijekom njezine proizvodnje, ali i tijekom skladištenja, osobito ako uzorci hrane i njezini sastojci nisu tretirani sredstvima protiv plijesni [14]. Rast plijesni u proizvodnji hrane može se suzbiti primjenom dobre proizvođačke i higijenske prakse, ali i korištenjem povoljnih matematičkih modela, ovisno o vrstama i količini plijesni u proizvodu te mogu poslužiti u procesima upravljanja rizicima [15].

Mikotoksini predstavljaju toksične tvari koje učestalo kontaminiraju hranu i hranu za životinje, uzrokujući štetne učinke na zdravlje ljudi i životinja te značajne ekonomske gubitke diljem svijeta [16,17].

Žitarice i njihovi proizvodi koji se koriste u prehrani ljudi i životinja predstavljaju najpovoljniji supstrat za razvoj plijesni i produkciju mikotoksina. FAO (*The Food and Agriculture Organization*) smatra se da je oko 25% svjetske proizvodnje žitarica kontaminirano mikotoksinima koji mogu ozbiljno utjecati na zdravlje ljudi i životinja [18]. Kontaminacija usjeva mikotoksinima pojavljuje se još u polju za vrijeme rasta, tijekom berbe i transporta te skladištenja [19]. Osim u žitaricama i njihovim proizvodima, mikotoksini se mogu naći i u mlijeku, mesu te jajima, a u organizam ulaze najčešće putem hrane. Zbog kontaminacije hrane mikotoksinima dolazi do znatnih ekonomskih gubitaka u proizvodnji žitarica, ali i u stočarskoj proizvodnji, odnosno proizvodnji mesa i mesnih proizvoda [20-23]. Mikotoksini su prirodni spojevi niske molekularne mase, koje produciraju različite vrste toksikogenih plijesni kao što su *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* i *Claviceps*. Smatraju se kontaminantima hrane s vrlo toksičnim učincima na zdravlje ljudi i životinja [24]. Do njihove biosinteze dolazi ako su stvoreni adekvatni uvjeti neophodni za njihov razvoj kao što su relativna vlažnost, temperatura i sadržaj kisika, te fizička oštećenja supstrata i prisutnost toksikogenih plijesni [25-28]. Mikotoksini su stabilni spojevi stoga su vrlo često prisutni i u gotovim prehrambenim proizvodima koji su prošli tehnološku obradu, a njihova opasnost očituje se u njihovoj visokoj toksičnosti u vrlo malim količinama bez senzorskih promjena proizvoda koji je namijenjen konzumaciji [29].

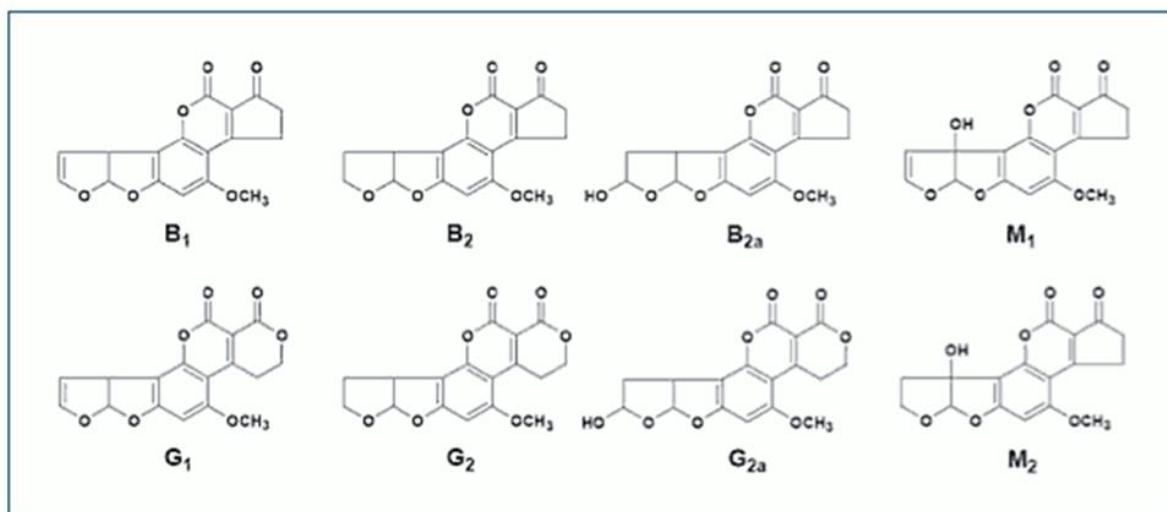
Podaci govore da je identificirano više stotina različitih mikotoksina koji produciraju više od 100 vrsta plijesni, a oni koji su s obzirom na opasnost za zdravlje ljudi i životinje identificirani kao najtoksičniji su aflatoksini, okratoksin A, patulin, fumonizini, zearalenon i deoksinivalenol. Vlaga i temperatura dva su faktora koji imaju ključnu ulogu u razvoju plijesni i sintezu toksina [30].

Mikotoksini se međusobno razlikuju se po svojoj strukturi, mehanizmu djelovanja i toksičnosti, ovisno o pljesni koja ih producira. Do njihove biosinteze dolazi ako su stvoreni određeni uvjeti kao što su relativna vlažnost, temperatura i sadržaj kisika, fizička oštećenja supstrata te prisutnost toksikogenih plijesni [25-28].

Aflatoksini su toksični, teratogeni i kancerogeni produkti plijesni *Aspergillus flavus* i *A. parasiticus*, a njihova maksimalna produkcija odvija se pri temperaturi od 28 °C do 35 °C i pH vrijednosti od 3,5 do 8 [31,32]. Štetni učinci mikotoksina počeli su se proučavati 60-ih godina 20. stoljeća kada je na farmama u Engleskoj došlo do pomora oko 100.000 purana zbog akutne nekroze jetre i hiperplazije žučnih kanala, a bolest je nazvana „X bolest purana“ [33]. Aflatoksini su derivati difurokumarina, a produciraju ih plijesni iz roda *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*. Okolišni uvjeti koji pogoduju rastu aflatoksina su duga sušna razdoblja i visoka temperatura te pojavnost oborina za vrijeme berbe ili neposredno prije, što se smatra glavnim razlogom pojavnosti trovanja velikih razmjera izazvanih aflatoksinima za koje je karakteristično da se pojavljuju u tropskim područjima [34]. Istraživanja ukazuju da je do sada otkriveno više od 14 različitih vrsta prirodno proizvedenih aflatoksina, a najznačajniji aflatoksini su: aflatoksin B1 i B2 (AFB1 i AFB2), aflatoksin G1 i G2 (AFG1 i AFG2), aflatoksin M1 (AFM1) i aflatoksin M2 (AFM2) (Slika 1) [35]. Oni u različitim organizmima pokazuju toksična svojstva kao što su teratogenost, mutagenost, kancerogenost i imunosupresivnost. Najčešći put unosa gotovo svih aflatoksina je putem hrane, odnosno probavnog sustava, ali je utvrđeno da AFB1 koji se ujedno smatra i najtoksičnijim aflatoksinom, u organizam može ući i putem kože te dišnim sustavom, odnosno inhalacijom prašine kontaminirane s aflatoksinima osobito radnika u poljoprivredno-prehrambenom sektoru [36]. Sve druge vrste aflatoksina nekoliko su puta manje toksične u odnosu na AFB1. Iako je AFB1 je toksičniji od AFG1, ako dođe do metaboličke aktivacije AFG1 putem stvaranja epoksida, toksičnost ovih dvaju mikotoksina postaje približno jednaka [37-39]. Prema Lee i suradnicima, razina

toksičnosti najznačajnijih aflatoksina prikazana je kao AFB1 >AFG1 >AFB2 >AFG2 [40]. AFM1 predstavlja hidroksilirani metabolički produkt AFB1 koji nastaje tijekom oksidacijskih procesa u organizmu nakon ingestije kontaminirane hrane, a AFM2 je hidroksilirani metabolički produkt AFB2 koji nastaje tijekom oksidacijskih procesa u mlijeku sisavaca koji su hranidbom primali kontaminiranu hranu [41]. AFB1 nakon što je hranom unesen u probavni trakt sisavaca najčešće se metabolizira u jetri uz djelovanje CYP3A4 i CYP1A2, te njegovom hidroksilacijom nastaje AFM1, osnovne molekule i metaboliti mogu se naći u krvi, urinu, u majčinom i kravljem mlijeku te ostalim mliječnim proizvodima [32,42-43].

Slika 1. Kemijska struktura aflatoksina

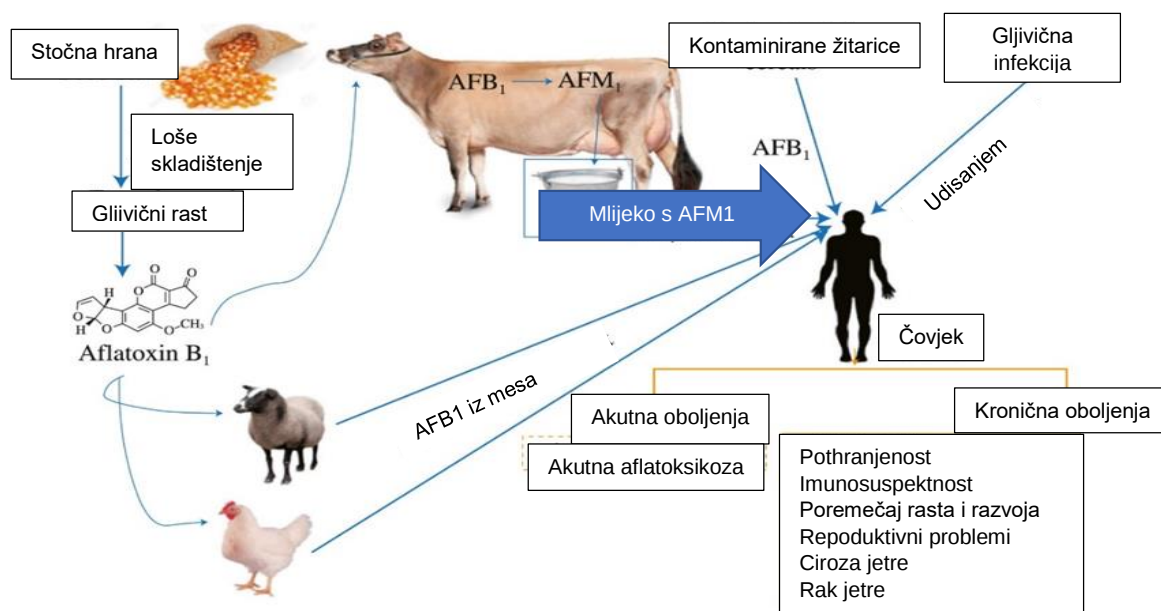


Izvor: Bilandžić N. Varenina I. Božić Đ. Sedak M. Đokić M. Solomun Kolanović B. i Cvetnić Ž., Aflatoxin M1 u mlijeku i mliječnim proizvodima, Veterinarska stanica, Zagreb, 2013. [35]

Iako su istraživanja pokazala kako su glavni izvor mikotoksina u ljudskoj prehrani, žitarice i proizvodi na bazi žitarica (direktan unos), postoji zabrinutost zbog mogućeg ulaska mikotoksina u prehrambeni lanac čovjeka i kroz meso, jaja, mlijeko i mliječne proizvode što predstavlja indirektan unos kod ljudi i životinja, osobito ako su životinje bile hranjene krmom kontaminiranom plijesnima, koje sintetiziraju mikotoksine ili samim mikotoksinima. Takav neizravan put unosa mikotoksina kroz kontaminiranu

hranu životinjskog podrijetla u prehrambeni lanac čovjeka predstavlja „*carry over*” efekt (Slika 2) [44-49].

Slika 2. Prikaz unosa mikotoksina u prehrambeni lanac čovjeka putem „*carry over*” efekta



Izvor: Raghdha A E S, Jeburb A B, Kangc W i sur.; An overview on the major mycotoxins in food products: characteristics, toxicity, and analysis; Journal of Future Foods [49]

Zbog sve veće osviještenosti ljudi i brige za javno zdravstvo, kontaminiranost hrane za ljudsku potrošnju, a jednako tako i stočne hrane, mikotoksini su postali važna društvena tema, budući da njihovo prisustvo u hrani za ljude i/ili životinje čini ugrozu za javno zdravlje.

1.2.1 Utjecaj klimatskih promjena na nastanak mikotoksina

Posljednjih desetljeća znanstvenici koji se bave klimatskim promjenama ukazuju na globalno zatopljenje, dok znanstvenici koji se bave agrarom i kontrolom hrane upućuju na problem koji nastaje u proizvodnji hrane i poljoprivredi upravo zbog navedenih klimatskih promjena. Klimatske promjene mogu u budućnosti izmijeniti otpornost žitarica - domaćina i samu interakciju s patogenima te tako imati značajan utjecaj na razvoj toksikogenih plijesni te tako povećati produkciju mikotoksina [50]. Klimatske promjene (osobito temperatura, vlažnost zraka i oborine) mogu utjecati na razvoj i rast

toksikogenih gljiva na usjevima te proizvodnju mikotoksina i to u gotovo svim dijelovima svijeta, ako su zadovoljeni uvjeti za njihov razvoj. Scenarij s povećanjem temperature za 2°C predviđa značajno veću kontaminaciju kukuruza AFB1 u usporedbi s trenutnim stanjem, ali bez velikih promjena u geografskom rasponu zbog specifičnih geografskih i klimatskih uvjeta. Najrizičnija područja s povećanim koncentracijama aflatoksina obuhvaćaju istočnu Europu, Balkanski poluotok i mediteranske regije, što je očekivano s obzirom na potrebne uvjete za rast plijesni. S druge strane, zemlje sjeverne Europe trenutno su manje izložene kontaminaciji aflatoksinima, ali bi se mogle suočiti s promjenama u klimatskim uvjetima u budućnosti [51]. Promjena klime ima direktan utjecaj na rast, distribuciju i proizvodnju mikotoksina poput aflatoksina, fumonizina i okratoksina. Prognoze pokazuju da će se područja s potencijalnom kontaminacijom proširiti na nove geografske širine zbog povećanja temperatura, što dodatno naglašava važnost predviđanja i upravljanja tim rizicima. Klimatske promjene ne samo da utječu na uzgoj biljaka, već i na uvjete skladištenja, transporta i prerade, što može dodatno povećati izloženost mikotoksinima. Ova kompleksna interakcija između klime, okoliša i poljoprivrede zahtijeva sveobuhvatan pristup regulaciji, nadzoru i prevenciji kako bi se osigurala sigurnost hrane i zaštita zdravlja ljudi i životinja. Kontaminacija stočne hrane jedan je od najozbiljnijih globalnih problema. Gubici koje svjetska gospodarstva prijavljuju dosežu i do nekoliko milijardi USD [52].

1.2.1 Aflatoksini

Aflatoksini su produkti plijesni *Aspergillus flavus* izuzetno su toksični, ubrajaju se među najjače prirodne kancerogene, možemo ih pronaći u velikom broju namirnica. Jedna od namirnica je i mlijeko gdje njegovo prisustvo u vrlo malim koncentracijama čini veliku opasnost za ljudsko zdravlje.

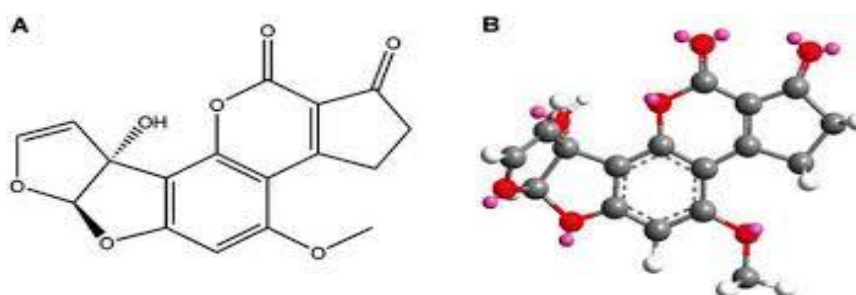
1.2.1.1 Aflatoksin M1

Aflatoksin M1 je 4-hidroksilirani metabolit aflatoksina B1, molekulske mase od 328 g/mol, molekulske formule $C_{17}H_{12}O_7$ (Slika 3) [53], koji se putem mliječnih žlijezda izlučuje u mlijeko. Aflatoksin M1 je manje toksičan u odnosu na AFB1 te je prema

Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (IARC), klasificiran u grupu 2B kao mogući humani karcinogen [35]. Preživači hranjeni stočnom hranom kontaminiranom AFB1 u svojem predželucu djelomično razgrade AFB1, dok preostali nerazgrađeni dio ulazi kroz krvožilni sustav u jetru te se tamo metabolizira u monosaharidne derivate aflatoksin M1 [53].

Mlijeko, a posebno ono kravlje je nutritivno bogata namirnica, predstavlja važan izvor nutrijenata i mikronutrijenata koja je u prehrani sisavaca prisutna već nekoliko tisuća godina, budući da je jeftina i lako dostupna namirnica [54]. Upravo iz tih razloga moguća prisutnost aflatoksina u mlijeku može prouzročiti veliki rizik za akutne i kronične učinke na zdravlje ljudi kao i mogući javnozdravstveni problem, budući da je mlijeko hrana koju konzumiraju sve dobne skupine posebno djeca i osobe starije životne dobi. Koliku opasnost predstavljaju aflatoksini govori činjenica da se AFM1 osim u mlijeku životinjskog podrijetla može naći i u majčinom mlijeku [55]. Prisutnost AFM1 predstavlja posebno veliki rizik od njegovog štetnog utjecaja na dojenčad budući da dojenčad ima malu tjelesnu masu i nisku sposobnost detoksikacije [56]. Istraživanja su ukazala da djeca koja su bila izložena AFM1 u kasnijoj životnoj dobi podložniji su raznim infektivnim oboljenjima. O ozbiljnosti ovog problema govori činjenica da su u svijetu napravljene mnoge studije na temu kontaminacija majčinog mlijeka aflatoksinima [57].

Slika 3. Aflatoksin M1 (AFM1) u 2D (A) i 3D (B) prikazu



Izvor; Varga I, Solomun Kolanović B, Varenina I, Božić Luburić Đ, Bilanžić N; kontaminacija mliječnih proizvoda aflatoksinom M1; Veterinarska stanica, Zagreb, 2020. [53]

Zbog afiniteta prema bjelančevinama iz mlijeka AF M1 može biti prisutan i u ostalim mliječnim proizvodima kao što su jogurt, sir i drugim mliječnim proizvodima, a njegova koncentracija ovisi o proizvodnom procesu pripreme mliječnih proizvoda, udjelu vode i vrsti konačnog proizvoda. Budući da AFM1 relativno stabilna molekula, te se ne može inaktivirati toplinskim tretmanima poput pasterezacije [58]. Međutim postoje neka istraživanja koja upućuju da je tijekom sterilizacije mlijeka i tekućih mliječnih proizvoda došlo do smanjivanja koncentracije AFM1 za oko 32% pri rasponu temperature od 135-150°C. Jednako tako istraživanja ukazuju i na činjenicu da se količine povećavaju stajanjem proizvoda u skladišnim prostorima, a povećanje ovisi o vrsti proizvoda i roku trajanja [59]. Upravo zbog činjenice da je nemoguće u potpunosti ukloniti AFM1, te da se metode koje su primjenjivane za uklanjanje AFB1 iz stočne hrane nisu pokazale učinkovite, institucije koje su uključene u donošenje zakonskih propisa donijele su odredbe o najviše dopuštenim količinama AFM1 za sirovo mlijeko, toplinski obrađeno mlijeko i mlijeko za proizvodnju mliječnih proizvoda koje propisuje Uredba o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani. Ako je sadržaj AFM1 u mlijeku veći od 0,05 µg/kg, mlijeko se smatra zdravstveno neispravnim, te se ne može koristiti u prehrani ljudi [8].

1.3 MIKOFIKSATORI

Budući da postoji opasnost i velika zabrinutost zbog ulaska mikotoksina u prehrambeni lanac čovjeka, veliki broj istraživanja je usmjeren upravo na otkrivanje mikofiksatora koji će učinkovito uklanjati mikotoksine iz hrane. Do sada su se uglavnom koristili anorganski oblici mikofiksatora na bazi aluminosilikata, aktivnog ugljena i gline, a najčešće su se upotrebljavali za dekontaminaciju stočne hrane. Učinkovitost vezivanja mikofiksatora i mikotoksina ovisi o kemijskoj strukturi mikotoksina i adsorbensa [60,61].

Istraživanja učinkovitosti anorganskih mikofiksatora koja su se provodila na različitim vrstama kontaminirane hrane namijenjenoj za prehranu morskih račića te na kontaminiranom kukuruznom brašnu namijenjenom za prehranu svinja, potvrdila su da njihovo korištenje ima učinkovito djelovanje na vezivanje mikotoksina [62-64]. Problem u korištenju anorganskih mikofiksatora koji se primjenjuju na hrani za životinje, njihov je negativan utjecaj na parametre kvalitete hrane. Dokazano je da upravo njihova

primjena utječe na smanjenje vitamina i minerala u tretiranoj hrani, pa je životinjama koje konzumiraju takvu hranu potrebno u prehranu dodavati vitamine i minerale u obliku dodataka prehrani što iziskuje dodatni financijski izdatak uzgajivačima životinja [65]. Nisu svi anorganski mikofiksatori uvijek pogodni za vezivanje mikotoksina s obzirom na to da na sebe mogu vezati hranjive tvari, lijekove i druge spojeve iz probavnog trakta životinje, što može negativno utjecati na njihovo zdravlje. Neki mikofiksatori imaju sposobnost transformiranja mikotoksina u modificirane oblike, te tako mogu zadržati određenu razinu toksičnosti i biti biološki aktivni [66-68].

Zbog utvrđenih navedenih nedostataka anorganskih mikofiksatora, istraživanja su usmjerena prema pronalasku optimalnih mikofiksatora organskog podrijetla. Rezultati istraživanja ukazuju da su dobri organski mikofiksatori bakterije mliječne kiseline (BMK) koje imaju dobar afinitet vezivanja AFM1 [69]. Jednako tako, pokazalo se da i β -glukani imaju dobar afinitet prema mikotoksinima te se mogu koristiti u dekontaminaciji hrane [70,71].

Navedeno potvrđuje istraživanje koje je provedeno s kvascem *Trichosporon mycotoxinivorans* kao mikofiksator gdje je dokazano njegovo dobro svojstvo vezivanja s mikotoksinima u hrani namijenjenoj uzgoju pilića [72,73]. Slična istraživanja provedena su i na drugim vrstama hrane za životinje gdje su korištene komercijalno dostupni mikofiksatori na bazi β -glukana iz kvasca, u svrhu uklanjanja mikotoksina kao što su AFB1, te zearalenon i okratoksin A [74-76]. Korištenje mikroorganizama kao alat za vezivanje nudi se kao alternativa za kontrolu i eliminaciju aflatoksina iz hrane i hrane za životinje. Poznato je da mannan iz stanične stijenke kvasca ima značajnu ulogu u vezivanju aflatoksina, a jednako tako stanice kvasca na sebe mogu vezati i druge molekule kao što su metalni ioni, preko složenih veznih struktura na površini stijenke, vezna mjesta se identificiraju kao polisaharidi stanične stijenke [77].

Studije „*in vitro*“ su pokazale da stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae* može vezati široki spektar toksina, te se smatra najučinkovitijim modelnim organizmom za njihovo vezivanje [78,79]. Istraživanja su pokazala da se β -D-glukani nalaze u obliku nasumične zavojnice ili u obliku uređene strukture o čemu ovise i dostupna mjesta vezivanja, a kako se mijenja prostorna organizacija β -D-glukana, tako dolazi do jače ili slabije adsorpcije molekula toksičnih tvari. U vezivanje metala s kvascima

uključene su karboksilne, amino, hidroksilne i amidne skupine bjelančevina i ugljikohidrata koji se nalaze u staničnoj stijenci beta-glukana [80-82].

1.3.1 Beta-glukan (β-glukan)

Beta-glukan je polisaharid sastavljen od molekula D-glukoze koje su lančano povezane s beta (1→3), (1→4) i/ili (1→6) vezama, bilo u razgranatom ili nerazgranatog oblika. Kada se ugradi u hranu, ima sposobnost mijenjanja njezinih funkcionalnih svojstava kao što su viskoznost, rahlost, tekstura i senzorska svojstva. Zbog različitih vrsta glikozidnih veza prisutnih u strukturi beta-glukana, razlikujemo dva izomera, onog koji izgrađuje stijenske plijesni i kvasaca, a izgrađen je od molekula beta-D-glukopiranozid povezanih beta-1,3- i beta-1,6-glikozidnim vezama dajući razgranatu strukturu [83], dok je drugi prisutan u neprerađenim proizvodima od žitarica i to u obliku nerazgranatih lanaca koji se sastoje od monomera beta-D-glukopiranozid povezanih beta-1,3- i beta-1,4-glikozidnim vezama [84]. Funkcionalna svojstva beta-glukana izravno su povezana s njihovim podrijetlom /izvorom, molekularnom težinom i strukturnim značajkama [85]. Budući da beta-glukan pripada jednoj od frakcija prehrambenih vlakana, pripisuju mu se i zdravstvene dobrobiti, te blagotvornim učincima kod određenih gastrointestinalnih bolesti i podržavanje imunološkog sustava [86], a ovisno o porijeklu 1,3-beta-D-glukana razlikuju se i njihova specifična svojstva kao što su topivost, stupanj grananja, molekulska masa i oblik molekule, o kojima ovise i biološka aktivnost beta-glukana [87]. Posljednje studije o primjeni i utjecaju beta-glukana na zdravlje ljudi govore da se beta-glukani nalazi u svakodnevnoj ljudskoj prehrani i važan su čimbenik u prevenciji pojedinih kroničnih nezaraznih bolesti. Beta-glukan kao prirodni polisaharid nalazi se i u stijenkama biljaka, kao što su zob, pšenica i ječam, a možemo ga naći i u stijenkama stanica gljivica, pekarskom kvascu *Saccharomyces cerevisiae* te nekim mikroorganizmima. Sadržaj beta-glukana varira ovisno o vrsti žitarica tako ga u pšenici možemo naći u količini od oko 1%, kod zobi u rasponu od 3% do 7% koji se primarno nalazi u staničnoj stijenci endosperma, mekinje ga sadrže u prosjeku oko 10,4%, dok ga u ječmu nalazimo u količini od 5% do 11%. beta-glukan ima veliku primjenu u medicini, farmaciji, prehrambenoj industriji, kozmetici i kemijskoj industriji, a primjenjiv je i u području veterine, te u stočnoj hrani [86-88].

Zbog niske topljivosti, kroz promjene u molekularnoj težini i strukturnoj konformaciji, molekula beta-glukana može se modificirati tako da se poboljšaju njegova bio funkcionalna svojstva. Kombinacija metoda modifikacije kao što su fizikalno-kemijski, kemijsko-enzimski, mehano-fizikalni ili mehano-kemijski procesi mogu značajno utjecati na bio funkcionalne karakteristike beta-glukana te promijeniti njegova funkcionalna svojstva. Veliki je broj studija koje proučavaju utjecaj modifikacije beta-glukana na njegove bio funkcionalne karakteristike, ali još uvijek nedostaje razumijevanje načina na koji metode modifikacije utječu na ponašanje beta-glukana [89].

U novije vrijeme, istraživanja beta-glukana usmjerena su na sposobnost njihovog vezivanja s kontaminantima u hrani, posebice vezivanje s mikotoksinima, među kojima se po svojim toksikološkim svojstvima izdvajaju aflatoksini. Razine aflatoksina u poljoprivredi se kontroliraju raznim strategijama koje uključuju i primjenu fungicida i herbicida, no njihova uporaba nema značajan učinak na smanjenje količina aflatoksina. Takvi postupci često imaju negativan učinak na okoliš, te štete koje takvim postupcima nastaju, kao i mogući zdravstveni problemi, nisu ništa manji od štete koja nastaje s pojavom samih aflatoksinima [90]. Neke od prvih studija pokazale su da 1-3-beta-D-glukan, posebno s bočnim lancima 1-6-beta-D-glukana, može regulirati prisutnost aflatoksina. Istraživanja su otkrila da beta-glukani mogu apsorbirati do 50% zearalenona što se pripisuje vodikovim vezama između hidroksilne, laktanske i ketonske skupine zearalenona i van der Waalsove interakcije između fenilnih i beta-D glukopiranoznih dijelova. Primjenom molekularnih metoda otkriveno je da hidroksilne, laktanske i ketonske skupine sudjeluju u stvaranju vodikovih veza i van der Waalsove interakcije između glukana i AFB1 [91].

1.3.2 Bakterije mliječne kiseline (BMK)

Poznato je da su bakterije mliječne kiseline (BMK) široko rasprostranjeni mikroorganizmi koji se mogu naći u raznim dijelovima eko sustava koji su bogati ugljikohidratima, kao što su biljke, fermentirana hrana i površine sluznice ljudi, te kopnenih i morskih životinja. Radio se o mikroorganizmima koji su dio normalne fiziološke flore koja se nalazi u probavnom traktu ljudi i životinja [92].

Bakterije mliječne kiseline najčešće se povezuju s prehrambenom industrijom gdje se koriste za fermentaciju mliječnih proizvoda, mesa i povrća, te u proizvodnji vina, u proizvodnji stočne hrane, a ističu se i sa svojim antimikrobnim djelovanjem [93,94].

Zahvaljujući sposobnosti određenih sojeva BMK da vežu i neutraliziraju mikotoksine, koriste se i kao potencijalna nova biološka metoda za smanjenje toksičnosti mikotoksina ili sprječavanje njihove apsorpcije u ljudski organizam. Provede se istraživanja koja ukazuju da BMK imaju sposobnost vezivanja AFM1 iz mlijeka i mliječnih proizvoda čime se umanjuje količina toksičnog mikotoksina iz hrane ali i iz hrane za životinje, čime se smanjuju gospodarske štete koje bi nastala zbog bacanja kontaminirane hrane, te se osigurava sigurnost hrane za njezinu konzumaciju [95,96].

Osim toga, mogu proizvesti antimikrobne tvari uključujući bakteriocine koji imaju sposobnost inhibiranja patogenih bakterija i bakterija koje kvare hranu, osim toga, važan su izvor i drugih inhibicijskih tvari, antimikrobnih spojeva diacetila i vodikovog peroksida, te ugljikovog monoksida [93,97].

Bakterije mliječne kiseline imaju široku primjenu kao starter kulture u industrijskoj proizvodnji različitih fermentiranih prehrambenih proizvoda zbog svog GRAS statusa (*Generally Recognized As Safe*) prema FDA (Američka Agencija za hranu i lijekove), odnosno QPS statusa (*Qualified Presumption of Safety*) prema zakonodavstvu Europske unije [93, 98]

1.4 MLIJEKO I NJEGOVA NUTRITIVNA SVOJSTVA

Mlijeko i mliječni proizvodi pripadaju u najvažnije namirnice u ljudskoj prehrani čija se potrošnja sve više povećava od kada je poznato da je mlijeko bogato određenim hranjivim sastojcima [99]. Na kemijski sastav mlijeka utječu različiti čimbenici, kao što su starost životinje, laktacija, reprodukcija, doba godine, kvaliteta prehrane, temperatura, zdravstveno stanje i starost životinje, a najveću potrošnju ima kravlje mlijeko [100]. Prema definiciji, mlijeko je proizvod mliječnih žlijezda sisavaca, koje je dobiveno jednom ili više mužnji, kojem ništa nije dodano niti oduzeto. Složenog je kemijskog sastava, prirodno bogato pojedinim nutrijentima i mikronutrijentima kao što su bjelančevine, masti, ugljikohidrati, te kalcij, magnezij, fosfor i vitamini [101]. Pojedini mikronutrijent kao što su Ca, Mg, Na, K, P i Cl, te Fe, Cu, Zn i Se neophodni su za odvijanje određenih funkcija u organizmu. Važno je za istaknuti da su različito raspoređeni u mlijeku, tako da se ioni K, Na i Cl nalaze u vodenoj fazi, dok su Ca, P i Mg djelomično vezani za micle kazeina. U organizmu čovjeka, mikronutrijenti zastupljeni su s 4% u odnosu na ukupnu tjelesnu masu i dio su svakog tkiva, tjelesne tekućine, stanice i organa [102]. Kataliziraju veliki broj bioloških reakcija u tijelu, među kojima se ističu kontrakcija mišića, prijenos živčanih impulsa, a veliku pomoć pružaju pri iskorištavanju hranjivih tvari iz hrane [103,104]. Dokazano je da toplinska obrada mlijeka utječe na sastav minerala u mlijeku, odnosno količine minerala u sirovom mlijeku su veće u odnosu na toplinski obrađeno mlijeko. To se ne odnosi na željezo jer je za njega utvrđeno da se u većoj količini nalazi u toplinski obrađenom mlijeku nego u sirovom. Mineralni sastav mlijeka je promjenjiv jer ovisi o stadiju laktacije, načinu hranjenja životinje, genskoj predispoziciji, te okolišnim uvjetima, kemijski oblik u kojem se mineral nalazi u mlijeku, vrlo je važan jer o njemu ovisi apsorpcija u želucu i biološko iskorištenje [105].

Utvrđeno je da se najveća količina kalcija u kravljem mlijeku (99%) nalazi u frakciji obranog mlijeka, dok je dvije trećine ukupnog kalcija u obliku kalcijevog fosfata u koloidnoj fazi (micle kazeina) ili kao ioni kalcija vezanih na fosfoserin. Ostali dio kalcija prisutan je u topivoj fazi mlijeka. Ionski kalcij prisutan je u topivoj fazi mlijeka (10% od ukupnog kalcija), a preostali dio topivog kalcija nalazi se u obliku kalcijevog citrata [106,107].

Fosfor se u mlijeku nalazi u organskom i anorganskom obliku. Organski oblik fosfora vezan je za kazein (20% od ukupnog fosfora), a ostalih 80% čini anorganski fosfor, od kojeg se 44% veže za micele kazeina kalcijevog fosfata, a ostalih 56% nalazi se u topivom obliku kao slobodni fosfatni ion. Fosfor je element koji se povezuje s nizom važnih bioloških funkcija u ljudskom organizmu i dio je mnogih bioloških komponenti kao što su masti, bjelančevine, ugljikohidrati, te nukleinske kiseline. Važan je u izgradnji kostiju i regulaciji mnogih enzima, a dio je i ATP-a (adenozin-trifosfata) [108,109]. Utvrđeno je da se magnezij u kravljem mlijeku nalazi u obranoj frakciji (98 - 100%), od čega 65% u topivoj fazi, dok je se ostali dio nalazi u koloidnoj fazi vezan za micelle kazeina [110].

Natrij je glavni kation prisutan u izvanstaničnim tekućinama i važan je regulator tlaka, acido-bazne ravnoteža i membranskog potencijala, a ujedno ima i važnu ulogu u aktivnom transportu tvari kroz staničnu membranu. Količine natrija u mlijeku su relativno niske, stoga dnevni unos natrija putem kravljeg mlijeka je relativno mali, ali neki mliječni proizvodi koji sadrže dodatne količine soli, predstavljaju značajan izvor natrija u prehrani. Kalij je jedan od najvažnijih unutar staničnih kationa, a izvanstanični kalij važan je za prijenos živčanih impulsa, mišićne kontrakcije i održavanje krvnog tlaka. Utvrđeno je da unos kalija ima pozitivan učinak na kvalitetu ljudskih kostiju [111]. Bitno je istaknuti da sadržaj natrija, kalija i klorida u mlijeku imaju fiziološki značaj i u prehrani dojenčadi, ali njihov prekomjeren unos može uzrokovati probleme vezane uz funkciju bubrega kod dojenčadi [106]. Kalcij je nutrijent koji je odgovoran za normalno održavanje srčanog ritma, zgrušavanje krvi, lučenje hormona, kontrakciju mišića i aktivaciju određenih enzima. Mlijeko i mliječni proizvodi predstavljaju bogat izvor kalcija [112], a njegova apsorpcija u organizmu ovisi o količini vitamina D te dobi osobe [113]. Oko 20-30% kalcija unesenog u organizam se apsorbira [114], a stopa apsorpcije ovisi o obliku u kojemu kalcij prisutan u hrani, količini, topljivosti i interakciji s drugim sastojcima hrane. Iz svega navedenog, može se zaključiti da kalcij iz mlijeka ima visok stupanj bioiskoristivosti [115]. Također je važno istaknuti da omjer kalcija i fosfora u mlijeku iznosi 1,2-1,4:1, što doprinosi apsorpciji kalcija u organizam a u organizmu se apsorbira oko 20-30% unesenog kalcija [112].

1.4.1 Nutrijenti

Nutrijenti su zapravo hranjive tvari ili sastav koje su sastavni dio svake hrane najčešće njihov udio u hrani je različit ovisno o vrsti hrane. Nutrijenti su važni za rast i razvoj organizma te su važan izvor energije.

1.4.1.1 Bjelančevine

Bjelančevine su, uz vodu, najvažnije tvari u organizmu čovjeka. Sudjeluju u izgradnji mišića, kože, kose, noktiju, te unutarnjih organa, uključujući srce i mozak. Sastoje se od aminokiselina međusobno vezanih peptidnim vezama. Preporučeni dnevni unos bjelančevina (*Recommended Daily Allowance*, RDA) za zdravu odraslu osobu s minimalnom tjelesnom aktivnošću 2012. godine iznosio 0,83 g bjelančevina po kg tjelesne težine dnevno, dok se 2023. godine dnevni unos se smanjio i iznosi 0,8 g/kg tjelesne težine. Konzumaciju bjelančevina iznad navedenih količina potrebno je izbjegavati kako ne bi došlo do neželjenih posljedica po zdravlje [116-118].

Bjelančevine su sastavni dio raznih vrsta prehrambenih proizvoda. Može ih se naći u gotovo svojoj hrani, osim u rafiniranim šećerima i mastima. Dobrim izvorom bjelančevina smatraju se bjelančevine životinjskog podrijetla kao što su meso, riba, jaja, mlijeko i mliječni proizvodi. Hrana životinjskog podrijetla, poput mesa, riba, jaja (bjelanjak), mlijeka, jogurta i sira, najbolji je izvor bjelančevina jer u svom sastavu sadrže sve aminokiseline za razliku od biljnih bjelančevina. Izvor biljnih bjelančevina su mahunarke i žitarice, a veću količinu bjelančevina u svom sastavu sadrži soja [119,120].

1.4.1.2 Masti

Prema kemijskom sastavu masti su esteri glicerola i viših masnih kiselina pa se svrstavaju u trigliceride, nisu topive u vodi, ali se dobro otapaju u organskim otapalima. Masti koje konzumiramo, predstavljaju izvor energije i esencijalnih masnih kiselina, te vitamina topivih u mastima kao što su A, D, E i vitamin K. Prirodno se nalaze u proizvodima životinjskog podrijetla kao što su masno tkivo, meso i mliječni proizvodi,

ali ih sadrže i orašasti plodovi, sjemenke, žitarica ali i neke vrste voća kao što su masline, odnosno maslinovo ulje i avokado [121-124].

Masti se mogu naći i u procesiranoj, odnosno industrijski prerađenoj hrani. Radi se o trans-masnim kiselinama kakve nalazimo npr. u margarinu, te različitim biljnim uljima. Smatraju se nepoželjnim u prehrani jer se povezuju s obolijevanjem od srčano-žilnih bolesti, a epidemiološke studije ukazale su na čvrstu povezanost između konzumiranja masne hrane i karcinoma [125-127].

Razlikujemo zasićene i nezasićene masti, odnosno masne kiseline. Masti su spojevi sa zasićenim masnim kiselinama (palmitinska, stearinska), te su zato pri sobnoj temperaturi u krutom ili polukrutom stanju dok su ulja spojevi s nezasićenim masnim kiselinama (oleinska, linolna, linolenska) pa su stoga pri sobnoj temperaturi u tekućem agregatnom stanju. Od svih hranjivih tvari, masti se najčešće povezuju s bolestima srca i krvnih žila, šećernom bolesti i debljinom do koje dolazi ako se često konzumira hrana bogata mastima bez obzira da li se radi o zasićenim i/ili nezasićenim mastima, budući da imaju isti doprinos količini energije (1 g masti = 9 kcal) [128,129,11].

1.4.1.3 Ugljikohidrati

Ugljikohidrate, ovisno o veličini molekule, te koliko će energije i kojom brzinom, osloboditi u organizmu, ovisi o složenosti molekularne strukture pojedinih ugljikohidrata, pa se tako razlikuju jednostavni i složeni ugljikohidrati. Jednostavni ugljikohidrati su različiti oblici šećera, kao što su glukoza i saharoza. Radi se malim molekulama koje organizam može brzo razgraditi i apsorbirati te pretvoriti u energiju zbog toga vrlo brzo dolazi do povećanja razine glukoze u krvi. Sva dodatna glukoza u krvotoku pohranjuje se u jetri i mišićnom tkivu koja se oslobađa kada organizmu treba dodatna energija [130]. Velike količine jednostavnih ugljikohidrata koji daju slatki okus, sadrži voće, mliječni proizvodi, med te sirup od javora i agave [131]. Ugljikohidrati koji se sastoje od dugih nizova jednostavnih ugljikohidrata nazivaju se složenima. Da bi ih organizam mogao apsorbirati, moraju se razgraditi do jednostavnih ugljikohidrata, stoga sporije stvaraju energiju. Oni također povećavaju razinu šećera u krvi, sporije i na niže razine od jednostavnih ugljikohidrata, ali na duže vrijeme [132]. Složeni ugljikohidrati uključuju škrob i vlakna nalazimo ih proizvodima od pšenice (kao što su

kruh i tjestenina), te ostalim vrstama žitarica (kao što su raž i kukuruz), grahu i korjenastom povrću (kao što su krumpir i batat) [133]. 1 g ugljikohidrata kojeg putem hrane unosimo u organizam oslobađa energiju od 4 kcal.

1.4.2 Mikronutrijenti

1.4.2.1 Kalcij (Ca)

Kalcij je jedan od najzastupljenijih mikronutrijenata u organizmu i čini 1-2% tjelesne težine odraslog čovjeka, a više od 99% ukupnog Ca pohranjen je u kostima i zubima. Ima ključnu ulogu u mineralizaciji kostiju, a njegov nedostatak u organizmu dovodi do smanjenja koštane mase i osteoporoze. Važno je naglasiti da konzumiranje hrane bogate kalcijem u svim fazama života, ima ključnu ulogu u zaštiti čovjeka od nedostatka kalcija u organizmu, a njegova adsorpcija u ljudskom organizmu uvelike ovisi o količini vitamina D i dobi osobe [134-136].

Dosadašnja istraživanja ukazuju da konzumacija mlijeka i mliječnih proizvoda ima važnu ulogu u unosu kalcija u organizam, mineralizaciji kostiju, te kod razvoja kroničnih bolesti. Poznato je da mlijeko i mliječni proizvodi sadrže visoke razine vitamina D, riboflavina, vitamina C i vitamina B12 koji su također neophodni za održavanje zdravlja kostiju [137,138]. Preporučeni dnevni unos (*Recommended Daily Allowance*, RDA) kalcija mijenja se ovisno o dobi, spolu i o raznim patološkim stanjima, općenito se nalazi u rasponu od 1000 do 1200 mg [139]. Preporučeni dnevni unos kalcija mijenja se ovisno od dobi. Prema Europskoj agenciji za sigurnost hrane (EFSA), djeca u dobi od 11 do 17 godina starosti trebaju prosječno, tijekom dana unijeti maksimalno 1150 mg/dan, dok se za osobe starije od 25 godina preporučuje unos od 750 mg/dan [140].

1.4.2.2 Magnezij (Mg)

Magnezij ima veliku ulogu kao aktivator za više od 300 enzimskih reakcija, a posebno onih reakcija u koje je uključen ATP [141,142]. Budući da je ATP-a uključen u mnoge metaboličke procese, magnezij sudjeluje u metabolizmu ugljikohidrata, lipida, nukleinskih kiselina i bjelančevina. Prema znanstvenom mišljenju Europske agencije za hranu (EFSA), preporučeni dnevni unos magnezija za odraslog muškaraca iznosi 350 mg/dan, a za žene 300 mg/dan [143]. Nedostatak magnezija u organizmu može utjecati na nastanak osteoporoze, a ujedno utječe i na aktivnost mišića [142]. Magnezij može interferirati s kalcijem na razini membrane ili se vezati za membranske fosfolipide, modulirajući tako propusnost membrane. Predstavlja peti mineral po važnosti u organizmu nakon kalija, fosfora, kalcija i natrija. Žitarice i proizvodi od žitarica, te mlijeko i mliječni proizvodi predstavljaju izvor magnezija u prehrani, i njihovom konzumacijom može se osigurati preporučeni dnevni unos magnezija, te tako prevladati nedostatak magnezija, iako se u posljednje vrijeme na tržištu mogu pronaći mlijeko i mliječni proizvodi obogaćeni dodanim magnezijem [144,145].

1.4.2.3 Natrij (Na)

Natrij je izvanstanični kation čija je uloga održavanje osmotskog tlaka izvanstaničnih tekućina i ima važnu ulogu u regulaciji ravnoteže vode u organizmu [102]. Važan je i u formuliranju hrane budući da utječe na njezina senzorska svojstva, a upotrebljava se i u konzervirajuće svrhe. Prekomjerni unos bilo koje esencijalne hranjive tvari pa tako i natrija može izazvati ozbiljne zdravstvene probleme osobito kardiovaskularnog sustava. Najveće količine natrija u organizam ulaze putem kuhinjske ili morske soli. Iz tog razloga Svjetska zdravstvena organizacija dala je smjernice prehrambenoj industriji za smanjenjem sadržaja soli u pakiranoj hrani. Preporučuje se da se do 2030. godine unos natrija smanji za 30%, tako da se koristi kalijeva sol, odnosno zamjene za sol. Previsoke ili preniske količine ovog minerala u organizmu jednako su opasne, stoga je potrebno voditi računa o uravnoteženoj prehrani s optimalnom količinom natrija kako bi se osiguralo normalno funkcioniranje organizma [146-148].

1.4.2.4 Kalij (K)

Kalij je u organizmu važan za održavanje zdravlja srca i kostiju, a ima i ulogu u smanjenju moždanog udara i koronarnih bolesti. Iz navedenih razloga, unos hrane koja u svom sastavu sadrži kalij je vrlo bitan. Kalij je nutrijent koji se obično ne nalazi u obogaćenoj hrani i rijetko se konzumira kao dodatak prehrani. Hrana koja predstavlja dobar izvor kalija su voće i povrće, osobito krumpir koji predstavlja njegov najveći izvor, te mliječni proizvodi [149,150]. Glavna mu je uloga u raspodjeli vode unutar i izvan stanica, a ima ulogu u staničnom metabolizmu, sudjeluje u prijenosu energije, lučenju hormona te regulaciji sinteze bjelančevina i glikogena. Smatra se da se 85% kalija unesenog hranom, apsorbira u gastrointestinalnom traktu. Preporučeni dnevni unos kalija za područje Europske unije iznosi 3,1 g/dan, dok WHO preporučuje unos od 3,5 g/dan za osobe starije od 16 godina [151,152].

1.4.2.5 Fosfor (P)

Fosfor je mikronutrijent čija je uloga u organizmu povezana s drugim elementima, poput magnezija i kalcija. Sastavni je dio kostiju i zubiju, a neophodan je za funkcioniranje stanica i mišića, prijenos genetskih informacije, a važan je sastojak adenozin trifosfata (ATP) i nukleinskih kiselina [153]. Na apsorpciju fosfora u organizmu utječe ukupna količina fosfora u prehrani, te kemijski oblik fosfora, odnosno da li se radi o organskom ili anorganskom obliku fosfora. Glavni čimbenici koji utječu na doprinos fosfora u organizam je hrana s visokom udjelom bjelančevina, odnosno mlijeko i mliječni proizvodi, perad, riba, te žitarice i njihovi proizvodi. Na nivou Europske unije, srednji unos fosfora u devet zemalja, kreće se od 265 do 531 mg/dan za dojenčad, od 641 do 973 mg/dan za djecu do 3 godine starosti a za odrasle osobe od 1000 do 1767 mg/dan, dok preporučeni dnevni uznoš za dojenčad iznosi 160 mg/dan, za djecu do 3 godine starosti 250 mg/dan, a za odrasle 550 mg/dan [154]. Pravilnom prehranom većina populacije unosi dovoljne količine fosfora u organizam, stoga je održavanje uravnotežene prehrane bitni čimbenik u osiguranju dovoljnih količina hranjivih tvari uključujući i fosfor.

1.5 VITAMINI

Vitamini su organski spojevi, koji se u malim količinama nalaze u hrani. Pripadaju skupini hranjivih tvari budući da ih tijelo ne može sintetizirati, a potrebni su za održavanje njegovog zdravlja i dobrobiti. Budući da kataliziraju brojne biokemijske reakcije u organizmu potrebno ih je unositi hranom, a svaki od vitamina ima različitu biokemijsku funkciju vitamini [155]. Vitamini se još nazivaju i mikronutrijentima, jer su dnevne potrebe za vitaminima do 100 mg dnevno. Poznato je 13 vitamina, koji su podijeljeni u dvije skupine, na vitamine topive u vodi i na one topive u mastima. Vitamini topivi u mastima uključuju vitamin A, D, E i K, a vitamini topivi u vodi su vitamin C te vitamini B kompleksa, tiamin (B1), riboflavin (B2), niacin (B3), pantotensku kiselinu (B5), piridoksin (B6), folnu kiselinu (B9), kobalamin (B12) i biotin [156].

1.5.1 Vitamin A

Ljudski organizam nije u stanju samostalno proizvesti vitamin A stoga ga je potrebno unositi putem hrane koja u svom sastavu sadrži vitamin A. Važan izvor unosa vitamina A predstavlja hrana životinjskog podrijetla kao što su riba, jaja te mlijeko i mliječni proizvodi. Vitamin A ima ulogu u zaštiti epitela sluznice probavnog trakta, kroničnih infekcija, kolitisa, gastritisa, proljeva i drugih funkcionalnih i organskih poremećaja. Ukratko možemo reći da je vitamin A važan za rast novih stanica, djeluje kao antioksidans, sudjeluje u sintezi rodopsina te tako doprinosi boljem vidu, održava zdravlje kože te poboljšava stvaranje i aktivnost bijelih krvnih stanica i podržava funkciju imunosnog sustava [157-159].

Nedostatak vitamina A može uzrokovati noćnu sljepoću (niktalopija) i keratomalaciju, pri čemu potonja rezultira trajnom sljepoćom ako se ne liječi. Radi se o vodećem uzroku sljepoće u dječjoj dobi koja se može spriječiti, a svake godine pogađa preko 250 000 do 500 000 pothranjene djece u zemljama u razvoju, od kojih oko polovica umre u roku od godinu dana nakon što su postali slijepi. Svjetska zdravstvena organizacija klasificirala je nedostatak vitamina A kao javnozdravstveni problem, a 2013. godine, istraživanjem je dokazano da je nedostatkom vitamina A pogođeno otprilike jedna trećina djece u dobi od 6 do 59 mjeseci, a najviša stopa utvrđena je u

subsaharskoj Africi (48%) i južnoj Aziji (44%) [160,161]. utvrđena je u subsaharskoj Africi (48%) i južnoj Aziji (44%) [160,161].

1.5.2 Vitamin D

Vitamin D ili kalciferol je vitamin topiv u mastima. Unos dovoljne količine vitamina D pomaže rastu i razvoju kostiju i zuba, kao i boljoj otpornosti na određene bolesti. Vitamin D ima i mnoge druge zdravstvene prednosti. Brojna istraživanja ukazuju na njegov antikancerogeni učinak, a potvrđeno je da može imati ulogu u smanjenju rizika od nastanka multiple skleroze. Vitamin D je jedan od rijetkih vitamina koje naše tijelo može samo proizvesti. Naime, on nastaje sintezom u našem organizmu pod utjecajem sunčeve svjetlosti. Vitamin D potiče apsorpciju kalcija i fosfora, regulira metabolizam kostiju, sudjeluje u regulaciji arterijskog krvnog tlaka, regulira proizvodnju inzulina te tako sudjeluje u prevenciji nastanka dijabetesa [162]. Mnoge studije tijekom pandemije Covid-19 pokazale su pozitivnu ulogu vitamina D u ublažavanju i prevenciji komplikacija nastalih Covid-19 [163].

Nedostatak vitamina D predstavlja poseban problem kod dojenčadi. Procjenjuje se da više od milijarde ljudi diljem svijeta ima niske koncentracije vitamina D zbog čega se s pravom govori o „pandemiji“ hipovitaminoze. Većina vitamina D stvara se u koži pod utjecajem sunčeve svjetlosti, dok je unos ovoga vitamina putem hrane u prosjeku vrlo nizak i iznosi svega 20% od ukupnih dnevnih potreba [164]. Dnevne potrebe vitamina D prema preporukama EFSA-e za odrasle uključujući trudnice, dojilje i adolescente u dobi od 11 do 17 godina, iznosi 100 µg ekvivalenata vitamina D (VDE)/dan a za djecu u dobi od 1 do 10 godina, od 50 µg VDE/dan je uzimajući u obzir tjelesnu masu djeteta [165].

1.5.3 Vitamin E

Vitamin E esencijalni je nutrijent koji ima važnu u održavanju ljudskog zdravlja, s obzirom na to da sudjeluje u važnim tjelesnim funkcijama, poznato je da ima i antioksidativna svojstva. Sastoji se od četiri tokoferola i četiri tokotrienola, a dominantan oblik vitamina E u organizmu je α -tokoferol [166]. S obzirom na to da je topiv u mastima vitamin E se može taložiti u svim organima u tijelu, a osobito ima mogućnost pohranjivanja u masnom tkivu i nadbubrežnoj žlijezdi. U hrani je zastupljen u visoko vrijednim uljima kao što je maslinovo, sezamovo ili suncokretovo, mada se kao najbolji izvor vitamina E smatraju orašasti plodovi. Kako se i životinje hrane hranom koja sadrži vitaminom E (pšenične mekinje, zobene pahuljice, rogač, kukuruz), tako meso i jaja te mlijeko postaju izvor vitamina E [167,168]. Kako je α -tokoferol prepoznat kao jedini esencijalni oblik vitamina E, panel za prehranu, novu hranu i alergene EFSA-e, proveo je sustavna istraživanja vezano uz rizik od poremećaja koagulacije i krvarenja, do kojih može doći od prekomjernog unosa vitamina E u organizma. Iz tog razloga utvrđena je gornja granica unosa vitamina E koja iznosi 300 mg/dan za odraslu populaciju, 260 mg/dan za djecu od 15-17 godina starosti dok npr. za dojenčad od 4-6 mjeseca starosti iznositi 50 mg/dan [169]. Prihvatljiv dnevni unos za odraslog muškarca iznosi 13 mg/dan, a za žene 11 mg/dan, za djecu od 3 do 10 godina 9 mg/dan, od 1 do 3 godine 6 mg/dan, dok za djecu starosti od 7 do 11 mjeseci, referentna vrijednost iznosi 5 mg kg⁻¹ [170].

1.5.4 Vitamin K

Vitamin K pripada skupini vitamina topivih u mastima. Prirodno se pojavljuje u hrani poznat pod nazivom filokinon, odnosno vitamin K1 te menkinom odnosno vitamin K2. Filokinon predstavlja primarni prehrambeni oblik vitamina K, a nalazimo ga u tamnozelenom lisnatom povrću kao što su špinat, zelena salata te kupusnjače, dok se vitamin K2 uglavnom nalazi u proizvodima životinjskog podrijetla kao što su meso, sir, jaja [171].

Vitamin K ima važnu ulogu u zgrušnjavanju krvi te zdravlju kardiovaskularnog i koštanog sustava, osobito kod osoba starije životne dobi [172,173].

Nedostatak vitamina K u organizmu izaziva krvarenja, a istraživanja su ukazala na smanjene količine vitamina K kod novorođenčadi čije majke nisu uzimale tijekom trudnoće navedeni vitamin, te je takva dojenčad osjetljivija na krvarenja od onih koja su hranjena adaptiranom hranom [174].

Svjetska zdravstvena organizacija WHO/FAO je 2004. godine odredila preporučeni dnevni unos vitamina K u količini od 1 µg/kg tjelesne težine što odgovara 55 µg/dan za odrasle žene i 65 µg/dan za odrasle muškarce, a istu količinu od 1 µg/kg tjelesne težine preporučila je i EFSA u svom znanstvenom mišljenju iz 2017. godine [175,176].

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Kontaminiranost mlijeka AFM1 kao posljedicom hranjenja životinja hranom kontaminiranom aflatoksinom B1 je relativno česta pojava. Da bi se spriječile velike gospodarske štete i uništavanje kontaminiranog mlijeka, te zaštitilo zdravlje ljudi i životinja od konzumiranja zdravstveno neispravnog i po zdravlje štetnog mlijeka, moguće je korištenjem mikofiksatora vezati AFM1 i omogućiti daljnju uporabu mlijeka. Kao bi se mlijeko i dalje moglo koristiti za prehranu ljudi i/ili životinja, svrha ovog istraživanja je pronaći najučinkovitije mikofiksatore koji će ukloniti AFM1 iz mlijeka, a sačuvati njegovu nutritivnu vrijednost.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi u kojoj mjeri odabrani mikofiksatori, beta-glukan iz kvasca (u koncentraciji 0,005% i 0,01%), beta-glukan iz zobi (u koncentraciji 0,005% i 0,01%), te žive i mrtve BMK, vežu AFM1 iz namjerno kontaminiranog mlijeka u 0-tom, drugom, četvrtom i 24-om satu vezivanja nakon postupka centrifugiranja da bi se utvrdilo koji od korištenih mikofiksatora ima najveći afinitet za vezivanje AFM1.

Drugi cilj rada bio je utvrditi u kojoj mjeri, vezivanje AFM1 i odabranih mikofiksatora utječu na sadržaj nutrijenata u mlijeku tijekom 0-tog, drugog, četvrtog i 24-sata vezivanja, te na energetska vrijednost mlijeka, a sve kako bi se utvrdilo koji od korištenih mikofiksatora najmanje vežu bjelančevine, masti, ugljikohidrate i šećere (laktozu), te kako promjene u količinama makronutrijenata utječu na energetska vrijednost mlijeka i na njegovu kvalitetu.

Treći cilj bio je utvrditi u kojoj mjeri, vezivanje AFM1 i odabranih mikofiksatora utječu na sadržaj odabranih mikronutrijenata: Na, K, Mg, Ca i P, te vitamina A, D, E i K. u nultom satu vezivanja (tretmana), nakon dva sata, četiri sata i 24 sata vezivanja. Dobivene vrijednosti uspoređivat će se s vrijednostima mikronutrijenata u mlijeku prije kontaminacije AFM1 i dodatka mikofiksatora, kako bi se utvrdilo da li količina ne vezanih mikronutrijenata udovoljava uvjetima korištenja mlijeka u prehrambene svrhe.

Također, cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi da li postoje statistički značajne razlike između analiziranih nutrijenata i mikronutrijenata s odabranim mikofiksatorima, u odnosu na različito vrijeme tretiranja mikofiksatorima.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Uzorci

U ovom je radu kao materijal za istraživanje korišteno komercijalno mlijeko domaćeg proizvođača s 2,8% mliječne masti te tradicionalni mliječni proizvodi poput svježeg kravljeg mlijeka, sira i vrhnja iz kojih su izolirane bakterije mliječne kiseline (BMK). Također su za potrebe istraživanja korišteni i komercijalni oblici beta-glukana iz zobi (Darvitalis, Hrvatska) i beta-glukana iz kvasca (Transfer Point Inc., SAD), te standardna otopina AFM1. Za eksperimentalno istraživanje korišteno je po 15 uzoraka mlijeka, iz kojih su načinjeni poduzorci, u kojima su se određivali nutrijenti i makronutrijenti. U istraživanju su korišteni mikofiksatori beta-glukana iz zobi i beta-glukana iz kvasca čija je masena koncentracija iznosila 0,01% i 0,005%, a žive i mrtve bakterije mliječne kiseline dodavane su u mlijeko za žive u broju od 10^6 CFU mL⁻¹ a za mrtve 1 mg biomase/mL, dok je koncentracija dodanog standarda AFM1 iznosila 0,5 µg⁻¹. kao kontrolni uzorak koristilo se ne kontaminirano mlijeko istog proizvođača, s istom količinom mliječne masti 2,8% m.m..

3.1.2 Mikroorganizmi

U ovom istraživanju korišten je soj bakterija mliječne kiseline (*L. plantarum* KM) koji je dio zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, a izolirani su iz svježeg kravljeg mlijeka, svježeg kravljeg sira i vrhnja. Kulture su čuvane u MRS bujonu (De Man, Rogosa, & Sharpe, Biolife, Milano Italija) s 30%-tnim glicerolom (V/V) pri temperaturi od -70 °C do početka izvođenja eksperimenta.

3.1.3 Hranjive podloge za bakterije mliječne kiseline (BMK)

Za bakterije mliječne kiseline korišten je MRS agar (De Man, Rogosa i Sharpe) koji je sastavljen od peptona 10 g L^{-1} ; goveđeg ekstrakta $10,0 \text{ g L}^{-1}$; ekstrakta kvasca $5,0 \text{ g L}^{-1}$; glukoze $20,0 \text{ g L}^{-1}$; dinatrijevhidrogenfosfata $2,0 \text{ g L}^{-1}$; natrijevog acetata $5,0 \text{ g L}^{-1}$; amonijevog citrata $2,0 \text{ g L}^{-1}$; magnezijevog sulfata $0,2 \text{ g L}^{-1}$; manganovog sulfata $0,05 \text{ g L}^{-1}$; agara $15,0 \text{ g L}^{-1}$; Tweena 80 $1,0 \text{ g L}^{-1}$; voda (destilirana) 1 L ; pH 6,5.

Također je korišten i MRS bujon koji je istog sastava kao MRS agar, ali bez dodanog agara. Postupak sterilizacija bujona i agara provedena je na $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ /15 minuta.

3.1.4 Kemikalije

U Tablici 1. prikazan je popis kemikalija neophodnih za pripremu standardne otopine AFM1, koja se koristila za kontaminaciju uzoraka mlijeka.

Tablica 1. Kemikalije za analizu AFM1

Naziv kemikalije	Kratika	Čistoća	Proizvođač
Natrij klorid	NaCl	p.a.	Alkaloid SR Makedonija
Dinatrijev hidrogen fosfat	Na_2HPO_4	p.a.	Scharlab, S.L., Španjolska
Kalijev dihidrogen fosfat	KH_2PO_4	p.a.	PanReac AppliChem, Španjolska
Kalijev klorid	KCl	p.a.	Alkaloid SR Makedonija
Natrij hidroksid	NaOH	p.a.	Merck Njemačka

U Tablici 2. prikazane su kemikalije koje su se koristile u eksperimentalnom dijelu disertacije, za dokazivanje nutrijenata: mast, bjelančevina i šećera (laktoze).

Tablica 2. Kemikalije za određivanje nutrijenata

Naziv nutrijenta	Naziv kemikalije	Kratica	Čistoća	Proizvođač
Masti	Petrol eter		p.a.	ApphChem, Germany
	Kloridna kiselina	HCl	37%	Scharlab, S.L., Španjolska
	Deionizirana voda		0,055 $\mu\text{S cm}^{-1}$	Nirosta VV Sistem, Nirosta water technologies Republika Hrvatska
Bjelančevine	Sulfatna kiselina	H ₂ SO ₄	95-99%	Supelco, Germany
	Katalizator u tableti	Kejltabs Cu/3,5	p.a	Foss Velika Britanija
Šećer laktoza	Acetonitril	ACN	HPLC	PanReac AppliChem, Španjolska
	Deionizirana voda		0,055 $\mu\text{S cm}^{-1}$	Nirosta VV Sistem, Nirosta water technologies, Republika Hrvatska

Za određivanje mikronutrijenata Ca, K, Na, Mg, P te vitamina A, D, E i K koristene su kemikalije navedene u Tablici 3.

Tablica 3. Kemikalije za određivanje mikronutrijenata

Naziv mikronutrijenta	Naziv kemikalije	Kratica	Čistoća	Proizvođač
Kalcij (Ca)	Nitratna kiselina	HNO ₃	≥65%	Scharlab, S.L., Španjolska
Kalij (K)				
Natrij (Na)	Vodikov peroksid	H ₂ O ₂	30%	Fisher, Velika Britanija
Magnezij (Mg)				
Fosfor	Kalijev dihidrogenfosfat	KH ₂ PO ₄	p.a.	Alkaloid SR Makedonija
	Amonijevheptamolibdat– tetrahidrat	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O	p.a.	BioChem, Francuska
	Hidrokinon	C ₆ H ₆ O ₂	p.a.	TOI- Japan

	Natrijev sulfit	Na ₂ SO ₄	p.a.	Alkaloid SR Makedonija
	Kloridna kiselina	HCl	37%	Scharlab, S.L., Španjolska
	Sulfatna kiselina	H ₂ SO ₄	95%	Supelco, Germany
Vitamin A,D,E,K	Etanol	EtOH	96%	Gram-mol, Zagreb.Hrvatska
	Butil hidroksitoluen BHT	2,6 Di-tert butil -4-methylphenol	p.a.	Aldrich SAD
	Heksan	C ₆ H ₁₄	ECD-FID	Merc, Njemačka
	Acetonitril	ACN	HPLC	PanReac AppliChem, Španjolska
	Metanol	MeOH	HPLC	Merc, Njemačka

Za potrebe ovog istraživanja korišteni su certificirani referentni materijali koji su prikazani u Tablici 4.

Tablica 4. Popis certificiranih referentnih materijala (mikronutrijenti) koji su korišteni u ovom istraživanju

Naziv	Kratica	Čistoća	Proizvođač
Kalij	K	99,998%	CPA Chem, Bugarska
Natrij	Na	99,998%	CPA Chem, Bugarska
Magnezij	Mg	99,994%	CPA Chem, Bugarska
Kalcij	Ca	99,994%	CPA Chem, Bugarska
Fosfor	P	99,994%	CPA Chem, Bugarska
Vitamin A		98,7%	Dr.Ehrenstorfer, LGC standards, Njemačka

Vitamin D		98,9%	Dr.Ehrenstorfer, LGC standards, Njemačka
Vitamin E		99,8%	Dr.Ehrenstorfer, LGC standards, Njemačka
Vitamin K		97,3%	Dr.Ehrenstorfer, LGC standards, Njemačka
Aflatoksin M1 (AFM1)		99,0%,	Romer Labs Diagnostic GmbH, Austrija

3.1.5 Instrumenti

Za provedbu ovog istraživanja korišteni su pomoćni instrumenti navedeni u Tablici 5.

Tablica 5. Pomoćni instrumenti

Naziv instrumenta	Proizvođač
Peć za žarenje "NABERTHERM"	Nabertherm GmbH, Njemačka
Vodena kupelj	Lauda, Njemačka
Ultrazvučna vodena kupelj	Branson, SAD
Tresilica	Ika -Werke GmbH, Njemačka
Centrifuga Rottina 38	Hettich Zentrifugen, Njemačka
Sušionik MEMMERT (37 ± 1 °C, 103 ± 2 °C)	Memmert, Njemačka
Mikrovalna peć za spaljivanje uzoraka	Milestone Systems, Danska

U eksperimentalnom dijelu za mjerenje nutrijenata i makronutrijenata u uzorcima mlijeka korišteni su mjerni instrumenti koji su prikazani u Tablici 6.

Tablica 6. Mjerni instrumenti

Naziv instrumenta	Proizvođač
Analitička vaga $\pm 0,1$ mg	Mettler Toledo , Švicarska
UV-VIS spektrofotometar Lambda 35	PerkinElmer, SAD
Uređaj za hidrolizu HYDROTHERM	Gerhardt, Njemačka
Hidrolizator masti “SOXTEC SYSTEM ”-2047 (+ nadogradnja 12024)	Foss, Danska
Ekstraktor masti “SOXTHERM”	O.I.ANALYTICAL, SAD
Blok za razgradnju DT 220	Foss, Danska
Destilator bjelančevina “KJELTEC 8400 ANALYZER”	Foss, Danska
Tekućinski kromatograf DAD/FLD “Agilent – 1200 Series”	Agilent, SAD
UPLC-ICPMS Nexion	Perkin Elmer, SAD
LC-MS/MS (Tekućinski kromatograf sa spektrometrom masa)	Agilent,SAD

3.1.6 Pribor

U radu i pripremi uzoraka korišten je pribor

- pipete proizvođača Brand 1 mL, 5 mL, 10 mL
- Erlenmayerove tikvice 250 mL
- stakleni štapić
- laboratorijska čaša od 10 mL, 50 mL, 100 mL, 500 mL
- epruvete
- vajalice s umetkom
- satno staklo
- odmjerne tikvice od 10 mL, 20 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL 1000 mL
- staklene menzure od 100 mL
- stakleni ljevčiči
- filter papiri (Whatman, Cytiva Europe GmbH, Velika Britanija)
- filteri 0,45 μ m 0,2 μ m (Pall Corporation, SAD)
- stakleni filter papir (Pall Corporation, SAD)
- kivete - debljina sloja 1cm
- plastične kivete od 70 mL
- porculanske zdjelice
- aluminijske posudice s poklopcem
- eksikator
- imunoafinitetne kolone s antitijelima za AFM1 (Vikam, SAD)
- sustav za ekstrakciju na čvrstoj fazi s vakuum kadicom i pumpom (Supelco, SAD)

3.2 METODE

3.2.1 Beta-glukani i priprema otopine

U istraživanju su korišteni komercijalni beta-glukan iz zob i beta-glukan iz kvasca. Oba beta-glukana pripremljena su na dva koncentracijska nivoa, za koncentraciju od 0,01% odvagano je 0,01 g beta-glukana u 100 mL mlijeka, a za koncentraciju od 0,005% odvagano je 0,005 g beta-glukana u 100 mL mlijeka.

3.2.2 Priprema standardne otopine AFM1

U odmjerne tikvici od 10 mL acetonitrilom (ACN) razrijedi se određeni volumen certificiranog referentnog materijala AFM1 (čistoće 99± 1%, Romer Labs Diagnostic GmbH, Austrija). Nakon razrjeđenja dobivena otopina koncentracijea od 50 ng mL⁻¹ ponovno se razrjeđuje s pomoću otopine acetonitrila i vode u omjeru (2:8) te se dobiva radni standard koji se čuva u tamnoj staklenoj ambalaži u hladnjaku. Pripremljeni standard koristit će se za namjernu kontaminaciju uzoraka komercijalnog mlijeka AFM1, kontaminirani uzorci koristit će se u eksperimentalnom dijelu disertacije.

3.2.3 Izolacija i identifikacija izolata BMK

Odabrane bakterije mliječne kiseline (BMK) čuvane pri –70°C u MRS bujonu s 30% (V/V) glicerola revitaliziraju se naciepljivanjem u MRS bujonu i inkubiraju na 30 °C tijekom 48 sati. Zatim se za svaki bakterijski soj aktivirane prekonoćne stanice naciepljuje u 25 mL (MRS) bujona te se sakupe pod aseptičkim uvjetima centrifugiranjem (3000 rpm/10 min) na sobnoj temperaturi, isperu tri puta s 5 mL sterilne deionizirane vode i resuspendiraju u sterilnoj deioniziranoj vodi nakon čega se podijele u dvije skupine. Prva skupina su žive stanice, broj živih stanica određuje se serijom decimalnih razrjeđenja, brojanjem poraslih kolonija na MRS Agar, a izražava se kao CFU vrijednost. Druga skupina stanica (mrtve stanice) tretirana je termički u laboratorijskoj vodenoj kupelji pri 100 °C tijekom 60 minuta. Stanice BMK tretirane u vodenoj kupelji odvojene su centrifugiranjem na 3000 rpm tijekom 10 minuta i pripremljena je biomasa u količini od 1 mg biomase/mL. Odsutnost živih stanica BMK u termički tretiranim uzorcima provjerena je određivanjem CFU vrijednosti. Broj stanica

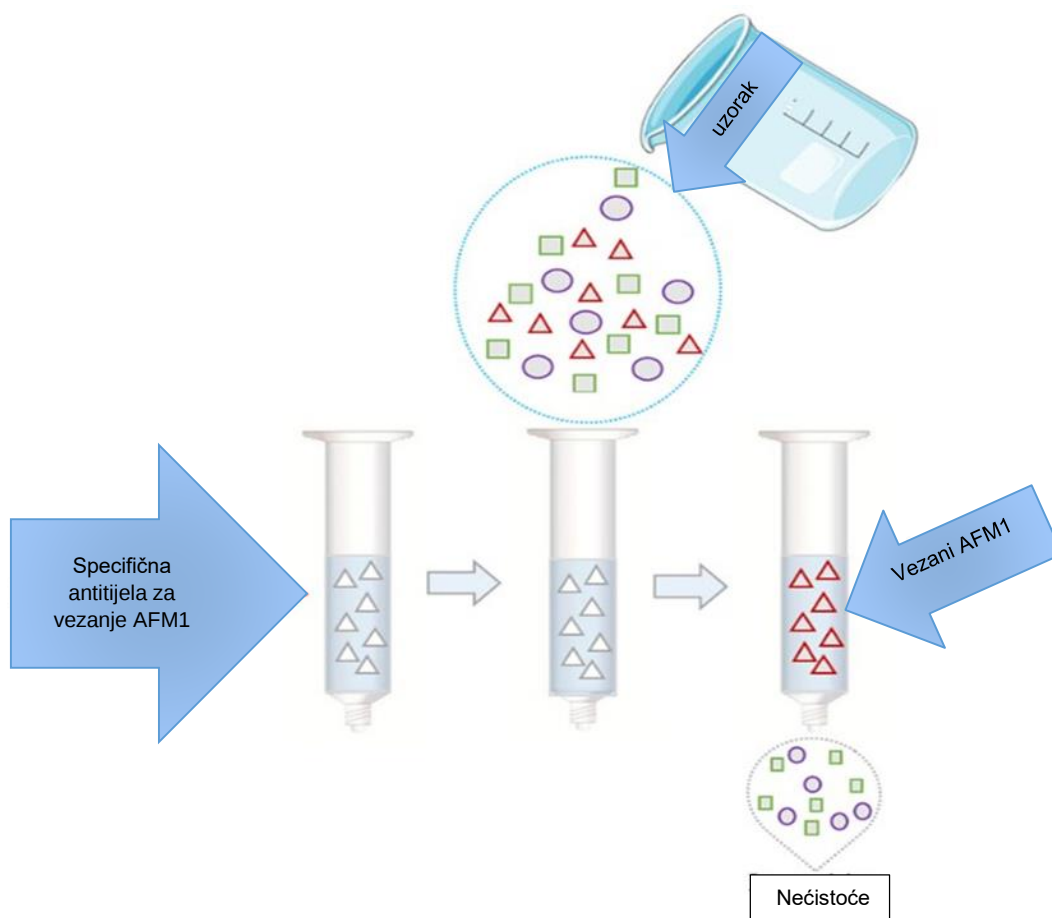
za provođenje pokusa vezanja AFM1 iznosi 10^6 za žive i 1 mg biomase/mL za mrtve BMK.

3.2.4 Određivanje AFM1 kombiniranom metodom tekućinske kromatografije - spektrometrije masa (LC-MS/MS)

Odvaže se 70 g homogeniziranog uzorka mlijeka te se centrifugira 15 min pri 4200 rpm/min. Nakon centrifugiranja, s površine mlijeka staklenim štapićem se odstrani sva nakupljena masnoća. Potom se 10-20 g supernatanta odvaže u laboratorijsku čašu i propusti kroz imuno afinitetnu kolonu (Slika 4) [177] koja se prethodno kondicionira s 10 mL PBS-pufera. Protok uzorka kroz kolonu ne smije prelaziti 3 mL min^{-1} , a punilo kolonica ne smije ostati suho do kraja propuštanja uzorka. Nakon propuštanja uzorka mlijeka, imunoafinitetna kolona se ispiri s 10 mL deionizirane vode i osuši se pod vakuumom do suhoga. AFM1 se eluira propuštanjem 4 ml acetonitrila kroz kolonu. Eluat se skuplja u epruvetu, koji se zatim upari do suhog u struji dušika, nakon čega se dodaje 500 μL smjese acetonitril/voda (2:8) mikrotitarskom špricom, filtrira preko filtera (0,2 μm). Tako pripremljen uzorak postavlja se u automatski uzorkivač instrumenta LC-MS/MS.

Priprema PBS pufera: U 900 mL deionizirane vode otopi se 8 g NaCl, 1,2 g Na_2HPO_4 , 0,2 g KH_2PO_4 i 2 g KCl. pH vrijednost otopine podešava se 0,8% otopinom NaOH sve dok ne dostigne pH 7,4 nakon čega se volumen nadopunjuje deioniziranom vodom do oznake 1000 mL u odmjernoj tikvici.

Slika 4. Princip razdvajanja analita pomoću imunoafinitetnih kolona



Izvor: Vaz A, Cabral Silva A.C, Rodrigues P, Venâncio A. Detection Methods for Aflatoxin M1 in Dairy Products, *Microorganisms* 2020.[177]

Analitička metoda kojom se određuje maseni udio AFM1 u mlijeku (LC-MS/MS tehnika) je validirana i akreditirana prema normi HRN EN ISO 14501:2008 [178]. Parametri validacije metode prikazani su (Tablica 7). Navedenom metodom postignuta je granica kvantifikacije (engl. *Limit of quantification* - LOQ) metode od $0,010 \mu\text{g kg}^{-1}$. Prisutnost aflatoksina M1 u uzorku utvrđuje se usporedbom retencijskog vremena (R_t) pika na kromatogramu uzorka s retencijskim s vremenom pika radnog standarda. AFM1 je prisutan ako se retencijsko vrijeme pika na kromatogramu uzorka razlikuje od

retencijskog vremena pika radnog standarda za $\pm 2,5\%$ sukladno Pravilniku o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata NN 2/2005 [179].

Za svaki eksperiment korištena je i pozitivna kontrola (samo AFM1 u mlijeku), a svaki eksperiment proveden je u triplicatu, uvjeti koje je potrebno osigurati za kvantifikaciju AFM1 na LC-MS/MS tehnici zadani su parametrima validacije metode a prikazani su u Tablici 7. Količine dobivenih vrijednosti određivane su prema formuli gdje se koncentracija AFM1 (ω) izračunava tako da se masena koncentracija (γ) pomnoži s volumenom razrjeđenja (V), a zatim rezultat podijeli s masom uzorka (m).

$$\omega = \frac{\gamma \times V}{m}$$

Tablica 7. Parametri validacije metode za određivanje AFM1 LC-MS/MS tehnikom

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

MDK - maksimalno dozvoljena količina, RSD – relativna standardna devijacija

a prema Uredbi komisije (EZ) br. 401/2006 o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani [180]

b prema rezultatima validacijskih eksperimenata

c Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (NN 02/05) [179].

3.2.5 Određivanje suhe tvari

Postupak određivanja vode započinje tako da se odvaže $5,000 \text{ g} \pm 0,0500$ homogeniziranog uzorka mlijeka u osušene i izvagane aluminijske posudice s poklopcem, odvagani uzorak se suši u sušioniku 2 sata $\pm 5 \text{ min}$ na temperaturi od $130 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ od trenutka kada se postigne zadana temperatura. Nakon sušenja aluminijske zdjelice se prenose u eksikator gdje se hlade 30 do 45 minuta. Ohlađene zdjelice s uzorkom se nakon hlađenja važu, te se na temelju razlika između masa prije i nakon sušenja izračuna maseni udio vode ($\% = \text{g}/100\text{g}$).

Jednadžba kojom se izračunava udio suhe tvari:

$$\text{Suha tvar (\%)} = W = \left[\frac{m_2 - m_1}{m_0} \right] \times 100\%$$

Gdje je m_0 masa (g) uzorka, m_1 masa (g) prazne aluminijske posudice, m_2 masa (g) aluminijske posudice s uzorkom nakon sušenja u sušioniku na $130 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Suha tvar predstavlja udio mineralnog ostatka, bjelančevina, masti i ugljikohidrata. Kako bismo dobili udio suhe tvari u uzorku potrebno je od 100% oduzeti udio određene vode i time dobivamo rezultat za količinu suhe tvari.

3.2.6 Određivanje pepela spaljivanjem

U izvaganu keramičku zdjelicu odvagane se $2,000 \pm 0,0500 \text{ g}$ homogeniziranog uzorka mlijeka nakon čega slijedi spaljivanje u muflonovoj peći na $550 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 18 sati. Nakon spaljivanja keramičke zdjelice s ostatkom pepela, pohranjuju se u eksikator na hlađenje tijekom 45 minuta. Ohlađeni pepeo potrebno je izvagati, a na temelju razlika između mase uzorka prije i mase uzorka nakon spaljivanja izračunava se maseni udio pepela ($\% = \text{g}/100\text{g}$).

3.2.7 Određivanje ukupnog sadržaja masti u mlijeku prema Gerhart-u

Da bi odredili količinu masti u uzorku potrebno je odvagati $2,000 \pm 0,0500 \text{ g}$ homogeniziranog uzorka mlijeka u kapsulu koja se umetne u sustav za hidrolizu te se

doda 4 N kloridna kiselina. Hidroliza traje oko 1 sat, nakon čega se sustav ispire vodom do neutralnog pH. Kapsula se suši oko 3 sata na 103 °C, dodaje se 150 mL petroletera, te se pokreće program u sustavu za ekstrakciju, a ekstrahirana mast stavlja se u sušionik 30 minuta na 103 °C kako bi se uklonilo preostalo otapalo. Kada se čaša ohladi ista se važe te se na temelju razlike u masi čaše za ekstrakciju prije postupka i čaše za ekstrakciju nakon postupka izračunava maseni udio masti (%= g/100g) u uzorku. Navedena metoda je validirana (Tablica 8) i akreditirana prema normi HRN EN ISO 1735:2008 [181].

Tablica 8. Parametri validacije, kriterija prihvatljivosti i dobivenih vrijednosti za određivanje masti

Parametar	Kriterij prihvatljivosti	Rezultati
Ponovljivost	RSD ≤ 5,7% jaja	0,47%
	RSD ≤ 5,7% ajvar	0,95%
	RSD ≤ 5,7% mljeveno meso	2,12%
Međupreciznost	RSD ≤ 5,7% jaja	0,34%
	RSD ≤ 5,7% ajvar	0,53%
	RSD ≤ 5,7% mljeveno meso	1,62%
Točnost	Iskorištenje = 95-105%	99,6%

RSD - relativna standardna devijacija

3.2.8 Određivanje količine dušika (bjelančevina) metodom po Kjeldahlu

Prilikom određivanja dušika u mliječnim proizvodima potrebno je izvagati 1,000 g homogeniziranog uzorka u celofanski tuljčić koji se ubaci u Kjeldahlovu cijev volumena 250 mL, te se dodaje 1 tableta katalizatora i 12 mL 99% koncentrirane sulfatne kiseline. Proces razgradnje na bloku za razgradnju traje 2 sata pri temperaturi od 420 °C, uzorak se smatra razgrađenim kada tekućina koja ostane u kiveti poprimi plavo-zelenu boju

bez crnih ostataka. Kada proces razgradnje završi uzorci se stavljaju na hlađenje gdje se nakon hlađenja kreće u proces titracije na titracijskom aparatu Kjeldahl. Postupak titracije za pojedini uzorak traje otprilike 5 minuta prilikom čega se koriste boratna otopina, titracijska otopina pripremljena od brom krezola i metil oranža i 40% NaOH. Nakon završetka procesa, na ekranu aparata prikazuje se maseni udio dušika (%= g/100g) u uzorku. Dobivene vrijednosti za dušik množe s faktorom za mliječne uzorke koji iznosi 6,38 a dobivena vrijednost umnoška masenog udjela dušika u uzorku te pripadajućeg faktora, predstavlja udio bjelančevina u analiziranom uzorku. Proces određivanja bjelančevina provodi se prema Normi HRN EN ISO 8968- 1:2014 [182], te je u laboratoriju akreditirana sukladno Normi HRN EN ISO/ IEC 17025 [183]. Parametri validacije i kriteriji prihvatljivosti opisane metode za određivanje bjelančevina prikazani su u (Tablica 9).

Tablica 9. Parametri validacije, kriterija prihvatljivosti i dobivenih vrijednosti za određivanje bjelančevina

Parametar	Kriterij prihvatljivosti	Rezultati
Ponovljivost	RSD $\leq$ 5,7% mlijeko	1,11%
	RSD $\leq$ 5,7% džem	3,85%
	RSD $\leq$ 5,7% kulenova seka	0,68%
Međupreciznost	RSD $\leq$ 5,7% jaja	0,96%
	RSD $\leq$ 5,7% ajvar	3,20%
	RSD $\leq$ 5,7% mljeveno meso	0,66%
Točnost	Iskorištenje = 95-105%	102,3%

RSD - relativna standardardna devijacija

3.2.9 Određivanje ukupnih ugljikohidrata

Određivanje ukupnih ugljikohidrata provodi se računski, na osnovu dobivenih vrijednosti za količinu suhe tvari, bjelančevina, masti i pepela. Od 100% vrijednosti oduzimaju se određeni udjeli prethodno navedenih parametara (suhe tvari, bjelančevina, masti i pepela) gdje dobivena razlika predstavlja udio ugljikohidrata.

Udio ukupnih ugljikohidrata izražava se u postotku (%):

Udio ugljikohidrata (%) = 100 (%) - [udio suhe tvari (%) + udio pepela (%) + udio masti (%) + udio bjelančevina (%)]

Račun se provodi prema radnoj uputi RU-31-054 za određivanje ugljikohidrata, energije i soli računski, NZZJZ „Dr. Andrija Štampar“ [184].

3.2.10 Izračun energetske vrijednosti

Izračun energetske vrijednosti dobivamo umnoškom Atwaterovih faktora. Koje kod izračunavanja primjenjujemo na načina da dobiveni udio ugljikohidrata pomnožimo sa Atwaterovih faktorom koji za ugljikohidrate i bjelančevine iznosi četiri, dok za udio masti iznosi devet. Energetska vrijednost ili kalorijska vrijednost izražava se mjernom jedinicom (kcal), a određivana je prema radnoj uputi RU-31-054 za određivanje ugljikohidrata, energije i soli računski, NZZJZ „Dr. Andrija Štampar“ [184].

Prikaz formule izračuna energetske vrijednosti:

Energetska vrijednost (kcal) = 4 x udio ugljikohidrata (%) + 4 x udio bjelančevine (%) + 9 udio masti (%).

3.2.11 Određivanje fruktoze, glukoze, saharoze i laktoze

U odmjernu tikvicu od 50 mL odvaži se $5,000 \pm 0,050$ g homogeniziranog uzorka mlijeka u koju se dodaje 25 mL redestilirane vode. 15 minuta se uzorak miješa na magnetskoj miješalici nakon miješanja uzorak se do oznake nadopuni ACN, zatim se profiltrira kroz 0,45 µm filter u bočicu za automatski uzorkivač, tako pripremljeni uzorak

se injektira u prethodno pripremljeni instrument za kromatografsku analizu, u (Tablica 10) prikazani su uvjeti analize uzorka na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti (HPLC). Kvalifikacija dobivenih rezultata (fruktoze, glukoze, saharoze i laktoze) određivala se prema formuli: Količine dobivenih vrijednosti šećera (laktoze), određivane su prema formuli gdje se koncentracija šećera (ω) izračunava tako da se masena koncentracija (γ) pomnoži s volumenom razrjeđenja (V), a zatim rezultat podijeli s masom uzorka (m).

$$\omega = \frac{\gamma \times V}{m}$$

Tablica 10. Uvjeti rada tekućinskog kromatografa (HPLC) za određivanje fruktoze, glukoze, saharoze i laktoze

Naziv mjernog parametra	Vrijednost
Mobilna faza	Acetonitril : voda (75:25 V/V)
Protok mobilne faze	0,6 mL min ⁻¹
Temperatura	40°C
Detektor	RI detektor
Volumen analiziranog uzorka	Konstantan – 20 µL
Vrijeme eluiranja	30 minuta
Kolona	Shodex Asahipak-NH ₂ P, 250 x 4,5 mm, 5µL

3.2.12 Određivanje vitamina A, D, E i K tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

U pripremi uzorka za analizu vitamina kao ekstrakcijsko otapalo koristi se etanol (EtOH) s butil hidroksi tolueom (BHT), BHT je antioksidans koji se u ekstrakcijsko otapalo dodaje kao bi se spriječila moguća oksidacija vitamina. U 100 mL etanola dodamo i otopimo 0,025 g butil hidroksi tolueo (BHT), u plastičnu kivetu od 70 mL otpipetira se 1 mL mlijeka dodaje se 500 µl EtOH + (BHT), uzorak se homogenizira na Vortexu 1 min, nakon čega se uzorak radi dodatne homogenizacije stavlja u ultrazvučnu vodenu kupelj na 10 min. Nakon završenog procesa homogenizacije u

uzorak dodajemo 4 mL destilirane vode i 10 mL heksana s 0,025% BHT. Heksan je prethodno pripremljen tako da se u 100 mL doda 0,025 g BHT. Kivetu s uzorkom i otapalom obloži se u aluminijskom folijom te stavlja na tresilicu 30 minuta. Nakon 30 minuta kiveta s uzorkom stavlja se u centrifugiranja na 3400 okretaja/10 minuta. Iz uzorka se nakon centrifuge pipetom u epruvetu prenosi 5 mL odvojenog heksansanskog sloja, preneseni heksanski sloj uparava se u struji dušika na 40°C. Resuspenzija uzorka provodi se s 250 µL ACN : MeOH (75:25). U tako pripremljenom uzorku provodi se identifikacija i kvantifikacija vitamina koristeći HPLC tehniku, tražene parametre snimamo prema uvjetima prikazanim u (Tablica 11). Količine dobivenih vrijednosti vitamina, određivane su prema formuli gdje se koncentracija vitamina (ω) izračunava tako da se masena koncentracija (γ) pomnoži s volumenom razrjeđenja (V), a zatim rezultat podijeli s masom uzorka (m).

$$\omega = \frac{\gamma \times V}{m}$$

Tablica 11. Uvjeti rada tekućinskog kromatografa (HPLC) za određivanje vitamina

Naziv mjernog parametra	Vrijednost
Mobilna faza	H ₂ O : MeOH (20 : 80 V/V)
Temperatura	40 °C
Detektor	UV-265 nm
Volumen uzorka	50 µL
Kolona	Feni-heksil 150 x 4,6 mm; 5 µm

3.2.13 Određivanje fosfora spektrofotometrijski

U keramičku zdjelicu otpipetira se 5 mL mlijeka te se uzorak suši pod UV - infracrvenom lampom oko 1 h. Nakon sušenja pod UV lampom uzorak se spaljuje u mufolnoj peći na 550°C oko 3 sata. Keramička zdjelica iz ohlađene peći vadi se u eksikator i hladi još 30 minuta. U ohlađenu zdjelicu s uzorkom dodaje se 5 mL HCl 1:2 (HCl:voda), te se kuha na vodenoj kupelji 30 minuta poklopljeno satnim stakalcem. Nakon toga uzorak iz zdjelice se filtrira u odmjernu tikvicu od 250 mL, ispire se s

destiliranom vodom, a tikvica se nadopuni do oznake. Iz odmjerne tikvice od 250 mL uzimamo pipetom od 5 mL alikvot koji prenosimo u odmjernu tikvicu od 100 mL u koju se dodaje nakon alikvota dodajemo 5 mL amonijevog molibdata $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$, 5 mL hidrokinona ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$) i 5 mL natrijevog sulfita (Na_2SO_3), tikvica se do oznake nadopuni s destiliranom vodom. Tikvica sa pripremljenim uzorkom ostaje 60 minuta na sobnoj temperaturi, te u tom vremenu mora doći do razvijanja plave boje. Iz odmjerne tikvice uzorak odpipetiramo u kvarcne kivete koje koristimo za spektrofotometrijsko mjerenje apsorbancija na 650 nm na UV-VIS spektrofotometru Lambda 35 (Perkin Elmer, SAD).

Jednadžba za izračun količine fosfora u analiziranom uzorku

$$C = \frac{c(\text{fosfora}) \frac{g}{mL} \times 100 \text{ mL} \times 50 \times 2,289}{m(g)}$$

Gdje C prikazuje konačnu koncentraciju fosfora izraženog kao P_2O_5 , c prikazuje koncentraciju dobivenog fosfora očitane absorbancije, 100 mL zadnji volumen uzorka, 50 razrijeđene uzorka, a 2,289 faktor preračunavanja.

3.2.14 Vezivanje mikronutrijenata pomoću BMK

Suspenzije BMK, za žive stanice 10^6 CFU mL^{-1} a za mrtve 1 mg biomase/mL koja je termički tretirana, nacijepljene su u 5 mL mlijeka za svaki uzorak koji je uzet u postupak. U isti uzorak dodani su i standardi traženih mikronutrijenata Ca, Mg, Na, K, za svaki nutrijent korištena je koncentracija 1000 mg L^{-1}

Nacijepljeni uzorci inkubiraju se na temperaturi od 4°C , centrifugiraju se u centrifugi pri 3000 rpm/20 min u nultom, drugom, četvrtom i dvadesetčetvrtom satu te se nakon centrifuge ispiru deioniziranom vodom. Tako pripremljeni supernatant skupljen nakon centrifuge i ispiranja spreman je za analizu ne vezanog Ca, Mg, Na i K, ICP-MS tehnikom

3.2.15 Vezivanje mikronutrijenata pomoću beta-glukana iz kvasca i beta-glukana iz zobi

Komercijalni beta-glukan iz kvasca i beta-glukan iz zobi pripremljen u koncentracijama 0,005% i 0,01% dodan je u 5 mL uzorka mlijeka te je u svaki uzorak uz beta-glukan dodan standard mikronutrijenta u koncentraciji 1000 mg L⁻¹ Ca, Mg, K, Na. Uzorci su inkubirani 24 sata na 4 °C, centrifugiraju se pri 3000 rpm/20 min u nultom, drugom, četvrtom i dvadesetčetvrtom satu te se nakon centrifugiranja ispiru deioniziranom vodom. Tako pripremljeni supernatant skupljen nakon centrifuge i ispiranja spreman je za analizu ne vezanog Ca, Mg, Na i K ICP-MS tehnikom.

3.2.16 Određivanje kalcija, kalija, natrija, magnezija vezanim sustavom inudktivno spregnute plazme i spektrometrije masa (ICP-MS)

Odvaže se 5 mL homogeniziranog uzorka mlijeka u teflonsku kivetu namijenjenu za mikrovalnu digestiju, zatim se dodaje 3 mL koncentrirane nitratne kiseline i 1 mL 30%-tnog vodikovog peroksida. Kiveta se stavlja u bubanj za mikrovalnu digestiju. Digestija uzorka odvija se pri tlaku od 180 bara, na 200°C u trajanju od 45 minuta, nakon završene digestije bubanj s kivetama hladimo minimalno 60 minuta. Nakon hlađenja, otopina se profiltrira odmjernu tikvicu od 20 mL koja se nadopuni do oznake deioniziranom vodom. Tako pripremljen uzorak pogodan je za snimanje na ICP-MS uređaju. Otopina uzorka se s pomoću peristaltičke pumpe uvodi u raspršivač (nebulizer), gdje se raspršuje s pomoću struje argona, koji služi kao plin nosioc. Formira se aerosol, koji prolazi kroz komoru za raspršivanje (*spray chamber*) čija je temperatura regulirana Peltier uređajem. U komori se kolizijom uklanjaju veće kapljice uzorka. Manje kapljice uzorka ulaze direktno u cijev horizontalno postavljene baklje instrumenta (*torch*). Zahvaljujući jako visokoj temperaturi plazme, koja može rasti do 10 000 K, kapljice aerosola prolaze faze desolvatacije, isparavanja, atomizacije i konačno ionizacije kojom se uklanja po jedan elektron svakog atoma. Pozitivno nabijeni ioni proizvedeni u plazmi uvode se u vakuum sustav s pomoću konusa (*sample i skimmer cone*). Leće (*lenses*) fokusiraju ione u maseni analizator (kvadrupol) gdje se razdvajaju na temelju omjera mase i naboja (m/z), a detektiraju se s pomoću multiplikatora elektrona (*electron multiplier*) (ICP-MS, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, *Agilent Technologies*) shematski prikaz rada ICP-MS uređaja vidljiv je na (Slika 5) [185].

Metali su identificirani i kvantificirani na uređaju induktivno spregnute plazme s masenim detektorom (ICP-MS, engl. *Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*) (Slika 6). Metoda je validirana i akreditirana, SOP 298-053 [186] čime je dokazana njena prihvatljivost za navedena ispitivanja (Tablica 12).

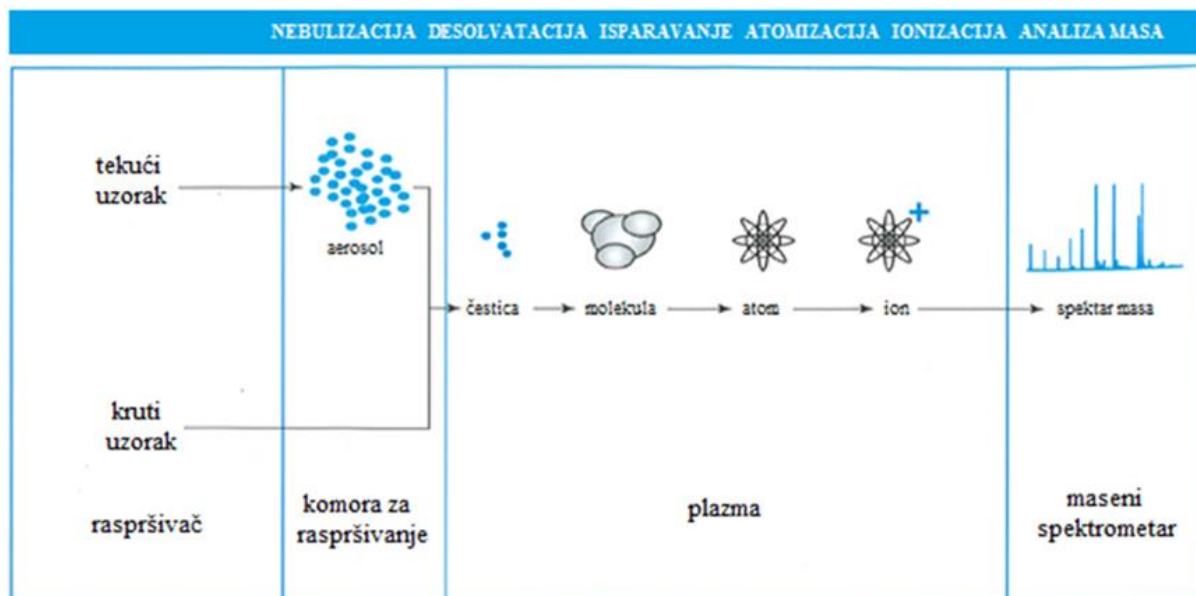
Kvantifikacija metala računata je prema jednadžbi:

$$\omega = \frac{\gamma \times V}{m}$$

Tablica 12. Uvjeti rada instrumenta ICP-MS

Naziv mjernog parametra	Vrijednost
Injektor	Kvarcni
Konusni	Nikal
Raspršivač	MicroMist
Rf-snaga	1180 W
Protok plina plazme	15,0 L min ⁻¹
Protok plina raspršivača	1,07 L min ⁻¹
Protok pomoćnog plina	0,90 L min ⁻¹
Vrijeme integriranja	1000 ms
Točke po piku	100
Broj replika	5
Vrijeme odgode	30 s
Vrijeme ispiranja	70 s

Slika 5. Shematski prikaz procesa u ICP-MS instrumentu od uvođenja uzorka do analize masa



Izvor: Radna uputa proizvođača ICP-MS, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Agilent Technologies[185]

Slika 6. Uređaj induktivno spregnute plazme s masenim detektorom (ICP-MS 7800) proizvođača Agilent



Izvor: Privatna zbirka fotografija NZJZ „Dr. Andrija Štampar“

3.3 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička je obrada rezultata izvršena uz pomoć Open Statistical Software, programskog jezika Jamovi i programa jamovi [187,188].

Statistička analiza provedena je za sve analitičke parametre koji su bili predmet istraživanja ovog doktorskog rada. Sveukupno je analizirano i statistički obrađeno 18 analitičkih parametara: natrij, magnezij, kalij, kalcij, fosfor, vitamin D, vitamin E, vitamin A, AFM1, energija izražena kJ, energija izražena u kcal, masti, ugljikohidrati, šećeri, bjelančevine, voda, suha tvar, pepeo). Cilj statističke obrade podataka bio je utvrditi da li navedeni parametri ovise statistički značajno o vremenu inkubacije (0, 2, 4, 24 sata) i/ili o vrsti korištenih mikofiksatora (beta-glukan iz kvasca (0,005% i 0,01%), beta-glukan iz zobi (0,005% i 0,01%) te mrtve i žive BMK).

Nastavno na navedeno, postavlja se i pitanje, pokazuje li se usporedbom svih 18 analiziranih parametara, povezanosti između vremena vezivanja i vrste mikofiksatora koji optimalno smanjuje koncentraciju mikotoksina, a istovremeno ne utječe na kvalitetu mlijeka, odnosno na uklanjanje nutritivnih sastojaka iz mlijeka.

U svrhu vizualizacije statističkih rezultata, izrađeno je ukupno 18 grafikona koji prikazuju zasebne rezultate svakog od ispitivanih analitičkih parametara u kojima je prikazana koncentracija odnosno sadržaj mjenog sastojka ovisno o vremenu vezivanja za svih 6 mikofiksatora. Stupci pogreške predstavljaju konfidencijske intervale od 95%. Gdje se konfidencijski intervali ne preklapaju razlika je statistički značajna (razina značajnosti $\alpha=0,05$). Točkastom vodoravnom linijom ucrtana je referentna vrijednost analitičkog parametra.

Budući da je u istraživanje uključeno više faktora, analitičke parametre smo statistički analizirali linearnim miješanim modelom (linear mixed model). Model je primijenjen za svaki izmjereni analitički parametar posebno. Pri tome je koncentracija odnosno sadržaj izmjerenog parametra ovisna varijabla, a vrijeme vezivanja i vrsta mikofiksatora su fiksni faktori. Kako je svako mjerenje izvršeno na 15 uzoraka, a uzorci se mogu međusobno blago razlikovati u pogledu sadržaja

mjernih parametara, uzorci su u miješanom modelu definirani kao slučajni faktor (*random factor*). Rezultat modela prikazuje u kojoj mjeri fiksni faktori objašnjavaju ovisnu varijablu i koliko slučajni faktor utječe na preostalu varijancu (*variance*). *Post-hoc testom* uz *Tukeyev-u* korekciju utvrđene su p-vrijednosti za usporedbu svih vremena vezivanja i mikofiksatora, te njihovih kombinacija u pogledu srednje vrijednosti izmjerenog parametra. Kod p-vrijednosti manje od 0,05 ($<0,05$) smatramo da se srednje vrijednosti izmjerenog parametra statistički značajno razlikuju.

4 REZULTATI

Za potrebe ekperimentalnog rada, analizirano je 15 uzoraka mlijeka, a svaki uzorak mjeran je u triplikatu što ukupno iznosi 45 uzoraka, a svki od njih je analiziran na 18 parametara. Rezultati su prikazani tablicama od 13 do 56 te slikama od 7 do 23.

4.1. REZULTATI VEZIVANJA AFM1 SA ODABRANIM MIKOFIKSATORIMA

Tablica 13. Prikaz vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zob i ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Konc. %	Vrijeme/ sat	Min $\mu\text{g L}^{-1}$	Max $\mu\text{g L}^{-1}$	SV $\pm$ SD $\mu\text{g L}^{-1}$	% Vezanog AFM1	Konc. AFM1 u kont.uzorku
β - glukan kvasac	0,005	0 h	0,051	0,054	0,052 $\pm$ 0,04	89,6	<LOQ
β - glukan kvasac	0,01	0 h	0,044	0,047	0,045 $\pm$ 0,04	91,0	<LOQ
β - glukan zob	0,005	0 h	0,044	0,057	0,046 $\pm$ 0,04	90,8	<LOQ
β - glukan zob	0,01	0 h	0,037	0,042	0,039 $\pm$ 0,04	92,2	<LOQ
β - glukan kvasac	0,005	2 h	0,041	0,046	0,043 $\pm$ 0,04	91,4	<LOQ
β - glukan kvasac	0,01	2 h	0,040	0,047	0,045 $\pm$ 0,04	91,0	<LOQ
β - glukan zob	0,005	2 h	0,040	0,051	0,049 $\pm$ 0,04	90,2	<LOQ
β - glukan zob	0,01	2 h	0,038	0,042	0,040 $\pm$ 0,04	92,0	<LOQ
β - glukan kvasac	0,005	4 h	0,049	0,053	0,051 $\pm$ 0,04	89,8	<LOQ
β - glukan kvasac	0,01	4 h	0,046	0,049	0,047 $\pm$ 0,04	90,6	<LOQ
β - glukan zob	0,005	4 h	0,037	0,049	0,047 $\pm$ 0,04	90,6	<LOQ
β - glukan zob	0,01	4 h	0,021	0,370	0,036 $\pm$ 0,04	92,8	<LOQ
β - glukan kvasac	0,005	24 h	0,049	0,055	0,052 $\pm$ 0,04	89,6	<LOQ
β - glukan kvasac	0,01	24 h	0,048	0,055	0,051 $\pm$ 0,04	89,8	<LOQ
β - glukan zob	0,005	24 h	0,043	0,047	0,045 $\pm$ 0,04	91,0	<LOQ
β - glukan zob	0,01	24 h	0,037	0,040	0,038 $\pm$ 0,04	92,4	<LOQ

Konc. = koncentracija; Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanog AFM1;

SD = standardna devijacija; Kont.uzorak = kontrolni uzorak mlijeka 2,8% m.m.

Tablica. 14 Prikaz vezivanja **AFM1** u mlijeku mikofiksatorima BMK-žive i BMK-mrtve ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Vrijeme/ sat	Min $\mu\text{g L}^{-1}$	Max $\mu\text{g L}^{-1}$	SV $\pm$ SD $\mu\text{g L}^{-1}$	% Vezanog AFM1	Konc. AFM1 u kont.uzorku
BMK ŽIVE	0 h	0,02	0,029	0,024 $\pm$ 0,019	95,2	<LOQ
BMK MRTVE	0 h	0,043	0,06	0,046 $\pm$ 0,019	90,8	<LOQ
BMK ŽIVE	2 h	0,043	0,053	0,047 $\pm$ 0,019	90,6	<LOQ
BMK MRTVE	2 h	0,042	0,046	0,043 $\pm$ 0,019	91,4	<LOQ
BMK ŽIVE	4 h	0,029	0,04	0,034 $\pm$ 0,019	93,2	<LOQ
BMK MRTVE	4 h	0,041	0,72	0,087 $\pm$ 0,019	82,6	<LOQ
BMK ŽIVE	24 h	0,051	0,1	0,063 $\pm$ 0,019	87,4	<LOQ
BMK MRTVE	24 h	0,03	0,5	0,056 $\pm$ 0,019	88,8	<LOQ

Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanog AFM1; SD = standardna devijacija; Kont.uzorak = kontrolni uzorak mlijeka 2,8% m.m.; BMK za žive 10^6 CFU mL⁻¹; BMK mrtve 1 mg biomase/mL

4.2 REZULTATI UTJECAJA VEZIVANJA AFM1 SA ODABRANIM MIKOFIKSATORIMA NA NUTRITIVNI SASTAV MLIJEKA I ENERGETSKU VRIJEDNOST

Tablica 15. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobu na količinu **bjelančevina** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Konc. %	Vrijeme/ sat	Min g/100g	Max g/100g	SV±SD g/100g	(%) ne vezanih bjelančevina
β- glukan kvasac	0,005	0 h	3,23	3,73	3,50±0,023	102,9
β- glukan kvasac	0,01	0 h	3,78	4,02	3,41±0,023	100,3
β- glukan zob	0,005	0 h	3,22	3,74	3,49±0,023	102,6
β- glukan zob	0,01	0 h	3,22	3,74	3,48±0,023	102,4
β- glukan kvasac	0,005	2 h	3,22	3,75	3,48±0,023	102,4
β- glukan kvasac	0,01	2 h	3,23	3,72	3,47±0,023	102,1
β- glukan zob	0,005	2 h	3,22	3,74	3,48±0,023	102,4
β- glukan zob	0,01	2 h	3,25	3,75	3,52±0,023	103,5
β- glukan kvasac	0,005	4 h	3,23	3,74	3,49±0,023	102,6
β- glukan kvasac	0,01	4 h	3,23	3,74	3,47±0,023	102,1
β- glukan zob	0,005	4 h	3,22	3,74	3,47±0,023	102,1
β- glukan zob	0,01	4 h	3,32	3,74	3,50±0,023	102,9
β- glukan kvasac	0,005	24 h	3,23	3,74	3,48±0,023	102,4
β- glukan kvasac	0,01	24 h	3,22	3,74	3,51±0,023	103,2
β- glukan zob	0,005	24 h	3,23	3,72	3,47±0,023	102,1
β- glukan zob	0,01	24 h	3,22	3,72	3,47±0,023	102,1
Količina bjelančevina u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 3,4 g/100g i nije se mijenjala tijekom tretmana.						

Konc. = koncentracija; Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanih bjelančevina; SD = standardna devijacija;

Tablica 16. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na količinu **bjelančevina** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Vrijeme /sat	Min g/100g	Max g/100g	SV±SD g/100g	(%) ne vezanih bjelančevina
BMK ŽIVE	0 h	3,23	3,75	3,48±0,02	102,4
BMK MRTVE	0 h	3,22	3,71	3,45±0,02	101,5
BMK ŽIVE	2 h	3,23	3,75	3,50±0,02	102,9
BMK MRTVE	2 h	3,22	3,74	3,44±0,02	101,2
BMK ŽIVE	4 h	3,23	3,74	3,49±0,02	102,6
BMK MRTVE	4 h	3,23	3,75	3,50±0,02	102,9
BMK ŽIVE	24 h	3,24	3,74	3,48±0,02	102,4
BMK MRTVE	24 h	3,24	3,75	3,51±0,02	103,2
Količina bjelančevina u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 3,4 g/100g i nije se mijenjala tijekom tretmana.					

Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanih bjelančevina; SD= standardna devijacija; BMK za žive 10⁶ CFU mL⁻¹; BMK mrtve 1 mg biomase/mL

Tablica 17. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobi na količinu **masti** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Konc. %	Vrijeme /sat	Min g/100g	Max g/100g	SV±SD g/100g	(%) ne vezanih masti
β- glukan kvasac	0,005	0 h	1,74	3,01	2,37 ± 0,04	86,8
β- glukan kvasac	0,01	0 h	1,89	2,90	2,35 ± 0,04	86,1
β- glukan zob	0,005	0 h	2,02	2,89	2,39 ± 0,04	87,5
β- glukan zob	0,01	0 h	1,99	2,89	2,44 ± 0,04	89,4
β- glukan kvasac	0,005	2 h	1,90	2,86	2,37 ± 0,04	86,8
β- glukan kvasac	0,01	2 h	1,90	2,87	2,34 ± 0,04	85,7
β- glukan zob	0,005	2 h	1,95	2,89	2,48 ± 0,04	90,8
β- glukan zob	0,01	2 h	1,90	2,88	2,40 ± 0,04	87,9
β- glukan kvasac	0,005	4 h	1,90	2,87	2,34 ± 0,04	85,7
β- glukan kvasac	0,01	4 h	1,92	2,88	2,33 ± 0,04	85,3
β- glukan zob	0,005	4 h	1,90	2,90	2,39 ± 0,04	87,5
β- glukan zob	0,01	4 h	1,90	2,89	2,40 ± 0,04	87,9
β- glukan kvasac	0,005	24 h	1,89	2,90	2,49 ± 0,04	91,2
β- glukan kvasac	0,01	24 h	1,89	2,81	2,35 ± 0,04	86,1
β- glukan zob	0,005	24 h	2,02	2,89	2,39 ± 0,04	87,5
β- glukan zob	0,01	24 h	2,02	2,89	2,40 ± 0,04	87,9
Količina masti u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 2,73 g/100g i nije se mijenjala tijekom tretmana.						

Konc. = koncentracija; Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanih masti; SD = standardna devijacija;

Tablica 18. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na količinu **masti** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Vrijeme /sat	Min g/100g	Max g/100g	SV±SD g/100g	(%) ne vezanih masti
BMK ŽIVE	0 h	1,90	2,87	2,36 ± 0,04	86,4
BMK MRTVE	0 h	1,90	2,89	2,35 ± 0,04	86,1
BMK ŽIVE	2 h	1,89	2,89	2,30 ± 0,04	84,2
BMK MRTVE	2 h	1,91	2,9	2,37 ± 0,04	86,8
BMK ŽIVE	4 h	1,92	2,89	2,42 ± 0,04	88,6
BMK MRTVE	4 h	2,01	2,87	2,43 ± 0,04	89,0
BMK ŽIVE	24 h	1,90	2,85	2,33 ± 0,04	85,3
BMK MRTVE	24 h	1,91	2,90	2,36 ± 0,04	86,4
Količina masti u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 2,73 g/100g i nije se mijenjala tijekom tretmana.					

Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanih masti; SD = standardna devijacija; BMK za žive 10^6 CFU mL⁻¹; BMK mrtve 1 mg biomase/mL.

Tablica 19. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobu na količinu **ugljikohidrata** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Konc. %	Vrijeme /sat	Min g/100g	Max g/100g	SV±SD g/100	(%) ne vezanih UH
β- glukan kvasac	0,005	0 h	3,37	5,65	4,62±0,083	96,3
β- glukan kvasac	0,01	0 h	2,89	7,99	4,63±0,083	96,5
β- glukan zob	0,005	0 h	3,43	5,61	4,57±0,083	95,2
β- glukan zob	0,01	0 h	3,6	5,63	4,64±0,083	96,7
β- glukan kvasac	0,005	2 h	3,52	5,62	4,47±0,083	93,1
β- glukan kvasac	0,01	2 h	3,31	5,65	4,42±0,083	92,1
β- glukan zob	0,005	2 h	3,5	5,6	4,68±0,083	97,5
β- glukan zob	0,01	2 h	3,1	5,66	4,43±0,083	92,3
β- glukan kvasac	0,005	4 h	3,47	5,56	4,51±0,083	94,0
β- glukan kvasac	0,01	4 h	3,27	5,6	4,52±0,083	94,2
β- glukan zob	0,005	4 h	3,66	5,39	4,60±0,083	95,8
β- glukan zob	0,01	4 h	3,47	5,66	4,48±0,083	93,3
β- glukan kvasac	0,005	24 h	3,54	5,53	4,56±0,083	95,0
β- glukan kvasac	0,01	24 h	3,51	5,36	4,43±0,083	92,3
β- glukan zob	0,005	24 h	3,58	5,43	4,62±0,083	96,3
β- glukan zob	0,01	24 h	3,68	5,47	4,59±0,083	95,6
Količina ugljikohidrata u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 4,8 g/100g i nije se mijenjala tijekom tretmana.						

Konc. = koncentracija; Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanih UH; UH = ugljikohidrati

SD = standardna devijacija;

Tablica 20. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na količinu **ugljikohidrata** u mlijeku o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Vrijeme /sat	Min g/100g	Max g/100g	SV ±SD g/100g	(%) ne vezanih UH
BMK ŽIVE	0 h	3,41	5,57	4,53±0,069	94,4
BMK MRTVE	0 h	3,43	5,53	4,54±0,069	94,6
BMK ŽIVE	2 h	3,67	5,54	4,56±0,069	95,0
BMK MRTVE	2 h	3,24	5,59	4,47±0,069	93,1
BMK ŽIVE	4 h	3,6	5,65	4,47±0,069	93,1
BMK MRTVE	4 h	3,52	5,29	4,34±0,069	90,4
BMK ŽIVE	24h	3,43	5,87	4,53±0,069	94,4
BMK MRTVE	24 h	3,29	5,53	4,51±0,069	94,0
Količina ugljikohidrata u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 4,8 g/100g i nije se mijenjala tijekom tretmana.					

Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanih UH ; UH = ugljikohidrati; SD = standardna devijacija; BMK za žive 10⁶ CFU mL⁻¹; BMK mrtve 1 mg biomase/mL

Tablica 21. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobi na količinu **šećera (laktoze)** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Konc. %	Vrijeme /sat	Min mg L ⁻¹	Max mg L ⁻¹	SV±SD mg L ⁻¹	(%) ne vezanog šećera
β- glukan kvasac	0,005	0 h	3,25	4,48	4,17±0,13	89,4
β- glukan kvasac	0,01	0 h	2,49	4,64	4,14±0,13	88,8
β- glukan zob	0,005	0 h	3,09	4,68	4,32 ±0,13	92,7
β- glukan zob	0,01	0 h	3,05	4,78	4,34±0,13	93,1
β- glukan kvasac	0,005	2 h	3,43	4,84	4,22±0,13	90,5
β- glukan kvasac	0,01	2 h	4,22	4,62	4,46 ±0,13	95,1
β- glukan zob	0,005	2 h	3,32	4,5	4,16±0,13	89,2
β- glukan zob	0,01	2 h	3,34	4,62	4,31±0,13	92,4
β- glukan kvasac	0,005	4 h	3,06	4,37	4,30±0,13	92,2
β- glukan kvasac	0,01	4 h	3,1	4,51	4,22±0,13	90,5
β- glukan zob	0,005	4 h	3,27	4,56	4,38±0,13	93,9
β- glukan zob	0,01	4 h	3,42	4,74	4,35±0,13	93,3
β- glukan kvasac	0,005	24 h	3,3	4,53	4,22±0,13	90,5
β- glukan kvasac	0,01	24 h	3,3	4,39	4,68±0,13	100,4
β- glukan zob	0,005	24 h	3,23	4,78	4,27±0,13	91,6
β- glukan zob	0,01	24 h	3,02	4,55	4,28±0,13	91,8
Količina šećera u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 4,66 mg L ⁻¹ i nije se mijenjala tijekom tretmana.						

Konc. = koncentracija; Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanih šećera; SD = standardna devijacija;

Tablica 22. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na količinu **šećera (laktoze)** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Vrijeme /sat	Min mg L ⁻¹	Max mg L ⁻¹	SV±SD mg L ⁻¹	(%) ne vezanog šećera
BMK ŽIVE	0 h	4,28	4,48	4,36±0,25	93,5
BMK MRTVE	0 h	4,75	4,17	4,94±0,25	106,0
BMK ŽIVE	2 h	4,43	4,95	4,68±0,25	100,3
BMK MRTVE	2 h	4,29	4,51	4,40±0,25	94,4
BMK ŽIVE	4 h	4,68	4,32	4,82±0,25	103,4
BMK MRTVE	4 h	4,26	4,76	4,44±0,25	95,3
BMK ŽIVE	24 h	4,03	4,39	4,27±0,25	91,5
BMK MRTVE	24 h	4,65	4,27	4,83±0,25	103,6
Količina šećera u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 4,66 mg L ⁻¹ i nije se mijenjala tijekom tretmana.					

Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanog šećera; SD = standardna devijacija;

BMK za žive 106 CFU mL⁻¹; BMK mrtve 1 mg biomase/mL

Tablica 23. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zob i na **energiju kJ/100 g** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Konc. %	Vrijeme /sat	Min kJ/100g	Max kJ/100g	SV±SD kJ/100g	% kJ/100g
β- glukan kvasac	0,005	0 h	198,15	232,93	213,58±1,41	89,1
β- glukan kvasac	0,01	0 h	192,36	235,72	212,49±1,41	88,6
β- glukan zob	0,005	0 h	196,76	232,82	213,43±1,41	89,0
β- glukan zob	0,01	0 h	192,76	231,58	213,33±1,41	89,0
β- glukan kvasac	0,005	2 h	198,39	231,85	215,11±1,41	89,7
β- glukan kvasac	0,01	2 h	195,5	231,04	212,1,4131±	88,6
β- glukan zob	0,005	2 h	195,07	227,94	214,57±1,41	89,5
β- glukan zob	0,01	2 h	197,8	235,32	216,47±1,41	90,3
β- glukan kvasac	0,005	4 h	195,33	232,12	214,18±1,41	89,4
β- glukan kvasac	0,01	4 h	195,71	230,59	211,74±1,41	88,3
β- glukan zob	0,005	4 h	194,07	232,18	212,85±1,41	88,8
β- glukan zob	0,01	4 h	196,57	233,00	213,84±1,41	89,2
β- glukan kvasac	0,005	24 h	197,68	231,40	214,94±1,41	89,7
β- glukan kvasac	0,01	24 h	199,02	230,31	216,94±1,41	90,5
β- glukan zob	0,005	24 h	193,94	225,94	214,27±1,41	89,4
β- glukan zob	0,01	24 h	195,67	235,07	214,36±1,41	89,4
Količina energije kJ/100g u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 239,7 kJ/100g i nije se mijenjala tijekom tretmana.						

Konc. = koncentracija; Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost energije kJ/100g; SD = standardna devijacija

Tablica 24. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na **energiju kJ/100 g** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Vrijeme /sat	Min kJ /100g	Max kJ/100g	SV±SD kJ/100g	(%) kJ/100g
BMK ŽIVE	0 h	194,05	231,33	213,29±1,18	88,9
BMK MRTVE	0 h	198,88	226,90	212,17±1,18	88,5
BMK ŽIVE	2 h	195,40	228,88	211,38±1,18	88,1
BMK MRTVE	2 h	199,30	226,33	212,00±1,18	88,4
BMK ŽIVE	4 h	199,45	232,69	214,71±1,18	89,5
BMK MRTVE	4 h	196,45	234,20	213,55±1,18	89,0
BMK ŽIVE	24 h	195,61	229,20	211,32±1,18	88,1
BMK MRTVE	24 h	194,05	231,33	213,29±1,18	88,9
Količina energije kJ/100g u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 239,7 kJ/100g i nije se mijenjala tijekom tretmana.					

Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost energije kJ/100g; SD = standardna devijacija

BMK za žive 10⁶ CFU mL⁻¹; BMK mrtve 1 mg biomase/mL

4.3 REZULTATI UTJECAJA VEZIVANJA AFM1 SA ODABRANIM MIKOFIKSATORIMA NA MIKRONUTRIJENTE U MLIJEKU

Tablica 25. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobi na količinu **kalcija** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Konc. %	Vrijeme /sat	Min mg L ⁻¹	Max mg L ⁻¹	SV±SD mg L ⁻¹	% ne vezanog kalcija
β- glukan kvasac	0,005	0 h	1350,40	1437,47	1397,93±244,65	161,7
β- glukan kvasac	0,01	0 h	1032,40	1297,40	1157,49±244,65	133,9
β- glukan zob	0,005	0 h	839,14	920,93	886,18±244,65	102,5
β- glukan zob	0,01	0 h	1207,32	1393,94	1284,97±244,65	148,6
β- glukan kvasac	0,005	2 h	1379,25	1467,46	1426,56±244,65	165,0
β- glukan kvasac	0,01	2 h	1254,79	1338,23	1294,13±244,65	149,7
β- glukan zob	0,005	2 h	902,30	999,32	957,47±244,65	110,7
β- glukan zob	0,01	2 h	1200,75	1492,50	1347,50±244,65	155,8
β- glukan kvasac	0,005	4 h	846,92	980,30	910,38±244,65	105,3
β- glukan kvasac	0,01	4 h	732,86	852,40	786,32±244,65	90,9
β- glukan zob	0,005	4 h	720,80	857,23	783,29±244,65	90,6
β- glukan zob	0,01	4 h	793,20	954,79	877,64±244,65	101,5
β- glukan kvasac	0,005	24 h	708,13	899,32	802,55±244,65	92,8
β- glukan kvasac	0,01	24 h	1207,40	1299,40	1247,30±244,65	144,3
β- glukan zob	0,005	24 h	1000,20	1099,57	1047,16±244,65	121,1
β- glukan zob	0,01	24 h	690,20	788,81	740,10±244,65	85,6
Količina kalcija u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 864,7 mg L ⁻¹ i nije se mijenjala tijekom tretmana.						

Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanog kalcija; SD = standardna devijacija

Tablica 26. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na količinu **kalcija** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Vrijeme /sat	Min mg L ⁻¹	Max mg L ⁻¹	SV±SD mg L ⁻¹	% Ne vezanog kalcija
BMK ŽIVE	0 h	628,14	1030,95	808,70±48,49	93,5
BMK MRTVE	0 h	668,05	1110,1	899,33±48,49	104,0
BMK ŽIVE	2 h	680,39	1114,65	928,91±48,49	107,4
BMK MRTVE	2 h	645,19	1268,40	906,40±48,49	104,8
BMK ŽIVE	4 h	647,95	1254,14	964,74±48,49	111,6
BMK MRTVE	4 h	643,75	1393,18	955,54±48,49	110,5
BMK ŽIVE	24 h	641,75	1199,40	937,03±48,49	108,4
BMK MRTVE	24 h	605,79	1230,90	906,96±48,49	104,9
Količina kalcija u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 864,7 mg L ⁻¹ i nije se mijenjala tijekom tretmana.					

Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanog kalcija; SD = standardna devijacija; BMK za žive 106 CFU mL⁻¹; BMK mrtve 1 mg biomase/mL

Tablica 27. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobi na količinu **magnezija** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Konc. %	Vrijeme /sat	Min mg L ⁻¹	Max mg L ⁻¹	SV ±SD mg L ⁻¹	(%) ne vezanog Magnezija
β- glukan kvasac	0,005	0 h	70,50	99,17	82,27±6,30	113,3
β- glukan kvasac	0,01	0 h	63,45	86,92	77,09±6,30	106,2
β- glukan zob	0,005	0 h	70,24	82,10	76,17±6,30	104,9
β- glukan zob	0,01	0 h	70,18	79,17	75,66±6,30	104,2
β- glukan kvasac	0,005	2 h	71,23	79,89	74,77±6,30	103,0
β- glukan kvasac	0,01	2 h	66,48	79,91	74,39±6,30	102,5
β- glukan zob	0,005	2 h	72,32	88,26	81,93±6,30	112,8
β- glukan zob	0,01	2 h	62,59	71,24	66,53±6,30	91,6
β- glukan kvasac	0,005	4 h	81,45	89,91	86,22±6,30	118,7
β- glukan kvasac	0,01	4 h	68,89	79,98	74,23±6,30	102,2
β- glukan zob	0,005	4 h	60,20	69,37	65,66±6,30	90,4
β- glukan zob	0,01	4 h	67,20	79,30	73,55±6,30	101,3
β- glukan kvasac	0,005	24 h	67,32	79,48	74,04±6,30	102,0
β- glukan kvasac	0,01	24 h	63,42	83,28	73,27±6,30	100,9
β- glukan zob	0,005	24 h	85,35	96,20	90,01±6,30	124,0
β- glukan zob	0,01	24 h	71,03	81,34	76,94±6,30	106,0
Količina magnezija u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 72,61 mg L ⁻¹ i nije se mijenjala tijekom tretmana.						

Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanog magnezija; SD = standardna devijacija

Tablica 28. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na količinu **magnezija** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Vrijeme /sat	Min mg L ⁻¹	Max mg L ⁻¹	SV±SD mg L ⁻¹	(%) Ne vezanog magnezija
BMK ŽIVE	0 h	60,90	89,27	74,87±13,96	103,1
BMK MRTVE	0 h	65,11	135,52	99,17±13,96	136,6
BMK ŽIVE	2 h	58,56	96,10	77,51±13,96	106,7
BMK MRTVE	2 h	58,35	137,27	95,82±13,96	132,0
BMK ŽIVE	4 h	59,32	86,95	75,81±13,96	104,4
BMK MRTVE	4 h	60,22	88,92	71,37±13,96	98,3
BMK ŽIVE	24 h	55,80	66,11	59,66±13,96	82,2
BMK MRTVE	24 h	90,54	99,40	94,83±13,96	130,6
Količina magnezija u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 72,61 mg L ⁻¹ i nije se mijenjala tijekom tretmana.					

Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanog magnezija; SD = standardna devijacija; BMK za žive 106 CFU mL⁻¹; BMK mrtve 1 mg biomase/mL

Tablica 29. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zob i na količinu **natrija** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Konc. %	Vrijeme/ sat	Min mg L ⁻¹	Max mg L ⁻¹	SV±SD mg L ⁻¹	(%) ne vezanog natrija
β- glukan kvasac	0,005	0 h	249,40	281,75	271,96±42,38	104,1
β- glukan kvasac	0,01	0 h	230,74	279,13	258,91±42,38	99,1
β- glukan zob	0,005	0 h	297,09	388,57	347,24±42,38	133,0
β- glukan zob	0,01	0 h	245,51	284,73	264,46±42,38	101,3
β- glukan kvasac	0,005	2 h	232,89	277,83	253,66±42,38	97,1
β- glukan kvasac	0,01	2 h	240,89	248,35	294,16±42,38	112,6
β- glukan zob	0,005	2 h	254,62	292,30	283,90±42,38	108,7
β- glukan zob	0,01	2 h	220,50	251,50	237,92±42,38	91,1
β- glukan kvasac	0,005	4 h	250,12	358,99	333,75±42,38	127,8
β- glukan kvasac	0,01	4 h	262,85	292,30	277,18±42,38	106,1
β- glukan zob	0,005	4 h	213,45	221,00	216,73±42,38	83,0
β- glukan zob	0,01	4 h	233,62	261,52	248,76±42,38	95,3
β- glukan kvasac	0,005	24 h	325,40	371,40	349,09±42,38	133,7
β- glukan kvasac	0,01	24 h	319,14	398,40	362,46±42,38	138,8
β- glukan zob	0,005	24 h	263,59	289,98	282,89±42,38	108,3
β- glukan zob	0,01	24 h	274,65	298,00	284,42±42,38	108,9
Količina natrija u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 261,13 mg L ⁻¹ i nije se mijenjala tijekom tretmana.						

Min = minimum; Max =maksimumm; SV = srednja vrijednost ne vezanog natrija; RSD = standardna devijacija

Tablica 30. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na količinu **natrija** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Vrijeme/ Sat	Min mg L ⁻¹	Max mg L ⁻¹	SV±SD mg L ⁻¹	(%) ne vezanog natrija
BMK ŽIVE	0 h	224,57	308,38	268,28±36,9	102,7
BMK MRTVE	0 h	262,37	491,46	383,27±36,9	146,8
BMK ŽIVE	2 h	242,59	407,17	327,22±36,9	125,3
BMK MRTVE	2 h	231,94	479,84	358,57±36,9	137,3
BMK ŽIVE	4 h	252,35	456,85	358,82±36,9	137,4
BMK MRTVE	4 h	259,27	447,65	346,16±36,9	132,6
BMK ŽIVE	24 h	234,46	390,19	302,72±36,9	115,9
BMK MRTVE	24 h	244,11	394,27	312,56±36,9	119,7
Količina natrija u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 261,13 mg L ⁻¹ i nije se mijenjala tijekom tretmana.					

Min = minimum; Max = maksimumm; SV = srednja vrijednost ne vezanog natrija; SD = standardna devijacija; BMK za žive 106 CFU mL⁻¹; BMK mrtve1 mg biomase/mL

Tablica 31. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u187 mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobu na količinu **kalija** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Konc. %	Vrijeme/sat	Min mg L ⁻¹	Max mg L ⁻¹	SV±SD mg L ⁻¹	(%) Ne vezanog kalija
β- glukan kvasac	0,005	0 h	1400,20	1536,60	1464,89±181,75	123,2
β- glukan kvasac	0,01	0 h	1170,20	1740,70	1573,65±181,75	132,4
β- glukan zob	0,005	0 h	1120,70	1320,70	1215,03 ±181,75	102,2
β- glukan zob	0,01	0 h	1125,70	1305,05	1215,92 ±181,75	102,3
β- glukan kvasac	0,005	2 h	1405,27	1596,70	1484,26±181,75	124,8
β- glukan kvasac	0,01	2 h	1278,95	1395,40	1340,36±181,75	112,7
β- glukan zob	0,005	2 h	1313,31	1499,85	1405,69±181,75	118,2
β- glukan zob	0,01	2 h	1177,11	1343,80	1253,98±181,75	105,5
β- glukan kvasac	0,005	4 h	739,40	1571,15	1211,36±181,75	101,9
β- glukan kvasac	0,01	4 h	1015,30	1289,90	1126,06±181,75	94,7
β- glukan zob	0,005	4 h	750,97	873,54	797,55 ±181,75	67,1
β- glukan zob	0,01	4 h	1051,00	1288,69	1175,76±181,75	98,9
β- glukan kvasac	0,005	24 h	1010,50	1518,30	1338,75±181,75	112,6
β- glukan kvasac	0,01	24 h	1102,56	1379,30	1240,44±181,75	104,3
β- glukan zob	0,005	24 h	1202,52	1450,80	1337,29±181,75	112,5
β- glukan zob	0,01	24 h	1031,43	1230,34	1116,60±181,75	93,9
Količina kalija u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 1188,86 mg L ⁻¹ i nije se mijenjala tijekom tretmana.						

Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanog kalija; SD = standardna devijacija;

Tablica 32. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na količinu **kalija** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Vrijeme /sat	Min mg L ⁻¹	Max mg L ⁻¹	SV±SD mg L ⁻¹	% Ne vezanog kalija
BMK ŽIVE	0 h	725,88	1234,87	983,75±210,84	82,7
BMK MRTVE	0 h	887,15	2121,07	1512,44±210,84	127,2
BMK ŽIVE	2 h	837,29	2045,10	1408,34±210,84	118,5
BMK MRTVE	2 h	987,34	1859,28	1427,04±210,84	120,0
BMK ŽIVE	4 h	995,31	1297,05	1159,12±210,84	97,5
BMK MRTVE	4 h	997,64	1575,21	1290,48±210,84	108,5
BMK ŽIVE	24 h	667,61	1245,36	976,49±210,84	82,1
BMK MRTVE	24 h	741,56	1421,73	1064,94±210,84	89,6
Količina kalija u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 1188,86 mg L ⁻¹ i nije se mijenjala tijekom tretmana.					

Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanog kalija; SD = standardna devijacija; BMK za žive 106 CFU mL⁻¹; BMK mrtve 1 mg biomase/mL

Tablica 33. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobu na količinu **fosfora** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Konc. %	Vrijeme/ sat	Min mg L ⁻¹	Max mg L ⁻¹	SV±SD mg L ⁻¹	(%) ne vezanog fosfora
β- glukan kvasac	0,005	0 h	717,5	732,3	724,5±190,98	78,5
β- glukan kvasac	0,01	0 h	806,3	820,3	813,2±190,98	88,1
β- glukan zob	0,005	0 h	827,2	853,7	840,4±90,98	91,0
β- glukan zob	0,01	0 h	920,4	948,7	936,1±190,98	101,4
β- glukan kvasac	0,005	2 h	721,5	765,2	746,7±190,98	80,9
β- glukan kvasac	0,01	2 h	885,2	899,1	891,6±190,98	96,5
β- glukan zob	0,005	2 h	975,2	983,2	979,9±190,98	106,1
β- glukan zob	0,01	2 h	1256,6	1284,8	1272,6±190,98	137,8
β- glukan kvasac	0,005	4 h	1175,4	1186,5	1182,7±190,98	128,1
β- glukan kvasac	0,01	4 h	998,5	1080,1	1043,7±190,98	113,0
β- glukan zob	0,005	4 h	1195,0	1225,1	1213,2±190,98	131,4
β- glukan zob	0,01	4 h	1150,2	1189,1	1176,3±190,98	127,4
β- glukan kvasac	0,005	24 h	1109,0	1191,0	1146,5±190,98	124,1
β- glukan kvasac	0,01	24 h	1040,2	1177,6	1151,1±190,98	124,6
β- glukan zob	0,005	24 h	1107,0	1165,6	1141,2±190,98	123,6
β- glukan zob	0,01	24 h	1203,5	1396,2	1317,7±190,98	142,7
Količina fosfora u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 923,59 mg L ⁻¹ i nije se mjenjala tijekom tretmana.						

Konc. = koncentracija; Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanog fosfora; SD = standardna devijacija

Tablica 34. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na količinu **fosfora** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Vrijeme /sat	Min mg L ⁻¹	Max mg L ⁻¹	SV±SD mg L ⁻¹	(%) ne vezanog fosfora
BMK ŽIVE	0 h	1169,3	1182,5	1175,7±211,0	127,3
BMK MRTVE	0 h	1195,3	1234,8	1216,7±211,0	131,7
BMK ŽIVE	2 h	1398,2	1422,0	1410,3±211,0	152,7
BMK MRTVE	2 h	1623,2	1725,4	1677,6±211,0	181,7
BMK ŽIVE	4 h	989,9	1102,6	1043,1±211,0	113,0
BMK MRTVE	4 h	993,1	1175,2	1044,7±211,0	113,1
BMK ŽIVE	24 h	1099,1	1275,3	1142,2±211,0	123,7
BMK MRTVE	24 h	1185,9	1275,8	1228,5±211,0	133,0
Količina fosfora u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 923,50 mg L ⁻¹ i nije se mjenjala tijekom cijelog tretmana					

Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanog fosfora; SD = relativna standardna devijacija; BMK za žive 10⁶ CFU mL⁻¹; BMK mrtve 1 mg biomase/m

4.4 REZULTATI UTJECAJA VEZIVANJA AFM1 SA ODABRANIM MIKOFIKSATORIMA NA VITAMINE TOPIVE U MASTIMA

Tablica 35. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobi na količinu **vitamina A** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Konc. %	Vrijeme /sat	Min µg/100g	Max µg/100g	SV ±SD µg/100g	(%) ne vezanog vitamina A
β- glukan kvasac	0,005	0 h	0,02	0,03	0,02±0,01	100
β- glukan kvasac	0,01	0 h	0,03	0,05	0,03±0,01	150
β- glukan zob	0,005	0 h	0,01	0,03	0,02±0,01	100
β- glukan zob	0,01	0 h	0,02	0,05	0,02±0,01	100
β- glukan kvasac	0,005	2 h	0,02	0,04	0,03±0,01	150
β- glukan kvasac	0,01	2 h	0,01	0,02	0,01±0,01	50
β- glukan zob	0,005	2 h	0,03	0,05	0,04±0,01	200
β- glukan zob	0,01	2 h	0,01	0,06	0,05±0,01	250
β- glukan kvasac	0,005	4 h	0,01	0,03	0,01±0,01	50
β- glukan kvasac	0,01	4 h	0,03	0,05	0,04±0,01	200
β- glukan zob	0,005	4 h	0,02	0,04	0,03±0,01	150
β- glukan zob	0,01	4 h	0,02	0,04	0,03±0,01	150
β- glukan kvasac	0,005	24 h	0,02	0,04	0,03±0,01	150
β- glukan kvasac	0,01	24 h	0,01	0,03	0,02±0,01	100
β- glukan zob	0,005	24 h	0,02	0,04	0,03±0,01	150
β- glukan zob	0,01	24 h	0,02	0,04	0,03±0,01	150
Količina vitamina A u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 0,02 µg/100g i nije se mjenjala tijekom cijelog tretmana						

Konc. = koncentracija; Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanog Vitamina A; SD = relativna standardna devijacija

Tablica 36. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na količinu **vitamina A** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Vrijeme /sat	Min µg/100g	Max µg/100g	SV±SD µg/100g	% ne vezanog vitamina A
BMK ŽIVE	0 h	0,02	0,03	0,02±0,01	100
BMK MRTVE	0 h	0,03	0,05	0,03±0,01	150
BMK ŽIVE	2 h	0,01	0,03	0,02±0,01	100
BMK MRTVE	2 h	0,02	0,05	0,02±0,01	100
BMK ŽIVE	4 h	0,02	0,04	0,03±0,01	150
BMK MRTVE	4 h	0,01	0,02	0,01±0,01	50
BMK ŽIVE	24 h	0,03	0,05	0,04±0,01	200
BMK MRTVE	24 h	0,01	0,05	0,02±0,01	100
Količina vitamina A u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 0,02 µg/100g i nije se mjenjala tijekom cijelog tretmana					

Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanog vitamina A; SD = relativna standardna devijacija; BMK za žive 10^6 CFU mL⁻¹; BMK mrtve 1 mg biomase/mL

Tablica 37. prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i β -glukanom iz zobu na količinu **vitamina D** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Konc. %	Vrijeme /sat	Min μ g/100g	Max μ g/100g	SV $\pm$ SD μ g/100g	(%) ne vezanog vitamina D
β - glukan kvasac	0,005	0 h	0,01	0,05	0,03 $\pm$ 0,01	75,0
β - glukan kvasac	0,01	0 h	0,02	0,05	0,04 $\pm$ 0,01	100,0
β - glukan zob	0,005	0 h	0,01	0,04	0,06 $\pm$ 0,01	150,0
β - glukan zob	0,01	0 h	0,01	0,04	0,02 $\pm$ 0,01	50,0
β - glukan kvasac	0,005	2 h	0,02	0,05	0,03 $\pm$ 0,01	75,0
β - glukan kvasac	0,01	2 h	0,03	0,05	0,04 $\pm$ 0,01	100,0
β - glukan zob	0,005	2 h	0,01	0,04	0,03 $\pm$ 0,01	75,0
β - glukan zob	0,01	2 h	0,02	0,05	0,04 $\pm$ 0,01	100,0
β - glukan kvasac	0,005	4 h	0,02	0,04	0,03 $\pm$ 0,01	75,0
β - glukan kvasac	0,01	4 h	0,01	0,04	0,02 $\pm$ 0,01	50,0
β - glukan zob	0,005	4 h	0,02	0,05	0,04 $\pm$ 0,01	100,0
β - glukan zob	0,01	4 h	0,01	0,05	0,03 $\pm$ 0,01	75,0
β - glukan kvasac	0,005	24 h	0,01	0,05	0,03 $\pm$ 0,01	75,0
β - glukan kvasac	0,01	24 h	0,01	0,05	0,04 $\pm$ 0,01	100,0
β - glukan zob	0,005	24 h	0,02	0,04	0,03 $\pm$ 0,01	75,0
β - glukan zob	0,01	24 h	0,01	0,04	0,02 $\pm$ 0,01	50,0
Količina vitamina D u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 0,04 μ g/100g i nije se mjenjala tijekom cijelog tretmana						

Konc. = koncentracija; Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanog vitamina D; SD = standardna devijacija

Tablica 38. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na količinu **vitamina D** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Vrijeme/ sat	Min μ g/ 100g	Max μ g/ 100g	SV $\pm$ SD μ g/100g	(%) ne vezanog vitamina D
BMK ŽIVE	0 h	0,02	0,05	0,04 $\pm$ 0,01	100,0
BMK MRTVE	0 h	0,02	0,04	0,03 $\pm$ 0,01	75,0
BMK ŽIVE	2 h	0,02	0,04	0,03 $\pm$ 0,01	75,0
BMK MRTVE	2 h	0,02	0,04	0,03 $\pm$ 0,01	75,0
BMK ŽIVE	4 h	0,01	0,03	0,02 $\pm$ 0,01	50,0
BMK MRTVE	4 h	0,02	0,04	0,03 $\pm$ 0,01	75,0
BMK ŽIVE	24 h	0,02	0,04	0,03 $\pm$ 0,01	75,0
BMK MRTVE	24 h	0,03	0,05	0,03 $\pm$ 0,01	75,0
Količina vitamina D u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 0,04 μ g/100g i nije se mjenjala tijekom cijelog tretmana					

Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanog vitamina D; SD = standardna devijacija;

BMK za žive 10^6 CFU mL⁻¹; BMK mrtve 1 mg biomase/mL

Tablica 39. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobi na količinu **vitamina E** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Konc. %	Vrijeme /sat	Min mg/100g	Max mg/100g	SV±SD mg/100g	% ne vezanog vitamina E
β- glukan kvasac	0,005	0 h	0,04	0,07	0,06±0,01	200,0
β- glukan kvasac	0,01	0 h	0,02	0,05	0,04±0,01	133,3
β- glukan zob	0,005	0 h	0,02	0,04	0,04±0,01	133,3
β- glukan zob	0,01	0 h	0,03	0,05	0,04±0,01	133,3
β- glukan kvasac	0,005	2 h	0,02	0,05	0,04±0,01	100,0
β- glukan kvasac	0,01	2 h	0,04	0,07	0,06±0,01	200,0
β- glukan zob	0,005	2 h	0,03	0,05	0,04±0,01	133,3
β- glukan zob	0,01	2 h	0,04	0,06	0,05±0,01	166,7
β- glukan kvasac	0,005	4 h	0,04	0,06	0,06±0,01	200,0
β- glukan kvasac	0,01	4 h	0,03	0,05	0,04±0,01	133,3
β- glukan zob	0,005	4 h	0,03	0,05	0,04±0,01	133,3
β- glukan zob	0,01	4 h	0,03	0,05	0,04±0,01	133,3
β- glukan kvasac	0,005	24 h	0,02	0,05	0,04±0,01	133,3
β- glukan kvasac	0,01	24 h	0,04	0,05	0,04±0,01	133,3
β- glukan zob	0,005	24 h	0,02	0,05	0,04±0,01	133,3
β- glukan zob	0,01	24 h	0,02	0,05	0,04±0,01	133,3
Količina vitamina E u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 0,03 µg/100g i nije se mjenjala tijekom cijelog tretmana						

Konc. = koncentracija; Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanog vitamina E; SD = standardna devijacija

Tablica 40. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatora BMK žive i BMK mrtve na količinu **vitamina E** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Vrijeme /sat	Min mg/100g	Max mg/100g	SV±SD mg/100g	% ne vezanog vitamina E
BMK ŽIVE	0 h	0,02	0,05	0,03±0,01	100,0
BMK MRTVE	0 h	0,04	0,07	0,06±0,01	200,0
BMK ŽIVE	2 h	0,03	0,05	0,04±0,01	133,3
BMK MRTVE	2 h	0,04	0,06	0,05±0,01	166,7
BMK ŽIVE	4 h	0,04	0,06	0,06±0,01	200,0
BMK MRTVE	4 h	0,03	0,05	0,04±0,01	133,3
BMK ŽIVE	24 h	0,03	0,05	0,04±0,01	133,3
BMK MRTVE	24 h	0,03	0,07	0,05±0,01	166,7
Količina vitamina E u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana iznosila je 0,03 µg/100g i nije se mjenjala tijekom cijelog tretmana					

Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanog vitamina E; SD = standardna devijacija;

BMK za žive 106 CFU mL⁻¹; BMK mrtve 1 mg biomase/mL.

Tablica 41. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatora beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobu na količinu **vitamina K** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Mikofiksator	Konc. %	Vrijeme /sat	Min $\mu\text{g}/100\text{g}$	Max $\mu\text{g}/100\text{g}$	SV $\mu\text{g}/100\text{g}$
β - glukan kvasac	0,005	0 h	<0,01	<0,01	<0,01
β - glukan kvasac	0,01	0 h	<0,01	<0,01	<0,01
β - glukan zob	0,005	0 h	<0,01	<0,01	<0,01
β - glukan zob	0,01	0 h	<0,01	<0,01	<0,01
β - glukan kvasac	0,005	2 h	<0,01	<0,01	<0,01
β - glukan kvasac	0,01	2 h	<0,01	<0,01	<0,01
β - glukan zob	0,005	2 h	<0,01	<0,01	<0,01
β - glukan zob	0,01	2 h	<0,01	<0,01	<0,01
β - glukan kvasac	0,005	4 h	<0,01	<0,01	<0,01
β - glukan kvasac	0,01	4 h	<0,01	<0,01	<0,01
β - glukan zob	0,005	4 h	<0,01	<0,01	<0,01
β - glukan zob	0,01	4 h	<0,01	<0,01	<0,01
β - glukan kvasac	0,005	24 h	<0,01	<0,01	<0,01
β - glukan kvasac	0,01	24 h	<0,01	<0,01	<0,01
β - glukan zob	0,005	24 h	<0,01	<0,01	<0,01
β - glukan zob	0,01	24 h	<0,01	<0,01	<0,01

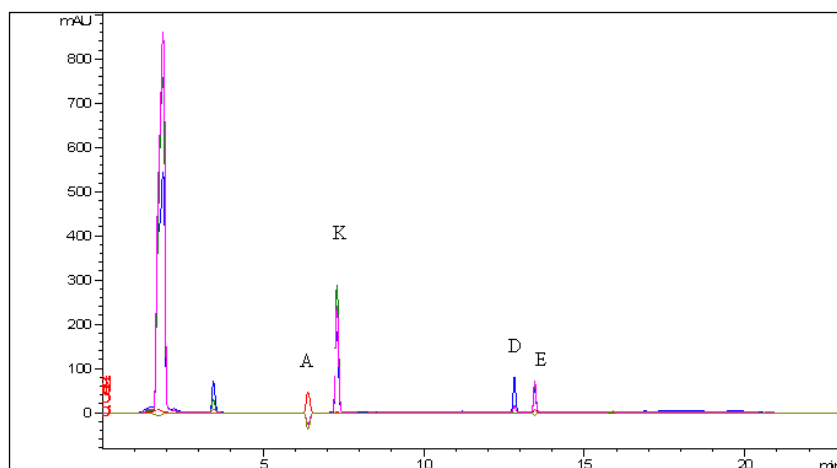
Konc. = koncentracija; Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanog vitamina K

Tablica 42. prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatora BMK žive i BMK mrtve na količinu **vitamina K** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

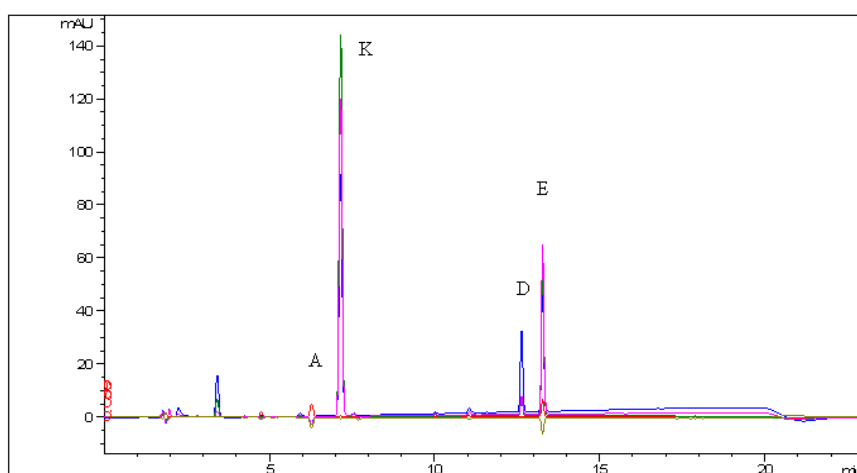
Mikofiksator	Vrijeme/sat	Min $\mu\text{g}/100\text{g}$	Max $\mu\text{g}/100\text{g}$	SV $\mu\text{g}/100\text{g}$
BMK ŽIVE	0 h	<0,01	<0,01	<0,01
BMK MRTVE	0 h	<0,01	<0,01	<0,01
BMK ŽIVE	2 h	<0,01	<0,01	<0,01
BMK MRTVE	2 h	<0,01	<0,01	<0,01
BMK ŽIVE	4 h	<0,01	<0,01	<0,01
BMK MRTVE	4 h	<0,01	<0,01	<0,01
BMK ŽIVE	24 h	<0,01	<0,01	<0,01
BMK MRTVE	24 h	<0,01	<0,01	<0,01

Min = minimum; Max = maksimum; SV = srednja vrijednost ne vezanog vitamina K; BMK za žive 10^6 CFU mL⁻¹; BMK mrtve 1 mg biomase/mL

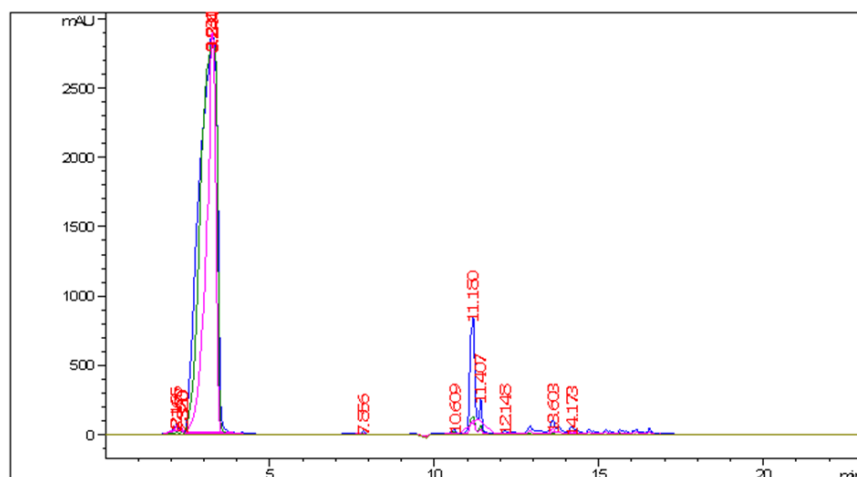
Slika 7. Kromatogramski prikaz uzoraka mlijeka sa standardom Vitamina K



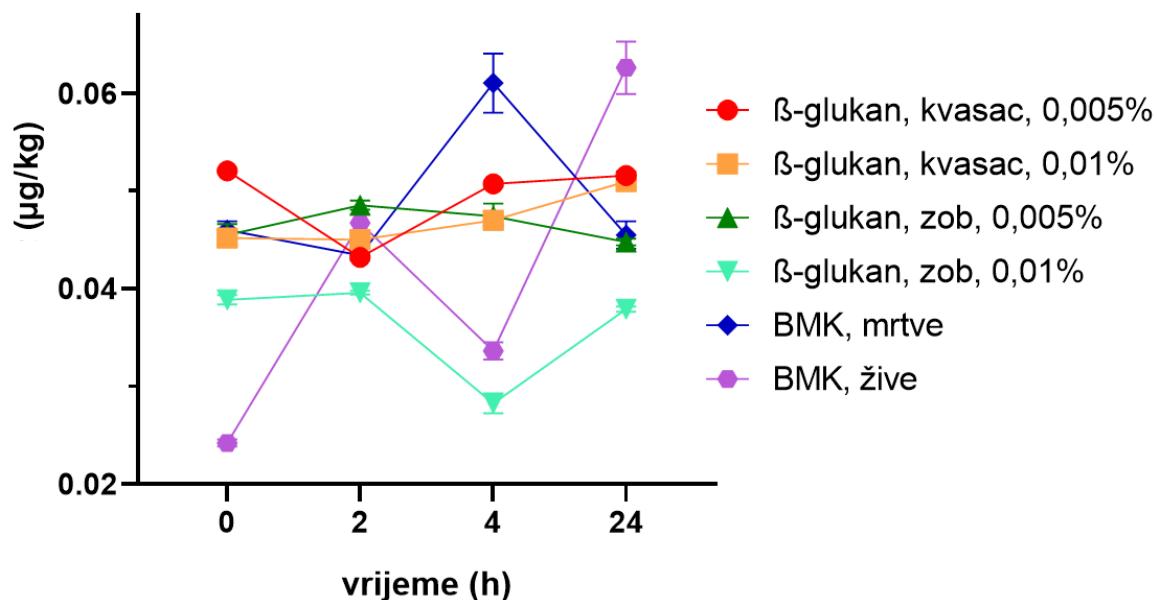
Slika 8. Kromatogramski prikaz standarda Vitamina K



Slika 9. Kromatografski prikaz mlijeka 2,8 % m.m.



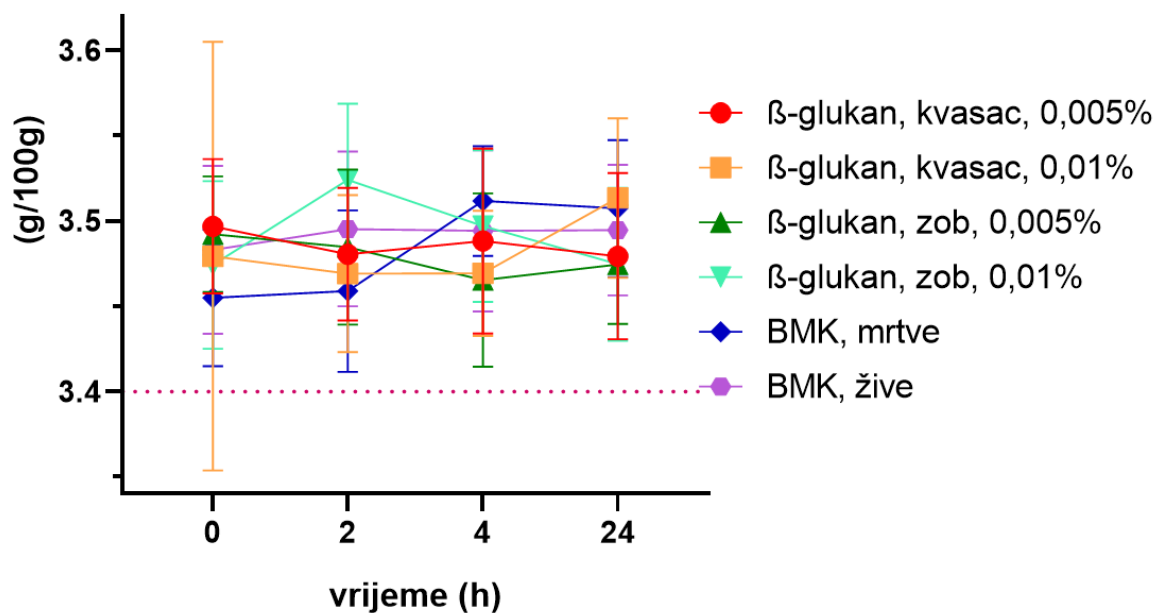
Slika 10. Grafički prikaz vezivanja AFM1 iz mlijeka i odabranih mikofikastora



Tablica 43. Usporedba vezivanja AFM1 i odabranih mikofiksatora u odnosu na vrijeme vezivanja - Post Hoc Test

Usporedba							
vrijeme	vs	vrijeme	razlika	SE	T	df	p _{Tukey}
0	-	2	-0.002450	3.095e-4	-7.9183	322.0	<.00001
0	-	4	-0.002710	3.095e-4	-8.7561	322.0	<.00001
0	-	24	-0.006924	3.095e-4	-22.3762	322.0	<.00001
2	-	4	-2.593e-4	3.095e-4	-0.8378	322.0	0.83642
2	-	24	-0.004474	3.095e-4	-14.4579	322.0	<.00001
4	-	24	-0.004215	3.095e-4	-13.6201	322.0	<.00001

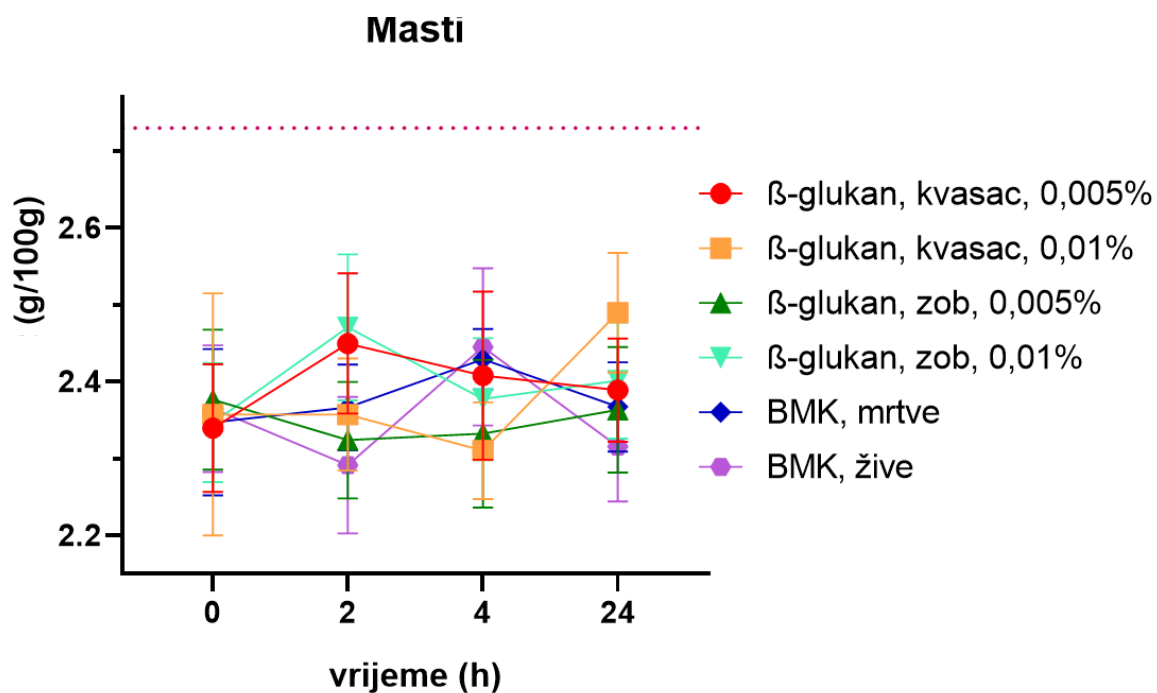
Slika 11. Grafički prikaz vezivanja bjelančevina iz mlijeka i odabranih mikofikastora



Tablica 44. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu bjelačevina u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Usporedba							
vrijeme	vs	vrijeme	razlika	SE	T	df	p _{Tukey}
0	-	2	-0.005333	0.01472	-0.3622	336.0	0.98372
0	-	4	-0.007556	0.01472	-0.5131	336.0	0.95592
0	-	24	-0.010556	0.01472	-0.7169	336.0	0.89035
2	-	4	-0.002222	0.01472	-0.1509	336.0	0.99877
2	-	24	-0.005222	0.01472	-0.3547	336.0	0.98468
4	-	24	-0.003000	0.01472	-0.2037	336.0	0.99700

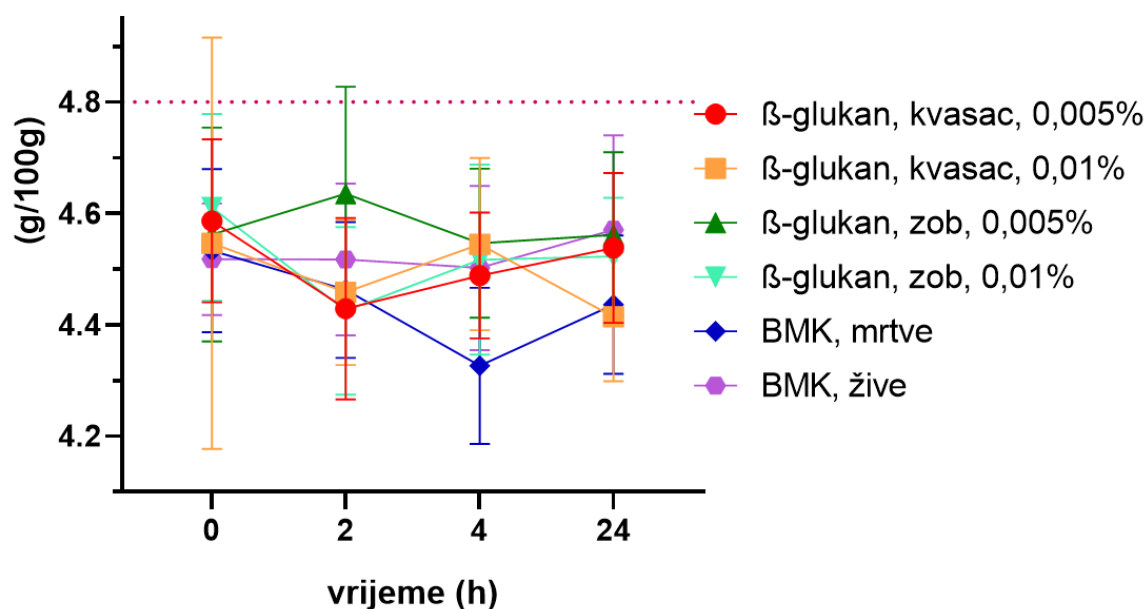
Slika 12. Grafički prikaz vezivanja masti iz mlijeka i odabranih mikofikastora



Tablica 45. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu masti u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Usporedba							
vrijeme	vs	vrijeme	razlika	SE	T	Df	p _{Tukey}
0	-	2	-0.021159	0.02522	-0.8389	336.0	0.83588
0	-	4	-0.028344	0.02522	-1.1238	336.0	0.67512
0	-	24	-0.032307	0.02522	-1.2809	336.0	0.57576
2	-	4	-0.007185	0.02522	-0.2849	336.0	0.99193
2	-	24	-0.011148	0.02522	-0.4420	336.0	0.97112
4	-	24	-0.003963	0.02522	-0.1571	336.0	0.99862

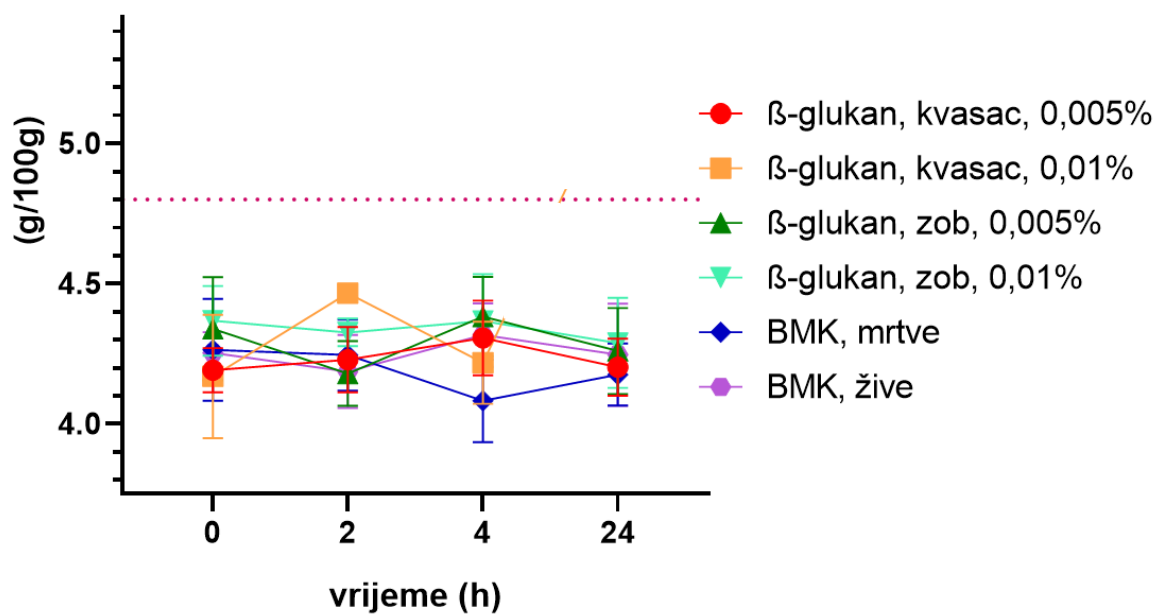
Slika 13. Grafički prikaz vezivanja ugljikohidrata iz mlijeka i odabranih mikofikastora



Tablica 46. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu ugljikohidrata u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Usporedba							
vrijeme	vs	vrijeme	razlika	SE	t	df	p _{Tukey}
0	-	2	0.07146	0.04738	1.50817	322.0	0.43376
0	-	4	0.07197	0.04738	1.51912	322.0	0.42721
0	-	24	0.05231	0.04738	1.10402	322.0	0.68732
2	-	4	5.185e-4	0.04738	0.01094	322.0	1.00000
2	-	24	-0.01915	0.04738	-0.40415	322.0	0.97765
4	-	24	-0.01967	0.04738	-0.41509	322.0	0.97587

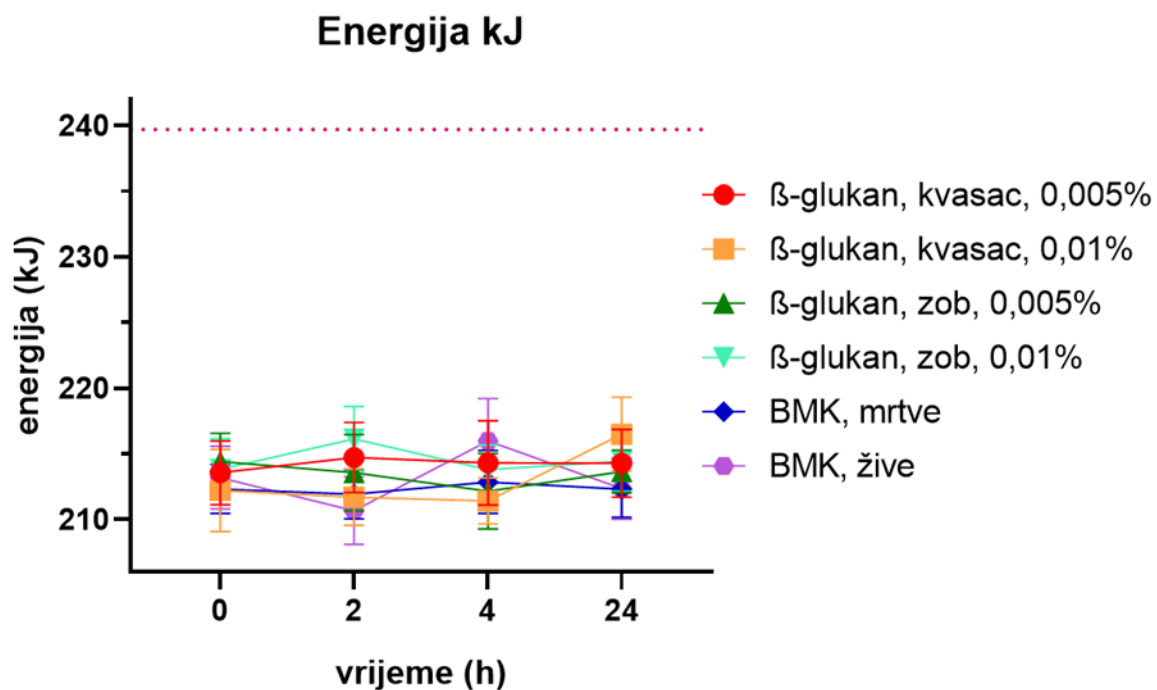
Slika 14. Grafički prikaz vezivanja šećera (laktoze) iz mlijeka i odabranih mikofikastora



Tablica 47. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu šećera (laktoze) u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Usporedba							
vrijeme	vs	vrijeme	razlika	SE	t	df	p _{Tukey}
0	-	2	-0.008259	0.04108	-0.2011	336.0	0.99712
0	-	4	-0.014889	0.04108	-0.3625	336.0	0.98369
0	-	24	-0.135863	0.04108	-3.3075	336.0	0.00573
2	-	4	-0.006630	0.04108	-0.1614	336.0	0.99850
2	-	24	-0.127604	0.04108	-3.1064	336.0	0.01101
4	-	24	-0.120974	0.04108	-2.9450	336.0	0.01807

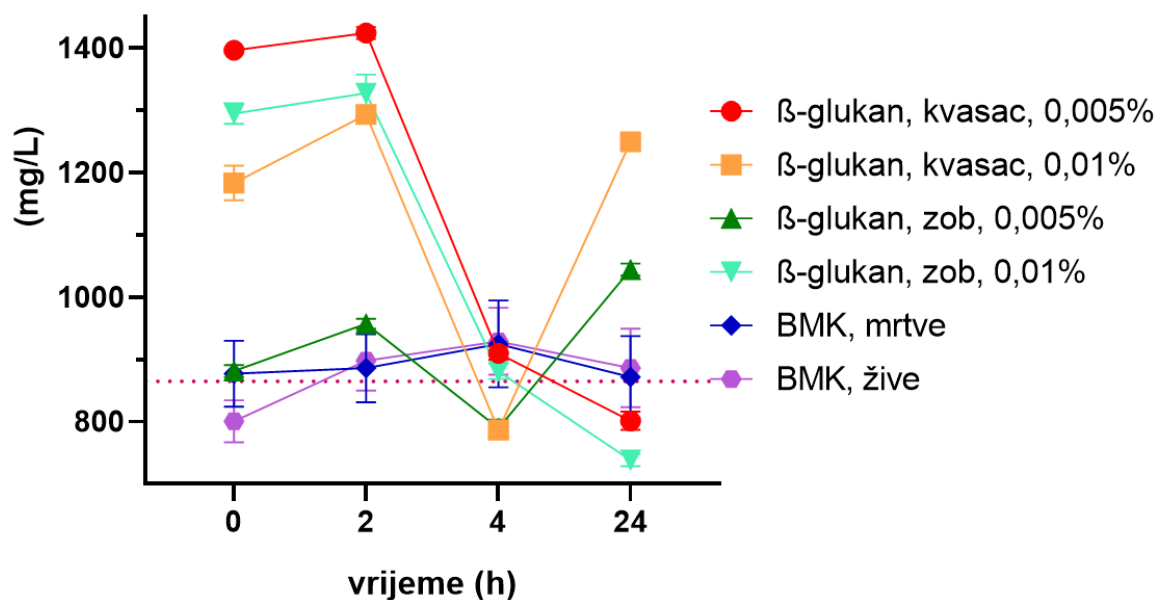
Slika 15. Grafički prikaz Energije kJ iz mlijeka i odabranih mikofikastora



Tablica 48. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na energiju kJ u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Usporedba							
vrijeme	vs	vrijeme	razlika	SE	t	df	pTukey
0	-	2	0.1275	0.7235	0.1762	336.0	0.99805
0	-	4	-0.1692	0.7235	-0.2339	336.0	0.99549
0	-	24	-0.6701	0.7235	-0.9262	336.0	0.79082
2	-	4	-0.2967	0.7235	-0.4101	336.0	0.97670
2	-	24	-0.7976	0.7235	-1.1024	336.0	0.68829
4	-	24	-0.5009	0.7235	-0.6923	336.0	0.89999

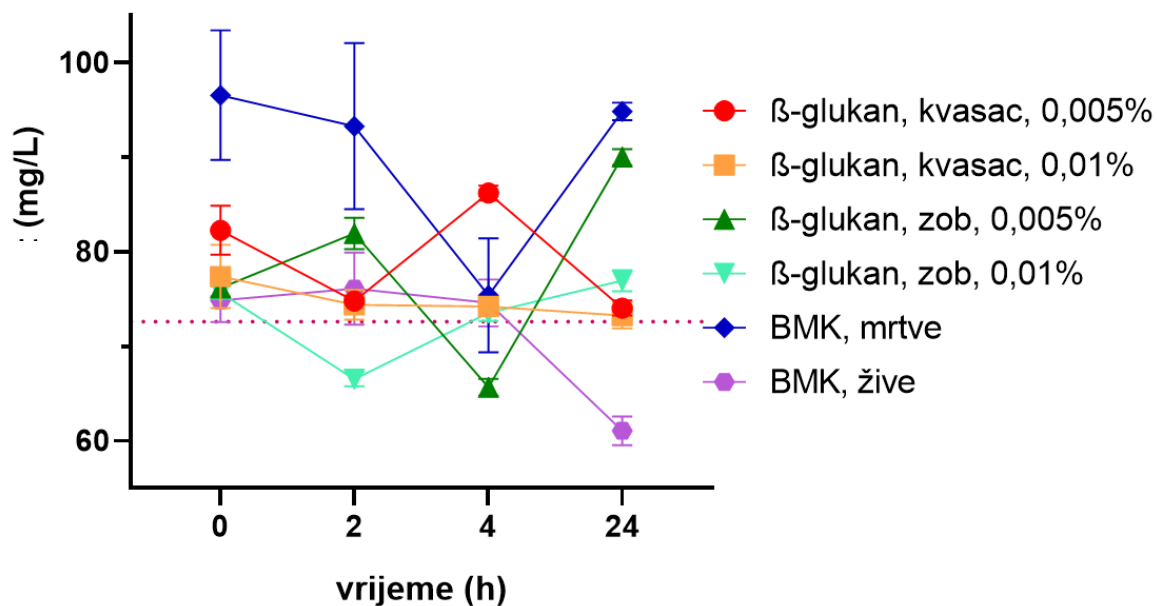
Slika 16. Grafički prikaz vezivanja kalcija iz mlijeka i odabranih mikofikastora



Tablica 49. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu kalcija u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Usporedba							
vrijeme	vs	vrijeme	razlika	SE	t	df	p _{Hukey}
0	-	2	-58.72	9.905	-5.928	322.0	<.00001
0	-	4	202.03	9.905	20.397	322.0	<.00001
0	-	24	140.39	9.905	14.174	322.0	<.00001
2	-	4	260.75	9.905	26.325	322.0	<.00001
2	-	24	199.10	9.905	20.102	322.0	<.00001
4	-	24	-61.65	9.905	-6.224	322.0	<.00001

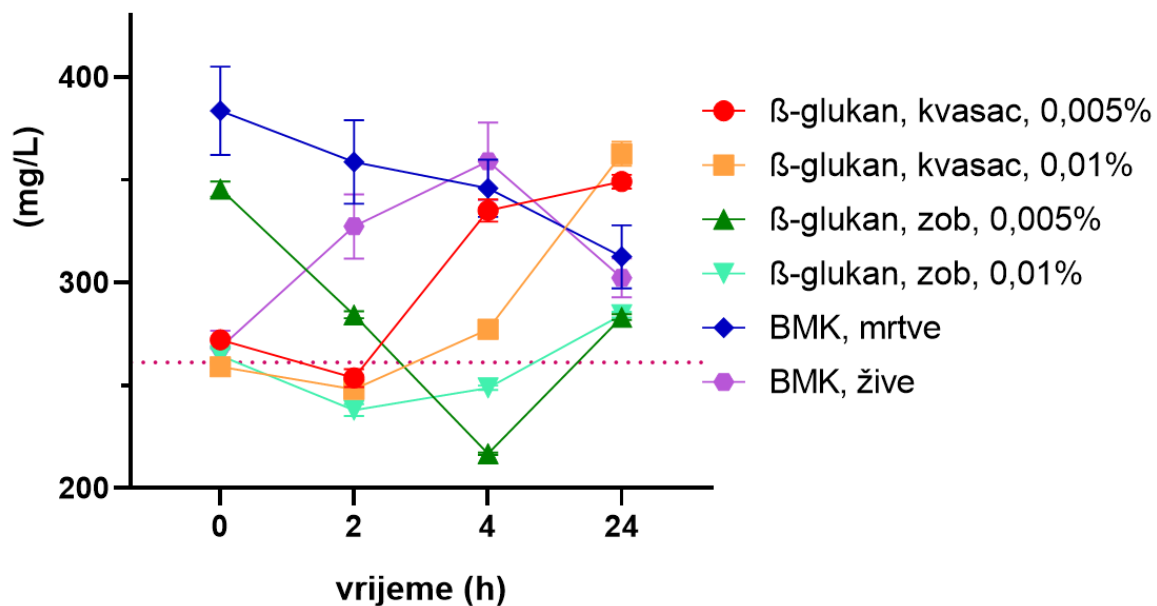
Slika 17. Grafički prikaz vezivanja magnezija iz mlijeka i odabranih mikofikastora



Tablica 50. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu magnezija u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Usporedba							
vrijeme	vs	vrijeme	razlika	SE	t	df	pTukey
0	-	2	2.6481	0.8764	3.0215	322.0	0.01438
0	-	4	5.5453	0.8764	6.3274	322.0	<.00001
0	-	24	2.1265	0.8764	2.4264	322.0	0.07419
2	-	4	2.8973	0.8764	3.3058	322.0	0.00578
2	-	24	-0.5216	0.8764	-0.5951	322.0	0.93351
4	-	24	-3.4188	0.8764	-3.9010	322.0	0.00067

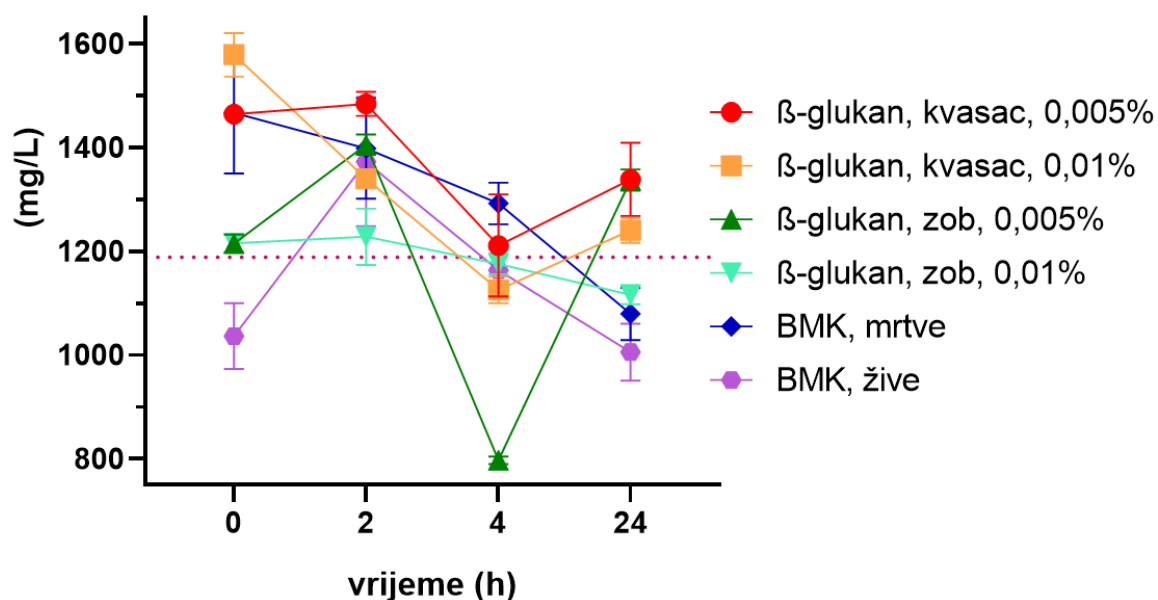
Slika 18. Grafički prikaz vezivanja natrij iz mlijeka i odabranih mikofikastora



Tablica 51. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu natrija u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Usporedba							
vrijeme	vs	vrijeme	razlika	SE	t	df	p _{Tukey}
0	-	2	13.8286	2.8350	4.8778	336	<.00001
0	-	4	1.7387	2.8350	0.6133	336	0.92781
0	-	24	-16.8464	2.8350	-5.9423	336	<.00001
2	-	4	-12.0899	2.8350	-4.2645	336	0.00015
2	-	24	-30.6750	2.8350	-10.8201	336	<.00001
4	-	24	-18.5851	2.8350	-6.5556	336	<.00001

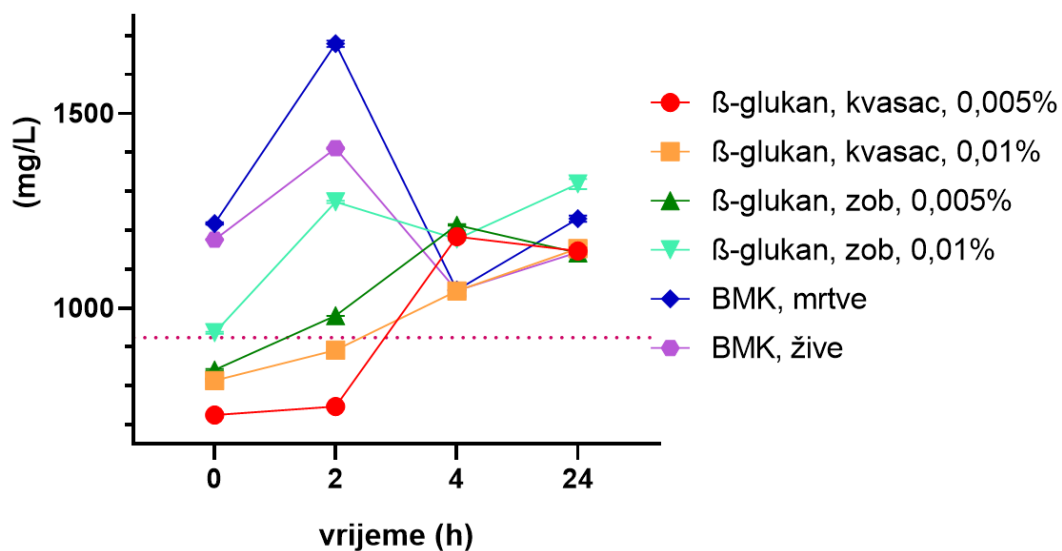
Slika 19. Grafički prikaz vezivanja kalij iz mlijeka i odabranih mikofikastora



Tablica 52. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu kalija u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Usporedba							
vrijeme	vs	vrijeme	razlika	SE	t	df	p _{Hukey}
0	-	2	-41.91	16.37	-2.561	322.0	0.05293
0	-	4	201.94	16.37	12.339	322.0	<.00001
0	-	24	143.29	16.37	8.756	322.0	<.00001
2	-	4	243.85	16.37	14.900	322.0	<.00001
2	-	24	185.20	16.37	11.316	322.0	<.00001
4	-	24	-58.65	16.37	-3.584	322.0	0.00220

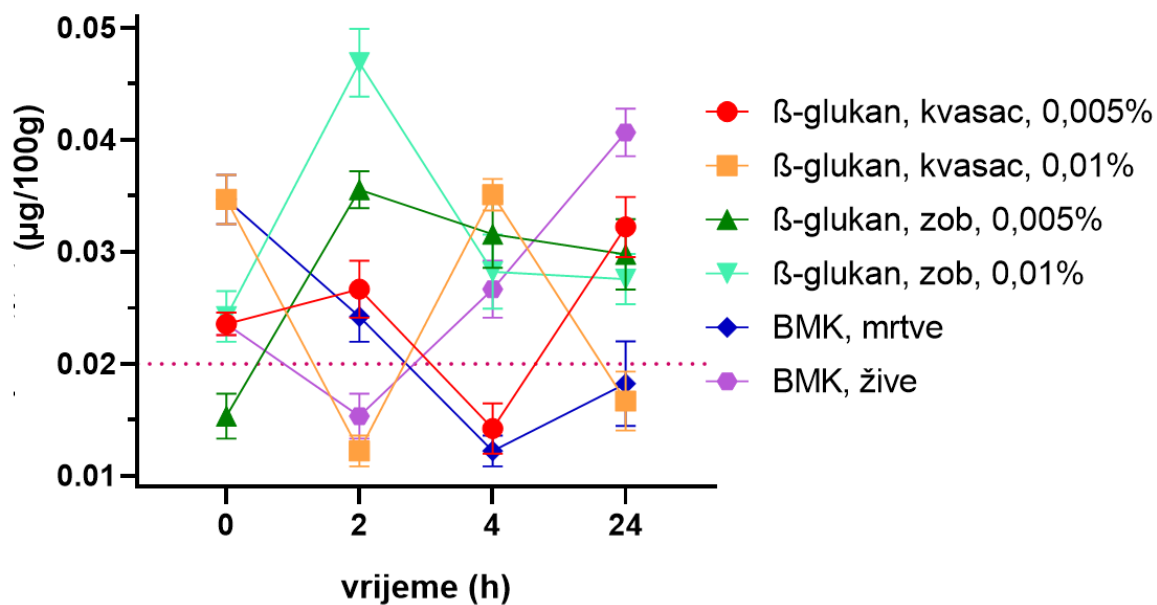
Slika 20. Grafički prikaz vezivanja fosfora iz mlijeka i odabranih mikofikastora



Tablica 53. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu fosfora u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Usporedba							
Vrijeme	vs	vrijeme	razlika	SE	t	df	pTukey
0	-	2	-212.26	2.061	-102.98	336.0	<.00001
0	-	4	-166.64	2.061	-80.84	336.0	<.00001
0	-	24	-237.46	2.061	-115.20	336.0	<.00001
2	-	4	45.62	2.061	22.13	336.0	<.00001
2	-	24	-25.21	2.061	-12.23	336.0	<.00001
4	-	24	-70.82	2.061	-34.36	336.0	<.00001

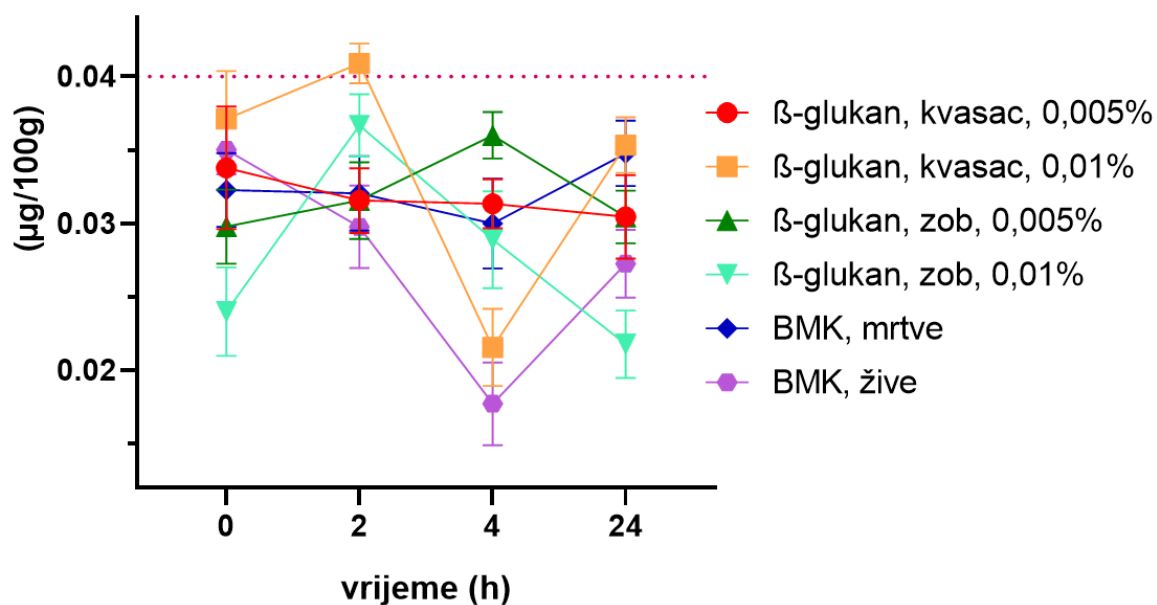
Slika 21. Grafički prikaz vezivanja Vitamina A iz mlijeka i odabranih mikofikastora



Tablica 54. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu vitamina A u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Usporedba							
vrijeme	vs	vrijeme	razlika	SE	t	Df	p _{tukey}
0	-	2	-8.148e-4	6.742e-4	-1.209	322.0	0.62186
0	-	4	0.001333	6.742e-4	1.978	322.0	0.19859
0	-	24	-0.001519	6.742e-4	-2.252	322.0	0.11164
2	-	4	0.002148	6.742e-4	3.186	322.0	0.00857
2	-	24	-7.037e-4	6.742e-4	-1.044	322.0	0.72382
4	-	24	-0.002852	6.742e-4	-4.230	322.0	0.00018

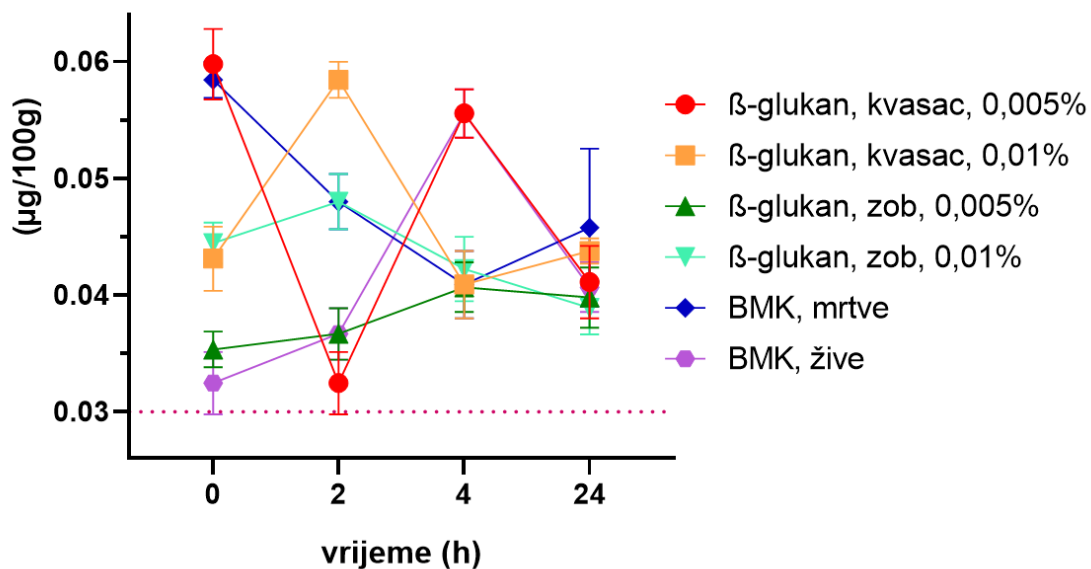
Slika 22. Grafički prikaz vezivanja vitamina D iz mlijeka i odabranih mikofikastora



Tablica 55. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu vitamina D u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Usporedba							
vrijeme	vs	vrijeme	razlika	SE	t	Df	p _{Tukey}
0	-	2	-0.001756	7.480e-4	-2.348	322.0	0.08961
0	-	4	0.004408	7.480e-4	5.893	322.0	<.00001
0	-	24	0.001985	7.480e-4	2.653	322.0	0.04143
2	-	4	0.006164	7.480e-4	8.241	322.0	<.00001
2	-	24	0.003741	7.480e-4	5.001	322.0	<.00001
4	-	24	-0.002423	7.480e-4	-3.239	322.0	0.00721

Slika 23. Grafički prikaz vezivanja vitamin E iz mlijeka i odabranih mikofikastora



Tablica 56. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu vitamina E u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Usporedba							
vrijeme	vs	vrijeme	razlika	SE	t	Df	p _{Tukey}
0	-	2	0.002222	7.713e-4	2.8811	322.0	0.02189
0	-	4	-3.704e-4	7.713e-4	-0.4802	322.0	0.96344
0	-	24	0.003926	7.713e-4	5.0899	322.0	<.00001
2	-	4	-0.002593	7.713e-4	-3.3612	322.0	0.00480
2	-	24	0.001704	7.713e-4	2.2088	322.0	0.12300
4	-	24	0.004296	7.713e-4	5.5700	322.0	<.00001

Vrijednost 100 % ne vezanog dijela ispitanih parametara, označava vrijednost koja je jednaka količini prije dodavanja AFM1 i mikofiksatora te predstavlja referentnu vrijednost izmjerenu u kontrolnom uzorku mlijeka.

U koliko je vrijednost ne vezanog parametra 100 %, u tom slučaju nije došlo do smanjenja niti do povećanja količine ispitivanog parametra u odnosu na referentnu vrijednost.

U koliko je %-tak ne vezanog parametra manji od 100 %, količina ispitivanog parametra se smanjila u odnosu na referentnu vrijednost.

Kada je %-tak ne vezanog parametra veći od 100 %, došlo je do povećanja ispitivanog parametra u odnosu na referentnu dozu.

Što je odstupanje bliže 100 %, to je korišteni mikofiksator efikasniji, odnosno efikasniji je u vezivanju AFM1 dok vezivanje ispitanih parametara je vrlo malo ili ga uopće nema. Analize svih parametara provedene su nakon što je mlijeko namjerno kontaminirano s AFM1, te su u mlijeko nakon kontaminacije dodani mikofiksatori i provedenog uklanjanjanja mikofiksatora postupkom centrifugiranja. Vrijednosti vezanog AFM1 izražene su u postotku (%). Jednako tako vrijednosti ne vezanih nutrijenata, mikronutrijenata i vitamina topivih u mastima izraženi su također u postotku (%).

5 RASPRAVA

Bez obzira na strogi i dobro postavljeni zakonodavni okvir, incidenti s hranom i dalje su prisutni, a osobito oni čija se pojavnost veže uz klimatske promjene kao što je pojavnost mikotoksina u hrani i hrani za životinje. Očekuje se da će se na globalnoj razini temperatura u 21. stoljeću povisiti do 2 °C, a da će se toksigene plijesni, poglavito one iz roda *Aspergillus flavus* i *Fusarium graminearum*, vrlo brzo prilagoditi novim klimatskim uvjetima što će rezultirati njihovom daljnjom pojavnosti u hrani i hrani za životinje [189]. Preventivna djelovanja na takve izazove, predstavljaju jedan su od ključnih zadataka javnog zdravstva, a sve kako bi se zaštitilo zdravlje ljudi i životinja.

Poduzimanje preventivnih mjera radi sprečavanja nastanka mikotoksina je najsigurniji način sprječavanja njihovih štetnih posljedica, ali studije ukazuju da, bez obzira na provedbu preventivskih mjera za nastanak mikotoksina, njihova pojavnost se i dalje potvrđuje u raznim vrstama hrane, kao što su žitarice, hrane za životinje, te mlijeko, posebno ako se radi o plijesnima iz roda *Aspergillus flavus*, te njihovim metabolitima, aflatoksinima [190].

Za izradu ovog rada sveukupno je analizirano po 15 uzoraka komercijalnog mlijeka s 2,8% m.m. za svaki od odabranih mikofiksatora. Svaki od parametara analiziran je u triplikatu, a rezultati su prikazani Tablicama 13 do 56 i Slikama 7 do 23.

5.1 UTJECAJ ODABRANIH MIKOFIKSATORA NA VEZIVANJE AFM1 IZ MLIJEKA

Kako bi spriječili velike gospodarske štete i zaštitili zdravlje ljudi i životinja, za uklanjanje mikotoksina iz hrane koriste se razne vrste mikofiksatora. Njihova uloga je smanjiti količine mikotoksina na prihvatljivu razinu, kako bi kontaminirana hrana postala prikladna za konzumaciju ljudi i/ili životinja. Istraživanja vezana uz korištenje mikofiksatora do sada su bila uglavnom usmjerena na anorganske adsorbente čija je uloga smanjenje bioraspoloživosti mikotoksina u stočnoj hrani, odnosno smanjenje izloženosti mikotoksinima. Najčešće korišteni adsorbensi su oni na bazi aluminosilikata (bentonit, glina, zeolit), ali u novije vrijeme sve se veća pažnja posvećuje organskim adsorbensima kao što beta-glukani i BMK. Osim apsorbirajućih sredstava koriste se i biotransformacijska sredstva čija je uloga vezana uz razgradnju mikotoksina u

netoksične metabolite korištenjem biotransformacijskih sredstava kao što su bakterije, gljivice ili enzimi, čije je djelovanje dosta specifično [191,192]

Prema novim propisima EU, mikofiksatori se u hrani mogu koristiti samo ako dobro vežu jedan ili više mikotoksina, a da pri tome nemaju štetne učinke na životinje, ne utječu negativno na kvalitetu hrane, te ne smiju maskirati mikotoksine u hrani tako da se oni ne mogu analitički utvrditi [193].

Budući da su anorganski adsorbensi gotovo neučinkoviti kada je u pitanju njihovo vezivanje za aflatoksine u hrani [69], danas se kao dobra alternativa nameću stanice kvasca i BMK. Osim što se koriste u proizvodnji hrane te doprinose njezinoj hranjivoj vrijednosti, pokazuju i veliki potencijal za vezivanje mikotoksina koji se u hrani nalaze. [73], [194].

Studija koja je provedena na jogurtu u kojeg su dodane BMK i stanice kvasca, a koji je bio kontaminiran s aflatoksinom B1 i AFM1, adsorpcija mikotoksina je iznosila od 86,9% do 91,2% [195].

Zbog sve veće svijesti o zaštiti okoliša i sigurnosti hrane, korištenje organskih mikofiksatora za uklanjanje mikotoksina iz hrane danas se sve više potencira, jer je takva vrsta adsorpcije sigurnija prilikom konzumiranja tako tretirane hrane, ekološki prihvatljivija i ekonomski isplativija. Upravo iz navedenog razloga, kvasci i bakterije mliječne kiseline, imaju velike prednosti u odnos na anorganske adsorbense. Iz istraživanja je razvidno da imaju velike adsorpcijske sposobnosti i veliku sigurnost u svojoj primjeni. Utvrđeno je također, da važnu ulogu kod adsorpcije mikotoksina predstavlja struktura i morfologija stanične stijenke [196].

U ovom istraživanju kao mikofiksatori korišteni su beta-glukan iz kvasca (0,005% i 0,01%) i beta-glukan iz zobi (0,005% i 0,01%), te BMK žive i mrtve. Navedeni mikofiksatori dodani su u uzorke mlijeka koje je prethodno namjerno kontaminirano s AFM1 u količini od $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, a nakon postupka uklanjanja mikofiksatora centrifugom, te se pratila efikasnost njihovog vezivanja u 0-tom, drugom, četvrtom i 24 satu. Pojedinačni rezultati istraživanja prikazani su u Tablici 13, Tablici 14 i Tablici 43, te na Slici 10 koja daje grafički prikaz rezultata nakon statističke obrade. Grafikon prikazuje ukupni prikaz vezivanja AFM1 s odabranim mikofiksatorima iz kojeg je razvidno da se već u 0-tom satu vezivanja postiže značajno smanjenje AFM1 s obzirom na to da se

količina dodanog mikotoksina u mlijeko, smanjuje s $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ na količinu od $0,052 \mu\text{g L}^{-1}$ (vezivanje 89,4%) za beta-glukan iz kvasca (0,005%), pa sve do $0,024 \mu\text{g L}^{-1}$ (vezivanje 95,4%) za BMK žive. Tablicom 15 prikazana je efikasnost srednje vrijednosti vezivanja odabranih mikofiksatora s AFM1 iz mlijeka iz koje je razvidno da u 0-tom satu vezivanja, najbolju efikasnost imaju BMK-žive (95,2%), a od glukana, beta-glukan iz zobi (0,01%) čija je efikasnost 92,2%, a najmanju beta-glukan iz kvasca (0,005 %). Prateći proces vezivanja mikofiksatora s AFM1 tijekom 24 sata, kao najefikasniji mikofiksator pokazao se beta-glukan iz zobi (0,01%) a efikasnost vezivanja iznosi mu 92,4%.

Rezultati govore u prilog tome da svi korišteni mikofiksatori imaju dobru učinkovitost u vezivanju AFM1 neposredno nakon dodatka mikofiksatora, odnosno u 0-tom satu vezivanja. Ističemo kako su svi korišteni mikofiksatori smanjili inicijalnu kontaminaciju mlijeka na prihvatljivu vrijednost za konzumaciju, odnosno na MDK vrijednost koja je propisana Uredbom o najvećim dozvoljenim količinama kontaminanta u hrani [8] i iznosi $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$. Vezivanje beta-glukana s AFM1 tumači se polisaharidnom građom stanične stijenke kvasca koja posjeduje lako dostupna adsorpcijska mjesta te koristi različite mehanizme vezivanja kao što su vodikove i ionske veze [60]. Statističkom obradom dobivenih rezultata (Tablica 43) utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0,05$), između 0-tog, 2 i 4 sata vezivanja. Također ne postoji statistički značajna razlika između srednjih vrijednosti AFM1, između tretmana beta-glukanom iz kvasca (0,005%) i BMK mrtve, te beta-glukanom iz kvasca (0,01%) i beta-glukan iz zobi (0,005%). Vidljivo je da vrijeme vezivanja kao i odabir mikofiksatora imaju značajan utjecaj na srednju vrijednost AFM1. Rezultate vezivanja koji su dobiveni u ovom istraživanju možemo usporediti s rezultatima dobivenim u sličnim studijama koje su provedene u svrhu dekontaminacije žitarica s mikotoksinima. Rezultati studije ukazuju da se %-tak vezivanja mikotoksina s prirodnim mikofiksatorima kretao od 77% do 95% kada su u pitanju kvasci, a sam proces vezivanja dešava se već u prvih pet minuta trajanja tretmana. Uspoređujući rezultate ovog istraživanja i opisane studije, možemo zaključiti da dobiveni rezultati potvrđuju dobru efikasnost vezivanja AFM1, u kratkom vremenu koje je u ovom istraživanju evidentirano već u 0-tom satu provedbe tretmana [73]. Dobiveni rezultate u ovom istraživanju, usporedivi su i s rezultatima istraživanja u kojem je korišteno komercijalno sterilizirano mlijeko kontaminirano s AFM1, a kao mikofiksatori korištene su stanice kvasca (mrtve) i BMK, samostalno i u

kombinaciji s BMK. Dokazano je da se u vrlo kratkom vremenu od 30 do 60 minuta postigla visoka učinkovitost vezivanja, veća od 90%, što ukazuje na činjenicu da bi navedeni mikofiksatori mogli imati svoju primjenu u komercijalne svrhe, a što je i svrha ovakvih istraživanja [80]. Da se radi o vrlo brzom procesu vezivanja mikotoksina sa stanicama kvasaca i BMK već unutar prve minute tretmana, te da osim beta-glukana iz kvasca i beta-glukan iz zobi, BMK (žive i mrtve) imaju također dobar afinitet vezivanja AFM1 već u 0-tom satu vezivanja. Studije na fermentiranim proizvodima u koje se BMK dodaju radi stvaranja okusa, također potvrđuju da je upotreba BMK osim za formiranje fermentiranih proizvoda, izuzetno efikasna kada je u pitanju uklanjanje AFM1 iz navedenih proizvoda [197], a efikasnost se još povećava ako se proizvodima dodaju stanice kvasaca čime se postiže efikasnost vezivanja i do 90,0% što potvrđuju i rezultati dobiveni istraživanjem u ovom doktorskom radu [198].

5.2 UTJECAJ ODABRANIH MIKOFIKSATORA NA VEZIVANJE NUTRIJENATA IZ MLIJEKA I ENERGETSKU VRIJEDNOST MLIJEKA

Budući da je mlijeko namirnica složenog sastava koja je bogata nutrijentima i mikronutrijentima, kao što su bjelančevine, masti, ugljikohidrati, vitamini, te mikronutrijentima poput onih koji su istraživani u ovom radu (Ca, Mg, Na, K i P) i vitamina, a bez kojih organizam ne bi mogao normalno funkcionirati [101], praćenje očuvanja njihove stabilnost tijekom tretmana mlijeka mikofiksatorima jedan od najvažnijih ciljeva ovoga istraživanja. Smatra se kako je mlijeko jedina hrana koja se uspjela prilagoditi potreba novorođenčadi jer sadrži sve potrebne hranjive sastojke za njihov normalan rast i razvoj, a epidemiološke studije potvrđuju njegovu važnost u prehrani te njegovo neupitno nutritivno bogatstvo, stoga se njegova konzumacija preporučuje i kod prevencije određenih bolesnih stanja [199, 200]. Istraživanja o važnosti mlijeka u prehrani ljudi ukazuju da konzumacija mlijeka sukladno preporučenim prehrambenim smjernicama, može biti korisna za sve dobne skupine, osim za one koji su intolerantni na laktozu, te one koji su alergični na mliječne bjelančevine. Podaci prikupljeni 2009. godine ukazuju kako mlijeko u prehrani doprinosi s 8% energije, 12% masti i gotovo 16% bjelančevina za područje Sjeverne

Amerike, dok u Europi, udio energije iznosi 9,1%, a udio bjelančevina iznosi između 10% i 20% [201, 202].

S obzirom na važnost mlijeka i mliječnih proizvoda u prehrani ljudi, neophodno je osigurati njihovu zdravstvenu ispravnost kako bi bili sigurni za konzumaciju. Kontaminacija mlijeka AFM1, proučava se već nekoliko godina, a njegovo uklanjanje baziralo se uglavnom na korištenje anorganskih adsorbensa za koje je bilo evidentno da uzrokuju poremećaje u prirodnom sastavu mlijeka. U tu svrhu istraživan je kapacitet detoksikacije mlijeka s glinom, a ujedno su razmatrani i učinci gline na nutritivni sastav mlijeka. Analize su pokazale kako neke od glina imaju relativno dobar potencijal za uklanjanje AFM1, dok je kod drugih utvrđen vrlo niski učinak, ali je utvrđeno da su bjelančevine iz mlijeka osjetljive na adsorpciju gline od masti i laktoze te je došlo do smanjenja bjelančevina u tretiranom mlijeku [203], u odnosu na anorganske adsorbense, organski adsorbens pokazali su se učinkovitiji u odnosu na vezivanje mikotoksina mada je njihov utjecaj na nutritivni sastav mlijeka slabo istražen, te iz dostupnih istraživanja nema relevantnih podataka o njihovom utjecaju na parametre kvalitete mlijeka [204, 205]. U ovom istraživanju pratio se proces vezivanja bjelančevina, masti, ugljikohidrata i šećera s organskim mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca, beta-glukanom iz zobi koji su dodani u mlijeko u količinama od 0,005% i 0,01%, te BMK žive i mrtve, tijekom 0-tog sata, nakon 2 sata, 4, sata i 24 sata. Računski je određena energetska vrijednost mlijeka izražena u kcal, te je procijenjen utjecaj istraživanih mikofiksatora na dobivenu energetska vrijednost. Pojedinačni rezultati utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku s istraživanim mikofiksatorima na količinu bjelančevina prikazani su Tablicama 15, 16 i 43, te Slikom 11. Nakon dodatka mikofiksatora dolazi do povećanja količine bjelančevina već u 0-tom satu vezivanja, u odnosu na količinu bjelančevina u mlijeku prije provedbe tretmana. Kod korištenja beta-glukana iz kvasca i zobi kao mikofiksatora AFM1, količine nevezanih bjelančevina kretale su se od 100,3% kada se koristio beta-glukan iz kvasca (0,01%) u 0-tom satu vezivanja do 103,5% u drugom satu vezivanja kada se koristio beta-glukan iz kvasca (0,005%) (Tablica 15). Povećanje se može tumačiti kemijskim sastavom glukana koji u svom sastavu, osim polisaharida, lipida i minerala, sadrži i bjelančevine koje su mogli pridonijeti povećanju ukupnih bjelančevina u tretiranom mlijeku [206]. Povećanja količine bjelančevina bilježi se i kod korištenja mikofiksatora BMK (žive i mrtve) čiji su rezultati prikazani u Tablici 16. Nakon dodavanja BMK,

povećanje količine bjelančevina u tretiranom mlijeku iznosilo je od 101,5% za BMK-mrtve i 102,4% za BMK-žive u 0-tom satu vezivanja, dok su se vrijednosti bjelančevina tijekom 24 satnog trajanja tretmana tijekom 24 sata kretale od 101,2% do 103,2%. Budući da je poznato kako je stanična stijenka gram-pozitivnih bakterija u koje ubrajamo i BMK, sastavljena od glikopolimera i bjelančevina [207], za očekivati je da će se količina bjelančevina povećati njihovim dodatkom u mlijeko, što je evidentno i u ovom istraživanju. Kao najefikasniji mikofiksator iz skupine beta-glukana, tijekom 24-satno trajanje tretmana, pokazao se beta-glukan iz zobi (0,01%) s količinom nevezanih bjelančevina od 102,7% u odnosu na količinu bjelančevina prisutnu u mlijeku prije početka tretmana (3,40 g/100g), dok je najmanje vezivanje zabilježeno kod beta-glukana iz kvasca (0,01%), gdje je količina nevezanih bjelančevina iznosila 101,9%. BMK (žive i mrtve) gotovo podjednako vežu bjelančevine te se vrijednosti njihovog vezivanja tijekom tretmana kreću od 102,2% do 102,9%. Iz grafičkog prikaza (Slika 11) je razvidno da je količine bjelančevina, nakon vezivanja mikofiksatorima u 0-tom satu veća od referentne vrijednosti, odnosno količine bjelančevina koja se nalazila u mlijeku prije tretmana (3,4 g/100g). Dodatkom odabranih mikofiksatora količina bjelančevina se kreće u rasponu od 3,41 g/100g do 3,52 g/100g za cijelo vrijeme tretmana. Navedeno se može tumačiti činjenicom da i beta-glukani i BMK u svom sastavu sadrže određenu količinu bjelančevine koja je doprinijela blagim porastom njihove ukupne količine tijekom tretmana mlijeka. S obzirom na to da su Smjernicama Europske komisije dozvoljena odstupanja nutritivnih vrijednosti do 10% u svim kategorijama hrane, pa stoga i u mlijeku i mliječnim proizvodima, dobivena odstupanja smatraju se prihvatljiva [208]. Obradeni podaci Post Hoc testom (Tablica 44) govore da ne postoje statistički značajne razlike u vremenu trajanja tretmana kao niti između korištenih mikofiksatora ($p > 0,05$). Moguće je da vrijeme nema utjecaj na količinu bjelančevina u uzorcima mlijeka, ili da je utjecaj vrlo malen.

Utjecaj vezivanja AFM1 u mlijeku s beta-glukanom iz kvasca (0,005% i 0,01%) i beta-glukanom iz zobi (0,005% i 0,01%) na količinu masti prikazani je Tablicom 17, dok je Tablicom 18 dan prikaz količine nevezanih masti korištenjem BMK (žive i mrtve) kao mikofiksatora AFM1 iz mlijeka. Grafički prikaz pojedinačnih vrijednosti vezivanja prikazani su Slikom 12. Rezultati ukazuju na činjenicu da se količina masti neposredno nakon dodavanja mikofiksatora smanjila u odnosu na količinu masti koja je bila prisutna u mlijeku prije tretmana (2,73 g/100g), kod svih istraživanih beta-glukana te

da se količina nevezanih masti kretala od 85,3% u 4-tom satu vezivanja s beta-glukanom iz kvasca (0,01%), do 91,2% u 24-tom satu s beta-glukanom iz kvasca (0,005%). Kod korištenja BMK (žive i mrtve) najniži postotak vezivanja utvrđen je kod korištenja BMK (žive) u 24 satu vezivanja, a najveći kod korištenja BMK (mrtve) u 4-tom satu vezivanja i iznosi 89,0%. Kod svih korištenih mikofiksatora utvrđeno je da vezivanje AFM1 s mikofiksatorima ne utječe u značajnoj mjeri na vezivanje masti iz tretiranog mlijeka, te da je njihova efikasnost vidljiva već u 0-tom satu vezivanja. Također možemo istaknuti kako su razlike u količini nevezanih masti vrlo male kod svih korištenih mikofiksatora i tijekom cjelokupnog trajanja tretmana. Istraživanja koja su provedena na soji kontaminiranoj mikotoksinima, a gdje se kao mikofiksator koristio beta-glukan, utvrđeno je da beta-glukan kao mikofiksator ne utječe u značajnoj mjeri na nutritivni sastav soje, odnosno ne dolazi do razlike u količini nutrijenta tijekom tretmana glukanimi, ali je ponovno potvrđena njihova učinkovitost u uklanjanju mikotoksina [209]. Iz dobivenih rezultata ovoga istraživanja razvidno je da su beta-glukan iz kvasca i iz zobi (0,005% i 0,01%) najmanje utjecali na vezivanje masti kako u 0-tom satu tretmana, tako i tijekom 24-satnog tretmana. Kod korištenja BMK (žive i mrtve) kao mikofiksatora AFM1 u mlijeku, efikasnost vezivanja tijekom tretmana je približno jednaka. Slika 12 daje pregled svih rezultata količine vezanih masti iz mlijeka nakon dodatka odabranih mikofiksatora, te potvrđuje da se u prvom satu vezivanja količina masti u mlijeku smanjuje za sve korištene mikofiksatore, u odnosu na referentnu vrijednost utvrđenu prije dodatka mikofiksatora i AFM1 koja je iznosila 2,8 g/100g. S obzirom na to da je za masti dozvoljeno odstupanje od $\pm 1,5$ g, dobiveni rezultati smatraju se prihvatljivima, te se mlijeko s navedenim odstupanjem može koristiti za ljudsku konzumaciju [208]. Post Hoc analizom (Tablica 45) utvrđeno je da ne postoji statističke razlike kada je u pitanju vrijeme kroz koje se tretman provodi ($p > 0,05$), kao i kombinacije ispitivanih mikofiksatora. S obzirom na statističke podatke možemo zaključiti da odabrani mikofiksatori i vrijeme vezivanja nemaju utjecaj na promjenu količine masti u analiziranim uzorcima mlijeka.

Utjecaj vezivanja između AFM1 i odabranih beta-glukana kao mikofiksatora na količinu ugljikohidrata u tretiranom mlijeko prikazan je Tablicom 19, a utjecaj vezivanja AFM1 s BMK (žive i mrtve) Tablicom 20, te Tablicom 46 i Slikom 13. Iz Tablice 19 vidljive su minimalne, maksimalne i srednje vrijednosti vezivanja korištenih beta-glukana iz kvasca i zobi u 0-tom, drugom, četvrtom i 24 satu vezivanja, te %-tak ne vezanih

ugljikohidrata u odnosu na količinu ugljikohidrata prije početka tretmana. Dobiveni rezultati ukazuju da se %-tak ne vezanih ugljikohidrata, kroz vrijeme trajanja tretmana kreće od 92,1% kada se kao mikofiksator koristio beta-glukan iz kvasca (0,01%), do 97,5% kod korištenja beta-glukana iz zobi (0,005%) u drugom satu vezivanja. Također je vidljivo da je visoki %-tak ne vezanih ugljikohidrata prisutan već u 0-tom satu vezivanja, ali i za cijelo vrijeme trajanja tretmana. Slični rezultati utvrđeni su kada se kao mikofiksator koriste BMK (žive i mrtve) a prikazani su u Tablici 20. Uočava se da je %-tak ne vezanih ugljikohidrata kod korištenja BMK manji u odnosu beta-glukane, i kreće se od 90,4% do 95,0%. Također se uočava da se u 0-tom satu vezivanja postiže visok %-tak ne vezanih ugljikohidrata koji se u drugom i četvrtom satu tretmana smanjuje, da bi se u 24 satu ponovno povećao što se može tumačiti reverzibilnom reakcijom kakva je uočena kod vezivanja AFM1 i beta-glukana [209]. Rezultati također ukazuju da beta-glukani iz zobi (0,005%) najmanje utječe na vezivanje ugljikohidrata iz mlijeka tijekom trajanja tretmana, a kada su u pitanju BMK, prosječno bolje rezultate postižu BMK (žive). Visoki postotak nevezanih ugljikohidrata kod korištenih mikofiksatora može se objasniti kemijskim sastavom beta-glukana i BMK koji u svom sastavu sadrže ugljikohidrate, te svojim dodatkom u mlijeko mogu utjecati na njihovu količinu. Slika 13 daje grafički prikaz dobivenih rezultata vezivanja ugljikohidrata nakon dodatka mikofiksatora u mlijeko. Razvidno je da se količina ugljikohidrata smanjuje u 0-tom satu vezivanja u odnosu na referentnu vrijednost s 4,8 g/100g na količine od 4,5 do 4,6 g/100g. Nakon 0-tog sata, količine ugljikohidrata tijekom trajanja tretmana i dalje ostaju ispod referentne vrijednosti, a kreću se od 4,33 g/100g (BMK - mrtve) utvrđene u četvrtom satu vezivanja, do 4,65 g/100 g za beta-glukan iz zobi (0,005%) u drugom satu vezivanja. S obzirom na to da je za ugljikohidrate dozvoljeno odstupanje ± 2 g, vrijednosti ugljikohidrata u tretiranom mlijeku smatraju se prihvatljivima za konzumaciju [208]. Post Hoc analizom utvrđeno je da ne postoji statističke razlike u vremenima u kojima se tretman provodi ($p > 0,05$), te u kombinacijama ispitivanih mikofiksatora. Iz navedenog proizlazi, da korišteni mikofiksatori u odnosu na vrijeme tretiranja uzoraka mlijeka, nemaju statistički značajan utjecaj na količinu ugljikohidrata u analiziranim uzorcima (Tablica 46). U ovom istraživanju praćen je i utjecaj mikofiksatora na količinu šećera (laktoze) u mlijeku nakon vezivanja s AFM1. Laktoza ili mliječni šećer važan je izvor energije, a od svih saharida koje mlijeko sadrži (10%), 98% opada na laktozu [210]. Rezultati koji su dobiveni u ovom istraživanju nakon tretmana mlijeka s AFM1 i

mikofiksatora prikazani su Tablicom 21 i Tablicom 22, rezultati dobiveni statističkom obradom podataka Tablicom 47, te Slikom 14. Utvrđeno je da kod korištenja beta-glukana iz kvasca i iz zobí, postotak ne vezane laktoze kreće se od 88% kod korištenja beta-glukana iz kvasca (0,01%) u 0-tom satu vezivanja do 100,4% kod korištenja istog mikofiksatora u 24 satu vezivanja. Slične vrijednosti dobivene su i u studiji gdje su istraživanja provedena na beta-glukanu iz zobí koji se dodavao u mlijeko sa svrhom razvoja novih proizvoda na bazi mlijeka, a koja je utvrdila da beta-glukan nije imao utjecaj na promjenu količine laktoze u mlijeku [211]. Također, slične vrijednosti vezivanja zabilježene su i kod BMK (žive i mrtve) gdje se postotak ne vezane laktoze kretao od 91,5% kod korištenja živih BMK do 106,0 kada su se kao mikofiksatori koristile mrtve BMK tijekom 24 satnog tretmana (Tablica 26). Najviše srednje vrijednosti ne vezanog šećera (laktoze) tijekom 24 satnog trajanja tretmana evidentirane kod beta-glukana iz zobí (0,01%) i iznosi 93,61%, te kod BMK (mrtve) 99,8%. Budući da su kod navedenih mikofiksatora utvrđena najmanja odstupanja od referentne vrijednosti, koja za laktozu iznosi $4,66 \text{ mg L}^{-1}$, mogu se smatrati najučinkovitijim mikofiksatorima kod vezivanja šećera (laktoze) iz mlijeka (Tablica 21, Tablica 22). Slika 14 predstavlja grafički prikaz utjecaja svih analiziranih mikofiksatora na količinu šećera u svim uzorcima tretiranog mlijeka. Vidljivo je da se količine šećera smanjuju u 0-tom satu tretmana u odnosu na referentnu vrijednost koja iznosi $4,8 \text{ g/100 g}$, na $4,66 \text{ g/100g}$. Vrijednosti šećera kreću se od $4,1 \text{ g/100g}$ kod vezivanja s mrtvim BMK u 4-tom satu vezivanja, do $4,5 \text{ g/100g}$ kada se kao mikofiksator koristio beta-glukan iz kvasca (0,005%) u drugom satu vezivanja. Iz rezultata je razvidno da nema statistički značajne razlike kod korištenih mikofiksatora i vremena vezivanja ($p > 0,05$) te se takav rezultat može tumačiti da isti nemaju utjecaja na promjenu količine šećera u analiziranom uzorku mlijeka (Tablica 47).

Energetska vrijednost hrane, pa tako i mlijeka izračunava se jedinstvenom formulom prema Uredbi EU o informiranju potrošača [11], a ovisi o količini bjelancevina, masti, ugljikohidrata te šećera i izražava se u kcal ili u kJ. Uzevši u obzir dobivene vrijednosti za navedene nutrijente, izračunate su energetske vrijednosti za sve tretirane uzorke mlijeka, a rezultati su prikazani Tablicom 23 i Tablicom 24, Tablicom 48, te Slikom 15. Jasno je vidljivo kako se energetska vrijednost mlijeka nakon provedenog tretmana smanjila u odnosu na početnu vrijednost prije tretmana kada je iznosila 239 kJ/100 g , iz razloga jer je nakon tretmana došlo do sniženja količine ugljikohidrata, šećera i masti

koje doprinose energetske vrijednosti mlijeka. Najmanja odstupanja energetske vrijednosti tretiranog mlijeka u odnosu na referentnu vrijednost, postignuta je korištenjem beta-glukana iz kvasca (0,005%) i beta-glukana iz zobi (0,01%) gdje postotak (%) ne vezane energije iznosi 89,4%, dok je kod BMK postignut gotovo isti %-tak ne vezane energije od 88,7%. Dobivene niže vrijednosti sukladno vodiču EU još uvijek se nalaze unutar dozvoljenih odstupanja za navedenu vrstu hrane [208], te se mlijeko s obzirom na njegovu energetske vrijednost smatra sukladnim i može se koristiti u prehrambene svrhe. Nema statistički značajnih razlika između zadanih vremena i pojedinih mikofiksatora ($p > 0,05$), što navodi na činjenicu kako vrijeme vezivanja i korišteni mikofiksatori nemaju utjecaja na energetske vrijednosti mlijeka (Tablica 48).

5.3 UTJECAJ ODABRANIH MIKOFIKSATORA NA VEZIVANJE MIKRONUTRIJENATA IZ MLIJEKA

U sklopu ove disertacije, provedeno je i istraživanje utjecaja odabranih mikofiksatora na vezivanje mikronutrijenata iz mlijeka, nakon namjerne kontaminacije mlijeka AFM1. Mikronutrijenti u mlijeku se nalaze ili u vodenoj fazi mlijeka, ili su vezani za kazein [102]. Važnost mikronutrijenata za organizam je od neprocjenjive važnosti zato što sudjeluju u svim važnim biološkim procesima [103,104]

Količine minerala u mlijeku mogu se poremetiti tijekom njegovog zagrijavanja što ima za posljedicu smanjenje količine mikronutrijenata u odnosu na sirovo mlijeko, stoga su tretmani mikofiksatorima u ovom istraživanju provedeni na mlijeku sobne temperature.

Od velike važnosti je znati u kojem se kemijskom obliku pojedini mineralni element nalazi u mlijeku jer o tome ovisi njihova apsorpcija u želucu i njihovo biološko iskorištenje. Mineralni sastav mlijeka varira ovisno o stadiju laktacije i hranidbenom statusu životinje, okolišnim uvjetima te genetskim čimbenicima [105]. U radu je istraživao utjecaj vezivanja mikofiksatora i AFM1, na količinu Ca, Mg, Na, K i P. Rezultati za kalcij prikazani su u Tablicama 25 i 26, te Slikom 16. Rezultati ukazuju da u 0-tom satu tretmana kod korištenja svih oblika beta-glukana, dolazi do porasta količine kalcija od 102,5 do 161,7% u odnosu na početnu vrijednost kalcija prije

početka tretmana a koja iznosi 864,7 mg L⁻¹, količine se tijekom drugog sata tretmana još povećavaju, a nakon toga pa sve do 24 sata se povećavaju ili smanjuju (Tablica 25). Kod korištenja BMK -žive, u 0-tom satu vezivanja dolazi do smanjenja količine kalcija a količina ne vezanog kalcija iznosi 93,5%, dok kod BMK-mrtve, količina ne vezanog kalcija maksimalno iznosi 104,0%. Daljnjim tijekom vezivanja, dolazi do povećanja količine ne vezanog kalcija kod oba oblika BKM pa sve do završetka tretmana (Tablica 26). Efikasnosti vezivanja svih istraživanih mikofiksatora tijekom 24 satnog tretmana ukazuju da je najmanje odstupanje od ne vezanog kalcija u odnosu na referentnu vrijednost uočeno kod beta-glukana iz zobi (0,005%) i iznosi 106,2%, dok kod BMK najmanje odstupanje uočeno je kod BMK žive i iznosi 105,2%. Sve dobivene vrijednosti koje odstupaju od referentne vrijednosti smatraju se prihvatljivima te se mlijeko s obzirom na količinu kalcija smatra prikladnim za prehranu [208]. Grafički prikaz (Slika 16) jasno prikazuje kako je najveća količina ne vezanog kalcija u tretiranom mlijeku u drugom satu vezivanja za sve istraživane mikofiksatore, odnosno dodavanjem mikofiksatora u mlijeku povećava se kvaliteta mlijeka u odnosu na količinu kalcija. Tome govore u prilog podaci istraživanja vezanih uz proizvode kojima se dodaju beta-glukani čime se poboljšava nutritivni sastav samog proizvoda kako zbog kalcija tako i zbog drugih sastojaka koji su sadržani u kvascima i žitaricama, te osobito zobi [212]. Iz navedenog razloga bilo je za očekivati da će se dodatkom navedenih mikofiksatora povećati količina kalcija u tretiranom mlijeku u odnosu na referentnu vrijednost. Također ističemo da istraživanja koja koriste BMK za proizvodnju obogaćene i funkcionalne hrane budući da imaju sposobnost modificirati funkciju sastojaka hrane kako bi se dobili proizvodi obogaćeni kalcijem i fosfor, ukazuju na visoki kapacitet vezivanja fermentirajućih bakterija prema kalciju [213]. Post Hoc testom je utvrđeno da postoje statistički značajne razlike između odabranih vremena i ispitivanih mikofiksatora ($p < 0,05$). S obzirom na rezultate, moguće je da vrijeme i odnos mikofiksatora, nama utjecaj na količinu kalcija u mlijeku ili da je utjecaj vrlo malen (Tablica 49).

Tablicom 27 i 28 te Slikom 17 prikazani su rezultati koji se odnose na utjecaj vezivanja AFM1 u mlijeku s odabranim mikofiksatorima na količinu magnezija ovisno o duljini tretmana. Vidljivo je da se srednje vrijednosti ne vezanog magnezija kreću od 90,4% kada je kao mikofiksator korišten beta-glukan iz zobi (0,01%) u 0-tom satu vezivanja do 124,0% kada se kao mikofiksatori koristio beta-glukan iz zobi (0,005%) u 24-tom

satu vezivanja. Kod BMK vrijednosti ne vezanog magnezija kreću se u rasponu od 82,2% za BMK žive u 24-tom satu do 136,6% kod BMK-mrtve u 0-tom satu vezivanja. Od korištenih beta-glukana, najmanje promjene u količini magnezija uočene su kod beta-glukana iz zobi (0,01%) i iznosi 100,7%, te kod BMK žive gdje je utvrđeno 99,1% ne vezanog magnezija. Sva zabilježena odstupanja ne vezanog magnezija u odnosu na referentnu vrijednost prihvatljiva su prema Smjernicama EU [208], te se mlijeko može smatrati sigurnim za konzumaciju. Iz grafikona (Slika 17) je vidljivo da, se količina magnezija u 0-tom satu tretmana povećana u odnosu na referentnu vrijednost kod svih analiziranih uzoraka i korištenih mikofiksatora. Nakon 0-tog sata dolazi do pada količine magnezija kod svih korištenih mikofiksatora osim kod beta-glukana iz zobi (0,005%) i BMK žive, gdje se pad količine magnezija uočava između drugog i četvrtog sata vezivanja. Istraživanja koja se temelje na mineralnom sastavu žitarica govore o prisutnosti magnezija u žitaricama ali i o magneziju kao neophodnom sastavu hranjivih podloga koje služe za rast i metaboličke aktivnosti BMK što može doprinijeti povećanju količine magnezija u supstratu u koji se one dodaju, stoga se porast količine magnezija u ovom istraživanju, kako u 0-tom satu vezivanja tako i tijekom cijelog 24-satnog tretmana može tumačiti navedenom činjenicom [214, 215]. Statističkom obradom podataka (Tablica 50), korištenjem Post Hoc testa utvrđeno je da u vremenu 0-tog do 24-tog sata vezivanja nema statistički značajne vrijednosti ($p > 0,05$) kod korištenih mikofiksatora, odnosno možemo tumačiti da u navedenom trajanju tretmana nema značajnog utjecaja korištenih mikofiksatora na količinu magnezija u analiziranim uzorcima mlijeka.

Rezultati za natrij prikazani su Tablicom 29, Tablicom 30, te Slikom 19. Kada se kao mikofiksator koriste beta-glukani iz kvasca i beta-glukani iz zobi, srednje vrijednosti ne vezanog natrija za pojedine mikofiksatore kreću se od 83,0% kada je korišten beta-glukan iz zobi (0,01%) u četvrtom satu vezivanja do 133,0% za beta-glukan iz zobi 0,005% u 0-tom satu vezivanja. Kada govorimo o BMK kao mikofiksatorima i njihovom utjecaju na vezivanje natrija u mlijeku namjerno kontaminiranom AFM1, najmanji postotak vezivanja utvrđen je u 0-tom satu kada su korištene BMK žive, a količina ne vezanog natrija iznosi 102,7% u odnosu na početnu količinu natrija prije tretmana mlijeka, koja iznosi 261,13 mg L⁻¹. Najveća

količina natrija utvrđena je kod korištenja BMK mrtve, također u 0-tom satu vezivanja i iznosi 146,8%. Rezultati ukazuju na činjenicu da se od beta-glukana, kao najefikasniji mikofiksator pokazao beta-glukan iz zobi (0,01%), jer je srednja vrijednost ne vezanog natrija tijekom trajanja tretmana najbliža vrijednosti natrija prije tretiranja mlijeka i iznosi 99,1%. Nakon statističke obrade svih analiziranih uzoraka tretiranog mlijeka tijekom 24-satnog tretmana, utvrđeno je da su vrijednosti natrija u 0-tom satu tretmana jednaka ili veća od referentne vrijednosti. Nakon 0-tog sata vezivanja zabilježen je pad količine natrija u mlijeku, kod svih korištenih mikofiksatora osim kod živih BMK, gdje se količina natrija povećava sve do 4 sata, nakon čega se u 24-tom satu bilježi njegov pad, ali se njegova količina još uvijek nalazi iznad referentne vrijednosti, za razliku od beta-glukana iz kvasca (0,005% i 0,01%), te beta-glukana iz zobi 0,01% gdje vrijednosti padaju ispod referentne vrijednosti. Iz navedenih podataka možemo zaključiti kako je najbolje vrijeme vezivanja korištenih mikofiksatora beta-glukan iz kvasca (0,005% i 0,01%), te beta-glukan iz zobi 0,01% u 0-tom satu vezivanja, dok je za BMK (žive i mrtve), te za beta-glukan iz zobi (0,005%) u 24-satu vezivanja, jer su odstupanja vrijednosti natrija tada najbliže referentnoj vrijednosti. Povećanje količine natrija koje se bilježi u 0-tom satu vezivanja, odnosno neposredno nakon dodatka mikofiksator može se tumačiti prirodno prisutnim natrijem u žitaricama odnosno u beta-glukanima koji su se u ovom istraživanju dodavali u mlijeku, ali i iz sredstva za puferiranje podloge, kao što su natrijev acetat i dinatrijev glicerofosfat, koji se koriste za rast BMK, a koje prilikom dodavanja u mlijeko mogu doprinijeti povećanju količine natrija [216, 217]. Post Hoc testom (Tablica 51) utvrđeno je da u vremenu 0-tog do 4-tog sata vezivanja nema statistički značajne vrijednosti ($p > 0,05$) kod korištenih mikofiksatora, odnosno možemo tumačiti da u navedenom trajanju tretmana nema značajnog utjecaja korištenih mikofiksatora na količinu natrija u analiziranim uzorcima mlijeka. Nakon četvrtog sata vezivanja rezultati su statistički značajni ($p < 0,05$)

Tablica 31 daje prikaz utjecaja vezivanja AFM1 i odabranih beta-glukana na kalij. Vidljivo je da se u 0-tom satu vezivanja količina kalija kod svih korištenih mikofiksatora povećala u odnosu na referentnu vrijednost koja iznosi 1188,86 mg L⁻¹, a količina kalija nakon vezivanja kreće se od 102,2% kod korištenja beta-glukana iz zobi (0,005%) do

132,4% kada se kao mikofiksator koristi beta-glukan iz kvasca (0,005%). Tijekom drugog sata vezivanja vrijednosti kalija neznatno se mijenjaju i kreću se u rasponu od 105,5% kod korištenja beta-glukana iz zobi (0,01%) do 124,8% kada se kao mikofiksator koristi beta-glukan iz kvasca (0,005%). U četvrtom satu vezivanja vrijednosti kalija su niže u odnosu na prethodno vrijeme trajanja tretmana, a niže su i u odnosu na referentnu vrijednost za sve korištene mikofiksatore osim za beta-glukan iz kvasca (0,005%) gdje iznosi 101,9%, dok kod ostalih se vrijednosti kreću od 67,1% (beta-glukan iz zobi 0,005%) do 98,9% kod korištenja beta-glukana iz zobi (0,01%). Kod korištenja BMK, u prvom satu vezivanja kod korištenja BMK žive dolazi do pada količine kalija (82,7%), dok kod korištenja BMK mrtve, dolazi do njegovog porasta (127,2%). Tijekom daljnjeg trajanja tretmana, dolazi do promjene u vezivanju a samim tim i do promjene količine kalija u mlijeku. Najmanje odstupanje od referentne vrijednosti zabilježeno je kod korištenja živih BMK u četvrtom satu vezivanja, %-tak ne vezanog kalija iznosi 97,5% (Tablica 32, Slika 19). Iz svih dobivenih rezultata možemo izdvojiti beta-glukan iz kvasca (0,005%) kako mikofiksator koji u prosjeku najmanje djeluje na količinu kalija u mlijeku, odnosno pokazalo se da u prosjeku ne veže kalij (srednja vrijednost ne vezanog kalija iznosi 100%), od BMK, manji utjecaj na vezivanje kalija imaju BMK žive, u prosjeku, količina ne vezanog kalija kada se kao mikofiksator koriste navedene bakterije, iznosi 95,2%. Istraživanja ukazuju da je kalij kao mineralni sastojak prisutan u žitaricama koje predstavljaju prirodan izvor beta-glukana, stoga je za očekivati prisutnost kalija i u beta-glukanu. Navedeno govori u prilog objašnjenju povećanja količine kalija u 0-tom satu vezivanja [218, 219]. Post Hoc testom (Tablica 52) utvrđeno je da u 0-tom i drugom satu vezivanja nema statistički značajne razlike ($p > 0,05$) isto možemo tumačiti da u navedenom vremenu trajanju tretmana, odnosno vezivanja mikofiksatora, nema značajnog utjecaja korištenih mikofiksatora na količinu kalija u analiziranom mlijeku.

Rezultati utjecaja mikofiksatora na vezanje fosfora iz namjerno kontaminiranog mlijeka AFM1, prikazani su Tablicom 33 i Tablicom 34, te Slikom 20, a rezultati dobiveni statističkom obradom Tablicom 53. Količina ne vezanog fosfora u mlijeku tijekom tretmana beta-glukanima kao mikofiksatorima iznosila je 78,5% u odnosu na referentnu vrijednost fosfora utvrđenu prije početka tretmana mlijeka, a koja je iznosila 923,50 mg L⁻¹ kada je kao mikofiksator korišten beta-glukanom iz kvasca

(0,005%) u 0-tom satu vezivanja do 137,8% tijekom drugog sata vezivanja, kada je korišten beta-glukana iz zobi (0,01%). Kada je u pitanju korištenje BMK (žive i mrtve) u svrhu mikofiksatora i njihov utjecaj na vezivanje fosfora iz tretiranog mlijeka razvidno je iz Tablice 34, da se količine ne vezanog fosfora kreće od 127,3% u 0-tom satu vezivanja kod BMK žive, do 181,7% kod BMK mrtve u drugom satu vezivanja. Od svih korištenih beta-glukana kao mikofiksatora, tijekom cijelog trajanja tretmana, kao mikofiksator koji najmanje utječe na promjenu fosfora u mlijeku pokazao se je beta-glukan iz kvasca (0,005%) jer utvrđena srednja vrijednost vezivanja fosfora iznosi 102,9% u odnosu na količinu fosfora koja je u mlijeku utvrđena prije dodavanja AFM1 i mikofiksatora. Kod BMK, najmanji utjecaj na promjenu fosfora imaju žive BMK kod kojih srednja vrijednost vezivanja tijekom 24-satnog trajanja tretmana iznosi 129,1%. Slika 20 daje grafički prikaz vezivanja svih tretiranih uzoraka mlijeka s istraživanim mikofiksatorima. Jasno je vidljivo da nakon dodatka mikofiksatora beta-glukana iz zobi (0,01%), te BMK živih i mrtvih, u 0-tom satu vezivanja, dolazi do povećanja količine fosfora u tretiranom mlijeku u odnosu na referentnu vrijednost fosfora, a koja se nastavlja i u drugom satu dok se u četvrtom satu bilježi njegov pad da bi do kraja tretmana došlo do ponovnog rasta fosfora kod svih korištenih mikofiksatora, osim beta-glukana iz zobi (0,01%). Dodavanje beta-glukana iz kvasca (0,005% i 0,01%), te beta-glukana iz zobi (0,005%) izazvalo je pad količine fosfora ispod referentne vrijednosti da bi do drugog sata vezivanja, a osobito u četvrtom satu došlo do njegovog povećanja iznad referentne vrijednosti i tako se zadržalo do kraja tretmana. S obzirom na to da je za fosfor, dozvoljeno odstupanje do +45% i -35% [208], dobivena odstupanja mogu se smatrati prihvatljivima, a mlijeko s utvrđenim količinama fosfora smatra se zdravstveno ispravnim te se može koristiti za konzumaciju. Fosfor je sastavni dio žitarica pa tako i beta-glukana, a koji se u hrani nalazi najčešće u obliku spojeva kao što je npr. fitinska kiselina za čiju razgradnju su potrebni enzimi poput fitaze koja katalizira hidrolizu fitinske kiseline u fosforu [220] a istraživanje na prirodne mliječno-kisele fermentacije kukuruza ukazalo je na smanjene razine fitata u kukuruza što je rezultiralo povećanjem slobodnog fosfora, [221] stoga je opravdano očekivati, da dodatak beta-glukana kao mikofiksatora u mlijeko može poremetiti referentnu vrijednost fosfora u mlijeku. Povećanje razine fosfora nakon provedbe

tretmana, može se tumačiti i korištenjem fosfatnog pufera (PBS) koji se koristi tijekom vezivanja AFM1, što možemo usporediti i istraživanjem u kojem se također PBS koristio kao pufer otopina s BMK u svrhu uklanjanje AFM1 iz mlijeka, ali količina fosfora u mlijeku nije određivana [222]. Post Hoc testom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) kod svih zadanih vremena i mikofiksatora, odnosno vrijeme i vrsta korištenih mikofiksatora imaju utjecaj na količinu fosfora u tretiranom mlijeku (Tablica 53).

5.4 UTJECAJ ODABRANIH MIKOFIKSATORA NA VEZIVANJE VITAMINA TOPIVIH U MASTIMA

Mlijeko kao namirnica ima značajan doprinos u unosu vitamina u organizam i smatra njihovim bitnim izvorom. Lipofilnu frakciju mlijeka čine vitamini topivi u mastima A, D, E i vitamin K, a zbog svojih hidrofobnih svojstava, uglavnom se nalaze u mliječnoj masti. Njihova zastupljenost u mlijeku varira, a razlike se pripisuju poteškoćama u homogenizaciji i pripremi uzorka za analizu, kao i različitim analitičkim metodama i njihovim granicama kvantifikacije (LOQ) [223].

Količine vitamina u mlijeku mogu varirati i s obzirom na način prehrane životinja, duljinu skladištenja, zbog izlaganja svjetlosti, zagrijavanju, te tijekom zakiseljavanja, kada se količine vitamina u mlijeku mogu smanjiti u odnosu na početnu vrijednost. Još uvijek postoje otvorena pitanja oko stvarne količine vitamina u mlijeku i mliječnim proizvodima, kao i zbog činjenice da razne vrste sastojaka koje se nalaze u hranu mogu utjecati na promjenu količine vitamina [223, 224]. U ovom doktorskom radu, dio istraživanja bio je usmjeren na praćenje vrijednosti vitamina A, D, E i K, nakon što je mlijeko tretirano AFM1 i mikofiksatorima. Prije početka tretmana, određene su referentne vrijednosti svakog od vitamina, te se je pratila promjena njihove količine tijekom 24-satnog tretmana istraživanim mikofiksatorima koji su se dodavali u mlijeko nakon namjerne kontaminacije mlijeka AFM1.

U Tablici 35 i Tablici 36 prikazani su rezultati vitamina A, nakon vezivanja AM1 u namjerno kontaminiranom mlijeku s istraživanim mikofiksatorima. Kod korištenja beta-glukana kao mikofiksatora AFM1 utvrđeno je da se tijekom 24 satnog tretmana, najniže

vezivanje od 50% vitamina A bilježi kada se kao mikofiksator koristio beta-glukan iz kvasca (0,01%) u drugom te u četvrtom satu vezivanja, dok je najveća količina ne vezanog vitamin A zabilježena u drugom sati vezivanja kada je korišten beta-glukan iz zobi 0,01%, a količina ne vezanog vitamina A iznosila je 150% u odnosu na referentnu vrijednost vitamina A utvrđenom u kontrolnom uzorku koja je iznosila 0,02 µg/100g (Tablica 35). Kod korištenja BMK kao mikofiksatora, utvrđeno je da BMK mrtve u četvrtom satu vezivanja vežu najveću količinu vitamina A, a %-tak ne vezanog vitamina iznosi 50%, dok kod BMK žive utvrđena je najveća količina ne vezanog vitamina A utvrđena je u 24-satu i iznosi 200% (Tablica 36).

Prateći sve korištene vrste mikofiksatora tijekom 24 satnog vezivanje s AFM1 i utjecaj na vezivanje vitamina A, utvrđeno je da beta-glukani iz zobi (0,005% i 0,01%), te beta-glukan kvasac (0,01%) imaju utjecaj na vezivanje vitamina A. Tijekom drugog sata vezivanja dolazi do povećanja vitamina A koje iznosi 200%, odnosno 250% u odnosu na referentnu vrijednost dobivenu analizom kontrolnog uzorka mlijeka kod beta-glukana iz zobi, dok kod beta-glukana iz kvasca (0,01%) tijekom četvrtog sata vezivanja dolazi do povećanja vitamina A od 200%. Također je utvrđeno da najmanji utjecaj na početnu količinu vitamina A ima beta-glukan iz kvasca (0,005%) jer je srednja vrijednost ne vezanog vitamina A 112,5%, a kada su u pitanju BMK, možemo reći da su BMK mrtve, efikasnije u odnosu na BMK žive, jer srednja vrijednost ne vezanog vitamina A iznosi 100%, odnosno BMK mrtve, ne utječu niti na smanjenje niti na povećanje vitamina A u mlijeku kada se koriste kao mikofiksatori AFM1. Nakon statističke obrade rezultata, grafički prikaz na Slici 21, ukazuje na činjenicu da su vrijednosti vitamina A, nakon dodatka ispitivanih mikofiksatora u 0-tom satu tretmana povećane u odnosu na referentnu vrijednost (0,02 µg/100g) kod svih mikofiksatora, osim kod beta-glukana iz zobi (0,005%), gdje je količina vitamina A smanjena u odnosu na referentnu vrijednost. U drugom satu vezivanja vrijednosti vitamina A se smanjuju kod korištenja beta-glukan iz kvasca (0,01%), te BMK žive i mrtve, dok se kod ostalih mikofiksatora vrijednosti vitamina A povećavaju. Tijekom četvrtog sata, bilježi se pad vitamina A u odnosu na drugi sat vezivanja kod korištenja beta-glukana iz kvasca (0,005%), a količina vitamina A iznosi 50%, te iz zobi (0,005%, 0,01%) gdje količine vitamin A iznose 150% u odnosu na referentnu vrijednost. Pad vrijednosti vitamina A kod korištenja mrtvih BMK također se uočava unutar drugog i četvrtog sata. Nakon 24-satnog tretmana količine ne vezanog vitamina A su iznad referentne vrijednosti ili na referentnoj vrijednosti, osim

kada se kao mikofiksatori koriste žive BMK, tada se količina nevezanog vitamina A nalazi se iznad referentne vrijednosti (200%). Uspoređujući dobivena odstupanja za količine A vitamina, s dozvoljenim odstupanjem koje propisuje EU, a iznosi do +50% do -40%, razvidno je da sve vrijednosti vitamina A u analiziranom mlijeku su prihvatljive, te se mlijeko može smatrati sigurnim za korištenje u prehrambene svrhe, osim kod beta-glukana iz zobi (0,005% i 0,01%), beta-glukana iz kvasca (0,01%) i BMK žive, gdje su zabilježena odstupanja veća od +50%. Iako su studije vezane uz utjecaj mikofiksatora na vezivanje vitamina u mlijeku vrlo oskudne, a za utjecaj vezivanja na vitamin A gotovo ih nema, dostupni rezultati ukazuju na činjenicu da prilikom korištenja šest različnih mikofiksatora, uglavnom anorganskog podrijetla, dolazi do degradacije vitamina A u mlijeku tijekom četiri sata vezivanja na temperaturi od 37 °C, a s obzirom na dobiven negativan rezultat, daljnja se ispitivanja više nisu provodila [225]. Navedeni rezultati mogu se u manjem dijelu usporediti s rezultatima ovog istraživanja gdje je također vidljivo da se količina vitamina A smanjila u četvrtom satu vezivanja tijekom provođenja tretmana ali ne u većoj mjeri, što možemo pripisati činjenici da su u ovom istraživanju korišteni organski mikofiksatori, a tretman se provodio na sobnoj temperaturi, budući da je iz ranijih studija razvidno da tretmani na višim temperaturama degradiraju vitamine. S obzirom na rezultate dobivene u ovom istraživanju možemo istaknuti da je najbolje vrijeme vezivanja u 0-tom za sve mikofiksatore budući da su u tom vremenu zabilježena najmanja odstupanja količine vitamina A u odnosu na referentnu vrijednost. Sva odstupanja u tom vremenu nalaze se unutar propisanih vrijednosti [208]. Post Hoc testom utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0,05$) kod korištenih vremenskih tretmana i vrste korištenih mikofiksatora. Osim u 24 satu vezivanja gdje je ($p < 0,05$), što navodi na zaključak da od 0-tog do 24 sata vezivanja korišteni mikofiksatori ne utječu značajno na smanjenje vitamina A u tretiranom mlijeku (Tablica 54).

Istraživanja utjecaja organskih i anorganskih mikofiksatora na vezivanje vitamina D govore kako adsorpcije s anorganskim mikofiksatorima nema, dok kod korištenja kvasca kao organskog mikofiksatora primijećeno je vezivanje u pokusima kada je vitamin D korišten samostalno a ne u kombinaciji s ostalim vitaminima kao što je to bio slučaj u istraživanju provedenom u ovom doktorskom radu [225]. Poznato je da beta-glukani iz kvasca imaju glavnu ulogu u mehanizmu adsorpcije s vitaminom D gdje dolazi do interakcije karboksilne skupine i aromatskih prstenova vitamina D sa

strukturu beta-glukana, no složena molekularna struktura vitamina D objašnjava i nisku adsorpciju vitamina D, a kada je istovremeno prisutno više vitamina, dolazi do kompeticije za adsorpcijsko mjesto tako da se neki od vitamina neće vezati za beta-glukane [225].

Ako usporedimo rezultate navedenog istraživanja s rezultatima prikazanih u Tablici 37, Tablici 38. gdje je vidljiv utjecaj vezivanja beta-glukana iz kvasca (0,005% i 0,01%), te beta-glukana iz zobi (0,005% i 0,01%) na vezivanje vitamina D u mlijeku namjerno kontaminiranom AFM1, gdje se količina ne vezanog vitamina D kretala od 50% kod korištenja beta-glukana iz zobi (0,01%) do 150% kada se kao mikofiksator koristio beta-glukan iz zobi (0,005%). Odstupanja su utvrđena u odnosu na referentnu količinu vitamina D određenu u kontrolnom uzorku mlijeka prije početka tretmana a koja je iznosila je 0,04 µg/100g. Obzirom na dobivne rezultate možemo reći da beta-glukani iz zobi (0,01%) tijekom 24-satnog tretmana djeluju kao adsorbens na vitamin D i vežu ga do 50%. Beta-glukani iz kvasca vežu vitamin D u manjoj mjeri ili ga uopće ne vežu, jer je najvjerojatnije došlo do kompeticije za vezivna mjesta s drugim vitaminima, kako je to navedeno u ranije opisanoj studiji, te se vitamin D nije vezao s beta-glukanima iz kvasca u količini većoj od 25% tijekom 24-satnog tretmana. Kada govorimo o korištenju živih i mrtvih BMK na vezivanje vitamina D, rezultati su prikazani vidljivi u Tablici 38 iz kojih je razvidno da kod korištenja živih BMK, u 0-tom satu vezivanja ne dolazi do vezivanja vitamina D s mikofiksatorom, jer količina ne vezanog vitamina iznosi 100%. U drugom satu vezivanja dolazi do vezivanja vitamina D za ostale korištene BMK i količina ne vezanog vitamina D iznosi 75 % u odnosu na njegovu referentnu vrijednost i ostaje na toj razini tijekom 24-satnog trajanja tretmana, osim u četvrtom satu vezivanja kada je utvrđeno da BMK žive vežu vitamin D u količini od 50% u odnosu na količinu vitamina D utvrđenu prije tretmana mlijeka (0,04 µg/100g). Na nestabilnost količine vitamina D u mlijeku, može utjecati toplina, svjetlost, i kiseli uvjeti koji nastaju dodatkom BMK, stoga se mlijeko često obogaćuje vitaminom D kao bi se poboljšala njegova nutritivna svojstva [224]. Od svih korištenih mikofiksatora, vidljivo je da tijekom 24-satog tretmana najmanji utjecaj na vezivanje vitamina D ima beta-glukan iz zobi (0,005%) jer upravo kod njegovog korištenja utvrđeno je da srednja vrijednost ne vezanog vitamina D iznosi 100%, dok BMK žive i mrtve podjednako vežu vitamin D, a količina ne vezanog vitamina iznosi 75%, što se može tumačiti i adsorpcijom vitamina D na organske mikofikasatore budući da su slične studije utvrdile kako stanična

stijenka kvasca može adsorbirati vitamin D i do 20% [225]. Nakon statističke obrade podataka iz Slike 22 je razvidno da dodatkom mikofiksatora u mlijeko, vrijednost vitamina D se smanjuje u odnosu na referentnu vrijednost, i tako ostaju cijelo vrijeme trajanja tretmana, a sva odstupanja nalaze se unutar dozvoljenih odstupanja za vitamine [208], te se mlijeko može smatrati sigurnim, odnosno zdravstveno ispravnim za korištenje u prehrani ljudi i/ili životinja.

Post Hoc testom utvrđeno je da između 0-tog i drugog sata vezivanja nema statistički značajne razlike između vremenskog tretmana i korištenih mikofiksatora ($p > 0,05$) kao i u vremenu od 4-tog i 24-tog sata. Navedeni podaci govore u prilog da vrijeme i korišteni mikofiksatori u opisanom vremenskom intervalu nemaju utjecaja na količinu vitamina D u tretiranim uzorcima mlijeka (Tablica 55).

Istraživanja koja su provedena s ciljem utvrđivanja sposobnosti adsorpcije vitamina E vežu se uglavnom uz anorganske mikofiksatore i kvasac. Provedena „*In vitro*“ studija kojom je istraživao utjecaj šest vrsta mikofiksatora na adsorpciju vitamina A, D i E u kombinaciji i pojedinačno, ukazuje da vezivanje vitamina E za mikofiksatore utječe da biološka raspoloživost vitamina E, može biti smanjena, ako vitamin samostalno dolazi u kontakt s mikofiksatorima, a ukoliko je u kombinaciji s drugim vitaminima, adsorpcija je prisutna samo kod anorganskih mikofiksatora [225]. Tablicom 39 i Tablicom 40 prikazani su rezultati koji se odnose na utjecaj vezivanja AFM1 u mlijeku s odabranim mikofiksatorima na vitamin E, ovisno o duljini tretmana. Nevezane količine vitamina E, u 0-tom satu vezivanja, kreću se od 133,3% za sve korištene beta-glukane, osim za beta-glukan iz kvasca (0,005%) gdje je utvrđena količina ne vezanog vitamina od 200%. Tijekom drugog sata vezivanja dolazi do promjene u količini ne vezanog vitamina E, te se vrijednosti kreću od 100% za beta-glukan iz kvasca (0,005%) do 200% za beta-glukan iz kvasca (0,01%), da bi tijekom trajanja tretmana došlo do ujednačavanja količine vitamina E na 133,3% za sve korištene beta-glukane, osim za beta-glukan iz kvasca (0,005%) gdje je u četvrtom satu evidentirano da je količina ne vezanog vitamina E 200% u odnosu na referentnu vrijednost utvrđenu u kontrolnom uzorku mlijeka prije tretmana, a koja je iznosila 0,03 µg/100g. Slični rezultati dobiveni su i kada su kao mikofiksatori korištene BMK. Utvrđeno je da se vrijednosti ne vezanog vitamina E tijekom 24-satnog trajanja tretmana kreću od 100% do 200% (Tablica 40). Nakon statističke obrade podataka iz (Slika 23), gdje su grafički prikazane vrijednosti

svih analiziranih uzoraka, razvidno je da je količina vitamina E tijekom trajanja tretmana iznad referentne vrijednosti za sve analizirane uzorke, a odstupanja dosežu i do 200%, odnosno 100% više od referentne vrijednosti. Navedeno je evidentirano kod korištenja beta-glukan iz kvasca (0,005%), te mrtvih BMK. Zabilježena odstupanja vitamina E u odnosu na referentnu vrijednost, nalaze se iznad preporučenih vrijednosti koje propisuju Smjernice EU (+50%) [208]. Rezultati ukazuju da mlijeko tretirano beta-glukanom iz kvasca (0,005%), te mrtvim BMK nije primjereno za prehranu ljudi, ali se može upotrijebiti kao hrana za životinje, budući da je znanstveni odbor EFSA-e odobrio da se vitamin E može upotrebljavati u dodacima prehrani za životinje u količini od 200 IU vitamina E/kg [226]. Statističkim Post Hoc testom utvrđeno je da nema statistički značajne razlike ($p > 0,05$) u tretmanu od 0-tog do 4-tog sata vezivanja, te od drugog do 24-tog sata vezivanja. Iz navedenih podataka možemo zaključiti da navedena vremena i korišteni mikofiksatora nemaju značajnog utjecaja na promjenu količinu vitamina E u tretiranim uzorcima mlijeka (Tablica 56).

Studije koje su istraživale prisutnost vitamina K u mlijeku, ukazale su na činjenicu da mlijeko ne predstavlja izvor vitamina K jer je njegova količina u mlijeku vrlo niska. U prilog tome govore i rezultati istraživanja koje je provedeno na mlijeku uzorkovanom s tržišta SAD gdje je utvrđeno da su dobivene vrijednosti vitamina K također vrlo niske. Za razliku od mlijeka, kod fermentiranih mliječnih proizvoda, posebno sireva, utvrđene su veće vrijednosti vitamina K, osobito kod onih sireva s većom količinom masti gdje je količina vitamina K proporcionalna količini masti [223, 227].

Na osnovu učešća većeg broja laboratorija u određivanju vitamina K u mlijeku, pokazalo se da se kao metoda za određivanje količine vitamina K preporučuje HPLC tehnika uz reverzibilnu fazu i korištenjem fluorescentnog detektora, a studija koja je provela istraživanje prisutnosti vitamina K na 25 uzoraka mlijeka koristeći navedenu HPLC tehniku, utvrdila je da je iskorištenje metode vrlo visoko i iznosi 91,7% [228, 229]. Određivanje količine vitamina K za potrebe ovog istraživanja provedeno je na 15 uzoraka mlijeka. Za identifikaciju i kvantifikaciju vitamina K korištena je preporučena HPLC s reverzibilnom fazom uz fluorescentni detektor, te je utvrđeno da su količine vitamina K niže od granice kvantifikacije metode (LOQ) koja za vitamin K iznosi 0,01 $\mu\text{g}/100\text{g}$. (Tablica 41 i Tablica 42). Navedeno potvrđuju kromatogrami prikazani Slikama 7, 8 i 9 iz kojih je razvidno da nema vidljivog odaziva na kromatogramu

analiziranog uzorka mlijeka vezanog uz vitamin K, u količini većoj od LOQ, kao niti nakon dodavanja istraživanih beta-glukana i BMK koje se inače koriste za fermentaciju mliječnih proizvoda [223, 228] nije došlo do promjene u vrijednosti vitamina K. Iako ranije opisana studija govori o pozitivnom utjecaju BMK na povećanje vitamina K u sirevima osobito s većom količinom masti, u ovom slučaju one nisu utjecale na njegovo povećanje najvjerojatnije zbog male količine mliječne masti u mlijeku, te kratkog kontakta između mikofiksatora i mlijeka, budući da je cjelokupni tretman trajao maksimalno 24 sata.

Ovim istraživanjem prikupljeni su rezultati za učinkovitost pojedinačnog vezivanja mikofiksatora za AFM1 iz namjerno kontaminiranog mlijeka kako i njihov utjecaj na parametre kvalitete, odnosno zdravstvene ispravnosti. Rezultati predstavljaju znanstveni doprinos u području mikotoksikologije, prehrane i javnog zdravstva, kao i osnovu za daljnja znanstvena istraživanja bioloških mikofiksatora pojedinačno ili u kombinaciji na druge vrste mikotoksina i druge oblike hrane.

.

6 ZAKLJUČAK

Nakon provedenog istraživanja i dobivenih rezultata, kao i provedene rasprave može se zaključiti:

1. Mikofiksatori korišteni u ovom istraživanju pokazuju približno isti afinitet vezivanja AM1 iz namjerno kontaminiranog mlijeka, a srednje vrijednosti efikasnosti vezivanja kreću se od 90,1% do 92,4% za beta-glukan iz kvasca (0,005%) te od 88,4% do 91,6% za BMK.
2. Između korištenih beta-glukana, beta-glukan iz zobi (0,01%) pokazao je najveći afinitet za AFM1 (92,4%), dok je najmanji afinitet uočen kod beta-glukana iz kvasca (0,005%).
3. Kada su korištene BMK, veći afinitet prema AFM1 imaju žive BMK (91,6%), dok je efikasnost vezivanja mrtvih BMK iznosi 88,4%.
4. S obzirom na to da je kod korištenja svih mikofiksatora tijekom tretmana dolazilo do promjene u količinama vezanog i ne vezanog AFM1, možemo zaključiti da se radi o reverzibilnom procesu vezanja AFM1.
5. Beta-glukan iz kvasca ima najmanji utjecaj na vezivanje bjelančevina iz mlijeka tijekom 24 satnog trajanja tretmana, a količina ne vezanih bjelančevina iznosi 101,9% u odnosu na referentnu vrijednost od 3,4 g/100g, dok najveće odstupanje od referentne vrijednosti utvrđeno je kod beta-glukana iz zobi (0,01%) i iznosi 102,7%. Kada su korištene BMK kao mikofiksatori, rezultati pokazuju, da gotovo i nema razlike u vezivanju bjelančevina kada se koriste BMK žive ili BMK mrtve. Odstupanje za BMK mrtve iznosi 102,2%, a za BMK žive 102,6%. Iz rezultata možemo zaključiti da korišteni mikofiksatori podjednako utječu na smanjenje bjelančevina u mlijeku jer razlika između najveće i najmanje količine ne vezanih bjelančevina iznosi 0,8% što se smatra prihvatljivim, te zaključujemo kako istraživani mikofiksatori nemaju utjecaj na vezivanje bjelačevina u količinama većim od dozvoljenih.
6. Kada su u pitanju masti, najmanji utjecaj na njihovo vezivanje utvrđen je kod beta-glukana iz kvasca (0,005%). Količina nevezanih masti u odnosu na referentnu vrijednost iznosi 90,0%, dok je najveće odstupanje uočeno kada se koristi beta-glukan iz zobi (0,005% i 0,01%), a količina ne vezanih masti u odnosu na referentnu vrijednosti iznosi 88,3%. Kod BMK, najmanji utjecaj na

vezivanje bjelančevina imaju BMK mrtve, a odstupanje od referentne vrijednosti iznosi 87%, dok kod BMK žive, iznosi 86,1%. Sva zabilježena odstupanja masti, kod svih korištenih mikofiksatora smatraju se prihvatljivima te zaključujemo kako istraživani mikofiksatori nemaju utjecaj na vezivanje masti u količinama većim od dozvoljenih.

7. Kod ugljikohidrata, možemo zaključiti da istraživani mikofiksatori nisu utjecali na promjenu njihove količine u tretiranom mlijeku, a sva dobivena odstupanja se smatraju prihvatljivim, te se mlijeko, obzirom na sadržaj ugljikohidrata može smatrati sigurnim i prihvatljivim za konzumiranje.
8. Na temelju praćenja utjecaja korištenih mikofiksatora na količinu šećera (laktoze) u tretiranom mlijeku, možemo zaključiti da korišteni beta-glukani i BMK nemaju veliki utjecaj na vezivanje šećera (laktoze) jer vrijednosti ne vezanog šećera iznose od 91,3% do 93,61%, te se se mogu preporučiti za uklanjanje AFM1.
9. Uzevši u obzir dobivene vrijednosti odstupanja za bjelančevine, masti, ugljikohidrate te šećere (laktozu), nakon korištenja mikofiksatora, zaključujemo da na energetska vrijednost mlijeka svi korišteni mikofiksatori imaju gotovo jednaki učinak, budući da je tijekom 24 satnog tretmana utvrđeno da se srednje vrijednosti energije ne vezanih nutrijenata kreću od 89,0% do 89,4%, što ukazuje na činjenicu da se svi istraživani mikofiksatori mogu koristiti u otklanjanu AFM1 iz mlijeka uz zadržavanje omjera nutrijenata u količinama prihvatljivim za prehranu ljudi i/ili životinja.
10. Za sve istraživane mikofiksatore pokazalo se da ne uklanjaju minerale (Ca, Mg, Na, K i P) iz mlijeka u količinama većim od dozvoljenih, te se mogu preporučiti za uklanjanje AFM1, uz zadržavanje prihvatljivih količina istraživanih minerala.
11. Utvrđeno je kako beta-glukan iz zobi (0,005% i 0,01%) i bet glukan iz kvasca (0,01%), te žive BMK imaju utjecaj na vezivanje vitamina A, jer dolazi do njegovog značajnog povećanja od 200% za beta-glukan iz zobi (0,005%) i beta-glukan iz kvasca (0,01%), za 250% kod beta-glukana iz zobi (0,01%), te za žive BMK za 200% u odnosu na preporučeno odstupanje (+50%). Stoga zaključujemo kako se navedeni mikofiksatori ne bi trebali koristiti za uklanjanje AFM1 iz mlijeka ako se želi zadržati postojanost vitamina A. Takvo se mlijeko smatra neprikladnim i nesigurnim za ljudsku prehranu, ali se može koristiti za

prehranu životinja ili kao sirovina za proizvodnju mliječnih proizvoda. Za vitamin D utvrđeno je kako odabrani mikofiksatori ne utječu na promjenu njihovih količina u tretiranom mlijeku u odnosu na referentne vrijednosti i dozvoljena odstupanja, te se može zaključiti kako se korišteni mikofiksatori u ovom istraživanju mogu preporučiti za uklanjanje AFM1 iz mlijeka, a da će mlijeko i dalje u svom sastavu imati prihvatljive količine vitamina D, te će se moći koristiti za ljudsku prehranu. Mlijeko tretirano beta-glukanom iz kvasca (0,005%), te mrtvim BMK nije primjereno za prehranu ljudi jer količine vitamina E odstupaju od propisanih, ali se može upotrijebiti kao hrana za životinje ili kao sirovina za proizvodnju novih proizvoda. Korištenje ostalih mikofiksatora (beta-glukan iz kvasca 0,01%, beta-glukan iz zobi 0,005% i 0,01%, te BMK žive) nije utjecalo na odstupanja E vitamina u količinama većih od propisanih, stoga se mogu preporučiti za korištenje u svrhu vezivanja AFM1 iz mlijeka. Kod vitamina K utvrđeno je da dodavanje bioloških mikofiksatora nema utjecaja na promjenu njegove vrijednosti, s obzirom na to, da je njegova količina u mlijeku prije i nakon tretmana ostala ista (0,01 µg/100g).

12. S obzirom na duljinu tretmana, svi istraživani mikofiksatori svoju efikasnost vezivanja AFM1 u namjerno kontaminiranom mlijeku pokazuju već u 0-tom satu vezivanja, uz prihvatljiva odstupanja nutrijenata i mikronutrijenata, osim kada je u pitanju beta-glukan iz zobi (0,01%) i vezivanje vitamina A, te beta-glukan iz kvasca (0,005%) i mrtve BMK kad se govori o vezivanju vitamina E.
13. Statističkom obradom podatka utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0,05$) između duljine trajanja tretmana i korištenog mikofiksatora kod bjelancevina, masti, ugljikohidrata i šećera (laktoze), vitamina A, vitamina D i vitamina E, dok kod ukupne energetske vrijednosti, te vezivanja natrija, kalija, i fosfora, postoje statistički značajne razlike ($p < 0,05$).
14. Dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost primjene organskih mikofiksatora za uklanjanje AFM1 iz mlijeka, uz minimalni utjecaj na sastav mlijeka, čime se osigurava primjerena kvaliteta i zdravstvena ispravnost mlijeka za prehranu ljudi i/ili životinja, te se isti mogu predložiti proizvođačima mlijeka i nadležnim institucijama, ali i Znanstvenom panelu Europske agencije za sigurnost hrane da istraživane mikofiksatore odobre za rutinsku upotrebu.

7 LITERATURA

1. Comodo N, Bonaccorsi G. The new EU regulations for food safety. *Ital J Public Health*. 2012;4(1):7-12.
2. Stelzl T, Belc N, Cito N, et al. European food safety research: an explorative study with funding experts' consultation. *Heliyon*. 2023;9(12):1-14.
3. Pročišćene verzije Ugovora o Europskoj uniji i Ugovora o funkcioniranju Europske unije. *Služb List Eur unije*. 2016;(C 202/01).
4. European Commission. Communication from the commission to the European Parliament, the European Council, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions - The European Green Deal. Brussels: European Commission; 2019. COM(2019) 640 final.
5. European Commission. Komunikacija Komisije Europskom parlamentu, Vijeću, Europskom gospodarskom i socijalnom odboru i Odboru regija - Strategija „od polja do stola” - za pravedan, zdrav i ekološki prihvatljiv prehrambeni sustav. Brussels: European Commission; 2020. COM(2020) 381 final.
6. Europski parlament i Vijeće EU. Uredba (EZ) br. 178/2002 o utvrđivanju općih načela i uvjeta zakona o hrani, osnivanju Europske agencije za sigurnost hrane te utvrđivanju postupaka u područjima sigurnosti hrane. *Služb List Eur unije*. 2002.
7. Europska komisija. Uredba Komisije (EZ) br. 2073/2005 od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu. *Služb List Eur unije*. 2005;(L3381/1). Konsolidirani tekst od 08.03.2020.
8. Europska komisija. Uredba Komisije (EU) 2023/915 od 25. travnja 2023. o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani i o stavljanju izvan snage Uredbe (EZ) br. 1881/2006. *Služb List Eur unije*. 2023;(L 119/103).
9. Pleadin J, Frece J, Markov K. Mycotoxins in food and feed. *Adv Food Nutr Res*. 2019;89:297-345.
10. Adeyeye SAO, Yildiz F. Fungal mycotoxins in foods: a review. *Cogent Food Agric*. 2016;2(1):1-11.
11. Europski parlament i Vijeće EU. Uredba (EU) br. 1169/2011 od 25. listopada 2011. o informiranju potrošača o hrani, izmjeni uredbi (EZ) br. 1924/2006 i (EZ)

- br. 1925/2006 te o stavljanju izvan snage određenih direktiva. Služb List Eur unije. 2011;(L304/18);168-213.
12. Zakon o zaštiti životinja. Nar Nov. 2017;(102).
 13. Europski parlament i Vijeće EU. Uredba (EZ) br. 396/2005 o maksimalnim razinama ostataka pesticida u ili na hrani i hrani za životinje biljnog i životinjskog podrijetla. Konsolidirani tekst: Uredba (EZ) br. 1333/2008 o prehrambenim aditivima.
 14. Mikaeili A, Karimi I, Bakhtiari T. The preliminary study on the contamination of warehouse-stored pistachios with aflatoxinogenic fungi in Kermanshah, Iran: the tip of the iceberg. *KSU J Nat Sci.* 2010;13(2):4-7.
 15. Dagnas S, Membré JM. Predicting and preventing mold spoilage of food products. *J Food Prot.* 2013;76(3):538-51.
 16. Reddy KRN, Salleh B, Saad B, Abbas HK, Abel CA, Shier WT. An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Rev.* 2010;29(1):3-26.
 17. Yang C, Song G, Lim W. Effects of mycotoxin-contaminated feed on farm animals. *J Hazard Mater.* 2020;389:122087.
 18. Eskola M, Kos G, Elliott CT, Hajšlová J, Mayar S, Krska R. Worldwide contamination of food crops with mycotoxins: validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2020;60(16):2773-89.
 19. Coffey R, Lummins E, Ward S. Exposure assessment of mycotoxins in dairy milk. *Food Control.* 2009;20:239-49.
 20. Ushkalov V, Danchuk V, Midyk S, Voloshchuk N, Danchuk O. Mycotoxins in milk and in dairy products. *Food Sci Technol.* 2020;14(3):137-49.
 21. Bailly JD, Guerre P. Mycotoxins in meat and processed meat products. In: Toldrá F, editor. *Safety of meat and processed meat. Food Microbiol Food Saf.* New York, NY: Springer; 2009.
 22. Kaynarca HD, Hecer C, Ulusoy B. Mycotoxin hazard in meat and meat products. *Atatürk Univ Vet Sci J.* 2019;14(1):90-7.
 23. Omar SS. Prevalence, level and health risk assessment of mycotoxins in the fried poultry eggs from Jordan. *Environ Res.* 2021;200:111701.

24. International Agency for Research on Cancer (IARC). Aflatoxins. In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France: IARC; 2002.
25. Sassahara M, Pontes Neto D, Yanaka EK. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Paraná state. *Food Chem Toxicol.* 2005;43:981-4.
26. Sforza S, Dall'Astra C, Marchelli R. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 2006;25:54-76.
27. Pleadin J, Frece J, Markov K. Aflatoksini - Onečišćenje, učinci i metode redukcije. *Croat J Food Technol Biotechnol Nutr.* 2014;9(3-4):75-82.
28. Medina A, Rodriguez A, Magan N. Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production. *Front Microbiol.* 2014;5:348.
29. Palfi M, Knežević N, Vrandečić K, Čosić J. Mikotoksini u hrani - zakonodavni okvir. *Glas Biljne Zaštite.* 2020;20(4):472-83.
30. Petrović E, Čosić J, Vrandečić K, Godena S. Occurrence of mycotoxins in food and beverages. *J Cent Eur Agric.* 2023;24(1):137-50.
31. García-Pérez OD, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Cavazos DV, Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D. Effectiveness of aluminosilicate-based products for detoxification of aflatoxin-contaminated diets for juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Cienc Mar.* 2013;39(1):1-13.
32. de Almeida JSFD, Doležal R, Krejcar O, et al. Molecular modeling studies on the interactions of aflatoxin B1 and its metabolites with human acetylcholinesterase. Part II: Interactions with the catalytic anionic site (CAS). *Toxins (Basel).* 2018;10(10):389.
33. Pleadin J, Lešić T, Kmetič I, Markov K, Zadravec M, Frece J, et al. Toksični učinci mikotoksina: Mehanizam djelovanja i mikotoksikoze. *Hr Čas Prehramb Tehnol Biotehnol Nutr.* 2020;15(1-2):3-10.
34. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(3):497-516.
35. Bilandžić N, Varenina I, Božić Đ, Sedak M, Đokić M, Solomun Kolanović B, Cvetnić Ž. Aflatoksin M1 u mlijeku i mliječnim proizvodima. *Vet Stanica.* 2013;44(3):195-203.

36. Grenier B, Applegate TJ. Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: meta-analysis of published experiments in animals. *Toxins (Basel)*. 2013;5(2):396-430.
37. Kew MC. Prevention. In: Lau WY, editor. *Hepatocellular carcinoma*. New Jersey: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd; 2008. p. 85-185.
38. Lizárraga-Paulín EG, Moreno-Martínez E, Miranda-Castro SP. Aflatoxins and their impact on human and animal health: an emerging problem [Internet]. In: *Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology*. InTech; 2011.
39. Guevara-González RG, editor. *Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology*. IntechOpen; 2011.
40. Lee SD, Yu IS, Jung K, Kim YS. Incidence and level of aflatoxins contamination in medicinal plants in Korea. *Microbiology*. 2014;42(4):339-45.
41. Min L, Fink-Gremmels J, Li D, Tong X, Tang J, Nan X, et al. An overview of aflatoxin B1 biotransformation and aflatoxin M1 secretion in lactating dairy cows. *Anim Nutr*. 2021;7(1):42-8.
42. Kumar VV. Aflatoxins: properties, toxicity and detoxification. *Nutr Food Sci Int J*. 2018;6(5):1.
43. Santos Pereira C, Cunha SC, Fernandes JO. Prevalent mycotoxins in animal feed: occurrence and analytical methods. *Toxins (Basel)*. 2019;11(5):290.
44. Markov K, Pleadin J, Bevardi M, Vahčić N, Sokolić-Mihalak D, Frece J. Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control*. 2013;34:312-7.
45. Britzi M, Friedman S, Miron J, et al. Carry-over of aflatoxin B1 to aflatoxin M1 in high yielding Israeli cows in mid- and late-lactation. *Toxins (Basel)*. 2013;5(1):173-83.
46. Di Stefano V, Pitonzo R, Cicero N, D'Oca MC. Mycotoxin contamination of animal feedingstuff: detoxification by gamma-irradiation and reduction of aflatoxins and ochratoxin A concentrations. *Food Addit Contam*. 2014;31:2034-9.
47. Giovati L, Magliani W, Ciociola T, Santinoli C, Conti S, Polonelli L. AFM₁ in milk: physical, biological, and prophylactic methods to mitigate contamination. *Toxins (Basel)*. 2015;7(10):4330-49.

48. Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Risk assessment of aflatoxins in food. *EFSA J.* 2020;18(3):6040.
49. Raghdha AES, Jebur AB, Kang W, et al. An overview on the major mycotoxins in food products: characteristics, toxicity, and analysis. *J Future Foods.* 2020;2(2):91-102.
50. Pleadin J, Zadavec M, Lešić T, Frece J, Vasilj V, Markov K. Klimatske promjene - potencijalna prijetnja još znatnijoj pojavnosti mikotoksina. *Vet Stanica.* 2020;51(6):659-71.
51. Zingales V, Tarouncher M, Martino PA, Ruiz MJ, Caloni F. Climate change and effects on molds and mycotoxins. *Toxins.* 2022;14(7):445.
52. Cardwell KF, Desjardins A, Henry SH, Munkvold G, Robens J. Mycotoxins: the cost of achieving food security and food quality. *APSnet Features.* 2001.
53. Varga I, Solomun Kolanović B, Varenina I, Božić Luburić Đ, Bilanžić N. Kontaminacija mliječnih proizvoda aflatoksinom M1. *Vet Stanica.* 2020;50(5):547-56.
54. Dorić I, Lisak Jakopović K, Barukčić I, Božanić R. Croatian J Food Technol Biotechnol Nutr. 2019;14(1-2):24-32.
55. Movassaghghazani M, Shabansalmani N. Assessment of aflatoxin M1 in human breast and powdered milk in Tehran, Iran. *Toxicon.* 2024;237:107530.
56. Iqbal SZ, Jinap S, Pirouz AA, Ahmad Faizal AR. Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. *Trends Food Sci Technol.* 2015;46:111-5.
57. Ezekiel CN, Abia WA, Braun D, et al. Mycotoxin exposure biomonitoring in breastfed and non-exclusively breastfed Nigerian children. *Environ Int.* 2022;158:106996.
58. Markov K, Frece J, Čvek D, Lovrić N, Delaš F. Aflatoxin M1 in raw milk and binding of aflatoxin by lactic acid bacteria. *Mljekarstvo.* 2010;60(4):244-51.
59. Emh E, Gunbeaj M, Ashraf SA, El-Akary NB, Sherwani S, Awadelkareem AM, et al. Effect of storage on the level of aflatoxin M1 in milk and other dairy products sold at Tripoli Province, Libya. *J Pure Appl Microbiol.* 2018;2(4):1959-64.
60. Huwig A, Freimund S, Käppeli O, Dutler H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol Lett.* 2001;122(2):179-88.

61. Di Gregorio MC, Neeff DV, de Jager AV, Corassin CH, Carão AC, de Albuquerque R, Oliveira CAF. Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. *Toxin Rev.* 2014;33(3):125-35.
62. García-Pérez OD, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Cavazos DV, Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D. Effectiveness of aluminosilicate-based products for detoxification of aflatoxin-contaminated diets for juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Cienc Mar.* 2013;39(1):1-13.
63. Doll D, Danicke S, Valenta V, Flachowsky G. In vitro studies on the evaluation of mycotoxin detoxifying agents for their efficacy on deoxynivalenol and zearalenone. *Arch Anim Nutr.* 2004;58(4):311-24.
64. Chefchaou H, Mzabi A, Tanghort M, et al. A comparative study of different mycotoxin adsorbents against DON, T2 toxin, aflatoxins, and fumonisins production in maize flour. *Livest Res Rural Dev* [Internet]. 2019 [cited 2025 Feb 8];31(3). Available from: <http://www.lrrd.org/lrrd31/3/hanan31035.html>
65. Schatzmayr G, Zehner F, Täubel M, et al. Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Mol Nutr Food Res.* 2006;50(6):543-51.
66. Vieira SL. Nutritional implications of mould development in feedstuffs and alternatives to reduce the mycotoxin problem in poultry feeds. *World's Poult Sci J.* 2003;59(1):111-22.
67. Gupta AD, Rawat KP, Bhadauria V, Singh H. Recent trends in the application of modified starch in the adsorption of heavy metals from water: A review. *Carbohydr Polym.* 2021;269:117763.
68. Li Y, Tian G, Dong G, et al. Research progress on the raw and modified montmorillonites as adsorbents for mycotoxins: A review. *Appl Clay Sci.* 2018;163:299-311.
69. Jakopović Ž, Čanak I, Romac A, Kuharić Ž, Bošnjir J, Ivešić M, et al. Usporedba vezanja AFM1 iz mlijeka živim, mrtvim i liofiliziranim stanicama BMK. *Hr Čas Prehramb Tehnol Biotehnol Nutricion* [Internet]. 2018 [cited 2025 Feb 8];13(1-2):32-37. Available from: <https://doi.org/10.31895/hcptbn.13.1-2.3>
70. Jouany JP. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Anim Feed Sci Technol.* 2007;137:342-62.

71. Yiannikouris A, André G, Buléon A, et al. Comprehensive conformational study of key interactions involved in zearalenone complexation with beta-D-glucans. *Biomacromolecules*. 2004;5(6):2176-85.
72. Yiannikouris A, André-Leroux G, Poughon L, et al. Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with beta-D-glucans. *Biomacromolecules*. 2006;7(4):1147-55.
73. Shetty PH, Jespersen L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends Food Sci Technol*. 2006;17(2):48-55.
74. Hanif N, Muhammad G, Siddique M, Khanum A. Clinico-pathomorphological, serum biochemical and histological studies in broilers fed ochratoxin A and a toxin deactivator (Mycofix® Plus). *Br Poult Sci*. 2008;49(5):632-42.
75. Campagnollo FB, Franco LT, Rottinghaus GE, et al. In vitro evaluation of the ability of beer fermentation residue containing *Saccharomyces cerevisiae* to bind mycotoxins. *Food Res Int*. 2015;77(3):643-8.
76. Aazami MH, Nasri MHF, Mojtahedi M, Battacone G. Effect of yeast cell wall and (1→3)-β-D-glucan on transfer of aflatoxin from feed to milk in Saanen dairy goats. *Anim Feed Sci Technol*. 2019;254:114191.
77. Aazami MH, Nasri MHF, Mojtahedi M, Mohammadi SR. In vitro aflatoxin B1 binding by the cell wall and (1→3)-β-D-glucan of baker's yeast. *J Food Prot*. 2018;81(4):670-6. doi:10.4315/0362-028X.JFP-17-412
78. Hodnik V, Anderluh G. Toxin detection by surface plasmon resonance. *Sensors*. 2009;9(3):1339-54.
79. Zoghi A, Khosravi-Darani K, Sohrabvandi S. Surface binding of toxins and heavy metals by probiotics. *Mini Rev Med Chem*. 2014;14(1):84-98.
80. Corassin CH, Bovo F, Rosim RE, Oliveira CAF. Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M1 in UHT skim milk. *Food Control*. 2013;31:80-3.
81. Nowak K, Wiater A, Choma A, Wiącek D, Bieganski A, Siwulski M, Waśko A. Fungal (1 → 3)-α-D-glucans as a new kind of biosorbent for heavy metals Int *J Biol Macromol*. 2019;137:960–5.

82. Yiannikouris A, Francois J, Poughon L, Dussap CG, Jeminet G, Bertin G, Jouany JP. Influence of pH on complexing of model β -D-glucans with zearalenone. *J Food Prot.* 2004;67(12):2745.
83. Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME, Terlikowska KM. Quantitative evaluation of 1,3,1,6 β -D-glucan contents in wild-growing species of edible Polish mushrooms. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2017;68(3):281-90.
84. Rakowska R, Sadowska A, Dybkowska E, Świdorski F. Spent yeast as a natural source of functional food additives. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2017;68(2):115-21.
85. Ahmad A, Kaleem M. β -Glucan as a food ingredient. In: *Biopolymers for Food Design*. Amsterdam: Elsevier; 2018. p. 351–81.
86. Lange E. Oats products as functional food. *ŻYWNOSĆ Nauka Technologia Jakość/Food Sci Technol Qual.* 2010;3(70):7-24.
87. Ciecierska A, Drywień ME, Hamulka J, Sadkowski T. Nutraceutical functions of beta-glucans in human nutrition. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2019;70(4):315-24.
88. Jurkaninová L, Dvořáček V, Gregusová V, Havrlentová M. Cereal β -d-glucans in food processing applications and nanotechnology research. *Foods.* 2024;13(3):500.
89. Kaur R, Sharma M, Ji D, Xu M, Agyei D. Structural features, modification, and functionalities of beta-glucan. *Fibers.* 2020;8(1):1-29.
90. Abbas H, Wilkinson J, Zablotowicz R, Accinelli C, Abel C, Bruns H, Weaver M. Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Rev.* 2009;28(2–3):142–53.
91. Vetvicka V. Effects of β -glucan on some environmental toxins: An overview. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2014;158(1):1-4.
92. Aureli P, Capurso L, Castellazzi AM, Clerici M, Giovannini M, Morelli L, et al. Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacol Res.* 2011;63:366-76.
93. Šušković J, Kos B, Beganović J, Leboš Pavunc A, Habjanič K, Matošić S. Antimicrobial activity – the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technol Biotechnol.* 2010;48(3):296-307.

94. Florou-Paneri P, Christaki E, Bonos E. Lactic acid bacteria as a source of functional ingredients. In: Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes. InTech; 2013.
95. Ahlberg SH, Joutsjoki V, Korhonen HJ. Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *Int J Food Microbiol.* 2015;207:87-102.
96. Sevim S, Topal GG, Tengilimoglu-Metin MM, Sancak B, Kizil M. Effects of inulin and lactic acid bacteria strains on aflatoxin M1 detoxification in yoghurt. *Food Control.* 2019;100:235-9.
97. Makarova KS, Koonin EV. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J Bacteriol.* 2007;189(4):1199-208.
98. Frece J, Čvek D, Kovačević D, Gobin I, Kovač T, Markov K. Karakterizacija bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* 1K izoliranog iz „slavonskog kulena“ kao probiotičke funkcionalne starter kulture. *Meso.* 2010;XII(4):208-14.
99. Malbon K. Neonatal nutrition and metabolism. *Arch Dis Child.* 2007;92(4):F328.
100. Kechagias C. *Milk Science, Technology and Quality Assurance Controls.* 1st ed. 2011;34:143-59.
101. Pravilnik o mlijeku i mliječnim proizvodima, NN. 2009:20.
102. Pike RL, Brown ML. *Nutrition: An Integrated Approach.* New York: John Wiley & Sons; 1984.
103. Vahčić N, Hruškar M, Marković K, Banović M, Colić Barić I. Essential minerals in milk and their daily intake through milk consumption. *Mljekarstvo.* 2010;60(2):77-85.
104. Zamberlin Š, Antunac N, Havranek J, Samaržija D. Mineral elements in milk and dairy products. *Mljekarstvo.* 2012;62(2):111-25.
105. Malbe M, Oustavel T, Kodis I, Viitak A. Content of selected micro and macro elements in dairy cows. *Agron Res.* 2010;8(Special Issue II):323-6.
106. Cashman KD. Macroelements, nutritional significance. In: Roginski H, Fuquay JW, Fox PF, editors. *Encyclopedia of Dairy Sciences.* No. 3. London: Academic Press; 2002. p. 2051-8.
107. Moreno-Rojas R, Zurera-Cosano G, Amaro-Lopez MA. Concentration and seasonal variation of calcium, magnesium, sodium, and potassium in raw cow, ewe, and goat milk. *Int J Food Sci Nutr.* 1994;45(2):99-105.

108. Soetan KO, Olaiya CO, Oyewole OE. The importance of mineral elements for humans, domestic animals, and plants - a review. *Afr J Food Sci.* 2021;4(5):200-22.
109. Muneer K. Concentrations of major and minor elements in cow's milk at Najaf Province. *Kufa J Vet Med Sci.* 2016;7(2):9-14.
110. De la Fuente MA, Olano A, Juarez M. Distribution of calcium, magnesium, phosphorus, zinc, manganese, copper, and iron between the soluble and colloidal phases of ewe's and goat's milk. *Le Lait.* 1997;77(4):515-20.
111. Morris RC, Sebastian A, Forman A, Tanaka M, Schmidlin O. Normotensive salt-sensitivity: effects of race and dietary potassium. *Hypertension.* 1999;33:18-23.
112. Canabady-Rochellea LS, Mellemab M. Physical-chemical comparison of cow's milk proteins versus soy proteins in their calcium-binding capacities. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2010;366:110-2.
113. Dorić I, Lisak Jakopović K, Barukčić I, Božanić R. Influence of milk on human health. *Croat J Food Technol Biotechnol Nutr.* 2019;14(1-2):24-32.
114. Theobald HE. Dietary calcium and health. *Nutr Bull.* 2005;30:237-77.
115. Buzinaro EF, Almeida RN, Mazeto GM. Bioavailability of dietary calcium. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50(5):852-61.
116. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for protein. *EFSA J.* 2012;10(2):2557.
117. Wu G. Dietary protein intake and human health. *Food Funct.* 2016;7:1251-65.
118. Health Council of the Netherlands. Dietary reference values for protein. 2021/10, The Hague, 2 March 2021.
119. Howe PE. Foods of animal origin. *JAMA.* 1950;143(15):1337-42. doi:10.1001/jama.1950.82910500017008.
120. Sá AGA, Moreno YMF, Carciofi BAM. Plant proteins as high-quality nutritional sources for the human diet. *Trends Food Sci Technol.* 2022;97:170-84.
121. Spector AA, Kim HY. Discovery of essential fatty acids. *J Lipid Res.* 2015;56(1):11-21.
122. Ravisankar P, Reddy AA, Nagalakshmi B, Koushik OS, Kumar BV, Anvith PS. The comprehensive review on fat-soluble vitamins. *IOSR J Pharm.* 2015;5(1):12-28.

123. Tomé-Rodríguez S, Barba-Palomeque F, Ledesma-Escobar CA, Miho H, Díez CM, Priego-Capot F. Influence of genetic and interannual factors on the fatty acids profile of virgin olive oil. *Food Chem.* 2023;422:136175.
124. Opiyo SA, Mugendi B, Njoroge PW, Wanjiru SN. A review of fatty acid components in avocado. *IOSR J Appl Chem.* 2023;16(3):18-27.
125. Alonso L, Fraga MJ, Juárez M. Determination of trans fatty acids and fatty acid profiles in margarines marketed in Spain. *JAOCs.* 2000;77(2):131-6.
126. Willett WC, Stampfer MJ, Manson JE, Golditz GA, Speizer FE, Rosner BA, Sampson LA, Hennekens CH. Intake of trans fatty acids and risk of coronary heart disease among women. *Lancet.* 1993;341:581–5.
127. Carroll KK. Dietary fats and cancer. *Am J Clin Nutr.* 1991;53(4).
128. Hall WL. Dietary saturated and unsaturated fats as determinants of blood pressure and vascular function. *Nutr Res Rev.* 2009;22(1):18-38.
129. DiNicolantonio JJ, O'Keefe JH. Monounsaturated fat vs saturated fat: Effects on cardio-metabolic health and obesity. *Mo Med.* 2022;119(1):69-73.
130. Griel AE, Ruder EH, Kris-Etherton PM. The changing roles of dietary carbohydrates: from simple to complex. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(9):1958-65.
131. González-Montemayor AM, Flores-Gallegos AC, Serrato-Villegas LE, López-Pérez MG, Montañez-Sáenz JC, Rodríguez-Herrera R. Honey and syrups: Healthy and natural sweeteners with functional properties. In: *Natural Beverage.* 2019;13:43-177.
132. Puddu PE, Menotti A. Simple versus complex carbohydrates and health: A frequently neglected problem. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2021;31(7):1949-52.
133. Wang S, Guo P. Botanical sources of starch. In: Wang S, editor. *Starch: Structure, Functionality and Application in Foods.* Singapore: Springer; 2020.
134. Pavlek Ž, Bošnjir J, Kuharić Z, Racz A, Jurak I, Lasić D, et al. The influence of binding of selected mycotoxin deactivators and aflatoxin M1 on the content of selected micronutrients in milk. *Processes.* 2022;10:2431.
135. Li K, Wang XF, Li DY, Chen YC, Zhao LJ, Liu XG, et al. The good, the bad, and the ugly of calcium supplementation: A review of calcium intake on human health. *Clin Interv Aging.* 2018;13:2443-52.

136. Cashman KD. Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. *Br J Nutr.* 2002;87(S2):S169-S177.
137. Nicklas TA. Calcium intake trends and health consequences from childhood through adulthood. *J Am Coll Nutr.* 2003;22(5):340–56.
138. Ilesanmi-Oyelere BL, Kruger MC. The role of milk components, pro-, pre-, and synbiotic foods in calcium absorption and bone health maintenance. *Front Nutr.* 2020;7:1-7.
139. Muscariello R, Rendina D, Giannettino R, et al. Calcium daily intake and the efficacy of a training intervention on optimizing calcium supplementation therapy: A clinical audit. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2021;31(1):354-360.
140. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific opinion on dietary reference values for calcium. *EFSA J.* 2015;13(5):4101.
141. Sanders GT, Huijgen HJ, Sanders R. Magnesium in disease: A review with special emphasis on the serum ionized magnesium. *Clin Chem Lab Med.* 1999;37:1011-33.
142. Rude RK, Gruber HE. Magnesium deficiency and osteoporosis: Animal and human observations. *J Nutr Biochem.* 2004;15(12):710-6.
143. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific opinion on dietary reference values for magnesium. *EFSA J.* 2015;13(7):4186.
144. Eustina O, Hilton Deeth C. Magnesium in milk. *Int Dairy J.* 2017;71:89-97.
145. Rosanoff A, Kumssa DB. Impact of rising body weight and cereal grain food processing on human magnesium nutrition. *Plant Soil.* 2020;457:5–23.
146. Tremblay A, Gagné MP, Pérusse L, Fortier C, Provencher V, Corcuff R, et al. Sodium and human health: What can be done to improve sodium balance beyond food processing? *Nutrients.* 2024;16(8):1199.
147. World Health Organization. WHO Global Report on Sodium Intake Reduction. Geneva, Switzerland: WHO; 2023.
148. Kodintsev VV, Lenda IV, Ponomarev AV, Naumov NA, Salatov YaS. Sodium as one of the basic elements in human life. *Eur J Nat Hist.* 2022;5:4-8. UDC 612.392.69.
149. Weaver CM. Potassium and health. *Adv Nutr.* 2013;4(3):368S-77S.
150. McLean RM, Wang NX. Potassium. In: *Advances in Food and Nutrition Research.* 2021;96:89-121.

151. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), Turck D, Bresson JL, Burlingame B, Dean T, Fairweather-Tait S, Heinonen M, Hirsch-Ernst KI, et al. Dietary reference values for potassium. *EFSA J.* 2016;14(10):156.
152. Frassetto LA, Goas A, Gannon R, Lanham-New SA, Lambert H. Potassium. *Adv Nutr.* 2023;14(5):1237-40.
153. Soetan KO, Olaiya CO, Oyewole OE. The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. *Afr J Food Sci.* 2010;4(5):200-22.
154. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for phosphorus. *EFSA J.* 2015;13(7):4185.
155. Lukaski HC. Vitamin and mineral status: Effects on physical performance. *Nutrition.* 2004;20(7–8):632-44.
156. Godswil CA, Somtochukwu VI, Ikechukwu A, Echeta Chinelo K. Health Benefits of Micronutrients (Vitamins and Minerals) and their Associated Deficiency Diseases: A Systematic Review. *Internat J Food Sci.* 2020;3(1):1-32.
157. Pham VT, Dold S, Rehman A, Bird JK, Steinert RE. Vitamins, the gut microbiome and gastrointestinal health in humans. *Nutr Res.* 2021;95:35-53.
158. Urena-Torres P, Souberbielle JC. Pharmacologic role of vitamin D natural products. *Curr Vasc Pharmacol.* 2014;12(2):278-85.
159. Roos N, Leth T, Jakobsen J, Thilsted SH. High vitamin A content in some small indigenous fish species in Bangladesh: perspectives for food-based strategies to reduce vitamin A deficiency. *Int J Food Sci Nutr.* 2002;53(5):425–37.
160. UNICEF. Vitamin A Deficiency and Supplementation. UNICEF Dana, 2018.
161. Imdad A, Herzer K, Mayo-Wilson E, Yakoob MY, Bhutta ZA. Vitamin A supplementation for preventing morbidity and mortality in children from 6 months to 5 years of age. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;3(3):CD008524.
162. Vranešić Bender D, Giljević Z, Kušec V, Laktašić Žerjavić N, Bošnjak Pašić M, Vrdoljak E, et al. Smjernice za prevenciju, prepoznavanje i liječenje

- nedostatak vitamina D u odraslih. Liječn vjesn. 2016;138(5-6): [cited 2024 Jul 15]. Available from: <https://hrcak.srce.hr/172851>
163. Hadizadeh F. Supplementation with vitamin D in the COVID-19 pandemic? *Nutr Rev.* 2021;79(2):200-8.
 164. Sutlović D. Toksikologija hrane, Toksikologija dodataka prehrani i dijetetskih proizvoda. Split: Web knjižara, 2011.
 165. EFSA. Outcome of a public consultation on the Draft Scientific Opinion of the EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) on Dietary Reference Values for vitamin D; Dietary reference values for vitamin D.
 166. Jiang Q. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radic Biol Med.* 2014;72:76-90.
 167. Lobo LMC, Hadler MCM. Vitamin E deficiency in childhood: a narrative review. *Nutr Res Rev.* 2023;36(2):392-405.
 168. Traber MG. Human Vitamin E deficiency, and what is and is not Vitamin E? *Free Radic Biol Med.* 2024;213:285-92.
 169. EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA). Scientific opinion on the tolerable upper intake level for vitamin E. *EFSA J.* 2024;8:e8953.
 170. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies. *EFSA J.* 2015;13(7):4149.
 171. Thane CW, Paul AA, Bates CJ, Bolton-Smith C, Prentice A, Shearer MJ. Intake and sources of phyloquinone (vitamin K1): variation with socio-demographic and lifestyle factors in a national sample of British elderly people. *Br J Nutr.* 2002;87:605–13.
 172. Shearer MJ. The roles of vitamins D and K in bone health and osteoporosis prevention. *Proc Nutr Soc.* 1997;56:915–37.
 173. Schurgers LJ, Dissel PE, Spronk HM, Soute BA, Dhore CR, Cleutjens JP, Vermeer C. Role of vitamin K and vitamin K-dependent proteins in vascular calcification. *Z Kardiol.* 2001;90(3):57-63.
 174. Shearer MJ. Vitamin K deficiency bleeding (VKDB) in early infancy. *Blood Rev.* 2009;23:49–59.
 175. World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nations. Vitamin and mineral requirements in human nutrition: report of a joint

- FAO/WHO expert consultation, Bangkok, Thailand, 21–30 September 1998. 341 pp.
176. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Dietary reference values for vitamin K. EFSA J. 2017;5(5):4780.
177. Vaz A, Cabral Silva AC, Rodrigues P, Venâncio A. Detection Methods for Aflatoxin M1 in Dairy Products. Microorganisms. 2020;8(2):246.
178. HRN EN ISO 14501:2008. Mlijeko i mlijeko u prahu -- Određivanje sadržaja aflatoksina M1 -- Pročišćavanje pomoću imunoafinitetne kromatografije i određivanje pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (ISO 14501:2007; EN ISO 14501:2007).
179. Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata. NN:2005:02.
180. Uredbi komisije (EZ) br. 401/2006 o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani.
181. Sir i proizvodi na bazi topljenog sira -- Određivanje sadržaja masti -- Gravimetrijska metoda (Referentna metoda) (ISO 1735:2004; EN ISO 1735:2004). HRN EN ISO 1735:2008.
182. Mlijeko -- Određivanje sadržaja dušika -- 1. dio: Kjeldahlovo načelo i izračunavanje sirovih proteina (ISO 8968-1:2014; EN ISO 8968-1:2014).
183. HRN EN ISO/IEC 17025:2017. Opći zahtjevi za osposobljenost ispitnih i umjerenih laboratorija.
184. Radna uputa 31-054 Za određivanje ugljikohidrata, energije i soli računski. NZZJZ dr. Andrija Štampar.
185. Radna uputa proizvođača ICP-MS, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Agilent Technologies.
186. SOP 298-053. NZZJZ dr. Andrija Štampar.
187. R Core Team. A Language and Environment for Statistical Computing. R. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2024.
188. The jamovi project. jamovi (Version 2.5.7.0) [Computer Software], 2024.
189. Casu A, Camardo Leggieri M, Toscano P, Battilani P. Changing climate, shifting mycotoxins: A comprehensive review of climate change impact on mycotoxin contamination. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2024;23(2):e13323.

190. Kos J, Anić M, Radić B, Zadavec M, Janić Hajnal E, Pleadin J. Climate Change—A Global Threat Resulting in Increasing Mycotoxin Occurrence. *Foods*. 2023;12(14):2704.
191. Wu Q, Jezkova A, Yuan Z, Pavlikova L, Dohnal V, Kuca K. Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metab Rev*. 2009;41(1):1-7.
192. Liu DL, Yao DS, Liang YQ, Zhou TH, Song YP, Zhao L, Ma L. Production, purification, and characterization of an intracellular aflatoxin-detoxifying enzyme from *Armillariella tabescens* (E-20). *Food Chem Toxicol*. 2001;39(5):461-6.
193. Regulation (EC) No 1831/2003 Of The European Parliament And Of The Council on additives for use in animal nutrition. *OJ L*. 2023;268:29.
194. Fuchs S, Sontag G, Stidl R, Ehrlich V, Kundi M, Knasmüller S. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food Chem Toxicol*. 2008;46:1398–407.
195. Pires RC, da Costa Calumby J, Rosim RE, Pires RD, Borowsky AM, Ali S, et al. Evaluation of Ability of Inactivated Biomasses of *Lactobacillus rhamnosus* and *Saccharomyces cerevisiae* to Adsorb Aflatoxin B1 In Vitro. *Foods*. 2024;13(20):3299.
196. Luo Y, Liu X, Yuan L, Li J. Complicated interactions between bio-adsorbents and mycotoxins during mycotoxin adsorption: Current research and future prospects. *Trends Food Sci Technol*. 2020;96:127-34.
197. Wang Y, Jiang L, Zhang Y, Ran R, Meng X, Liu S. Research advances in the degradation of aflatoxin by lactic acid bacteria. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2023;23(1):e20230029.
198. Fakhrabadipour M, Khajehrahimi AE, Haghdoost NS, Anvar SA, Tala M. Efficiency of *Bifidobacterium bifidum* and *Saccharomyces cerevisiae* for detoxification of aflatoxin M1 in skim milk. *Int J Dairy Technol*. 2023;76(3):564–71.
199. Fulgoni VL, Keast DR, Auestad N, Quann EE. Nutrients from dairy foods are difficult to replace in Americans' diets: food pattern modeling and an analysis of the National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2006. *Nutr Res*. 2011;31(10):759-65.
200. Pereira PC. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*. 2014;30(6):619-27.

201. Georgieva D, Kharchevnikov S, Roshan A, Kravtsov V. Recent trends in the characterization of milk proteins: The role of proteinases in the proteolysis of milk proteins. *Dairy Sci Technol*. 2023;103(1):1-17.
202. Górská-Warsewicz H, Rejman K, Laskowski W, Czeczotko M. Milk and dairy products and their nutritional contribution to the average Polish diet. *Nutrients*. 2019;11(8):1771.
203. Carraro A, De Giacomo A, Giannossi ML, Medici L, Muscarella M, Palazzo L, et al. Clay minerals as adsorbents of aflatoxin M1 from contaminated milk and effects on milk quality. *Appl Clay Sci*. 2014;88–89:92-9.
204. Kolosova A, Stroka J. Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: a review. *World Mycotoxin J*. 2011;4(3):225-56.
205. Faucet-Marquis V, Joannis-Cassan C, Hadjeba-Medjdoub K, Ballet N, Pfohl-Leszkowicz A. Development of an in vitro method for the prediction of mycotoxin binding on yeast-based products: case of aflatoxin B1, zearalenone, and ochratoxin A. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(17):7583-96.
206. Synytsya A, Novak M. Structural analysis of glucans. *Ann Transl Med*. 2014;2(2):17.
207. Chapot-Chartier MP, Kulakauskas S. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microb Cell Fact*. 2014;13(1).
208. Smjernice za nadležna tijela za provjeru usklađenosti sa sljedećim zakonodavstvom EU-a: Uredbom (EU) br. 1169/2011 Europskog parlamenta i Vijeća od 25. listopada 2011. o informiranju potrošača o hrani. NN, 2012.
209. El-Naggar MA, Thabit TM. Evaluation of β -d-glucan biopolymer as a novel mycotoxin binder for fumonisin and deoxynivalenol in soybean feed. *Foodborne Pathog Dis*. 2014;11(6):433-8.
210. Gambelli L. Milk and its sugar-lactose: A picture of evaluation methodologies. *Beverages*. 2017;3(3):1-6.
211. Sharafbafi N, Tosh SM, Alexander M, Corredig M. Phase behaviour, rheological properties, and microstructure of oat β -glucan-milk mixtures. *Food Hydrocolloids*. 2014;41:274-80.
212. Mykhalevych A, Polishchuk G, Nassar K, Osmak T, Buniowska-Olejniak M. β -Glucan as a techno-functional ingredient in dairy and milk-based products—A review. *Molecules*. 2022;27(19):6313.

213. Tian L, Xiong D, Jia J, Liu X, Zhang Y, Duan X. Mechanism study on enhanced emulsifying properties of phosvitin and calcium-binding capacity of its phosphopeptides by lactic acid bacteria fermentation. *LWT*. 2022;155:113002.
214. Hayek S, Ibrahim S. Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: A review. *Food Nutr Sci*. 2013;4(11A):73-87.
215. Biel W, Kazimierska K, Bashutska U. Nutritional value of wheat, triticale, barley, and oat grains. *Acta Sci Pol Zootechnica*. 2020;19(2):9-28.
216. Chappell A, Scott KP, Griffiths IA, Cowan AA, Hawes C, Wishart J, Martin P. The agronomic performance and nutritional content of oat and barley varieties grown in a northern maritime environment depends on variety and growing conditions. *J Cereal Sci*. 2017;74:1-10.
217. Hayek SA, Gyawali R, Aljaloud SO, Krastanov A, Ibrahim SA. Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products. *J Dairy Res*. 2019;86(4):490-502.
218. Demirbas A. β -Glucan and mineral nutrient contents of cereals grown in Turkey. *Food Chem*. 2005;90(4):773-7.
219. De Angelis M, Gallo G, Rosaria Corbo M, McSweeney PLH, Faccia M, Giovine M, Gobbetti M. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Int J Food Microbiol*. 2023;87(3):259-70.
220. Lopez Y, Gordon DZ, Fields ML. Release of phosphorus from phytate by natural lactic acid fermentation. *J Food Sci*. 1983;8(3):953-4.
221. Bovo F, Corassin CH, Rosim RE, et al. Efficiency of lactic acid bacteria strains for decontaminating aflatoxin M1 in phosphate buffer saline solution and in skimmed milk. *Food Bioprocess Technol*. 2013;6:2230-4.
222. Gaucheron F. Milk and dairy products: A unique micronutrient combination. *J Am Coll Nutr*. 2011;30(5):400S-9S.
223. Öste R, Jägerstad M, Andersson I. Vitamins in milk and milk products. In: Fox PF, editor. *Advanced dairy chemistry volume 3*. Boston: Springer; 2011. p. 823-72.
224. Kihal A, Rodríguez-Prado ME, Cristofol C, Calsamiglia S. Short communication: Quantification of the effect of mycotoxin binders on the bioavailability of fat-soluble vitamins in vitro. *Animals*. 2021;11(8):2251.

225. Sánchez RC, Martorell JC, Baldoví EC. Neutralización de micotoxinas por sustancias adsorbentes. *Nereis*. 2012;4:77-88.
226. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Scientific opinion on the safety and efficacy of vitamin E as a feed additive for all animal species. *EFSA J*. 2010;8(6):1635.
227. Fu X, Harshman SG, Shen X, Haytowitz DB, Karl JP, Wolfe BE, Booth SL. Multiple vitamin K forms exist in dairy foods. *Curr Dev Nutr*. 2017;1(6):e000638.
228. Indyk HE, Woollard DC. Determination of vitamin K in milk and infant formulas by liquid chromatography: Collaborative study. *J AOAC Int*. 2000;83(1):21-130.
229. Chase W, Eitenmiller RR, Long AR. Liquid chromatographic analysis of vitamin K1 in milk-based infant formula with matrix solid-phase dispersion. *J AOAC Int*. 1999;82(5):1140-5.

POPIS SLIKA I TABLICA

POPIS SLIKA

Slika 1. Kemijska struktura aflatoksina

Slika 2. Prikaz unosa mikotoksina u prehrambeni lanac čovjeka putem „*carry over*“ efekta

Slika 3. Aflatoksin M1 (AFM1) u 2D (A) i 3D (B) prikazu

Slika 4. Princip razdvajanja analita pomoću imunoafinitetnih kolona

Slika 5. Shematski prikaz procesa u ICP-MS instrumentu od uvođenja uzorka do analize masa

Slika 6. Uređaj induktivno spregnute plazme s masenim detektorom (ICP-MS 7800) proizvođača Agilent

Slika 7. Kromatografski prikaz mlijeka 2,8% m.m.

Slika 8. Grafički prikaz vezivanja AFM1 iz mlijeka i odabranih mikofikastora

Slika 9. Kromatogramski prikaz standarda Vitamina K

Slika 10. Kromatografski prikaz mlijeka 2,8% m.m.

Slika 11. Grafički prikaz vezivanja bjelančevina iz mlijeka i odabranih mikofikastora

Slika 12. Grafički prikaz vezivanja masti iz mlijeka i odabranih mikofikastora

Slika 13. Grafički prikaz vezivanja ugljikohidrata iz mlijeka i odabranih mikofikastora

Slika 14. Grafički prikaz vezivanja šećera (laktoze) iz mlijeka i odabranih mikofikastora

Slika 15. Grafički prikaz Energije kJ iz mlijeka i odabranih mikofikastora

Slika 16. Grafički prikaz vezivanja kalcija iz mlijeka i odabranih mikofikastora

Slika 17. Grafički prikaz vezivanja magnezija iz mlijeka i odabranih mikofikastora

Slika 18. Grafički prikaz vezivanja natrij iz mlijeka i odabranih mikofikastora

Slika 19. Grafički prikaz vezivanja kalij iz mlijeka i odabranih mikofikastora

Slika 20. Grafički prikaz vezivanja iz mlijeka i odabranih mikofikastora

Slika 21. Grafički prikaz vezivanja Vitamina A iz mlijeka i odabranih mikofikastora

Slika 22. Grafički prikaz vezivanja vitamina D iz mlijeka i odabranih mikofikastora

Slika 23. Grafički prikaz vezivanja vitamin E iz mlijeka i odabranih mikofikastora

POPIS TABLICA

Tablica 1. Kemikalije za analizu AFM1

Tablica 2. Kemikalije za određivanje nutrijenata

Tablica 3. Kemikalije za određivanje mikronutrijenata

Tablica 4. Popis certificiranih referentnih materijala (mikronutrijenti) koji su korišteni u ovom istraživanju

Tablica 5. Pomoćni instrumenti

Tablica 6. Mjerni instrumenti

Tablica 7. Parametri validacije metode za određivanje AFM1 LC-MS/MS tehnikom

Tablica 8. Parametri validacije, kriterija prihvatljivosti i dobivenih vrijednosti za određivanje masti

Tablica 9. Parametri validacije, kriterija prihvatljivosti i dobivenih vrijednosti za određivanje bjelančevina

Tablica 10. Uvjeti rada tekućinskog kromatografa (HPLC) za određivanje fruktoze, glukoze, saharoze i laktoze

Tablica 11. Uvjeti rada tekućinskog kromatografa (HPLC) za određivanje vitamina

Tablica 12. Uvjeti rada instrumenta ICP-MS

Tablica 13. Prikaz vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobi ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica. 14 Prikaz vezivanja **AFM1** u mlijeku mikofiksatorima BMK-žive i BMK-mrtve ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 15. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobi na količinu **bjelančevina** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 16. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na količinu **bjelančevina** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 17. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobi na količinu **masti** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 18. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na količinu **masti** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 19. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobi na količinu **ugljikohidrata** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 20. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na količinu **ugljikohidrata** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 21. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobi na količinu **šećera (laktoze)** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 22. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na količinu **šećera (laktoze)** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 23. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobi na **energiju kJ/100 g** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 24. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na **energiju kJ/100 g** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 25. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobi na količinu **kalcija** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 26. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na količinu **kalcija** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 27. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobi na količinu **magnezija** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 28. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na količinu **magnezija** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 29. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobu na količinu **natrija** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 30. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na količinu **natrija** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 31. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobu na količinu **kalija** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 32. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na količinu **kalija** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 33. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobu na količinu **fosfora** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 34. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na količinu **fosfora** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 35. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobu na količinu **vitamina A** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 36. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na količinu **vitamina A** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 37. prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobu na količinu **vitamina D** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 38. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima BMK žive i BMK mrtve na količinu **vitamina D** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 39. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatorima beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobu na količinu **vitamina E** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 40. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatora BMK žive i BMK mrtve na količinu **vitamina E** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 41. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatora beta-glukanom iz kvasca i beta-glukanom iz zobu na količinu **vitamina K** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 42. Prikaz utjecaja vezivanja AFM1 u mlijeku mikofiksatora BMK žive i BMK mrtve na količinu **vitamina K** u mlijeku ovisno o duljini vezivanja (tretmana)

Tablica 43. Usporedba vezivanja AFM1 i odabranih mikofiksatora u odnosu na vrijeme vezivanja - Post Hoc Test

Tablica 44. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu bjelačevina u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Tablica 45. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu masti u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Tablica 46. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu ugljikohidrata u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Tablica 47. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu šećera (laktoze) u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Tablica 48. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na energiju kJ u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Tablica 49. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu kalcija u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Tablica 50. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu magnezija u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Tablica 51. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu natrija u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Tablica 52. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu kalija u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Tablica 53. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu fosfora u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Tablica 54. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu vitamina A u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Tablica 55. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu vitamina D u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Tablica 56. Utjecaj vezivanja odabranih mikofiksatora na količinu vitamina E u mlijeku ovisno o vremenu vezivanja - Post Hoc Test

Životopis

EUROPEAN CURRICULUM VITAE FORMAT



OSOBNOSTNE OBAVIJESTI

Ime	ŽELJKA PAVLEK
Adresa	PODGORAČKA 8
Telefon	0958956168
Faks	/
E-pošta	zpavlek71@gmail.com
URL	

Nacionalnost	HRVATICA
Državljanstvo	REPUBLIKE HRVATSKE
Datum rođenja	02.02.1971

RADNO ISKUSTVO

- | | |
|--------------------------------------|---|
| • Datum (od – do) | 1989-1990 |
| • Naziv i sjedište tvrtke zaposlenja | Zavod za javno zdravstvo grada Zagreba |
| • Vrsta posla ili područje u | Službi za zdravstvenu ekologiju,
Odjel za ispitivanje pitkih i otpadnih voda |
| • Zanimanje i položaj koji obnaša | Kemijski tehničar |
| • Osnovne aktivnosti i odgovornosti | Poznavanje i primjena radnih uputa za određivanje pitkih i otpadnih voda, uzimanje uzoraka na terenu i njihova obrada u laboratoriju. Poznavanje Normi i drugih propisa vezanih uz analitičke metode koje se primjenjuju u Laboratoriju. Rukovanje i rad sa priborom i opremom. |
| | Znanje rada na PC |
| | Kritično i kreativno razmišljanje |
| | Etičnost |

- | | |
|--------------------------------------|--|
| • Datum (od – do) | 2002-2007 |
| • Naziv i sjedište tvrtka zaposlenja | Zavod za javno zdravstvo grada Zagreba |
| • Vrsta posla ili područje | Službi za zdravstvenu ekologiju
Laboratorij za ispitivanje tla i otpada |
| • Zanimanje i položaj koji obnaša | kemijski tehničar |
| • Osnovne aktivnosti i odgovornosti | Poznavanje i primjena radnih uputa za određivanje parametara u otpadu i ispitivanje tla i njegovih parametara, uzimanje uzoraka na terenu i njihova obrada u laboratoriju. Poznavanje Normi i drugih propisa vezanih uz analitičke metode koje se primjenjuju u Laboratoriju. Rukovanje i rad sa priborom i opremom. |
-
- | | |
|--------------------------------------|---|
| • Datum (od – do) | 2007-2015 |
| • Naziv i sjedište tvrtke zaposlenja | Nastavni zavod za javno zdravstvo Dr. Andrija Štampar |
| • Vrsta posla ili područje u | Službi za zdravstvenu ekologiju
Odjel za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu hrane i predmeta opće uporabe |
| • Zanimanje i položaj koji obnaša | kemijski tehničar, |
| • Osnovne aktivnosti i odgovornosti | Poznavanje i primjena radnih uputa za određivanje pesticida, mikotoksina, alergena, PAH-spojeva i antibiotika hrani. Poznavanje Normi i drugih propisa vezanih uz analitičke metode koje se primjenjuju u Laboratoriju. Rukovanje i rad sa priborom i opremom u svrhu određivanja parametara kvalitete meda, pesticida, alergena, mikotoksina i antibiotika i PAH spojeva |
-
- | | |
|--------------------------------------|---|
| • Datum (od – do) | 2015- danas |
| • Naziv i sjedište tvrtke zaposlenja | Nastavni zavod za javno zdravstvo Dr. Andrija Štampar |
| • Vrsta posla ili područje u | Službi za zdravstvenu ekologiju
Odjel za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu hrane i predmeta opće uporabe |
| • Zanimanje i položaj koji obnaša | |
| • Osnovne aktivnosti i odgovornosti | Zdravstveni djelatnik I.vrste

Kontinuirano ispitivanje kvalitete i onečišćenja hrane na području Republike Hrvatske. |

Sudjeluje u izradi planova, elaborata i izvještaja o kakvoći hrane bilo cjelovitih ili kao dijela većih studija
 Izrađuje dokumente sustava upravljanja, primjenjuje uspostavljenu dokumentaciju sustava upravljanja
 Vrednuje metode ispitivanja, utvrđuje prikladnost metode ispitivanja za namijenjenu svrhu tako što provodi verifikaciju, validaciju te procjenjuje mjernu nesigurnost.
 Provodi ispitivanja primjenom najsloženijih analitičkih metoda, provodi unutarnju i vanjsku kontrolu kvalitete rezultata ispitivanja, evidentira nesukladnosti te provodi popravne radnje.
 Sudjeluje u stručnim i znanstvenim projektima i posebnim istraživanjima.

- Datum (od – do) 2015-danas
- Naziv i sjedište tvrtke zaposlenja Zdravstveno veleučilište u Zagrebu, Katedra za prehranu i analitičke tehnike
- Vrsta posla ili područje Vježbe iz kemijske analize hrane, Sudjelovanje u nastavi, te znanstveno istraživačkim projektima
- Zanimanje i položaj koji obnaša
- Osnovne aktivnosti i odgovornosti Asistent, Katedra za prehranu i analitičke tehnike

Sudjelovanje u pripremi i izvođenju vježbi iz kemijske analize hrane

ŠKOLOVANJE I IZOBRAZBA

- Datum (od – do) 2006-2010
- Naziv i vrsta obrazovne ustanove Fakultet zdravstvenih studija, Univerzitet Sarajevo
- Osnovni predmet /zanimanje Sanitarno inženjerstvo
- Naslov postignut obrazovanjem diplomirani sanitarni inženjer
- Stupanj nacionalne kvalifikacije (ako postoji) HKO-7
- Datum (od – do) 1985-1989
- Naziv i vrsta obrazovne ustanove Kemijsko tehnološki obrazovni centar
- Osnovni predmet /zanimanje
- Naslov postignut obrazovanjem Kemijski tehničar
- Stupanj nacionalne kvalifikacije (ako postoji) HKO- 4,2

OSOBNOSTNE VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI

MATERINJI JEZIK HRVATSKI

DRUGI JEZICI

- sposobnost čitanja engleski, makedonski, njemački
- sposobnost pisanja engleski, makedonski
- sposobnost usmenog izražavanja engleski, makedonski, njemački

SOCIJALNE VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI

Član komore zdravstvenih radnika

ORGANIZACIJSKE VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI

Vještine vođenja, upravljanja te organizacije poslova. Sposobnost analitičkog razmišljanja i pronalaženja najoptimalnijih rješenja. Pouzdanost i odgovornost u radu. Dobro razvijene koordinacijske sposobnosti pri radu u epidemiološkoj službi s ciljem sprečavanja širenja COVID-19 pandemije.

TEHNIČKE VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI

Iskustvo rada na spektrofotometrijskim i kolorimetrijskim (ELISA) metodama. Pretraživanje i korištenje znanstvenih baza i weba. Napredno poznavanje Microsoft Office TM alata (Word TM, Excel TM, Power Point TM). Osnovno poznavanje aplikacija grafičkog dizajna (Photoshop TM). Iskustvo statističke analize s paketom SPSS statistika. Pretraživanje i korištenje znanstvenih baza podataka i znanstvenih web aplikacija.

VOZAČKA DOZVOLA

B kategorija

DODATNE OBAVIJESTI

Samohrani roditelj, dvoje djece

DRUGE VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI

Radovi u časopisima

Znanstveni i pregledni radovi

1. Pavlek, Željka; Bosnir, Jasna; Kuharić, Željka; Racz, Aleksandar; Jurak, Ivan; Lasić, Dario; Markov, Ksenija; Jakopović, Željko; Frece, Jadranka

The Influence of Binding of Selected Mycotoxin Deactivators and Aflatoxin M1 on the Content of Selected Micronutrients in Milk. // *Processes*, 10 (2022), 2430, 12 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

2. Pavlek, Željka; Bošnir, Jasna; Ivešić, Martina; Sonja Serdar, Sonja; Kuharić, Željka; Jakopović, Željko; Frece, Jadranka; Markov, Ksenija; Čanak, Iva; Aleksandar Racz, Aleksandar

Istraživanje kvalitete mlijeka nakon uklanjanja AFM1 bakterija mliječne kiseline i beta-glukana. // *Medica Jadertina*, 51 (2021), 1; 5-12 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

3. Brkić, Danijel; Jajetić, Andrea; Racz, Aleksandar; Benić, Marijan; Pavlek, Željka; Kuharić, Željka; Šabarić, Jasenka; Prskalo, Ivana; Bošnir, Jasna

Žitarice i mlinski proizvodi kao dobar izvor magnezija u svakodnevnoj prehrani. // *Journal of applied health sciences*, 7 (2021), 1; 71-86 doi:10.24141/1/7/1/7 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

4. Uršulin-Trstenjak, Natalija; Puntarić, Dinko; Levanić, Davor; Gvozdić, Vlatka; Pavlek, Željka; Puntarić, Ada; Puntarić, Eda; Puntarić, Ida; Vidosavljević, Domagoj; Lasić, Dario; Vidosavljević, Marina

Pollen, Physicochemical, and Mineral Analysis of Croatian Acacia Honey Samples: Applicability for Identification of Botanical and Geographical Origin. // *Journal of Food Quality*, 2017 (2017), 1-11 doi:10.1155/2017/8538693 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Stručni radovi

5. Jakopović, Željko; Čanak, Iva; Romac, Anamarija; Kuharić, Željka; Bošnir, Jasna; Ivešić, Martina; Frece, Jadranka; Pavlek, Željka; Markov, Ksenija

Usporedba vezanja AFM1 iz mlijeka živim, mrtvim i liofiliziranim stanicama BMK. // *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 13 (2018), 1-2; 32-37 (međunarodna recenzija, članak, stručni)

Drugi radovi u časopisima

1. Jakopović, Željko; Čanak, Iva; Frece, Jadranka; Bošnir, Jasna; Ivešić, Martina; Kuharić, Željka; Pavlek, Željka; Markov, Ksenija

Uklanjanje kompleksa β -glukan-AFM1 iz mlijeka. // *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 14 (2018), 3-4; 136-139 (međunarodna recenzija, članak, ostalo)