

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Uklanjanje aflatoksina M1 i metala iz mlijeka primjenom
bakterija mliječne kiseline i β -glukana

1. Uvod

Mikotoksini

- gr. mykes – gljiva, toxicon – otrov
- sekundarni metaboliti plijesni
- uzročnici različitih bolesti —————> mikotoksikoze
- procjena Organizacije za prehranu i poljoprivredu (eng. FAO) – 25% prehrambenih proizvoda u svijetu kontaminirano je mikotoksinima



- zadnjih godina je uočena prisutnost mikotoksina u hrani za ljude i životinje - EU RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) sustav žurnog uzbunjivanja

- 2013.g. su u Hrvatskoj utvrđene povišene koncentracije aflatoksina M1, odnosno koncentracije iznad najviših dopuštenih količina od $0,05 \mu\text{gkg}^{-1}$

- mikotoksini se najčešće otkriju u orašastim plodovima (pistacio, kikiriki, bademi)

- zabrinutost oko pojave mikotoksina u gotovim proizvodima životinjskog podrijetla

- traže se rješenja za smanjenje koncentracije mikotoksina

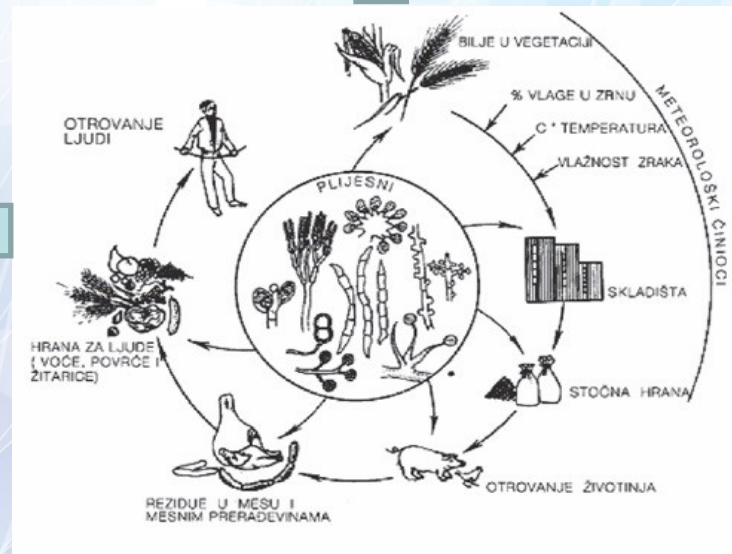
- potrebno razviti zdravstveno prihvatljive metode za smanjenje konc. mikotoksina



Put mikotoksina u hranidbenom lancu

Veliki problem je odsutnost senzorskog upozorenja prilikom konzumacije hrane koja sadrži mikotoksine

Do nastanka mikotoksina može doći u polju, tijekom žetve i transporta te skladištenja

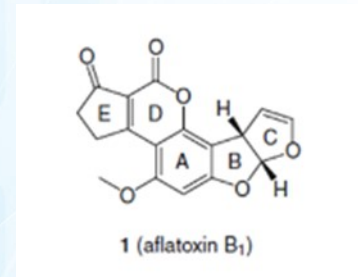


Mikotoksini su opasni zbog visoke toksičnosti u malim količinama

Zabrinutost oko ulaska mikotoksina u prehrambeni lanac čovjeka, kroz meso, jaja, mlijeko i mliječne proizvode ako su životinje bile hranjene krmom kontaminiranom plijesnima koje sintetiziraju mikotoksine, ili samim mikotoksinima („carry over” efekt)

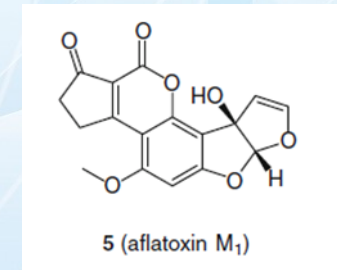
• AFB1

- razgradnjom u jetri nastaju izrazito karcinogeni metaboliti
- smatra se najviše toksičnim, mutagenim i karcinogenim među poznatim mikotoksinima
- skupina 1 spojeva s dokazanim karcinogenim učinkom (IARC)



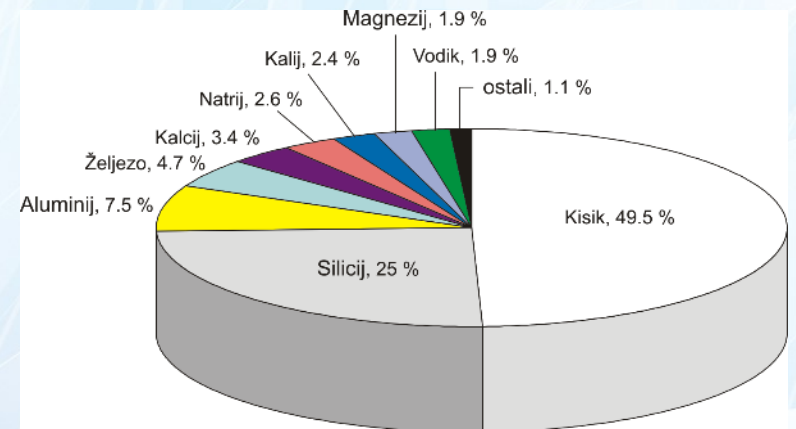
• AFM1

- produkt biološke pretvorbe AFB1 u mliječnim žlijezdama sisavaca hranjenih krmom koja bila kontaminirana AFB1
- afinitet prema proteinima mlijeka (nalazi se u mliječnim proizvodima)
- relativno stabilna molekula, nemogućnost inaktivacije toplinskim tretmanima poput pasterizacije
- opasnost za potrošače velikih količina mlijeka, poput djece



Metali

- prirodno prisutni u Zemljinoj kori (zastupljenost oko 25%)



- onečišćenje okoliša metalima posljedica je antropogenih aktivnosti (rudarstvo, taljenje)
- u mlijeku prirodno prisutni Cu, Fe i Zn, ali njihova povećana konc. negativno utječe na stabilnost i kvalitetu mlijeka

Biofiksatori

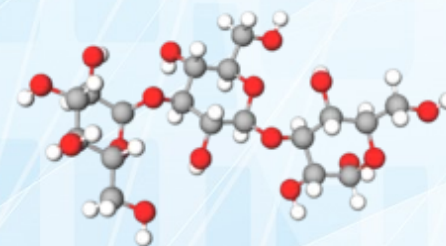
Fizikalne i kemijske metode detoksifikacije ↔ Upotreba mikrobnih kultura

Najčešće se koriste prirodni i sintetski zeoliti kao dodaci krmivima

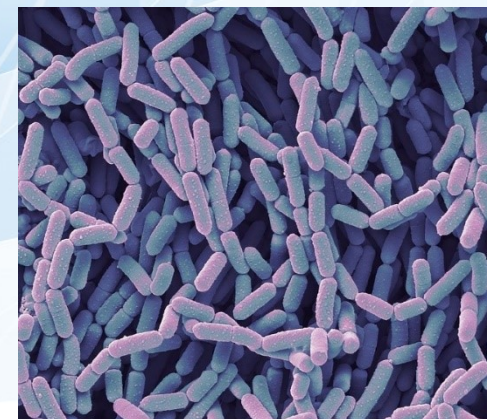
Uklanjanju aflatoksine na bazi adsorpcije

Nedostatak - apsorbiraju i potrebne hranjive tvari

β -glukan

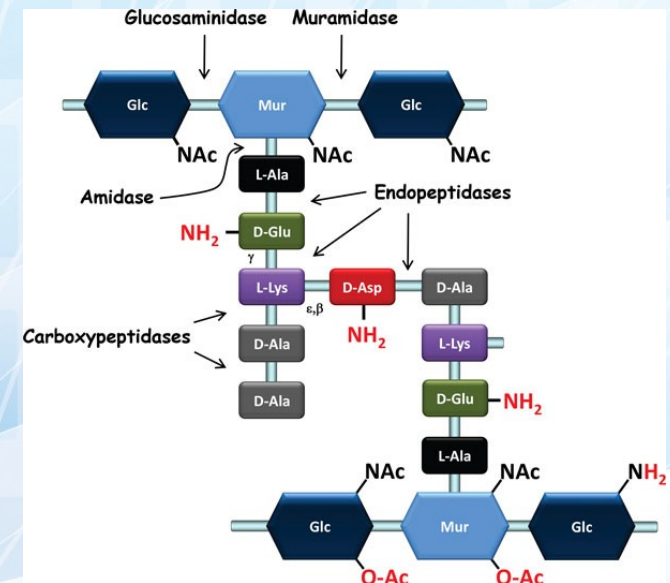


L. rhamnosus



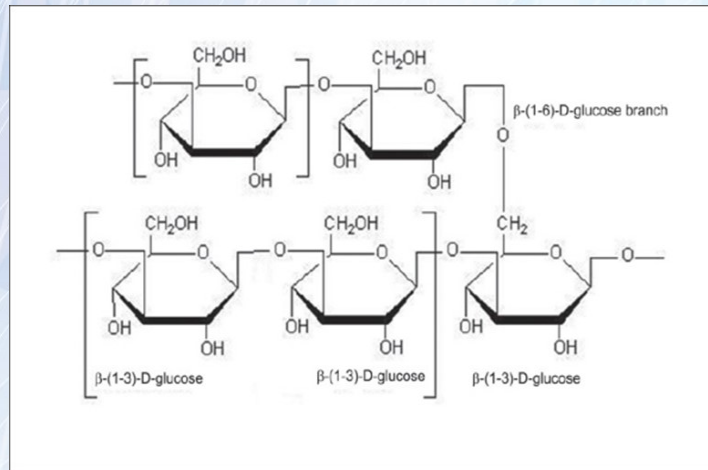
Bakterije mliječne kiseline

- sposobnost uklanjanja mikotoksina i iona metala (efikasnost varira od niskih % uklanjanja do skoro potpunog uklanjanja)
- svaki soj djeluje specifično
- složen proces (ovisi o uvjetima u okolišu)



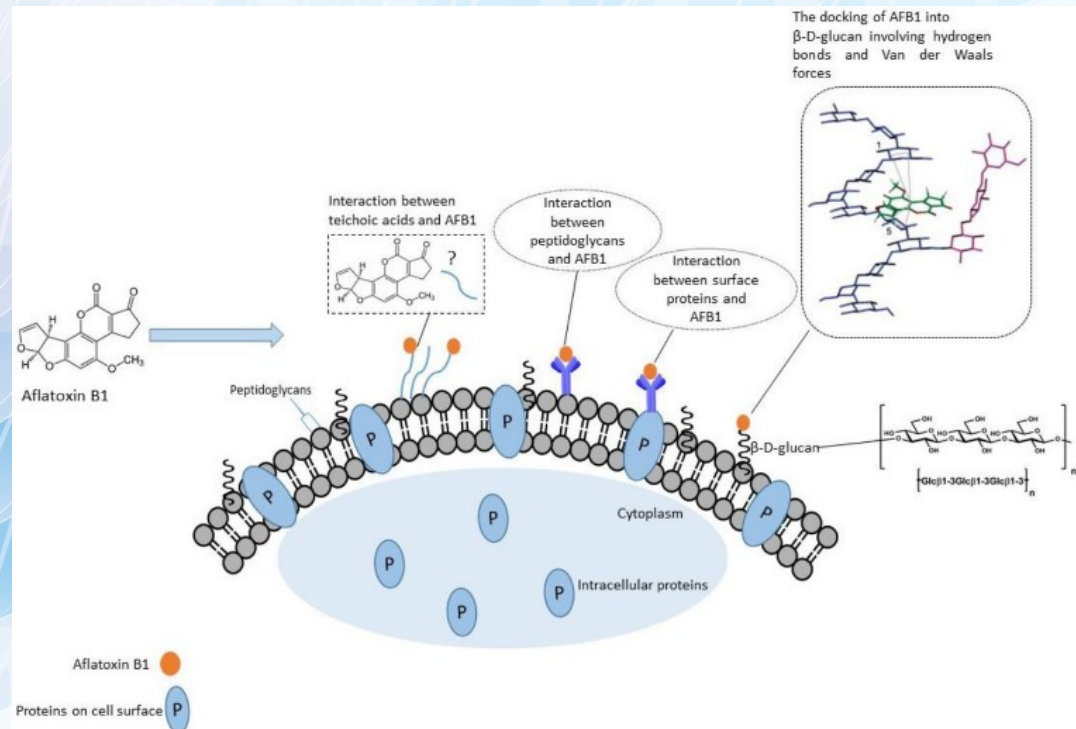
β - glukana

- najvažnija biološka aktivnost β – glukana - sposobnost reguliranja imunološkog sustava
- glavni izvor β – glukana – žitarice (zob, ječam)



Vežanje AFM1 bakterijama mliječne kiseline

- **vežanje (adsorpcija) i otpuštanje (desorpcija)**
- učinkovitost vežanja povezana sa sojem bakterije, kao i s brojem mjesta vežanja na površini stanice
- **polisaharid i peptidoglikan st. stijenke** odgovorni za vežanje mutagena
- slabe nekovalentne veze (Van der Waals veze, vodikove veze ili hidrofobne interakcije)

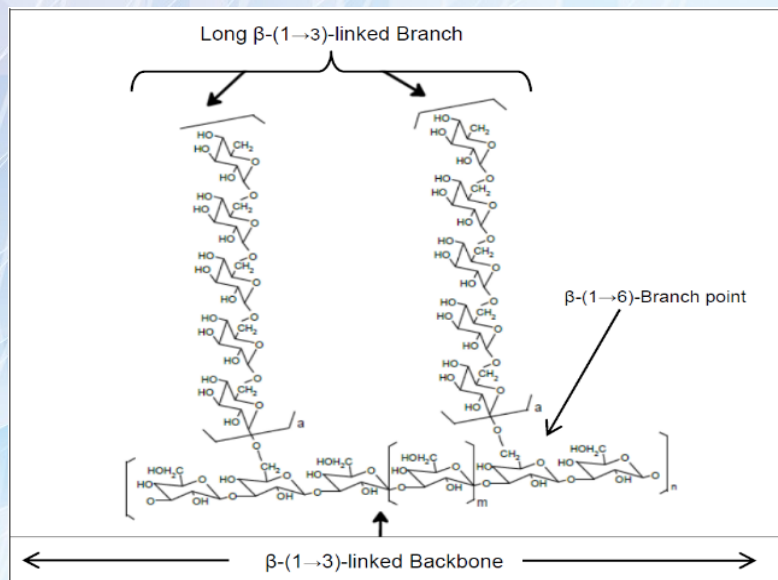


Vežanje iona metala pomoću bakterija mliječne kiseline

- dva osnovna mehanizma vežanja: **biosorpcija** i **bioakumulacija**
- biosorpcija: pasivni proces vežanja iona na st. stijenku bakterija, ne uključuje metaboličke procese
- bioakumulacija: proces vežan uz metabolizam prilikom kojeg ioni metala prolaze kroz st. membranu i akumuliraju se u stanici
- površina BMK – peptidoglikan, proteini, polisaharidi, teihoične kiseline (karboksilne, fosfatne, hidroksilne grupe) → veliki broj liganda sposobnih za vežanje kationa (Cd^{2+} , Pb^{2+})

Mehanizam vezanja mikotoksina β -glukanom

- β -D-glukani, posebice oni vezani **β -1 \rightarrow 3 vezom**, a na mjestima grananja **β -1 \rightarrow 6 vezom**, mogu regulirati prisutnost aflatoksina
- vezanje molekula aflatoksina u dva koraka:
 1.) molekula aflatoksina je zarobljena unutar jednostrukog heliksa lanca povezanog β -1 \rightarrow 3 vezom
 2.) razgranati lanci glukana povezani β -1 \rightarrow 6 vezom obavijaju molekulu toksina i zadržavaju je unutar heliksa



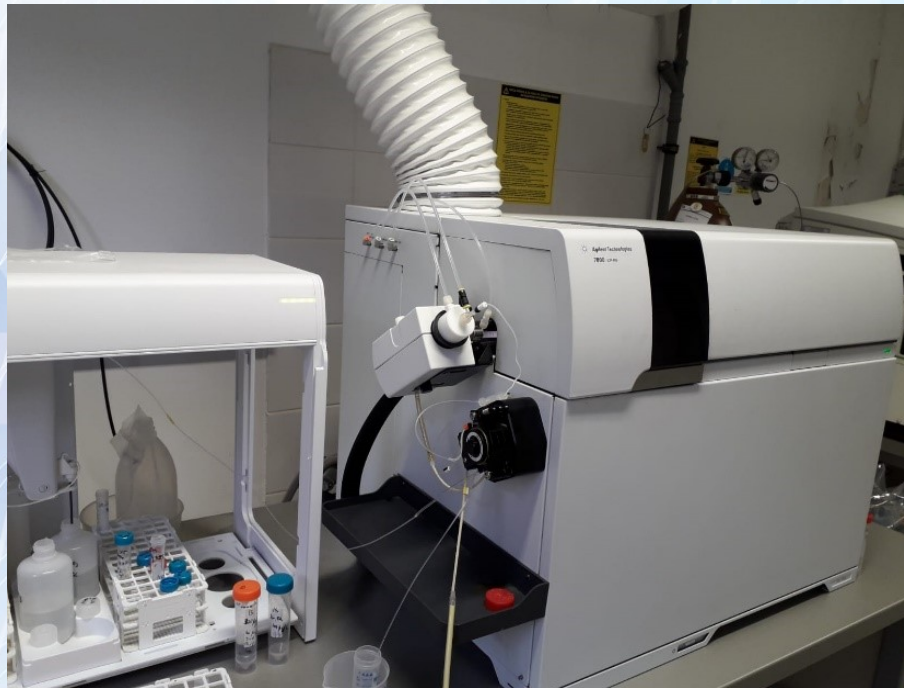
2. Materijali i metode

- ispitivanja su provedena na steriliziranom kravljem mlijeku s 2,8% mliječne masti
- sojevi bakterija mliječne kiseline izolirani su iz svježeg kravljeg mlijeka, svježeg kravljeg sira i vrhnja
- β -glukan je izoliran iz stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*
- u uzorcima mlijeka je određivan maseni udio AFM1 i metala (Cu, Zn, Fe, Se, Hg, Cd, Pb, Al, Mo, Mn)

- određivanje AFM1 provedeno je HPLC tehnikom (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti) uz FLD (fluorescencijski) detektor



- određivanje koncentracije metala provedeno je ICP-MS tehnikom (induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom) nakon digestije u mikrovalnoj pećnici



Vežanje AFM1/metala pomoću BMK

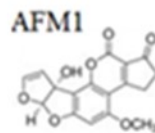
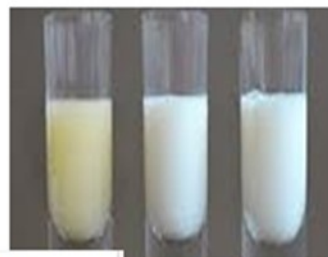


- vežanje ispitano na 10 sojeva BMK
- za vežanje AFM1 i metala korištene su:
 - žive stanice BMK - 10^6 i 10^8 CFUmL⁻¹
 - biomasa toplinski tretiranih stanica u količini od 1 i 5 mgmL⁻¹ mlijeka
 - liofilizirane st. BMK – liofilizator „Christ Alpha 1-2 LD plus“
- postotak vezanog AFM1/metala određivan je nakon 0.-tog, 2., 4. i 24. h inkubacije

Vežanje AFM1/metala β -glukanom



S. cereisiae i izolacija β -glukana alkalno-kiselinskom ekstrakcijom



Cu, Zn, Fe, Se, Hg,
Cd, Pb, Al, Mo, Mn



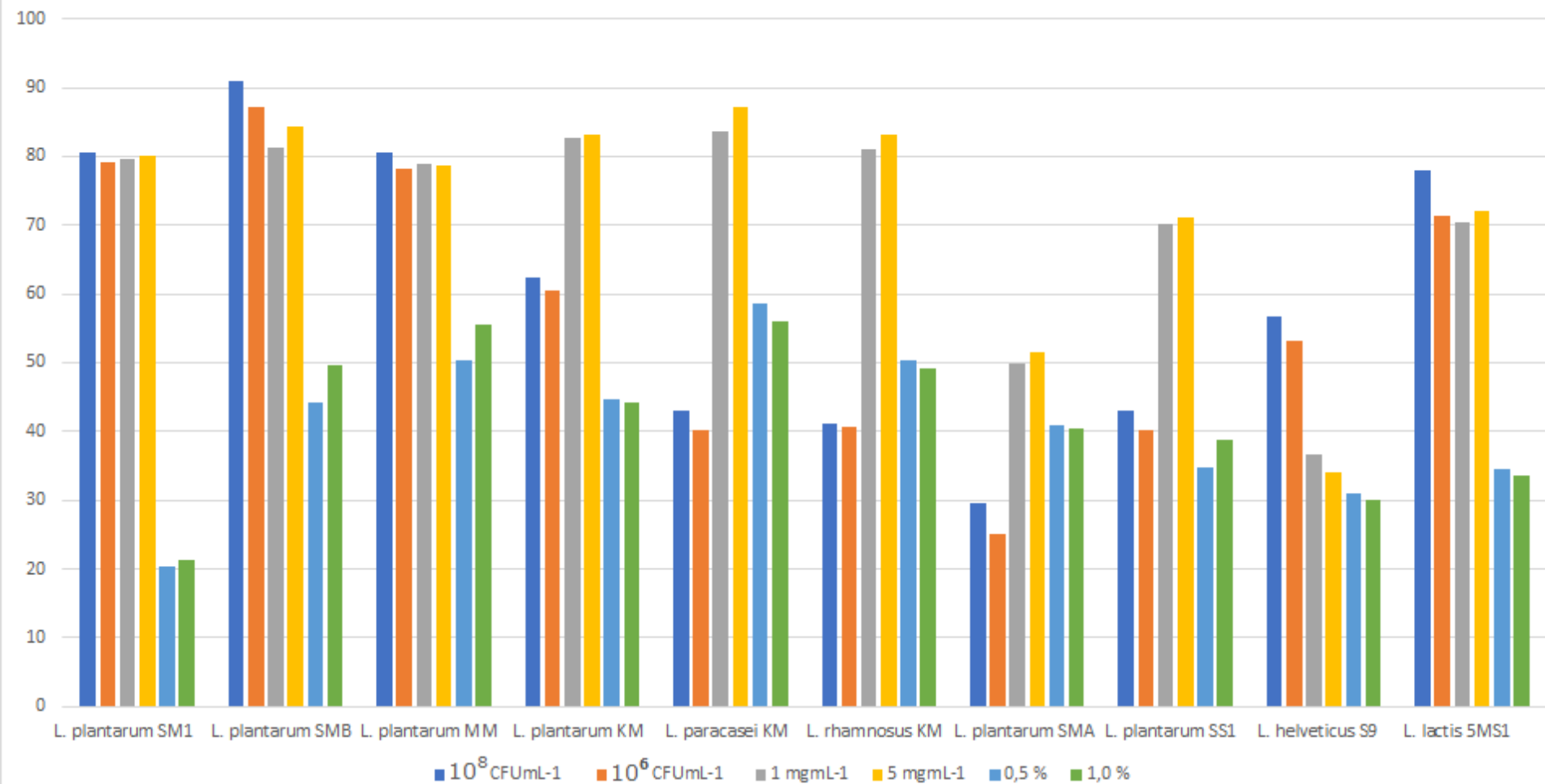
Određivanje vežanja
AFM₁/metala

- β -glukan izoliran iz kvasca u koncentracijama **0,01 i 0,005 % (w/v)**
- postotak vezanog AFM1/metala određivan je nakon 0-tog, 2., 4. i 24. h inkubacije

The background features a light blue and white color palette with wavy, abstract patterns. Two prominent starburst or lens flare effects are visible, one in the upper left and one in the lower left, adding a dynamic and modern feel to the design.

4. Rezultati

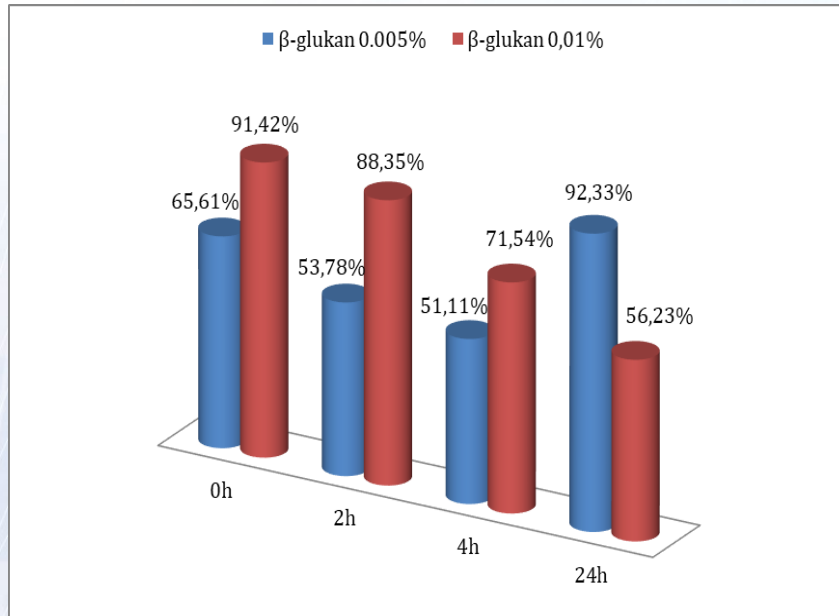
Vežanje AFM1 pomoću BMK



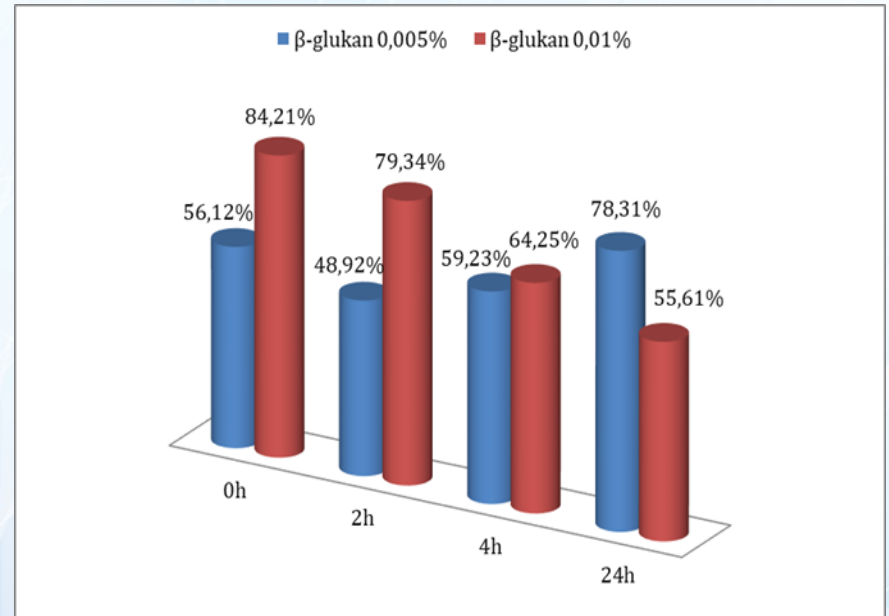
Vežanje metala pomoću BMK

Vrijeme inkub. (h)	% vežanja							
	0		2		4		24	
metali	Žive	Mrtve	Žive	Mrtve	Žive	Mrtve	Žive	Mrtve
Fe	56,08	82,89	37,68	76,42	54,17	78,57	63,90	81,82
Se	53,88	83,72	75,14	80,45	64,36	70,24	69,24	67,75
Mo	33,89	87,77	65,23	85,12	63,07	61,18	62,83	78,90
Cd	65,10	82,43	43,38	56,10	20,88	30,33	48,75	60,28
Pb	53,91	63,02	37,04	42,45	52,30	54,79	49,48	50,59
Cu	66,49	79,07	56,56	60,97	72,21	74,78	68,21	58,28
Al	68,26	73,13	33,76	48,13	24,45	33,17	42,81	63,63
Mn	62,42	72,14	49,18	50,82	74,12	73,22	39,88	47,58
Zn	31,42	78,20	36,95	57,49	64,22	69,15	62,93	63,79
Hg	58,25	67,98	21,35	39,98	35,65	23,98	62,50	67,73

Vežanje AFM1 β -glukanom



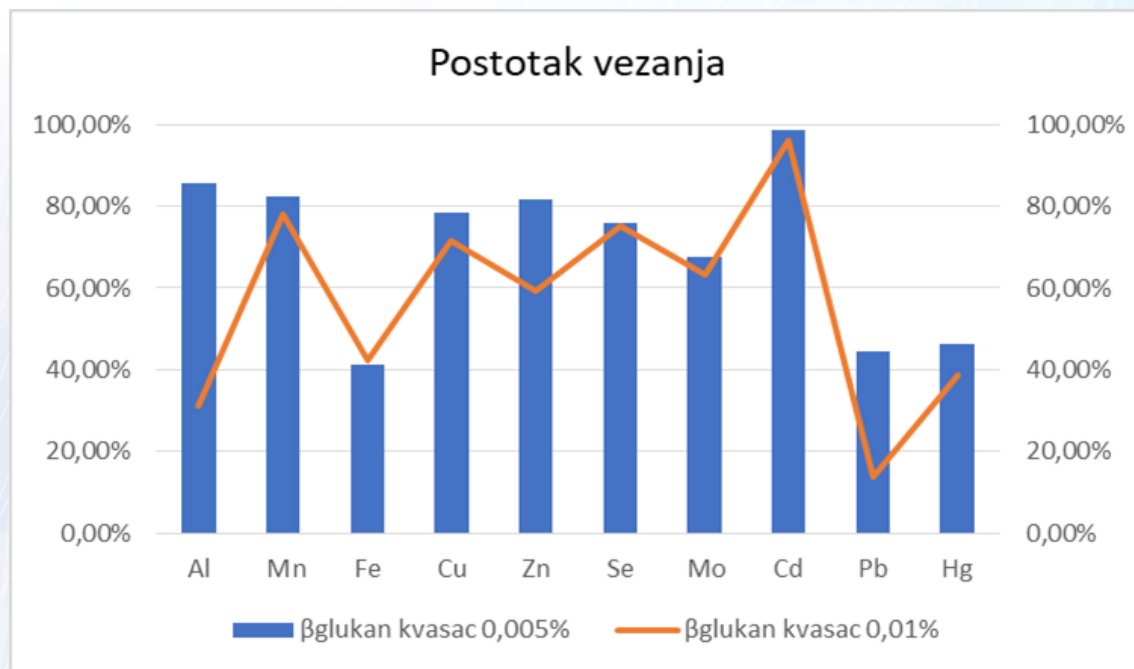
Postotak vežanja AFM1 ($0,5 \mu\text{gkg}^{-1}$) β -glukanom (0,01 i 0,005 %) izoliranim iz kvasca



Postotak vežanja AFM1 ($0,05 \mu\text{gkg}^{-1}$) β -glukanom (0,01 i 0,005 %) izoliranim iz kvasca

- upotrebom 0,01 % β -glukana sposobnost vežanja AFM1 pada linearno s vremenom
- $0,5 \mu\text{gkg}^{-1}$ AFM1 – 0,005% β -glukan – pad vežanja (4. sat) – rast vežanja – maksimum u 24. satu

Vežanje metala β -glukanom



- β -glukan je pokazao najveću sposobnost vežanja **Cd** i to 96,10 % u koncentraciji 0,01 %, odnosno 98,65 % u koncentraciji 0,005 %
- najslabiji afinitet β -glukan pokazao prema ionima **Fe**, **Pb** i **Hg** (42,31%, 13,60% i 38,51% za 0,01 % odnosno 41,13%, 44,46% i 46,21% za 0,005%)
- efikasnost vežanja metala β -glukanom (0,005 % i 0,01 %) u 0-tom satu varira od 13,60-98,65 %
- β -glukan u koncentraciji 0,005 % je za elemente Al, Mn, Cu, Zn, Mo, Cd, Pb, Hg pokazao veću efikasnost vežanja od β -glukana koncentracije 0,01 %
- statistički značajna razlika uočena je za **Al** i **Pb**, gdje je razlika u vežanju iznosila 54,76 %, odnosno 30,86 %

ZAKLJUČCI

1. Različiti sojevi BMK u ovisnosti o parametrima (žive, mrtve, liofilizirane stanice i vrijeme trajanja pokusa) pokazuju različitu učinkovitost vezanja aflatoksina M1 koja se kretala od 15,75-94,49 %.
2. Mrtve stanice BMK pokazuju bolju sposobnost vezanja AFM1 u umjetno kontaminiranom mlijeku u odnosu na žive i liofilizirane stanice, jer se termičkom obradom stanica povećava dostupna površina za vezanje AFM1.
3. Vezanje AFM1 je reverzibilan proces, jer su neki od odabranih sojeva BMK tijekom inkubacije otpustili dio vezanog AFM1, a zatim ga ponovo vezali, dok je kod drugih sojeva uočeno da je postotak vezanog AFM1 uglavnom održavan tijekom inkubacije.
4. Vezanje AFM1 stanicama BMK je brzi proces, a maksimum vezanja se dogodi u prvih par minuta i za neke sojeve BMK iznosi > 80 %.
5. Postoje značajne razlike u afinitetu BMK prema različitim metalima, zbog čega se javljaju velike razlike u količini vezanih metala pa su tako žive stanice BMK vezale metale u rasponu od 4-98,50 %, a mrtve stanice u rasponu od 9,38–96,80 %.

HVALA NA PAŽNJI ☺