

Aflatoksin M₁ u sirovom mlijeku i vezanje aflatoksina pomoću bakterija mliječne kiseline

Ksenija Markov*, Jadranka Frece, Domagoj Čvek,
Nikolina Lovrić, Frane Delaš

Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica,
Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
Pierottijeva 6, Zagreb, Hrvatska

Prispjelo - Received: 07.09.2010.
Prihvaćeno - Accepted: 22.11.2010.

Sažetak

Aflatoksin M₁ (AFM₁) potencijalni je karcinogen za ljude, te njegova prisutnost u mlijeku i mliječnim proizvodima predstavlja opasnost za ljudsko zdravlje. Stoga se u ovom radu određivao stupanj mikrobiološkog onečišćenja plijesnima te potencijalna prisutnost aflatoksina M₁ u 60 uzoraka sirovog mlijeka, nasumično uzetih od individualnih proizvođača iz različitih krajeva kontinentalne Hrvatske. Najčešće izolirani rodovi plijesni bili su *Geotrichum* (78,3 %), *Aspergillus* (32,4 %) i *Penicillium* (27,0 %). Od ukupno 60 istraživanih uzoraka mlijeka u 86,66 % utvrđena je prisutnost aflatoksina M₁, a u 6,66 % uzoraka količine su bile iznad dozvoljenih granica. Bakterije mliječne kiseline koje se koriste u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda kao starter kulture, mogu imati ulogu u smanjenju količine aflatoksina u hrani i krmivu. U ovom je radu istražena i sposobnost bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), *Lactobacillus delbrueckii* S1 i *Lactobacillus plantarum* A1 da vežu aflatoksin M₁. Standardni soj *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) i izolat *L. delbrueckii* S1 mogu značajno (P<0,05) vezati AFM₁ (>50%) u usporedbi s izolatom *L. plantarum* A1 koji ga može vezati između 18,7 do 28,7 %.

Ključne riječi: aflatoksin M₁, bakterije mliječne kiseline, sirovo mlijeko

Uvod

Mikotoksini mogu ući u prehrambeni lanac čovjeka i životinja izravnom ili neizravnom kontaminacijom. U izravnoj je kontaminaciji prehrambeni proizvod osnova za rast toksikogene plijesni, a neizravna kontaminacija javlja se kada su dodaci namirnicama kontaminirani mikotoksinima (Duraković i Duraković, 2003.; Frece i sur., 2010.). Mlijeko je temeljni prehrambeni proizvod, koji osim energetski vrijednih tvari organizmu daje i zaštitne tvari, koje su esencijalne za ljudsko zdravlje. Mlijeko može sadržavati aflatoksine koji su najtoksičnija skupina mikotoksina, sekundarnih metabolita plijesni, kemijski vrlo različite strukture s različitim biološkim učincima. Sintetiziraju ih vrste *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*, ali i druge vrste iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Rhizopus*.

Aflatoksini su mutageni, karcinogeni i teratogeni spojevi i njihova prisutnost u organizmu tijekom dužeg vremenskog razdoblja i u ekstremno malim količinama, može biti opasna za ljudsko zdravlje. Toksični metaboliti aflatoksina mogu se naći i u proizvodima životinjskog podrijetla, mlijeku i mesu, ukoliko je prethodno hrana za životinje bila onečišćena plijesnima, a onečišćenje ovisi o geografskom području, klimatskim uvjetima, vlazi i temperaturi (Sassahara i sur., 2005.). Iako još nema sigurnih dokaza o toksičnom djelovanju mikotoksina na čovjeka, ipak postoji zabrinutost, jer se u mlijeku krava hranjenih hranom onečišćenom aflatoksinom B₁ (AFB₁) može nalaziti aflatoksin M₁ (AFM₁) poznati hepato-karcinogeni spoj. AFM₁, metabolit AFB₁, produkt je biološke pretvorbe u mikrosomima jetre, a izlučuje se u mlijeko kroz mliječne žlijezde sisavaca

*Dopisni autor/Corresponding author: Tel/Phone: +385 1 4605 045; E-mail: kmarko@pbf.hr

hranjenih krmom koja je sadržavala spomenuti aflatoksin B skupine (Zdolec i sur., 2006.). Zbog svog afiniteta prema proteinima mlijeka, AFM₁ može biti prisutan i u mliječnim proizvodima, a koncentracija AFM₁ ovisi o samom proizvodnom procesu pripreme mliječnih proizvoda, o vrsti proizvoda, udjelu vode i konačnom proizvodu (Jeličić i sur., 2009.). AFM₁ može se dokazati u mlijeku 12 do 24 sata nakon konzumacije aflatoksinom B₁, a najviše se razine dostižu nakon nekoliko dana. Nakon prestanka unosa AFB₁ u organizam, koncentracija aflatoksina M₁ se smanjuje unutar 72 sata do količine kada se više ne može dokazati. Mnogi istraživači su objavili da postoji linearna veza između količine AFM₁ u mlijeku i AFB₁ u krmivu (Kamkar, 2008.). Pretpostavka je da je količina izlučenog AFM₁ u mlijeku muznih krava 1-3 % od ukupne količine AFB₁ unesenog u organizam (Van Egmond, 1989.), međutim u istraživanjima Veldman i sur. (1992.) i Özdemir-a (2007.) detektirane su i razine do 6 %, koje variraju ovisno o vrsti životinje.

AFM₁ je relativno stabilna molekula u sirovim i obrađenim mliječnim proizvodima i ne može se inaktivirati toplinskim tretmanima poput pasterizacije za vrijeme obrade sira (Bakirci, 2001.; Govaris i sur., 2002.; Moss, 2002.). Treba napomenuti da se AFM₁ ne nalazi samo u mlijeku životinja, već i u majčinom mlijeku (El-Sayed i sur., 2002.). Iz tog razloga, mnoge države imaju propise kontrole razine AFB₁ u hrani za životinje/ljude. Najviše dopuštene koncentracije za AFM₁ u mlijeku i mliječnim proizvodima razlikuju se od zemlje do zemlje (Özdemir, 2007.), ali zakonska regulativa u zemljama EU je jedna od najstrožih za ovaj mikotoksin u svijetu i iznosi 0,05 µg/L za konzumno mlijeko (Commission Regulation (EC) N. 466/2001.; Verstraete, 2008.). U mnogim zemljama Europe, koje nisu članice EU tako i u zemljama Južne i Sjeverne Amerike, Azije i Afrike dozvoljena količina za AFM₁ je deset puta veća i iznosi 0,5 µg/L. U Republici Hrvatskoj su Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 154/2008.) regulirane najviše dopuštene količine mikotoksina AFM₁ u sirovom mlijeku, toplinski obrađenom mlijeku i mlijeku za proizvodnju mliječnih proizvoda od 0,05 µg/L, koje su u skladu s preporukom Europske komisije. Ukoliko je razina aflatoksina M₁ u mlijeku veća od dopuštene proizvod se ne smije koristiti za prehranu

ljudi, niti za proizvodnju mliječnih proizvoda (NN 154/2008.).

Mnogi mikroorganizmi, uključujući bakterije, kvasce, plijesni, aktinomicete i alge mogu ukloniti ili smanjiti količine aflatoksina u hrani i krmu. Među tim mikroorganizmima, bakterije mliječne kiseline (BMK) predstavljaju jedinstvenu skupinu koja se najširoko koristi u proizvodnji i očuvanju fermentiranih proizvoda. Bakterije mliječne kiseline (BMK) su prirodno prisutne u raznoj hrani, gdje produžuju trajnost proizvoda, što je doprinijelo da budu prihvaćene kao bezopasne za ljudsko zdravlje. BMK koje se koriste u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda kao starter kulture, mogu imati ulogu u smanjenju količine aflatoksina u hrani i krmivu. U istraživanjima mnogih autora (Haskard i sur., 2001.; Peltonen i sur., 2001.; Colak, 2007.) dokazano je vezanje aflatoksina s pomoću bakterija mliječne kiseline. Uz dokaze o korisnoj aktivnosti BMK, sposobnost vezanja aflatoksina im daje značajan potencijal za primjenu u funkcionalnoj hrani (Frece i sur., 2009.).

Svrha ovoga rada bila je odrediti stupanj mikrobiološkog onečišćenja plijesnima, količinu aflatoksina M₁ i istražiti sposobnost bakterija mliječne kiseline da vežu AFM₁ u uzorcima sirovog mlijeka.

Materijali i metode

Uzorkovanje

60 uzoraka svježeg sirovog kravlje mlijeka nasumice izabrani od individualnih proizvođača uzetih iz različitih krajeva kontinentalne Hrvatske, bili su analizirani na prisutnost AFM₁. Uzorci su prikupljeni u jednakom broju tijekom ljeta (n=30) kada su krave na ispaši i zimi (n=30) kada su krave hranjene krmom. Uzorci su prevezeni u laboratorij u rashlađenim kontejnerima (+4 °C) i čuvani na -20 °C do analize.

Isolacija i identifikacija plijesni

Porast plijesni je određena na Sabouraud agaru (Biolife, Italija) nakon 5 dana uzgoja pri 25 °C (HRN EN ISO 8261:2003). Svaka morfološki različita kolonija plijesni je mikroskopski pregledana koristeći imerzioni objektiv povećanja 100/1,25 (Samson i sur., 2000.).

ELISA metoda

Kvantitativna analiza AFM₁ u uzorcima provedena je ELISA-metodom (enzyme-linked immunosorbent assay): ridascreen aflatoxin M₁ (CN AM1-EO1, Immunolab). Osnova ovog testa je reakcija antigen - antitijelo. Test kit sadrži reagense za 96 uzoraka (uključujući i baždarnu krivulju). Standardi su koncentrirani 10x, te ih je potrebno razrijediti otopinom za razrjeđivanje standarda u omjeru 1:10 (50 μL standarda + 450 μL otopine za razrjeđivanje) prije upotrebe u testu. Baždarna krivulja pokazuje odnos koncentracije aflatoksina M₁ u standardu i vrijednost njegove absorbancije pri 450 nm očitane na čitaču mikrotitarskih pločica TECAN (Sunrise). Svi uzorci mlijeka su bili pripremljeni prema uputama u ELISA kitu.

Bakterijska kultura

U ovom radu kao test-mikroorganizmi za istraživanje sposobnosti vezanja AFM₁ upotrijebljeni su sojevi bakterija: *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 (Valio Ltd., Helsinki, Finska), te *Lactobacillus delbrueckii* S1 (izoliran iz svježeg kravljeg sira) i *Lactobacillus plantarum* A1 (izoliran iz polutvrdog kravljeg sira) dobiveni iz Zbirke mikroorganizama, Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Bakterije mliječne kiseline su uzgajane u 5 mL De Mann, Rogosa i Sharpe (MRS) bujonu (Biolife, Italija) pri 37 °C kroz 24 h. Bakterijski rast je određen na MRS agaru (Biolife, Italija) nakon 48 sati inkubacije pri 37 °C brojanjem poraslih kolonija, a broj živih stanica je izražen kao CFU/mL.

Standard AFM₁

Standard AFM₁ je dobavljen od Sigma, St. Louis, Mo., USA, otopljen u smjesi otapala benzenacetronitril (97/3 vol/vol) do konačne koncentracije AFM₁ od 5 μg/mL.

Vežanje AFM₁

10 mL uzorka sirovog mlijeka, u kojima nije dokazana prisutnost AFM₁, je nacijepljeno bakterijama mliječne kiseline i to: *L. rhamnosus* GG u broju 8,096 log₁₀CFU/mL, *L. delbrueckii* S1 u broju 7,939 log₁₀CFU/mL i *L. plantarum* A1 u broju

8,025 log₁₀CFU/mL, te je u uzorke mlijeka dodan aflatoksin M₁ u koncentraciji 10 ng/mL uzorka. Bakterije i AFM₁ u uzorcima mlijeka inkubirani su pri 37 °C kroz 48 h. Supernatant uzoraka sakupljen je centrifugiranjem nakon 0, 24 i 48 h inkubacije, a količina nevezanog AFM₁ određena je ELISA metodom.

Statistička analiza

Sva mjerenja provedena su u trostrukom pokusu. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednosti ± SD (standardna devijacija). U analizi eksperimentalnih podataka korišten je SAS program (SAS Institute, Cary, NC, USA). Statistička značajnost određivana je Studentovim T-testom (p<0,05), a vrijednosti označene zvjezdicom su značajno različite u usporedbi sa 0-tim h inkubacije.

Rezultati i rasprava

Plijesni u sirovom mlijeku mogu utjecati na organoleptička svojstva mliječnih proizvoda, proizvoditi mikotoksine i predstavljati potencijalnu opasnost po zdravlje potrošača (Wouters i sur., 2002.; Godič-Torkar i Vengušt, 2008.). Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je i procijeniti stupanj mikrobiološkog onečišćenja sirovog mlijeka plijesnima (tablica 1). Plijesni su pronađene u 37 (61,66 %) uzoraka sirovog mlijeka, a najčešće izolirani rodovi bili su *Geotrichum* sp. (78,3 %), *Aspergillus* sp. (32,4 %) i *Penicillium* sp. (27,0 %). Dobiveni rezultati se mogu usporediti s rezultatima Jodral i sur. (1993.) i Godič-Torkar i Vengušt (2008.), u kojima su plijesni izolirane iz sirovog mlijeka uglavnom pripadale rodovima *Geotrichum*, *Fusarium* i *Aspergillus*. Većina tih rodova nađeni su kao zagađivači balirane silaže (O'Brien i sur., 2005.), pa bi se moglo pretpostaviti da je krmivo bilo jedan od mogućih izvora kontaminacije sirovog mlijeka.

Kako prisutnost aflatoksina M₁ u mlijeku predstavlja razlog za zabrinutost, svrha ovog rada bila je odrediti količinu aflatoksina M₁ u uzorcima sirovog mlijeka tijekom ljetnih i zimskih mjeseci ELISA metodom. Rezultati količine AFM₁ u uzorcima sirovog mlijeka prikazani su u tablici 2. Vidljivo je da je AFM₁ utvrđen u 86,66 % uzoraka (n=60). U istraživanjima Bakirci-a (2001.), u uzorcima mlijeka AFM₁ je dokazan u 87,77 % uzoraka, a čak u 44 % uzoraka u koncentracijama višim od dozvoljenih. Godič-Torkar i Vengušt (2008.) su u 40 uzoraka

svježeg mlijeka dokazali da je 10 % uzoraka kontaminirano aflatoksinom u koncentracijama višim od 50 ng/kg. U istraživanjima nekih autora prisutnost AFM₁ je dokazana u 82,5 % uzoraka sira (Kamkar, 2005.), u 33 % uzoraka dječje hrane na bazi mlijeka (Oveisi i sur., 2007.), a pasterezirano mlijeko je bilo neispravno u 17,8 % uzoraka (Alborzi i sur., 2006.).

Kao što prikazuje tablica 2, veće koncentracije AFM₁ utvrđene su u uzorcima skupljenim tijekom zime, u odnosu na one skupljene ljeti. 4 analizirana uzorka tijekom zime sadrže AFM₁ u količinama koje su iznad količina propisanih Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 154/2008.) od 50 ng/L. AFM₁ dokazan je u maksimalnoj količini od 87,8 ng/L u samo jednom uzorku mlijeka, a u 3 uzorka u rasponu od 53,57-59,12 ng/L. Količina AFM₁ od 8,84-42,17 ng/L određena je u 24 uzorka, dok je u 2 uzorka sirovog mlijeka AFM₁ bio <0,1 ng/L. Dobiveni rezultati su u suglasju s rezultatima mnogih autora koji su također u svojim istraživanjima dokazali veće količine AFM₁ u uzorcima mlijeka sakupljenih tijekom zime nego, onih sakupljenih tijekom ljeta (Panariti, 2001.; Lopez i sur., 2003.; Montagna i sur., 2008.; Bilandžić i sur., 2010.). Razina kontaminacije AFM₁ tijekom zimskog perioda veća je, što se može objasniti time da su zimi krave hranjene krmom koja može biti kontaminirana mikotoksinima, a do kontaminacije može doći u polju prije ili tijekom žetve/košnje, u transportu, te tijekom uskladištenja. Vjerojatnost za kontaminaciju krmiva plijesnima/mikotoksinima odnosi se na zemljopisno podrijetlo, kao i na klimatske uvjete (oscilacija temperature i vlage u različitim godišnjim dobima). Smatralo se da uvezena stočna hrana iz tropskih i suptropskih područja uglavnom predstavlja opasnost od aflatoksina, ali podaci mnogih autora osporili su ovu pretpostavku (Bakirci, 2001.; Panariti, 2001.; Pietri i Diaz, 2003.; Colak, 2007.; Godič-Torkar i Vengušt, 2008.; Montagna i sur., 2008.; Ghanem i Orfi, 2009.).

Niska učestalost kontaminacije uzoraka AFM₁ ljeti se vjerojatno odnosi na činjenicu da su krave više na ispaši i hrane se zelenom travom. Od 24 uzorka sirovog mlijeka u kojima je dokazana prisutnost AFM₁, ni u jednom uzorku mlijeka nije utvrđena koncentracija AFM₁ koja premašuje dopuštenu količinu po našoj zakonskoj regulativi. Maksimalna razina AFM₁ bila je 36,52 ng/L u samo jednom uzorku, dok je u 6

uzoraka AFM₁ bio <0,1 ng/L (tablica 2). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je u 92,3 % uzoraka sirovog mlijeka količina AFM₁ ispod količine od 50 ng/L propisane Pravilnikom (NN 154/2008.) i u skladu s preporukom Europske komisije (tablica 3). Slične rezultate dobili su Bilandžić i sur. (2010.) koji su u svojim istraživanjima dokazali da je količina AFM₁ čak u 98,4 % uzoraka sirovog mlijeka u Republici Hrvatskoj ispod 50 ng/L.

Poznato je da AFM₁ u mlijeku i mliječnim proizvodima osim što može biti opasan za potrošače, pogotovo malu djecu, dovodi i do ekonomskih gubitaka zbog onečišćenog mlijeka. Suvremeni trend u prehrani postala je potreba za smanjenjem sintetičkih aditiva u hrani i proizvodnja hrane sa što manje štetnim utjecajem na okolinu, te uporaba drugih aditiva ili sastojaka hrane prirodnog podrijetla koji pridonose povećanju sigurnosti hrane (Markov i sur., 2009.; Frece i sur., 2010.). Zbog toga postoji velika potražnja za novim strategijama u sprečavanju zagađenja i negativnih posljedica uzrokovanih AFM₁. U cilju razvijanja sigurnog i praktičnog načina uklanjanja AFM₁ iz tekućeg medija, provedena su mnoga istraživanja s određenim sojevima bakterija mliječne kiseline (Oatley i sur., 2000.; Pieridis i sur., 2000.; Haskard i sur., 2001.; Peltonen i sur., 2001.). Rezultati pokazuju da određene vrste BMK koje se koriste u mliječnim proizvodima mogu ponuditi novi način uklanjanja aflatoksina M₁ iz mlijeka. Ti prirodni izolati BMK iz spontanijih fermentacija mogli bi se koristiti kao specifične starter kulture, nakon fenotipske i genotipske karakterizacije, te predstavljati mogući izvor novih antimikrobnih metabolita. Osim toga, interes za primjenu BMK i njihovih antimikrobnih metabolita u prevenciji kvarenja i produženju trajnosti hrane koja je svježeg okusa, bogata nutrijentima i vitaminima, minimalno prerađena i bio-konzervirana jedan je od najvećih izazova prehrambene industrije danas (Markov i sur., 2009.; Frece i sur., 2010.).

U ovom radu istražena je mogućnost BMK *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103, te izolata *Lactobacillus delbrueckii* S1 (izoliran iz svježeg sira) i *Lactobacillus plantarum* A1 (izoliran iz polutvrđog kravljeg sira) da vežu AFM₁ (tablica 4). Dobiveni rezultati pokazuju da probiotički soj *L. rhamnosus* GG značajno uklanja AFM₁ iz uzorka mlijeka tijekom čitavog vremena inkubacije, što je u suglasju s rezultatima drugih autora koji su dokazali da njihovi sojevi *L. rhamnosus* GG Lc705 i *L. rhamnosus* Lc1/3

vežu oko 80 % i 54,6 % AFB₁ iz tekućeg medija (El-Nezami i sur., 1998.b; Peltonen i sur., 2001.).

Izolat bakterija mliječne kiseline *L. delbrueckii* S1 pokazao je značajno visok postotak sposobnosti vezanja AFM₁ u odnosu prema izolatu *L. plantarum* A1 (tablica 4). Dobiveni rezultati pokazuju da *L. delbrueckii* S1 već u nultom satu inkubacije veže preko 50 % AFM₁, a na kraju inkubacije (48 sati) zabilježeno je visokih 51 % vezanog AFM₁. Međutim, izolat *L. plantarum* A1 veže malu količinu AFM₁ od 18,7 % na početku inkubacije do 28,7 % nakon 48 sati. Neki autori razlike u sposobnosti vezanja aflatoksina bakterijama mliječne kiseline objašnjavaju različitom strukturom stanične stijenke bakterija, dok drugi smatraju da je važan broj bakterija u podlozi (El-Nezami i sur., 1998.a; Pieridis i sur., 2000.; El-Nezami i sur., 2002.). Naša istraživanja pokazala su da uz standardni soj *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 i izolat *L. delbrueckii* S1 ima veliki potencijal

upotrebe u mliječnoj industriji kao mikroorganizam koji može ukloniti ili smanjiti, za više od 50 %, količinu aflatoksina u hrani i krmi. Uzorci mlijeka, u kojima bi koncentracija AFM₁ bila >50 ng/L, na ovaj način bi zadovoljili Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 154/2008.) budući bi te nedozvoljene koncentracije AFM₁ bile uklonjene uz pomoć dodanog bakterijskog izolata. U daljnjim istraživanjima će se provesti detaljna fenotipska i genotipska karakterizacija izolata *L. delbrueckii* S1, s ciljem moguće primjene kao starter kulture za mliječnu industriju.

Zaključci

Prisutnost AFM₁ u sirovom mlijeku ne predstavlja ozbiljan rizik za zdravlje ljudi, budući da 92,3 % uzoraka zadovoljava vrijednosti propisane Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 154/2008.), ali je

Tablica 1. Stupanj onečišćenja sirovog mlijeka plijesnima
Table 1. The level of contamination with moulds in raw milk

Plijesni Moulds	Broj pozitivnih uzoraka No. of positive samples		Raspon vrijednosti Value
	n/37	%	log ₁₀ CFU/mL
<i>Geotrichum</i> sp.	29	78,3	1,04-3,32
<i>Aspergillus</i> sp.	12	32,4	0,6-1,7
<i>Penicillium</i> sp.	10	27,0	0,7-2,1
<i>Fusarium</i> sp.	3	8,1	1,2-1,37
<i>Mucor</i> sp.	1	2,7	0,47

Tablica 2. Koncentracija AFM₁ u uzorcima sirovog mlijeka
Table 2. Concentration of AFM₁ in raw milk samples

Godišnje doba Season	Broj uzorka No. of samples	Pozitivni uzorci Positive samples		AFM ₁ (ng/L)		
		n	%	n	%	Raspon /Range
Ljeto/Summer	30	24	80	9	37,50	0,17-4,3
				11	45,83	5,40-9,89
				2	8,33	10,55-11,33
				2	8,33	26,47-36,52
Zima/Winter	30	28	93,33	7	25,00	8,84-17,5
				17	60,71	21,62-42,17
				3	10,71	53,57-59,12
Uupno/Total	60	52	86,66	1	3,57	87,8

Tablica 3. Količine AFM₁ prema Pravilniku (NN 154/2008) i EU
 Table 3. Quantities AFM₁ according to the Regulations (NN 154/2008) and the EC

	Pozitivni uzorci/Positive samples		
	n/52	Raspon vrijednosti Value ng/L	%
<50 ng/L	48	0,17 - 42,17	92,3
>50 ng/L	4	53,57 - 87,8	7,7
Ukupno/Total			100

Tablica 4. Utjecaj vremena inkubacije na vezanje AFM₁ bakterijama mliječne kiseline
 Table 4. The effect of incubation time on AFM₁ binding by LAB strains

BMK/LAB	log ₁₀ CFU/mL	% vezanog AFM ₁ ± SD/% AFM ₁ bounded ± SD		
		Vrijeme inkubacije (h)/Incubation period (h)		
		0	24	48
<i>L. rhamnosus</i> GG	8,096	63,4±0,15	51,7±1,3*	56,1±1,7*
<i>L. delbrueckii</i> S1	7,939	53,2±0,23	48,1±0,9*	51,3±1,5
<i>L. plantarum</i> A1	8,025	18,7±0,9	20,6±1,1	28,7±0,23*

Svaki iznos predstavlja srednju vrijednost ± SD trostrukog pokusa/Results are the average ± SD of triplicate assays

*Vrijednosti su značajno različite (P<0,05) u usporedbi sa 0 h inkubacije/Indicates a significant (P<0.05) difference in binding compared to the 0 h of incubation

potrebno kontinuirano praćenje aflatoksina tijekom godišnjih doba, te je potrebna stalna edukacija svih sudionika u proizvodnji i prometu mlijeka.

Iz rezultata istraživanja može se zaključiti da standardni soj *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 i izolat *L. delbrueckii* S1 imaju sposobnost uklanjanja znatne količine mikotoksina (iznad 50 %), te bi se njihovim dodavanjem kao starter kultura u mlijeko mogao smanjiti rizik od kontaminacije AFM₁ i na taj način bi kontaminirano mlijeko zadovoljilo Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 154/2008.). Stoga, uklanjanje mikotoksina iz mliječnog matriksa mogao bi biti jedan od kriterija pri izboru sojeva bakterija kao starter kultura u mliječnoj industriji.

Aflatoxin M₁ in raw milk and binding of aflatoxin by lactic acid bacteria

Summary

Aflatoxin M₁ (AFM₁) is potential human carcinogen. Its presence in milk and dairy products represents risk for human health. Therefore, this

study was carried out in order to determine the degree of microbiological contamination by mold, and the potential presence of aflatoxin M₁ in 60 raw milk samples, randomly taken from individual producers from different regions of the continental Croatia. The most common genera isolated fungi were *Geotrichum* (78.3 %), *Aspergillus* (32.4 %) and *Penicillium* (27.0 %). From total of 60 studied milk samples, 86.66 % were positive for the presence of aflatoxin M₁, and 6.66 % of samples were above the prescribed limits. Lactic acid bacteria used in fermented dairy products as a starter culture may play a role in reduction of aflatoxin in foods and nutrients. In this paper the ability of lactic acid bacteria: *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), *Lactobacillus delbrueckii* S1 and *Lactobacillus plantarum* A1 to bind aflatoxin M₁ was investigated. Standard strain *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) and *L. delbrueckii* S1 can significantly (P<0.05) remove AFM₁ (>50 %) compared to *L. plantarum* A1, which binds AFM₁ between 18.7 to 28.7 %.

Key words: aflatoxin M₁, lactic acid bacteria, raw milk

Literatura

1. Alborzi, S., Pourabbas, B., Rashidi, M., Astaneh, B. (2006): Aflatoxin M₁ contamination in pasteurized milk in Shiraz (south of Iran). *Food Control* 17 (7), 582-584
2. Bakirci, I. (2001): A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Control* 12 (1), 47-51.
3. Bilandžić, N., Varenina, I., Solomun, B. (2010): Aflatoxin M₁ in raw milk in Croatia. *Food Control* 21, 1279-1281.
4. Colak, H. (2007): Determination of Aflatoxin M₁ Levels in Turkish White and Kashar Cheeses Made of Experimentally Contaminated Raw Milk. *Journal Of Food And Drug Analysis* 15 (2), 163-168.
5. European Commission, Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L 16/1, 2001.
6. Duraković, S., Duraković, L. (2003): *Mikologija u biotehnologiji*, Kugler, Zagreb.
7. El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., Ahokas, J. (1998a): Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁. *Food and Chemical Toxicology* 36 (4), 321-326.
8. El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., Ahokas, J. (1998b): Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *Journal of food protection* 61 (4), 466-468.
9. El-Nezami, H., Polychronaki, N., Salminen, S., Mykänen, H. (2002): Binding Rather Than Metabolism May Explain the Interaction of Two Food-Grade *Lactobacillus* Strains with Zearalenone and Its Derivative α -Zearalenol. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (7), 3545-3549.
10. El-Sayed, A.M., Abd-Alla, A.S.E., Neamet-Allah, A.A. (2002): Aflatoxins in human specimen collected in Egypt. *Mycotoxin Research* 18, 23-30.
11. Frece, J., Kos, B., Svetec, I.K., Zgaga, Z., Beganović, J., Leboš, A., Šuškić, J. (2009): Synbiotic effect of *Lactobacillus helveticus* M92 and prebiotics on the intestinal microflora and immune system of mice. *Journal of Dairy Research* 76, 98-104.
12. Frece, J., Markov, K., Kovačević, D. (2010): Određivanje autohtone mikrobne populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu. *Meso XII* (2), 92-98.
13. Ghanem, I., Orfi, M. (2009): Aflatoxin M₁ in raw, pasteurized and powdered milk available in the Syrian market. *Food Control* 20 (6), 603-605.
14. Godič-Torkar, K., Vengušt, A. (2008): The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M₁ in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control* 19 (6), 570-577.
15. Govaris, A., Roussi, V., Koidis, P.A., Botsoglou, N.A. (2002): Distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yoghurt. *Food Additives & Contaminants* 19 (11), 1043-1050.
16. Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Kankaanpää, P.E., Salminen, S., Ahokas, J.T. (2001): Surface Binding of Aflatoxin B₁ by Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (7), 3086-3091.
17. Jeličić, I., Božanić, R., Krčmar, N. (2009): Primjena HACCP sustava u proizvodnji UHT steriliziranog mlijeka. *Mljekarstvo* 59 (2), 155-175.
18. Kamkar, A. (2005): A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in Iranian Feta cheese. *Food Control* 16, 593-600.
19. Kamkar, A. (2008): The study of aflatoxin M₁ in UHT milk samples by ELISA. *Journal of Veterinary Research* 63, 7-12.
20. Lopez, C.E., Ramos, L.L., Ramadán, S.S., Bulacio, L.C. (2003): Presence of aflatoxin M₁ in milk for human consumption in Argentina. *Food Control* 14 (1), 31-34.
21. Markov, K., Frece, J., Čvek, D., Delaš, F. (2009): *Listeria monocytogenes* i drugi kontaminanti u svježem siru i vrhnju domaće proizvodnje s područja grada Zagreba, *Mljekarstvo* 59 (3), 225-231
22. Montagna, M.T., Napoli, C., De Giglio, O., Iatta, R., Barbuti, G. (2008): Occurrence of Aflatoxin M₁ in Dairy Products in Southern Italy. *International Journal of Molecular Sciences* 9 (12), 2614-2621
23. Moss, M.O. (2002): Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *International Biodeterioration and Biodegradation* 50, 137-142.
24. Oatley, J.T., Rarick, M.D., Ji, G.E., Linz, J.E. (2000): Binding of aflatoxin B₁ to bifidobacteria in vitro. *Journal of Food Protection* 63, 1133-1136.
25. O'Brien, M., O'Kiely, P., Forristal, P.D., Fuller, H.T. (2005): Fungi isolated from contaminated baled grass silage on farms in the Irish Midlands. *FEMS Microbiology Letters* 247 (2), 131-135.
26. Oveisi, M. R., Jannat, B., Sadeghi, N., Hajimahmoodi, M., Nikzad, A. (2007): Presence of aflatoxin M₁ in milk and infant milk products in Tehran, Iran. *Food Control* 18 (10), 1216-1218.
27. Özdemir, M. (2007): Determination of aflatoxin M₁ levels in goat milk consumed in Killis province. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 54, 99-103.
28. Panariti, E. (2001): Seasonal variations of aflatoxin M₁ in the farm milk in Albania. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 52 (1), 37-41.
29. Peltonen, K., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J., Salminen, S. (2001): Aflatoxin B₁ binding by Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria and *Bifidobacteria*. *Journal of Dairy Science* 84 (10), 2152-2156.
30. Pietri, A., Diaz, G. (2003): *Personal communication*, Faculty of Agriculture UCSC, Piacenza, Italy.
31. Pieridis, M., El-Nezami, H., Peltonen, K., Salminen, S., Ahokas, J. (2000): Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M₁ in a food model. *Journal of Food Protection* 63, 645-650.
32. Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani. Narodne novine br. 154/2008.

33. Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O. (2000): *Introduction to Food- and Airborne Fungi*. 6th ed, CBS-Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 1-31.
34. Sassahara, M., Pontes Netto, D., Yanaka, E.K. (2005): Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M₁ in raw milk in the North of Paraná state. *Food Chemical Toxicology* 43, 981-984.
35. Van Egmond, H.P. (1989): *Aflatoxin M : Occurrence, Toxicity, Regulation*. U: *Mycotoxins in Dairy Products*, ed. H.P. Van Egmond, Elsevier Applied Science, London/New York, 11-55.
36. Veldman, A., Meijst, J.A.C., Borggreve, G.J., Heeres-van der Tol, J.J. (1992): Carry-over of aflatoxin from cow's food to milk. *Animal Production* 55, 163-168.
37. Verstraete, F. (2008): *EU legislation on mycotoxins in food and feed: Overview of the decision-making process and recent and future developments*. U: *Mycotoxins: Detection, methods, management, public health and agricultural trade*, ed. J.F. Leslie, R. Bandyopadhyay, A. Visconti, Acera, Guana, 77-100.
38. Zdolec, N., Hadžiosmanović, M., Kozačinski, L., Cvrtila, Ž., Filipović, I. (2006): Ostatci biološki štetnih tvari u mlijeku. *Mljekarstvo* 56 (2), 191-202.
39. Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., Smit, G. (2002): Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal* 12, 91-109.