



IZVORNI ZNANSTVENI RAD

Usporedba vezanja AFM₁ iz mlijeka živim, mrtvim i liofiliziranim stanicama BMK

Željko Jakopović¹, Iva Čanak¹, Anamarija Romac¹, Željka Kuharić², Jasna Bošnjir², Martina Ivešić², Jadranka Frece¹, Željka Pavlek², Ksenija Markov^{1*}

¹ Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, Sveučilište u Zagrebu, 10 000 Zagreb, Hrvatska

² Služba za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju, Nastavni Zavod za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar, Mirogojska 16, 10 000, Zagreb, Hrvatska

* Corresponding author: kmarko@pbf.hr

Sažetak:

Mikotoksini su sekundarni metaboliti niske molekulske mase koje sintetiziraju plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* te su česti kontaminanti raznovrsnih prehrambenih proizvoda. Kako bi se smanjio rast plijesni, a time i udio mikotoksina u namirnicama, koriste se razne fizikalne i kemijske metode. Posljednjih nekoliko godina ispituje se učinak bakterija mliječne kiseline (BMK) na sposobnost inhibicije rasta plijesni i njihova uloga u uklanjanju mikotoksina iz kontaminirane hrane. Zbog svojih, po zdravlje korisnih svojstava, bakterije mliječne kiseline predstavljaju izvrsno rješenje za tretiranje namirnica kontaminiranih mikotoksinima. Cilj ovog rada bio je ispitati i usporediti sposobnosti, živih, mrtvih i liofiliziranih stanica BMK na vezanje aflatoksina M₁ (AFM₁) u umjetno kontaminiranom mlijeku. Ovisno o korištenom soju, vremenu inkubacije i tretmanu, uspješnost vezanja AFM₁ stanicama BMK iznosila je 23,73-94,49%. Liofilizirane stanice ispitivanih sojeva BMK manje ($p < 0,05$) vežu AFM₁ u mlijeku, a jedini izuzetak su stanice *Lactobacillus rhamnosus* KM koje nakon 4 sata vežu AFM₁ u najvećem postotku (>90%). Najveća razlika u uspješnosti vezanja AFM₁ između mrtvih i liofiliziranih stanica uočljiva je kod soja *L. rhamnosus* KM i iznosi 62,49% dok su razlike u vezanju AFM₁ najmanje kod *Lactococcus lactis* 5MS1. Koncentracija slobodnog AFM₁ u mlijeku nakon tretiranja BMK određivana je visoko djelotvornom tekućinskom kromatografijom (HPLC).

Ključne riječi: aflatoksin M₁, bakterije mliječne kiseline, žive stanice, mrtve stanice, liofilizacija

Abstract:

Mycotoxins are secondary low molecular weight metabolites synthesized by some filamentous fungi (mainly *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*) and are common contaminants of various food products. In order to reduce the growth of mold, and thus the share of mycotoxins in foods, various physical and chemical methods are used. In the last few years, the effect of lactic acid bacteria (LAB) on the ability to inhibit mold growth and the role of eliminating mycotoxins from contaminated food has been studied. Because of their beneficial properties on consumers health, lactic acid bacteria are an excellent solution for treating foods contaminated with mycotoxins. The aim of this paper was to examine and compare the ability of viable, dead and lyophilized cells of LAB to bind aflatoxin M₁ (AFM₁) in artificially contaminated milk. Depending on the strain used, time of incubation and treatment, binding of AFM₁ with LAB cells was 23.73-94.49%. The lyophilized cells of the tested LAB strains bind AFM₁ less ($p < 0.05$) with the only exception being *Lactobacillus rhamnosus* KM cells that bind AFM₁ at the highest percentage (>90%) after 4 hours. The greatest difference in the performance of AFM₁ binding between dead and lyophilized cells was observed in *L. rhamnosus* KM strain (62.49%) while smallest differences in AFM₁ binding were observed with *Lactococcus lactis* 5MS1. Free AFM₁ concentration in milk, after LAB treatment was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Keywords: aflatoxin M₁, lactic acid bacteria, viable cells, dead cells, freeze-drying

Uvod

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni koji mogu imati toksične učinke kod ljudi i životinja (IARC, 1993; 2002), a do njihove biosinteze dolazi pod određenim okolišnim uvjetima, prikladnoj relativnoj vlažnosti, temperaturi i sadržaju kisika, te u ovisnosti o fizičkom oštećenju supstrata i prisutnosti plijesni (Sassahara i sur., 2005; Sforza i sur., 2006; Pleadin i sur., 2014; Medina i sur., 2014). Među više od 300 poznatih mikotoksina, aflatoksini se smatraju jednim od najvažnijih mikotoksina, ne samo zbog svoje toksičnosti već i zbog rasprostranjenosti u prirodi. Intenzivnije proučavanje utjecaja miko-

toksina na ljudsko zdravlje počelo je nakon što je dokazano da razgradnjom aflatoksina B₁ (AFB₁) u jetri nastaju izrazito karcinogeni metaboliti, a kao produkt biološke pretvorbe AFB₁ u mliječnim žlijezdama sisavaca hranjenih krmom koja je sadržavala spomenuti aflatoksin (AF), dokazan je aflatoksin M₁ (AFM₁) (Masoero i sur., 2007). 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. AFM₁ je relativno stabilna molekula u sirovom mlijeku isto kao i u mliječnim proizvodima i ne može se inaktivirati toplinskim tretmani-

ma poput pasterezacije ili sterilizacije mlijeka (Govaris i sur., 2002). AFM₁ se može naći u mlijeku i urinu sisavaca nakon konzumacije proizvoda kontaminiranih AFB₁. U zemljama EU dozvoljena koncentracija AFM₁ u mlijeku ne smije prelaziti 0,05 µgkg⁻¹ (EC, 2006) dok u SAD-u maksimalna dozvoljena koncentracija iznosi 0,5 µgkg⁻¹ (FDA, 2005). S obzirom na visoku toksičnost AF, razvijene su strategije za sprečavanje njihova stvaranja u hrani kao i uklanjanje, inaktivaciju ili smanjivanje biorasploživosti u kontaminiranim proizvodima (Hernandez-Mendoza i sur., 2009) te se dijele u dvije kategorije: (i) prevencija rasta mikotoksikogenih plijesnini i (ii) dekontaminacija i/ili detoksifikacija hrane i krmiva kontaminiranih mikotoksinima (Kabak i sur., 2006; Mishra i Das, 2003). Detoksifikacija prehrambenih proizvoda kontaminiranih mikotoksinima upotrebnom fizikalnih i kemijskih metoda, ograničena je zbog sigurnosnih razloga, mogućeg gubitka nutritivne vrijednosti tretiranih namirnica te ograničene uspješnosti i troškova implementacije (Bata i Lasztity, 1999). Navedeni faktori doveli su do razvoja alternativnih strategija detoksifikacije mikotoksina poput upotrebe bioloških agenasa, prvenstveno mikroorganizama. Bakterije mliječne kiseline (BMK), uključujući i neke probiotičke vrste (Dalić i sur., 2010), pokazuju sposobnost vezanja aflatoksina u umjetno kontaminiranom mediju (Kabak i Var, 2008; Haskard i sur., 2001). Iako mehanizam djelovanja BMK na AF nije još razjašnjen, pretpostavlja se da su stanične komponente kao polisaharidi i peptidoglikan odgovorne za fizičko vezanje AF odnosno da se radi o adheziji na komponente stanične stijenke bakterija, umjesto kovalentnog vezanja ili biotransformacije mikotoksina (Shetty i Jespersen, 2006; Lahtinen i sur., 2004). Većina istraživanja vezanja aflatoksina BMK provedena je u otopinama, što otežava njihovu primjenu u hrani i krmu. Moguće rješenje ovog problema bilo bi sušenje stanica BMK i njihova primjena u obliku dodataka prehrani kako bi se smanjila razina izloženosti aflatoksinima, bez narušavanja kvalitete proizvoda (Bovo i sur. 2014). Stoga, cilj ovog rada bio je odrediti sposobnost uklanjanja AFM₁ iz umjetno kontaminiranog mlijeka s pomoću BMK, u obliku živih, mrtvih ili liofiliziranih stanica.

Materijali i metode

Mikroorganizmi

Bakterije mliječne kiseline korištene u ovom radu, *Lactobacillus plantarum* KM, *Lactobacillus paracasei* KM, *Lactobacillus rhamnosus* KM i *Lactococcus lactis* 5MS1 dobivene su iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Zagreb. Kulture su čuvane u MRS bujonu (de Man, Rogosa, & Sharpe, Biolife, Milano, Italija) pri temperaturi od 4 °C do izvođenja pokusa.

Standard AFM₁

Standard AFM₁ nabavljen je od LGC Promochem (Leeds, UK). Radna otopina AFM₁ pripremljena je razrjeđivanjem standarda, 0,5 µg/mL u acetonitrilu do 0,05 µg/mL i pohranjena na 4 °C do izvođenja pokusa.

Određivanje vezanja AFM₁ živim, mrtvim i liofiliziranim BMK u mlijeku

Kako bi se odredilo vezanje AFM₁ pomoću BMK u mlijeku, odabrane kulture BMK koje se čuvaju na 4 °C u MRS bujonu prvo se namnože naciepljivanjem u 3 x 5 mL MRS bujona i inkubiraju na 30 °C tijekom 24 sata. Zatim se svaki bakterijski soj prekonoćne kulture naciepi u 25 mL MRS-a i inkubira na 37 °C tijekom 24 sata. Biomasa poraslih stanica se sakupi pod aseptičkim uvjetima centrifugiranjem (3000 x g 10 min) na sobnoj temperaturi, ispere tri puta s 5 mL sterilne deionizirane vode i resuspendira u sterilnoj deioniziranoj vodi i podijeli u tri skupine. Prva skupina su žive stanice, druga mrtve (termički tretirane), a treća skupina su liofilizirane stanice. Broj živih stanica određen je serijom decimalnih razrjeđenja, brojanjem poraslih kolonija na MRS agaru (Biolife, Milano, Italija) do koncentracije od 10⁸ CFU/mL. Mrtve stanice su termički tretirane u laboratorijskoj vodenoj kupelji pri 100 °C kroz 60 minuta. Stanice BMK tretirane u vodenoj kupelji odvojene su centrifugiranjem na 3000 x g tijekom 10 minuta i pripremljene u količini od 1 mg biomase/mL. Za postupak liofilizacije bakterijska biomasa dobivena centrifugiranjem suspendirana u 1 mL 10%-tnog obranog mlijeka, podijeljena je u alikvote (1,5 mL) i smrznuta na -20 °C preko noći. Proces liofilizacije proveden je na liofilizatoru Christ Alpha 1-2 LD plus (Christ GmbH, Osterode, Njemačka) tijekom 24 sata pri temperaturi od -55 °C.

U uzorke mlijeka u kojima nije dokazana koncentracija AFM₁ dodane su žive (10⁶ CFU/mL), termički tretirane (1 mg/mL) i liofilizirane stanice (0,5 %) te AFM₁ do konačne koncentracije od 0,50 µg/L uzorka. Uzorci mlijeka s bakterijama i AFM₁ nakon inkubacije (4 °C) sakupljeni su centrifugiranjem nakon 0-tog; 2.; 4. i 24. sata inkubacije i u njima je HPLC tehnikom određena količina nevezanog AFM₁.

Određivanje koncentracije aflatoksina M₁ u mlijeku HPLC tehnikom

Prije HPLC analize, uzorci su pročišćeni imunoafinitetnim kolonama (Vicam) uz dodatak 10 mL PBS pufera. Brzina protoka nije prelazila 3 mL/min. Nakon ispiranja kolona s 10 mL destilirane vode i sušenja u vakuumu, AFM₁ je eluiran s 4 mL acetonitrila. Prikupljeni eluat uparen je u struji dušika. Koncentracija preostalog AFM₁ u uzorcima određena je na Agilent 1100 HPLC uređaju (Agilent, Santa Clara, CA, SAD), opremljenim s CSI-6150 vakuum isparivačem, Agilent pumpom (model G 1310 A9) te fluorescentnim detektorom valnih duljina ekscitacije i emisije 365 odnosno 455 nm. Odvajanje je provedeno na Synergi Polar koloni (150 x 3,0 mm, 4µm) (Agilent). Mobilna faza (voda/acetonitril, 60/40, v/v) eluirana je pri protoku 0,5 mL/min, a vrijeme retencije AFM₁ bilo je 3,5 min. Parametri validacije su prikazani u tablici 1.



Tablica 1. Parametri validacije HPLC metode

Table 1. Validation parameters of HPLC method

Parametar / Parameter	Kriterij prihvatljivosti / Eligibility criteria	Rezultati / Results
Selektivnost / Selectivity	Informacija^b / Information^b	Zadovoljava / Satisfies
Iskorištenje / Yield	0,005 µgkg ⁻¹ ⇒ informacija ^b 0,01 µgkg ⁻¹ ⇒ informacija ^b 0,05 µgkg ⁻¹ ⇒ informacija ^b > 0,05 µgkg ⁻¹ ⇒ 70 do 110 % ^a	57,0 % 58,9 % 79,1 % 102 %
Preciznost - preciznost mjerenja / Precision – precision measurement	RSD ≤ 20 % ^c	1,92 %
Linearnost / Linearity	k ≥ 0,999 ^b	0,999
Granica detekcije / Detection Limit	≤ 1/3MDK (0,017 µgkg ⁻¹) ^b	0,0025 µgkg ⁻¹
Granica kvantifikacije / Quantification Limit	≤ 1/2MDK (0,025 µgkg ⁻¹) ^b	0,005 µgkg ⁻¹

a prema Uredbi komisije (EZ) br. 401/2006 o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani / a Commission Regulation (EC) No. 401/2006 laying down sampling and analysis methods for the official control of levels of mycotoxins in foodstuffs

b prema rezultatima validacijskih eksperimenata / b according to the results of validation experiments

c Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (NN 02/05) / c Ordinance on the Implementation of Analytical Methods and Interpretation of Results (OG 02/05)

Statistička analiza

Svi pokusi provedeni su u triplikatu. Za statističku obradu podataka korišten je program STATISTICA v.7.1. za Windows 10 (Stat-Soft, Tulsa, OK, SAD). Srednje vrijednosti postotaka vezanja AFM₁ živim, mrtvim i liofiliziranim stanicama BMK uspoređene su korištenjem dvostruke analize varijanci (ANOVA), a statistički značajne razlike izražene su na razini vjerojatnosti od 95 % (p<0,05).

Rezultati i rasprava

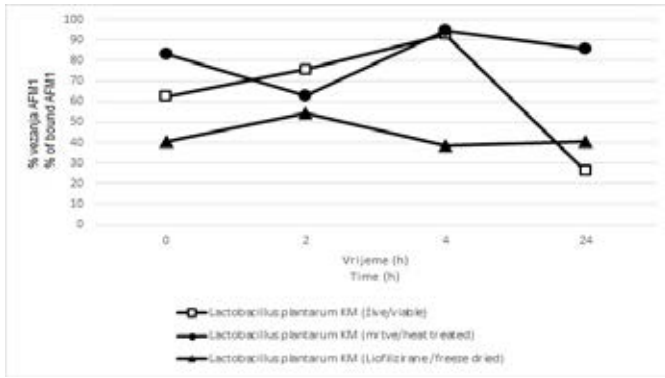
Odabranim sojevima BMK ispitana je mogućnost vezanja aflatoksina M₁ u mlijeku. U eksperimentima su korištene žive, mrtve (termički tretirane) i liofilizirane stanice BMK. Dobiveni rezultati su prikazani na slikama 1-4, a u tablici 2 vidljiv je i raspon koncentracija AFM₁ u mlijeku tijekom 24 sata, inokuliran sa živim, mrtvim i liofiliziranim stanicama BMK.

Tablica 2. Koncentracija AFM₁ (µg/L) u prisutnosti BMK tijekom 24 sata

Table 2. Concentration of AFM₁ (µg/L) in presence of LAB during 24 hours

Soj / Strain	Raspon koncentracija AFM ₁ (µg/L) / AFM ₁ concentration range (µg/L)		
	Žive stanice / Viable cells	Mrtve stanice / Heat treated cells	Liofilizirane stanice / Freeze-dried cells
<i>L. plantarum</i> KM	0,04-0,36	0,03-0,18	0,21-0,28
<i>L. paracasei</i> KM	0,15-0,30	0,06-0,14	0,16-0,32
<i>L. rhamnosus</i> KM	0,08-0,33	0,08-0,18	0,04-0,35
<i>L. lactis</i> SMS1	0,12-0,35	0,15-0,34	0,24-0,34

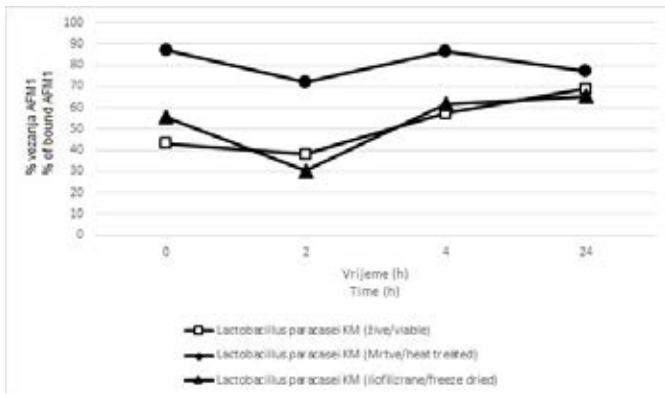
Uspješnost vezanja AFM₁ stanicama BMK iznosila je od 23,73-94,49 %, ovisno o korištenom soju, vremenu inkubacije i tretmanu stanica. Statistički značajno (p<0,05) vezanje AFM₁ uočeno je kod soja *L. plantarum* KM živim i mrtvim stanicama nakon 4 sata inkubacije u usporedbi s liofiliziranim stanicama (58,37 % odnosno 59,18 %) (slika 1).



Slika 1. Postotak vezanja AFM₁ živim, mrtvim i liofiliziranim stanicama *L. plantarum* KM

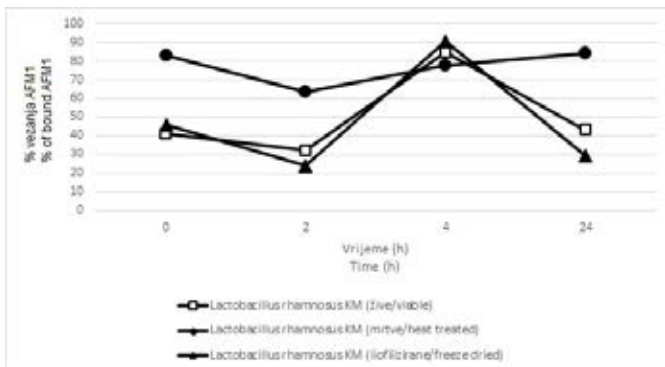
Figure 1. Percentage of AFM₁ binding by live, heat treated and freeze-dried cells of *L. plantarum* KM

Mrtve stanice *L. paracasei* KM pokazuju veći postotak vezanja AFM₁ u odnosu na žive i liofilizirane stanice, što se posebice vidi u drugom satu gdje ta razlika iznosi 46,88 % odnosno 57,77 % ($p < 0,05$) (slika 2). Na slici 3 vidljivo je da nakon 4 sata, žive, mrtve i liofilizirane stanice *L. rhamnosus* KM ne pokazuju značajnu razliku u vezanju AFM₁ iz mlijeka. U ostalim vremenima mjerenja mrtve stanice su značajno vezale AFM₁, čak do 62,49 % u odnosu na liofilizirane stanice te 49,36 % u odnosu na žive stanice ($p < 0,05$).



Slika 2. Postotak vezanja AFM₁ živim, mrtvim i liofiliziranim stanicama *L. paracasei* KM

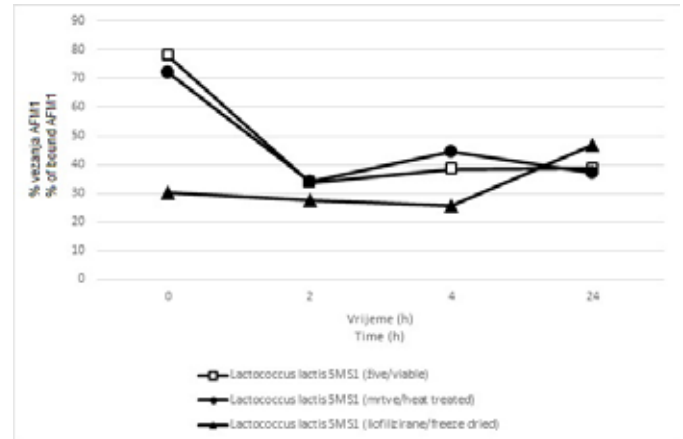
Figure 2. Percentage of AFM₁ binding by live, heat treated and freeze-dried cells of *L. paracasei* KM



Slika 3. Postotak vezanja AFM₁ živim, mrtvim i liofiliziranim stanicama *L. rhamnosus* KM

Figure 3. Percentage of AFM₁ binding by live, heat treated and freeze dried cells of *L. rhamnosus* KM

Najmanju sposobnost vezanja pokazale su stanice *L. lactis* 5MS1 čiji postotak ne prelazi 80 % (slika 4). Na slici 4 također je vidljivo da liofilizirane stanice manje vežu AFM₁ u nultom satu u odnosu na žive i mrtve stanice, a nakon 24 sata nema značajne promjene u vezanju ($p > 0,05$).



Slika 4. Postotak vezanja AFM₁ živim, mrtvim i liofiliziranim stanicama *L. lactis* 5MS1

Figure 4. Percentage of AFM₁ binding by live, heat treated and freeze-dried cells of *L. lactis* 5MS1

Dobiveni rezultati su veći u odnosu na rezultate Pierides i sur. (2000) kod kojih je %-tak vezanja AFM₁ za žive stanice *Lactobacillus* sojeva u vremenu od 15-16 sati bio u rasponu od 18,1 do 53,8 %. Slične rezultate vezanja, ali za AFB₂, su u svom istraživanju dobili Peltonen i sur. (2001) kada su ispitali sposobnost vezanja AFB₁ za 15 sojeva BMK. Na osnovu dosadašnjih istraživanja uočeno je bolje vezanje AFB₁ u odnosu na AFM₁. Razlog tome može biti dodatna -OH skupina u molekuli AFM₁ koja povećava polarnost same molekule AFM₁, odnosno obzirom na veću hidrofilnost ima tendenciju zaostajanja u vodenoj otopini. Nadalje, Pierides i sur. (2000) su zaključili kako je manja uspješnost uklanjanja AFM₁ iz mlijeka u odnosu na AFB₁ posljedica njegovog vezanja za kazein te smanjenje dostupnosti molekule. Elgerbi i sur. (2006) su uočili veće uklanjanje AFM₁ iz UHT mlijeka s *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. i *Bifidobacterium* spp. sojevima tijekom 24, 48, 72 i 96 sati, što ukazuje na potrebu za daljnjim ispitivanjima interakcija između BMK i AFM₁.

El-Nezami i sur. (1998) su uočili razliku u postotku vezanja AFB₁ živim stanicama *L. rhamnosus* GG (77±1 %) i *L. rhamnosus* LC-705 (75±4 %) te liofiliziranim živim stanicama (65±2 % odnosno 50±1 %) tijekom 4 sata. Ovakva razlika objašnjena je mogućnošću induciranja promjena u komponentama stanične stijenke živih bakterija koje doprinose sposobnosti vezanja AFB₁. Ovu pretpostavku dodatno potvrđuju i rezultati istih autora (El-Nezami i sur., 1998) koji su ustanovili kako je vezanje AFB₁ puno učinkovitije s gram pozitivnim nego gram negativnim bakterijama, čime je dodatno stavljen naglasak na građu stanične stijenke i vezanja toksina. Nadalje, prema Carvalho i sur. (2004), liofilizacija (sama faza sušenja) bakterijskih kultura može imati za posljedicu oštećenje stanične stijenke, stanične membrane, DNA, denaturacije osjetljivih proteina i smanjenja održivosti stanica.



Dobro uklanjanje toksina pomoću živih stanica BMK zabilježili su i Bovo i sur. (2013). AFM₁ su djelomično uklonili iz otopine PBS pufera i umjetno kontaminiranog obranog mlijeka dodatkom *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* sojeva, dok su Kabak i Var (2008) iz rekonstituiranog mlijeka dodatkom *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* sojeva uklonili 7,85-25,94 % AFM₁. Iako mehanizam djelovanja ovih mikroorganizama na aflatoksin još nije razjašnjen, a budući da je dokazano da i žive i mrtve stanice vežu mikotoksine, predložen je model mehanizma vezanja mikotoksina koji se odvija u dva procesa: vezanje (adsorpcija) i otpuštanje (desorpcija) za/od mjesta vezanja na površini stanice mikroorganizma. (Lahtinen i sur. 2004; Shetty i Jespersen, 2006).

Zaključci

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da mrtve stanice BMK imaju bolju sposobnost vezanja AFM₁ u umjetno kontaminiranom mlijeku u odnosu na žive i liofilizirane žive stanice. Primjena mrtvih stanica BMK mogla bi ponuditi rješenje smanjenja koncentracije AFM₁ u mlijeku u posebnim situacijama kontaminacije mlijeka (kada su NDK za AFM₁ iznad dozvoljenih koncentracija), a da ne utječe na kvalitetu samog proizvoda. Nadalje, ovo će istraživanje biti usmjereno na razumijevanje mehanizma uključenog u uklanjanje mikotoksina pomoću BMK i potencijalnu primjenu u mliječnoj industriji.

Zahvala

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom „Inovativni postupci uklanjanja AFM₁ biofiksatorima iz mlijeka, (IP-2016-06-4306).

Literatura

Bata, A. Lasztity, R. (1999) Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science and Technology*, 10 223-228.

Bovo, F., Franco, L., Rosim, R., Trindade, C., Oliveira, C. (2014) The Ability of *Lactobacillus rhamnosus* in Solution, Spray-dried or Lyophilized to Bind Aflatoxin B₁. *Journal of Food Research*, 3(2) 35-43.

Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X., Gibbs, P. (2004) Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 14 835-847.

Dalié, D.K.D., Deschamps, A.M., Richard-Forget, F. (2010) Lactic acid bacteria-potential for control of mould growth and mycotoxins: a review. *Food Control*, 21(4) 370-380.

EC (2006) Commission Regulation 1881/2006 of 19 December setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union, L 364 5-24.

Elgerbi, A.M., Aidoo, K.E., Candlish, A.A.G., Williams, A.G. (2006) Effects of lactic acid bacteria and bifidobacteria on levels of aflatoxin M₁ in milk and phosphate buffer. *Milchwissenschaft*, 61(2) 197-199.

El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., Ahokas, J. (1998) Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁. *Food and Chemical Toxicology*, 36 321-326.

FDA (2005) Sec. 527.400 whole milk, low fat milk, skim milk - Aflatoxin M₁ (CPG 7106.10). FDA/ORR Compliance Policy Guides.

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 and Contaminants*, 19 (11) 1043-1050.

Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Kankaanpää, P.E., Salminen S., Ahokas, A.T. (2001) Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7) 3086-3091.

Hernandez-Mendoza, A., Garcia, H. S., Steele, J. L. (2009) Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B₁. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1064-1068. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.042>

International Agency for Research on Cancer (IARC) (1993) Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans. Vol. 56, IARC, Lyon, France.

International Agency for Research on Cancer (IARC) (2002) Aflatoxins. In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 62, IARC, Lyon, France.

Kabak, B., Dobson, A.D.W., Var, I. (2006) Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46 593-619.

Kabak, B., Var, I. (2008) Factors affecting the removal of aflatoxin M₁ from food model by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 43 617-624.

Lahtinen, S. J., Haskard, C. A., Ouwehand, A. C., Salminen, S. J., Ahokas, J. T. (2004) Binding of aflatoxin B₁ to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Additives and Contaminants*, 21, 158-164. <http://dx.doi.org/10.1080/02652030310001639521>

Masoero, F., Gallo, A., Moschini, M., Piva, G., Diaz, D. (2007) Carry-over of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal*, 1 1344-1350.

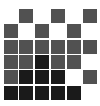
Medina A., Rodriguez A., Magan N. (2014) Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B₁ production. *Frontiers in Microbiology*, 5 1-7.

Mishra, H.N., Das, C. (2003) A review on biological control and metabolism of aflatoxins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 245-264.

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 2152-2156.

Pierides, 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.

Pleadin, J., Frece, J., Markov, K. (2014) Aflatoxini - Onečišćenje, učinci i metode redukcije. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 9(3-4) 75-82.



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.

Sforza, S., Dall'Astra, C., Marchelli, R. (2006) Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 25 54-76.

Shetty, P.H., Jespersen, L. (2006) *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science and Technology*. 17 48-55.