



IZVORNI ZNANSTVENI RAD – ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER

Uklanjanje kompleksa β -glukan-AFM₁ iz mlijeka

Removal of β -glucan-AFM₁ complex from milk

Željko Jakopović¹, Iva Čanak¹, Jadranka Frece¹, Jasna Bošnjir², Martina Ivešić², Željka Kuharić², 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 toksikotvornih plijesni te su česti kontaminanti raznih prehrambenih proizvoda. Pojava aflatoksina M₁ (AFM₁) u mlijeku, prijjetnja je zdravlju potrošača, posebice maloj djeci te dovodi do ekonomskih gubitaka zbog zbrinjavanja kontaminiranog mlijeka. Metode uklanjanja i/ili redukcije mikotoksina koje se koriste u prehrambenoj industriji troše velike količine energije i kemijskih sredstava, stoga biološke metode sve više dobivaju na značaju zbog svoje netoksičnosti i ekološkog aspekta. Cilj ovog rada je bio odrediti količinu nevezanog AFM₁ nakon uklanjanja kompleksa β -glukan-AFM₁ pomoću Centricon 70 Plus, MWCO 100 kDa filtera. U radu je upotrijebljen komercijalni β -glukan dobiven iz zobi i β -glukan izoliran iz biomase kvasca. Rezultati istraživanja ukazuju da je nakon uklanjanja kompleksa β -glukan-AFM₁ u uzorku mlijeka zaostalo 35% AFM₁ u slučaju kada je β -glukan dobiven iz zobi, odnosno 36,4% AFM₁ kada je β -glukan izoliran iz kvasca.

Ključne riječi: aflatoksin M₁, β -glukan, kvasac, LC/MS-MS, zob

Abstract

Mycotoxins are secondary metabolites of toxic molds and are common contaminants of various food products. The appearance of aflatoxin M₁ (AFM₁) in milk is a threat to consumers' health, especially to small children and leads to economic losses due to the disposal of contaminated milk. Methods of removal and/or reduction of mycotoxins used in the food industry consume large amounts of energy and chemical resources, so biological methods are increasingly gaining importance because of its non-toxicity and ecological aspect. The aim of this study was to determine the amount of unbound AFM₁ after removing the β -glucan-AFM₁ complex using Centricon 70 Plus, MWCO 100 kDa filter. The commercial β -glucan obtained from oats and β -glucan isolated from yeast biomass were used in this paper. The results show that after the removal of complexes in the milk sample, level of retained AFM₁ was 35% for β -glucan obtained from oats and 36.4% for β -glucan isolated from yeast, respectively.

Keywords: aflatoxin M₁, binding, β -glucan, yeast, LC/MS-MS, oats

Uvod

Zbog činjenice da prisutnost plijesni i/ili mikotoksina u hrani može biti opasna po ljudsko zdravlje i predstavljati gospodarski problem enormnih razmjera, sve je veći naglasak na razvoj metoda redukcije mikotoksina kojima bi se omogućila proizvodnja zdravstveno ispravne hrane (Pleadin i sur. 2014). Aflatoksini su štetni za zdravlje ljudi i životinja, uglavnom zbog mutagenih, teratogenih, imunosupresivnih te kancerogenih učinka. Aflatoksin B₁ (AFB₁) je mikotoksin koji napada jetru i može uzrokovati rak tijekom kroničnog izlaganja. Hidroksilacija AFB₁ dovodi do stvaranja aflatoksina M₁ (AFM₁), koji je zbog citotoksičnih, genotoksičnih i karcinogenih učinaka (Murphy i sur., 2006; Ostry i sur., 2017) klasificiran u skupinu 2B (IARC, 2002). Budući da se proces hidroksilacije AFB₁

odvija u buragu mliječnih sisavaca hranjenih kontaminiranom hranom, sadržaj AFM₁ u mlijeku je povezan s razinom AFB₁ u sirovoj hrani (Creppy, 2002, Bakirci, 2001). Kako je mlijeko glavni hranjivi sastojak u prehrani djece, a ona su osjetljivija na aflatoksine u usporedbi s odraslim osobama. Uzimajući u obzir zdravstvene rizike povezane s izloženosti čovjeka na AFM₁, velik broj zemalja postavio je maksimalne dopuštene količine (MDK) AFM₁ u mlijeku (Prandini i sur., 2009). Međutim, ta ograničenja variraju između 0,05 μ g/kg u europskim zemljama (EC, 2006) i 0,5 μ g/kg u SAD-u (FDA, 2005). Sprječavanjem rasta plijesni i stvaranja AFB₁ u poljoprivrednim proizvodima namijenjenim za životinje primjenom dobre proizvođačke prakse (DPP) moguće je kontrolirati koncentraciju AFM₁ u hrani. Trenutačno ne postoji tehnologija koja bi potpuno uklonila mikotoksine iz hrane i prehrambenog lanca. Kako

bi se uklonili aflatoksini ili smanjila njihova prisutnost u hrani i hrani za životinje, primjenjuju se fizikalne, kemijske i biološke metode (Jaynes i Zartman, 2011). U posljednjih nekoliko godina biološke metode dekontaminacije su sve značajnije jer se smatraju sigurnijima u usporedbi s fizikalnim i kemijskim metodama (Gonçalves i sur., 2017). Provedena su brojna ispitivanja staničnih stijenki kvasaca i bakterija zbog njihove sposobnosti formiranja kompleksa s mikotoksinima kako bi detoksificirali hranu i krmivo (Assaf i sur., 2017; Faucet-Marquis i sur., 2014). Isto tako, istraživanja (Yiannikouris i sur., 2004a; Yiannikouris i sur., 2004b) pokazuju da se dodatkom kvasca *Sacchomyces cerevisiae* kontaminiranoj hrani ili krmnoj smjesi, prisutni mikotoksini selektivno vežu, stoga je moguće izbjeći „carry-over“ efekt mikotoksina na jestive životinjske proizvode kao što su jaja, meso ili mlijeko (Yiannikouris i sur., 2006). β -glukan koji je sastavni dio stanične stijenke kvasca, plijesni i nekih viših biljaka ekološki je prihvatljiv za uklanjanje aflatoksina, bez sinteze negativnih nusproizvoda te se nameće kao alternativno rješenje naspram tradicionalnih fizikalnih, kemijskih i fizikalno-kemijskih metoda redukcije aflatoksina (Karazhiyan i sur., 2016). Cilj ovog rada je bio ispitati djelotvornost komercijalnog β -glukana dobivenog iz zobi i β -glukana izoliranog iz kvasčeve biomase na uklanjanje AFM₁ iz umjetno kontaminiranog mlijeka.

Materijali i metode

Priprema mlijeka kontaminiranog s AFM₁

AFM₁ standard (0,5 μ g/mL) otopljen u acetonitrilu nabavljen je od LGC Promochem (Leeds, UK). Mlijeko je kontaminirano do konačne koncentracije od 0,5 μ g/kg razrjeđivanjem standardne otopine AFM₁ u punomasnom mlijeku (kupljeno na lokalnom tržištu).

Priprema β -glukana

β -glukan izoliran je iz stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* 20, koji je dio zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju hrane, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. β -glukan iz zobi nabavljen je od tvrtke Darvitalis (Zagreb, Hrvatska). Izolacija iz stanične stijenke kvasca napravljena je prema Zechner-Krpan i sur. (2010), a na način da je biomasa svježeg kvasca podvrgnuta alkalno kiseloj ekstrakciji uz uklanjanje manoproteina, a dobiveni mokri talog osušen je na zraku pri sobnoj temperaturi. Izolirani β -glukan potvrđen je (1-3) (1-6) β -D-glukan kitom (Megazyme, Wicklow, Poljska).

Vežanje AFM₁

β -glukan je dodan u umjetno kontaminirano mlijeko u koncentraciji od 0,01% i 0,005%. Uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi tijekom 24 h. U određenim vremenskim intervalima (0, 2, 4 i 24h) uzorci su filtrirani kroz Centricon 70 Plus, MWCO 100 kDa (Merck, Darmstadt, Njemačka) pri 3500 x g tijekom 10 minuta radi uklanjanja AFM₁- β -glukan kompleksa. Uzorci za određivanje nevezanog AFM₁ izuzeti su u 0, 2, 4 i 24 satu trajanja pokusa.

Određivanje nevezanog AFM₁

Homogenizirani uzorak mlijeka (70 g) prenesen je u kivetu i centrifugiran 15 min pri 4500 x g. Gornji sloj masne

komponente uklonjen je i 50 mL supernatanta propušteno je kroz imunoafinitetnu kolonu (Vicam, MA, USA) prethodno kondicioniranu s 10 mL fosfatnog (PBS) pufera. Aflatoksin M₁ eluiran je s 4 mL acetonitrila. Eluat je sakupljen i uparen do suhog u struji dušika.

Nevezani mikotoksin je kvantificiran korištenjem UPLC-MS / MS (Waters, MA, USA). AFM₁ iz mlijeka dobiven je u mobilnoj fazi s 0,1% mravlje kiseline u vodi i 0,1% mravlje kiseline u acetonitrilu. Protok je bio fiksiran na 0,25 ml / min, volumen injekcije 20 μ L a vrijeme retencije AFM₁ iznosilo je 10 minuta.

Statistička analiza

Svi pokusi provedeni su u triplicatu. Za statističku obradu podataka korišten je program STATISTICA v.7.1. za Windows 10. Srednje vrijednosti vezanja AFM₁ β -glukanom iz zobi i β -glukanom izoliranim iz stanične stijenke kvasca, uspoređene su korištenjem dvostruke analize varijanci (ANOVA), a statistički značajne razlike izražene su na razini vjerojatnosti od 95% ($p < 0,05$).

Rezultati i rasprava

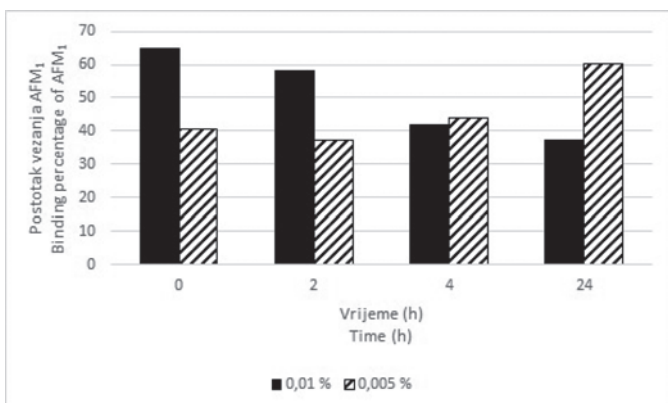
Biološke metode uklanjanja ne koriste dodane kemikalije koje bi mogle nepovoljno utjecati na okoliš, a spriječeno je i nastajanje nepoželjnih nusproizvoda u namirnici koji bi mogli narušiti zdravstvenu ispravnost i senzorska svojstva hrane te samim time nepovoljno utjecati na zdravlje ljudi (Yiannikouris i sur., 2006). Stoga je cilj ovoga rada bio ispitati sposobnost uklanjanja AFM₁ iz umjetno kontaminiranog mlijeka pomoću β -glukana izoliranog iz zobi te iz stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* 20, kao biofiksatora. Ispitana su dva različita postotka β -glukana (0,01% i 0,005%), a koncentracije nevezanog AFM₁ (μ g/kg) nakon uklanjanja kompleksa AFM₁- β -glukan su prikazane u tablici 1. Početna koncentracija AFM₁ u mlijeku iznosila je 0,5 μ g/kg. Dodatkom 0,01% β -glukana iz zobi koncentracija AFM₁ u uzorku mlijeka smanjila se na 0,175 μ g/kg već u početku eksperimenta. Tijekom 24 sata, koncentracija AFM₁ je porasla do 0,314 μ g/kg (Tablica 1), što ukazuje na reverzibilno vežanje molekula AFM₁ i β -glukana. Utjecaj 0,005% β -glukana iz zobi na koncentraciju AFM₁ je slabiji (usporedno s 0,01%) i najmanja koncentracija AFM₁ detektirana je tek nakon 24 sata u iznosu od 0,200 μ g/kg (Tablica 1). Uspoređujući koncentracije β -glukana izoliranog iz stanične stijenke kvasca i β -glukana iz zobi, vidljivo je da β -glukan iz kvasca ima slabiju sposobnost uklanjanja AFM₁ iz mlijeka. Koncentracije nevezanog AFM₁ nakon uklanjanja kompleksa AFM₁- β -glukan (iz kvasca) veće su u odnosu na koncentracije nevezanog AFM₁ nakon uklanjanja kompleksa AFM₁- β -glukan (iz zobi) (Tablica 1). Nakon tretmana s 0,01% i 0,005% β -glukana iz kvasca te nakon uklanjanja kompleksa, u uzorku mlijeka je dokazana koncentracija nevezanog AFM₁ u rasponu od 0,247-0,460 μ g/kg, odnosno 0,182-0,444 μ g/kg (Tablica 1). Najbolje uklanjanje AFM₁ pokazalo se upotrebom 0,01% β -glukana iz zobi i 0,005% β -glukana izoliranog iz kvasca i iznosi 0,175 μ g/kg odnosno 0,182 μ g/kg. Dobiveni rezultati se poklapaju s istraživanjem skupine autora Rahaie i sur. (2012) koji su zaključili da je faza vežanja aflatoksina vrlo brz proces i svoj maksimum dostiže u prvim satima.



Tablica 1. Koncentracija nevezanog AFM₁ (μg/kg) u umjetno kontaminiranom mlijeku tijekom 24 sata nakon uklanjanja kompleksa AFM₁-β-glukan

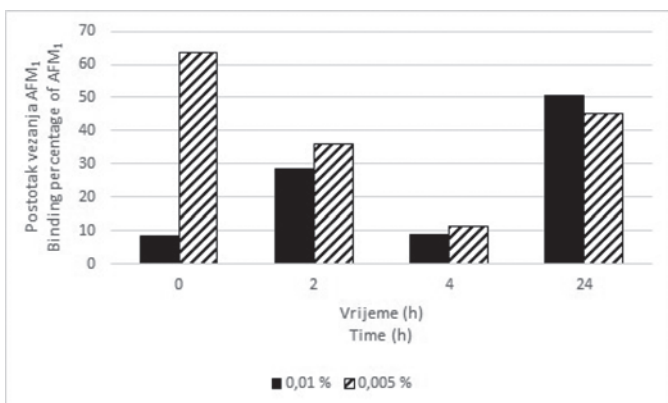
Table 1. Concentration of unbound AFM₁ (μg/kg) in artificially contaminated milk during 24 hours after removal of AFM₁-β-glucan complex

Vrijeme (h) / Time (h)	Konc. β-glukana / β-glucan conc.		AFM ₁ (μg/kg)	
			β-glukan iz kvasca / β-glucan from yeast	β-glukan iz zobi / β-glucan from oats
	0,01 %	0,005 %	0,01 %	0,005 %
0	0,460	0,182	0,175	0,298
2	0,357	0,322	0,210	0,314
4	0,456	0,444	0,291	0,282
24	0,247	0,275	0,314	0,200



Slika 1. Postotak vezanja AFM₁ iz umjetno kontaminiranog mlijeka β-glukanom iz zobi

Figure 1. Binding percentage of AFM₁ from artificially contaminated milk with β-glucan from oats



Slika 2. Postotak vezanja AFM₁ iz umjetno kontaminiranog mlijeka β-glukanom iz kvasca

Figure 2. Binding percentage of AFM₁ from artificially contaminated milk with β-glucan from yeast

Rezultati prikazani na slici 1 također vode zaključku kako je vezanje AFM₁ efikasnije upotrebom β-glukana iz zobi, a to je

najvjerojatnije posljedica drugačije molekulske građe u odnosu na β-glukan izoliran iz kvasca (slika 2). Razlika u molekularnoj strukturi odražava se i na fizikalno-kemijske karakteristike, a smanjena topljivost ili bioraspodivnost u mediju uzrokuju i sasvim drugačije metaboličke reakcije (El-Arab i sur., 2009).

Na početku eksperimenta obje vrste β-glukana ostvarile su dobro vezanje AFM₁ i to 65% β-glukan iz zobi (slika 1), odnosno 63,6% β-glukan iz kvasca (slika 2). Usporedimo li postotke vezanja AFM₁ 0,01%-tnim i 0,005%-tnim β-glukanom iz zobi, uočljive su značajne razlike (p<0,005). U nultom i drugom satu eksperimenta, 0,01% β-glukan značajnije je vezao AFM₁ (p<0,05) u odnosu na 0,005% β-glukan. Međutim, nakon 24 sata, postotak vezanja AFM₁ je drugačiji i 0,005% β-glukan značajnije (p<0,05) veže AFM₁. Međutim, kada pogledamo vezanje β-glukana iz kvasca, uočljivo je da 0,005% β-glukan u nultom satu veže značajno više AFM₁ (p<0,05), u odnosu na 0,01%. Tijekom trajanja eksperimenta, 0,01% i 0,005% β-glukana iz kvasca nisu pokazivali značajne razlike u sposobnosti vezanja AFM₁.

Slika 1 također pokazuje kako upotrebom 0,01% β-glukana iz zobi, sposobnost vezanja AFM₁ linearno pada s vremenom, dok se upotrebom 0,005% β-glukana, sposobnost vezanja AFM₁ povećava nakon drugog sata eksperimenta do svog maksimuma u 24. satu.

Slika 2, međutim, prikazuje izrazito nelinearan rast odnosno pad sposobnosti vezanja AFM₁. Ovakva promjena može se objasniti činjenicom da je reakcija vezanja AFM₁ i β-glukana, odnosno nastajanje kompleksa AFM₁-β-glukan reverzibilna reakcija, u kojoj značajnu ulogu imaju slabe van der Waalove veze (Yiannikouris i sur., 2006).

Yiannikouris i sur. (2006) navode kako je veza između β-glukana i istraživanih mikotoksina (aflatoksin B₁, deoksini-valenol i patulin) uključivala interakciju van der Waalovih sila kao i stabilnu vodikovu vezu koja povezuje hidroksilne, ketonske i laktonske skupine koje su uglavnom prisutne u mikotoksima, a doprinose stabilnosti kompleksa mikotoksin-β-glukan. Također, uvjeti okoline, kao što su stereokemija, pH vrijednost i hidrofobna svojstva mikotoksina od primarne su važnosti za stvaranje kompleksa mikotoksin-β-glukan te određuju afinitet mikotoksina prema β-glukanu, a može se primijeniti i na interakciju AFM₁ i β-glukana. Međutim, valja napomenuti kako sam mehanizam vezanja AFM₁ i β-glukana još nije u potpunosti istražen, budući da je većina istraživanja usredotočena na druge mikotoksine. Stoga, nema puno podataka za usporedbu s rezultatima ovog istraživanja te su potrebna daljnja ispitivanja vezana uz biološku dekontaminaciju AFM₁.

Zaključci

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da oba ispitivana β-glukana (iz zobi i iz kvasca) imaju sposobnost vezanja AFM₁, odnosno formiranja kompleksa AFM₁-β-glukan, a samim time i mogućnost uklanjanja tog mikotoksina iz mlijeka. Budući da je β-glukan izoliranom iz kvasca *S. cerevisiae* dodijeljen GRAS status (FDA, 1983), a da je β-glukan iz kvasca u ovom istraživanju u koncentraciji od 0,005% pokazao značajno vezanje AFM₁, može se zaključiti da kao takav predstavlja potencijalnu primjenu biološke dekontaminacije AFM₁ iz mlijeka u industriji.



Zahvala

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

Literatura

- Assaf, J.C., Atoui, A., Khoury, E.L., Chokr, A., Louka, N. (2017) A comparative study of procedures for binding of aflatoxin M1 to *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49 120-127.
- 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 47-51.
- Creppy, E.E (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127 19-28.
- El-Arab, A.E., Foheid, S. and El-Said, M. (2009) Effect of yeast and botanical beta-glucan on serum lipid profile and cecum probiotic bacteria using rats fed cholesterol diet, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 59 (2) 169-174.
- European Commission (2006) Commission regulation (EC) no 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of European Union*, 364 5-24
- Faucet-Marquis, V., Joannis-Cassan, C., Hadjeba-Medjoud, K., Ballet, N., Pfohl-Leskowicz, A. (2014) Development of an in vitro method for the prediction of mycotoxin binding on yeast-based products: case of aflatoxin B, zearalenone and ochratoxin A. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 7583-7596.
- Food and Drug Administration – FDA (2005) Compliance program guidance manual. <http://www.fda.gov/downloads/animalveterinary/guidancecomplianceenforcement/complianceenforcement/ucm113409.pdf>. Pristupljeno: 31.03.2018.
- Food and Drug Administration – FDA (1983) FDA Specifications 184.1983. <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2002-title21-vol3/pdf/CFR-2002-title21-vol3-sec184-1983.pdf>. Pristupljeno: 27.09.2018.
- Gonçalves, B.L., Gonçalves, C., Rosim, R.E., Oliveira, C.A.F., Corassin, C.H. (2017) Evaluations of Different Sources of *Saccharomyces cerevisiae* to Binding Capacity of Aflatoxin B1 Utilizing their Adsorption Isotherms, *Journal of Food Chemistry and Nanotechnology*, 3(4) 126-132.
- 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.
- Jaynes, W.F., Zartman, R.E. (2011) Aflatoxin toxicity reduction in feed by enhanced binding to surface-modified clay additives. *Toxins*, 3 551-565.
- Karazhyan, H., Mehraban Sangatash, M., Karazhyan, R., Mehrzad, A., Haghighi, E. (2016) Ability of Different Treatments of *Saccharomyces cerevisiae* to Surface Bind Aflatoxin M1 in Yoghurt, *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18 1489-1498.
- Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C., Bryant, C.M. (2006) Food mycotoxins: an update. *Journal of Food Science*, 71 51-65.
- Ostry, V., Malir, F., Toman, J., Grosse, Y. (2017) Mycotoxins as human carcinogens – the IARC monographs classification. *Mycotoxin Research*, 33 65-73.
- 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.
- Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., Piva, G. (2009) On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47 984-991.
- Rahaie, S., Emam-Djomeh, Z., Razavi, S. H., Mazaheiri, M. (2012) Evaluation of aflatoxin decontaminating by two strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pistachio nuts, *International Journal of Food Science and Technology*, 47 (8) 1647-1653
- Yiannikouris, A., Andre, G., Poughon, L., Francois, J., Dussap, C.G., Jeminet, G., Bertin, G., Jouany, J.P. (2006) Chemical and Conformational Study of the Interaction Involved in Mycotoxin Complexation with b-d-Glucans. *Biomacromolecules*, 7 (4) 1147-1155.
- Yiannikouris, A., Francois, J., Poughon, L., Dussap, C. G., Bertin, G., Jeminet, G., Jouany, J.P. (2004a) Adsorption of Zearalenone by b-d-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Journal of Food Protection*, 67 (6) 1195-1200.
- Yiannikouris, A., Francois, J., Poughon, L., Dussap, C. G., Bertin, G., Jeminet, G., Jouany, J.P. (2004b) Influence of pH on Complexing of Model b-d-glucans with Zearalenone. *Journal of Food Protection*, 67 (12) 2741-2746.
- Zechner-Krpan, V., Petravić-Tominac, V., Gospodarić, I., Sajli, L., Đaković, S., Filipović-Grčić, J. (2010) Characterization of β -Glucans Isolated From Brewer's Yeast and Dried by Different Methods, *Food Technology and Biotechnology*, 48 (2) 189-197.