

Hrvatska zaklada za znanost

Istraživački projekt IP-2016-06-4306

„Inovativni postupci uklanjanja AFM₁
biofiksatorima iz mlijeka“

BIOMYCOFIX-MILKFREE

Ustanova nositelja projekta:
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zagreb, 24.03.2017.

Voditeljica Projekta
Prof.dr.sc.Ksenija Markov

-Ugovor je potpisan dana **22.02.2017.**

-Trajanje projekta 2 god. od **01.03.2017.** do **28.02.2019.**

-Ukupan iznos projekta =**484.091,00 kn**

Projekt se 100% financija sredstvima Hrvatske zaklade za znanost

Ciljevi projekta

- odrediti optimalne parametre vezanja AFM_1 u mlijeku pomoću bakterija mliječne kiseline (BMK) izolirane iz tradicionalnih mliječnih proizvoda i β -glukana
- predložiti rješenje uklanjanja nastalog kompleksa biofiksator- AFM_1 , a da pri tome ne dođe do promjene nutritivne vrijednosti mlijeka
- potaknuti proizvođače mlijeka na kontinuirano praćenje AFM_1 u mlijeku, budući da najveća odgovornost za kvalitetu i zdravstvenu ispravnost mlijeka leži na subjektima u poslovanju s hranom

Aktivnosti svakog člana projektnog tima

1. Voditeljica, prof.dr.sc. Ksenija Markov- upravljačka uloga u financijskim i svim ostalim aktivnostima
2. Prof.dr.sc. Jadranka Frece-priprema i odabir najučinkovitijih biofiksatora AFM₁, molekularne metode u identifikaciji BMK
3. Željko Jakopović, mag. ing.- priprema uzoraka za određivanje vezanja AFM₁ i ostale mikrobiološke metode
4. Iva Čanak, mag.ing.- provođenje molekularnih metoda u identifikaciji BMK
5. Izv. prof.dr.sc. Jasna Bošnjir- analize mikotoksina i kemijske analize sastava mlijeka
6. Željka Pavlek,dipl.ing.- priprema i pročišćavanje uzoraka mlijeka i korištenje imunoafinitenih kolona
7. Željka Kuharić, dipl.ing.-identifikacija i kvantifikacija aflatoksina M₁ tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti
8. Dr.sc.Martina Ivešić, dipl.ing. - rad na visokosofisticiranim analitičkim tehnikama za određivanje aflatoksina M₁ LC-MS i LC-MS-MS tehnikama
9. Sonja Serdar,dipl.ing. - određivanje nutritivnih vrijednosti mlijeka, posebno bjelančevina, masti i ugljikohidrata

Plan rada i ZADUŽENJE SVAKOG ČLANA PROJEKTOG TIMA

(za prvu godinu provedbe projekta)

RP	aktivnosti	suradnici	Trajanje aktivnosti (m)
RP1			
	Priprema protokola za mikrobiološke analize (izolacija i identifikacija BMK, izolacija β -glukana iz stanica kvasca, priprema živih i mrtvih stanica BMK, liofilizacija stanica BMK uz odabir lioprotektora);	K. Markov, J. Frece Ž. Jakopović, I. Čanak	1.-3.
	Priprema protokola za kemijske analize (količine proteina, masti i sastava masnih kiselina, ukupnih glikohidrata, laktoze, vode, pepela)	J.Bošnjir, S.Serdar, Ž.Pavlek	1.-3.
	D1.1.5. Protokol za određivanje β -glukana enzimskim metodama (m3)	Ž. Jakopovi,; I. Čanak J. Frece	1.-3.
	Protokol za pripremu uzoraka mlijeka za uklanjanje AFM1 uz primjenu različitih biofiksatora BMK i β -glukana	K. Markov, Ž. Jakopović	1.-3.
	Protokol za pripremu uzoraka mlijeka za određivanje AFM1 HPLCi LC-MS/MS metodom	M. Ivešić, Ž.Kuharić Ž. Pavlek	1.-3.
	Razvoj metode za uklanjanje kompleksa BMK -AFM ₁ iz mlijeka metodom membranske filtracije upotrebom bakterioloških filtra	K. Markov, Ž. Jakopović I. Čanak, J. Frece	3.-6.
	Razvoj metode za uklanjanje kompleksa β -glukan -AFM ₁ iz mlijeka metodom centrifugiranjem u filteru Centricon Plus-70, MWCO 100kDa	K. Markov, Ž. Jakopović I. Čanak, J. Frece	3.-6.
	uvođenje metode određivanja AFM1 u mlijeku HPLC tehnikom	M. Ivešić, Ž. Kuharić, Ž. Pavlek	3.-6.
	uvođenje metode određivanja AFM1 u mlijeku kombiniranom metodom tekućinske kromatografije - spektrometrije masa (LC-MS/MS)	M. Ivešić, Ž. Kuharić, Ž. Pavlek	3.-6.
	Provođenje postupka javne nabave za kupnju nove opreme	K. Markov	2.-4.
	instalirana kupljena nova oprema	K. Markov, Ž. Jakopović J.Bošnjir, Ž.Pavlek, S.Serdar	2.-4.

Nastavak aktivnosti

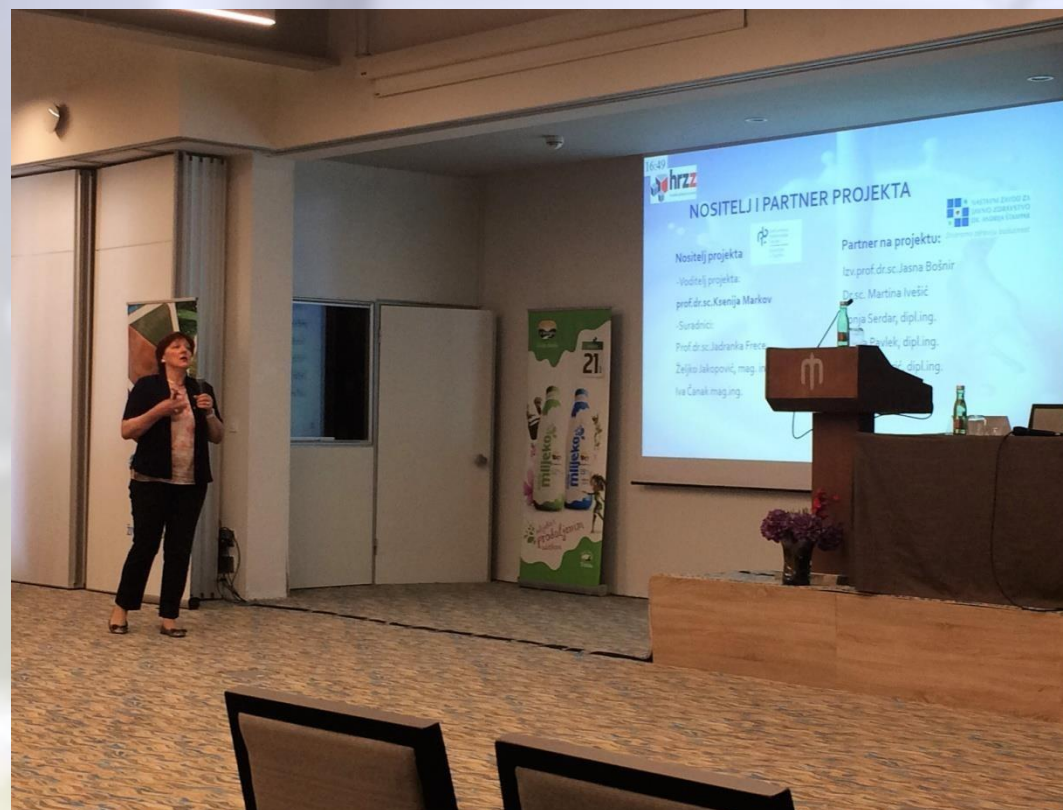
RP	aktivnosti	suradnici	Trajanje aktivnosti (m)
RP2			
	Prikupljanje uzoraka svježeg kravljeg mlijeka, sira i vrhnja domaćih proizvođača i izolacija BMK klasičnim mikrobiološkim metodama na selektivnim podlogama	K. Markov I. Čanak Ž. Jakopović	4.-6.
	Identifikacija izoliranih BMK fenotipskim i genotipskim metodama (API, SDS-PAGE, PCR-RAPD)	J. Frece I. Čanak Ž. Jakopović K. Markov	5.-8.
	Odabir BMK koje pokazuju najbolja svojstva vezanja/uklanjanja AFM1; priprema i čuvanje kultura u liofiliziranom obliku	K. Markov J. Frece Ž. Jakopović I. Čanak	7.-10.
	Priprema uzorka mlijeka umjetno kontaminiranog različitim konc. AFM1 i optimiranje uvjeta za vezanje/uklanjanje AFM1 BMK	K. Markov Ž. Jakopović I. Čanak Ž. Kuharić	8.-12.
	Priprema uzoraka za određivanje %nevezanog AFM1 HPLC i LC-MS/MS tehnikom	K. Markov Ž. Jakopović M. Ivešić Ž. Pavlek Ž. Kuharić	9.-14.
	web stranica	Ž. Jakopović	10.-12.

JAVNO PREDSTAVLJANJE PROJEKTA

Predavanje pod naslovom:

**„Inovativni postupci uklanjanja
AFM₁ biofiksatorima
iz mlijeka“**

održano je na XI Konferenciji o
sigurnosti i kvaliteti hrane u RH u
organizaciji HGK od 29.-31. svibnja
2017. Opatija (izv. prof.dr.sc. Jasna
Bošnjir)



Rezultati projekta pripremljeni za prezentaciju projekta u vidu postera na Međunarodnom Kongresu "Food safety and quality" od 22.-24.11. 2017. Opatija

Sažetak postera

Application of membrane filtration, with the possibility of removing the LAB-AFM₁ complex from milk

Ksenija Markov^{1*}, Iva Čanak¹, Željko Jakopović, Jasna Bošnić², Željka Kuharić², Željka Pavlek², Martina Ivešić², Jadranka Frece¹

Previous scientific studies indicate the need for further development of application of biological methods in removing / binding or biotransformation of mycotoxins in food and feed. Such methods should inactivate mycotoxins without affecting nutritional value and organoleptic properties of the product being processed. In practice, synthetic and natural zeolites are most commonly used as fodder additives, which effectively eliminate aflatoxin based on the adsorption, however, lack is that except the adsorption of mycotoxins necessary nutrients are also being absorbed. Therefore, the microbial population from fresh cow's milk and traditional dairy products such as cottage cheese and cream was isolated and identified with the aim of selecting bioprotective cultures as biofixator for the removal of AFM₁ in / out of milk. One hundred and fifty colonies of LAB were isolated and identified by API tests and ten strains confirmed with molecular (PCR) methods. All confirmed strains (*Lactobacillus plantarum* SM1, *Lactobacillus helveticus* S9, *Lactococcus lactis* 5MS1, *Lactobacillus plantarum* SMB, *Lactobacillus plantarum* SMA, *Lactobacillus plantarum* SS1, *Lactobacillus paracasei* KM, *Lactobacillus rhamnosus* KM, *Lactobacillus plantarum* KM, *Lactobacillus plantarum* MM)) were tested for possible removing/binding of AFM₁ from milk. Therefore, the one of the goals of the work is to implement the practical application of membrane filtration, with the possibility of removing the complex biofixator-AFM₁ from milk and preserving the nutritional value of milk. The amount of unbound AFM₁ was determined by HPLC.