



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**DISTRIBUCIÓN, ESTABILIDAD Y ASOCIACIÓN DE LA AFLATOXINA M₁ CON
LAS PRINCIPALES PROTEÍNAS DE LA LECHE DE VACA, DURANTE LA
MANUFACTURA Y ALMACENAMIENTO DE QUESO FRESCO SIMILAR AL
QUESO TURRIALBA ELABORADO EN COSTA RICA**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del
Programa de Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos
para optar al grado y título de Maestría
Académica en Ciencia de Alimentos

GUADALUPE CHAVARRÍA MOLINA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2023

DEDICATORIA

A Dios que me permite la vida para tener todas las experiencias posibles. A mi familia, especialmente a mi madre, *Matilde Molina Vásquez*, quien con su luz, amor, sabiduría, carisma y positivismo me inculco la idea de que todo es posible con trabajo y esfuerzo y me apoyo en todos mis proyectos a lo largo de mi vida. A mi padre *Jaime Chavarría Alpízar*, mis hermanos *Gustavo*, *Vanesa* y *María del Pilar*, a mis familiares y amigos por ser mi red de apoyo siempre.

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores Ph.D. Eric Wong González, Director de la tesis; Ph.D. Marianela Cortés Muñoz, asesora de tesis; Ph.D. César Rodríguez Sánchez, asesor de tesis que han sido guía y apoyo invaluable para llevar adelante este proyecto.

A mis compañeros del Centro de Investigación en Nutrición Animal (CINA-UCR) Ph.D. Andrea Molina Alvarado, encargada del proyecto de investigación; MSc. Fabio Granados Chinchilla, Químico de Aplicación; Licda. Geovana Méndez y Licda. Astrid Leiva Gabriels, del Laboratorio de Microbiología. A todos ellos por su extraordinario apoyo en el desarrollo de esta investigación.

A M.Sc. Diana Viquez Barrantes del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, por su valiosa colaboración.

A todos los que de una u otra forma han sido parte de este proceso y me han acompañado en todo este camino, especialmente *Graciela Paniagua Moya*.

A todos, muchas gracias.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado Maestría Académica en Ciencia de Alimentos.”

M.Sc. Fabio Granados Chinchilla

Representante de la Decana del Sistema de Estudios de Posgrado

Ph.D. Eric Wong González

Director de Tesis

Ph.D. Marianela Cortés Muñoz

Asesora

Ph.D. César Rodríguez Sánchez

Asesor

M.Sc. Rebeca López Calvo

Directora Programa de Posgrado en Ciencia de Alimentos

Guadalupe Chavarría Molina

Candidata

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE GENERAL.....	v
RESUMEN.....	vii
INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE ANEXOS.....	xi
CAPITULO 1. JUSTIFICACIÓN.....	1
CAPITULO 2. OBJETIVOS.....	4
2.1. <i>Objetivo general</i>	4
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	4
CAPITULO 3. MARCO TEÓRICO	5
3.1 Generalidades del mercado de la leche.....	5
3.2 La leche bovina	6
3.3 El queso.....	8
3.4 Principales proteínas de la leche	9
3.4.1 Caseína	10
3.4.2 β -lactoglobulina (β -Lg)	12
3.4.3 α -lactoalbúmina (α -La)	13
3.4.4 Albúmina sérica bovina (ASB)	14
3.4.5. Lactoferrina bovina (LFB).....	14
3.5 Micotoxinas, Aflatoxina M ₁ y legislación.....	16
3.5.1 Micotoxinas	16
3.5.2 Aflatoxina M ₁	19
3.5.3 Legislación de AFM ₁ en Costa Rica.....	20
3.6 Antecedentes de afinidad de aflatoxina M ₁ con proteínas	20
3.7 Variables que influyen el reparto de AFM ₁ en queso fresco	24

3.7.1 Tecnología de elaboración del queso.....	25
3.7.2 Influencia de cultivo microbiano bacterias ácido lácticas (BAL) sobre AFM ₁	27
CAPITULO 4. ARTÍCULO DISTRIBUCIÓN, ESTABILIDAD E INTERACCIÓN DE AFLATOXINA M ₁ CON PROTEÍNAS EN QUESO FRESCO.....	31
Abstract	31
Keywords:.....	32
4.1 Introduction	32
4.2 Materials and methods.....	33
4.2.1. Reagents.....	33
4.2.2. Cheese preparation	34
4.2.3. Enumeration of lactic acid bacteria (LAB) in fresh cheese	35
4.2.4. Aflatoxin M ₁ interaction with milk, cheese, and whey proteins	35
4.2.5. Protein precipitation and crosslinking with formaldehyde	36
4.2.6. HPLC-based AFM ₁ detection.....	36
4.2.7. AFM ₁ interaction with purified proteins.....	37
4.2.8. Statistical analyses.....	38
4.3 Results and discussion	38
4.3.1. AFM ₁ carry-over from contaminated milk to cheese and whey.....	38
4.3.2. AFM ₁ stability in cheese.....	39
4.3.3. AFM ₁ interaction with milk, cheese, and whey proteins	41
4.4 Conclusion	44
4.5 References.....	45
CAPITULO 5. OBSERVACIONES ADICIONALES	50
CAPITULO 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	54
6.1 Conclusiones generales.....	54
6.2 Recomendaciones generales	55
CAPITULO 7. BIBLIOGRAFÍA	56
CAPITULO 8. ANEXOS	69

RESUMEN

Las micotoxinas son productos naturales originados por el metabolismo secundario de varios hongos toxigénicos que existen en la naturaleza. Las aflatoxinas B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) y G₂ (AFG₂) son un grupo de toxinas cancerígenas producidas principalmente por los hongos *A.parasiticus* y *A. flavus*. Se encuentran comúnmente en cultivos, granos, piensos y forrajes de los que se alimentan los rumiantes y por lo tanto, puede estar presentes en la leche. Una vez ingerido por los mamíferos a través de la dieta o la lactancia, AFB₁ se oxida en el hígado para dar lugar a AFM₁; un potencial carcinógeno que puede ser encontrado en leche, queso y otros productos lácteos. A pesar de que su estructura está compuesta por átomos de oxígeno y dobles enlaces, se considera que AFM₁ es muy poco soluble en agua y es termoestable; por lo tanto, los procesos de fabricación convencionales no lo eliminan de la leche. Como consecuencia, se puede encontrar en el suero y en diferentes tipos de queso.

En este trabajo se buscó elucidar la distribución y reparto de AFM₁ en queso fresco y suero durante su manufactura, así como determinar el nivel de interacción de dicha toxina con varias proteínas de la leche, queso y suero. Adicionalmente, se analizó el comportamiento de asociación *in vitro* de la caseína, α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, albúmina sérica bovina, lactoferrina y una mezcla de estas con una concentración fija de AFM₁ después del entrecruzamiento covalente. Se analizó también la afinidad de las fracciones de caseína (α_s , κ y β) con la AFM₁. Finalmente se estudio la estabilidad de la AFM₁ en queso fresco durante el almacenamiento en presencia de un cultivo protector de bacterias ácido lácticas.

Los resultados demuestran que hasta 70% de los niveles de AFM₁ presente en leche enriquecida con 0.5 y 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ fue liberada en el suero durante la manufactura de queso fresco mediante proceso estandarizado. Las proteínas del suero y leche con más moléculas de AFM₁ unidas fueron α -lactalbúmina y caseína con 88% y 81% respectivamente. La fracción de caseína que mostró mayor afinidad a la AFM₁ fue la α_s caseína que unió el 100% de la AFM₁. También se observó una disminución sustancial, de hasta 75%, de la concentración de AFM₁ durante el almacenamiento del queso por 28 días que correlaciona inversamente con los conteos de bacterias ácido lácticas ($r = -0,825$, $p = 0,011$) Este conocimiento puede servir como base para intervenciones en la industria láctea con la intención de aumentar la seguridad del queso y otros productos lácteos.

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Composición química de la leche de vaca.	7
Cuadro 2	Propiedades de las principales proteínas de la leche.	9
Cuadro 3	Descripción de la fosforilación de las fracciones de caseína.	10

ARTICULO

Cuadro 1	Physicochemical characterization of starter milk, manufactured cheese and whey and performance of the chromatographic methods used for determination of AFM ₁ in these matrices.	37
Cuadro 2	Aflatoxin M ₁ distribution in whey and fresh cheese that were derived from artificially contaminated milk with two different toxin concentrations at day zero.	39

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura química de AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ .	18
Figura 2	Estructura química de AFM ₁ y AFM ₂ .	19
Figura 3	Estructura terciaria de α -La. Estructuras secundarias: α -hélice (magenta); 3_{10} hélice (azul); hoja β (amarilla); giro (cian) y espiral aleatoria (marrón). Regiones Hidrofóbicas: caja hidrofóbica (verde) y grupo aromático I (naranja).	51
Figura 4 (A)	Representación gráfica de las interacciones del AFM ₁ con el α -La en la región de la caja hidrofóbica. Diagrama de interacciones hidrofóbicas (líneas blancas punteadas) de AFM ₁ con los aminoácidos de la caja hidrofóbica.	52
Figura 4 (B)	Representación gráfica de las interacciones del AFM ₁ con el α -La en la región de la caja hidrofóbica. Presentación imagen estéreo de los enlaces de hidrógeno (líneas punteadas negras) formadas con AFM ₁ y los aminoácidos de la caja hidrofóbica.	52
ARTICULO		
Figura 1 (A)	Lactic acid bacteria enumeration and protein stability (discontinuous line and right ordinate, number in brackets represent mean protein concentration) during cheese maturation.	39
Figura 1 (B)	Toxin levels, in function of time, during fresh cheese ripening in storage at 4°C for the 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ spike level.	39
Figura 2 (A)	AFM ₁ concentration in function of mixture of cheese and whey main proteins.	42
Figura 2 (B)	AFM ₁ concentration in function of increasing concentrations of casein (cheese main protein) and α -lactalbumin (whey main protein).	42

LISTA DE ABREVIATURAS

UCR	Universidad de Costa Rica
CINA	Centro de Investigación en Nutrición Animal
CITA	Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food Drug Administration
TM	Toneladas métricas
AF	Aflatoxinas
AFB ₁	Aflatoxina B ₁
AFM ₁	Aflatoxina M ₁
AFM ₂	Aflatoxina M ₂
AFB ₂	Aflatoxina B ₂
AFG ₁	Aflatoxina G ₁
AFG ₂	Aflatoxina G ₂
ASB	Albumina Sérica Bovina
α - LA	α - Lactoalbúmina
β - LG	β - Lactoglobulina
LFB	Lactoferrina bovina
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IARC	International Agency Research on Cancer
ADN	Ácido desoxirribonucleico
RTCR	Reglamento Técnico Costa Rica
GRAS	Generally Recognized As Safe
QPS	Qualified Presumption of Safety
BAL	Bacterias Ácido Lácticas

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1 Recomendaciones para elaboración de queso fresco Turrialba. Aseal; 2013.
- Anexo 2 Inserto de fabricante con método de extracción para AFM₁ en fase sólida con columnas de inmunoafinidad AflaStar™ M₁ R.
- Anexo 3 Protocolo para fijar la unión de proteínas mediante formaldehído. Cold Spring Harbor Protocols. Cshprotocols.cshlp.org
- Anexo 4 Protocolo para precipitar proteínas mediante ácidotricloroacético. Cold Spring Harbor Protocols. Cshprotocols.cshlp.org
- Anexo 5 Ficha técnica del cloruro de calcio marca Calcivac “Promotor de la coagulación de la leche” de Vaco S.A Laboratorios.
- Anexo 6 Ficha técnica del cuajo CHYMAX EXTRA “Coagulante líquido” de la marca CHR Hansen.
- Anexo 7 Ficha técnica del cultivo láctico FD-DVS STI-14 “Thermophilic lactic acid culture *Streptococcus thermophilus*” de CHR Hansen.
- Anexo 8 Lic.DDA-MAG: 011-052 VAP FEED Alimento Balanceado para vacas lecheras de alto potencial genético para producción láctea.

CAPITULO 1. JUSTIFICACIÓN

Las Aflatoxinas son un tipo de micotoxinas producidas en su mayoría por hongos del ambiente y son responsables de la pérdida de billones de dólares en la economía mundial por contaminar diferentes cultivos causando muchos efectos sobre la salud humana y de los animales. De las aflatoxinas descritas hasta ahora la Aflatoxina B₁ es considerada una de las más importantes por su toxicidad y es a partir de ésta que se produce la aflatoxina M₁ (AFM₁) en la leche de los rumiantes (Shabeer et al., 2022).

La incidencia mundial de AFM₁ en la leche y los productos lácteos en décadas pasadas ha emergido como uno de los problemas más críticos debido al alto consumo de estos alimentos y los peligros potenciales de AFM₁ para la salud humana, especialmente en grupos de edad inmunológicamente vulnerables (Campagnollo et al., 2016). Se ha reportado que la AFM₁ exhibe propiedades carcinogénicas (Ostry et al., 2016; Einolghozati et al., 2021; EFSA, 2020), citotóxicas, teratogénicas y genotóxicas.

Además, a largo plazo la exposición a AFM₁ conduce a inmunosupresión, hepatocarcinoma y retraso en el crecimiento en niños. La exposición a AFM₁ plantea un grave riesgo para la salud debido a su probable interacción con el ADN (Zhang et al., 2015; Monter Arciniega et al., 2022).

Estudios sobre la relación de AFM₁ con hepatitis han revelado una mayor vulnerabilidad de portadores de hepatitis hacia el carcinoma hepatocelular si han estado expuestos a alimentos contaminados con aflatoxinas (Giolo et al., 2012; EFSA, 2020). Aproximadamente 0,55–0,60 millones de casos de carcinoma hepatocelular se notifican cada año, entre los cuales alrededor de 0,025-0,15 millones de casos son atribuidos a la exposición a las AF por medio de la dieta (Muaz et al., 2021). Además, se ha relacionado su alta toxicidad a bajas concentraciones con el desarrollo de cáncer de riñón (Sarmast et al., 2021).

La AFM₁ resiste temperaturas entre 260 y 320°C sin descomponerse y permanece estable en la leche y derivados tras procesos industriales como la pasteurización, la ultrapasteurización (Monter Arciniega et al., 2022), el autoclavado y esterilización (Sarmast et al., 2021), lo que genera un riesgo a la salud humana. Se ha mencionado también que la AFM₁ puede asociarse a la caseína de la leche, debido a que aumenta su hidrofobicidad durante la etapa de proteólisis en la elaboración del queso, condición necesaria para que AFM₁ se una a la caseína (Monter Arciniega et al., 2022).

La leche y los productos lácteos juegan un papel importante en la dieta humana para todos los grupos de edad debido a la gran cantidad de ingredientes y elementos esenciales como proteínas, lípidos y calcio. Numerosos estudios sobre la leche bovina han demostrado que AFM₁ se une a las proteínas de la leche, y en particular a caseína, que se concentra en la cuajada durante la fabricación de queso (Brackett & Marth, 1982; López et al., 2001). Consecuentemente, el consumo de leche y sus derivados contaminados con micotoxinas es un importante mecanismo de transferencia de AFM₁ a los consumidores; sin embargo, estudios han demostrado que la tasa de ocurrencia de AFM₁ en la leche y su arrastre a varios productos lácteos es variable (Campagnollo et al., 2016; Kamkar et al., 2014; Sarmast et al., 2021).

Uno de los productos lácteos favoritos a nivel global es el queso, que varía en tipos (blando, semiduro y duro) y orígenes, así como en los métodos que se utilizan para su producción. Todas estas variables y especificaciones influyen en la transferencia de AFM₁ de la leche al queso (Mohajeri et al., 2013; Campagnollo et al., 2016). En Costa Rica, un 80% del total de la leche que llega a las pequeñas y medianas empresas procesadoras se destina para la producción de queso mientras que en las grandes industrias se estima que se transforma cerca del 10% de la leche en queso (Villalobos García, 2017).

Algo que llama la atención es que se ha demostrado recientemente que los quesos frescos contienen los niveles de AFM₁ más altos en comparación con los demás tipos de queso (Khaneghah et al., 2021). A raíz de esto, es relevante elucidar la forma como se distribuye la AFM₁ de la leche al queso y al suero durante la fabricación de queso fresco, así como evaluar su estabilidad durante el almacenamiento y conservación. Este trabajo aborda ambas interrogantes. Adicionalmente, se analizó la interacción de AFM₁ con las principales proteínas de la leche.

Este conocimiento pueden servir de base para nuevas investigaciones a futuro, ya que, por ejemplo, el suero que se elimina luego de la fabricación del queso constituye cerca del 80-90% del volumen de la leche utilizada y representa una fuente importante de nutrientes que se aprovechan en la elaboración de queso Ricotta, suplementos para consumo animal, productos de panadería, refrescos para hidratar, concentrados de proteína para deportistas, agentes microencapsulantes en alimentos, agentes estabilizantes de emulsiones o componente de fórmulas infantiles y otros alimentos (Delboni et al., 2016; Cattaneo et al., 2013).

También, estas proteínas del suero son modificadas y utilizadas como hidrocoloides alimenticios en distintas aplicaciones: como reemplazadores de grasa en productos alimenticios, estabilizador de espumas, como ingrediente funcional para modificar estructura y viscosidad de los alimentos o para mejorar el rendimiento de los quesos (Wolz et al., 2016; Zhang et al., 2015).

CAPITULO 2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo general*

Estudiar la asociación de la AFM₁ con las principales proteínas de la leche de vaca, su distribución y estabilidad durante la manufactura y almacenamiento de un queso fresco similar al Turrialba.

2.2. *Objetivos específicos*

2.2.1 Ensayar *in vitro* la asociación de AFM₁ a la caseína, albúmina sérica bovina, β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina y lactoferrina para comparar su nivel de afinidad.

2.2.2 Estudiar la distribución de la toxina AFM₁ en el queso y suero durante el proceso de manufactura del queso fresco mediante ensayo controlado para estimar la proporción de reparto en cada fracción.

2.2.3 Evaluar la estabilidad de la AFM₁ durante el tiempo (28 días) y condiciones de almacenamiento (bolsa plástica a 4°C) del queso fresco preparado con leche artificialmente contaminada con la toxina.

CAPITULO 3. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades del mercado de la leche

A nivel mundial el consumo de leche y sus derivados ha aumentado considerablemente a través del tiempo gracias a la industrialización de esta actividad. Actualmente, la leche que se comercia proviene principalmente de vacas (81%), búfalos (15%), cabras, ovejas y camellas (4% combinadas) (Walstra et al., 2006 ;OECD/FAO, 2021). La leche de vaca al ser la que más se produce es utilizada para consumo como tal o en forma de una gama de productos lácteos.

Según datos suministrados por la agencia de las Naciones Unidas, a través de la Organización de Alimentos y Agricultura (Food and Agriculture Organization; FAO), en su informe Anuario Estadístico sobre Agricultura y Alimentación Mundial del año 2021, la producción mundial de leche, para el año 2019, fue de 883 283 700 toneladas métricas (TM), con un crecimiento del 0,41% con respecto al año 2018 (FAO, 2021).

En los países desarrollados, el consumo per cápita anual de productos lácteos se proyecta crecerá modestamente de 283,6 kg en 2018-2020 a 302,4 kg en el 2030, en comparación con un aumento de 128,4 kg a 151,2 kg en los países en vías de desarrollo (OECD/FAO, 2021).

A nivel de la región centroamericana, Costa Rica es el segundo mayor productor de leche de vaca después de Nicaragua. En el año 2019 tuvo una producción estimada de 1189100 TM de leche, aproximadamente 2,4% más que el año 2018 (FAO, 2021) mostrando un consumo promedio per cápita de 217 kg de productos lácteos/año durante el año 2016 (Cámara de Productores de Leche Costa Rica, 2022).

Esta actividad económica generó en nuestro país, en el 2020, por concepto de exportaciones un ingreso de 152.66 millones de dólares, correspondiente a un

volumen de 92,96 millones de kg netos de productos lácteos, muy por encima de otras actividades del sector pecuario nacional como lo son la industria avícola, porcina y de ganado de carne (Cámara de Productores de Leche Costa Rica, 2022).

Para el el año 2021, se exportó un estimado de 116 millones de dólares en productos lácteos, donde los principales productos comercializados fueron leche en polvo, fluida y deslactosada, helados, mantequilla, yogurt, queso fresco, mezclas y pastas lácteas. El destino de estos productos fue principalmente mercados de Centroamérica y el Caribe (PROCOMER, 2021; Cámara de Productores de Leche Costa Rica, 2022).

Se ha estimado que existen en el país unas 26 957 fincas dedicadas a la actividad lechera, 17 399 en la modalidad de doble propósito y 9 558 bajo el sistema de lechería especializada. Las fincas lecheras de doble propósito abarcan cerca de 691 609 hectáreas de la superficie del territorio nacional y las de lechería especializada abarcan 239 900 hectáreas. Con una productividad media de 7,683 L de leche/hectárea/año y una productividad diaria de 2,5 millones de litros de leche al día.

Del total de la leche producida diariamente en el país, el 60,0% es procesada por la industria formal, la cual está compuesta en general por 43 empresas y el restante 40,0% es procesada por el sector informal artesanal (Cámara de Productores de Leche de Costa Rica, 2013). Los datos anteriores sugieren la enorme importancia de la industria lechera tanto a nivel mundial como nacional.

3.2 La leche bovina

El alto consumo de la leche y sus derivados se atribuye a las cualidades nutritivas y funcionales porque contiene proteínas de alto valor biológico, hidratos de carbono en forma de lactosa, grasas, vitaminas y minerales (Fox et al., 2015), constituyendo

un alimento de extraordinaria importancia ya que se considera como una fuente de macro y micronutrientes para la nutrición y salud humana (Willett et al., 2020). El **Cuadro 1** muestra la composición de la leche de vaca. En éste se observa los aportes a la dieta de los distintos componentes basados en una porción de 100 gramos de leche fresca.

Cuadro 1. Composición química promedio/usual de la leche de vaca.

Componente	Cantidad / 100 g	Unidad	Componente	Cantidad / 100 g	Unidad
Energía	64,0	kcal	Zinc	360,0	µg
Agua	88,0	g	Colesterol	13,0	mg
Grasa	3,5	g	Ácido pantoteico	0,3	mg
Proteína	3,3	g	Vitamina C	1,0	mg
Lactosa	4,8	g	Vitamina E	0,1	mg
Ácido oleico	1,1	g	Vitamina A	40,0	µg
Ácido linoleico	0,2	g	Caroteno	20,0	µg
Calcio	120,0	mg	Tiamina	40,0	µg
Fosforo	100,0	mg	Riboflavina	170,0	µg
Potasio	150,0	mg	Vitamina B6	50,0	µg
Sodio	50,0	mg	Vitamina B12	0,5	µg
Cloro	100,0	mg	Biotina	3,5	µg
Magnesio	12,0	mg	Vitamina D	0,1	µg
Hierro	50,0	µg	Solidos totales	12.7	g

(Stavrinos et al., 2001; Fox et al., 2015).

Sin embargo, la leche al ser una suspensión altamente nutritiva se convierte también en un sustrato ideal para el crecimiento de diversos microorganismos de deterioro, así como patógenos. Adicionalmente, es importante considerar que el estado higiénico de la leche y los productos lácteos pueden ser afectados por la presencia de sustancias químicas como residuos de antimicrobianos, antihelmínticos, pesticidas, bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas, furanos, metales pesados, elementos radioactivos y micotoxinas (Stavrinos et al., 2001)

Al someter la leche a diversos procesos como centrifugación, procesos térmicos, evaporación, filtración a través de membranas, concentración mediante secado, coagulación enzimática, coagulación ácida, fermentación y congelación, se puede

obtener materia prima como crema, leche descremada, cuajo de caseína, caseína ácida, suero y queso para la creación de diversos productos para el consumo humano (Fox et al., 2015).

3.3 El queso

El queso es un grupo muy variado de productos lácteos, elaborados en todo el mundo; la fabricación de queso se originó en el Medio Oriente durante la Revolución Agrícola, hace aproximadamente unos 8.000 años. La producción y el consumo de queso, varían mucho entre países y regiones. El queso es el ejemplo clásico de un alimento de conveniencia: se puede utilizar como plato principal de una comida, como postre o merienda, como relleno de sándwich, ingrediente alimentario o condimento. (Fox et al., 2015).

Aunque la mayoría de los quesos tradicionales tienen un contenido de grasa bastante alto, son fuentes ricas en proteínas y, en la mayoría de los casos, en calcio y fósforo. La producción de cuajada de queso es esencialmente un proceso de concentración en el que la grasa de la leche y la caseína se concentran unas diez veces mientras que las proteínas del suero, la lactosa y las sales solubles se eliminan del suero. (Fox et al., 2015).

La producción de todas las variedades de queso implica un protocolo por lo general similar, con varios pasos de los cuales algunos se modifican para dar un producto con las características deseadas. Los principales pasos generales son 1. Selección, estandarización y, en la mayoría de los casos, pasteurización de la leche. 2. Acidificación, generalmente a través de la producción in situ de ácido láctico por el cultivo iniciador. Opcionalmente en este paso se puede agregar CaCl_2 y colorante (agregando extracto de carotenoides sintético o natural, ejemplo Annatto que contiene bixina y norbixina) 3. Coagulación de la leche por acidificación y temperatura o proteólisis limitada por enzima (cuajo). 4. Deshidratación del coágulo para producir la cuajada de queso, mediante una

variedad de técnicas, algunos de los cuales son específicos de la variedad de queso. Se puede cortar, mover, calentar, acidificar, agregar NaCl, separar el coágulo del suero (desuerado), voltear y prensar 5. Formar la cuajada en formas características. 6. Para la mayoría de las variedades, maduración (maduración) de la cuajada durante la cual la característica se desarrollan el sabor y la textura del queso (Fox et al., 2017). En el caso del queso fresco este está listo para su consumo inmediatamente de terminar el prensado.

3.4 Principales proteínas de la leche

Como se observa en el **Cuadro 2**, la leche de vaca está compuesta de 33 g/L de proteína, distribuidas en 28 g/L de caseína (~ 80%) y 5 g/L (~ 20%) de proteínas del suero (Fox et al., 2015).

Cuadro 2. Propiedades de las principales proteínas de la leche

Propiedades	Caseínas				Proteínas del suero		
	α_{s1} -B 8P	α_{s2} -A 11P	β -A ² 5P	κ -B 1P	α -La-B	β -Lg-B	Albumina sérica
Peso molecular	23,614	25,230	23,983	19,023	14,176	18,363	66,267
Residuos/Moléculas							
Aminoácidos	199	207	209	169	123	162	582
Prolina	17	10	35	20	2	8	34
Cisteína	0	2	0	2	8	5	35
Disulfuro ^a	0	0	0	0	4	2	17
Fosfato	8	11	5	1	0	0	0
Carbohidratos	0	0	0	b	c	d	0
Hidrofobicidad (KJ/residuo)	4.9	4.7	5.6	5.1	4.7	5.1	4.3
Residuos cargados/mol	34	36	23	21	28	30	34

(Fox et al., 2015).

Donde: a = Puentes disulfuro intramolecular, b = variable (ver texto), c = Una pequeña fracción de las moléculas, d = 0 excepto por la variante dave (DV)

3.4.1 Caseína

La caseína es una proteína altamente compleja. Pertenece a la familia de proteínas que unen metales, específicamente se asocian con calcio, magnesio y zinc (Boland, et al., 2020).

Está compuesta por varias fracciones distintas: α_{s1} caseína (37%), α_{s2} caseína (10%), κ -caseína (12%), β caseína (35%) y γ caseína (6%). Las cuatro fracciones de caseína exhiben variabilidad o también llamada microheterogeneidad debido a variabilidad en el grado de fosforilación. Todas las caseínas son fosforiladas, pero en un grado variable (α_{s1} 8-9 P; α_{s2} 10-13 P; β 4-5 P; κ 1-2 moléculas de P por molécula de caseína). El número de grupos fosfato es indicado así α_{s1} -CN 8P. En el **Cuadro 3** se muestra una descripción de la fosforilación de las distintas fracciones de caseína.

Cuadro 3. Descripción de la fosforilación de las fracciones de caseína.

Caseína	Número de residuos de fosfato
α_{s1}	8, pero ocasionalmente puede tener 9
α_{s2}	10, 11, 12 o hasta 13
β	5, pero ocasionalmente puede tener 4
κ	1 pero ocasionalmente puede tener 2 ó 3

La heterogeneidad de la caseína también está dada por la existencia de puentes disulfuro en α_{s2} y κ -caseína, por la hidrólisis de la β - α_{s1} - α_{s2} caseína por la plasmina, o variaciones en el grado de glicosilación de κ – caseína que resulta en varias formas moleculares de la κ -caseína. También influyen polimorfismos genéticos en todas las proteínas de la leche, resultando en cerca de 60 variantes de caseína y proteínas del suero (estas variables genéticas se indican en letras latinas). La frecuencia con la que ocurren ciertas variantes genéticas es específica de la raza de vaca que da origen a la leche. Varias propiedades tecnológicamente

importantes de las proteínas de la leche, por ejemplo, las propiedades para cuajar durante la fabricación de queso, la estabilidad al calor, el rendimiento y la proporción de las proteínas en la leche están correlacionadas con ciertos polimorfismos y se están realizando importantes investigaciones sobre este tema (Fox et al., 2015; Goulding et al; 2020).

Las distintas fracciones de caseína, en presencia de calcio, forman una estructura llamada micela. Estas son grandes partículas coloidales altamente hidratadas. Unen cerca de 1.6-2.7 g H₂O g⁻¹ proteína y adquieren una voluminosidad de 3-7 mL g⁻¹. Esto sugiere que la micela tiene una estructura porosa en la cual las proteínas ocupan el 25% del volumen total (Fox et al., 2015).

Aún se desconoce cómo se organiza dicha estructura, sin embargo, se cree que cada fracción de caseína expone hasta cierto punto las regiones hidrofílicas en la superficie de la micela y las regiones hidrofóbicas se ubican principalmente al interior de la micela (Goulding et al; 2020). Los residuos de aminoácidos polares y no polares en la estructura primaria de las caseínas de leche bovina no están distribuidos de manera uniforme, por el contrario, ocurren en clusters dando como resultado regiones hidrofílicas e hidrofóbicas a cada fracción de caseína. Esto le confiere a las micelas su cualidad emulsionante y espumante. Al ser las caseínas relativamente pequeñas, relativamente hidrofóbicas, anfipáticas, moléculas de estructura flexible o aleatoria, con niveles relativamente bajos de estructuras secundarias y terciarias es difícil poder acertar con un modelo que defina la estructura de la micela definitivamente (Fox et al., 2015).

Las caseínas son fácilmente susceptibles a la proteólisis en contraste con las proteínas globulares como las de suero de la leche, que son resistente a la proteólisis en su estado nativo. Durante el proceso de fabricación de queso la κ -caseína es la única fracción de caseína que es hidrolizada por acción de la enzima quimosina en la etapa inicial de la formación del cuajo. También es importante

mencionar que la caseína es fácilmente hidrolizable por proteinasas secretadas por microorganismos de deterioro en el producto (Fox et al., 2015).

Cabe señalar es que cuando se calienta la leche durante el proceso de fabricación del queso la κ – caseína interactúa con β - lactoglobulina del suero de la leche para formar un complejo unido por puentes disulfuro el cual modifica muchas propiedades de las micelas incluyendo su capacidad de formar el cuajo y su estabilidad al calor (Fox et al., 2015).

3.4.2 β -lactoglobulina (β -Lg)

La β -Lactoglobulina (β -Lg) representa el 50% de las proteínas del suero, es decir, el 12% de la proteína total en la leche bovina. Es una proteína globular típica muy compacta y ha sido muy bien caracterizada. Su masa molecular es de aproximadamente 18 kDa por monómero. Existen dos principales variantes genéticas, A y B, que ocurren más frecuentemente (Fox et al., 2015).

Puede existir, dependiendo del pH en tres formas: como monómero (pH < 3.5 y >7.5), como dímero (pH= 5.5 – 7.5) o como octámero (pH= 3.5 – 5.5). Consiste en 162 residuos de aminoácidos por monómero, contiene dos puentes disulfuro intramoleculares y 1 mol de cisteína por monómero. Esta cisteína es de especial importancia porque, como se mencionó anteriormente después de un proceso de desnaturalización térmica, reacciona con el disulfuro intermolecular de κ -caseína y afecta de forma significativa la coagulación del cuajo y la estabilidad de la leche al calor (Boland et al., 2020).

También como se señaló antes, la β -Lg es muy resistente a la proteólisis cuando se encuentra en su constitución nativa. Esto sugiere que su función primaria no es nutricional y que tiene otros roles biológicos.

La β -Lg es miembro de la familia de proteínas llamada lipocalinas (Boland et al., 2020). Los miembros de la familia de las lipocalinas se caracterizan por varias

propiedades comunes de reconocimiento molecular: la capacidad de unirse a una gama de pequeñas moléculas hidrofóbicas, unirse a receptores específicos de la superficie celular y la formación de complejos con macromoléculas solubles (Flower, 1996). Se ha mencionado que β -Lg mediante su capacidad para unirse a los ácidos grasos, estimula la actividad de las lipasas, que puede ser su principal función fisiológica. Normalmente si los ácidos grasos están libres las lipasas están inhibidas (Fox et al., 2015).

También se ha mencionado que la β -Lg juega un rol en el metabolismo del fosfato en la glándula mamaria, en transferir inmunidad pasiva a los recién nacidos, tiene la habilidad de unir y transportar vitamina A y D, ácido palmítico, fosfolípidos, retinol y componentes aromáticos (Fenelon et al., 2019).

3.4.3 α -lactoalbúmina (α -La)

La α -La pertenece a la familia de proteínas que unen metales, específicamente se asocia con calcio (Boland et al., 2020).

Alrededor del 20% de la proteína del suero bovino (3,5% de la proteína total de la leche) es α -lactoalbúmina que es la principal proteína de la leche humana. La α -La es una pequeña proteína que contiene 123 residuos de aminoácidos. Su masa molecular es de aproximadamente 14 kDa. También tiene una estructura altamente compacta y globular (Goulding et al; 2020).

Su estructura primaria y terciaria tiene similitud con la lisozima, que es una importante proteína bacteriostática, con actividad lítica principalmente sobre bacterias gram positivas, y que está ampliamente distribuida en la naturaleza (Wu et al; 2019) Su función biológica es contribuir a la síntesis de lactosa junto con la enzima lactosa sintetasa. Existe una correlación directa entre la concentración de α -La y la lactosa presente en la leche. α -La es una metaloproteína que contiene 2 átomos de Ca^{+2} por molécula junto a cuatro residuos de Aspartato estos residuos son altamente conservados en todas las α -La y en la lisozima. Esta habilidad de

unir Ca^{2+} le confiere estabilidad a la temperatura. Puede recuperar su conformación después de la desnaturalización. Esta habilidad la pierde cuando el $\text{pH} < 5.0$ pues los residuos de Aspartato se protonan y pierden su capacidad de unir calcio. Una vez que esto sucede, la α -La es desnaturalizada a bajas temperaturas y no recupera su conformación cuando se enfría (Boland et al., 2020).

3.4.4 Albúmina sérica bovina (ASB)

La leche bovina normal contiene un nivel bajo de albúmina sérica sanguínea (ASB) ($0.1\text{--}0.4 \text{ g L}^{-1}$; $0.3\text{--}1.0 \%$ del total). La masa molecular de BSA es aproximadamente 65 kDa ; contiene 582 residuos de aminoácidos, 17 disulfuros y un sulfhidrilo. Todos los disulfuros involucran cisteínas que están relativamente cerca en la cadena polipeptídica, por lo tanto, se organiza en una serie de bucles relativamente cortos. La molécula tiene forma elíptica y se divide en tres dominios. Debido a su función biológica, ASB se ha estudiado ampliamente. Controla la presión osmótica de la sangre (y por lo tanto regula la captación de fluidos de los tejidos), transporta hormonas de la tiroides y otras hormonas, ácidos grasos y muchos medicamentos, se une al Ca^{2+} y amortigua el pH (Fox et al., 2015). Se cree que no se sintetiza en glándula mamaria, sino que es transferida de la circulación materna a la leche (Fenelon et al., 2019). Probablemente tiene poco o nada importancia en la leche, aunque al unir metales y ácidos grasos, puede permitirle estimular la actividad de la lipasa (Fox et al., 2015). También se ha descrito que en leche la ASB se une a zinc, cobre y tiroxina. Básicamente la función más aceptada es la de ser fuente de aminoácidos a los animales lactantes (Fenelon et al., 2019).

3.4.5. Lactoferrina bovina (LFB)

Pertenece a la familia de proteínas que unen metales, específicamente se asocia con hierro (Fe) (Boland et al., 2020). La LFB estructuralmente, es una glicoproteína que une átomos de hierro y consta de una sola cadena polipeptídica de

aproximadamente 700 aminoácidos, con una masa molecular aproximada de 78 kDa. Las concentraciones en la leche bovina son mucho más bajas que en la leche humana y oscilan entre $0,8 \text{ g L}^{-1}$ en la primera leche o calostro a $0,1 \text{ g L}^{-1}$ en leche madura (Fenelon et al., 2019). Su estructura es similar a la Transferrina que es una proteína que transporta hierro en sangre, pero su afinidad por el hierro es 300 veces más alto. La presencia de LFB en glándula mamaria depende de la prolactina. Su concentración es más alta durante etapa temprana del embarazo (Fox et al., 2015).

Aunque la función exacta de los glicanos (carbohidratos unidos a la proteína) no se entiende completamente, pueden proteger a LFB de la proteólisis y están involucrados en el reconocimiento de receptores. Su bioactividad ha sido ampliamente documentada. Tiene cualidades bactericidas y bacteriostáticas. Los efectos bacteriostáticos de LFB resultan, en parte, de su capacidad para retener el hierro que las bacterias requieren para su crecimiento. De esta forma mejora la biodisponibilidad del hierro a nivel intestinal (Goulding et al; 2020). Inhibe el crecimiento bacteriano al permeabilizar la pared celular de las bacterias uniéndose a polisacáridos a través de su extremo N terminal (Fox et al., 2015). También exhibe actividades antioxidantes, anti carcinogénica, antivirales, antifúngicos y antiprotozoarios. que probablemente son distintas de su capacidad para quelar el hierro. Los péptidos resultantes de la proteólisis de LFB también tienen actividad antibacteriana. Incluso se ha mencionado su capacidad para promover la proliferación de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* contribuyendo así a una microbiota intestinal beneficiosa (Fenelon et al., 2019).

La LFB también participa en la modulación de la respuesta inmune e inflamación, existe evidencia que sugiere que aumenta el número y actividad de los linfocitos B, los linfocitos T y las células asesinas naturales. Puede acelerar la maduración de células B y T y aumentar la expresión de receptores celulares. También se sabe que puede atravesar la barrera hematoencefálica y tiene un efecto supresor

del estrés. Puede mejorar el desarrollo neuronal y cognitivo postnatal (Fenelon et al., 2019).

3.5 Micotoxinas, Aflatoxina M₁ y legislación

3.5.1 Micotoxinas

El término “micotoxina” fue implementado en 1962 en una inusual crisis veterinaria cerca de Londres, Inglaterra, donde aproximadamente unos 100 mil pavos murieron por una misteriosa enfermedad asociada a la ingesta de semillas contaminadas, enfermedad que fue conocida como “Enfermedad X” de los Pavos. Este brote llevo al descubrimiento de las aflatoxinas y a una serie de investigaciones sobre toxinas fúngicas como contaminantes de alimentos para humanos y animales (Shephard, 2009; Monter Arciniega et al., 2022).

Se ha reportado que, cada año, cerca del 25% de los productos alimenticios están siendo contaminados con micotoxinas (Mollayusefian et al., 2021).

En los hatos lecheros, las raciones de alimento para vacas en producción de leche se formulan combinando uno o dos forrajes (que aportan fibra), concentrados (aportan energía y proteína), sales minerales, vitaminas, aditivos, tampones, probióticos y otros (Cerdas Ramírez, 2014).

Las micotoxinas son productos naturales de bajo peso molecular producidos como metabolitos secundarios por hongos filamentosos ubicuos (naturales, del ambiente) principalmente por *Aspergillus parasiticus*, *A. flavus* y *A. nomius* (Abadura et al., 2022). Estos hongos infectan las plantaciones y frutos en el campo y se desarrollan en los alimentos si las condiciones del ambiente como humedad (80-90%), actividad de agua (aw), temperatura (25-30°C), pH y concentración de oxígeno son adecuadas para su crecimiento (Bosco & Mollea, 2012; Mollayusefian et al., 2021; Shabeer et al., 2022). Las micotoxinas son tóxicas y químicamente

heterogéneas, capaces de causar enfermedad y muerte en seres humanos y otros vertebrados, no tienen significancia bioquímica en el crecimiento y desarrollo de los hongos y su tamaño puede variar desde formas simples de cadenas de 4 carbonos (toxina moniliforme) hasta sustancias complejas tales como fomopsinas (Zain, 2011; Monter Arciniega et al., 2022);

En Costa Rica se comercializan alimentos balanceados para vacas lecheras cuya formulación en su mayoría está compuesta por maíz/sorgo/trigo ($50\pm 10\%$), acemite de trigo/salvadillo de trigo/semolina de arroz, pulpa de naranja, pulpa de remolacha, harina de coco, harina de coquito de palma africana, cascarilla de soya, harina de soya, soya integral, harina de frijol (15-20%), deshidratados de la destilería de maíz DGSS (15%) y otros subproductos como semilla de algodón, gluten de maíz, melaza de caña, entre otros (12%). El restante 3% se completa con núcleos minerales y otros suplementos (Lic. DAA-MAG: 011-052, ver anexo 8). Relacionado con esto, es interesante observar que las vacas al inicio de la lactancia tienen una dieta compuesta por 50% forraje y 50% alimento balanceado donde por cada kg de alimento se va a obtener un estimado de 3 kg de leche. Considerando que cada vaca va a consumir un aproximado de 4-10 kg de alimento diario se puede estimar el rendimiento de leche que esta dieta va a proporcionar por día (Cerdas Ramírez, 2014) y a su vez proyectar el aporte que el alimento hace en cuanto a la presencia de micotoxinas en la leche en caso de que el alimento esté contaminado.

Actualmente se conocen más de 300 micotoxinas, sin embargo, las más estudiadas son aquellas a las que se les asocia un potencial carcinogénico o tóxico (Zain, 2011). Entre las más importantes desde esta perspectiva, se encuentran la zearalenona, fumonisina (B_1 y B_2), toxina T_2/HT_2 , deoxinivalenol (DON), ocratoxina A y aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , M_1 , M_2) (Creppy, 2002; Monter Arciniega et al., 2022). Las letras B y G se refieren al color de la fluorescencia (azul o verdosa) observada bajo luz UV, mientras que los subíndices 1 y 2 indican el componente mayor y menor respectivamente (Abadura et al., 2022). Hasta el momento han sido

reconocidas 20 tipos diferentes de aflatoxinas, siendo la aflatoxina B₁ (AFB₁) la más frecuente y con el más alto potencial carcinogénico (Mollayusefian et al., 2021). En la **Figura 1** se muestra la estructura química de las aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂.

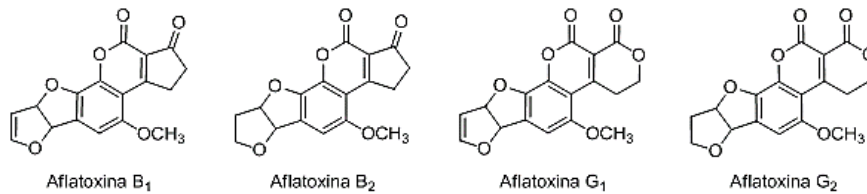


Figura 1. Estructura química de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂

Químicamente hablando, este grupo particular de contaminantes son componentes heterocíclicos cumarinicos unidos a anillos de tetrahydrofurano, las AFB₁ y AFB₂ contienen adicionalmente un anillo ciclopentano, mientras que AFG₁ y AFG₂ poseen en su lugar una delta lactona (Campagnollo et al., 2016).

La producción de aflatoxinas, por ejemplo, AFB₁ y AFG₁, se ve favorecida en climas tropicales y subtropicales (Bbosa et al., 2013; Britzi et al., 2013) similares al que se tiene en Costa Rica.

Una vez ingeridas por mamíferos a través de la dieta, AFB₁ es oxidada por el citocromo P450 en el hígado (grupo hidroxilo en la posición 4) a un epóxido reactivo intermediario más polar o a la forma AFM₁ (4-monohidroxilato) que es la más común. Al ser una molécula compuesta por 7 átomos de oxígeno y siete dobles enlaces, su solubilidad en agua es bastante pobre (IARC, 2002). Se ha reportado que 0.3-6.2% de la AFB₁ presente en los alimentos para animales es transformada en AFM₁ y aparece en la leche 12 horas después de ser ingerida por primera vez y sus niveles bajan a valores no detectables después de 72 horas de la última ingesta (Mollayusefian et al., 2021; Abadura et al., 2022).

3.5.2 Aflatoxina M₁

Aflatoxina M₁ (AFM₁) tiene un bajo peso molecular aproximadamente 328 g mol⁻¹ (Cattaneo et al., 2013) y es producida en mayor proporción que la AFM₂ por lo que la primera es la de mayor interés y preocupación. Ambas son metabolizadas en el hígado, como se explicó anteriormente, como parte de la detoxificación de la molécula y son eliminadas del cuerpo de la vaca a través de la orina, las heces y la leche, de ahí la importancia que tiene en este estudio (Bbosa et al., 2013). En la **Figura 2** se muestra la estructura química tanto de la AFM₁ como de la AFM₂.

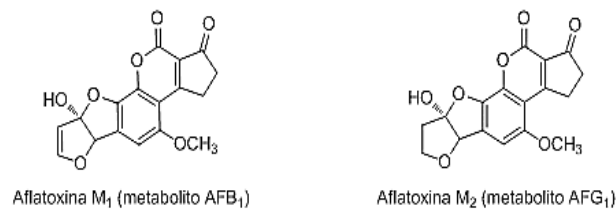


Figura 2. Estructura química de AFM₁, AFM₂

La conversión de AFB₁ a AFM₁ es influenciada por algunos factores nutricionales, incluido el tipo de alimento, la cantidad ingerida, velocidad de la digestión y factores fisiológicos de los animales por ejemplo raza, estado de salud, capacidad de desintoxicación del hígado, período de lactancia, rendimiento de la producción de leche y factores ambientales incluyendo estación, clima, ubicación geográfica y nivel de desarrollo de la región (Mollayusefian et al., 2021).

Estas toxinas generan varios problemas tanto a humanos como a los animales. En estos últimos por ejemplo, se han reportado problemas a nivel reproductivo, inmunológico, de ganancia de peso, entre otros. Adicional a esto se sabe que son altamente cancerígenas, teratogénicas (Bbosa et al., 2013) y de difícil tratamiento para ser eliminadas de los alimentos ya que son termoresistentes por lo que no se desactivan con tratamientos térmicos y permanecen en los alimentos por largos periodos de tiempo (Bosco & Mollea, 2012).

Debido a sus características, la AFM₁ es considerada un serio problema de higiene en los alimentos pues como se mencionó por su resistencia al calor mantiene su estructura intacta por lo que puede estar presente en leche comercialmente disponible y en subproductos lácteos. Sumado al alto consumo de estos productos en la población su impacto puede ser importante sobre todo en niños en etapa de crecimiento cuya vulnerabilidad es mayor. También se ha descrito la presencia de AFM₁ en leche materna (Mohammadi, 2011; Abadura et al., 2022).

El riesgo potencial de la exposición a AFM₁ vía consumo de leche y/o subproductos lácteos ha sido demostrado en varios estudios. Se sabe en general que AFM₁ puede causar daño al ADN, mutación de genes, anomalías cromosomales y transformación celular en células de mamíferos *in vitro* en insectos, eucariotas menores y bacterias. Aunque es menos tóxica que la AFB₁ su regulación sigue siendo sumamente importante (Scaglioni et al., 2014).

3.5.3 Legislación de AFM₁ en Costa Rica

En Costa Rica se estableció como límite máximo de residuos en el producto entero sea leche, queso o demás derivados lácteos AFM₁ un límite de $\leq 0.5 \mu\text{g Kg}^{-1}$ según lo descrito en el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.75:17 Productos Lácteos. Quesos Madurados. Especificaciones" basado en el (Codex Alimentarius, 1995, p.35).

3.6 Antecedentes de afinidad de aflatoxina M₁ con proteínas

Un dato relevante es que la AFM₁ es soluble principalmente en la fase acuosa de la leche, sin embargo, tiene particular afinidad por otros componentes de carácter proteico (Prandini et al., 2009). Al respecto, existen estudios que muestran que durante la producción del calostro la AFM₁ es excretada asociada a la fracción de inmunoglobulinas presentes en la leche (Coppock et al., 2009). Se ha encontrado también que la AFM₁ tiene una afinidad especial por la caseína (Brackett et al.,

1982; López et al., 2001; Indyk et al., 2021), principal proteína presente en la leche y que va a formar la cuajada con la que se fabrica el queso.

En relación con esto, es importante notar que el contenido de proteína total por cada kg de leche es de aproximadamente 33,0 g, donde 26,4 g (80,0%) corresponden a caseína y el restante 20,0% lo componen otras proteínas en orden de cantidad presente: β -lactoglobulina 4,3 g (13,0%), α -lactoalbúmina 1,5 g (4,6%), albúmina sérica bovina (ASB) 0,4 g (1,2%), lactoferrina 0,1 g (0,4%), inmunoglobulinas 0,7 g (2,1%) y el restante porcentaje es de proteosa peptona y otras proteínas de menor relevancia (Walstra et al., 2006). Mientras, el suero contiene 2% lactoferrina, 4% caseína, 6% ASB, 23% α -lactoalbumina y 65% β -lactoglobulina (Gellrich et al., 2014).

Aún no se ha elucidado la forma en que la toxina AFM₁ se acopla a la caseína, pero se cree que ésta unión se da en regiones ricas en residuos de aminoácidos con carácter hidrofóbico (Prandini et al., 2009). Aunque la afinidad de AFM₁ con la caseína de la leche es conocida, existe muy poca información sobre la interacción de la AFM₁ con proteínas del suero. Éstas últimas son altamente susceptibles a desnaturalización inducida por altas temperaturas; ya que el tratamiento térmico altera significativamente su estructura secundaria y por tanto afecta la interacción entre las proteínas. Consecuentemente, cuando las proteínas del suero se exponen a altas temperaturas, pueden exhibir grupos reactivos capaces de interaccionar con otros componentes como probablemente la AFM₁. Esto podría también explicar porque durante la fabricación del queso, a partir de leche no pasteurizada, cuando las proteínas del suero están en su configuración nativa, AFM₁ no parece reaccionar con ellas y prefiere la caseína por la cual la afinidad es probablemente mucho más alta en esas condiciones (Cattaneo et al., 2013).

Algo muy interesante que podría explicar las posibles diferencias en cuanto a afinidad de cada fracción de proteína del suero con la AFM₁ es que hay estudios donde se demostró que la α -La y la β -Lg, a un mismo pH, presentan cargas positivas y negativas y que forman complejos con otras moléculas a través de

fuerzas electroestáticas. Esto sucede cuando el pH de la solución está por encima de uno de los puntos isoeléctricos (pI) de una proteína y por debajo del pI de la otra. Se han reportado diferentes pI para α -La (4.2-4.5 o 4.6-4.9 o 5.0), para β -Lg (4.6 o 4.8 o 5.1 o 5.2 5.1-5.5) y para LFB (8.7 o 8.8 o \cong 9). En un estudio de simulación, Delboni et al. (2016) utilizaron valores de pI de 5.0, 4.8, 9.6 para α -La, β -Lg y LFB, respectivamente. Llama la atención que en diversos reportes indican que la β -Lg forma complejos con otras moléculas, mientras que la α -La no lo hace (Delboni et al., 2016).

Se ha visto, por ejemplo, que la LFB tiene una enorme habilidad para formar complejos y que se asocia con la β -Lg, pero no se sabe si también lo puede hacer con la α -La. Incluso se ha demostrado que β -Lg y LFB se asocian tanto en una relación estequiométrica de 1:1, como en clusters β -Lg₂-LF- β -Lg₂ formando heterocomplejos (Delboni et al., 2016).

En el estudio de Delboni et al. (2016) se evidenció que la energía de interacción entre la α -La y LFB es débil, mientras que, en contraste, β -Lg y LFB muestran una fuerte atracción entre ellas. Al parecer la fuerza que conduce la formación de los complejos de la LFB en este estudio está relacionada con interacciones electrostáticas, donde la carga de la proteína juega un rol clave. Incluso en las pruebas de simulación, el complejo α -La - β -Lg mostró ser inestable, por lo que se considera poco probable su asociación. Lo contrario sucedió con el complejo β -Lg - LFB, donde β -Lg interactúa mejor con LFB que con α -La (Delboni et al., 2016).

Otro aspecto importante, para comprender la formación de complejos entre moléculas, es que la concentración de sal influye en el pI de las proteínas y por ende en las fuerzas que prevalecen durante las interacciones con otras proteínas o moléculas. Una pequeña cantidad de sal con una alta concentración de proteína puede tener una fuerza iónica equivalente a la de un sistema concentrado con alto

contenido de sal. En esta condición, la concentración máxima de sal donde el complejo puede ocurrir se reduce. A baja concentración de sal, los complejos α -La - LFB y β -Lg -LFB tienen una marcada tendencia a formarse, lo cual no sucede a altas concentraciones de sal (Delboni et al., 2016).

Usando un modelo de integración numérica aplicado a sistemas moleculares llamado simulación Monte Carlo, Delboni et al. (2016) lograron teorizar cómo interactúan las proteínas β -Lg, α -La y LFB bajo ciertas condiciones de pH y concentración de sal. Su modelo sugiere que hay un rango o ventana de pH y concentración de sal en el cual las proteínas son más susceptibles a formar complejos entre ellas, siendo el pH fisiológico (≈ 6.5) el más favorable. La ventana de pH para lograr la formación de los complejos con una concentración de sal de 150 mM fue α -La -LFB (pH=5.0-9.6), β -Lg - LFB (pH=4.8-9.6). La interacción entre α -La - β -Lg solo se puede predecir para valores de pH entre 4.8-4.9, ya que, como se mencionó, la conformación muestra niveles de energía que la hacen inestable (Delboni et al., 2016).

Con todos estos hallazgos se podría sugerir para nuestra investigación que existe probabilidad de que la α -La pueda mostrar mayor interacción con la AFM₁ respecto a las demás proteínas del suero a ensayar, ya que se encuentra libre en ese momento, bajo las condiciones de pH y sal durante la fabricación del queso fresco.

Así, considerando la conocida afinidad de la AFM₁ por la caseína e inmunoglobulinas de la leche, y dado que no se conocen datos sobre la unión de la AFM₁ a otras proteínas como la β -lactoglobulina, α -lactalbúmina, albúmina sérica bovina y lactoferrina, es que se seleccionaron éstas y la caseína como objeto de estudio en este trabajo.

3.7 Variables que influyen el reparto de AFM₁ en queso fresco

En este estudio, se planteó la interrogante de cuál sería la forma de distribución de la toxina AFM₁ en el queso fresco que se fabrica en Costa Rica. Se ha descrito para otros tipos de queso, como el queso Cheddar, queso procesado para untar, queso Brick, queso parmesano y queso Mozzarella, que las concentraciones de AFM₁ fueron 4,3, 1,9, 1,7, 5,8 y 8,1 veces superiores, respectivamente, en relación a la leche descremada con la que fueron elaborados (Cattaneo et al., 2008). Con respecto a quesos frescos más suaves, análogos al queso fresco elaborado en Costa Rica, la concentración de AFM₁ fue entre 2,5-3,5 veces más alta que la encontrada en la leche utilizada en su fabricación (Yousef & Marth, 1989; Oruc et al., 2006).

En general, existe evidencia suficiente que sustenta la estabilidad de la toxina AFM₁ en diferentes tipos de queso durante su almacenamiento (Iha et al., 2013), no obstante resultados previos, de un estudio realizado en Costa Rica donde se analizó la concentración de AFM₁ en queso y leche fluida comercializada, muestra que los quesos comercializados presentan valores promedio de toxina menores a los presentes en leche. Así mismo se observó que, de las muestras colectadas, un menor porcentaje de muestras de queso mostró niveles detectables de toxina en comparación al número de muestras de leche positivas (Chavarría et al., 2015). Asumiendo como cierto que la AFM₁ es afín a la caseína de la cuajada, era de esperar que se diera un efecto de concentración de la toxina cuando se produjo el queso a partir de leche naturalmente contaminada con AFM₁. Sin embargo, esto no se demostró en dicho estudio. Por tanto, se presume que en este caso el efecto de la tecnología de fabricación puede jugar un papel importante en la distribución de la toxina.

Estudios previos mencionan que el aumento de la presencia de AFM₁ en queso va en función del tipo de queso elaborado (si es fresco o madurado), la tecnología aplicada en la elaboración y la cantidad de agua eliminada durante el proceso la

cual se ve afectada por factores como la temperatura del tratamiento enzimático para elaborar el cuajo, tiempo de prensado, saturación de la salmuera y el pH (Mohammadi, 2011; Abadura et al., 2022).

3.7.1 Tecnología de elaboración del queso

Como se mencionó anteriormente, los procesos para fabricar queso llevan pasos similares sin embargo se pueden fabricar quesos frescos, que están listos para el consumo o quesos maduros que se almacenan por un período de tiempo para obtener características de textura, aroma y sabor que los diferencian.

Durante el almacenamiento, conforme pasan los días, ocurre en el queso una serie de reacciones bioquímicas catalizadas por microorganismos o por enzimas cuya intensidad va a depender de la temperatura de almacenamiento, refrigeración (menor a 15 °C) para la conservación y donde los cambios son lentos o temperatura de maduración (entre 9-16°C) donde los cambios son más rápidos. Entre otras cosas, se metaboliza la lactosa residual, el lactato y el citrato. También se da la lipólisis y metabolismo de ácidos grasos en algunos tipos de queso, así como proteólisis y catabolismo de aminoácidos. La fermentación de la lactosa a ácido láctico principalmente es causada por microorganismos principalmente del cultivo iniciador o por contaminación accidental con otras bacterias en quesos artesanales. Esto modifica el pH durante el almacenamiento. Los cambios en la textura, apariencia y sabor del queso se dan por la hidrólisis de la matriz proteica y por incremento del pH debido al catabolismo del ácido láctico y producción de NH₃ por la deaminación de los aminoácidos. Esto último afecta también la estabilidad y actividad de muchas enzimas que probablemente están involucradas en el desarrollo del sabor (Fox et al., 2017).

Se ha demostrado que los cambios en los niveles de AFM₁ en el queso madurado están probablemente relacionados con la actividad de las enzimas proteolíticas y lipolíticas. La proteólisis afecta las áreas hidrofóbicas de la caseína de forma que

no estén disponibles para unirse con AFM₁. Además, los ácidos grasos, que son liberados por las enzimas lipolíticas, pueden actuar como un agente para cambiar el enlace hidrofóbico de AFM₁ en queso. La naturaleza de los enlaces químicos es otro factor que afecta potencialmente el nivel de AFM₁ durante la maduración de varios quesos. Ya que el enlace de AFM₁ con la caseína es hidrofóbico y no covalente, podría permitir que AFM₁ se libere más fácilmente al entorno del queso. Por lo tanto, el nivel de toxinas podría disminuir en el queso madurado (Sarmast et al., 2021).

Otro dato interesante es que se encontró reportes de incremento de la concentración de toxina en queso según se tratara de queso duro (168%), semiduro (68.7%) o blando (60.6%). Se dice que la concentración más alta en queso duro está relacionada a mayor drenaje del suero y pérdida de humedad durante el procesamiento (Sarmast et al., 2021).

Todas las operaciones anteriores pueden influenciar el reparto de AFM₁ pues van a generar cambios en la estructura de las moléculas con grupos afines y por ende posibilitan o no la unión de la toxina. La toxina, como ya se mencionó, es termoestable. Acá lo más importante a considerar es la estabilidad de las proteínas de la leche a la temperatura, concentración de sal, iones calcio, pH, etc. que pueden causar su desnaturalización y por ende exponer grupos reactivos afines a AFM₁, o bien incluso deshacer interacciones ya existentes entre AFM₁ con alguna estructura química por pérdida de afinidad, cambios conformacionales o disolución de los enlaces.

Al respecto, todas las caseínas tienen un alto contenido de aminoácidos no polares (35-40%) (Fox et al., 2015) que pueden ser posibles sitios de unión de la AFM₁ si quedan expuestos durante el proceso de fabricación del queso por efecto de enzimas como la quimosina u otras proteinasas, durante la coagulación.

La caseína como tal es muy estable a altas temperaturas. La leche a su pH natural de 6.7 puede ser calentada a 100°C /24 horas sin coagular y resiste el

calentamiento a 140°C hasta 20 min. Tales tratamientos térmicos severos causan muchos cambios en la leche, por ejemplo, producción de ácidos a partir de la lactosa que resulta en una disminución del pH y cambios en el equilibrio salino, que eventualmente provocan la precipitación de la caseína. Las proteínas de suero, por otro lado, son relativamente termolábiles, siendo completamente desnaturizadas por calentamiento a 90 °C durante 10 min (Fox et al., 2015).

Adicionalmente, las proteínas del suero a diferencia de las caseínas permanecen solubles a pH= 4.6; también son solubles en presencia de saturación de NaCl, se mantienen solubles después de la coagulación de las caseínas con la enzima quimosina (Fox et al., 2015), esto las puede volver disponibles para interaccionar con la AFM₁.

Las proteínas del suero al ser estables en las condiciones definidas en este estudio para la preparación del queso (65°C / 30 min) se van a drenar y perder mediante el proceso de corte de la cuajada, prensado y volteado del queso durante el almacenamiento. Es por ello que se debe medir la concentración de AFM₁ en el suero después de la elaboración del queso.

3.7.2 Influencia de cultivo microbiano bacterias ácido lácticas (BAL) sobre AFM₁

Paralelamente en este trabajo se investigó la estabilidad de la toxina AFM₁, durante el almacenamiento del producto en anaquel. Investigaciones anteriores muestran que la estabilidad de AFM₁ durante el almacenamiento y maduración del queso puede ser variable. Se ha reportado, por ejemplo, que la concentración de AFM₁ en queso Cheddar, Brick, Limburger, Camembert y Tilsit incrementó durante la etapa temprana de maduración y disminuyó posteriormente mientras que en el queso Gouda o Mozzarella no cambió apreciablemente (Oruc et al., 2006).

Se ha descrito previamente que las BAL y los probióticos pueden reducir la cantidad de aflatoxina libre en la leche y los productos lácteos por varios mecanismos entre ellos unión de la aflatoxina a las células bacterianas, y tal vez, su descomposición estructural. (Nguyen et al., 2019).

Las BAL se utilizan como microorganismos grado alimentario para la producción de una variedad de productos lácteos fermentados. También las BAL son los organismos probióticos más comunes utilizados para hacer alimentos funcionales. Las BAL son bien conocidas por su metabolismo fermentativo en el que convierten carbohidratos simples en ácidos orgánicos y otros productos finales. (Öztürkoğlu et al., 2018)

Las BAL incluyen un amplio rango de bacterias Gram-positivas, catalasa negativa, no móviles, no formadoras de esporas, productoras de ácido láctico como el principal producto final de la fermentación. (Walstra et al., 2006) Según sus requerimientos de temperatura para crecimiento se clasifican en mesófilas (20-30°C) o termófilas (37-45°C) (Fashandi et al., 2018) Debido a su estatus GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro) y presuntamente seguro (QPS) provisto por la FDA, las BAL han llamado mucho la atención de los investigadores en relación a su potencial como bioconservadores (Nasrollahzadeh et al., 2022).

Streptococcus thermophilus es un miembro del cluster BAL. Un grupo bacterias filogenéticamente relacionado que juega un rol muy importante en las fermentaciones de alimentos. *S. thermophilus* crece mejor de 42-45°C, pero puede sobrevivir a 60°C/30 minutos, produce exopolisacáridos (EPS) que imparten propiedades reológicas deseables como viscosidad y es heterótrofo, requiere carbohidratos simples como fuente de energía, y aminoácidos preformados como fuente de nitrógeno. Es una bacteria bien adaptada al ambiente de la leche, siendo su hábitat primario (Hutkins et al., 2014).

Particularmente, es importante mencionar que, aunque la AFM₁ es usualmente estable, la presencia de bacterias lácticas como *Streptococcus thermophilus*, la

cual es utilizada como cultivo láctico protector en la elaboración del queso, ha demostrado un efecto de disminución de la AFM₁ en otros productos como yogurt (Elsanhoty et al., 2014).

Se ha observado que factores como la temperatura, período de incubación, pH, tipo de cepa BAL, nivel de contaminación, número de microorganismos, así como las sustancias nutricionales pueden afectar indirectamente la cantidad de AFM₁ al influir en la crecimiento y actividad de las BAL. Se ha descrito que durante el almacenamiento en presencia de BAL el pH disminuye, aumenta la acidez, así como aumenta la proteólisis y lipólisis haciendo que AFM₁ disminuya (Nguyen et al., 2019).

Estudios previos mencionan que la unión de la AFM₁ a las BAL se da en las primeras horas de almacenamiento. Se ha evidenciado que en yogurt a 4°C un 59% de la AFM₁ se redujo después de dos semanas de almacenaje. Otro estudio mostró una ligera reducción de 3.2% en queso respecto a la concentración inicial en leche (Arab et al., 2012). Otra investigación señala que la cepa de *S. thermophilus* ST-36 redujo en un 39.16% la concentración de AFM₁ en leche, la cual inicialmente era de 10 µg Kg⁻¹ (Sarimehmetoglu et al., 2004). Así mismo Govaris et al. (2002) en su investigación encontraron que *S. thermophilus* ST-36 produjo una reducción de 22% de AFM₁ partiendo de una concentración inicial de 50 µg Kg⁻¹. Otro grupo de investigadores observaron una disminución en la concentración de AFM₁ durante el almacenaje del queso Tarkhineh en el cual utilizaron *S. thermophilus* como cultivo iniciador y lo atribuyen a la presencia de BAL (Moradi et al., 2021).

En el caso de las BAL, la pared celular bacteriana juega un papel importante en la unión a aflatoxinas. Las aflatoxinas se unen a los componentes de la pared celular a través de interacciones débiles no covalentes como puentes de hidrógeno o fuerzas de Van Der Waals y esta unión puede verse afectada por condiciones ambientales como pH, concentración de sal, etc. Los polisacáridos, ácidos

teicoicos y la capa de peptidoglicán de la pared celular son considerados de carácter hidrofóbico y han sido los elementos más importantes relacionados a la unión de AFM₁ a la pared bacteriana (Arab et al., 2012; Assaf et al., 2019). Esta conclusión se obtuvo después de realizar un experimento donde se aplicó un tratamiento a las bacterias con periodato y pronasa E que causaron una degradación no específica de los carbohidratos y proteínas de la pared celular resultando en la incapacidad de las bacterias en unirse a la AFM₁ (Muaz et al., 2021).

Se ha observado que los tratamientos con calor y cambios del pH incrementan las uniones de AFM₁ a los componentes de la pared celular de las bacterias, al desnaturalizarse las proteínas degradándose a péptidos pequeños y en el caso de los polisacáridos dañando el enlace glicosídico y perdiendo el peptidoglicán y los monosacáridos exponiendo así más sitios de unión a AFM₁ (Nasrollahzadeh et al., 2022; Fashandi et al., 2018; Nguyen et al., 2019).

Algo importante de tener presente es que las fuerzas que mantienen la unión entre AFM₁ y la pared bacteriana son débiles, por lo que esta unión puede ser reversible (Muaz et al., 2021). Esto puede hacer que en el caso del proceso de almacenaje del queso fresco durante el drenado del suero se pierda parte de la AFM₁.

Adicionalmente, la afinidad de la pared celular de las BAL a la AFM₁ es variable según la cepa, esto se ha evidenciado en diversos estudios (Sarmast et al., 2021) por lo que debe considerarse cuando se evalúen los datos de este trabajo.

Partiendo de esta información, como parte de esta investigación, se indagó si durante el tiempo de almacenamiento la concentración de la toxina sufre algún cambio a través del tiempo que podría ser atribuido a los recuentos de BAL o a otros relacionados con la composición química o a las condiciones de almacenamiento del queso fresco.

CAPITULO 4. ARTÍCULO DISTRIBUCIÓN, ESTABILIDAD E INTERACCIÓN DE AFLATOXINA M₁ CON PROTEÍNAS EN QUESO FRESCO.

En este apartado, se hace un cambio a un capítulo de publicación, el cuál puede ser accesado a través de esta cita

Chavarría Molina, G., Molina Alvarado, A., Leiva Gabriel, A., Méndez Hernández, G., Wong González, E., Cortés Muñoz, M., Rodríguez Sánchez, C & Granados Chinchilla, F. (2017). Distribution, stability, and protein interactions of Aflatoxin M₁ in fresh cheese. *Food Control*, 73, 581-586. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.005>

DISTRIBUTION, STABILITY, AND PROTEIN-INTERACTIONS OF AFLATOXIN M₁ IN FRESH CHEESE

Abstract

Aflatoxin M₁ (AFM₁), a metabolite resulting from the hepatic metabolism of aflatoxin B₁, is a potential carcinogen that can be found in milk, cheese, and others dairy products. In this work, we aimed to elucidate the distribution and fate of AFM₁ in fresh cheese and whey during cheese manufacturing and storage as well as the level of interaction of this toxin with various milk, cheese, and whey proteins. Additionally, we analyzed the in vitro behavior of casein, α -lactalbumin, β -lactoglobulin, bovine serum albumin (BSA), lactoferrin, and mixtures thereof, with a fixed concentration of AFM₁ after covalent crosslinking. Our results show that up to 70% of the AFM₁ levels present in milk spiked with 0.5 and 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ are released in whey during fresh cheese manufacturing. The whey and milk proteins with more AFM₁ molecules bound were α -lactalbumin and casein, with 88% and 81%, respectively. We also observed a substantial decrement in AFM₁ concentration

during ripening that correlated inversely with plate counts of lactic acid bacteria and directly with the whey-draining process that occurs during fresh cheese maturation or storage. This knowledge may serve as a basis for interventions in the dairy industry aiming to increase the security of cheese and other dairy products.

Keywords: Aflatoxin M₁: Fresh cheese, Milk, Whey, Cheese manufacturing, Milk protein interactions.

4.1 Introduction

The aflatoxins B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) and G₂ (AFG₂) are a group of carcinogenic toxins produced by various fungi (Zain, 2011; Bbosa et al., 2014). They are commonly found in crops, grains, feedstuff, and forage from which ruminants feed and therefore can occur in milk (Kabak, Dobson & Var, 2006). Once ingested by mammals through the diet or lactation, AFB₁ is oxidized in the liver at its hydroxyl group at the 4-position to give rise to AFM₁; a potential carcinogen (IARC, 2002; Prandini et al. 2009; Bbosa et al., 2014). Despite containing 8 oxygen atoms and 7 double bonds, AFM₁ is considered to be very slightly soluble in water (IARC, 2002) and is heat stable; hence conventional manufacturing processes do not remove it from milk (Ellis, Smith, Simpson, & Oldham, 1991).

As a consequence, it can be found in whey and different types of cheese (Cattaneo, Marinoni, Iametti, & Monti, 2013; Mohammadi, 2011; Chavarría, Granados-Chinchilla, Alfaro-Cascante, & Molina, 2015). AFM₁ levels in cheese are influenced by a variety of factors, including the milk used and its origin. Other technological features, such as cheese type, renneting, press time, salt concentration, final pH, and the amount of water eliminated during processing (Mohammadi, Alizadeh, Bari, Tajik, 2008; Mohammadi, 2011), also impact final levels of AFM₁. Studies have shown that AFM₁ concentrations in cheese do not change even after three months of storage (Deveci, 2007). Therefore, these potential carcinogens persist during ripening and storage and can reach end consumers. This situation may represent a relevant public health issue on account of the importance of cheese in human

nutrition. Indeed, it is projected that the worldwide cheese production will increase ca.~2% per year and that cheese consumption is especially high (ca. 12.5 kg per capita per year) in developed countries (Ayyash, Sherkat, & Shah, 2014; Lafougere, 2012).

Whereas whey contains 2% lactoferrin, 4% casein, 6% BSA, 23% α -lactalbumin and 65% β -lactoglobulin, milk is composed of 0.4% lactoferrin, 1.2% BSA, 4.6% α -lactalbumin, 13% β -lactoglobulin and 80% casein (Haug, Høstmark, Harstad, 2007; Gellrich, Meyer, & Wiedemann, 2014). It is known that AFM₁ binds to proteins through non-covalent interactions (Prandini et al., 2009) and studies have demonstrated that AFM₁ has an affinity for the hydrophobic regions of casein (Bianco et al., 2012; Brackett & Marth, 1982; Lopez, Ramos, Ramadan, Bulacio, & Perez, 2001). Compared to ricotta cheese, for example, fresh cheese is very rich in proteins (Cattaneo et al., 2013).

Thus fresh cheese could retain AFM₁ more avidly. With this hypothesis in mind, we aimed to determine the distribution and stability of AFM₁ during fresh cheese manufacturing as well as the level of interaction of this toxin with different whey and milk proteins. Finally, since lactic acid bacteria (LAB) show enhanced AFM₁ binding in contaminated matrices (Bovo, Corassin, Rosim, & Oliveira, 2013; Corassin, Bovo, Rosim, & Oliveira, 2013; Dalie, Deschamps, & Richard-Forget, 2010), LAB populations were assessed in parallel to understand AFM₁ fate and behavior during cheese maturation and storage.

4.2 Materials and methods

4.2.1. Reagents

An AFM₁ standard (>98.00%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was used for fresh cheese contamination and in all protein-interaction assays. Calibration curves for AFM₁ quantification were prepared with a certified analytical standard containing

0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of this analyte in acetonitrile (Biopure™, Romer Labs Diagnostic GmbH, Tulln, Austria). HPLC grade acetonitrile and methanol were purchased from J.T. Baker (Avantor Materials, PA, USA). Sodium ethylenediaminetetraacetate (Na_2EDTA), sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium chloride (NaCl), paraformaldehyde and 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). All reagents used were ACS grade. All solutions were prepared with ultrapure water (final conductivity = 0.055 $\mu\text{S cm}^{-1}$) obtained with a Millipore Elix 35/Milli-Q Advantage A10 system (Millipore, Bedford, MA, USA). In the preparation of fresh cheese, we used an aqueous calcium chloride (CaCl_2) solution (37 g/100 g, Calcivac®, Vaco S.A Laboratories, San Jose Costa Rica) to form curd, a chymosin solution for milk coagulation (CHY-MAX® EXTRA, CHR Hansen, Milwaukee, USA), and a thermophilic LAB as a starter culture (FDDVS STI-14, CHR Hansen, Milwaukee, USA).

4.2.2. Cheese preparation

Raw milk used for cheese manufacturing was collected at five farms located at San José de la Montaña, Costa Rica and transported to the laboratory at 4 °C. The basal levels of AFM_1 in these milk samples was determined according to the methods AOAC® OMAS^{SR} 974.17; 980.21; 986.16; and 2000.08 (AOAC International, 2016) and their chemical composition (i.e. fat, non-fat milk solids, density, added water, protein and cryoscope freezing point) was studied with the Ekomilk milk analyzer (MILKANA KAM98-2A, Everest instruments, INDIA) (Table 1). Within the first 24 h after collection, each milk sample was divided into two equal volumes and spiked with AFM_1 until final concentrations of 0.5 and 1.5 ng mL^{-1} were reached, notwithstanding the initial levels of AFM_1 in the raw material. After spiking, contaminated milk batches were continuously stirred for 10 min to ensure complete AFM_1 dispersion. Traditional techniques, similar to those used to make Costa Rican “Turrialba” cheese (Granados & Álvarez, 2007), were employed for fresh cheese preparation. Briefly, spiked milk samples were pasteurized at 65 °C for 30 min in a

water bath, cooled to 38 °C, and mixed with 1.5 g CaCl₂/100 g of sample. Subsequently, the milk was cooled to 35 °C and mixed with 10 mg of the aforementioned LAB culture. Coagulation was achieved through addition of chymosin and incubation of the mixture for 35 min at 33 °C. The resulting curd was cut into cubes with an edge length of 1-2 cm, salted with 1 g NaCl/100 g of sample, and drained into screens (1 mm aperture size). After draining, the curd was fitted into molds which were maintained for 24 h at 4 °C pressed under their own weight. Physicochemical analyses, including Ca, Na, ash, total nitrogen (expressed as protein), and fat content, were performed on each batch of final product (Table 1). To monitor protein stability, a batch of cheese was analyzed with AOAC[®] OMA^{SR} method 2001.14 at days 0, 7, 14, 21 and 28 in triplicate.

4.2.3. Enumeration of lactic acid bacteria (LAB) in fresh cheese

The abundance of LAB in each cheese batch during storage at 4°C was determined at days 0, 7, 14, 21 and 28 by triplicate using plate counts (Coeuret, Dubernet, Bernardeau, Gueguen, & Vernoux, 2003). Briefly, we homogenized 10 g of fresh cheese in 90 mL peptone water. After this homogenization step, serial decimal dilutions of the resulting suspensions were spread by duplicate onto Mann-Rogosa-Sharpe agar plates (MRS, Oxoid, Wade Road, United Kingdom) which were incubated under microaerophilic conditions at 20 °C for 72-120 h. Non-sporulated Gram-positive bacilli negative for the catalase test were further identified as LAB with the API[™] 50 CH system (BioM_erieux, Marcy l'Etoile, France).

4.2.4. Aflatoxin M₁ interaction with milk, cheese, and whey proteins

To study the interaction of AFM₁ with whey or milk proteins, under controlled conditions, we mixed 0.905 ± 0.235 mg AFM₁ L⁻¹ (as per HPLC analysis) with solutions containing 0.5, 1.0 and 2.0 g whey protein mix/100 g or 1.75, 3.5 and 7.0 g milk protein mix/ 100 g, (composition of each mixture detailed below) 12.5 mL of deproteinized whey obtained through cold ultrafiltration, 12.5 mL of 0.1 mol L⁻¹

HEPES (pH 7.0), 0.85 g/100 mL NaCl in order to increase ionic strength, and 0.1 mmol L⁻¹ EDTA to avoid metal induced crosslinking during formaldehyde precipitation (as described in 2.5). The whey protein mix contained 57.1% [501.50 mg] β -lactoglobulin, 22.9% [200.9 mg] α -lactalbumin, 6.9% [60.53 mg] BSA, 2.4% [20.78 mg] casein and 1.6% [16.70 mg] lactoferrin. In turn, the mixture of milk protein was composed of 79.4% [697.54 mg] casein, 12.9% [113.40 mg] β -lactoglobulin, 5.5% [48.75 mg] α -lactalbumin, 1.8% [15.54 mg] BSA and 0.3% [2.31 mg] lactoferrin. The detailed composition of this deproteinized whey, as well as the procedure followed to obtain it appears in Table 1.

4.2.5. Protein precipitation and crosslinking with formaldehyde

Protein-AFM₁ interactions in the aforementioned whey and milk protein suspensions were stabilized through crosslinking for 60 min with 25 mmol L⁻¹ paraformaldehyde (Nadeau & Carlson, 2007). After that, the reactions were quenched with 25 mmol L⁻¹ of sodium dodecyl sulfate. Protein complexes were precipitated with trichloroacetic acid (Link & LaBaer, 2011) and the precipitates were passed through Whatman 41 filters (GE Healthcare Bio- Sciences, Pittsburgh, PA). The resulting supernatants were later analyzed for AFM₁ by HPLC (as described in 2.6).

4.2.6. HPLC-based AFM₁ detection

The concentration of AFM₁ in milk, whey, cheese, and supernatants from the protein precipitations was determined with a previously described method that combines enzyme-assisted extraction, immunoaffinity clean-up, and high-performance liquid chromatography coupled with a fluorescent detector (HPLC-FLD) (Chavarría et al., 2015). The recovery, variation, and limit of detection (LoDs) of this method in milk, whey and cheese are shown in Table 1. AFM₁ concentrations were measured in each cheese batch during storage at 4 ° C at days 0, 7, 14, 21 and 28 by triplicate.

Milk						
Batch/Property	Fat (g/100 g)	Non-fat milk solids (g/100 g)	Density (g mL ⁻¹)	Added water (mL)	Protein (g/100 g)	Cryoscope freezing point (°C)
L ₁	3.59	8.91	1.0302	0	3.42	-0.58
L ₂	6.24	8.34	1.0256	2.46	3.24	-0.54
L ₃	3.58	9.19	1.0314	0	3.53	-0.60
L ₄	3.70	9.15	1.0310	0	3.51	-0.60
L ₅	5.22	8.70	1.0279	0	3.36	-0.57

Cheese			Whey			
Control	Crude ash (g/100 g)	Calcium (mg kg ⁻¹)	Sodium (mg kg ⁻¹)	Crude ash (g/100 g)	Calcium (mg kg ⁻¹)	Sodium (mg kg ⁻¹)
	2.20 ± 0.03	336.1 ± 42.3	282.1 ± 24.9	1.11 ± 0.01	48.6 ± 6.1	179.5

Cheese		Whey	
	Protein (g/100 g)	Fat (g/100 g)	Fat (g/100 g)
Control	12.2 ± 0.3	18.7 ± 1.2	0.44 ± 0.03
L ₁	20.0 ± 0.4	12.8 ± 0.8	0.26 ± 0.02
L ₂	10.4 ± 0.2	19.5 ± 1.3	0.46 ± 0.03
L ₃	11.5 ± 0.2	10.7 ± 0.7	0.044 ± 0.003
L ₄	10.9 ± 0.2	13.5 ± 0.9	0.12 ± 0.01
L ₅	11.4 ± 0.2	16.7 ± 1.1	0.48 ± 0.03

AFM ₁ method performance			
	Milk	Cheese	Whey
Recovery (%)	92.2–109.7	81.8–92.3	98.2–103.7
Coefficient of Variation, CV (%)	3.8	4.7	1.4
Limit of detection/quantitation, ng kg ⁻¹	14/42	23/70	12/37

Table 1 Physicochemical characterization of starter milk, manufactured cheese and whey and performance of the chromatographic methods used for determination of AFM₁ in these matrices.

4.2.7. AFM₁ interaction with purified proteins

To refine the results obtained with controlled protein mixtures, we repeated the formaldehyde crosslinking experiments using 1.88, 3.75 and 7.50 g casein/100 g solution and 0.25, 0.75, 1.25 or 2.50 g α -lactalbumin/100 g solution. Additionally, the same treatment was applied to similar concentrations of BSA (130.22 mg), β -lactoglobulin (104.35 mg), casein (143.95 mg), α -lactalbumin (106.97 mg), lactoferrin (100.43 mg) using a fixed 0.5 μ g L⁻¹ AFM₁ concentration in a total volume of 25 mL. A similar assay was performed for each of the three commercially available casein fractions α _s [100.91 mg], κ [104.30 mg], β [111.23 mg]). A supplementary assay was also done to simulate the natural fraction ratio of casein (Modler, 1985). In this experiment, 17.81, 9.65 and 2.45 mg mL⁻¹ of α _s, κ , β were used, respectively. Recoveries obtained for the resulting supernatants were normalized based on their masses.

4.2.8. Statistical analyses

t- and U Mann-Whitney tests were applied to investigate whether the results obtained for high and low AFM₁ concentrations differed. An ANOVA analysis with blocking (disregarding the variability of LAB counts among batches) was performed to assess whether LAB counts changed across time. Similarly, an ANOVA test coupled with a post hoc Tukey analysis was used to determine whether AFM₁ levels diminished as a function of time. These assays were performed using IBM PAWS Statistics 22 (Armonk, NY). P values below 0.05 were considered to be significant. To explain the interaction of AFM₁ with increasing protein concentrations, logarithmic curves (slopes, intercepts and determination coefficients) were constructed using Sigmaplot 13 software (Systat Software Inc., San Jose, CA). A value of $r \sim 0$ was deemed as lack of association.

4.3 Results and discussion

4.3.1. AFM₁ carry-over from contaminated milk to cheese and whey

We manufactured cheese with milk contaminated with two AFM₁ levels (0.5 and 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$) to calculate the carryover of AFM₁ from contaminated milk to fresh cheese and whey. For both concentrations assayed, a higher percentage of AFM₁ was retained in whey (0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$: mean value [70.4 \pm 22.0] %; 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$: mean value [73.1 \pm 14.0] %) rather than in cheese irrespective of the spike level (Table 2). Similar results were obtained in a previous study (López et al., 2001), in which up to 60% of AFM₁ was retained by whey. This may be further influenced, as the milk quantities used in fresh cheese manufacturing are considerably lower (ca. 6-8 L of milk to produce 1 kg cheese) than those used for matured cheese. Other researchers obtained similar results in the production of Minas Frescal cheese, where a 30.6% - 42.3% carry-over was reported (Fernandes, Correa, Rosimc, Kobashigawac, & Oliveira, 2012).

4.3.2. AFM₁ stability in cheese

To monitor AFM₁ and protein stability during storage in cheese we measured both concentrations in cheese at days 0, 7, 14, 21 and 28 by triplicate. Also the variation in LAB density during storage was analyzed. At day 0, the manufactured cheese had an average concentration of AFM₁ $0.42 \pm 0.26 \mu\text{g L}^{-1}$ (Table 2).

Table 2 Aflatoxin M₁ distribution in whey and fresh cheese that were derived from artificially contaminated milk with two different toxin concentrations at day zero.

Batch/Product	Milk basal concentration	Cheese		Whey		Carry-over from milk to cheese (%)		Carry-over from milk to whey (%)	
		[AFM ₁] $\mu\text{g L}^{-1}$							
Spike level		0.5	1.5	0.5	1.5	0.5	1.5	0.5	1.5
L ₁	0.02 ± 0.01	0.15 ± 0.04	0.18 ± 0.05	0.47 ± 0.12	1.81 ± 0.47	24.2	9.0	75.8	91.0
L ₂	<0.014	<0.014	0.19 ± 0.05	0.40 ± 0.10	1.01 ± 0.26	0.0	15.8	100	84.2
L ₃	1.13 ± 0.29	0.21 ± 0.05	0.91 ± 0.24	0.72 ± 0.19	1.19 ± 0.31	22.6	43.3	77.4	56.7
L ₄	0.05 ± 0.01	0.23 ± 0.06	0.42 ± 0.11	0.33 ± 0.09	0.85 ± 0.22	41.2	33.1	58.8	66.9
L ₅	<0.014	0.15 ± 0.04	0.41 ± 0.11	0.10 ± 0.02	0.72 ± 0.19	60.0	36.3	40.0	66.7
Mean \pm SD	0.24 ± 0.44	0.15 ± 0.08	0.42 ± 0.26	0.40 ± 0.20	1.12 ± 0.38	29.6 ± 22.4	27.5 ± 14.5	70.4 ± 22.0	73.1 ± 14.0

After 28 days of storage, between 10.1 and 70.7% of these AFM₁ levels remained in cheese (Fig. 1b). This decay in AFM₁ concentration correlated directly with the starter milk levels of non-fat milk solids ($r = 0.747$) and milk protein ($r = 0.769$) (Table 1). The abundance of culturable LAB in the cheese was correlated inversely ($r = 0.825$) with the AFM₁ concentration (Fig. 1a,b) during storage.

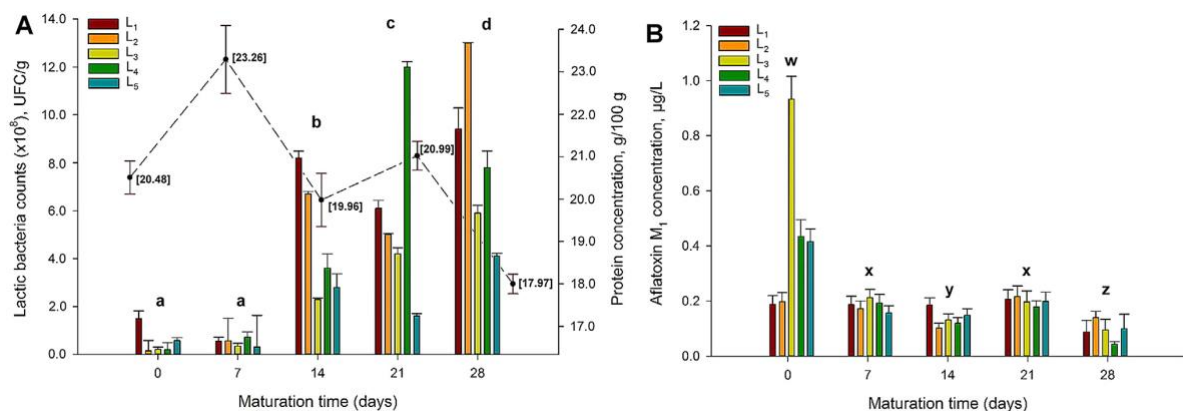


Fig. 1. (A) Lactic acid bacteria enumeration and protein stability (discontinuous line and right ordinate, number in brackets represent mean protein concentration)

during cheese maturation. (B) Toxin levels, in function of time, during fresh cheese ripening in storage at 4 °C for the 1.5 µg L⁻¹ spike level. Dissimilar letters represent significant differences with $p < 0.05$. a/a: $p = 0.0981$ a/b: $p = 0.006$; b/c: 0.0152; c/d: $p = 0.0233$. w/x: $p = 0.011$; x/y: $p = 0.0201$; x/x: 0.107; x/z: $p = 0.0189$.

We also noted a time-dependent decrease in cheese protein content that correlated with the increase of LAB population density in the samples ($r = 0.878$) (Fig. 1a). Though the mechanism behind this results is still unclear, our data (Fig. 1a, b) seems to reinforce publications stating that LAB may decontaminate AFM₁ in cheese (Bovo et al., 2013) and other matrices (Corassin et al., 2013; Zinedine, Faid, & Benlemlih, 2005), (Fig. 1a,b). Corassin et al. (2013) previously introduced the idea of using such microorganisms to decrease aflatoxin contamination issues in the dairy industry. This idea is suited for the Costa Rican scenario. Previous reports (Hernández-Mendoza, Guzán-de-Peña, & García, 2009) have already documented the interaction between AFM₁ and teichoic acids and other bacterial cell wall components of probiotic bacteria and yeasts (Gonçalves, Rosim, Gonçalves et al., 2015; Gonçalves, Rosim, Oliveira, & Corassin, 2015; Hernández- Mendoza et al., 2009).

Empirical observations indicated that as LAB counts increase with time, more difficulties are faced with the cheese extract/digests going through the immunoaffinity columns, probably due to higher cellular debris. In this regard, Bovo and coworkers (Bovo et al., 2013; Bovo, Tuanny, Rosim, Fávaro, & Oliveira, 2014) have already established that non-viable cell counts affect toxin sequestration. Hence one might argue that bacterial structures may remain despite milk pasteurization and as such milk non-viable microorganisms may still influence the results observed. Lipolysis and proteolysis, which in turn may affect toxin binding capabilities, may also contribute to the decrease of AFM₁ concentration during cheese ripening and storage (McSweeney, 2004).

Finally, since cheese pH changes as a function of time, the electrostatic and hydrophobic forces that mediate protein-toxin interactions may vary during the ripening process. (Deveci, 2007) already demonstrated that AFM₁ remains in White Pickled cheese for up to 3 months of storage in brine and that approximately 31% of the AFM₁ passed to whey while only about 3% passed to the brine during ripening. Therefore, salting may prevent the subsequent loss of AFM₁ during cheese storage possibly due to an increase in ionic strength and disruption of the interaction between toxin and protein or due to accelerated dehydration of the cheese (Ayyash et al., 2014) and transference of AFM₁ to whey. In a similar fashion, Cattaneo and coworkers (Cattaneo et al., 2013) demonstrated that AFM₁ retention and distribution in ricotta cheese (a whey-based product) is also dependent on processing and manufacturing. In fact, ca. 6% of its initial concentration stays in the ricotta cheese, the remainder is lost in the liquid portion. Ultrafiltration and spray-drying can also contribute reducing AFM₁ levels in a significant manner from contaminated whey (Cattaneo et al., 2013). These data are consistent with our findings.

4.3.3. AFM₁ interaction with milk, cheese, and whey proteins

To study the interaction of AFM₁ with milk and whey proteins, we exposed purified AFM₁ to a mixture of milk and whey main proteins in 3 different concentrations (maintaining the respective protein proportion), precipitated the AFM₁ - protein complexes and measured the remnant AFM₁ in the supernatant (Fig. 2a). We found an inverse correlation between the concentration of milk ($r = - 0.997$) and whey ($r = - 0.986$) proteins mix and the remnant concentration of AFM₁ in the supernatant. The slope of the curve depicting reductions in AFM₁ concentration in supernatants as a function of increasing protein concentrations for whey proteins ($m_x = - 0.157$) was almost half of that obtained for milk proteins ($m_x = - 0.441$) (Fig. 2a).

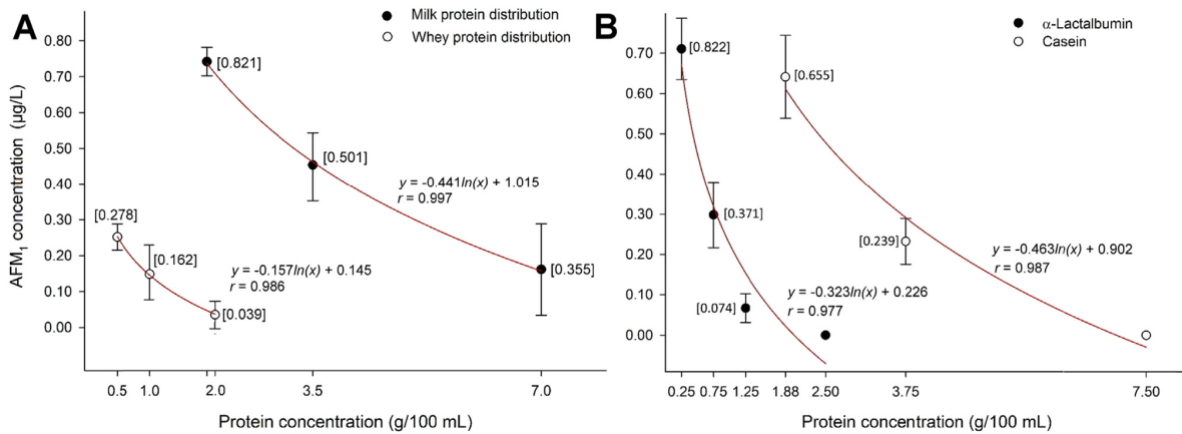


Fig. 2. AFM₁ concentration in function of (A) mixture of cheese and whey main proteins (B) increasing concentrations of casein (cheese main protein) and α -lactalbumin (whey main protein). Numbers in square brackets represents AFM₁ remnant concentration from the, initially, $0.90 \pm 0.23 \mu\text{g L}^{-1}$ spiked solutions.

To analyze the affinity of AFM₁ for milk and whey proteins in detail, we repeated these experiments using AFM₁ $0.90 \pm 0.23 \mu\text{g L}^{-1}$ and 1.88, 3.75 and 7.50 g of casein (major milk and cheese protein)/100 g solution and 0.25, 0.75, 1.25 and 2.50 g of α -lactalbumin (major whey protein)/100 g solution (Fig. 2b). As expected, the remnant concentration of AFM₁ in the supernatant correlated inversely with the concentration of casein ($r = -0.987$) and α -lactalbumin ($r = -0.977$) in the solution, probably due to the relatively high concentration of casein in milk (ca. 80 g casein/100 g protein). While the supernatant that was derived from the treatment with 2 g of α -lactalbumin/100 mL showed no signal for AFM₁ in the HPLC assay, that from the experiment with the same concentration of casein exhibited an AFM₁ concentration of $0.65 \pm 0.12 \mu\text{g L}^{-1}$, representing a reduction of 27.2% (Fig. 2b).

However, curves depicting reductions in AFM₁ concentration in supernatants as a function of increasing protein concentrations had similar slopes ($m_x = -0.323$, α -lactalbumin vs. $m_x = -0.463$, casein, Fig. 2b). In contrast to the AFM₁ affinity to α -lactalbumin alone (with 0.5 g protein/100 mL, recovery = 52.4%, Fig. 2b), a synergic effect on AFM₁ affinity and sequestration was observed when a combination of β -

lactoglobulin, α -lactalbumin, and BSA was assayed. In this case, at 0.5 g protein/100 mL, only 27.8% AFM₁ was recovered (Fig. 2a).

The opposite was true for the milk protein distribution simulation where a more dramatic drop in the remaining AFM₁ concentration was observed if only casein (with 2 g protein/100 mL, recovery = 64.4%, Fig. 2b) was used instead of the milk proteins mix (with 2 g protein/100 mL, recovery = 79.1%, Fig. 2a). This may occur due to strong competition between proteins, especially considering that non-specific, non-covalent forces are involved in these interactions.

To determine the level of affinity of the milk, cheese and whey proteins to AFM₁, we exposed solutions of α -lactalbumin, casein, β -lactoglobulin, lactoferrin and BSA (each with a concentration ca. 4 mg mL⁻¹) to 0.5 μ g L⁻¹ AFM₁. In accordance with our previous results (Fig. 2a-b), α -lactalbumin [87.7%; (0.082 \pm 0.021) μ g L⁻¹ AFM₁.] and casein [80.6%; (0.129 \pm 0.174) μ g AFM₁ L⁻¹ solution] showed a high affinity towards AFM₁. In decreasing affinity, the remainder of the proteins behaved as follows: β -lactoglobulin [49.7%; (0.348 \pm 0.090) μ g L⁻¹], lactoferrin [47.9%; (0.336 \pm 0.087) μ g L⁻¹] and BSA [7.5%; (0.447 \pm 0.116) μ g L⁻¹].

To assess whether the affinity of AFM₁ is related to a particular subunit of casein, a similar assay was performed for each of the three commercially available casein fractions casein (α_s , κ , β). All casein fractions showed a differential affinity to AFM₁: α_s -casein [100%; <0.014 μ g L⁻¹], β -casein [54.5%; (0.262 \pm 0.068) μ g L⁻¹], κ casein [21.4%; (0.452 \pm 0.118) μ g L⁻¹] and a mixture of subunits α_s , κ , β exhibited a rather low relative affinity [26.9%; (0.420 \pm 0.110) μ g L⁻¹]. These results hint towards an antagonistic effect among fractions and may explain the differential prevalence of AFM₁ in cheese types with different fraction ratios (e.g. Primosale, Robiola, Grana Padano, Ricotta).

Based on the molecular weight of each protein and AFM₁ and each solution concentration, one may obtain an approximation of the number of molecules of

AFM₁ that are associated with each protein (our calculation considers the initial molecules added minus the number of molecules that remain in the supernatant after protein precipitation) = 2.28×10^{12} to 2.69×10^{13} . Moreover, the number of protein molecules in solution at the beginning of the assay = 7.76×10^{17} to 4.54×10^{18} . With both estimates, it is possible to approximate the fraction of AFM₁ molecules that are attached to the proteins. In this regard, only $8.21 \times 10^{-4} \%$ (i.e. $2.47 \times 10^{13} / 3.01 \times 10^{18}$) of the AFM₁ molecules are associated with casein.

Similar results were obtained with the rest of the proteins tested, with values ranging from 6.33×10^{-4} (α -lactalbumin) to 1.15×10^{-3} (BSA). However, this does not consider the expected existing equilibrium among species. We hypothesize that casein, despite having by our own estimates, a very high affinity towards AFM₁, undergoes structural changes due to enzymatic cleavage that occurs during renneting and fermentation (acidification), which greatly decrease its capacity to bind AFM₁. This allows whey proteins and other cheese components (e.g., nonfat milk solids) to freely associate with this toxin.

4.4 Conclusion

We demonstrated that AFM₁ in fresh cheese is retained, in a higher proportion, in whey rather than in cheese and that each dairy protein exhibits a differential in vitro binding towards AFM₁ and may play a distinct role in its detoxification; some whey proteins, even more so than casein, bind more strongly AFM₁. This knowledge may serve as a basis for interventions in the dairy industry aiming to increase the security of cheese and others dairy products. The presence of dairy proteins and processing itself influences the association, retention and affinity of the cheese towards AFM₁ heavily. Based on our discussed behavior of AFM₁ in dairy products and by-products, AFM₁ distribution, fate and interaction with other dairy ingredients should not be disregarded because whey and related products, which were once considered process wastes, are now used in animal feed and as nutritional supplements.

4.5 References

AOAC International. (2016). Official methods of analysis (OMA) of AOAC International (20th ed.). Arlington, VA: AOAC International.

Ayyash, M., Sherkat, F., & Shah, N. (2014). Sodium chloride substitution of cheese. In V. R. Preedy, R. R. Watson, & V. B. Patel (Eds.), *Handbook of cheese in health: Production, nutrition and medical sciences* (1st ed, pp. 545-565).

Bbosa, G. S., Kitya, D., Lubega, A., Ogwal-Okeng, J., Anokbonggo, W. W., & Kyegombe, D. B. (2014). Review of the biological and health effects of aflatoxins on body organs and body systems agricultural and biological sciences. In M. Razzaghi-Abyaneh (Ed.), *Aflatoxins - Recent advances and future prospects* (1st ed, pp. 321-326).

Bianco, G., Russo, R., Marzocco, S., Velotto, S., Autore, G., & Severino, L. (2012). Modulation of macrophage activity by aflatoxins B₁ and B₂ and their metabolites aflatoxins M₁ and M₂. *Toxicon*, 59(6), 644-650.

Bovo, F., Corassin, C. H., Rosim, R. E., & Oliveira, C. A. F. (2013). Efficiency of lactic acid bacteria strains for decontamination of aflatoxin M₁ in phosphate buffer saline solution and in skimmed milk. *Food and Bioprocess Technology*, 6(8), 2230-2234.

Bovo, F., Tuanny, L., Rosim, R. E., Fávaro, C. S., & Oliveira, C. A. F. (2014). The ability of *Lactobacillus rhamnosus* in solution, spray-dried or lyophilized to bind aflatoxin B₁. *Journal of Food Research*, 3(2), 35-42.

Brackett, R. E., & Marth, E. H. (1982). Association of aflatoxin M₁ with casein. *Zeitschrift fur Lebensmittel untersuchung und forschung*, 174(6), 439-441.

Cattaneo, T. M. P., Marinoni, L., Iametti, S., & Monti, L. (2013). Behavior of Aflatoxin M₁ in dairy wastes subjected to different technological treatments: Ricotta cheese production, ultrafiltration and spray-drying. *Food Control*, 32(1), 77-82.

Chavarría, G., Granados-Chinchilla, F., Alfaro-Cascante, M., & Molina, A. (2015). Aflatoxin M₁ presence in milk, cheese and sour cream samples commercially available in Costa Rica using enzyme-assisted extraction and HPLC. *Food Additives and Contaminants: Part B: Surveillance*, 8(2), 128-135.

Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M., & Vernoux, J. P. (2003). Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait*, 83(2003), 269-306.

Corassin, C. H., Bovo, F., Rosim, R. E., & Oliveira, C. A. F. (2013). Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M₁ in UHT skim milk. *Food Control*, 31(1), 80-83.

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.

Deveci, O. (2007). Changes in the concentration of aflatoxin M₁ during manufacture and storage of White Pickled cheese. *Food Control*, 18(9), 1103-1107.

Ellis, W. O., Smith, J. P., Simpson, J. P., & Oldham, J. H. (1991). Aflatoxins in food: Occurrence, biosynthesis, effects on organism's detection and methods of control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30(4), 403-439.

Fernandes, A. M., Correa, B. R., Rosim, E., Kobashigawa, E., & Oliveira, C. A. F. (2012). Distribution and stability of aflatoxin M₁ during processing and storage of Minas Frescal cheese. *Food Control*, 24(1-2), 104-108.

Gellrich, K., Meyer, H. H. D., & Wiedemann, S. (2014). Composition of major proteins in cow milk differing in mean protein concentration during the first 155 days of lactation and the influence of season as well as short-term restricted feeding in early and mid-lactation. *Czech Journal of Animal Science*, 59, 97-106.

Gonçalves, B.L., Rosim, R.E., Gonçalves, J.L., Keliani, B., Oliveira, C.A.F., Corassin, C.H., The ability of different *Saccharomyces*-based products to reduce aflatoxin M₁ in milk produced by dairy cows, *International Conference on Food Chemistry and Technology 2015a*.

Gonçalves, B. L., Rosim, R. E., Oliveira, C. A. F., & Corassin, C. H. (2015). The in vitro ability of different *Saccharomyces cerevisiae*-based products to bind aflatoxin B₁. *Food Control*, 47, 298-300.

Granados, L. & Álvarez, C. J.. Estudio técnico de la denominación de origen del queso Turrialba para su inscripción en el registro de la propiedad industrial costarricense. Available at: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/olq/documents/costarica/ppp/Miercoles/documentacion/EstudioTecnico.pdf> (Last accessed on 12.15).

Haug, A., Høstmark, A. T., & Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition - A review. *Lipids in Health and Disease*, 6(25), 1-16.

Hernández-Mendoza, A., Guzán-de-Peña, D., & García, H. S. (2009). Key role of teichoic acids on aflatoxin B₁ binding by probiotic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 107(2), 395-403.

IARC. (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 82, 1-556.

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

Lafougere, C. (2012). World and EU dairy through 2016. Available at http://ec.europa.eu/agriculture/milk/background/jm-2012-12-12/01-gira_en.pdf. Last Accessed on 12. 15..

Link, A. J., & LaBaer, J. (2011). Trichloroacetic acid (TCA) precipitation of proteins. Cold Spring Harbor Protocol, 993e994. <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot5651>.

López, C., Ramos, L., Ramadán, S., Bulacio, L., & Pérez, J. (2001). Distribution of aflatoxin M₁ in cheese obtained from milk artificially contaminated. *International Journal of Food Microbiology*, 64(1-2), 211-215.

McSweeney, P. L. H. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 127-144.

Modler, H. W. (1985). Functional properties of nonfat dairy ingredients - A review. Modification of products containing casein. *Journal of Dairy Science*, 68(9), 2195-2205.

Mohammadi, H. (2011). A review of aflatoxin M₁, milk, and milk products, aflatoxins - *Biochemistry and molecular biology*. In Ramon G. Guevara-Gonzalez (Ed.). ISBN: 978-953-307-395. Available from www.intechopen.com.

Mohammadi, H., Alizadeh, M., Bari, M. R., & Tajik, H. (2008). Minimization of aflatoxin M₁ content in Iranian white brine cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 61(2), 141-145.

Nadeau, O. W., & Carlson, G. M. (2007). Protein Interactions Captured by Chemical Cross-linking: One-Step Cross-linking with Formaldehyde. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2(4). <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot4634>.

Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., & Piva, G. (2009). On occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47(5), 984-991.

Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2), 129-144.

Zinedine, A., Faid, M., & Benlemlih, M. (2005). In vitro reduction of aflatoxin B₁ by strains of lactic acid bacteria isolated from moroccan sourdough bread. *International Journal of Agricultural & Biology*, 7(1), 1-4.

CAPITULO 5. OBSERVACIONES ADICIONALES

Estudios posteriores a la publicación del presente artículo han corroborado la afinidad de AFM₁ a la α -Lactoalbúmina, reforzando los hallazgos de este trabajo. Jiménez Pérez et al. (2020) probaron que, en efecto, la α -La puede actuar como portador de AFM₁ en el suero durante la elaboración del queso. Mediante el uso de distintos métodos espectroscópicos enlazados con estudios de acoplamiento molecular demostraron que AFM₁ solo tiene un sitio de unión a la α -La cuando se forma el complejo entre las dos moléculas. Se demostró además, que las interacciones hidrofóbicas entre α -La y AFM₁ estaban formadas por aminoácidos no polares, a saber, Ile59, Val99, Trp60 y Tyr103. Los dos últimos pertenecen a la región de caja hidrofóbica reportada previamente por Chrysina et al. (2000). Además, se identificaron tres enlaces de hidrógeno que contribuyen a la estabilización del complejo. También mediante estudios de dicroísmo circular con UV lejano revelaron alteraciones en la estructura secundaria de la α -La cuando se forma el complejo AFM₁- α -Lactoalbúmina. Pudieron observar un incremento en el contenido de estructuras α -hélice de 35-40% y un aumento en hojas β de 16 – 19%. Esto junto al modelado de acople molecular demostró que AFM₁ puede unirse a las regiones hidrofóbicas de α -La.

Con el modelo computacional utilizado en este estudio pudieron predecir el complejo más estable que se podría formar entre AFM₁ - α -Lactoalbúmina. En la **Figura 3** se muestra la estructura terciaria de α -La la cual está compuesta por dos regiones hidrofóbicas: la caja hidrofóbica y el grupo aromático I. Se calculó, para cada región, la posible formación del complejo con la mínima energía libre de unión (ΔG_b) y se escogió la más favorable (Jiménez Pérez et al., 2020).

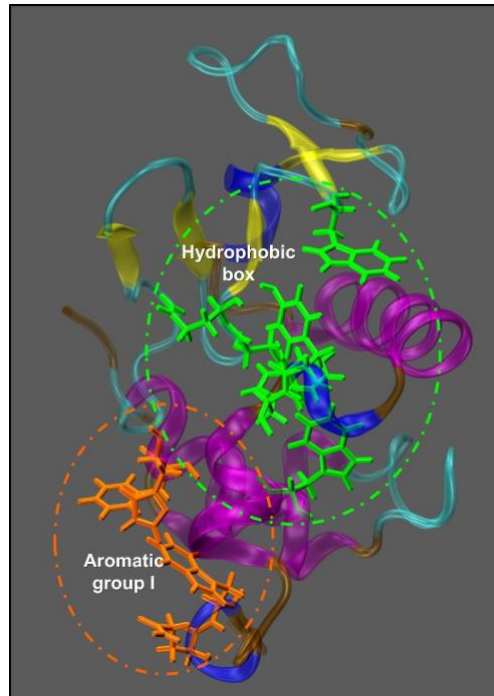


Figura 3. Estructura terciaria de α -La. Estructuras secundarias: α -hélice (magenta); 3_{10} hélice (azul); hoja β (amarilla); giro (cian) y espiral aleatoria (marrón). Regiones Hidrofóbicas: caja hidrofóbica (verde) y grupo aromático I (naranja) (Jiménez Pérez et al., 2020).

En la **Figura 4 A**, se puede observar como las interacciones hidrofóbicas entre la AFM_1 - α -Lactoalbúmina involucran los aminoácidos no polares Ile59, Val99, Trp60 y Tyr103. También se señalan los enlaces con tres hidrógenos formados dos de ellos con Asn56 y Glu49. También se puede observar en la **Figura 4B** que la caja hidrofóbica consiste de estructuras α -hélice y hojas β que según los resultados del estudio de dicroísmo circular incrementaron su ordenamiento estructural, sugiriendo ser el sitio de unión de AFM_1 (Jiménez Pérez et al., 2020).

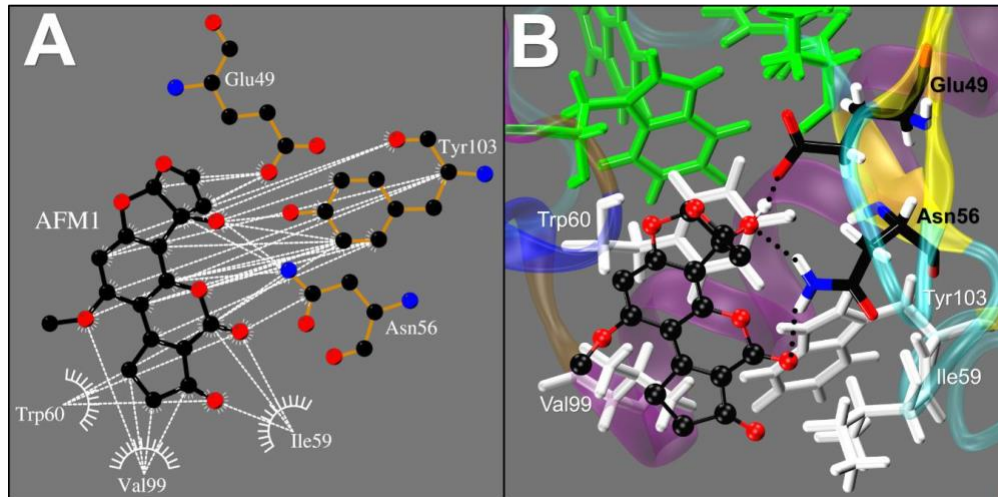


Figura 4. Representación gráfica de las interacciones del AFM₁ con el α -La en la región de la caja hidrofóbica. (A) Diagrama de interacciones hidrofóbicas (líneas blancas punteadas) de AFM₁ con los aminoácidos de la caja hidrofóbica. (B) Presentación imagen estéreo de los enlaces de hidrógeno (líneas punteadas negras) formadas con AFM₁ y los aminoácidos de la caja hidrofóbica (Jiménez Pérez et al., 2020).

Otros trabajos recientes sobre la interacción de AFM₁ con proteínas de la leche llegan a conclusiones que apoyan los resultados de este trabajo. Mediante el uso de espectroscopia “Attenuated total reflectance- Fourier transform infrared” (ATR-FTIR) acoplado a quimiometría, Harshitha et al. (2022) confirmaron la afinidad de AFM₁ hacia las proteínas de la leche a través de interacciones hidrofóbicas en enlaces C=O presentes en las proteínas. Los resultados sugieren que la ventana espectral de 1700-1600 cm⁻¹ provee indicaciones de cambios conformacionales de la estructura secundaria de las proteínas de la leche causados por AFM₁. La afinidad a la caseína puede ser atribuida a su estructura porosa. La leche contiene muchos componentes, cada uno de estos exhiben grupos funcionales y estructuras secundarias que componen un perfil absorción espectroscópico (ATR-FTIR) (Harshitha et al., 2022). La derivatización de segundo orden de los espectros FTIR ha demostrado que resuelve características distintivas del espectro infrarrojo sin rasgos aparentes en picos claros que pueden ser asociados con α hélice, hojas β

y giros. Lo cual es útil para analizar potenciales cambios en la estructura secundaria de las proteínas de la leche debido a los tratamientos durante los procesos (Harshitha et al., 2022).

Finalmente, Einolghozati et al. (2021) realizaron un estudio similar donde se investigó el comportamiento de distribución de AFM₁ durante la producción de queso fresco y su almacenaje. Ellos obtuvieron una recuperación de la AFM₁ en suero de 70.72% respecto a la concentración inicial de AFM₁ en leche muy similar al del presente estudio que fue de AFM₁=70.4–73.1% (Einolghozati et al., 2021).

CAPITULO 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones generales

De acuerdo a la tecnología de fabricación de queso utilizada en esta investigación se obtuvo una recuperación de AFM₁ en queso fresco de 27-29% y en suero de 70.4-73.1%. A raíz de los resultados, se debe prestar atención a la calidad de la leche con que se preparan los quesos de forma que el producto final no exceda los límites de AFM₁ ≤ 0.5 µg Kg⁻¹ establecidos en la legislación costarricense. También, es indispensable extender la vigilancia de AFM₁ en productos elaborados a partir de suero, sean de fabricación nacional o importados, asegurándose que cumplan con los niveles máximos de residuos permitidos tanto para su uso en animales como para consumo humano.

De la evaluación de la interacción entre proteínas de la leche con AFM₁ las que mostraron mayor afinidad fueron α-La (87.7%) y caseína (80.6%) y las que exhibieron menor afinidad β-Lg (49.7%), LFB (47.9%), ASB (7.5%). Los datos obtenidos sirvieron para orientar investigaciones recientes, como se mencionó previamente, sobre la interacción de AFM₁ con α-La y demás proteínas. Teniendo en consideración que la mayor afinidad de AFM₁ es con α-La y caseína se puede orientar una vigilancia, de límites máximos permitidos, dirigida hacia productos de consumo humano o de animales cuya base principal sean estas dos proteínas.

Durante el almacenamiento del queso fresco los recuentos de BAL aumentaron y correlacionó con una disminución de la concentración de AFM₁. Esto coincide con los hallazgos de trabajos previos donde se ha observado un efecto de detoxificación de AFM₁ por parte de las BAL. En este caso se evidencia la utilidad de *S. thermophilus* como cultivo protector contra microorganismos de deterioro y a su vez como descontaminante de AFM₁. No obstante su eficacia depende del nivel de contaminación del producto y de la capacidad de la cepa en establecer las uniones con la toxina.

6.2 Recomendaciones generales

Algunos autores han demostrado que la capacidad de unión de la pared bacteriana a la AFM₁ se mantiene a pesar de tratamientos térmicos como la pasteurización. Es decir, que bacterias no viables o fragmentos derivados secuestran la toxina. Esto puede posibilitar nuevas investigaciones para probar si agregados de microorganismos no viables y seguros, como el mismo *S. thermophilus*, integrados durante el proceso de la elaboración del queso, pueden contribuir a capturar la toxina en el producto durante su vida en anaquel y que no se vean afectadas las características sensoriales o reológicas del producto por efecto del crecimiento bacteriano.

Aún queda mucho por delante para alcanzar la comprensión sobre las interacciones de las proteínas de la leche con AFM₁. Nuevos estudios deben ser realizados para dar respuesta a todas las interrogantes que surgen sobre este tema.

CAPITULO 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abadura, S.Z; Jilo, S.A; Abdurahman, M; & PNair, S.K. (2022). Review on public health effects of aflatoxins in milk and milk-based foodstuffs of dairy cow. *Journal of Veterinary Healthcare*. 2(4):42-53. <https://doi.org/10.14302/issn.2575-1212.jvhc-22-4105>
- Arab, M; Sohrabvandi, S; Mortazavian, A.M; Mohammadi, R; & Rezaei Tavirani, M. (2012). Reduction of aflatoxin in fermented milks during production and storage. Review article. *Toxin Reviews*, 31(3-4): 44–53. <https://doi.org/10.3109/15569543.2012.738350>
- Assaf, J.C; Nahle, S; Chokr, A; Louka, N; Atoui, A; & El Khury, A. (2019). Assorted methods for decontamination of aflatoxin m1 in milk using microbial adsorbents. *Toxins*, 11 (6), 304. <https://doi.org/10.3390/toxins11060304>
- Bbosa, G.S; Kitya, D; Lubega, A; Ogwal-Okeng, J; Anokbonggo, W.W; & Kyegombe, D.B. (2013). Chapter 12. Review of the biological and health effects of aflatoxins on body organs and body systems. <https://doi.org/10.5772/51201>
- Boland, M; & Singh, H. (2020). Milk proteins from expression to food. Third edition. Academic Press. Elsevier. ISBN 978-0-12-815251-5. <https://www.elsevier.com/books/milk-proteins/boland/978-0-12-815251-5>
- Bosco, F; & Mollea, C. (2012). Mycotoxins in food. In (Ed.) Food industrial processes - methods and equipment. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/33061>

- Brackett, R. E., & Marth, E. H. (1982). Association of aflatoxin M₁ with casein. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174:439–441. <https://doi.org/10.1007/BF01042721>
- Britzi, M; Friedman, S; Miron, J; Solomon, R; Cuneah, O; Shimshoni, J.A; Soback, S; Ashkenazi, R; Armer, S; & Shlosberg, A. (2013). Carry-over of aflatoxin B₁ to aflatoxin M₁ in high yielding israeli cows in mid- and late-lactation. *Toxins* 5(1): 173-183. <https://doi.org/10.3390/toxins5010173>
- Cámara de Productores de leche Costa Rica. (2013). Congreso nacional lechero. Situación actual y perspectivas del sector lácteo costarricense. <http://proleche.com/recursos/documentos/congreso2013/Situacion actual y perspectivas del sector lacteo a nivel nacional Vision de la Camara Lic Jorge Manuel Gonzalez Echeverria Costa Rica.pdf>
- Cámara de Productores de leche Costa Rica. (2022). Consumo per cápita de productos lácteos en costa rica. <http://proleche.com/consumo-de-productos-lacteos/>
- Campagnollo, F.B; Ganev, K.C; Khaneghah, A.M; Portela, J.B; Cruz, A. G; Granato, D; Corassin, C.H; Oliveira, C.A.F; & Sant'Ana, A. S. (2016). The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of Aflatoxin M₁: A review. *Food Control*, 68: 310–329. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.007>
- Cattaneo, T.M; Monti, L; Panarelli, E.V; Francolino, S; Bertuzzi, P; & Pietri, A. (2008). Fate of aflatoxin M₁ during production and storage of Crescenza cheese.

<http://www.chiriottieditori.it/images/stories/IJFS%20archivio/IJFS204.pdf#page=20>

Cattaneo, T.M; Marinoni, L; Iametti, S; & Monti, L. (2013). Behavior of aflatoxin M₁ in dairy wastes subjected to different technological treatments: Ricotta cheese production, ultrafiltration and spray-drying. *Food Control* 32(1): 77-82. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.007>

Cerdas Ramírez, R. (2014). Formulación de raciones para carne y leche. Desarrollo de un módulo práctico para técnicos y estudiantes de ganadería de Guanacaste, Costa Rica. *InterSedes.* 14(29). <https://doi.org/10.15517/isucr.v14i29.13504>

Chavarría, G; Granados-Chinchilla, F; Alfaro-Cascante, M; & Molina, A. (2015). Detection of aflatoxin M₁ in milk, cheese and sour cream samples from Costa Rica using enzyme-assisted extraction and HPLC. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 8(2): 128–135. <https://doi.org/10.1080/19393210.2015.1015176>

Chrysina, E. D; Brew, K; & Acharya, K.R. (2000). Crystal structures of Apo- and holo-bovine α -lactalbumin at 2.2-Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions, *J. Biol. Chem.* 275(47):37021–37029. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004752200>.

Codex Alimentarius. (1995). *Norma general para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos. nivel máximo (NM) AFM₁ en leche o productos derivados* https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B193-1995%252FCXS_193s.pdf

Coppock, R.W; & Jacobsen, B.J. (2009). Mycotoxins in animal and human patients: Review. *Toxicology and Industrial Health*. 25(9-10):637-655. <https://doi.org/10.1177/0748233709348263>

Creppy, E.E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*. 127(1-3):19-28. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(01\)00479-9](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(01)00479-9)

Delboni, L.A; & Barroso da Silva, F.L (2016). On the complexation of whey proteins. *Food Hydrocolloids*, 55: 89–99 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.11.010>

Einolghozati, M; Heshmati, A; & Mehri, F. (2021). The behavior of aflatoxin M₁ during lactic cheese production and storage. *Toxin Reviews*, 41(4):1163-1171. <https://doi.org/10.1080/15569543.2021.1979044>

Elsanhoty, R.M; Salam, S.A; Ramadan, M.F; & Badr, F.H. (2014). Detoxification of aflatoxin M₁ in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. *Food Control* 43:129-134. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.002>

EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain): Schrenk, D; Bignami, M; Bodin, L; Chipman, JK; Del Mazo, J; Grasl-Kraupp, B; Hogstrand,

- C; Hoogenboom, L.R; Leblanc, J.C; Nebbia, C.S; Nielsen, E; Ntzani, E; Petersen, A; Sand, S; Schwerdtle, T; Vleminckx, C; Marko, D; Oswald, IP; Piersma, A; Routledge, M; Schlatter, J; Baert, K; Gergelova, P; & Wallace, H. (2020). Scientific opinion – Risk assessment of aflatoxins in food. *EFSA Journal*, 18(3):6040. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6040>
- FAO. (2021). *World food and agriculture – Statistical Yearbook 2021*. Rome. <https://doi.org/10.4060/cb4477en>
- FAO. (2021). *Dairy Market Review: Emerging trends and outlook*, December 2021. Rome. <https://www.fao.org/3/cb7982en/cb7982en.pdf>
- Fashandi, H.M; Abbasi, R; & Khaneghah, A.M. (2018). The detoxification of aflatoxin M₁ by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.*: A review. *J Food Process Preserv*, 42(9):13704. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13704>
- Fenelon, M. A; Hickey, R.M; Buggy, A; McCarthy, N; & Murphy, E.G. (2019). Chapter 12: Whey proteins in infant formula. In Hilton, C.D; & Bansal, N. (Eds.), *Whey Proteins from Milk to Medicine* (p.p 439-494). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00013-8>
- Flower, D.R. (1996). The lipocalin protein family: Structure and function. *Biochem J*. 318 (1):1-14. <https://doi.org/10.1042/bj3180001>.
- Fox, P. F; Guinee, T. P; Cogan, T. M; & McSweeney, P.L.H. (2017). Chapter 12: Biochemistry of cheese ripening. In: *Fundamentals of cheese science*. (p.p 391–442). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_12

Fox, P.F; Uniacke-Lowe, T; McSweeney, P.L.H; & O'Mahony, J.A. (2015). Dairy chemistry and biochemistry. Second edition. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2>

Gellrich, K; Meyer, H.H.D; & Wiedemann, S. (2014). Composition of major proteins in cow milk differing in mean protein concentration during the first 155 days of lactation and the influence of season as well as short-term restricted feeding in early and mid-lactation. *Czech Journal of Animal Science* 59(3):97-106 <https://doi.org/10.17221/7289-CJAS>

Giolo, M; De Oliveira, C; Bertolini, D; Campana, M; Sampaio, M; Pontes, D; Nixdorf, S; & Machinski, M. (2012). Aflatoxin M₁ in the urine of non-carriers and chronic carriers of hepatitis B virus in Maringa, Brazil. *Brazilian journal of pharmaceutical sciences*, 48 (3):447–452. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502012000300011>

Goulding, D.A; Fox, P.F; & O'Mahony, J.A. (2020). Chapter 2: Milk proteins: An overview. In: Milk proteins from expression to food. Third edition. (p.p 21–98). Academic Press, Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815251-5.00002-5>

Govaris, A; Roussi, V; Koidis, P.A; & Botsoglou, N.A. (2002). Distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yoghurt. *Food Addit Contam*, 19(11):1043–1050. <https://doi.org/10.1080/0265203021000007831>

Harshitha, C.G; Sharma, N; Singh, R; Sharma, R; Ghandi, K; & Mann, B. (2022). Interaction study of aflatoxin M₁ with milk proteins using ATR-FTIR. *J Food Sci Technol*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05587-x>

Hutkins, R; & Goh, Y.J. (2014) *Streptococcus thermophilus*. In: Streptococcus. Encyclopedia of food microbiology, 3:554-559. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00325-6>

Iha, M.H; Baltazar, C; Akemi, I; & Trucksess, M. W. (2013). Aflatoxin M₁ in milk and distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yoghurt and cheese. *Food Control* 29(1): 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.058>

Indyk, H.E; Wood, J.E; & Gill, B.D. (2021). Aflatoxin M₁ binding to bovine α- and κ-caseins demonstrated by surface plasmon resonance. *International Dairy Journal*, 121:105119 <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105119>.

Jiménez Pérez, C; Tello Solís, S.R; Gómez Castro, C.Z; Alatorre Santamaría, S; Gómez Ruiz, L; Rodríguez Serrano, G; Cruz Borbolla, J; García Garibay, M; & Cruz Guerrero, A. (2020). Spectroscopic studies and molecular modelling of the aflatoxin M₁- bovine α-lactalbumin complex formation, *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 209:111957 <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111957>

Kamkar, A; Fallah, A. A; & Mozaffari Nejad, A. S. (2014). The review of aflatoxin M₁ contamination in milk and dairy products produced in Iran. *Toxin Reviews*, 33(4): 160–168. <https://doi.org/10.3109/15569543.2014.922580>

Khaneghah, A. M; Moosavi, M; Omar, S.S; Oliveira, C.A.F; Karimi Dehkordi, M; Fakhri, Y; Huseyn, E; Nematollahi, A; Farahani, M; & Sant'Ana, A.S. (2021). The

- prevalence and concentration of aflatoxin M₁ among different types of cheeses: A global systematic review, meta-analysis, and meta-regression, *Food Control*, 125:107960. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107960>.
- López, C; Ramos, L; Ramadan, S; Bulacio, L; & Pérez, J. (2001). Distribution of aflatoxin M₁ in cheese obtained from milk artificially contaminated. *Int. J. Food Microbiol.* 64(1-2):211–215. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00444-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00444-X)
- Mohajeri, F.A; Ghalebi, S. R; Rezaeian, M; Gheisari, H. R; Azad, H. K; Zolfaghari, A; & Fallah, A.A. (2013). Aflatoxin M₁ contamination in white and Lighvan cheese marketed in Rafsanjan, Iran. *Food Control*, 33(2): 525–527. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.002>
- Mohammadi, H. (2011). Chapter 19: A Review of aflatoxin M₁, milk, and milk products. In: Aflatoxins. Biochemistry and molecular biology, Dr. Ramon G. Guevara-Gonzalez (Ed.), ISBN: 978-953-307-395-8, IntechOpen. http://cdn.intechopen.com/pdfs/20400/InTechA_review_of_aflatoxin_m1_milk_and_milk_products.pdf
- Mollayusefian, I; Ranaei, V; Pilevar, Z; Cabral Pinto, M; Rostami, A; Nematolahi, A; Khedher, K; Thai, V; Fakhri, Y; & Khaneghah, A.M. (2021). The concentration of aflatoxin M₁ in raw and pasteurized milk: A worldwide systematic review and meta-analysis, *Trends in Food Science & Technology*, 115:22-30. ISSN 0924-2244. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.033>.

- Monter Arciniega, A; Cruz Cansino, N; Ramírez Moreno, E; Zafra Rojas, Q; Cervantes Elizarrarás, A; & Ariza Ortega, J. (2022). Pathologies associated to the consumption of aflatoxin M₁ in dairy products. *Mexican Journal of Medical Research ICOSA*. 10(20):7-15. <https://doi.org/10.29057/mjmr.v10i20.8510>
- Moradi, L; Paimard, G; Sadeghi, E; Rouhi, M; Mohammadi, R; Noroozi, R; & Safajoo, S. (2021). Fate of aflatoxins M₁ and B₁ within the period of production and storage of Tarkhineh: A traditional Persian fermented food. *Food Sci Nutr*. 10(3):945–952. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2728>
- Muaz, K; Riaz, M; Fernandes de Oliveira, C.A; Akhtar, S; Ali, S.W; Nadeem, H; Park, S; & Balasubramanian, B. (2021): Aflatoxin M₁ in milk and dairy products: global occurrence and potential decontamination strategies, *Toxin Reviews*, 41(2):588-605. <https://doi.org/10.1080/15569543.2021.1873387>
- Nasrollahzadeh, A; Mokhtari, S; Khomeiri, M; & Saris, P. (2022). Mycotoxin detoxification of food by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Contamination*. 9:1. <https://doi.org/10.1186/s40550-021-00087-w>
- Nguyen, T; Flint, S; & Palmer, J. (2019). Control of aflatoxin M₁ in milk by novel methods: A review. *Food Chemistry*, 311:125984 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125984>
- OECD/FAO. (2021). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2021-2030*, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/19428846-en>

Oruc, H.H; Cibik, R; Yilmaz, E; & Kalkanli, O. (2006). Distribution and stability of Aflatoxin M₁ during processing and ripening of traditional white pickled cheese. *Food Additives and Contaminants*. 23(2):190-195. <https://doi.org/10.1080/02652030500389048>.

Ostry, V; Malir, F; Toman, J; & Grosse, Y. (2016) Mycotoxins as human carcinogens-the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Research*, 33:65-73 <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0265-7>

Öztürkoğlu Budak, Ş. & Akal, H. C. (Eds.). (2018). Microbial cultures and enzymes in dairy technology. IGI Global. <https://doi.org/10.4018/978-1-5225-5363-2>

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(5): 984–991. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.10.005>.

PROCOMER. (2021). Anuario Estadístico 2021. <https://www.procomer.com/exportador/documentos/anuario-estadistico-2020/>
Recuperado 26-09-2022.

RTCA 67.04.75:17 Productos Lácteos. Quesos Madurados. Especificaciones" Poder Ejecutivo Costa Rica. Decreto Ejecutivo: 41787 del 28/01/2019. Publica resolución N° 406-2018 (COMIECO-LXXXV) del 07/12/2018 y su Anexo "Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.75:17 Productos Lácteos. Quesos Madurados. Especificaciones" Fecha de vigencia 07-06-2019. http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_complet

o.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=89129&nValor3=116838¶m2=1&strTipM=TC&IResultado=1&strSim=simp

Sarimehmetoglu, B; & Kuplulu, O. (2004). Binding ability of aflatoxin M₁ to yoghurt bacteria. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 51:195–198.
<https://dspace.ankara.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12575/59094/1752.pdf?sequence=1>

Sarmast, E; Fallah, A.A; Jafari, T; Khaneghah, A.M. (2021). Impacts of unit operation of cheese manufacturing on the aflatoxin M₁ level: A global systematic review and meta-analysis. *LWT-Food Science and Technology* 148:111772.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111772>

Scaglioni, P.T; Becker Algeri, T; Drunkler, D; & Badiale Furlong, E. (2014). Aflatoxin B₁ and M₁ in milk. *Analytica Chimica Acta*, 829:68-74.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.04.036>

Shabeer, S; Asad, S; Jamal, A; & Ali, A. (2022). Aflatoxin contamination, its impact and management strategies: an updated review. *Toxins*, 14(5):307.
<https://doi.org/10.3390/toxins14050307>

Shephard, G.S. (2009). Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century: Review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395:1215–1224
<https://doi.org/10.1007/s00216-009-2857-y>

Stavrinos, V; Wolinsky, I; Zampelas, A; Mantis, A.J; & Matalas, A.L. (2001). Chapter 6: Milk and dairy products. in: the mediterranean diet: constituents and health promotion, p 127-156. <https://doi.org/10.1201/9781420042221>

Villalobos García, E. (2017) Tesis “Aplicación de un plan de mejora que potencie el proceso productivo de la microempresa “Rancho Avellanas” a través de un diagnóstico de Buenas Prácticas de Manufactura, mejora de una línea de producción, análisis sensorial del producto terminado y capacitación a sus colaboradores”<http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/4348/1/41866.pdf>

Walstra, P; Wouters, J.T.M; & Geurts, T.J. (2006). Chapter 1: Milk, main characteristics. dairy science and technology. Taylor & Francis. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420028010>

Willett, W.C; & Ludwig, D.S. (2020). Milk and health: Review. *N Engl J Med* 382(7):644-654. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1903547>

Wolz, M; Mersch, E; & Kulozik, U. (2016). Thermal aggregation of whey proteins under shear stress. *Food Hydrocolloids*, 56:396-404. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.12.036>

Wu, T., Jiang, Q., Wu, D., Hu, Y., Chen, S., Ding, T., Ye, X., Liu, D & Chen, J. (2019). What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review, *Food Chemistry* 274: 698-709. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.017>

Yousef, A.E; & Marth, E.H. (1989). Stability and degradation of aflatoxin M₁.
Mycotoxins in dairy products. p.p127-161.

<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19920452071>

Zain, M.E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2): 129–144. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>

Zhang, J; Zheng, N; Liu, J; Li, F.D; Li, S.L; & Wang, J.Q. (2015). Aflatoxin B₁ and aflatoxin M₁ induced cytotoxicity and DNA damage in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 83:54-60.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.05.020>

RECOMENDACIONES PARA ELABORACIÓN DE QUESO FRESO-TURRIALBA

Ingrediente	Cantidad para 40 litros producto	Cantidad para 100 litros producto
Leche 2,0-2,7% grasa	40	100
Calcio polvo	10 gramos (1 copita)	20 gramos (1 copita)
Cultivo STM7 ó ST114	50 U para 15 000 litros	
Cuajo Chymax	2,5 ml	6 ml
3 muñecas	3,5 ml	9 ml

PROCEDIMIENTO:

- 1. Estandarización:** Se puede trabajar con leche entera o bien descremar a un 2-3% de grasa. Entre mayor cantidad de grasa más suave será la textura del queso.
- 2. Pasteurización:** Llevar la leche a 65°C y mantenerla a esa temperatura por 30 minutos.

Los tiempos y las temperaturas se deben aplicar estrictamente:

- A temperaturas mayores puede darse una desestabilización de la proteína ocasionando dificultad para cuajar y pérdida de rendimiento.
- Si las temperaturas y tiempos son menores no se asegura la reducción adecuada de la carga microbiana.

- 3. Enfriamiento:** Enfriar la leche a 34 ó 35°C lo más rápido posible.
- 4. Adición de calcio:** El calcio se debe disolver previamente en agua en un envase de plástico o vidrio resistente al calor, no usar acero inoxidable, aluminio ni otro recipiente de metal.

5. **Adición cultivo láctico.** El cultivo se puede adicionar directamente o bien tomar una porción pequeña de leche para disolverlo, agitar por 10 minutos para asegurar la distribución del cultivo.

- El peso del sobre puede variar dependiendo del lote, porque se empaca según la actividad del cultivo por lote. Se recomienda desinfectar el sobre y los utensilios para abrirlo con alcohol.
- Se puede dividir el cultivo en varias bolsitas para facilitar su uso.
- Preservar en congelación.

6. **Premaduración:** Después de adicionar el cultivo se debe agitar por 2 minutos, dejar reposar la leche por 30 minutos para que las bacterias se multipliquen.

7. **Adición del cuajo:** Después de pasada la media hora se adiciona el cuajo. Se debe disolver en un 25 ml de agua. Se agita por 2 minutos para asegurar la dispersión del cuajo por toda la leche.

- No utilizar agua caliente porque puede dañar la enzima.
- Preservar en refrigeración.
- No devolver a la botella porciones de cuajo que se haya sacado anteriormente para evitar contaminar el producto.

8. **Reposo de cuajo:** Una vez adicionado el cuajo se debe esperar el punto ideal de coagulación para cortar, por lo general es de 30 minutos.

9. **Corte de la cuajada:** Cortar la cuajada en cubos de 1,3-1,7 cm, luego se deja reposar por 5 minutos, para que el suero se libere lentamente de la cuajada. Posteriormente se agita suavemente por 15 minutos.

- Preferiblemente utilizar la lira para evitar un maltrato excesivo de la cuajada y obtener cubos con tamaños similares que permita una estructura homogénea del queso.
- El batido de la cuajada no debe ser muy fuerte ni rápido para evitar pérdidas en el rendimiento.
- La coloración del suero debe ser amarillo-verdoso, sueros de coloraciones blancas es un indicativo de disminución de rendimiento por pérdida de grasa y proteína.

10. Desuerado: Desuerar a nivel de cuajada.

11. Salado: La cantidad de sal se calcula sobre la cantidad de leche inicial, se recomienda utilizar 1,5-1,8 kilogramos por cada 100 litros de leche. Se mezcla la sal con el suero a nivel de cuajada.

12. Moldeo: Colocar la cuajada en los moldes.

13. Volteo: Voltrear el molde una vez para formar el queso en bloque.

14. Prensado: Es una operación opcional, pero se puede prensar de 0,1 a 0,2 kg/cm² de 20 a 30 minutos.

15. Enfriamiento: Colocar el queso en un cuarto frío.

16. Empaque: Se debe empacar al siguiente día.

AflaStar™ M1 R - Immunoaffinity Columns

Item No. COIAC1005

For the purification of Aflatoxin M1 in conjunction with HPLC

PRODUCT DESCRIPTION

AflaStar™ M1 R - Immunoaffinity Columns are designed for rapid and simple purification of Aflatoxin M1 from milk and dairy products. AflaStar™ M1 R - Immunoaffinity Columns are reliable, user friendly, and robust. AflaStar™ M1 R - Immunoaffinity Columns contain monoclonal antibodies against Aflatoxin M1, which are covalently bound to gel-particles. Aflatoxins are metabolic products of the mold species *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Aflatoxins are highly toxic and carcinogenic.

INTENDED USE

AflaStar™ M1 R - Immunoaffinity Columns are suitable for use in a wide range of commodities including milk and dairy products.

Milk can be directly applied to the column while a representative sample of a milk product (e.g. cheese) must be taken and extracted. See detailed procedures in the next section. The AflaStar™ M1 R - Immunoaffinity Columns retains the Aflatoxin M1 present in the sample and separates it from the other substances of the extract. After a short rinsing phase isolated Aflatoxin M1 can be eluted using methanol. This eluate is suited for determining the concentration of Aflatoxins M1 directly with the HPLC.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. Mycotoxins are highly toxic substances! Please take care and use protective measures!
2. Please decontaminate any equipment used with 4% solution of sodium hypochlorite.
3. Each AflaStar™ M1 R - Immunoaffinity Column contains thimerosal.
4. Do not use the AflaStar™ M1 R - Immunoaffinity Column after the expiration date indicated on the label.
5. AflaStar™ M1 R - Immunoaffinity Columns are designed for single use only.

ADDITIONAL EQUIPMENT AVAILABLE BUT NOT PROVIDED

- Adapter (Item No. COIAC9001)
- Syringe barrel as a supply reservoir, i.e. 50 mL (Item No. COIAC9002)
- Luer Lock valve (Item No. COIAC9003)
- Romer EVAP™ System (Item No. EQOEV1031, 220 Volt, or EQOEV1040, 110 Volt)

RECOMMENDED SOLVENTS, BUFFERS and MATERIALS

Methanol, HPLC-grade Extraction solvent for solid samples; 80/20 (V/V) methanol water, celite

All solvents and buffers should be at room temperature (+22-28°C). We recommend the use of Biopure Aflatoxin M1 standard.

PROCEDURE

1) SAMPLE APPLICATION

The AflaStar™ M1 R - Immunoaffinity Column is put on an adapter. The column and the extract must be at room temperature.

The column does not require rinsing before application of the milk or diluted extract. The AflaStar™ M1 R - Immunoaffinity Column usually drips independently. The adapter with the syringe barrel is attached. The milk or diluted extract is applied until all has passed over the column.

2) EXTRACTION

2a) Milk/Milk powder:

Apply 50 mL of warm milk (30-35°C) or powdered milk solution to the column via a filter (e.g. Whatman No. 4 filter). Allow the whole liquid to pass through the column by gravity with a flow rate of approx. 1-3 mL/min. Before the column runs dry the column is washed.

2b) Solid Samples (e.g. cheese):

Weigh out 25 g of sample into a 250 mL Erlenmeyer flask or a half-pint blender jar. If the sample is butter: In a blender jar, melt 25 g of sample and add 15 g of celite. Add 100 mL of 80/20 (V/V) methanol/water and stopper flask or seal jar. Shake for 1 hour on gyratory shaker or blend on high speed for 2 minutes. Note: make sure to blend sugary or oily samples such as chocolate or cheese.

Using a small funnel, filter extract into a sample jar through a glass microfiber filter. Take 10 mL of this extract, add 40 mL deionized water and apply onto the AflaStar™ M1 R column. Allow the whole liquid to pass through the column by gravity with a flow rate of approx. 1-3 mL/min. Before the column runs dry the column is washed.

3) RINSE

After the diluted extract has completely passed through, the column must be rinsed. The AflaStar™ M1 R - Immunoaffinity Column should be rinsed with 2 x 10 mL of distilled or deionized water. The first portion of the rinse solution should be used to rinse the container. The second portion of the rinse solution should be applied directly to the AflaStar™ M1 R - Immunoaffinity Column.

Any remaining liquid should be removed from the column by applying slight pressure on top of the column or by applying vacuum to the bottom. Take care that the column does not dry completely.

4) ELUTION

The syringe barrel will be removed from the AflaStar™ M1 R - Immunoaffinity Column and a suitable vial placed under the column for the collection of the eluent. For the elution of bound Aflatoxins use only HPLC grade methanol. Elute with 1.5 - 3 mL methanol (i.e. 3 x 0.5 mL). The methanol should be left on the column for a few seconds before starting elution to allow intensive contact with the gel.

After the last portion is applied, any remaining liquid should be removed from the column by applying slight pressure on top of the column or by applying vacuum in the bottom. This eluent can be directly analyzed by HPLC. In case of low-level contamination, the eluent can be dried down (for example with the Romer Evap™-System) and the residue can be dissolved in a small portion of mobile phase. (Take care that the analyte does not stick to the glass surface by using silanized tubes).

BIBLIOGRAPHIE

- 1 CAST (Council for Agricultural Science and Technology) -report; Mycotoxins Risks in Plant, Animal, and Human Systems, Jan. 2003
- 2 Tauchtmann, F., et al; Alimenta 11, 85 (1972); protective measures

AflaStar™ M1 R - Immunoaffinity Column

FACT SHEET 06/2010

Product-Code:	COIAC1005	COICT1005
Packaging unit:	25 Immunoaffinity Columns	10 Immunoaffinity Columns
Gel Bed Volume:	0.25 ml	0.25 ml
Specification:	Monoclonal antibodies against Aflatoxin M1	Monoclonal antibodies against Aflatoxin M1
Flow Rate:	1-3 ml/min	1-3 ml/min
Storage:	2- 8°C, do not freeze	2- 8°C, do not freeze

Romer Labs, Inc. - America
1301 Stylemaster Drive, Union, MO 63084-1156 USA, www.romerlabs.com

Cite as: Cold Spring Harb. Protoc.; 2007; doi:10.1101/pdb.prot4634



Protein Interactions Captured by Chemical Cross-linking: One-Step Cross-linking with Formaldehyde

Owen W. Nadeau and Gerald M. Carlson

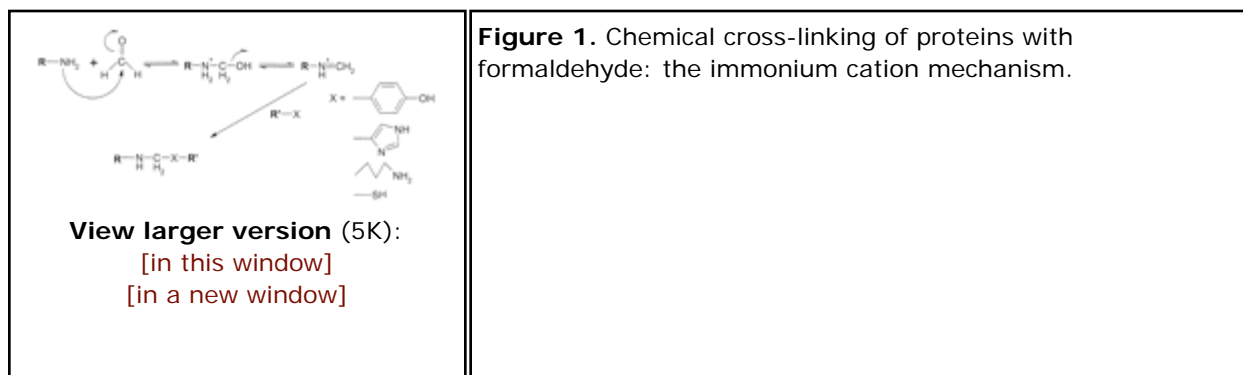
This protocol was adapted from "Protein Interactions Captured by Chemical Cross-linking," Chapter 7, in *Protein-Protein Interactions* (eds. Golemis and Adams). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2005.

INTRODUCTION

This protocol describes a method for chemical cross-linking of proteins using formaldehyde. With the exception of zero-length cross-linkers, formaldehyde has the shortest cross-linking span (~2-3 Å) of any cross-linking reagent, thus making it an ideal tool for detecting specific protein-protein interactions with great confidence. Despite its simple chemical structure (CH₂O), formaldehyde's single carbonyl group functions essentially as a homobifunctional reagent and is capable of conjugating targets through two different chemical pathways. In Mannich-type reactions, which typically require elevated temperatures (37°C or above) for a period of 2-24 hours for acceptable yields, formaldehyde condenses with amines (1°, 2°, or salts of ammonia) and compounds with active hydrogens to form stable cross-links. Formaldehyde also reacts with amines to form highly reactive immonium cations that are reactive toward protein-containing nucleophiles, including sulfhydryls, amines, phenols, and imidazoles. The latter reaction is more rapid than the former and is generally the more predominant in typical protein cross-linking reactions at ambient temperatures.


RELATED INFORMATION

The reaction mechanism showing chemical cross-linking of proteins with formaldehyde via an immonium cation is shown in [Figure 1](#).



MATERIALS

Reagents

 EDTA (200 mM, pH 7.0)

HEPES (200 mM, pH 8.2)

Alternatively, use another non-nucleophile buffer containing either sucrose or NaCl (see Step 3).

 Paraformaldehyde (Sigma)

  SDS buffer

Target proteins

Equipment

Heating block, preset to 100°C (Fisher Scientific)

Test tubes, screw cap (Kontes)

METHOD

Preparation of Formaldehyde

1. Prepare a 500 mM solution of formaldehyde by adding 75 mg of paraformaldehyde to 5 ml of H₂O in a screw-cap test tube.

Formaldehyde polymerizes at high concentrations; however, in dilute solutions (millimolar range), the reagent exists as a monomer. To prevent polymerization, commercial preparations (formalin solutions) often include methanol or other additives that can adversely affect protein-protein interactions.

2. Seal the tube and incubate for 24 hours at 100°C in a heating block. Store the solution at 4°C. *The solution is generally stable for several months.*

Time-Dependent Cross-linking

3. Dilute proteins (0.5-3 mg/ml) in a reaction mix that contains HEPES (50 mM, pH 8.2) [or another non-nucleophile buffer containing either sucrose (5%) or NaCl (50 mM)] to stabilize the protein reactants, and EDTA (0.1 mM) to prevent metal-induced effects on cross-linking.

The total volume should be at least 120 µl to cover an adequate range of time points (see Step 5).

4. Initiate cross-linking by adding formaldehyde in a 100:1 molar excess over potential protein nucleophiles. (If the identity and number of nucleophiles are not known, initiate with a final concentration of 25 mM formaldehyde in the reaction.)

To ensure reproducible cross-linking, carry out the reaction at a fixed temperature (25°C-30°C).

5. Determine the optimal time for cross-linking the targets by removing 20-µl aliquots from the reaction after 5, 10, 15, 30, and 60 minutes. Stop each reaction by adding an equal volume of SDS

buffer.

6. Visualize conjugates as described in [Protein Interactions Captured by Chemical Cross-linking: Simple Cross-linking Screen Using Sulfo-MBS](#).

TROUBLESHOOTING

Problem: Cross-linking is nonspecific or excessive.

[Step 6]

Solution: If cross-linking is nonspecific or excessive, first try reducing either the concentration of the formaldehyde or the protein reactants to optimize complex formation. Other options include lowering the pH or reducing the reaction times to less than those used in the initial screen.

Problem: No cross-linking is observed.

[Step 6]

Solution: If no cross-linking is observed, then increase the concentration of target protein in the reaction. Alternatively, use a different cross-linking agent.

Problem: Cross-linking problems are observed when studying a complex protein mixture.

[Step 6]

Solution: When using complex formulations of proteins (e.g., from expression systems or whole cell lysates), it is important to check for the presence of high concentrations of detergents or reagents with nucleophilic side groups (e.g., the primary amines of Tris), as they may inhibit complex formation or compete for the reactive groups of the cross-linker, respectively.



Caution

General warning

This material contains hazardous components. Please see recipe for full details.



Caution

Paraformaldehyde

Paraformaldehyde is highly toxic and may be fatal. It may be a carcinogen. It is readily absorbed through the skin and is extremely destructive to the skin, eyes, mucous membranes, and upper respiratory tract. Avoid breathing the dust or vapor. Wear appropriate gloves and safety glasses and use in a chemical fume hood. Keep away from heat, sparks, and open flame.



Recipe

EDTA

To prepare EDTA at 0.5 M (pH 8.0): Add 186.1 g of disodium EDTA•2H₂O to 800 mL of H₂O. Stir vigorously on a magnetic stirrer. Adjust the pH to 8.0 with NaOH (~20 g of NaOH pellets). Dispense into aliquots and sterilize by autoclaving. The disodium salt of EDTA will not go into solution until the pH of the solution is adjusted to ~8.0 by the addition of NaOH.



Recipe


SDS buffer

  0.125 M Tris (pH 6.8)

20% glycerol

 5% β-mercaptoethanol

  4% SDS

 0.003% Coomassie blue (Sigma)

Copyright © 2007 by Cold Spring Harbor Laboratory Press. Online ISSN: 1559-6095 [Terms of Service](#) All rights reserved. Anyone using the procedures outlined in these protocols does so at their own risk. Cold Spring Harbor Laboratory makes no representations or warranties with respect to the material set forth in these protocols and has no liability in connection with their use. All materials used in these protocols, but not limited to those highlighted with the Warning icon, may be considered hazardous and should be used with caution. For a full listing of cautions, [click here](#).

All rights reserved. No part of these pages, either text or images, may be used for any reason other than personal use. Reproduction, modification, storage in a retrieval system or retransmission, in any form or by any means—electronic, mechanical, or otherwise—for reasons other than personal use is strictly prohibited without prior written permission.



CiteULike



Connotea



Del.icio.us



Digg



Reddit



Technorati



Twitter

What's this?



Cold Spring Harbor Protocols

Trichloroacetic Acid (TCA) Precipitation of Proteins

Andrew J. Link and Joshua LaBaer

Cold Spring Harb Protoc 2011; doi: 10.1101/pdb.prot5651

Email Alerting Service

Receive free email alerts when new articles cite this article - [click here](#).

Subject Categories

Browse articles on similar topics from *Cold Spring Harbor Protocols*.

[Proteins and Proteomics, general](#) (478 articles)
[Proteomics](#) (60 articles)

To subscribe to *Cold Spring Harbor Protocols* go to:
<http://cshprotocols.cshlp.org/subscriptions>

Protocol

Trichloroacetic Acid (TCA) Precipitation of Proteins

Andrew J. Link and Joshua LaBaer

INTRODUCTION

Cell or tissue extracts of proteins often contain interfering substances that must be removed. A number of methods are available for concentrating dilute protein solutions and simultaneously removing contaminating substances. Trichloroacetic acid (TCA)/acetone precipitation, as described here, is often used for this purpose.

MATERIALS

It is essential that you consult the appropriate Material Safety Data Sheets and your institution's Environmental Health and Safety Office for proper handling of equipment and hazardous materials used in this protocol.

Reagents

Acetone
Protein sample
Trichloroacetic acid (TCA) (Sigma-Aldrich T9159)
Prepare a 100% (w/v) solution by dissolving 2.2 g of TCA in 1 mL of H₂O. Then prepare a 10% solution by adding 0.1 mL of 100% TCA solution to 0.9 mL of H₂O. Keep both solutions ice cold.

Equipment

Microcentrifuge
Vacuum evaporator (e.g., SpeedVac)

METHOD

1. Add 0.11 volumes of ice-cold 100% TCA to the protein sample.
2. Place on ice for 10 min.
3. Add 500 μ L of ice-cold 10% TCA to the sample.
4. Place on ice for 20 min.
5. Centrifuge at 20,000g for 30 min.
6. Carefully remove the supernatant.
Aspiration of the supernatant with a pipette or a disposable transfer pipette works well. Avoid disturbing the protein pellet.
7. Add 500 μ L of acetone. Very gently rock the tube once or twice to rinse the tube and pellet.

Adapted from *Proteomics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*, by Andrew J. Link and Joshua LaBaer. CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2009.

Cite as: Cold Spring Harb Protoc; 2011; doi:10.1101/pdb.prot5651

www.cshprotocols.org



8. Centrifuge at 20,000g for 10 min. Very carefully remove the supernatant to avoid disturbing the protein pellet.
Aspiration of the supernatant with a pipette or a disposable transfer pipette works well.
9. Dry the protein pellet in a vacuum evaporator (typically <5 min).
The pellet is now ready for resuspension in a mass spectrometry compatible buffer.



PROMOTOR DE LA COAGULACIÓN DE LA LECHE

GENERALIDADES

En la fabricación de todo tipo de quesos la coagulación láctea es uno de los pasos más importantes del proceso y de él dependen factores tan importantes como el rendimiento de producción o el tiempo de labor.

La coagulación de la leche es un proceso que se ve afectado por varios factores, entre ellos: la cantidad de cuajo utilizado, la temperatura, la acidez y la concentración de calcio libre en la leche. Si bien la leche es fuente rica en calcio, en algunas condiciones la leche para quesería no cuenta con la cantidad de calcio necesaria para una buena coagulación, pudiendo variar entre otros a consecuencia de: el tipo de alimento del ganado, el período de producción de las vacas, por la presencia de mastitis o por la época del año. Por estas condiciones es común que en la fabricación de queso se trabajen leches bajas en calcio, de esta forma y sin saberlo el productor reduce sus rendimientos productivos y deja de recibir parte de su ganancia.

DESCRIPCIÓN

CALCIVAC, es un aditivo alimentario que permite agregar a la leche en forma sencilla, la cantidad necesaria de calcio para obtener una mejor coagulación. El uso periódico de CALCIVAC® le permite obtener, entre otros: una cuajada más firme en un menor tiempo, mejorar la acción del cuajo, acelera el desuerado y le facilita el manejo de la cuajada al momento de desuerar, tiende a aumentar los rendimientos de producción. Esto le permite ofrecer a sus clientes un producto de mayor y mejor calidad.

Importante: Utilice este producto con la leche a temperaturas no mayores a 40 C°.

FORMA DE USO

- CALCIVAC, se agrega directamente a la leche de quesería antes de añadir el cuajo, se debe mezclar por espacio de 2 minutos para asegurar una adecuada distribución del producto.
- Se recomienda la utilización de entre 40 y 50 c.c. de CALCIVAC, por cada 100 litros de leche procesada.
- **Importante.** Utilice este producto con la leche a temperatura no mayor a 40C°



PROMOTOR DE LA COAGULACIÓN DE LA LECHE

BENEFICIOS

CALCIVAC, 100% puro, preparado con agua filtrada y bajo todas las especificaciones y exigencias del M.S.

- Preparado bajo estrictas normas de seguridad y salubridad.
- Más fácil de usar – **No es necesario diluir**- Listo para usar
- Más fácil de medir
- No produce irritación al manipularse
- No produce vapores
- Más fácil de disolver
- **Menos** factible de contaminar por agua o por otras sustancias de proceso
- Cada lote tiene su Certificado de Análisis

SEGURIDAD

Usando el producto de acuerdo a las instrucciones no presenta riesgo. Use siempre protección adecuada **En caso de accidente llame al médico INMEDIATAMENTE**, consulte las hojas de seguridad del producto (MSDS) .

Teléfono de Emergencia

Centro Nacional de Intoxicación Tel. 2231028 Laboratorios Vaco, S.A. (506) 22290950

PRESENTACIÓN

CALCIVAC, se ofrece en envases plásticos de:

- 500 ml.
- 1000 ml.
- galón de 3.785 litros.
- pichingas de 19 litros.





CHYMAX EXTRA^{MR}

Coagulante líquido

INFORMACIÓN TÉCNICA

Descripción	El coagulante CHYMAX EXTRA^{MR} es un líquido elaborado con enzimas coagulantes específicas de la leche, libre de materia extraña. Este coagulante representa la nueva generación de enzimas, con alta especificidad y baja actividad proteolítica, al estar compuesto por Quimosina pura.
Ingredientes	Agua, quimosina, cloruro de sodio, color caramelo, benzoato de sodio como conservador.
Fuerza o título	Un litro de coagulante CHYMAX EXTRA^{MR} coagula mínimo 20,000 litros de leche en aproximadamente 30 – 40 minutos en un caso ideal. El tiempo de coagulación depende de la acidez, temperatura, contenido de calcio y calidad general de la leche; por consiguiente, la coagulación puede demorarse más al elaborar un queso con leche con un pH \geq a 6.6 o con temperatura inferior a 32°C.
Modo de empleo	Diluya el coagulante en 5 – 10 veces su cantidad de agua potable fría (libre de cloro) en un recipiente limpio. Agregue inmediatamente el coagulante diluido a la leche agitando perfectamente para asegurar una mezcla uniforme, a continuación deje reposar la leche hasta que se coagule, luego siga los procedimientos normales de toda elaboración de quesos. La temperatura óptima de empleo del CHYMAX EXTRA^{MR} es de 32 - 37 °C. Se sugiere no emplear el coagulante CHYMAX EXTRA^{MR} a temperaturas mayores de 45° C debido a que se desnaturaliza la enzima. Para afirmar la cuajada, se recomienda agregar cloruro de calcio a la leche pasteurizada, lo que equivale a restituir un elemento natural de la leche cruda, se recomienda usar 0.04% de CAL-SOL^{MR} (cloruro de calcio líquido al 50% elaborado por CHR HANSEN).
Usos	El coagulante CHYMAX EXTRA^{MR} se recomienda para todo tipo de queso.
Vida útil	Este producto tiene una vida útil de 14 meses conservado en buenas condiciones de almacenamiento.
Presentaciones	Presentación: Porrón 20 L Código: 690361
Condiciones de almacenamiento	CHYMAX EXTRA^{MR} debe ser almacenado bajo refrigeración en su envase original. CHYMAX EXTRA^{MR} líquido debe ser transportado en condiciones que mantengan el producto por debajo de 20 °C. Una exposición prolongada a un calor excesivo puede tener influencia sobre la vida útil del producto. Una vez abierto el producto asegurarse de volver a cerrar perfectamente bien y mantenerlo bajo refrigeración.

Especificaciones

Sensoriales:	
Apariencia:	Líquido translucido de color ámbar.
Aroma:	Característico
Físicoquímicos:	
*Título/Fuerza	1:20,000 Litros
Gravedad específica a 20°C	1.11 - 1.14
pH	5.0 - 5.9
°Be	13 - 16
Microbiológicos:	
Cuenta Total	1000 UFC/ml Máx.
Hongos y Levaduras	10 UFC/ml Máx.
Grupo coliforme	Ausente

*Información adicional previa solicitud del cliente

El uso de este producto deberá ser aprobado por el cliente, considerando las características propias del producto final en el que es aplicado (dosificación, formulación, condiciones de proceso, estabilidad, almacenamiento, vida anaquel y legislación). La información contenida en este documento es de nuestro conocimiento correcto y verdadero y se presenta de buena fe. Sin embargo, se proporciona sin garantía que implique la infracción de la patente. Esta información es ofrecida para su consideración y verificación y no puede ser duplicada o usada en ninguna otra forma sin el consentimiento por escrito de CHR HANSEN.

CHY-MAXTM está patentado y protegido por EP 0429490, US 6509171, US 5840570, CA 1333777, US 5364770, US 6103490, US 5578463, US 6004785, US 6379928, US 6171817, EP 0429628, FI 0110124, US 5679543, US 6130063, CA 2034487, AU 627334, JP 3153234, EP 0477280, FI 100537, US 5378621, US 5801034, CA 2058633, EP 0538350, EP 0607998, EP 0722771, US 5935442, US 5866006, US 6043067, CA 2086752, CA 2259061, CA 2259062, AU 659090, JP 3168206, US 5198345, US 5503991, US 5525484, CA 1341300, EP 1257562, US 2006099588, EP 1515986, US 2002160445, EP 1362099, US 5332805, US 5215908, EP 477277, CA 2058453, US 5139943, EP 477285, CA 1340867, US 4935370, US 5955297, US 4935354, US 4961938, US 4935369, CA 1340214. Otras patentes se aplican.

FD-DVS STI-14

Product Information

Version: 1

Description Thermophilic lactic acid culture.

Taxonomy Streptococcus thermophilus

Packaging **Material No:** 697997 **Size** 10X50 U **Type** Pouch(es) in box

Physical Properties **Color:** Off-white to slightly reddish or brown
Form: Granulate

Application **Usage**
The culture is primarily applied in Pasta Filata cheese types. The culture can be applied alone or in combination with other lactic acid cultures, e.g. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*.

Recommended inoculation rate

Amount of milk to be inoculated (in liters)	500	2,000	5,000	10,000	15,000	20,000	25,000
Amount of DVS culture	50 U	200 U	500 U	1,000 U	1,500 U	2,000 U	2,500 U
Amount of milk to be inoculated (in lbs)	1,140	4,500	11,350	22,700	34,000	45,500	57,000
Amount of DVS culture	50 U	200 U	500 U	1,000 U	1,500 U	2,000 U	2,500 U

Directions for Use

Remove cultures from the freezer just prior to use. **Do not thaw.** Sanitize the top of the pouch with chlorine. Open the pouch and pour the freeze-dried granules directly into the pasteurized product using slow agitation. Agitate the mixture for 10-15 minutes to distribute the culture evenly. The recommended incubation temperature is 35-45°C (95-113°F). For more information on specific applications see our technical brochures and suggested recipes.

Range Cultures in this series include STI-12, STI-13 and STI-14 (freeze-dried).

FD-DVS STI-14

Product Information

Version: 1

CHR HANSEN

Storage and handling

< -18 °C / < 0 °F.

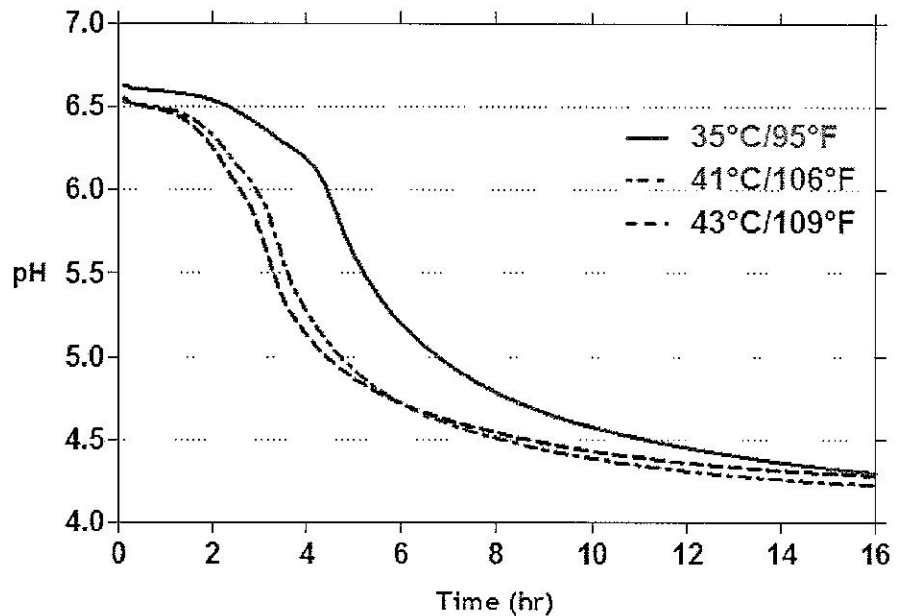
Shelf life

At least 24 months from date of manufacture when stored according to recommendations.

At +5°C (41°F) the shelf life is at least 6 weeks.

Technical Data

Acidification curve



Fermentation conditions:

Lab milk 9.5 % T.S.: 140°C/8 seconds - 100°C/30 minutes

Inoculation: 500U/5000L

Analytical Methods

References and analytical methods are available upon request.

Other Information

Salt sensitivity:

- 50% inhibition: 2.7% NaCl.
- 100% inhibition: >3.0% NaCl.

FD-DVS STI-14

Product Information

Version: 1



CHR HANSEN

Legislation

Chr. Hansen's cultures comply with the general requirements on food safety laid down in Regulation 178/2002/EC. Lactic acid bacteria are generally recognized as safe and can be used in food, however, for specific applications we recommend to consult national legislation.

The product is intended for use in food.

Food Safety

No guarantee of food safety is implied or inferred should this product be used in applications other than those stated in the Usage section. Should you wish to use this product in another application, please contact your Chr. Hansen representative for assistance.

Ingredients

Available upon request.

Labeling

Suggested labeling "lactic acid culture" or "starter culture", however, as legislation may vary, please consult national legislation.

Dietary status

Kosher: Kosher Dairy Excl. Passover

Technical support

Chr. Hansen's Application and Product Development Laboratories and personnel are available if you need further information.

Lic. DAA-MAG: 011-052
Peso Neto: 46 kg y Granel.

VAP FEED
ALIMENTO BALANCEADO PARA VACAS LECHERAS DE ALTO POTENCIAL GENÉTICO PARA PRODUCCION LÁCTEA.

MEDICADO
INGREDIENTE ACTIVO

Monensina Sódica 30 mg/kg (30 g/ton)

Para mejorar la eficiencia de la producción de leche

ANÁLISIS DE GARANTÍA

Humedad	(máx.)	13,0 %
Proteína Cruda	(min.)	16,0 %
Extracto Etéreo	(min.)	3,0 %
Fibra Cruda	(máx.)	10,0 %
Energía Digestible	(min.)	3 400 kcal/kg
Energía Neta de Lactancia	(min.)	1,85 Mcal/kg
Calcio	(min.)	0,4 %
Calcio	(máx.)	1,2 %
Fosforo	(min.)	0,3 %
Sal Común (NaCl)	(min.)	0,3 %
Sal Común (NaCl)	(máx.)	0,7 %

INGREDIENTES


Maiz y/o sorgo y/o trigo, acemite de trigo y/o salvadillo de trigo y/o semolina de arroz, pulpa de naranja y/o pulpa de remolacha y/o harina de coco, harina de coquito de palma africana y/o cascarilla de soya, harina de soya y/o soya integral y/o harina de frijol, destilados de granos secos con solubles (DDGS) y/o semilla de algodón y/o gluten de maíz, melaza de caña, sales de calcio de ácidos grasos de cadena larga de palma africana (grasa de sobre paso), carbonato de calcio, fosfato dicálcico y/o fosfato monocálcico, cloruro de sodio (sal), bicarbonato de sodio y/o sesquicarbonato de sodio y/o alga calcárea marina, vitamina A vitamina D3, Vitamina E, óxido de magnesio y/o sulfato de magnesio, sulfato de cobalto y/o glucoheptonato de cobalto, sulfato de cobre y/o complejo cobre aminoácido, sulfato de zinc y/o óxido de zinc y/o complejo zinc aminoácido, EDDI y/o iodato de calcio, sulfato de manganeso y/o óxido de manganeso, selenito de sodio y/o complejo selenio levadura, carbonato de hierro, aluminosilicatos de calcio y sodio, pared celular de levadura y/o cultivo de levaduras y/o levaduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*), hidroxianálogo de metionina (MHA), ácido propiónico y/o propionato de calcio y/o propionato de amonio y Monensina sódica.

INDICACIONES DE USO

- Este alimento está especialmente dirigido a vacas de alto potencial genético de producción. Ideal para sistemas de semiconfinamiento y confinamiento total.
- Se recomienda suministrar en una relación general de 2,5 a 3:1 kg de leche: concentrado y de ser posible basado en un balance nutricional.
- Para más información consulte con nuestro departamento de asistencia técnica.

PRECAUCIÓN Y ADVERTENCIAS.

- Almacenar en un lugar seco, fresco, ventilado, lejos de agroquímicos y sobre tarimas.
- No suministrar este alimento a caballos u otros equinos.
- La ingestión de Monensina por estas especies puede ser fatal.
- No suministrar a cabras en producción de leche.
- No utilizar en terneros que van a ser procesados para carne blanca.
- No suministrar este producto conjuntamente con la tiamulina.
- No suministrar alimento con monensina cuando los pastizales o las raciones contengan cantidades inadecuadas de nutrientes para sostener la producción de leche, ya que es poco probable que haya una respuesta adecuada al uso de la monensina.


Ing. Alejandra Jiménez Picado
Céd. 1-0885-0243
No. Colegiado: 7294
18/06/2021

Aprobado: 06 JUL 2021
Vencimiento: 06 JUL 2026

Producido en Costa Rica por:

#011,052

COOPERATIVA DE PRODUCTORES DE LECHE, DOS PINOS, R.L.
Planta Procesadora de Alimentos para
Animales - Ciruelas - Alajuela - Tel.: 24373600
Fax: 24373602 Apartado: 179-4060 Alajuela

Lote No.: _____

Fecha elaboración: _____

Fecha de vencimiento: _____



Ing. Alejandra Jiménez Picado

Céd. 1-0885-0243

No. Colegiado: 7294

18/06/2021

Copia del Expediente

Aprobado:	06 JUL 2021
Vencimiento:	06 JUL 2026

BG5822DECSB

USO VET. ...ARIO

Elanco® AF1406

Rumensin® 200

TM

CONTENIDO NETO: 25 kg

VENAS
25 MAY 2006
APROBADO
Dirección de Medicamentos
Veterinarios

Rumensin® 200

Elanco® AF1406

INDICACIONES DE USO:
Este medicamento es un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas. Se utiliza para el tratamiento de la inflamación y el dolor en animales domésticos. No se recomienda su uso en animales que estén sufriendo de insuficiencia renal o hepática, o que estén sufriendo de una enfermedad que afecte al sistema cardiovascular.

Contraindicaciones:
Este medicamento está contraindicado en animales que estén sufriendo de insuficiencia renal o hepática, o que estén sufriendo de una enfermedad que afecte al sistema cardiovascular.

Precauciones:
Este medicamento debe utilizarse con precaución en animales que estén sufriendo de una enfermedad que afecte al sistema cardiovascular.

Modo de empleo:
Este medicamento debe utilizarse en animales que estén sufriendo de inflamación y dolor. La dosis recomendada es de 2 mg/kg de peso corporal, administrada una vez al día.

Forma de presentación:
Este medicamento se presenta en forma de comprimidos.

Composición:
Este medicamento contiene 200 mg de meloxicam por comprimido.

Fecha de caducidad:
Este medicamento tiene una fecha de caducidad de 3 años a partir de la fecha de fabricación.

Información adicional:
Este medicamento es un medicamento de venta libre. Se puede adquirir en cualquier farmacia veterinaria.

VENAS
25 MAY 2006
APROBADO
Dirección de Medicamentos
Veterinarios

Elanco® AF1406
Rumensin® 200

*Notificación
al H. INTERMUNICIPAL*

BG5822DECSB