

Aflatoksino M₁ nustatymas piene ir jogurte ELISA metodu

I. Jasutienė, G. Garmienė

KTU Maisto institutas, Taikos pr. 92, LT-51180 Kaunas; lmai328@takas.lt

Aflatoksino M₁ koncentracija nustatyta žalio pieno mėginiuose, surinktuose iš septynių Lietuvos rajonų, ir prekybos tinkluose pirktuose jogurto mėginiuose. Tyrimai atlikti KTU Maisto institute ir VĮ „Pieno tyrimai“. Kiekybiniam aflatoksino M₁ nustatymui taikytas konkurencinis imunofermentinis (ELISA) testas RIDASCREEN®Aflatoxin M₁. Ištyrus 18 skirtingo riebumo ir terminio apdirbimo Lietuvoje pagaminto jogurto mėginių nustatyta aflatoksino M₁ koncentracija buvo mažesnė už metodo aptikimo ribą, tai yra nesiekė 5 ng/kg. Iš 65 žalio pieno mėginių devyniuose rasta aflatoksino M₁. Vidutinė nustatyta koncentracija (5,9±0,9) ng/kg sudarė 12 % leistinos normos, didžiausia nustatyta koncentracija 7,9 ng/kg atitinkamai sudarė 15,8 %.

Raktažodžiai: aflatoksinas M₁, jogurtas, pienas, ELISA.

Įvadas

Aflatoksinas M₁ yra pagrindinis aflatoksino B₁ metabolitas. Aflatoksinas B₁ į karvės organizmą patenka su aflatoksinu užkrėstais pašarais, o po organizme vykstančių pokyčių susidaro aflatoksinas M₁, kuris patenka į pieną [1]. Eksperimentai su karvėmis parodė, kad patekusio į organizmą aflatoksino B₁ 1–3 % virsta M₁ piene, tačiau susidarancio aflatoksino M₁ kiekiui piene labai didelę įtaką turi šėrimo ir melžimo laikas bei gyvulio organizmo būklė [2]. Aflatoksinas M₁ yra gana stabilus, jo koncentracijai piene pasterizacija neturi įtakos, todėl iš užteršto pieno pagaminti produktai taip pat gali būti užteršti aflatoksinu M₁. Visame pasaulyje tiriamas pieno produktų užterštumas aflatoksinais. Išsivysčiusiose šalyse retai randama daugiau leistinos normos, kitur tai rimta maisto saugos problema [3–6]. Didelis dėmesys aflatoksino tyrimams piene skiriamas ir todėl, kad pieną ir pieno produktus dažnai vartoja vaikai, kurie yra jautresni neigiamam aflatoksino poveikiui. Lietuvoje agroklimatinės sąlygos yra palankios mikromicetams augti, todėl maisto produktai ir pašarai gali būti užteršti aflatoksinais. Išsamūs epidemiologiniai tyrimai Lietuvoje neatlikti, 2003 m. Nacionalinėje veterinarijos laboratorijoje ištirti 104 pieno ir jo produktų mėginiai, iš jų 41 rasta aflatoksino M₁, tačiau nustatyta koncentracija buvo mažesnė už leidžiamą 0,05 μg/kg (50 ng/kg) [7].

Šio darbo tikslas – nustatyti įvairiuose Lietuvos rajonuose surenkamo žalio pieno ir pagaminto jogurto užterštumą aflatoksinu M₁ ELISA metodu.

Tyrimų metodai

Tyrimų objektai – iš septynių Lietuvos rajonų surinktas žalias pienas, prekybos tinkluose pirkti Lietuvoje pagaminto jogurto mėginiai.

Kiekybiniam aflatoksino M₁ nustatymui taikytas konkurencinis imunofermentinis (ELISA) testas RIDASCREEN®Aflatoxin M₁ (R-Biopharm AG, Vokietija), skirtas aflatoksinui M₁ nustatyti piene ir pieno produktuose. Aptikimo riba piene 5 ng/kg, metodas specifinis aflatoksinui M₁, kryžminės reakcijos su aflatoksinais B₁, B₂, G₁ ir G₂ nevyksta [8].

Pieno mėginių paruošimas analizei. Pienas 10 min centrifuguojamas 3500×g greičiu šaldoma centrifuga 10 °C temperatūroje. Po to nuo mėginio paviršiaus lazdele nuimamas susidaręs riebalų sluoksnis ir gautas supernatantas naudojamas analizei.

Jogurto mėginių paruošimas analizei. Jogurtas 3 min kaitinamas 80 °C temperatūroje, siekiant inaktyvuoti gyvus jogurto mikroorganizmus, po to atvėsinamas iki kambario temperatūros ir praskiedžiamas pH 7,2 fosfato buferiniu tirpalu (PBS) dešimt kartų (1 dalis jogurto ir 9 dalys buferio). Gerai supurtoma. Atskiesto jogurto mėginiai naudojami analizei.

ELISA testo procedūra. Į mikroindelių stovą sudedamas reikiamas kiekis indelių standartiniams tirpalams ir mėginiams. Į atskirus indelius įpilama 100 μl standarto arba paruošto mėginio ir inkubuojama lėtai purtant 60 min kambario temperatūroje tamsoje. Po inkubacijos skystis iš mikroindelių išpilamas ir apvertus energingai

pastuksenama į sugeriamąjį popierių, kad iš indelių pasišalintų visas skystis. Į kiekvieną mikroindelį pripilama po 250 µl distiliuoto vandens ir vėl išpilama. Plovimo procedūra pakartojama dar kartą. Į kiekvieną mikroindelį įpilama po 100 µl fermento konjugato ir vėl lėtai purtant inkubuojama 60 min kambario temperatūroje tamsoje. Skystis išpilamas ir tris kartus praplaunama distiliuotu vandeniu. Į kiekvieną mikroindelį įpilama po 50 µl fermento substrato (šlapalo peroksido) ir 50 µl chromogeno (tetrametilbenzidino). Sumaišoma ir inkubuojama 30 min kambario temperatūroje tamsoje. Po inkubacijos įpilama po 100 µl reakciją sustabdančio reagento. Gerai sumaišoma ir išmatuojama absorbcija esant bangos ilgiui 450 nm. Absorbcija yra atvirkščiai proporcinga aflatoksino M₁ koncentracijai mėginyje.

Rezultatų apskaičiavimas. Išmatuotos standartinių tirpalų ir tiriamųjų mėginių absorbcijos vertės surašomos į RIDAVIN.EXE programą ir pagal standartinę semilogaritminę kreivę apskaičiuojama aflatoksino M₁ koncentracija mėginiuose ng/kg. Jogurto mėginiams įvertinamas skiedimo laipsnis, rezultatą dauginant iš 10.

Rezultatai ir jų aptarimas

Pirmame darbo etape ištirta 18 Lietuvoje pagaminto jogurto mėginių, išigytų prekybos tinkluose. Jogurto mėginiai buvo įvairių gamintojų,

skirtingo riebumo, termiškai apdoroti ir su gyvomis jogurto kultūromis. Gauti rezultatai parodė, kad visuose tirtuose jogurto mėginiuose aflatoksino M₁ koncentracija buvo mažesnė už aptikimo ribą, tai yra nesiekė 5 ng/kg. Literatūros ir mūsų ankstesnių tyrimų duomenimis, rauginimas turi reikšmingos įtakos aflatoksino M₁ kiekiui [9–11]. Tirtuose jogurto mėginiuose, pagamintuose iš aflatoksinu M₁ užkrėsto pieno, aflatoksino M₁ koncentracija sumažėjo 28,5 % mažesniu kiekiu (0,31 µg/l) užkrėstame mėginyje ir 29,2 % didesniu kiekiu (0,76 µg/l) užkrėstame mėginyje palyginti su pradiniu aflatoksino M₁ kiekiu žaliavoje [12].

Antrame darbo etape ištirtas žiemos periodo, kai karvės šeriamos koncentruotais pašarais, pieno žaliavos užterštumas aflatoksinu M₁. VĮ „Pieno tyrimai“ buvo surinkti žalio pieno mėginiai iš Rokiškio, Pasvalio, Telšių, Ukmergės, Utenos, Panevėžio ir Mažeikių rajonų. ELISA metodu ištyrus pieno mėginius, devyniuose rasta aflatoksino M₁, nustatyta koncentracija buvo nuo 5,2 iki 7,9 ng/kg. Tai rodo, kad Lietuvoje surenkamo pieno užterštumas aflatoksinu neviršija leistinos 50 ng/kg normos. 13,8 % tirtų mėginių nustatyta vidutinė aflatoksino M₁ koncentracija buvo 5,9 ng/kg, tai yra maždaug 12 % leistinos normos, didžiausia nustatyta koncentracija atitinkamai sudarė 15,8 %. Duomenys apie tirtus pieno mėginius ir nustatytą vidutinę aflatoksino M₁ koncentraciją pateikti lentelėje.

Lentelė. Aflatoksino M₁ piene tyrimo rezultatai

Rajonas	Tirta mėginių	Iš jų rasta aflatoksino M ₁	Nustatyta vidutinė koncentracija, ng/kg
Mažeikių	8	1	5,3±0,7
Panevėžio	9	0	-
Pasvalio	8	0	-
Rokiškio	16	4	5,7±0,5
Telšių	8	2	6,1±1,1
Ukmergės	8	2	6,6±1,8
Utenos	8	0	-
Iš viso:	65	9	5,9±0,9

Išvados

1. Iš septynių Lietuvos rajonų surinktų 65 žalio pieno mėginių aflatoksino M₁ rasta devyniuose mėginiuose (14 % ištirtų mėginių).
2. Vidutinė žaliame piene nustatyta koncentracija (5,9±0,9) ng/kg sudarė 12 % leistinos normos, didžiausia nustatyta koncentracija 7,9 ng/kg atitinkamai sudarė 15,8 %.
3. Ištyrus 18 skirtingo riebumo ir terminio apdirbimo Lietuvoje pagaminto jogurto mėginių,

nustatyta, kad visuose tirtuose jogurto mėginiuose aflatoksino M₁ koncentracija buvo mažesnė už ELISA metodo aptikimo ribą 5 ng/kg.

Literatūra

1. **Hunt D. C.** Determination of mycotoxins // HPLC in Food Analysis. 1982. P. 271–284.
2. **Sarimehmetoglu B., Kuplulu O., Aycicek H.** Detection of aflatoxin M₁ in yogurt by ELISA //

- Milchwissenschaft. 2003. Vol. 58, No. 11/12. P. 643–645.
3. **Galvano F., Galofaro V., Ritieni A., Bognanno M., Angelis A., Galvano G.** Survey of the occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products marketed in Italy: second year of observation // *Food Additives and Contaminants*. 2001. Vol. 18, No. 7. P. 644–646.
 4. **Rodriguez V., Calonge D., Ordonez E.** ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M₁ in raw cow's milk // *Food Additives and Contaminants*. 2003. Vol. 20, No. 3. P. 276–280.
 5. **Lopez C. E., Ramos L. L., Ramadan S. S., Bulacio L. C.** Presence of aflatoxin M₁ in milk for human consumption in Argentina // *Food Control*. 2003. No. 14. P. 31–34.
 6. **Bakirci I.** A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey // *Food Control*. 2001. No. 12. P. 47–51.
 7. **Brukštienė D., Petraitis J., Kiesiūnaitė G., Tamošiūnas V.** Mikotoksinų paplitimas Lietuvoje naudojamuose maisto produktuose // *Maisto chemija ir technologija. Konferencijos pranešimų medžiaga*. Kaunas, 2003. P. 39–41.
 8. **RIDASCREEN[®] Aflatoxin M₁ Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxin M₁.** R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany, 2003. 25 p.
 9. **Govaris A., Roussi V., Koidis P. A., Botsoglou N. A.** Distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yoghurt // *Food Additives and Contaminants*. 2002. Vol. 19, No. 11. P. 1043–1050.
 10. **Hassanin N. I.** Stability of aflatoxin M₁ during manufacture and storage of yoghurt, yoghurt-cheese and acidified milk // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1994. Vol. 65. P. 31–34.
 11. **Blanco J. L., Carrion B. A., Liria N., Diaz S., Garcia M. E.** et al. Behavior of aflatoxins during manufacture and storage of yoghurt // *Milchwissenschaft*. 1993. Vol. 48, No. 7. P. 385–387.
 12. **Jasutienė I., Garmienė G., Kulikauskienė M.** Aflatoksino M₁ stabilumo jogurto gamybos metu tyrimas chromatografiniu metodu // *Maisto chemija ir technologija. Mokslo darbai*. 2003. T. 37, Nr. 3. P. 34–40.

Pateikta spaudai 2004-09

I. Jasutienė, G. Garmienė

EVALUATION OF THE AFLATOXIN M₁ IN MILK AND YOGURT BY ELISA METHOD

Summary

The difurancoumarin derivatives known as aflatoxins are highly toxic fungi metabolites belonging to the vast class of mycotoxins that may contaminate foods and feeds when storage conditions favour fungal growth. Because of potential health hazards for humans, levels of aflatoxins are monitored throughout the world. The aim of this study was to investigate in row milk and yogurt the level of contamination by aflatoxin M₁. ELISA immunochemical method was used. After investigating of 18 commercial yogurt samples it was found that the concentration of aflatoxin M₁ was below the detection limit 5 ng/kg. Nine samples (13.8 %) of 65 row milk from seven Lithuania's districts were contaminated with aflatoxin M₁. Determined concentration ranging from 5.2 to 7.9 ng/kg.

Keywords: aflatoxin M₁, yoghurt, milk, ELISA.

И. Ясутене, Г. Гармене

ИММУНОФЕРМЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФЛАТОКСИНА M₁ В МОЛОКЕ И ЙОГУРТЕ

Резюме

Производные дифуранкумарина, известные как афлатоксины, являются высокотоксичными метаболитами микробного происхождения, которые могут загрязнять пищевые продукты и корм животных, если условия хранения благоприятны для роста плесневых грибов. По причине потенциальной опасности для здоровья людей во всем мире проводятся мониторинги уровня афлатоксинов в пищевых продуктах. Цель настоящего исследования – иммуноферментное определение уровня загрязнения сырого молока и йогурта. При исследовании 18 коммерческих образцов йогуртов установлено, что концентрация афлатоксина M₁ не превышает уровня чувствительности метода, который составляет 5 нг/кг. Афлатоксин M₁ обнаружен в девяти образцах сырого молока, что составляет 13,8 % из 65 отобранных в 7 районах Литвы. Пределы загрязнения от 5,2 до 7,9 нг/кг.