

## Žaliavinio pieno užteršimas aflatoksinu M<sub>1</sub>

**Ina Jasutienė, Galina Garmienė**

*KTU Maisto institutas, Taikos pr. 92, LT-51180 Kaunas; ina.jasutiene@lmai.lt*

**Aušra Steponavičienė**

*Lietuvos žemės ūkio universitetas, Studentų 11, LT-53362 Akademija, Kaunas*

Aflatoksinas M<sub>1</sub> piene ir pieno produktuose aptinkamas tada, kai karvės šeriamos aflatoksinu B<sub>1</sub> užterštais pašarais. Aflatoksinas M<sub>1</sub> dėl savo kenksmingumo yra nepageidaujamas maisto produktuose, jo kiekis reglamentuojamas ir kontroliuojamas. Šio darbo tikslas buvo nustatyti žaliavinio pieno mėginių, surinktų įvairiuose Lietuvos rajonuose 2007 metų tvartinio šėrimo periodu, užterštumą aflatoksinu M<sub>1</sub>. Tyrimai atlikti KTU Maisto institute ir VĮ „Pieno tyrimai“. Kiekybiniam aflatoksino M<sub>1</sub> nustatymui naudotas konkurencinis imunofermentinis (ELISA) testas RIDASCREEN®Aflatoxin M<sub>1</sub>. Ištyrus 82 pieno mėginius, nustatyta aflatoksino M<sub>1</sub> koncentracija buvo mažesnė už metodo nustatymo ribą, tai yra nesiekė 0,005 µg/kg.

**Raktažodžiai:** aflatoksinas M<sub>1</sub>, žaliavinis pienas, ELISA.

### Įvadas

Saugi maisto grandinė – tai socialinė ir ekonominė būtinybė Lietuvoje. Maisto pramonei vis svarbiau, kad vartotojas pasitikėtų jos gaminamų produktų sauga. Nuolatinė vartotojo apsauga, informavimas, jo nuomonės išklaušymas – tai iššūkiai, su kuriais susiduria maisto pramonė šiandien, ir siekiant į juos atsakyti reikalingi kryptingi, gerai koordinuoti moksliniai tiriamieji bei eksperimentinės plėtros darbai. Pieno produktų grandinė prasideda nuo žaliavinio pieno, todėl aktualu ištirti jo užterštumą žmogaus sveikatai kenksmingomis medžiagomis. Aflatoksinas M<sub>1</sub> yra toksiškas, mutageniškas, teratogeniškas bei kancerogeniškas junginys [1–5]. Pasaulyje atliekamos plačios studijos iš karto keliose šalyse, siekiant nustatyti užterštumo lygį įvairiuose maisto produktuose, lyginamas užterštumas įprastuose ir ekologiniuose ūkiuose.

Aflatoksinas M<sub>1</sub> yra pagrindinis aflatoksino B<sub>1</sub> metabolitas, kuris susidaro karvės organizme ir patenka į pieną, kai šeriama pašarais, užterštais aflatoksinu B<sub>1</sub> [6]. Eksperimentai su karvėmis parodė, kad patekusių į organizmą aflatoksino B<sub>1</sub> 1–3 % virsta M<sub>1</sub> piene, nustatyta tiesinė priklausomybė tarp aflatoksino M<sub>1</sub> piene ir aflatoksino B<sub>1</sub> koncentracijos pašaruose [7]. Visame pasaulyje tiriamas pieno produktų užterštumas aflatoksinais, išsivysčiusiose šalyse retai jų randama daugiau leistinos normos, kitur tai rimta maisto saugos problema [8–11]. Irane ištyrus 111 žalio pieno mėginių, 85 iš jų (76,6 %) buvo rasta aflatoksino M<sub>1</sub>,

kurio kiekis varijavo nuo 0,015 iki 0,28 µg/l, net 40 % teigiamų mėginių viršijo didžiausią leistiną 0,05 µg/l ribą [12]. Lietuvoje agroklimatinės sąlygos yra palankios mikromicetams augti, todėl maisto produktai ir pašarai gali būti užteršti aflatoksinais [13]. Išsamūs stebėsenos tyrimai Lietuvoje nėra daryti, 2003 m. Nacionalinėje veterinarijos laboratorijoje ištirti 104 pieno ir jo produktų mėginiai, iš jų 41 rasta aflatoksino M<sub>1</sub>, tačiau nustatyta koncentracija buvo mažesnė už leistiną 0,05 µg/kg (50 ng/kg) [14]. KTU Maisto institute buvo tiriamas žalio pieno užterštumas 2004 m. žiemos periodu – ištyrus 65 mėginius, aflatoksino M<sub>1</sub> rasta devyniuose, vidutinė nustatyta koncentracija (5,9±0,9) ng/kg sudarė 12 % leistinos normos, didžiausia nustatyta koncentracija 7,9 ng/kg atitinkamai sudarė 15,8 % [15].

Šio darbo tikslas – nustatyti įvairiuose Lietuvos rajonuose surenkamo žaliavinio pieno užterštumą aflatoksinu M<sub>1</sub>.

### Tyrimų objektai ir metodai

Tyrimų objektai – žaliavinis pienas, surinktas 2007 metų žiemos periodu iš 22 Lietuvos rajonų: Akmenės, Anykščių, Biržų, Jonavos, Joniškio, Jurbarko, Kėdainių, Klaipėdos, Kretingos, Mažeikių, Pakruojo, Plungės, Radviliškio, Raseinių, Rokiškio, Skuodo, Šakių, Šiaulių, Šilalės, Šilutės, Telšių, Ukmergės.

Kiekybiniam aflatoksino M<sub>1</sub> nustatymui taikytas konkurencinis imunofermentinis (ELISA) testas RIDASCREEN®Aflatoxin M<sub>1</sub> 30/15 (R-Biopharm

AG, Vokietija), skirtas aflatoksinui  $M_1$  nustatyti piene ir pieno produktuose. Aptikimo riba piene 0,005  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , metodas specifinis aflatoksinui  $M_1$ , kryžminės reakcijos su aflatoksinais  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  ir  $G_2$  nevyksta [16].

Pienas 10 min centrifuguojamas  $3500\times g$  greičiu šaldoma centrifuga  $10^\circ\text{C}$  temperatūroje. Po centrifugavimo nuo mėginio paviršiaus lazdele nuimamas susidaręs riebalų sluoksnis, ir gautas be riebalų pienas naudojamas analizei.

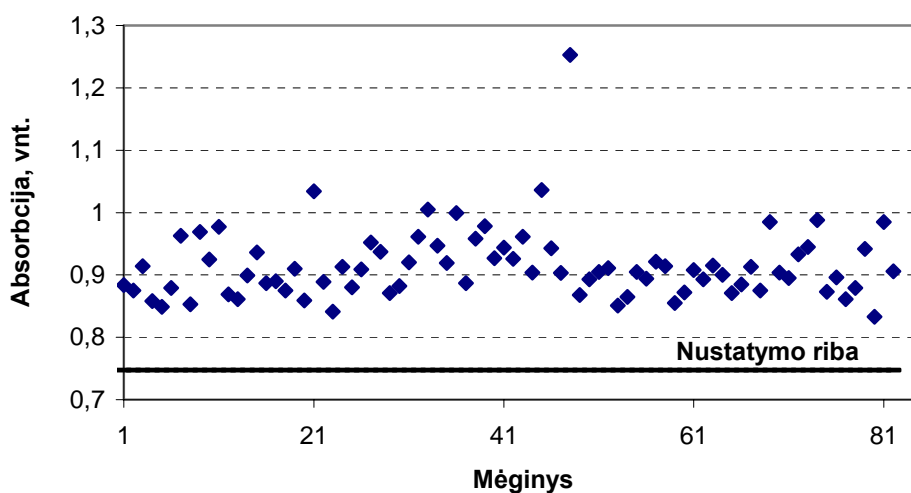
ELISA testo procedūra: į mikroindelių stovą sudedamas reikiamas kiekis indelių, dengtų antikūnais prieš aflatoksiną  $M_1$ , skirtų standartiniams tirpalams ir mėginiams. Į atskirus indelius įpilama 100  $\mu\text{l}$  standarto arba paruošto mėginio ir inkubuojama lėtai purtant 30 min kambario temperatūroje tamsoje. Po inkubacijos skystis iš mikroindelių išpilamas ir apvertus energingai pastuksenama į sugeriamąjį popierių, kad iš indelių išbėgtų visas skystis. Į kiekvieną mikroindelį pripilama po 250  $\mu\text{l}$  buferinio plovimo tirpalo ir vėl išpilama. Plovimo procedūra pakartojama du kartus. Į kiekvieną mikroindelį įpilama po 100  $\mu\text{l}$  skiesto fermento konjugato (aflatoksinu  $M_1$  ir peroksidazės junginio) ir vėl lėtai purtant inkubuojama 15 min kambario temperatūroje tamsoje. Skystis išpilamas ir tris kartus praplaunama buferiniu plovimo tirpalu. Į kiekvieną mikroindelį įpilama po 100  $\mu\text{l}$  fermento substrato (šlapalo peroksido) ir chromogeno (tetrametilbenzidino) mišinio. Sumaišoma ir inkubuojama 15 min kambario temperatūroje tamsoje. Po inkubacijos įpilama po 100  $\mu\text{l}$  reakciją sustabdančio reagento. Gerai sumaišoma ir

išmatuojama absorbcija bangos ilgiui esant 450 nm. Absorbcija yra atvirkščiai proporcinga aflatoksinu  $M_1$  koncentracijai mėginyje.

Rezultatų apskaičiavimas: išmatuotos standartinių tirpalų ir tiriamųjų mėginių absorbcijos vertės suvedamos į RIDAVIN.EXE programą ir pagal standartinę semilogaritminę kreivę apskaičiuojama aflatoksinu  $M_1$  koncentracija mėginiuose  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

### Rezultatai ir jų aptarimas

Tirtas žiemos periodo, kai karvės šeriamos koncentruotais pašarais, pieno žaliavos užterštumas aflatoksinu  $M_1$ . VĮ „Pieno tyrimai“ buvo surinkti žaliavinio pieno mėginiai iš 22 Lietuvos rajonų: Akmenės, Anykščių, Biržų, Jonavos, Joniškio, Jurbarko, Kėdainių, Klaipėdos, Kretingos, Mažeikių, Pakruojo, Plungės, Radviliškio, Raseinių, Rokiškio, Skuodo, Šakių, Šiaulių, Šilalės, Šilutės, Telšių, Ukmergės. ELISA metodu ištyrus standartus ir pieno mėginius, mažiausios analizės koncentracijos standarto absorbcija buvo 0,747 vienetų, tiriamųjų mėginių – nuo 0,833 iki 1,253 vienetų (pav.). Kaip minėta anksčiau, absorbcija yra atvirkščiai proporcinga aflatoksinu  $M_1$  koncentracijai: kuo mažesnė aflatoksinu  $M_1$  koncentracija, tuo absorbcijos vertė yra didesnė. Kadangi visų tiriamųjų pieno mėginių ELISA testo absorbcijos vertės buvo didesnės už mažiausios analizės koncentracijos standarto absorbcijos vertę, reiškia, visuose mėginiuose aflatoksinu  $M_1$  koncentracija buvo mažesnė už ELISA metodo nustatymo ribą 0,005  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .



Pav. Tiriamųjų žalio pieno mėginių ELISA testo absorbcijos vertės

Lietuvoje, kaip ir kitose Europos Sąjungos valstybėse, didžiausias leistinas aflatoksino M<sub>1</sub> kiekis yra 0,05 µg/kg. Nustatyta nedidelį užteršimo lygį galėjo lemti ir neįprastai ilgas bei šiltas ruduo, gerokai sutrumpėjęs tvartinio šėrimo periodas. Kadangi užsitęsė ganymo periodas, karvės buvo trumpiau šeriamos koncentruotais pašarais, sumažėjo galimybė gauti aflatoksiniu B<sub>1</sub> užterštus pašarus. 2004 metais tvartinis periodas buvo ilgesnis, tuo metu ištyrus žalio pieno mėginius, surinktus iš septynių rajonų, devyniuose buvo rasta aflatoksino M<sub>1</sub>: vienas teigiamas mėginys buvo iš Mažeikių rajono, po du mėginius iš Telšių ir Ukmergės rajonų, keturi – iš Rokiškio rajono [15]. Nustatytas užterštumas aflatoksiniu M<sub>1</sub> nebuvo didelis, koncentracija buvo nuo 0,0053 iki 0,0066 ng/kg.

Kitose Europos šalyse taip pat nustatomas nežymus užterštumas aflatoksiniu M<sub>1</sub>. Jungtinėje Karalystėje aflatoksino M<sub>1</sub> rasta 3 žaliavinio pieno mėginiuose iš 100, tarp kurių 50 buvo ekologinio ūkio ir 50 įprastos gamybos pienas. Tačiau reikia pažymėti, kad nustatyta aflatoksino koncentracija buvo nedidelė – nuo 0,01 iki 0,021 µg/l [17]. Italijoje ištyrus 161 pieno mėginį, 125 rasta aflatoksino M<sub>1</sub>, koncentracija buvo nuo 0,01 iki 0,0235 µg/l, vidutinė vertė – 0,00628 µg/l [18]. Kai kuriose trečiojo pasaulio šalyse užterštumas aflatoksiniu taip pat nėra didelis. Argentinoje iš 77 mėginių 18 buvo užteršti aflatoksiniu M<sub>1</sub>, tačiau nustatyta koncentracija buvo labai nedidelė: (0,016±0,007) µg/l žaliaviniame piene, (0,0125±0,002) µg/l piene iš pieno miltelių ir (0,013±0,002) µg/l pasterizuotame piene [19]. Autoriai daro išvadą, kad tokius rezultatus lėmė Argentinos klimatas, leidžiantis galvijus ganyti ištaisus metus.

Nepriklausomai nuo gautų rezultatų, būtina nuolat kontroliuoti pašarų ir pieno užterštumą aflatoksinais, sekti, kad į rinką nepatektų aflatoksinais užteršti maisto produktai.

## Išvada

Ištyrus iš 22 Lietuvos rajonų žiemos periodu surinktus 82 žalio pieno mėginius, visuose mėginiuose aflatoksino M<sub>1</sub> kiekis buvo mažesnis už 0,005 µg/kg.

**Padėka.** Dėkojame Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui bei LR Žemės ūkio ministerijai už finansinę paramą.

## Literatūra

1. **Dichter C. R.** Risk estimates of liver cancer due to aflatoxin exposure from peanuts and peanut products // *Food and Chemical Toxicology*. 1984. Vol. 22, No. 6. P. 431–437.

2. **Groopman J. D., Cain L. G., Kensler T. W.** Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relationship to cancer // *Critical Reviews in Toxicology*. 1988. Vol. 19. P. 113–145.
3. **Massey T. E., Stewart R. K., Daniels J. M., Liu L.** Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B<sub>1</sub> carcinogenicity // *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1995. Vol. 208. P. 213–227.
4. **Peers F. G., Linsell C. A.** Dietary aflatoxins and liver cancer: a population based study in Kenya // *British Journal of Cancer*. 1973. Vol. 27. P. 473–484.
5. **Shank R. C., Gibson J. B., Nondasuta A., Wogan G. N.** Dietary aflatoxins and human liver cancer. II. Aflatoxins in market foods and foodstuffs of Thailand and Hong Kong // *Cosmetics Toxicology*. 1972. No. 10. P. 61–69.
6. **Hunt D. C.** Determination of mycotoxins // *HPLC in Food Analysis*. London, New York, 1982. P. 271–284.
7. **Dragacci S., Gleizes E., Fremy J. M., Candlish A. A.** Use of immunoaffinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in cheeses // *Food Additives and Contaminants*. 1995. Vol. 12, No. 1. P. 59–65.
8. **Galvano F., Galofaro V., Ritieni A., Bognanno M., Angelis A., Galvano G.** Survey of the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products marketed in Italy: second year of observation // *Food Additives and Contaminants*. 2001. Vol. 18, No. 7. P. 644–646.
9. **Rodriguez V., Calonge D., Ordonez E.** ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw cow's milk // *Food Additives and Contaminants*. 2003. Vol. 20, No. 3. P. 276–280.
10. **Lopez C. E., Ramos L. L., Ramadan S. S., Bulacio L. C.** Presence of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk for human consumption in Argentina // *Food Control*. 2003. No. 14. P. 31–34.
11. **Bakirci I.** A study on the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products produced in Van province of Turkey // *Food Control*. 2001. No. 12. P. 47–51.
12. **Kamkar A.** A study on the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk produced in Sarab city of Iran // *Food Control*. 2005. Vol. 16, No. 7. P. 593–599.
13. **Garalevičienė D.** Mycotoxins and moulded feed: effect on laying hen and contamination of Lithuanian feeds. Doctoral theses. Uppsala, 2001. 81 p.
14. **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.
15. **Jasutienė I., Garmienė G.** Aflatoksino M<sub>1</sub> nustatymas piene ir jogurte ELISA metodu // *Maisto chemija ir technologija*. 2004. T. 38, Nr. 2. P. 5–7.
16. **RIDASCREEN® Aflatoxin M<sub>1</sub>**. Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxin M<sub>1</sub>. R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany, 2003. 25 p.
17. Survey of milk for mycotoxins No.17/01, Food standards agency. Prieiga per internetą: [www.food.gov.uk/science/surveillance/fsis2001/milk-myc](http://www.food.gov.uk/science/surveillance/fsis2001/milk-myc).

18. **Galvano F., Galofaro V., Ritieni A., Bognanno M., Angelis A., Galvano G.** Survey of the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products marketed in Italy: second year of observation // *Food Additives and Contaminants*. 2001. Vol. 18, No. 7. P. 644–646.
19. **Lopez C. E., Ramos L. L., Ramadan S. S., Bulacio L. C.** Presence of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk for human consumption in Argentina // *Food Control*. 2003. No. 14. P. 31–34.

Pateikta spaudai 2007-04

I. Jasutienė, G. Garmienė, A. Steponavičienė

## **EVALUATION OF THE AFLATOXIN M<sub>1</sub> IN RAW MILK**

### **Summary**

Aflatoxin M<sub>1</sub> appears in milk and dairy products as a direct result of the ingestion of feed contaminated with aflatoxin B<sub>1</sub> by cattle. Because of the potential health hazards for humans, the levels of aflatoxin M<sub>1</sub> are regulated and monitored throughout the world. The aim of this study was to investigate the contamination level of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk. Raw milk samples were collected from farms in various districts of Lithuania during the winter period of 2007 when cows are fed in stables. The ELISA immunochemical method

RIDASCREEN®Aflatoxin M<sub>1</sub> was used for evaluation. After investigation of 82 milk samples it was found that the concentration of aflatoxin M<sub>1</sub> was below the detection limit 0.005 µg/kg.

**Keywords:** aflatoxin M<sub>1</sub>, milk, ELISA.

И. Ясутене, Г. Гармене, А. Степонавичене

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФЛАТОКСИНА M<sub>1</sub> В СЫРОМ МОЛОКЕ**

### **Резюме**

Источником загрязнения молока афлатоксином M<sub>1</sub> является загрязненный афлатоксином B<sub>1</sub> корм для животных. Из-за потенциальной опасности для здоровья людей уровень афлатоксина M<sub>1</sub> регламентируется и контролируется во всем мире. Цель настоящего исследования – определение уровня загрязнения сырого молока афлатоксином M<sub>1</sub>. Образцы молока были собраны с ферм различных районов Литвы в течение зимнего периода 2007 года, когда коровы питаются в стойле. Применяли иммунохимический метод ELISA – RIDASCREEN®Aflatoxin M<sub>1</sub>. После исследования 82 образцов молока было установлено, что концентрация афлатоксина M<sub>1</sub> была ниже предела чувствительности 0,005 мкг/кг.