

JACEK DOMAGAŁA

POZOSTAŁOŚCI AFLATOKSYNY M_1 W KRAJOWYM MLEKU W PROSZKU I ODŻYWKACH DLA DZIECI

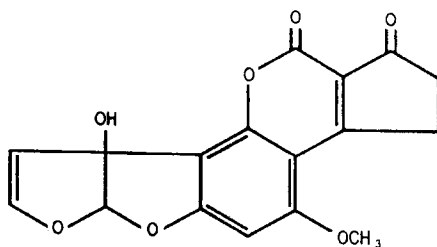
Streszczenie

Przebadano 50 próbek mleka w proszku i odżywek dla dzieci z różnych krajowych wytwórni oraz różnych partii produkcyjnych. W próbkach oznaczano zawartość AFM_1 przy użyciu bezpośredniej metody immunosorpcji enzymów skoniugowanych ELISA oraz obecność toksynotwórczych szczepów z gatunku *A. flavus*. W 10 próbkach stwierdzono obecność AFM_1 w ilości 3,1–8,6 ng/kg. Jedna próbka zakażona była pleśnią *A. flavus*, która nie wykazywała jednak właściwości toksynotwórczych na agarze Czapeka. Wykrycie obecności AFM_1 w większości odżywek z dodatkiem skrobi nasuwa przypuszczenie, że skrobia może powodować w metodzie ELISA reakcję fałszywie pozytywną.

Wstęp

Aflatoksyna M_1 (AFM_1) jest mikotoksyną o silnych właściwościach toksycznych, mutagennych i rakotwórczych dla zwierząt i człowieka. Do mleka przechodzi jako metabolit aflatoksyny B_1 z pasz zakażonych pleśniami toksynotwórczymi, głównie z gatunku *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* [4, 5, 7]. Struktura chemiczna AFM_1 przedstawiona jest na rys.1. Występowanie aflatoksyny M_1 w mleku surowym przeznaczonym do przetwórstwa może powodować jej przechodzenie do produktów mleczarskich. Dotyczy to także takich produktów jak mleko w proszku oraz odżywki dla dzieci. Występowanie aflatoksyn w produktach mleczarskich może być także wywołane zakażeniem tych produktów toksynotwórczymi szczepami pleśni.

Wcześniejsze badania Domagały i Kiszy [1] oraz Domagały i wsp. [3] dotyczyły skażenia aflatoksynami pasz i mleka surowego w Polsce. W krajowej literaturze przedmiotu brak jest jednak danych na temat występowania aflatoksyny M_1 w przetworach mleczarskich. Celem niniejszej pracy było zbadanie skażenia aflatoksyną M_1 mleka w proszku i odżywek dla dzieci pochodzących z kilku krajowych zakładów produkcyjnych.



Rys. 1. Struktura chemiczna aflatoksyny M_1 .

Fig. 1. Chemical structure of aflatoxin M_1 .

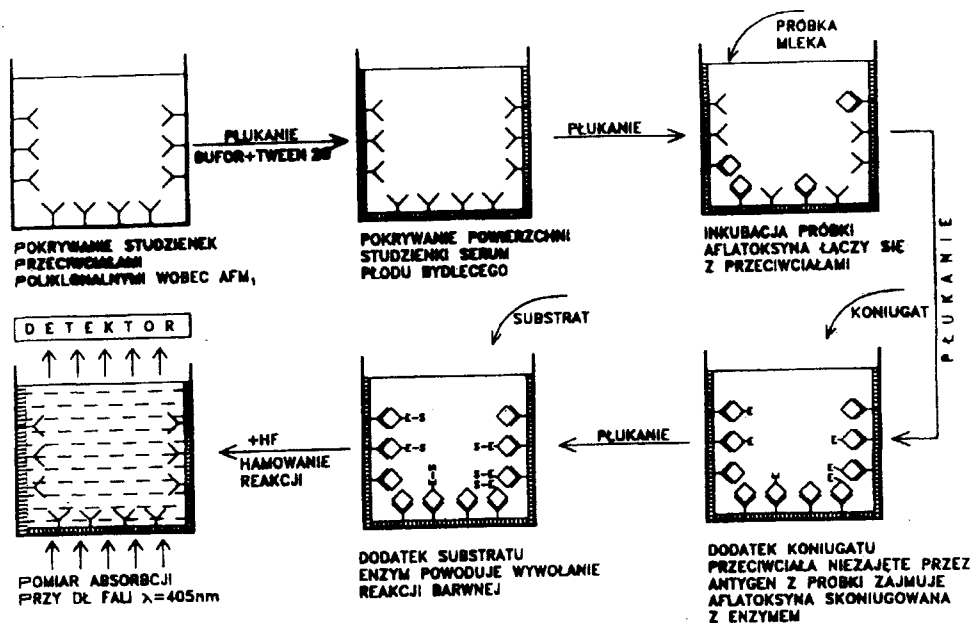
Material i metody badań

Materiał badawczy stanowiło mleko w proszku pełne i odtuszczone oraz odżywki dla dzieci pochodzące z 10 krajowych wytwórni, zakupione w sklepach detalicznych w Krakowie. Ogółem przebadano 50 próbek. Wśród nich 8 próbek stanowiło odtuszczone mleko w proszku z dwóch zakładów produkcyjnych, 16 – pełne mleko w proszku z sześciu zakładów produkcyjnych, 1 – mleko kozie pełne w proszku, po 5 próbek: Bebiko 0 i Bebiko 1, po 4 – Bebiko 2R i Bebiko 2GR z jednej wytwórni, 1 – Laktowit 0 oraz po 3 – Laktowit 1 i Laktowit 2 także z jednej wytwórni. Próbkę od tych samych producentów pochodziły z różnych partii produkcyjnych.

Oznaczenia zawartości AFM_1 dokonano przy użyciu bezpośredniej metody immunosorpcji enzymów skoniugowanych ELISA, zgodnie z metodyką opracowaną przez Steimera i wsp. [10], z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych. Granica oznaczalności AFM_1 wynosiła 3 ng/kg. Stosowano standard AFM_1 firmy Sigma Chemical Co., St. Louis, USA.

Mleko w proszku i odżywki regenerowano w wodzie destylowanej zgodnie z przepisem na opakowaniu. Mleko regenerowane poddawano analizie metodą ELISA. Jako fazę stałą stosowano płytki do mikromiarczkowania (mikropłytki), a jako substrat enzymu – siarczan 2,2'-diazyno-3-etylo-benzotiazoliny. Schemat postępowania jest przedstawiony na rys. 2. Ilościowego oznaczenia zawartości toksyny w próbkach regenerowanego mleka dokonywano metodą pomiaru absorpcji w mikropłytkach w specjalnym spektrofotometrze EAR 400 AT firmy SLT – Labinstruments, Austria. W każdej analizowanej próbce mleka w proszku i odżywek oznaczano również liczbę pleśni [8] oraz obecność szczepów z gatunku *A. flavus*, a w razie ich wykrycia sprawdzano ich zdolności toksynotwórcze. W tym celu z hodowli na podłożu syntetycznym, na którym oznaczano liczbę pleśni, izolowano szczepy z gatunku *A. flavus*, przeszczipiano je na skosy z agaru Czapeka i inkubowano 3 tygodnie w temp. 20–22°C. Po tym

czasie podłoża wraz z wyrosłą grzybnią ekstrahowano 3-krotnie chloroformem. Obecność aflatoksyn w ekstrakcie badano metodą chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym Kieselgel 60 [2].



Rys. 2. Schemat postępowania w metodzie ELISA stosowanej do oznaczania zawartości aflatoksyny M_1 w mleku regenerowanym i odżywkach dla dzieci.

Fig. 2. The procedure of ELISA method used for determination of aflatoxin M_1 content in reconstituted milk and infant formulae.

Wyniki i dyskusja

Spośród 50 przebadanych próbek mleka w proszku i odżywek dla dzieci w 10 z nich stwierdzono obecność aflatoksyny M_1 . Wyniki analiz zamieszczono w tabeli 1. Obecność aflatoksyny stwierdzono w 1 próbce mleka pełnego w proszku, w 2 próbkach odżywki Bebiko 1, w dwóch próbkach Bebiko 2R, w 2 próbkach Bebiko 2GR i 3 próbkach Laktowitu 2. Średni poziom zawartości toksyny wynosił 5,1 ng/kg mleka regenerowanego i w żadnej próbce nie przewyższał poziomu 10 ng/kg. Poziom ten przyjęty jest w krajach Unii Europejskiej jako dopuszczalna zawartość aflatoksyny M_1 w mleku przeznaczonym dla dzieci [4].

Liczebność pleśni w badanych próbkach wahała się w granicach 25–60 j.t.k. w 1 g, była więc niższa niż dopuszczalna dla mleka pełnego w proszku klasy ekstra [9]. Jedna spośród badanych próbek była zakażona pleśnią z gatunku *A. flavus*. Wyizolo-

wany szczep nie wykazywał jednak zdolności do tworzenia aflatoksyn na podłożu Czapeka. Można zatem przypuszczać, że stwierdzona w analizowanych próbkach aflatoksyna M₁ pochodziła z surowca skażonego tą toksyną.

Tabela 1

Zawartość aflatoksyny M₁ w mleku w proszku i odżywkach dla dzieci
Content of aflatoxin M₁ in milk powder and infant formulae

Rodzaj produktu Type of product	Liczba prób Number of samples	Liczba prób pozytywnych Number of positive samples	% prób pozytywnych % of positive samples	Średnia zawartość AFM ₁ [ng/kg*] Average content of AFM ₁ [ng/kg*]	Zakres zawartości afm ₁ [ng/kg*] Range of afm ₁ content [ng/kg*]
Mleko pełne w proszku Full-fat milk powder	16	1	6	5,4	5,4
Mleko kozie pełne w proszku Full-fat goat's milk powder	1	0	0	0	0
Mleko odtłuszczone w proszku Skim milk powder	8	0	0	0	0
Bebiko 0	5	0	0	0	0
Bebiko 1	5	2	40	4,7	4,3–5,2
Bebiko 2R	4	2	50	4,3	4,1–4,5
Bebiko 2GR	4	2	50	5,8	4,4–7,2
Laktowit 0	1	0	0	0	0
Laktowit 1	3	0	0	0	0
Laktowit 2	3	3	100	5,1	3,1–8,6
OGÓLEM TOTAL	50	10	20	5,1	3,1–8,6

* zawartość AFM₁ w kg mleka regenerowanego

* content of AFM₁ in kg of reconstituted milk

Zaskakującym wydaje się jednak fakt stwierdzenia obecności AFM_1 w większości modyfikowanych odżywek, szczególnie z dodatkiem skrobi ryżowej lub gryczanej (Bebiko 2R i 2GR oraz Laktovit 2). Nasuwa to przypuszczenie, że skrobia może powodować wywołanie fałszywie pozytywnej reakcji w metodzie ELISA, co w efekcie daje wyniki zawyżone. Zakażenie skrobi pleśnią należy wykluczyć ze względu na ostre wymagania jakościowe dla surowców stosowanych do produkcji odżywek dla dzieci. Wyjaśnienie tych wątpliwości wymaga więc dalszych badań z tego zakresu.

Otrzymane wyniki zawartości aflatoksyny M_1 w mleku w proszku i odżywkach są niższe od wyników podobnych badań przeprowadzonych w USA, Francji i Tajlandii, gdzie zawartość toksyny w skażonych próbkach mleka w proszku mieściła się w zakresie 30–418 ng/kg [7]. Otrzymane wyniki zbliżone są do danych niemieckich. Heeschen i wsp. [6] przebadali 28 próbek mleka w proszku i stwierdzili, że zawartość aflatoksyny M_1 mieściła się w zakresie 2,33–31,14 ng/kg przy średniej jej zawartości równej 12,4 ng/kg. W innych badaniach Heeschen i Blüthgen [5] przeanalizowali 48 próbek mleka w proszku i 23 próbki odżywek dla dzieci, żadna z analizowanych odżywek nie zawierała AFM_1 w ilości większej niż 10 ng/kg, a w 2 % analizowanego mleka w proszku zawartość AFM_1 mieściła się w zakresie 10–20 ng/kg.

Wnioski

1. Wykrycie pozostałości aflatoksyny M_1 w próbkach mleka w proszku i odżywek dla dzieci, przy braku obecności toksynotwórczych szczepów pleśni w tych produktach, świadczyć może o skażeniu surowca przeznaczonego do ich produkcji, a pośrednio o zanieczyszczeniu pasz stosowanych w żywieniu krów, od których pochodziło mleko.
2. Stwierdzone stężenia aflatoksyny M_1 mieściły się poniżej dopuszczalnego poziomu skażenia tą toksyną mleka dla dzieci w krajach Unii Europejskiej.

Podziękowanie

Autor składa serdeczne podziękowanie b. dyrektorowi Instytutu Higieny Federalnego Centrum Badania Mleka w Kilonii – panu prof. dr med. wet. Walterowi Heeschenowi za umożliwienie przeprowadzenia oznaczeń zawartości AFM_1 w mleku w proszku i odżywkach metodą ELISA.

LITERATURA

- [1] Domagała J., Kisza J.: Występowanie aflatoksyn i ich prekursorów w paszach i w mleku. Acta Acad. Agricult. Techn. Olst., **29**, 1996, 105.
- [2] Domagała J., Blüthgen A., Heeschen W.: Methods of determination of aflatoxins precursors in dairy cows' feed: 1. Determination of sterigmatocystin level in mixed feed and corn silage. Milchwissenschaft, **52**, 8, 1997, 452.

- [3] Domagała J., Kiswa J., Blüthgen A., Heeschen W.: Contamination of milk with aflatoxin M₁ in Poland. *Milchwissenschaft*, **52**, 11, 1997, 631.
- [4] Egmond van H.P.: *Mycotoxins in dairy products*. 1989, Elsevier Applied Science, London and New York.
- [5] Heeschen W., Blüthgen A.: Aflatoxin M₁ in Milch und Milcherzeugnissen. *Forschungsreport Ernährung, Landwirtschaft, Forsten.*, **6**, 1991, 3.
- [6] Heeschen W., Blüthgen A., Tolle A., Engel G.: Untersuchungen zum Vorkommen von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver in der Bundesrepublik Deutschland. *Milchwissenschaft*, **36**, 1, 1981, 1.
- [7] Okamura H., Okimoto J., Kishimoto S., Hasegawa A., Kawamura O., Nakajima M., Mijabe M., Ueno Y.: A improved indirect competitive ELISA for aflatoxin M₁ in milk powders using novel monoclonal antibodies. *Food and Agricultural Immunology*, **5**, 2, 1993, 75.
- [8] PN-77/A-86031 Mleko i przetwory mleczarskie. Badania mikrobiologiczne.
- [9] PN-92/A-86024 Mleko i przetwory mleczarskie. Mleko w proszku.
- [10] Steimer J., Hahn G., Heeschen W., Blüthgen A.: Zum enzymimmunologischen Nachweis von Aflatoxin M₁ in der Milch: Entwicklung eines schnellen Aflatoxin M₁ - Suchtests unter Verwendung von Polystyrol-Perlen als Festkörperphase. *Milchwissenschaft*, **43**, 12, 1988, 772.

RESIDUES OF AFLATOXIN M₁ IN POLISH MILK POWDER AND INFANT FORMULAE

S u m m a r y

Samples of milk powder and infant formulae (50) from different country factories and different production lots were tested. Contents of AFM₁ was determined using direct enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The sample were tested also for the appearance of toxinogenic strains from *A. flavus* species. The presence of AFM₁ in amount from 3,1 to 8,6 ng/kg was stated in 10 samples. One sample was infected by *A. flavus* mould, which did not exhibit toxinogenic properties on Czapek's agar. Detection of AFM₁ in the most of infant formulae with starch addition supposes that starch can cause false positive reaction in ELISA method. ☒