

**ISTRAŽIVANJE DEGRADACIJE AFLATOKSINA M₁
U MLIJEKU***
INVESTIGATION OF AFLATOXIN M₁ DEGRADATION IN MILK

A. Smajlović, M. Muminović, Indira Mujezinović, V. Čupić**

Aflatoksin M₁ je veoma toksičan metabolit aflatoksina B₁ i B₂. S obzirom na to da je jedan od najpotentnijih hepatokarcinogena, mutagena, teratogena i imunosupresora, a hrana za životinje često bude kontaminirana aflatoksinogenim gljivicama i aflatoksinima, moguća je i kontaminacija mlijeka i mliječnih proizvoda aflatoksinom M₁.

Vještački kontaminirano mlijeko aflatoksinom M₁ je bilo podvrgnuto uticaju fizikalnih procesa (uticaj niske temperature od -18°C i izlaganja mikrotalasima u mikrotalasnoj rerni), te uticaju vremena držanja (od 1 do 12 mjeseci), kao i uticaju kombinacija navedenih postupaka, nakon čega je praćen nivo degradacije aflatoksina M₁.

Uzorci vještački kontaminiranog mlijeka, nakon pojedinačno provedenih postupaka su podvrgavani istraživanjima uz korištenje ELISA metode.

Primjećeno je neznatno smanjenje koncentracije toksina, što ukazuje na to da vrijeme i temperatura od -18°C ne utiču znatnije na koncentraciju aflatoksina M₁ u vještački kontaminiranom sirovom mlijeku, dok postupak tretiranja mlijeka mikrotalasima u mikrotalasnoj rerni nije značajnije uticao na postotak apsorbance aflatoksina M₁.

Ključne riječi: mlijeko, aflatoksin, ELISA

Uvod / Introduction

Aflatoksin M₁ je veoma toksičan 4-hidroksilirani metabolit aflatoksina B₁ i B₂. S obzirom na to da se javlja u mlijeku sisara koji su hranjeni hranom kontaminiranom spomenutim aflatoksinima, oznaku M je dobio od engleske riječi *milk* (mlijeko). S obzirom na to da je jedan od najpotentnijih hepatokarcinogena,

* Rad primljen za štampu 27. 03. 2012. godine

** Mr sc. Ahmed Smajlović, dr sc. Mehmed Muminović, profesor, dr sc. Indira Mujezinović, docent, Katedra za farmakologiju i toksikologiju, Veterinarski fakultet Univerziteta u Sarajevu, Bosna i Hercegovina; dr sc. med. vet. Vitomir Čupić, profesor, Katedra za farmakologiju i toksikologiju, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Srbija

mutagena, teratogena i imunosupresora, a hrana za životinje često bude kontaminirana aflatoksinogenim gljivicama i aflatoksinima, moguća je i kontaminacija mlijeka i mliječnih proizvoda aflatoksinom M₁. Zbog toga je i veoma značajna njegova blagovremena detekcija i određivanje koncentracije u mlijeku i mliječnim proizvodima za ishranu ljudi (Eaton i Groopman, 1994; Prandini i sar., 2009).

U literaturi postoje različiti, pa čak i oprečni podaci o tome da neki postupci koji su uobičajeni kod obrade i držanja mlijeka, kao što su skladištenje i zamrzavanje na -18°C utiču, odnosno ne utiču značajno na nivo aflatoksina M₁ u mlijeku (Manorama i Singh, 1995). Postoje određeni podaci o uticaju mikrotalasa na aflatoksin B₁ u supstratima biljnog porijekla kao što je kikiriki (Prado i Oliveira, 1996). Međutim, u literaturi nismo uspjeli naći podatke o uticaju mikrotalasa na stabilnost aflatoksina M₁ u vještački kontaminiranom mlijeku, što smo željeli provjeriti. Također, želja nam je bila da provjerimo stabilnost aflatoksina M₁ u vještački kontaminiranom mlijeku skladištenom na niskim temperaturama tokom dužeg vremenskog perioda (do godinu dana).

Postoje različiti literaturni podaci da neki postupci koji su uobičajeni kod obrade i držanja mlijeka, kao što su držanje tokom 4-6 dana na 0°C (Rustom, 1997; Stoloff i sar., 1975; Manorama i Singh, 1995), smrzavanje 0 do 80 dana na -18°C (Aman, 1995; Stoloff i sar., 1975) ili tokom 6 dana na -18°C (Manorama i Singh, 1995), pasterizacija (Applebaum i sar. 1982; Manorama i Singh, 1995) i kuhanje (Stoloff i sar., 1975; Manorama i Singh, 1995; CAST, 2003), utiču na nivo aflatoksina M₁ u mlijeku. S te strane, za očekivati je da i drugi fizikalni procesi, kao što su mikrotalasi, mogu također uticati na nivo aflatoksina M₁ u mlijeku. Pošto takvih podataka u literaturi nema, naš zadatak je bio da se provjeri i eventualno utvrdi kakav je uticaj tretiranja uzoraka mlijeka mikrotalasima na degradaciju aflatoksina M₁.

Ovoj pretpostavci ide u prilog to što istovremeno ima podataka da neki postupci obrade i držanja mlijeka, kao što su držanje 17 dana na 4°C (Stoloff i sar., 1975), smrzavanje tokom 120 dana na -18°C (Manorama i Singh, 1995), zatim tokom nekoliko mjeseci na -18°C (Eaton i Groopman, 1994), pasterizacije (Krogh, 1987; Park i Liang, 1993; Roginski, 2002; Stoloff i sar., 1975; CAST, 2003) i kuhanja (Aman, 1995; Eaton i Groopman, 1994; Roginski, 2002) ne utiču značajno na nivo aflatoksina u mlijeku. Kako su rezultati navedenih autora uglavnom oprečni, za pretpostaviti je da bi naši rezultati, dobijeni pod određenim uvjetima provođenja nekih fizikalnih postupaka, mogli potvrditi rezultate jedne ili druge grupe autora i prvi put prezentirati uticaj mikrotalasa na nivo aflatoksina M₁ u uzorcima vještački kontaminiranog mlijeka.

Zbog svega navedenog, cilj našeg rada bio je:

1. utvrditi uticaj mikrotalasa na degradaciju aflatoksina M₁ u vještački kontaminiranom sirovom mlijeku i
2. utvrditi uticaj trajanja skladištenja uzoraka mlijeka na temperaturi od -18°C na nivo aflatoksina M₁ u vještački kontaminiranom sirovom mlijeku.

Materijal i metode istraživanja / Material and methods

Istraživanje je provedeno tokom 12 mjeseci. Prvo je obavljeno jedno-kratno uzorkovanje ukupno 120 litara mlijeka koje je zaleđeno na temperaturi od -18°C. Nakon toga, mlijeko je vještački kontaminirano aflatoksinom M₁ u koncentraciji od 0,05 µg/kg, a što je i maksimalna dozvoljena količina ovog toksina u sirovom mlijeku prema Regulativi EC 1881/2006 i Pravilniku o maksimalnim dozvoljenim količinama određenih kontaminanata u hrani (Službeni glasnik BiH 37/09). Koncentracija toksina je provjeravana u 6 turnusa: nakon jednog, dva, tri, četiri i šest mjeseci i nakon godinu dana.

Vještački kontaminirano mlijeko aflatoksinom M₁ je bilo podvrgnuto uticaju fizikalnih procesa (uticaj niskih temperatura oko -18°C i izlaganja mikrotalasima u mikrotalasnoj rerni), te uticaju vremena držanja (1 mjesec, 2 mjeseca, 3 mjeseca, 4 mjeseca, 6 mjeseci i godinu dana), kao i uticaju kombinacija navedenih postupaka, nakon čega je praćen nivo degradacije aflatoksina M₁.

Izlaganje mikrotalasima u mikrotalasnoj rerni se provodilo nakon odmrzavanja mlijeka u trajanju od 5 minuta na 700 W.

Uzorci vještački kontaminiranog mlijeka, nakon pojedinačno provedenih postupaka su podvrgavani istraživanjima uz korištenje enzimske imunosorpcione analize (ELISA), koja se danas najčešće koristi za rutinsku dijagnostiku aflatoksina M₁ (Shephard i sar., 2011). Za korištenje ELISA metode smo se odlučili jer je ELISA jednostavna, dovoljno precizna, jeftina i pouzdana metoda za analizu više uzoraka u kratkom vremenskom periodu, a korišten je komercijalni Ridascreen® Aflatoksin M₁ (e-Biopharm, Njemačka).

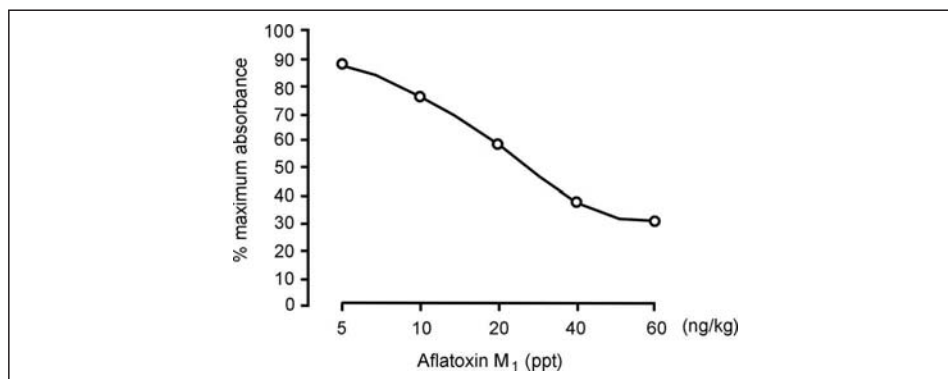
Za interpretiranje rezultata, treba istaći da je postotak apsorbance obrnuto proporcionalan koncentraciji toksina, odnosno, što je postotak apsorbance viši, koncentracija aflatoksina M₁ u uzorku mlijeka je niža. Apsorpcija ili apsorbance aflatoksina M₁ obilježenog enzim-konjugatom iskazuje se kao postotak apsorbance prilikom izračunavanja dobivenih rezultata.

Procenat apsorpcije je dobivan tako što su srednje vrijednosti apsorpcije, koje su dobivene za standarde i uzorke, dijeljene s apsorpcionom vrijednošću prvog (nultog) standarda i množene sa 100. Tako je nulti standard jednak 100%, a apsorpcione vrijednosti se označavaju u procentima.

$$\frac{\text{Apsorpcija (apsorbanca) standarda (ili uzorka)}}{\text{Apsorpcija (apsorbanca) nultog standarda}} \times 100 = \% \text{apsorpcije (apsorbance)}$$

Izračunate vrijednosti za standarde se unose u koordinatni sistem na semilogaritamskom grafičkom papiru nasuprot koncentraciji aflatoksina M₁ u ng/l. Kalibraciona krivulja bi trebala biti linearna u rasponu od 10-40 ng/l (ppt). Koncentracija aflatoksina M₁ u ng/l koja odgovara apsorpciji svakog uzorka može se pročitati s kalibracione krivulje. Da bi se dobila stvarna koncentracija aflatok-

sina M₁ u ng/l koja se nalazi u uzorku, koncentracija očitana s kalibracione krivulje se mora dalje umnožiti s odgovarajućim faktorom razrjeđenja, a taj faktor kod mlijeka iznosi 1 (shema 1).



Shema 1. Originalna kalibraciona krivulja analitičkog kita Ridascreen® Aflatoksin M₁ /
Schematic presentation 1. Original calibration curve for analytical kit Ridascreen Aflatoksin M₁

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

S obzirom na to da je mlijeko često kontaminirano različitim mikroorganizmima ili njihovim toksinima, kako tokom procesa samog nastanka mlijeka u mliječnoj žlijezdi, tako i tokom procesa proizvodnje i prerade, značajno mjesto u higijeni mlijeka predstavlja kontaminacija aflatoksinom M₁, koja se dešava nakon metaboličkog prelaza aflatoksina B₁ u aflatoksin M₁, u jetri životinje.

Ovo saznanje je navelo veliki broj autora da pokušaju pojačati nivo degradacije ovog toksina u mlijeku, primjenom različitih fizikalnih procesa (smrzavanje, pasterizacija, kuhanje i sl.), direktnim ili indirektnim putem. Nažalost, dobijeni rezultati bili su oprečni i nisu pružili valjanu informaciju o efektima pomenu-tih fizikalnih procesa u smislu podobnosti kontaminiranog mlijeka u ljudskoj ishrani.

Vodeći se oprečnim navodima nekih autora, želeli smo da provjerimo da li podvrgavanje vještački kontaminiranog sirovog mlijeka aflatoksinom M₁ različitim temperaturnim režimima dovodi do njegove degradacije.

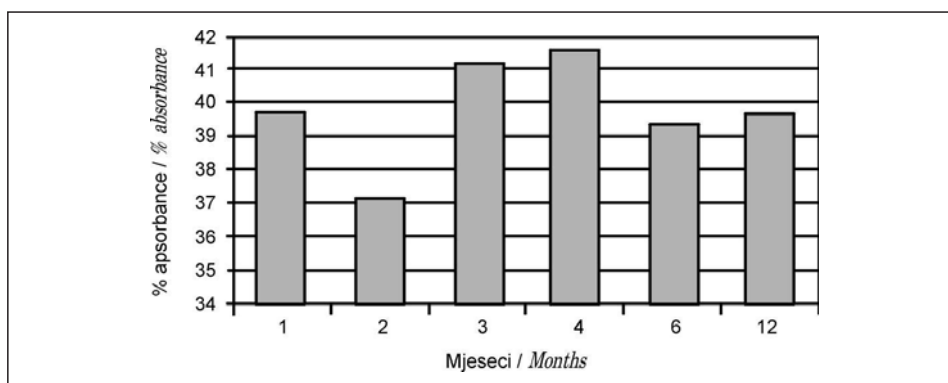
Smrzavanje je jedan od fizikalnih postupaka koji služi za održavanje uzoraka mlijeka prije analize, odnosno njegove upotrebe. Veliki broj autora bavio se proučavanjem stabilnosti aflatoksina M₁ u smrznutom mlijeku. Nalaze prema kojima temperatura od -18°C tokom određenog vremenskog perioda ne utiče značajnije na koncentraciju aflatoksina M₁ u mlijeku navode McKinney i sar. (cit. Manorama i Singh, 1995). Oni su mlijeko kontaminirano aflatoksinom M₁ držali 120 dana na -18°C, kada je došlo do polagane degradacije toksina (za 13%) u

prvih 30 dana. S druge strane, Stoloff i saradnici (1975), u sličnoj studiji, dobili su manji procenat degradacije aflatoksina M₁ u mlijeku, kroz duži vremenski period, dok Eaton i Groopman (1994) smatraju da skladištenje tokom nekoliko mjeseci na temperaturi od -18°C ne utiče značajnije na sadržaj ovog toksina u mlijeku i mliječnim proizvodima.

Sa nalazima navedenih autora se slažu i naši nalazi jer nakon provedenog istraživanja u trajanju od 12 mjeseci i provjeravanja koncentracije aflatoksina M₁ u 6 navedenih turnusa, primjećeno je neznatno smanjenje koncentracije toksina, što ukazuje da vrijeme i temperature od -18°C ne utiču znatnije na koncentraciju aflatoksina M₁ u vještački kontaminiranom sirovom mlijeku.

Dobiveni rezultati upućuju na to da je postupak smrzavanja mlijeka na temperaturi od -18°C neznatno uticao na postotak apsorbance, tako da je taj postotak bio najviši nakon 4 mjeseca – 41,68%, a najniži nakon prvog – 37,19% (graf. 1).

Neravnomjerna distribucija aflatoksina M₁ obično je uzrokovana vještačkom kontaminacijom mlijeka, što nije slučaj pri prirodnoj kontaminaciji kod koje dolazi do metaboličkog prelaza aflatoksina B₁ u aflatoksin M₁ u jetri životinje koji se izlučuje mlijekom.



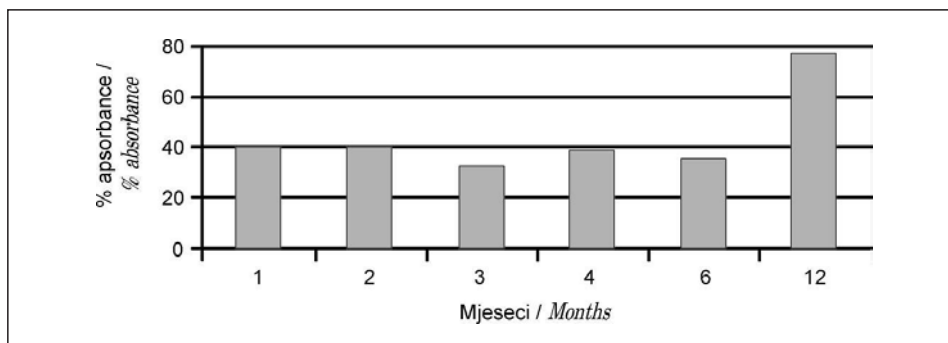
Grafikon 1. Uticaj vremena držanja i temperature (-18°C) na postotak apsorbance aflatoksina M₁ /

Graph 1. Effect of time of maintenance and temperature (-18°C) on percentage of aflatoxin M₁ absorbance

U procesima industrijske obrade i prerade mlijeka, kao i procesima proizvodnje mliječnih proizvoda, termička obrada mlijeka mikrotalasima u mikrotalasnoj rerni se, najvjerovatnije, uopšte ne koristi. Budući da u dostupnoj literaturi nema podataka o tome da je neko, termički ili tehnološki proces koji se zasniva na upotrebi mikrotalasa, pokušao primjeniti u degradaciji aflatoksina M₁ u mlijeku ni u eksperimentalne ni u komercijalne svrhe, naši pokazatelji za sada čine usamljen primjer.

Postoje podaci (Frag i sar., 1996; Prado i Oliveira, 1996; CAST, 2003) da se aflatoksini mogu degradirati pod uticajem mikrotalasa, u mikrotalasnju rerni. Naime, Prado i Oliveira (1996) su vršili ispitivanja o degradaciji aflatoksina (B₁ i G₁) u kikirikiju u mikrovalnoj rerni (jačina 0,8 kW) u trajanju 3 i 6 minuta. Rezultati su pokazali da je došlo do degradacije oba aflatoksina u količinama od 41,52% do 69,56% u uzorku koji je bio izložen mikrovalovima tokom 6 minuta. Također su Frag i sar. (1996) uradili opširnu studiju o uništavanju aflatoksina u kikirikiju korištenjem mikrotalasnne rerne. Oni su koristili različite koncentracije aflatoksina B₁, B₂, G₁ i G₂, varirali su dužinu vremena izlaganja i jačinu mikrotalasa. Došli su do zaključaka da je degradacija aflatoksina bila veća s povećanjem temperature u mikrovalnoj rerni i produžavanjem vremena ekspozicije mikrotalasa.

Budući da dostupna literatura ne raspolaže pokazateljima šta se dešava s aflatoksinom M₁ u mlijeku i mliječnim proizvodima tokom izlaganja mikrotalasa u mikrotalasnju rerni, u našim istraživanjima pokušalo se odgovoriti na to pitanje. U našim istraživanjima, izlaganje mlijeka kontaminiranog aflatoksinom M₁ mikrotalasa (700 W) tokom 5 minuta ne utiče značajnije na postotak apsorbance i koncentraciju aflatoksina M₁ u mlijeku niti u jednom od 6 turnusa provedenog eksperimenta.



Grafikon 2. Uticaj vremena držanja na temperaturi od -18°C i mikrovalova na postotak apsorbance aflatoksina M₁ /

Graph 2. Effect of time of maintenance at a temperature of -18°C and microwaves on percentage of aflatoxin M₁ absorbance

Dobiveni rezultati pokazuju da je postotak apsorbance u mlijeku tretiranom mikrotalasa najviši nakon 12 mjeseci – 79,04%, a najniži nakon 3 mjeseca – 33,27%. To ukazuje na to da postupak tretiranja mlijeka mikrotalasa u mikrotalasnju rerni nije značajnije uticao na postotak apsorbance aflatoksina M₁. Jedino je kombinovani postupak držanja mlijeka tokom 12 mjeseci na temperaturi od -18°C, a nakon toga izlaganja mikrotalasa, doveo do značajnijeg povećanja postotka apsorbance tj. smanjenja koncentracije aflatoksina M₁ (graf. 2).

Zaključak / Conclusion

1. Niske temperature skladištenja (-18°C) tokom perioda do 12 mjeseci nisu ispoljile značajniji uticaj na smanjenje koncentracije aflatoksina M₁ u mlijeku, vjerovatno zbog efekta konzervacije koga niske temperature izazivaju kod toksina.

2. Izlaganje mikrotalasima u mikrotalasnoj rerni (700 W) tokom 5 minuta nije značajnije smanjilo koncentraciju aflatoksina M₁ u mlijeku vjerovatno zbog termostabilnosti aflatoksina M₁.

Literatura / References

1. Aman IM. Stability of Aflatoxin M1 in milk samples. *Chemie Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel* 1995; 17(5-6): 161-3.
2. Applebaum RS, Brackett RE, Wiseman DW, Marth EH. Aflatoxin: Toxicity to Dairy Cattle and Occurrence in Milk and Milk Products – a Review. *J Food Protect* 1982; 45(8): 752-77.
3. Council for Agricultural Science and Technology (CAST): *Mycotoxins – Risk in Plant, Animal and Human Systems*. Ames, Iowa, 2003.
4. Eaton DL, Groopman JD. *The Toxicology of Aflatoxins – Human Health, Veterinary and Agricultural Significance*. Academic Press, 1994.
5. Farag RS, Rashed MM, Abo Hagger MAA. Aflatoxin destruction by microwave heating. *Int J Food Sci Nutr* 1996; 47(3): 197-208.
6. Krogh P. *Mycotoxins in food*. Academic Press, 1987.
7. Manorama, Singh RS. *Mycotoxins in milk and milk products – a review*. *J Dairy Foods Home Sci* 1995; 14(3): 101-7.
8. Park DL, Liang B. Perspectives on aflatoxin control for human food and animal feed. *Trends in Food Science and Technology* 1993, 4: 334-2.
9. Prado G, Oliveira SD. Microwave oven effect on the destruction of aflatoxin on peanuts. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 1996; 56(2): 21-4.
10. Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L, Laporta M, Piva G. On the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(5): 984-91.
11. Roginski H. *Encyclopedia of Dairy Science*. Academic Press Inc. 2002.
12. Rustom IYS. Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chem* 1997; 59(1): 57-67.
13. Shephard GS i sar. Development in mycotoxin analysis: an update for 2009-2010. *World Mycotoxin Journal* 2011; 4(1): 3-28.
14. Stoloff L, Trucksess M, Hardin N, Francis OJ, Hayes JR, Polan CE, Campbell TC. Stability of aflatoxin M in milk. *J Dairy Sci* 1975; 58(12): 1789-93.
15. Pravilnik o maksimalnim dozvoljenim količinama određenih kontaminanata u hrani. *Službeni glasnik BIH* 37/09, 2009. 16. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, 2006.

ENGLISH

INVESTIGATION OF AFLATOXIN M₁ DEGRADATION IN MILK

A. Smajlović, M. Muminović, Indira Mujezinović, V. Čupić

Aflatoxin M₁ is a highly toxic 4-hydroxylated metabolite of aflatoxins B₁ and B₂. It is one of the most potent hepatocarcinogens, mutagens, teratogens and immunosuppressors. Feed is often contaminated with aflatoxigenic moulds and aflatoxins with a high possibility of contaminating milk and dairy products with aflatoxin M₁. Samples of artificially contaminated milk were exposed to the effects of physical conditions (temperature of -18°C and for microwaves in a microwave oven), time (during the period from 1 to 12 months) and a combination of the above mentioned conditions. Following this, levels of aflatoxin M₁ degradation were established by using the ELISA method.

An insignificant decrease in concentration of toxin was observed which indicates that a temperature of -18°C does not significantly influence the concentration of aflatoxin M₁ in the artificially contaminated milk. At the same time, treatment of milk with microwaves in a microwave oven showed an insignificant influence on the percentage of aflatoxin M₁ absorbance.

Key words: milk, ELISA, aflatoxin M₁

РУССКИЙ

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕГРАДАЦИИ АФЛАТОКСИНА M₁ В МОЛОКЕ

A. Смайлович, М. Муминович, Индира Муезинович, В. Чупич

Афлатоксин M₁ очень токсический метаболит афлатоксина B₁ и B₂. Принимая во внимание, что один из потенциейших гепатокарциногенов, мутагенов, тератогенов и иммуносупрессоров, а корм для животных часто будет загрязнённый афлатоксиногенными грибами и афлатоксинами, большая и возможность контаминации молока и молочных продуктов афлатоксином M₁.

Искусственно контаминированное молоко афлатоксином M₁ было подвергнуто воздействию физических процессов (воздействие низких температур от -18°C и выставления микроволнам в микроволновой духовке), да воздействию времени держания (от 1 до 12 месяцев), словно и воздействию комбинаций приведённых поступков, после чего слежен уровень деградации афлатоксина M₁.

Причины искусственно контаминированного молока, после отдельно проведённых поступков подверганы исследованиями при пользовании ELISA метода.

Замечено незначительное уменьшение концентрации токсинов, что указывает, что время и температуры от -18°C не воздействуют более зачительно на концентрацию афлатоксина M₁ в искусственно контаминированном сыром молоке, пока поступок отношения к молоку микровонами в микроволновой духовке не более зачительно влиял на процент абсорбенцы афлатоксина M₁.

Ключевые слова: молоко, афлатоксин, ELISA