

AFLATOKSINO M<sub>1</sub> STABILUMAS RAUGINTŲ PIENO PRODUKTŲ GAMYBOS METU

Ina Jasutienė, Meilė Kulikauskienė, Galina Garmienė  
 KTU Maisto institutas, Taikos pr. 92, LT-51180 Kaunas  
 tel., faks. (8-37) 31 23 93; el. paštas: lmai@lmai.lt

**Santrauka.** Toksinų kiekį maisto produktuose ir pašaruose galima sumažinti fiziniais, cheminiais arba mikrobiologiniais būdais. Technologinio proceso metu aflatoksinai gali jungtis su matricos komponentais, skilti į mažiau toksiškas medžiagas veikiant karščiui ar kitiems veiksniams. Toksinus akumuliuoti arba sujungti gali ir mikroorganizmai. Šio darbo tikslas buvo ištirti aflatoksino M<sub>1</sub> stabilumą raugintų pieno produktų gamybos metu. Pienas gautas ištirpinus pieno miltelius, kuriuose aflatoksino M<sub>1</sub> koncentracija 0,044±0,006 µg/g. Išvalytas imunine kolonėle aflatoksinas M<sub>1</sub> nustatytas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu naudojant fluorescencinį detektorių. Ištyrus pieną iki ir po pasterizavimo bei raugintus produktus nustatyta, kad 3 min. pasterizavimas 95°C temperatūroje reikšmingos įtakos aflatoksino stabilumui neturėjo, nors nustatyta aflatoksino koncentracija buvo vidutiniškai 9 proc. mažesnė palyginti su pradine, nustatyta piene. Rauginimas reikšmingai paveikė aflatoksino M<sub>1</sub> stabilumą. Privalomųjų jogurto kultūrų ir *Streptococcus thermophilus* bei probiotinių kultūrų ir tradicinių jogurto kultūrų raugais raugintuose iki pH 4,0 ir 4,5 jogurto, *Lactococcus* raugu rauginto pieno mėginiuose aflatoksino koncentracija vidutiniškai sumažėjo 25 proc. palyginti su pradine. Raugo sudėtis ir rauginimo trukmė iki skirtingo produkto pH statistiškai reikšmingos įtakos aflatoksino stabilumui neturėjo.

**Raktažodžiai:** aflatoksinas M<sub>1</sub>, pasterizavimas, rauginimas.

STABILITY OF AFLATOXIN M<sub>1</sub> DURING PRODUCTION OF FERMENTED DAIRY PRODUCTS

Ina Jasutienė, Meilė Kulikauskienė, Galina Garmienė  
 Food Institute of Kaunas University of Technology, Taikos 92, Kaunas LT-51180, Lithuania  
 Tel./fax. +370 37 312393, e-mail: lmai@lmai.lt

**Summary.** Mycotoxins in food and feeds may be removed, detoxified or transformed by physical, chemical or microbiological agents. During technological process matrix's components may involve binding of the aflatoxin; transformation of aflatoxin to less toxic moieties during heating or other effects; some microorganisms can accumulate or bind aflatoxins too. The aim of this study was to determine stability of aflatoxin M<sub>1</sub> during production of fermented dairy products. The milk obtained after dissolving milk powder artificial contaminated with aflatoxin M<sub>1</sub> at 0.044±0.006 µg/g. Quantification of aflatoxin was performed after clean-up with immunoaffinity column by HPLC with fluorescence detection. Investigation of milk before and after pasteurization showed, that 3 min heating at 95 °C temperature have no significant effect on aflatoxin stability, while determined concentration of aflatoxin M<sub>1</sub> was on 9% lower compared to milk before pasteurization. Fermentation had significant effect on the aflatoxin M<sub>1</sub> stability, concentration decreased in average by 25% compared to milk before pasteurization. Indispensable yoghurt cultures and *Streptococcus thermophilus*; probiotic cultures and traditional yoghurt cultures were used in fermentation of yoghurt to pH 4.0 and 4.5. *Lactococcus* starter were used in production of fermented milk. Composition of starter and duration of fermentation had no significant effect on aflatoxin stability.

**Keywords:** aflatoxin M<sub>1</sub>, pasteurization, fermentation.

**Įvadas.** Maistas turi didelę reikšmę ekonomikai, visuomenės sveikatai ir žmonių gyvenimo kokybei, todėl labai svarbu užtikrinti piliečių sveikatą ir gerovę tiriant kenksmingų medžiagų kaupimąsi maisto produktuose, rasti prevencinių priemonių ir įvertinti jų poveikį.

Aflatoksinai yra mikromicetų metabolitai, kuriuos produkuoja maisto produktuose esantys *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ir *Aspergillus nomius*. Juos išskiria ir kai kurios kitos maiste neaptinkamos *Aspergillus* rūšys (Frisvad, Thrane, 2002). Kai pieniniai galvijai šeriami aflatoksino B<sub>1</sub> užterštais pašarais, organizme jis virsta aflatoksino M<sub>1</sub> ir pereina į audinius, biologinius skysčius bei pieną (Zarba et al., 1992). Kadangi aflatoksinai pasižymi hepatotoksiškumu ir mutageniškumu, pašaruose ir maiste jie nepageidaujami ir griežtai kontroliuojami. ES reglamentuojamas aflatoksino M<sub>1</sub> kiekis piene

yra ne daugiau 0,05 µg/kg.

Mikotoksinų kiekį maisto produktuose ir pašaruose galima sumažinti fiziniais, cheminiais arba mikrobiologiniais būdais. Technologinio proceso metu aflatoksinai gali jungtis su matricos komponentais, skilti į mažiau toksiškas medžiagas veikiant karščiui ar kitiems veiksniams. Toksinus akumuliuoti arba sujungti gali ir mikroorganizmai. Žinoma, kad kai kurios pieno rūgšties ir bifidobakterijų padermės gali sumažinti aflatoksino B<sub>1</sub> kiekį (Lahtinen et al., 2004).

Didžiosios Britanijos mokslininkai ištyrė aštuonių pieno rūgšties bakterijų ir keturių bifidobakterijų savybę sumažinti aflatoksino M<sub>1</sub> kiekį piene (Elgerbi et al., 2006). Paveikiausia buvo *Lactobacillus (Lb.) bulgaricus*, kuri aflatoksino kiekį piene sumažino 80,5 proc. palyginti su pradiniu. *Lactococcus* padermės aflatoksino sumažino

46,0–68,5 proc., bifidobakterijos – 67,0–72,5 proc. Mokslininkai siūlo šią pieno rūgšties ir bifidobakterijų savybę panaudoti valant pieną nuo aflatoksino – perleisti pieną per sistemą su imobilizuotomis bakterijomis.

Tiriama, kaip kaitinimas veikia AFM<sub>1</sub>. Kaitinant pieną 40 s 71°C temperatūroje, aflatoksino koncentracija sumažėja 6–14 proc., kaitinant 15 min 120°C temperatūroje, koncentracija sumažėja 24–25 proc. (Marth, 1979). Kiti mokslininkai teigia, kad, pieną kaitinant 45 s 72°C temperatūroje, AFM<sub>1</sub> sumažėja 65 proc., sterilizuojant 115°C temperatūroje – 81 proc. (Hajslova, Radova, 2000). Apžvalginiam straipsnyje pateikiama informacija apie žalią, pasterizuotą ir sterilizuotą pieną. Jame nustatyta aflatoksino koncentracija buvo atitinkamai 1,57, 1,58 ir 1,50 µg/kg. Šiuo atveju pasterizavimas įtakos neturėjo. Mokslinės informacijos apie toksinų pokyčius maisto produktų gamybos metu yra nedaug (Scott, 1984). 1972 m. JAV mokslininkai, tirdami 2,0 µg/l užterštą pieną, pirmieji nustatė, kad pasterizavimas nedaro įtakos AFM<sub>1</sub> stabilumui (Stoloff et al., 1975).

Ištyrus aflatoksino M<sub>1</sub> pasiskirstymą ir stabilumą iš 0,050 ir 0,100 µg/l užteršto pieno gaminant sūrį, nustatyta, kad aflatoksino koncentracija varškėje padidėjo atitinkamai 3,9 ir 4,4 karto palyginti su pienu, o išrūgose jo kiekis sumažėjo (Govaris et al., 2001). Sūryje aflatoksino visada daugiau nei piene, iš kurio jis pagamintas. Sūrio nokinimo metu toksino kiekis mažėja: per 6 mėnesius aflatoksino M<sub>1</sub> sumažėjo 30 proc., bet visiškai jis nesuiro.

Kiti mokslininkai taip pat tyrė technologijos veiksmų įtaką aflatoksino stabilumui (Bakirci, 2001). Nustatyta, kad pasterizavimas sumažina aflatoksino M<sub>1</sub> koncentraciją 7,62 proc., tačiau rezultatas statistiškai nepatikimas. Daugelis tyrėjų pabrėžia, kad, gaminant sūrį iš aflatoksino užteršto pieno, aflatoksinas pereina ir į sūrį ir į išrūgas, tačiau minkštame sūryje jo koncentracija 2,5–3,3 karto didesnė, o kietame – 3,9–5,8 karto didesnė palyginti su pienu, iš kurio sūris pagamintas. Statistiškai patikimo skirtumo tarp pieno žaliavos ir jogurto nenustatyta. Svieste ir grietinėlėje aflatoksino M<sub>1</sub> nustatyta mažiau nei žaliaviniam piene: aflatoksinas M<sub>1</sub> jungiasi prie pieno baltymų frakcijos, todėl į riebalų frakciją jo pereina mažiau.

Buvo tiriamas aflatoksino M<sub>1</sub> pasiskirstymas ir stabilumas jogurto gamybos ir laikymo metu (Govaris et al., 2002). Jogurtas buvo gaminamas iš 0,050 ir 0,100 µg/l aflatoksino M<sub>1</sub> užteršto pieno. 3 min pasterizavimas 92°C temperatūroje įtakos aflatoksino koncentracijai neturėjo, o rauginimas statistiškai patikimai ( $p < 0,01$ ) sumažino M<sub>1</sub> kiekį abiejuose tirtuose mėginiuose. Aflatoksino koncentracija jogurto mėginiuose, kurių pH 4,6 ir 4,0, po rauginimo sumažėjo atitinkamai 13 ir 22 proc., išlaikius 4 savaites – 16 ir 34 proc. Laikymo metu aflatoksinas M<sub>1</sub> buvo stabilus jogurte, kurio pH 4,6, negu jogurte, kurio pH 4,0.

**Darbo tikslas** – ištirti aflatoksino M<sub>1</sub> stabilumą raugintų pieno produktų gamybos metu.

**Medžiagos ir metodai.** Aflatoksino M<sub>1</sub> etaloninis tirpalas, kurio koncentracija 1 µg/ml chloroformo (Sigma, Vokietija); pieno milteliai ERM-BD284, gauti iš karvių, šertų aflatoksinais užkrėstais pašarais, pieno, kuriuose aflatoksino M<sub>1</sub> koncentracija 0,044±0,006 µg/g (IRRM,

Belgija). Aflatoksino tyrimui paimti mėginiai: iš pieno miltelių gautas pienas prieš pasterizuojant ir pasterizavus, rauginti pieno produktai, pagaminti KTU Maisto institute.

Aflatoksino M<sub>1</sub> užteršti pieno milteliai ištirpinti iki 40°C pašildytame vandenyje (santykis 1:10). Gautas tirpalas 3 min pasterizuotas 95°C temperatūroje ir atšaldytas iki 42°C.

Jogurtas pagamintas naudojant 0,025 proc. Chr. Hanseno firmos (Danija) raugą DVS YC-180, sudarytą iš privalomųjų jogurto kultūrų *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ir *Streptococcus thermophilus*, arba raugą DVS ABY-2, sudarytą iš probiotinių kultūrų *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium* Bb-12 ir tradicinių jogurto kultūrų *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bei *Streptococcus thermophilus*, rauginant termostate 42°C temperatūroje iki pH 4,0 arba 4,5. Rauginti mėginiai sumaišyti ir greitai atvėsinti iki 20°C, toliau laikyti 4°C temperatūroje.

Raugintas pienas pagamintas naudojant 0,01 proc. Chr. Hanseno firmos (Danija) raugą DVS CH-N-22, sudarytą iš *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (*biovardiacetylactis*). Rauginta termostate 24°C temperatūroje iki pH 4,2, tada atšaldyta iki 4°C temperatūros.

Pieno mėginiai iki ir po pasterizavimo atvėsinti šaldytuve iki 10°C, tada centrifuguoti 10 min 2000×g. Viršutinis riebalų sluoksnis pašalintas ir 10 ml filtruoto per popierinį filtrą nugriebto pieno valyta imunine kolonėle. Jogurto arba rauginto pieno 50 ml sumaišyta su 50 ml metanolio – vandens mišinio (80:20 pagal tūrį), 5 min homogenizuota maišykle „Homogenizer MPW-302“ (Lenkija) ir centrifuguota 10 min 2000×g. Supernatantas filtruotas per popierinį filtrą ir valytas imunine kolonėle (R-Biopharm AG, Vokietija). Aflatoksinas M<sub>1</sub> nustatytas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu su fluorescencine detekcija pagal standartą IDF 171:1995.

Chromatografinė įranga „Schimadzu“ (Japonija), atvirkščių fazių kolonėlė „Adsorbosil C<sub>18</sub>“ (5 µm, 125×4,6 mm) su prieškolone C<sub>18</sub>. Nustatymo sąlygos: sužadavimo banga 365 nm, emisijos banga 435 nm; išvirkščiamas tūris – 20 µl; judrioji fazė – 25 proc. acetono nitrilo tirpalas vandenyje, tėkmės greitis – 0,8 ml/min.

Įvertinus valymą imunine kolonėle, aflatoksino koncentracija C (µg/l) mėginyje paskaičiuota pagal formulę:

$$C = A \times (V_2/V_1) \times (1/M),$$

čia:

C – aflatoksino M<sub>1</sub> koncentracija tiriamajame mėginyje;

A – aflatoksino M<sub>1</sub> kiekis nanogramais apskaičiuotas pagal smailės plotą;

V<sub>1</sub> – išvirkštas mėginio tūris (20 µl);

V<sub>2</sub> – galutinis išvalyto mėginio ekstrakto tūris (200 µl);

M – pieno (10 ml), jogurto ekstrakto (10 ml) arba pieno miltelių (1 g) kiekis, perleistas per imuninę kolonėlę.

Aflatoksino M<sub>1</sub> išgava buvo 90–112 proc. Tyrimo rezultatai nekoreguoti pagal išgavą.

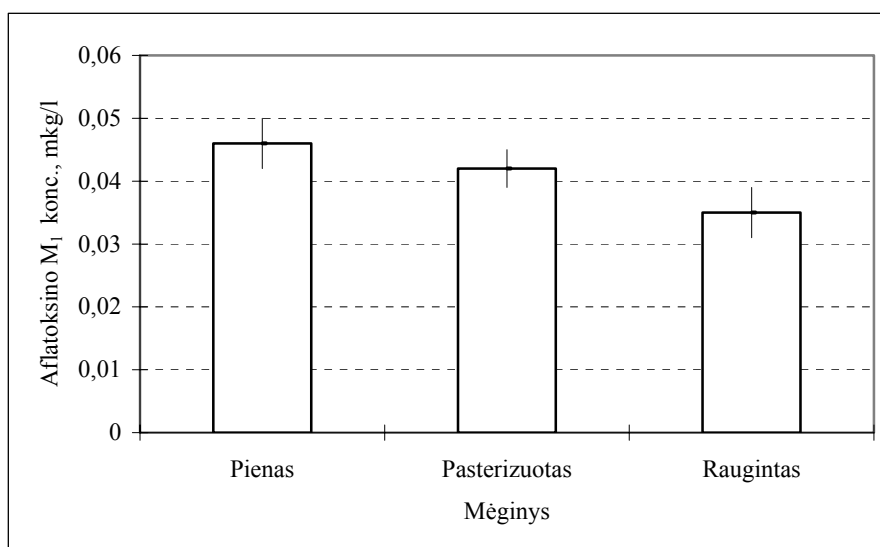
Mėginiai tirti tris kartus, paskaičiuota vidutinė vertė ir standartinis nuokrypis. Tyrimo duomenys įvertinti

dispersinės analizės metodu, naudojantis kompiuterine programa „ANOVA for EXCEL vers. 3.1“ (P. Tarakanovas, Lietuva). Statistiškai patikimi skirtumai nustatyti pagal Fisherio kriterijų ( $p < 0,05$ ).

**Tyrimų rezultatai ir aptarimas.** Ištyrus pieną, gautą ištirpinus žinoma aflatoksinų koncentracija užterštus pieno miltelius, iki ir po pasterizavimo nustatyta, kad pasterizavimo metu aflatoksinų koncentracija sumažėjo 8,9 proc. (1 pav.). Matematiškai įvertinus rezultatus nustatyta,

kad koncentracijos mažėjimas nėra statistiškai patikimas – 3 min pasterizavimas 95°C temperatūroje reikšmingos įtakos aflatoksinų kiekiui piene neturėjo. Šie duomenys sutapo su kitų tyrėjų išvadomis, kad pasterizavimas ir sterilizavimas aflatoksinų M<sub>1</sub> kiekio piene nemažina (Stoloff et al., 1975; Govaris et al., 2002; Bakirci, 2001).

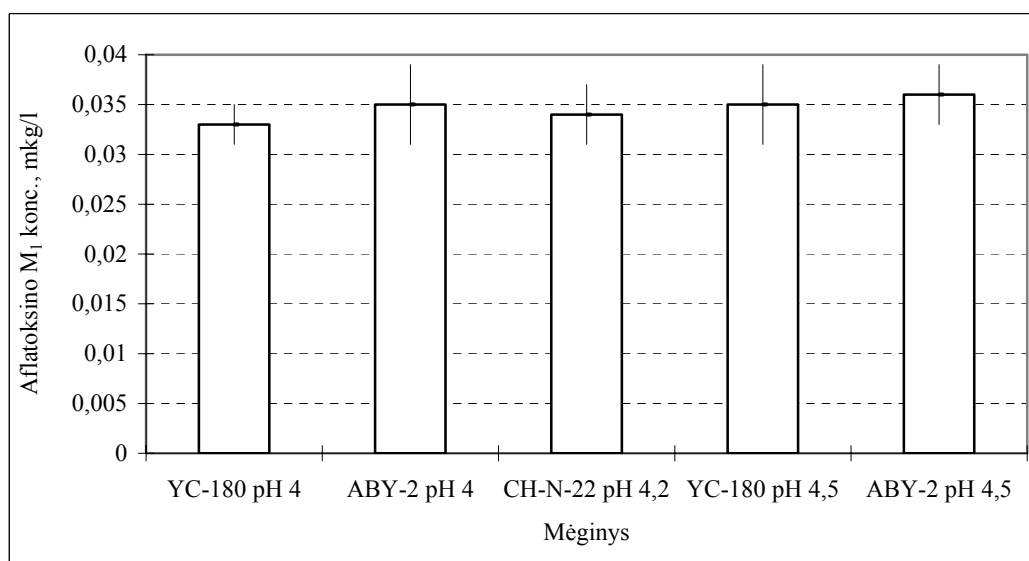
Jogurte, rauginame YC-180 raugu iki pH 4,5, nustatyta aflatoksinų M<sub>1</sub> koncentracija buvo 0,035±0,004 µg/l, tai yra 23,9 proc. mažesnė nei pradinė piene (1 pav.).



1 pav. Pasterizavimo ir rauginimo YC-180 raugu iki pH 4,5 įtaka aflatoksinų M<sub>1</sub> stabilumui

Toliau tyrėme, kokią įtaką aflatoksinų M<sub>1</sub> stabilumui daro raugo sudėtis ir rauginimo trukmė. Jogurto mėginiai buvo rauginami privalomųjų jogurto kultūrų ir *Streptococcus thermophilus* (YC-180) bei probiotinių kultūrų ir tradicinių jogurto kultūrų raugais (ABY-2) iki pH 4,0 ir 4,5. Jogurtas pH 4,0 pasiekė po 6 h, pH 4,5 – po 8 h 45 min rauginimo. *Lactococcus* raugu (CH-N-22) pienas

raugintas 13 h, gauto produkto pH 4,2. Rauginimo metu aflatoksinų M<sub>1</sub> koncentracija sumažėjo nuo 22 iki 28 proc. palyginti su pradine, nustatyta piene (2 pav.). Statistiškai įvertinus gautus rezultatus nustatyta, kad raugo sudėtis ir rauginimo trukmė reikšmingos įtakos aflatoksinų stabilumui neturėjo.



2 pav. Raugo sudėties ir rauginimo trukmės įtaka aflatoksinų M<sub>1</sub> stabilumui

Aflatoksino  $M_1$  stabilumas galėjo mažėti dėl žemo terpės pH, organinių rūgščių arba kitų biocheminių procesų metu susidarančių produktų. Rauginimo metu mažėjantis terpės pH keičia pieno baltymų struktūrą, formuojasi jogurto sutrauka. Kazeino struktūros pokyčiai jogurto gamybos metu taip pat gali daryti įtaką aflatoksino  $M_1$  prisijungimui prie šio baltymo (Govaris et al., 2002). Rauginimo metu susidaro daug pieno rūgšties, kuri taip pat gali sukelti aflatoksino  $M_1$  degradaciją. Kiti, nors ir nedideliais kiekiais susidarantys produktai, tokie kaip lakiosios riebalų rūgštys, aminorūgštys, peptidai ar aldehydai, taip pat gali daryti įtaką aflatoksino  $M_1$  stabilumo mažėjimui raugintuose pieno produktuose.

**Išvados.** Ištyrus aflatoksino  $M_1$  koncentraciją žinomu kiekiu užterštame pradiname ir pasterizuotame piene nustatyta, kad 3 min pasterizavimas  $95^\circ\text{C}$  temperatūroje reikšmingos įtakos aflatoksino stabilumui neturėjo, nors aflatoksino koncentracija buvo vidutiniškai 9 proc. mažesnė negu pradiname piene. Rauginimas reikšmingai veikė aflatoksino  $M_1$  stabilumą. Privalomųjų jogurto kultūrų ir *Streptococcus thermophilus*, probiotinių kultūrų ir tradicinių jogurto kultūrų raugais raugintuose iki pH 4,0 ir 4,5 jogurto ir *Lactococcus* raugu rauginto pieno mėginiuose aflatoksino koncentracija vidutiniškai sumažėjo 25 proc. palyginti su pradine. Raugo sudėtis ir rauginimo trukmė iki skirtingo produkto pH statistiškai reikšmingos įtakos aflatoksino stabilumui neturėjo.

**Padėka.** Dėkojame Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui už dalinį šio darbo finansavimą (sutartis P-29/06).

#### Literatūra

1. Bakirci I. A study on the occurrence of aflatoxin  $M_1$  in milk and milk products produced in Van province of Turkey. Food Control. 2001. No. 12. P. 47–51.
2. Elgerbi A. M., Aidoo K. E., Williams A.G., Candlish A. A. G. Effects of lactic acid bacteria and bifidobacteria on levels of aflatoxin  $M_1$  in milk and phosphate buffer. Milchwissenschaft. 2006. N. 61. P. 197–199.
3. Frisvad J. C., Thrane U. Mycotoxin production by common filamentous fungi. In: Introduction to food- and airborne fungi. Wageningen, Netherlands, 2002. 389 p.
4. Govaris A., Roussi V., Koidis P. A., Botsoglou N. A. Distribution and stability of aflatoxin  $M_1$  during production and storame of yoghurt. Food Additives and Contaminants. 2002. Vol. 19(11). P. 1043–1050.
5. Govaris A., Roussi V., Koidis P. A., Botsoglou N. A. Distribution and stability of aflatoxin  $M_1$  during processing, ripening and storage of Telemes cheese. Food Additives and Contaminants. 2001. Vol. 18 (5). P. 437–443.
6. Hajslova J., Radova Z. Mycotoxins – occurrence in food crops; changes during food storage/processing. Study Tour in the Field of Advances in the Laboratory Techniques and Technology in Food Industry. Prague, 2000. 12 p.
7. Lahtinen S. J., Haskard C. A., Ouwehand A. C., Salminen S. J., Ahokas J. T. Binding of aflatoxin  $B_1$  to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. Food Additives and Contaminant. 2004. Vol. 21(2). P. 158–64.
8. Marth E. H. Aflatoxin in milk, cheese and other dairy products. Marschall Italian & specialty cheese seminars. 1979. P. 1–18.
9. Scott P. M. Effects of Food Processing on Mycotoxins. Journal

of Food Protection. 1984. Vol. 47 (6) P. 489–499.

10. Stoloff L., Trucksess M., Hardin N., Francis O. J., Hayes J. R., Polan C. E, Campbell T. C. Stability of aflatoxin  $M_1$  in milk. Journal of Dairy Science. 1975. Vol. 58 (12). P. 1789–1793.
11. Zarba A., Wild C. P., Hall A. J., Montesano R., Hudson G. J., Groopman J. D. Aflatoxin  $M_1$  in human breast milk from the Gambia, west Africa, quantified by combined monoclonal antibody immunoaffinity chromatography and HPLC. Carcinogenesis. 1992. Vol. 13(5). P. 891–894.