

17. Howe T. R., LaQuier F. W., Barbour A. G.: Infect. Immunol. 54, 207, 1986.
18. Hovind-Hougen K., Asbrink E., Stiernstedt G., Steere A. C., Hovmark A.: Zentbl. Bakterirol. Mikrobiol. Hyg. A 263, 103, 1986.
19. Isogal H., Isogal E., Masuzawa T., Yanagihara Y., Matsubara M., Shimanuki M., Seta T., Fukai K., Kurosawa N., Enokidani M., Nakamura T., Tajima M., Takahashi K., Fujii N.: Microbiol. Immunol. 36, 1029, 1992.
20. Kornblatt A. N., Urband P. H., Steere A. C.: J. Am. Vet. Med. Ass. 186, 960, 1985.
21. Krinsky W. L., Brown S. J., Askenase P. W.: Exp. Parasitol. 53, 381, 1982.
22. Krjučečnikov V. N., Korenberg E. I., Ščerbakov C. V., Goretova H. B., Juržcova E., Galouzka J., Gubatek E., Kovalevskij J. V., Levin M. L., Bunikis I. A.: Ž. M. E. J. 6, 10, 1990.
23. Luger S. W.: N. Engl. J. Med. 322, 1752, 1990.
24. Magnarelli L. A., Anderson J. F., Chappell W. A.: Yale J. Biol. Med. 57, 619, 1984.
25. Magnarelli L. A., Anderson J. F.: J. Clin. Microbiol. 26, 1482, 1988.
26. Marcus L. C., Patterson M. M., Gilfillan R. E., Urband P. H.: Am. J. Vet. Res. 46, 2570, 1985.
27. Masuzawa T., Beppu Y., Kawabata H., Yanagihara Y., Iwamoto Y., Shimizu T., Johnson R. C.: J. Clin. Microbiol. 30, 3016, 1992.
28. Morbidity and Mortality Weekly Report. US Public Health Service Publ. Centers for Diseases Control. 41, 425, 1992.
29. Piesman J., Mather T. N., Sinsky R. J., Spielman A.: J. Clin. Microbiol. 25, 557, 1987.
30. Achaible U. E., Kramer M. D., Museteanu C., Zimmer G., Mossmann H., Simon M. M.: J. Exp. Med. 170, 1427, 1989.
31. Schwan T. G., Burgdorfer W., Garon C. F.: Infect. Immunol. 56, 1831, 1988.
32. Steere A. C., Malavista S. E., Hardin J. A., Ruddy S., Askenase W., Andiman W. A.: Ann. Intern. Med. 86, 685, 1977.
33. Steere A. C.: N. Engl. J. Med. 321, 586, 1989.
34. Szechiński J., Kowalewski M., Sobieszkański B., Gościński G.: Przeg. Epid. 46, 317, 1992.
35. Radda A., Burger I., Stanek G., Wewalka G.: Zentbl. Bakterirol. Mikrobiol. Hyg. 263, 79, 1986.
36. Rahn D. W., Malavista S. E.: Ann. Intern. Med. 114, 472, 1991.
37. Wilson M. L., Spielman A.: J. Med. Entomol. 22, 408, 1985.

Adres autora: dr med. Robert Flisiak, ul. Wierzbowa 9/63, 15-743 Białystok

JAN KISZA, JACEK DOMAGAŁA*

artykuł przeglądowy

Aflatoksyny w paszach i mleku – występowanie, oznaczanie i metody eliminacji

Instytut Technologii Mleczarskiej, Wydział Technologii Żywności ART, Blok 35, 10-718 Olsztyn – Kortowo
*Katedra Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych, Wydział Rolniczy AR, Al. 29 Listopada 52, 31-425 Kraków

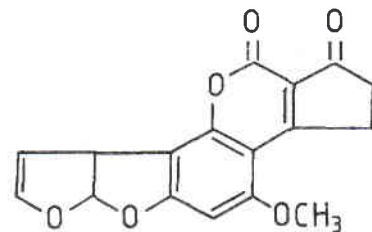
Na początku lat 60. Alcroft i Carnaghan wykazali, że spożywanie przez krowy mleczne paszy zanieczyszczonej aflatoksyną B₁ (AFB₁) prowadzi do pojawienia się w mleku czynnika toksycznego już w kilka godzin po przyjęciu paszy. Czynnikiem ten nazwano aflatoksyną M₁ (AFM₁).

Fakt, że mleko, jeden z najważniejszych i najcenniejszych pokarmów, może być skażone aflatoksynami wywołał lawinę badań naukowych, których wyniki do dzisiaj nie zostały jeszcze jednoznacznie rozstrzygnięte. Do badań tych zostały zaangażowane różne dyscypliny naukowe, jednak szczególna uwaga skoncentrowana została na studiach toksykologicznych, na rozwijaniu nowoczesnych metod oznaczania AFB₁ w paszach oraz AFM₁ w mleku i produktach mleczarskich, a także na produkcji standardów AFB₁ i AFM₁ dla celów analitycznych. Podejmowano też wiele badań nad występowaniem tych toksyn w paszach, mleku i produktach mleczarskich, jak również nad ich stabilnością oraz wpływem różnych metod przetwarzania żywności i możliwością ich eliminacji z pasz i żywności. Różne kraje określiły dopuszczalne limity występowania AFB₁ w paszach i AFM₁ w mleku (4).

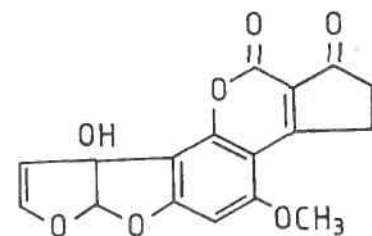
Struktura chemiczna, właściwości, występowanie

Aflatoksyny stanowią grupę wtórnych metabolitów produkowanych głównie przez pleśń *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*, wykazujących działanie toksyczne i rakotwórcze. AFB₁ jest pochodną związku pierścieniowego kumaryny połączonej z dwufuranem i pentanonem. Jej masa cząsteczkowa wynosi 312, a wzór sumaryczny C₁₇H₁₂O₆.

AFM₁ jest 4-hydroksypochodną aflatoksyny B₁ o wzorze sumarycznym C₁₇H₁₂O₇ i masie cząsteczkowej 328. Strukturę chemiczną aflatoksyn B₁ i M₁ przedstawia ryc. 1 (4, 11).



Aflatoksyna B₁



Aflatoksyna M₁

Ryc. 1. Struktura chemiczna aflatoksyn B₁ i M₁

Odkąd stwierdzono, że krowy mleczne karmione paszą zanieczyszczoną AFB₁ wydzielają AFM₁ w mleku, podjęto liczne badania, mające na celu wyjaśnienie szybkości, mechanizmu i zakresu związanych z tym przemian. Ustalono, że po podaniu krowie paszy zanieczyszczonej AFB₁, AFM₁ pojawia się w mleku już 12 – 24 godzin po pierwszym podaniu. Ilość AFM₁ w mleku stanowi około 1% przyjętej z paszą AFB₁. Sieber i Blanc obliczyli wydzieloną ilość AFM₁ i znaleźli przybliżony zakres 0 – 4% przyjętej AFB₁, przy średniej ilości 1% (4). Według Heeschena i wsp. (6) przejście AFB₁ w występujący w mleku metabolit AFM₁ jest szacowane na około 2% ± 1% i utrzymuje się mniej więcej na stałym poziomie. Natomiast Kiermeier i wsp. wykazali, że stężenie AFM₁ w mleku może się zmieniać w zależności od indywidualnych cech zwierzęcia (4). Wiele z przeprowadzonych badań sugeruje też, że do osiągnięcia ustabilizowanego wydzielania AFM₁ w mleku potrzebne jest stałe 3 – 6-dniowe przyjmowanie AFB₁. Regularne spożywanie AFB₁ nie prowadzi jednak do akumulacji toksyny w organizmie i po wycofaniu zakażonej diety AFM₁ przestaje być obecna w mleku w ciągu 2 – 4 dni (4, 6).

Zdolność wiązania się aflatoksyny B₁ z białkami, kwasem DNA i RNA może zakłócać normalne funkcjonowanie komórki i zapoczątkować zmiany nowotworowe, martwicze i mutageniczne. Ostra toksyczność i rakotwórczość AFB₁, szczególnie w stosunku do wątroby, zostały już dosyć dobrze poznane w badaniach na zwierzętach. Spośród zwierząt doświadczalnych myszy okazały się względnie odporne zarówno na toksyczne, jak i na rakotwórcze działanie AFB₁. Dawka LD₅₀ dla myszy wynosiła 9 mg/kg masy ciała. Nie zanotowano toksycznego wpływu na myszy żywione dawkami 3,6 mg/kg masy ciała przez 3 miesiące. Szczury są bardziej wrażliwe na rakotwórcze działanie AFB₁, ale jednocześnie bardziej odporne na jej ostrą toksyczność. Dawka LD₅₀ dla szczurów waha się od 1 mg/kg masy ciała dla szczurów bezpośrednio po urodzeniu do 7,2 mg/kg masy ciała dla 100 g samców szczurów. Mały odwrotnie niż szczury są bardziej wrażliwe na toksyczne niż rakotwórcze działanie AFB₁. Bardzo wrażliwy na AFB₁ jest młody drób, a zwłaszcza młode kaczki, które są wykorzystywane w wielu testach biologicznych na stwierdzenie obecności aflatoksyn. Istnieją również doniesienia o licznych schorzeniach wątroby u świń, młodego bydła mlecznego i psów, których pokarm zawierał aflatoksynę B₁ (11).

Znacznie mniej informacji istnieje na temat toksycznego działania aflatoksyny M₁. Wynika to z trudności w pozyskaniu odpowiedniej ilości czystej toksyny niezbędnej do badań rakotwórczości. Ze zrozumiałych względów brak jest badań rakotwórczości AFM₁ na ludziach. Badania takie przeprowadzono najpierw na pstrągu tęczowym, gatunku bardzo wrażliwym na AFB₁, na młodych kaczkach i szczurach. U wszystkich rodzajów zwierząt stwierdzono uszkodzenia wątroby, nowotwory i wypadki śmiertelne. Na podstawie przeprowadzonych badań wyciągnięto wniosek, że AFM₁, podobnie jak AFB₁, jest substancją rakotwórczą w stosunku do wątroby, chociaż jej rakotwórczość wynosi około 2-10% rakotwórczości AFB₁. Dodatkowo AFM₁ może powodować martwicę kanalików nerkowych i nowotwory jelit (4).

W 1987 r. 34 kraje posiadały regulacje prawne dotyczące aflatoksyn w żywności i paszach. W latach 80. zastrzono dopuszczalne granice występowania aflatoksyn w żywności i paszach w porównaniu do lat 70. Spowodowało to spadek ilości przypadków występowania zakażonych pasz czy mleka

i produktów mleczarskich (4). W krajach EWG dopuszczalna zawartość AFB₁ w całkowitej dawce paszy dla bydła mlecznego wynosi 10 µg/kg, natomiast w dodatkach paszowych 200 µg/kg. Duże różnice istnieją w dopuszczalnych poziomach występowania AFM₁ w mleku między krajami Europy Zachodniej, gdzie dopuszcza się obecność 50 µg/kg mleka, a USA, dawnym ZSRR i dawną Czechosłowacją, gdzie istniejąca dopuszczalna granica wynosi 500 µg/kg mleka. Przypuszcza się, że regulacje prawne krajów Wspólnoty Europejskiej dla obecności aflatoksyn w paszach i żywności będą w przyszłości raczej zaostrzane (4). W naszym kraju zgodnie z Polską Normą PN-81/A-86002 zawartość aflatoksyny M₁ w mleku surowym jest niedopuszczalna.

Z powodu powszechności występowania aflatoksynotwórczych szczepów *A. flavus* i *A. parasiticus* w przyrodzie oraz ciągłej możliwości zakażenia nimi żywności i pasz, przypadki występowania aflatoksyn w tych produktach pojawiają się od czasu do czasu. Strzelecki i wsp. (14) podają, że spośród 8371 przebadanych próbek pasz i komponentów paszowych pochodzących z terenu północno-zachodniej Polski 39% skażonych było aflatoksyną B₁. Średni poziom toksyny wynosił 36 µg/kg, a maksymalna stwierdzona ilość 10 100 µg/kg. Badane próbki były w 92% zakażone szczepami *Aspergillus* w tym 72% przez *A. flavus*, w 83% przez szczepy *Penicillium* i w 20% przez szczepy *Fusarium*. 8,5% wszystkich szczepów posiadało zdolności tworzenia aflatoksyn. Juskiewicz i wsp. (8) przebadali 208 próbek mieszanek paszowych i 36 próbek koncentratów paszowych dla drobiu, trzody chlewnej i bydła pochodzących z polskich wytwórni pasz. W żadnej z próbek mieszanek paszowych nie znaleziono aflatoksyny B₁, natomiast 2 próbki koncentratów paszowych dla drobiu i trzody chlewnej okazały się skażone tą toksyną w ilości 30 i 50 µg/kg.

W 1990 r. przeprowadzono badania mleka z farm w Szlezewiku-Holsztynie na zawartość AFM₁. Probki pozytywnie reagujące zawierały toksynę w ilości 0,1 ng/kg do 50 ng/kg – średnio 8,6 ng/kg. Dla terenu całych Niemiec średnia zawartość AFM₁, wynosiła 12 ng/kg (6). W dawnej Czechosłowacji w latach 1987/88 badaniami objęto 376 próbek mleka surowego i 300 próbek mleka pasteryzowanego. Wśród próbek mleka surowego 11,7% zawierało AFM₁, w ilości 25-100 ng/dm³, a 0,5% powyżej 100 ng/dm³. W 5,1% próbek mleka pasteryzowanego stwierdzono obecność AFM₁ w ilości 25-100 ng/dm³. W latach 1988/89 przebadano 89 próbek mleka surowego, z czego 23,6% zawierało AFM₁ w ilości 20-100 ng/dm³, a 6,7% w ilości 100-500 ng/dm³ (5). Z 47 próbek mleka UHT badanego w Hiszpanii 14 zawierało AFM₁ w ilości 20-100 ng/dm³ (1).

Pojawienie się pasz i żywności zanieczyszczonych aflatoksynami zmusiło higienistów, toksykologów i analityków żywności do opracowania z jednej strony coraz doskonalszych, czulszych, a przy tym w miarę prostych i tanich metod oznaczania aflatoksyn, a z drugiej strony metod eliminacji aflatoksyn z pasz oraz mleka i produktów mleczarskich.

Metody oznaczania aflatoksyn

Aflatoksyny najczęściej oznaczane są metodami chromatograficznymi, z których chromatografia cienkowarstwowa (TLC), chromatografia cieczowa (LC) oraz wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa (HPLC) znalazły największe zastosowanie. Procedura analityczna oznaczania aflatoksyn obejmuje następujące czynności: pobranie i przygotowanie próbek do analizy, ekstrakcja, oczyszczanie ekstraktu, zagę-

szczenie ekstraktu, rozdzielanie składników ekstraktu, wybór metody oznaczenia, obliczenie wyników, potwierdzenie identyfikacji toksyny (4).

Właściwe pobranie próbek jest szczególnie istotne przy oznaczaniu AFB₁ w paszach, gdzie dystrybucja toksyny jest bardzo niejednorodna. Problem ten nie istnieje w przypadku oznaczania AFM₁ w mleku, natomiast pojawia się znowu w przypadku takich produktów mleczarskich, jak sery.

Różnice pomiędzy poszczególnymi metodami oznaczania dotyczą najczęściej wyboru metody ekstrakcji i odpowiedniego zestawu rozpuszczalników, odpowiedniej metody lub kombinacji metod oczyszczania otrzymanych ekstraktów oraz zastosowania chromatografii cienkowarstwowej jedno- lub dwukierunkowej, chromatografii cieczowej lub HPLC z normalną lub odwróconą fazą.

Jako rozpuszczalników do ekstrakcji używa się najczęściej chloroformu z dodatkiem roztworu NaCl, chlorku metylenu, acetonu z 1 N roztworem kwasu fosforowego, acetonu w mieszaninie z wodą, metanolu z wodą lub acetonitrylu z wodą (4, 13).

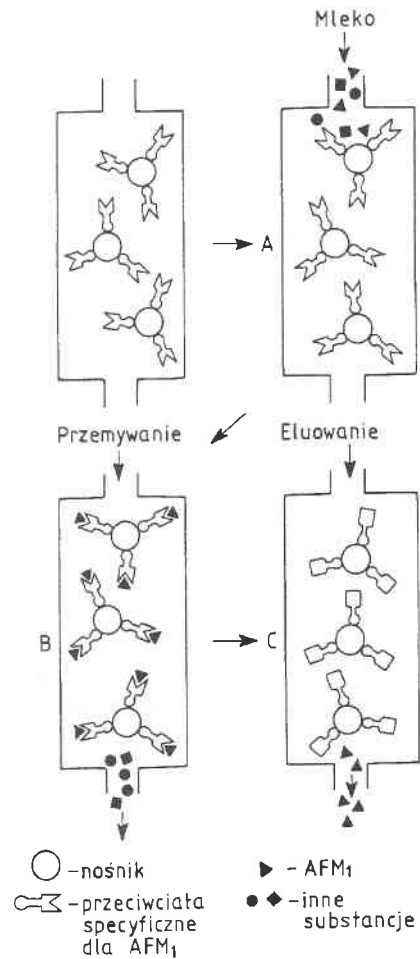
Oczyszczanie ekstraktów ma na celu usunięcie w maksymalnym stopniu substancji, które mogłyby maskować aflatoksyny, a chodzi o takie substancje, jak tłuszcze czy barwniki przy minimalnych stratach aflatoksyn. Spośród najczęściej stosowanych metod oczyszczania ekstraktów wymienić należy frakcjonowanie rozpuszczalnikowe z heksanem i eterem, chromatografię kolumnową z żelom krzemionkowym, oczyszczanie na kolumnach C₁₈ Sep Pac (4, 13), dializę (15), filtrację żelową (9, 10).

Zagęszczanie ekstraktów prowadzi się z reguły w próżniowych wyparkach rotacyjnych. Stężenie toksyny w oczyszczonych i ostatecznie rozdzielonych ekstraktach oblicza się na podstawie porównania intensywności fluorescencji toksyny w próbce w świetle UV ze standardem toksyny (metoda półilościowa) lub metodą densytometrii fluorescencyjnej na płytkach chromatografii cienkowarstwowej (metoda ilościowa).

W celu zminimalizowania ryzyka wystąpienia reakcji fałszywie pozytywnych identyfikacja aflatoksyn w próbkach pozytywnych powinna być potwierdzona. Najbardziej odpowiednia do tego celu jest wysokoczuła metoda spektroskopii masowej. Jest to jednak metoda czasochłonna, bardzo kosztowna, wymagająca specjalistycznej aparatury. Dostępne są też prostsze techniki, polegające bądź to na zmianie barwy fluorescencji aflatoksyn np. po spryskaniu rozwiniętej płytki chromatograficznej rozcieńczonym roztworem H₂SO₄, bądź na utworzeniu specyficznych pochodnych o innych właściwościach chromatograficznych niż analizowana toksyna. Przykładem takiego zabiegu jest reakcja z kwasem trójfluoroocetowym (4).

W ostatnich latach pojawiły się inne czułe metody oznaczania aflatoksyn oparte na reakcji antygen-przeciwciała. Chodzi tu przede wszystkim o oczyszczanie i zagęszczanie ekstraktów metodą chromatografii powinowactwa immunologicznego oraz kompleksowy test do oznaczania aflatoksyn ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (2, 4).

Kolumny powinowactwa immunologicznego składają się z monoklonalnych przeciwciał specyficznych wobec AFM₁ lub AFB₁, które są unieruchomione na nośniku. Mają one wystarczającą pojemność do oczyszczenia nawet bardzo zanieczyszczonych próbek praktycznie bez strat toksyny. Poprawia to precyzję i czułość metody. Zasadę metody chromatografii powinowactwa immunologicznego przedstawia ryc. 2 (4).



Ryc. 2. Zasada oczyszczania ekstraktu aflatoksyn metodą chromatografii powinowactwa immunologicznego

Główne zalety testów ELISA, zarówno gotowych, dostępnych w handlu, jak i tych przygotowywanych w laboratoriach, to krótki czas analizy w porównaniu z metodami chemicznymi, mniejsze zużycie odczynników, większa możliwość automatyzacji pomiarów, a przez to mniejszy koszt oznaczenia i możliwość przetestowania znacznie większej ilości prób w jednostce czasu. Niektóre kraje już z powodzeniem stosują metodę ELISA do oceny stanu skażenia aflatoksynami żywności i pasz (2, 5, 6).

Metody eliminacji aflatoksyn

Najbardziej skutecznym sposobem otrzymania produktów żywnościowych pochodzenia zwierzęcego wolnych od aflatoksyn jest wyeliminowanie aflatoksyny B₁ z paszy dla zwierząt. Metodą najczęściej używaną, która została zastosowana na dużą skalę do detoksyfikacji zanieczyszczonego ziarna zbóż i nasion bawełny jest traktowanie pasz amoniakiem. Działanie amoniaku na AFB₁ powoduje powstanie β-ketokwasu AFB₁. Zainicjowanie, a następnie przebieg reakcji w wysokim ciśnieniu i wysokiej temperaturze powoduje dekarboksylację β-ketokwasu do tzw. aflatoksyny D₁ (3). Ponieważ ten sposób obróbki obniżyć może jakość i wartość odżywczą paszy, stąd jako metodę alternatywną zaproponowano działanie wodorosiarczynem sodu (4). Innymi metodami proponowanymi dla detoksyfikacji paszy są: ogrzewanie żywą parą, stosowanie mikrofal, promieniowania podczerwonego, ultrafioletowego, promieniowania gamma oraz stosowanie związ-

ków chloru: podchlorynu, dwutlenku chloru lub chloru gazowego, a także stosowanie takich substancji utleniających, jak: nadtlenek wodoru, ozon oraz kwasowych i alkalicznych czynników hydrolitycznych (12). Zalecane jest stosowanie kombinacji metod fizycznych i chemicznych. Produkty, jakie powstać mogą w wyniku reakcji AFB₁ po obróbce różnymi czynnikami fizycznymi i chemicznymi, przedstawia ryc. 3.

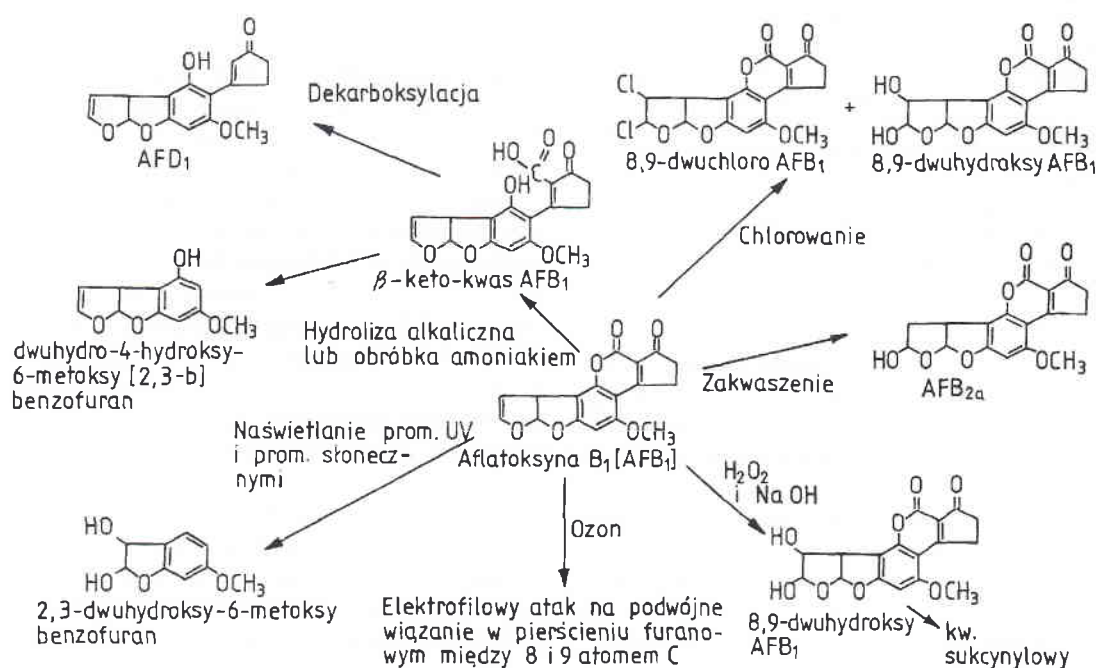
Pomimo licznych prób eliminowania aflatoksyn z paszy i wprowadzenia surowszych regulacji prawnych nie zawsze otrzymuje się produkty żywnościowe, w tym i mleko wolne od aflatoksyn. Wiele przeprowadzonych badań dotyczyło możliwości destabilizacji toksyny podczas przetwarzania mleka, a także traktowania mleka czynnikami fizycznymi lub chemicznymi w celu obniżenia zawartości lub wyeliminowania toksyny.

Badania nad wpływem obróbki cieplnej mleka w zakresie temperatur pasteryzacji i sterylizacji mleka nie przyniosły jednoznacznych rozstrzygnięć, chociaż większość z tych badań wykazała, że ogrzewanie mleka w tych zakresach temperatur nie powoduje istotnych zmian zawartości AFB₁ w produktach mleczarskich. Również w badaniach z zastosowaniem niskich temperatur nie osiągnięto jednoznacznie pozytywnych wyników z zakresu stabilności AFB₁. Stoloff i wsp. stwierdzili, że stężenie AFB₁ w naturalnie skażonym mleku surowym, a przechowywanym w temp. -18°C nie obniżyło się podczas pierwszych 68 dni mrożenia. Natomiast Wiseman i wsp. wykazali, że AFB₁ jest stabilna podczas przechowywania lodów i sorbetów przez 9 miesięcy. Z badań wynika, że przechowywanie zamrożonych, zanieczyszczonych produktów mleczarskich, w tym i mleka, przez kilka miesięcy nie wpływa na zawartość AFB₁ (4).

Pewien wpływ na obniżenie zawartości AFB₁ w produktach mleczarskich wywiera kwas mlekowy w procesie fermentacji mlekowej. Np. w kefirze wyprodukowanym z mleka skażonego AFB₁ stwierdzono 40% niższe stężenie AFB₁ po dwóch tygodniach jego przechowywania w temp. 7°C (4). Ismail i wsp. (7) przypisują utratę 40-50% AFB₁ oddziaływaniu fermentacji mlekowej i obróbki termicznej w zakresie temperatur pasteryzacji mleka.

Usunięcie wody z mleka w procesach zagęszczania i suszenia służy koncentracji suchej masy, w tym również i takich kontaminantów, jak AFB₁. Może to czynić toksynę bardziej podatną na oddziaływanie światła, tlenu i innych jeszcze czynników destabilizujących. Kiermeier i Mashaley wykazali, że zagęszczanie naturalnie zanieczyszczonego mleka nie wpływa na ilość AFB₁, a suszenie rozpyłowe obniża jej zawartość o 12,6% (4).

Ci sami autorzy produkowali śmietanę, a następnie masło z mleka naturalnie zanieczyszczonego AFB₁. Stężenie AFB₁ w śmietanie było 32% mniejsze aniżeli w mleku, masło natomiast zawierało 18%, a maślanka 82% AFB₁ zawartej w śmietanie. Stubblefield i Shannon (4) przeprowadzili podobne doświadczenia produkując masło ze sztucznie zanieczyszczonej śmietany: 16% AFB₁ przeszło do masła, a 84% pozostało w maślance. Taki rozdział wytłumaczyć można zdolnością AFB₁ do wiązania się z białkami mleka, głównie zaś z kazeiną. Ma to swoje konsekwencje także w produkcji sera. Podczas przerobu mleka zanieczyszczonego AFB₁ toksyna jest rozdzielana między ziarno i serwatkę. Gdyby rozdział ten tłumaczyć lepszą rozpuszczalnością AFB₁ w wodzie, można byłoby oczekiwać większego stężenia AFB₁ w serwatce niż w ziarnie serowym. Jednak większość wyników badań wskazuje na wyższe stężenie toksyny w ziarnie aniżeli w serwatce. Ponieważ aflatoksyny są nierozpuszczalne w tłuszczu, zwiększenie zawartości tłuszczu w ziarnie może spowodować obniżenie stężenia toksyny w ziarnie. Wyniki badań nad możliwą asocjacją AFB₁ z białkami serwatkowymi nie potwierdziły tego zjawiska. Jedynym zatem wyjaśnieniem pozostaje asocjacja z kazeiną, a potwierdzają to jednoznacznie wyniki badań Bracketta i Martha (4). Autorzy ci pozyskaną z mleka kazeinę dializowali wobec ultrafiltratu mleka zawierającego AFB₁. Po 24 godz. dializy w temp. 7°C roztwór kazeiny zawierał 2,5 – 2,9 raza więcej toksyny niż ultrafiltrat mleka. AFB₁ nie jest wiązana kowalencyjnie z kazeiną, ponieważ może być wyekstrahowana; wiązana może być raczej przez hydrofobowe interakcje z hydrofobowymi powierzchniami kazeiny (3, 4).



Ryc. 3. Przemiana AFB₁ po działaniu różnymi czynnikami fizycznymi i chemicznymi

Ponieważ procesy przetwórcze mleka w zasadzie nie zmieniają lub tylko nieznacznie obniżają zawartość AFM₁, podjęto również badania nad zastosowaniem różnych fizycznych i chemicznych metod detoksyfikacji mleka z AFM₁. Badaniem objęto takie dodatki do mleka, jak: siarczyny, wodorosiarczyny oraz nadtlenek wodoru w kombinacji z ryboflawiną, lakto-peroksydazą lub naświetlaniem promieniami UV. Dotychczas zostało przetestowanych tylko kilka metod, lecz tylko niektóre z nich są obiecujące. Dalsze badania powinny uwzględniać różne metody degradacji toksyny w połączeniu z doбором właściwych parametrów przetwarzania mleka. Przykładem tego może być działanie na mleko promieniami UV w połączeniu z ultrafiltracją. Oplacalne może okazać się również usprawnienie enzymatycznych metod degradacji AFM₁ oraz szersze wykorzystanie do tego celu mikroorganizmów takich, jak bakterie kwasu mlekowego. Użyteczność i praktyczna aplikacja tych metod muszą być jednak jeszcze gruntownie badane (4).

Piśmiennictwo

1. Blanco J.L., Dominguez L., Gomez-Lucia E., Garayzabal J.F.F., Garcia J.A., Suarez G.: Appl. Environ. Microbiol. 54, 1622, 1988.

2. Domagala J.: Przem. Spoż. 47, 191, 1993.
3. Egmond van H.P.: Food Chemistry 11, 289, 1983.
4. Egmond van H.P.: Mycotoxins in Dairy Products. Elsevier Applied Sci. London - New York 1989.
5. Fukal L., Brezina P., Marek M.: Dt. Lebensm. Rundsch. 86, 289, 1990.
6. Heesch W., Blüthgen A.: Forschungsreport Ernährung, Landwirtschaft, Forsten 6, 3, 1991.
7. Ismail A.A., Tawfek N.F., Abd-Alla El Sayed A.M., El-Dairouty R.K., Sharaf O.M.: Dt. Lebensm. Rundsch. 85, 76, 1989.
8. Juszkiwicz T., Kozak A., Wiśniewska-Dmytrow H.: Medycyna Wet. 49, 251, 1993.
9. Nijhuis H., Blüthgen A., Heesch W.: Milchwiss. 37, 449, 1982.
10. Nijhuis H., Heesch W., Mühlhoff C.: Milchwiss. 38, 157, 1983.
11. Palmgren M.S., Hayes A.W.: Aflatoxins in Food w: Mycotoxins in Food. Academic Press Limited, 65-95, 1987.
12. Samarajewa U., Sen A.C., Cohen M.D., Wei C.I.: J. Food Prot. 56, 489, 1990.
13. Scott P.M.: Food Additives and Contaminants 6, 283, 1989.
14. Strzelecki E.L., Gąsiorowska U., Gorazdowska M., Cader-Strzelecka B., Pawełczak M.: Mycotoxin Res. 4, 89, 1989.
15. Tuinstra L.G.M.T., Kienhuis P.G.M., Dols P.: J. Ass. Off. Anal. Chem. 73, 969, 1990.

Adres autora: prof. dr hab. Jan Kisza, Kortowo 45c/7, 10-718 Olsztyn

MIROSLAW M. MICHALSKI, JOLANTA G. ROLA, KRZYSZTOF KWIATEK

Oporność cieplna szczepów *L. monocytogenes* wyizolowanych z mleka

Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from milk

Thermal resistance of *L. monocytogenes* strains that had been isolated from raw milk was determined in BHI broth. *L. monocytogenes* 1 were isolated from collected milk and *L. monocytogenes* 2 directly from a cow udder. The strains at concentration of approximately 1×10^6 cell ml^{-1} were heated at 55°, 60° and 65°C for various periods of time. Decimal reduction times for *L. monocytogenes* 1 were $D_{55} = 37.45$ min, $D_{60} = 2.63$ min., $D_{65} = 0.24$ min. and for *L. monocytogenes* 2 the data were 9.73, 0.98 and 0.17 respectively. Z-values were 4.79 and 5.56°C, respectively. The reports that *L. monocytogenes* can survive pasteurization temperature have not been confirmed.

W procesach przetwarzania żywności drobnoustroje chorobotwórcze, wywołujące zakażenia oraz zatrucia pokarmowe, muszą być inaktywowane przez ogrzewanie lub ich rozwój powinien być zahamowany poprzez jeden lub kombinację wielu czynników fizyko-chemicznych takich, jak: pH, aktywność wody (a_w), temperatura przechowywania czy też dodatków różnego rodzaju substancji chemicznych (np. azotan potasu, azotan sodu, askorbiniany, sól kuchenna, kwas benzoowy itp.) (17, 21, 22, 23).

W mleku i jego przetworach oraz w żywności tradycyjnej, o dużej zawartości wody, niejednokrotnie trudno jest ustalić skuteczność działania wielu czynników na mikroflorę znaj-

dującą się w produkcie spożywczym. Tak więc dla tego rodzaju żywności bardzo ważne są procesy cieplne tj. pasteryzacja lub sterylizacja. Produktem żywnościowym najczęściej spożywanym przez ludzi jest mleko i jego produkty. Jednym z ważniejszych drobnoustrojów chorobotwórczych występujących w mleku jest *Listeria monocytogenes*. Drobnoustroj ten ma zdolność rozwoju w niskich temperaturach i może być przyczyną zatruc pokarmowych. Wyniki badań monitoringowych w różnych krajach wskazują, iż od 1,75% do 56,2% badanych próbek mleka i przetworów mleczarskich zawierało *L. monocytogenes* (1, 3, 9, 10, 11, 13, 15, 19).

Prawidłowo przeprowadzony proces cieplny powinien w możliwie największym stopniu wyeliminować drobnoustroje znajdujące się w mleku przy maksymalnym zachowaniu jego wartości odżywczych i smakowych. Im więcej bakterii zostanie zabitych w trakcie tego procesu, tym bezpieczniejszy będzie produkt spożywczy z niego wyprodukowany. Stopień wyjałowienia zależy nie tylko od czasu i temperatury obróbki cieplnej, lecz również od liczby bakterii występujących w mleku i ich wrażliwości na działanie temperatury (2, 18, 21, 22, 23).

Ze względu na dużą oporność na większość czynników fizyko-chemicznych w środowisku mleka, obróbka termiczna wydaje się być najbardziej efektywną metodą dezaktywacji tego zarazka. Sygnalizowane przez niektórych autorów przypadki przeżywania przez *L. monocytogenes* procesów pasteryzacji skłoniły nas do podjęcia badań mających na celu określenie parametrów termobakteriologicznych tj. czasu re-