

Magdalena POLAK-ŚLIWIŃSKA, Andrzej KUNCEWICZ
Katedra Towaroznawstwa i Badań Żywności
Wydział Nauki o Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

Porównanie zawartości wybranych mikotoksyn w produktach zbożowych z upraw ekologicznych i konwencjonalnych

Streszczenie

Mikotoksyny wytwarzane głównie przez grzyby toksynotwórcze z rodzaju *Fusarium*, *Penicillium* i *Aspergillus* są postrzegane jako wysoce niebezpieczne tak w uprawie konwencjonalnej, jak i ekologicznej. Zdecydowana większość produktów spożywczych pochodząca z tych upraw to produkty zbożowe, będące często głównym źródłem mikotoksyn w paszy dla zwierząt i w diecie człowieka. Celem niniejszej pracy było porównanie zawartości wybranych mikotoksyn (ochratoxyny A, fumonizyn i zearalenonu) w produktach zbożowych pochodzących z upraw konwencjonalnych i ekologicznych, znajdujących się w obrocie handlowym na terenie Warmii i Mazur. Badaniami objęto próbki produktów zbożowych, takich jak mąki i makarony pod kątem obecności w nich ochratoxyny A (OTA), fumonizyn (FBs) i zearalenonu (ZEA). W badanych próbkach mąk z upraw ekologicznych stwierdzono większe zanieczyszczenie OTA niż w mąkach z upraw konwencjonalnych, natomiast mniejsze w przypadku zanieczyszczeń ZEA. Badanie poziomu występowania OTA i ZEA potwierdziło ich obecność w próbkach produktów ekologicznych odpowiednio w 10 % i 20 % oraz w 100 % próbek produktów konwencjonalnych. Zanieczyszczenie FB₁ i FB₂ konwencjonalnych mąk kukurydzianych było także 100 %. W żadnym przypadku nie stwierdzono przekroczenia najwyższych dopuszczalnych poziomów ustalonych dla analizowanych mikotoksyn.

Słowa kluczowe: mikotoksyny, zboża, przetwory zbożowe, żywność ekologiczna i konwencjonalna

The comparison of chosen mycotoxins in cereal products with conventional and ecological crops

Summary

Mycotoxins produced mainly by toxinogenic fungi of the genera *Fusarium*, *Penicillium* and *Aspergillus* are considered as highly dangerous in conventional and ecological crops. The vast majority of food products derived from these crops are cereal products, which are often the main source of mycotoxins in animal feed and human diet. The aim of this study was to compare the content of selected mycotoxins (ochratoxin A, fumonisins and zearalenone) in cereal products derived from conventional and ecological crops available on the market in the Warmia and Mazury region. The study included the samples of cereal products such as flours and pastas for the presence of ochratoxin A (OTA), fumonisins (FBs) and zearalenone (ZEA). The analyzed flours from ecological crops showed higher contamination by ochratoxin A (OTA) in comparison with products from conventional crops while smaller in the case of contamination by zearalenone (ZEA). Ochratoxin A (OTA) and zearalenone (ZEA) occurred in 10 % and 20 % of the samples from ecological crops, respectively and 100 % of the samples from conventional crops. The FB₁ and FB₂ contamination of conventional maize flour was also 100 %. In no case exceeding the maximum levels for analyzed mycotoxins.

Key words: mycotoxins, cereals, cereal products, ecological and conventional food

Wstęp

Infekcje upraw zbóż, wywołane przez fitopatogenne grzyby z rodzaju *Fusarium* oraz przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium*, obecne często podczas przetwarzania i przechowywania zbóż, prowadzą do pojawienia się w łańcuchu żywnościowym ich wtórnych metabolitów, określanych jako mikotoksyny (Engelhardt i in. 2006). Mikotoksyny stanowią grupę substancji toksycznych dla ludzi i zwierząt, wytwarzanych przez wiele gatunków grzybów toksynotwórczych w warunkach stresu środowiskowego, zwłaszcza, gdy dochodzi do zmian temperatury, dostępności tlenu czy zmian wilgotności (Stolarska, Janda 2004; Pławińska-Czarnak, Zarzyńska 2010; Stanisławczyk i in. 2010; Mruczyk, Jeszka 2013). W Polsce, są to w dużym stopniu produkty grzybów z rodzaju *Fusarium*, które należą do najczęściej izolowanych patogenów z upraw rolniczych w kraju,

ale także na świecie (Suchorzyńska, Misiewicz 2009; Szulc, in. 2012). Większość z mikotoksyn naturalnie zanieczyszcza przede wszystkim zboża i produkty zbożowe, co potwierdzone jest w wielu badaniach próbek mąk, makaronów, kaszy, chleba i in. produktów spożywczych (Bittencourt i in. 2005). Mikotoksyny produkowane przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, określane są, jako mikotoksyny fuzaryjne. Wyróżnia się trichoteceny A i B, fumonizyny oraz zearalenon wraz z pochodnymi. Wszystkie one charakteryzują się wysoką toksycznością w stosunku do mikroorganizmów, roślin, zwierząt oraz ludzi (Szulc i in. 2012). Badania mikotoksyn zanieczyszczających ziarno zbóż, na większą skalę, rozpoczęto w 1960 roku, co wiązało się z uprawą zbóż w monokulturze i oszczędnościowymi systemami uprawy (tzw. system minimum tillage). Spożycie przez

organizmy żywe zanieczyszczonego mikotoksynami ziarna może powodować choroby ludzi i zwierząt, zwane mikotoksykozami, które są problemem ogólnoswiatowym. Monitorowanie występowania mikotoksyn w zbożach i paszach jest utrudnione ze względu na punktowe ich występowanie w produkcji, co jest niezmiernie ważne przy pobieraniu próbek do badań (Korbas, Horoszkiewicz-Janka 2013). Stąd, utworzony w 2002 roku, system wczesnego ostrzegania o niebezpiecznej żywności i paszach RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed), stanowiący europejski system ostrzegania o niebezpiecznych produktach żywnościowych, obowiązujący we wszystkich krajach Unii, również obejmujący Norwegię, Lichtenstein i Islandię (Stankiewicz 2012). W skali naszego kraju, mikotoksynami uznanymi za istotne z punktu ekonomicznego i toksykologicznego są: ochratoksyna A, zearalenon, fumonizyny, jak też trichoteceny (głównie deoksyniwalenol). OTA jest mikotoksyną, którą zalicza się do substancji wytwarzanej przez grzyby przechowalnicze (bytujące po zbiorze, w trakcie niewłaściwego przechowywania ziarna zbóż, nasion oleistych i ich produktów) z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium*, wśród których *A. ochraceus* i *P. veru-cosum* wytwarzają jej najwięcej (Sekiyama i in. 2005; Belajová, Rauová 2007; Cabañas i in. 2008). Ochratoksyna A jest substancją o działaniu mutagennym, teratogennym i neurotoksycznym. Odegrała znaczącą rolę przy ustalaniu etiologii Bałkańskiej Endemicznej Nefropatii (BEN) (Castegnaro i in. 1987; Vrabcheva i in. 2000; Ziarno, Ujazdowska 2009). Występowanie OTA stwierdzono w zbożach, takich, jak: pszenica, kukurydza, jęczmień, żyto, owies, ryż czy sorgo, co nierozdzielnie związane jest z klimatem, a ściślej mówiąc z warunkami podczas żniw, zbiorów i przechowywania zbóż (Schollenberger i in. 2005a, 2005b, Ziarno, Ujazdowska 2009). Maksymalny dopuszczalny poziom (NDP) ochratoksyny A w produktach zbożowych, przeznaczonych do bezpośredniego spożycia przez ludzi, reguluje Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 1881/2006 i wynosi $3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Zearalenon (ZEA) charakteryzuje się estrogennym i anabolicznym oddziaływaniem na wiele gatunków zwierząt, głównie na trzodę chlewną, która jest najbardziej wrażliwa na ten ksenobiotyk. ZEA powoduje u tych zwierząt zapalenie sromu i pochwy, hiperplazję śluzówki macicy, jak również atrofię jąder u samców, wzrost gruczołu sutkowego i inne (Chang i in. 1979; Edwards i in. 1987; Haggler i in. 2001; Gajęcki i in. 2010). W odniesieniu do toksycznego oddziaływania ZEA u ludzi, stwierdzono przypadki przedwczesnego dojrzewania dzieci w wieku od 7 do 8 lat (Painter 1997; Shier i in. 2000) w Puerto Rico (Saenz De Rodriguez i in. 1985). ZEA wytwarzany jest głównie przez *Fusarium graminearum* i *Fusarium proliferatum* oraz *Fusarium culmorum* (Engelhardt i in. 2006). Zalecenie Komisji z 2006 roku ujmuje, że w przypadku zearalenonu, progi maksymalnej zawartości dla produktów zbożowych wynoszą $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, a dla produktów ubocznych kukurydzy $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Zalecenie Komisji WE nr 576/2006), przy czym dla zbóż i produktów zbożowych do bezpośredniego spożycia przez ludzi dopuszczalny maksymalny poziom ZEA jest dużo niższy i wynosi $75 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, a dla kukurydzy i produktów z kukurydzy do bezpośrednio spożycia przez ludzi, to $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 1126/2007). Fumonizyny (FBs) to najczęściej metabolity *Fusarium moniliforme* (Peraica i in. 1999). Fu-

monizyna B₁ stanowi główne zanieczyszczenie ziarna kukurydzy we wszystkich regionach jej uprawy i jest najczęściej występującą mikotoksyną w kolbach kukurydzy (Czerwiecki 1997). Aczkolwiek, istnieją też dowody na występowanie fumonizyn w innych produktach, m.in. ryż, piwo i makaron pszenny (Stępień i in. 2007). Porażenie kolb kukurydzy przez *F. subglutinans*, *Fusarium moniliforme*, *F. verticillioides* i *F. proliferatum* zwiększa się istotnie pod wpływem żerowania szkodników, które uszkadzają okrywe owocownasienną ziarniaków (Korbas, Horoszkiewicz - Janka 2013). Fumonizyny mogą wywoływać nowotwory przełyku i wątroby. Wykazują działanie neurotoksyczne, neurotoksyczne i immunosupresyjne (Stępień i in. 2007), stąd, tak istotna jest kontrola ich zawartości w żywności. Zagrożenie wystąpienia tej grupy mikotoksyn dotyczy zwłaszcza ziarna kukurydzy i produktów pochodnych (Szulc i in. 2012). Wyróżnia się fumonizynę: B₁, B₂ oraz B₃ (Stępień i in. 2007), przy czym fumonizyna B₁ (FB₁) jest najbardziej znacząca z punktu widzenia bezpieczeństwa i ochrony zdrowia ludzi oraz zwierząt (Scientific Committee On Food 2000; Bennett, Klich 2003). Mogą one być wytwarzane przed żniwami, jak i podczas wczesnego etapu suszenia ziarna (Czerwiecki 2007). Podobnie do innych mikotoksyn, wykazują oddziaływanie toksyczne w stosunku do wielu gatunków zwierząt oraz człowieka (Kluczek, Kojder 2000). Dopuszczalna zawartość fumonizyn (FBs) w produktach na bazie kukurydzy do bezpośredniego spożycia przez ludzi nie może przekraczać $1000 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, przy czym w płatkach śniadaniowych na bazie kukurydzy NDP wynosi $800 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, zaś w przetworzonej żywności na bazie kukurydzy oraz żywności dla niemowląt i małych dzieci NDP to $200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 1126/2007).

Cel badań

Celem pracy było porównanie zawartości wybranych mikotoksyn (ochratoksyna A - OTA, fumonizyn - FBs i zearalenonu - ZEA) w produktach zbożowych z upraw ekologicznych i konwencjonalnych.

Materiał i metody

Materiał do badań

W grupie produktów zbożowych w kierunku obecności wybranych mikotoksyn przebadano makarony i mąki z upraw ekologicznych i konwencjonalnych, które zakupiono na terenie Olsztyna. Zestawienie produktów poddanych badaniom przedstawiono w tabelach 1 i 2. W grupie mąk konwencjonalnych analizowane mąki kukurydziane pochodziły od 4 różnych producentów.

Izolowanie i oznaczanie ochratoksyny A

Do kolby stożkowej, o pojemności 250 ml, odważono $50\pm 0,1$ g zmielonego produktu zbożowego (makaron/mąka) z dodatkiem 5 g chlorku sodu. Próbkę ekstrahowano 100 ml 80% metanolu przez 30 minut. Ekstrakt sączono przez sączone bibułowy do kolbki Erlenmayera, o pojemności 100 ml i powtórzono ekstrakcję próbki 50 ml 80% metanolu, wstrząsając przez 15 minut. Uzyskany ekstrakt ponownie sączono przez sączone bibułowy do kolbki Erlenmayera, o pojemności 100 ml. Do dalszej analizy pobrano 15 ml klarow-

nego przesącza, który rozcieńczano 60 ml wody destylowanej. Po dokładnym wymieszaniu, roztwór sączono przez sączonek drobonowłóknisty. Następnie 15 ml przefiltrowanego ekstraktu naniesiono na złożę kolumnienki powinowactwa immunologicznego OchraStar™ (Romer Labs®). Toksynę eluowano z kolumnienki 1,5 ml metanolu, o czystości HPLC. Eluat zbierano do fiolki szklanej, z której odparowywano rozpuszczalnik w strumieniu azotu, w temperaturze 35°C. Pozostałość rozpuszczano w fazie ruchomej (0,5 ml) przygotowanej do analizy HPLC. Ekstrakty poddano analizie chromatograficznej. Wykorzystano chromatograf cieczerw Agilent Technologies 1200 (Waldbronn, Niemcy). Warunki analizy chromatograficznej były następujące: kolumna chromatograficzna Ascentis Express C18 (Supelco, USA) 150 × 3,0 mm, 2,7 μm, temperatura pracy kolumny: 30°C; faza ruchoma – woda : acetonitryl : kwas octowy (49,5: 49,5: 1 v/v/v); natężenie przepływu 0,5 ml·min⁻¹; objętość dozowana: 40 μl; detektor fluorymetryczny (FLD): λ_{ex} = 340 nm, λ_{em} = 470 nm.

Tabela 1. Zestawienie badanych produktów z upraw ekologicznych

Table 1. The list of analyzed products with ecological crops

Nr próbki; No of sample	Rodzaj produktu; Type of product
MAKARON; PASTA	
1	Razowy bio pszenny; Bio wholemeal wheat
2	Razowy bio orkiszowy – rurki; Bio wholemeal pelt - tubes
3	Razowy bio orkiszowy – świderki; Bio wholemeal pelt – spirals
4	Razowy bio żytni – świderki; Bio wholemeal rye – spirals
5	Razowy bio żytni – wstążki wstążki; Bio wholemeal rye - ribbons
MAKA; FLOUR	
1	Bio żytnia typ 2000; Bio rye type 2000
2	Bio pszenna typ 2000; Bio wheat type 2000
3	Bio orkiszowa typ 1850; Bio spelt type 1850
4	Bio graham typ 1850; Bio graham type 1850
5	Żytnia razowa typ 2000; Wholemeal rye type 2000
6	Żytnia chlebowa typ 720; Rye „chlebowa” type 720
7	Pszenna jasna typ 550; Wheat type 550
8	Pszenna razowa typ 2000; Wholemeal wheat type 2000
9	Kukurydziana; Corn
10	Kukurydziana bio; Bio corn

Tabela 2. Zestawienie badanych produktów z upraw konwencjonalnych

Table 2. The list of analyzed products with conventional crops

Nr próbki; No of sample	Rodzaj MĄKI; Type of flour
1	Pszenna typ 500; Wheat type 550
2	Kukurydziana 1; Corn 1
3	Pszenna typ 650; Wheat type 650
4	Pszenna typ 650; Wheat type 650
5	Kukurydziana 2; Corn 2
6	Kukurydziana 3; Corn 3
7	Kukurydziana 4; Corn 4

Izolowanie i oznaczanie fumonizyn B₁ i B₂

Przygotowanie mieszaniny reaktywnej OPA/MCE do derywatywacji

Roztwór OPA/MCE przygotowano poprzez rozpuszczenie 40 mg aldehydu o-ftalowego (OPA) w 1 ml metanolu, dodanie 5 ml 0,1 M tetraboranu sodu i 50 μl merkaptioetanolu (MCE). Po dokładnym wymieszaniu przygotowany odczynnik był trwały przez okres 1 tygodnia.

Przygotowanie próbek do badań na obecność fumonizyn

Próbki produktów zbożowych do badań (makaron/mąka) dokładnie rozdrobniano. Odważano 50 g produktu do kolby stożkowej o pojemności 250 ml. Do rozdrobnionej próbki dodawano 5 g chlorku sodu i 100 ml 80% alkoholu metylowego. Zawartość kolby wytrząsano przez 30 minut, a następnie przesączało przez sączonek karbowany. Pobierano po 5 ml przesącza, do którego dodawano 20 ml wody dejonizowanej. Całość ponownie przesączało przez sączonek drobonowłóknisty Whatman Nr 4. W celu wyodrębnienia z roztworu fumonizyn B₁ i B₂, 10 ml przesączonego ekstraktu nanoszono na kolumnkę powinowactwa immunologicznego Fumoni-Test™ (Romer Labs®). Fumonizynę B₁ i B₂ eluowano z kolumny za pomocą 1 ml metanolu. Eluat odparowywano w strumieniu azotu w temperaturze nieprzekraczającej 35°C. Po odparowaniu rozpuszczalnika, suchą pozostałość rozpuszczano w 0,1 ml mieszaniny acetonitryl – woda (1:1, v/v) i dokładnie mieszano na mieszadle typu Vortex. Następnie, w celu utworzenia pochodnych fumonizyn, do mieszaniny dodawano 0,2 ml mieszaniny reaktywnej OPA/MCE i ponownie mieszano na mieszadle typu Vortex. Po upływie 1 minuty od dodania mieszaniny reaktywnej OPA/MCE, próbkę bezpośrednio dozowano do kolumny chromatograficznej Zorbax Stable Bond C₈ (150 × 4,6 mm, 5 μm), pracującej w temperaturze 25°C. Pozostałe warunki analizy chromatograficznej: faza ruchoma: metanol – 0,1M diwodorofosforan sodu o pH= 3,35 (80:20 v/v); prędkość przepływu fazy ruchomej: 1ml·min⁻¹; objętość dozowania: 20 μl; detektor fluorymetryczny (FLD): λ_{ex} = 335 nm i λ_{em} = 440 nm.

Izolowanie i oznaczanie zearalenonu

Do kolby o pojemności 250 ml, odważano 25 g próbki, a następnie dodawano 5 g chlorku sodu. Ekstrakcję próbki przeprowadzano za pomocą 100 ml 80% alkoholu metyloвого, po czym wytrząsano przez 30 minut i filtrowano przez karbowany sączek. Następnie pobrano 10 ml przesączu, dodano 40 ml wody i całość ujednorodniono. Analit wyodrębniano z próbki, przepuszczając 10 ml tak przygotowanego ekstraktu przez złożę kolumnienki powinowactwa immunologicznego ZearaStar™ (Romer Labs®). Zearalenon eluowano dwoma porcjami metanolu o objętości 0,5 ml. Rozpuszczalnik odparowano w strumieniu azotu w temperaturze 50°C. Suchą pozostałość rozpuszczano w 0,5 ml fazy ruchomej. Ekstrakty analizowano za pomocą chromatografu cieczowego Agilent Technologies 1200 (Waldbronn, Niemcy). Warunki analizy chromatograficznej: kolumna chromatograficzna Discovery® HS, 150 × 4,6 mm, 3 μm; faza ruchoma: acetonitryl – metanol – woda (56: 4: 40 v/v); prędkość przepływu fazy ruchomej: 1 ml·min⁻¹; temperatura kolumny: 24 °C; objętość dozowania: 100 μl; detektor fluorymetryczny (FLD): λ_{ex} = 236 nm i λ_{em} = 440 nm.

Opracowanie wyników

Interpretację jakościową otrzymanych chromatogramów przeprowadzono poprzez porównanie czasu retencji każdej z analizowanych mikotoksyn w odpowiednim roztworze wzorcowym do czasu retencji danego analitu w próbce rzeczywistej. Analizę ilościową przeprowadzono poprzez odczyt zawartości badanej mikotoksyny w próbce z krzywej wzorcowej i właściwe obliczenia. Wyniki wyrażono w μg·kg⁻¹ produktu. Granicę wykrywalności wyznaczono dla próbek ślepych produktów zbożowych objętych badaniem oraz wyliczono, jako sumę średniej zawartości poszczególnej mikotoksyny w próbkach ślepych (\bar{x}) (n=5) i 6·s. Każdą próbkę analizowano w trzech równoległych powtórzeniach. Otrzymane wyniki opracowano statystycznie za pomocą testu Tukey'a, przy poziomie istotności p ≤ 0,05.

Wyniki i ich dyskusja

W przygotowaniu próbek produktów zbożowych do analizy wybranych mikotoksyn metodą HPLC postępowano wg aplikacji podanych przez firmę Romer Labs®, przy modyfikacji, polegającej na zmianie ilości naważki próbki i odczynników używanych do ekstrakcji. Obecność OTA analizowano w grupie makaronów i mąk ekologicznych. W tym celu do badań wybrano 5 rodzajów makaronu zaopatrzonego w znak certyfikacji wymagany dla produktu ekologicznego i 10 rodzajów mąk pochodzących z uprawy ekologicznej (tabela 1). We wszystkich analizowanych próbkach makaronów nie stwierdzono obecności OTA (LOD = 1 ng·kg⁻¹) (tabela 3).

Wśród 10 próbek mąk ekologicznych (tabela 4) analizowanych w kierunku obecności OTA mikotoksynę tę stwierdzono w 1 z 10 badanych próbek, przy czym zanieczyszczona próbka nr 2 (mąka Bio pszenna typ 2000) zawierała 2,075 μg·kg⁻¹ OTA, który to poziom jest bliski wartości NDP ustalony dla tej mikotoksyny. W pozostałych analizowanych próbkach mąki nie stwierdzono obecności OTA.

Tabela 3. Średnie stężenie ochratoxyny A (μg·kg⁻¹) w makaronach ekologicznych

Table 3. The average concentration of ochratoxin A (μg·kg⁻¹) in ecological pastas

Nr próbki; No sample	Rodzaj makaronu; Type of pasta	OTA [μg·kg ⁻¹]
1	Razowy bio pszenny; Bio wholemeal wheat	
2	Razowy bio orkiszowy – rurki; Bio wholemeal pelt - tubes	
3	Razowy bio orkiszowy – świderki; Bio wholemeal pelt – spirals	poniżej LOD; below LOD
4	Razowy bio żytni – świderki; Bio wholemeal rye – spirals	
5	Razowy bio żytni – wstążki; Bio wholemeal rye - ribbons	

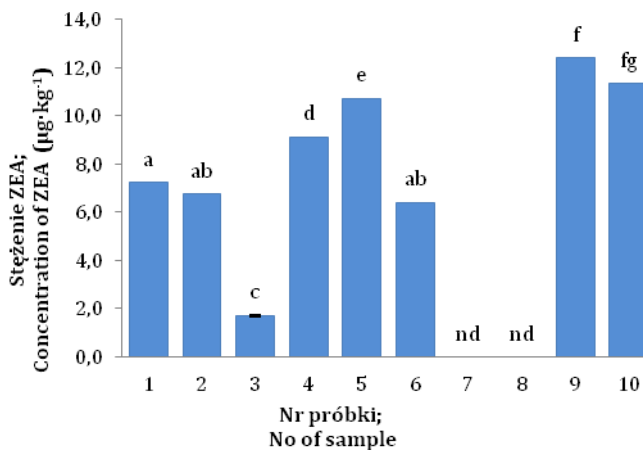
LOD – granica wykrywalności / the limit of detection

Tabela 4. Średnie stężenie ochratoxyny A ($\bar{x} \pm s$) (μg·kg⁻¹) w mąkach ekologicznych

Table 4. The average concentration of ochratoxin A ($\bar{x} \pm s$) (μg·kg⁻¹) in ecological flours

Nr próbki; No sample	Rodzaj mąki; Type of flour	OTA [μg·kg ⁻¹]
1	Bio żytnia typ 2000; Bio rye type 2000	poniżej LOD; below LOD
2	Bio pszenna typ 2000; Bio wheat type 2000	2,075±0,035
3	Bio orkiszowa typ 1850; Bio spelt type 1850	
4	Bio graham typ 1850; Bio graham type 1850	
5	Żytnia razowa typ 2000; Wholemeal rye type 2000	
6	Żytnia chlebowa typ 720; Rye „chlebowa” type 720	poniżej LOD; below LOD
7	Pszenna jasna typ 550; Wheat type 550	
8	Pszenna razowa typ 2000; Wholemeal wheat type 2000	
9	Kukurydziana; Corn	
10	Kukurydziana bio; Bio corn	

LOD – granica wykrywalności / limit of detection



Rys.1. Średnie stężenie ZEA ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) w mąkach ekologicznych

nd – nie wykryto;

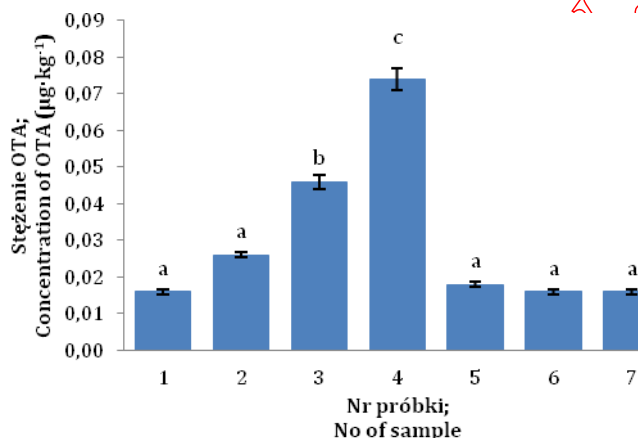
a, b, c... – średnie wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

Fig. 1. The average concentration of ZEA ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) in ecological flours

nd – not detected;

a, b, c... – average values indicated by different letters differ significantly at $p \leq 0,05$

Analiza mąk ekologicznych pod względem zanieczyszczenia drugą ważną mikotoksyną, czyli zearalenonem wykazała, iż produkty te nie są wolne od tej groźnej substancji, aczkolwiek poziom jej występowania był na dopuszczalnym poziomie. Spośród 10 badanych mąk tylko w 2 z nich nie wykryto ZEA (LOD = $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), natomiast w pozostałych produktach zawartość ZEA oscylowała w zakresie od $1,711 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ do $12,420 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (rysunek 1), przy czym tylko w próbce nr 2 i 6 (mąka Bio pszenna typ 2000 i mąka żytnia chlebowa typ 720) poziom zanieczyszczenia ZEA był zbliżony, w pozostałych próbkach wartości te różniły się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$).



Rys. 2. Średnie stężenie OTA ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) w mąkach konwencjonalnych

a, b, c – średnie wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

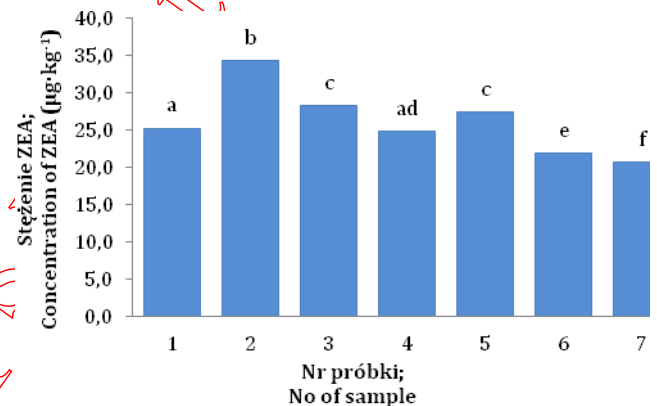
Fig. 2. The average concentration of OTA ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) in conventional flours

a, b, c – average values indicated by different letters differ significantly at $p \leq 0,05$

Obecność OTA stwierdzono we wszystkich badanych mąkach konwencjonalnych (rysunek 2). Jej poziom kształtował się w zakresie od $0,016 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ do $0,074 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Najwyższą jej zawartość wykryto w próbce nr 4 (mąka Bio graham typ

1850) – $0,074 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Spośród analizowanych produktów tylko w próbce nr 3 i 4 średnie stężenie OTA różniło się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$). W pozostałych próbkach poziom zanieczyszczenia tą mikotoksyną był zbliżony. W każdym analizowanym przypadku zanieczyszczenie OTA mieściło się w granicy dopuszczalnej, która uregulowana jest przez Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 1881/2006.

Inaczej przedstawiały się wyniki zanieczyszczenia ZEA (rysunek 3) próbek mąk konwencjonalnych, bowiem wszystkie badane mąki zawierały tę mikotoksynę na poziomie bliskim NDP, co wskazuje na potrzebę ciągłych kontroli odnośnie występowania tej mikotoksyny w żywności, a zwłaszcza w produktach zbożowych. Poziom zearalenonu wahał się w analizowanych mąkach od $20,651 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ do $34,321 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, przy czym nie przekroczył najwyższego dopuszczalnego poziomu zanieczyszczenia tą mikotoksyną, który w przypadku produktów zbożowych, takich jak mąki wynosi $75 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Rozporządzenie WE Nr 1126/2007). W próbce nr 3 i 5 oznaczone poziomy ZEA były zbliżone, w pozostałych próbkach mąk konwencjonalnych zawartość tej substancji była istotnie różna ($p \leq 0,05$).

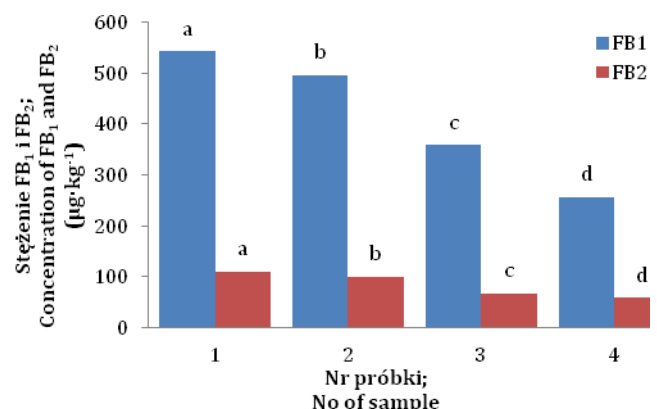


Rys. 3. Średnie stężenie ZEA ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) w mąkach konwencjonalnych

a, b, c, d... – średnie wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

Fig. 3. The average concentration of ZEA ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) in conventional flours

a, b, c, d... – average values indicated by different letters differ significantly at $p \leq 0,05$



Rys. 4. Średnie stężenie FB1 i FB2 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) w mąkach konwencjonalnych

a, b, c, d... – średnie wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

Fig. 4. The average concentration of FB1 and FB2 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) in conventional flours

a, b, c, d... – average values indicated by different letters differ significantly at $p \leq 0,05$

Badane próbki mąk konwencjonalnych analizowano także pod względem obecności fumonizyn FB_1 i FB_2 (rysunek 4). Badaniami objęto 4 konwencjonalne mąki kukurydziane różnych producentów, które różniły się istotnie pod względem zawartości poszczególnych fumonizyn ($p \leq 0,05$). Poziomy FB_1 i FB_2 w tym typie produktów kształtowały się odpowiednio: od 256,742 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ do 542,621 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ dla FB_1 , zaś dla FB_2 - od 57,552 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ do 110,352 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. W tego rodzaju produktach ustanowiono NDP dla sumy FB_1 i FB_2 wynoszący 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Wobec przedstawionych regulacji prawnych oznaczone w badaniach własnych poziomy fumonizyn pozwalają stwierdzić, iż ziarno kukurydzy, które wykorzystano do produkcji mąki mogło pochodzić z kolb porażonych przez patogeny, powodujące fuzariozę ziarniaków, wskazując tym samym na potrzebę stałego monitoringu produktów na bazie kukurydzy w kierunku ich obecności. Należy nadmienić przy tym, iż niebezpieczeństwo zanieczyszczenia ziarna mikotoksynami wzrasta, gdy przedplonem w uprawie zbóż jest kukurydza lub inna odmiana zboża wrażliwego na porażenie przez patogeny, jak na przykład *Fusarium graminearum*, co przyczynia się do zwiększenia inokulum fuzaryjnego w glebie (Korbas, Horoszkiewicz - Janka 2013). Uprawa zbóż po kukurydzy oraz kukurydzy po zbożach jest w tym kontekście bardzo niebezpieczna i wpływa znacząco na wielkość plonu oraz jego jakość, co przedkłada się także na jakość produktów zbożowych. Stąd istotna jest pielęgnacja poźniwna, gdyż w każdym ziarniaku od momentu zbioru zachodzi końcowa faza dojrzewania fizjologicznego ziarna (tzw. dojrzewanie poźniwne), które to ziarniaki intensywnie oddychają i wydzielają ciepło oraz wilgoć. Przewietrzanie ziarna, dbałość o wymaganą bezpieczną wilgotność i temperaturę ziarna oraz powietrza w przestrzeniach międzyziarnowych jest dużym zabezpieczeniem przed pojawianiem się w nim mikotoksyn. Stanisławczyk i in. (2010) wykazali największe stężenie OTA w ziarnie zbóż (1,23 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) i w mące (1,44 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Natomiast w analizowanych próbkach makaronu ok. 7% materiału było zanieczyszczone OTA na poziomie przekraczającym zalecaną wartość, w przeciwieństwie do wyników otrzymanych w badaniach własnych. Oznaczone poziomy ZEA w ziarnie zbóż (żyto, pszenica) i przetworach zbożowych (mąka, kasze, makarony i płatki owsiane) nie przekroczyły przyjętego dopuszczalnego stężenia tej mikotoksyny, co też potwierdzono w prezentowanych rezultatach badań. W publikacji Rybińskiej i in. (2008) przedstawiono wyniki oceny zanieczyszczenia mikotoksynami różnych produktów spożywczych wykonane w 2006 roku, które to badania były konieczne do realizacji postanowień obowiązujących przepisów i planowanych przez Komisję Europejską zmian w ramach krajowych badań monitoringowych w laboratoriach Państwowej Inspekcji Sanitarnej. Dotyczyły one m.in. oznaczenia poziomu zanieczyszczenia toksynami *Fusarium*, czyli deoksyniwalenolem (DON), zearalenonem (ZEA) oraz fumonizynami B_1 (FB_1) i B_2 (FB_2) żywności pochodzącej z obrotu handlowego (produkty otrzymane z kukurydzy, produkty zbożowe, produkty dla niemowląt i małych dzieci) oraz od producentów (surowiec). W przypadku fumonizyn wykazano 2-krotne przekroczenie poziomu NDP w mące kukurydzianej oraz w kaszce kukurydzianej, czego

nie potwierdzają badania własne, choć poziom występowania fumonizyn był znaczący. W 72 próbkach produktów przeznaczonych dla dzieci nie stwierdzono przekroczenia NDP ustalonego dla ZEA (Rybińska i in. 2008). W grupie produktów zbożowych przebadano 105 próbek w kierunku fumonizyn B_1 i B_2 , zaś 138 zbadano w kierunku DON i ZEA. W jednej próbce oznaczono poziom FBs przekraczający NDP (popcorn - suma FB_1 i FB_2 1100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). W przypadku DON zanieczyszczone były 4 próbki, zaś w przypadku ZEA - 2 (Rybińska i in. 2008). Mruczyk i Jeszka (2013) przeprowadzili analizę produktów zbożowych z upraw konwencjonalnych i ekologicznych w kierunku obecności OTA i ZEA. Badania wskazały, iż ochratoksyna A (OTA) stanowiła zanieczyszczenie 12 z 19 próbek produktów (63,13%) pochodzących z upraw ekologicznych i 9 z 19 próbek produktów (47,37%) pochodzących z upraw konwencjonalnych. Średnie stężenie tej toksyny w produktach ekologicznych i konwencjonalnych wynosiło odpowiednio 3,22 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ i 1,03 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Zearalenon wykryto w 1 próbce pochodzącej z uprawy ekologicznej oraz w 3 próbkach z uprawy konwencjonalnej, co stanowiło odpowiednio 5,29% i 15,79%. Solarska i in. (2012) analizowali produkty na bazie orkiszu z upraw ekologicznych w kierunku obecności ochratoksyny A, aflatoksyn, deoksyniwalenolu, zearalenonu i toksyny T-2, posługując się metodą ELISA. Badania wykonane w 2010 roku dowiodły o zanieczyszczeniu tych produktów OTA i ZEA na poziomie, odpowiednio, 6% i 8%, przy czym największy poziom zanieczyszczenia stwierdzono w przypadku DON. Jak dowodzą dane literaturowe i wyniki badań własnych, zarówno zbożowe produkty ekologiczne, jak i konwencjonalne nie są wolne od zagrożenia tymi wtórnymi grzybowymi metabolitami. Jednak pełne spektrum mikotoksyn najczęściej stwierdza się w produktach powstałych z przemiału zbóż, tj. owsa, pszenicy czy żyta - w otrębach. W skład otrąb wchodzi bowiem zewnętrzna okrywa ziarna, w której występuje największa zawartość mikotoksyn (Schollenberger i in. 2005A). Złe warunki przechowywania ziarna, głównie wysoka wilgotność i brak wentylacji magazynów powodują korzystne warunki do rozwoju grzybów toksynotwórczych, a tym samym duże prawdopodobieństwo zanieczyszczenia ziarna i produktów zbożowych mikotoksynami, które w efekcie mogą wykazywać oddziaływanie synergistyczne w organizmach ludzi i zwierząt (Solarska i in. 2012). Wykrywanie przekroczeń dopuszczalnych poziomów zanieczyszczenia poszczególnymi mikotoksynami zwłaszcza w żywności specjalnego przeznaczenia wskazuje na dużą potrzebę, a nawet konieczność wdrożenia odpowiednich działań zmierzających do wyeliminowania zagrożeń mikotoksynowych przez producentów i przedsiębiorców branży spożywczej, zwłaszcza przed wprowadzeniem produktu na rynek.

Wnioski

1. Analiza próbek zbożowych produktów ekologicznych i konwencjonalnych w kierunku obecności ochratoksyny A (OTA) wykazała 100% zanieczyszczenie OTA próbek mąk i makaronów pochodzących z upraw konwencjonalnych, przy czym w 1 z 10 badanych próbek mąk ekologicznych poziom występowania OTA był najwyższy.

2. Większą zawartość zearalenonu (ZEA) stwierdzono w produktach zbożowych konwencjonalnych w porównaniu z produktami z upraw ekologicznych.
3. Suma fumonizyny B₁ (FB₁) i fumonizyny B₂ (FB₂) oznaczona w konwencjonalnych mąkach kukurydzianych nie przekroczyła zalecanej wartości NDP dla tego rodzaju produktów.
4. Na podstawie przeprowadzonych badań można przypuszczać, iż zbożowe produkty typu mąki i makarony dostępne na terenie Warmii i Mazur są prawdopodobnie bezpieczne do spożycia pod względem występowania OTA, FBs i ZEA, o czym świadczy brak przekroczenia najwyższego dopuszczalnego poziomu każdej z badanych mikotoksyn.

Literatura

1. Belajová E., Rauová D. 2007. *Determination of ochratoxin A and its occurrence in wines of Slovakian retail*. Journal of Food and Nutrition Research, 46(2): 68-74.
2. Bennett J.W., Klich M. 2003. *Mycotoxins*. Clinical Microbiology Review, 36: 497-516.
3. Bittencourt A.B.F., Oliveira C.A.F., Dilkin P., Corrêa B. 2005. *Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo*, Brazil Food Control, 16: 117-120.
4. Cabañas R., Bragulat M.R., Abarca M.L., Castellá G., Cabañas F.J. 2008. *Occurrence of Penicillium verrucosum in retail wheat flours from the Spanish market*. Food Microbiology, 25: 642-647.
5. Castegnaro M., Barstch H., Chernozemsky I. 1987. *Endemic nephropathy and urinary tract tumors in the Balkans*. Cancer Res. 47: 3608-3609.
6. Chang K., Kurtz H.J., Mirocha C.J. 1979. *Effects of the mycotoxin zearalenone on swine reproduction*. American Journal of Veterinary Research, 40: 1260-1267.
7. Czerwiecki, L. 2007. *Mikotoksyny w ziarnie zbóż i co dalej?* Przegląd Zbożowo – Młynarski, 51(10): 25-27.
8. Edwards S., Cantley T.C., Day B.N. 1987. *The effects of zearalenone on reproduction in swine II*. Theriogenol. 28: 51-58.
9. Engelhardt G., Barthel J., Sparrer D. 2006. *Fusarium mycotoxins and ochratoxin A in cereals and cereal products*. Molecular Nutrition & Food Research, 50: 401-405.
10. Gajęcki M., Gajęcka M., Jakimiuk E., Zielonka Ł., Obremski K. 2010. *Zearalenone: Undesirable substance*. in: Rai M., Varma A., Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons. Springer: 131-144.
11. Haggler W.M. JR., Towers N.R., Mirocha C.J., Eppley R.M., Bryden W.L. 2001. *Zearalenone: Mycotoxin or mycoestrogen? Fusarium*: Nelson P.E. Memorial Symposium, edited by Summerell B.A., Leslie J.F., Bachouse D., Bryden W.L., Burges L.W. (St. Paul: APS Press): 321-331.
12. Kluczek J.P., Kojder A. 2000. *Mikotoksyny w zarysie*. Wydawnictwo Uczelniane Akademii Techniczno-Rolniczej, Bydgoszcz, 120-151.
13. Korbas M., Horoszkiewicz-Janka J. 2013. *Zapobieganie powstawaniu mikotoksyn – rośliny rolnicze*. Ekspertyza, Instytut Ochrony Roślin Państwowy Instytut Badawczy. Poznań (dostęp 2.12.2013)
<http://www.minrol.gov.pl/pol/layout/set/print/content/download/44252/244088/file/Ekspertyza-doradca.pdf>
14. Mruczyk K., Jeszka J. 2013. *Porównanie zawartości ochratoksyny A (OTA) i zearalenonu (ZEA) w produktach zbożowych z upraw ekologicznych i konwencjonalnych*. Nauka Przyroda Technologie, 7(3): 48.
15. Painter K. 1997. *Puberty signs evident in 7-and 8-year old girls*. USA Today, April 8, P.A-1.
16. Peraica M., Radic B., Lucic A., Pavlovic M. 1999. *Toxic effects of mycotoxins in humans*. Bulletin of the World Health Organization, 77 (9): 754-766.
17. Pławińska – Czarnak J., Zarzyńska J. 2010. *Mikotoksyny w żywności pochodzenia zwierzęcego*. Mikologia Lekarska, 17(2): 129.
18. Rozporządzenie Komisji (WE) NR 1126/2007 zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych w odniesieniu do toksyn Fusarium w kukurydzy i produktach z kukurydzy. (Dz. U. WE L 255/14-17).
19. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych. (Dz. U. WE L 364/5-24).
20. Rybińska K., Postupolski J., Lendzion E., Kurpińska-Jaworska J., Szczesna M. 2008. *Programy monitoringowe realizowane przez Państwową Inspekcję Sanitarną w zakresie zanieczyszczenia wybranych środków spożywczych mikotoksynami*. Roczniki PZH, 59(1): 1-7.
21. Saenz De Rodriguez C.A., Bangiovanni A.M., Conde De Borrego D. 1985. *An epidemic of precocious development in Puerto Rican children*. Journal Pediatrics, 393-396.
22. Schollenberger M., Drochner W., Ruffle M., Suchy S., Terry – Jara H., Muller H.M. 2005A. *Trichothecene toxins in different groups of conventional and organic bread of the german market*. Journal of Food Composition and Analysis, 18: 69-78.
23. Schollenberger M., Muller H.M., Ruffle M., Suchy S., Planck S., Drochner W. 2005B. *Survey of Fusarium toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany*. International Journal of Food Microbiology, 97: 317-326.
24. Scientific Committee On Food. 2000. *Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium toxins Part 31: Fumonisin B₁ (FB₁)*. SCF/CS/CNTM/MYC/ 24 FINAL (17.10.2000).
25. Sekiyama B.L., Ribeiro A.B., Machinski P.A., Machinski Junior M. 2005. *Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in maize-based food products*. Brazilian Journal of Microbiology, 36: 289-294.
26. Shier W.T., Shier A.C., Xie W., Mirocha C.J. 2000. *Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins*. Toxicon, 39: 1435-1438.
27. Solarska E., Marzec M., Kuzdraliński A., Muszyńska M. 2012. *The occurrence of mycotoxins in organic spelt products*. Journal of Plant Protection Research, 52 (2): 190-195.
28. Stanisławczyk R., Rudy M., Świątek B. 2010. *Występowanie mikotoksyn w zbożach i przetworach zbożowych znajdujących się w placówkach handlowych województwa podkarpackiego*. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 6 (73): 58-66.
29. Stankiewicz D. 2012. *System wczesnego ostrzegania o niebezpiecznej żywności i paszach RASFF*. Analizy BAS, 11(78): 1-6.
30. Stępień M., Sokół-Leszczyńska B., Łuczak M. 2007. *Mikotoksyny, produkty spożywcze a zdrowie człowieka*. Postępy Mikrobiologii, 46(2): 167-177.

31. Stolarska A., Janda K. 2004. *Zagrożenia dla zbóż – grzyby strzępkowe*. Przemysł Spożywczy, 11: 56–57.
32. Suchorzyńska M., Misiewicz A. 2009. *Mikotoksynotwórcze grzyby fitopatogeniczne z rodzaju Fusarium i ich wykrywanie technikami PCR*. Postępy Mikrobiologii, 48 (3): 221–230.
33. Szulc P., Kruczek A., Bocianowski J., Waśkiewicz A., Beszterda M., Goliński P. 2012. *Ocena poziomu stężeń fumonizyn w różnych odmianach kukurydzy*. Progress in Plant Protection, 52(2): 310–313.
34. Vrabcheva T., Usleber E., Dietrich R., Märtilbaver E. 2000. *Co-occurrence of Ochratoxin A and Citrinin in Cereals from Bulgarian Villages with a History of Balkan Endemic Nephropathy*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 2483–2488.
35. Zalecenie Komisji (WE) nr 576/2006 z dnia 17 sierpnia 2006 r. w sprawie obecności deoksyniwalenolu, zearalenonu, ochratoksyny A, T-2 i HT-2 oraz fumonizyn w produktach przeznaczonych do żywienia zwierząt. (Dz. U. WE L 229/7 – 9).
36. Ziarno M., Ujazdowska M. 2009. *Ochratoksyna w żywności*. Przemysł Spożywczy, 63: 21–25.

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2009-2011, jako projekt badawczy własny nr N N312 439837

Magdalena Polak-Śliwińska
Uniwersytet Warmińsko – Mazurski w Olsztynie
Wydział Nauki o Żywności
Katedra Towaroznawstwa i Badań Żywności
10-957 Olsztyn, Pl. Cieszyński 1
tel. (0-89) 523-45-84
e-mail: m.polak@uwm.edu.pl