

MYQET DHE MYKOTOKSINAT NË DISA PRODUKTE USHQIMORE PËR FOSHNJË

*DHAMO K.¹, SHABANI L.²

Universiteti Aldent, Departamenti i Farmacisë

Universiteti i Tiranës, Fakulteti i Shkencave të Natyrës, Departamenti i Kimisë
Industriale

e-mail: klodiola.dhamo@fshnstudent.info

Përmbledhje

Aflatoksinat janë një nga mbi 200 mykotoksinat e njohura të prodhuara nga myqet. Ato janë toksike, kancerogjene, mutagjene. Mund të jenë të pranishme në shumë produkte ushqimore të përpunuara dhe të papërpunuara, duke përfshirë drithërat dhe qumështet e përdorura si ingredientë në produktet ushqimore për foshnje. Konsumi i tyre mund të përbëjë një rrezik potencial për shëndetin e foshnjave. Në këtë punim u përcaktua mykoflora e 53 mostrave të ushqimeve tregtare për fëmijë të pranishme në Shqipëri. Ushqimet u shqyrtuan për prani dhe nivel të mykotoksinave duke përdorur kromatografinë në shtresë të hollë (TLC). Në mostrat e analizuar u izoluan rreth njëzet shtame myqesh, të përbëra kryesisht nga *Aspergillus. Spp*, *Penicillium. spp*, dhe dy specie të paidentifikuara. Një pjesë e mirë e tyre rezultuan toksikogjene, megjithatë vetëm 2.4% e mostrave përmbanin aflatoksina në nivel $5-10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ dhe se pjesa e mbetur përmbante nivele të ulëta të toksinave. Rezultatet tregojnë rëndësinë e regjimit periodik të testimi të përbërësve në ushqimet foshnjore për praninë e ndotjes mykotike.

Abstract

Aflatoxins, are one of over 200 known mycotoxins produced by mold. They are toxic, carcinogenic, and mutagenic and may be present in many raw and processed food commodities including cereals and milk used as ingredients in infant food products. Consumption of these commodities may pose a potential risk to the health of infants. The mycoflora of 53 samples of baby food commercially available in Albania was determined. The samples were screened for mycotoxin presence using thin layer chromatography (TLC). Twenty mold strains were recovered from the samples consisting of *Aspergillus. spp*, *Penicillium. spp*, and two unidentified species. Some of these were found to be mycotoxigenic however only 2.4% of the food samples contained aflatoxins ($5-10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and the remaining contained low levels of the toxin. The results show the importance of periodic testing regime of ingredients used infant food formula for the presence of fungal contamination.

Fjalëkyçe : mykotoksina, aflatoksina, TLC, ushqime foshnjore.

Hyrje

Produktet ushqimore për fëmijë, kanë qënë të lidhura me sëmundje serioze dhe vdekje të foshnjave për shkak të infeksioneve mikrobike. Drithërat, produktet e qumështit, frutat dhe frutat e thata janë disa nga materialet e përdorura në

formulimin e ushqimit për fëmijë të vegjël. Mykotoksinat prodhohen nga gjini të myqeve, veçanërisht *Penicillium*, *Aspergillus* dhe *Fusarium*, ato njihen si një problem shëndetësor në të gjithë botën veçanërisht në vendet me temperaturë të lartë ambientale dhe lagështi relative tipike të vendeve tropikale. Një vëmendje e madhe i duhet dhënë myqeve aflatoksigenike si *Aspergillus flavus* dhe *Aspergillus parasiticus*. Aflatoksinat prodhohen në natyrë sidomos nga *Aspergillus flavus* dhe *Aspergillus parasiticus*. Kur aflatoksinat gëlltiten nga lopët me qumësht, një pjesë (rreth 1.5%) hidroksilotohet dhe ekskretohet në qumësht, komponimet kanë toksicitetet më të ulët se molekulat mëmë, por e rëndësishme për shkak të konsumit të gjerë të qumështit të lopës nga foshnjat. (Creppy, 2002).

Karcinogjenët mund të jenë të pranishëm në shumë ushqime të përpunuara dhe të papërpunuara. Midis tyre drithërat dhe qumështi janë shumë të ndjeshëm ndaj ndotjes me mykotoksina dhe janë përdorur shpesh si përbërës në shumë produkte ushqimore për fëmijë të vegjël (Pittet, 1998). Konsumi i tyre mund të përbëjë një rrezik potencial për shëndetin e foshnjeve (Creppy, 2002; Van Egmond, 2002). Prania e aflatoksinave në dietën e foshnjeve është një shqetësim i madh. Studimet tregojnë se sensibiliteti për aflatoksin është më i madh në fëmijët e vegjël (Polychronaki 2007; Polychronakiab 2006). Aflatoksinat janë rezistente ndaj trajtimit termik, pasterizimit, sterilizimit dhe varieteteve të tjera të procedurave të përpunimit të ushqimeve (Barug, 2003; Van Egmond 2002). Pra, për të prodhuar produkt me cilësi të lartë është thelbësore të mbrohen lëndët e para nga kontaminimi.

Materiali dhe metodat

Ekzaminimi mykologjik i mostrave të ushqimit për fëmijë

Lagështia dhe temperatura e lartë favorizon rritjen e myqeve në prodhimet ushqimore, për këtë arsye ndikon dhe në prodhimin e mykotoksinave. Qëllimi i studimit ishte përcaktimi i mykoflorës së një sërë ushqimesh tregtare për fëmijë, dhe vlerësimi i aftësisë së tyre toksikogjenike, duke përcaktuar gjithashtu sintezën dhe nivelin e aflatoksinave në mostra. Rezultatet nga ky studim do të ndihmojnë për të kuptuar mykoflorën e përgjithshme të pranishme në produktet ushqimore për fëmijë që qarkullojnë në tregun shqipëtar dhe rrezikun e pranisë së mykotoksinave në to.

Janë analizuar pesëdhjetë e tre mostra ushqimesh për fëmijë që u mblodhën nga disa burime. Mostrat janë riekzaminuar për florën mykotike të ruajtura në 28 ° C për 7 ditë. Për izolimin, numërimin dhe identifikimin e myqeve është përdorur metoda e hollimeve limite. Të gjitha testet janë kryer në tri kopje. Kolonitë u numëruan dhe shprehën në cfu/g produkt. Mesatarja është llogaritur duke përdorur Microsoft Office Excel 2008. Mostrat u rihidratuan me tretës, ujë steril dhe u kultivuan në terrene përkatëse: malt ekstrakt agar dhe patate dekstrozë

agar. Pjatat u mbajtën në inkubator në 28 ° C për 5-7 ditë. (Barug, 2003; Van Egmond 2002)

Shqyrtimi i kromatografisë në shtresë të hollë (TLC)

Në terrenin malt ekstrakt agar dhe patate dekstroze agar u zhvilluan dhe u rritën rreth njëzet shtame ose izolate të ndryshme myqesh. Pjatat e petrit me kulturë u inkubuan në 28 ° C për 7 ditë dhe u shqyrtuan për sintezë të mykotoksinave duke përdorur teknikën TLC (Candlish, 2012). Pjesët e terrenit të ngurtë me agar janë përgatitur nga prerja e kolonive të micelit mykor në një diametër prej 5 mm.

Ato u trajtuan me 2 ml metanol për ekstraktimin e toksinës nga myqet dhe u centrifuguan për 30 sekonda. Ekstraktet (10 µL) u vunë në pllaka TLC (20 X 20 cm, Merck) të veshura me 0.25 mm shtresë të hollë xhel silici. Më pas, u përdorën si standarde 10 µL mykotoksin, në total: aflatoksina, okratoksin A dhe citrinin, të cilat u pikuan së bashku me mostrat e ekstrakteve të myqeve. Pllakat u zhvilluan në një kamer me sistem shtegëtues që përmban acetat etili-acid formik-toluen (05:04:01) për 1 orë dhe u panë nën dritën UV në gjatësi vale 365 nm (Hans & Walter, 1986).

Rezultatet dhe diskutimi

Prania e myqeve në produktet ushqimore për fëmijë

Një sasi prej 53 mostrash ushqimesh për fëmijë, fillimisht u analizuan për praninë e myqeve dhe më pas për metabolitë të prodhuar nga myqet e izoluar. Tabelat 1, 2 dhe 3 tregojnë numrin e myqeve në produktet e testuara para dhe pas ruajtjes së mostrave në 28 ° C për 7 ditë. Në produktet të cilat rezultuan pozitive për praninë e myqeve 2, 3 myqe në pjata petri deri 4,5cfu/g kolonive të zhvilluara (cfu/g).

Nga mostrat e analizuar u vu re prania e myqeve nga gjinitë *Aspergillus spp*, *Penicillium spp*, por nuk u kryen studime të mëtejshme morfologjike - biokimike për ti klasifikuar ato në nivel specish. Me përjashtim të rasteve kur identifikimi i specit është i qartë nga tiparet fenotipike, kulturele për izolatet e *Aspergillus niger* dhe *Aspergillus flavus*. Njëzet nga format mykore të izoluar i përkasin: *Aspergillus spp*. (pesë izolate) dhe *Penicillium spp*, (trembëdhjetë izolate), ndersa dy koloni u raportuan të pa identifikuar. U vu re një rritje e numërimit të myqeve në shumicën e mostrave pas 7 ditësh inkubimi në 28°C.

Tabela 1. Numri total i myqeve për mostrat nga 1-23 para dhe pas ruajtjes në 28°C për 7 ditë

Numri i mostrave	Përbërësit kryesorë	Ruajtja në temp. dhome (21°C ± 1°C)	Ruajtja në 28°C për 7 ditë
		Numri total i myqeve CFU/g	Numri total i myqeve CFU/g
1	Miell orizi, maltodekstrin.	0	0
2	Miell orizi, maltodekstrin.	2	3
3	Miell gruri, sheqer, perime.	3	4
4	Miell gruri, perime.	3	4
5	Miell orizi me fruta të thata	3	4
6	Miell orizi, maltodekstrin	4	5
7	Miell orizi, maltodekstrin	2	3
8	Drithëra me qumësht	2	3
9	Miell orizi me qumësht	2	3
10	Miell orizi me qumësht	0	0
11	Miell orizi, maltodekstrin	0	1
12	Miell orizi, maltodekstrin	0	0
13	Miell gruri, banane, qumësht i skremuar pluhur, qumësht pluhur, ekstrakt malti, yndyrë qumështi	3	3
14	Miell gruri, perime (karrota, domate, spinaq), qumësht i skremuar pluhur, ekstrakt malti, yndyrë qumështi	2	3
15	Miell gruri, niseshte misri.	2	3
16	Qumësht, drithëra, portokall dhe mjalt, qumësht i skremuar, miell gruri.	3	3
17	Miell orizi.	3	4
18	Miell gruri, niseshte misri.	3	4

19	Miell gruri, niseshte misri.	2	3
20	Miell gruri, niseshte misri.	3	4
21	Miell gruri, niseshte misri.	4	5
22	Miell orizi.	0	0
23	Miell gruri, niseshte misri.	4	4

Tabela 2. Numri total i myqeve për mostrat nga 24-36 para dhe pas ruajtjes në 28°C për 7 ditë

Numri i mostrave	Përbërësit kryesorë	Ruajtja në temp. dhome (21°C ± 1°C)	Ruajtja në 28°C për 7 ditë
		Numri total i myqeve CFU/g	Numri total i myqeve CFU/g
24	Qumësht, drithëra, portokall dhe mjalt, qumësht i skremuar, miell gruri.	4	4
25	Qumësht, drithëra, portokall dhe mjalt, qumësht i skremuar, miell gruri..	1	5
26	Miell gruri, qumësht pluhur i skremuar, banane, malt ekstrakt, yndyrë qumështi.	4	5
27	Miell gruri, banane, qumësht i skremuar pluhur, ekstrakt malti, yndyrë qumështi.	0	1
28	Miell orizi.	4	5
29	Miell gruri, perime (karrota, domate, spinaq), qumësht i skremuar pluhur, ekstrakt malti, yndyrë qumështi	4	4
30	Drithëra me qumësht	5	5

31	Qumësht, drithëra, portokall dhe mjalt, qumësht i skremuar, miell gruri..	4	5
32	Miell gruri, qumësht pluhur i skremuar, banane, malt ekstrakt, yndyrë qumështi.	4	5
33	Miell gruri, banane, qumësht i skremuar pluhur, ekstrakt malti, yndyrë qumështi.	0	0
34	Miell orizi me qumësht	0	2
35	Miell orizi me qumësht	1	2
36	Qumësht, drithëra, portokall dhe mjalt, qumësht i skremuar, miell gruri	4	4

Tabela 3. Numri total i myqeve për mostrat nga 37-53 para dhe pas ruajtjes në 28°C për 7 ditë

Numri i mostrave	Përbërësit kryesorë	Ruajtja në temp. dhome (21°C ± 1°C)	Ruajtja në 28°C për 7 ditë
		Numri total i myqeve CFU/g	Numri total i myqeve CFU/g
37	Qumësht, drithëra, portokall dhe mjalt, qumësht i skremuar, miell gruri.	4	4
38	Qumësht, drithëra, portokall dhe mjalt, qumësht i skremuar, miell gruri	5	5
39	Qumësht i skremuar, miell gruri, koncentrat frutash (portokall, banane, limon).	0	1
40	Qumësht i skremuar, miell gruri, koncentrat frutash (portokall, banane, limon).	0	0

41	Qumësht i skremuar, miell gruri, koncentrat frutash (portokall, banane, limon).	0	0
42	Miell gruri, perime.	0	2
43	Miell gruri, perime.	0	0
44	Miell gruri, perime.	4	4
45	Qumësht, drithëra, portokall dhe mjalt, qumësht i skremuar, miell gruri	4	5
46	Qumësht i skremuar, miell gruri, koncentrat frutash (portokall, banane, limon).	0	0
47	Qumësht i skremuar, miell gruri, koncentrat frutash (portokall, banane, limon).	0	0
48	Miell gruri, perime.	0	4
49	Miell gruri, perime.	0	3
50	Miell gruri, banane, qumësht i skremuar pluhur, qumësht pluhur, ekstrakt malti, yndyrë qumështi.	5	5
51	Miell orizi, maltodekstrin.	5	6
52	Miell gruri, perime (karrota, domate, spinaq), qumësht i skremuar pluhur, ekstrakt malti, yndyrë qumështi	5	5
53	Drithëra me qumësht	5	5

Numri i myqeve në produktet e testuara para dhe pas ruajtjes së mostrave në 28 ° C për 7 ditë. Në produktet të cilat rezultuan pozitivë për praninë e myqeve, numërimi minimal dhe maksimal është nga 3 deri në 5 cfu/g.

Prania e myqeve toksikogjenike dhe mykotoksinave në produktet ushqimore për fëmijë

Mykotoksinat e prodhuara nga shtamet e izoluar tregohen në Tabelat 4 dhe 5. Kromatografia në shtresë të hollë tregon se të gjitha llojet e *Aspergillus* spp të izoluar ishin në gjendje të prodhonin aflatoksina, shtatë nga trembëdhjetë llojet e *Penicillium* spp ishin mykotoksinë pozitive dhe shumica e mostrave ishin në gjendje të prodhonin citrinin; pesë lloje prodhuan banda të paidentifikuara fluoeshente, të cilat mendohet të jenë ose mykotoksina të paidentifikuara ose pigmente të prodhuara nga myqet.

Tabela 4. Ekzaminimi i myqeve të izoluar për sintezë të mykotoksinave duke përdorur kromatografinë në shtresë të hollë (TLC)

Myku Nr. i mostrës	Terreni kultivues	Dita e inkubimit 7	Dita e inkubimit 8	Dita e inkubimit 9	Dita e inkubimit 10	Mykotoksina
<i>Penicillium</i> spp (3)	MEA	-	-	-	-	Asnjë
	PDA	-	-	-	-	
<i>A. flavus</i> (3)	MEA	+	+	+	+	Aflatoksinë
	PDA	+	+	+	+	
<i>A. flavus</i> (22)	MEA	+	+	+	+	Aflatoksinë
	PDA	+	+	+	+	
<i>Aspergillus</i> spp (35)	MEA	+	+	+	+	Aflatoksinë
	PDA	+	+	+	+	
<i>Penicillium</i> spp. (26a)	MEA	-	-	+	+	I panjohur
	PDA	-	-	+	+	
<i>Penicillium</i> spp.(26b)	MEA	-	-	-	-	I panjohur
	PDA	-	-	-	+	

<i>Penicillium</i> spp. (33)	MEA	+	+	+	+	Citrininë
	PDA	-	-	-	-	
<i>Penicillium</i> spp. (36b)	MEA	+	+	+	+	Citrininë
	PDA	-	+	+	+	
<i>A. flavus</i> (33)	MEA	+	+	+	+	Aflatoksinë
	PDA	+	+	+	+	

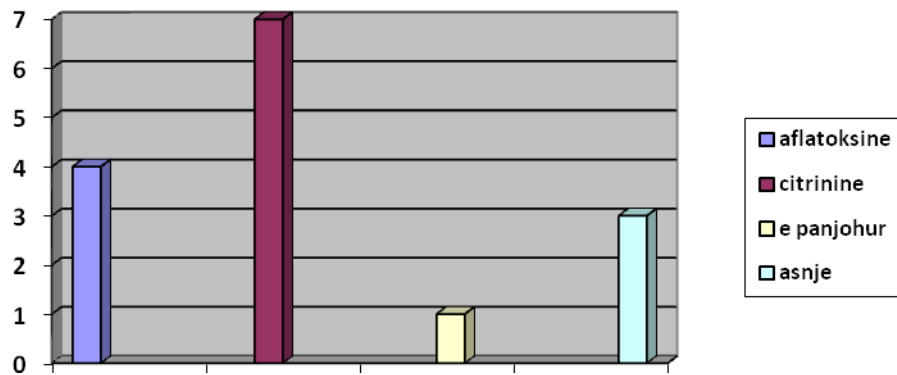
MEA: Malt ekstrakt agar, PDA: Ekstrakt patate dekstroz agar + (toksin pozitive) – (toksin negative)

Tabela 5. Ekzaminimi i myqeve të izoluarra për sintezë të mykotoksinave duke përdorur kromatografinë në shtresë të hollë (TLC) (vazhdim)

Myku Nr. i mostrës	Terreni kultivues	Dita e	Dita e	Dita e	Dita e	Mykotoksina
		7	8	9	10	
<i>Penicillium</i> spp. (38)	MEA	+	+	+	+	Citrininë
	PDA	+	+	+	+	
<i>Penicillium</i> spp. (42a)	MEA	+	+	+	+	Citrininë
	PDA	+	+	+	+	
<i>Penicillium</i> spp (46)	MEA	-	-	-	+	Citrininë
	PDA	-	-	-	+	
<i>A. niger</i> (47)	MEA	+	+	+	+	I panjohur
	PDA	+	+	+	+	
<i>Penicillium</i> spp. (42b)	MEA	+	+	+	+	Citrininë
	PDA	+	+	+	+	
<i>Penicillium</i> spp. (42c)	MEA	+	+	+	+	Citrininë
	PDA	+	+	+	+	

MEA: Malt ekstrakt agar, PDA: Ekstrakt patate dekstroz agar + (toksin pozitive) – (toksin negative)

Kromatografia në shtresë të hollë tregon se të gjitha llojet e *Aspergillus* spp. të izoluaru ishin në gjendje të prodhonin aflatoksina, shtatë nga trembëdhjetë llojet e *Penicillium* spp ishin mykotoksinë pozitive dhe shumica e mostrave ishin në gjendje të prodhonin citrinin.



Grafiku 1. Paraqitja grafike (sipas tabelës 4,5) të numërimit mbas ditës së shtatë deri në ditën e dhjetë të myqeve të izoluaru për sintezë të mykotoksinave të gjinive ndryshme

Konkluzione

Ky studim tregon se është i rëndësishëm testimi periodik i produkteve ushqimore për fëmijë, veçanërisht produkteve të drithit për mykotoksina. Këto toksina nuk mund të eliminohen tërësisht nga drithërat dhe është shumë e vështirë të shkatërrohen me ngrohje. Duhet të bëhen të gjitha përpjekjet për tu siguruar që toksinat të jenë më poshtë kufijve të lejuar.

Në këtë studim, një pjesë e mirë e mostrave rezultuan toksikogjene, megjithatë vetëm 2.4% e mostrave përmbanin aflatoksina në nivel $5-10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ dhe pjesa e mbetur nuk i kalonin vlerat $3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ për aflatoksina të veçanta dhe $7,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ për aflatoksina në total. Këto shuma ishin brenda kufirit të tolerancës së pranuar nga Bashkimi Evropian ($5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ për aflatoksina të veçanta dhe $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ për aflatoksinat totale në ushqimet me bazë drithi. (EC, 2007). Është i rëndësishëm testimi periodik i ushqimeve për fëmijë dhe përbërësve të tij për mykotoksina për të kontrolluar shfaqjen e toksinave në ushqimet e destinuaru për foshnja.

Literatura

- A. Pittet, (1998): Natural Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds, *Medical Veterinary*, Vol. 149, 479-499
- E. E. Creppy, (2002): Update of Survey, Regulation and Toxic Effects of Mycotoxins in Europe," *Toxicology Letters*, Vol. 127, 667-743
- H. P. van Egmond, (2002): Worldwide Regulations for Mycotoxins," *Advances in Experimental Medical Biology*, Vol. 504, 257-269.
- N. Polychronaki, R. M. West, P. C. Turner, H. Amra, M. Abdel-Wahhab, H. Mykkänen and H. El-Nezami, (2007): A Longitudinal Assessment of Aflatoxin M1 Excretion in Breast Milk of Selected Egyptian Mothers," *Food Chemistry and Toxicology*, Vol. 45, No. 7, 1210- 1215
- N. Polychronaki, P. C. Turner, H. Mykkänen, Y. Gong, H. Amra, M. Abdel-Wahhab and H. El-Nezami, (2006): Determinants of Aflatoxin M1 in Breast Milk in a Selected Group of Egyptian Mothers, *Food Additives and Contaminants*, Vol. 23, No. 7, 700-708
- D. Barug, H. P. van Egmond, R. Lopez-Garcia, T. van Osenbruggen and A. Visconti, (2003) Meeting the Mycotoxins Menace," *Wageningen Academic*, The Netherlands
- EC (Codex Alimentarius Commissions), (2007): Discussion and Possible Opinion on Draft Commissions Regulation Amending Regulation (EC) NO. 466/2001 as Regards Aflatoxins and Ochratoxin A in Foods for Infant and Young Children (SANCO/0983/2002 REV. 6)
- P. V. Hans and H. P. Walter, (1986): Determination of Mycotoxins," *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 58, No. 2, 315-326
- A. A. G. Candlish, C. A. Haynes and W. H. Simson, (2012): Detection and Determination of Aflatoxins Using Affinity Chromatography, *International Journal of Food Science and Technology*, Vol. 23, No. 5, 479-485