



**ИНСТИТУТ ЗА ПОВРТАРСТВО
СМЕДЕРЕВСКА ПАЛАНКА**

**Биотехнологија и савремени приступ
у гајењу и оплемењивању биља**

**Национални научно-стручни скуп са
међународним учешћем**

ЗБОРНИК РАДОВА

Смедеревска Паланка, 15. децембар 2021.

ИНСТИТУТ ЗА ПОВРТАРСТВО СМЕДЕРЕВСКА ПАЛАНКА

**Биотехнологија и савремени
приступ у гајењу и
оплемењивању биља**

**Национални научно-стручни скуп са
међународним учешћем**

ЗБОРНИК РАДОВА

Смедеревска Паланка
15. децембар 2021.

Зборник радова

Биотехнологија и савремени приступ у гајењу и
оплемењивању биља

Национални научно-стручни скуп са међународним учешћем

Смедеревска Паланка, 15. децембар 2021.

Издавач

Институт за повртарство Смедеревка Паланка

www.institut-palanka.rs

За издавача

Доц. др Алмир Муховић, научни сарадник
в.д. директора Института за повртарство

Главни и одговорни уредник

Др Алмир Муховић

Уредник

Др Веселинка Зечевић

Технички уредник

Љиљана Радисављевић

Штампа

Дигитал дизајн доо, Смедеревска Паланка

Тираж 100 комада

Година издања

2021

ISBN

978-86-89177-03-9

**ПОЈАВА И ОДРЕЂИВАЊЕ ОХРАТОКСИНА А У ЦРВЕНОЈ
МЛЕВЕНОЈ СЛАТКОЈ ПАПРИЦИ ЕЛИСА МЕТОДОМ**

**OCCURRENCE AND DETERMINATION OF OCHRATOXIN A
IN RED GROUND SWEET PEPPER BY ELISA METHOD**

Марко Јауковић^{1*}, Веселинка Зечевић²

¹*Југоинспект Београд ад, Београд, Теодора Драјзера 11*

²*Институт за повртарство, Смедеревска Паланка, Карађорђева 71*

**Аутор за кореспонденцију: jaukovicmarko@gmail.com*

Извод

Производи од слатке паприке су широко комерцијализовани и конзумирају се на глобалном нивоу. Иако млевена слатка црвена паприка не представља матрикс који подржава раст микроорганизама, присуство токсигених плесни и микотоксина се често детектује. Главни циљ овог рада био је да испита могућност анализе охратоксина А у млевеној црвеној слаткој паприци користећи ЕЛИСА методу.

За потребе валидације методе коришћени су сертификован референтни материјал и један природно контаминиран узорак ниске концентрације. У циљу испуњења захтева процеса валидације извршена је процена: лимита детекције (LoD), лимита квантификације (LoQ), опсега, тачности и прецизности. Добијени резултати анализираних узорака и процена перформанси наведених карактеристика показали су да је ова метода у сагласности са Еурацхем лабораторијским водичем, ЕУ регулативом и да је адекватна за употребу.

Кључне речи: Охратоксин А, паприка, ЕЛИСА метод

Abstract

Sweet pepper products are widely commercialised and consumed worldwide. Red ground sweet pepper presents unusual characteristics for microbial growth. However, the presence of mycotoxin producing fungi and the co-occurrence of mycotoxins in the production chain have been

commonly detected. The main aim of this work was to examine the possibility to analyse ochratoxin A in red ground sweet pepper using ELISA method.

One certified reference material and one naturally contaminated and randomly selected sample with low level of contamination were used to validate analytical method. In order to fulfill the requirements defined by the validation process we evaluated: limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), working range, trueness and precision. Results received by analysing samples and evaluating all of the listed performance characteristics proved that this method is in compliance with Eurachem laboratory guides, EU legislation and is 'fit for purpose'.

Key words: Ochratoxin A, pepper, ELISA

Увод

Паприка и производи од паприке су веома подложни контаминацији микотоксиногеним плеснима. Већина ових производа завршавају на тржишту након неадекватног процеса производње, који у пракси подразумева само сушење и млевење пре паковања (Kneifel et al,1994).

Стога је неопходно испратити цео процес производње у циљу превенције контаминације плеснима и микотоксинима. Охратоксин А је најчешћи контаминент пронађен у храни за људску исхрану и исхрану животиња. Сматра се најистакнутијим микотоксином који се јавља у узорцима паприке и производима од паприке. Због своје токсичности и канцерогеног потенцијала, контаминација охратоксином А изазива забринутост на глобалном нивоу (Costa et al, 2019.).

Према Правилнику о максималним концентрацијама одређених контаминената у храни (Сл.гласник РС 81/2019; 126/2020; 90/2021), максимално дозвољена количина охратоксина А у сушеној млевеној паприци износи 20 µg/kg. Лабораторијска анализа и могућност детекције охратоксина А представља једно од кључних средстава у анализи појаве овог микотоксина. Савремена аналитичка пракса подразумева валидацију сваке примењене методе (Eurachem guide, 2014).

Валидација неке методе испитивања представља обезбеђивање објективних доказа, односно записа о спровођењу валидационих

експеримената да је та метода испитивања прикладна за дату намену (Rajković и сар, 2012). Приликом извођења валидационог експеримента у употреби су бројна валидациона средства попут бланк узорака, рутинских тест узорака, спајкованих узорака, референтних материјала и стандарда.

Материјал и методе рада

У току процеса валидације методе испитивања, испитане су следеће карактеристике дате методе:

- Лимит детекције (LoD)
- Лимит квантификације (LoQ)
- Линеарност
- Прецизност у условима поновљивости и репродуктивности
- Аналитички принос (Recovery)

Приликом извођења експерименталног дела истраживања коришћен је сертификовани референтни материјал (TQC-MT100, 9,5 ± 1,2 ppb), насумице изабрани природно контаминирани узорци сушене паприке у праху, стандардни ЕЛИСА тест кит, компетитивни ензимски имуноесеј за квантитативну анализу охратоксина А у храни, имуноафинитетне колонице за припрему узорака, PBS пуфер и метанол (RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 Art. No. R1312, R-Biopharm, Darmstad, Germany).

Основа теста је антиген-антитело реакција. Слободни и ензимски везан охратоксин А (коњугат) се „надмећу“ за место везивања антитела (компетитивна ЕЛИСА).

Статистичка обрада добијених резултата је рађена у програму SPSS 15.0 (SPSS, IBM corporation, USA).

Резултати и дискусија

Лимит детекције и лимит квантификације прописани су од стране произвођача тест кита, а утврђени су израчунавањем стандардне девијације резултата мерења концентрације анализата у узорку ниске контаминације.

Након израчунавања стандардне девијације, вредности лимита детекције (LoD) и лимита квантификације (LoQ) добијени су уз помоћ следећих формула:

$$LoD=3* s'$$

$$LoQ=10* s'$$

Добијени резултати приказани су у Табели 1.

Табела 1. Резултати добијени одређивањем лимита детекције и лимита квантификације методе

Узорак	X_{sr} ($\mu\text{g/l}$)	Стандардна девијација (s')	Број понов. мерења (n)	LoD ($\mu\text{g/l}$)	LoQ ($\mu\text{g/l}$)
Узорак ниске контаминације	0,116	0,005	6	0,015	0,05

Провера линеарности спроведена је у следећих пет калибрационих тачака: 0,05 ррб; 0,1 ррб; 0,5 ррб; 1 ррб и 2,5 ррб. Свака од пет претходно наведених тачака анализирана је у две пробе (дупло мерење). Добијени резултати приказани су у табели 2.

Табела 2. Резултати добијени мерењем концентрација 5 изабраних калибрационих тачака

Калибрациона тачка ($\mu\text{g/l}$)	0,05	0,10	0,50	1,00	2,50
Проба 1 ($\mu\text{g/l}$)	0,038	0,088	0,36	0,85	2,21
Проба 2 ($\mu\text{g/l}$)	0,060	0,130	0,62	1,23	2,71

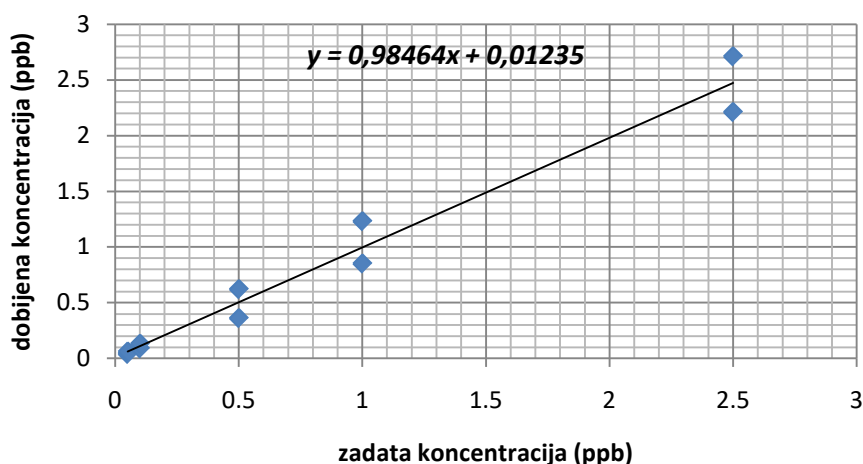
Приказани резултати обрађени су употребом функција које се налазе у Microsoft Excel програму, а резултати су приказани у таб. 3.

Табела 3. Резултати добијени испитивањем линеарности

Опсег методе*	0,5 до 25 $\mu\text{g/l}$
Регресиона линија	$y = 0,98646x + 0,01235$
Број нивоа	5
Број узорака	10
Стандардна грешка криве	0,044
Нагиб криве	0,98646
Y-одсечак	0,01235
Коефицијент корелације (R^2)	0,970835
Интервал поверења	-0,1582 до 0,182903
Z_t	0,3
Да ли је коефицијент корелације (R^2) мањи од 1?	ДА
Да ли је нула укључена у интервал поверења?	ДА
Z_t није значајно ($Z_t < F_{tab}$)?	ДА
Да ли се линеарност може прихватити?	ДА

* Опсег методе изражен у $\mu\text{g/kg}$ узорка варира у зависности од типа узорка и начина припреме (маса одмереног узорка, разблаживање), а условљен је захтевом одговарајућег правилника у смислу МДК вредности.

Ради лакшег уочавања добијених резултата конструисан је дијаграм, такође, коришћењем функција у оквиру Microsoft Excel програма (графикон 1).



Графикон 1. Илустрација линеарности

Прецизност у условима поновљивости за ЕЛИСА методу проверена је анализом истог узорка, од стране једног аналитичара у различитим временским периодима, под истим, тачно дефинисаним условима у више понављања. Овом приликом коришћен је сертификован референтни материјал ТQC-МТ100. Узорак је анализиран у две пробе (дупло одређивање) у 6 серија понављања. Након добијених резултата, приступило се израчунавању прецизности у условима поновљивости и репродуктивности. Наиме, за оба параметра прецизности израчуната је стандардна девијација, а након тога, израчунат је проценат одступања од средње вредности (РСД%) на основу следећих формула:

$$РСД\% \text{ (поновљивост)} = \frac{Std}{srednja\ vrednost} \times 100$$

$$РСД\% \text{ (репродуктивност)} = \frac{STD}{srednja\ vrednost} \times 100$$

Добијене вредности приказане су у табели 4.

Табела 4. Резултати провере поновљивости и репродуктивности

<i>Прецизност</i>					
<i>Поновљивост</i>			<i>Репродуктивност</i>		
Средња вредност (Sv) (µg/l)	Стандардна девијација (Std)	Процент одступања од средње вредности (РСД%)	Средња вредност (SV) (µg/l)	Стандардна девијација (STD)	Процент одступања од средње вредности (РСД%)
9,36	0,81	8,62	9,49	0,92	9,68

Тачност у аналитици микотоксина се одређује анализом сертификованог референтног материјала и изражава се као однос добијене средње вредности мерења и сертификоване вредности референтног материјала. Приликом утврђивања аналитичког приноса вредности коришћен је сертификовани референтни материјал (ТQC-МТ100) и анализиран је у 6 серија, у по две пробе (дупло одређивање). Аналитички принос вредности је израчунат према следећој формули:

$$Recovery = \frac{srednja\ vrednost\ niza\ merenja}{vrednost\ SRM} \times 100$$

Добијене вредности приказане су у табели 5.

Табела 5. Резултати добијени утврђивањем рецоверу вредности

Вредност сертифициваног референтног материјала	9,5 µg/l
Средња вредност низа мерења	9,36 µg/l
Стандардна девијација мерења	0,81
Релативна стандардна девијација мерења (RSD)	8,62%
Recovery вредност	98%

Закључак

Анализом добијених резултата, може се закључити следеће:

- Коефицијент корелације (R^2) је мањи од 1, а интервал поверења укључује нулу, што је у складу са прописаним критеријумима.
- Прецизност у условима поновљивости и репродуктивности за СРМ у складу је са критеријумима перформанси метода за одређивање садржаја охратоксина А.
- Аналитички принос (*recovery*) се налази у прописаном опсегу и испуњава захтеве критеријума методе испитивања.

Другим речима, може се потврдити да ЕЛИСА метода за утврђивање концентрације охратоксина у сушеној млевеној паприци испуњава прихватљиве критеријуме за параметар тачности методе.

Литература

- Commission Regulation (EC) No 401/2006. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Official Journal of the European Union, 2006, L70: 20-21
- Costa, J, Rodríguez, R, Garcia-Cela, E, Medina, A, Magan, N, Lima, N, Battilani, P. and Santos, C. (2019). Overview of Fungi and Mycotoxin Contamination in Capsicum Pepper and in Its Derivatives. *Toxins*, 2019,11(1), 27
- Eurachem Guide. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Second Edition, 2014: 7-46

Kneifel, W, Berger, E. (1994). Microbiological criteria of random samples of spices and herbs retailed on the Austrian market. *J. Food Prot*, 1994, 57, 893–901.

Правилник о максималним концентрацијама одређених контаминената у храни („Службени гласник РС“ бр. 81/2019; 126/2020; 90/2021).

(RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 Art. No. R1312, R-Biopharm, Darmstad, Germany)

Rajković, A, Šmigić, N, Anđelković, M. (2012). Organizacija rada i akreditacija laboratorija. Univerzitet u Beogradu. Poljoprivredni fakultet, Beograd, 2012: 135-145.

CIP - Каталогизација у публикацији
Народна библиотека Србије, Београд

631.52(082)
606:63(082)

НАЦИОНАЛНИ научно-стручни скуп са међународним учешћем
Биотехнологија и савремени приступ у гајењу и оплемењивању
биља (2021 ; Смедеревска Паланка)

Зборник радова / Национални научно-стручни скуп са
међународним учешћем Биотехнологија и савремени приступ
у гајењу и оплемењивању биља, Смедеревска Паланка
15. децембар 2021. ; [уредник Веселинка Зечевић]. -
Смедеревска Паланка : Институт за повртарство, 2021
(Смедеревска Паланка : Дигитал дизајн). - 344 стр. :
илустр. ; 25 cm

Тираж 100. - Стр. 9: Предговор / Веселинка Зечевић. -
Библиографија уз сваки рад. - Abstracts.

ISBN 978-86-89177-03-9

а) Биљке -- Оплемењивање -- Зборници б) Биотехнологија --
Зборници

COBISS.SR-ID 52862729