

MIKOTOKSINI IZ EDAMSKOG SIRA I NJIHOVA TOKSIČNOST

Dr Marija ŠKRINJAR, prof. dr Radivoj ŽAKULA, Tehnološki fakultet,
Novi Sad

Sažetak

U toku ovog rada ispitana je zastupljenost plesni, prisustvo aflatoksina B₁ i ohratoksina A u uzorcima edamskog sira, kao i toksičnost ekstrakata uzoraka plesnivog sira.

Utvrdeno je da su svi uzorci sira bili plesnivi. Iz tih uzoraka izolovan je veliki broj plesni, koje su svrstane u 6 rodova i 19 vrsta. Penicillium camemberti i P. verrucosum var. cyclopium predstavljali su najčešće izolovane kontaminente.

Ni jedan uzorak sira nije bio kontaminiran aflatoksinom B₁, dok je ohratoksin A utvrđen u dva uzorka u koncentracijama od 820 i 1100 µg/kg.

Svi ekstrakti sira bili su manje ili više toksični za embrione pilića, a 40% ekstrakata izazvalo je smrtnost tretiranih embriona već u toku prvog dana ogleada. Svega 9,33% embriona preživelo je ogled.

Uvod

Od svih proizvoda od mleka, sir predstavlja najbolju podlogu za rast i razmnožavanje brojnih vrsta plesni.

Do kontaminacije sira plesnima, a zatim i mikotoksinima, može doći kako za vreme pripremanja i zrenja sira, tako i kasnije u toku skladištenja, sečenja i pakovanja. Sir može biti kontaminiran mikotoksinima i na indirektan način, tj. ako je proizveden od mleka koje je zagađeno ovim metabolitima. Ustanovljeno je da prilikom sterilizacije mleka ne dolazi do promene koncentracije mikotoksina, da je pri izradi sireva u surutci sadržaj mikotoksina manji, dok je u siru nekoliko puta veći u odnosu na sirovo mleko (E g m o n d et al., 1976.).

Ma da su u našoj zemlji zadnjih godina publikovani značajni radovi koji ukazuju na kontaminaciju mleka i proizvoda od mleka plesnima, kao i prisustvo mikotoksina u njima, nedostaje dublje istraživanje o toj problematici kod pojedinih mlečnih proizvoda.

Zadatak ovog rada, koji predstavlja mali deo istraživanja o kontaminaciji mleka i proizvoda od mleka plesnima i mikotoksinima, bio je da se ispita zastupljenost vrsta plesni i prisustvo aflatoksina B₁ i ohratoksina A u uzorcima edamskog sira uzetim iz prodajne mreže metodom slučajnog izbora, kao i toksičnost ekstrakata uzoraka plesnivog sira.

Materijal i metode rada

U ovom radu ispitano je 25 uzoraka edamskog sira uzetih iz prodajne mreže metodom slučajnog izbora. Svi uzorci sira bili su zaštićeni folijom.

Za izolaciju i determinaciju plesni korišćeni su Sabouraud dekstrozni agar, PDA (Potato Dextrose Agar) i Czapek agar (s 3% saharoze).

Determinacija plesni izvršena je prema Raper-u i Thom-u (1949.), Ellis-u (1971.), Pidopličk-u i Miljk-u (1971.), von Arx-u (1974.) i Samson-u et al. (1976., 1977.).

Prisustvo aflatoksina B₁ i ohratoksina A ispitano je u gornjem sloju sira (debljine 0,5 do 1,0 cm). Kvalitativno i kvantitativno određivanje mikotoksina izvedeno je multimikotoksinskom metodom prema Eppley-u (1978.), s tim što je odmašćivanje izvršeno s dvostrukom količinom heksana, zbog većeg sadržaja masti u siru.

Ekstrakti uzoraka sira korišćeni su, nakon završenih ispitivanja na pločama za TLČ, u ogledima ispitivanja toksičnosti plesnivog sira na embrionima pilića. Embrionirana jaja upotrebljena u tim ogledima bila su stara osam dana. Ogledi ispitivanja toksičnosti pojedinih uzoraka izvedeni su u tri ponavljanja. U žumančanu kesu svakog jajeta inokulisano je 0,1 ml uzorka razređenog na 10⁻⁵. Kontrolna grupa jaja inokulisana je sa istom količinom fiziološkog rastvora. Embrioni su svakodnevno posmatrani, a rezultati beleženi tokom osam dana.

Rezultati i diskusija

Svi uzorci edamskog sira bili su kontaminirani plesnima (tab. 1). Iz tih uzoraka izolovan je veći broj plesni, koje su nakon detaljnijeg pregleda svrstane u 6 rodova i 19 vrsta i to: *Acremonium strictum* Gams, *Alternaria tenuissima* (Kunze ex Pers.) Wiltshire, *Cladosporium cladosporioides* (Fr.) de Vries, *Mucor globosus* Fischer, *M. hiemalis* Wehmer, *M. racemosus* Fres., *Penicillium brevcompactum* Dierckx, *P. camemberti* Thom, *P. chrysogenum* Thom, *P. citrinium* Thom, *P. commune* Thom, *P. cyaneum* (Bain. and Sart.) Biourge, *P. expansum* Link ex Gray, *P. frequentans* Westling, *P. janthinellum* Biourge, *P. velutinum* van Beyma, *P. verrucosum* Dierckx var. *album* (G. Smith) Samson, Stolk & Hadlok, *P. verrucosum* Dierckx var. *cyclopium* (Westling) Samson, Stolk & Hadlok i *Trichothecium roseum* Link.

Rod *Penicillium* bio je predstavljen sa najvećim brojem vrsta (13) i zauzimao je čak oko 90% od ukupne mikopopulacije, koja je izolovana iz uzoraka edamskog sira. Tako velika zastupljenost *Penicillium* vrsta u siru može se objasniti time, što su ova ispitivanja vršena u periodu februar—mart, a za taj period godine karakteristično je najčešće rasprostranjenje plesni ovog roda (Škrinjar, 1979.). Takođe je poznato, da se u uslovima niskih temperatura, u kojima su držani uzorci sira, razmnožavaju uglavnom *Penicillium* vrste (Bullerman, 1976.).

Interesantno je istaći činjenicu, da su *P. camemberti* i *P. verrucosum* var. *cyclopium* predstavljali najčešće izolovane kontaminante. Od ukupno 25 ispitivanih uzoraka sira, čak 94% uzoraka, kako je ustanovljeno, bilo je kontaminirano s *P. verrucosum* var. *cyclopium*, a samo nešto manje (92%) sa *P. camemberti*.

Svih 25 uzoraka sira ispitano je, takođe, na prisustvo aflatoksina B₁. Međutim, ni jedan uzorak nije bio kontaminiran ovim toksinom.

Tabela 1. Plesni izolovane iz edamskog sira uzetog iz prodajne mreže

Table 1. Moulds isolated from Edam cheese taken from market

Uzorak br.	Vrsta plesni
1	Mucor globosus Penicillium camemberti P. verrucosum var. cyclopium
2	Cladosporium cladosporioides Penicillium camemberti P. verrucosum var. cyclopium
3	Penicillium camemberti P. velutinum P. verrucosum var. cyclopium
4	Penicillium camemberti P. frequentans P. verrucosum var. cyclopium
5	Mucor hiemalis Penicillium camemberti P. expansum P. verrucosum var. cyclopium
6	Penicillium brevi-compactum P. camemberti P. chrysogenum P. verrucosum var. cyclopium
7	Penicillium camemberti P. verrucosum var. cyclopium
8	Mucor hiemalis Penicillium camemberti P. commune P. verrucosum var. cyclopium
9	Mucor globosus Penicillium camemberti P. citrinum P. verrucosum var. cyclopium
10	Alternaria tenuissima Penicillium camemberti P. verrucosum var. cyclopium Trichothecium roseum
11	Mucor hiemalis Penicillium velutinum P. verrucosum var. cyclopium
12	Penicillium camemberti P. commune P. verrucosum var. cyclopium
13	Penicillium camemberti P. velutinum P. verrucosum var. cyclopium

Uzorak br.	Vrsta plesni
14	Penicillium camemberti P. expansum P. janthinellum
15	Penicillium expansum P. janthinellum P. verrucosum var. cyclopium
16	Penicillium camemberti P. verrucosum var. cyclopium
17	Penicillium camemberti P. expansum P. velutinum P. verrucosum var. album P. verrucosum var. cyclopium
18	Penicillium camemberti P. expansum P. frequentans P. velutinum P. verrucosum var. cyclopium
19	Penicillium camemberti P. cyaneum P. frequentans P. verrucosum var. cyclopium
20	Mucor hiemalis Penicillium camemberti P. janthinellum
21	Mucor racemosus Penicillium camemberti P. expansum P. verrucosum var. cyclopium
22	Penicillium camemberti P. commune P. cyaneum P. expansum P. verrucosum var. album P. verrucosum var. cyclopium
23	Penicillium camemberti P. verrucosum var. album P. verrucosum var. cyclopium
24	Acremonium strictum Penicillium camemberti P. commune P. velutinum P. verrucosum var. album P. verrucosum var. cyclopium
25	Penicillium camemberti P. commune P. janthinellum P. verrucosum var. cyclopium

U istim uzorcima sira izvršeno je i ispitivanje prisustva ohratoksina A. Utvrđeno je, da su dva uzorka sira (br. 4 i 12) bila kontaminirana ohratoksinom A (tab. 2). Količine toksina, ustanovljene u tim uzorcima, iznosile su 820

Tabela 2. Prisustvo ohratoksina A u uzorcima edamskog sira
Table 2. Biosynthesis of ochratoxin A in Edam cheese samples

Uzorak br.	Ohratoksin A μg/kg
1	—
2	—
3	—
4	820
5	—
6	—
7	—
8	—
9	—
10	—
11	—
12	1100
13	—
14	—
15	—
16	—
17	—
18	—
19	—
20	—
21	—
22	—
23	—
24	—
25	—

(uzorak br. 4) i 1100 μg/kg (uzorak br. 12). Kao što je napred izneto, oba uzorka bila su kontaminirana plesnima. Iz uzorka br. 4 izolovani su *P. camemberti*, *P. frequentans* i *P. verrucosum* var. *cyclopium*, a iz uzorka br. 12 *P. camemberti*, *P. commune* i *P. verrucosum* var. *cyclopium*.

Uzimajući u obzir činjenicu da se biosinteza ohratoksina A može odvijati i u uslovima niskih temperatura, iako smanjenim intenzitetom (Purchase, 1974.), smatra se, da bi prisustvo ohratoksina A u dva ispitivana uzorka sira moglo biti posledica rasta i razmnožavanja *P. verrucosum* var. *cyclopium*.

Kao što se u tabeli 3 može videti, svi ekstrakti sira bili su više ili manje toksični za embrione pilića.

Ustanovljeno je, također, da je 40% ekstrakata sira izazvalo smrtnost tretiranih embriona već u toku prvog dana ogleda. Među tim uzorcima nalazio se i uzorak br. 12, u kome je prethodno utvrđeno 1100 μg/kg ohratoksina A.

Nadalje, jako toksični bili su ekstrakti uzoraka sira br. 2, 3, 4, 5, 9, 10, 19, 20 i 21. Ekstrakti tih uzoraka izazvali su uginuće svih inokulisanih embriona u toku 48 sati. Jedino je šest uzoraka sira (br. 14, 15, 17, 18, 24 i 25) ispoljilo manju toksičnost.

Tabela 3. Ispitivanje utjecaja toksičnosti plesnivog edamskog sira na embrionima pilića
Table 3. Investigation of effect of mouldy Edam cheese toxicity on chicken embryos

Uzorak br.	Ohratoksina A µg/kg	Vreme (Dani)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	
1	—	3/3	—	—	—	—	—	—	—	—
2	—	2+1/3	—	—	—	—	—	—	—	—
3	—	2+1/3	—	—	—	—	—	—	—	—
4	820	0/3	0+3/3	—	—	—	—	—	—	—
5	—	2/3	2+1/3	—	—	—	—	—	—	—
6	—	3/3	—	—	—	—	—	—	—	—
7	—	3/3	—	—	—	—	—	—	—	—
8	—	3/3	—	—	—	—	—	—	—	—
9	—	2/3	2+1/3	—	—	—	—	—	—	—
10	—	2/3	2+1/3	—	—	—	—	—	—	—
11	—	3/3	—	—	—	—	—	—	—	—
12	1100	3/3	—	—	—	—	—	—	—	—
13	—	3/3	—	—	—	—	—	—	—	—
14	—	1/3	1+0/3	1+0/3	1+0/3	1+0/3	1+0/3	1+0/3	1+0/3	1+0/3
15	—	2/3	2+0/3	2+0/3	2+0/3	2+0/3	2+0/3	2+0/3	2+0/3	2+0/3
16	—	3/3	—	—	—	—	—	—	—	—
17	—	2/3	2+0/3	2+0/3	2+0/3	2+0/3	2+0/3	2+0/3	2+0/3	2+0/3
18	—	2/3	2+0/3	2+0/3	2+0/3	2+0/3	2+0/3	2+0/3	2+0/3	2+0/3
19	—	2/3	2+1/3	—	—	—	—	—	—	—
20	—	2/3	2+1/3	—	—	—	—	—	—	—
21	—	0/3	0+3/3	—	—	—	—	—	—	—
22	—	3/3	—	—	—	—	—	—	—	—
23	—	3/3	—	—	—	—	—	—	—	—
24	—	1/3	1+0/3	1+0/3	1+0/3	1+0/3	1+0/3	1+0/3	1+0/3	2+0/3
25	—	1/3	1+0/3	1+1/3	2+0/3	2+0/3	2+0/3	2+0/3	2+0/3	2+0/3

Legenda: 3/3; 2/3; 1/3; 0/3 = prvi broj označava broj uginulih embriona, a drugi broj inokulisanih embrioniranih jaja

U tabeli 3 može se takođe videti, da je u toku prvog dana oglada uginulo od ukupno 75 inokulisanih embriona čak 53, što predstavlja 70,66% ispitivanih embriona. Oglad je preživelo samo 9,33% embriona.

Skoro sa sigurnošću možemo da zaključimo da su plesni, koje su se pojavile kao kontaminanti ispitivanih uzoraka sira, najverovatniji uzročnici ovako visoke smrtnosti, konstantovane u toku bioloških oglada.

Summary

All the samples of Edam cheese collected from the market were contaminated by moulds. A great number of moulds from these samples were isolated. The moulds were classified into 6 genus and 19 species.

Aflatoxin B₁ was not detected in cheese samples, while ochratoxin A was found in two samples at the concentration level from 820 to 1100 µg/kg.

All the extracts of contaminated cheese were toxic for chicken embryos. During the first test day the letal effect on embryos was shown by 40% of total number of extracts. Only 9,33% of embryos survived the treatment.

Literatura

- ARX, von J. A. (1974.); The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture. J. Cramer, FL-9490 VADUZ, 315 pp.
- BULLERMAN, L. B. (1976.); Examination of Swiss Cheese for incidence of mycotoxin producing molds. *Dairy Sci. Abst.* **38**, 7, 4195—4198.
- EGMOND, van H. P., P. L. SCHULLER, R. E. PAULSCH (1976.); The effect of processing on the aflatoxin M₁ content of milk and milk products. III International I.U.P.A.C. Symp. of Mycotoxins in foodstuffs, Paris, 1976.
- ELLIS, M. B. (1971.); Dematiaceae, Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew & Surrey, England, 507 pp.
- EPPLEY, M. B. (1978.); *J.A.O.A.C.* **61**, 3, 584—585.
- PIDOPLIČKO, N. M. i A. A. MILJKO (1971.); Atlas mukoraljnih gribov. Izdateljstvo »Naukova dumka«, Kiev, 187 pp.
- PURCHASE, I. F. H. (1974.); Mycotoxins. Elsevier Scien. Publ. Co., Amsterdam—New York, ix + 443 pp.
- RAPER, K. B. i C. THOM (1949.); A Manual of the Penicillia. Williams & Wilkins Co., Baltimore, xi + 875 pp.
- SAMSON, R. A., A. C. STOLK, R. HADLOK (1976.); Revision of the subsection Fasciculata of *Penicillium* and some allied species. *Stud. Mycol. Baarn* **11**, 47 pp.
- SAMSON, R. A., CHRISTIANE ECKARDT, R. ORTH (1977.); The taxonomy of *Penicillium* species from fermented cheeses. *Antonie van Leeuwenhoek* **43**, 3/4, 341—350.
- ŠKRINJAR MARIJA (1979.); Mikološka aerozagađenja u nekim mestima SAP Vojvodine sa osvrtom na alergijska oboljenja. Magistarski rad, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.