

PLESNI I MIKOTOKSINI MLEKA I POLUTVRDOG SIRA*

Dr Marija ŠKRINJAR, prof. dr Radivoj ŽAKULA, Tehnološki fakultet,
Novi Sad, Emilija STOJANOVIĆ, dipl. biol., »Odžačanka«, Odžaci

Sažetak

U radu su prikazani rezultati ispitivanja prisustva plesni i mikotoksina u sirovom mleku i siru tipa trapist, dobijeni tokom jedne godine.

Uvod

Mleko, a pogotovo sir, predstavljaju povoljne supstrate za razvoj različitih vrsta plesni.

Stepen kontaminacije sirovog mleka plesnima zavisi od različitih faktora, kao što su zdravstveno stanje i higijena muzne stoke, higijena pribora za mužu i slično. Sirovo mleko može biti kontaminirano i mikotoksinima, metabolitima plesni, ako je muzna stoka hranjena plesnivom stočnom hranom (K i e r m e i e r i dr. 1975, W e i s s i dr. 1978, Š u t i ć i dr. 1979, V e n g u š t i dr. 1983).

Postupkom termičke obrade mleka ovi se mikroorganizmi uglavnom uništavaju. Međutim, prilikom proizvodnje sira često dolazi do ponovne kontaminacije plesnima, uglavnom iz vazduha. Za vreme zrenja sira može se uočiti ubrzano razmnožavanje plesni, pogotovo ako površina sira nije zaštićena na odgovarajući način, pa se tokom zrenja u površinskom sloju sira može konstantovati ne samo prisustvo nepoželjnih mikopopulacija, već i njihovih toksičnih metabolita (Š k r i n j a r, 1984).

Materijal i metod

Određivanje ukupnog broja plesni vršeno je u uzorcima sirovog mleka, koji su uzimani sa različitih otkupnih stanica jedne mlekare sa područja SAP Vojvodine, kao i u svim fazama prerade i obrade mleka i proizvodnje sira tipa trapist. Ova ispitivanja vršena su tokom jedne godine, i u sva godišnja doba.

Uzimanje uzoraka i određivanje ukupnog broja plesni u mleku i siru vršeno je po standardnom laboratorijskom postupku (Ž a k u l a i T o d o r o v i ć, 1969).

Izolovane plesni su determinisane prema Thom-u i Raper-u (1945), Raper-u i Thom-u (1949), Booth-u (1971), Ellis-u (1971), Pido-
pličk-u i Miljk-u (1971), von Arx-u (1974) i Samson-u i dr. (1976, 1977).

Aflatoksin B₁, ohratoksin A i zearalenon određivani su multimikotoksin-
skom metodom prema E p p l e y-u (1969), s time što je odmašćivanje izvršeno s dvostrukom količinom heksana.

Prilikom uzimanja uzoraka sira, tokom njegovog zrenja, za mikotoksikolo-
ške analize, merene su temperatura i relativna vlažnost vazduha u prostorijama za zrenje sira.

* Referat održan na 5. Kongresu mikrobiologa Jugoslavije, Poreč, 1985.

Rezultati i diskusija

Rezultati ispitivanja prisustva plesni i mikotoksina u uzorcima mleka i sira, ispitanim u jesenjem periodu, prikazani su u tablicama 1, 2 i 3.

Tablica 1. Ukupan broj plesni u uzorcima sirovog mleka i sira ispitanim u jesenjem periodu godine

Table 1. Total viable count of moulds in raw milk and cheese samples tested in fall

Uzorak broj	Vrsta uzorka	Ukupan broj plesni (u 1 g)
1	Sirovo mleko (Otkupna stanica I)	$1,0 \times 10^6$
2	Sirovo mleko (Otkupna stanica II)	$8,0 \times 10^3$
3	Sirovo mleko (Otkupna stanica III)	$1,2 \times 10^4$
4	Mleko iz pasterizatora	—
5	Mleko u kadi	10
6	Surutka u kadi	$1,0 \times 10^3$
7	Gruš u kadi	$4,0 \times 10^2$
8	Sir nakon kalupljenja	$2,0 \times 10^2$
9	Salamura	$2,5 \times 10^2$
10	Sir star 2 dana	$1,0 \times 10^2$
11	Sir star 4 dana	$8,0 \times 10^2$
12	Sir star 15 dana	$2,0 \times 10^2$
13	Sir star 22 dana	$2,0 \times 10^2$
14	Sir star 29 dana	$1,0 \times 10^2$

Ukupan broj plesni u sirovom mleku kretao se od $8,0 \times 10^3$ do $1,0 \times 10^6$ u 1 ml. Budući da, prema Pravilniku o uslovima u pogledu mikrobiološke ispravnosti kojima moraju odgovarati životne namirnice u prometu (Sl. list SFRJ, br. 2, 1980), sirovo mleko ne sme sadržavati više od $3,0 \times 10^6$ mikroorganizama u 1 ml, uzorak mleka broj 1 mogao bi se označiti kao higijenski neispravan, jer su pored plesni, čiji je ukupan broj iznosio $1,0 \times 10^6$ /ml, izolovane u velikom broju i bakterije. Kriterijumi Međunarodnog saveza mlecarske industrije (1974) o kvalitetu sirovog mleka nešto su strožiji. Prema njihovom dogovoru, može se govoriti o lošim higijenskim uslovima u toku proizvodnje mleka ukoliko je ukupan broj mikroorganizama veći od 10^5 u 1 ml.

Pasterizacija mleka se obično odvija u toku 30 min. pri 64°C . Međutim, ovaj postupak je modifikovan, pa se često koristi tzv. »high temperature-short time« (HTST) metod, pri čemu se mleko tretira temperaturom od 74°C u toku 15 sekundi. Ovaj toplotni tretman, pored termofilnih, preživljavaju i mezofilni mikroorganizmi otporni na visoku temperaturu, koji počnu da se razmnožavaju kada se temperatura mleka snizi do, za njih, optimalne.

U toku ovih ispitivanja postupak pasterizacije takođe je nešto modifikovan. Pasterizacija je izvedena u toku 40 sekundi i pri temperaturi od 75°C i tim tretmanom plesni su potpuno eliminisane iz mleka.

Tablica 2. Vrste plesni izolovane iz uzoraka sirovog mleka i sira ispitanim u jesenjem periodu godine

Table 2. Mould species isolated from raw milk and cheese samples tested in fall

Uzorak broj	Vrsta uzorka	Vrsta plesni
1	Sirovo mleko (Otkupna stanica I)	<i>Mucor hiemalis</i> <i>Penicillium verrucosum</i> <i>var. cyclopium</i>
2	Sirovo mleko (Otkupna stanica II)	<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Penicillium brevi-compactum</i> <i>P. chrysogenum</i>
3	Sirovo mleko (Otkupna stanica III)	<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Geotrichum candidum</i>
4	Mleko iz pasterizatora	—
5	Mleko u kadi	<i>Aspergillus fumigatus</i>
6	Surutka u kadi	<i>Geotrichum candidum</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>
7	Gruš u kadi	<i>Penicillium verrucosum</i> <i>var. cyclopium</i>
8	Sir nakon kalupljenja	<i>Penicillium verrucosum</i> <i>var. cyclopium</i>
9	Salamura	<i>Fusarium moniliforme</i> <i>var. subglutinans</i> <i>Monilia sp.</i> <i>Penicillium brevi-compactum</i> <i>P. camemberti</i> <i>P. verrucosum var. cyclopium</i> <i>Phoma pomorum</i>
10	Sir star 2 dana	<i>Penicillium camemberti</i> <i>P. verrucosum var. cyclopium</i> <i>Phoma pomorum</i>
11	Sir star 4 dana	<i>Penicillium camemberti</i> <i>P. cyaneum</i> <i>V. verrucosum var. cyclopium</i>
12	Sir star 15 dana	<i>Penicillium camemberti</i>
13	Sir star 22 dana	<i>Penicillium camemberti</i> <i>P. expansum</i> <i>P. verrucosum var. cyclopium</i>
14	Sir star 29 dana	<i>Geotrichum candidum</i> <i>Paecilomyces sp.</i> <i>Penicillium camemberti</i>

Surutka i gruš u sirnoj kadi, naknadno su kontaminirani plesnima i to najverovatnije iz vazduha. Ukupan broj plesni u tim uzorcima bio je $1,0 \times 10^3$, odnosno $4,0 \times 10^2$.

Prema Robinson-u (1983) optimalna temperatura vazduha u prosto-rijama za zrenje polutvrđog sira, kao što su edamski sir i trapist, iznosi 12 do 15 °C, a relativna vlažnost vazduha 89 do 90%. U toku ovih oglada, relativna vlažnost vazduha bila je nešto niža od dozvoljene, dok je temperatura vazduha bila optimalna za zrenje sira (tablica 4). Ovi faktori su nesumnjivo, pored kva-

Tablica 3. Prisustvo aflatoksina B₁, ohratoksina A i zearalenona u uzorcima sirovog mleka i sira ispitanim u jesenjem periodu

Table 3. Aflatoxin B₁, ochratoxin A and zearalenone presence in raw milk and cheese samples tested in fall

Uzorak broj	Vrsta uzorka	Aflatoksin B ₁ µg/kg	Ohratoksin A µg/kg	Zearalenon µg/kg
1	Sirovo mleko (Otkupna stanica I)	—	—	—
2	Sirovo mleko (Otkupna stanica II)	—	—	—
3	Sirovo mleko (Otkupna stanica III)	—	—	—
4	Mleko iz pasterizatora	—	—	—
5	Mleko u kadi	—	—	—
11	Sir star 4 dana	—	—	—
12	Sir star 15 dana	—	—	—
13	Sir star 22 dana	—	—	—
14	Sir star 29 dana	—	—	—

Tablica 4. Temperatura i relativna vlažnost vazduha u prostorijama za zrenje sira u jesenjem periodu godine

Table 4. Ripening room-air temperature and relative humidity in fall

Uzorak broj	Vrsta uzorka	Temperatura vazduha (0 °C)	Relativna vlažnost vazduha (%)
10	Sir star 2 dana	14,5	81,0
11	Sir star 4 dana	13,5	83,0
12	Sir star 15 dana	11,5 — 14,0	68,0
13	Sir star 22 dana	13,5	77,0
14	Sir star 29 dana	14,5	88,0

litete mleka, pasterizacije, higijene pogona i načina vakumiranja sira, imali značajan utjecaj na higijensku ispravnost sira. Od vremena kalupljenja sira, pa do završetka zrenja u ispitivanim uzorcima utvrđen je, naime, relativno mali ukupan broj plesni. Kao što se iz tablice 1 može videti, taj broj kretao se od $1,0 \times 10^2$ do $8,0 \times 10^2$, što znači da je bio približno isti tokom zrenja i da se nije povećavao.

U tablici 2 prikazane su vrste plesni koje su izolovane iz sirovog mleka, surutke i gruša u sirnoj kadi i uzoraka sira za vreme zrenja u jesenjem periodu. Izolovane plesni svrstane su u 9 rodova i 14 vrsta. Rod *Penicillium* bio je predstavljen s najviše vrsta, a od toga je *P. verrucosum* var. *cyclopium* imao najveće rasprostranjenje. Ova plesan pojavila se kao kontaminant 50% ispitanih uzoraka.

Aflatoksin B₁, ohratoksin A i zearalenon, mikotoksini koji su ispitani u ovom radu, u jesenjem periodu nisu utvrđeni u mleku i siru (tablica 3). Međutim, u ohratoksinskoj frakciji ustanovljeno je prisustvo nepoznatog toksina. Mrlje ovog metabolita bile su zelenoplave boje, intenzivno su fluorescirale, a

R_t vrednost bila je nešto manja nego kod ohratoksina A. Kvalitativno i kvantitativno određivanje ovog toksina nije izvršeno zbog nedostatka standarda.

U zimskom periodu ukupan broj plesni u sirovom mleku nešto se smanjio i iznosio je $1,0 \times 10^3$ i $1,5 \times 10^3$ /ml u tri uzorka, dok iz jednog uzorka plesni nisu izolovane (tablica 5).

Tablica 5. Ukupan broj plesni u uzorcima sirovog mleka i sira ispitanim u zimskom periodu godine

Table 5. Total viable count of moulds in raw milk and cheese samples tested in winter

Uzorak broj	Vrsta uzorka	Ukupan broj plesni (u 1 g)
1	Sirovo mleko (Otkupna stanica I)	$1,0 \times 10^3$
2	Sirovo mleko (Otkupna stanica II)	—
3	Sirovo mleko (Otkupna stanica III)	$1,5 \times 10^3$
4	Sirovo mleko (Otkupna stanica IV)	$1,0 \times 10^3$
5	Mleko iz pasterizatora	—
6	Mleko u kadi	10
7	Mleko u kadi	—
8	Gruš u kadi	—
9	Surutka u kadi	70
10	Salamura	$1,5 \times 10^2$
11	Sir posle kalupljenja	$2,0 \times 10^2$
12	Sir star 2 dana	$4,0 \times 10^2$
13	Sir star 7 dana	—
14	Sir star 10 dana	—
15	Sir star 20 dana	10
16	Sir star 31 dan	$2,0 \times 10^2$
17	Sir star 42 dana	$6,0 \times 10^2$

U pasterizovanom mleku, kao i jednom uzorku mleka u kadi i grušu plesni takođe nisu konstantovane u zimskom periodu.

U površinskom sloju sira, starom 7 i 10 dana, plesni nije bilo, dok je u ostalim periodima tokom zrenja sira konstantovan relativno mali ukupan broj plesni (od 10 do $6,0 \times 10^2$ /ml) (tablica 5).

Kao zagađivači uzoraka mleka i sira ispitanih u zimskom periodu pojavilo se svega 5 rodova plesni (tablica 6). *Penicillium* je bio zastupljen samo sa dve vrste i to: *P. camemberti* i *P. verrucosum* var. *cyclopium*. Karakteristična je pojava *Geotrichum candidum*, plesni koja se često pojavljuje kao kontaminant mleka i proizvoda od mleka (Škrinjar, 1984, Škrinjar i dr., 1983). U ovom periodu *G. candidum* izolovan je čak iz 90% uzoraka koji su bili plesnivi.

Relativno mali ukupan broj plesni, koji je nađen u ispitivanim uzorcima, kao i mala zastupljenost različitih vrsta, najverovatnije su posledica niske temperature i relativne vlažnosti vazduha, koja je zabeležena u prostorijama za zrenje sira u zimskom periodu (tablica 7).

Tablica 6. Vrste plesni izolovane iz uzoraka sirovog mleka i sira ispitanim u zimskom periodu godine

Table 6. Mould species isolated from raw milk and cheese samples tested in winter

Uzorak broj	Vrsta uzorka	Vrsta plesni
1	Sirovo mleko (Otkupna stanica I)	<i>Alternaria alternata</i> <i>Geotrichum candidum</i> <i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>
2	Sirovo mleko (Otkupna stanica II)	—
3	Sirovo mleko (Otkupna stanica III)	<i>Geotrichum candidum</i> <i>Geotrichum</i> sp. ₁
4	Sirovo mleko (Otkupna stanica IV)	<i>Geotrichum candidum</i> <i>Penicillium camemberti</i>
5	Mleko iz pasterizatora	—
6	Mleko u kadi	<i>Geotrichum candidum</i>
7	Mleko u kadi	—
8	Gruš u kadi	—
9	Surutka u kadi	<i>Geotrichum candidum</i> <i>Rhizopus nigricans</i>
10	Salamura	<i>Geotrichum candidum</i>
11	Sir posle kalupljenja	<i>Geotrichum candidum</i>
12	Sir star 2 dana	<i>Geotrichum candidum</i>
13	Sir star 7 dana	—
14	Sir star 10 dana	—
15	Sir star 20 dana	<i>Geotrichum candidum</i>
16	Sir star 31 dan	<i>Geotrichum candidum</i> <i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>
17	Sir star 42 dana	<i>Mucor hiemalis</i> <i>Penicillium camemberti</i>

Tablica 7. Prisustvo aflatoksin B₁, ohratoksin A i zearalenona u uzorcima sirovog mleka i sira ispitanim u zimskom periodu godine

Table 7. Aflatoxin B₁, ochratoxin A and zearalenone presence in raw milk and cheese samples tested in winter

Uzorak broj	Vrsta uzorka	Aflatoxin B ₁ µg/kg	Ochratoxin A µg/kg	Zearalenon µg/kg
1	Sirovo mleko (Otkupna stanica I)	u tragovima	—	—
2	Sirovo mleko (Otkupna stanica II)	u tragovima	—	—
3	Sirovo mleko (Otkupna stanica III)	u tragovima	—	—
4	Sirovo mleko (Otkupna stanica IV)	u tragovima	—	—
5	Mleko iz pasterizatora	u tragovima	—	—
6	Mleko u kadi	u tragovima	—	—
7	Mleko u kadi	u tragovima	—	—
13	Sir star 7 dana	u tragovima	—	—
14	Sir star 10 dana	—	—	—
15	Sir star 20 dana	—	—	—
16	Sir star 31 dan	u tragovima	—	—
17	Sir star 42 dana	u tragovima	—	—

Tablica 8. Temperatura i relativna vlažnost vazduha u prostorijama za zrenje sira u zimskom periodu godine

Table 8. Ripening room-air temperature and relative humidity in winter

Uzorak broj	Vrsta uzorka	Temperatura vazduha (0 °C)	Relativna vlažnost vazduha (‰)
12	Sir star 2 dana	9,0	81,0
13	Sir star 7 dana	10,5	80,0
14	Sir star 10 dana	10,0	79,0 — 84,0
15	Sir star 20 dana	10,5 — 11,0	78,0 — 86,0
16	Sir star 31 dan	8,5	82,0 — 86,0
17	Sir star 42 dana	8,0	82,0 — 89,0

Aflatoksin B₁ ustanovljen je u zimskom periodu u svim uzorcima mleka i sira ali u malim koncentracijama (tablica 8). Izvorište aflatoksina B₁ i uzročnik njegove pojave u mleku, a kasnije i siru, verovatno je higijenski neispravna stočna hrana, kojom je hranjena muzna stoka u to doba. Ochratoksin A i zearalenon nisu konstantovani, međutim, ponovo je utvrđeno prisustvo istog nepoznatog toksičnog metabolita u ochratoksinskoj frakciji, kao i u jesenjem periodu, i to u velikim količinama.

Rezultati ispitivanja prisustva plesni i mikotoksina u mleku i siru, koja su vršena u prolećnom periodu, dati su u tablicama 9, 10 i 11.

Tablica 9. Ukupan broj plesni u uzorcima sirovog mleka i sira ispitanim u prolećnom periodu godine

Table 9. Total viable count of moulds in raw milk and cheese samples tested in spring

Uzorak broj	Vrsta uzorka	Ukupan broj plesni (u 1 g)
1	Sirovo mleko (Otkupna stanica I)	$1,00 \times 10^3$
2	Sirovo mleko (Otkupna stanica II)	$4,00 \times 10^3$
3	Sirovo mleko (Otkupna stanica III)	$1,30 \times 10^3$
4	Mleko iz pasterizatora I	$0,50 \times 10^2$
5	Mleko iz pasterizatora II	$1,00 \times 10^2$
6	Mleko u kadi	—
7	Gruš u kadi	—
8	Surutka u kadi	—
9	Salamura	$1,50 \times 10^2$
10	Sir posle kalupljenja	$1,00 \times 10^3$
11	Sir iz salamure	$3,00 \times 10^2$
12	Sir pre vakumiranja	10
13	Sir star 10 dana	$1,50 \times 10^2$
14	Sir star 20 dana	$1,80 \times 10^2$
15	Sir star 30 dana	$2,20 \times 10^2$
16	Sir star 40 dana	$1,60 \times 10^2$

Tablica 10. Vrste plesni izolovane iz uzoraka sirovog mleka i sira ispitanim u prolećnom periodu godine

Table 10. Mould species isolated from raw milk and cheese samples tested in spring

Uzorak broj	Vrsta uzorka	Vrsta plesni
1	Sirovo mleko (Otkupna stanica I)	<i>Geotrichum candidum</i>
2	Sirovo mleko (Otkupna stanica II)	<i>Geotrichum candidum</i> <i>Monilia</i> sp. <i>Phoma lycopersici</i>
3	Sirovo mleko (Otkupna stanica III)	<i>Geotrichum candidum</i> <i>Monilia</i> sp. <i>Oidiodendron tenuissimum</i>
4	Mleko iz pasteurizatora I	<i>Cladosporium herbarum</i>
5	Mleko iz pasteurizatora II	<i>Cladosporium oxysporum</i> <i>Penicillium claviforme</i>
6	Mleko u kadi	—
7	Gruš u kadi	—
8	Surutka u kadi	—
9	Salamura	<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Fusarium moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i> <i>Geotrichum candidum</i> <i>Penicillium camemberti</i> <i>P. verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i> <i>Phoma pomorum</i>
10	Sir posle kalupljenja	<i>Geotrichum candidum</i>
11	Sir iz salamure	<i>Geotrichum candidum</i>
12	Sir pre vakumiranja	<i>Geotrichum candidum</i>
13	Sir star 10 dana	<i>Alternaria alternata</i> <i>Geotrichum candidum</i>
14	Sir star 20 dana	<i>Aspergillus versicolor</i> <i>Penicillium camemberti</i> <i>P. commune</i> <i>P. verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i> <i>Ulocladium botrytis</i>
15	Sir star 30 dana	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>A. versicolor</i> <i>Mucor circinelloides</i> <i>Penicillium camemberti</i> <i>P. verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>
16	Sir star 40 dana	<i>Alternaria alternata</i> <i>Cladosporium herbarum</i> <i>Penicillium claviforme</i> <i>P. frequentans</i> <i>P. verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>

Upoređujući rezultate prikazane u tablicama 5 i 9 može se videti, da je ukupan broj plesni, nađen u proleće u sirovom mleku, bio priližno isti kao i u zimskom periodu.

Mada se postupak pasterizacije odvijao na isti način kao i u toku ranijih istraživanja, neke su plesni preživjele ovaj toplotni tretman. U mleku u sirnoj kadi, grušu i surutki, plesni nisu pronađene, a u uzorcima sira konstantovan je približno isti ukupan broj plesni, kao i tokom zime.

Geotrichum candidum ponovo se javio kao značajan kontaminant mleka i sira u prolećnom periodu (tablica 10). Međutim, može se uočiti, da su se u ovom periodu pojavile i plesni (*Aspergillus versicolor*, *Cladosporium herbarum*, *C. oxysporum*, *Mucor circinelloides*, *Oidiodendron tenuissimum*, *Penicillium claviforme*, *P. commune*, *P. frequentans*, *Phoma lycopersici*, *Ulocladium botrytis*), čije prisustvo tokom ovih oglada do sada nije zapaženo.

Tablica 11. Prisustvo aflatoksina B₁, ohratoksina A i zearalenona u uzorcima sirovog mleka i sira ispitanim u prolećnom periodu godine

Table 11. Aflatoxin B₁, ochratoxin A and zearalenone presence in raw milk and cheese samples tested in spring

Uzorak broj	Vrsta uzorka	Aflatoksin B ₁ µg/kg	Ohratoksin A µg/kg	Zearalenon µg/kg
1	Sirovo mleko (Otkupna stanica I)	—	—	—
2	Sirovo mleko (Otkupna stanica II)	—	—	—
3	Sirovo mleko (Otkupna stanica III)	—	—	—
4	Mleko iz pasterizatora I	—	—	—
5	Mleko iz pasterizatora II	—	—	—
6	Mleko u kadi	—	—	—
12	Sir pre vakumiranja	—	—	—
13	Sir star 10 dana	—	—	—
14	Sir star 20 dana	—	—	—
15	Sir star 30 dana	—	—	—
16	Sir star 40 dana	—	—	—

Aflatoksin B₁, ohratoksin A i zearalenon nisu ustanovljeni u uzorcima ispitanim u prolećnom periodu (tablica 11) ali se u ohratoksinskoj frakciji ponovo pojavio nama nepoznati metabolit.

Nastavak u broju 2/86.