

ISPITIVANJE UTICAJA AFLATOKSINA B₁ NA DINAMIKU RAZVOJA MIKROORGANIZAMA U ZRENJU TRAPISTA

Mr. Dragojlo OBRADOVIĆ, Angelina NIKOLIN, dipl. inž., prof. dr. Marija ŠUTIĆ, Poljoprivredni fakultet Beograd, Aleksandar Davitkov, dipl. inž., PKB, Beograd

Uvod

Mikotoksini su metabolički proizvodi plesni i spadaju u grupu prirodno najjačih karcinogenih supstanci koje se mogu naći u hrani. Od svih mikotoksina, kada se radi o mleku i mlečnim proizvodima najintenzivnije su ispitivani aflatoksinini o čemu svedoče veoma obimni literaturni podaci (Wogan, 1964., Purchese, 1974., Šutić et al., 1979.).

Formiranje aflatoksina je u tesnoj povezanosti sa plesnima koje ih stvaraju i od interesa su samo one koje u mleku i mlečnim proizvodima kao prirodnoj sredini proizvode aflatoksine. Međutim, kada se *Aspergillus flavus* prebaci u drugu sredinu sa subkultivisanjem može da izgubi sposobnost sinteze toksina. Aflatoksinini su termostabilni, odnosno ne razgrađuju se prilikom termičkog tretmana, pa je i mogućnost pozitivnog nalaza kod pojedinih mlečnih proizvoda uvećana.

Međutim, uprkos tome što se dejstvo aflatoksina na životinje i čoveka detaljno izučava, njihov uticaj na mikroorganizme nije razjašnjen. Pretpostavlja se da kod mikroorganizama postoji veći broj mesta na koje deluje aflatoksin, što može dovesti do morfoloških i fizioloških promena, inhibicije sinteze DNA (Lillehoy and Siegler, 1967.), a u izvesnim slučajevima i do smrti. Imajući u vidu značaj bakterija mlečne kiseline za proizvodnju fermentisanih proizvoda, preduzeta su ispitivanja da se vidi kako na njih deluju aflatoksinini. Prvi rezultati su pokazali da aflatoksin B₁ koči razvoj bakterija mlečne kiseline (Šutić, 1972.). U docnijim radovima (Šutić et al., 1976. i Šutić i Banina, 1979.) izneto je da aflatoksin B₁ menja morfološki izgled bakterija mlečne kiseline kao i njihova fiziološka svojstva. Tako se pod dejstvom aflatoksina B₁ štapičastim bakterijama povećava dužina i širina a kod streptokoka povećava se broj ćelija u lancu.

Pored toga acidogena sposobnost bakterija je varirala a kao opšta konstatacija izneto je da osetljivost na aflatoksine varira u zavisnosti od vrste i soja, koncentracije aflatoksina kao i dužine izlaganja ćelija. Imajući u vidu značaj navedenih problema, vezanih za dejstvo aflatoksina na bakterije mlečne kiseline, smatrali smo da će biti korisno da utvrdimo u kojoj meri aflatoksin B₁ deluje na dinamiku mikroflore u procesu zrenja sireva. Ovo dejstvo aflatoksina B₁ ispitivano je u zrenju sira trapista koji je sazrevao na klasičan način i u plastičnim folijama.

Materijal i metod rada

Sirevi korišćeni u ovom radu izrađeni su u RO IMLEK OOUR STANDARD PKB-a po standardnoj tehnologiji za sir trapist u dve varijante. U prvoj varijanti mleku su dodavane kulture za trapist, a u drugoj pored kultura dodat je aflatoksin B₁ u koncentraciji 32 µg/l mleka. Aflatoksin B₁ proizveden je u laboratoriji katedre za mikrobiologiju sa kulturom *Aspergillus flavus* soj MP₁. Polovina sireva i jedne i druge varijante sazrevala je na klasičan način a druga polovina u plastičnim folijama, na temperaturi od 10—12° C. Mikrobiološke analize su obuhvatile ispitivanje mleka i gruša kao i uzoraka sira koji su uzimani pre pakovanja u foliju, a zatim posle 13, 26, 36 i 47 dana od izrade.

Za praćenje razvoja karakteristične mikroflore korišćen je: kvašćev dekstrozni agar za ukupan broj mikroorganizama, hranljivi agar sa 10% NaCl za mikrokoke, agar po Rogosi za štapičaste bakterije mlečne kiseline i Barnesova podloga za streptokoke. Pored toga vršena je i organoleptička ocena svih sireva.

Rezultati ispitivanja

Iz rezultata dinamike razvića ukupnog broja mikroorganizama (graf. 1.) može se uočiti da je u gruš sa aflatoksinom nađen manji broj mikroorganizama (4×10^6). Međutim, već petog dana zrenja uočena je vrednost za sir sa aflatoksinom od 35×10^6 bakterija po gramu prema 25×10^6 za sir bez aflatoksina. Za oba sira koji su sazrevali na klasičan način ovo su bile maksimalne vrednosti. Kod obe varijante sira sa zrenjem u foliji, najveći broj mikroorganizama pronađen je 26-og dana, a zatim je u daljem toku zrenja opadao.

Rezultati dinamike razvića streptokoka prikazani na graf. 2. ukazuju da i u ovom slučaju gruš sa aflatoksinom sadrži manji broj streptokoka, ali da već posle pet dana ta vrednost postaje veća u odnosu na varijantu bez aflatoksina. Isto tako zapaža se da broj streptokoka kod sira sa zrenjem u foliji blaže opada u odnosu na sireve sa klasičnim zrenjem. Taj blaži pad se primećuje, kod varijante bez aflatoksina posle 13 dana, a kod varijante sa aflatoksinom posle 26 dana.

Upoređivanjem rezultata iznetih u graf. 3. zapaža se da gruš sa aflatoksinom sadrži $1,7 \times 10^4$ bakterija po gramu a gruš bez aflatoksina $3,5 \times 10^4$. U daljem toku zrenja broj štapičastih bakterija raste i to u obe varijante, s tim što su vrednosti kod sira sa aflatoksinom veće, tako da 26-og dana iznose 12×10^6 (gr. prema 6×10^6) gr. za sir bez aflatoksina. Ovo su istovremeno bile i maksimalne vrednosti, jer u daljem toku zrenja broj štapičastih bakterija opada. Kod sireva koji su pakovani u folijama maksimalne vrednosti za sir bez aflatoksina postignute su 26-og dana a za drugu varijantu 10 dana kasnije.

Kod rezultata dinamike mikrokoka prikazane na grafikonu 4. zapaža se da vrednosti opadaju za sve varijante, sem u slučaju sira sa aflatoksinom koji sazreva na klasičan način. Kod ove varijante maksimalan broj mikrokoka postignut je 36-og dana, ali je već u sledećem ispitivanju broj bio manji od iste varijante sa zrenjem u foliji.

Organoleptička ocena je pokazala da se kod sira sa aflatoksinom, kod koga je primenjeno klasično zrenje, na preseku zapaža manji broj neravnomerno raspoređenih šupljika, dok je boja testa bila ujednačena i vidno svetlija u odnosu na standardnu varijantu. Isto tako testo je bilo elastično i gumasto, miris nespecifičan, a ukus gorak.

Za sir sa aflatoksinom u plastičnim folijama karakteristična je ujednačena beličasto-žuta boja, sa manjim brojem šupljika na preseku, i to više na sredini. Sir je posedovao zrnastu strukturu, nespecifičan miris i kao i u prethodnom slučaju odavao je utisak potpuno nezrelog sira.

Diskusija

Iz iznetih rezultata se vidi da aflatoksin B₁ deluje na ukupan broj mikroorganizama, broj streptokoka, broj štapičastih bakterija mlečne kiseline i broj mikrokoka. Karakteristično je da je gruša sira kome je dodat aflatoksin, sadržavao manji broj svih ispitivanih vrsta mikroorganizama u odnosu na normalnu varijantu, a da je i samo zgrušavanje duže trajalo. Ovo navodi na pretpostavku da aflatoksin B₁ koči razvoj bakterija mlečne kiseline i da acidogena sposobnost navedenih bakterija zavisi kako od koncentracije aflatoksina tako isto i od vrste mikroorganizama i dužine izlaganja njegovom dejstvu (Šutić et. al., 1976).

Međutim, već petog dana zrenja dolazi do povećanja ukupnog broja mikroorganizama, broja streptokoka, broja štapičastih bakterija mlečne kiseline i ove vrednosti su veće od onih koje su zabeležene kod varijante bez aflatoksina.

Ovo pruža mogućnost tumačenju da je koncentracija aflatoksina bila nedovoljna da zaustavi razvoj mikroorganizama i da nakon početne inhibicije slede faze prilagođavanja i blage stimulacije. Pri tome ne sme se izgubiti iz vida da se početna dodatna koncentracija aflatoksina B₁ od 32 µg/l povećava jer prema podacima iz literature samo oko 20% aflatoksina odlazi u surutku a oko 80% ostaje u neispravnom grušu pošto se pretpostavlja da postoji afinitet aflatoksina u odnosu na kazein (Mc. Kinney et al., 1973).

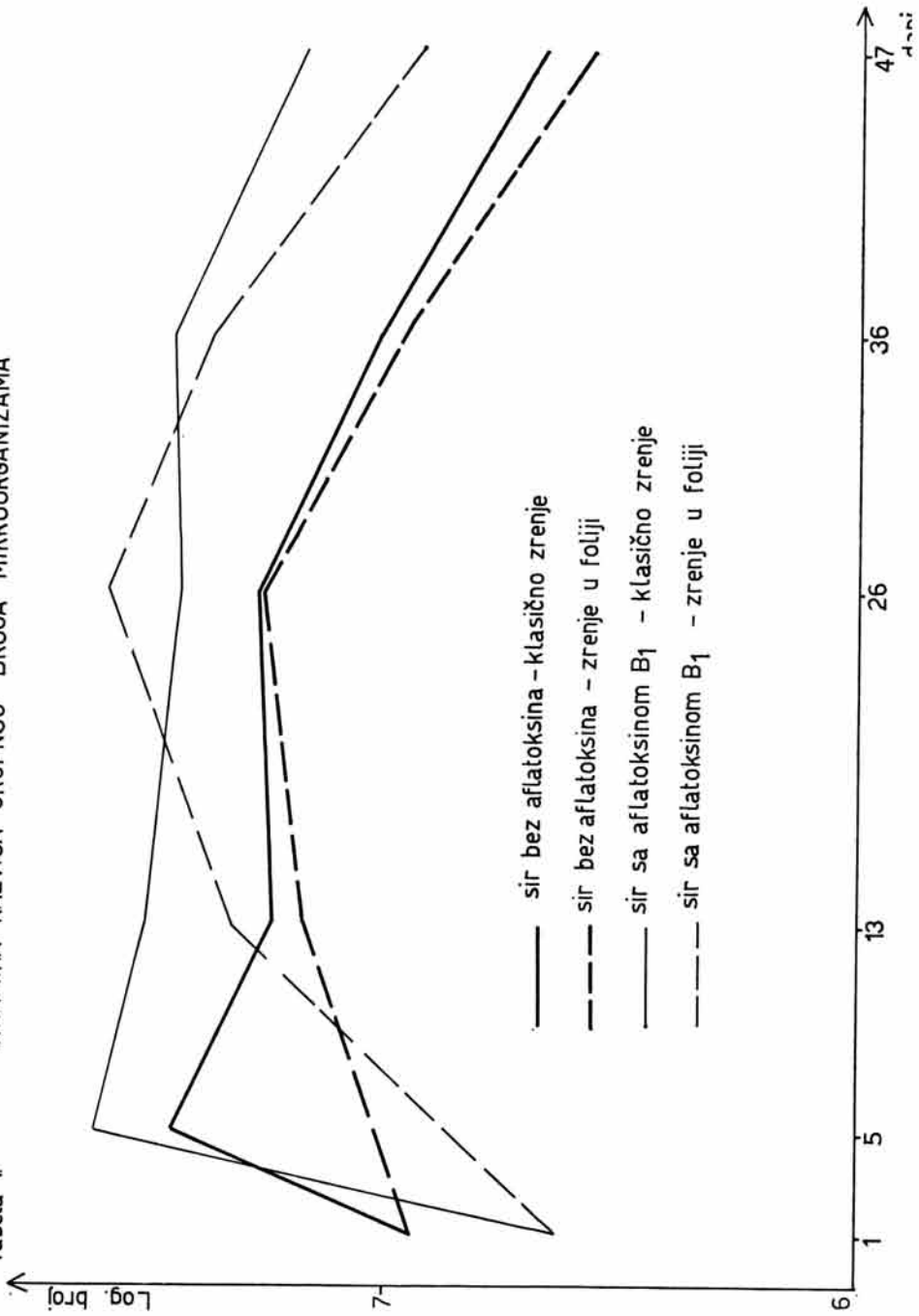
Prema podacima iz literature aflatoksin B₁ u izvesnim slučajevima i pri određenim koncentracijama, stimulatивно deluje kako na bakterije mlečne kiseline tako i na ostale mikroorganizme (Šutić i Banina 1979., Tong Man-Ong. 1975). Pod dejstvom aflatoksina B₁ štapičaste bakterije mlečne kiseline se izdužuju i na pojedinim mestima zadebljavaju dok se kod streptokoka pored uvećanja javlja veći broj ćelija u lancu. Ovo bi moglo biti objašnjenje zašto je u celom toku zrenja sem u početnoj fazi ukupan broj mikroorganizama bio veći kod sireva kod kojih je dodavan aflatoksin.

Upoređivanjem dinamike razvića streptokoka i štapičastih bakterija mlečne kiseline, broj streptokoka je veći od broja štapičastih bakterija u celokupnom toku zrenja, bez obzira na njihovo konstantno opadanje, što je u saglasnosti sa menjanjem mikroflore sireva za vreme zrenja. Ponovo se zapaža da je broj ispitivanih bakterija bio veći kod sireva kod kojih je dodavan aflatoksin, samo što se maksimalne vrednosti postižu 13 dana kasnije u odnosu na odgovarajuće kod sira bez aflatoksina.

Za dinamiku razvića mikrokoka karakterističan je stalni trend opadanja, sem u slučaju sira kome je dodan aflatoksin B₁, a trend koji je sazrevao na

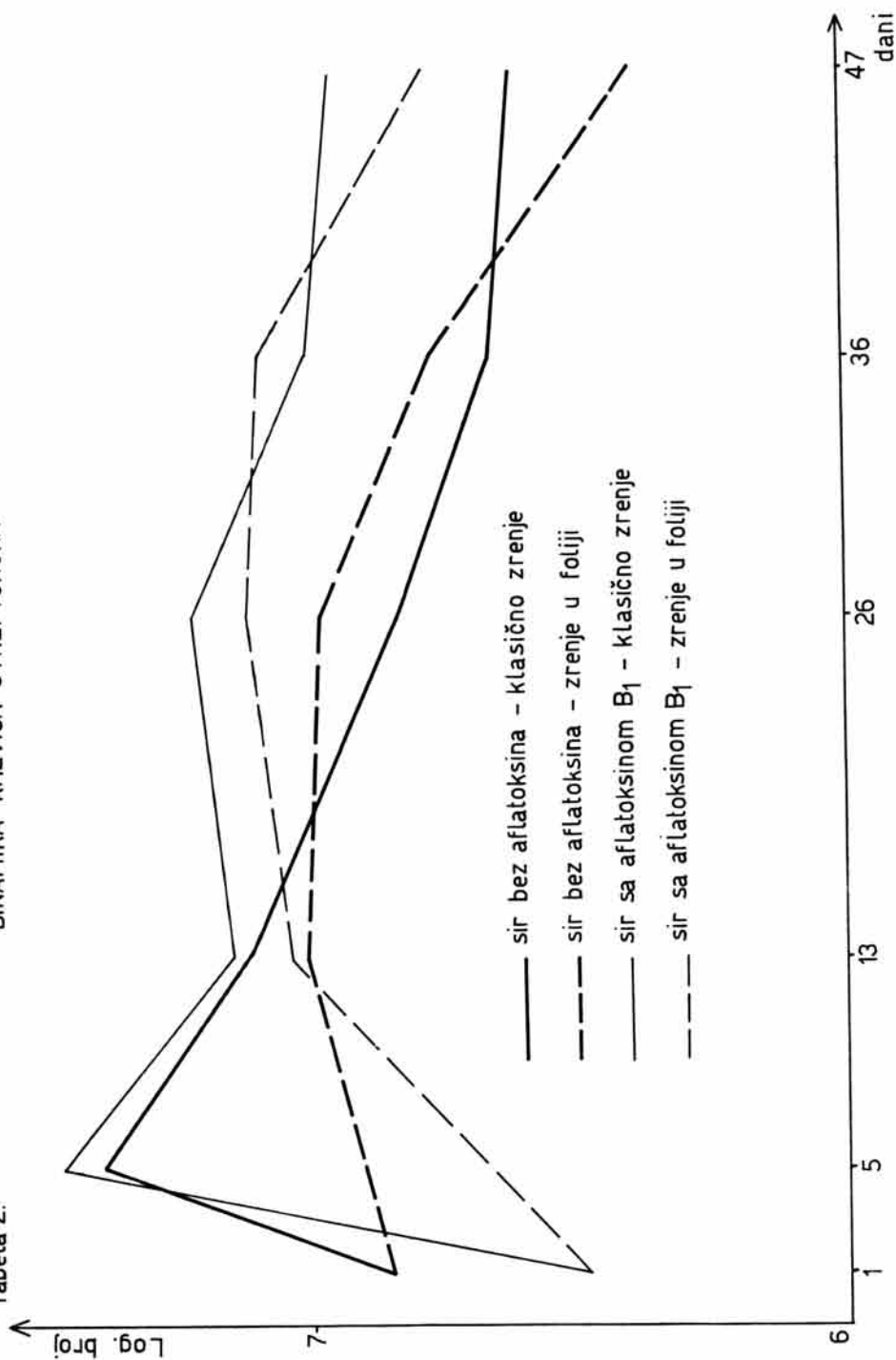
DINAMIKA RAZVIĆA UKUPNOG BROJA MIKROORGANIZAMA

Tabela 1.

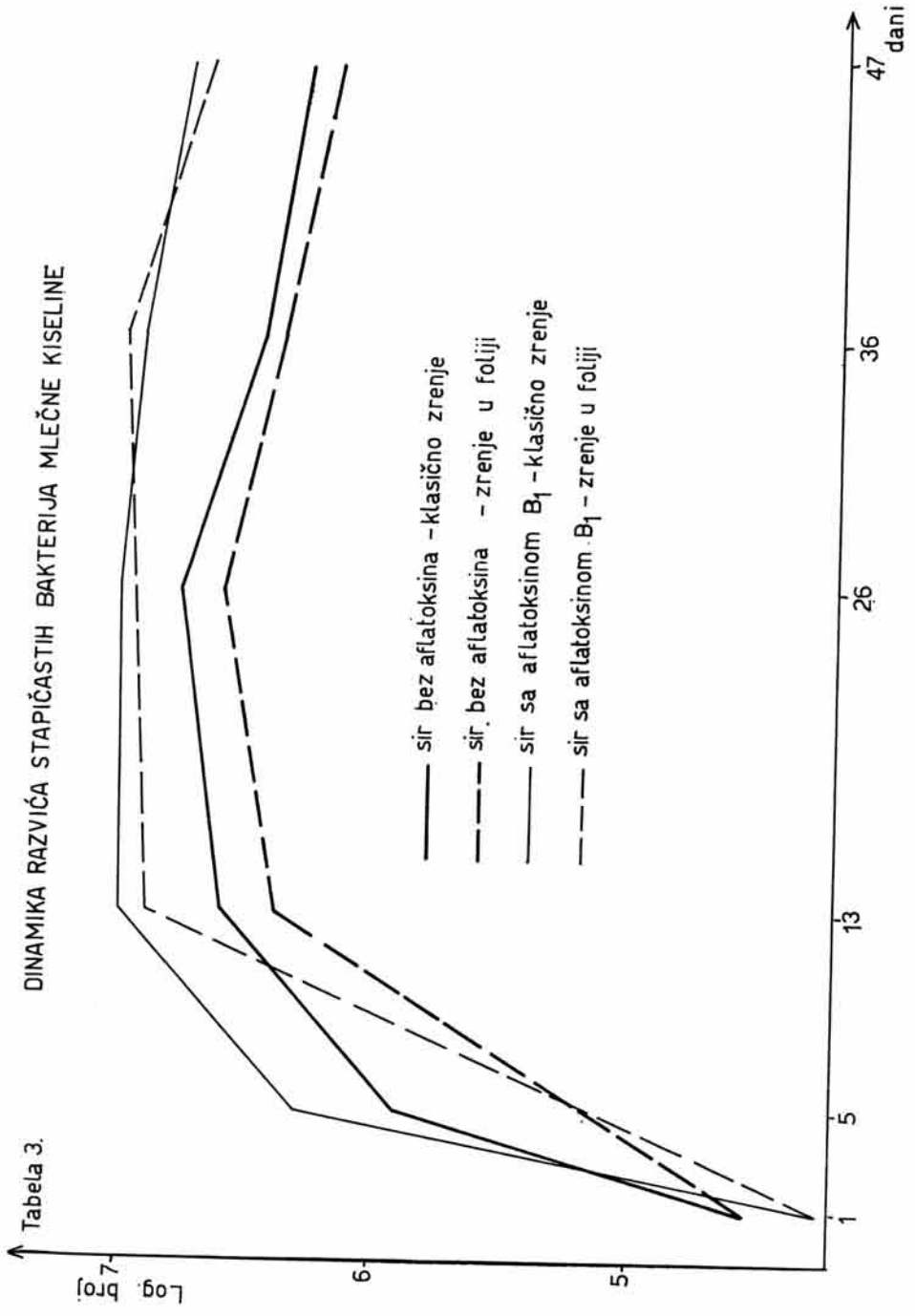


DINAMIKA RAZVIĆA STREPTOKOKA

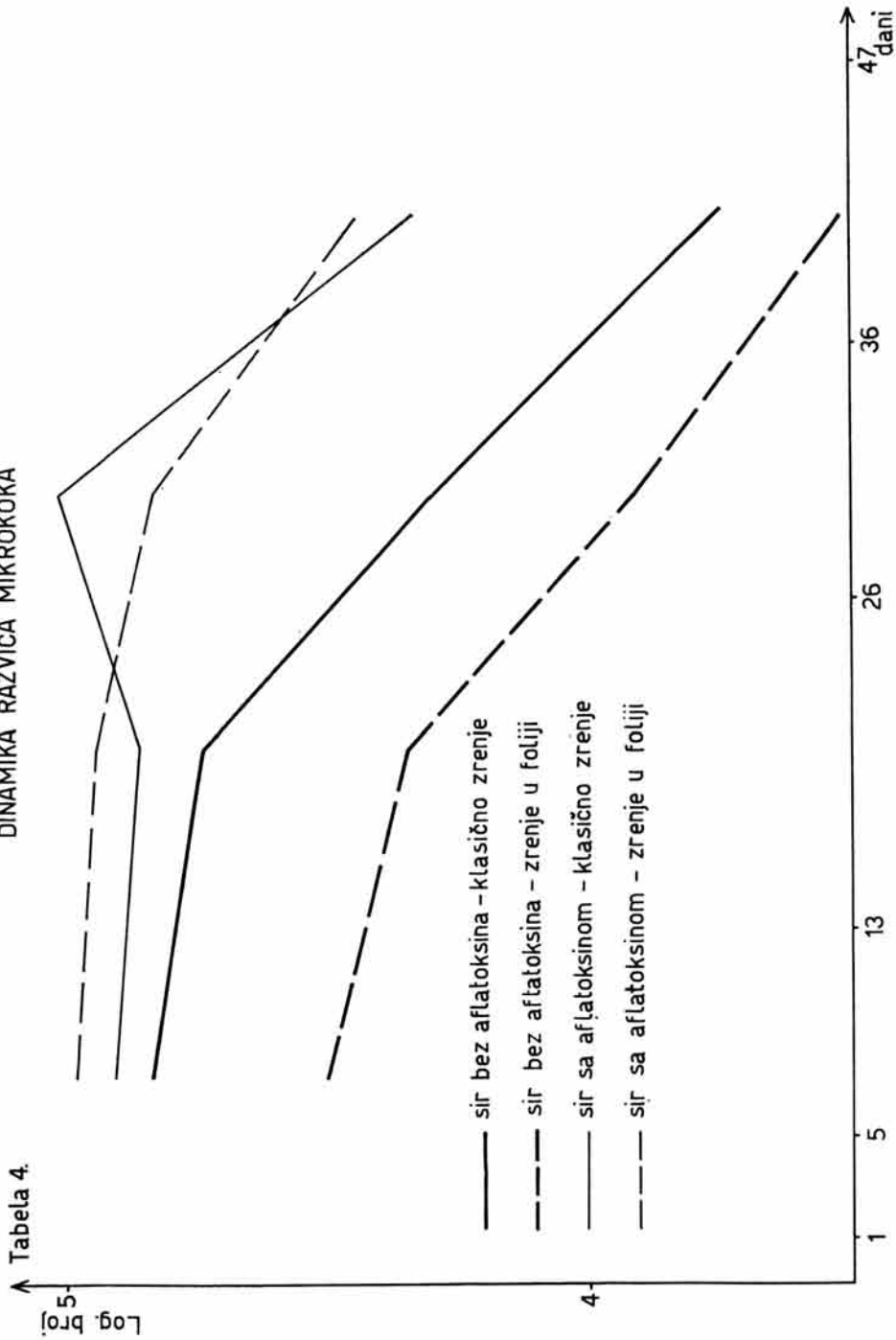
Tabela 2.



DINAMIKA RAZVIĆA STAPIĆASTIH BAKTERIJA MLEČNE KISELINE



DINAMIKA RAZVIĆA MIKROKOKA



klasičan način, ali se ovo povećanje ne bi moglo pripisati nekim specifičnim promenama u zrenju sireva.

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da aflatoksin utiče na proces podsirivanja mleka, da ga produžuje u odnosu na mleko kome nije dodat aflatoksin. Za vreme podsirivanja broj mikroorganizama u grušu s aflatoksinom je manji nego u grušu normalne varijante. U docnijem toku zrenja zapaža se stimulatívno dejstvo aflatoksina na bakterije, tako da je broj svih ispitivanih mikroorganizama bio veći kod sireva kojima je dodavan aflatoksin.

Aflatoksin deluje i na organoleptička svojstva sireva jer su sirevi sa aflatoksinom bili nezreli i posedovali su gumastu konzistenciju. Ovo potvrđuje i podatak da je broj mikroorganizama na kraju zrenja kod sireva sa aflatoksinom odgovarao broju u siru bez aflatoksina sa 13 dana starosti.

Research of aflatoxin B₁ influence on development of microorganisms during Trappist cheese ripening

Summary

The effect of aflatoxin B₁ on Trappist cheese microflora is presented. It has been shown that curdling of milk with aflatoxin B₁ is prolonged. The total bacterial number in the curd was also smaller in comparison with standard sample. Higher bacterial numbers in the further course of cheese ripening indicated that aflatoxin had a slight stimulation on the cheese microflora.

Literatura

1. LILLEHOJ, E. B. and SIEGLER, A. 1967: Inhibition of DNA synthesis in *Flavobacterium aurantiacum* by aflatoxin B₁, *J. Bacteriol* 14, 403.
2. MC KINNEY, J. D., GC. CACANAGH, J. T. BELL, and HOVERSLAND, 1973: *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 50, 79.
3. Tong-Mang Ong. 1975: Aflatoxin mutagenesis. *Mutation Research*, 32, 35—53.
4. PURCHASE, J. F. H. 1974: *Mycotoxins*, Amsterdam.
5. SUTIC, M. 1972: Dejstvo aflatoksina na vrste bakterija mlečne kiseline. II Kongres mikrobiologa Jugoslavije, Opatija, 323—324.
6. SUTIC, M., BANINA, A. i JOVANOVIĆ, S. 1976: III Kongres mikrobiologa Jugoslavije, Bled, 690—691.
7. SUTIC, M., MITIC, S. i SVILAR, N. 1979: Aflatoksini u mleku i mlečnim proizvodima, *Mljekarstvo*, 29. (4) 74—80.
8. SUTIC, M. i BANINA, A. 1979: Promene bakterija mlečne kiseline pod uticajem aflatoksina B₁ i značaj za proizvodnju, *Mljekarstvo* 29. (5) 106—107.
9. WOGAN, G. N. 1964: *Mycotoxins in Foodstuffs*, 412, MIT Press, Cambridge, MAS.