

Prema rezultatima drugih autora i prema našim ispitivanjima energetska vrijednost tržnog mlijeka je niša od svježeg mlijeka. Ovo ukazuje na činjenicu da standardizacijom mlijeka oduzimamo dio energetske materije, a postupkom sa mlijekom snizujemo i procenat bjelančevina što naročito utiče kod ocjenjivanja hranljive vrijednosti konzumnog mlijeka.

### Literatura

1. ADRIAN J.: Valeur alimentaire du lait La maison Rustique Paris 1973.
2. DAVIS J. D.: A Dictionary of Dairying, London 1955.
3. DOZET N., KALUĐERČIĆ M., STANIŠIĆ M., SUMENIĆ S.: Ispitivanje bjelančevina mlijeka hranidbenih komponenti u ljudskoj ishrani **Hrana i ishrana XVI**, 5—6 1975.
4. DOZET N., STANIŠIĆ M., SUMENIĆ S., PARIJEZ S.: Sastav, kvalitet i proizvodnja mlijeka na brdsko-planinskom području. **Mljekarstvo** 25 (10), 1975.
5. INIHOV G. S.: Biohimijska molekula i moločnih proizvoda Pišćepromizdat, Moskva 1962.
6. JAKOBSEN P. E.: Nutritive Value of dairy Products **Dairy Industries International** 43 (6) 1978.
7. JENNESS R., PATTON S.: Principles of dairy chemistry John Wiley New York, 1959.
8. LIBEC S. P.: Fiziko-himijske svojstva i termoustojčivost zagotavljaemoga moloča **Mol. prom.** 8, 1978.
9. MILETIĆ S.: Varijacije sastava pasterizovanog mlijeka **Poljoprivredna znanstvena Smotra** 40 (50) 113—118, Zagreb 1977.
10. PIJANOWSKI E.: Zarys chemii i technologii mleczarstwa Warszawa 1957.
11. PORTER J. W. G.: Milk and Dairy Foods Oxford University press, 1975.

## PROMENE BAKTERIJA MLEČNE KISELINE POD UTICAJEM AFLATOKSINA B<sub>1</sub> I ZNAČAJ ZA PROIZVODNJU\*

Prof. dr Marija ŠUTIĆ, mr. Ana BANINA, Poljoprivredni fakultet, Beograd

### Uvod

U proizvodnji kiselo-mlečnih proizvoda postoji problem spornijeg zgrušavanja mleka ili ono potpuno izostaje. Najčešći uzroci ove pojave su slab kvalitet bakterija mlečne kiseline, kontaminacija drugim bakterijama, kontaminacija virusima, prisustvo penicilina u mleku i drugih agenasa koji deluju na bakterije mlečne kiseline (Galesloot, 1956., Baugham and Nelson, 1958., Liska, 1969., Rašić i Kurmann, 1978.).

Međutim, dešava se da mleko ne sadrži nikakve poznate strane agense i da su bakterije mlečne kiseline dobrog kvaliteta, pa ipak ne dolazi do normalnog zgrušavanja. Nesumnjivo je dokazano da se u mleku može naći aflatoksin M<sub>1</sub>, koji predstavlja hidroksilni derivat aflatoksina B<sub>1</sub>, sa istim toksičnim svojstvima (Allcroft and Carnagham, 1963., Allcroft et al., 1966., Allcroft and Roberts, 1968., Jong et al., 1964., Masri et al., 1967., Kiermeier, 1973. i dr.). S obzirom da je aflatoksin termostabilan ne razgrađuje se prilikom termičke obrade, pa se može naći i u mleku za kiselo-mlečne proizvode. Aflatoksin B<sub>1</sub> ne samo da štetno deluje na organizam čoveka i životinje, već i na mikroorganizme (Ciegler and Lillehoj, 1968., Burmeister and Hesseltine, 1966. i dr.), pa smo smatrali da će biti korisno da proverimo dejstvo aflatoksina na bakterije mlečne kiseline.

\* Referat održan na XVII Seminaru za mljekarsku industriju, Zagreb 1979.

U našem prvom radu iz ove problematike (Šutić, 1972.) utvrdili smo, aukso-nografskom metodom na čvrstoj podlozi, da aflatoksin B<sub>1</sub> zaustavlja razvoj nekih bakterija mlečne kiseline i da zona inhibicije zavisi od koncentracije aflatoksina i vrste bakterija. Ovi rezultati su pokazali da se ovim eksperimentima treba nastaviti, pa smo ispitivali utjecaj aflatoksina B<sub>1</sub> na morfološka i acidogena svojstva nekih bakterija mlečne kiseline. Bilo bi možda bolje da smo koristili aflatoksin M<sub>1</sub>, ali njega je teško dobiti, a kako je to derivat aflatoksina B<sub>1</sub> sa istim toksičnim svojstvima, to smo koristili aflatoksin B<sub>1</sub>.

Aflatoksin B<sub>1</sub> smo proizvodili u Laboratoriji za mikrobiologiju sa kulturom *Aspergillus flavus* soj MP<sub>1</sub> (izolovan u SAD sa šunke, Šutić et al., 1972.) koji je proveren spektrofotometrijski i biološkim testom.

Ova ispitivanja su već saopštena na drugim kongresima (Šutić i dr. 1976a, 1976b, 1978), pa ćemo ovde prikazati izvode iz tih radova.

Uticao aflatoksina B<sub>1</sub> na morfološka svojstva bakterija mlečne kiseline

U jednom ogledu ispitivan je uticaj aflatoksina B<sub>1</sub> u koncentraciji 0,11, 0,22 i 0,44 µg/10 ml obranog mleka, na dva soja *Lactobacillus helveticus*, jedan soj *L. casei* i jedan soj *Streptococcus lactis*. Mikroskopski preparati iz kontrolnog mleka i sa dodatim količinama aflatoksina, posle 24, 48 i 72 časa od zasejavanja, pokazuju da aflatoksin deluje na izgled ćelija ispitivanih bakterija mlečne kiseline. Kod štapičastih bakterija dolazi do promene u širini ćelija, a kod *S. lactis* do promena u broju ćelija u lancu. Ovi rezultati prikazani su u tabeli 1.

**Tabela 1**  
Prosečne vrednosti širine ćelija laktobakterija i broja ćelija u nizu *S. lactis* pod dejstvom aflatoksina B<sub>1</sub>

| Kulture                                    | Vreme u čas. | Kontrola bez aflatoksina | Aflatoksin B <sub>1</sub> |         |              |
|--|--------------|--------------------------|---------------------------|---------|--------------|
|  |              |                          | 0,11 µg                   | 0,22 µg | 0,44 µg/loml |
| <i>L. helveticus</i><br>No 1.              | 24           | 0,52                     | 0,65                      | 0,63    | 0,75         |
|  | 48           | 0,46                     | 0,80                      | 0,91    | 0,85         |
|  | 72           | 0,52                     | 0,57                      | 0,65    | 0,58         |
| <i>L. helveticus</i><br>No 2.              | 24           | 1,0                      | 1,43                      | 1,48    | 1,18         |
|  | 48           | 1,4                      | 1,53                      | 1,47    | 1,46         |
|  | 72           | 1,38                     | 1,40                      | 1,47    | 1,21         |
| <i>L. casei</i>                            | 24           | 1,48                     | 1,51                      | 1,52    | 1,41         |
|  | 48           | 1,35                     | 1,43                      | 1,68    | 1,28         |
|  | 72           | 0,90                     | 1,02                      | 1,13    | 0,91         |
| <i>S. lactis</i><br>broj ćelija<br>u lancu | 24           | 5,06                     | 7,06                      | 7,35    | 7,7          |
|  | 48           | 4,53                     | 5,10                      | 6,10    | 6,57         |
|  | 72           | 4,53                     | 6,33                      | 6,55    | 7,9          |

Širina ćelija u µ.

Rezultati u tabeli 1. pokazuju da aflatoksin B<sub>1</sub> ima uticaja na ispitivane bakterije i kod štapičastih bakterija povećava se širina ćelija, a kod *S. lactis* povećava se broj ćelija u nizu. Isto tako može se zapaziti da dejstvo zavisi od koncentracije aflatoksina i vrsta mikroorganizama. U ovom slučaju *L. helveticus* je osetljiviji i u većoj meri dolazi do povećanja širine ćelije nego kod *L. casei*. Oba soja *L. helveticus* nisu podjednako osetljiva na prisustvo aflatoksina, pa prema tome ni svi sojevi jedne vrste ne reaguju istovetno na dejstvo aflatoksina.

U drugom ogledu koristili smo nešto veće koncentracije aflatoksina i druge vrste bakterija mlečne kiseline, odnosno 2 soja *L. bulgaricus* i 2 soja *S. thermophilus*. Uticaj dejstva aflatoksina B<sub>1</sub> praćen je u obranom mleku i MRS buljonu, a rezultati prikazani u tabeli 2.

**Tabela 2**

**Uticaj aflatoksina B<sub>1</sub> na dužinu ćelija kod *L. bulgaricus* u  $\mu$  i broj ćelija u nizu kod *S. thermophilus***

| Kulture                        | Vreme u čas. | Kontrola bez aflatoksina | Aflatoxin B <sub>1</sub> |            |               |
|--------------------------------|--------------|--------------------------|--------------------------|------------|---------------|
|                                |              |                          | 15 $\mu$ g               | 30 $\mu$ g | 50 $\mu$ g/ml |
| <i>L. bulgaricus</i><br>No 1.  | 24           | 36,1                     | 43,0                     | 88,5       | 60,6          |
|                                | 48           | 31,5                     | 99,5                     | 67,3       | 65,9          |
|                                | 72           | 30,2                     | 73,1                     | 85,2       | 63,1          |
| <i>L. bulgaricus</i><br>No 2.  | 24           | 11,5                     | 13,0                     | 27,5       | 46,3          |
|                                | 48           | 10,1                     | 10,2                     | 14,6       | 25,5          |
|                                | 72           | 11,1                     | 8,4                      | 41,2       | 77,3          |
| <i>S. thermophilus</i><br>No 1 | 24           | 2,2                      | 20                       | 23,3       | 29,1          |
|                                | 48           | 1,8                      | 18,5                     | 20,5       | 28,9          |
|                                | 72           | 1,7                      | 31,5                     | 36,5       | 41,3          |
| <i>S. thermophilus</i><br>No 2 | 24           | 2,0                      | 23,5                     | 27,5       | 28,9          |
|                                | 48           | 1,7                      | 29,2                     | 31,0       | 32,4          |
|                                | 72           | 1,9                      | 32,3                     | 30,3       | 40,6          |

Prikazani rezultati u tabeli 2 takođe pokazuju dejstvo aflatoksina na povećanje dužine ćelija laktobakterija, a kod streptokoka povećanje broja ćelija u nizu. Međutim, i ovde se zapaža da svi sojevi nisu jednako osetljivi na dejstvo aflatoksina, kao ni na iste koncentracije ovog toksina. U tabeli su prikazane prosečne vrednosti, a u nekim slučajevima kod *L. bulgaricus* No 1. dužina ćelija je bila i 170  $\mu$  pri koncentraciji aflatoksina od 15  $\mu$ g, posle 48 časova.

Pored promene dužine ćelija menja se i izgled ćelija, što se bolje zapaža u preparatima iz mleka bojenim metilenskim plavilom. Ćelije na pojedinim mestima zadebljavaju i u štapiću su granulozna zrnca jače izražena. Pri većim koncentracijama aflatoksina i ćelije *S. thermophilus* zadebljavaju i kod takvih ćelija prečnik može biti i dva puta veći od kontrolnih.

Uticaj aflatoksina B<sub>1</sub> na acidogena svojstva bakterija mlečne kiseline

Promene u morfologiji ćelija mogu se odraziti i na stvaranje kiseline, pa je određivan stepen kiselosti obranog mleka u prisustvu različitih koncentracija aflatoksina. Rezultati prvog ogleda pokazuju da se količina mlečne kiseline kod (*L. helveticus* povećava, a kod *L. casei* smanjuje u prisustvu aflatoksina B<sub>1</sub>, a kod *S. lactis* takođe, smanjuje. Promene nisu jako velike, jer su korišćene male koncentracije aflatoksina. Međutim, ove promene zavise isto tako od koncentracije aflatoksina i vrsta bakterija, kao i dužine dejstva aflatoksina.

U drugom ogledu kada su korišćene veće koncentracije aflatoksina ne zapaža se i veći uticaj na stvaranje kiseline pri gajenju pojedinačnih kultura, dok

je taj uticaj jači u združenom gajenju ispitivanih kultura. Tako *L. bulgaricus* u prisustvu aflatoksina stvara nešto više kiseline i to kod svih koncentracija, dok *S. thermophilus* stvara nešto manje kiseline. Zgrušavanje mleka kod svih ispitivanih kultura sa 15  $\mu\text{g/ml}$  aflatoksina bilo je za 10 minuta kasnije od kontrolnog mleka, a kod 30 i 50  $\mu\text{g/ml}$  aflatoksina za 15 minuta. Čvrstina gruš kod *L. bulgaricus* No 2. i *S. thermophilus* No 1. u toku 24 časa je bila nešto manja u prisustvu aflatoksina, nego u kontrolnom mleku.

Na površini gruš u prisustvu ispitivanih koncentracija aflatoksina javlja se serum od 1—5 mm, dok kod kontrolnog mleka nema seruma.

U združenom gajenju *L. bulgaricus* i *S. thermophilus* aflatoksin jače deluje na vreme zgrušavanja, nego u pojedinačnim kulturama, što se može videti u tabeli 3.

Iz rezultata u tabeli 3 vidi se da su ispitivane bakterije osetljivije na aflatoksin B<sub>1</sub> u združenom gajenju nego kod pojedinačnih kultura, jer se u svim kombinacijama, izuzev prve, vreme zgrušavanja mleka produžava za 90—105 minuta u odnosu na kontrolu.

U toku ovih ispitivanja zapaženo je produženo zgrušavanje mleka bez aflatoksina, ako se zaseje sa kultrom iz mleka sa aflatoksinom. Tako je kod svih ispitivanih pojedinačnih kultura kontrolno mleko zgrušano za 4 časa i 45 min., a mleko zasejano sa kulturom iz mleka sa aflatoksinom za 8 čas. i 30 min. Pri ponovljenom presejavanju iz ovog mleka došlo je do zgrušavanja za 5 čas. i 30 min. Ova zapažanja su veoma značajna za praksu i treba ih kompleksnije izučiti.

**Tabela 3**

**Uticaj aflatoksina B<sub>1</sub> na zgrušavanje mleka u združenom gajenju bakterija mlečne kiseline (u časovima)**

| Kulture  | Kontrola bez<br>aflatoksina | Aflatoksin B <sub>1</sub> |                  |                     |
|--|-----------------------------|---------------------------|------------------|---------------------|
|  |                             | 15 $\mu\text{g}$          | 30 $\mu\text{g}$ | 50 $\mu\text{g/ml}$ |
| <i>L. bulgaricus</i> No 1. +<br><i>S. thermophilus</i> No 1. | 3 <sup>55</sup>             | 4                         | 4 <sup>05</sup>  | 3 <sup>30</sup>     |
| <i>L. bulgaricus</i> No 2. +<br><i>S. thermophilus</i> No 2. | 4 <sup>15</sup>             | 5 <sup>30</sup>           | 5 <sup>50</sup>  | 5 <sup>50</sup>     |
| <i>L. bulgaricus</i> No 1. +<br><i>S. thermophilus</i> No 2. | 4                           | 5 <sup>45</sup>           | 5 <sup>45</sup>  | 5 <sup>45</sup>     |
| <i>L. bulgaricus</i> No 2. +<br><i>S. thermophilus</i> No 1. | 4                           | 5 <sup>45</sup>           | 5 <sup>45</sup>  | 5 <sup>45</sup>     |
| Maja za jogurt*  | 3                           | 4 <sup>30</sup>           | 4 <sup>30</sup>  | 4 <sup>30</sup>     |

\* *L. bulgaricus* i *S. thermophilus* održavaju se u združenom gajenju u mleku.

Na kraju treba da napomenemo, da ne dolazi do gubljenja aflatoksina u mleku sa bakterijama mlečne kiseline, jer je iz svih uzoraka posle 48 i 72 časa gajenja izdvojen aflatoksin. Koncentracije su nešto niže nego prilikom dodavanja u mleko, ali se to može pripisati metodici izolacije.

## Diskusija

Morfološka promenljivost bakterija mlečne kiseline, u zavisnosti od ekoloških faktora ili različitih agenasa koji mogu biti prisutni u mleku, je dobro poznata. Tako je Stević (1948) utvrdio da se ćelije *L. bulgaricus* na niskim temperaturama (20°C) izdužuju i stvaraju dugačke niti, a mogu stvarati i kapsule, dok u kiseloj sredini postaju jako granulirane.

Galesloot (1956) je utvrdio slične promene kod bakterija mlečne kiseline pod dejstvom penicilina i *L. bulgaricus* stvara dugačke niti jako granulirane, a ćelije *S. thermophilus* zadebljavaju i stvaraju dugačke lance. Ovakve promene zapažene su u kod *S. lactis* pod dejstvom penicilina (Baughman and Nelson, 1958., Liska, 1969). Morfološke promene bakterija mlečne kiseline mogu izazvati i male koncentracije drugih jedinjenja, kao što su preparati za pranje vimena, sredstva za dezinfekciju, hlorni preparati, neki deterdženti i dr. (Rašić and Kurmann, 1978).

Naša ispitivanja pokazuju da i aflatoxin B<sub>1</sub> izaziva morfološke promene bakterija mlečne kiseline skoro identične sa promenama, koje izazivaju napred izneti faktori. Kako smo u rezultatima naveli, *L. bulgaricus* pod dejstvom aflatoxina B<sub>1</sub> se izdužuje, na pojedinim delovima lanca zadebljava i stvara izrazite granule. Slične promene smo utvrdili i kod *L. helveticus* i *L. casei*, koji zadebljavaju, ali su u ispitivanjima upotrebljene manje koncentracije aflatoxina, pa su i promene slabije.

*S. lactis* i *S. thermophilus* stvaraju duže nizove u prisustvu aflatoxina B<sub>1</sub> i takođe, pojedine ćelije u lancu zadebljavaju. Iste morfološke promene kod *S. bovis* zabeležili su Mathur i dr. (1976) sa aflatoxinom u koncentraciji od 50 µg/ml. Aflatoxin B<sub>1</sub> deluje i na morfološke promene drugih bakterija, pa se tako ćelije *Bacillus megaterium* (Beuchat and Lechowich, 1971) i *E. coli* (Curry and Greenberg, 1962), izdužuju i stvaraju dugačke filamente.

Suprotno podacima o morfološkim promenama bakterija, prema nama dostupnoj literaturi, nema zapažanja o dejstvu aflatoxina B<sub>1</sub> na fiziološke promene bakterija mlečne kiseline, a posebno na stvaranje kiseline u mleku. Naši rezultati su pokazali da je ova fiziološka odlika, takođe značajno izmenjena. Ona je naročito evidentna, kako je to napred rečeno, u primeni združenih kultura, koje se obično koriste u praksi prerade mleka. Zbog toga uticaj aflatoxina na fiziološke osobine bakterija mlečne kiseline zaslužuje posebnu pažnju u daljim istraživanjima.

## Zaključak

Ispitivanja dejstva aflatoxina B<sub>1</sub> na neke bakterije mlečne kiseline pokazuju da aflatoxin deluje na morfološku i fiziološku promenljivost bakterija i te promene zavise od vrste i sojeva bakterija i koncentracije aflatoxina i dužine njegovog dejstva.

Kod *L. helveticus* u prisustvu aflatoxina B<sub>1</sub> širina ćelija se povećava, a kod *L. casei*, u nekim slučajevima, nezatno smanjuje. Ćelije *L. bulgaricus* se pod dejstvom aflatoxina B<sub>1</sub> izdužuju i na pojedinim delovima lanca zadebljavaju i stvaraju izrazite granule. *S. lactis* i *S. thermophilus* povećavaju broj ćelija u lancu, a pojedine ćelije u lancu zadebljavaju.

Uticaj aflatokšina na acidogena svojstva zavisi, također, od vrste bakterija i koncentracije aflatokšina. Kod *L. helveticus* količina mlečne kiseline se povećava, a kod *L. casei* smanjuje. Količina mlečne kiseline se smanjuje i kod streptokoka u prisustvu aflatokšina B<sub>1</sub>.

U združenom razviću baterija mlečne kiseline za proizvodnju jogurta dolazi do izrazitog usporavanja zgrušavanja mleka za 90—105 minuta u odnosu na kontrolu.

Dobijeni rezultati pokazuju da aflatoksin značajno deluje na bakterije mlečne kiseline što dovodi i do ekonomskih šteta u proizvodnji, pa se ovim problemima u daljim istraživanjima mora posvetiti veća pažnja.

#### Literatura

1. ALLCROFT R., CARNAGHAM, R. B. A., 1963. *Vet. Record*, **75**, 259.
2. ALLCROFT, R. ROGERS, H., LEWIS, G. NABNEY, J. BEST, P. E., 1966. *Nature* **209**, 154.
3. ALLCROFT, R. ROBERTS, B. A., 1968. *Vet. Record*, **27**, 116—118.
4. BAUGHMAN, R. W. NELSON, F. E., 1958. *J. of Dairy Sci.* **41**, 4, 706.
5. BEUCHAT, L. R., LECHOWICH, R. V., 1971. *Applied Microbiology* **21**, 1, 124—131.
6. BURMEISTER, H. R. HESSELTINE, C. W., 1966. *Appl. Microbiol.* **14**, 403.
7. CIEGLER, A. LILLEHOJ, E., 1968. *Mycotoxins*. Peoria, III. USA.
8. CURRY, J. GREENBERG, J., 1962. *J. Bacteriol.* **83**, 38—42.
9. GALESLOOT, T. E., 1956. *Ned. Molk-en Zulveltijschr.* **10**, 64.
10. De IONGH, H., VLES, R. O. VAN PELT, J. G., 1964. *Nature* **202**, 466—467.
11. KIERMEIER, F., 1973. *Pure and Appl. Chem.* **35**, 3, 271—273.
12. MASRI, M. S., LUNDIN, R. E., PAGE, J. R., GRACIA, V. C., 1967. *Nature* **215**, 12, 753.
13. MATHUR, F. CAROLYN, R. C. SMITH G. H. HAWKINS, 1976. *J. of Dairy Sci.* **59**, 3, 455.
14. LISKA, B. J., 1959. *J. of Dairy Sci.* **42**, 1391—1393.
15. RAŠIĆ, J. Lj. KURMANN, J. A., 1978. *Yoghurt*, Copenhagen, Denmark.
16. STEVIĆ, B. 1948. Arhiv za polj. nauke i tehniku, III, 5.
17. ŠUTIĆ MARIJA, AYRES, J. C. KOEHLER, P. E., 1972. *Appl. Microbiol.* **23**, 3, 656.
18. ŠUTIĆ MARIJA, 1972. 2. Kongres mikrobiologa Jugoslavije, 323—324, Opatija.
19. ŠUTIĆ MARIJA, BANINA ANA i JOVANOVIĆ SVETLANA, 1976. 3. Kongres mikrobiologa Jugoslavije, 686—687, Bled.
20. ŠUTIĆ MARIJA, BANINA ANA i STOJANOVIĆ M., 1976. 3. Kongres mikrobiologa Jugoslavije, 690—691. Bled.
21. ŠUTIĆ MARIJA i BANINA ANA, 1978. Fifth International Congress of Food Science and Technology. Kyoto, Japan.

## UTICAJ NEKIH ČINILACA NA AKTIVNOST SIRILA, RENILAZE I PEPSINA\*

Mr. Abdulah Al RUBAI, prof. dr Jovan ĐORĐEVIĆ, dr Dragoslava MIŠIĆ,  
dr Dušica PETROVIĆ, Poljoprivredni fakultet, Zemun

Za zgrušavanje mleka u proizvodnji sireva se tradicionalno koristi sirilo u kome od proteolitičkih fermenata prevlađuje sirišni ferment — himozin.

Posljednjih godina u svetu se sve više osjeća nestašica sirila, koja nastaje zbog ograničenog klanja teladi uslijed slabe ekonomičnosti i zbog stalnog porasta proizvodnje sireva. Zato se danas ozbiljno ispituju mogućnosti iznalaženja i primene i drugih proteolitičkih fermenata za koagulaciju mleka u proizvodnji sireva.

\* Referat održan na XVII Seminaru za mljekarsku industriju, Zagreb 1979.