

BIOSINTEZA AFLATOKSINA B₁ I G₁ TIJEKOM
RASTA PLIJESNI *ASPERGILLUS PARASITICUS*
NRRL 2999 U ČISTOJ I MJEŠOVITOJ KULTURI
PRI RAZLIČITIM TEMPERATURAMA

S. Duraković, O. Pospišil i J. Velikonja
Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološki fakultet,
Zagreb

(Primljeno 20. II 1984)

Istražen je utjecaj temperature inkubacije na biosintezu aflatoksina B₁ i G₁ s pomoću plijesni *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 tijekom njezina rasta u čistoj i u mješovitoj kulturi s plijesnima koje ne sintetiziraju aflatoksine. Dokazano je da se maksimalna količina obaju istraživanih toksina sintetizira pri 28 °C. Maksimum biosinteze aflatoksina B₁ postignut je nakon 14, a aflatoksina G₁ nakon 21 dan. Temperatura uzgoja od 35 °C pogoduje bujnijem rastu biomase, ali inhibira sintezu aflatoksina. Nakon 42 dana uzgoja biomasa mješovite kulture plijesni reducira koncentraciju aflatoksina B₁ na 60%, a koncentraciju aflatoksina G₁ na 55% maksimalne vrijednosti što je dobivena u procesu biosinteze. U istim uvjetima uzgoja, biomasa čiste kulture *A. parasiticus* NRRL 2999 reducira koncentraciju aflatoksina B₁ na 75%, a koncentraciju aflatoksina G₁ na 65% maksimalne vrijednosti.

Mikotoksini kao fungalni metaboliti predstavljaju veliku skupinu (više od 150 vrsta) različitih kemijskih spojeva, što se često susreću kao kontaminanti hrane i krmiva (1). Najotrovniji među njima su aflatoksini, skupina od dvadesetak kemijski sličnih spojeva.

Tijekom istraživanja je uočeno da plijesni sintetiziraju aflatoksine u strogo definiranim uvjetima, i da pri tom bitnu ulogu imaju sastav supstrata, temperatura i količina vode u supstratu (2).

S obzirom na to da se na prirodnim supstratima nikada ne nalaze čiste, nego uvijek mješovite kulture mikroorganizama, zadatak ovih istraživanja je bio da se ustvrdi kada i u kojem opsegu dolazi do sinteze aflatoksina B₁ i G₁ tijekom rasta toksikogene plijesni *A. parasiticus* NRRL 2999 u mješovitoj kulturi s plijesnima, koje se pojavljuju kao kontaminanti na kukuruzu, a ne sintetiziraju aflatoksine.

MATERIJAL I METODE

S površine pljesnivih klipova kukuruza, što su sadržavali 32% vode, izoliran je veći broj aflatoksin-negativnih plijesni. Od njih su odabrane dvije, najčešće prisutne, i određene kao *Trichothecium roseum* ZMTF 1226* i *Fusarium* sp. ZMTF 1215* (3). Plijesan *A. parasiticus* NRRL 2999, opisana kao jedan od izrazitih producenata aflatoksina, upotrijebljena je u pokusima kao test mikroorganizam.

Parametri istraživanja su bili:

- supstrat — kukuruzno zrno hibrida ZG SK 502A
- početna količina vode u supstratu — 38%
- početni broj spora u supstratu — $1,5 \times 10^6/g$
- temperatura inkubacije — 15 °C, 20 °C, 28 °C i 35 °C
- vrijeme uzgoja — 0—42 dana.

Za dobivanje inokuluma plijesni su uzgajane u čistim kulturama na podlozi za sporulaciju — kosom krumpirovu glukoznom agaru, a spore su nakon inkubacije (7 dana pri 28 °C) suspendirane u po 5 ml sterilne vodene otopine Triton X-100. Biosinteza aflatoksina je provedena u stacionarnoj kulturi, u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 ml, s po 50 g kukuruznog zrna. Tijekom uzgoja uzimani su svakih 7 dana uzorci iz termostata, u kojima je određivana količina biomase i aflatoksina B₁ i G₁. Količina biomase je određivana »hitinskom metodom«, što su je opisali Donald i Mirocha (4).

U preliminarnim istraživanjima određen je sadržaj hitina u zdravu zrnu kukuruza i u miceliju svake od istraživanih plijesni (5). Nađeno je da sadržaj hitina u hibridu kukuruza, što je upotrijebljen kao supstrat, iznosi 105—120 µg/g. Sadržaj hitina u miceliju plijesni *A. parasiticus* NRRL 2999 iznosi 220 mg/g suhe tvari micelija, u miceliju *T. roseum* ZMTF 1226 sadržana su 252 mg hitina/g suhe tvari, a u miceliju *Fusarium* sp. ZMTF 1215 taj je sadržaj 196 mg/g suhe tvari.

Na osnovi dobivenih podataka određene su baždarne krivulje za svaku od istraživanih plijesni iz kojih se, prema sadržaju hitina, izravno određivala količina suhe tvari biomase. Za određivanje suhe tvari biomase odvagano je po šest različitih količina vlažnog micelija svake od istraživanih plijesni. Uzorci su prosušeni pri 60 °C tijekom 2 sata, a zatim na 105 °C do konstantne mase. Aflatoksini su kvalitativno određivani s pomoću tankoslojne kromatografije, a kvantitativno s pomoću fluorodenzitometrije (6). Kao pokretna faza je upotrijebljen sustav otapala kloroform : aceton : petroleter (33 : 6 : 1) stoga što je tijekom istraživanja dokazano da ovaj sustav najbolje odvaja aflatoksin B₁ od aflatoksina G₁ (5).

* ZMTF — Zbirka mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

REZULTATI

Tablica 1. prikazuje količine sintetizirane biomase i aflatoksina B₁ i G₁ tijekom rasta čiste kulture plijesni *A. parasiticus* NRRL 2999, u ovisnosti o vremenu uzgoja. Početna količina vode u supstratu je 38%, a pokusi su provedeni pri temperaturi 15 °C, 20 °C, 28 °C i 35 °C.

Tablica 2. prikazuje količine sintetizirane biomase i aflatoksina B₁ i G₁ tijekom rasta mješovite kulture plijesni *A. parasiticus* NRRL 2999, *T. roseum* ZMTF 1226 i *Fusarium* sp. ZMTF 1215. Početna količina vode u supstratu je 38%, a pokusi su provedeni pri temperaturi 15 °C, 20 °C, 28 °C i 35 °C.

Sa slika 1. i 2. se vidi odnos koncentracija aflatoksina B₁ i G₁ i količine biomase (P/X) tijekom rasta čiste i mješovite kulture istraživanih plijesni pri 28 °C, u vremenu uzgoja. Posebnom krivuljom je prikazana promjena sadržaja vode u supstratu tijekom praćenja procesa.

RASPRAVA

Određivanje biomase osobito je važno za praćenje metabolizma mikroorganizama, jer je količina biomase mjerilo metabolizma. Hitin je osnovni sastojak staničnih stijenki plijesni i može se upotrijebiti kao mjera ukupna rasta plijesni na zrnu žitarica, budući da u zdravu zrnu nema hitina ili ga ima vrlo malo. Po kemijskoj strukturi hitin je polimer N-acetilglukozamina nedefinirane molne mase, pa se N-acetilglukozamin upotrebljava kao standardna supstancija za određivanje hitina.

Na osnovi rezultata, što su dobiveni u pokusima pri temperaturi od 15 °C, primjećuje se da ova temperatura nije pogodna za sintezu aflatoksina B₁ i G₁ u količinama koje se s pomoću upotrijebljenih metoda mogu odrediti, iako plijesni uzgojene pri toj temperaturi pokazuju određeni stupanj rasta (tablice 1. i 2).

Pri temperaturi od 20 °C, tijekom rasta čiste kulture plijesni *A. parasiticus* NRRL 2999, započinje sinteza aflatoksina G₁. Količina sintetizirane biomase gotovo je dvostruko veća nego pri 15 °C, a maksimalna količina ovog toksina dokazana je nakon 21 dan uzgoja i iznosi 12,7 µg/g suhe tvari micelija (tabl. 1). Tijekom rasta ove plijesni u mješovitoj kulturi s plijesnima *T. roseum* ZMTF 1226 i *Fusarium* sp. ZMTF 1215 inhibirana je sinteza i aflatoksina B₁ i aflatoksina G₁ (tablica 2).

Prema očekivanju, temperatura od 28 °C pogodnija je za sintezu biomase plijesni *A. parasiticus* NRRL 2999 (7), a i za sintezu aflatoksina (8). Ova i njoj srodne plijesni su tipičnije vrste u toplijim nego u hladnijim klimatskim područjima. Iako se biomasa povećava do 42. dana uzgoja, maksimum biosinteze aflatoksina B₁ zabilježen je već nakon 14 dana i iznosi 91,0 µg/g suhe tvari micelija. Maksimum biosinteze aflatoksina G₁ postignut je 7 dana kasnije i iznosi 29,5 µg/g suhe tvari micelija (tablica 1).

Tablica 1.

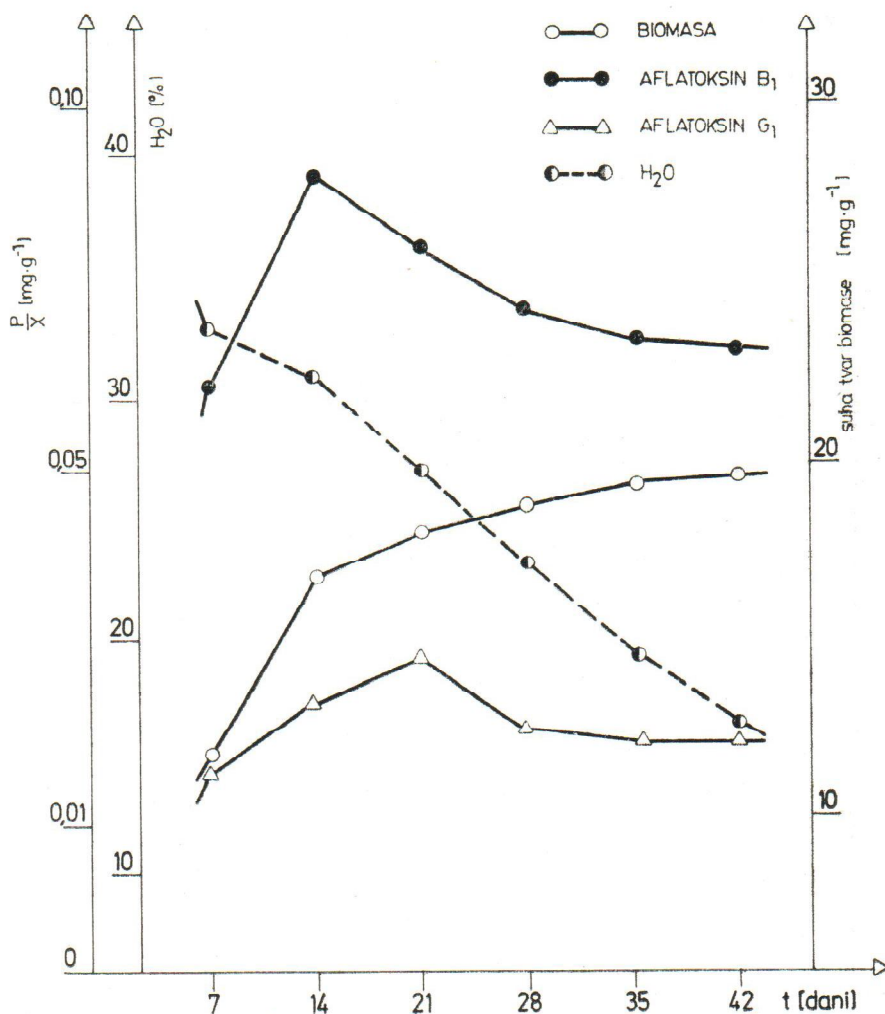
Sinteza biomase i aflatoksina B₁ i G₁ tijekom rasta plijesni *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 pri različitim temperaturama. Hranjiva podloga: 50 g kukuruznog zrna s 38% H₂O u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 ml

Vrijeme (dani)	Suha tvar biomase (mg · g ⁻¹) (određeno prema sadržaju hitina)				Aflatoksin (određeno na suhu tvar biomase)							
					B ₁ (μg · g ⁻¹)				G ₁ (μg · g ⁻¹)			
	15 °C	20 °C	28 °C	35 °C	15 °C	20 °C	28 °C	35 °C	15 °C	20 °C	28 °C	35 °C
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	1,3	3,5	12,1	15,8	—	—	62,2	19,4	—	11,4	14,6	—
14	2,6	4,7	16,7	24,9	—	—	91,0	28,8	—	11,9	23,5	—
21	2,6	4,8	17,9	26,4	—	—	81,4	32,3	—	12,7	29,5	—
28	2,6	5,0	18,7	27,9	—	—	73,2	28,5	—	11,8	20,4	—
35	2,6	5,0	19,3	28,1	—	—	69,0	27,5	—	11,4	19,3	—
42	2,6	5,0	19,7	28,1	—	—	68,0	27,5	—	11,4	19,0	—

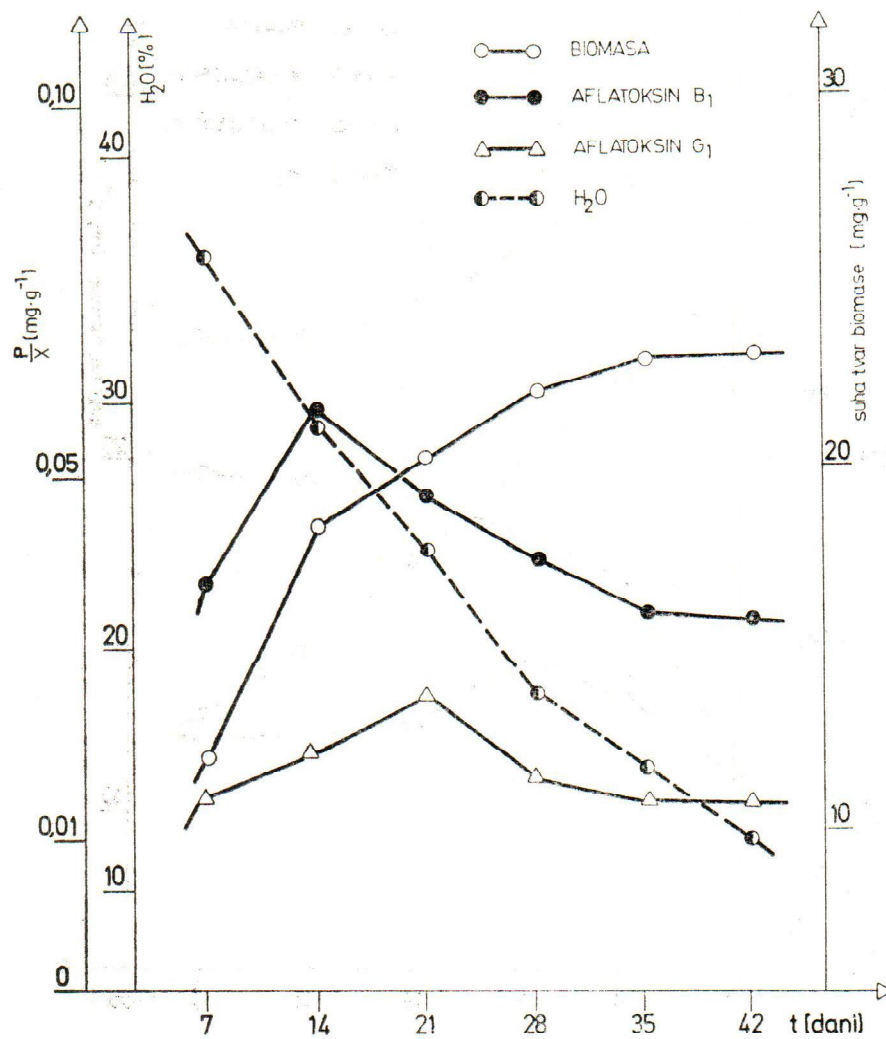
Tablica 2.

Sinteza biomase i aflatoksina B₁ i G₁ tijekom rasta mješovite kulture plijesni *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, *Trichothecium roseum* ZMTF 1226 i *Fusarium* sp. ZMTF 1215 pri različitim temperaturama. Hranjiva podloga: 50 g kukuruznog zrna s 38% H₂O u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 ml

Vrijeme (dani)	Suha tvar biomase (mg · g ⁻¹) (određeno prema sadržaju hitina)				Aflatoksin (određeno na suhu tvar biomase)							
					B ₁ (μg · g ⁻¹)				G ₁ (μg · g ⁻¹)			
	15 °C	20 °C	28 °C	35 °C	15 °C	20 °C	28 °C	35 °C	15 °C	20 °C	28 °C	35 °C
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	2,2	4,9	12,1	20,0	—	—	39,2	13,6	—	—	14,7	—
14	5,2	6,6	18,3	28,6	—	—	59,5	20,4	—	—	18,6	—
21	6,1	7,4	20,2	30,8	—	—	47,8	26,0	—	—	26,6	—
28	6,5	7,8	22,0	31,1	—	—	41,2	21,9	—	—	16,8	—
35	6,9	8,0	23,0	31,1	—	—	36,3	20,4	—	—	14,9	—
42	6,9	8,0	23,0	31,1	—	—	36,0	20,0	—	—	14,7	—



Sl. 1. Odnos koncentracija aflatoksina B₁ i G₁ i količine biomase (P/X) u ovisnosti o količini vode u supstratu i vremenu, tijekom rasta čiste kulture plijesni *A. parasiticus* NRRL 2999 pri 28 °C. Hranjiva podloga: 50 g kukuruznog zrna s početnom količinom vode 38%.



Sl. 2. Odnos koncentracija aflatoksina B₁ i G₁ i količine biomase (P/X) u ovisnosti o količini vode u supstratu i vremenu, tijekom rasta mješovite kulture plijesni *A. parasiticus* NRRL 2999, *T. roseum* ZMTF 1226 i *Fusarium* sp. ZMTF 1215 pri 28 °C. Hranjiva podloga: 50 g kukuruznog zrna s početnom količinom vode 38%

Uzgajana u mješovitoj kulturi, plijesan *A. parasiticus* NRRL 2999 pokazuje manju sposobnost sinteze aflatoksina B₁ i G₁. Količina sintetiziranog aflatoksina B₁ je manja za 35%, a količina aflatoksina G₁ za 10%, u odnosu na rast ove plijesni u čistoj kulturi (tablica 2). Dobiveni rezultati govore u prilog rezultatima istraživanja *Masimanga i sur.* (9), koji su dokazali da rast toksikogene plijesni u mješovitoj kulturi rezultira inhibicijom sinteze aflatoksinâ.

Tijekom uzgoja plijesni *A. parasiticus* NRRL 2999 pri 35 °C sintetizira se velika količina biomase već nakon 21 dan (26,40 mg/g supstrata) i znatno se povećava do 42 dana (28,10 mg/g supstrata) (tablica 1). Sva je površina zrna u to vrijeme prekrivena hifama plijesni, koje polagano ulaze u stacionarnu fazu rasta zbog pomanjkanja hrane ili nakupljanja produkata metabolizma, od kojih su mnogi toksični za proces rasta. Količina aflatoksina B₁ je oko 3 puta manja od količine ovog toksina sintetiziranog pri 28 °C. Ovako visoka temperatura još izrazitije djeluje na sintezu aflatoksina G₁ koji se, sudeći prema dobivenim rezultatima, sintetizira u relativno uskom temperaturnom području (tablica 1).

Pri ovoj temperaturi uzgoja, a u odnosu na temperaturu od 28 °C, manje je izražen utjecaj mješovite kulture u smislu inhibicije sinteze aflatoksina. Količina aflatoksina B₁ manja je za oko 60% a, kao i tijekom rasta čiste kulture *A. parasiticus* NRRL 2999, nije dokazana sinteza aflatoksina G₁ (tablica 2).

Pri svim istraživanim uvjetima biomasa mješovite kulture pokazuje veću sposobnost uklanjanja aflatoksinâ iz supstrata. Tijekom rasta mješovite kulture, a u ovisnosti o temperaturi inkubacije dokazano je, nakon 42 dana, smanjenje koncentracije aflatoksina B₁ za 23–40%, a aflatoksina G₁ za 45% (tablica 2). Uspoređujući ove rezultate s rezultatima što su dobiveni tijekom rasta čiste kulture *A. parasiticus* NRRL 2999 dolazi se do spoznaje da je tijekom rasta mješovite kulture plijesni konačna koncentracija aflatoksina B₁ niža za 5–14%, a aflatoksina G₁ za 10% (tablice 1. i 2).

Nema sumnje da i količina vode u supstratu bitno utječe na sintezu aflatoksinâ. Ako se promotre podaci sa sl. 1. i 2, primjećuje se da je optimalna količina vode za sintezu aflatoksina B₁ oko 30%, a za sintezu aflatoksina G₁ ta je količina nešto niža. Dobiveni rezultati se dobro slažu s podacima što su ih objavili *Diener i Davis* (7), prema kojima je količina od 32% vode u supstratu optimalna za biosintezu aflatoksinâ.

Da bi se na osnovi rezultata ovih istraživanja mogla izračunati količina aflatoksinâ na gram (kg) supstrata, prikazan je na slikama 1 i 2 odnos koncentracije aflatoksina B₁ i G₁ i količine biomase, pri optimalnoj temperaturi uzgoja čiste i mješovite kulture plijesni. Kada se u izraz P/X (omjer koncentracije aflatoksina i količine biomase) uvrste podaci o količini biomase, dobiva se, nakon izračunavanja, količina aflatoksina na gram (kg) supstrata. Ovakvo je izračunavanje nužno stoga što je Pravilnikom ozakonjena dopuštena količina aflatoksina B₁ i G₁/kg supstrata (10).

ZAKLJUČCI

1) Određivanje biomase plijesni na čvrstim supstratima »hitinskom metodom« je relativno brz postupak i može se uspješno upotrijebiti za mjerenje veličine kontaminacije zrna žitarica s plijesnima.

2) Ne može se povući usporedba između bujnog rasta toksikogene plijesni i sinteze aflatoksina, jer je tijekom istraživanja dokazano da se ovi toksini sintetiziraju pri strogo definiranim uvjetima. Temperatura je, pri tom, najbitniji parametar.

3) Tijekom rasta u mješovitoj kulturi došao je do izražaja antagonistički utjecaj plijesni *T. roseum* ZMTF 1226 i *Fusarium* sp. ZMTF 1215 na rast plijesni *A. parasiticus* NRRL 2999 i biosintezu aflatoksina B₁ i G₁.

4) Smanjenje koncentracije obaju istraživanih toksina je izrazitije tijekom rasta mješovite kulture plijesni.

Literatura

1. Ciegler, A.: Mycotoxins. U: A. I. Laskin and H. A. Lechevalier, Handbook of Microbiology, Vol. III — Microbial Products. CRC Press, Cleveland 1973, str. 525.
2. Hesseltine, C. W.: Process Biochem., 12 (1977) 24.
3. Barnett, H. L., Hunter, B. B.: Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minnesota 1972.
4. Donald, W. W., Mirocha, C. J.: Cereal Chem., 54 (1977) 466.
5. Duraković, S.: Utjecaj mješovitih kultura plijesni s površine žitarica na biosintezu aflatoksina s pomoću plijesni *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 1981.
6. Eppley, R. M.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 51 (1966) 473.
7. Diener, U. L., Davis, N. D.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 47 (1970) 347.
8. Lopez, L. C., Christensen, C. M.: Phytopathology, 57 (1967) 588.
9. Masimango, N., Remacle, J., and Ramaut, J.: Ann. Nutr. Aliment., 33 (1979) 149.
10. Pravilnik o količinama pesticida i drugih otrovnih tvari, hormona, antibiotika i mikotoksina koji se mogu nalaziti u živežnim namirnicama, Sl. list SFRJ, 59 (1983) 1635.

Summary

THE BIOSYNTHESIS OF AFLATOXIN B₁ AND G₁ DURING THE GROWTH OF THE MOULD *ASPERGILLUS PARASITICUS* NRRL 2999 IN PURE AND MIXED CULTURE AT VARIOUS TEMPERATURES OF CULTIVATION

The influence of incubation temperature on the biosynthesis of aflatoxins B₁ and G₁ has been investigated with the mould *A. parasiticus* NRRL 2999 during growth in pure culture and in mixed culture containing moulds which do not synthesize aflatoxins. The highest rate of the biosynthesis of aflatoxin B₁ was observed at 28 °C after 14 days of cultivation, whereas the biosynthesis of aflatoxin G₁ reached its maximum after 21 days. The cultivation temperature of 35 °C favoured a rank mycelium growth, though it inhibited the synthesis of both investigated toxins. After 42 days of cultivation the biomass of the mixed mould culture decreased the concentration of aflatoxin B₁ to 60%, and the concentration of aflatoxin G₁ to 55% of the highest values obtained in the process of biosynthesis. Under equal conditions of cultivation, the biomass of *A. parasiticus* NRRL 2999 grown in pure culture decreased the concentration of aflatoxin B₁ to 75%, and the concentration of aflatoxin G₁ to 65% of the highest values obtained.

Department of Biochemical Engineering,
Faculty of Food Technology and
Biotechnology, Zagreb

Received for publication
February 20, 1984