

UTJECAJ TEMPERATURE I KOLIČINE VODE
U SUPSTRATU NA RAST PLIJESNI
ASPERGILLUS OCHRACEUS 318 I BIOSINTEZU
OKRATOKSINA A

O. POSPIŠIL i S. DURAKOVIĆ

Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološki fakultet,
Zagreb

(Primljeno 28. VII 1982)

U ovom je radu istražena proizvodnja okratoksina A u odnosu na količinu biomase, na kukuruznu zrnju u odabranim uvjetima. Utvrđeno je da se najveća količina okratoksina A sintetizira pri 20 °C i 38% vode u supstratu. Viša temperatura uzgoja (28 °C) pogoduje rastu plijesni, ali utječe na smanjenje produkcije okratoksina A. Temperatura od 37 °C zaustavlja istodobno produkciju okratoksina A i produkciju biomase. Već količina biomase od 1,5 mg. g⁻¹ proizvodi mjerljive količine okratoksina A.

Među brojnim mikotoksinima okratoksin A, kao nespecifičan metabolit *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium viridicatum* i drugih vrsta plijesni, zaokuplja pažnju mikotoksikologa zbog učestale pojave i raznovrsnih mogućih negativnih učinaka na ljudski i životinjski organizam.

Uz dokazani nefrotoksični, hepatotoksični i teratogeni učinak u pokusnih životinja (1), sezonsku nefropatiju svinja u Danskoj Krogh i Hasselager (2) povezuju s prisutnošću okratoksina A u krmivima. Danas se smatra da bi taj mikotoksin mogao biti povezan i s etiologijom balkanske endemske nefropatije, bolesti ljudi s nekih područja Jugoslavije, Rumunjske i Bugarske.

Sezonska pojava plijesni i okratoksina A povezana je s oscilacijom temperature i vlage u različitim godišnjim dobima. Osim tih faktora, na produkciju mikotoksina utječu i vrsta supstrata, kao i genetičke osobine plijesni (3, 4, 5).

Pojava plijesni *A. ochraceus* i okratoksina A česta je u životinjskoj i ljudskoj hrani. Prema Pavloviću i sur. (6) taj je toksin prisutan u namirnicama biljnog podrijetla s endemskog područja brodske Posavine

u 9,38% istraženih uzoraka. To je mnogo više od količine okratoksina A u pojedinim zemljama u kojima balkanska endemska nefropatija nije poznata.

Prisutnost plijesni i okratoksina A dokazana je i u raznovrsnoj stočnoj hrani, što je osumnjičena za oboljenje svinja na nekim gospodarstvima SR Srbije (7).

Okratoksin A je ustanovljen čak i u procesu proizvodnje suhих kobasica u prvim danima zrenja, pri temperaturi od 20 °C i sadržaju vode preko 80% (8).

U drugim literaturnim izvorima navodi se da je za proizvodnju okratoksina A potrebna temperatura od 28 °C (9).

Nepodudarni i nepotpuni objavljeni podaci naveli su autore da istraže odnos količine biomase plijesni i sintetiziranog okratoksina A s pomoću plijesni *A. ochraceus* 318 u odabranim parametrima uzgoja na kukuruznom zrnu.

MATERIJAL I METODE

Istraživanje biosinteze okratoksina A s pomoću plijesni *A. ochraceus* 318 (iz Zbirke mikroorganizama Biotehnološkog fakulteta u Zagrebu) sastojalo se od:

- uzgoja odabrane plijesni na krumpirovu glukoznom agaru za proizvodnju inokuluma
- uzgoja plijesni na kukuruznom zrnu za biosintezu okratoksina
- pročišćavanja ekstrakata stupnom kromatografijom
- kvalitativne analize okratoksina tankoslojnom kromatografijom
- polukvantitativne analize okratoksina A.

Parametri biosinteze su bili:

- početna količina vode u supstratu — 28% i 38%
- temperatura inkubacije — 20 °C, 28 °C i 37 °C
- početni broj spora u supstratu — $1,5 \times 10^6/g$
- vrijeme uzgoja — 0—42 dana.

Za određivanje količine micelija na čvrstom supstratu upotrijebljena je »hitinska metoda« (10). Osnova ove metode je bazična hidroliza hitina, sadržanog u uzorku, do hitozana. Ovako dobiven hitozan određuje se neizravno spektrofotometrijski prema standardnoj baždarnoj krivulji za N-acetilglukozamin, što se upotrebljava kao standard.

Duraković (11) je ustanovio da sadržaj hitina u zdravu zrnu kukuruza (upotrijebljen je hibrid ZG SK 502 A) iznosi 105—120 $\mu g/g$. Isti je autor ustvrdio da sadržaj hitina u miceliju plijesni *A. ochraceus* 318 iznosi 228 mg/g suhe tvari micelija.

Za identifikaciju okratoksina A dobivenog u procesu biosinteze upotrijebljen je sustav otapala za razvijanje benzen: ledena octena kiselina (9:1) što ga preporučuju Labie i Tache (12).

REZULTATI

Tablica 1. prikazuje rezultate istraživanja odnosa količine biomase i sintetiziranog okratoksina A u supstratu s početnom količinom vode od 28%. Pokusi su provedeni pri temperaturama 20 °C, 28 °C i 37 °C.

Tablica 2. prikazuje rezultate istraživanja odnosa količine biomase i sintetiziranog okratoksina A u supstratu s početnom količinom vode od 38%. Pokusi su provedeni pri temperaturama 20 °C, 28 °C i 37 °C.

Iz slika 1, 2, 3, 4. i 5. vidi se promjena količine vode u kukuruznom zrnu tijekom inkubacije 42 dana i njezin utjecaj na sintezu okratoksina

Tablica 1.

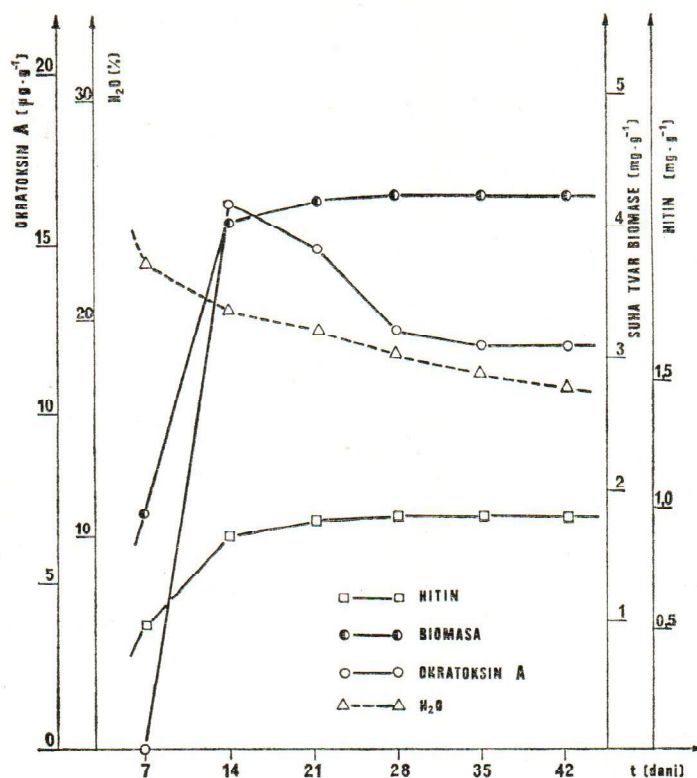
Produkcija biomase i okratoksina A s pomoću plijesni Aspergillus ochraceus 318 pri različitim temperaturama na kukuruznom zrnu s 28% vode

Vrijeme (dani)	Suha tvar biomase (mg. g ⁻¹) (određeno prema sadržaju hitina)			Okratoksin A (μg. g ⁻¹) (određeno na suhu tvar biomase)		
	20 °C	28 °C	37 °C	20 °C	28 °C	37 °C
7	1,7	3,7	0,9	0	0	0
14	3,9	4,3	1,4	16,5	14,2	0
21	4,4	4,9	1,6	15,1	12,8	0,6
28	4,0	6,0	1,7	12,7	10,9	0,9
35	4,0	6,0	1,8	12,1	10,5	0,5
42	4,0	6,0	1,8	12,1	10,4	0,5

Tablica 2.

Produkcija biomase i okratoksina A s pomoću plijesni Aspergillus ochraceus 318 pri različitim temperaturama na kukuruznom zrnu s 38% vode

Vrijeme (dani)	Suha tvar biomase (mg. g ⁻¹)			Okratoksin A (μg. g ⁻¹) (određeno na suhu tvar biomase)		
	20 °C	28 °C	37 °C	20 °C	28 °C	37 °C
7	2,20	3,5	2,0	12,9	10,7	0
14	5,0	5,0	2,3	20,3	16,2	0,9
21	5,6	5,9	3,0	18,1	15,3	0,9
28	6,6	6,1	3,2	17,0	15,0	1,0
35	6,1	6,2	3,2	17,0	14,5	1,0
42	6,2	6,2	3,2	17,0	14,4	0,9

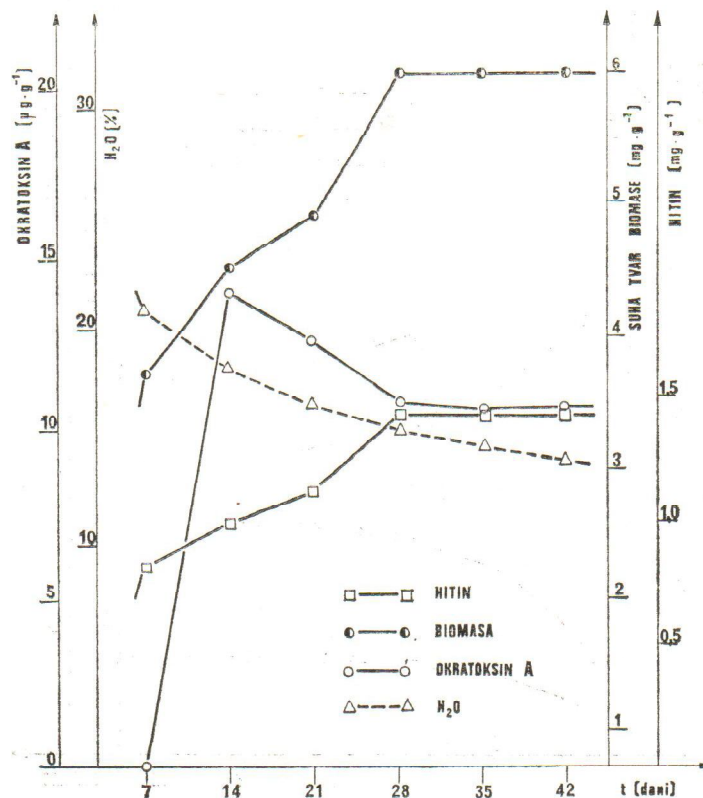


Sl. 1. Biosinteza okratoksina A s pomoću plijesni *A. ochraceus* 318 na kukuruznom zrnu u ovisnosti o količini biomase i sadržaju vode u supstratu. Temperatura inkubacije 20 °C. Početna količina vode u supstratu 28%.

A pri upotrijebljenoj temperaturi. Na slikama je prikazana i promjena količine hitina u miceliju prema kojoj je određena i ukupna količina biomase.

RASPRAVA

Ovim se radom željelo ustvrditi: kakav je odnos između količine biomase plijesni i sintetiziranog okratoksina A u odabranim uvjetima rasta plijesni; znači li vidljiva kontaminacija zrna plijesnima ujedno i obligatnu prisutnost ovog toksina; može li malena količina micelija sintetizirati mjerljive količine toksina.

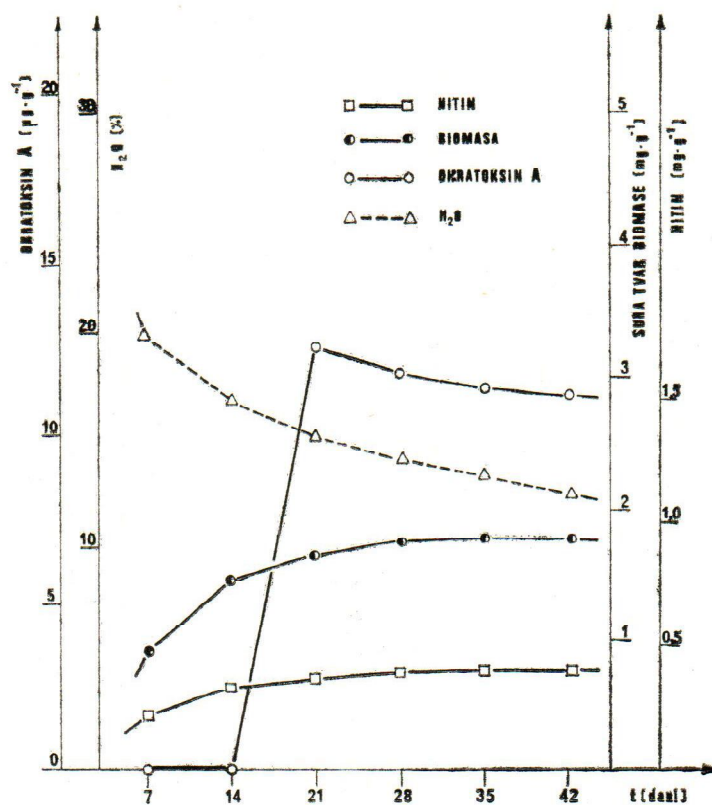


Sl. 2. Biosinteza okratoksina A s pomoću plijesni *A. ochraceus* 318 na kukuruznom zrnu u ovisnosti o količini biomase i sadržaju vode u supstratu. Temperatura inkubacije 28 °C. Početna količina vode u supstratu 28%.

Iz priloženih tablica i slika vidljivo je da je za biosintezu okratoksina A s pomoću plijesni *A. ochraceus* 318 potrebna velika količina vode u kukuruznom zrnu (više od 20%). Takvu količinu vode kukuruzno zrno često sadrži u vrijeme ekstremno vlažnih žetvenih mjeseci.

Prema dobivenim rezultatima najpogodnija temperatura za ovu biosintezu je oko 20 °C, što je prosječna temperatura u ljetnim mjesecima naših žitorodnih krajeva.

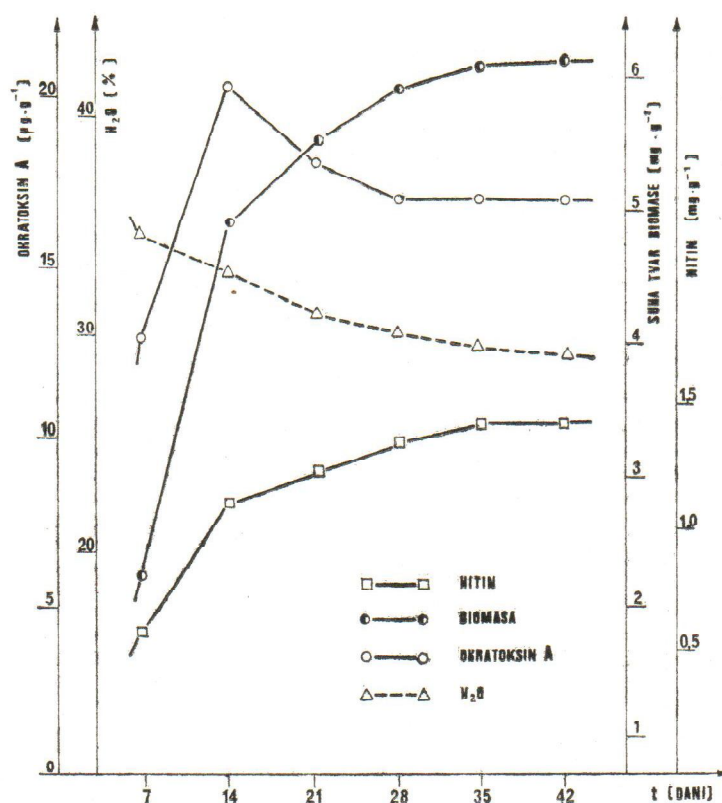
Temperatura od 28 °C ubrzava rast plijesni i utječe na proizvodnju najveće biomase (4–5 mg/g⁻¹), ali usporava i smanjuje biosintezu toksina.



Sl. 3. Biosinteza okratoksina A s pomoću plijesni *A. ochraceus* 318 na kukuruznom zrnu u ovisnosti o količini biomase i sadržaju vode u supstratu. Temperatura inkubacije 37 °C. Početna količina vode u supstratu 28%.

Temperatura od 37 °C, što je česta u gomilama zrna kao rezultat »samozagrijavanja«, ne pogoduje rastu plijesni *A. ochraceus* 318. Pri toj temperaturi dokazana je količina biomase od svega 1,7 mg·g⁻¹ suhe tvari (što je jedva uočljivo na zrnu kukuruza). Rezultati su pokazali da i ovako mala količina biomase sintetizira mjerljive količine okratoksina A (0,50–0,90 µg·g⁻¹).

Iz priloženih slika se vidi da sniženje količine vode u zrnu kukuruza na 15–20%, tijekom rasta plijesni, zaustavlja porast biomase, a količina okratoksina A se, u ovisnosti o temperaturi, postepeno smanjuje.

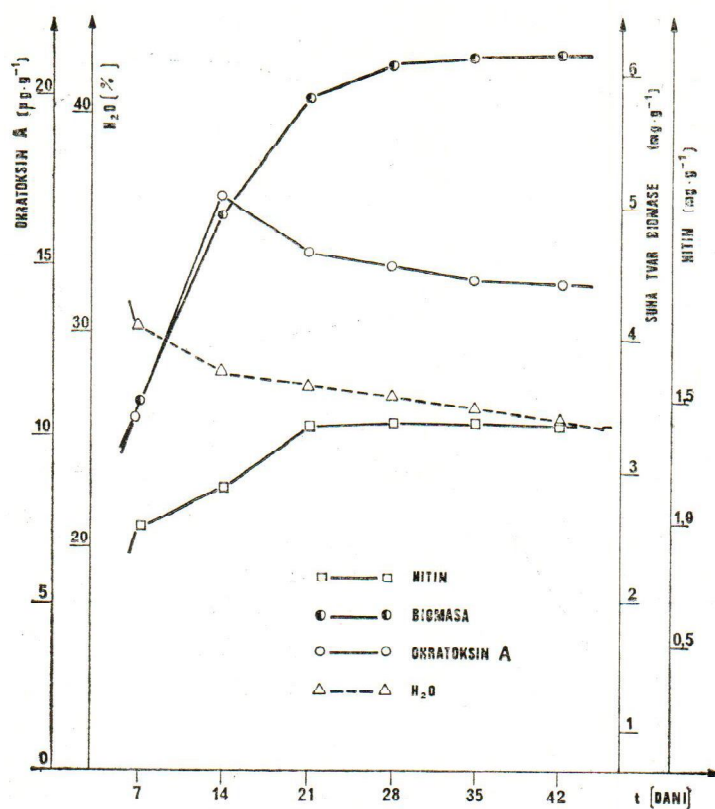


Sl. 4. Biosinteza okratoksina A s pomoću plijesni *A. ochraceus* 318 na kukuruznom zrnu u ovisnosti o količini biomase i sadržaju vode u supstratu. Temperatura inkubacije 20 °C. Početna količina vode u supstratu 38%.

Najveća proizvodnja toksina započela je, u svim pokusima, tek nakon 14 dana uzgoja, odnosno u vrijeme intenzivne sporulacije. Vizuelnim praćenjem porasta plijesni ustanovljeno je da micelij prije sporulacije (do 7 dana rasta s 38% vode, a do 14 dana s 28% vode), ne proizvodi ili proizvodi vrlo male količine okratoksina A.

ZAKLJUCCI

1. Maksimalnu količinu okratoksina A proizvodi istraživana plijesan pri 20 °C i početnoj količini vode u supstratu od 38% (20,3 µg·g⁻¹).



Sl. 5. Biosinteza okratoksina A s pomoću plijesni *A. ochraceus* 318 na kukuruznom zrnu u ovisnosti o količini biomase i sadržaju vode u supstratu. Temperatura inkubacije 28 °C. Početna količina vode u supstratu 38%.

2. Povišenjem temperature inkubacije od 20 °C na 28 °C povećava se količina biomase za oko 50%, a količina okratoksina A smanjuje se za oko 15%.

3. Temperatura inkubacije od 37 °C istodobno inhibira i sintezu biomase i sintezu okratoksina A.

4. Već količina biomase od 1,5 mg·g⁻¹ sintetizira mjerljive količine okratoksina A (0,6 µg·g⁻¹).

Literatura

1. Krogh, P.: Mycotoxic nephropathy, u: Mycotoxins, I. F. H. Purchase, Elsevier Scientific Pub. Co. Amsterdam, 1974, str. 419-428.
2. Krogh, P., Hasselager, E., Friis, P.: Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B., 78 (1970) 401.
3. Hesselatine, C. W.: Bacteriol. Rev., 30 (1966) 795.
4. Hesselatine, C. W.: Biotechnol. Bioeng., 14 (1972) 24.
5. Hesselatine, C. W.: Mycotoxins, 2 (1976) 17.
6. Pavlović, M., Pleština, R., Krogh, P.: Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B., 87 (1979) 243.
7. Kordić, B., Muntanola-Cvetković, M., Panin, M.: Zentralbl. Veterinarmed., 26 (1979) 540.
8. Labie, C., Tache, S.: Bull. Acad. Vet. Fr., 52 (1979) 553.
9. Hugh, L., Mary, E., Fun Sun Chu: Appl. Microbiol., 6 (1971) 1032.
10. Donald, W. W., Mirocha, C. J.: Cereal. Chem., 54 (1977) 466.
11. Duraković, S.: Utjecaj mješovitih kultura s površine žitarica na biosintezu aflatoksina s pomoću plijesni *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, 1981.
12. Labie, C., Tache, S., Bull. Acad. Vet. Fr., 52 (1979) 553.

Summary

THE EFFECT OF TEMPERATURE AND WATER CONTENT IN SUBSTRATE ON THE GROWTH OF THE MOULD ASPERGILLUS OCHRACEUS 318 AND ON THE BIOSYNTHESIS OF OCHRATOXIN A

The production of ochratoxin A was examined in relation to the amount of biomass on corn grains under selected conditions. The largest amount of ochratoxin A was synthesized at 20 °C, with 38% water in substrate. A higher cultivation temperature (28 °C) proved favourable to mould growth, but decreased the production of ochratoxin A. A temperature of 37 °C stopped at the same time the production of ochratoxin A and of the biomass. The amount of 1.5 mg/g biomass produced a measurable amount of ochratoxin A.

Department of Biochemical Engineering,
Faculty of Biotechnology, Zagreb

Received for publication
July 28, 1982