

DOKAZIVANJE BAKTERIJSKIH METABOLITA U HIGIJENSKOJ KONTROLI HLAĐENOG MLEKA

I PIRUVAT

Mr. Zora MIJAČEVIĆ, Veterinarski fakultet, Beograd

Sažetak

Broj mikroorganizama u hlađenom mlijeku ustanovljen je indirektno određivanjem piruvata. Rezultati kontinuirane i manuelne analize pokazali su praktičnost i brzinu opisane metode.

Uvod

U savremenim uslovima otkupa mleka hlađenje je postalo osnovni postupak kojim se privremeno odlaže kvarenje mleka. Međutim, uskladištenje mleka na nižim temperaturama uslovljava zastupljenost psihrotrofnih bakterija, koje se označavaju kao lipolitičke i proteolitičke, a potpuno su potisnute streptokoke i ostale bakterije koje spadaju u grupu glikolitičkih.

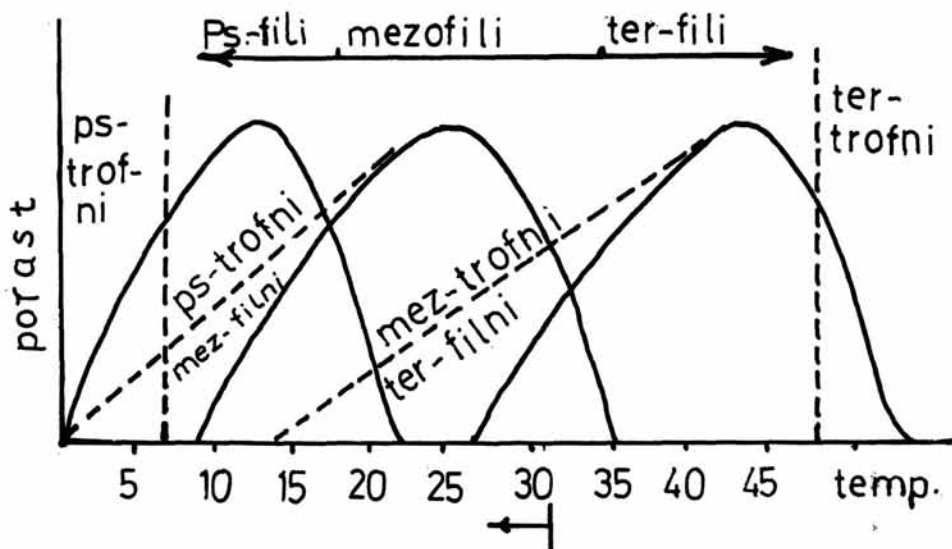
Mleko u kojem su većinom zastupljene psihrotrofne bakterije ima produženo redukciono vreme jer se aktivnošću ovih mikroorganizama neznatno menja redoks potencijal mleka. Kiselinski stepen ovog mleka takođe duže vremena ostaje nepromenjen. Na osnovu ovoga mogao bi se doneti pogrešan zaključak da je mleko higijenski ispravno i sa malim brojem mikroorganizama. Proučavanjem psihrotrofnih bakterija utvrđeno je da se njihova aktivnost zasniva na razlaganju proteina i masti. Stoga količina piruvata, slobodnih amini i masnih kiselina daje podatak o higijenskoj ispravnosti i samom kvalitetu mleka čuvanom na nižim temperaturama.

Pojam psihrotrofnih mikroorganizama obuhvata mikroorganizme koji mogu da se razmnožavaju pri različitim temperaturama. Zavisnost brzine rasta mikroorganizama od temperature a s tim u vezi njihova podela date su na dijagramu 1. (Beek 1971).

Psihrofilni mikroorganizmi nisu predstavljeni određenom familijom ili rodom, nego ih sačinjavaju razne vrste bakterija i gljivica. U zavisnosti od uslova čuvanja i vrste namirnica (mleka i mlečnih proizvoda) psihrotrofni mikroorganizmi ispoljavaju biohemijske procese glikolize, proteolize i lipolize. Ovi biohemijski procesi dovode do umanjivanja hranljive vrednosti namirnica, i organoleptičkih promena (promene mirisa i ukusa), a biogeni amini nastali razlaganjem proteina, mogu dovesti do nespecifičnih trovanja namirnicama.

Dokazivanje psihrotrofnih bakterija

Postoji više mogućnosti za dokazivanje psihrotrofnih bakterija u mleku i mlečnim proizvodima ali se najčešće koriste: određivanje ukupnog broja psihrotrofnih bakterija i određivanje produkta bakterijskog metabolizma.



Dijagram 1

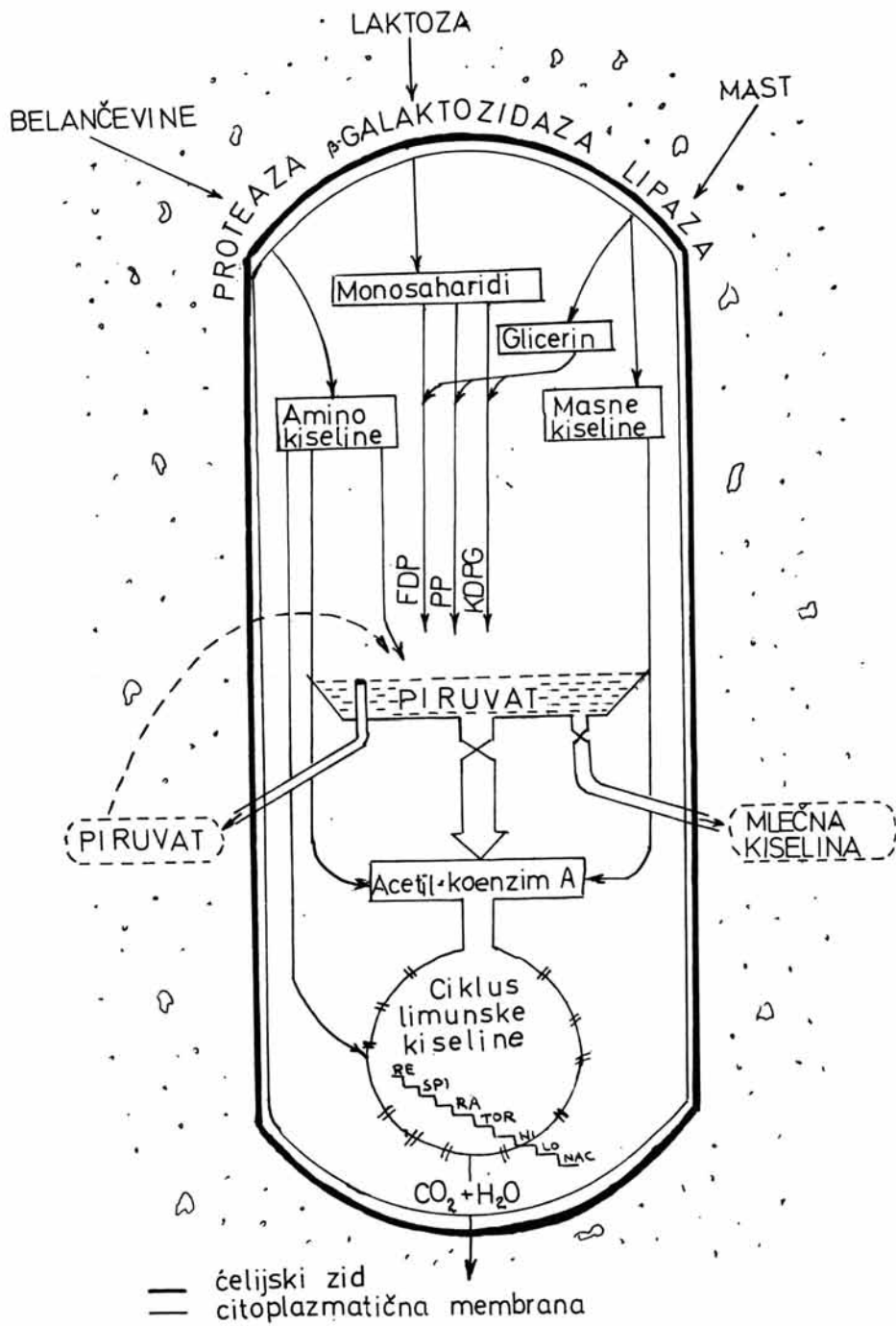
Dokazivanje ukupnog broja psihotrofnih bakterija u mleku

Psihotrofne bakterije dokazuju se na hranljivim podlogama postupkom za određivanje ukupnog broja bakterija. Zasejana hranljiva podloga se inkubira 10 dana pri temperaturi 7°C. Nakon ovog vremena određuje se broj psihotrofnih bakterija brojanjem izraslih kolonija.

Određivanje produkta bakterijskog metabolizma

Za razumevanje mikrobioloških procesa razlaganja organskih materije potrebno je poznavanje bakterijskog metabolizma. Metabolizam je niz hemijskih reakcija koje protiču u živoj ćeliji. Izvor energije su materije iz okoline (ugljeni hidrati, belančevine i masti) koje ćelija zahvaljujući svojim mnogobrojnim encimskim aktivnostima razlaže, od makromolekula do mono i dimera koji se mogu uneti u ćelije (Suhren 1973). Metabolizam pojedinih hranjivih materija mleka dat je na priloženoj slici 1.

Na slici 1 je lako uočljivo da je u centru metaboličkih aktivnosti mikroorganizama piruvat, koji predstavlja centralni produkt metaboličkog razlaganja tri osnovne grupe hranjivih materija u mleku (ugljeni hidrati, belančevine i masti). Iz ovoga proizlazi, da je moguće merenjem promena koncentracije piruvata, dati odgovor na metaboličku aktivnost mikroorganizama u namirnica, kao i indirektno govoriti o tome koliki je broj bakterija u ispitivanom uzorku.

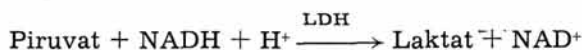


Slika 1

Metoda određivanja piruvata

Princip

Piruvat će biti redukovan u laktat kod istovremene oksidacije NADH₂ u prisustvu laktodehidrogenaze (LDH). Za vreme reakcije potrebna količina NADH₂ je ekvivalentna količini piruvata. Opadanje NADH₂ u rastvoru određuje se kolorimetrijski.



Uzimanje uzoraka za ispitivanje

Iz celokupnog mleka nakon dobrog mešanja uzima se reprezentativni uzorak koji može da se konzervira hlađenjem na 0°C za vreme od 4—5 sati. Za konzervisanje do 24 časa korisati se formaldehid (0,2 ml 3,5% formaldehida na 10 ml mleka).

Automatski postupak kontinuirane protočne analize

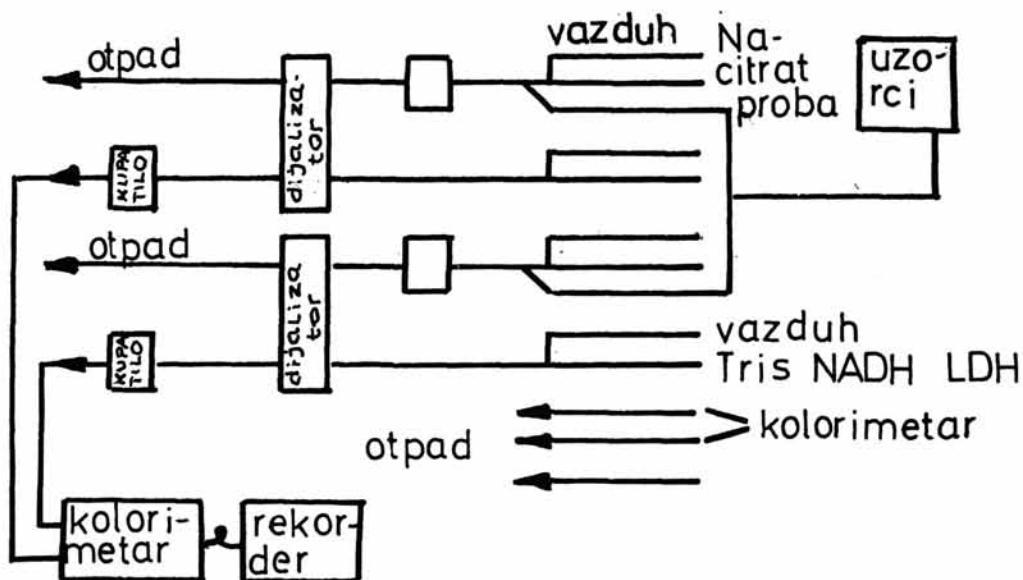
Za ovaj postupak potrebno je 0,42 ml uzorka koji se razblažuje sa 0,80 ml natrijumcitrata, a uzorci su međusobno odvojeni (segmentirani) sa 0,32 ml vazduha. Dijaliza nastaje u analitičkom kanalu sa 1,20 ml tris pufera-NADH₂-LDH rastvora, koji se segmentira sa 0,42 ml vazduha. Reakcija protiče u vodenom kupatilu na 37°C. Merenje se vrši u protočnoj kiveti od 15 mm kod 340 nm. Šema postupka određivanja piruvata data je na slici 2.

Manuelni postupak dokazivanja piruvata Postupak dokazivanja piruvata Priprema proba mleka

10 ml mleka izmeša se sa 5 ml trihlorsirćetne kiseline i centrifugira 10 minuta na 3.000 Upm. Na 5 ml supernatanta doda se 2 ml pufera (0,7 M trietanolaminhidrohlorida) i promeša. Pre ispitivanja filtrat se zagreje na 20°C.

Merenje

Merenje se vrši pri temperaturi 25°C u staklenoj kiveti od 1 cm debljine pri talasnoj dužini od 360 nm prema vazduhu. U kivetu se odpipetira 2 ml filtrata i 0,2 ml NADH₂ i odredi ekstinkcija E₁. Potom se doda 0,02 ml LDH izmeša staklenim štapićem i nakon završetka reakcije (oko 5 min.) meri



Slika 2

ekstinkcija E_2 . Oduzimanjem od E_1 ekstinkcije E_2 dobija se diferencijalna ekstinkcija (E).

Određivanje vrednosti piruvata Standardna kriva

Vrednost piruvata je određena pomoću standardne krive. Pri tome se rastvor piruvata poznate koncentracije priprema u 1% NaHCO_3 a postupak je kao i kod proba s mlekom. Dobijene odgovarajuće ekstinkcije zavise i od koncentracije.

Reagensi

- 10% trihlorsirćetna kiselina
- Trihlorsirćetna kiselina 100 g
- Destilovana voda ad 1000 ml
- 0,7 N trietanolaminhidrohlorid puffer
- Trietanolaminhidrohlorid 13,0 g
- Destilovana voda 90,0 ml
- sa 30% NaOH doterati pH na 8,6
- NADH_2 — rastvor
- NADH_2 (natrijumova so) 60,0 mg
- NaHCO_3 1,0 g
- Destilovana voda ad 110,0 ml

LDH — rastvor
 LDH (iz miškulature kunića) 5,0 mg/ml 0,4 ml
 Destilovana voda 0,6 ml
 Piruvat rastvor (za standardnu krivu)
 Na — piruvat 0,128 g
 Destilovana voda ad 100,0 ml
 Standardni rastvor za standardnu krivu

Rastvor piruvata (ml)	10% NaHCO ₃ (ml)	Koncentracija piruvata (ppm)
0,0	10	0,0
2,5	10 dopuniti	2,5
5,0	10 s destilo-	5,0
7,0	10 vanom vo-	7,0
10,0	10 dom do 100 ml	10,0

Standardni rastvor može da stoji nedelju dana na temperaturi frižidera.

Materijal za ispitivanje

Kao materijal za ispitivanje korišćeno je sirovo mleko.

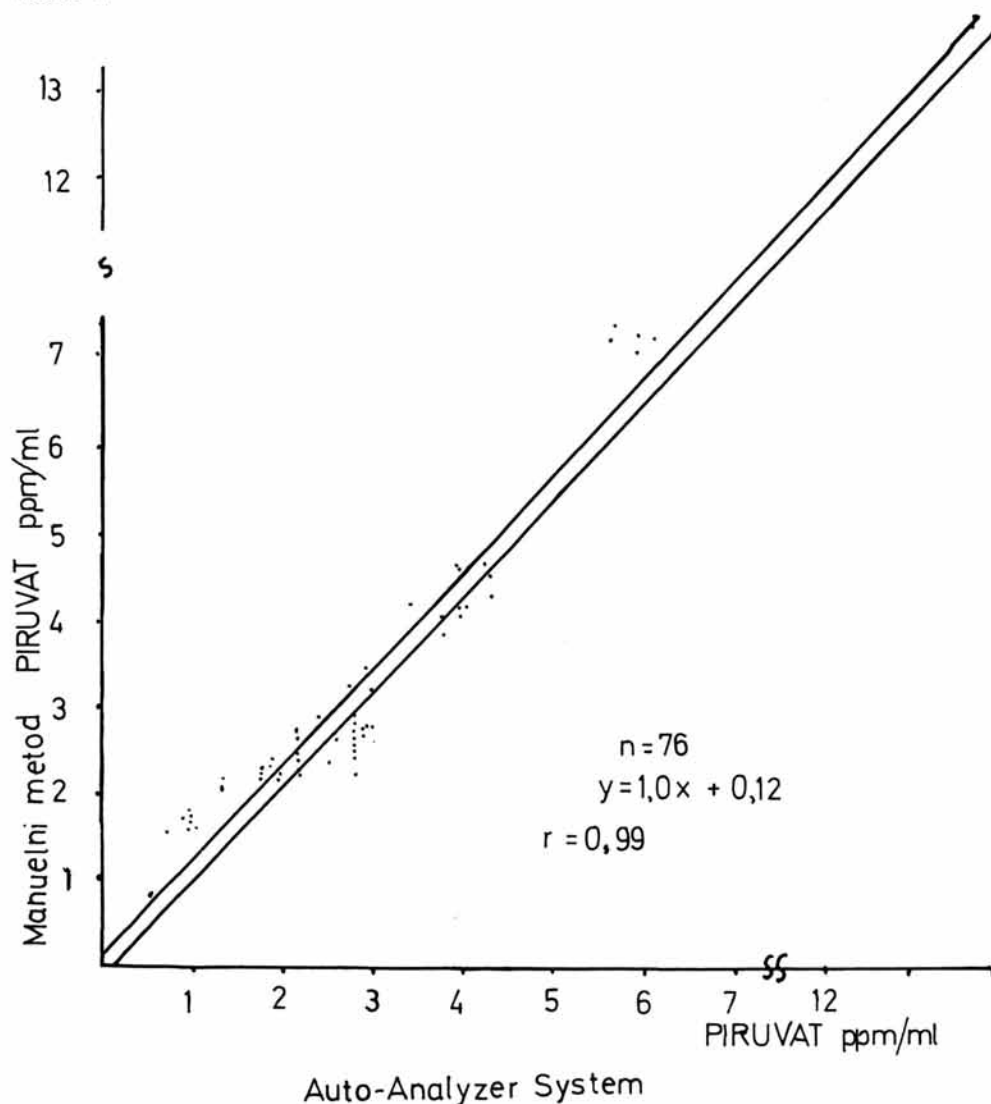
Rezultati i diskusija

Hlađenje mleka posle muže, kao obavezni postupak primarne obrade mleka, isključuje redukcioni test kao verodostojnu metodu za određivanje ukupnog broja bakterija u mleku. U toku čuvanja mleka na niskim temperaturama dominantnu mikrofloru čine psihrofilni mikroorganizmi, od kojih su najčešće zastupljene vrste roda *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Micrococcus*. Izvori kontaminacije mleka ovim mikroorganizmima su (Miljković 1977) cisterne za transport i silosi za lagerovanje mleka. Ovi mikroorganizmi se često pominju kao izraziti predstavnici lipolitičkih i proteolitičkih bakterija (Heeschen 1971, Suhren 1973) pa je njihovo dokazivanje tim značajnije.

Dokazivanje ovih mikroorganizama zasejavanjem na podlogama je dug proces i zbog toga su tražene brže i jednostavnije metode. Metode dokazivanja piruvata je brza i jednostavna, daje tačne rezultate u veoma kratkom vremenskom intervalu. Ova metoda može s uspehom da se koristi u ohlađenom i u neohlađenom mleku. Postoje 2 postupka za dokazivanje piruvata jedan je potpuno automatski, kontinuirani postupak na aparatu Auto-Analyzer II.

Ako se primenjuje ovaj postupak kontinuirane protočne analize tad se u toku jednog časa može pregledati od 60—130 uzoraka mleka.

U toku našeg rada uporedili smo rezultate količine piruvata dobijene u postupku protočne analize i manuelno, da bi utvrdili da li manuelna metoda može poslužiti za dokazivanje piruvata u laboratorijama koje nemaju odgovarajuću aparaturu za prvi postupak. Slaganje rezultata dato je na grafikonu 1.



Grafikon 1

Iz grafikona se vidi da je korelacija između metoda vrlo visoka $r = 0,99$ a linija regresije je $y = 1,0x + 0,12$. Tačnost metode manualnog određivanja piruvata određuje se koeficijentom varijacije (VK) pri različitim nivoima piruvata. Dobijeni rezultati prikazani su u tablici 1.

Tablica 1

Tačnost metode u zavisnosti od nivoa piruvata u mleku određenog manuelnom metodom (Suhren i dr. 1976)

Nivo piruvata (ppm)	n	\bar{X}_a	s_a	VK
1,0	4	0,8	0,13	15,3
1,01—2,0	15	1,6	0,10	5,3
2,01—3,0	13	2,7	0,15	5,7
3,01—4,0	5	3,6	0,15	4,4
5,01	11	6,6	0,14	2,1
Ukupno	56	3,4	0,13	5,4

Iz priloženih rezultata se vidi da su odstupanja od srednjih vrednosti različitog nivoa piruvata iznosila 0,13 ppm (0,10 do 0,15). Koeficijent varijacije u proseku bio je 5,4% a koeficijent varijacije 15,3%, nalazi se kod nivoa piruvata do 1,0 ppm.

Zaključak

Za indirektno dokazivanje broja mikroorganizama u hladnom mleku preporučuje se dokazivanje piruvata.

Uporednim ispitivanjem količine piruvata u mleku protočnom analizom i manuelno utvrđena je vrlo visoka korelacija $r = 0,99$ a linija regresije $y = 1,0x + 0,1$.

PROVING OF THE BACTERIAL METABOLITES IN HYGIENICAL CONTROL OF THE COOLED MILK — I PIRUVATE

Summary

Number of microorganisms in the cooled milk was estimated indirectly by determination of pyruvate. Practicality and rapidity of described methods were of continues and manual analyses.

Literatura

- BEEK, G. (1972): Psychrotrophe Organismen in Milch. **Archiv für Lebensmittelhygiene** 12, 278—281.
- HEESCHEN, W. (1971): Untersuchungen zur quantitativen Analyse und Lebensmittelhygienischen Bedeutung bakterieller Kataboler Reaktionen in Milch. Hab. doktorski rad, Berlin.
- HEESCHEN, W., SUHREN, G. TOLLE, A. (1977): Pyruvatmessung in Milch und konzept eines Systems zur Erfassung der bakteriologische Beschriffenheit **Die Molk. Zeit., Welt der Milch** 31, 16, 489—494.
- MILJKOVIC, V. (1977): Higijena i tehnologija mleka, Naučna knjiga, Beograd.
- SUHREN, G. (1973): Zur Eignung der enzymatischen Pyruvatbestimmung für die Messung der bakteriellen Belastung von Milch. Doktorski rad, Bon.
- SUHREN, G., HEESCHEN, W., TOLLE, A. (1976): Automatische und manuelle enzymatische Pyruvatbestimmung in der Milch. **Milch wissenschaft** 31, 5, 257—260.
- TOLLE, A., HEESCHEN, W., WERNERA, H., REICHMUTH, J., SUHREN, G. (1972): Die Pyruvatbestimmung ein neuer Weg zur Messung der bakteriologischen Vertigkeit von Milch. **Milchwissenschaft** 27, 6, 343—352.