

# DOKAZIVANJE BAKTERIJSKIH METABOLITA U HIGIJENSKOJ KONTROLI HLAĐENOG MLEKA

## II TIROZIN

Mr. Zora MIJAČEVIĆ i mr. Tatjana VULETA, Veterinarski fakultet, Beograd

### Sažetak

*Broj proteolitičkih mikroorganizama u ohlađenom mleku je u korelaciji sa tirozinskom vrijednošću. Zato bi se određivanjem tirozinske vrijednosti mogla dobiti slika o ispravnosti mleka.*

### Uvod

Čuvanjem mleka na niskim temperaturama, stvaraju se nepovoljni uslovi za razmnožavanje većine mikroorganizama što bi trebalo da omogući produženo uskladištenje mleka. Međutim, u takvim uslovima dolazi do rasta i razmnožavanja psihrotrofnih bakterija, koje svojim proteolitičkim enzimima vrše razlaganje belančevina mleka. Stepenn nastale proteolize ne može se utvrditi određivanjem samo broja psihrotrofnih bakterija, nego je potrebno kvantitativno odrediti i proizvode njihove metaboličke aktivnosti. Metodom određivanja tirozinske vrednosti omogućeno je merenje stepena proteolize. Tirozinska vrednost (TV) definiše se kao sadržaj amino kiselina i peptida mleka rastvorljivih u kiselinama, izražena intenzitetom obojenja reakcione smeše (dobijene Lori Folia-ovim postupkom), koji je ekvivalentan količini tirozina u 1 ml mleka.

Promene tirozinske vrednosti mleka u kome su dokazane proteolitičke bakterije zavisi od dužine čuvanja toga mleka na nižim temperaturama. Juffs (1973) je zapazio da se tirozinska vrednost sirovog mleka blago povećava u toku dva dana, značajno povećava 4-tog dana a izrazito 7-og dana čuvanja pri temperaturi nižoj od 10° C. Porast tirozinske vrednosti je u zavisnosti od ukupnog broja bakterija. Ako je ukupan broj bakterija manji od 10<sup>6</sup>/ml nema značajnog povećanja tirozinske vrednosti, znatno povećanje ove vrednosti nastaje kada je ukupan broj bakterija 10<sup>7</sup>/ml ili viši. Povećanje TV u mleku dovodi do promene organoleptičkih osobina mleka koje može da se označi kao bajato, kiselo, gorko i truležno.

Iz toga proizlazi da je povećanje tirozinske vrednosti pokazatelj kvarenja mleka. U toku našega rada želeli smo da proverimo TV kao parametar održivosti i kvalitete mleka.

### Materijal i metode rada

#### Materijal

U eksperimentu je korišćeno nepasterizovano i pasterizovano mleko.

Nepasterizovanom mleku ohlađenom odmah posle muže na 10°C i 2°C dodavani su razni mikroorganizmi. Mikroorganizmi, koji su korišćeni u eksperimentu izolovani su iz mleka čuvanog u hladioniku pri 4—8°C.

Pasterizovano mleko dobijeno je pasterizacijom 30' na 63°C. Mleko je posle pasterizacije ohlađeno na 10°C a zatim su mu dodati isti mikroorganizmi kao i nepasterizovanom.

### Metode rada

Ukupan broj bakterija (UBB). Za određivanje povećanja broja bakterija u vremenskom intervalu do četiri dana korišćena je metoda određivanja ukupnog broja bakterija (u daljem tekstu UBB) u mleku propisana u Sl. listu SFRJ br. 55/73.

Vrednost tirozina (TV) kao pokazatelja proteolitičkih promena u mleku je određivana metodom po Juffs-u (1973).

Princip metode sastoji se u nastajanju obojene reakcije Folin-Ciocalten-reagensa sa tirozinom i drugim aminokiselinama, kao i peptidima, koji se rastvaraju u 10% trihlorsirćetnoj kiselini. Tirozin redukuje Folin-Ciocalten-reagens u alkalnoj sredini pri čemu se stvara jedinjenje plave boje.

### Postupak

5 ml 30% trihlorsirćetne kiseline dobro se izmeša sa 10 ml mleka. Posle nekoliko minuta mešavina se filtruje (Whatman No 2). Na 2 ml filtrata doda se 10 ml sveže pripremljenog alkalnog rastvora bakartartarata i snažno protrese. Nakon 10 min. doda se 1 ml razblaženog Folin-Ciocalten-rastvora i još jednom dobro promeša. Stajanjem 30—45' pri temperaturi od 25—30°C razvija se boja, koja se meri spektrofotometrom na 700 nm.

Dodavanjem bakartartarata pojavljuje se talog koji se pre merenja u spektrofotometru otklanja filtracijom.

### Reagensi

30% trihlorsirćetna kiselina: 30 g TCA/100 ml H<sub>2</sub>O

Alkalni rastvor bakartartarata:

Reagens A: 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 0,1 N NaOH

Reagens B: 0,5% CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O u 1% Na ili K-tartarata

Pomeša se: 50 ml rastvora A i 1 ml rastvora B

Folin-Ciocalten-reagens:

Folin-Ciocalten-reagens : H<sub>2</sub>O u odnosu 1:2

### Standardna kriva

Za konstruisanje baždarene krive koristi se rastvor L-tirozina koncentracije 101 mg/100 ml 10% trihlorsirćetne kiseline. Od ovog osnovnog standardnog rastvora prave se razblaženja od 10 do 100 ppm (standardi). Od pripremljenih standarda uzima se 5 ml i razblaži sa 10 ml H<sub>2</sub>O, a boja se razvija kao i u postupku.

## Sigurnost metode

Dodavanjem mleku poznatih količina tirozina i njihovo naknadno dokazivanje pokazuje tačnost metode. »Recovery« za koncentracije tirozina od 10—60 ppm je 105,3% (Tolle, 1978).

### Rezultati

Rezultati su prikazani odvojeno za nepasterizovano i za pasterizovano mleko.

#### Nepasterizovano mleko

Praćenje promena broja bakterija u nepasterizovanom mleku u zavisnosti od temperature i vremena čuvanja prikazano je u tablici 1.

**Tablica 1**

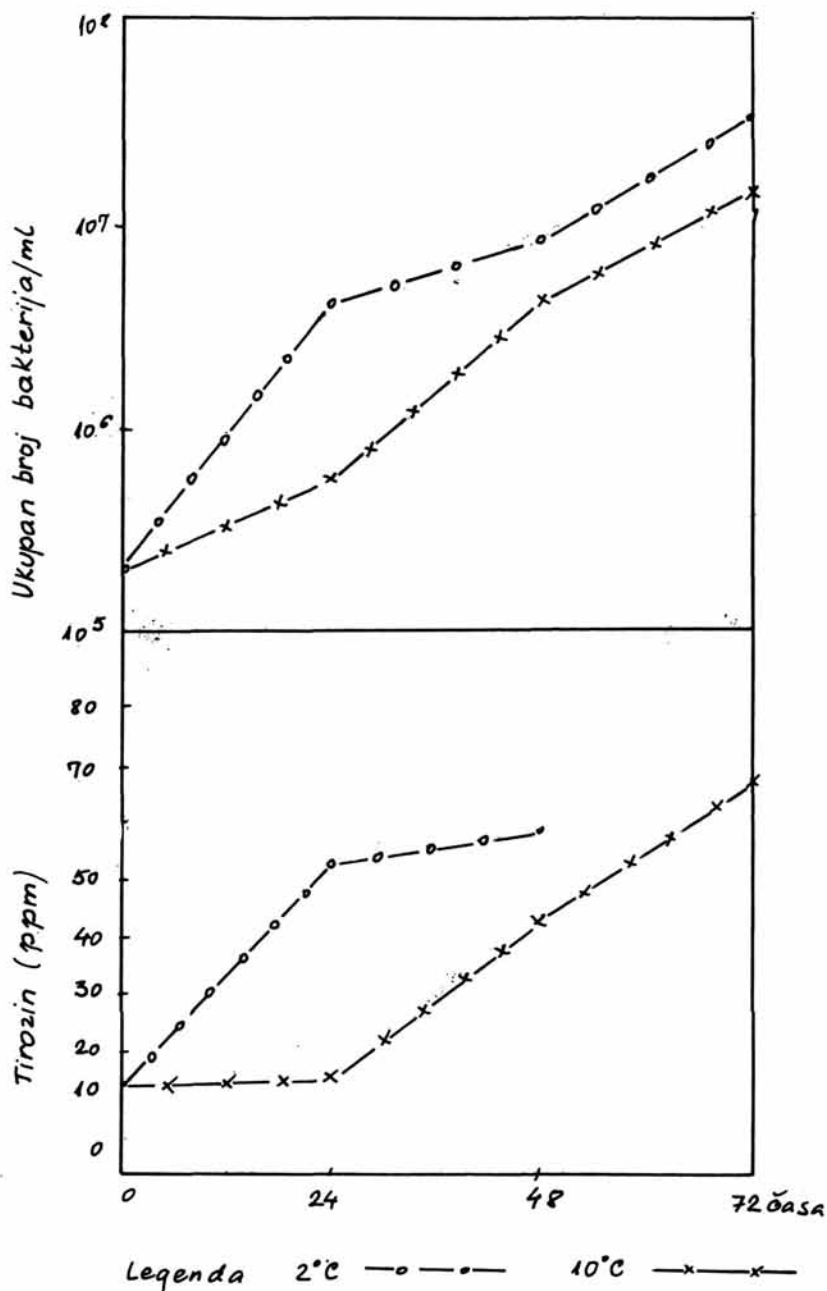
**Povećanje broja bakterija u nepasterizovanom mleku u zavisnosti od temperature i trajanja čuvanja mleka**

Trajanje čuvanja mleka	Temperat. čuv. mleka	Broj uzoraka	Broj bakterija u ml mleka			
			$\bar{x}\log_6$	$s\log_6$	$\bar{X}_G$	$s_G$
0	2°C	11	6,3269	0,382	2.122.755,6	2,0335
24	2°C	11	6,7891	0,5343	6.153.185,3	3,4221
48	2°C	11	7,6727	0,3635	47.068.165,5	2,3093
72	2°C	11	8,0213	0,1970	106.481.148,6	1,5739
0	10°C	11	6,3873	0,4825	2.439.342,1	2,0372
24	10°C	9	7,6189	0,5602	41.580.421,6	3,6372
48	10°C	5	7,8560	0,4116	71.559.429,1	2,5800
72	10°C	3	8,6900	0,3816	489.778.819,4	2,4076

Čuvanjem mleka na temperaturi od 2°C mikroorganizmi se razmnožavaju i za 24 časa, broj bakterija će se povećati od 2.122,755,6 do 6,153,185,3. Izrazito povećanje broja bakterija zapaža se posle čuvanja istog mleka još 24 časa. Broj bakterija u mleku čuvanog na 10°C povećavao se brže, tj. već za 24<sup>h</sup> broj bakterija je bio veći za 20 puta od početnog broja. Uporedo s ispitivanjima UBB ispitivana je i tirozinska vrednost u uzorcima mleka.

Početne tirozinske vrednosti za nepasterizovano mleko bile su 12,4 ppm. Povećanje TV nastaje za 24 časa u mleku koje je čuvano na 10°C i iznosi 51,0 ppm dok TV vrednost u mleku sa 2°C ostaje skoro nepromenjena (12,5 ppm). Posle 48 časova TV se znatno povećava i kod mleka držanog na t=2°C iznosi 41,0 ppm, a u mleku držanom na t=10°C 57,5 ppm. Nakon 3 dana mleko hladeno na 10°C se organoleptički promenilo i isključeno je iz daljeg ispitivanja, a TV mleka čuvanog isto vreme na 2°C se povećala.

Promene UBB i TV u zavisnosti od temperature i dužine čuvanja mleka dati su na grafikonu 1.



Grafikon 1

Promene ukupnog broja bakterija i tirozinska vrednost u nepasterizovanom mleku čuvanom na temperaturi 2 i 10°C

## Pasterizovano mleko

Povećanje UBB u pasterizovanom mleku prikazano je u tablici 2. Ako je mleko čuvano na temperaturi od 2°C broj bakterija se povećao za jednu potenciju u toku 48 časova, a kod mleka uskladištenog na 10°C i u istom vremenskom intervalu 200 puta (za 2 potencije). Početne tirozinske vrednosti za pasterizovano mleko su 47,0 ppm. TV mleka čuvanog na 10°C brže se menjala i za 24 časa dostigla je 155,0 ppm a za sledećih 24 časa 213 ppm. Promene tirozinske vrednosti u mleku čuvanom na 2°C bile su sporije i posle 96 časova dostižu 123 ppm.

Na grafikonu 2. prikazana je međusobna zavisnost između broja bakterija i promene TV u mleku u zavisnosti od temperature i trajanja uskladištenja mleka.

**Tablica 2**

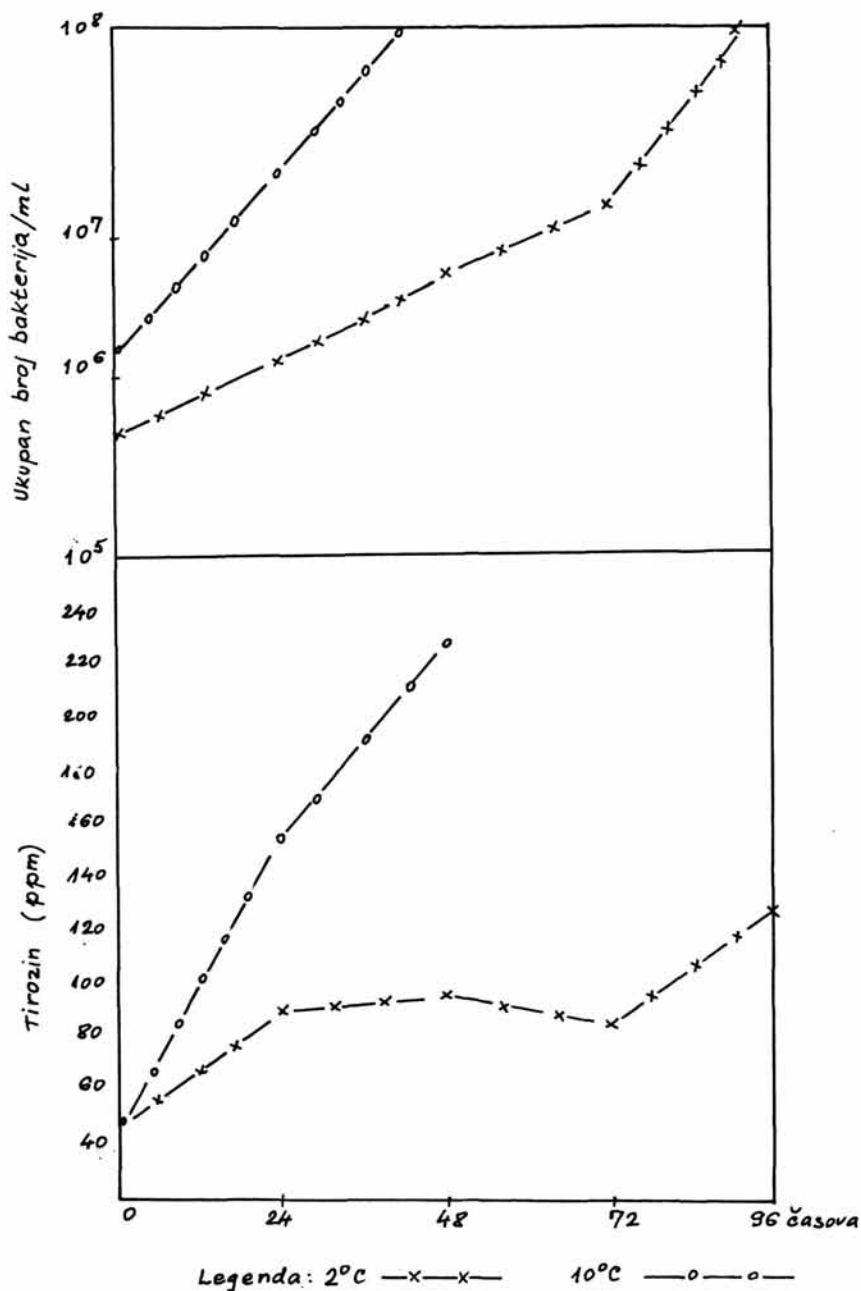
**Povećanje broja bakterija u pasterizovanom mleku u zavisnosti od temperature i trajanja čuvanja mleka**

Trajanje čuvanja mleka	Temperatura čuvanja mleka	Broj uzoraka	Broj bakterija u ml mleka			
			$\bar{x}\log G$	$s\log G$	$\bar{X}_G$	SG
0	2°C	5	5,7360	0,9797	544.502,6	9,54
24	2°C	5	6,0500	1,4749	1.122.018,4	29,8474
48	2°C	5	6,6300	1,4786	4.265.795,0	30,1021
72	2°C	5	7,3080	1,6252	20.323.570,1	42,1874
96	2°C	4	8,3175	0,1828	207.730.372,6	1,5234
0	10°C	10	6,2190	0,8340	1.655.769,9	6,8231
24	10°C	9	7,4933	0,2726	31.141.055,8	1,8732
48	10°C	9	8,5011	0,3540	317.037.847,7	2,2596

## Diskusija

Kontrolom svežine mleka određivanjem kiselinskog stepena mleka dobija se uvid u određene aktivnosti mikroorganizma. Glikolitički mikroorganizmi razlažu laktozu do mlečne kiseline i tako povećavaju ukupnu kiselost. Čuvanjem mleka na niskim temperaturama dolazi do razmnožavanja psihrofilnih bakterija koje svojim proteolitičkim fermentima razlažu belančevine, a produkti razlaganja manje utiču na promenu kiselinskog stepena. Stepem proteolize određuje se tirozinskom vrednosti (TV).

Promene belančevina mleka koje imaju za posledicu promene tirozinske vrednosti u toku čuvanja mleka zavise od više činilaca, a najčešće se navodi početni broj proteolitičkih bakterija, trajanje čuvanja mleka i temperatura čuvanja. Poznato je da proteoliza mleka zavisi i od načina termičke obrade mleka.



**Grafikon 2**

Promene ukupnog broja bakterija i tirozinska vrednost u pasterizovanom mlek čuvanom na temperaturama 2 i 10° C

U nepasterizovanom mleku broj bakterija se pri 2°C poveća u toku 24 časa za samo pola potencije dok u sledećih 24 časa postiže izrazito povećanje broja bakterija. Tirozinska vrednost mleka čuvanog na 2°C nema promena u prva 24 časa. Sa povećanjem broja bakterija u sledećih 24 časa raste i tirozinska vrednost na 41,0 ppm. Čuvanjem nepasterizovanog mleka na t=10°C broj bakterija se intenzivnije poveća u toku prvog dana. U istom intervalu utvrdili smo da se TV povećava sa 12,4 ppm na 51,0 ppm. U naredna 24 časa porast bakterija je još uvek značajan ali se tirozinska vrednost manje menja (57,5 ppm).

U pasterizovanom mleku su promene izražajnije. Početna vrednost tirozina za pasterizovano mleko je u proseku 47,0 ppm. Tirozinska vrednost u mleku čuvanom na 10°C, 48 časova je bila 213 ppm. Kod istog početnog broja bakterija u pasterizovanom mleku tirozinska vrednost će se sporije menjati ako je to mleko uskladišteno na 2°C jer je i porast mikroorganizama sporiji (grafikon 2).

Upoređivanje tirozinske vrednosti sa porastom broja bakterija u mleku utvrđeno je da su ove dve vrednosti zavisne i da sa porastom broja bakterija raste i TV. Porastom tirozinske vrednosti menjaju se i organoleptičke osobine mleka. U toku eksperimenta utvrdili smo da se kod povećanja TV preko 100 ppm već uočavaju organoleptičke promene u mleku. Iz ovoga proizlazi da bi tirozinska vrednost mleka mogla da se koristi kao parametar za utvrđivanje ispravnosti i održivosti mleka.

### Zaključak

1. Čuvanjem mleka na 2°C u toku 48 časova utvrđeno je povećanje TV nepasterizovanog mleka od 12,4 ppm do 41,0 ppm a u mleku čuvanom na 10°C i do 57,5 ppm.
2. Proteolitička aktivnost mikroorganizama u pasterizovanom mleku je izrazitija. TV se povećava od 47,0 ppm do 213 ppm za mleko čuvano na 10°C u toku 2 dana, ili do 123 ppm u vremenu od 4 dana na t=2°C.
3. Pri povećanju TV preko 100 ppm mleko je organoleptički promenjeno.

### PROVING OF THE BACTERIAL METABOLITES IN HYGIENICAL CONTROL OF THE COOLED MILK — II TYROSINE

#### Summary

Number of microorganisms in the cooled milk is in correlation with tyrosine value. Determination of this value enables the milk quality evaluation.

### Literatura

1. JUFFS, H. S. (1973): Proteolysis detection in milk, **Journal of Dairy Research** 40, 371, 383
2. JUFFS, H. S. (1975): Proteolysis detection in milk, **Journal of Dairy Research** 42, 31
3. TOLLE, A., HECSCHEN, W., MUSCHICK, R., SUCHREN, G.: Untersuchung zur hygienischen Wertigkeit ULTRAHOCHERHITZTER und sterilisierter milch unter besonderer Berücksichtigung des zur Herstellung verwendeten Rohstoff.  
2. Zwischenbericht zum Forschungsforhaben Kiel, 1980.