

Antibakterijska aktivnost laktoperoksidaza-tiocijanata vodonikperoksida sistema u mleku

(The Antimicrobial Effect of the Lactoperoxidase Thiocyanate — Hydrogen Peroxide System in Milk)

Dr. Zora MIJAČEVIĆ, Veterinarski fakultet, Beograd; dr. Ivanka OTENHAJMER, Veterinarski i mlekarski institut, Beograd; Danica IVANOVIĆ, »Imlek« Standard PKB Padinska Skela

Sažetak

Izvorni znanstveni rad — Original Scientific Paper
Prispjelo: 6. 2. 1989.

UDK: 637.579.678

Laktoperoksidaza u prisustvu tiocijanatnog jona i vodonikperoksida čini sistem označen kao laktoperoksidaza-tiocijanata — vodonikperoksid (LPS). Za aktivnost LPS potrebno je da su prisutne sve tri komponente u odgovarajućim ekvivalentnim koncentracijama. Laktoperoksidaza i tiocijanat se prirodno javljaju u mleku, dok H_2O_2 treba obezbediti iz nekog egzogenog izvora. Tokom rada utvrdili smo da je za aktiviranje LPS potrebna koncentracija H_2O_2 od 0,4 mMol. Produžena bakteriostaza dejstvom LPS zavisi od nivoa kontaminacije i pri početnoj koncentraciji 10^4 mik/ml je 9^h, a pri većim početnim koncentracijama 10^5 i 10^6 mik/ml iznosi 6^h. U uzorcima mleka s aktivnim LPS pH se sporije menja tako da je takvom mleku produžena tehnološka ispravnost.

Summary

Lactoperoxidase with thiocyanate ions and hydrogen peroxide are contained in the lactoperoxidase — thiocyanate — hydrogen peroxide — labelled system (LPS). For the LPS activity, the adequate equivalent concentrations of all three components are necessary. Lactoperoxidase should be supplied from some exogenous source. It is suggested that 0.4 mMol of H_2O_2 is the necessary concentration for the LPS activation. Prolonged bacteriostasis by the LPS action is dependant on the levels of contamination and at the initial concentration of 10^4 microorg./ml it lasts for 9 hours and at 10^5 and 10^6 microorg./ml for 6 hours. In milk samples with the activated LPS, pH variations are slower, technological correctness of milk, therefore, being prolonged.

Inhibicija rasta mikroorganizama u mleku rezultat je antibakterijske aktivnosti imunoglobulina kao specifičnog odbrambenog mehanizma i raznih fermenta koji nastaju u mlečnoj žlezdi ili vode poreklo iz krvi. Pored lizozima, laktoferina, poslednjih se 10 godina sve veći značaj pridaje fermentu laktoperoksidaza koji katalizira oksidacije u mleku.

Laktoperoksidaza u prisustvu tiocijanatnog jona i vodonikperoksida čini sistem označen kao laktoperoksidaza tiocijanat — vodonikperoksid (LPS). Za aktivnost LPS potrebno je da su prisutne sve tri komponente u odgovarajućim ekvivalentnim koncentracijama. Laktoperoksidaza i tiocijanat se prirodno

javlja u mleku dok H_2O_2 treba obezbediti iz nekog egzogenog izvora iako je poznato da H_2O_2 u manjim koncentracijama mogu u mleku stvarati i homofermentativne bakterije mlečne kiseline. Kravlje mleko sadrži velike koncentracije laktoperoksidaze sintetizovane u mlečnoj žlezdi (A n d e r s e n, T r a n t a l i s, K a n g, 1974; D e s m a z e a u d, 1983). Prosečna koncentracija iznosi 30 mg/l (P o l i s i S h m u k l e r, 1953). Naophodna koncentracija laktoperoksidaze za aktiviranje antibakterijskog sistema je 0,5 do 1,0 mg/l (B j ö r c k, 1978 b). Koncentracija laktoperoksidaze u mleku je najveća prvih pet dana posle telenje (K i e r m e i e r i K a y s e r 1960), a potom opada.

Druga komponenta toga sistema tiocijanat nalazi se u mleku ali njegova koncentracija veoma varira (B o u l a n g e, 1959; K o r h o n e n, 1973; L a w r e n c e, 1970) i zavisi o koncentraciji glikozinolata u stočnoj hrani. Koncentracija SCN varira od 1 do 59 ppm.

Pokazalo se da je koncentracija od 15 ppm dovoljna za aktiviranje LP sistema (B j ö r c k, 1978 b) u uskladištenom neobrađenom mleku. Nedavno se pokazalo da je jon tiocijanata prisutan u ljudskoj pljuvački u koncentraciji od 10 μ m (A u n e i i T h o m a s, 1977), a u želučanom soku ljudi 40 do 50 ppm (B j ö r c k, 1979), što pokazuje da su te koncentracije mnogo veće nego u mleku.

Treća komponenta tog sistema H_2O_2 ne nalazi se u sveže pomuženom mleku koje ne sadrži bakterije. Konzerviranje mleka vodonikperoksidom poznato je već 150 godina. Dodavanje velikih koncentracija, kao sredstva za konzerviranje mleka, ima određene nedostatke kao što su smanjenje hranljive vrednosti mleka, uticaj na prirodni antibakterijski sistem, jer ga inaktivira i nepraktičnost sprovođenja. Dodavanjem H_2O_2 u mleko u koncentracijama od 500 do 800 ppm (B j ö r c k, 1982) postiže se samo nespecifični antibakterijski i oksidativni efekat. Tako visoke koncentracije H_2O_2 utiču na oslobađanje SH grupa u beta laktoglobulinima (M u n y a u a, 1975), a poznato je da ove grupe imaju značajni efekat na aktiviranje LP sistema (B j ö r c k, 1982).

Poslednjih godina se pokazalo da mnogo manje koncentracije H_2O_2 pružaju indirektno znatan antibakterijski efekat u mleku pod uslovom da mleko sadrži otprilike ekvivalentne koncentracije tiocijanata. Antibakterijska aktivnost LPS prema *Streptococcus* vrstama direktno zavisi o koncentraciji SCN^- . Za inhibiciju rasta *Str. agalactiae* potrebne su minimalne koncentracije SCN^- koje se uvek nalaze u mleku, dok je za inhibiciju *Str. cremoris* potrebno 0,4 μ g/ml, a *Str. pyogenes* 1,5 μ g/ml SCN^- (B r o w n i M i c k e l s o n, 1979).

Objašnjenje za antibakterijsko delovanje LPS je u oksidaciji SCN^- u hipotiocijanatni jon $OSCN^-$ koji je biostabilan i oksidira SH grupe u sulfeniltiocijanatne derivate. Taj sistem inhibira transport glukoze i glukolizu *Str. agalactiae*. To ukazuje da su funkcionalne SH grupe proteina uključene u transport glukoze. $OSCN^-$ jon koji nastaje pod dejstvom LPS dovodi do oksidacije SH grupa *Escherichiae coli* u sulfeniltiocijanatne derivate, što dovodi do inhibicije bakterijskog disanja (M i c k e l s o n, 1979).

U našem radu želeli smo da utvrdimo mogućnost korišćenja LPS za očuvanje higijenske ispravnosti mleka u neadekvatnim uslovima otkupa i transporta mleka.

Materijal i metode rada

Kao materijal korišćeno je mleko dobijeno mužom najmanje dve krave. Aktiviranje LPS postignuto je dodavanjem NaSCN tako da koncentracija SCN⁻ u mleku bude 15 ppm. Koncentracija vodonikperoksida iznosila je od 0,3 do 3,0 mMol/l. Prisustvo slobodnog H₂O₂ dokazivano je peroksidazom metodom Storch.

Uzorci mleka inkubirani su (30 °C u trajanju do 24 časa). Promena broja mikroorganizama utvrđivana je posle 0, 3, 6, 9, 12 i 24 časa inkubacije metodom određivanja ukupnog broja bakterija.

Rezultati i diskusija

Uticaoj različitih koncentracija H₂O₂ u mleku na aktiviranje LPS prikazano je u tablici 1.

Tablica 1. Uticaj različitih molariteta H₂O₂ na aktivnost LPS
Table 1. Effect of different molarities of H₂O₂ on LPS activity

Koncentracija H ₂ O ₂ Concentration of Sabi — Hours	Broj bakterija po ml mleka posle Bacterial counts in 1 ml milk after					
	0 ^h	3	6	9	12	24
3 mMol/l*	6,0 × 10 ¹	3,0 × 10 ¹	1,0 × 10 ¹	4,0 × 10 ¹	6,0 × 10 ¹	1,8 × 10 ⁶
0,3 mMol/l	4,2 × 10 ²	7,0 × 10 ²	9,0 × 10 ³	8,1 × 10 ³	9,0 × 10 ⁶	1,8 × 10 ⁸
0,4 mMol/l	4,4 × 10 ²	1,1 × 10 ³	3,7 × 10 ³	9,3 × 10 ³	1,2 × 10 ⁵	6,0 × 10 ⁶
K	7,4 × 10 ²	8,8 × 10 ³	1,4 × 10 ⁵	1,2 × 10 ⁶	3,7 × 10 ⁷	2,8 × 10 ⁸

* dokaz H₂O₂ u višku

* determination of H₂O₂ in excess

Različite koncentracije H₂O₂ utiču različito na aktiviranje laktoperoksidaza-tiocijanata-vodonik peroksid sistema. Koncentracije H₂O₂ od 0,3 mMol/l veoma malo inhibiraju razmnožavanje mikroorganizama, dok visoka koncentracija H₂O₂ od 3,0 mMol/l potpuno inhibira rast mikroorganizama prvih časova. U uzorcima mleka u kojima je zapaženo potpuno kočenje rasta mikroorganizama (30 °C za 12 časova) ustanovljeno je prisustvo slobodnog H₂O₂.

Dodavanjem 0,4 mMol/l H₂O₂ mleku inhibiran je rast mikroorganizama, a nije dokazan slobodan H₂O₂ pa je u daljem radu korišćena ta koncentracija H₂O₂ za procenjivanje aktivnosti LPS prema mikroorganizmima. Björck i sar. (1975) su utvrdili da LPS ima bakteriostatsko dejstvo koje može da produži fazu mirovanja mikroorganizama nekoliko časova, što je od značaja za sakupljanje i transport mleka u neadekvatnim uslovima. Dužina bakteriostaze u mleku s LPS zavisi od mnogo faktora, a najznačajniji su temperatura

i nivo kontaminacije mleka mikroorganizmima. Uticaj nivoa kontaminacije mleka mikroorganizmima na antibakterijsku aktivnost LPS u mleku prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Uticaj nivoa kontaminacije mleka mikroorganizmima na dužinu bakteriostaze dejstvom LPS

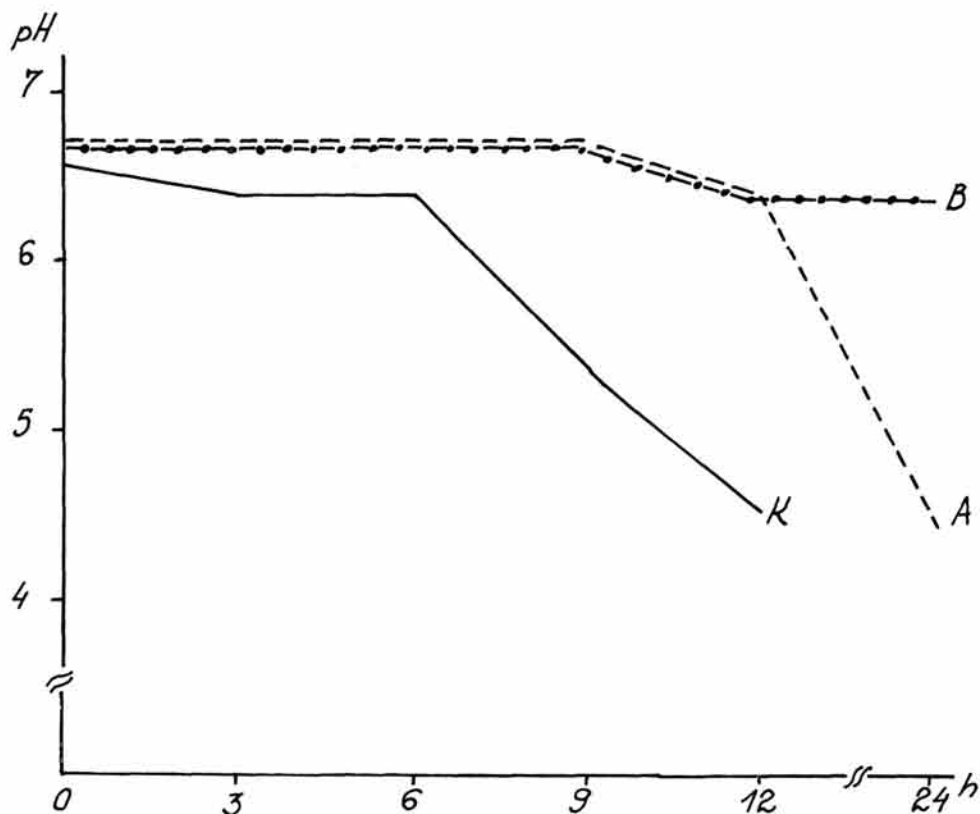
Table 2. Influence of microbial contamination level in milk on duration of bacteriological inactivity caused by LPS

Sati Hours	Nivo kontaminacije Contamination level	
	Kontaminacija Contamination	Aktivnost LPS LPS activity
0	$8,0 \times 10^4$	$6,4 \times 10^4$
	$3,0 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$
	$5,4 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$
3	$4,0 \times 10^5$	$4,9 \times 10^4$
	$1,6 \times 10^6$	$1,3 \times 10^5$
	$3,6 \times 10^6$	$8,5 \times 10^5$
6	$2,7 \times 10^6$	$5,6 \times 10^4$
	$2,5 \times 10^6$	$3,5 \times 10^5$
	$1,2 \times 10^7$	$2,2 \times 10^6$
9	$4,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$
	$1,9 \times 10^7$	$2,8 \times 10^6$
	$2,5 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$
12	$2,8 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$
	$3,4 \times 10^7$	$4,4 \times 10^7$
	$9,4 \times 10^7$	$6,4 \times 10^7$
24	$5,0 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$
	$2,8 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$
	$7,0 \times 10^7$	$2,9 \times 10^8$

Inhibicija rasta ukupne populacije mikroorganizama u mleku zavisi od nivoa početne kontaminacije. U mleku početne kontaminacije 10^4 mikroorganizama/ml period bakteriostaze je 9 časova, dok inhibitorni efekat LPS uz kontaminaciju na nivou 10^5 i 10^6 mikroorganizama/ml iznosi do 6 časova. U kontrolnim uzorcima nivo ukupne populacije je veći i do dve potencije.

Iz rezultata zapaža se da je pH vrednost u uzorcima mleka s aktivnim LPS uvek niža nego u kontrolnim uzorcima (grafikon 1).

Praćenjem pH vrednosti mleka u kontrolnim i uzorcima s LPS zapažamo da se mleko kontrolnih uzoraka zgrušalo posle 12 časova čuvanja (30°C) a u mleku s LPS nije došlo do promena pH mleka prvih 12 časova. Inhibicijom rasta mikroorganizama u mleku očuvane su njegove fizičko hemijske osobine i produžena tehnološka ispravnost.



Grafikon 1. Promena pH u zavisnosti od aktivnosti LPS u mleku

Graph 1. pH variations dependant on the LPS activity in milk

Legenda: A — mleko s aktivnim LPS (0,3 mMol H_2O_2)
 B — mleko s aktivnim LPS (3 mMol H_2O_2)
 K — kontrola

Legend: A. Milk with the activated LPS (0.3 mMol/ H_2O_2)
 B. Milk with the activated LPS (3 mMol/ H_2O_2)
 K. Control

Zaključak

1. Za aktiviranje LPS potrebne su koncentracije H_2O_2 od 0,3—0,4 mMol/l mleka. Koncentracija H_2O_2 0,4 mMol/l ima bolju antibakterijsku aktivnost od koncentracije 0,3 mMol H_2O_2 /l mleka.
2. Na antibakterijsku aktivnost LPS utiče početni nivo mikroorganizama u mleku. Inhibicija razmnožavanja mikroorganizama traje 6—9 časova u zavisnosti od nivoa početne koncentracije.

3. Mleko s aktivnom LPS zbog usporenog razmnožavanja mikroorganizama prije se kvari.

Literatura

- ANDERSON W. A., TRANTALIS, J., KANG Y. H. (1975): **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** 23, 295.
- AUNEI, T., THOMAS, E. L. (1977): **Eur. J. Biochem.** 80, 209—214.
- BJÖRCK, L., CLÉASSON, O., SCHUKTHESS, W. (1979): **Milchwissenschaft** 34 (12) 726—729.
- BJÖRCK, L. (1978a): **J. Dairy Res.** 45, 109—118.
- BJÖRCK, L. (1978b): **J. Dairy Res.** 45, 131—147.
- BJÖRCK, L., CLÉASSON, O. (1980): **J. Dairy Sci.** 63 (6) 919—922.
- BJÖRCK, L. (1982): **Kieler Milchw. Forsch.** 34 (1) 5—11.
- BROWN R. W. i MICKELSON, M. N. (1979): **Am. J. Vet. Res.** 40, 250.
- BONLANGE, M. C. R. (1959): **Soc. Biol.** 153, 2019—2020.
- DESMAZEAUD M. (1983): **La technique Laitière** 976, 11—18.
- KIERMEIER F. C., KAYSER: **Z. Lebensm. Unters. Forsch.** 112, 481—498, 1960.
- KORHONEN H. (1973): **Meljertish. Aikakausk** 32 (3) 1—158.
- LAWRENCE A. J.: XVIII Int. Dairy Congr. Vol. 1 E 99, 1970.
- MICKELSON M. N. (1979): **Applied and Environ. Microbiol.** 38 (5) 821—826.
- MUNYUA, J. K. (1975): **Milchwissenschaft**, 30, 730—734, (12).
- POLIS, B. D., SHMUKLER H. W. (1953): **J. of Biological Chemistry**, 201, 475.