

## Primjena fluorescentne mikroskopije u mljekarskoj znanosti (Application of Fluorescence Microscopy in Dairy Science)

S. H. YIU, Food Research Centre, Research Branch, Agriculture Canada,  
Ottawa, Ontario, Canada K1A 0C6

Revijalni prikaz — Review

Prispjelo: 15. 4. 1987.

Poznavanje kemijskog i strukturnog sastava mliječnih proizvoda veoma je važno jer može pomoći poboljšanju proizvodnih tokova i/ili kakvoće proizvoda. Više je analitičkih metoda koje se koriste za istraživanje kemijskih i strukturnih aspekata mliječnih proizvoda.

Fluorescentna mikroskopija jedna je od rijetkih koja može dati informaciju o oba aspekta istovremeno, i za kratko vrijeme. Sastojci mliječnih proizvoda (proteini, mast, mikroorganizmi itd.) mogu postati vidljivi uzajamnim djelovanjem male količine uzoraka sa specifičnim fluorescentnim bojama ili reagensima. Kod pripreme uzoraka hrane za fluorescentnu mikroskopiju postupci su relativno jednostavni i brzi. Prednost tih tako pripremljenih uzoraka je u tome što se mogu istraživati i uz pomoć drugih metoda optičke mikroskopije, kao što je svjetlosni i polarizacioni mikroskop, pri čemu ne treba mijenjati postupak pripreme.

Fluorescentna mikroskopija koristi se za proučavanje strukturnog odnosa između proteina i masti u siru (King, 1958; Mulder i sur. 1966; Shimmin, 1982). Slične tehnike primijenjene su za otkrivanje strukture razdiobe i ostalih sastojaka kao što su kristali soli, bakterije iz startera i plijesni na površini kod sireva proizvedenih upotrebom različitih postupaka zrenja (Yiu, 1985). Usprkos jednostavnosti, specifičnosti, fleksibilnosti i analitičkom kapacitetu fluorescentne mikroskopije (Yiu, 1985), obavijesti o toj metodi u mljekarskom istraživanju ograničene su i nisu skupljene na jednom mjestu.

Ovaj kratak pregled želi ukazati, predočenjem nekoliko primjera primjene fluorescentne mikroskopije za istraživanja u mljekarstvu, mogućnosti te metode kao uspješne analitičke metode.

### Principi fluorescentne mikroskopije

Mnogi sastojci, koji se zovu »fluorofori«, fluoresciraju tako da apsorbiraju svjetlosnu energiju kratkog vala, a emitiraju energiju, kao svjetlo, duljeg vala. Fluorescencija se može inducirati i kod nekih bioloških tvari, kao što su protein i mast, uz pomoć fluorescentnih tvari i boja koje se zovu »fluorohromi«. Fluorescentna mikroskopija je analitička tehnika koja otkriva razdjeljenje fluorofora i fluorohroma prisutnih u materijalu koji se proučava u mikroskopskom mjerilu.

Pri primjeni fluorescentne mikroskopije važan instrument je standardni mikroskop (svjetlosni), modificiran tako da uzorci budu pobuđeni svjetlom podesne valne dužine, pa se promatra fluorescentno emitiranje uzoraka. Svi izvori svjetlosti emitiraju širok raspon valnih dužina uključujući kratke UV i plavo zračenje, koja su važna za fluorescentnu mikroskopiju.

Samo je nekoliko izvora svjetlosti prikladnih za fluorescentnu iluminaciju.

Najjednostavniji izvor je visokotlačna lampa sa živinom parom, kao što je Osram HBO 100 ili HBO 200. Filter za svjetlo (filter za pobuđivanje) upotrebljava se za izdvajanje svih valova svjetla osim specifičnih valova za pobuđivanje. Smješten je između izvora svjetlosti i uzorka. Drugi filter upotrebljava se samo za prijenos svjetlosnih valova koje emitiraju fluorescentni sastojci. Taj filter je smješten između uzorka i okulara mikroskopa. Izvor svjetla može biti postavljen tako da osvjetljava uzorak ili preko propuštenog svjetla ili preko običnog svjetla (epi-iluminacija). Taj drugi sistem, koji koristi dihroitično zrcalo za prijenos svjetla, proizvodi bolji intenzitet fluorescencije od prvog sistema i ne ovisi o debljini uzoraka.

Uz to, posebni fluorescentni objektivni, kao planahromatski i drugi tipovi objektivna s velikim brojem otvora, upotrebljavaju se kao dodaci za poboljšanje osjetljivosti kod mikroskpiranja.

### Priprema uzoraka

Za fluorescentnu mikroskopiju koriste se razmjerno jednostavni i brzi postupci pripreme uzoraka. Kako je već navedeno, na isti način pripremljeni uzorci mogu se testirati i primjenom drugih optičkih mikroskopskih metoda, kao što su svjetlosni i polarizacioni mikroskop.

Metode za pripremu mlijeka i mlijeka u prahu fluorescentnu mikroskopiju prvi puta je opisao King (1955). Najjednostavniji postupak pripreme sastoji se od ručnog postavljanja mliječnog proizvoda koji se istražuje na stakalce za brzo istraživanje. Za detaljnije istraživanje i postizanje bolje razdvojne moći uzorci se urone u glikol-metakrilat smolu (Yiu, 1985). U nekim slučajevima, kao kod istraživanja distribucije masnih globula u siru, vrlo je korisno smrznuti uzorke. Postupak smržavanja uzoraka traje vrlo kratko vrijeme, tek nekoliko minuta (Muller i sur. 1966; de Jong, 1978; Yiu, 1985). Prethodno oblikovana debljina uzoraka može se smrznuti uz pomoć krio-mikrotoma pri temperaturi od  $-20^{\circ}\text{C}$  do  $-30^{\circ}\text{C}$ . Prije mikroskopskog pregleda uzorci se otope.

Uzorci namijenjeni da se urone u glikol-metaklorat smolu moraju se fiksirati da se izbjegnju strukturne promjene u toku postupka pripreme. Uzorci koji se istražuju na stakalcu ili kao smrznuti ne moraju se fiksirati.

Za fiksiranje uzoraka najčešće se upotrebljavaju aldehidi, kao npr. formaldehid i glutaraldehid, i to u obliku razrijeđene vodene otopine. Fiksacija može trajati nekoliko minuta, ali i nekoliko sati, što ovisi o prirodi uzoraka. Kompaktni uzorci, kao što su npr. zreli sirevi, zahtijevaju više vremena za fiksaciju, nego uzorak kao što je npr. jogurt.

Poznato je da glutaraldehid inducira nespecifičnu fluorescenciju u nekim tvarima, kao npr. u proteinu. Ovaj podatak treba uzeti u obzir kada se istražuju uzorci koji sadrže takve tvari, a fiksirani su glutaraldehidom i istraženi fluorescentnom mikroskopijom.

### Bojenje

Samo neki sastojci mliječnih proizvoda su fluorofori i oni prirodno fluoresciraju (autofluorescencija). Mliječni sastojci najčešće reagiraju sa specifičnim bojama, koje se obično upotrebljavaju u obliku vodenih otopina.

Većina metoda za bojenje uzoraka jednostavna je i može se provesti u razmjerno kratkom vremenu. Osnovno je da se pripremljeni dio uzoraka postavi na stakalce i prekrije otopinom reagensa odabrane boje, te ostavi stajati 1—2 minute pri sobnoj temperaturi. Uzorak se potom ispere vodom i suši na zraku. Na obojeni uzorak često se stavlja nefluorescentna uljna imerzija ili se voda prekrije pokrovnim stakalcem. Tako se eliminira nespecifična fluorescencija.

Izbor reagensa za bojenje (boje) za fluorescentnu mikroskopiju ovisi o kemijskoj preradi sastojaka koji se istražuje. Na primjer, Acridine Orange (0,01% do 0,1%-tna otopina) upotrebljava se za studiranje proteinskih matrica u različitim mliječnim proizvodima (Mulder i sur. 1966; de Jong, 1978; Shimmin, 1982). To je kationska boja koja ima metahromatsko svojstvo, što znači da fluorescira u različitim bojama od zelene do crvene, a što ovisi o stupnju vezanja između boje i proteinske strukture. Yiu (1985) je koristila Acridine Orange kao boju za otkrivanje strukturnih i kemijskih promjena u proteinskoj matrici u toku površinskog zrenja sira camemberta.

Phosphine (0,1%) je podesan za istraživanje masnih globula u mlijeku i mlijeku u prahu (King, 1955), u mliječnom koagulumu (King, 1958) i siru (Shimmin, 1982). Druga boja podesna za istraživanje masti je Nile Blue (0,1%). To je kationska (bazna) plava boja koja u vodenoj otopini spontano oksidira i stvara oksido-sastojke (poznate i kao Nile Red). Nile Red je crvena boja, a daje žutu fluorescenciju s maksimum apsorpcije pri oko 500 nm. Ima specifičan afinitet za neutralne lipide (Fowler i Greenspan, 1985), a upotrebljava se za izračunavanje razlika u distribuciji masnih globula u sirevima s različitim zrenjem (Yiu, 1985).

Ostale boje, kao što je Acriflavine HCl i Calcofluor White, također se upotrebljavaju za fluorescentnu mikroskopiju pri studiranju mliječnih proizvoda (Yiu, 1985). Međutim, prethodno navedene tri boje, posebno Acridine Orange, su boje koje su najprikladnije za ta istraživanja.

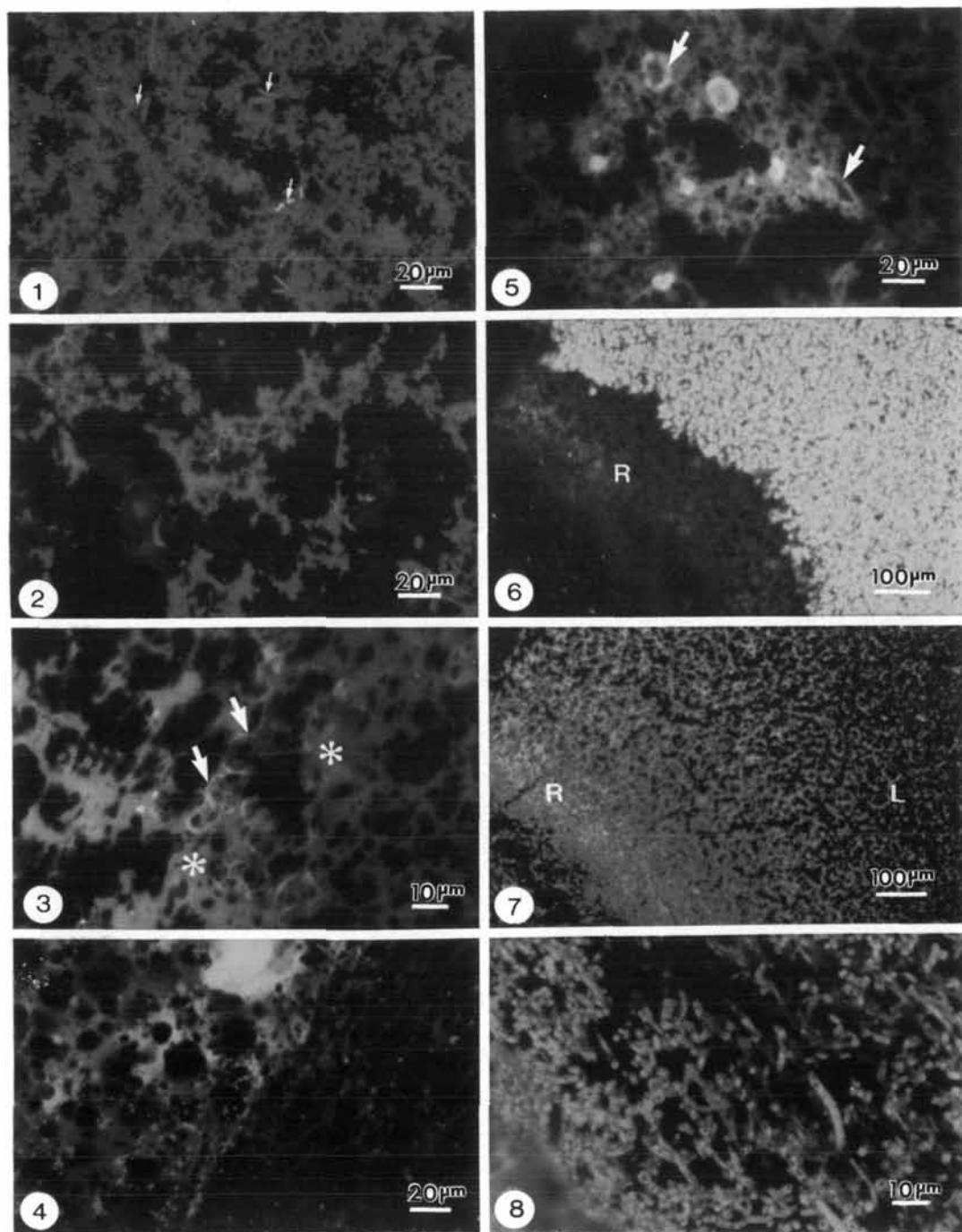
### **Primjeri za primjenu fluorescentne mikroskopije u istraživanjima mlijeka i mliječnih proizvoda**

Fluorescentna mikroskopija upotrebljava se za istraživanje prisutnosti i distribucije prirodnih sastojaka mlijeka i mliječnih proizvoda kao što su masne globule (King, 1955), kristali soli (Yiu, 1985), različiti mikroorganizmi (Yiu, 1985, Kalab i Palo, 1987) i različiti dodaci kao što su škrob, emulgirajuće tvari itd. Može se upotrijebiti i za aktiviranje različitih kemijskih i fizikalnih promjena kao što su emulgiranje masti, otapanje soli za topljenje i oblikovanje kristala u topljenom siru, ili za rast plijesni na površini mekih sireva s plijesnima te za penetraciju fungalnih hifa u gruše.

U nastavku rada dato je nekoliko primjera fluorescentne mikroskopije u istraživanjima u mljekarskoj preradi.

#### **1. Analize teksture jogurta i sira**

Jogurt je proizvod koji se dobiva koagulacijom kazeinskih micela djelomično evaporiranog mlijeka. Koagulaciju uzrokuju bakterije mliječno-kiselog vrsta *Lactobacillus bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* koji se u mlijeku razvijaju u simbiotskim odnosima.



## LEGENDA SLIKA — LEGENDS TO FIGURES

Slika 1: Prirodni jogurt. Dio u glycol-methacrylate obojen Acridine Orange bojom prikazuje prisutnost bakterija (strelice) u proteinskom matriksu.

Fig. 1: Natural yoghurt. A section in glycol-methacrylate stained with Acridine Orange demonstrates the presence of bacteria (arrows) in the protein matrix.

Slika 2: Jogurt s 2% škroba koji služi kao vezivna tvar. Škrob pokazuje zelenu fluorescenciju u proteinskom matriksu koji fluorescira oranž bojom.

Fig. 2: Yoghurt with 2% starch used as a thickening agent. Starch shows green fluorescence in the protein matrix fluorescing in orange colour.

Slika 3: Prirodni sir (Mozzarella) obojen Acridine Orange bojom, prikazuje prisutnost kristala (kalcijum fosfata, strelice) blizu veza granula gruša.

Fig. 3: Natural (Mozzarella) cheese, stained with Acridine Orange demonstrates the presence of crystalline inclusions (calcium phosphate, arrows) near curd granule junctions (\*).

Slika 4: Dio sirne smjese s 20% pretopljenog sira na početku procesa nakon zagrijavanja do 71 °C. Bojenje Acridine Orange bojom otkriva razliku između svježe topljenog sira (tamno zelena boja) i pretopljenog sira (svijetlo zeleno područje). Crna područja su mast, a narančasti dijelovi su bakterije mliječno-kiselog vrenja.

Fig. 4: A section of a cheese blend containing 20% rework at the beginning of processing after heating to 71 °C. Staining with Acridine Orange reveals the difference between freshly processed cheese (dark green area) and rework (light green area). Black areas are fat and orange spots are lactic acid bacteria.

Slika 5: Topljeni Gruyere obojen Acridine Orange bojom; otkriva se prisutnost kristala soli za topljenje (strelice).

Fig. 5: Processed Gruyere cheese stained with Acridine Orange reveals the presence of crystalline melting salts (arrows).

Slika 6: Razdioba masti u siru Camembert blizu površine sira vidi se bojenjem Nile Blue A bojom. Masne globule pokazuju žutu fluorescenciju, tamniju dublje ispod površine sira. Nema masti u zreloj zoni (R), blizu površine sira.

Fig. 6: Fat distribution in Camembert cheese near its surface is demonstrated by staining with Nile Blue A. Fat globules exhibit yellow fluorescence deeper below the cheese surface. No fat is present in the ripe zone (R) near the surface.

Slika 7: Razlike između zrelih (R) i manje zrelih (L) zona sira Camembert vide se bojenjem Acridine Orange bojom.

Fig. 7: Differences between the ripened (R) and less-ripened (L) zones in Camembert cheese are revealed in sections stained for protein with Acridine Orange.

Slika 8: Površinska plijesan *Penicillium camemberti* na Camembert siru pokazuje oranž-fluorescentna obojenost kad se oboji Acridine Orange bojom.

Fig. 8: Surface mould of *Penicillium camemberti* on Camembert cheese exhibits orange fluorescence when stained with Acridine Orange.

Poroznost proteinskog matriksa kazeina ovisi o koncentraciji proteina i može se promatrati fluorescentnom mikroskopijom. Za proizvodnju jogurta, za poboljšanje teksture, često se upotrebljavaju različita sredstva za vezivanje kao što se karagenan, različite gume ili škrob. Formacija proteinskog matriksa i njegova gustoca u prirodnom jogurtu vide se na slici 1. Za bojenje uzoraka uzeta je 0,1% -tna otopina boje Acridine Orange. Mikroskopska snimka jogurta proizvedenog uz dodatak škroba kao sredstva za vezivanje prikazana je na slici 2.

U siru je (slika 3) proteinski matriks znatno gušći nego u jogurtu. U matriksu je mast raspršena u obliku pojedinačnih globula ili njihovih agregata različitih veličina. Granule grušta međusobno su vezane u područjima gdje se međusobno fuzioniraju. Svojevremeno je za ta područja da imaju nižu koncentraciju masti od unutrašnjeg dijela granule (K a l a b, 1986).

Međutim, postojanje (pojavljivanje) bakterija mliječno-kiselog vrenja češće je na vezama između granula nego na drugim mjestima u siru (R a m m e l, 1960).

Topljeni sir proizvodi se topljenjem jednog ili više različitih sireva uz dodatak soli za topljenje i ostalih dodataka (C a r i ć i sur, 1985). Tekstura konačnog proizvoda ovisi o sastavu smjese odabranih sireva, o soli za emulgiranje i o temperaturi zagrijavanja, te o vremenu zagrijavanja. Pretjerano visoko i produženo zagrijavanje utječe na konačni proizvod, pa se dobije tvrdi sir, što zahtijeva ponovno pretapanje. U nekim slučajevima ponovno pretopljeni sir zadovoljavajuće utječe na svojstva topljenog sira za čiju se proizvodnju može koristiti (K a l a b i sur, 1987). Jednostavnom metodom fluorescentne mikroskopije, koristeći Acidrine Orange kao boju, otkrivaju se kemijske i strukturne razlike između pretopljenog i izvornog sastava sira (slika 4). Može se uočiti i da se pretopljeni sir brzo raspoređuje u svježem siru smjesu u toku početne faze topljenja. Razvoj osmiofilnih područja, kao dijela kemijskih promjena u visoko zagrijanom siru, uočene su elektronskim mikroskopom (K a l a b i sur, 1987).

## 2. Oblikovanje i raspodjela kristala soli u tvrdom i topljenom siru

Netopivi kristali soli, kao što je kalcijum fosfat, oblikuju se kao rezultat zrenja kod nekih sireva (B r o o k e r i sur, 1975; B r o o k e r, 1987), a i kod proizvodnje topljenog sira (C a r i ć i sur, 1985).

Međutim, tipovi kristala soli, kao što su citrati i fosfati upotrebljavaju se kao emulgirajuće tvari u proizvodnji topljenog sira. Obje vrste soli mogu se lako vidjeti uz pomoć svjetlosti i fluorescentne mikroskopije. Okrugle ili izdužene strukture koje se pojavljuju u polariziranom svjetlu, i tako pokazuju kristaliziranje, obojeni su crno uz pomoć Van Kossa metode ili crveno, Alizarin Red metodom (Y i u, 1985) i ukazuju na prisutnost soli kalcija i fosfata. Te strukture otkrivene su (slika 3) bojenjem dijelova Mozzarella sira Acridine Orange bojom. Većina kristala nalazi se blizu vezova između granula. Za uspo-

redbu, soli za topljenje koje se upotrebljavaju kao emulgirajuće tvari u procesu proizvodnje topljenog sira, topive su i ne sadrže kalcij. Slika 5 prikazuje komercijalni topljeni Gruyere koji sadrži visoku koncentraciju kristala soli za topljenje, a proizvođač ih deklarira kao natrijev citrat. Neotopljene soli za topljenje ne sudjeluju u popravljaju emulgirajućih svojstava proteina sira i povećana koncentracija takvih kristala u siru nije poželjna.

Fluorescentna mikroskopija može se koristiti za brzo istraživanje proizvoda u toku procesa proizvodnje i tako može pomoći u kontroli kakvoće proizvoda.

### 3. Strukturne i kemijske promjene u Camembert siru u toku zrenja

Camembert je meki sir s površinskim zrenjem. Bijela plijesan, *Penicillium camemberti*, gusto se razvija na površini sira, tako da njene hife prodiru u unutrašnjost gruš i djeluju na sir uzrokujući proteolizu i lipolizu.

Istraživanja uzoraka uz pomoć fluorescentne mikroskopije s površine sira i neposredno ispod površine sira Camemberta, pripremljenih u obliku smrznutih sekcija ukazala su na kemijske i strukturne razlike nastale djelovanjem plijesni na sir. Dijelovi sira obojeni su Nile Blue A bojom (slika 6) i Acridine Orange bojom (slika 7 i 8).

Vidljivo je da je dio sira neposredno ispod površine sasvim zreo. Taj je dio bez ikakvih prepoznatljivih struktura masnih globula, dok dio sira koji je zreo u manjem stupnju, a nalazi se dalje od površine sira sadrži uklopljene globule masti (slika 6). Isti dijelovi sira, obojeni Acridine Orange bojom, pokazuju da je zreli dio sira sastavljen od vrlo gustog proteinskog matriksa koji pokazuje oranž-fluorescenciju. Proteinski matriks u manje zreloj dijelu sira, međutim, pokazuje zelenu fluorescenciju (slika 7). Te razlike u fluorescenciji ukazuju na razlike u sposobnosti proteina da vežu boje, a to pokazuje da su nastale kemijske i strukturne promjene kao rezultat zrenja. Te promjene mogu biti indikator stupnja zrenja za sireve s plijesnima kap što je Camembert. Obilan razvoj hifa *P. camemberti* na površini sira i prodiranje hifa unutar gornjeg dijela proteinskog matriksa prikazani su na slici 8.

### Zaključak

Kemijske i strukturne analize sastava mliječnih proizvoda mogu se istovremeno obaviti primjenom fluorescentne mikroskopije. Ta je tehnika razmjerno jednostavna i brza, a postupak nije skup. Skupa je samo oprema koja se koristi: fluorescentni mikroskop i kriomikrotom (za pripremu smrznutih dijelova), koji i nije neophodan. Na analitičke mogućnosti fluorescentne mikroskopije utječu i mogućnost i specifičnost nekih boja koje se preporučuju. Ta se tehnika pokazala vrlo korisnom za mljekarska znanstvena istraživanja. Ona može pomoći poboljšanju kakvoće proizvoda i efikasnosti proizvodnje.

Autor zahvaljuje dr. Miloslavu Kalabu na korisnim sugestijama. Prikaz 747 Food Research Centre.

**Literatura**

- BROOKER, B. E., HOBBS, D. G., TURVEY, A. (1975): Observations on the microscopic crystalline inclusions in Cheddar cheese. **J. Dairy Res.** **42**, 341—348.
- BROOKER, B. E. (1987): The crystallization of calcium phosphate at the surface of mould-ripened cheeses. **Food Microstruc.** **6** (1), 25—33.
- CARIĆ, D., GANTAR, M., KALÁB, M. (1985): Effects of emulsifying agents on the microstructure and other characteristics of process cheese — a review. **Food Microstruc.** **4**, 297—312.
- DE JONG, L. (1978): Protein breakdown in soft cheese and its relation to consistency. 3. The micellar structure of Meshanger cheese. **Neth. Milk Dairy J.** **32**, 15—25.
- KALÁB, M. (1986): Mikrostruktura mlečnih proizvoda — Pregled. **Mljekarstvo** **36** (12), 355—370.
- KALÁB, M., PALO, V. (1987): Development of microstruktura in Olomouc cheese cakes: Electron microscopic study. **Milchwissenschaft** **42** (4), 207—211.
- KALÁB, M., EMMONS, D. B., SARGANT, A. G. (1976): Milk gel structure. V. Microstructure of yoghurt as related to the heating of milk. **Milchwissenschaft** **31** (7), 402—408.
- KALÁB, M., YUN, J., YIU, S. H. (1987): Textural properties and microstructure of process cheese food rework. **Food Microstruc.** **6** (2), in press.
- KING, N. (1955): Fluorescence microscopy of fat in milk and milk powder. **J. Dairy Res.** **22**, 205—210.
- KING, N. (1958): Observations by fluorescence microscopy of casein in milk, curd and cheese. **J. Dairy Res.** **25**, 312—319.
- MULDER, H., DE GRAAF, J. J., WALSTRA, P. (1966): Microscopical observations on the structure of curd and cheese. **Proc. 17th Int. Dairy Congress, Section D**, 413—420.
- RAMMEL, C. G. (1960): The distribution of bacteria in New Zealand Cheddar cheese. **J. Dairy Res.** **27**, 341—351.
- SHIMMIN, P. D. (1982): Observations of fat distribution in cheese by incident light fluorescence microscopy. **Austral. J. Dairy Technol.** **37**, 33—34.
- YIU, S. H. (1985): A fluorescence microscopic study of cheese. **Food Microstruc.** **4**, 99—106.
- YIU, S. H. (1987): Fluorescence microscopy in food technology. **Zeiss Focus** **4**, 6—7.