

## ZNAČAJ FOSFATAZNE PROBE ZA KONTROLU EFIKASNOSTI PASTERIZACIJE MLEKA

Kontrola efikasnosti pasterizacije mleka jeste jedno od glavnih funkcija laboratorije mlekare. Pod efikasnom pasterizacijom se podrazumeva zagrevanje mleka na određenu temperaturu i za određeno vreme predviđenih standardom ( $72^{\circ}\text{C}$  za 16 sekunda ili  $62\text{--}65^{\circ}\text{C}$  za 30 minuta), isključujući mogućnost naknadnog mešanja i sa najmanjim količinama svežeg mleka. Niža temperatura zagrevanja mleka od propisane ili kraće vreme držanja mleka na toj temperaturi označava nepropisnu pasterizaciju. Takvo mleko može biti opasno za direktnu potrošnju zbog prisustva preživelih patogenih bakterija. Isto to važi i kada je mleko propisno pasterizovano, ali u njega naknadno dospelo sirovo mleko nepravilnim rukovanjem ili nekom greškom.

Zbog ovoga i kontrola efikasnosti pasterizacije dobija poseban značaj u opštoj kontroli pasterizacije mleka.

Danas se ona vrši pomoću fosfatazne probe, ili bliže rečeno probe na dokazivanje prisustva fermenta fosfataze. Ovaj se ferment redovno nalazi u mleku, odakle dolazi iz vimena. Fosfataza se zagrevanjem mleka inaktivira na nešto višoj temperaturi od one, koja je potrebna za uništenje patogenih bakterija. Standardi pasterizacije (temperatura + vreme) obezbeđuju uništenje fosfataze u mleku. Odavde proizlazi da uništenje fermenta fosfataze predstavlja indirektni dokaz uništenja patogenih bakterija, uključujući tu i *B. tuberkuloze*, u mleku. Otuda dalje proizlazi i sanitarni značaj ove metode.

Činjenica da je fosfataza u stanju da razlaže fosfatna jedinjenja, iskorišćena je za uvođenje metode dokazivanja ovoga fermenta u mleku. Zasluga za ovo pripada Kayu i Grahamu, koji su prvi uveli fosfataznu probu kao metod kontrole efikasnosti pasterizacije mleka. Fosfatazna proba po Kayu i Grahamu sastoji se u tome što se određena količina mleka doda u puferni supstrat koji sadrži fosfatno jedinjenje dinatrijum fenilfosfat i to inkubira 24 časa na  $37\text{--}38^{\circ}\text{C}$ . U slučaju nepropisne pasterizacije, zaostala fosfataza oslobađa fenol, koji se onda meri pomoću specijalnog diska i to izražava broječno.

I neznatne greške u pasterizaciji mleka ili pak dodatak svežeg mleka u količini od 0,2% mogu se otkriti ovom metodom.

Kasnije je na bazi modifikacije ove fosfatazne probe uvedeno više novih metoda od kojih su najpoznatije proba po Aschaffenburgu i Mullenu, proba po Sandersu i Sageru, po Schareru, Stivenu i dr.

Fosfatazna proba po Aschaffenburgu i Mullenu je zbog svoje jednostavnosti, praktičnosti i efikasnosti metoda, koja se može preporučiti i našim mlekarama.

A) za izvođenje ove metode potrebne su sledeće hemikalije: 1) Puferni rastvor (3,5 gr. bezvodnog  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 1,5 gr.  $\text{NaHCO}_3$  na 1l), 2) Supstrat: dinatrijum p-nitrofenilfosfat, 3) Puferni supstrat: preneti 150 mg. sup-

straća u graduisanu bocu od 100 ml. i dopuniti do marke pufernim rastvorom. Ovaj je rastvor bezbojan a može se čuvati najviše sedam dana u frižideru.

B) **Tehnika izvođenja analize.** Staviti 5 ml. pufernog supstrata u epruvete i to zagrejati u vodenom kupatilu na 37—38° C. Zatim dodati 1 ml. mleka koje se ispituje, zatvoriti gumenim zapašaćem i invertirati radi mešanja. Na isti način se priprema i kontrola, samo se ovde doda 1 ml. prokuvanog mleka koje se ispituje. Inkubirati epruvete na 37—38° C i posle 30 min. pročitati rezultat na Lovibond komparatoru snabdevenog specijalnim diskom za ovu metodu. Kontrola se stavi na levu stranu a uzorak na desnu stranu. Pošto se pročita rezultat epruvete se ponovo stave u vodeno kupatilo i inkubiraju još 1½ čas odn. od početka analize 2 časa. Tada se izvrši još jedno čitanje i zabeleži rezultat.

### C) Tumačenje rezultata

| Čitanje diska posle 30 min. inkubacije | Tumačenje                     |
|--|-------------------------------|
| 0 ili trag                             | propisna pasterizacija        |
| 6                                      | sumnjiva                      |
| 10 ili preko                           | nepropisna pasterizacija      |
| Čitanje diska posle 2 časa inkubacije  | Tumačenje                     |
| 0 do 10                                | propisna pasterizacija        |
| preko 10 do 18                         | neznatno nepropisna pasteriz. |
| preko 18 do 42                         | nepropisna pasterizacija      |
| preko 42                               | jako nepropisna pasterizacija |

Kako se vidi, rezultat čitanja posle 30 min. inkubacije otkriva eventualne grube greške u izvođenju pasterizacije mleka, dok posle 2 časa mogu se otkriti i mnogo manje greške. Zbog ovoga je neophodno izvesti analizu uvek do kraja tj. inkubirati uzorke ukupno 2 časa.

Princip ove metode se zasniva na tome da u slučaju nepotpune inaktivacije fosfataze, a što se može desiti kod nepropisne pasterizacije ili dodatka svežeg mleka, izdvaja se iz pufernog supstrata slobodni p-nitrophenol, koji dobija žutu boju u alkalnom rastvoru. Prema intenzitetu ove boje može se proceniti stepen greške u izvođenju pasterizacije mleka. To se tačno određuje čitanjem na specijalnom disku i to brojčano izražava. Za razliku od prvobitne fosfatazne probe po Kayu i Grahamu, ova proba umesto 24 časa traje samo 2 časa. Drugo, uvođenjem p-nitrophenilphosphata umesto dinatrijumfenilphosphata izbegnuta je mogućnost uticanja na rezultat analize eventualnog prisustva tragova phenola u priboru za rad, filter papiru i sl. za vreme izvođenja analize.

Fosfatazna proba se izvodi za vreme pasterizacije mleka. Tom prilikom se u određenim vremenskim intervalima uzima pasterizovano mleko iz boca i posi u laboratoriju na ispitivanje. Potrebno je bar tri puta uzeti uzorke i to na početku, u sredini i na kraju pasterizacije mleka.

Uvođenje ove metode u mlekarsku praksu dalo je veoma korisne rezultate. Laboratorija mlekare je u stanju da već u toku izvođenja pa-

sterizacije mleka otkrije fosfataznom probom greške u radu pasterizacionog uređaja ili rukovanja mlekom i na taj način da spreči izlaz takvog mleka iz mlekare. Takođe se i uređaj za pasterizaciju može podvrgnuti kontroli ispravnog rada pomoću ove probe i ispraviti eventualne konstrukcione greške.

Razume se da i ova metoda, kao i svaka druga ima svoja ograničenja, koja se moraju znati prilikom njene upotrebe.

1) Potreban je pažljivi rad i dobra uvežbanost, ako se žele dobiti pouzdani rezultati.

2) Zabeleženi su slučajevi reaktivacije fosfataze u pasterizovanom mleku, ako je temperatura zagrevanja prelazila 82° C i to mleko kasnije držano na temperaturi preko 15° C. Prema tome pridržavanje utvrđenih standarda potrebno je i sa gledišta pouzdanosti rezultata fosfatazne probe.

3) Postoje bakterije kao što su *Bacillus cereus*, *Bacillus mesentericus*, neke vrste iz rođa *Pseudomonas*, *Aerobacter*, *Escherichia*, *Micrococcus* i dr., koje stvaraju ferment fosfatazu u mleku i time prouzrokuju lažnu pozitivnu reakciju. Zbog toga je važno primeniti fosfataznu probu na sveže pasterizovanom mleku, najbolje dok je još u pogonu, ili ga konzervirati nekim sredstvom, koje ne deluje štetno na fosfatazu. U protivnom slučaju može se dogoditi da mleko inače propisno pasterizovano, a koje je držano u hladnjači ili frižideru daje pozitivnu reakciju na fosfataznu probu.

Fosfataznu probu ne treba mešati sa određivanjem Koli-titra ili procenom ukupnog broja bakterija. Ona nam daje samo odgovor na pitanje da li je pasterizacija mleka izvedena propisno i bez dodatka svežeg mleka ili ne, prema tome da li je to mleko na izlasku iz pasterizacionog uređaja pogodno za direktnu potrošnju ili ne. Očevidno da je sanitarni značaj ove metode van svake sumnje. Ostale metode, koje se najčešće koriste u kontroli pasterizovanog mleka, kao Koli-titar i ukupni broj bakterija, govore nam samo o tome da li postoji i kolika je reinfekcija mleka posle pasterizacije odn. da li je čišćenje i »sterilizacija« uređaja i ostalog pribora izvedena propisno ili ne, te prema tome da li takvo mleko odgovara sanitarnim propisima u bakteriološkom pogledu. Znači ove metode ne mogu zamenjivati jedna drugu, već sve zajedno, naročito fosfatazna proba i koli-titar, čine nerazdvojnu celinu u kontroli pasterizacije mleka.

Velika je šteta da je fosfatazna proba zapostavljena po našim mlekarama, iako ona daje jasan odgovor po pitanju efikasnosti pasterizacije mleka.

Danas se primenjuju i odgovarajuće fosfatazne probe (modificirane probe) u maslarstvu i sirarstvu za procenu efikasnosti pasterizacije pavlake odn. mleka koje ide za izradu tih proizvoda. Važno je naglasiti i ovde da se može samo na svežem maslacu vršiti fosfatazna proba, ako se žele dobiti pouzdani rezultati.

Ako se procena efikasnosti pasterizacije fosfataznom probom shvati kao sastavni deo kontrole pasterizacije mleka, onda će i primena ove metode ubrzo naći svoje mesto u laboratoriji mlekare.