

Bioluminiscenčná kontrola sanitácie a trvanlivosti UHT mlieka

LUBOMÍR VALÍK - FRIDRICH GÖRNER
- BEÁTA NERÁDOVÁ - ZUZANA SIROTNÁ

SÚHRN. V práci sa experimentálne skúmalo využitie bioluminiscenčnej metódy pri kontrole účinnosti sanitácie modelových nerezových plôch kontaminovaných suspenziou baktérií izolovaných zo surového mlieka. Bioluminiscenčná metóda sa použila aj na detekciu zámerne kontaminovaných vzoriek trvanlivého mlieka. Z porovnania detekcie mikroorganizmov na modelových plochách po ich sanitácii klasickou sterovou kultivačnou a bioluminiscenčnou metódou vyplynulo, že na praktické účely je vhodnejšia bioluminiscenčná metóda. Bioluminiscenčne sa na sanitovaných plochách deteguje aj nemikrobiálny ATP reprezentujúci organické nečistoty, ktoré sa neskôr po sanitácii stávajú zdrojom živín pre mikroorganizmy. Pri kontrole rekontaminácie vzoriek trvanlivého mlieka baktériami izolovanými zo surového mlieka sa v modelových pokusoch ukázalo, že luminometrická odozva sa môže merať už po 1 až 2 dňoch od kontaminácie trvanlivého mlieka, čo v praxi znamená do 2 dní po jeho výrobe. V tomto čase bola luminometrická odozva na rast kontaminantov v mlieku najvyššia, neskôr dochádzalo k jej poklesu. Pri takomto postupe sledovania nesterility trvanlivého mlieka je v praxi možné skrátiť doteraz zaužívanú 5 až 7-dňovú karanténnu dobu vyrobeného trvanlivého mlieka.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: bioluminiscenčná metóda; účinnosť sanitácie; trvanlivé mlieko

Zásadnou požiadavkou exportnej schopnosti produktov mliekarenských závodov je aplikácia systémového prístupu na dosiahnutie ich požadovanej akosti a trvanlivosti. V súčasnosti sa v potravinárstve široko používa postup symbolizovaný medzinárodnou skratkou HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point, v slovenskom preklade „Analýza nebezpečenstva a kritické ovládacie body“) [1].

Doc. Ing. Lubomír VALÍK, PhD., Prof. Ing. Dr. Fridrich GÖRNER, DrSc., Ing. Beáta NERÁDOVÁ, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Ing. Zuzana SIROTNÁ, Štátny fakultný zdravotný ústav SR Bratislava, Trnavská 52, 826 45 Bratislava.

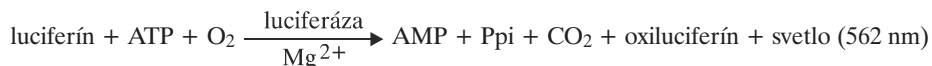
Korešpondujúci autor: Doc. Ing. Lubomír VALÍK, PhD., email: lubomir.valik@stuba.sk

Jednou zo zásadných požiadaviek tohoto systémového prístupu zabezpečenia požadovaných akostných a hygienických znakov vyrábaných požívatín je možnosť kontroly a ovládanie jednotlivých technologických operácií a procesov v reálnom čase. To znamená, že po zistení prípadného nedodržania príslušného parametra technologického procesu, musí byť daná možnosť ihneď postupovať podľa príslušných nápravných opatrení. Preto sa musí kontrola uskutočňovať metódami, ktoré operátora informujú o vzniknutej chybe v čo možno najkratšom čase.

V tejto snahe bol použitý princíp stanovenia adenosín-5'-trifosfátu (ATP) v biologickom materiáli, ktorý vyvinul McELROY [2] a pre prax aplikovali autori DeLUCA A McELROY [3]. Metóda sa v analytickej praxi obvyčajne nazýva „bioluminiscenčná“ alebo „luminometrická“.

Postup je založený na skutočnosti, že mikrobiálne bunky (živé, či mŕtve, ale nerozložené), ako aj bioluminiscenčne aktívna organická hmota obsahujú ATP. Táto látka sa nachádza ako jeden z donorov energie v živých organizmoch a tiež aj v somatických bunkách a micelách kazeínu. Pomocou stanovenia ATP sa preto môže zistiť počet mikroorganizmov a ostatnej bioluminiscenčne aktívnej organickej hmoty na predmetoch a plochách prichádzajúcich do styku s potravinami, ako aj rekontaminácia trvanlivého mlieka (ultrapasterizovaného mlieka - UHT).

Stanovenie ATP v biologickom materiáli je založené na zviditeľnení chemickej energie vo forme svetla, ktoré vznikne reakciou chemickej látky luciferín s hlavným donorom voľnej energie biologických systémov obsahujúcich ATP, za účasti enzýmu luciferáza, iónov Mg^{2+} a vzdušného kyslíka. Pri optimálnych reakčných podmienkach je intenzita vzniknutého svetla priamo úmerná množstvu ATP v skúmanej vzorke [4]. Táto reakcia prebieha podľa nasledovného vzťahu:



Merateľné svetlo má vlnovú dĺžku $\lambda = 562 \text{ nm}$ a je spôsobené uvoľnenou energiou $63 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ vzniknutou premenou ATP na AMP (Ppi označuje dva zvyšky kyseliny pyrofosforečnej, APM - adenosín-5'-monofosfát).

GRIFFITH a kol. [5] upozornili, že hygienické skúmanie predmetov a plôch stykajúcich sa s potravinami sa má zameriavať popri nežiaducich mikroorganizmoch aj na skúmanie prítomnosti celkovej organickej hmoty na nich. Sanitačnými krokmi sa devitalizujú živé mikroorganizmy, ale ošetrované predmety a plochy nemusia byť nimi vždy zbavené aj neživej organickej hmoty.

Trvanlivé mlieko je technologickou operáciou ultrapasterizácie (UHT) zbavené živých mikroorganizmov, ktoré by sa mohli množiť počas jeho oficiálnej trvanlivosti pri teplotách 6 °C až 24 °C [6]. Nie je preto sterilné v pravom slova zmysle. V mimoriadnych situáciách sa môže stať, že trvanlivé mlieko takéto mikroorganizmy obsahuje, alebo môže byť rekontaminované počas plnenia do obalov a pod. Preto sa od výrobcu požaduje jeho 5-dňové karanténne uchovávanie v závode pred expedíciou do obchodnej siete. Táto požiadavka je pre závody hospodársky značne náročná. Z tohto dôvodu je snaha prípadne prítomné nežiaduce mikroorganizmy v trvanlivom mlieku identifikovať už za kratší čas. Skúsenosti závodov vyrábajúcich trvanlivé mlieko ukazujú, že množenie sa nežiaducich mikroorganizmov v ňom sa môže prostredníctvom zvýšenia obsahu ATP dokázať už po dvojdnovom karanténnom uchovávaní v závode.

V práci sa experimentálne skúmalo využitie bioluminiscenčnej metódy na kontrolu čistoty plôch stýkajúcich sa s potravinami v porovnaní s klasickou kultivačnou mikrobiologickou metódou, ako aj posúdenie obsahu nežiaducich mikroorganizmov v trvanlivom (UHT) mlieku.

Materiál a metódy

Na stanovenie luminometrickej odozvy umelo kontaminovaných plôch z nehrdzavejúcej ocele rozmerov 10 × 20 cm so suspenziou mikroorganizmov surového mlieka sa použil prístroj Charm LUMinator TTM a príslušné stery Pocket SwabsTM výrobcu Charm Science, Malden, Massachusetts, USA. V prípade stanovenia luminometrickej odozvy trvanlivého mlieka, normálneho a umelo kontaminovaného mliečnymi baktériami sa použil ten istý prístroj.

Modelové plochy z nehrdzavejúcej ocele sa rovnako kontaminovali suspenziou mikroorganizmov v surovom mlieku a na vzduchu usušili. Ich mikrobiologické vyšetrenie sa robilo sterovou metódou a paralelne luminometrickou metódou. Stery sa konštantne trepali v 10 ml sterilného fyziologického roztoku a kultivačne vyšetrili s použitím média GTK agar (agar, glukóza, tryptón, kvasničný extrakt; Imuna, Šarišské Michaľany).

Trvanlivé mlieko (UHT mlieko) priemyselne zabalené do 1-litrových obalov sa kontaminovalo odstupňovaným množstvom surového mlieka (1 ml; 0,1 ml; 0,05 ml a 0,01 ml) pomocou injekčnej striekačky a dôkladne pretrepalo na dosiahnutie homogenity kontaminácie. Pri meraní luminometrickej odozvy sa vždy použilo aj paralelné nekontaminované trvanlivé mlieko.

Trvanlivé mlieko sa vyrobilo na aparátúre Tetra Therm Aseptic Flex s výkonom 6500 l/h od firmy Tetra Pak, Lund, Švédsko. Raz šetrne pasteurizované mlieko (74 °C, 20 s) sa prietokovo nepriamo zahrievalo na 137 °C až 142 °C, pričom pôsobenie tejto teploty na mlieko bolo 3 s až 6 s.

Výsledky a diskusia

Pri skúmaní výsledkov modelovej sanitácie plôch kontaminovaných mikroorganizmami surového mlieka bioluminiscenčnou metódou (RLU) a klasickou sterovou kultivačnou metódou (KTJ) sa ukázal významný rozdiel v získaných výsledkoch. Luminometrickou metódou (RLU) stanovenia ATP pred a po sanitácii sa dosiahla redukcia skúmaných znakov o 2,10 log RLU a 2,58 log RLU. Pomocou kultivačnej sterovej metódy (KTJ) sa dosiahla vyššia redukcia počtu KTJ, konkrétne o 5,15 log KTJ a 5, 45 log KTJ. Podľa týchto výsledkov skúmania účinnosti rovnakej sanitácie rovnako kontaminovaných plôch sa zistil zdanlivo nižší účinok sanitácie meraný luminometrickou metódou (tab. 1).

Tieto rozdielne výsledky spočívali v tom, že kultivačnou mikrobiologickou metódou sa stanovili iba živé reziduálne bunky mikroorganizmov. Naproti tomu luminometrické meranie výsledkov sanitácie reagovalo aj na devitalizované, ale ešte nerozložené mikrobiálne bunky, ako aj na iné luminometricky aktívne zložky nečistôt. Toto je výhodou luminometrickej metódy. Cieľom sanitácie nie je iba devitalizácia živých mikroorganizmov, ale aj

TAB. 1. Výsledky luminometrickej odozvy počtu baktérií a ostatnej organickej nečistoty na rovnako kontaminovanej a sanitovanej pokusnej ploche.

TAB. 1. Results of the luminometric response to the amounts of bacteria and organic residues on identically contaminated and sanitized surfaces.

Kroky ¹	KTJ/25 cm ²	log KTJ/25 cm ²	RLU/25 cm ²	log RLU/25 cm ²
kontaminácia zmesou baktérií zo surového mlieka ²	1,1.10 ⁶	6,05	8,24.10 ⁵	5,92
sanitácia, pokus č. 1 ³	8	0,90	6,61.10 ³	3,82
log redukcia ⁴		5,15		2,10
sanitácia, pokus č. 2 ⁵	4	0,60	2,18.10 ³	3,34
log redukcia		5,45		2,58

KTJ - kolóniu tvoriaca jednotka, RLU - relatívna svetelná jednotka.

KTJ - colony forming unit (CFU), RLU - relative light unit. 1 - steps, 2 - contamination with bacteria from raw milk, 3 - sanitation, experiment No. 1, 4 - log reduction, 5 - sanitation, experiment No. 2.

odstránenie všetkých organických nečistôt zo sanitovaných plôch. Ak tieto nečistoty nie sú odstránené, môžu neskoršie (na druhý deň) slúžiť ako živné médium pre ďalšie kontaminujúce mikroorganizmy.

Táto skutočnosť je výhodou luminometrického skúmania čistoty plôch stykajúcich sa s potravinami. Výhoda luminometrickej metódy vystupuje do popredia aj v rýchlosti získania výsledkov. Výsledky kultivačnej metódy sú známe najskôr o dva dni, ale výsledky luminometrickej metódy sú známe prakticky ihneď.

Možnosť používania luminometrického skúmania mikrobiálnej kontaminácie trvanlivého mlieka (UHT)

Pri výrobe trvanlivého mlieka ultrapasterizáciou s nepriamym ohrevom sa východzie surové mlieko najprv šetrne pasterizuje (74 °C s výdržou 20 s) a potom sa v UHT aparátúre kontinuálne zahrieva. Vo východzom šetrne pasterizovanom mlieku sa nachádza ATP z devitalizovaných, ale ešte nerozložených mikroorganizmov, ako aj ATP nemikrobiálneho pôvodu.

Podľa vykonaných opakovaných meraní mlieko surové alebo už raz šetrne pasterizované vykazovalo nasledovnú luminometrickú odozvu:

- čerstvé surové kravské mlieko:
 $n = 5$, $\bar{x} = 825\,380$ RLU, $s_{\bar{x}} = \pm 370$ RLU, $v_k = 0,05$ %;
- čerstvé surové kravské mlieko:
 $n = 5$, $\bar{x} = 733\,070$ RLU, $s_{\bar{x}} = \pm 960$ RLU, $v_k = 0,15$ %;
- čerstvé kravské raz šetrne pasterizované mlieko:
 $n = 5$, $\bar{x} = 746\,165$ RLU, $s_{\bar{x}} = \pm 407$ RLU, $v_k = 0,05$ %.

Ako je z vyššie uvedených priemerných hodnôt RLU čerstvého surového mlieka a už raz šetrne pasterizovaného mlieka vidieť, že nebol medzi nameňanými hodnotami rovnakých vzoriek vo vnútri každého súboru, ako aj medzi nimi, významný rozdiel. Možno taktiež konštatovať, že šetrný pasterizačný zohrev nemal na obsah stanoviteľného ATP vplyv. Práve devitalizované mikrobiálne bunky si svoj obsah ATP zachovali.

Trvanlivé mlieko vyrobené z vyššie uvedeného pasterizovaného mlieka vykazovalo už nižšie luminometrické odozvy. Tieto sa u rôznych vzoriek pohybovali v rozmedzí 182 263 RLU až 517 252 RLU, pri $n = 6$, $\bar{x} = 331\,219$ RLU, $s_{\bar{x}} = \pm 144\,009$ RLU, $v_k = 43,5$ %.

Vplyv kontaminácie trvanlivého mlieka surovým mliekom

Vychádzali sme z predpokladu, že náhodná mikrobiálna kontaminácia trvanlivého mlieka, alebo počas jeho karanténneho uchovávaní rozmnožená reziduálna mikroflóra, by mohla mať na jeho ATP merateľný vplyv.

Otázkou bolo, za aký čas by sa v umelo kontaminovanom trvanlivom mlieku významne zvýšil obsah ATP a aký kvantitatívny stupeň kontaminácie by toto spôsobil.

Najprv sa merala luminometrická odozva rôznych vzoriek trvanlivého mlieka vyrobených na UHT aparátúre. Vzorky boli čerstvé, ale aj niekoľko dní uchovávané. Výsledky týchto meraní sú zhrnuté v tab. 2.

Z luminometrických hodnôt šiestich náhodných vzoriek trvanlivého mlieka je vidieť, že vo všeobecnosti boli ich hodnoty RLU nižšie ako v čerstvom pasterizovanom mlieku. Ich priemerná hodnota RLU bola 331 219. Priemerný úbytok UHT zázehvom a krátkym uchovávaním bol oproti pasterizovanému mlieku 55,6 %.

Na experimentálne zodpovedanie správania sa obsahu ATP v trvanlivom mlieku po jeho kontaminácii surovým mliekom, čo do výšky luminometrickej odozvy a času jej trvania, sa robil pokus. Vzorky trvanlivého mlieka (1 liter v originálnom balení) sa umelo kontaminoval s 1,0 ml; 0,5 ml; 0,1 ml a 0,01 ml surového mlieka. Po dôkladnom premiešaní sa pred kontamináciou, ihneď po kontaminácii a po jednom, dvoch, troch a štyroch dňoch podrobili luminometrickému meraniu. Výsledky sú graficky znázornené na obr. 1.

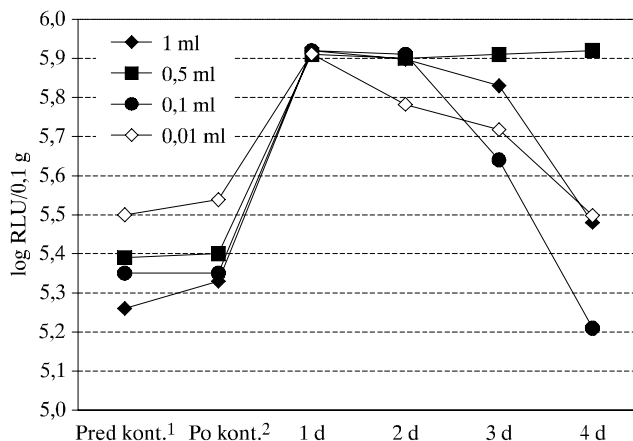
Na grafe je vidieť, že luminometrická odozva trvanlivého mlieka pred kontamináciou bola medzi 5,2 log RLU až 5,5 log RLU, čo zodpovedalo čerstvému trvanlivému mlieku. Po kontaminácii sa jeho luminometrická odozva zvýšila v pomere ku stupňu kontaminácie. Markantný nárast luminometric-

TAB. 2. Výsledky luminometrickej odozvy vzoriek trvanlivého mlieka.
TAB. 2. Results of the luminometric response to samples of UHT milk.

Vzorka ¹	RLU
1	314 634
2	500 000
3	247 159
4	182 263
5	226 007
6	517 252
\bar{x}	331 219
$s_{\bar{x}}$	144 009
v_k	43,5 %

RLU - relatívna svetelná jednotka, \bar{x} - aritmetický priemer, $s_{\bar{x}}$ - smerodajná odchýlka priemeru, v_k - variačný koeficient.

RLU - relative light unit. 1 - sample, \bar{x} - arithmetic average; $s_{\bar{x}}$ - standard deviation; v_k - coefficient of variance.



OBR. 1. Grafické znázornenie luminometrickej odozvy v 0,1 g trvanlivého mlieka po jeho zámernej rekontaminácii surovým mliekom a po uchovávaní pri teplote laboratória (22–24 °C).

FIG. 1. Luminescent response of 0.1 g UHT milk after an intentional recontamination with defined amounts of raw milk and storage at a laboratory temperature (22–24 °C).

1 - before contamination, 2 - after contamination.

kej odozvy sa zaznamenal na druhý deň po kontaminácii vzoriek. Prakticky pri všetkých vzorkách sa zaznamenal vzostup luminometrickej odozvy na asi 5,9 log RLU. Táto hodnota sa udržala pri troch vyšších stupňoch kontaminácie až do tretieho dňa; pri najnižšej kontaminácii (0,01 ml.l⁻¹ trvanlivého mlieka) už klesol na nižšiu hodnotu. Na štvrtý deň odozva už markantne klesala. Na piaty deň klesla významne pri všetkých stupňoch s výnimkou 0,5 ml.l⁻¹ trvanlivého mlieka.

Z tohto experimentálneho pozorovania je možné odvodiť nasledovné poučenie:

1. Pri všetkých kvantitatívnych stupňoch umelej kontaminácie trvanlivého mlieka surovým mlieko sa zaznamenal maximálny nárast luminometrickej odozvy už na druhý deň inkubácie pri laboratórnej teplote. Na tretí deň merania luminometrická odozva pri nižších stupňoch kontaminácie už klesala. Kontaminačné mikrobiálne bunky pravdepodobne podliehali lýze spojenej s deštrukciou ich ATP.
2. Luminometrická kontrola kontaminácie trvanlivého mlieka môže skrátiť jeho karanténne uchovávanie v závode pred jeho expedíciou do obchodnej siete.

Záver

Luminometrická odozva skúmania výsledkov sanitácie plôch stykajúcich sa s potravinami podáva informáciu nie iba o devitalizácii živých buniek mikroorganizmov, ale aj o prítomnosti bioluminiscenčne aktívnej organickej hmoty. Túto informáciu poskytuje operátorovi za krátky čas po skúmaní (minúty).

Luminometrická metóda skúmania kontaminácie trvanlivého mlieka mikroorganizmami, ktoré by sa v ňom mohli množiť počas jeho oficiálnej trvanlivosti, umožňuje skrátiť povinný karanténny čas jeho uchovávania pred expedíciou do obchodnej siete.

Podakovanie

Bioluminiscenčnú aparatúru na meranie ATP „CHARM Luminator T™“ nám zapožičali firmy Henkel Ecolab, a. s. Bratislava a Rajo, a. s. Bratislava.

Literatúra

1. Guidelines for the Application of the HACCP system. Codex Alimentarius, Section 7.5, HACCP Guidelines, Vol. 1 Suppl. 1. Rím : FAO, 1993. 58 s.
2. McELROY, W. D.: The energy source for bioluminescence in an isolated system. *Zoology*, 33, 1947, s. 342-345.
3. DeLUCA, M. - McELROY, W. D.: Purification and properties of firefly luciferase. In: LUCA, M.: *Methods in enzymology*. London : Academic Press, 1978, s. 3-15.
4. BETINA, V. - NEMEC, P.: *Všeobecná mikrobiológia*. Bratislava : Alfa, 1997. 477 s.
5. GRIFFITH, J. - BLUCHER, A. - FLERI, J. - FIELDING, I.: An evaluation of luminometry as a technique in food microbiology and a comparison of six commercially available luminometers. *Food Science and Technology Today*, 8, 1984, s. 209-216.
6. Nariadenie Vlády Slovenskej republiky z 9. júla 2003 o zdravotných požiadavkách na výrobu a uvádzanie na trh surového mlieka, tepelne ošetrovaného mlieka a mliečnych výrobkov. Zbierka zákonov č. 312/2003, čiastka 144, s. 2406-2440.

Do redakcie došlo 21.11.2003.

Control of sanitation and shelf-life of UHT milk by the bioluminescence method

VALÍK, L. - GÖRNER, F. - NERÁDOVÁ, B. - SIROTNÁ, Z.:

Bull. potrav. Výsk., 42, 2003, p. 229-237.

SUMMARY. Use of a bioluminescence method was studied in checking of the efficiency of the sanitation of stainless steel surfaces contaminated with a suspension of bacteria isolated from raw milk. The bioluminescence method was also used in the detection of intentionally contaminated samples of UHT milk. The result of the comparison of the microbial detection on model surfaces after sanitation by the classical swab culture method and by the bioluminescence method was that the bioluminescence method was more suitable for practical purposes. By the bioluminescence method, ATP of non-microbial origin is detected on sanitized surfaces as well, which represents organic contamination that becomes, later after sanitation, a source of nutrients for microorganisms. At the control of the recontamination of UHT milk samples by bacteria isolated from raw milk it was found that the luminometric response can be measured already 1 or 2 days after UHT milk contamination, which practically means in less than 2 days after its production. In this time, the luminometric response to the growth of contaminants was maximal, later a decrease was observed. Using this procedure of monitoring the non-sterility of UHT milk in practice, it is possible to shorten the currently applied 5- to 7-days quarantine of the produced UHT milk.

KEYWORDS: bioluminescence method; efficiency of sanitation; UHT milk