

(11) Patent numeris: **3802**

(51) Int. Cl.⁵: **G01N 33/04**

(21) Paraiškos numeris: **IP1479**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 11 22**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 06 26**

(45) Patent paskelbimo data: **1996 03 25**

(72) Išradėjas:

Joana Šalomskienė, LT

Antanas Šarkinas, LT

(73) Patent savininkas:

Lietuvos maisto institutas, Taikos pr. 92, 3031 Kaunas, LT

(54) Pavadinimas:

Inhibitorių pieno produkte nustatymo būdas

(57) Referatas:

Šis išradimas susijęs su pieno pramone, konkrečiai, su inhibitorių pieno produktuose nustatymo būdais.

Išradimo tikslas - padidinti pieno kontrolės tikslumą.

Būdas numato bandinio paruošimą, pasterizavimą, mikrobiteštų, turinčių jautrios test - kultūros *Bacillus subtilis* sporų, sumirkymą, hermetišką įpakavimą, termostatavimą ir mikrobiteštų spalvos įvertinimą.

Nauja šiame būde tai, kad prieš pasterizavimą sauso pieno produkto svėrinį praskiedžia distiliuotu vandeniu, o pradinio produkto ir distiliuoto vandens santykis atitinkamai turi būti $1:2,5 \pm 0,5$.

Šis išradimas susijęs su pieno pramone, o būtent, su inhibitorių pieno produktuose nustatymo būdais.

Žinomas inhibitorių pieno produktuose nustatymo būdas (buv. TSRS autorinis liudijimas Nr. 857866, TPK G01 N 33/04), pavyzdžiui, sūriuose ir varškėje, tačiau jis nėra jautrus: juo galima nustatyti apie 0,05 TV penicilino grame, apie 0,02 % formalino ir apie 0,05 % vandenilio peroksido. Toks jautrumas nepakankamas, kadangi pagal medicininius - biologinius reikalavimus ir sanitarines maisto žaliavų ir produktų kokybės normas (Mediko - biologičeskije trebovanija i sanitarnyje normy kačestva prodovolstvennogo syrja i piščevych produktov. Utv. ministerstvom zdravoochranenija SSSR 01 08 1989, Nr. 5061-89, rus.) piene ir pieno produktuose leidžiama mažiau kaip 0,01 TV penicilino grame.

Artimiausias šiam išradimui yra buv. TSRS autorinis liudijimas Nr. 1682926, TPK G01 N 33/04, kuriame aprašomas inhibitorių piene nustatymo būdas, numatantis bandinio paruošimą, pasterizavimą, mikrobitesto, turinčio jautrios test - kultūros *Bacillus subtilis* sporų, sumirkymą jame, hermetišką įpakavimą, termostatavimą ir mikrobitesto spalvos įvertinimą. Šio būdo rtūkumas toks, kad būdo jautrumas pienui yra daugiau kaip 0,01 TV penicilino 1 cm³, ~ 0,005 % formalino ir daugiau kaip 0,01 % vandenilio peroksido. Sausiems pieno produktams, skirtiems eksportui į užsienį leidžiami dar mažesni inhibitorių kiekiai, pvz., 0,004-0,005 TV penicilino 1 cm³ atstatyto pieno.

Išradimo tikslas- kontrolės tikslumo padidinimas pieno produktuose.

Šis tikslas pasiekiamas inhibitorių pieno produkte nustatymo būdu, numatančiu bandinio paruošimą, pasterizavimą, mikrobitesto, turinčio jautrios test - kultūros *Bacillus subtilis* sporų, sumirkymą jame, hermetišką įpakavimą, termostatavimą ir mikrobitesto spalvos įvertinimą. Pagal šį išradimą prieš pasterizavimą sauso pieno produkto svėrinys praskiedžiamas distiliuotu vandeniu, o pradinio produkto ir distiliuoto vandens santykis turi būti $1:2,5 \pm 0,5$.

Kiekvienas šio išradimo skiriamasis požymis susijęs su jo tikslu.

Pradinio produkto svėrinio praskiedimas distiliuotu vandeniu $1:2,5 \pm 0,5$ leidžia nustatyti 3-4 kartus didesnę inhibitorių koncentraciją atstatytame produkte, negu praskiedus santykiu 1:9 (pagal GOST 9225-84. Moloko i moločnyje produkty. Metody mikrobiologičeskogo issledovanija, rus.), kai
5 prie 10 g sausų pieno produktų pridedama 90 cm³ sterilaus fiziologinio tirpalo. Vietoje fiziologinio tirpalo naudojamas distiliuotas vanduo, kaip ir sausų pieno produktų atstatymui cheminių analizių atlikimui (GOST 8764-73. Konservy moločnyje. Metody ispytanij, rus.). Distiliuoto vandens panaudojimas sausų pieno produktų atstatymui nepadidina druskų
10 koncentracijos, kuri ir šiaip padidėja, mažesniu laipsniu praskiedus produktą (vietoje santykio 1:9 - $1:2,5 \pm 0,5$). Vadinasi, jei, pavyzdžiui, atstatytuose pagal minėtą GOST 8764-73 lieso pieno milteliuose nustatome daugiau kaip 0,01 TV/cm³ penicilino, pvz., 0,02 TV/cm³, ~0,005 % formalino ir daugiau kaip 0,01 % vandenilio peroksido, tai atstatytuose pagal šį išradimą lieso pieno
15 milteliuose, nustatydami tas pačias inhibitorių koncentracijas, faktiškai nustatome 3-4 mažesnes inhibitorių koncentracijas, negu įprastiniu būdu atstatytame sausame piene, t. y. ~ 0,004-0,005 TV/cm³ penicilino, ~ 0,001-0,002 % formalino ir ~ 0,004-0,005 % vandenilio peroksido.

Mažinant sauso pieno praskiedimo laipsnį, didėja baltymų, riebalų,
20 laktozės ir mineralinių medžiagų kiekis, o tai gali paveikti kultūros augimą. Ištyrėme, kaip produkto praskiedimo laipsnis veikia kultūros *Bacillus subtilis* augimą.

Mažesnis negu 2 kartus, pvz., 1,8, praskiedimo laipsnis netinka todėl, kad kai kuriais atvejais slopina test - kultūros *Bacillus subtilis* augimą. Tokiu
25 laipsniu praskiestame bandinyje sunku sumirkyti mikrobiteštą dėl jo tirštumo, be to, produkto praskiedimo 2 kartus pakanka pasiekti norimą metodo tikslumą. Didesnis negu 3 kartus praskiedimo laipsnis, pvz., 3,5 karto neturi neigiamo poveikio *Bacillus subtilis* augimui, bet jis nėra tinkamas norint pasiekti pageidaujamą metodo tikslumą. Taigi , kiekvienas skiriamasis
30 išradimo požymis būtinas, esminis, kartu ir visumoje su bendrais esminiais prototipo požymiais pakankami tikslui pasiekti.

Būdas naudojamas taip.

1 dalis nerūgštaus sauso pieno produkto ištirpinama $2,5 \pm 0,5$ dalyse pašildyto iki $40-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ distiliuoto vandens. Gautas tirpalas, pvz., 10 cm^3 , įpilamas į mėgintuvėlį ir naudojamas analizei. Lygegrečiai ruošiamas kontrolinis bandinys iš sausojo preparato inhibitoriams piene nustatyti ir į
5 mėgintuvėlį įpilama 10 cm^3 kontrolinio bandinio. Abu mėgintuvėliai užkemšami steriliais guminiais kamščiais. Vandens vonelėje mėgintuvėliai šildomi $87 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 10 minučių. Po to ataušinama iki $60 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūros.

Liepsnoje apdegintu pincetu už perforuotos dalies išimti iš prakirpto
10 polietileninio maišelio mikrobiteštai, turintys jautrios test - kultūros *Bacillus subtilis* sporų, nuo 2 iki 5 sekundžių mirkomi iškaitintuose tiriamo produkto ir kontrolinio bandinio mėgintuvėliuose. Kiekviename mėgintuvėlyje sumirkoma po 2 mikrobitestus.

Sumirkyti mikrobiteštai hermetiškai užlydomi polietileno maišeliuose,
15 nutraukus jų perforuotas dalis. Užlydyti polietileno maišeliai sudedami į neperšviečiamus popierinius maišelius, kurie išlaikomi temostate $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 12-18 valandų padėti gulsčiai. Po to vizualiai įvertinama mikrobiteštų splava.

Metodo jautrumas toks:

20 ~0,004-0,005 TV/ cm^3 penicilino atstatyto produkto;
~0,001-0,002 % formalino ir
~0,004-0,005 % vandenilio peroksido.

1pavyzdys

25 Inhibitoriai nustatomi penkiuose sauso lieso pieno bandiniuose. 1 dalis (3g) kiekvieno sauso lieso pieno bandinio ištirpinama 3 dalyse (9g) pašildyto iki $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ distiliuoto vandens. Lygegrečiai ruošiamas kontrolinis bandinys iš sausojo preparato inhibitoriams piene nustatyti. Kiekvieno tiriamo bandinio gautas tirpalas supilamas į atskirą mėgintuvėlį (viso 5 mėgintuvėliai), į šeštą
30 mėgintuvėlį supilama 10 cm^3 kontrolinio bandinio. Visi mėgintuvėliai užkemšami steriliais guminiais kamščiais ir šildomi vandens vonelėje $87\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 10 minučių. Po to ataušinama iki $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūros.

Liepsnoje apdegintu pincetu už perforuotos dalies išimti iš prakirpto polietileno maišelio mikrobiteštai nuo 2 iki 5 sekundžių mirkomi iškaitintuose tiriamo pieno ir kontrolinio bandinio mėgintuvėliuose. Kiekviename mėgintuvėlyje sumirkoma po du mikrobiteštus.

- 5 Sumirkyti mikrobiteštai hermetiškai užlydomi polietileno maišeliuose nutraukus jų perforuotas dalis. Užlydyti polietileno maišeliai sudedami į neperšviečiamus popierinius maišelius, kurie išlaikomi termostate 37 °C temperatūroje 16 valandų padėti gulsčiai.

Analizės rezultatai vertinami pagal 1 lentelę.

10

1 lentelė

	Spalva		
Bandinio pavadinimas	Mikrobiteostas		Įvertinimas
	I	II	
Kontrolinis	Rausva	Rausva	Nėra inhibitorių
1. Sausas liesas pienas	Rausva	Rausva	Nėra inhibitorių
2. Sausas liesas pienas	Šviesiai kreminė	Šviesiai kreminė	Yra inhibitorių
3. Sausas liesas pienas	Rausva	Šviesiai kreminė	Nėra inhibitorių
4. Sausas liesas pienas	Dalies mikrobitesto-rausva	Šviesiai kreminė	Nėra inhibitorių
5. Sausas liesas pienas	Šviesiai kreminė su pavieniais raudonais taškeliais	Šviesiai kreminė	Yra inhibitorių

Antrame ir penktame sauso lieso pieno bandinyje rasta inhibitorių, atitinkančių $\sim 0,004-0,005$ TV penicilino 1 cm^3 . Pirmame, trečiame ir ketvirtame bandiniuose inhibitorių nerasta.

5 2 pavyzdys

Inhibitoriai nustatomi trijuose sauso riebaus pieno bandiniuose. 1 dalis (30g) kiekvieno sauso riebaus pieno bandinio ištirpinama 2,5 dalyse (75g) pašildyto iki 42°C distiliuoto vandens. Lygegrečiai ruošiamas kontrolinis bandinys iš sausojo preparato inhibitoriams piene nustatyti. Kiekvieno tiriamo bandinio tirpalas (po 10 cm^3) įpilamas į atskirą mėgintuvėlį (iš viso į 3 mėgintuvėlius), o į ketvirtą įpilama 10 cm^3 kontrolinio bandinio. Visi mėgintuvėliai užkemšami steriliais guminiais kamščiais. Vandens vonelėje mėgintuvėliai šildomi 86°C temperatūroje 10 minučių. Po to ataušinama iki 65°C temperatūros. Toliau viskas vykdoma kaip 1 pavyzdyje.

Analizės rezultatai vertinami pagal 2 lentelę.

2 lentelė

	Spalva		
Bandinio pavadinimas	Mikrobitestas		Įvertinimas
	I	II	
Kontrolinis	Rausva	Rausva	Nėra inhibitorių
1. Sausas riebus pienas	Dalies mikrobitesto-rausva	Rausva	Nėra inhibitorių
2. Sausas riebus pienas	Rausva	Rausva	Nėra inhibitorių
3. Sausas riebus pienas	Šviesiai kreminė	Šviesiai kreminė	Yra inhibitorių

Trečiame riebaus pieno bandinyje rasta inhibitorių, atitinkančių ~ 0,004-0,005 TV penicilino 1 cm³. Pirmame ir antrame bandiniuose inhibitorių nerasta.

3 pavyzdys

- 5 Inhibitoriai nustatomi trijuose sausos grietinės bandiniuose. 1 dalis (10g) kiekvieno sausos grietinės bandinio ištirpinama 2 dalyse (20g) pašildyto iki 43 °C distiliuoto vandens. Lygagrečiai ruošiamas kontrolinis bandinys iš sausojo preparato inhibitoriams piene nustatyti. Kiekvieno tiriamo bandinio tirpalas (po 10 cm³) įpilamas į atskirą mėgintuvėlį (iš viso gaunami 3
- 10 mėgintuvėliai), o į ketvirtą įpilama 10 cm³ kontrolinio bandinio. Visi mėgintuvėliai užkemšami steriliais guminiais kamščiais. Vandens vonelėje mėgintuvėliai šildomi 87 °C temperatūroje 10 minučių. Po to ataušinama iki 58 °C temperatūros. Toliau viskas vykdoma kaip ir 1 pavyzdyje.

Analizės rezultatai vertinami pagal 3 lentelę.

15

3 lentelė

	Spalva		
Bandinio pavadinimas	Mikrobiteostas		Įvertinimas
	I	II	
Kontrolinis	Rausva	Rausva	Nėra inhibitorių
1. Sausa grietinė	Rausva	Rausva	Nėra inhibitorių
2. Sausa grietinė	Šviesiai kreminė	Šviesiai kreminė	Yra inhibitorių
3. Sausa grietinė	Rausva	Šviesiai kreminė	Nėra inhibitorių

- Antrame sausos grietinės bandinyje rasta inhibitorių, atitinkančių ~0,004-0,005 TV penicilino 1 cm³. Pirmame ir trečiame bandiniuose inhibitorių nerasta.
- 20

Siūlomas būdas leidžia padidinti metodo tikslumą. Inhibitorių nustatymo piene metodu (pagal žinomą technikos lygį) galima nustatyti

inhibitorių koncentraciją, atitinkančią daugiau kaip 0,01 TV/cm³ penicilino, o siūlomu metodu galima nustatyti žymiai mažesnes inhibitorių koncentracijas, atitinkančias ~ 0,004-0,005 TV/1 cm³ penicilino atstatytame piene. Tai ypač svarbu eksportuojant sausų pieno produktus į užsienį, kur reikalavimai inhibitoriams žymiai griežtesni negu Lietuvoje.

5 Siūlomas būdas inhibitorių nustatymui sausuose pieno produktuose atitinka užsienyje naudojamų inhibitorių nustatymo būdų tikslumą. Be to, būdo jautrumas pakankamas nustatyti inhibitorių (antibiotikų) koncentracijas, atitinkančias medicininius - biologinius reikalavimus ir sanitarines normas,

10 keliamas pieno produktams.

Mūsų siūlomas būdas leidžia nustatyti inhibitorius sausame pieno produkte.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

- 5 Inhibitorių pieno produkte nustatymo būdas, apimantis bandinio paruošimą, pasterizavimą, mikrobitestų, turinčių jautrios test-kultūros *Bacillus subtilis* sporų, sumirkytų jame, hermetišką įpakavimą, termostatavimą ir mikrobitestų spalvos įvertinimą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad prieš pasterizavimą sauso pieno produkto svėrinį praskiedžia distiliuotu vandeniu, o pradinio produkto ir distiliuoto vandens santykis atitinkamai turi būti $1 : 2 \pm 0,5$.