

¹ ZORA MIJAČEVIĆ
¹ SNEŽANA BULAJIĆ
² DRAGO NEDIĆ

¹ Fakultet veterinarske medicine, Beograd

² Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Republika Srpska

637.146.3:547.541.521:615.281

UTICAJ REZIDUA SULFONAMIDA U MLEKU NA FERMENTACIJU JOGURTNE KULTURE

Pored toksikološkog rizika, koji mogu prouzrokovati rezidualne količine veterinarskih lekova prisutne u namirnicama, značajna je i tehnološka sigurnost.

Potreba za kontrolom tehnološke sigurnosti mleka proizlazi iz različite osetljivosti pojedinih starter kultura na prisutne rezidualne količine veterinarskih lekova.

Sulfopreparati koji se koriste u terapiji različitih oboljenja, tokom perioda laktacije kod krava dovode do nalaza rezidua sulfopreparata i u mleku.

Polazeći od činjenice da se u Srbiji godišnje proizvede 250.000 t jogurta, potrebe za starter kulturama u tom slučaju iznose 5.000 t (tehničke mase). Ovi podaci jasno pokazuju koliko mogu biti ekonomske štete ukoliko se u mleku nađu materije koje inhibiraju rast starter kultura.

Rezultati koji su prikazani u ovome radu jasno ukazuju da se određene količine sulfopreparata izlučuju mlekom posle intrauterine i intramamarnе aplikacije i inhibiraju aktivnost jogurtne kulture. Pri intrauterinoj aplikaciji inhibicija kiseljenja jogurtne kulture zavisi od stepena promena u mlečnoj žlezdi, a pri intramamarnoj aplikaciji rezidua sulfopreparata mogu inhibirati kiseljenje jogurtne kulture tokom 16 muža.

Ključne reči: Rezidua sulfonamida • Jogurtna kultura • Inhibicija aktivnosti jogurtne kulture

UVOD

EC regulativom br. 2377/90 utvrđen je postupak za određivanje maksimalno dozvoljenih količina rezidua (MRLs) veterinarskih lekova u namirnicama animalnog porekla.

Pored toksikološkog rizika, koje mogu prouzrokovati rezidualne količine veterinarskih lekova, prisutne u namir-

nicama, značajna je i tehnološka sigurnost.

Bakterije mlečne kiseline, svojom aktivnošću „konzervišu” mleko, a pored toga odgovorne su i za ispoljenu proteolitičku aktivnost i stvaranje arome.

Potreba za kontrolom tehnološke sigurnosti mleka proizlazi iz različite osetljivosti pojedinih starter kultura na prisutne rezidualne količine veterinarskih lekova.

Kontrolom tehnološke sigurnosti najčešće se procenjuje stvaranje mlečne kiseline, pri čemu je značajno i određivanje odnosa izomera L+ i D-mlečne kiseline, a pored toga i sposobnost proteolize startera. Od velikog je značaja i porast broja mikroorganizama, kao i njihov međusobni odnos, posebno u mešovitoj kulturi (Suhren, 1996).

Sulfopreparati koji se koriste u terapiji različitih oboljenja tokom perioda laktacije kod krava, dovode do nalaza

rezidua sulfopreparata i u mleku. Maksimalno dozvoljene količine rezidua sulfopreparata prikazane su u tabeli 1.

Polazeći od činjenice da se u Srbiji godišnje proizvede 250.000 tona jogurta, potrebe za starter kulturama u tom slučaju iznose 5.000 tona (tehnička masa). Ovi podaci jasno pokazuju koliko mogu biti ekonomske štete ukoliko se u mleku nađu materije koje inhibiraju rast starter kultura. Prema podacima iz literature, jogurtna kultura pokazuje inhibiciju stvaranja kiseline, acetaldehida i aromogenih materija pri količinama sulfadimidina i trimetoprima 1.000–2.000 µg/kg (Mayra-Makinen 1993, 1995), a koncentracija sulfadiazina od 1.000 µg/kg delimično inhibira rast *Streptococcus thermophilus* i stvaranje laktata (Soback, 1981).

Cilj ovog rada je da se utvrdi da li intrauterino i intramamarno lečenje krava u laktaciji sa sulfopreparatima ima uticaja na aktivnost jogurtne kulture.

Tabela 1. MAKSIMALNO DOZVOLJENE KOLIČINE (MRLS) I SIGURNOSNO / TOLERANTNI NIVO ZA REZIDUE SULFONAMIDA U MLEKU (µg/kg)
 Table 1. MAXIMUM RESIDUE LIMITS (MRLS) AND SAFE / TOLERANCE LEVELS FOR RESIDUES OF SULFONAMIDES IN MILK (µg/kg)

Sulfonamidi Sulfonamides	MRL Codex	MRL EU	Sigurnosno / tolerantni nivo Safe / tolerance levels
<i>Sulfadimidin</i> ⁽⁴⁾	25	100 ⁽⁶⁾	10/0
<i>Sulfadimethoxin</i>		100 ⁽⁶⁾	10/10
<i>Sulfamerazin</i>		100 ⁽⁶⁾	10/0
<i>Sulfathiazol</i>		100 ⁽⁶⁾	10/0
<i>Sulfadiazin</i>		100 ⁽⁶⁾	10/0

(4) sulfamethazine, (6) preliminarily

Adresa autora: Dr Zora Mijačević, red. prof. Fakultet veterinarske medicine, 11000 Beograd, Bulevar JNA 18

MATERIJAL

Materijal su predstavljali uzorci mleka pojedinih četvrti vimena krava i to po 20 uzoraka mleka posle jednokratne intrauterine terapije sa Egocombinom uzeti posle 1, 2, 4. i 6. muže i po 8 uzoraka mleka posle intramamarnе terapije sa Trisulfaxylar-om uzeti posle 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8. i 16. muže. Tehnološka sposobnost mleka kontrolisana je jogurnom kulturom.

METODE

Kontrola rezidua sulfonamida u mleku posle intrauterine (iu) i intramamarnе (imm) terapije izvođena je sa *B. subtilis* ATCC 6633. Osetljivost testa je ispitana sa poznatim rastvorima sulfonamida.

Jogurtna kultura je pripremljena od štok kulture i uvek korišćena kao sveža. Ocena brzine kiseljenja je izvođena tako što je 10 ml mleka iz četvrti vimena zagrejano na 80°C/10 min i ohlađeno na 42±1°C. Ovako pripremljenom mleku dodato je 0,2 ml sveže jogurtne kulture. Kontrola brzine kiseljenja je izvođena sa sigurno negativnom kontrolom, tj. mlekom bez rezidua sulfonamida. Posle inkubacije od 3h kontrolisan je pH mleka.

Kontrola zdravstvenog stanja mlečne žlezde određivana je ispitivanjem mleka iz pojedinih četvrti na broj somatskih ćelija primenom Mastitis testa. Mleko u kome, posle dodavanja mastitis reagensa nema promena, označeno je sa –, a intenzitet promena konzistencije mleka u četvrtima sa povećanim brojem somatskih ćelija označen je sa +; ++ i +++.

REZULTATI

Izlučivanje sulfonamida mlekom pojedinih četvrti posle iu aplikacije Egocombinom prikazano je u tabeli 2.

Prisustvo sulfonamida u mleku pojedinih četvrti vimena, posle jednokratne iu aplikacije leka, dokazano je u prvoj i u drugoj muži u po dve četvrti. Takođe se iz tabele vidi da su rezidue sulfonamida dokazane u mleku četvrti sa jako i izrazito pozitivnim Mastis testom.

Brzina kiseljenja jogurtne kulture, utvrđena promenom pH posle 3h inkubacije na 42±1°C, u uzorcima mleka pojedinih krava posle iu aplikacije leka prikazana je u tabeli 3.

Odstupanja koja se javljaju u brzini kiseljenja jogurtne kulture mogu biti rezultat prisustva rezidua sulfonamida u mleku. Iz prethodne tabele se vidi da su u 4 od 20 četvrti dokazane rezidue sulfonamida u mleku prve i druge muže. Takođe se zapaža da su rezidue utvrđene u četvrtima sa povećanim brojem somatskih ćelija. Da bi utvrdili kako zdravstveno stanje mlečne žlezde utiče na nalaz rezidua, a s tim i na brzinu fermentacije jogurtne kulture

pratili smo promenu pH u mleku pojedinih četvrti vimena. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 4.

Rezidue sulfonamida su dokazane u dve četvrti sa Mastitis testom ++ i u 2 četvrti sa mastitis testom +++. Brzina kiseljenja u mleku druge muže jasno pokazuje da postoji inhibicija kiseljenja mleka sa jogurnom kulturom posle iu aplikacije Egocombina. Inhibicija kiseljenja je intenzivnija što je poremećaj u sekreciji mlečne žlezde izra-

Tabela 2. IZLUČIVANJE REZIDUA EGOCOMBINA IZ POJEDINIH ČETVRTI VIMENA
Table 2. EXCRETING OF EGOCOMBIN'S RESIDUES FROM INDIVIDUAL QUARTERS OF UDDER

Krava Cow	Mastitis test Mastitis test				Nalaz rezidua u mleku posle aplikacije leka The residues in milk after antimicrobial application			
	PD	PL	ZD	ZL	1. muža 1st milking	2. muža 2nd milking	4. muža 4th milking	6. muža 6th milking
1.	–	–	–	–	–	–	–	–
2.	–	+	–	+	–	–	–	–
3.	–	++	+	++	PL; ZL	PL; ZL	–	–
4.	+++	–	+++	+++	ZD; ZL	ZD; ZL	–	–
5.	–	–	–	–	–	–	–	–

PD – prednja desna četvrt vimena

PL – prednja leva četvrt vimena

ZD – zadnja desna četvrt vimena

ZL – zadnja leva četvrt vimena

Tabela 3. BRZINA KISELJENJA JOGURTNE KULTURE U MLEKU POSLE IU
APLIKACIJE EGOCOMBINA

Table 3. ACIDIFYING CAPACITY OF JOGHURT CULTURE IN MILK AFTER INTRA
THERAPY WITH EGOCOMBIN

Krava Cow	Brzina kiseljenja jogurtne kulture u mleku posle aplikacije Egocombina Acidifying capacity of joghurt culture in milk after application of Egocombin		
	2. muža – 2nd milking	4. muža – 4th milking	6. muža – 6th milking
1.	4,72 ± 0,19	4,75 ± 0,06	4,65 ± 0,06
2.	4,75 ± 0,26	4,70 ± 0,00	4,62 ± 0,05
3.	5,75 ± 0,24	4,55 ± 0,06	4,57 ± 0,05
4.	6,00 ± 0,42	5,32 ± 0,32	4,80 ± 0,00
5.	5,60 ± 0,18	4,75 ± 0,06	4,60 ± 0,00

Tabela 4. BRZINA KISELJENJA JOGURTNE KULTURE U MLEKU POJEDINIH
ČETVRTI POSLE IU TERAPIJE SA EGOCOMBIN-OM

Table 4. ACIDIFYING CAPACITY OF JOGHURT CULTURE IN MILK OF INDIVIDUAL
QUARTERS AFTER APPLICATION OF EGOCOMBIN

Intenzitet Mastitis testa Intensity of Mastitis test	n	Brzina kiseljenja jogurtne kulture u mleku pojedinih četvrti posle aplikacije Egocombina Acidifying capacity of joghurt culture in milk of individual quarters after application of Egocombin		
		2. muža – 2nd milking	4. muža – 4th milking	6. muža – 6th milking
–	12	5,12 ± 0,51	4,75 ± 0,10	4,63 ± 0,06
+	3	5,23 ± 0,51	4,63 ± 0,11	4,60 ± 0,10
++	2	5,90 ± 0,00	4,55 ± 0,07	4,60 ± 0,00
+++	3	6,10 ± 0,46	5,43 ± 0,29	4,80 ± 0,00

ženiji. U mleku pojedinih četvrti iz četvrte muže zapaža se značajna inhibicija brzine kiseljenja sa izrazitom promenom u konzistenciji mleka (Mastitis test +++). Ova pojava se zapaža i u mleku 6. muže. U mleku 6. muže nisu dokazane rezidue sulfonamida primenom metodom, dok je brzina kiseljenja u mleku iz četvrti koje su mastitis testom ocenjene kao -; +; i ++ ista kao i u kontrolnom mleku.

Izlučivanje sulfonamida mlekom posle intramamarnе aplikacije Trisulfaxylara ispitano je kod dve krave. Rezidue sulfonamida u mleku pojedinih četvrti kontrolisane su posle 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8. i 16. muže, a dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 5.

Kontrolom promena u mlečnoj žlezdi utvrđeno je da je u jednoj četvrti mastitis test bio sumnjiv (\pm), u tri četvrti pozitivan (+), u jednoj jako pozitivan (++) i u tri izrazito pozitivan (+++). Lek je aplikovan u četvrti vimena koje su imale izrazito pozitivnu reakciju. Rezidue sulfonamida su dokazane posle osme muže u mleku ispitivanih četvrti sa jako pozitivnom i izrazito pozitivnom reakcijom Mastitis testa.

Brzina kiseljenja jogurtne kulture, utvrđena promenom pH posle 3h inkubacije na $42 \pm 1^\circ\text{C}$, u uzorcima mleka pojedinih krava posle intramamarnе aplikacije leka prikazana je u tabeli 6.

Iz rezultata brzine kiseljenja zapaža se da je u mleku i posle 16-te muže aktivnost jogurtne kulture delimično inhibirana. Nalaz rezidua sulfonamida u mleku sa promenjenom sekrecijom vimena je intenzivnije i dugotrajnije, pa je za očekivati da u mleku iz tih četvrti i inhibicija fermentacije jogurtne kulture bude dugotrajnija. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 7.

Iz rezultata prikazanih u tabeli jasno se zapaža da i posle višekratne muže mleko pojedinih četvrti sadrži inhibitore jogurtne kulture, jer je i posle 16-te muže brzina fermentacije usporena.

ZAKLJUČAK

Rezultati prikazani u ovome radu jasno ukazuju da se posle intrauterine i intramamarnе aplikacije određene količine sulfopreparata izlučuju i inhibiraju aktivnost jogurtne kulture. Naši rezultati se ne slažu sa rezultatima Mayra-Makinen (1993, 1995) koja navodi da su

jogurtne kulture neosetljive na prisustvo sulfopreparata i to na kombinaciju sulfadimidin + trimetoprim i sulfadiazina i da se ne zapaža inhibicija kulture tokom proizvodnje jogurta u prisustvu 1000-2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ovih preparata. Naši rezultati se ne slažu ni sa rezultatima Suhren (1996), koja je utvrdila da sulfadimidin, Dapson i trimetoprim u količinama znatno iznad maksimalno doz-

voljenih (MRL) ne inhibiraju rast jogurtne kulture V2 i V709.

Na osnovu rezultata sprovedenog eksperimenta može se zaključiti da je kontrola prisustva sulfopreparata u mleku neophodna, jer pored mogućeg toksikološkog dejstva, mogu imati i nepovoljno tehnološko dejstvo i time mogu izazvati značajne ekonomske štete.

Tabela 5. IZLUČIVANJE REZIDUA TRISULFAXYLARA IZ POJEDINIH ČETVRTI VIMENA
Table 5. EXCRETING OF RESIDUES OF TRISULFAXYLAR FROM INDIVIDUAL QUARTERS OF UDDER

Mastitis test	Nalaz rezidua sulfonamida u mleku pojedinih četvrti posle muže The prevalence of residues of sulfonamides in milk of individual quarters of udder									
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	16.	
\pm (1)	1	1	1	-	-	-	-	-	-	
+	3	3	3	1	1	-	-	-	-	
++(1)	1	1	1	1	1	1	1	1	-	
+++ (3)	3	3	3	3	3	3	3	3	1	

Tabela 6. BRZINA KISELJENJA JOGURTNE KULTURE U MLEKU POSLE INTRAMAMARNE TERAPIJE SA TRISULFAXYLAROM
Table 6. ACIDIFYING CAPACITY OF JOGHURT CULTURE IN MILK AFTER INTRAMAMMARY THERAPY WITH TRISULFAXYLAR

Muža Milking	Brzina kiseljenja jogurtne kulture u mleku krava posle intramamarnе terapije sa Trisulfaxylarom Acidifying capacity of yoghurt culture in milk after intramammary therapy with Trisulfaxylar	
	Krava 1 – Cow 1	Krava 2 – Cow 2
4.	$6,18 \pm 0,59$	$6,04 \pm 0,26$
5.	$6,01 \pm 0,14$	$5,83 \pm 0,43$
6.	$5,92 \pm 0,31$	$5,80 \pm 0,43$
7.	$5,87 \pm 0,36$	$5,65 \pm 0,51$
8.	$5,60 \pm 0,26$	$5,50 \pm 0,14$
16.	$5,30 \pm 0,24$	$5,05 \pm 0,37$

Tabela 7. BRZINA KISELJENJA JOGURTNE KULTURE U MLEKU POJEDINIH ČETVRTI POSLE INTRAMAMARNE TERAPIJE SA TRISULFAXYLAROM
Table 7. ACIDIFYING CAPACITY OF JOGHURT CULTURE IN MILK OF INDIVIDUAL QUARTERS OF UDDER AFTER INTRAMAMMARY THERAPY WITH TRISULFAXYLAR

Muža – Milking	Brzina kiseljenja jogurtne kulture u mleku pojedinih četvrti posle intramamarnе terapije sa Trisulfaxylarom Acidifying capacity of yoghurt culture in milk of individual quarters of udder after intramammary therapy with Trisulfaxylar			
	Intenzitet Mastitis testa – Intensity of Mastitis test			
	\pm	+	++	+++
4.	$5,80 \pm 0,00$	$5,75 \pm 0,40$	$6,40 \pm 0,00$	$6,47 \pm 0,12$
5.	$5,90 \pm 0,00$	$5,60 \pm 0,20$	$6,05 \pm 0,00$	$6,20 \pm 0,17$
6.	$5,80 \pm 0,00$	$5,50 \pm 0,10$	$5,90 \pm 0,00$	$6,23 \pm 0,15$
7.	$5,40 \pm 0,00$	$5,40 \pm 0,10$	$5,80 \pm 0,00$	$6,23 \pm 0,15$
8.	$5,50 \pm 0,00$	$5,37 \pm 0,06$	$5,50 \pm 0,00$	$5,77 \pm 0,12$
16.	$4,80 \pm 0,00$	$4,93 \pm 0,06$	$5,20 \pm 0,00$	$5,53 \pm 0,06$

LITERATURA

1. Suhren, G.: Influence of residues of antimicrobials in milk on commercially applied starter cultures – model trials. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 48 (2) 131–149 (1996)
2. Mayra-Makinen, A.: Residues and Quality Impairment of Fermented Milk Products and Cheeses. IDF-Workshop on Residues of Antibiotics and other Antimicrobial Inhibitors in Raw and Heat-treated Milk, Copenhagen, December 8–10 (1993)
3. Mayra-Makinen, A.: Technological significance of residues for the dairy industry. In: International Dairy Federation: Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk, Special Issue 9505 S, 136–143 (1995)
4. Soback, S.: Acta vet. scand. 22 493-500 (1981)

SUMMARY**THE INFLUENCE OF SULFONAMIDES' RESIDUES IN MILK ON FERMENTATION ABILITY OF YOGHURT CULTURE**

¹Zora Mijačević, ¹Snežana Bulajić, ²Drago Nedić

¹Fakultet veterinarske medicine, Beograd, ²Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Republika Srpska

In addition to the toxicological significance of residues of veterinary drugs in food of animal origin, the technological aspect is of great economic importance. The control of technological safety of milk is necessary due to variously sensitivity of certain starter culture to residual quantities of veterinary drugs. Sulfonamides, which are applied in the therapy of various illnesses in cows during lactation period, consequently lead to presence of residues of sulfonamides in milk. The annual production of yoghurt in Serbia is estimated on 25.000 t, and therefore it is necessary to ensure about 5.000 t of starter cultures. These data clearly pointed out the economic aspect of the presence of antimicrobials in milk, due to their inhibitory effect on starter culture activity. The results of present study showed that certain quantities of sulfonamides are excreted by milk after intrauterine and intramammary therapy and consequently inhibited the activity of starter culture. At intrauterine application of antimicrobial drugs, inhibition of yoghurt culture acidification depends on degree of disturbance in milk gland. At intramammary application of sulfonamides, the residues of sulfonamides could inhibit the acidification ability of yoghurt culture during 16 milking.

Key words: Residues of sulfonamides • Yoghurt culture • Inhibition of activity of yoghurt culture