

## POUZDANOST POKUSA NA PEROKSIDAZU I FOSFATAZU U KONTROLI ISPRAVNO PASTERIZIRANOG MLIJEKA I VRHNJA

Pravilnik o kvaliteti mlijeka i proizvoda od mlijeka (PKM) objavljen u Sl. listu SFRJ br. 15/64. propisuje, da dugotrajno i kratkotrajno pasterizirano mlijeko mora dati negativnu reakciju na fosfatazu, a visoko pasterizirano mlijeko negativnu reakciju na peroksidazu. U tom se Pravilniku dalje navodi, da se pri dobro provedenoj trajnoj i kratkotrajnoj pasterizaciji uništava fosfataza, a pri visokoj peroksidaza.

Ako se u dugotrajno i kratkotrajno pasteriziranom mlijeku ustanovi po jednoj od metoda ispitivanja enzim fosfataza, to je prema PKM dokaz, da to mlijeko nije bilo zagrijavano dovoljno dugo ili pri dovoljno visokoj temperaturi odnosno da mu je naknadno dodano sirovo mlijeko. Ako se u visoko pasteriziranom mlijeku prema PKM ustanovi enzim peroksidaza, dokaz je da to mlijeko nije ispravno zagrijano. Ni u jednom, ni u drugom slučaju mlijeko se u smislu PKM ne može smatrati ispravno pasteriziranim, i ne smije se stavljati u promet odnosno prodaju. Prema PKM nalaz peroksidaze odnosno fosfataze, nakon provedene toplinske obrade, također mora biti negativan u slatkom i kiselom vrhnju te u maslacu.

Osvrnut ćemo se na novija istraživanja o pouzdanosti pokusa na peroksidazu i fosfatazu.

### A) POKUS NA PEROKSIDAZU

Pokus na peroksidazu bio je tačno prilagođen tipu pastera kakav je bio prilikom uvođenja pločastog pastera. Poboljšanjem tipova tih uređaja za grijanje, osobito posljednjih godina, promijenili su se tehnički preduvjeti za pokus na peroksidazu. U prvom redu poboljšao se protok mlijeka i s time u vezi smanjilo se trajanje grijanja. Uza sve to u jednakoj mjeri su se uništili mikroorganizmi, a uvelike uščuvala svojstva mlijeka, a i enzima. Kod definiranja triju postupaka pasterizacije nije se jednako postupalo. Definicija dugotrajne pasterizacije bila je, da se mlijeko grije 30 minuta pri 62 do 65°C. Kod kratkotrajne i visoke pasterizacije odustalo se od utvrđivanja temperature i trajanja zagrijavanja. To se nepovoljno odrazilo na pouzdanost pokusa na peroksidazu,

Grijanjem mlijeka pri 85°C, prema postojećim propisima, za visoku pasterizaciju peroksidaza se potpuno ne uništava. Oko 1,5% peroksidaze koju sadrži sirovo mlijeko ostaje neuništena. Količina peroksidaze, koja zaostaje nakon grijanja, može varirati od 10 do 20%, što zavisi o količini, koju sadrži sirovo mlijeko.

Budući da osjetljivost reagencija za određivanje peroksidaze nije jednaka, trebalo bi propisati standard prema kojem bi se te reagencije ispitale prije provedbe pokusa na peroksidazu. Ta potreba osobito dolazi do izražaja u međunarodnom prometu, kad se traži primjena pokusa na peroksidazu. Dolazilo je npr. do zabuna u kontroli mlijeka u prahu, kada su se prilikom ispitivanja upotrebile osjetljivije reagencije.

Još je teže dokazati propisno zagrijavanje s pomoću pokusa na peroksidazu, ako se ne kani dokazati sirovo mlijeko, već mlijeko koje nije dovoljno zagrijano, npr. kad iz jednog pastera istječe jedan sat u tank mlijeko koje je pro-

pisno grijano pri 85°C, a zatim mlijeko koje je 15 minuta grijano pri 83°C. Ovo se ne može dokazati pokusom na peroksidazu.

Na osnovu radova Schwarza i Sydowa (1949) u propisno zagrijanom mlijeku pri 85°C mogu se s pomoću reagensa N3 dokazati ove količine nedovoljno zagrijanog mlijeka:

60%	mlijeka	grijanog	pri	83°C
20%	"	"	"	82°C
10%	"	"	"	81°C
5%	"	"	"	80°C
5%	sirovog	mlijeka		

**Radi toga kontrolni uzorak valja uzeti samo i neposredno nakon izlaska mlijeka iz izmjenjivača topline.** Tada se jedino može dokazati da li je mlijeko zagrijano pri nižoj temperaturi od 85°C, a nikako ne u mlijeku uzetom iz tanka, u kojem je izmiješano propisno grijano mlijeko s nedovoljno zagrijanim.

Pozitivna reakcija na peroksidazu trebala bi biti dokazom, da je mlijeko nedovoljno zagrijano. Međutim, to nije zbog regeneracije (naknadne reakcije) peroksidaze.

**Daljnja nepouzdanost reakcije na peroksidazu jeste u tome da se peroksidaza posve ne uništava pri 85°C.** Razlikujemo originalnu od regenerirane peroksidaze. Vrlo je teško manje količine originalne peroksidaze, koje se nalaze u nedovoljno zagrijanom mlijeku ne uništiti, kako bi se isključila regenerirana peroksidaza. To se može postići ili spontanom kiseljenjem ili naknadnom pasterezacijom mlijeka pri 70°C za vrijeme od 10 minuta. Najmanje odstupanje od spomenute temperature ima za posljedicu uništavanje originalne peroksidaze ili jedan dio regenerirane peroksidaze ostaje neuništen.

Na osnovu toga regeneracija sprečava mogućnost dokazivanja nedovoljno zagrijanog mlijeka. Sigurnost ove metode dokazivanja, kako je naprijed navedeno, još je manja za mlijeko koje potječe iz trgovačke mreže, jer je peroksidaza uvelike regenerirana. Zato treba uzimati uzorke mlijeka, kad istječe iz uređaja za grijanje. Tada može poslužiti za kontrolu u samom pogonu i ne treba se bojati smetnja, koje nastaju miješanjem propisno zagrijanog mlijeka s drugim mlijekom niti pojavom regeneracije.

Daljnja poteškoća kod prosuđivanja visoko zagrijanog mlijeka s pomoću pokusa na peroksidazu izgleda da je i u tome, što oštećenje peroksidaze uvelike zavisi o svježini mlijeka koje se grije. Peroksidaza se to više oštećuje, što je mlijeko starije.

Još su kompliciraniji odnosi kod visoko zagrijane sirutke. Ako se svježa sirutka visoko zagrije ponajprije se oštećuje peroksidaza kao i u svježem mlijeku, dok je regeneracija mnogo manja. Što su uzorci sirutke stariji, to se smanjuje aktivnost peroksidaze. Dva do tri dana stara, nedovoljno zagrijana sirutka, pa čak i sirova sirutka, ako se dulje vremena čuva pri temperaturi od 40°C, daje negativni ishod reakcije na peroksidazu i dovodi u zabunu, da je sirutka propisno zagrijana pri visokoj temperaturi. **Stara sirutka kao i staro mlijeko daje negativnu reakciju na peroksidazu već kada se grije pri 81°C.**

Iz naprijed navedenih razloga u zadnje vrijeme reakcija na peroksidazu smatra se nepouzdanom. Pokušalo se usporediti, ponajviše u pogledu njihove tačnosti, pokus na peroksidazu s reakcijom na fosfatazu. Međutim, to ipak nije pravilno. Fosfataza se posve uništava već kratkotrajnom pasterezacijom mlijeka pri 71°C za 30 do 40 sekunda. Međutim, kod sadašnjih tipova pastera reakcija na peroksidazu nije prikladna kao dokaz da je mlijeko visoko grijano pri 85°C.

Pokus na fosfatazu ne može se upotrijebiti kao zamjena za pokus na peroksidazu, jer je kod visokog zagrijavanja već pri 76°C reakcija na fosfatazu negativna. **Da je mlijeko zagrijano pri rasponu temperature od 75° do 85°C najbolje se može dokazati s pomoću dijagrama temperature na uređaju za pasterizaciju.** Tačnost takve registracije iznosi  $\pm 0,5^\circ\text{C}$ . Tačno održavanje temperature u uređaju za pasterizaciju može se još osigurati dodatnim relejem, povezanim sa živinim kontaktnim termometrom, koji će staviti u pogon alarmni uređaj ili prekidač električne struje.

Da li je došlo do prodora sirovog mlijeka ili je ono naknadno dospjelo u propisno zagrijano mlijeko, najmanje možemo to dokazati reakcijom na fosfatazu, s obzirom da se njome može utvrditi prisutnost od 0,5% sirovog mlijeka. I u svakom slučaju negativnog rezultata pokusa na peroksidazu treba također ispitati visoko zagrijano mlijeko na fosfatazu, da bi se utvrdila eventualna sadržina sirovog mlijeka.

## B) POKUS NA FOSFATAZU

Gilcreas je već god. 1939. opazio da je 40% uzoraka vrhnja nakon ispravno provedene pasterizacije u elektro-pasteru davalo pozitivnu reakciju na fosfatazu, pa je izgledalo da je tome razlog nedovoljno grijanje. Međutim, svi uzorci pasteriziranog mlijeka su naprotiv dali negativnu reakciju. Iste je godine Brown dokazao, da je koncentracija enzima u vrhnju veća od one u mlijeku i da se zbog toga vrhnje mora grijati pri višoj temperaturi nego mlijeko. Zapazio je čak da maslac proizveden iz besprijekorno pasteriziranog vrhnja koje je dalo negativnu reakciju na fosfatazu, pokazuje pozitivnu reakciju na fosfatazu, ako se drži pri sobnoj temperaturi. Isti autor smatra sigurnim da se ovdje ne radi o bakterijskoj fosfatazi, već mnogo prije o pravoj regeneraciji.

Wiley, Newman i Whitehead su god. 1941 također konstatirali, da zagrijavanje mlijeka pri visokoj temperaturi u vacreatoru čak pri 93,3°C (200°F) ne uništava potpuno fosfatazu.

Objasnili su to time da vrhnje sadrži nešto »vezane« fosfataze, koja se oslobađa dodavanjem soli ili šećera odnosno prilikom sušenja vrhnja u vakuumu. Do tog je časa fosfataza zaštićena topljivim bjelančevinama koje se denaturiraju grijanjem. Barber i Frazier (1943) opazili su naknadni nastanak pozitivne reakcije na fosfatazu i u ohlađenom pasteriziranom vrhnju.

Ritter (1953) je vrlo tačno opisao fosfatazu pri pasterizaciji vrhnja. Po njegovim podacima vrhnje se mora grijati najmanje 1 minutu pri 70°C da bi dalo negativan rezultat pokusa na fosfatazu. Fosfatasa se po njegovim opažanjima kemijskim putem reaktivira u prisutnosti različitih tvari, kao npr. natrijevog klorida, magnezijevog klorida, saharoze, galaktoze i stanovitih kalcijevih spojeva.

Da reakcija na fosfatazu kod različitih mlječnih proizvoda zakazuje i da može dovesti do pogrešne ocjene proizlazi iz toga, što čak uperizirano, tj. praktički sterilno mlijeko pokazuje pozitivni fosfatadni test, o čemu izvještavaju Wright i Tramer (1953). U toku sedmodnevnog čuvanja pri 22—37°C (maksimum pri 30°C) povisuje se fosfatadna vrijednost mlijeka od 2,5—2,8 na 13—18 Lovibond-jedinica, iako je ono još uvijek sterilno, pa je time isključena pojava bakterijske fosfataze. Prema Procteru (1949) ne radi se tu o pravoj regeneraciji, nego o reakciji sulfhidrilnih grupa, koje se oslobađaju grijanjem mlijeka pri visokoj temperaturi.

Siegenthaler (1954 i 1956) se bavio ponajviše tučenim vrhnjem, pa je zapazio, da nakon zagrijavanja pri visokoj temperaturi dolazi do regeneracije fosfataze. Kao što je kod regeneracije peroksidaze, tako je i kod regeneracije fosfataze regenerirani enzim osjetljiviji od originalnog, i grijanjem vrhnja 5 minuta pri 55°C uništava ga se 75%, dok se visokom pasterizacijom uništi samo 25% originalnog enzima.

Wright (1956) je utvrdio regeneraciju fosfataze ne samo u vrhnju nego i u mlijeku stanovitih farma nakon provedene kratkotrajne pasterizacije pri normalnoj temperaturi (71 do 72°C/15 sek.). I u mlijeku zagrijavanom iznad 100°C ustanovljena je regeneracija fosfataze. **Samo dugotrajno pasterizirano mlijeko u nijednom slučaju nije dalo pozitivnu reakciju na fosfatazu niti je u njemu kasnije nastupila regeneracija.**

Simonart i Huberlant (1956) objasnili su regeneraciju fosfataze. Oni su naime opazili, da otrovi enzima, kao što su formalin i sublimat, sprečavaju ponovnu pojavu pozitivne fosfatane reakcije u pasteriziranom vrhnju, dok to naprotiv ne čine toluol, vodikov superoksid i penicilin. S druge strane inverziji (»preokretu« reakcije) pogoduje šećer, natrijev klorid, površinski aktivne tvari kao što je npr. klorid kvaternog alkilamina i evaporiranje. Iz ovih pojava dade se zaključiti, da regeneracija nastaje oslobođenjem »vezane« ili »zaštićene« fosfataze. Vjerojatno je ta zaštita fizikalno-kemijske prirode.

Scholz (1956) je potvrdio, da je fosfataza vezana na mast i što je mlijeko masnije, to je njena vrijednost viša. U kratkotrajno pasteriziranom vrhnju koje se čuva pri temperaturi od 10 do 30°C vrijednost fosfataze se povećava.

Paschke (1958) se bavio reaktiviranjem fosfataze u maslacu. Dok maslac iz kiselog vrhnja ne pokazuje pojave regeneracije, u maslacu iz slatkog vrhnja nastupa nakon jedne do dvije sedmice tako jaka regeneracija, da se više ne može dokazati da li je vrhnje bilo pravilno zagrijano.

Fram (1957) je istraživao kratkotrajno zagrijano vrhnje, mlijeko i obrano mlijeko. Vrhnje (20%, odnosno 38%) grijano 16 sekunda pri 74°C dalo je pozitivnu reakciju na fosfatazu nakon 2 sata čuvanja pri 31°C, mlijeko nakon 6 sati, a obrano mlijeko nakon 18 sati.

Paschke (1960) je utvrdio, da se kisela fosfataza ne regenerira u slatkom vrhnju ni u maslacu iz slatkog vrhnja, i izradio je metodu za razlikovanje originalne od regenerirane fosfataze.

Mickle, Drab i Olson su potpuno opovrgli pouzdanost pokusa na fosfatazu kada su utvrdili, da se aktivnost fosfataze povećava čak i u dugotrajno pasteriziranom mlijeku (63 odnosno 67°C). Fosfataza se pri 22 i 32°C brže regenerira nego ako se čuva pri 11°C. Aktivnost fosfataze povećava se čuvanjem mlijeka neovisno o temperaturi čuvanja.

MacFarren, Thomas, Black i Campbell (1960) ustanovili su optimalne uvjete regeneracije fosfataze, a ti su za mlijeko pri temperaturi grijanja od 104 do 110°C, a za vrhnje pri 104 do 121°C, kada se nakon toga mlijeko odnosno vrhnje čuvaju pri 34°C. Regeneracija se povećava dodavanjem 1,5% magnezijevog klorida vrhnju odnosno 2% mlijeka. Aktivnost fosfataze se povećava za 8 do 10 puta.

Sydow (1962) na temelju podataka navedenih istraživanja, da iz pozitivne reakcije na fosfatazu ne može odmah zaključiti na neispravan rad pastera

ili na prisutnost sirovog mlijeka, osobito ako se mlijeko i mlječni proizvodi zagrijavaju pri visokoj temperaturi. U tim slučajevima potrebna je radi prosuđivanja ispravnosti zagrijavanja, osim pokusa na fosfatazu, bakteriološka pretraga (nalaz koliformnih bakterija, broj živih bakterija) i termogram uređaja za grijanje.

### ZAKLJUČAK

Kontrolni organi vanjskih inspeksijskih službi (sanitarne, veterinarske i tržne) pridržavaju se odredaba postojećeg PKM, te po istom donose i rješenja na temelju izvršenih laboratorijskih pretraga. Budući da ocjena o ispravnosti rada pastera odnosno postupka pasterizacije na osnovu pozitivnog rezultata pokusa na peroksidazu ili pokusa na fosfatazu često donosi mljekarskoj proizvodnji materijalne gubitke — potrebno je hitno mijenjati postojeći PKM.

Iz izloženog vidljivo je, da se propisi o kontroli ispravno provedenih postupaka toplinske obrade mlijeka i vrhnja — pokus na peroksidazu i pokus na fosfatazu — koje sadržava PKM ne temelje na današnjim naučnim saznanjima, pa stoga predlažem da naši naučni instituti, fakulteti ili mljekarska stručna udruženja izrade prijedlog nadležnim organima za ispravak i nadopunu navedenih propisa Pravilnika o kvaliteti mlijeka i proizvoda od mlijeka.

### Literatura:

- Schulz, M. E. & Sydow, G.: Ueber die ungenügende Beweiskraft der Peroxydaseprobe, *Milchwissenschaft* 10 (151—153), 1955.  
 Sydow, G.: Ueber die ungenügende Beweiskraft der Phosphataseprobe, *Molkerei- und Käserei-Zeitung* 13. 1962.

## PROIZVODNJA MLJEKA NA DRUŠTVENIM GOSPODARSTVIMA I STOČARSKIM ORGANIZACIJAMA U KOOPERACIJI U SRH GOD. 1966.

Na društvenim gospodarstvima ukupan broj goveda se nešto povećao, ali se nešto smanjio broj krava, kako je to vidljivo iz izvještaja »Rezultati uzgoja i kontrole produktivnosti goveda i svinja« Stočarskog selekcijskog centra Hrvatske u Zagrebu.

### Brojno stanje goveda na društvenim gospodarstvima SRH u god. 1966.

Tabela I

Broj organizacije	Pasmina	Raspl. bikova u pripustu	Krava	Podmlatka				Ukupno
				ženskog		muškog		
				preko 1 god.	do 1 god.	preko 1 god.	do 1 god.	
30	domaća							
	šarena	12	9454	2981	2195	194	1237	16073
17	crno-šara	15	7532	3541	1922	16	549	13575
4	crveno-šara	5	935	362	352	1	198	1853
8	smeđa	3	938	185	212	9	108	1455
4	siva	2	90	31	13	—	—	136
4	jersey	3	187	106	54	—	9	359
1	hereford	1	50	11	11	—	35	108
1	podolac	1	59	65	10	—	42	177
69	Svega	42	19245	7282	4769	220	2178	33736