

Uticaj silažnog mleka na fizičko-hemijske osobine sira ispoljava se najčešće nepovoljnim promenama ukusa, mirisa, i teksture, a ređe konzistencije i boje.

Iako se problem silažnog mleka prvo javio u sirarstvu i mada danas postoji prilično obimna literatura uopšte o silažnom mleku ipak je nemoguće detaljnije i sigurnije objasniti suštinu svih pojava koje za praktično sirarstvo imaju veliki značaj.

#### Literatura

1. Ritter P.: Landwirtschaft. Jahrbuch der Schweiz 50, 1949.
2. Zollikofer E., Richard O.: Landwirtschaft. Jahrbuch der Schweiz, 1943; XII Int. Dairy Congr. I, 1949.
3. Zollikofer E., Richard O.: Landwirtschaft. Jahrbuch der Schweiz, 1943.
4. Thomé K., Swartling P.: XIII Int. Dairy Congr. II. 1953.
5. Möller E.: Milchwissenschaft, 4, 1949.
6. Kürsteiner J.: Cit.: Kosjowski F.: Advances in Cheese Technology. FAO Agr. Studies 38, 1958.
7. Thomé K., Swartling P.: Medd. Stat. Mejer. 38, 1952.
8. Jotov N. i sar.: Nedostaci i patogene bakterije u belom mekom siru i kačkavalju. Izd. Akad. polj. nauka, Sofija, 1963.
9. Carbone E., Emaldi G.: XV Int. Dairy Congr. I, 1959.
10. Demeyer K.: Cit.: Orth A. (14).
11. Hostettler H.: Cit.: Orth A. (14).
12. Mocquot G.: Cit.: Bolliger O.: Manuale Lactis, Fol. II, Kl. 5 33 (181) 1955.
13. Henriques E.: Manuale Lactis Fol. II, Kl. 5. 35 (185) 1955.
14. Orth A., Koch G.: Milchwissenschaft 16, 177, 1961.
15. Orth A., Koch G.: Molker. — Käser. — Ztg. 4, 1963.
16. Renner E., Kiermeier F.: Milchwiss. 19, 60, 1964.
17. Bonomi A. i sar.: Riv. Zootec. Milano, 35, 1962; D. S. A. 24, (2179) 1962.
18. Burkhalter G.: D. S. A. 23, (3143) 1961.
19. Becker-H., Stocker W.: Milchw. Forsch. 9, 121, 1930.

Dipl. inž. Vera Vojnović, Zagreb

Prehrambeno-tehnološki institut

#### METODE ODREĐIVANJA PROTEINA U MLIJEKU

U savremenoj mljekarskoj industriji potrebna je stalna kontrola glavnih sastojaka mlijeka. U većini mljekara, mlijeko se plaća prema sadržini masti, što stimulira proizvođače na povećanje % masti u mlijeku.

Kako je količina proteina (bjelančevina) također jedan od važnih faktora koji pridonose boljem iskorišćenju mlijeka, naročito u proizvodnji sira i mlječnog praha, ukazuje se potreba za usvajanjem jedinstvenih metoda određivanja proteina u mlijeku. Takva bi metoda morala odgovarati ovim zahtjevima:

1. mora biti upotrebljiva za uzorke mlijeka u svim stadijima laktacije;
2. uobičajeni konzervansi ( $HgCl_2, K_2Cr_2O_7$ ) koji se dodaju uzorcima ne smiju utjecati na tačnost rezultata;
3. mora postojati linearan odnos između stvarne sadržine proteina i izmjerene vrijednosti;
4. tehnika izvođenja mora biti jednostavna i pogodna za vršenje serijskih ispitivanja;
5. ne smije biti skupa.

Osim klasične Kjeldahl-ove metode, koja je dosta složena i dugotrajna, postoji čitav niz drugih, koje bi bile prikladnije za serijske analize.

Posljednjih tridesetak godina objavljeno je mnogo radova u kojima se predlažu nove, brze metode za određivanje proteina. Spomenut ćemo samo neke od njih, a u prvom redu one, koje su ispitane u pojedinim laboratorijima. Prema karakterističnim svojstvima određivanja možemo ih podijeliti na:

**Fizikalne metode:**

refraktometrijska  
spektrofotometrijska  
i metoda vezanja boje

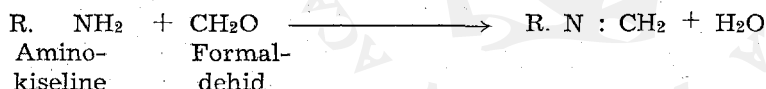
**Kemijske metode:**

destilaciona  
acidometrijska  
i formol titracija

Od prethodno navedenih metoda dvije su našle širu primjenu, i to formol titracija i metoda vezanja boje. Ovdje ćemo ih podrobnije opisati i navesti postupak za svaku od njih.

### **F o r m o l t i t r a c i j a**

God. 1896. otkrio je Blum da djelovanjem formaldehida na proteine dolazi do povišenja kiselosti proteinske otopine. Ovaj su princip primijenili Schiff (1899.) i Steinegger (1905.) za određivanje koncentracije amino-kiselina u otopini proteina. Reakciju formaldehida možemo prikazati ovom šemom:



Formaldehid veže bazične  $\text{NH}_2$  skupine, a slobodne  $\text{COOH}$  skupine se titriraju lužinom.

Mehanizam reakcije nije još dovoljno ispitan, pa je kod formol titracije potrebno uvesti faktor koji se empirijski određuje uspoređivanjem rezultata titracije s rezultatima Kjeldahl-ove metode.

Prema Pyne-u, rezultat titracije pomnoži se s faktorom 0,338 da se dobije postotak proteina. Razlike u rezultatima formol titracije i metode po Kjeldahlu iznose  $\pm 0,15\%$ .

### **Propis metode po Pyne-u**

Reagensi:

1. 0,0025% otopina fuksina
2. 1,0% etanolna otopina fenolftaleina
3. zasićena otopina kalijevog oksalata
4. 0,1 n-otopina natrijevog hidroksida
5. formalin (40% otopina formaldehida)

Pribor:

1. tikvice po Erlenmayer-u od 200 ml, 2 kom.
2. pipeta od 50 ml
3. pipeta od 10 ml
4. pipeta od 2 ml
5. pipeta graduirana od 1 ml, 2 kom.
6. bireta od 50 ml.

### Postupak:

U dvije tikvice po Erlenmayeru od 200 ml odpipetira se po 50 ml mlijeka. U tikvicu br. 1 doda se 0,2 ml 0,0025 % otopine fuksina, a u tikvicu br. 2 0,5 ml 1%-tne otopine fenolftaleina, zatim se u obje tikvice doda po 2 ml zasićene otopine kalijevog oksalata i promiješa. Nakon dvije minute se sadržina u tikvici br. 2 titrira s 0,1 n-natrijevom lužinom do boje otopine u tikvici broj 1. Potom se doda 10 ml formalina, čeka se 1 minutu i ponovno titrira s 0,1 n-natrijevom lužinom do boje u tikvici br. 1. Kod druge titracije potrošeni broj ml 0,1 n-natrijeve lužine daje formolni broj (po Pyne-u).

### Račun:

Sadržina bjelančevine =  $(a \times 0,338)\%$

$a$  = broj ml 0,1 n-NaOH potrošen kod druge titracije 0,338 = empirijski faktor

(ovaj faktor vrijedi samo za rad po opisanoj metodi)

### Metode vezanja boje

Pod određenim uvjetima stanovita količina proteina veže i taloži konstantnu količinu boje. Ova reakcija između baznih amino grupa proteina i kiselinskih grupa boje odvija se u stehiometrijskom odnosu. Taj se odnos boje prema proteinima zove »kapacitet vezanja boje«, ili skraćeno DBC (Dye binding capacity). Pod određenim uvjetima DBC proteina je prilično konstantan. Na osnovu toga razrađeno je nekoliko metoda određivanja proteina vezanjem boje.

#### a) Metoda Amino Black 10 B

Ova metoda zasniva se na ovom principu: kod niskog pH proteinske molekule nalaze se kao viševalentni kationi, koji s anionskim bojilom Amido Black 10 B daju netopljivi kompleks. Ekstinkcija nevezane boje mjeri se kod valne dužine 5780 Å.

#### b) Metoda po Udy-u

Kod ove metode proteini mlijeka (pH 2,2) formiraju netopljivi kompleks sa suviškom anionskog bojila »Orange G«. Boja se taloži u proporcionalnoj količini s brojem aktivnih proteinskih bazičnih grupa, a ekstinkcija nevezane boje mjeri se kod valne dužine 4700 Å.

Prema podacima kojima raspoložemo, kod nas se dosad nije mnogo radilo na određivanju proteina raznim novim metodama. Najveću primjenu ima još uvijek klasična metoda po Kjeldahl-u.

Među objavljenim radovima na određivanju proteina u mlijeku drugim metodama napominjemo određivanje proteina metodom po Udy-u izvršeno u Zavodu za poznavanje i analizu životnih namirnica Tehnološkog fakulteta u Zagrebu.

Dobiveni rezultati kolorimetrijskog određivanja uspoređeni su prema Kjeldahl-ovoj metodi, izvedenoj u semimikro tehnici. Na osnovu podataka dobivenih eksperimentalnim mjerenjem ustanovljeno je da postoji linearni odnos između ekstinkcije nevezane boje i količine proteina u postocima. Razlike eksperimentalnih i izračunatih vrijednosti kretale su se od +0,14 do -0,11%.

## Propis kolorimetrijske metode

### Reagensi:

0,05%-tna pufera otopina »Orange G«

»Orange G« boja suši se u termostatu kod 70°C do konstantne težine. 1 g ove boje otopi se u 2 l Mac Ilvaineova pufera.

Mac Ilvaine-ov pufer

Otopina A — 0,2 M dinatrijev fosfat 145 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  p. a. otopi se u 2 l vode oslobođene  $\text{CO}_2$ , 10 ml ove otopine titrira se sa 0,1 N HCL uz kap indikatora metiloranž do boje koju pokazuje 30 ml otopine (sastava: 2,28 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  p. a. i 1,00g NaCl p. a. u 250 ml vode) s istom količinom indikatora. Zatim se otopina A podese tako da kod ponovne titracije troši 20 ml 0,1 N HCl.

Otopina B — 0,1 M limunska kiselina 45 g kristalične limunske kiseline p. a. otopi se i nadopuni vodom do 2 l. 10 ml ove otopine titrira se s 0,1 N NaOH uz fenolftalein. Otopina B se podese tako da troši 30,00 ml 0,1 N NaOH u ponovnoj titraciji. Za održavanje otopina A i B dodaje se 0,1% toluola.

Mac Ilvaine-ov pufer određenog pH priprema se uzimanjem određenih količina otopina A i B. Tako se za 1 litru pufera (pH 2,2) uzima 20 ml otopine A i 980 ml otopine B.

### Pribor:

mikrobireta a 2 ml  
odmjerna tikvica a 2 l  
odmjerna tikvica a 100 ml  
odmjerna tikvica a 25 ml  
pipeta graduirana a 1 ml  
pipeta odmjerna a 25 ml  
magnetska mješalica  
spektrofotometar »Unicam«  
kiveta promjera 1 cm

### Radni postupak:

Količini od 0,75 ml mlijeka doda se 25 ml, 0,05%-tne puferne otopine »Orange G« i miješa 5 minuta na magnetskoj mješalici. Zatim se centrifugira 20 minuta kod 3.000 okretaja. 2 ml centrifugata otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 ml i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Ekstinkcija nevezane boje očita se fotometriranjem kod 4700 Å Fotometriranje se vrši u kivetama promjera 1 cm u »Unicam« spektrofotometru (slijepa proba:  $\text{H}_2\text{O}$  destil.).

Za izračunavanje rezultata potrebno je načiniti baždarni diagram.

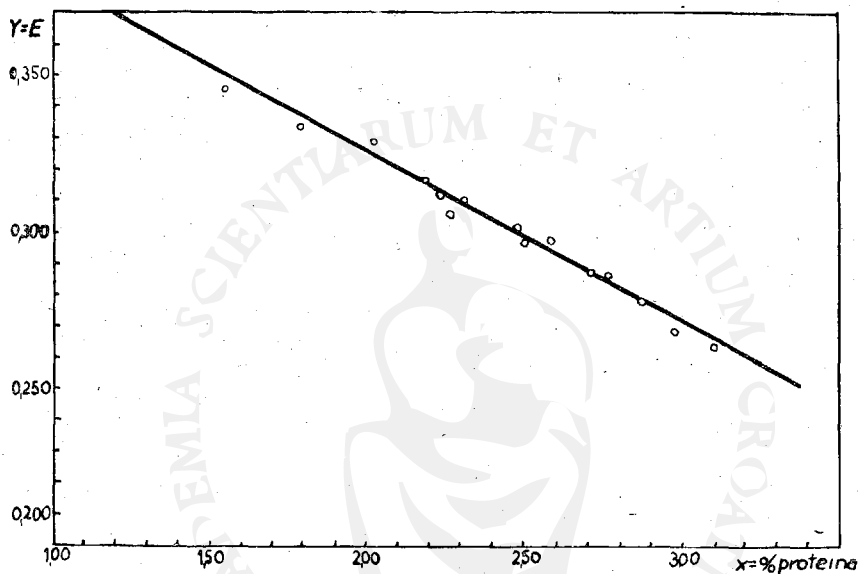
Na idućoj strani dajemo prikaz jednog takvog diagrama:

Pored toga dosta je proširena metoda alkalne destilacije vodenom parom, te ćemo je ukratko opisati. Ovu je metodu objavio Kofranyi god. 1950., a princip je ovaj: zagrijavanjem mlijeka u alkalnom mediju stvara se amonijak, a količina dobivenog amonijaka u uskoj je vezi sa sadržinom proteina u mlijeku.

### Postupak:

U svrhu ispitivanja uzorak mlijeka se ohladi s NaOH, doda se  $\text{BaCl}_2$  i nakon toga se provodi destilacija vodenom parom u destilacionom aparatu po Parnas-Wagneru. Destilacija traje 10 minuta, računajući od momenta kad prodestilira prva kap. Prodestilirani amonijak hvata se u predložak s određenom količinom  $n/40 \text{H}_2\text{SO}_4$ . Ostatak kiseline se

## BAŽDAR NI DIAGRAM



retitrira s  $n/40$  NaOH i na taj način izračuna količina vezane  $H_2SO_4$ . Broj mililitara  $n/40 \cdot H_2SO_4$  vezanih za amonijak množi se s faktorom 0,191 da se dobije sadržina proteina u mlijeku.

Lolkema i Have su god. 1958. proveli ispitivanje proteina u mlijeku ovom metodom. Uspoređivanjem rezultata s Kjeldahlovom metodom dobili su standardnu devijaciju razlike od 0,05%. Kako se pokazalo da je ova metoda tačnija nego druge u Holandiji predložena je kao standardna metoda za određivanje sadržine proteina u mlijeku pri obračunavanju otkupne cijene mlijeka.

### Zaključak:

Iskustva u svijetu, a posebno u Holandiji, pokazala su prednosti novih brzih metoda određivanja proteina u mlijeku, tako da se mnogi laboratoriji danas njima uvelike služe.

Pojedine od ovih metoda, npr. formol titracija, dosta su jednostavne i ne traže nekih posebnih aparatura, tako da se ispitivanje može vršiti i u laboratoriju većih mljekara. Druge, koje zahtijevaju specijalne aparature i veće stručno iskustvo kao npr. metoda po Udy-u, mogu se provoditi u za to osposobljenim laboratorijima.

Smatramo da bi bilo korisno da se i kod nas uvedu neke od ovih metoda za određivanje proteina u mlijeku, tim više, što danas već imamo dobro opremljene centralne institute, koji su u mogućnosti da vrše serijska ispitivanja za mljekarsku industriju.

### Literatura

Vajić B.: Analitika živežnih namirnica I mlijeko i proizvodi od mlijeka Zagreb 1957. (skripta).

»Milchwissenschaft« 13. (1958.) str. 201.

Dairy Science Abstracts 24, (1962.) str. 223.

Grüner-Gentilizza-Filajdić: Kolorimetrijska metoda određivanja proteina u mlijeku s pomoću »Orange G« boje. »Kemija u industriji« god. X br. 7 (1961.)