

### **Mycobacterium tuberculosis:**

u kiselom mlijeku (pH 4—6)	18—21 dan
u sirutki	4—14 dana
u jogurtu i kefiru	14 dana
u maslacu	21 dan
u sirevima	3—28 tjedana

### **Brucella abortus:**

u mlijeku	7— 9 dana
u kiselom mlijeku	9 dana
u jogurtu	8 dana
u kefiru	19 dana
u slatkom i kiselom vrhnju	9 dana
u maslacu	50 dana
u mekim sirevima	35 dana

### **Virus slinavke i šapa:**

u mlijeku kod 17—20°C	27 sati
u vrhnju kod 18—20°C	3 dana
u nesoljenom maslacu iz kiselog vrhnja	nestaje već u vrhnju
u nesoljenom maslacu iz slatkog vrhnja	8 dana

Posebno treba spomenuti mogućnost **reinfekcije** kod svih mlječnih proizvoda, koja je u našim uvjetima vrlo česta. Do reinfekcije dolazi putem nedovoljno očišćenih mlječnih cijevi i boča za mlijeko, bučkalice, stroja za pakovanje i omotne ambalaže kod maslaca, sirnih marama, uređaja za mehaničku obradu, kotlova i kada, kalupa, polica za zrenje kod sira. Reinfekcija je često uzročnik kvarenja okusa pa i grušanja konzumnog mlijeka, jakog razvoja plijesni u maslacu, nadimanja u siru i dr. Prisutni mikroorganizmi u većem broju mogu svojim metabolizmom stvarati znatnu količinu škodljivih tvari, te proizvod učiniti škodljivim i opasnim po ljudsko zdravlje.

### **Literatura:**

1. G. Mocquot—F. Kosikowski: Advances in cheesetechnology, FAO, Rome, 1958.
2. P. Kästli: Beeinflussung der Milchqualität durch die Verwendung von Insektiziden, FAO, 53/11/8673, No 40.
3. A. Seaman: Bacteriology for dairy students, Cleaver-Hume press, London, 1963.

**Mr. ph. Radmilo Jović, Niš**

Hemijski institut Medicinskog fakulteta

## **PRIOLOG PROUČAVANJU PROTEINSKIH FRAKCIJA KRAVLJEG MLEKA**

Proteini mleka su do sada dosta ispitivani. Oni sačinjavaju jedan heterogeni sistem čija je kompleksnost izučavana hemijskim i fizičkim metodama, a u novije vreme i elektroforezom na papiru, mikroelektroforezom, elektroforezom i skrobnom gelu i disk elektroforezom u poliakrilamidu.

Proteini mleka se sastoje iz kazeina, laktoalbumina i laktoglobulina. Laktoalbumini i laktoglobulini sačinjavaju otprilike 1/8 svih belančevina mleka i nazivaju se rastvorljivim belančevinama mleka. Osim ovih frakcija, prema nekim autorima, nalaze se u mleku i imunoglobulini, koji preovlađuju u kolostrumu, ali postoje takođe i u mleku. Oni su kvalitativno identični ali kvantitativno različiti.

Smith je elektroforezom na papiru s puferom veronal natrijuma pri pH 8.4 našao u kravljem mleku šest frakcija: a, b, c, d, e i f. Frakcije a i b predstavljaju globuline (pseudo i euglobuline), frakcija e beta laktoglobulin, dok ostale frakcije c, d i f autor nije identifikovao (1).

Slatter i Van Winkle ispitujući elektroforezom kravlje mleko ustanovili su, da se pri pH 4.5 i 6.6 alfa kazein deli na dve frakcije, a pri pH 4.1 beta kazein se takođe razlaže na dve komponente: beta<sub>1</sub> i beta<sub>2</sub> (2).

A. Sangiori je izučavao promene kolostruma i punog kravljeg mleka elektroforezom na papiru od početka laktacije pa do petog meseca. Nađene su znatne promene kod različitih frakcija kolostruma mleka: neznatno smanjenje gama globulina, a povećanje beta laktoglobulina i alfa laktoalbumina (3). Isti autor je obradio više od 40 uzoraka kravljeg mleka elektroforezom na papiru, pošto je prethodno iz mleka uklonio masti i staložio kazein, a dobiveni proteinski filtrat koncentrisao. Ustanovio je da se elektroforezom izdvajaju četiri frakcije: globulinska, alfa laktoalbuminska, beta laktoalbuminska i albuminska (4).

Biserte i saradnici su izučavali elektroforezom na papiru kazein kravljeg mleka i našli su tri frakcije: alfa, beta i gama kazein. Istovremeno su upoređivali kazein kravljeg mleka s kazeinom različitih mleka i ustanovili su u većini ovih mleka prisustvo dve bitne frakcije: alfa i beta. Isti autori su radili i elektroforezu surutke kravljeg mleka i našli sledeće frakcije: serumalbumini, beta laktoglobulin, alfa laktoalbumin, sastojak X i imunoglobulin. Biserte je radio elektroforezu na papiru punog ženinog mleka s fosfatnim puferom pH 6.2. Prva frakcija, najpokretljivija, predstavlja mešavinu alfa kazeina i serum albumina, druga frakcija odgovara beta laktoglobulinu, a treća frakcija je verovatno sastavljena od mešavine beta i gama kazeina, beta laktoalbumina i globulina (5).

P. Trpinac i saradnici su radili elektroforezu na papiru svežeg nekuvanog majčinog mleka i istog mleka držanog na ledu i ustanovili su, da elektroforegrami pokazuju neznatne promene u odnosu proteinskih frakcija svežeg i hlađenog majčinog mleka.

Deutsch je našao razlike u fracionisanju majčinog i raznih vrsta životinjskog mleka. Elektroforezom mleka raznih životinjskih vrsta dobijaju se različiti elektroforegrami, koji su u doba laktacije za istu životinjsku vrstu isti.

Kazein je složeni fosfoproteid, koji predstavlja 4/5 proteina kravljeg mleka i samo jednu polovinu ženinog mleka. Sam kazein je čvrsto vezan za kalcijum-fosfat, koji pričinjava znatne teškoće prilikom elektroforetskog izdvajanja. Biserte navodi, da kazein kod krava sadržava 0,81% fosfora, dok kod žena 0,47%. Različite frakcije kazeina sadržavaju različite količine fosfora. Biserte je izdvojio u kravljem mleku tri frakcije kazeina i to: alfa, beta i gama frakciju. Upoređujući kazein svežeg kravljeg mleka s kazeinom različitih »veštačkih mleka« koja se upotrebljavaju u dečjoj dijetetici, konstatovao je da većina ovih mleka sadržavaju dve bitne frakcije i to alfa i beta frakciju. Osim ove

tri kazeinske frakcije, prema mišljenju nekih autora, nalazi se u mleku i imunoglobulin (7).

Različitim ispitivanjima nađen je i različit broj proteinskih frakcija u jednom istom mleku. U fosfatnom puferu kod pH 6.9 nađene su četiri frakcije, koje su definisane kao alfa, beta i gama kazein i laktoalbumin.

Aschaffenburg i Drewry su ispitivali frakcije laktoalbumina i laktoglobulina kod različitih vrsta krava i ustanovili da broj beta frakcija nije karakterističan za određenu jednu vrstu krava.

U nekim slučajevima su kod mleka jedne iste vrste krava našli jednu, a katkada dve beta laktoglobulinske frakcije. Isti autori su utvrdili, da se isti broj frakcija nalazi kod mleka krava, koje su jednojajni blizanci. Nasuprot ovome kod dvojajnih blizanaca nađene su različite frakcije za beta laktoglobulin (8). I radovi drugih autora govore o heterogenosti beta laktoglobulina (9). Veliki broj radova namenjen je pitanju hemijskog sastava ovih proteina, osobito pitanju njihove identičnosti s odgovarajućim proteinima, albuminima i globulinima krvi i kolostruma. Globulini krvi i mleka su identični, dok su serumalbumini i laktoalbumini vrlo slični, ali ne i istovetni. Elektroforetskim ispitivanjima je takođe utvrđeno da beta laktoglobulin putuje sporije od serum albumina. Na osnovu ovoga se predpostavlja da mlečna žlezda filtruje globuline mleka iz krvi, a sintetiše laktoalbumine.

Proteini mleka vezuju na sebe kao i proteini seruma mnogo različitih supstanci. Tako je utvrđeno da gvožđe nije vezano za beta laktoglobulin, već za druge globulinske frakcije.

Vandegaer i Miettinen su vršili elektroforezu proteina pasterizovanog i sterilizovanog mleka. Pasterizacija od 15 minuta na 27° ne menja bitno sastav proteina, dok se posle sterilizacije javlja potpuna denaturacija belančevina tako da je razdvajanje u pojedine frakcije nemoguće.

Pošto se u novije vreme elektroforetskim izdvajanjima pod različitim uslovima dobija veći broj frakcija, cilj našeg rada bio je da se ispitaju proteinske frakcije kravljeg mleka iz Niša papirnom i mikroelektroforezom po Kern-u i da se utvrdi njihov broj. Naša dalja ispitivanja bi nastavili elektroforezom mleka u skrobnom gelu.

### **Eksperimentalni deo**

Za naša ispitivanja uzimali smo oko 60 uzoraka kravljeg mleka od Konzumne mlekare u Nišu. Analize su vršene u laktacionom periodu od oktobra do decembra 1964.

Vršeno je razdvajanje frakcija proteina kravljeg mleka elektroforezom na papiru i mlečnog seruma kravljeg mleka mikroelektroforezom po Kern-u.

Papirna elektroforeza je vršena u vlažnoj komori po Grasmann i Hannig-u (11) na sobnoj temperaturi od 18—22°. Kao pufer upotrebljen je veronal natrijum, pH 8.6, jonske jačine 0.1 i fosfatni pufer, pH 6.2, jonske jačine 0.1. Elektroforetsko izdvajanje vršeno je na trakama filter papira Whatman No I (trake 4x30). Nanošenje mleka na trake vršeno je mikropipetom. Razdvajanje frakcija traje 12 sati pri naponu od 140 V. Posle toga vremena trake se vade i osuše na sobnoj temperaturi. Trake smo bojili bromfenolplavim, a odbojanje se vrši ispiranjem 4 puta po 5 minuta u 5% rastvoru sirćetne kiseline. Posle

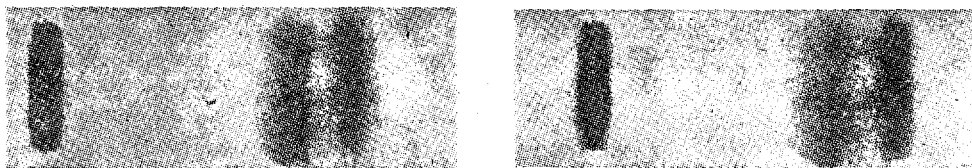
odbojavanja s trake je skinut višak boje, a ostaju obojene samo izdvojene frakcije, koje su eluirane 0.01 N rastvorom NaOH i određen intenzitet eluirane boje spektrofotometrijski.

Mikroelektroforeza je rađena s pomoću aparata za mikroelektroforezu firme »Kern«, čija je konstrukcija zasnovana na metodi Labhard-Staub-a i Lotmar. Kod ovog aparata redukcijom veličine ćelije i elektrodnih sudova redukovana je zapremina proteinskih rastvora i pufera. Čelija ima sledeće dimenzije: visinu 30 mm, a poprečni presek 1.5x5 mm. Za rad na ovom aparatu potrebno je oko 5 ml rastvora proteina i 100 ml pufera (što upoređeno s Tiselius-ovom aparaturom 25 ml, odnosno 1500 ml ili 4—5 mg materijala koji može da se frakcioniše s tačnošću  $\pm 2.5\%$ ).

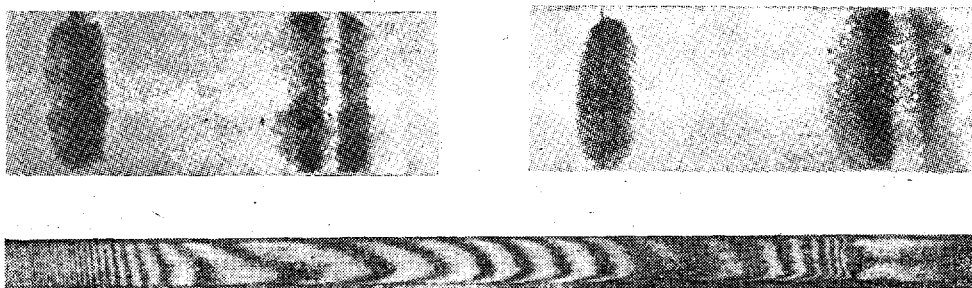
U ovom radu smo osim kvantitativnih promena frakcija proteina pratili i kvalitativne promene (oblik i izgled interferencionih traka).

**P u f e r** — Elektroforetska istraživanja vršena su Michaelis-ovim puferom (Na-veronal-Na-acetat), jonske jačine 0.1, pH 8.6.

**Mlečni serum** — Za analizu je uzimano kravlje mleko odnosno serum ovog mleka. Mleko je centrifugiranjem oslobođeno lipida, zatim je dodavan labferment (himozin) 1—2 kapi/10 ml i posle blagog mućkanja je ostavljeno 1 čas u termostatu na 37°. Centrifugiranjem na 3000 obrtaja u minuti, prvo je odvojen najveći deo kazeina, a posle ceđenja i ponovljenog centrifugiranja na 4000 obrtaja/min. dobiven je opalescentni mlečni serum. Uzorci mlečnog seruma u kojima je koncentracija proteina bila manja od 1,5% morali su prethodno da se koncentruju. Mlečni serum je stavljen u kesicu od celofana i stavljen u struju hladnog vazduha iz fena. Željena koncentracija obično se postizala za 15—20 minuta, tako da za to vreme nije dolazilo do denaturisanja belančevina. Primećeno je izvesno denaturisanje frakcija srednje brzine pokretljivosti, ako se pervaporacija vrši posle dijalize.



Sl. 1 — proteinske frakcije kravljeg mleka  
— papirna elektroforeza —



Sl. 2 — elektroforezogram seruma kravljeg mleka  
— mikroelektroforeza —

Dijaliza mlečnih seruma vršena je 48—60 časova u hladnjaku na  $+4^{\circ}$ , uz najmanje 4—5 izmena pufera u tom vremenu.

Elektroforeze su vršene s naponom od 60 Volti, jačina struje od 3.5 mAmp. Elektroforetski tok u ćeliji traje 40—45 minuta na sobnoj temperaturi ( $18—25^{\circ}$ ), posle čega je vršeno snimanje.

**O b r a č u n a v a n j e** — Iz silaznih grana elektroforezograma crtane su krive gradjenata indeksa prelamanja i iz njih izračunavana relativna procentna koncentracija pojedinih frakcija proteina mlečnog seruma.

Frakcije proteina mlečnog seruma — Mikroelektroforezom na Kern-ovom aparatu postignuto je razdvajanje proteina mlečnog seruma u pet frakcija (sl. 2). Zbog vrlo različitog i neujednačenog obeležavanja pojedinih frakcija proteina mlečnog seruma, odlučili smo da frakcije obeležimo rimskim brojevima, počevši obeležavanje s najmanjim brojem (I) za najbržu frakciju, kao što su to činili i neki drugi autori.

I frakcija — Liči na prealbumine krvnog seruma, a koju jedni autori nazivaju »proteoza« frakcijom, a drugi »proteoza-pepton« frakcijom. Ovu frakciju nismo uspeali da jasno izdvojimo u svim mlečnim serumima u ovom delu laktacionog perioda.

II frakcija — Po obliku interferencionih traka u elektroforezogramu veoma liči na albumine krvnog seruma, pa je mnogi autori nazivaju »serum albuminima«. Ona je bila jasno izdvojena u svim mlečnim serumima.

III frakcija je bila razdvojena u dve frakcije, koje smo obeležili sa IIIa i IIIb, a po pokretljivosti je zauzimala mesto koje u elektroforezogramima zauzimaju alfa globulini u krvnom serumu.

IV frakcija — Po položaju koji zauzimaju u elektroforezogramima proteina mlečnog seruma podseća na Beta-globuline krvnog seruma.

V frakcija — Po položaju interferencionih traka u elektroforezogramu zauzima mesto kao i Gama-globulini krvnog seruma, a koju mnogi autori nazivaju imunolaktoglobulini.

### Rezultati i diskusija

Vršeno je razdvajanje proteina kravljeg mleka papirnom elektroforezom i seruma kravljeg mleka mikroelektroforezom. Elektroforetska određivanja vršena su u svežem mleku, mleku koje je čuvano u frižideru na  $+4^{\circ}$ , kao i u kuvanom mleku. Kako se proteini mleka kuvanjem denaturišu, to se u električnom polju ne razdvajaju na pojedine frakcije, te ih nismo mogli ni odrediti.

Rezultati ispitivanja proteina kravljeg mleka iz Niša papirnom elektroforezom i mikroelektroforezom mlečnog seruma kravljeg mleka dati su u tabeli I i II.

U tabeli I date su granične vrednosti relativnih procenata pojedinih frakcija proteina, koje su dobivene papirnom elektroforezom u laktacionom periodu od oktobra do decembra 1964.

Frakcije smo i ovde obeležili rimskim brojevima, počevši obeležavanje s najmanjim brojem (I) za najbržu frakciju. U prvu frakciju spada:  $\alpha$ -kazein, u drugu:  $\beta$ -laktoglobulin i u treću:  $\beta$ - i  $\gamma$ -kazein, laktoalbumin i globulin.

TABELA I

vrsta mleka	Proteinske frakcije (papirna elektroforeza) u rel. %		
	I	II	III
sveže kravlje mleko	2,98—12,83	21,43—29,54	50,24—71,48

TABELA II

	Proteinske frakcije (mikroelektroforeza) u rel. %					
	I	II	IIIa	IIIb	IV	V
serum	1,90	40,50	4,80	7,80	8,40	17,30
kravljeg mleka	do 2,70	do 47,80	do 6,10	do 9,70	do 14,20	do 25,20

Iz tabele II se vide granične vrednosti relativnih procenata pojedinih frakcija mlečnog seruma kravljeg mleka dobivenih mikroelektroforezom u laktacionom periodu od oktobra do decembra 1964.

Iz graničnih vrednosti koje su date u tabelama I i II može se konstatovati da nisu zapažene pravilnosti u odnosu na broj frakcija kao i na njihov međusobni odnos u vezi sa ovim periodom laktacije.

Iz slike 1 se vidi da papirnom elektroforezom nismo uspeli da dobijemo više od tri frakcije u kravljem mleku. Međutim, mikroelektroforezom uspeli smo da dobijemo pet frakcija u serumu kravljeg mleka, kao što se i vidi iz slike 2.

### Zaključak

Izvršeno je razdvajanje proteinskih frakcija od nekih 60 uzoraka kravljeg mleka iz Niša papirnom elektroforezom i mikroelektroforezom seruma kravljeg mleka u laktacionom periodu od oktobra do decembra 1964. Od svih ispitanih uzoraka kravljeg mleka papirnom elektroforezom samo u 8 slučajeva izdvojene su dve frakcije. Kod svih ostalih uzoraka papirnom elektroforezom izdvojene su tri, a mikroelektroforezom seruma kravljeg mleka izdvojeno je pet frakcija proteina.

Nisu zapažene pravilnosti u odnosu na broj frakcija i njihov relativni odnos u vezi s ovim periodom laktacije.

Dobiveni elektroforezogrami pokazuju neznatne promene proteinskih frakcija svežeg i hlađenog, te se iz ovoga vidi da nema razlike u biološkoj vrednosti što se tiče proteinskih frakcija.

Kuvanjem mleka proteini se denaturišu te se u električnom polju ne razdvajaju na frakcije.

## R É S U M É

### CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DES FRACTIONS PROTÉIQUES DU LAIT DE VACHE

On a fait la séparation des fractions protéiques de cca 60 échantillons du lait de vache de Niš l'électrophorèse à papier et par le microélectrophorèse du sérum du lait de vache pendant la période de lactation du mois d'octobre jusqu'au mois de novembre 1964. De toutes les échantillons du lait de vache examinées par l'électrophorèse à papier, on a séparé, seulement en huit cas, deux fractions. Mais des autres échantillons du sérum du lait de vache examinées par l'électrophorèse à papier, on a séparé trois fractions, et des échantillons examinées par le microélectrophorèse, cinq fractions.

On n'a pas observé les régularités relatives au nombre de fractions et leur connexion relative concernant cette période de lactation.

Les électrophoregrammes obtenus indiquent les changements insignifiants des fractions protéiques du lait frais et réfrigéré.

Quant aux fractions protéiques, on peut remarquer qu'il n'y a aucune différence en valeur biologique.

Les protéines sont dénaturées par la cuisson du lait et elles ne se séparent pas en fractions dans le champ électrique.

#### L I T E R A T U R A

1. Smith, L.: J. Biol. Chem., 1946, 165, 665.
2. Slatter W. L.; Van Winkll P.: J. Dairy Sci., 1952, 25 :1083.
3. A. Sangiorgi: Rivista di Clinica Ped., 1958, 61 :106, 61 :89.
4. G. Biserte, A. Kreton, G. Fontaine: Ann. de Ped., 1955, 7 :73.
5. P. Trpinac, B. Kapetanović, J. Rosić: Arhiv za farmaciju, 1959, 6 :321-325.
6. H. J. Antweiler: Die quantitative Elektrophorese in der Medic., 1952, 51.
7. R. Aschaffenburg, J. Drewry: Nature, 1955, 176-218.
8. R. Aschaffenburg, J. Drewry: Nature, 1957, 180-376.
9. W. Grossman, K. Hannig: Hope Seylers, Zschr.: 1952, 1 :290.
10. P. Trpinac, B. Rotović i O. Bugarski: Arhiv za farmaciju, 1960, 1 :19-22.
11. Z. Trifunac, R. T. Avramov i B. Kapetanović: Arhiv za farmaciju, 1962, 1 :11-15.
12. J. E. Vandegaer, J. K. Miettinen: Acta Chem. Scand., 1953, 7 :1239.

Dipl. inž. Momčilo Đorđević, Novi Beograd

Institut za mlekarstvo Jugoslavije

## PROIZVODNJA I PROMET MLEKA

### Uvod

Istraživanje ove materije obuhvata uglavnom poznavanje obima proizvodnje mleka, potrošnju proizvođačkog stanovništva i količine otkupljenog mleka.

Samo poznavanje obima proizvodnje kao osnove za formiranje tržišnih viškova, povlači za sobom i najnužnije prikazivanje odnosa koji utiču na proizvodnju.