

# UTICAJ TOPLOTNE OBRADJE I DUGOROČNOG USKLADIŠTENJA NA POJEDINE FRAKCIJE PROTEINA U VTS MLEKU <sup>1), 2)</sup>

Ivica VUJIČIĆ i Branka BAČIĆ  
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

## Uvod

Kratkotrajna visoko temperaturna toplotna obrada mleka u cilju sterilizacije izaziva niz hemijskih promena na gotovo svim njegovim sastojcima. U takvom VTS (visoko temperaturno steriliziranom — UHT) mleku hemijske promene se odražavaju i na njegove fizičke osobine kao što su promena ukusa, mirisa i destabilizacije proteina u obliku pojave želiranja i tzv. sedimenta. Pretpostavlja se da su promene na proteinima značajne na stabilnost proteinskog kompleksa i njegovo ponašanje u toku uskladištenja takvog mleka.

Dosadašnja ispitivanja su pokazala da termička obrada mleka zavisi od režima obrade, dovodi do većih ili manjih promena u obliku denaturiranja i delimične degradacije nekih proteina mleka (5, 6, 7, 10). U steriliziranom mleku se redovno susreće sadržaj neproteinskog azota i azota frakcije proteoza i peptona (8). Takođe je utvrđeno, naročito na eksperimentalnim izoliranim mesama pojedinih frakcija proteina mleka, da pod raznim uslovima toplotnog tretmana dolazi do međusobnog reagovanja i stvaranja kompleksa. Takav slučaj formiranja kompleksa pojavljuje se između -laktoglobulina i pojedinih komponenata kazeina (3, 4, 11, 13).

Dosadašnja ispitivanja u oblasti ove problematike uglavnom su izvođena pod različitim eksperimentalnim uslovima. Iz takvih oglada teško se može precizno sagledati stvaran obim promena koji se mogao očekivati da se pojavi u uslovima savremenog dobijanja VTS mleka. Zbog toga jedan od ciljeva naših ispitivanja odnosi se na istraživanje nastalih promena na proteinskom kompleksu izoliranom iz VTS mleka koje je dobijeno takvim toplotnim tretmanom koji je u modernoj proizvodnji toga mleka danas u širokoj primeni.

Drugi problem koji je od izuzetnog značaja za održivost ovoga mleka vezan je za degradativne promene na proteinima u toku uskladištenja. Iz veoma oskudnih dosadašnjih ispitivanja (5) može se pretpostaviti da takvi procesi postoje i da su posledica delovanja verovatno reaktivnih proteoza. Stoga je jedan od zadataka ovih istraživanja bio da se ispita postojanje takve pojave i utvrdi koje od frakcija proteinskog kompleksa mleka su najviše podležne tim promenama.

<sup>1</sup> Ovaj rad je finansiran iz fonda za naučni rad zajednice obrazovanja SAVP, 1969.

<sup>2</sup> Rad podnet na II Jugoslavenskom kongresu u prehrani, Zagreb, 3-5. juni 1969.

## Materijal i metodika

Mleko za ispitivanje bilo je proizvedeno pod uobičajenim proizvodnim uslovima pri jednom od režima kratkotrajne visoke temperaturne sterilizacije (139° C, 2—3 sekunde, indirektno zagrevanje). Sterilizirano mleko je aseptično pakovano u tetra-pak papirnu ambalažu koja je kaširana polietilenskim filmom i aluminiskom folijom. Uzorci mleka su čuvani na sobnoj temperaturi u toku nešto duže od dve godine. Organoleptička ocena i analize takvog mleka su vršene povremeno.

Kazein iz mleka izdvajan je zakiseljavanjem sa sirćetnom kiselinom (10%) i natrijumacetatom (1 N), po 1 ml od svakog reagensa na 10 ml mleka, da bi se dobio pH 4,7 pri čemu se kazein taloži. Surutka odvojena centrifugiranjem korišćena je za dalja ispitivanja tzv. proteina surutke.

Posle odvajanja surutke kazein je tri puta ispiran destiliranom dejoniziranom vodom i centrifugiran na 25.000 o/min. u toku 15 min. Dobijeni kazein je rastvaran u 5 ml 7M uree uz dodatak 1 kapi 2-merkaptetanola. Po postupku El-Negoumy-a (2) rastvor kazeina je nanesen na traku (3 × 15 cm) filter hartije Whatman 3M gde je sušen u struji toplog vazduha. Na isti način su osušeni i proteini iz surutke.

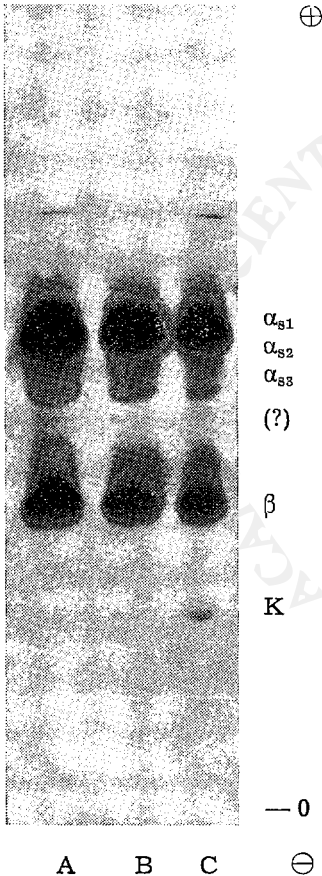
Tako konzervirani proteini na hartiji korišćeni su za elektroforeska ispitivanja. Elektroforeza proteina izvođena je na 7% poliakrilamidnom gelu po postupku koji je opisao Petersen (9). Kao elektrolit korišćen je pufer TRIS (tri-hidroksimetil-metilamin) -Na<sub>2</sub>EDTA (etilendiaminotetrasirćetna kiselina)-boratni pufer u 4,5 M urei (pH = 9,2; u 0,8). Poliakrilamidni gel je pravljen veličine 23 × 12 × 0,3 cm. Elektroforeza je odvijana u toku 24 časa pri konstantnom naponu od 240 V. na temperaturi od 5° C.

## Rezultati ispitivanja

### 1. Promena u kazeinskom kompleksu

Zonalna elektroforeza na poliakrilamidnom gelu predstavlja izvanrednu metodu kojom se dobija čak do 20 različitih frakcija iz kazeinskog kompleksa (12). Na slici 1 prikazane su pozicije većeg broja zona koje se odnose na pojedine kazeine. Takva slika se dobija elektroforezom na poliakrilamidnom gelu kazeinskog kompleksa izoliranog iz svežeg sirovog mleka koji nije pretrpio nikakve degradativne promene.

Kazeinski kompleks koji se izolira iz VTS mleka pokazuje izvesne elektroforeske razlike u odnosu na kazein iz svežeg sirovog mleka. To se veoma lako može zapaziti kada se uporedi izgled i pozicije zona na slikama 2, 3 i 4 prema onima koji se nalaze na slici 1. Iz toga se može zapaziti da kazeinski kompleks iz VTS mleka pokazuje uglavnom dve jasno izražene zone, i to  $\alpha_{s1}$ - i  $\beta$ -kazein. Pri tome se jasno vidi da su iščezle zone  $\alpha_{s2}$ - i  $\alpha_{s3}$ - kazeina kao i zona neidentifikovanog proteina (?) između  $\beta$ - i  $\alpha_{s3}$ -kazeina. Takođe se jasno pokazuje da niz zona koje se normalno pojavljuju i koje se označavaju kao k-kazein uglavnom se gube. No, pri tome treba zapaziti da u svim tim zonama u većem ili manjem obimu se nalazi jedna kontinuirana difuzna traka (slika 2 A — E), slika 3 (B i C), slika 4 (A, B i D). Pored ovoga treba takođe zapaziti da i same zone  $\alpha_{s1}$ - kao i  $\beta$ -kazeina pokazuju značajnu dispergiranosť. Naročito je vredno istaći jako produženu i jasno izraženu zonu koja se nastavlja na  $\beta$ -kazeina i kreće se prema kompleksu  $\alpha_s$ -kazeinima.



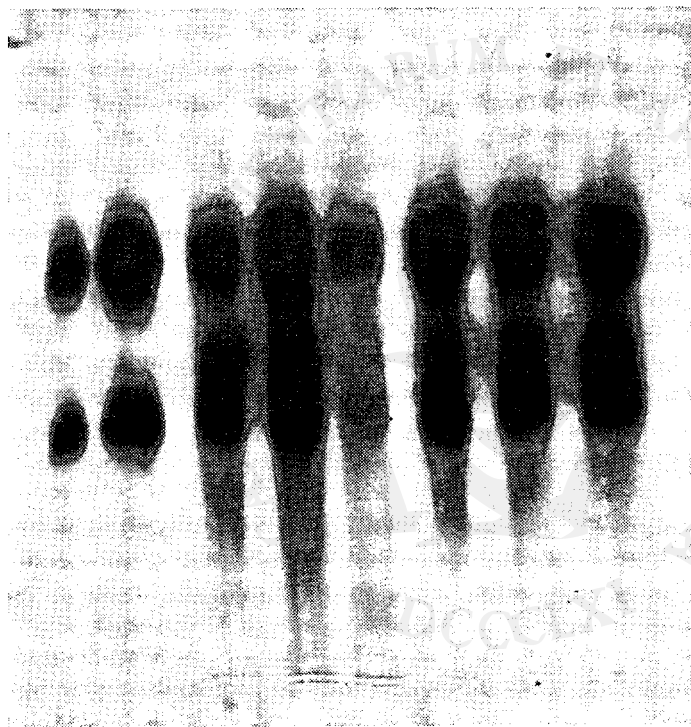
Kada se posmatraju ove promene na kazeinskom kompleksu sa aspekta uskladištenja VTS mleka onda se može zapaziti da su one utoliko više izražene ukoliko je mleko duže bilo čuvano. Na slikama 2 i 4 prikazani su rezultati elektroforeze kazeinskih kompleksa dobijenih iz VTS mleka sa starošću od 1 dana do 28 meseci. Izdužene kontinuirane trake ukazuju na degradativne promene koje se obavljaju u toku čuvanja ovoga mleka na pojedinim frakcijama kazeinskog kompleksa.

Sl. 1 — Pozicija pojedinih zona proteina kazeinskog kompleksa poreklom iz svežeg sirovog mleka od pojedinih krava koje su dobijene elektroforezom na poliakrilamidnom gelu.

## 2. Proteini sedimenta

U toku uskladištenja VTS mleka spontano se izdvaja jedna frakcija koja se taloži na dnu ambalaže obrazujući pri tome tzv. **sediment**. Prema izvesnim literaturnim podacima (1) takav sediment sadrži oko 60—67% proteina u suvoj materiji. Naša elektroforetska ispitivanja proteina iz sedimenta pokazuju da se oni sastoje uglavnom iz 3—4 frakcije, slika 5 (A i B) i slika 6 (B). Elektroforetski najpokretljivija frakcija pojavljuje se na poziciji  $\alpha_{s1}$ -kazeina pri čemu pakazuje redovno veću dispergiranost. Druga frakcija je jednim delom na poziciji  $\beta$ -kazeina A (genetska forma ili varijanta A), a drugim delom pokazuje veću mobilnost te se približava poziciji  $\beta$ -laktoglobulina, slika 5 (poređenje proba A, B prema C). Treća frakcija čija je elektroforetska pokretljivost manja od prethodne dve nalazi se jednim delom na poziciji zone manje pokretljive frakcije proteina krvnog senuma. Neki uzorci sedimenta pokazuju takođe i četvrtu frakciju koja pokazuje najmanju elektroforetsku pokretljivost i nalazi se na poziciji k-kazeina. Sediment takođe pokazuje u nekim slučajevima difu-

znu traku i treba istaći da je uvek utvrđeno da dosta materijala sedimenta ostaje u ishodištu ne pokazujući nikakvu elektroforesku pokretljivost.



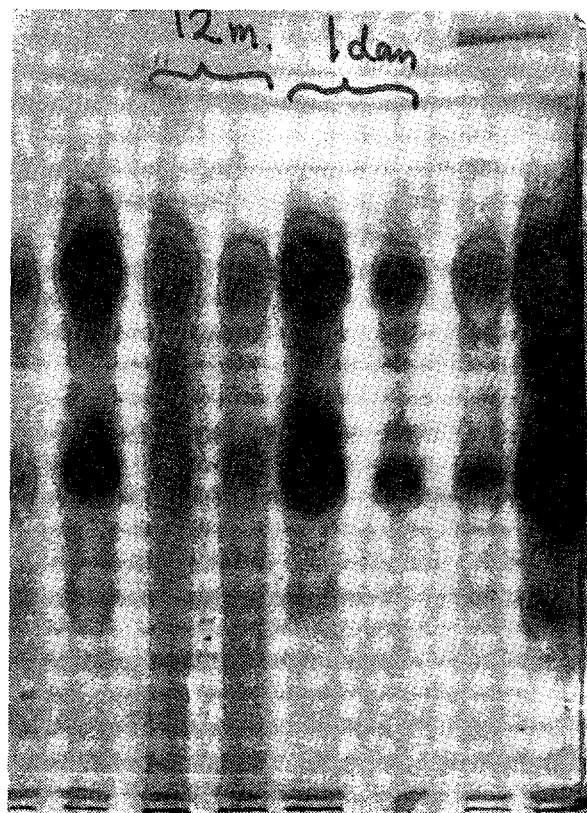
Sl. 2 Pozicije pojedinih zona proteina kazeinskog kompleksa koji je izoliran iz VTS mleka posle različitog trajanja uskladištenja:

- A 24 meseca,
- B 23 meseca,
- C 28 meseci,
- D 5 meseci,
- E 7 meseci i
- F 9 meseci.

Meseci	A	B	C	D	E	F
	24	23	28	5	7	9

### 3. Proteini taloga dobijenog centrifugiranjem i gela iz želiranog VTS mleka

Za VTS mleko je karakteristično da su proteini veoma nagnonjeni destabilizaciji koja u krajnjem slučaju dovodi do potpunog njegovog želiranja. Već pri običnom centrifugiranju VTS mleka lako se iz njega izdvaja veći ili manji talog. U našim ispitivanjima talog smo dobijali centrifugiranjem na 3.000 o/min. u toku 20 minuta. Tako dobijen talog iz neželiranog, kao i gel koji se dobije centrifugiranjem iz želiranog VTS mleka daju elektroforeski gotovo istu sliku proteinskih frakcija. Na slici 3 međusobnim poređenjem uzoraka B i C kao i uzoraka D i E može se zapaziti osnovne dve zone na poziciji  $\alpha_{s1}$ - i  $\alpha$ -kazeina. Takođe treba zapaziti da se kod taloga zona  $\beta$ -kazeina difuzno produžava u pravcu  $\alpha_{s1}$ -kazeina što nije slučaj kod kazeinskog kompleksa koji je izoliran iz istog mleka. Postojanje difuzne trake u slučaju B i C, a koja odsustvuje u slučaju D i E, javlja se kao posledica degradativnih procesa koji su nastali u toku dugoročnog uskladištenja.



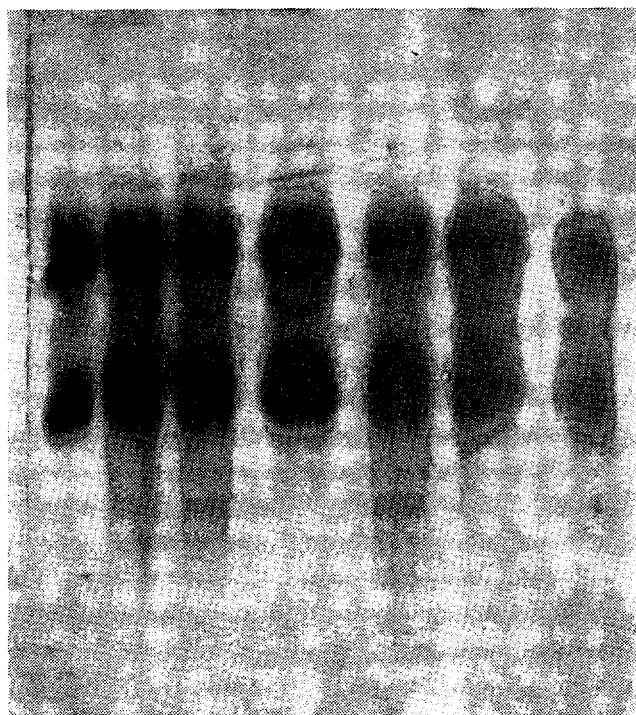
A      B      C      D      E      F  
 S      T<sub>c</sub>      K      T<sub>c</sub>      K      S

Sl. 3 Pozicije pojedinih frakcija proteina koje su dobijene elektroforezom na poliakrilamidnom gelu iz raznih uzoraka mleka:

A i F — kazeinski kompleks koji je izoliran i sirovog (toplotno ne tretiranog) mleka, B — proteini taloga koji je dobijen centrifugiranjem VTS mleka i C — kazeinski kompleks koji je izoliran iz istog VTS mleka posle centrifugiranja i izdvajanja taloga (B), D — proteini taloga koji je dobijen centrifugiranjem VTS mleka i E — kazeinski kompleks koji je izoliran iz istog VTS mleka posle centrifugiranja i izdvajanja taloga (D). U slučaju B i C VTS mleko je uskladištavano 12 meseci, a u slučaju D i E VTS mleko je staro 1 dan.

### Diskusija

Visoka kratkotrajna sterilizacija mleka sa svojim temperaturno-vremenskim režimom koji se koristi industrijski u proizvodnji VTS mleka izaziva izvesne promene na proteinima takvog mleka koje se mogu utvrditi zonalnom elektroforezom na poliakrilamidnom gelu. Kada se posmatraju promene na proteinima kazeinskog kompleksa onda se može konstatovati da u zoni  $\alpha$ -kazeina iščezavaju posle sterilizacije i uskladištenja frakcije  $\alpha_{s2}$ - i  $\alpha_{s3}$ -kazeina. Takođe se gubi i frakcija kazeina do sada neidentifikovana frakcija kazeina (?) koja se normalno pojavljuje između  $\alpha$ -kazeina i  $\alpha_{s3}$ -kazeina. Dosadašnja ispitivanja koja se nalaze u literaturi ne sadrže podatke koji bi nešto detaljnije govorili o načinu ponašanja i eventualno suštini promena koji se odigravaju na ovim frakcijama pri ovakvom tretmanu. No, iz ovih naših ispitivanja jasno proizilazi da se pri takvom tretmanu dešavaju izvesne promene koje se odražavaju na elektroforeskom ponašanju tih proteina. Ovde treba takođe istaći da se na pozicijama tih proteina pojavljuje jedna više-manje izražena difuzna zona.

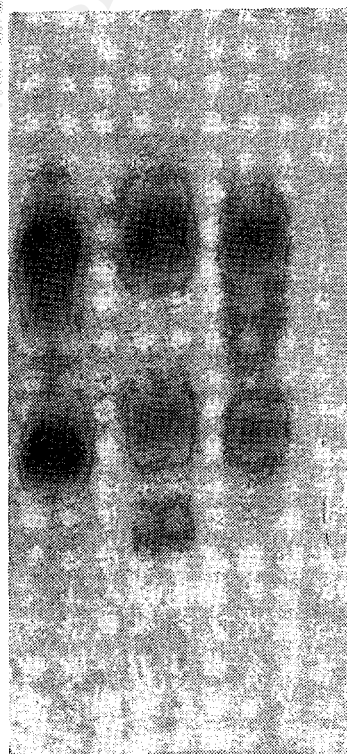


A      B      C      D  
 24    18    1 dan    Ž (kazein)

Sl. 4 Elektroforeska slika proteina kazeinskog kompleksa koji je izoliran iz VTS mleka posle različitog trajanja uskladištenja: A — 24 meseca, B — 18 meseci, C — 1 dan i D — 10 meseci (želirano mleko).

$\alpha_{s1}$  →

$\beta$  →

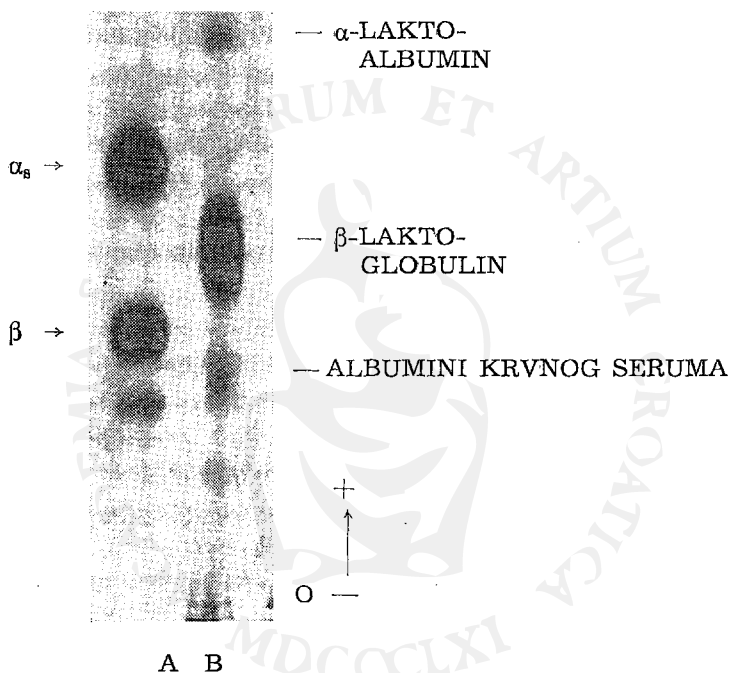


Sl. 5 Pozicije pojedinih zona proteina mleka: A — kazeinski kompleks koji je izoliran iz sirovog (toplotno netretiranog) mleka. B — proteini sedimenta koji je nastao u toku dugoročnog uskladištenja VTS mleka i C — protein iz taloga koji se dobije centrifugiranjem VTS mleka.

Sir  
 $M_1$

Sed.

$T_c$



Sl. 6 Pozicije pojedinih frakcija proteina surutke koji su izolirani iz sirovog (toplotno netretiranog) mleka (B) i proteini sedimenta VTS mleka (A).

U pogledu  $\alpha_{s1}$ -kazeina može se zapaziti da se on pojavljuje uvek s nešto većom izraženom difuznošću zone pri čemu se naročito ističu frakcije koje pokazuju nešto veću elektroforetsku pokretljivost. Sličan slučaj je utvrđen i sa  $\beta$ -kazeinom. Kod ovih proteina primećuje se naročito veća dispergiranošć zona u slučajevima kada je VTS mleko duže čuvano.

Sudeći po tome da k-kazein gotovo iščezava posle toplotne obrade i uskladištenja može se zaključiti da se na ovom kompleksu proteina očito dešavaju izrazite promene.

Za promene na proteinima koje se mogu utvrditi u VTS mleku posle dužeg uskladištenja karakteristično je da su one samo jednim delom izazvane u toku sterilizacije. Dobar deo tih promena prouzrokovan je u toku uskladištenja najverovatnije delovanjem reaktiviranih proteolitičkih enzima.

Iz ovog proizilazi da VTS mleko nije pošteđeno izvesnih proteolitičkih promena u toku dužeg čuvanja. U tom pogledu je za verovanje i moglo bi se pretpostaviti da mikrobiološki kvalitet ili bolje rečeno potencijalni proteolitički aktivitet sirovog mleka može da utiče na krajnji kvalitet VTS mleka.

Između proteina sedimenta koji se dobije centrifugiranjem iz neželiranog mleka i gela iz želiranog mleka ne postoje neke bitne i velike razlike. Međutim, proteini sedimenta koji se formiraju spontanim taloženjem na dnu ambalaže u toku dužeg čuvanja pokazuju da se bitno razlikuje od njih. To jasno

ukazuje da taj sediment nije povezan sa procesom želiranja VTS mleka. Takođe može se zaključiti da proces želiranja predstavlja jedan kontinuirani proces destabilizacije koji nije posledica samo poremećaja zone ravnoteže nego i promena na proteinima.

### Zaključak

Ispitivanja promena proteina u VTS mleku uz primenu zonalne elektroforeze na poliakrilamidnom gelu pokazala su ovo:

1. primenom zonalne elektroforeze na poliakrilamidu može se otkriti niz promena na proteinima mleka koji nastaju pri termičkoj obradi i u toku dužeg uskladištenja VTS mleka;
2. utvrđeno je da se pojavljuju znatne promene na  $\alpha_{s2}$ - i  $\alpha_{s3}$ - i k-kazeina koje se odražavaju na njihove elektroforeske osobine. Ovi proteini gotovo potpuno iščezavaju te se ne mogu naći njihove zone na gelu;
3. dobijeni rezultati pokazuju da na VTS mleku nisu izazvane neke veće promene na  $\alpha_{s1}$ - i  $\beta$ -kazeina koje bi se mogle otkriti elektroforezom. Međutim, zapaženo je da se zona tih proteina znatno povećava pokazujući jednim delom veću elektroforesku pokretljivost i difuznost;
4. kod želiranog VTS mleka proteini gela ne pokazuju elektroforesku razliku u odnosu na ove proteine koji se izdvoje u talogu iz neželiranog mleka pri centrifugiranju (3.000 o/min. 20-minuta). Međutim, sediment koji se spontano obrazuje u toku dužeg uskladištenja po proteinskom sastavu razlikuje se od gela i centrifugalnog taloga;
5. promene u proteinima VTS mleka su samo jednim delom posledica termičke obrade pri sterilizaciji. Ispitivanja jasno pokazuju na dobar deo promena u toku dužeg uskladištenja tog mleka, odakle bi se moglo pretpostavljati da su te promene posledica aktivnosti reaktivnih proteolitičkih enzima.

## CHANGES ON PROTEINS OF UHT STERILIZED MILK INDUCED BY HEAT TREATMENT AND STORAGE

I. F. VUJIČIĆ, Branka BAČIĆ

### Summary

Fresh UHT sterilized milk and during the 28 month storage (20° C) has been examined by the polyacrylamide gel electrophoresis in order to follow changes on proteins. Electrophoretic patterns show that the minor proteins  $\alpha_{s2}$ -,  $\alpha_{s3}$ -casein and unidentified fraction occurring between these proteins and -casein disappear after sterilization and in the course of storage as well. Remarkable changes have been found on the bands of k-casein and dispersed bands and  $\alpha_{s1}$ -casein. These alternations were as much as the storage was longer.

A sediment obtained by centrifugation (3000 rpm/20 min.) from ungelified milk and gel protein fraction separated from gelified milk consist of the same protein components. But, the sediment formed spontaneously during the storage of the UHT sterilized milk is distinguished from them by the other protein fractions.