

ISPITIVANJE PROTEOLIZE U HLAĐENOM SIROVOM MLEKU*

Ivica F. VUJIČIĆ,
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

U v o d

Na osnovu brojnih literaturnih izvora u našoj prethodnoj studiji (1, 2) istaknuto je da su u savremenoj tehnologiji proizvodnje mleka obavezna primena hlađenja i produžavanje čuvanja sirovog mleka do prerade doveli do korenitih promena u mikrobiološkom i tehnološkom kvalitetu mleka. Osnovne promene mogu se između ostalog obeležiti kao preovlađivanje psihofilnih bakterija sa proteolitičkim i lipolitičkim metabolitskim osobinama. Pojava proteolize u sirovom mleku kao i rezidualno delovanje nakupljenih termostabilnih proteinaza u proizvodima kao što je UHT-mleko i neki drugi trajni proizvodi predstavlja izuzetan praktički značaj. Budući da je direktno određivanje broja bakterija, psihofila i proteolita spor i skup postupak to se ispitivanje mogućnosti ocene proteolitičkog biopotencijala na osnovu metabolitičke aktivnosti postavlja kao jedan od puteva da se pronađe neki jednostavniji, brži i jeftiniji postupak. Stoga je cilj ovoga rada bio da se u tom smislu ispitaju metodološke mogućnosti i izvrše izvesni eksperimenti.

Metodološki problemi ispitivanja proteolize u mleku

Osetljivost pojedinih metoda koje se koriste za određivanje proteolize proteina je veoma teško oceniti.

Metode za određivanje proteolize se osnivaju na određivanju mnoštva različitih produkata razgradnje proteina te se izbor najbolje odnosno najpogodnije metode mora prilagoditi i usaglasiti sa specifičnostima proteolize proteina koji se ispituje.

Metoda **Hull**-a (3) i **Rosen**-a (4) koje se koriste za određivanje opšteg opsega proteolize smatraju se veoma osetljivim te se često upotrebljavaju za određivanje sposobnosti bakterija da izazivaju hidrolizu proteina. **Hull**-ova metoda je u osnovi kolorimetrijska metoda za određivanje tirozina, a **Rosen**-ova metoda je za određivanje slobodnih alfa-amino kiselina. Upotreba ninhidrina za kolorimetrijsko određivanje hidrolize proteina koju izazivaju bakterije nije pokazala dobre rezultate, **Fish** (5). Naime, odnos između količine neproteinskog azota (NPN) i ninhidrinskog broja je veoma varijabilan i zavisao od tipa proteolize kod pojedinih bakterija. Zbog toga se ne preporučuje.

* Rad referiran na V. Jugoslovenskom međunarodnom simpoziju u Portorožu, 16—18. aprila 1973.

Kolorimetrijsko određivanje s pomoću boja koje stvaraju kompleks sa proteinima takođe je korišćeno za praćenje proteolize. **Hammond i sar.** (6) su koristili u tu svrhu orange G i našli da je faktička osetljivost te metode pri potpunoj hidrolizi proteina daleko manja u odnosu na metode **Hull-a** i **Rosen-a**. Međutim, oni su utvrdili da kada se radi o delimičnoj proteolizi, ta metoda sa orange G ima prednost uprkos manjoj potencijalnoj osetljivosti, u odnosu na spomenute metode koje su zasnovane na određivanju amino kiselina kao produkata proteolize.

Ta prednost se sastoji u tome što ova metoda može da pokaže smanjenje u adsorpciji boje pri vrlo blagoj hidrolizi jedne ili više peptidnih veza, gde i ne dolazi do oslobađanja amino kiselina.

Određivanje neproteinskog azota (NPN) pošto se proteini stalože sa trihlor-sirćetnom kiselinom je najčešće primenjivan način za merenje stepena proteolize proteina. Ovom metodom se dobija kvantitativan uvid u obrazovanje NPN što je uglavnom zadovoljavajuće kada se radi o hidrolizi samo jedne vrste proteina. Međutim, u složenim biofluidima kao što je mleko, gde ima više različitih proteina, nešto bolja slika efekta i specifičnosti proteolize može se dobiti elektroforezom. **Fox** (7) ističe da dobijene promene u elektroforetskim osobinama su mnogo osetljivije nego što su promene u sadržaju NPN.

Upotreba formolne titracije (formolni titar ili broj) je takođe jedan od mogućnosti za praćenje proteolize u mleku. **Pijanowski** (8) je nešto modifikovao poznatu metodu formolne titracije mleka u cilju praćenja produkata proteolize mleka. On je utvrdio da se formolni titar sirovog mleka u toku čuvanja povećava.

Sopstvena ispitivanja

1. Materijal i metodika

Uzorci sirovog mleka skupljeni su sa pojedinih farmi neposredno posle muže ili pri prijemu mleka u Novosadskoj mlekari. Uzorci su odmah hlađeni, analizirani, a zatim čuvani na temperaturama prema šemi oglada.

Za praćenje proteolize u sirovom mleku korišćene su ove metode:

- (1) kolorimetrijska metoda sa amidnim crnilom 10B kao reaktivnom bojom i s pomoću aparata Pro-Milk Mk II koji inače ima posebno prilagođen protočni kolorimetar za kvantitativno određivanje proteina (9);
- (2) formolni titar (broj) određen je po standardnoj metodi uz dodatak 0,4 ml zasićenog rastvora kalijum oksalata na 10 ml mleka koju je inače dao **Pyne** (10). Formolni titar u ovome radu predstavlja broj ml 0,1n NaOH upotrebljenih za formolnu neutralizaciju 10 ml mleka, a izražen je u obliku indeksa. Uporedo s proteolizom praćene su organoleptičke osobine mleka.

2. Rezultati ispitivanja i diskusija

Polazeći od prethodnih razmatranja o opštim mogućnostima praćenja proteolize mi smo u ovom radu odabrali dve metode za koje smo smatrali da su najpogodnije da se prilagode rutinskom ispitivanju i to kolorimetrijsku sa amidnim crnilom i formolni titar. U tabeli 1 i 2 pokazane su promene % transmisije kao merila proteolize u toku čuvanja sirovog mleka na raznim temperaturama. Opadanje vrednosti % transmisije pokazuje pojavu i intenzitet proteolize.

Rezultati pokazuju da je pojava proteolize u pojedinim ogledima bila različita. Uglavnom da nije došlo do promena u toku prva dva dana čuvanja na 5°C. Veličina promene % transmisije je dosta mala 1—2% do prvih 7 dana čuvanja. Tek kod dugoročnog čuvanja do 27 dana (5°C) pokazala se veća razlika, oko 6%. Da bi sagledali uticaj intenzivnijeg procesa proteolize dodavali smo sirilo. U takvom jednom ogledu u tabeli 2 posle povećanja % transmisije u početku došlo je do velikog pada za oko 10% u toku 7 dana.

Naša ispitivanja proteolize s pomoću formolne titracije u tri serije ogleda pokazala su da se dobijaju povećane vrednosti formolnog titra sirovog mleka u toku čuvanja na 5°C, tabela 3. Ta povećanja nisu velika i iznose oko 1 do 5% u toku prvih 24 sata čuvanja, a kod nekih uzoraka nije došlo uopšte do povećanja. Nadalje se takođe pokazalo da se ta vrednost prvih dana povećava, ali docnije posle 2—3 dana ili se ne menja ili naginje ka opadanju.

Tabela 1.

Kretanje % transmisije kao pokazatelja proteolize kod mleka u pojedinim ogledima na temperaturama 5 i 10 C zavisno od trajanja čuvanja

Dani	Temperatura uskladištenja mleka i oznaka ogleda					
	5°C			10°C		
	I	II	III	I	II	III
0	40,0	42,0	44,0	40,0	42,0	44,0
2	40,0	40,0	44,0	40,0	40,0	44,0
4	40,0	40,0	44,0	40,0	40,0	42,0
14	39,0	30,0	—	—	—	—

Tabela 2.

Uticaj temperature i dodatak sirila na proteolizu u toku čuvanja mleka odnosno na promene % transmisije

Trajanje čuvanja (dana)	Mleko na 5°C	Mleko sa dodatkom sirila na 20°C	Mleko na 20°C
0	37,5	39 ⁽²⁾	37,5
1	37,5	46,5	37,5
5	37,5	29	29
7	37,5	27,5	35
27	31,5 ⁽¹⁾	10	22

(1) — Od 7. do 27 dana mleko čuvano na 20°C

(2) — Posle 15 minuta delovanja sirila; pre dodavanja sirila ta vrednost je iznosila 37,5.

Poređenje dobijenih rezultata sa organoleptičkim promenama u prvom redu ukusa i mirisa, može se utvrditi da su organoleptičke promene bile znatno izraženije. To se može smatrati posledicom uporednih promena i na drugim sastojcima mleka.

Merne promene u % transmisije i formolnog titra su dosta male što je svakako posledica i male proteolize. Ipak, ako se međusobno uporede može se videti da su promene u formolnom titru nešto uočljivije u toku 1—2 dana, što bi značilo da bi ova metoda bila prikladnija za ovu svrhu ispitivanja.

Tabela 3.

Srednja vrednost povećanja formolnog titra u procentima od početne vrednosti (100) za četiri serije oglada u toku čuvanja (5°C)

Trajanje čuvanja (dan)	Serije oglada		
	I	II	III
0	100	100	100
1	103	105	102
2	107	113	103
3	110	—	103
5	—	107	—
6	—	109	103
7	112	—	—
8	110	101	—

Zaključak

Iz prednjih ispitivanja mogu se izvesti ovi zaključci:

- (1) od niza mogućnosti dokazivanja i praćenja proteolize u sirovom mleku dve metode bi mogle biti od posebnog značaja za rutinsku kontrolu i to kolorimetrijska metoda sa amidnim crnilom i formolna titracija;
- (2) ispitivanja ukazuju na nešto bolju mernu osetljivost formolne titracije u odnosu na korišćenu kolorimetrijsku metodu i tehniku;
- (3) ispitivanja pokazuju da postoji mogućnost, ali da je još otvoreno pitanje kolika je osetljivost ovih metoda i veličina promena koje se mogu utvrditi i imaju praktičnu vrednost. U tom smislu trebalo bi izvesti niz daljih ispitivanja.

A STUDY ON THE DETECTION OF PROTEOLYSIS IN REFRIGERATED RAW MILK

Summary

Various methods for the detection of proteolysis were discussed in a great detail. Two methods considered the most convenient for routine work were used in following the proteolysis in refrigerated raw milk: (a) a colorimetric method (amido black 10B) adapted to the procedure for Pro-Milk Mk II apparatus (9) and (b) a formol titration method (10).

The results indicate that the proteolysis occurring in stored refrigerated raw milk can be followed by these methods. The sensitivity of formol titration is slightly superior to the colorimetric method, but it is not yet clear whether the sensitivity found is sufficient practical control.

Literatura

1. Vujičić, I. (1972): Neki teorijski i praktični aspekti proteolize u hladnom sirovom mleku. — *Mljekarstvo* 22 (11).
2. Vujičić, I. (1972): *Mleko*, 303 str. Univerzitet u Novom Sadu.
3. Hull, M. E. (1947): *J. Dairy Sci.* 30 881.
4. Rosen, H. (1957): *Arch. Biochem. Biophys.* 67 10.
5. Fish, J. C. (1969): *J. Dairy Sci.* 52 2039.
6. Hammond, E. G., Seals, R. G., Reinbold, G. W. (1966): *J. Dairy Sci.* 49 (5) 504—506.