

PRIOLOG RJEŠAVANJU ANALITIČKE KONTROLE BJELANČEVINA U MLIJEKU PRILIKOM OTKUPA*

Matilda GRÜNER i Mirko FILAJDIĆ
Tehnološki fakultet, Zagreb

Otkup mlijeka provodi se, gotovo u cijelom svijetu prema količini masti. Za proizvođača mlječnih prerađevina međutim, važna je i količina bjelančevina u mlijeku. To nije značajno samo s prehrambeno-biološkog već i s komercijalnog gledišta, jer se od mlijeka s većom količinom bjelančevina dobiva i veća količina sira.

U našim zakonskim propisima nema nikakvih odredaba o kontroli količine bjelančevina u mlijeku, pa se ona pri otkupu mlijeka i ne određuje. To je manjak kontrolne službe. U slučajevima kad su potrebni podaci o količini bjelančevina, oni se u laboratoriju gotovo uvijek određuju po Kjeldahlovoj metodi. Ta metoda, iako precizna, ima i nedostataka; dugotrajna je, pa zbog toga i nije prikladna za brze rutinske analize.

Kod otkupa mlijeka neobično je važno upotrijebiti analitičku metodu koja je brza, jeftina, a ipak dovoljno točna.

U literaturi je opisan velik broj metoda, koje se lako i brzo izvode. Jedna od tih je i metoda »formol titracije«. Popriličan broj modifikacija ove metode (1—4) ukazuje na to, da ona ne daje zadovoljavajuće rezultate.

Manju su primjenu našle metode koje se temelje na taloženju bjelančevina s pomoću soli teških kovina (HgCl_2) (5) ili na primjeni Esbachovog reagensa (6) kao i metoda fluorescencije (7).

Pri određivanju bjelančevina mlijeka, mnogo se upotrebljavaju metode koje se temelje na kolorimetrijskom određivanju. Tako bjelančevine mlijeka s dušičnom kiselinom (uz naknadno zaluženje) daju ksantoproteinsku reakciju, tj. žuto obojenje (8). Intenzitet nastale boje proporcionalan je količini bjelančevina. Nadalje, bjelančevine pri grijanju uz lužinu i CuSO_4 daju ljubičasto obojenje (biuret reakcija). Nakon petnaest minuta mjeri se intenzitet boje koji je proporcionalan koncentraciji boje (9). Neslerov reagens također se može primijeniti za kolorimetrijsko određivanje (10). Metoda se temelji na razaranju organske tvari s pomoću H_2SO_4 uz vodikov peroksid, a reakcioni su proizvodi praktički bezbojni. Nakon razređivanja vodom, neutralizacije s NaOH i ponovnog razrjeđivanja dodaje se Neslerov reagens i mjeri intenzitet žutog obojenja.

Od svih kolorimetrijskih postupaka, najveću su primjenu našle metode određivanja bjelančevina s pomoću bojila Orange G i amido crnila 10 B (11—29).

Princip ovih metoda temelji se na činjenici da se kod niskog pH molekule bjelančevina nalaze kao viševaljani kationi koji tvore netopljiv kompleks s anionskim bojilom Orange G ili amido crnilom 10 B kada ih se dodaje u suvišku. Bojilo taloži bjelančevine u proporcionalnoj količini s brojem aktivnih bjelančevinskih bazičkih skupina i zato je proporcionalno ukupnim bjelančevinama.

Postoji čitav niz modifikacija ovih metoda, a sastoj se u utvrđivanju optimalnih uvjeta kolorimetrijskih postupaka s obzirom na pH, količinu bojila, odnosno količinu mlijeka.

* Referat sa XI seminara za mljekarsku industriju, Zagreb, Tehnološki fakultet, 6—8. II 1973.

U našem laboratoriju primijenili smo metodu određivanja bjelančevina mlijeka s pomoću bojila Orange G, jer je vrlo brza (traje samo 35 minuta) nasuprot klasičnom mikro Kjeldahlovom postupku koji traje najmanje 90 minuta. Njome se mogu ispitivati uzorci svježeg mlijeka kao i uzorci mlijeka u prahu. Najveće razlike između »izračunatih i analitičkih« vrijednosti iznosile su od 0,14 %—0,11 % bjelančevina, a to je za praksu zadovoljavajuće.

Osim ove metode, u našem smo laboratoriju također primijenili metodu od Haugena. Princip Haugenove metode se sastoji u tome da se na traku filter papira (Whattman 1 ili Schleicher & Schül No. 2043 b) nanese 0,05 ml mlijeka u obliku kapi. Nakon sušenja, bjelančevine mlijeka se fiksiraju u otopini sublimata, a zatim boje s amido crnilom 10 B. Nakon ispiranja suviška bojila, zaošlo bojilo se eluira s otopinom Na_2CO_3 . Intenzitet boje eluata upravno je proporcionalan koncentraciji bjelančevina, i mjeri se na fotometru pri 530 nm.

Ovu smo metodu modificirali tako, da smo za eluiranje bojila upotrijebili 0,1 N otopinu NaOH, umjesto metanolne otopine Na_2CO_3 , i time skratili postupak eluiranja od 24 sata na 30 minuta. Intenzitet boje eluata mjeri se također pri 530 nm. Da bi se provjerila točnost metode izvršena su usporedna određivanja bjelančevina po standardnoj Kjeldahlovoj (mikro) metodi, a zatim su postignuti rezultati statistički obrađeni. Jednadžba regresije izračunata je tehnikom najmanjih kvadrata i ona za Haugenovu metodu glasi:

$$y = 0,378 + 14,186 x$$

a modificirana metoda glasi:

$$y = 0,627 + 7,2841 x$$

gdje je »x« postotak bjelančevina određen po Kjeldahlovoj metodi, a »y« srednja vrijednost 6 očitanih ekstinkcija. Prosječna relativna pogreška iznosi za obje metode 10 %, to je za praksu zadovoljavajuće.

Zaključak

Iskustvo u našem laboratoriju pokazalo je da se u kontroli bjelančevina mlijeka mogu, osim Kjeldahlove metode, primijeniti i druge metode čija je točnost manja, ali za praksu zadovoljavajuća.

Smatramo da je opisana modifikacija Haugenove metode, zbog svoje jednostavnosti i brzine izvođenja, pogodna za izvođenje serijskih analiza pri otkupu mlijeka na terenu. Prednost joj je i u tome što se uzorci na terenu pipetom nanose na trake filter papira, koje se zatim suši i osušene šalje u laboratorij na analizu. Količina uzorka mlijeka je neznatna, a transport daleko jednostavniji. Osim toga, takvi se uzorci mogu dulje vrijeme čuvati.

Literatura

- 1) Pool, J. F. A. (1923): Chemical Abstracts 17, 2331.
- 2) Pizzorno, N. L. (1951): Determination of milk protein. Chemical Abstracts 46 3173 (1952).
- 3) Schulz, M. V., Voss, E. & Kock, U. (1954): Proteintiter determination. Chemical Abstracts 48 13111 (1954).
- 4) Dudenkov, A. (1959): Molochnaya Prom. 20 (12) 37—39.

- 5) Martin, A. I. & Bordeianu, C. V. (1928): *Bul. Soc. Chim. Romania* **9** 76—85.
- 6) Charles, F. & Crowley, J. (1932): A simple method for the analysis of protein in milk. *Chemical Abstracts* **26** 2528 (1932).
- 7) Konev, S. V. & Kozumin, I. (1959): Determination of protein in milk and similar fluids. *Chemical Abstracts* **54** 6699 (1960).
- 8) Burniana, L. (1933): A new method for determining the protein content of milk. *Chemical Abstracts* **28** 1413 (1934).
- 9) Molnar, M. (1948): *Magyar Kem. Lapja* **3** 428—430.
- 10) Golob, W. (1927): *Z. anal. Chem.* **70** 119—128.
- 11) Steinshold, K. (1957): A colorimetric method for the determination of protein in milk, *Chemical Abstracts* **53** (15) 14369 (1959).
- 12) Raadsveld, C. W. (1958): The rapid estimation of the protein content of milk. *Chemical Abstracts* **53** (16) 15402 (1959).
- 13) Alais, C., Ribadeau—Dumas, B. & Saint—Lebe, L. (1961): Reaction of milk proteins with amido black. Application to the rapid estimation of nitrogenous constituents in milk. *Dairy Sci. Abstr.* **24** (1) 52 (1962).
- 14) Andersen, J. O., Jacobsen, I. & Winther, J. E. (1962): Estimation of milk protein content by some rapid methods. *Dairy Sci. Abstr.* **25** (1) 38 (1963).
- 15) Johnsen, O. & Hadland, G. (1961): Amido black method with direct measurement of colour and automatic recording of protein content. *Dairy Sci. Abstr.* **25** (2) 85 (1963).
- 16) Vogt, K. F. (1962): The amido-black method for the determination of total protein in milk. *Dairy Sci. Abstr.* **25** (2) 85 (1963).
- 17) Solberg, P. (1962): Norwegian contributions to the development of the amido black method suggested by Schober & Hetzel for the estimation of protein in milk and milk products. *Dairy Sci. Abstr.* **25** (4) 170 (1963).
- 18) Heidler, W. & Heidler, G. (1963): Colorimetric estimation of the protein content of milk with amido black 10 B. *Dairy Sci. Abstr.* **25** (10) 439 (1963).
- 19) Haugen, A. E. (1963): Colorimetric method of protein estimation in milk. *Dairy Sci. Abstr.* **25** (11) 486 (1963).
- 20) Posthumus, G. & Klijn, C. J. (1964): Automatic recording apparatus at the milk protein laboratory of the G. O. Z. *Dairy Sci. Abstr.* **26** (10) 503 (1964).
- 21) Hashimoto, Y., Arima, S. & Saito, Z. (1964): The determination of the protein content of milk by the colorimetric amido black method. I. Effect of dye solution. *Dairy Sci. Abstr.* **27** (4) 188 (1965).
- 22) Velilla, P., Carballido, A. & Valdehita, M. T. (1964): Colorimetric methods of estimating protein in foods. *Dairy Sci. Abstr.* **28** (1) 47 (1966).
- 23) Radcliffe, J. C. (1968): Use of recording spectrophotometer for amido black milk protein determinations. *Dairy Sci. Abstr.* **31** (2) 103 (1969).
- 24) Perotti, L. & Fornaroli, D. (1967): Determination of milk proteins: comparison of 3 analytical methods. *Dairy Sci. Abstr.* **31** (2) 103 (1969).
- 25) Fúster Monescillo, C. (1968): Rapid determination of milk proteins by the amido black method. *Dairy Sci. Abstr.* **31** (10) 598 (1969).
- 26) Thomasow, J., Mrowetz, G. & Delfs, E.-M. (1971): Determination of the protein content of milk according to the amido black method using the Pro-Milk-Automatic instrument. *Dairy Sci. Abstr.* **34** (1) 92 (1972).
- 27) Zwierzchowski, L. & Michalak, W. (1971): Effect of stage of lactation on contents of some milk constituents. I. Binding capacity of major milk proteins for amido black 10 B. *Dairy Sci. Abstr.* **34** (4) 338 (1972).
- 28) Michalak, W. & Zimakowska, D. (1971): Effect of amido black 10 B concentration in reagent on results with the Pro-Milk apparatus, their comparability with those of the Kjeldahl method and a standard curve based on casein solutions. *Dairy Sci. Abstr.* **34** (4) 344 (1972).
- 29) Udy, D. (1956): A rapid method for estimating total protein in milk. *Nature* **178** 314—315.