

# ELEKTROFORETSKA ISPITIVANJA PROTEINA MLEKA U PRAHU DOBIJENIH RAZLIČITIM POSTUPCIMA

Dr Marijana CARIC, Dragoljub GAVARIC dipl. ing.  
Tehnološki fakultet, Novi Sad

## Uvod

Poznato je da tokom operacija koje se odvijaju na povišenim temperaturama u tehnološkim procesima prerade mleka dolazi do izvesnih ireverzibilnih promena komponenata mleka, pre svega proteina, zatim laktoze i dr U zavisnosti od temperaturnog režima (visina temperature, vreme delovanja) je i intezitet nastalih promena. Danas postoje podaci o interakciji  $\beta$  — laktoglobulina i  $\alpha$  — kazeina (13), o denaturaciji (17), o interakciji proteina i laktoze Maillard-ovoj i drugim reakcijama (1, 2) komponenata mleka na povišenim temperaturama. Većina ovih promena uzrokovanih temperaturom utiču na tehnološki, odnosno nutritivni kvalitet proizvoda (15).

Grupa autora iz Švajcarske (6) je uz pomoć ultracentrifuge i elektronskog mikroskopa ustanovila da kod termički tretiranih proizvoda dolazi do povećanja sadržaja kazeina i smanjenja sadržaja serum proteina što objašnjavaju stvaranjem kompleksa serum proteina ( $\beta$ —laktoglobulina) i kazeina pri povišenoj temperaturi. Ta pojava se primećuje već pri pasterizaciji, naglašenija je kod uperizacije, a najviše izražena kod sterilizacije. U literaturi se takođe navodi (10; 11) da više temperature pasterizacije mleka od koga se proizvodi prah aktiviraju sulfhidrilne grupe koje smanjuju redoks potencijal i deluju kao antioksidansi masti tokom skladištenja mleka u prahu. U tom smislu Voss et. al. (16) predlažu da se kao pokazatelj kvaliteta mleka u prahu koristi indeks proteina surutke, mg N nednaturisanih proteina surutke/g obranog mleka u prahu. Relativno blag temperaturni tretman, koji dovodi do promene tercijerne strukture (izaziva denaturaciju), u prisustvu redukujućih supstanci prouzrokuje i nastajanje veze između  $\epsilon$ —amino grupa lizina i redukujućih supstanci (laktoze), koja ne može da bude hidrolizovana u digestivnom traktu. Nastali produkt Maillard-ove reakcije laktosilizin se međutim razgrađuje kiselom hidrolizom oslobađajući lizin, tako da uobičajeni način određivanja amino kiselina može da dovede do pogrešnih zaključaka u pogledu nutritivne vrednosti proizvoda (2). Tokom produženog skladištenja Maillard-ova reakcija se nastavlja ukoliko prah sadrži više od 5% vlage (8).

Cilj naših istraživanja je bio da se ispituju promene na proteinima mleka u prahu, prouzrokovanih različitim postupcima sušenja. Identifikacija frakcija kazeina i serum proteina izvršena je elektroforezom na poliakrilamidnom gelu. Kako različiti postupci proizvodnje sušenih mlečnih proizvoda podrazumevaju različite temperaturne režime, pretpostavka je da promene na proteinima koje se mogu ustanoviti elektroforezom nisu identične. Kao elektroforetska metoda izabrana je elektroforeza na poliakrilamidnom gelu, koja je tačnija od papirne, a u poređenju sa elektroforezom na škrobnom gelu ima takođe niz prednosti. Istovremeno je određena i rastvorljivost ispitivanih uzoraka praha, ukupna količina proteina u prahu i rekonstituisanom mleku, kao i količina kazeina, laktoalbumina i laktoglobulina u rekonstituisanom mleku istih uzoraka praha.

## Metodika istraživanja

Uzorci za ispitivanje, uzeti iz prodaje, potiču od sledećih proizvođača:

- punomasno i obrano mleko sušeno na valjcima: Mlekara, Subotica;
- punomasno i obrano mleko sušeno raspršivanjem: IPK Osijek, Osijek;
- instant punomasno i obrano mleko: KIK Pomurka, Murska Sobota;
- sirovo mleko — kontrolni uzorak: Mlekara, Novi Sad.

Izvršene su sledeće analize:

1. Suva materija — Količina suve materije je određena vagom Ultra — X Mettler LP 12 — P 160 N (3).
2. Rastvorljivost — Rastvorljivost je određena metodom sušenja (7).
3. Ukupni proteini u mleku — Količina proteina u mleku u prahu određena je standardnom makro metodom po Kjeldahl-u (7).
4. Ukupni proteini u rekonstituisanom mleku su određeni fotokolorimetrijskom metodom, aparatom Pro Milk II, Foss Electric, Kopenhagen (14).
5. Kazein — Količina kazeina u rekonstituisanom mleku određena je metodom po Schlossmann-u (7).
6. Laktoalbumini i laktoglobulini — Količina laktoalbumina i laktoglobulina je izračunata iz razlike ukupnih proteina i kazeina.
7. Elektroforeza kazeina i serum proteina na poliakrimidnom gelu — PAG elektroforeza kazeina i serum proteina uzoraka mleka u prahu izvršena je metodom po Raymond—u (9). Korišćen je 7% akrilamid i 7M urea pri pH = 9,2 jonske jačine  $\mu = 0,08$ . Razdvojene frakcije proteina su registrovane uz pomoć denzitometra Extinktionschreiber 2., Opton, Oberkochen.

## Rezultati i diskusija

U Tabeli 1. prikazani su rezultati ispitivanja rastvorljivosti i količine ukupnih proteina ispitivanih uzoraka mleka u prahu.

Najslabija rastvorljivost od svih ispitivanih proizvoda ustanovljena je, kako je i očekivano (4,5) kod proizvoda dobijenih sušenjem na valjcima: 74,96% prah punomasnog mleka, i 85,36% za prah obranog mleka. Ovo je posledica promena na proteinima, pre svega denaturacije, i ogleda se kao što se u istoj tabeli vidi i u količini proteina u prahu ispitivanih uzoraka. Veoma dobru rastvorljivost imaju proizvodi dobijeni sušenjem raspršivanjem u struji toplog vazduha: 98,39% prah punomasnog mleka i 99,17% prah obranog mleka. Visoka rastvorljivost (100%) oba instant proizvoda dobijenog metodom sušenja, proverena je i centrifugalnim postupkom. Naši rezultati potvrđuju nalaz Samuells�n-a i Hueg-a (12) koji su uz pomoć NMR aparata ustanovili da »rewet« metoda instantizacije uzrokuje povećanu rastvorljivost proizvoda obzirom da su ispitivani instant proizvodi dobijeni ovim postupkom.

Količina ukupnih proteina u prahu relativno je veća kod uzoraka obranog mleka bez obzira na način dobijanja, što je posledica uklanjanja masti iz suve materije mleka. Upoređujući uzorke obranog mleka u prahu međusobom vidi se da se najmanja količina proteina nalazi u proizvodu dobijenom sušenjem na valjcima (37,92%). Isti je slučaj i kod uzoraka punomasnog mleka u prahu, gde razlika u sadržaju proteina u korist proizvoda dobijenog postupkom raspršivanja prelazi 1,1%. Još očiglednija slika uticaja načina sušenja na količinu i sastav proteina proizvoda u prahu dobija se iz narednih kolona Tabele 1., gde su navedene količine ukupnih proteina, kazeina i serum proteina u rekonstituisanom mleku ispitivanih uzoraka. Uzorak praha mleka,

Tabela 1.

## Rastvorljivost i sadržaj proteina ispitivanih proizvoda mleka u prahu

Proizvod	Rastvorljivost (%)	Ukupni proteini u prahu (%)	Rekonstituisano mleko		
			Ukupni proteini (%)	Kazein %	Serum proteini (%)
Punomasno mleko sušeno na valjcima	74,96	28,73	2,57	2,26	0,31
Obrano mleko sušeno na valjcima	85,36	37,92	3,79	3,28	0,51
Punomasno mleko sušeno raspršivanjem	98,39	29,83	3,46	2,98	0,48
Obrano mleko sušeno raspršivanjem	99,17	38,87	4,47	3,86	0,61
Instant punomasno mleko u prahu	100	29,12	3,51	3,02	0,49
Instant obrano mleko u prahu	100	38,16	4,52	3,92	0,60
Sirovo mleko	—	—	3,60	2,98	0,62

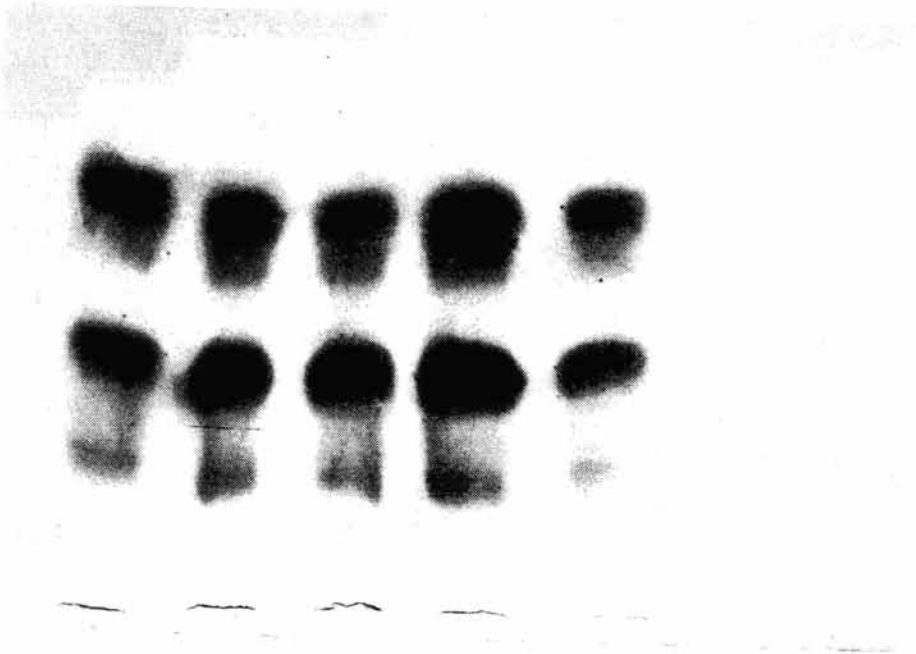
odnosno obranog mleka koji je proizveden sušenjem na valjcima sadrži u rekonstituisanom obliku takođe znatno manje proteina, kazeina i serum proteina, od mleka sušenog raspršivanjem i instant proizvoda.

U Tabeli 2. nalaze se rezultati ispitivanja sastava proteina dobijeni PAG elektroforezom svih uzoraka praha. Obzirom da je posebno rađena elektroforeza kazeina, a posebno serum proteina pojedinih uzoraka zbir relativnih učešća kazeinskih frakcija čini ceo kazein ( $\alpha_s + \beta + \kappa$  — kazein = 100 %), a zbir udela laktoalbuminskih i laktoglobulinskih frakcija daje ukupne serum proteine ( $\alpha$  — laktoalbumin +  $\beta$  — laktoglobulin + krvni serum albumin = 100%). Snimci gela i odgovarajući elektroferogrami iz kojih su dobijene vrednosti navedene u Tabeli 2. uzorka instant punomasnog mleka u prahu dati su na Slici 1. i Slici 2. i Grafikonu 1. i Grafikonu 2.

Tabela 2.

## Elektroforetski sastav proteina ispitivanih uzoraka praha

Proizvod	Frakcije kazeina (%)			Frakcije serum proteina (%)		
	$\alpha_s$	$\beta$	$\kappa$	$\alpha$ -lakto-albumin	$\beta$ -lakto-globulin	Krvni serum albumin
Punomasno mleko sušeno na valjcima	57,54	38,55	3,91	26,42	70,85	2,73
Obrano mleko sušeno na valjcima	52,96	41,93	5,11	25,94	72,04	2,02
Punomasno mleko sušeno raspršivanjem	57,93	37,14	4,93	26,17	71,02	2,81
Obrano mleko sušeno raspršivanjem	52,67	41,89	5,44	26,18	71,14	2,68
Instant punomasno mleko u prahu	50,30	42,48	7,22	19,53	79,55	0,92
Instant obrano mleko u prahu	48,81	44,17	7,02	20,82	77,68	1,50
Sirovo mleko	56,83	33,41	9,76	21,99	77,05	0,96

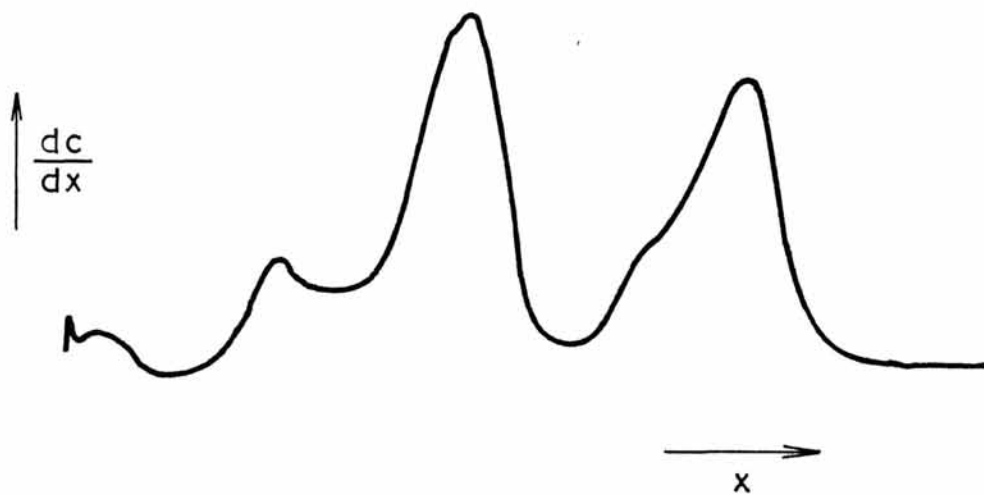


**Slika 1. Frakcije kazeina instant punomasnog mleka**

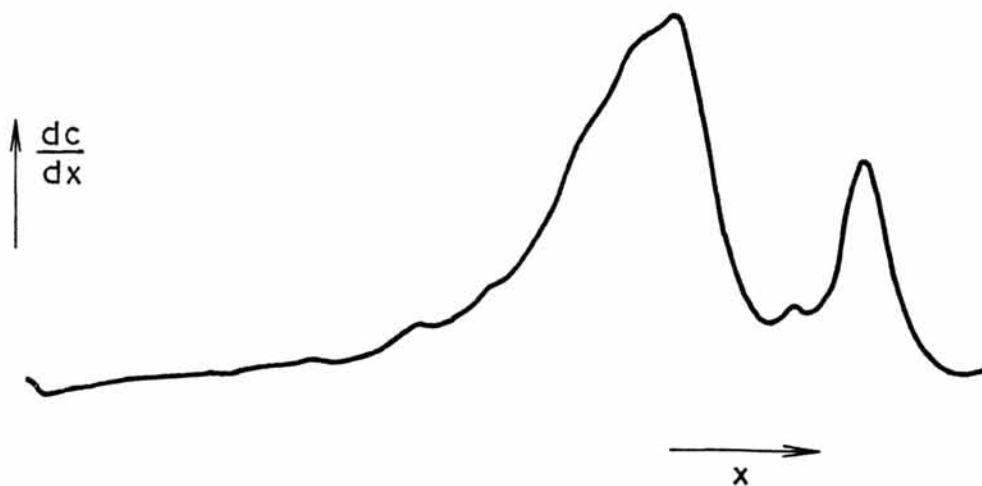


**Slika 2. Frakcije serum proteina instant punomasnog mleka**

**Grafikon 1. Elektroferogram kazeina instant punomasnog mleka**



**Grafikon 2. Elektroferogram serum proteina instant punomasnog mleka**



Rezultati ispitivanja elektroforetskog sastava frakcija kazeina svih uzoraka (Tabela 2.) ukazuju na znatno manju brojnu vrednost udela  $\alpha$  — kazeina u poređenju sa sirovim mlekom. Ovo je najizraženije kod praha dobijenog sušenjem na valjcima (3,91%). Zatim sledi prah dobijen raspršivanjem (4,93%), dok je instant proizvod (7,22%) po količini  $\alpha$  — kazeina najbliži sirovom mleku (9,76%). Obzirom da se brojne vrednosti frakcija kazeina dopunjavaju do 100, izmjena količina  $\alpha$  — kazeina utiče i na relativne udele ostalih frakcija kazeina.

Interesantno je konstatovati da je među frakcijama serum proteina primetno smanjen relativni udeo  $\beta$  — laktoglobulina u odnosu na druge komponente, kod svih ispitivanih proizvoda izuzev instant mlečnog praha. Verovatno je da elektroforezom ustanovljene manje količine  $\alpha$  — kazeina i  $\beta$  — laktoglobulina ukazuju na delimičnu interakciju  $\alpha$  — kazeina i  $\beta$  — laktoglobulina koja menja elektroforetsku pokretljivost obe frakcije a u literaturi je poznata i ustanovljena i drugim istraživačkim metodama (6,5). U prilogu ovome govori i povećan sadržaj ukupnog kazeina u odnosu na serum proteine koji proizlazi iz podataka u Tabeli 1.

### Zaključci

Izvršenim ispitivanjima je ustanovljeno da rastvorljivost praha kao i količina i sastav proteina mleka u prahu, znatno zavise od načina sušenja. Najbolji rezultati su dobijeni kod instant proizvoda mleka u prahu, nešto slabiji kod proizvoda dobijenih sušenjem raspršivanjem, dok su proizvodi mleka u prahu dobijeni sušenjem na valjcima, prvenstveno zbog slabe rastvorljivosti, nepodesni za direktnu upotrebu u ljudskoj ishrani. Međutim, proizvodi mleka u prahu dobijeni sušenjem na valjcima mogu da se koriste kao dodaci u drugim granama prehrambene industrije.

Rezultati ispitivanja elektroforetskog sastava frakcija kazeina punomasnog i obranog mleka, sušenog različitim postupcima su kod svih uzoraka pokazali znatno manji udeo  $\alpha$  — kazeina u poređenju sa sirovim mlekom. Ova pojava je najizraženija kod mleka sušenog na valjcima (3,91%  $\alpha$  — kazeina), zatim sledi prah dobijen raspršivanjem (4,93%  $\alpha$  — kazeina), dok je instant proizvod po količini  $\alpha$  — kazeina (7,22%) najbliži sirovom mleku (9,76%). Elektroforetska ispitivanja serum proteina su kod svih ispitivanih uzoraka izuzev instant praha pokazala relativno manji sadržaj  $\beta$  — laktoglobulina u poređenju sa sirovim mlekom.

Ove promene mogu da budu posledica interakcije  $\alpha$  — kazeina i  $\beta$  — laktoglobulina na povišenim temperaturama.

## Literatura

1. ADLAN, J.: **Industries Alimentares et Agricoles**, 89 1713—1720, 1972
2. BENDER, A. E.: Thermal processing COST Seminar, Dublin, 1977.
3. Betriebsanleitung Mettler LP 11/LP 12.
4. CARIC, M.: UNIDO Seminar, Novi Sad, 1977.
5. HALL, C. W., HENDRICK, T. I.: »Drying of Milk and Milk Products«, AVI Publishing Company, Inc., Westport, 1971.
6. HOSTETTLER, IMHOF, K., STEIN, J.: **Milchwissenschaft** 20, 189—198, 1965.
7. PEJIC, O., ĐORĐEVIĆ, J.: Mlekarski praktikum. Zavod za izdavanje udžbenika SR Srbije, Beograd, 1973.
8. PORTER, J. W. G.: Thermal processing COST Seminar, Dublin 1977.
9. RAYMOND, S. and NAKAMICHI, M.: **Anal. Biochem.** 3, 23, 1962.
10. ROTKIEWICZ, W., KISZA, I.: **Poczn. Technol. Chem. Zyan.** 21, 19—21. 1971.
11. ROTKIEWICZ, W., KISZA, I.: Zeszyty Nankawe Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie, Technologia Zywnosci, 179—200, 1973.
12. SAMUELSON, E. G. HUEG, B.: **Milchwissenschaft**, 28, 329—332, 1973.
13. SAWYER, W. H.: **J. Dairy Sci.**, 52, 1347—56, 1969.
14. SCHÖBER, R., HEITZEL, F. H.: **Milchwissenschaft**, 11, 123, 1956.
15. VILDER, J. de, MARTENS, R., NAUDTS, M.: **Milchwissenschaft**, 31, 396—401, 1976.
16. VOSS, E., MOLTZEN, B.: **Milchwissenschaft**, 28, 282—284, 1973.
17. WEBB, B. H. JOHNSON, A. H.: Fundamentals of dairy chemistry, AVI Publishing Company, inc., Westport, 1972.

## Summary

These investigations were carried out in order to determine using PAG electrophoresis the temperature induced changes in milk proteins during dried milk production in different ways: spray dried, drum dried and instantised. It was also examined: solubility, casein and total protein content, and casein and serum proteins in reconstituted milk.

From the obtained results it is evident that all investigated samples have lower  $\alpha$ -casein than raw milk, what is mostly expressed by drum dried product (3.91%  $\alpha$ -casein), while the instantised milk (7.22%) is nearest to raw milk (9.76%). Relatively lower  $\beta$ -lactoglobulin content by all samples, except instantised milk indicated the  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -casein interaction. On the basis of other analysis one may conclude that the best characteristics has instant product, after it comes spray dried milk, while the drum dried milk powder is better for use as a raw material in other food industries.