

PRILOG REDUKTAZNOJ PROBI MLEKA

Đorđe ZONJI

»MLEKOSIM, Novi Beograd

Količina boje koja dolazi na 1 ccm mleka kod izvođenja reduktazne probe ima uticaja na ishod probe odnosno na vreme redukcije. O ovoj problematici objavljeno je više radova. Između ostalih treba navesti rad Zeilinger (1), a kod nas u poslednje vreme rad Sotlarove, Kervine i Slanovec (2).

Povezanost vremena redukcije s količinom dodate boje mleku nije linearna, odnosi su mnogo složeniji. Zeilinger (1) je čak zaključio, na osnovu podataka do kojih je došao, da se teško može uočiti neka zajednička matematička tendencija vremena redukcije koja bi bila povezana s promenljivom količinom upotrebljene boje kod izvođenja reduktazne probe (kod istog uzorka mleka).

U ovom radu učinjen je pokušaj da se iznađe zakonitost koja povezuje vreme redukcije s promenljivom količinom upotrebljene boje.

Pošlo se pri tome od postavke da se mora pre svega formulirati kinetika procesa redukcije. Napominjemo, da smo za ovaj deo rada koristili objavljene podatke citiranih autora (1, 2).

Kinetiku procesa redukcije metilenskog plavog možemo formulirati na sledeći način:

označimo sa C_0 količinu boje koja je dodata mleku, tj. u vremenu $t = 0$, a nakon redukcije od t minuta, količinu boje u mleku označimo sa C , tada na osnovu zakona o dejstvu masa imamo:

$$\frac{dc}{dt} = K. c. \quad 1$$

i.

$$\frac{dc}{c} = K. dt \quad 2$$

K ... konstanta brzine redukcije.

Na osnovu 1. i 2. nalazimo C tj. količinu još ne redukovanog metilenskog plavog integracijom, te dobijamo

$$\ln C = - K.t + \text{Const.} \quad 3$$

Pod uslovom da je $t = 0$, $C = C_0$

dobijamo da je $\ln C_0 = \text{const.}$ 1 konačno

$$\ln C = \ln C_0 - k. t \quad 4$$

Ovo je u stvari izvod kinetike hemijske reakcije prvog reda.

Kada je redukcija metilenskog plavog završena, tj. boja je prevedena u leukobazu, možemo staviti:

$$C = 0$$

pa obrazac 4. prelazi u

$$k.t = \ln C_0 \quad 5$$

Konstanta brzine redukcije iznosi:

$$K = \frac{\ln C_0}{t} \quad 6$$

Zeilinger (1) je u svom radu naveo sledeće rezultate ogleda:
Tabela 1.

**Upotrebljeno boje (gama) (*)
na 10 ccm mleka**

| br. uzoraka | 150 | 75 | 37,4 |
|-------------|------------------------|-----|------|
| | vreme redukcije minuta | | |
| 1 | 250 | 220 | 175 |
| 2 | 340 | 300 | 215 |
| 3 | 75 | 60 | 40 |
| 4 | 95 | 70 | 60 |
| 5 | 125 | 110 | 105 |
| 6 | 12 | 8 | 3 |
| 7 | 115 | 85 | 47 |
| 8 | 100 | 80 | 53 |
| 9 | 345 | 345 | 310 |
| 10 | 180 | 110 | 63 |
| 11 | 345 | 340 | 300 |
| 12 | 465 | 435 | 400 |

(*) gama = 1 milioniti deo grama

(Uzorci 10, 11 i 12 = pasterizirano mleko)

Primenimo li obrazac 6 na ove podatke, dobijamo sledeće koeficijente (K_1 K_2 K_3)

Tabela 2.

| br. uzoraka | Količina boje (gama) | | 37,4 |
|-------------|----------------------|-------------|--------|
| | 150 K_1 | 75 K_2 | |
| 1 | 0,020 | 0,0195 | 0,0206 |
| 2 | 0,0147 | 0,0144 | 0,0168 |
| 3 | 0,0668 | 0,0719 | 0,0905 |
| 4 | 0,0527 | 0,0615 | 0,0603 |
| 5 | 0,04092 | 0,03925 | 0,0345 |
| 6 | 0,418 | 0,539 | 1,207 |
| 7 | 0,0435 | 0,0508 | 0,0770 |
| 8 | 0,05011 | 0,0539 | 0,0683 |
| 9 | 0,0145 | 0,0125 | 0,0168 |
| 10 | 0,0278 | 0,0392 | 0,0575 |
| 11 | 0,0145 | 0,0127 | 0,0120 |
| 12 | 0,0107 | 0,0992 | 0,0905 |

Proračunati koeficijenti morali bi biti, teorijski, iste vrijednosti. Međutim, imajući u vidu da je redukcija vrlo komplikovan biohemijski proces, možda i ne bi se ni mogla očekivati potpuna identičnost proračunatih vrednosti. Uostalom, poznato je da se delovanje fermenta u nekim intervalima koncentracije supstrata pokorava kinetici reakcije 1. reda, a u drugim, da mogu nastati znatna odstupanja, pa je vrlo teško jednostavno matematički formulisati ceo tok odvijanja ovog procesa, odnosno teorijski izvod za kinetiku usaglasiti sa stvarnošću.

Nezavisno od ove konstatacije, primenom koeficijenata možemo približno proračunati vreme redukcije pri promenljivoj količini boje (kod istog uzorka mleka).

Primer br. 1.

Kod upotrebe 150 gama boje, vreme redukcije iznosilo je 250 minuta; korišćenjem koeficijenta K_1 proračunavamo putem obrasca 6. vreme redukcije sa 75 i 37,4 gama i dobijamo:

| | 75 gama | 37,4 gama |
|----------------|----------|-----------|
| proračun | 215 min. | 181 min. |
| mereno | 220 min. | 175 min. |
| Primer br. 4. | | |
| proračun | 81,9 | 68,7 |
| mereno | 70,0 | 60,0 |
| Primer br. 12. | | |
| proračun | 400 | 335 |
| mereno | 435 | 400 |

Odstupanja proračunatih vrednosti od stvarno nađenih su promenljiva, a ponekad su visoka.

Ako po istom postupku obradimo podatke Sotlarove, Kervine i Slanovec (2) dobijamo:

| koncentracija boje u mleku | vreme obezbojavanja proračunato | minuta mereno |
|----------------------------|---------------------------------|---------------|
| 2,5 gama/ccm | — | 49,50 |
| 5,0 „ | 60,1 | 68,20 |
| 10,0 „ | 70,8 | 85,30 |
| 2,5 gama/ccm | — | 230 |
| 5,0 „ | 280 | 300 |
| 10,0 „ | 328 | 330 |
| 2,5 gama/ccm | — | 69,73 |
| 5,0 „ | 84,70 | 96,71 |
| 10,0 „ | 99,7 | 122,23 |

Napomena: mereno vreme je prosek.

Da je kinetika redukcije metilenskog plavog mnogo komplikovanija no kinetika neke druge encimske odnosno fermentске reakcije, proizlazi i iz činjenice što za vreme izvođenja reduktazne probe dolazi do porasta broja mikroorganizama i do promene redox potencijala mleka i promene pH, dakle u pitanju je kinetika jednog biološki, dinamičnog sistema, a nikako jednog kvantitativno definisanog sistema.

Karakteristika reakcije 1. reda je da vreme koje je potrebno da polovina polazne količine supstrata, u ovom slučaju količina metilenskog plavog, bude svedena na polovinu, ne zavisi od polazne koncentracije boje. Naime, ako se u obrascu 4. stavi da je

$$C = \frac{C_0}{2} \quad 7$$

dobijamo vreme t_s tj. vreme »poluvrednosti«. Ovo vreme iznosi

$$t_s = \frac{\ln 2}{k} \quad 8$$

Proračunamo li ts za neke podatke od Zeilingera (1) dobijamo sledeće vrednosti:

Tabela 3.

Koncentracija boje (gama)

| | 150 | 75 | 37,4 |
|---|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 34,6 min. | 35,2 min. | 33,6 min. |
| 2 | 13,1 min. | 11,2 min. | 11,4 min. |
| 8 | 13,8 min. | 12,8 min. | 10,1 min. |

odnosno, koristimo li podatke od Sotlarove, Kervine, Slanovec (2)

| | 10,0 | 5,0 | 2,5 |
|---|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 12,8 min. | 12,1 min. | 10,6 min. |
| 2 | 49,8 min. | 53,3 min. | 49,8 min. |
| 3 | 18,4 min. | 17,1 min. | 15,0 min. |
| 4 | 3,09 min. | 2,5 min. | 2,1 min. |

Ni u ovom slučaju kao ni kod koeficijenata brzine ne dobijamo potpuno iste veličine, što bi bilo nužno kod reakcije 1. reda. Uočava se smanjenje vremena sa smanjenjem količine boje.

Sve ovo ukazuje da bi obrazac za kinetiku redukcije morao biti dopunjen nekim faktorima koji bi bili povezani, na primer, s porastom broja mikroorganizama za vreme izvođenja probe, odnosno s promenom redox potencijala i pH mleka, itd.

Redukcija metilenskog plavog odvija se u zavisnosti od temperature.

U cilju ustanovljenja temperaturnog koeficijenta Q 10, merili smo vreme redukcije na temperaturi od 27°C i 37°C, a temperaturni koeficijent proračunat je po obrascu:

$$Q_{10} = \frac{K_2}{K_1}$$

9

Neki od dobijenih rezultata vidljivi su iz narednog pregleda:

Tbale 4.

| K1 (27°C) | K2 (37°C) | Q 10 |
|-----------|-----------|------|
| 0,0422 | 0,1055 | 2,5 |
| 0,0243 | 0,0703 | 2,89 |
| 0,0301 | 0,1055 | 3,50 |
| 0,1583 | 0,3166 | 2,0 |
| 0,2110 | 0,3166 | 1,5 |
| 0,0791 | 0,1584 | 2,0 |

Prema tome, porastom temperature za 10°C brzina redukcije povećava se za 2 do 3,5 puta (u opsegu eksperimentalnih podataka). Ovaj podatak je u skladu s poznatom činjenicom, da se brzina mnogih biohemijskih reakcija povećava za oko 2 puta pri porastu temperature za 10°C.

Na osnovu ovih koeficijenata brzine redukcije moguće je proračunati aktivacionu energiju kod redukcije. Veličina aktivacione energije kod mleka s neidentifikovanom mikroflorom je interesantna, jer u literaturi ima vrlo oskudnih podataka za redukciju s poznatom, čistom mikroflorom.

Poznato je, da odvijanju neke hemijske reakcije podleže samo deo molekula, i to onaj koji prema Maxwell—Boltzmannovom zakonu raspodjele energije poseduje potrebnu energiju, tj. aktivacionu energiju. Praktično to znači, da i kod reduktazne probe mora doći do izvesnog prethodnog aktiviranja da bi došlo do prelaza metilenskog plavog u bezbojnu leukobazu.

Prema Arrheniusu važi sledeći odnos između koeficijenta brzine i aktivacione energije:

$$\ln k = \ln C - \frac{A}{RT}$$

C.... konstanta

A.... aktivaciona energija

R.... gasna konstanta

T.... apsolutna temperatura

ln... prirodni logaritam

Pošto eliminišemo C s pomoću vrednosti K_1 i K_2 , dobijamo aktivacionu energiju A:

$$A = \frac{(\ln K_2 - \ln K_1) \cdot RT_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1}$$

Upotrebimo li podatke iz tabele 4. dobijamo sledeće vrednosti za aktivacionu energiju:

Tabela 5.

| | |
|----|--------------------|
| 1. | 22617 kalorija/mol |
| 2. | 19753 kalorija/mol |
| 3. | 23250 kalorija/mol |
| 4. | 12889 kalorija/mol |
| 5. | 7533 kalorija/mol |
| 6. | 12908 kalorija/mol |

Lembke i saradnici (3) našli su kod izvođenja reduktazne probe sa čistim kulturama *Bact. coli* i *Stept. lactis* aktivacionu energiju 30.000—32.000 kalorija/mol.

Ove jako diferentne vrednosti u aktivacionoj energiji ukazuju na svu složenost odvijanja ove na izgled jednostavne probe na čiji ishod utiču ne samo broj i vrsta mikroorganizama, već i njihova biološka aktivnost.

Teorijska razmatranja oko formulacije kinetike reducionog procesa pokazuju da između količine upotrebljene boje i vremena redukcije postoji povezanost, ali da se ista ne može jednostavno formulisati kao reakcija 1. reda, već da su odnosi mnogo složeniji. Praktički zaključak bi bio da se mora standardizirati odnos količine boje i mleka kod izvođenja reduktazne probe, pošto mogućnosti preračunavanja dobijenih rezultata po diferentnim metodama za sada nije sigurna.

Literatura:

1. Zeilinger, A.: Zur Reduktaseprobe, XIII Internat. Milchwirtschafts-Kongress, Haag 1953, sveska II.
2. Sotlar, M., Kervina, F., Slanovec, T.: Izbor preparata i koncentracija metilenskog plavila za reduktaznu probu, Simpozij, Bled, 1971.
3. Lembke, A., Kaufmann, W., Lagoni, H.: Kinetische Betrachtungen über die mikrobielle Methylenblau Reduktion XIII. Internat. Milchwirtsch. Kongress, Haag 1953, sveska II.