

NEKI TEORIJSKI I PRAKTIČNI ASPEKTI PROTEOLIZE U HLAĐENOM SIROVOM MLEKU*

Ivica VUJIČIĆ
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Uvod

Savremeni proces proizvodnje mleka redovno uključuje hlađenje sirovog mleka neposredno posle muže i njegovo kraće, ili najčešće i produženo čuvanje do 24 odnosno 48 sati pri temperaturi nižoj od 4°C.

Ovakvo hlađenje nikako ne predstavlja konzerviranje sirovog mleka, naročito ako su temperature više od 7°C i ako je mleko rđavog higijenskog kvaliteta. Niz fizičkih, biohemijskih fizičko-hemijskih i mikrobioloških promena može da se pojavi u tako hlađenom i čuvanom mleku. Za te promene se zna da utiču na smanjenje tehnološkog kvaliteta mleka. Od biohemijskih procesa u takvom mleku najbitniji su proteolitički i lipolitički.

Biohemijski procesi u sirovom mleku koji su vezani za izazivanje promena nativnih osobina proteina od višestrukog su interesa. Te promene su vezane za razlaganje i destabilizaciju pojedinih frakcija proteina i obrazovanje produkata proteolize koji mogu da imaju različiti uticaj na tehnološki kvalitet mleka. Stoga je cilj ove studije bio da se razmotre neki aspekti proteolize u hlađenom sirovom mleku i pokušaju naći objašnjenja i izvući zaključci koji bi bili interesantni za proizvodnju i preradu takvog mleka.

Neka opšta zapažanja o tehnološkom kvalitetu nisko hlađenog mleka

Nisko hlađeno mleko deluje na niz fizičko-hemijskih promena u mleku koje se odražavaju na njegov tehnološki kvalitet. Čuvanje mleka pri niskim temperaturama izaziva smanjenje sposobnosti mleka da se gruša pod delovanjem sirila. Zbog produženog grušanja dobija se gruša smanjene čvrstine. Ova pojava se najverovatnije može objasniti smanjenjem rastvorljivih soli kalcijuma i fosfata zbog hlađenja. **Kreiner** (1969) navodi slučaj mlekare u Austriji, koja prerađuje nisko hlađeno mleko u edamski sir i tilzit, i u kojoj primetno smanjenje kvaliteta sira nisu mogli da utvrde.

Ritter (1970) ističe da je najveći nedostatak nisko hlađenog mleka za njegovu preradu u ementalski sir, moguće razmnožavanje psihrofilnih bakterija i obrada mleka kojom se aktivira lipoliza mlečne masti zbog delimičnog oštećenja adsorpcionog plašta masnih kuglica. Slabljenje koagulisanja mleka može da se prevaziđe dodavanjem CaCl₂. **Bottazi** (1970) je našao da visoko kvalitetno hlađeno mleko ne utiče na kvalitet sireva kao što su mozzarella, gorgonzolla i taleggio. Međutim, ako se ti sirevi proizvode iz hlađenog mleka slabijeg kvaliteta, onda se pojavljuju mane ukusa i teksture, što se smatra kao posledica razvoja psihrofilnih i proteolitičkih bakterija u toku čuvanja sirovog mleka. On smatra da bi hlađenje bilo svrsishodno i korisno samo za kvalitetno mleko, i ono može da se hladi neposredno posle muže

* Uvodni deo projekta »Pojava i uticaj proteolize u sirovom mleku na njegov kvalitet« što ga je finansirao Fond za naučni rad SAPV 1972. godine.

i da se čuva najduže do 36 sati. U izradi mekog sira tipa Carré de l'Est, iz hladnog mleka koje je čuvano pri 5°C u toku 30—48 sati, V a s s a l (1966) je utvrdio da se, u poređenjima sa nehladenim mlekom, ovo mleko znatno duže podsirivalo i da je sir imao povišenu vlažnost, ali nije zapažena razlika u organoleptičkoj oceni. Zaključak je, da se meki sir može uspešno praviti ako je mleko zadovoljavajućeg bakteriološkog kvaliteta i ako nije čuvano duže od 48 sati pri 4—5°C. U jednom drugom ogledu, u izradi sira gruyère-a iz mleka koje je bilo hladeno u toku 6 sati, a zatim čuvano pri 3,5°C u toku 48 sati M o u r g u e s et al. (1967) su pokazali da je sir imao značajne organoleptičke mane i znatno povećanu količinu slobodnih neisparljivih masnih kiselina. Međutim, kada je mleko odmah posle muže u toku 2 sata ohlađeno do 5°C, a zatim čuvano pri 3,5°C u toku 24 ili 48 časova, takve mane nisu utvrđene.

U toku nekoliko godina (1962-67) M o l l e r - M a d s e n et al. (1969) pratili su uticaj nisko hlađenog mleka koje je skupljano svaki drugi dan na kvalitet proizvoda, pa su utvrdili da takvo mleko nije imalo veći broj bakterija u odnosu na svakodnevno skupljano mleko, ali je pokazivalo znatno češće mane mirisa. Sir napravljen od takvog mleka bio je nešto boljeg kvaliteta i nije bilo problema u kontroli kiselosti, fermentacije i podsirivanja. Maslac od takvog mleka nije pokazivao izražene razlike u kvalitetu, mada se pojavljuje veći broj slučajeva sa manama mirisa. Pasterizirano konzumno mleko imalo je isti kvalitet ocenjen neposredno posle pasterizacije, ali se taj kvalitet znatno smanjio u toku čuvanja pri 5°C/48 sati u odnosu na pasterizirano mleko dobijeno od svakodnevno skupljanog mleka.

A n t i l a (1971) je utvrdio da se sposobnost mleka da se zgrušava sa reninom znatno smanjuje kada ga je čuvao pri nižim temperaturama. Mleko koje je čuvao pri 2—3°C u toku 1, 2 i 3 dana imalo je produženo vreme zgrušavanja za 4, 7 odnosno 11%. Međutim, ono nije predstavljalo nikakav drugi problem u izradi sira. Takvo je mleko takođe pokazivalo smanjenje sposobnosti za izdvajanje pavlake što je vezano za izvesne promene na adsorpcionom plaštu masnih kuglica. Rezultati su takođe pokazali da u takvom mleku nije dolazilo do promene pH vrednosti, a da je primećen slab porast količine slobodnih masnih kiselina. Zapaženo je da je maslac iz takvog mleka više podložan kvarenju.

Značaj proteolitičkih procesa u sirovom mleku

Bez obzira na poreklo proteolitičkih enzima u mleku njihova aktivnost izaziva, pre svega, organoleptičke promene. Promene ukusa i mirisa mleka su najčešće posledice proteolize. Male promene u mleku koje se mogu organoleptički otkriti ne mogu da se utvrde hemijskim metodama za merenje proteolize i lipolize u mleku (P u n c h et al., 1965). Jedna od tipičnih proteolitičkih promena u mleku jeste tzv. slatko grušanje mleka, (B a č i ć, 1971).

Za preradu mleka, dve pojave su izuzetno važne: prvo, obim i tip proteolize u sirovom mleku; i drugo, rezidualno delovanje termostabilnih proteolitičkih enzima u mlečnim proizvodima.

Izdvojeni proteolitički enzimi iz nekoliko vrsta psihrofilnih bakterija koje se redovno susreću u mleku izazvali su merljivu proteolizu i zgrušavanje mleka čak i posle toplotne obrade u toku 10 min pri 95°C (H a r t m a n et al., 1972). Izdvojeni enzimi u fosfatnom puferu (pH 5,8) nisu bili aktivirani čak ni toplotnom obradom u toku 5 min pri 129°C.

Termorezistentne proteinaze su od posebnog značaja za stabilnost i trajnost kratkotrajno steriliziranog mleka (»UHT«-mleko). Rezidualno delovanje proteolitičkih enzima u takvom mleku utvrđeno je u nekoliko slučajeva (L i n d q v i s t, 1970; K i s h o n t i et al., 1970).

Takođe treba istaći i mogućni metodološki značaj proteolize mleka s obzirom da bi određivanje nivoa proteolitičkih enzima i njihove aktivnosti moglo da indirektno posluži kao pokazatelj bakteriološkog kvaliteta mleka i njegove pogodnosti za preradu.

Izvori, osobine i aktivitet proteolitičkih enzima u sirovom mleku

Proteolitički enzimi koji se mogu naći u mleku potiču iz dva izvora; ili su endogenog porekla iz mlečne žlezde ili su egzogenog, tj. mikrobnog porekla. Za biohemijske procese izazvane proteolitičkim enzimima u mleku oba izvora su značajna. Pri tome treba imati u vidu da je raznovrsnost proteolitičkih enzima mikrobnog porekla znatno veća i u izvesnim slučajevima to se odražava na pojavu mnoštva proteolitičkih promena u mleku.

Endogene proteinaze

Proteinaza u mleku poreklom iz mlečne žlezde nalazi se u maloj koncentraciji. Najnovija ispitivanja pokazala su, Dulley (1972), da ta proteinaza ima optimalni pH 6,5—9,0 i optimalnu temperaturu 37°C. Važno je istaći da enzim pokazuje i pri 5°C oko 20% aktivnosti u odnosu na maksimalnu aktivnost pri 37°C. Izolirana proteinaza pokazuje visoku termorezistentnost. Ona zadržava aktivnost posle pasterizacije pri 73°C u toku 15 sekundi. Budući da se tako ne inaktivira dokazano je da učestvuje u zrenju sira cheddar-a.

Ispitivanja izvedena na kazeinu pokazala su, (Carini, 1971) da proteoliza izazvana ovim enzimima dovodi do cepanja molekula α - i β -kazeina.

Peterson (1972) je uspeo s pomoću posebne afinitetne hromatografije sa inhibitorom pankreasnog tripsina da izdvoji tri proteolitički aktivna (najverovatnije tri proteinaze) vrška («peak») iz mleka. Proteinaze su pokazale jasnu aktivnost prema beta-kazeinu.

Egzogene proteinaze (bakterijski proteolitički enzimi)

Zastupljenost i proteolitička aktivnost psihrofila u hladenom mleku

U mleku neposredno posle muže, a naročito u onome koje je hlađeno do temperature niže od 10°C i čuvano izvesno vreme, uvek su nađene psihrofilne bakterije u znatnom broju. Procentualna zastupljenost psihrofila u odnosu na broj živih bakterija je vrlo različita u pojedinim ispitivanjima: Rašić et al. (1968) 2—3% u mleku gde je broj živih bakterija bio 3,6—6,2 $\times 10^4$ /ml i 0,8—1,5% gde je broj živih bakterija bio 5,3—12 $\times 10^5$ /ml; Otenhajmer et al. (1971) 9,5—98,8% pri broju živih bakterija od 1,0 $\times 10^5$ do 2,1 $\times 10^7$ /ml; Bockelmann (1970) 42% kada je broj živih bakterija bio < 10⁴, a 67% kada je taj broj bio 10⁶/ml; Marth et al. (1957) 7% gde je prosečan broj živih bakterija bio < 7 $\times 10^6$ /ml; Mourgues et al. (1967) 13—16% gde je prosečan broj živih bakterija bio od 1 $\times 10^6$ i 16% gde je taj broj bio 3,8 $\times 10^5$ /ml.

Iz dosadašnjih ispitivanja veoma je teško sagledati sve činjenice koje utiču na zastupljenost psihrofilne mikroflore u mleku.

Thomas et al. (1971) su utvrdili da je zastupljenost psihrofila u ispirku iz mlekovodnih cevi bila 44%, zatim u ispirku iz rashladnog bazena u kome se uskladištava mleko na farmi 83%, a u mleku koje se skuplja svaki drugi dan sa iste farme bilo je 32% psihrofila u odnosu na broj živih bakterija. Mleko koje je skupljano svakog drugog dana imalo je u proseku za 2,5 puta više psihrofila u odnosu na svakodnevno skupljano mleko (Hadland, 1965). Pri tome je zastupljenost psihrofila bila u prvom slučaju 6,2% a u drugom 13%, a broj živih bakterija bio je 7,1 $\times 10^6$ odnosno 1,3 $\times 10^4$ /ml. Nakanishi et al. (1971) su utvrdili da je mleko na dve farme imalo neposredno posle muže 49 odnosno 51/ml psihrofila. Isto to mleko pri uzorkovanju u mlekari imalo je 9,6 $\times 10^6$ odnosno 3,3 $\times 10^6$, a posle 10 dana čuvanja pri 5°C broj je porastao na 2,1 $\times 10^8$ odnosno 5,4 $\times 10^8$ /ml. Higginbottom (1966) je zapazila da je broj psihrofila u hladenom mleku (5°C) koje je bilo skupljano svaki drugi dan bio za 10 puta veći u odnosu na svakodnevno skupljano mleko. U 72 transportne cisterne za zbirno mleko Lohne (1969) je našla da je u 26,4% slučajeva broj živih bakterija bio < 10⁵/ml, a u 19,7% slučajeva imali su broj psihrofila < 10⁴/ml. Takođe je utvrđeno u ogledima sa 12 farmi da je u uzorcima s najmanjim brojem bakterija povećanje broja živih bakterija u toku čuvanja pri 5°C/48 sati bilo 0,1 i psihrofila 4,6 puta, a pri 10°C/48 sati 2,2 odnosno 44 puta. Međutim, u uzorku s najvećim brojem povećanje je bilo daleko veće: pri 5°C/48 sati broj živih bakterija povećan je za 2,3 i psihrofila za 57 puta, a pri 10°C/48 sati 37 odnosno 171 put. Kieszniak (1971) je našao da se u mleku koje je imalo posle muže 21 $\times 10^5$ do 24 $\times 10^3$ psihrofila posle čuvanja pri 2—4°C/18 sati taj broj povećao za 45—59 puta.

U zbirnom mleku posle skupljanja kada je bilo čuvano 3,5—4,5 dana pri 5°C pojavili su se znaci kvarenja, a istovremeno se broj psihrofila povećao od oko 3×10^3 na $7-11 \times 10^6/\text{ml}$ (Hawney, 1970).

Hartley et al. (1969) su utvrdili da se broj psihrofila povećao za 10 puta u mleku klase A posle 3 dana čuvanja pri 7,2°C. Istovremeno se broj koliformnih bakterija udvostručio, a broj enterokoka ostao je nepromenjen.

Ispitivanja psihrofilne mikroflore u mleku pokazala su da se velik broj rodova bakterija može naći u mleku i mlečnim proizvodima. To su najčešće: **Pseudomonas**, **Micrococcus**, **Alcaligenes**, **Achromobacter**, **Flavobacterium**, **Escherichia**, **Aerobacter**, **Proteus**, **Bacillus**, **Microbacterium**, **Streptococcus** i **Lactobacterium** (**Lactobacillus**). Marth et al. (1957) su utvrdili da u zbirnom mleku čuvanom 3—4 dana pri 3,3°C dominiraju gram-negativni štapići, zatim da se najbrže razvijaju vrste iz roda **Pseudomonas** kao i **Acinetobacter** i **Aerobacter** (**Klebsiella**), a **Flavobacterium** nije pokazivao množenje. Andrew (1959) je između 220 izdvojenih sojeva našao 37% sojeva iz roda **Achromobacter**, 29% **Flavobacterium**, 17% **Pseudomonas**, a 17% su sačinjavali **Micrococcus** i **Aerobacter**. Schultze et al. (1960) su izdvojili 586 sojeva psihrofila iz pasteriziranog mleka, pavlake, čokoladnih napitaka, svežeg sira (cottage) iz prometa koji su bili čuvani pri 4°C. Tu su bili zastupljeni ovi rodovi: 70,6% **Pseudomonas** (samo na vrstu **Ps. fluorescens** otpadalo je 46,1%); 7,9% **Alcaligenes**; 9,2% **Achromobacter**; 0,7% **Flavobacterium**; a 10,8% su bile koliformne bakterije i 0,8% kvasci. Otenhajmer et al. (1971) su u 128 sojeva izdvojenih iz hladnog mleka našle pripadnike ovih rodova: 3,1% **Pseudomonas**; 21,9% **Flavobacterium**; 11,7% **Achromobacter**; 16,4% **Escherichia**; 26,6% **Micrococcus**; 4,6% **Alcaligenes**; 8,6% **Citrobacter**; 3,1% **Aeromonas**; i 4,0% ostalih. Većina istraživača ističu poseban značaj zastupljenosti pojedinih vrsta iz roda **Pseudomonas** u nisko hladnom mleku.

Nakanishi et al. (1971) su našli da je u mleku posle muže 80—95% vrsta roda **Pseudomonas** bilo zastupljeno u odnosu na ukupan broj psihrofila. Isto mleko pri uzorkovanju u mlekari imalo je 30—35% spomenutih vrsta psihrofila, a posle daljeg čuvanja u toku 10 dana pri 5°C zastupljenost **Pseudomonas** spp. se povećala na 85—95%. Takođe je i Bockelmann (1970) utvrdio da oko 50% od svih psihrofila sačinjavaju vrste roda **Pseudomonas** u mleku čuvanom pri 5°C do 3 dana. Taj autor je takođe našao da je u hladnom mleku koje je skupljano svaki drugi dan **Pseudomonas** bio zastupljen samo sa 13% od ostalih psihrofila kada je broj živih bakterija bio $< 10^4/\text{ml}$, a ta je zastupljenost bila 37% kada je broj živih bakterija bio $< 10^6/\text{ml}$.

Psihrofilni sojevi koliformnih bakterija mogu da budu zastupljeni u količini od 5—20% od psihrofilne mikroflore hladnog zbirnog mleka, kako to iznose Panes et al. (1968). Ovi autori su u 180 uzoraka mleka utvrdili da se posle 72 sata pri 3—5°C broj koliformnih bakterija više od 100 puta poveća. Dominantnu koliformnu mikrofloru takvog hladnog mleka sačinjavali su **Klebsiella** (**Aerobacter**) **cloacae** i **K. aerogenes**.

Biohemijska aktivnost psihrofilne mikroflore u mleku je od posebnog značaja. Kiuru et al. (1971) su utvrdili da su od 300 izoliranih sojeva psihrofila 53% bili proteoliti, a od njih 84% su bile vrste iz roda **Pseudomonas**, 5% **Enterobacter**, 5% **Flavobacterium**, i 6% ostalih. Među neproteolitičkim sojevima nalazilo se 56% iz roda **Acinetobacter**, 18% **Pseudomonas**, 7% bakterija mlečne kiseline i 19% ostalih. Ispitivanja proteolitičkog delovanja nekih sojeva roda **Pseudomonas**, **Aerobacter** i **Flavobacterium** pokazala su da pod eksperimentalnim uslovima u čistoj kulturi njihove proteinaze prvenstveno razgrađuju alfa-s-kazein i beta-kazein, a samo **Aerobacter** stvara proteinaze koje razgrađuju i kapa-kazein. Pri eksperimentalnim temperaturama od 4°C i 8°C proteoliza je tekla veoma lagano tako, da je pre 7 dana teško zapaziti promene ukusa. Promene ukusa su zapažene tada kada se pojavila uočljiva razgradnja alfa-s-kazeina i beta-kazeina, koja je određivana na hromatografskoj koloni sa DEAE-celulozom.

Unutar izdvojenih 45 sojeva psihrofila iz nisko hladnog mleka Lacrosse (1966) je našao 40% proteolita, 6,7% lipolita i 18% onih sojeva koji su pokazivali istovremeno proteolizu i lipolizu. Izolirani sojevi roda **Pseudomonas** pokazivali su veoma visoku zastupljenost proteolita. Bockelmann (1970) je utvrdio da su 85% kazeoliti, 60% peptoniziraju želatin i 77% su lipoliti. U 320 uzoraka hladnog mleka Pal et al. (1970) su našli da je u proseku bilo 39,6% proteolita i 15% lipolita u odnosu na broj živih bakterija u mleku. U obranom mleku koje je čuvano 42 dana pri 0,5°C broj bakterija vrste **Ps. fluorescens** povećao se za više od 100 puta (Nakanishi et al., 1971). Taj porast broja praćen je smanjenjem kazeinskog N i povećanjem nepro-

teinskog N u inkubiranom mleku. Te promene su zapažene u veoma malom ili neznatnom obimu pri temperaturama od -5°C i -15°C . Pri čuvanju mleka u toku 28 dana pri $0-5^{\circ}\text{C}$ mogu se primetiti elektroforetske promene na kazeinu pod delovanjem bakterijske proteinaze od vrsta **Ps. fluorescens**, **Ps. fragi**, **Flavobacterium** sp. i **Achromobacter** sp. Naročito izrazita proteoliza je zapažena pod delovanjem vrste **Ps. fragi**. Ova bakterija peptonizira obrano mleko za 2-4 dana pri $10-15^{\circ}\text{C}$, ali ne u toku 10 dana pri $0-5^{\circ}\text{C}$. Vreme potrebno za peptonizaciju mleka bilo je 3 dana pri 10°C za vrste **Ps. nigrificans** i **Ps. putrefaciens** što je znatno manje od onog vrsta **Ps. cohaerens** i **Acetobacter oxydans** gde je iznosilo 10 dana. Slatko grušanje mleka što ga izaziva proteinaza vrste **Bacillus cereus** praćeno je sa hidrolizom kapa-kazeina i formiranjem para-kapa-kazeina kao što se dešava i u slučaju delovanja renina (sirišnog enzima).

Ispitujući 57 kultura psihrofilnih bakterija P u n c h et al. (1965) su utvrdili da se nivo populacije koji je bio potreban da izazove neku organoleptičku manu kretao općenito od 5 do 20 miliona/ml. Aktivnije kulture su bile ispod toga broja, a slabije iznad. Pri tome je zapaženo da te iste bakterije izazivaju organoleptičke promene u mleku pri nešto manjem broju pri 6°C , nego što je to slučaj kada se mleko inkubira pri 20°C . Većina ispitivanih kultura izazvala je promene pri broju manjem od 50×10^6 , a sve pri broju manjem od 100×10^6 .

Interesantno je istaći da u sirovom mleku, gde je normalno prisutna mešovita mikroflora, pri čuvanju u toku nekoliko dana pri 15°C ne dolazi do signifikantnog povećanja ukupne količine slobodnih amino kiselina kao i azota amino kiselina, ureje i ukupnih dijalizovanih azotnih materija. Odsustvo neke pravilnosti u povećanju ili smanjenju tih neproteinskih azotnih materija utvrđeno je takođe i u analognom slučaju kada su sirovom mleku dodavane čak čiste kulture bakterije **Pseudomonas** sp. **E. coli**, **Alcaligenes viscolactis** i **Micrococcus** sp.

Z a k l j u č a k

Višečasovno čuvanje hlađenog sirovog mleka postala je nezamenjiva operacija u savremenoj proizvodnji mleka. Zahvaljujući postojećem tehničkom napretku u ovoj oblasti ekonomski razlozi sve više utiču da se teži k maksimalnom produženju čuvanja mleka na farmi i jednokratnom skupljanju mleka u toku 48 sati posle muže. Takva tehnologija susreće se sa nizom problema koji proističu iz biohemijskih procesa koji se ne mogu sprečiti hlađenjem iako se znatno usporavaju. Iz razmatranja biohemijskih, a posebno proteolitičkih procesa u hlađenom sirovom mleku mogu se izvesti ovi zaključci:

- (1) Tehnološki kvalitet hlađenog sirovog mleka se znatno razlikuje od nehlađenog mleka. Te su razlike posledica delovanja nižih temperatura na neke biohemijske osobine, a uglavnom na mikrofloru i njenu biohemijsku aktivnost.
- (2) Mikroflora i biohemijski procesi u mleku koje je na duže vreme (do 48 ili više sati) čuvano pri niskim temperaturama se suštinski razlikuje od onog mleka koje nije hlađeno, samo delimično hlađeno ili samo na kratko vreme (nekoliko sati) hlađeno i čuvano pri niskim temperaturama (ispod 5°C).
- (3) Mleko čuvano pri niskim temperaturama odlikuje se visokom zastuplenošću psihrofilnih bakterija koje pokazuju izrazitu proteolitičku i lipolitičku aktivnost. Čak ni niže temperature od 4°C ne mogu da potpuno zaustave rast te mikroflore i pomenute biohemijske procese. Među psihrofilima uvek se nalazi veoma visok procenat proteolita.
- (4) Proteolitički enzimi u mleku su uglavnom bakterijskog porekla i njihova aktivnost u mleku je znatno važnija u poređenju sa enzimima koji su poreklom iz mlečne žlezde. Bakterijski enzimi vode poreklo uglavnom od psihrofilne mikroflore koja dospeva u mleko u toku njegovog dobijanja, jer bakterije koje dospevaju iz vimena su veoma retko proteoliti.

- (5) Proteolitički enzimi u mleku, bez obzira na njihovo endogeno ili egzogeno, bakterijsko poreklo, uglavnom pokazuju aktivnost i pri temperaturi od 5°C. Odatle i potiče prilično ograničena mogućnost konzerviranja sirovog mleka putem hlađenja.
- (6) Druga važna osobina proteolitičkih enzima u mleku jeste da među njima ima i onih koji su visoko termorezistentni. Mogućno delovanje rezidualnih bakterijskih proteinaza npr. u kratkotrajno steriliziranom (»UHT«) mleku može da izazove destabilizaciju proteina, želiranje, slatko grušanje i sl. Očito je da su mogućnosti u savremenoj tehnologiji mleka ograničene u pogledu inaktiviranja nepoželjnih proteinaza koje se mogu naći u sirovom mleku.
- (7) Čuvanje sirovog mleka mora da se sprovodi pri temperaturi ispod 4°C sve do momenta prerade. Neposredno i brzo hlađenje posle muže je neophodno, i pri mešanju s mlekom od prethodne muže temperatura ne sme da se poveća iznad 10°C. Odlaganje neposrednog hlađenja za 1-2 sata znatno skraćuje adaptivnu fazu psihrofila koji kasnije mogu da izazovu kvarenje mleka. Ako se mleko čuva u toku 72 sata pri temperaturama od 7°C i višim, tada dolazi do priličnog razmnožavanja bakterija i do promene ukusa i mirisa mleka.
- (8) Hlađenje sirovog mleka treba smatrati kao meru koja doprinosi znatnom smanjenju aktivnosti proteinaza u mleku, ali osnovni zadatak u dobijanju visoko kvalitetnog mleka jeste otklanjanje njegove kontaminacije sa psihrofilnim bakterijama kao glavnog izvora proteinaza.
- (9) Zbog očitih mikrobioloških i biohemijskih osobina nisko hlađenog mleka, tradicionalni testovi i standardi za određivanje higijenskog kvaliteta nisu prikladni i ne odgovaraju za takvo mleko. Preporučuje se standard za broj živih bakterija od 5×10^4 /ml i ne više koliformnih bakterija od 10^2 /ml. Za reduktaznu probu preporučuje se izvođenje preinkubacije mleka, a zatim dokazivanje reduktaze pri 37°C. Pretpostavlja se da bi možda najbolja bila direktna reduktazna proba pri 25°C ili 30°C.

Summary

THEORETICAL AND PRACTICAL ASPECTS OF PROTEOLYSIS IN REFRIGERATED RAW MILK

Ivica VUJIČIĆ

Various aspects of proteolysis occurring in refrigerated raw milk and relevant quality defects have been discussed in a great detail. The emphasis was placed particularly on the bacterial proteases and their activity during the cold storage of milk. Implications of proteolysis in alternate day collected milk were discussed and suggestions for new quality standards to be applied to such a milk were given.

Literatura

- Antila, V. (1971): Evaluation of bulk tank milk and its suitability for dairy use. **Suom. Eläin 77** (6) 259; Dairy Sci. Abs. **33** (11) 5643 (1971).
- Andrey, J. (1959): **J. Dairy Sci.** **42** 1781 (Cit.: Otenhajmer).
- Bačić, B. (1971): Slatko grušanje mleka. **Mljekarstvo 21** (7) 164—167.
- Battozzi, V. (1970): Use of refrigerated milk in cheesemaking. **Mondo di Latte 24** (3) 177.
- Bockelmann, I. L. (1970): Lipolytic and psychrotrophic bacteria in cold stored milk. XVIII. Int. Dairy Congr., I. E., 106. 1970.

- Carini, S. & Bozzolati, M. (1971): Milk proteases. I. Proteolysis of casein. **Dairy Sci. Abs.** 33 (3) 1585.
- Dulley J. K. (1972): Bovine milk protease. **J. Dairy Res.** 39 (1) 1—9.
- Hadland, G. (1965): Meiriteknikk 54—64.
- Hartley, J. C., Vedamuthu, E. R., Reinbold, E. W. & Clark, W. S. (1969): Effect of time and temperature of grade. A milk sample storage on bacterial test results: **J. Milk Fd. Technol.** 32 (2) 37.
- Hartman, G. H. & Hastings, C. W. (1972): Heat stable proteolytic enzymes produced by psychrophilic bacteria. **J. Dairy Sci.** 55 (5) 675.
- Hawney, S. G. & Royal, L. (1970): The effect of storage on the growth of psychrophilic bacteria and on the flavour of bulk collected milk, XVIII. Int. Dairy Congr., 1E, 508. 1970.
- Higgibotton, C. (1966): Bacteriological studies of raw milk before and after the adaption of bulk milk cooling on the farm. XVI. Inter. Dairy Congr., A 427, 1966.
- Kielsznia, R. (1971): Effect of bulk transportation on the bacteriological quality of refrigerated and non-refrigerated milk. **Dairy Sci. Abs.** 33 (2) 988.
- Kishonti, E. & Sjöström, G. (1970): Influence of heat resistant lipases and proteases in psychrotrophic bacteria on product quality. VIII. Inter. Dairy Congr., Vol. 1E, Sydney, 1970.
- Kiuru, K., Eklund, E., Gyllenberg, H. & Antila, M. (1971): Die proteolitische Aktivität der psychrotrophen Mikroorganismen in der Hofbehaltmilch. **Milchwiss.** 26 (3) 138.
- Kreiner, H. (1969): Duboko hlađenje kod proizvođača i na sabirnim stanicama. Simpozijum »Mleko od krave do potrošača«, Opatija, 1969.
- Lacrosse, R. (1966): Caractères caseolytique et lipolytique des bacteries psychrophiles isolées dans les laits ou les crèmes conservés a basse temperatures. **Milchwiss.** 21 (5) 278.
- Lindqvist, B. (1970): Residual proteolytic activity in UHT milk. VIII. Inter. Dairy Congr., Vol. 1E, Sydney.
- Loane, P. (1969): Psychrophiles in farm milks during storage. **Aust. J. Dairy Techn.** 12.
- Marth, E. H. & Frazier, W. C. (1957): **J. Milk Fd. Technol.** 20 72.
- Moller-Madsen, A., Birkjaer, H., Fisker, A. & Poulsen, P. (1969): Quality of dairy products with daily and every-other-day milk collection. Beretn. St. Forsogsmejeri 172.
- Mourgues, R., Acecolas, J. & Auclair J. (1967): Use of refrigerated milk from bulk tanks for cheese manufacture. II — **Revue lait. fr.** »Industrie lait« 243 and 296.
- Nakanishi, T. & Tanabe, T. (1971): Studies on psychrotrophic bacteria in cow's milk. I. Examination of psychrotrophic bacteria in raw milk. **Dairy Sci. Abs.** 33 (1) 394; II. Changes of protein in cow's milk by psychrotrophic bacteria during low temperature storage, **Dairy Sci. Abs.** 33 (4) 2004.
- Otenhajmer, I. & Mitić, S. (1971): Karakteristične vrste psihrofilnih bakterija u sirovom mleku. **Mljekarstvo** 21 (4) 74—79.
- Pal, R. N. & Harper, W. J. (1970): Characterization of the microflora of the raw milk supply. (I) Centennial Res. Ser. Dep. Dairy Tech., Ohio St. Univ., 1970; **Dairy Sci. Abs.** 33 (7) 3605 (1971).
- Panes, J. & Thomas, S. (1968): Psychrotrophic coli-aerogenes bacteria in refrigerated milk. **J. appl. Bac.** 31 420.
- Peterson, R. F. (1972): Isolation of milk protease by affinity chromatography. **J. Dairy Sci.** 55 (5) 676.
- Punch, J. D., Olson, J. C. & Thomas, R. L. (1965): Psychrophilic bacteria. 3. Population levels associated with flavour or physical change in milk. **J. Dairy Sci.** 48 (9) 1179.
- Rašić, J., Vujičić, I. & Lazić, P. (1968): Efekti primarne obrade mleka. Uticaj hlađenja na bakteriološki kvalitet mleka. **Mljekarstvo** 18 (10) 224.
- Ritter, W. (1970): Problems of cheesemaking with refrigerated milk with particular reference to Emmental cheese. **Industrie Aliment, Pinezolo** 9 (3) 108.