

Istaknuta je uloga plastičnih materijala, s osvrtom na međusobne razlike u pojedinim fizičko-hemijskim, mehaničkim i tehnološkim osobinama značajnim za kvalitet proizvoda. Pri tome su pomenute tendencije daljeg razvoja ovih materijala, kao i problemi na čijem su rešavanju angažovana znatna istraživanja.

Literatura

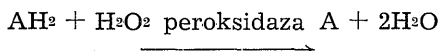
1. Guerault, M. A. (1967.) L'industrie laitière, 248, 602.
2. Naskovski, V. (1971.) Ambalaža i prezentacija, 3—4, 13.
3. Levi, B. (1971.) Ambalaža i prezentacija, 2, 3.
4. Poulnot, M. A. (1967.) L'industrie laitière, 248, 606.
5. Rašić, J. (1971.) Mljekarstvo, 4, 82.
6. Rašić, J. (1971.) Mljekarstvo, 5, 108.
7. Lakaut, R. (1967.) Emballages et conditionnement d'aujourd'hui. Paris.
8. Modern Packaging Encyclopedia. 1968. New York.
9. Packaging and Packaging materials with special reference to the packaging of food. Food Industries studies, No. 5. United nations industrial developments organization. Vienna/New York. 1969.
10. Ambalaža i prezentacija, 5, 1971, Beograd.

KOLORIMETRIJSKO ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI LAKTOPEROKSIDAZE*

Jovanka ĐORĐEVIĆ i Snežana GAVRILOVIĆ, Zemun

Peroksidazu mleka u kristalnom stanju prvi je izdvojio Theorel (3), što mu je omogućilo da detaljnije ispita sastav i osobine ovog fermenta. On je utvrdio da se koferment ovog encima sastoji od hemin grupe, da se peroksidaza iz mleka razlikuje od fermenta izdvojenog iz rena većom molekulskom težinom (93000) i manjim sadržajem gvožđa (0,07%). Polazeći od ovih činjenica kao i od porekla fermenta Theorell ga je nazvao laktoperoksidazom.

Laktoperoksidaza je ferment koji potiče iz mlečnih ćelija. Osobina joj je da katališe oksidaciju različitih supstrata s pomoću H₂O₂, koji se javlja kao akceptor elektrona. Ovaj tip reakcije može se prikazati na sledeći način:



Donatori elektrona (AH₂) mogu biti fenoli, aromatični amini (para aminobenzoeva kiselina, para fenilendiamin) i neka druga organska jedinjenja, koja su iskorišćena u različitim peroksidaznim probama.

Druga osobina laktoperoksidaze jeste njena termolabilnost. Ovaj ferment se inaktivise pri temperaturnom režimu visoke pasterizacije.

Ove dve osobine fermenta su iskorišćene kod peroksidazne probe koja se koristi za utvrđivanje da li je mleko zagrevano na 80°C ili iznad ove temperature (4). Znači da laktoperoksidaza ima praktični značaj za mljekarstvo.

* Ovaj rad na takmičenju »Nauka mladima« bio je pozitivno ocenjen. Jovanka Đorđević osvojila je prošle i ove godine Oktobarsku nagradu Beograda, dok je Snežana Gavrilović dobitnik Vukove i ovogodišnje Oktobarske nagrade. Oba autora su učenice koje su završile zemunsku gimnaziju.

Upoznajući se s našom literaturom o fermentima u mleku imale smo priliku da ustanovimo da je njihovoj problematici u nas posvećeno malo pažnje a o laktoperoksidazi smo našle samo udžbeničke podatke. Imajući u vidu značaj ovog fermenta za kontrolu mleka i odsustvo rezultata u našoj literaturi, pristupile smo, na sugestiju profesora, ispitivanju nekih osnovnih osobina laktoperoksidaze.

U ovom radu mi ćemo prikazati rezultate naših oglada s laktoperoksidazom iz kravljeg mleka.

NAČIN RADA

Mi smo ispitivale aktivnost laktoperoksidaze kao funkciju vremena i koncentracije fermenta.

Za ispitivanje aktivnosti fermenta koristile smo metodu koju su pronašli i ispitivali A u a r d, R o b e r t s i C a r d w e l l (1) i koja po oceni autora ima prednost nad ostalim primenjenim metodama u tome što je brza, lako izvodljiva, jevtina i tačna.

Reagensi: Za ovu metodu potrebni su 0,3N rastvor H_2O_2 i 2% rastvor p-fenilendiamina.

Prema preporuci autora metode 0,3N rastvor H_2O_2 smo pripremile rastvaranjem 1,75 ml 30% H_2O_2 u hladnoj destilisanom vodi tako da se dobije ukupno 100 ml rastvora.

2% rastvor p-fenilendiamina spravljale smo tako što smo na tehničkoj vagi odmerile 1 g p-fenilendiamina, rastvorile smo ga u oko 40 ml ključale destilisane vode uz stalno mešanje. Dobijeni rastvor smo profiltrirale, isprale smo filter s malo tople vode i kada se rastvor ohladio nalile smo vode do crte (50 ml).

Svakog dana za analizu su korišćeni sveže spravljani rastvori.

Mleko za analizu smo dobijale od Instituta za stočarstvo u Beogradu.

Merenje aktivnosti laktoperoksidaze vršile smo s pomoću Beckm a n - o v o g kolorimetra. Merenja smo vršile uz pomoć crvenog filtra, odnosno sa svetlosnim talasima od 490 m μ . Pre početka rada uključimo instrument da se zagreje. Zatim doteramo kazaljku da pokazuje nultu tačku. Potom stavimo odgovarajuću epruvetu napunjenu do polovine destilisanom vodom i podesimo kazaljku da pokazuje vrednost od 100% (providnost). Ovo smo ponavljale 2—3 puta dok instrument nije davao iste vrednosti pre i posle stavljanja epruvete s destilisanom vodom.

Tok rada: U Erlenmajerovu kolbu sipa se 40 ml destilisane vode, doda se 0,1 ml mleka i 0,5 ml rastvora p-fenilendiamina (mleko i rastvor p-fenilendiamina dodavale smo s pomoću mikropipete). Pošto se sadržaj kolbe brzo izmeša sipa se do polovine u specijalnu epruvetu (za kolorimetar) koja se stavlja u otvor instrumenta pa se podesi da kazaljka pokazuje 100 (providnost), odnosno nulu apsorpcije. Na taj način smo izbegle da nefermentativna oksidacija utiče na rezultate. To znači da nam je pripremljeni uzorak za analizu, ali bez vodonikperoksida, služio kao uporedna proba.

Sadržaj epruvete se ponovo pomeša s delom koji je ostao u kolbi, pa se mikropipetom brzo sipa 0,1 ml vodonikperoksida, brzo se promeša, sipa u epruvetu koja se odmah stavi u kolorimetar. Brzo pročitamo vrednost na skali koja pokazuje apsorpciju. Ova vrednost u tabelama je označena kao vrednost 0 (nula). Istovremeno sa stavljanjem epruvete u kolorimetar aktivira se štoperica. Vrednosti na kolorimetru su čitane svakih 30 sekundi. Najčešće je vršeno 10 merenja

(5 minuta) koja su u tabelama označavana brojevima od 1 do 10. Kod uzoraka kod kojih nije bilo većih promena kod tri uzastopna čitanja, broj merenja je mogao biti i manji.

Da bismo utvrdile kako koncentracija peroksidaze utiče na brzinu reakcije vršile smo ispitivanja tako što smo u različite kolbe sipale po 0,1, 0,3 i 0,5 ml svežeg mleka. Ostalo je bilo isto kao što je napred opisano.

Radi preciznijeg merenja uticaja koncentracije peroksidaze vršile smo merenja tako što smo umesto 0,1 ml sirovog mleka dodavale 0,1 ml mleka koje je sadržalo 10, 20, 40, 60 i 80% svežeg mleka dok je ostatak do 100% sačinjavalo kuvano mleko u kome je peroksidaza inaktivisana. Uzorke za ova ispitivanja smo sastavljale tako što smo na 9,8, 6, 4 i 2 ml kuvanog mleka dodavale 1, 2, 4, 6 i 8 ml sirovog mleka. Pošto je kuvano mleko pričinjavalo teškoće kod pipetiranja mikropipetama (nije htelo da ističe iz pipete) usled zgrušavanja dela njegovih belančevina pod dejstvom visoke temperature, mi smo pre mešanja sa sirovim profiltrirale ovo mleko kroz papirni filter. Kod ovih ispitivanja vršena su kolorimetrijska merenja i kod sirovog mleka (100%) kao i kod kuvanog mleka (0%).

RAZMATRANJE REZULTATA

a) Ispitivanje aktivnosti laktoperoksidaze u zavisnosti od vremena

Ova ispitivanja smo vršile sa 0,1 ml sirovog mleka, kako je objašnjeno u načinu rada. Prosečne vrednosti dobijene merenjima s pomoću Beckman kolorimetra prikazane su u tabeli 1.

Tabela 1

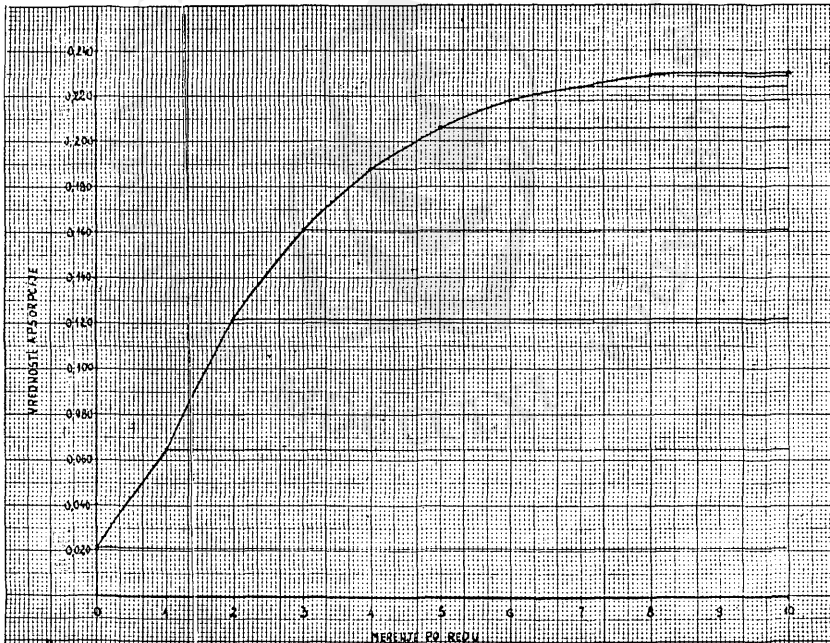
Aktivnost peroksidaze kao funkcija vremena

Redni broj merenja	Vreme od početka merenja u sekund.	Vrednost apsorbacije	Razlike aps. u jedinici vremena (min.)	Minimalne i maksimalne vrednosti	
				Min.	Max.
0	0	0,021	0	0,014	0,025
1	30	0,065	—	0,040	0,100
2	60	0,122	0,101	0,077	0,175
3	90	0,161	—	0,105	0,233
4	120	0,188	0,066	0,121	0,279
5	150	0,206	—	0,131	0,302
6	180	0,218	0,030	0,136	0,328
7	210	0,224	—	0,138	0,342
8	240	0,229	0,011	0,139	0,349
9	270	0,230	—	0,140	0,350
10	300	0,230	0,001	0,140	0,350

Rezultati koje smo dobile pokazuju da je aktivnost laktoperoksidaze različita kod različitih uzoraka mleka. Najmanje i najveće vrednosti koje smo dobile u toku merenja aktivnosti ovog fermenta navedene su u tabeli 1. Interesantno je da su uzorci mleka koji su pokazivali najmanju aktivnost u početku merenja imali i najmanju ukupnu aktivnost u toku ispitivanja i obrnuto. Zato se i minimalne i maksimalne vrednosti poklapaju s rezultatima dva ekstremna uzorka mleka.

Podaci govore da se s napredovanjem vremena vrednosti povećavaju. Porast ide uglavnom do osmog čitanja (4 minuta) a zatim se praktično zaustavlja tako da se razlika između osmog i desetog čitanja može takoreći zanemariti.

Intenzitet aktivnosti laktoperoksidaze nije ravnomeran u toku vremena. To se može lepo videti iz razlike kolorimetrijskih merenja na kraju svakog minuta, koja je takođe prikazana u tabeli 1. Ako bi se razlike aktivnosti u pojedinim minutima izrazile u procentima od razlike u prvom minutu, dobile bi se praktično iste vrednosti, pošto prosečna razlika u prvom minutu iznosi 0,101. Iz ovih podataka izlazi da se s napredovanjem vremena razlike brzo smanjuju i da posle 4 minuta one praktično nestaju. Ovo se jasno vidi i iz grafikona 1 u kome kriva pokazuje dinamiku promene u toku merenja a odsecci između pojedinih tačaka krive označavaju veličinu tih promena u toku 30 sekundi.



Jedna od karakteristika katalizatora jeste da oni ispoljavaju svoju aktivnost u malim količinama tako da učinak katalizatora nije u srazmeri s njegovom količinom. Tako npr. neznatna količina fermenta saharoze može da prevede znatnu količinu saharoze u invertni šećer (3). Međutim, naši podaci pokazuju da se razlike smanjuju brzo s napredovanjem vremena i da praktično nestaju posle četiri minuta.

Imajući u vidu napred navedenu osobinu katalizatora kao i rezultate koje smo dobile, pomislile smo da je prestanak reakcije verovatno posledica nedostatka reagensa (vodonikperoksida i p-fenilendiamina). Za to smo izvršile proveru da li je ovo u pitanju pa smo posle završetka poslednjeg čitanja na kolorimetru dodavale uzorku ili samo 0,1 ml H_2O_2 , ili samo 0,5 ml p-fenilendiamina ili i jedan i drugi reagens, pa smo ponovo vršile merenje na kolorimetru. Ova merenja su pokazala da dodavanje samo vodonikperoksida ne dovodi do promene boje, što znači da se ne radi o nedostatku ovog reagensa. Dodavanje samo p-fenilendiamina je izazvalo samo neznatnu promenu (0,004)

ali se boja nije menjala s vremenom. To navodi na zaključak da se ne radi o nedostatku ove supstance i da je mala promena kod ponovnog čitanja posledica toga što je ona svojom bojom uticala na rezultat. Dodavanje i vodonikperoksida i p-fenilendiamina uzorku kod koga je završeno merenje uticalo je na isti način kao i dodavanje samo p-fenilendiamina, s tim što je razlika bila neznatno veća (0,006).

Iz ovih oglada izlazi da smanjeni intenzitet reakcije s vremenom i njen prestanak posle 4 minuta nisu posledica nedostatka reaktiva. Ove činjenice su nas navele na mogućnost da se radi o smanjenju i prestanku aktivnosti fermenta posle izvesnog vremena. Zbog toga smo izvršile nova ispitivanja da bismo potvrdili ovu našu pretpostavku.

b) Ispitivanje uticaja količine fermenta

Da bismo utvrdile da li je smanjenje razlika i prestanak promene boje u vezi s fermentom izvele smo dve vrste oglada s različitim koncentracijama laktoperoksidaze. Kod jedne vrste oglada postupili smo tako da je kod prve varijante rađeno isto kao što je objašnjeno u načinu rada, tj. dodavano je po 0,1 ml svežeg mleka. Kod druge i treće varijante razlika je bila u tome što je dodavano po 0,3 i po 0,5 ml sirovog mleka. Prosečne vrednosti ovih ispitivanja su prikazane u tabeli 2.

Tabela 2

Uticaj koncentracije laktoperoksidaze na ukupnu aktivnost

Redni broj merenja	Dodata količina mleka		
	0,1 ml	0,3 ml	0,5 ml
0	0,017	0,026	0,038
1	0,047	0,172	0,270
2	0,097	0,350	0,542
3	0,143	0,489	0,742
4	0,173	0,581	0,875
5	0,198	0,650	0,930
6	0,211	0,689	0,965
7	0,219	0,710	1,010
8	0,225	0,724	1,010
9	0,228	0,732	1,010
10	0,229	0,733	1,010

Ovi podaci pokazuju istu tendenciju kao i oni koji su izloženi u prethodnom ogledu. I ovde je najveća aktivnost laktoperoksidaze bila u prvom minutu merenja i opadala je s napredovanjem vremena. Međutim, razlike u vrednostima kod primene različitih količina mleka, odnosno pri različitim koncentracijama laktoperoksidaze, su još izraženije. To pokazuje činjenica da je ukupna aktivnost na kraju merenja bila kod upotrebe 0,1 ml mleka 0,229, kod primene 0,3 ml istog mleka 0,733, a 0,5 ml je pokazivalo vrednost 1,010. Isto tako, na kraju prvog minuta uzorak koji je sadržao 0,5 ml mleka je pokazivao za 55% veću vrednost na kolorimetru od onog koji je sadržao 0,3 ml mleka i 5,6 puta (560%) veću vrednost od uzorka za 0,1 ml mleka.

Ako se podaci bolje sagledaju, može se primetiti da su vrednosti pročitane na kolorimetru otprilike 3 i 5 puta veće za uzorke koji sadrže 0,3 odnosno 0,5 ml mleka od vrednosti koje su dobijene za uzorak sa 1 ml mleka. Ova srazmera nije potpuna ali dopušta da se zaključi da se s povećanom koncentracijom

cijom laktoperoksidaze povećava efekat ukupne aktivnosti fermenta za određeno vreme.

Ovi podaci takođe pokazuju da nije nedostatak reagensa razlog što se reakcija zaustavlja posle određenog vremena, jer se vrednosti na kolorimetru mnogobruko povećavaju pri povećanju koncentracije fermenta a pri istoj količini reagenata. Oni takođe govore da razloge za smanjenje aktivnosti peroksidaze treba tražiti ili u promenama samog fermenta ili u uslovima za njegovo delovanje. Ovu našu pretpostavku potkrepljuju i navodi profesora Džamića (3) koji kaže: »Katalizatori se ne menjaju po završetku hemijskog procesa. U praksi se, međutim, dešava da katalizator izgubi stalno ili privremeno katalitička svojstva« i dalje »Poznato je da proteini dosta lako podležu procesu denaturacije. Kako su fermenti takođe proteini mogu takođe da se denurišu i na taj način gube katalitičko dejstvo. U toku reakcija koje katalizuju biološki katalizatori često bivaju inhibirani proizvodima katalizovane reakcije ili se pak njihovo fizičko i strukturno stanje toliko promenilo da dolazi do prekida katalize, koji po svome karakteru može da bude reverzibilan ili ireverzibilan.«

Druga vrsta ogleada izvedena je tako da je smanjivana koncentracija fermenta u mleku. To je postignuto tako što je kuvanom mleku dodavano 10, 20, 40, 60 i 80% sirovog mleka. Od te mešavine dodavano je po 0,1 ml, kako metoda predviđa.

Ovim ogledima želele smo da vidimo da li će i manja koncentracija fermenta ispoljavati na isti način svoje dejstvo i da izbegnemo dodavanje veće količine mleka od one koja je predviđena metodom. Rezultati ovih analiza prikazani su u tabeli 3.

Tabela 3

Uticaj koncentracije peroksidaze na njenu aktivnost

Redni broj merenja	Koncentracija sirovog mleka (%)						
	0	10	20	40	60	80	100
0	0,000	0,000	0,002	0,002	0,010	0,012	0,023
1	0,000	0,003	0,007	0,013	0,029	0,048	0,107
2	0,000	0,011	0,016	0,028	0,052	0,079	0,187
3	0,001	0,012	0,018	0,040	0,069	0,106	0,241
4	0,002	0,015	0,021	0,050	0,082	0,125	0,279
5	0,004	0,017	0,024	0,056	0,091	0,138	0,298
6	0,004	0,018	0,025	0,061	0,096	0,149	0,354
7	0,004	0,020	0,027	0,065	0,101	0,154	0,324
8	0,004	0,021	0,027	0,067	0,103	0,158	0,328
9	0,004	0,022	0,028	0,068	0,105	0,161	0,329
10	0,004	0,022	0,029	0,069	0,107	0,163	0,329

Navedeni podaci pokazuju istu tendenciju kao i kod prethodnih ispitivanja, tj. najveću aktivnost u toku prvog minuta i zatim opadanje i prestanak delovanja. Izuzetak čini kuvano mleko (koncentracija 0) koje ne menja boju u toku prvog minuta a zatim je menja u vrlo maloj meri. Verovatno je ovo posledica čisto hemijske (neencimatske) reakcije dodatih hemikalija.

S povećanjem koncentracije sirovog mleka zapaža se jasno veća aktivnost kako na početku tako i u daljem toku merenja. Ovaj podatak takođe govori da je aktivnost peroksidaze u prvom redu posledica njene koncentracije. Mo-

ra se primetiti da je u ovim ogledima ispoljena manja proporcionalnost koncentracije fermenta nego što je bio slučaj u prethodnom ogledu.

Razlike u boji bile su uočljive i golim okom. Stavljajući posle merenja Erlenmajerove kolbe sa sadržajem jednu do druge, onim redom kojim su ispitivane, mogle smo jasno uočiti razlike u intenzitetu boje od vrlo blede ružičasto-ljubičaste, kod najmanje koncentracije mleka, do indigo-plave boje, kod potpuno sirovog mleka.

Ovi podaci ukazuju na mogućnost da se ovom metodom približno odredi da li je pasterizovanom mleku dodato sirovo. Oni isto tako nagoveštavaju mogućnost da se ova metoda iskoristi za dokazivanje veličine greške kod visoke pasterizacije (niža temperatura), koja bi dovela do toga da celokupna količina peroksidaze nije inaktivisana.

Zaključak

1. Laktoperoksidaza pokazuje najveću aktivnost u toku prvog minuta posle dodavanja svih reagenasa. S napredovanjem vremena aktivnost se smanjuje i na kraju četvrtog minuta prestaje.

2. Smanjenje i prestanak aktivnosti laktoperoksidaze nije prouzrokovano nedostatkom reagenasa već je posledica promena ili na samom fermentu ili u uslovima za njegovo delovanje.

3. Koncentracija fermenta je od najvećeg značaja za intenzitet i ukupnu aktivnost laktoperoksidaze. S povećanjem koncentracije znatno se pojačava ukupna aktivnost ovog fermenta.

Literatura

1. Auard, L., Roberts, W., Cardwell, J.: A Method for the Estimation of Peroxidase Activity in Milk. J. D. Sci. (1956) 5.
2. Pejić, O., Đorđević, J.: Mlekarski praktikum, Naučna knjiga, Beograd 1964.
3. Džamić, M.: Osnovi biohemije — bioenergetika, vitamini, fermenti, hormoni. I deo, Beograd 1966.
4. Inihov, F.: Biohimija Moloka, Moskva, 1966.
5. Webb, B., Johnson, A.: Fundamentals of Dairy Chemistry, Westport, Connecticut, 1965.

Vijesti

SEDMICA ŽIVEŽNIH NAMIRNICA U IZRAELU

Priredba »Druga sedmica živežnih namirnica« održat će se 14—19. siječnja 1973. u Tel Aviv Hiltonu. Priređuje ga zajednički komitet za živežne namirnice jeruzalemske privredne konferencije, izraelskog ministarstva trgovine i izraelskog izvoznog instituta. Osim tradicionalnog sajma živežnih namirnica održat će priredbe komitet za živežne namirnice jeruzalemske privredne konferencije.

Za vrijeme sedmice za živežne namirnice gosti će imati prilike da posjete razne pogone, upoznati s novim proizvodima i metodama rada i utvrditi koji proizvod odgovara potrebama njihovog tržišta.

Osim ostalog raspravljat će se o problemima proizvodnje živežnih namirnica u Izraelu i o prodaji proizvoda u inozemstvo.