

## PRIMJENA ENZIMSKIH METODA U KONTROLI KVALITETE MLJEČNIH PROIZVODA\*

Dr Matilda GRÜNER, dr Vera VOJNOVIĆ, Prehrambeno-biotehnološki  
fakultet, Zagreb

Mlijeko kao i mlječne prerađevine zauzimaju sve značajnije mjesto u ishrani ljudi. S jedne strane mlječni proizvodi odgovaraju zahtjevima suvremene medicine, a s druge strane suvremena tehnologija proizvodnje, obrade i prerade mlijeka smanjila je mogućnost kvarenja ovih proizvoda, a time povećala trajnost.

Paralelno s razvojem tehnologije mlječnih proizvoda zahtjevi u vezi s propisima i uslovima pod kojima se namirnice stavljaju u promet postaju složeniji. Da bi se udovoljilo novim zadacima neophodno je uvađanje novih metoda, koje su selektivnije, a pri tome brze, precizne i jednostavne.

Neosporno je da navedena svojstva imaju enzimne metode, koje čine važno područje u suvremenoj analitici. Enzimna analiza ima naročiti značaj za naše laboratorije, koji nisu snabdjeveni skupom aparaturom kao što je plinska i tekućinska kromatografija.

Samo određivanje je nešto skuplje od klasičnih metoda, no ako se uzme u obzir ušteda na vremenu i efikasnost takve analize onda je ona i ekonomski opravdana.

Enzimna analiza nije nova. Već odavno se određuje aktivnost enzima fosfataze, peroksidaze, katalaze, lipaze, reduktaze, proteaze, zatim aktivitet dodanih enzima tokom obrade odnosno tehnološkog procesa, te određivanje inhibicije enzima uslijed djelovanja efektora.

U ovom referatu će biti govora o mogućnostima primjene enzimnih metoda u kontroli kvalitete mlječnih proizvoda tokom tehnološke obrade, te kontroli finalnih proizvoda tokom skladištenja.

Ove metode se do sada nisu primjenjivale kod nas, a u suvremenim laboratorijima već su postale rutinske, a neke od njih i standardne.

Enzimna analiza, pored već spomenutog određivanja aktiviteta enzima, podrazumijeva i analizu kod koje se koristi aktivitet enzima da bi se kvantitativno odredio supstrat. Enzim je u svojstvu reagensa u višku prema supstratu. Zahvaljujući specifičnosti enzima otpada dugotrajno i zamorno odvajanje i prečišćavanje srodnih spojeva zbog kojih inače dolazi do interferencije kod primjene klasičnih postupaka.

Osim toga u biološkim uslovima moguće je kvantitativno određivanje labilnih intermedijera, koji se dugotrajnim postupcima ne mogu odrediti.

Iako se samo jedan dio podataka dobiven enzimnim metodama može usporediti sa rezultatima kemijskih ili fizikalno kemijskih metoda, one zbog svoje specifičnosti imaju prednost pred drugim metodama. Kao primjer se može navesti reduktometrijsko određivanje šećera: »Svi šećeri imaju reducirajuće svojstvo, ali sve reducirajuće supstance nisu šećeri«. Tako prisutnost askorbin-

\* Referat održan na XXI Seminaru za mljekarsku industriju u Zagrebu, 1983.

ske kiseline i drugih reducensa svojim reducirajućim svojstvom utječu na povećanje rezultata.

Nadalje enzimnim metodama se dobiju informacije, koje se do sada poznatim metodama moglo dobiti uz veliki gubitak vremena pa čak sa pogrešnim rezultatima, koji su bili uslovljeni slabom specifičnošću.

Kao primjer može se spomenuti diferenciranje pojedinih šećera ili pojedinih organskih kiselina.

Važnost enzimske analize dolazi do izražaja, tamo gdje uobičajeni postupci nisu mogući kao npr. kod stereoizomernih formi mlječne kiseline, što je važno kod pripreme mlječno kiselih proizvoda.

Kod određivanja pojedinih sastojaka enzimnim metodama, najširu primjenu je našao *Warburgov optički test*, koji primjenjuje NAD i NADP — ovisne hidrogenaze. Piridin koenzimi apsorbiraju svjetlost kod 260 nm, a u reduciranom stanju imaju još dodatnu apsorpciju sa maksimumom kod 340 nm. Preko apsorbandije na 340 nm može se direktno pratiti enzimna reakcija. Svejedno pri tome da li NAD prima vodik sa supstrata ili NADH otpušta vodik.

Da bi se dobila bar djelomična slika o veličini oblasti, koju obuhvata enzimna analiza u kontroli kvalitete mlijeka i mlječnih proizvoda, te o mogućnosti praćenja i usmjeravanja te kontroli trajnosti mlječnih proizvoda, navesti ćemo samo najvažnija određivanja.

Određivanje **laktoze**, specifičnog šećera mlijeka i sastojaka namirnica na bazi mlijeka naročito u topljenim sirevima.

**Glukoza, fruktoza i saharoza** su sastojci prema čijoj količini se utvrđuje vrijednost npr. različitih desertnih proizvoda na bazi mlijeka.

Određivanje **škroba** u koliko se dodaje jogurt za poboljšanje konzistencije.

**Jabučna kiselina** — je parametar koji može poslužiti za izračunavanje količine dodatka voća u voćnim jogurtima i voćnom siru. Enzimsko određivanje **pirogroždane kiseline** kao centralnog metabolita bakterijske razgradnje ugljikohidrata, masti i bjelančevina, može se lakše i brže provesti od brojenja mikroorganizama.

**Limunska kiselina**, dolazi u formi Na, K ili Ca soli kod pripravljanja topljenih sireva. Limunska kiselina predstavlja važnu kiselinu mlijeka, jer se stajanjem mlijeka brzo razgrađuje, naročito djelovanjem mlječno-kiselih bakterija. Ova kiselina pored ostalog igra važnu ulogu u puferiranju i dispergiranju mlijeka.

**Octena kiselina** nastaje, uz propionsku, iz mlječne kiseline prilikom pravljenja sira. Tako količina octene kiseline može služiti kao mjera propionskog vrenja.

**Glutaminska kiselina** predstavlja kvantitativnu mjeru za proteolizu, koja nastaje tokom zrenja sira, a igra i stanovitu ulogu kod naknadnog zrenja.

**Mlječna kiselina** dolazi u dva izomera kao L mlječna kiselina i D mlječna kiselina. L mlječnu kiselinu stvaraju *Streptococcus* — vrste, a D mlječnu kiselinu *Lactobacillus lactis* i *Lactobacillus bulgaricus*.

*Lactobacillus helveticus* i *Lactobacillus acidophilus* stvaraju smjese obih mlječnih kiselina. Određivanje mlječne kiseline daje dobre informacije u kontroli mlječno kiselog vrenja i u praćenju tehnološke obrade. Na temelju određivanja obih formi mlječne kiseline može se zaključiti na aktivnost mlječno kiselih bakterija, te ih determinirati.

Nadalje na temelju količine mlječne kiseline može se zaključiti o svježini mlijeka kao i o toku zrenja sira, a također i o kiselosti vrhnja kod pripreme maslaca. Određivanjem ukupne mlječne kiseline može se dokazati da li je neko kiselo mlijeko neutralizirano.

**Etanol** je važan indikator za prisutnost kvasca npr. kod pripreme kefira, no može služiti i za indirektno određivanje kvasca u nekom mekom siru.

**Acetaldehid** se određuje kao jedna od komponenata arome jogurta. Enzimsko određivanje **triglicerida** preko glicerola može poslužiti kao alternativna metoda naročito u slučajevima kada uzorak sadrži malu količinu masti, kod određivanja masti u topljenim sirevima, kao i u slučajevima kod kojih ima vrlo malo uzorka kao što je to slučaj u mlijeku žene.

Određivanje **uree** može poslužiti kao indikator iz kojeg se može zaključiti na ishranu mliječnih krava proteinskom hranom.

Određivanje **laktuloze**, spoja, koji je karakterističan za toplinski tretman mlijeka i mliječnih proizvoda.

Iz svega izloženog može se zaključiti da enzimska analiza ispunjava u idealnom smislu sve zahtjeve, koji se od neke analize zahtijevaju. Uprkos tome u laboratorijima se još primjenjuju klasične kemijske metode, a da se ne postavlja pitanje njihove točnosti.

To je i razumljivo, jer su ove dobro uhodane metode do sada mogle dobro poslužiti.

Spremnost da se neka nova metoda uvede je to manja, kada ona ne daje rezultate na koje smo navikli. Tada se za odstupanje od točnosti rezultata radije govori o utjecaju »matriksa« (znanstveni naziv koji označava nespecificnost).

Prelaz od kemijskih metoda na enzimске mogao bi se lako provesti, budući da se enzimi primjenjuju u prehrambenim tehnologijama već hiljadama godina (pivo, vino, ocat, sir).

Tako je historija enzima usko povezana sa biokemijom i tehnologijom namirnica. Čak se može tvrditi, da se u ovim procesima prvi put zapazilo, primjenjivalo i studiralo djelovanje ovih biokatalizatora.

#### Literatura

- STEFEN, CHR. (1975): »Enzymatische Bestimmungsmethoden zur Erfassung der Gärungsvorgänge in der Milch-wirtschaftlichen Technologie« **Lebensm.-Wiss u. Technol.** 2, 1—4.
- STEFFEN, CHR., NICK, B. & BLANC, B. (1975): »Methodik zur enzymatischen Bestimmung von Lactose, Glucose, Galactose und Lactat in Käse« **Schweiz. Milchw. Forsch.** 4, 13—15.
- STEFFEN, CHR., NICK, B. & BLANC, B. (1975): »Die gärungstechnische Rolle von Lactose, Glucose und Galactose in der Fabrikation von Emmentaler Käse« **Schweiz. Milchw. Forsch.** 4, 10—22.
- BLANC, B. (1974): »Der Wert der Sauermilchprodukte in der modernen Ernährung« **31**, 105 + 11.
- GOLLER, H., KUBE, J. (1974): »Milchzucker in der Schokoladenherstellung« **Zucker und Süßwaren-Wirtschaft** 27, Heft 9.
- MICHAL, G., BEUTLER, H. O., LANG, G., GÜNTNER, U. (1976): »Enzymatic Determination of Succinic Acid in Foodstuffs« **Z. Anal. Chem.** 279, 137—138.
- HEEFCHEN, W. (1975): »Zur Messung des bakteriellen Katabolismus in Milch« **Arch. f. Lebensm.** 26, 13—14.

- TOLLE, A., HEESCHEN, W., WERNERY, H., REICHMUTH, I., SUHOM, G. (1972): »Die Pyruvat-Bestimmung — ein neuer Weg zur Messung der bakteriologischen Wertigkeit der Milch« **Milchwissenschaft**.
- WINTERER (1974): »Methoden zur Keimzahlbestimmung in Rohmilch« **Milchwirtschaftl. Berichte** 39, 113—115.
- WIESNER, H. U. (1975): »Zur Aussagekraft des Pyruvat-Gehalts in Rohmilch beim Erzeuger« **Milchwissenschaft** 30, 471—473.
- STAHLHUT-KLIPP, H. (1975): »Zur Methodik der enzymatischem Pyruvat- und Lactatbestimmung in Rohmilch« **Milchwissenschaft** 30, 468—470.
- ERBERSDOBLER, H. i ZUCKER, H. (1980): Harnstoffgehalt der Milch — ein Indikator der Proteinversorgung von Milchkühen, **Kraftfutter**, 1, 10.
- VON G., SUHREN, W. HEESCHEN und A. TOLLE (1976): Automatisierte und manuelle enzymatische Pyruvatbestimmung in der Milch, **Milchwissenschaft** 31, 5, 257.
- HAPER W. J., WANG J. (1981): Amino acid catabolism in Cheddar Cheese slurries 3. Selected products from glutaminic acid **Milchwissenschaft** 36 (2) 70—72.
- BLUMENTHAL A, HELBLING I, WEYMUTH H. (1973): Über die L (+) und D (—) Milchsäure-Konzentrationen von Joghurts verschiedener Fettgehalte, **Mitt. Geb. Lebensmittelunters. u. Hygiene** 64, 403—414.
- WIESNER, H.-U., STAHLHUT-KLIPP, H. und BENNER, J. (1975): Zum Vorkommen D (—). Lactat in Sauermilch, Joghurt und Kefir. **Archiv für Lebensmittelhygiene** 26, März/April 1975.
- PUHAN, Z., FLÜELER, O. u. Banhegyi, Marta, 1973: Mikrobiologischer Zustand sowie des industriell hergestellten Joghurts in der Schweiz. **Schweiz. Milchforschung**, Band 2, 11/1973.
- KRUSCH, U. (1978): Ernährungsphysiologische Gesichtspunkte der L (+) — und D (—) Milchsäure. **Kieler Mi. — Forschungsberichte** 3/1978.
- STETTER, K. O. u. KANDLER, O. (1973): Untersuchungen zur Entstehung von DL-Milchsäure bei Lactobacillen und Charakterisierung einer Milchsäureracemase bei einigen Arten der Untergattung Streptobakterium. **Archiv Mikrobiol.**, Bd. 94
- PUHAN, Z. und WANNER, ELISABETH, (1980): Gehalt und Konfiguration der Milchsäure in Milch-, Molken- und Gemüseprodukten aus den Reformhaus. Kurz-Mitteilung in Schweiz. **Milchw. Forschung**, Band 9, 4/1980.
- GIESACKE, D., STANGASSINGER, M. (1977): 14C-Versuche über den Stoffwechsel von D (—). Milchsäure. **Ernährungsumschau** 11/1977.
- WIETELMANN, SYLVIA (1981): Physiko — Chemische Untersuchungen verschiedener Joghurtsprodukte über einen längeren Lagerungszeitraum. Jahresarbeit. Mikrobiologisches Institut der Universität Bonn.