

MLJEKARSTVO

-VJEŽBE-

Za studente Opšteg smjera
Poljoprivrednog fakulteta
Univerziteta u Istočnom Sarajevu

Predmetni nastavnik: Prof.dr Miroslav Lalović

Istočno Sarajevo, 2019. godine

S a d r Ź a j:

- 1. Uzimanje uzoraka sirovog mlijeka za analizu**
- 2. Organoleptičko ispitivanje mlijeka**
 - 2.1. Boja i izgled
 - 2.2. Miris
 - 2.3. Ukus
 - 2.4. Konzistencija
- 3. Priprema mlijeka za analizu**
- 4. Određivanje sedimenata i mehaničkih nečistoća u mlijeku**
 - 4.1. Metode sedimentacije
 - 4.1.1. Postupak u boci od providnog bezbojnog stakla
 - 4.1.2. Postupak u boci po Gerberu
 - 4.2. Metode filtracije
- 5. Određivanje zapreminske mase (gustine) mlijeka**
 - 5.1. Određivanje laktodenzimetrom
- 6. Određivanje kiselosti (svježine) mlijeka**
 - 6.1. Određivanje pH metrom
 - 6.2. Određivanje indikator listićima
 - 6.3. Proba kuhanjem mlijeka
- 7. Određivanje mliječne masti u mlijeku**
 - 7.1. Acidni postupak po Gerberu
- 8. Određivanje suve materije u mlijeku**
 - 8.1. Postupak sušenja
- 9. Utvrđivanje falsifikovanja mlijeka**
 - 9.1. Dokazivanje i određivanje vode dodate u mlijeko
 - 9.1.1. Izračunavanje vode dodate u mlijeko pomoću laktodenzimetarskog stepena
 - 9.2. Određivanje vode dodate u mlijeko
 - 9.2.1. Na osnovu tačke ledišta mlijeka
 - 9.2.2. Na osnovu refrakcije mliječnog seruma
- 10. Dokazivanje antibiotika u mlijeku**
 - 10.1. Hemijske metode
 - 10.2. Mikrobiološke metode
 - 10.2.1. Difuziona metoda
 - 10.2.2. Metode okiseljavanja i redoks-potencijala (metilensko plavo)
- 11. Određivanje broja i vrste somatskih ćelija u mlijeku (dopuniti kroz seminarski rad)**
- 12. Određivanje broja mikroorganizama u mlijeku (dopuniti kroz seminarski rad)**

1. UZIMANJE UZORAKA SIROVOG MLIJEKA ZA ANALIZU

Kontrola kvaliteta i zdravstvene ispravnosti mlijeka i proizvoda od mlijeka obavlja se na uzorcima koji se uzimaju od muznih krava, neposredno iz vimena ili iz muzilice i kante za mlijeko, odnosno u proizvodnji- od proizvodne partije ili dijela proizvodne partije i u prometu od ambalažnih jedinica. Postupak uzimanja uzoraka je sastavni dio analize, pa zbog toga i spada u stručnu aktivnost koju obavljaju osposobljena stručna lica i ovlaštene radnici. Naime, uzorak se uzima u maloj količini i na odgovarajući način, tako da se i rezultati analize odnose na cjelokupnu količinu proizvoda od kojeg je uzorak uzet.

Odgovarajućim postupkom uzorkovanja se omogućava da svaki dio, odnosno jedinica proizvoda (kanta, kontejner, cisterna i dr.) ima istu mogućnost da bude izabrana kao uzorak ili za uzimanje uzorka. U tom slučaju uzorak predstavlja prosječan sastav proizvoda od koga se uzorak uzima.

Pod proizvodnom partijom mlijeka i proizvoda od mlijeka, u smislu odredaba Pravilnika o metodama uzimanja uzoraka i metodama hemijskih i fizičkih analiza mlijeka i proizvoda od mlijeka (**Sl. List RS. Pravilnik br. Uredbe**), podrazumijeva se odgovarajuća količina iste vrste proizvoda, koja je proizvedena u istim uslovima, istog dana ili u istom dijelu dana i istom tehnologijom.

Uzorak se uzima u dva identična (po sastavu, masi, odnosno zapremini) primjerka. Na zahtjev i za potrebe vlasnika proizvoda, odnosno njegovog predstavnika, radnik mora uzeti i treći identičan primjerak. Jedan primjerak uzorka ovlaštene radnik odmah dostavlja u ovlaštenu laboratoriju koju sam odredi, a drugi primjerak se čuva (kod vlasnika ili ovlaštenog radnika) za potrebe superanalize u uslovima koji su propisani normativnim aktima za pojedine vrste mlijeka (sirovo mlijeko u rashladnom uređaju temperature do +8° C). Treći primjerak čuva vlasnik u istim uslovima. U određenim okolnostima (visoke vanjske temperature, udaljenost laboratorije, kraj radne sedmice, praznici i dr.) ovlaštene radnici mogu konzervirati brzo kvarljive uzorke, kao što je sirovo mlijeko, odgovarajućim hemijskim sredstvima :

- Na 100 ml doda se 0,5-1,0 ml borne kiseline, ili
- 10 kapi zasićenog kalijumovog ili natrijumovog bikarbonata, ili
- 2-3 kapi formalina itd,

uz napomenu da je to dozvoljeno za uzorke koji su uzeti iz razloga vršenja fizičko-hemijske analize, a ne u druge svrhe (organoleptičke i mikrobiološke analize), te obavezu evidentiranja sredstva i dodate količine u zapisniku.

Nakon uzimanja uzorka, ovlaštene radnik mora da sačini zapisnik u koji unosi podatke kao što su: mjesto, uslovi čuvanja, datum i vrijeme uzimanja uzoraka, vrsta i količina proizvoda od kojeg se uzorak uzima, broj i količinu pojedinačno uzetih uzoraka, oznake za identifikaciju, vrstu i količinu konzervanasa ako su dodavani u uzorak, razlog uzimanja uzorka, uočena

odstupanja i nepravilnosti, vrsta analize koja se treba izvršiti itd. Zapisnik o uzimanju uzoraka potpisuje ovlašteni radnik koji je uzeo uzorak i vlasnik proizvoda, odnosno njegov predstavnik.

Uz uzorke i zapisnik, ovlaštenoj laboratoriji dostavlja se i dopis u kome se pored podataka o organu uprave čiji je ovlašteni radnik uzeo uzorke, broja i datuma, navodi: kome i na koju adresu dostaviti izvještaj o izvršenoj analizi, kome i na koju adresu se ispostavlja račun za troškove vršenja analize, hitnost vršenja analize itd. Po dobijanju izvještaja i nakon uvida u rezultate analize sa mišljenjem, te eventualnog ponovnog uvida u stanje proizvoda od koga je uzorak uzet, ovlašteni radnik preduzima odgovarajuće mjere, a vlasnik proizvoda ostvaruje svoja prava (zahtijeva vršenje superanalize na drugom primjerku uzorka, dostavlja treći primjerak uzorka u ovlaštenu laboratoriju koju sam odabere, ulaže žalbu nadležnom organu u roku koji se navodi u rješenju i dr.) u skladu sa relevantnim normativnim aktima.

U određenim slučajevima (mastitis, tuberkuloza vimena, kontrola muznosti i dr.) neposredno iz vimena muzare uzima se tzv. „Štalski uzorak mlijeka“. Predhodno se donji dijelovi vimena, a posebno papile i ruke stručnog lica ili mužača pripreme, tj. operu se mlakom vodom uz korišćenje sapuna, odnosno otopine deterdženta, a zatim se dezinfikuju odgovarajućom otopinom dezinficijensa ili 50-70 % otopinom etilnog alkohola. Iza brisanja vimena čistom i suvom krpom u odvojenu posudu izmuzu se prvi mlazevi koji se kasnije prokuvaju i neškodljivo uklone, a zatim se u prethodno pripremljenu (čistu i sterilizovanu) bočicu namuže 100-150 ml mlijeka (1-2 cm ispod grla bočice, odnosno čepa) iz jedne četvrti, polovine ili cijelog vimena. Bočica se začepi, prikladno obilježi, ohladi (pod mlazom vode iz česme ili u rashlađenom uređaju) i na odgovarajući način dostavi laboratoriji.

Uzorak zbirnog mlijeka (jedne muzare, jednog proizvođača, odnosno sabirnog mjesta) i tečnih proizvoda od mlijeka iz proizvodnje ili iz prometa koji se nalazi u posudama većih zapremina (kante, kontejneri, cisterne i dr.) uzima se sa različitih mjesta, neposredno nakon miješanja (mješalica odgovarajuće veličine), posebnom kašikom ili kutlačom duge drške u odgovarajuću posudu, u količini od oko 250,0 ml. Ako se mlijeko nalazi u više manjih posuda, onda se uzorak uzima iz svake posude na osnovu ponderisanih vrijednosti pojedinačnih zapremina. Naime, utvrdi se potrebna količina uzorka (oko 250,0 ml), odrede se količine mlijeka u litrima u svakoj posudi iz koje će se uzeti uzorak (npr 8 l, 13 l, 20 l, 27 l = 68 l), ujednače se mjerne jedinice (uzorak 250,0 ml, a u posudama je 8 000,0 ml, 13 000,0 ml, 20 000,0 ml, tj ukupno 68 000,0 ml), iz tih vrijednosti se izračuna faktor (dijele se ml uzorka sa ukupnim ml mlijeka, tj. $250,0 \text{ ml} : 68 000,0 \text{ ml} = 0,0037$), pa se s tim faktorom pomnože količine u ml u pojedinim posudama i dobiju se količine u ml koje treba uzeti iz određene posude ($8 000 \times 0,0037 = 29,6 \text{ ml}$; $13 000 \times 0,0037 = 41,8 \text{ ml}$; $20 000 \times 0,0037 = 74,0 \text{ ml}$ i $27000 \times 0,0037 = 99,9 \text{ ml}$) koje daju prosječan uzorak od 251,6 ml, odnosno približno zadatu količinu uzorka.

2. ORGANOLEPTIČKO ISPITIVANJE MLIJEKA

Organoleptički (ORL) ili senzorni pregled mlijeka je prva, i može se sa sigurnošću reći odlučujuća laboratorijska metoda. Naime, ako se organoleptičkim pregledom mlijeka utvrdi da su osobine (izgled, boja, miris, ukus i konzistencija) uzorka usljed hemijskih, mikrobioloških ili drugih procesa u tolikoj mjeri izmijenjene, i da nisu više upotrebljivi za određene svrhe, ne vrše se druge laboratorijske analize, a uzorak se ocjenjuje zdravstveno neispravnim.

Organoleptička analiza vrši se čulnim organima koji su izgrađeni od ćelija (receptora) koje reaguju na stimulanse i prenose impulse nervima do mozga. Postoje razlike u osjetljivosti pojedinih senzornih receptora, uz napomenu, da u nekim slučajevima, osjetljivost prelazi i mogućnosti laboratorijskih (hemijskih i dr.) analiza, te da se povećanjem stimulansa do određene granice pojačava i senzorna reakcija.

ORL analiza ne daje apsolutne, strogo definisane ili brojčane rezultate, već pruža opštu orijentaciju o osobinama i kvalitetu proizvoda, što omogućava pravilan izbor drugih metoda pregleda i pravilnu interpretaciju rezultata. To je i razlog zašto je ORL pregled obavezan i sastavni dio svakog pregleda i ocjene kvaliteta i higijenske ispravnosti, odnosno da se u posljednje vrijeme i ORL ubraja u naučne metode, bez obzira što je karakteriše i potencijalna doza subjektivnosti. Pravilnim izborom ocjenjivača-analitičara, metoda i tehnika pregleda u znatnoj mjeri se mogu izbjeći subjektivnosti.

U odnosu na obim, može biti JEDNOSTAVNA i SLOŽENA. Jednostavnom analizom utvrđuju se samo razlike u nekoj određenoj osobini ili čak u opštim osobinama između dva ili više proizvoda, a složenom analizom ocjenjuje se istovremeno više pojedinačnih osobina i njihov međusobni značaj za uzorak.

Interpretacija rezultata uobičajeno se vrši *verbalno i opisno (deskriptivno)* ili *sistemom bodovanja*. U verbalnoj i opisnoj interpretaciji pojedinih osobina koriste se jednostavni, prihvatljivi i specifični termini, koji su stručni i dovoljno izražajni, odnosno termini koji su uobičajeni u stručnim krugovima i industriji mlijeka. U sistemu bodovanja, numerički se ocjenjuju odabrane osobine, a ukupna ocjena se izražava kao integralna cjelina pojedinačnih osobina.

Uspjeh ORL ocjene primarno zavisi od stručnog obrazovanja i senzornih sposobnosti analitičara. Analitičar mora dobro da poznaje normalne osobine uzorka, način dobijanja, uslove i održivost u skladištu i u prometu, uzorke i vidove manifestacije kvarenja, te mogućnosti i metode fizikalno-hemijskih, mikrobioloških i drugih analiza, što mu omogućava pravilnu interpretaciju rezultata.

Organoleptička analiza, odnosno ocjenjivanje kvaliteta, vrši se u odgovarajućim uslovima (prostorija, svjetlo, temperatura, mir i dr.) uz korištenje potrebnog pribora (nož, daska, čaša, pribor za pisanje, formulari i dr.). U organizovanom ocjenjivanju kvaliteta proizvoda učestvuje 5

i više odabranih analitičara, dok u rutinskom (laboratorija, proizvodni pogon, tržište) ocjenjivanju - analizi učestvuje manji broj analitičara ili čak dobro osposobljeni pojedinci. Iz naprijed izloženog, može se zaključiti da je ORL analiza mlijeka odgovoran i veoma stručan posao, odnosno da se tom analizom počinje i završava ocjena kvaliteta i higijenske ispravnosti proizvoda - uzorka.

2.1. Boja i izgled

Značaj boje i uopštenog izgleda proizvoda - uzorka, ne može se dovoljno istaći jer postoje subjektivni standardi, odnosno očekivani ili određeni pojmovi za pojedine uzorke i nepoželjne boje i izgledi koji su u pravilu povezani sa slabijim kvalitetom. Ljudsko oko vrši finu kvalitativnu diferencijaciju boja u rasponu vidljivog spektra od 400 (ljubičasto) do 700 (crveno) milimikrona. U tom rasponu, ljudsko oko je najosjetljivije na boje u zeleno-žutom polju (520-580 milimikrona). Boja primljena okom sa osvijetljenog predmeta posmatranja zavisi od spektralnog sastava svjetlosnog izvora, fizičkim i hemijskim karakteristikama predmeta, prirodni pozadinskog osvjjetljenja i spektralnoj osjetljivosti oka.

Pojam izgled, pored boje, obuhvata i ostale vizuelne senzacije. Tako npr, jedna površina, pored određene boje, može biti glatka ili hrapava, jednolična ili nepravilna, sjajna ili mat itd.

Mlijeko je bijele boje bez sjaja, a ako sadrži veću količinu masti onda je svijetlo-žućkaste boje. Obrano i razvodnjeno mlijeko ima plavkastu boju i veću providnost, a izmijenjeno mlijeko može biti crvenkaste, žute i plavičaste boje. U mlijeku nema stranih primjesa i taloga, a mlijeko izmijenjenog izgleda u sebi može sadržavati dlake, djeliće prostirke, hrane i fecesa i druge nečistoće na površini ili u vidu taloga. U tankom sloju je neprovidno, što se utvrđuje laktoskopom (propuštanje mlaza svjetlosti), a izražava se u stepenima providnosti.

Boja i izgled utvrđuju se u posudi (epruveta, menzura, čaša i dr.) od bezbojnog stakla. Uvijek se radi i paralelna proba sa nepromijenjenim mlijekom.

Proizvodi od mlijeka imaju svojstven izgled i boju, koji takođe mogu biti izmijenjeni.

2.2. Miris

Miris je značajan element kvaliteta proizvoda. Generalno, miris prepoznaje jedinjenja koja sadrže vodonik, ugljenik, azot, kiseonik i sumpor, te jedinjenja halogena, fosfora, arsena, selena, antimona i silikona, kao i karbonile, estere, amini, imine i laktone.

Cjelina koja doprinosi mirisu nekog jedinjenja, naziva se osmoformna grupa. Na intenzitet i karakter mirisa imaju uticaja i građa, oblik, veličina i polarnost molekula.

Miris se registruje olfaktornim receptorima koji se nalaze u prednjim respiratornim putevima, odnosno na unutrašnjim površinama *concha superior* i pripadajućih površina septuma (ima 10-20 miliona bipolarnih neurona ovalnog oblika na površini od 2,5 cm²). Čulo mirisa kod čovjeka

je sekundarno u odnosu na čulo vida, a 10 000 puta je osjetljivije od čula ukusa. Čovjek može da registruje više desetina hiljada mirisa, a neke može da pamti i po nekoliko godina.

Pored olfaktornog mehanizma, neki mirisi se mogu osjetiti i na druge načine. Npr, amonijak izaziva reakciju nerva trigeminusa (inervira kožu lica, jezik i zube) pa nastaje posebna senzacija koja se kombinuje sa olfaktornom i daje jedinstven osjećaj.

Analitičar treba da opiše vrstu, karakter i intenzitet mirisa i tom prilikom treba da se služi istom i unaprijed određenom tehnikom izražavanja i terminima koji mogu biti:

- **opšti** (svojtven, čist, nečist, prijatan, neprijatan, pun, prazan, aromatičan, odvratn itd.),
- **specijalni** (sladunjav, kiseo, kiselkast, oštar, užegao itd.), i
- **po analogiji** (na fenol, jodoform, hlor, eter, naftalin, amonijak, sumpordioksid, sirće, sir, loj, kvasac, sapun, drvo, kožu, bijeli luk, ribu, kreč, zagorjelost, pečenje, ustajalost, buđ, staju i itd.).

Prilikom utvrđivanja karaktera i intenziteta mirisa, analitičar može koristiti i razrjeđenja standardnih mirisa nekih materija, a uopšteno je bitno da analitičar pravi razliku između prijatnih ili poželjnih i neprijatnih ili nepoželjnih mirisa.

Mlijeko ima poseban slabo izražen miris. Stajanjem, miris postaje sve izraženiji, u početku kiselkast, a kasnije se javlja miris po truleži. Pored toga, miris mlijeka može biti na: staju, buđ, repu, lijekove, kiseo, oštar, užegao i dr.

Utvrđuje se mirisanjem nakon otvaranja suda, što se može intenzivirati miješanjem ili zagrijavanjem istog na t° oko 50°C.

2.3. Ukus

Osjećaj ukusa izazivaju gustativne meaterije rastvorljive u pljuvački ili sokovim hrane kada dođu u dodir sa gustativnim kvržicama (ćelije receptori) koje se nalaze u papilama jezika. Najpotpuniji osjećaj slanog registruje se na stranama i vrhu jezika, kiselog na stranama, slatkog na vrhu, osjećaj gorkog na bazi jezika.

Osjećaj ukusa spaja se sa osjećajem mirisa u složenu senzaciju prijatnog ili neprijatnog različite gradacije, pa analitičar kao i kod mirisa treba da opiše vrstu, karakter i intenzitet ukusa, služeći se pri tom opštim, specijalnim i terminima po analogiji, vodeći računa da oba opisa daju jasnu sliku proizvoda. Tako, kod mlijeka i porizvoda od mlijeka očekivani ukus može biti izrazit kao pun i specifičan, s tim što treba strogo odvojiti izmijenjeni (npr kiseo, slan, neprijatan, bljutav, gorak, sapunast, po metalima itd.) od nedovoljno izraženog normalnog, uglavnom prihvatljivog ukusa.

Mlijeko ima slabo izražen svojstven slatko-slan ukus. Utvrđuje se nakon temperiranja mlijeka na t° oko 20°C , uz napomenu da se sirovo mlijeko predhodno pasterizuje (30 min na t° $63-65^{\circ}\text{C}$, ili druge pasterizacije).

2.4. Konzistencija

Konzistencija je složen pojam koji obuhvata više fizičkih svojstava kao što su: čvrstoća (sila sposobna da se suprotstavi deformaciji), kohezija (jačina internih veza koje drže proizvod kao cjelinu), žilavost (energija potrebna za žvakanje do gutanja), gumoznost (energija potrebna za razaranje polutečnih proizvoda), viskoznost (brzina proticanja po jedinici sile), elastičnost (brzina kojom se deformisani proizvod vraća u prvobitno stanje) i adhezija (rad potreban da se raskinu privlačne sile između proizvoda i druge kontaktne površine).

Konzistencija se utvrđuje kinetskim čulom, te čulom sluha i palpacije, kao i uopšte taktilnim senzacijama uključujući osjećaj bola.

U nastajanju senzacija učestvuju organizovani i slobodni nervni završeci jezika, mekog i tvrdog nepca, zubi i vilice, pa se refleksom žvakanja koji je kompleksni nervni mehanizam, može utvrditi da li je i u kom stepenu neki proizvod žilav ili nježan, hrapav ili gladak, te grub, vodenast itd.

Prilikom opisa konzistencije mlijeka i proizvoda od mlijeka uobičajeno se koriste termini: tečan, vodenast, sluzav, zgrušan, sočan, viskoznan, zrnast, vlaknast, uljast, mastan, mek, čvrst, grub, nježan, lomljiv, žilav, gumast, elastičan, suv, brašnast, pahuljičast itd.

Kod mlijeka i tečnih porizvoda od mlijeka, konzistencija se utvrđuje u posudi, zatim prilikom mućkanja, u providnoj posudi, ili prilikom presipanja iz suda u sud, a kod čvrstih proizvoda od mlijeka, pored palpiranja, lomljenja, žvakanja i sl., konzistometrima.

U odnosu na namjenu postoji više vrsta konzistometara, a svi se sastoje od pet osnovnih dijelova: pogosnki mehanizam, dio za ostvarivanje kontakta, dio za određivanje pravca, tipa i intenziteta sile, reagujući element i dio za očitavanja rezultata.

Konačna organoleptička ocjena mlijeka i proizvoda od mlijeka treba da je objektivna i stručna sinteza pojedinačnih utisaka i senzacija, jednostavna i razumljiva.

3. PRIPREMA MLIJEKA ZA ANALIZU

Nakon muže i primarne obrade, mlijeko se čuva u odgovarajućim posudama pod određenim uslovima.

Za vrijeme čuvanja, usljed djelovanja sile gravitacije, u mlijeku može doći do taloženja (sediment i druge mehaničke nečistoće) ili izdvajanja vrhnja na površinu što u znatnoj mjeri ima

uticaja na rezultate pregleda. Zbog toga se, radi dobijanja prosječnog uzorka, mlijeko prije pregleda mora dobro promiješati odgovarajućim mješalicama.

Ako se radi o uzorku dostavljenom u laboratoriju, onda se miješanje vrši presipanjem iz jedne u drugu posudu, vodeći pri tom računa da se ne stvara pjena. Međutim, ako i nakon miješanja na površini ostanu izdvojene grudvice mliječne masti, onda se posuda sa uzorkom zagrijava u vodenoj kupki (t° 40°C), dok se grudvice ne otope i ponovnim miješanjem ne emulguju. Tek nakon toga se hlađenjem (pod mlazom vode), ili zagrijavanjem (vodena kupka), temperatura uzorka mlijeka dovede u raspon od 12-18°C, jer se u tom rasponu vrše skoro svi pregledi.

4. ODREĐIVANJE SEDIMENTA I MEHANIČKIH NEČISTOĆA U MLIJEKU

Sediment i mehaničke nečistoće su važne oznake kvaliteta i zdravstvene ispravnosti mlijeka. U mlijeko dospiju iz vimena i okoline, a radi se o dlakama, komadićima hrane i fecesa, prašini i dr.. Te nečistoće su značajne, pored ostalog, iz razloga što sa sobom u mlijeko unose različite vrste mikroorganizama, a ukazuju i na zastupljenost higijenskih i drugih mjera (prekrivanje ili zatvaranje posuda, cijedenje i dr.) u toku muže, čuvanja i prenosa mlijeka do mljekarnika, sabirne stanice i mljekare. U skladu sa normativnim aktima, mlijeko pri stajanju ne smije stvarati talog niti sadržavati mjerljive količine nečistoća.

Sediment i mehaničke nečistoće u mlijeku utvrđuju se metodama sedimentacije i filtracije.

4.1. Metode sedimentacije

4.1.1. Postupak u boci od providnog bezbojnog stakla

Pribor:

- a) Mješalica za mlijeko
- b) Boca od providnog bezbojnog stakla

Postupak: mlijeko u većem sudu (>1l) promiješa se okretanjem i laganim potresanjem bez stvaranja pjene. Odmah zatim u bocu se ulije 1 litar mlijeka ili dostavljena količina uzorka i ostavi da miruje. Nakon 10, 20 i 30 minuta pažljivo se podigne boca iznad nivoa oka i posmatra dno. Ako se na dnu vidi talog onda 1 l mlijeka sadrži više od 10 mg sedimenta i mehaničkih nečistoća.

4.1.2. Postupak u boci po Gerberu

Pribor:

- a) Mješalica za mlijeko

- b) Boca po Gerberu - konusno sužena sa oznakama

Postupak: mlijeko se pripremi kao u postupku sa providnom bocom, zatim se ulije 500 ml u bocu po Gerberu i ostavi 12-24 sata u tamnoj i hladnoj prostoriji. Nakon toga očita se nivo sedimenta u konusnom dijelu boce. Ako se nivo nalazi na oznaci 1 onda u 1 litru mlijeka ima oko 6.5 mg, na oznaci 2 oko 9 mg, a na oznaci 3 oko 12 mg sedimenta i mehaničkih nečistoća.

4.2. Metode filtracije

Postupak u boci po Gerberu

Pribor:

- a) Mješalica za mlijeko
- b) Boca po Gerberu-otvorena s obje strane
- c) Vata
- d) Standardi nečistoća, odnosno klasaž

Postupak: predhodno se na metalnu mrežicu, koja se nalazi na suženom dijelu boce, postavi vata. Zatim se iznad posude, u gornji otvor, ulije 500 ml pripremljenog mlijeka (zagrijanog na t° oko 35°C i promiješanog) i ostavi da se profiltrira. Klase i stepen nečistoća procjenjuje se prema standardu.

5. ODREĐIVANJE ZAPREMINSKE MASE (GUSTINE) MLIJEKA

Zapreminska masa (gustina) je masa (g) jedinice volumena (ml) kod određene temperature.

Kod mlijeka (kravlje) na $t^{\circ}15^{\circ}\text{C}$ kreće se od 1,027-1,034 g/ml, kod ovčijeg mlijeka 1,034-1,040 g/ml, kod kozijeg 1,030-1,034 g/ml i kod bivoličijeg mlijeka 1,028-1,035 g/ml.

Na gustinu mlijeka utiču brojni faktori, među kojim sastav mlijeka ima najznačajniju ulogu. Naime, mlijeko u prosjeku sadrži 87,5% vode i 12,5% suve materije. U suvoj materiji ima u prosjeku 3,5% mliječne masti i 9,0% bezmasne suve materije. U bezmasnoj suvoj materiji u prosjeku ima 3,5% bjelančevina, 4,7% mliječnog šećera i 0,7% pepela. Dodavanjem ili oduzimanjem bilo kog od navedenih osnovnih sastojaka, mijenja se i gustina mlijeka prema граниčnim vrijednostima, ili čak ispod ili iznad njih, iz razloga što ti sastojci imaju različite gustine.

Gustina vode na temperaturi 0°C iznosi 0,999841 g/ml, na $3,98^{\circ}\text{C}$ - 0,9999973 g/ml, a na 15°C iznosi 0,999102 g/ml. Kada se u mlijeko doda 5% vode onda mu se gustina smanji za oko

0,00145, kada se doda 10% vode smanji se za oko 0,003, a kada se doda 15% vode, gustina se smanji za oko 0,016 g/ml.

Gustina mliječne masti iznosi 0,93 g/ml, pa se njenim oduzimanjem iz mlijeka povećava njegova gustina. Tako mlijeko iz koga se stajanjem izdvoji vrhnje, ima gustinu oko 1,035 g/ml.

Gustine suve materije mlijeka iznosi 1,33 g/ml, bezmasne suhe materije 1,6 g/ml, a bjelančevina 1,35 g/ml, pa bi dodavanje jednog od ovih sastojaka dovelo do povećanja gustine mlijeka.

Ako se prilikom pregleda utvrde vrijednosti ispod ili iznad normalnih, sumnja se na falsifikovanje-patvorenje (uglavnom dodavanje vode ili obiranje vrhnja-pavlake). Međutim, ako se npr. iz 10 litara mlijeka obere vrhnje, a zatim doda 1 l vode, gustina mlijeka ostaje u normalnim vrijednostima. Zbog toga se za dokazivanje falsifikovanja mlijeka, pored gustine, treba da odredi i sadržaj mliječne masti, a u slučaju dodavanja vode i materija veće zapreminske mase (so, šećer i dr.), te materije treba utvrditi odgovarajućim postupcima pregleda.

Pored rase, načina ishrane i držanja muznih grla, izmuzivanja (više masti u posljednjim zadnjim izmuzajima), različitih oboljenja itd., i vrijeme vršenja pregleda ima određenog uticaja na gustinu mlijeka. Naime, odmah po muži mlijeko ima manju gustinu za oko 0,001 g/ml što se objašnjava tzv. Rocknagelovim fenomenom tj. zgušnjavanjem mlijeka stajanjem i hlađenjem, te gubitkom gasova i očvršćavanjem i kristalizacijom mliječne masti.

Gustina mlijeka se može odrediti laktodenzimetrom (aerometrom), piknometrom i Mohr-Westphalovom vagom.

5.1. Određivanje laktodenzimetrom

Pribor:

- Laktodenzimetar
- Termometar (t° od 0-50, odnosno 100°C)
- Mješalica za mlijeko ili dvije čaše od 250 ml
- Menzura od 250 ml ili drugap osuda u kojoj laktodenzimetar može slobodno da pliva

Postupak: Mlijeko se predhodno pripremi tj. ohladi ili zagrije (posuda se drži u vodenom kupatilu ili prelijeva hladnom vodom iz česme uz miješanje) na t° oko 15°C (za određivanje specifične težine), odnosno t° 20°C (za određivanje gustine), a zatim 6-8 puta promiješa (mješalicom ili prelijevanjem iz čaše u čašu) bez stvaranja pjene. Zatim se niza zid mlijeko ulije u menzuru u tolikoj količini da, kada se u nju stavi laktodenzimetar, mlijeko ne prelije rub menzure.

Laktodenzimetar se uroni u mlijeko do oznake 30 na skali vretena, prstom ili olovkom lagano dovede u sredinu i pusti da slobodno pliva i da se umiri. Nakon 2-3 minuta vrši se očitavanje. Očitava se gornji (Quevenne) ili donji (Soxhlet, Gerber) meniskus, zavisno o uputstvu priloženom uz laktodenzimetar. Oko osobe koja vrši očitavanje je u nivou gornjeg ruba mlijeka. Nakon toga očita se temperatura mlijeka (posebni termometar, ili termometar ugrađen u vreteno ili tijelo laktodenzimetra), koja je potrebna radi vršenja korekcije laktodenzimetrijskog stepena ili broja. Naime, laktodenzimetri su izbaždareni za $t^{\circ} 15^{\circ}\text{C}$, odnosno $t^{\circ} 20^{\circ}\text{C}$, pa ako je temperatura mlijeka viša ili niža oni uranjaju više ili manje pa ne pokazuju tačne vrijednosti.

Korekcija se može vršiti samo u granicama od 10 do 20° (za specifičnu težinu), odnosno 15 do 25° (za gustinu). Tako se za svaki stepen temperature iznad 15 stepeni, odnosno 20°C dodaje vrijednost 0,2 na očitani laktodenzimetrijski stepen ili broj (toplije mlijeko je rjeđe, laktodenzimetar uranja više, brojevi rastu od gore prema dole, pa se očita manja vrijednost, kod hladnog mlijeka je obrnuto), a ispod navedenih temperatura oduzima se po 0,2.

6. ODREĐIVANJE KISELOSTI (SVJEŽINE) MLIJEKA

Svježina mlijeka uslovljena je kiselošću, a kiselost je uslovljena koncentracijom slobodnih H jona. Slobodni H joni uslovljavaju aktivnu kiselost tj. pH. Svježe mlijeko odmah nakon muže ima pH oko 6,6, a kiselost mu se kreće od 6,5 - $7,5^{\circ}\text{SH}$. Prema tome, svježe mlijeko ima slabo kiselu reakciju (prirodna kiselost), koja potiče od kazeina, kiselih (primarnih) fosfata i citrata, a u manjoj mjeri od albumina, globulina i ugljen dioksida.

Prirodna kiselost mlijeka povišena je kod muzara koje boluju od hroničnih upala vimena, tuberkuloze i agalaksije, zatim kod kolostruma i mlijeka rane laktacije, kod dodavanja nekih konzervanasa (borne i drugih kiselina, formalina), a smanjena je kod muzara koje boluju od akutnih upala vimena, zatim kod mlijeka kasne laktacije, kod dodavanja sredstava za neutralizaciju (natrijev karbonat i bikarbonat) itd.

Stajanjem mlijeka, uslijed razmnožavanja i djelovanja mliječnokiselinskih bakterija, razgrađuje se laktoza u mliječnu kiselinu i druge sastojke, što uslovljava povećanje kiselosti (nastala kiselost). ***Prirodna i nastala kiselost daju ukupnu odnosno titracionu kiselost, koja predstavlja količinu natrijumovog hidroksida potrebnog za neutralizaciju mlijeka.***

Povećanjem kiselosti mijenjaju se i osobine mlijeka. Naime, kada kiselost dostigne 9°SH ukus mlijeka je kiselkast, pa takvo mlijeko nije pogodno za ishranu niti za preradu (teže se centrifugira, a zagrijavanjem gruša mlijeko čija kiselost se kreće od $10-11^{\circ}\text{SH}$ gruša se kuhanjem, a sa kiselošću od $24-30^{\circ}\text{SH}$ gruša se (prelazi iz tečne u gelerastu konzistenciju) na sobnoj temperaturi.

Slobodni H joni (aktivna kiselost – pH) u mlijeku određuju se: potenciometrijski (elektrometrijski) i indikator listićima, a kiselost mlijeka kvantitativnim (titracijskim) i kvalitativnim metodama.

6.1. Određivanje pH-metrom

Pribor i hemikalije:

- Erlenmajerova tikvica
- Pipeta graduisana od 50 ml
- pH metar
- Standard pH

Postupak : pH-metar se zagrije i izbaždari, zatim se u tikvicu, do polovine, ulije pripremljeno mlijeko, nakon toga se u mlijeko urone elektrode i uključi pH-metar. Na skali se očita vrijednost, a postupak se ponovi. Iza mjerenja elektrode se isperu mlakom vodom (50° C) radi odmašćivanja.

6.2. Određivanje indikator listićima

Pribor i hemikalije:

- Bakteriološka epruveta
- Pipeta graduisana od 20 ml
- Indikator listići sa standardom pH

Postupak: u epruvetu se do vrha ulije pripremljeno mlijeko. U mlijeko se uroni indikator listić. Nakon cijedenja, boja se upoređuje sa standardom i očita pH vrijednost.

Napomena: orijentacioni odnos vrijednosti pH i °SH je:

pH	6,6	6,0	5,6	4,6
°SH	6	11	16	27

Soxlet - Henkel metoda (kvantitativna-titracijska metoda)

Stepeni kiselosti mlijeka po Soxlet-Henkelu (°SH) su broj ml 0,25 mol/l natrijevog hidroksida utrošenih za neutralizaciju 100 ml mlijeka uz indikator fenolftalein.

Pribor i hemikalije:

- a) Erlenmajerova tikvica od 100 ml, 2 komada, ili staklene čaše od 100 ml,
- b) Pipete graduisane od 1, 2, 10, 20 i 50 ml, zavisno o metodi
- c) Bireta
- d) 0,25 mol/l natrijevog hidroksida ili kalijevog hidroksida (u odmjernu posudu od 1000 ml doda se 10,0 g NaOH ili KOH mol. težine 40,01, doda vode do polovine, a kada se otopi dopuni vodom do oznake i odredi faktor)
- e) 2% otopina fenolftaleina (u odmjernu posudu od 100 ml doda se 2,0 g fenolftaleina- $C_6H_4=C_2O_2= (C_6H_4OH)_2$ - doda se 70%(v/v) etilnog alkohola- do polovine, a kada se otopi dopuni se alkoholom do oznake)
- f) 2 i 5% otopina kobalt sulfata (u odmjernu tikvicu od 100 ml doda se 2,0 g kobalt sulfata- $CoSO_4 \times 7H_2O$ doda vode do polovine, a kada se otopi dopuni se vodom do oznake).

Postupak: u Erlenmajerovu tikvicu ulije se 50,0 ml mlijeka, na to se doda 2 ml 2 % otopine fenolftaleina i titrira se sa 0,25 mol/l natrijevog hidroksida do blijedoružičaste boje. Radi izbjegavanja subjektivnosti u ocjeni boje, vrši se upoređivanje sa bojom standarda. Standard se pripremi tako da se u Erlenmajerovu tikvicu ulije 50,0 ml istog mlijeka i na to doda 1,0 ml 5% otopine kobalt sulfata.

Stepeni kiselosti izračunavaju se po formuli:

$$^{\circ}SH = a \times F \times 2$$

Gdje je:

a= ml 0,25 mol/l NaOH utrošenih za titraciju,

F= faktor 0,25 mol/l NaOH,

2= za titraciju uzeto 50,0 umjesto 100,0 ml mlijeka

Napomena: Titracija se mora završiti za 30 sekundi. Na istom uzorku rade se istovremeno i u istim uslovima dvije probe.

6.3. Proba kuvanjem mlijeka (kvalitativna metoda)

Mlijeko koje ima od 11-12^oSH gruša kuvanjem, pa se i ovim postupkom kao i predhodnim ne može se utvrditi početak kiseljenja mlijeka.

Pribor:

- a) Bakteriološka epruveta
- b) Kipuća vodena kupka ili drugi prikladni sud
- c) Pipeta graduisana od 5 ml

Postupak: u epruvetu se ulije 3-5 ml mlijeka. Epruveta se stavi u kipuću vodenu kupku tako da sadržaj bude ispod nivoa vode u kupki. Kada mlijeko proključa, epruveta se drži još oko 1 minut u kupki uz povremeno mućkanje (tom prilikom se može vršiti i provjera mirisa). Zatim se epruveta izvadi iz kupke, sadržaj promućka, nakosi i posmatra da li na stijenci ima ugruška. Ako na stijenci epruvete nema krpica mlijeko je svježije, sitne pahuljice govore sumnjivo, a pahuljice za kiselo mlijeko (11-12°SH).

Napomena: proba kuvanjem se može brzo i jednostavno izvesti na metalnoj pločici sa udubljenjem (ili kašika), koja se zagrijava električnom strujom. Naime, u udubljenje zagrijane pločice uzme se ili ulje ili par kapi mlijeka i posmatra da li u mlijeku ili pjeni ima krpica i pahuljica koje govore za povećanu kiselost.

7. ODREĐIVANJE MLIJEČNE MASTI U MLIJEKU

Mliječna mast je važan sastojak mlijeka, a njen sadržaj je značajna odlika kvaliteta. U pojedinim vrstama mlijeka, kao i unutar vrste, sadržaj mliječne masti znatno varira, pa zbog toga Pravilnik o kvalitetu mlijeka...51/82) i propisuje granične vrijednosti sadržaja mliječne masti. Tako, mlijeko (kravlje) mora da sadrži najmanje 3,2 % mliječne masti, ovčije, 6,0 %, kozije 3,2%, a bivoličino mlijeko mora da sadrži najmanje 8,0% mliječne masti.

Postoji više metoda i postupaka za određivanje mliječne masti u mlijeku, a metode se mogu podijeliti u dvije osnovne grupe: gravimetrijska (izdvajanje i mjerenje mase) i volumetrijske (izdvajanje i očitavanje volumena). Pored toga, za rutinsko određivanje sadržaja mliječne masti u mlijeku koriste se i posebni uređaji, kao što su Milkotester i Ultra X koji rade na principu fotometra, odnosno ekstrakcije i brzog sušenja i vaganja bezmasnog ostatka.

7.1. Acidni postupak po Gerberu (volumetrijski postupak po Gerberu)

Postupak se zasniva na principu rastvaranja bjelančevina mlijeka sumpornom kiselinom, suspenziji kapljica msti u kiseloj sredini i njihovom izdvajanju centrifugalnom silom što potpomaže amilni alkohol (smanjuje površinski napon).

Kod određivanja masti u ovčijem i bivoličijem mlijeku, predhodno se vrši razređivanje u omjeru 1:1, a nakon očitavanja rezultat se pomnoži sa 2.

Pribor i hemikalije :

- Butirometar sa čepom (fibu jedno - ili dvo - konusni)
- Gerberova centrifuga (1000-1200 obr./min)
- Trbušaste pipete za kiselinu (10 ml), mlijeko (11 ml) i milni alkohol (1 ml)
- Sumporna kiselina (gustine na t 20 °C od 1,820-1,825 g/ml, koja se priprema tako da se na 60-70 ml vode lagano uz miješanje doda 1 l sumporne kiseline gustine 1,840 g/ml)

- Amilni alkohol ($C_5H_{11}OH$ - gustine na $t^\circ 20^\circ C$ – 0,811 g/ml, tačke ključanja od 128-130 $^\circ C$, koji u slijepoj probi sa vodom umjesto mlijeka ne izdvaja sloj sličan masti).

Postupak: U čist i suh butirometar bez dodirivanja grla odgovarajućim pipetama doda se 10,0 ml sumporne kiseline, zatim se pažljivo niz zid nakošenog butirometra doda 11,0 ml pripremljenog mlijeka (preporučuje se 10, 75 ml radi tačnosti rezultata) i 1,0 ml amilnog alkohola. Zatim se butirometar omota papirnom vatom ili krpom i otvor začepi gumenim čepom. Čep se uvuče do nivoa amilnog alkohola. U početku butirometar se lagano mućka (čep okrenut od lica i tijela!), zatim nekoliko puta snažno promućka (dok sadržaj ne postane tečan, taman i bez ugrušaka) i na kraju okrene se 2-3 puta za 180 stepeni radi ravnomjernog miješanja dijela tečnosti u suženom dijelu butirometra. Ako se stvori ugrušak koji se mućkanjem ne može rastvoriti postupak se ponovi uz korištenje sumporne kiseline niže gustoće ili amilnog alkohola kojem se doda i kap formalina.

Butirometar se zatim stavi u ležište centrifuge, s tim što se vodi računa o položaju čepa (okrenut prema vanjskom rubu) i ravnomjernom opterećenju. Centrifugira se 5 minuta na 1000-1200 obr./min. Nakon toga butirometar se izvadi iz centrifuge, provjeri uspješnost postupka (izdvojen prozirni sloj bez ugruška) i orijentaciono očita rezultat, a zatim se butirometar stavi (čep okrenut prema dole) u vodenu kupku ($t^\circ 65^\circ C$) tako da nivo vode bude iznad nivoa izdvojene masti. Nakon 5 min pomijeranjem čepa granična linija masti i ostalog sadržaja (svijetli i tamni dio) dovede se na nulu ili cijeli broj skale i očita položaj donjeg meniskusa (najniža tačka konkavnog ulegnuća) višeg nivoa prozirnog sloja, odnosno masti. Prilikom očitavanja gornji meniskus izdvojene masti dovede se u visini očiju. Očitani broj predstavlja grame mliječne masti u 100 g mlijeka, odnosno postupak mliječne masti.

Treba napomenuti da se na istom uzorku mlijeka moraju izvršiti pod istim uslovima (laboratorija, analitičar, metoda itd) najmanje dva određivanja (istovremeno ili jedno za drugim) i da razlika u rezultatu ne smije biti veća od 0,1 %. Nadalje, pojava ljubičastog (uzorak konzervisan formalinom) ili tamnog (karmelizacija kod većeg sadržaja šećera) sloja ne utiče na tačnost rezultata.

8. ODREĐIVANJE SUVE MATERIJE U MLIJEKU

Suva materija mlijeka podrazumijeva sve sastojke osim vode i isparljivih gasova. U mlijeku se kreće od 10-16%, a srednja vrijednost je 12,5%. Određuje se gravimetrijski-vaganjem tj. isušivanjem vode (u sušioniku ili u posebnom uređaju - Ultra X) i računski pomoću formula iz vrijednosti za gustinu (specifičnu težinu) i sadžaj mliječne masti. Nadalje, može se očitati u tabelama iz poznatih vrijednosti, odnosno u milkoskan uređaju u kome se poluautomatski po

principu rada infracrvenog spektrofotometra odredi sadržaj vode, masti, bjelančevina i laktoze uz dodatak konstantne vrijednosti za mineralne materije izračuna se sadržaj suve materije u uzorku.

8.1. Postupak sušenja

Ovaj postupak je propisan Pravilnikom 32/83 za određivanje suve materije u mlijeku. Zasniva se na principu sušenja ($t^{\circ} 102 \pm 2^{\circ}\text{C}$) određene količine (oko 3 g) uzorka mlijeka do konstantne mase, a zatim se iz poznatih vrijednosti iz formule izračuna postotak suve materije.

Pribor i hemikalije:

- a) Sušionik ($t^{\circ} 102 \pm 2^{\circ}\text{C}$)
- b) Posudica (od aluminijuma, nikla ili stakla) sa poklopcem (prečnik 6-7 cm, visine do 3 cm)
- c) Pipeta od 5 ml
- d) Stakleni štapić
- e) Hvataljke
- f) Analitička vaga
- g) Eksikator
- h) Vodena kupka (t° oko 70°C)
- i) Etilni alkohol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - 96%)
- j) Kvarcni pijesak (ispran sa 5% rastvorom solne kiseline, pa vodom osušen i izžaren).

Postupak: U čistu i suhu posudicu doda se 10-15 g kvarcnog pijeska koji se štapićem i laganim potresanjem rasporedi po dnu posudice. Zatim se posudica sa poluotvorenim poklopcem stavi u sušionik ($t^{\circ} 102 \pm 2^{\circ}\text{C}$) i suši oko 30 minuta. Nakon toga posudica se prenese hvataljkama u eksikator, zadrži oko 10 minuta i izvaga na analitičkoj vagi (t). Pipetom se u posudicu ulije oko 3 ml mlijeka (pripremljenog kao u poglavlju 5), izvaga se tačnošću od 0,001 g (t_1), doda par kapi etilnog alkohola (sprečava stvaranje skrame) pažljivo promiješa pijesak, mlijeko i alkohol staklenim štapićem i sa pluo tvorenim poklopcem posuda stavi i drži oko 30 minuta u vodenom kupatilu (t° oko 70°C) dok se ne otpari veći dio vode. Zatim se hvataljka prenese u sušionik ($t^{\circ} 102 \pm 2^{\circ}\text{C}$) i suši 2 sata, nakon čega se posudica prenese u eksikator, drži oko 10 minuta i izvaga (t_2). Sušenje (oko 1 sat), hlađenje (oko 10 minuta) i vaganje posudice (t_{2-1} , t_{2-2} itd) ponavlja se do konstantne mase, odnosno dok razlika u masi između dva posljednja vaganja ne bude manja od 0,5 mg ili dok masa zadnjeg vaganja ne bude veća od pretposlednjeg (došlo do oksidacije masti i povećanja mase). Za izračunavanje postotka suve materije uzima se najmanja vrijednost (npr t_{2-3}).

Sadržaj suve materije izračunava se iz formule:

$$\text{Sadržaj suve materije (\%)} = \frac{(t_2 - t) \times 100}{(t_1 - t)}$$

gdje je:

t = masa osušene posudice, štapića i poklopca

t₁ = masa posudice, pijeska, štapića, poklopca i mlijeka

t₂ = najmanja masa nakon sušenja.

Napomena: od istog uzorka mlijeka, moraju se izvršiti najmanje dva određivanja suve materije paralelno ili neposredno jedno iza drugog u istim uslovima (laboratorija, analitičar, postupak i dr.), a razlika ne smije biti veća od ±0,05% relativne vrijednosti. Nadalje, oduzimanjem vrijednosti za suhu materiju od 100 dobije se postotak vode u mlijeku.

9. UTVRĐIVANJE FALSIFIKOVANJA MLIJEKA

Neriješeni i neadekvatno uspostavljeni tržišni odnosi privređivanja usloveli su da neodgovorni proizvođači, prerađivači i trgovci pribjegavaju različitim postupcima i aktivnostima kojima se umanjuje kvalitet proizvoda, zbog čega nije rijedak slučaj da se vrši falsifikovanje (patvorenje) mlijeka.

Falsifikovanje mlijeka može se vršiti na više načina: dodavanjem vode, oduzimanjem mliječne masti, dodavanjem surutke, obranog mlijeka, kolostruma i drugih vrsta mlijeka, sredstava za neutralizovanje i konzerviranje, mlijeka u prahu, sredstava za povećavanje gustine (šećer, so, brašno itd). Falsifikovanje utiče na elemente kvaliteta mlijeka, a u prvom redu na gustinu, te na sadržaj mliječne masti, suve materije itd.

9.1. DOKAZIVANJE I ODREĐIVANJE VODE DODATE U MLIJEKO

9.1.1. Izračunavanje vode dodate u mlijeko pomoću laktodenzimetarskog stepena

Laktodenzimetarski stepen se odredi, a procenat vode dodate u mlijeko izračunava se po formuli:

$$\% \text{ dodate vode} = (d - d_1) \times F$$

gdje je,

d = laktodenzimetarski stepen normalnog mlijeka (L=30,0)

d1= laktodenzimetarski stepen ispitivanog mlijeka

F= konstanta, a iznosi 3,33

9.2. ODREĐIVANJE VODE DODATE U MLIJEKO

9.2.1. Na osnovu tačke mržnjenja (ledišta)

Dodavanje vode u mlijeko povećava tačku mržnjenja, jer se smanjuje sadržaj šećera i soli u mlijeku. Pravilnik 51/82 propisuje da tačka mržnjenja mlijeka ne smije biti veća od -0,53 stepena C. Tačka mržnjenja odredi se, a procenat vode dodate u mlijeko izračunava se po Vinterovoj formuli:

$$\% \text{ dodate vode} = \frac{100(t-t_1)}{t}$$

gdje je:

t= tačka ledišta normalnog mlijeka (tl= - 0, 55°C)

t1= tačka ledišta ispitivanog mlijeka

Napomena : postupak određivanja procenta vode dodate u mlijeko na osnovu tačke mržnjenja je sigurniji (određuje ispod 6% dodane vode) od ostalih postupaka, prvenstveno za svježje, odnosno mlijeko koje nema kiselost veću od 9°SH.

9.2.2. Na osnovu refrakcije mliječnog seruma

Refrakcija je odklon (lom) zrake svjetla prilikom prolaza iz rjeđe (zrak) u gušću (serum) materiju. Na refrakciju mliječnog seruma utiču mnogi faktori, a kreće se od 38-42 refraktometrijska stepena, srednja vrijednost 39° r kod t° 17,5°C. Određuje se refraktometrima, kojih ima više vrsta (Zeiss-sa tubusom, Pulfrich, Helige, Gerber-sa prizmom i dr.)

Pribor i hemikalije:

- a) Refraktometar- imerzioni
- b) Epruveta 30 x 2 cm sa gumenim čepom kroz koji prolazi staklena cijev 30-50 cm dužine
- c) Pipete graduirane od 1 ml i 50 ml
- d) Lijevak i filter papir promjera 7 cm
- e) Vodeno kupatilo (t° 17°C)
- f) Termometar

- g) 20 % otopina kalcijumovog hlorida (u odmjerneji tikvici od 100 ml, doda se 20 g CaCl₂ i vode 50 ml, promiješa – otopi i dopuni vodom do oznake, gustine 1-1375 g/ml, a razrijeđen 1:10 sa vodom kod t° 17,5°C ima 26° r).

Postupak: Mliječni serum se odvoji od mlijeka postupkom po Ackermanu. Naime, u epruvetu (30 x 2 cm) ulije se 30 ml mlijeka i doda 0,25 ml otopine kalcijumovog hlorida. Sadržaj se dobro promiješa, zatim epruveta začepi gumenim čepom kroz koga prolazi staklena cijev (radi kondenzovanja pare), pa se stavi u ključalu vodu, tako da nivo mlijeka bude ispod nivoa vode u posudi. Nakon 15 minuta epruveta se ohladi pod mlazem vode, a izdvojeni seum profiltrira. Potpuno bistri serum, koji se nalazi u čašici, stavi se u vodeno kupatilo (t° 17,5°C) refraktometra, propusti svjetlo pomijeranjem ogledala i kada se temperatura izjednači (kontrolni termometar) na skali se očita refraktometrijski stepen (granica svijetlog i tamnijeg polja) sa tačnošću ±0,1. Uvijek se vrše dva određivanja pod identičnim uslovima.

Napomena: svaki put prije određivanja, refraktometar se baždari vodom koja na t° 17,5 °C mora da pokazuje stepen refrakcije 15. Kod drugih tipova refraktometra serum se ulijeva u tubus (Zeiss) ili se premaže prizma (helige, Gerber i dr.) pa vrši očitavanje.

Dodavanje vode u mlijeko smanjuje refrakciju mlijeka, odnosno mliječnog seruma, jer se smanjuje sadržaj šećera i soli koji uslovljavaju otklon zrake svjetlosti (refrakciju). Pravilnik 51/82 propisuje da refrakcija mlijeka ne smije da bude manja od 1,3420, odnosno da refraktometrijski broj mliječnog seruma nije manji od 39. Refraktometrisjki broj odredi se kao u 2.1.1., a procenat vode dodane u mlijeko izračunava se po formuli:

$$\% \text{ dodate vode} = \frac{100 (r - r_1)}{24}$$

Gdje je:

r = refraktometrijski broj normalnog mlijeka

r₁ = refraktometrijski broj ispitivanog mlijeka

24 = razlika u refraktometrijskom broju normalnog mlijeka i vode (r mlijeka= 39, r vode=15, a razlika= 24)

Napomena: procenat dodane vode u mlijeko može se očitati i iz tabele na osnovu poznatog refraktometrijskog broja:

Tabela 1. Očitavanje procenta vode dodane u mlijeko iz utvrđenog refraktometrijskog broja kod 17,5°C

Refraktometrijski broj	% dodane vode	Refraktometrijski broj	% dodane vode
39,0	0	36,3	12
38,0	0	36,1	13
37,9	4	35,9	14
37,7	5	35,7	15
37,5	6	35,5	16
37,3	7	35,3	17
37,1	8	35,1	18
36,9	9	35,0	19
36,7	10	34,8	20
36,5	11	34,6	21

10. DOKAZIVANJE ANTIBIOTIKA U MLJEKU

U skladu sa odredbama pozitivnih normativnih akata (Zakon 55/78, Pravilnik 68/89 i dr.) mlijeko se ocjenjuje zdravstveno neispravnim za javnu potrošnju, ako potiče od muzara koje su liječene lijekovima (uključujući i antibiotike) koji prelaze u mlijeko za vrijeme liječenja i nakon posljednje aplikacije nije prošlo potrebno vrijeme za izlučivanje iz organizma životinja, prema uputi proizvođača o njihovoj upotrebi (karenca), odnosno mlijeko se ocjenjuje zdravstveno neispravnim za javnu potrošnju ako sadrži otrovne sastojke, antibiotike, hormone, mikotoksine ili druge materije u odredbama Pravilnika o količinama pesticida i drugih otrovnih materija, hormona, antibiotika i mikotoksina koji se mogu nalaziti u živežnim namirnicama (Sl.list SFRJ 26/1980).

U savremenoj stočarskoj proizvodnji, antibiotici se koriste u nutritivne, preventivne i terapijske svrhe, pa je i za očekivati da se njihove rezidue mogu naći u mlijeku. Uz to treba pomenuti i namjerno dodavanje antibiotika u mlijeko u svrhu produženja održivosti. Količine rezidua antibiotika koje se iz organizma životinja luče mlijekom zavise od brojnih faktora, među kojima treba pomenuti: način aplikacije (u digestivni trakt, mišiće, vene, uterus, vime), vrstu i količinu antibiotika, individualne osobine muzara i dr. Najveće količine antibiotika izluče se u mlijeko ako se apliciraju direktno u vime (mastitisi), pa se o tome treba posebno voditi računa.

Prisustvo rezidualnih količina antibiotika u mlijeku ima višestruke posljedice. Tako kod konzumenata mogu dovesti do alergijskih reakcija, demratitisa, probavnih smetnji (izmjena mikroflore u crijevima), prenosa rezistencije (iz saprofitskih na patogene bakterije) itd. Nadalje, mlijeko koje sadrži rezidualne količine antibiotika je neprikladno za preradu u fermentirane (kiselo mlijeko, jogurt, kefir i dr.) i neke druge mliječne proizvode (pavlaka i dr.) jer koče rast i djelovanje bakterijskih kultura bez kojih se ti proizvodi ne mogu proizvesti. Uz to treba pomenuti da rezidualne količine antibiotika stimulišu umnožavanje nekih nepoželjnih vrsta bakterija koje mogu dovesti do greški u proizvodnji (npr nadimanje sira), odnosno stimulišu proizvodnju toksina (enterotoksični stafilokoki), što pospješuje pojavu alimentarnih trovanja. To

su proed ostalog i razlozi provođenja redovne kontrole na njihovo prisustvo pogotovo u indikovanim slučajevima.

Rezidue antibiotika u mlijeku mogu se utvrditi hemijskim, mikrobiološkim i ostalim metodama sa više ili manje uspjeha.

10.1.Hemijske metode

Princip se zasniva na hemijskom dokazu antibiotika u mlijeku. Metode su relativno brze (par sati), međutim nedostatak je što se tim metodama ne mogu dokazati male količine antibiotika, a upravo se o tim količinama i radi, i što je za njihovo izvođenje potrebno imati poseban pribor i uređaje. Upravo iz tog razloga se i rijeđe koriste u praksi,

10.2.Mikrobiološke metode

Princip se zasniva na sprečavanju rasta i aktivnosti test-mikroorganizama u odgovarajućoj sredini uslijed djelovanja antimikrobnih materija u mlijeku. Kao test-sojevi uobičajeno se koriste: *B.cereus*, *B. subtilis*, *St.aureus*, *Sarcina lutea*, *St.termophilus*, *Lb.bulgaricus* i dr., a za razlikovanje antibiotika od dezinficijienasa koriste se *Sacharomyces cerevisiae* (nije osjetljiv na antibiotike).

10.2.1. Difuziona metoda

Princip se zasniva na difuziji antibiotika iz mlijeka u hranljivu podlogu i sprečavanju umnožavanja (kolonizacije) test-mikroorganizama. Mlijeko se na hranljivu (krutu) podlogu može staviti na tri načina: u cilindre (oksfordska ili Haetleyeva metoda), na papiru (disk ili Vincentova metoda) i u bušene rupe (Flemingova ili Galeslootova i Hassingova metoda). Prilikom izvođenja vodi se računa o asepsi, odnosno radi se po principima mikrobiološkog ispitivanja mlijeka, a zbog sličnosti u priboru, hemikalijama i izvođenju metode se navode u integralnom tesktu.

Pribor i hemikalije:

- a) Petrijeve ploče
- b) Pipete graduisane od 1, 5 i 10 ml
- c) Pincete
- d) Cilindri (nehrđajući čelik), papirni-diskovi ili metalni bušač- zavisno o metodi
- e) Test mikroorganizam (muzejski soj- suspenzija ili svježa kultura),
- f) Kruta hranljiva podloga za utvrđivanje antibiotika,
- g) Standardi antibiotika
- h) Ostali pribor i uređaji kao za vršenje mikrobiološke analize.

Postupak: predhodno se pripremi (sastavi prema receptu ili se uzme gotova suha podloga) kruta hranljiva podloga za utvrđivanje antibiotika. U otopljenu i na oko 45°C ohlađenu podlogu ulije se odgovarajuća količina predhodno pripremljenog test-mikroorganizma, sadržaj promiješa bez stvaranja pjene i određena količina (5, 10 ili 16 ml, zavisno o metodi) ulije u Petri ploču, koja stoji na ravnoj površini. Nakon skrutnjavanja podloge lagano se na površinu podloge unakrsno i u pravilnom razmaku nanese četiri cilindra. Zatim se u dva unakrsna i ovilježena (na vanjskoj strani dna Petrijeve ploče) cilindra do vrha ulije standardna koncentracija antibiotika (koncentracija približna onoj koja se očekuje u mlijeku), a u preostala dva cilindra na isti način ulije se mlijeko. Ploča se uklopi i u istom položaju stavi u rashladni uređaj (t° oko +4°C) gdje se drži 2-3 sata (sprečava se rast test-mikroorganizama prije završene difuzije antibiotika u podlogu). Nakon toga inokuliranje petrijeve ploče stave se u termostat (t° oko 30°C, odnosno 37°C, zavisno od test-mikroorganizma), gdje se drži 24 sata. Izostanak rasta test-mikroorganizama, oko cilindra sa standardom, govori za pravilno izveden postupak, a za izostanak rasta oko cilindra sa mlijekom, govori za prisustvo antibiotika u uzorku. Mjerenjem i upoređivanjem prečnika zona inhibicije rasta zaključuje se o većoj ili manjoj količini antibiotika u mlijeku. Orijentacione količine antibiotika u mlijeku mogu se očitati i iz predhodno pripremljene standardne krive, koja se dobije kada se na koordinate nanese poznate koncentracije antibiotika u standardu i zone inhibicije rasta test-mikroorganizma.

12.1.1. Metode okiseljavanja i redoks-potencijala (redukcije)

Princip se zasniva na kočenju rasta i aktivnosti *St. Termophilus* (iz jogurtne kulture ili jogurta), odnosno u nedostizanju određene kiselosti ili izostanku redukcije dodanih boja uslijed djelovanja antibiotika iz mlijeka.

- postupak sa metilenskim plavim

Pribor i hemikalije:

- Bakteriološka epruveta
- Pipete graduisane od 2 i 10 ml,
- Vodena kupka (t 43°C i 85°C),
- Svježa reagensna smjesa (na 20 ml otopine peptona doda se 0,1 ml 0,5% vodene otopine metilenskog modrila (C₁₆H₁₈N₃SCl x 3H₂O i 3 ml jogurtne kulture ili jogurta.

Postupak: u epruvetu se ulije 10 ml mlijeka i stavi u vodenu kupku (t 85°C) kroz 5 minuta (pasterizacija). Zatim se sadržaj ohladi na oko 45°C i doda oko 2,0 ml reagensne smjese. Nakon miješanja epruveta se stavi u vodenu kupku (t° 43°C) i drži 160 minuta. Ako se zadrži plava boja sadržaja onda su antibiotici prisutni u mlijeku.