

Практикум

по Хигиена и технологија на
млеко и млечни производи



Проф. д-р Сандра Мојсова



Издавач:
Факултет за ветеринарна медицина – Скопје,
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје



Рецензенти:

Проф. д-р Павле Секуловски, Факултет за ветеринарна медицина – Скопје, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

Проф. д-р Соња Србиновска, Факултет за земјоделски науки и храна – Скопје, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

Лектор:

Виолета Карацовска- Стојанова

Уредник:

Проф. д-р Сандра Мојсова

CIP – Каталогизација во публикација

.....

.....

Национална и универзитетска библиотека „Св. Климент Охридски“, Скопје

Практикум по Хигиена и технологија на млеко и млечни производи

ISBN 978-9989-774-51-5

COBISS.MK-ID

Содржина

1. Млеко и млечни производи.....	6
1.1 Млеко од други видови животни.....	6
2. Земање примероци од млеко и од производи од млеко	11
2.1 Начин на земање примероци од млеко и од производи од млеко	12
3. Органолептичка анализа на млеко и млечни производи (сензорна анализа)	16
4. Испитување физички карактеристики на млекото	23
4.1 Одредување волуменска маса (густина) и специфична тежина на млекото	23
4.2 Одредување на густината на млекото со лактодензиметар	24
4.3 Одредување на густината со помош на пикнометар	26
4.4 Одредување на рефракција на млечен серум	27
4.5 Определување на точката на смрзнување.....	28
5. Одредување киселост на млекото.....	30
5.1 Титрациска киселост.....	31
5.1.1 Метод по Soxhlet-Henkel.....	31
5.1.2 Метод по Thörner	33
5.1.3 Метод по Dornic.....	34
5.2 Ориентациони методи за докажување киселост во млекото	35
5.2.1 Алкохолна проба.....	35
5.2.2 Постапка со ализарол	36
5.2.3 Црвена проба.....	37
5.2.4 Проба со варење.....	38
5.3 Активна киселост	38
6. Одредување млечна маст во млекото	40
6.1 Ацидобутирометрија по Gerber	42
6.2 Автоматизирани и брзи методи за определување масленост	46
7. Одредување суви материи во млекото.....	48
7.1 Постапка со сушење.....	48
7.2 Постапка со пресметување со формула	50
7.3 Одредување безмасна сува материја	50
7.3.1 Гравиметриска постапка	50

8. Доказување пастеризација на млекото	52
8.1 Пероксидаза	54
8.1.1 Доказување на активноста на пероксидазата – Метод по STORCH	54
8.2 Фосфатаза.....	55
8.2.1 Доказување на алкална фосфатаза според метод на Andersen-Petersen.....	56
8.2.2 Доказување на алкална фосфатаза со Fluorophos метод.....	57
9. Одредување протеини во млекото	59
9.1 Одредување содржина на белковини во млекото	59
9.1.1 Доказување на вкупен азот во млекото по Kjeldahl	60
10. Одредување на лактоза во млекото.....	65
10.1 Гравиметриски метод.....	65
11. Одредување на бројот на соматски клетки и дијагностика на маститис.....	68
11.1 Преглед на млекото на црна подлога (предмолзна проба).....	70
11.2 Откривање воспаление на вимето преку содржината на хлориди во млекото	71
11.3 Метод по Дрост	71
11.4 Модифицирана постапка	72
11.5 Брз метод за определување на хлориди во млекото	73
11.6 Откривање маститис преку определување рН на млекото	73
11.7 Откривање воспаление на вимето според електричната спроводливост на млекото.....	74
11.8 Одредување на количината на млеко од поединечни четвртини	74
11.9 Цитолошки методи.....	75
11.10 Директно микроскопско одредување на соматските клетки	75
11.11 Автоматско определување на соматски клетки со Fossomatic	77
11.12 Калифорнија маститис тест – CMT, Schalm-ов тест.....	78
11.13. Whiteside тест.....	80
11.14 CAMP тест	81
12. Контрола на хигиенската исправност на садови за млеко, млекарски уреди, работни површини и воздух во млечната индустрија	84
12.1 Микробиолошка контрола на канти за млеко	84
12.2 Микробиолошка контрола на шишиња за млеко	85
12.2.1 Директно броење колонии во шишињата	85
12.2.2 Метод со испирање шишиња.....	86
12.3 Испитување микробиолошка контаминација на воздухот.....	87

12.4	Микробиолошка контрола со метод на брисови	87
12.5	Алтернативни методи за земање површински примероци	89
12.6	Метод на земање брисови со сунѓери и гази	89
12.7	Самолепливи ленти	90
12.8	Агар колбаси	90
12.9	Отпечаток плочи	91
13.	Методи за детекција и докажување присуство на антибиотици	93
13.1	Брзи теренски методи (скрининг методи)	94
13.1.1	Латерални-флоу тестови (Strip tests)	94
13.2	Микробиолошки тестови	95
14.	Методи за детекција на микотоксини во млеко	98
14.1	Брзи теренски методи (скрининг методи)	98
14.2	ELISA метод за определување на афлатоксин M1 во млеко	99
14.3	Имуноафинитетни колони за определување на афлатоксини	101
15.	Микробиолошки преглед на млеко и млечни производи	103
15.1	Одредување на вкупен број микроорганизми	103
15.1.1	Одредување на вкупен број бактерии во млеко со микроскоп	104
	Метод по Breed	104
15.2	Одредување на бројот на бактерии со индиректна постапка	105
	Редуктазна проба	105
15.2.1	Редуктазен тест со метиленско сино	105
15.2.2	Метод со резазурин	107
15.3	Автоматск метод за определување на вкупниот број микроорганизми во млекото	108
16.	Ферментирани течни млечни производи	110
16.1	Органолептичка анализа	110
16.2	Физичко-хемиски испитувања	110
16.2.1	Одредување степен на киселост	110
16.2.2	Одредување pH-вредност	111
16.2.3	Одредување на млечна маст по Gerber	111
16.2.4	Одредување на слободна јаглородна киселина (CO ₂) во кефирот	112
16.2.5	Микробиолошко испитување (одредување на <i>Streptococcus thermophilus</i> и <i>Lactococcus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>)	113
17.	Павлака	114

17.2 Тест за пастеризација (пероксидазна проба со бензидин)	114
17.3 Физичко-хемиско испитување	115
17.3.1 Докажување на додадено брашно и скроб	115
17.3.2 Одредување на степенот на киселост на кисела павлака	115
17.3.3 Одредување на млечна маст во павлака со ацидобутирометриски метод	116
18. Путер	118
18.1 Органолептичка анализа.....	118
18.2 Физичко-хемиска анализа	118
18.2.1 Одредување на уделот на вода во путерот со метод на испарување (технички метод).....	118
18.2.2 Одредување на уделот на вода во путерот со метод на сушење (стандарден метод).....	119
18.3 Одредување на уделот на соли според Mohr.....	120
18.4 Одредување на млечна маст во путер според Gerber	121
19. Сирење	124
19.1 Органолептички преглед на сирење.....	125
19.2 Физичко-хемиски испитувања	125
19.2.1 Одредување на натриум хлорид во сирење според методот на Mohr	126
19.2.2 Одредување степен на киселост на сирење	126
19.2.3 Одредување на млечна маст во сирењето	126
19.2.4 Одредување на вода во сирењето.....	127
19.3 Одредување на број липолитички бактерии во сирењето.....	127
20. Млеко во прав	129
20.1 Органолептичка анализа.....	129
20.2 Доказ за присуство на фосфатаза	129
20.3 Физичко-хемиски испитувања	129
20.3.1 Одредување на уделот на сува материја во млеко во прав.....	130
20.3.2 Одредување степен на киселост во млекото во прав (реконституирано млеко)	130
20.3.4 Одредување на млечна маст во млекото во прав.....	131
20.3.5 Директно одредување на млечна маст во бутирометар за павлака	132
20.3.6 Одредување степен на вжегнатост на млеко во прав.....	132
21. Кондензирано млеко	134

21.2 Органолептичко тестирање	134
21.2 Одредување степен на киселост	134
21.3 Одредување на млечна маст според Gerber	134
21.4 Одредување на сува материја во кондензирано млеко.....	135
22. Сладолед	137
22.1 Одредување на внатрешна температура на сладолед	138
22.2 Сензорна анализа.....	138
22.3 Физичко-хемиска анализа	138
22.3.1 Одредување на вкупна сува материја во сладолед.....	138
22.3.2 Одредување на млечна маст во сладолед според Gerber	138
23. Литература	143

1. Млеко и млечни производи

Млекото претставува природен секрет на млечната жлезда, добиен со редовно, потполно и непрекинато молзење на едно или на повеќе здрави молзни животни, кои се правилно хранети и одгледувани. Притоа, на млекото не смее ништо да му биде додадено или одземено, ниту, пак, да биде подложено на термичка обработка повисока од 40 °C. Овој секрет се излачува од млечната жлезда по породувањето (партус), при што суровото млеко треба да потекнува од животни кај кои до породувањето има најмалку 30 дена или од породувањето поминале најмалку 8 дена.

Во зависност од видот на молзното животно од кое потекнува, млекото се дели на кравјо, овчо и козјо млеко. Од аспект на структурата, млекото претставува сложен систем што може да се опише како емулзија или суспензија на млечна маст во вода. Во неговиот состав се наоѓаат многубројни растворени материи, какви што се лактоза и минерални материи во облик на соли, како и материи во колоиден облик, пред сè протеини. Како природен производ млекото содржи повеќе од 90 различни хемиски компоненти, што укажува на неговата сложеност и хранлива вредност.

Од нутритивен аспект, млекото се одликува со висока биолошка вредност и претставува комплетна намирница што ги задоволува потребите на организмот за раст и развој. Тоа е лесно сварливо, има течна конзистенција и лесно се комбинира со други намирници. Млекото е богато со белковини и калциум, а содржи и значајни количества витамини, особено витамин А и витамини од Б-комплексот.

Под поимот млеко во стручната и секојдневната употреба најчесто се подразбира кравјото млеко, додека другите видови задолжително се означуваат со соодветна одредница, какви што се овчо млеко, козјо млеко, млеко од биволица, млеко од кобила, млеко од камила или друго млеко, вклучително и хумано млеко.

Главните состојки на суровото млеко се во следните вредности:

- Вода	86 – 89 %
- Суви материи	11 – 14 %
- Млечна маст	3,2 – 5,5 %
- Белковини	2,6 – 4,2 %
- Лактоза	4,6 – 4,9 %
- Минерални материи (пепел)	0,6 – 0,8 %

1.1 Млеко од други видови животни

Овчото млеко се одликува со специфичен хемиски состав, при што содржи значително поголема количина масни киселини со краток ланец во споредба со кравјото млеко. Оваа карактеристика му дава изразен и препознатлив вкус и мирис. Воедно, овчото млеко полесно се вари од кравјото млеко, што се должи на фактот дека млечната маст е распоредена во помали масни глобули. Сепак, поради ваквата структура, овчото млеко е помалку погодно за производство на путер, бидејќи млечната маст потешко се издвојува (обира).

Во споредба со кравјото и козјото млеко, овчото млеко содржи поголема количина белковини. Нивната содржина варира во текот на лактацијата, при што на почетокот е нешто пониска, а со нејзиното напредување постепено се зголемува.

Овчото млеко спаѓа во групата казеински млека, бидејќи неговата доминантна белковина е казеинот. Во однос на аминокиселинскиот состав, овчото млеко содржи поголеми количества глицин и лизин во споредба со козјото и кравјото млеко.

Козјото млеко, според содржината на млечни масти, е слично на кравјото млеко, но се одликува со значајни разлики во структурата и во големината на масните глобули. Млечната маст во козјото млеко претежно е составена од триацилглицериди и се издвојува со поголем удел на масни киселини со краток ланец во споредба со кравјото млеко. Благодарение на помалата големина и порамномерната распределеност на масните глобули, козјото млеко полесно се вари. Сепак, токму ова својство го прави помалку погодно за производство на путер, бидејќи млечната маст потешко се издвојува.

Како и кравјото и овчото млеко, козјото млеко спаѓа во групата казеински млека, при што казеинот претставува негова главна белковина. Казеинот во козјото млеко се разликува и по својот аминокиселински состав: содржи помали количества аргинин, глутаминска киселина, лизин, изолеуцин, леуцин, тирозин и валин, а поголеми количества аспарагинска киселина, хистидин, метионин, фенилаланин и треонин.

Магарешкото млеко се смета за млеко најсродно со човечкото млеко. Поради содржината на млечна маст, белковини, а особено лактоза, неговиот состав е многу поблизок до составот на хуманото млеко отколку до кравјото млеко. Поголемата содржина на лактоза придонесува за подобра апсорпција на калциумот во цревата, што има значајна улога во формирањето и зацврстувањето на коските.

Специфичноста на составот на магарешкото млеко се должи на поголемиот удел на белковини на сурутка, какви што се лизозимот, α -лакталбуминот и β -лактоглобулинот, кои поседуваат изразена антимикробна активност. Поради ова својство, во магарешкото млеко обично се регистрира ниска концентрација на бактерии.

Магарешкото млеко, со својот карактеристичен состав и нискиот удел на казеин, се смета за погодна алтернатива на хуманото млеко, особено кај доенчиња алергични на белковините од кравјото млеко. Дополнително, може да претставува добар избор и во случаи на нетолеранција на одредени видови храна, поради што често се вбројува во групата функционални намирници.

Со различни постапки на доработка, обработка и преработка во домаќинствата и во занаетчиските и индустриските објекти од млекото како суровина може да се добијат различни производи од млеко што се користат во секојдневната исхрана на луѓето. Според Правилникот за барања за квалитетот на суровото млеко („Сл. весник“ бр. 96/2011), се дефинираат следниве поими:

Мешано млеко е млеко добиено со мешање на млеко од различен вид добиток.

Млечни масти се производи кај кои маста е најважниот составен дел и се во цврста состојба, растеглива емулзија, во принцип од типот вода во масла добиени исклучиво од млеко и/или одредени млечни производи. Како и да е, другите супстанции што се додаваат за нивно производство немаат улога да извршат целосна или делумна замена на која било млечна состојка.

Конзумно млеко е производ исклучиво добиен од млеко и е наменет за испорака до потрошувачот без понатамошна обработка. Во конзумно млеко влегуваат пастеризирано и стерилизирано млеко.

Млечни производи се преработени производи добиени со преработка исклучиво на млеко или со понатамошна преработка од преработените производи, притоа може да се додадат материи што се неопходни за нивно производство, но тие не треба да имаат улога на делумна или целосна замена на некоја млечна состојка;

Ферментирани млека се произведуваат со ферментација на млекото (кравјо, козјо, овчо, биволско и нивна мешавина) со примена на стартер култури;

Засладен јогурт е јогурт во кој е додаден еден или повеќе видови шеќери или други дозволени засладувачи;

Згуснато млеко (делумно дехидрирано млеко) со или без додаток на шеќер е производ добиен со извојување на дел од водата од млекото, од делумно обезмастеното млеко или обезмастеното млеко или комбинација на овие производи, каде што може да се додаде павлака или млеко во прав при што додаденото млеко во прав во готовиот производ не смее да надминува 25 % од вкупните млечни суви материи;

Млеко во прав е производ добиен со дехидрирање (сушење) полномасно делумно обезмастено или обезмастено млеко, павлака или мешавина помеѓу млеко и павлака при што содржината на вода на производ не треба да е поголема од 5 %;

Композитни (сложени) млечни производи се производи кај кои млекото, млечните производи или состојките во млекото се основни состојки во готовиот производ, а додадените состојки што не потекнуваат од млеко немаат улога да извршат делумна или целосна замена на која било состојка од млекото;

Реконституирани млечни производи се производи добиени со комбинација на млечни масти и безмасна сува материја во нивен непроменет облик, со или без додавање вода со цел да се добие соодветен состав на готовиот производ;

Рекомбинирани млечни производи се производи добиени со комбинација на млечни масти или безмасна сува материја во нивен непроменет облик со или без додавање вода со цел да се добие соодветен состав на готовиот производ;

Додадени состојки се состојки, освен адитиви што се употребуваат во производството и треба да бидат во согласност со општите барања за безбедност и квалитет;

Сирило е ензимски препарат што го засирува млекото при производство на сирење, казеин или казеинати;

Павлака е производ добиен со извојување на маста од млекото односно нејзино концентрирање при што млечната маст ја задржува формата на емулзија како во млекото, а содржината на млечна маст не смее да биде помала од 10 %;

Путер е производ од млечни масти добиен исклучиво од пастеризирано млеко или павлака. Млечната маст треба исклучиво да е добиена со примена на физички методи;

Путер од сурутка е производ од млечни масти добиен од пастеризирана суруткина павлака. При производство на путер од сурутка може да се користи и пастеризирана павлака;

Матеница е спореден производ речиси без масти што се добива при производство на путер (биење на ферментирано и неферментирано млеко и павлака). Матеницата исто така се произведува со ферментација на обезмастено млеко со природно закиселување од млечни и аромогени бактерии или со инокулација на загреаното млеко со стартер култури;

Масло е производ добиен од путер, павлака или кајмак (скоруп) или од други млечни производи што содржат поголеми количини млечна маст од кои е издвоена речиси целата вода и безмасниот сув остаток;

Анхидрирана млечна маст е производ добиен од свежа павлака или путер и претставува концентрат на млечните масти;

Кајмак е производ добиен со одвојување на горниот слој на варено изладено млеко, овчо млеко или мешано млеко. Видот на млекото освен кравјото треба да биде означено;

Сирење (свежо или зрело, тврдо или полутврдо) е производ што се добива:

- Со коагулација (засирување) на: млеко, обезмастено, полуобезмастено или полномасно млеко, згуснато (концентрирано) обезмастено млеко, реконституирано млеко, млечна или суруткина павлака, матеница или комбинација на наведените млечни суровини, обезбедувајќи сигурност дека дадените состојки не се користат за замена на целата или дел од која било состојка на млекото, под дејство на сирило или други супстанции што предизвикуваат засирување (какви што се: млечна киселина, лимонска, оцетна и други органски киселини), сирило од микробиолошко потекло (генетско сирило) при што се издвојува сурутка (течност што се создава во текот на обработка на потсирка како спореден производ).
- Со употреба на различни технолошки решенија што содржат коагулација на млеко, односно полупроизводи и производи добиени од млеко при што се добива производ што суштински се разликува по своите физички, хемиски и сензорни особини од млекото како и производ дефиниран во претходната точка.

Топено сирење е производ добиен со мелење, мешање, топење и емулгирање на еден или повеќе видови сирење со или без додаток на производи од млеко, преку загревање и со употреба на средства за емулгирање;

Сурутка е спореден производ добиен при производството на сирење и казеин и треба да содржи најмалку 6 % сува материја;

Млечен пудинг е производ што се добива по пастеризација или краткотрајна стерилизација (УНТ) на смеса од млеко, производи од млеко и скроб;

Млечен десерт е производ што се добива по пастеризација или стерилизација и аерација на смеса од млеко, производи од млеко и скроб;

Смеса од сладолед е засладен производ добиен од млечни протеини, емулгирани млечни масти и други адитиви во согласност со позитивните прописи од оваа област;

Стартер култури се култури од еден или повеќе соеви на еден вид или различни соеви од два или повеќе видови, кои со својата активност го насочуваат технолошкиот процес при производство на ферментирани млечни производи и кои истовремено ги одредуваат сензорните особини на добиениот производ, и

Сирила се ензимски препарати од анимално, растително или микробиолошко потекло со кои се потсирува млекото заради производство на сирење или казеини. Сирилот може да содржи или да биде добиено и од генетски модифицирани организми.

Според Правилникот за барања за квалитетот на суровото млеко, стандардите за квалитет на конзумното млеко, млечните производи и употребата на нивните називи, квалитетот и активноста на starter културите, сирилата и други специфични материи и начинот на нивна употреба, начинот на дополнително означување на млекото и на млечните производи како и дозволеното отстапување на тежината во однос на декларираната („Службен весник на РМ“, бр. 96/2011 година), производите што се ставаат во промет во оригинално пакување (обвивка, сад или налепница) мораат да имаат декларација што ќе ги содржи следниве податоци:

- назив на производот и неговото трговско име (доколку има);
- фирма, односно седиште и назив на производителот;
- датум на производство и рок на траење;
- нето-количина (маса, волумен) на производот;
- основни состојки на производот и количина на тие состојки изразени во мерни единици или во проценти во однос на нето-маса на производот;
- вид и количина на материјал со биолошка вредност, доколку се додадени состојки заради збогатување на составот (протеини, инулин и слично);
- група употребени адитиви (боја, арома и конзерванси) и други дозволени адитиви;
- други податоци што се од интерес на потрошувачите.

Декларацијата мора да биде лесно воочлива, јасна и читлива. Не смее да содржи ознаки (називи, слики, цртежи) што би ги довеле до заблуда потрошувачите. Буквите од називот на производот треба да бидат поголеми од другиот текст. Непосредно под називот на производот треба да се наоѓа текст со податоци за бои и конзерванси, а ако произведувачот не го пакувал производот, треба да биде наведено името на фирмата што го направила тоа, датум на пакување, а производите што не се во оригиналното пакување (поединечно пакување во амбалажа што обезбедува оригиналност и квалитет на производот до отворање) текст со назив на производот од кој се гледа за која група производи станува збор, датум на производство и употребливо до.

2. Земање примероци од млеко и од производи од млеко

Млекото и млечните производи што се ставаат во промет на домашниот пазар подложат на здравствен надзор, ветеринарна и санитарна контрола. При увоз, тие подложат и на царинска контрола. Сите овие контроли се спроведуваат во согласност со важечките законски прописи.

Надзорот и контролата ги вршат органите на управата преку овластени лица, како што се санитарни, ветеринарни, земјоделски, пазарни и други инспектори. Овластените лица имаат право да земаат потребни количини примероци за лабораториски испитувања. При земањето на примероците задолжително се составува записник. Примероците, заедно со еден примерок од записникот, се доставуваат во овластена акредитирана лабораторија.

Записникот се составува при земање на примероците, во четири копии и треба да ги содржи следните податоци:

- име на сопственикот (производителот);
- датум и време на земање на примерокот;
- начин на складирање и чување на производот;
- оригиналната количина на производот;
- количината што е земена за испитување;
- начинот на земање на примерокот;
- видот на анализа што треба да се изврши.

Истовремено, и под исти услови, Агенцијата за храна и ветеринарство зема најмногу три примероци, и тоа официјален примерок за прва анализа, за дополнително стручно мислење по барање на операторот и референтен примерок за супер (референтна) анализа. (Закон за изменување и дополнување на законот за безбедност на храната, „Службен весник на РСМ“ бр. 209/2023 година)

По приемот на примероците и нивното евидентирање, овластената лабораторија е должна да ги изврши потребните испитувања во согласност со важечките нормативни акти. По завршувањето на испитувањата се издава извештај. Извештајот содржи податоци за испраќачот и за сопственикот на производот, како и резултати од анализата, со јасно наведување дали примерокот е во согласност со одредбите од Правилникот.

Резултатите од испитувањето може да бидат побиени со спроведување суперанализа. Суперанализата се врши на примерок кој е земен во исто време, на ист начин и испитан со ист метод во лабораторија која е на исто или повисоко ниво од лабораторијата во која е извршена првичната анализа.

Овластениот работник има право и обврска да преземе соодветни мерки, меѓу кои:

- привремена забрана за промет на производ за кој постои сомнеж дека не е здравствено исправен, сè додека тоа не се потврди со лабораториско испитување;
- забрана за промет и употреба на здравствено неисправни производи;
- наредба за одземање или уништување на здравствено неисправни производи;
- забрана за увоз на здравствено неисправни производи и нивно враќање на испраќачот;

- наредба за уништување на неисправни увезени производи, доколку тие не можат да бидат вратени.

Покрај редовните инспекциски контроли, производителите спроведуваат и внатрешни, односно интерни контроли. Овие контроли се вршат на местото на производство, какви што се фармите, млекарниците, производствените погони и откупните центри.

Внатрешната контрола може да биде:

- **здравствена**, со цел заштита на здравјето на луѓето и спречување на ширење заразни болести, особено зоонози;
- **економска**, за заштита на економските интереси на производителот и на потрошувачот;
- **технолошка**, поврзана со изборот на сировини, рандманот и технолошкиот процес;
- **селекциска**, за селекција на молзни крави според нивните производни карактеристики;
- **научна**, со цел проучување на карактеристиките на млекото и на млечните производи;
- **советодавна**, насочена кон отстранување недостатоци и унапредување на производството.

2.1 Начин на земање примероци од млеко и од производи од млеко

Контролата на квалитетот и здравствената исправност на млекото и на млечните производи се спроведува врз основа на примероци земени директно од вимето на кравите, од кантите за млеко (на ниво на штала), од производна партија или делови од производна партија (на ниво на производство), како и од поединечни амбалажни единици во промет.

Постапката на земање примероци претставува составен и суштински дел од испитувањето и спаѓа во стручна активност што ја извршуваат квалификувани и овластени лица, во согласност со пропишаните стандарди и постапки.

Со примена на соодветни постапки за моистрирање се обезбедува секој дел, односно секоја поединечна единица на производот (канта, контејнер, цистерна и др.), да има еднаква можност да биде избрана како мостра за земање примерок. Мострата, по дефиниција, претставува одредена количина млеко или млечен производ, која, според својот состав и својства, верно ја одразува вкупната количина млеко или млечен производ од кој е земена.

Примерокот мора да биде репрезентативен, пропорционален и просечен. Тој треба да биде соодветно спакуван или затворен, а при неговото земање мора да се спречи каква било контаминација. Затоа, примерокот секогаш се зема под асептични услови. Во одредени случаи, на примерокот може да му се додаде конзерванс, како, на пример, кај сурово млеко наменето за определување на бројот на соматски клетки. За време на транспортот задолжително мора да се почитува ладниот синџир, со цел да се зачуваат оригиналните својства и микробиолошката стабилност на примерокот.

Постојат неколку видови мостри:

1. Шталска мостра

Обично се зема да се испита продуктивноста на едно грло при вршење селекција, за испитување соматски клетки, вкупен број микроорганизми, хемиски состав, докажување фалсификат (додавање вода или одземање масти), антибиотици, афлатоксини.

2. Мостра од производство

Најчесто се зема од канти, цистерни. Во зависност од анализата што треба да се прави, можат да бидат земени 200 до 500 mL млеко или млечен производ.

3. Мостра од промет

Доаѓа во амбалажни единици (тетрапак, пластични пакувања или вакуумирани пакувања). Бројот на мостри што се земаат, треба да соодветствува на вкупната количина од која потекнуваат пакувањата.

Примероците се земаат со соодветен и чист прибор. Инструментите што се користат за земање мостри мора да бидат стерилни. Стерилизацијата може да се изврши со автоклавирање, сушење во сушница, палење со 96 % етил алкохол, како и со вриење во вода или изложување на жешка пара во траење од неколку минути.

За таа намена се користат различни прибори и инструменти, какви што се: пипети, мензури, лажици, црпалки, автоматски мешалки, шпатули, ножеви, сонди и друг соодветен прибор.



Слика 1. Инструменти за мострирање храна

Примероците мора да се стават во стерилни вреќички или садови (хартиени, поливинилни, метални или стаклени) со соодветна големина и волумен, изработени од материјал што не впира маснотии и вода.

При земањето примерок, особено важно е суровото млеко претходно добро да се измеша со цел да се постигне хомогеност на мострата. Мешањето може да се изврши со рачна мешалка или со механичка перфорирана мешалка прикачена на метална дршка. При мешањето треба да се внимава да не се создаваат воздушни меурчиња. Доколку станува збор за цистерна или резервоар, мешањето се врши со специјални мешалки со долги дршки (околу 1,5 m).

Кога станува збор за кашкавал, најпрво се отстранува површинскиот слој со стерилан нож. Потоа, со сонда се земаат примероци од повеќе различни места, со цел да се добие репрезентативна мостра.

Кај путерот, примерокот се зема од неколку места со сонда или со стерилна лажица.

По завршувањето на земањето на примероците, тие се пакуваат во соодветна амбалажа (картонска, дрвена или транспортен фрижидер). Примероците можат да бидат и запечатени со жиг или со печатен восок. Во најкраток можен рок, примероците треба да се достават во лабораторија, при што задолжително мора да се почитува ладниот синцир.

Во случаи кога не е можно примерокот да се достави во лабораторија за кратко време (поради високи температури, голема оддалеченост на лабораторијата или завршување на работното време), овластениот работник може да го замрзне примерокот или да го конзервира. Ова најчесто се применува кај лесно расипливи производи, како што е суровото млеко. Во такви случаи, примерокот не е погоден за микробиолошко и органолептичко испитување, но може да се користи за физичко-хемиска анализа.

Конзервирање примероци на сурово млеко

Најчесто употребувани конзерванси за сурово млеко се азидиол, бронопол, формалин, натриум бикарбонат и борна киселина. Многу е важно употребата на конзерванс да биде јасно евидентирана во записникот, со наведување на видот на средството и неговата количина.

Барањата што треба да ги исполни суровото млеко на национално ниво ги пропишува Правилникот за барања за квалитетот на суровото млеко, стандардите за квалитет на конзумното млеко, млечните производи и употребата на нивните називи, квалитетот и активната на стартер културите, сирилата и други специфични материи и начинот на нивна употреба („Сл. весник“ бр. 96/2011).

Специфични барања за различни видови млеко

Кравјото млеко треба да ги исполни следниве барања:

- да содржи најмалку 8,5 % суви материи без млечни масти
- густината да не е пониска од $1,025 \text{ g/cm}^3$ измерена на температура од 20 °C
- киселинскиот степен да е од 6,0 до 6,8 °SH, а pH-вредноста да е од 6,5-6,7 и да има негативна реакција на алкохолна проба со 72 % етил алкохол
- точката на смрзнување да не е повисока од -0,517 °C
- да содржи најмалку 3 %, а најмногу 5,5 % млечна маст
- да содржи најмалку 2,5 % а најмногу 4 % белковини

Овчото млеко треба да ги исполни следниве барања:

- да содржи најмалку 9,5 % сува материја без млечни масти
- густината да не е пониска од $1,034 \text{ g/cm}^3$ измерена на температура од 20 °C
- киселинскиот степен да е од 8,0 до 12,0 °SH, а pH-вредноста од 6,5 до 6,8
- точката на смрзнување да не е поголема од -0,560 °C
- да содржи најмалку 3 %, а најмногу 12 % млечна маст
- да содржи најмалку 3,8 %, а најмногу 8 % белковини

Козјото млеко треба да ги исполни следниве барања:

- да содржи најмалку 7,5 % сува материја без млечна маст
- густината да не е пониска од $1,024\text{g/cm}^3$ измерена на температура од 20 °C
- киселинскиот степен да е од 6,5 до 8,0 °SH, а pH-вредноста од 6,4 до 6,7
- точката на смрзнување да не е повисока од -0,54 °C
- да содржи најмалку 2,5 %, а најмногу 5 % млечна маст
- да содржи најмалку 2,5 %, а најмногу 4,5 % белковини

Биволското млеко треба да ги исполни следниве барања:

- да содржи најмалку 8 % млечна маст
- да содржи најмалку 11 % безмасна сува материја

Покрај горенаведените параметри, суровото млеко треба да има својствен изглед, боја, мирис и вкус. Најдоцна два часа по молзењето, млекото мора да се олади на температура не повисока од 6 °C.

Суровото млеко не смее да содржи остатоци од фармаколошки или хормонски средства над дозволените граници, ниту антибиотици, пестициди, детергенти или други штетни материи што можат да ги изменат неговите сензорни својства. Млекото треба да потекнува од животни во лактација, при што од партусот мора да имаат поминато најмалку осум дена, односно до наредниот партус да преостануваат најмалку триесет дена.

3. Органолептичка анализа на млеко и млечни производи (сензорна анализа)

Органолептичката анализа претставува составен дел од инспекцискиот извештај и се заснова на регистрирање на сетилните впечатоци што се добиваат преку сетилата за мирис, вкус, вид и допир на производот. Таа се врши со помош на сетилните органи, кои се изградени од специјализирани клетки (рецептори) што реагираат на различни стимуланти и ги пренесуваат нервните импулси до мозокот. Оваа анализа овозможува првична и брза процена на состојбата на производот.

Честопати, органолептичкиот преглед има одлучувачка улога при оценувањето на квалитетот и употребливоста на производот за човечка исхрана. Имено, доколку со органолептичката анализа се утврди дека својствата на производот (изглед, боја, мирис и вкус), како резултат на хемиски, микробиолошки или други процеси, се изменети во таква мера што производот повеќе не е употреблив за наменетата цел, не се спроведуваат дополнителни лабораториски испитувања, а примерокот се смета за здравствено неисправен.

Органолептичката анализа не обезбедува апсолутни, строго дефинирани резултати изразени во бројни вредности, туку овозможува општа ориентација за карактеристиките и за квалитетот на производот. На тој начин, таа придонесува за правилен избор на понатамошните аналитички методи и за соодветна интерпретација на добиените резултати. Со правилен избор на аналитичар (оценувач), како и со соодветен метод и техника на испитување, во значителна мера може да се намали субјективноста и да се постигне поголема прецизност, ширина и брзина на реакција на сензорниот апарат.



Слика 2. Лабораторија за органолептичка анализа

Во однос на обемот, органолептичката анализа може да биде едноставна и сложена. Интерпретацијата на резултатите вообичаено се врши вербално (описно, дескриптивно) или со примена на систем на бодување. Кај вербалната (дескриптивна) интерпретација се користат јасни, прифатливи и специфични термини што се доволно стручни и разбирливи.

Кај системот на бодување, одбраните својства се оценуваат нумерички, а вкупната оценка се изразува како интегрална целина составена од поединечните својства.

Успехот во органолептичката оценка првенствено зависи од стручното образование и од сензорните способности на аналитичарот. Аналитичарот мора добро да ги познава нормалните својства на производот – примерок, начинот на негово добивање, условите на складирање и промет, како и причините и видовите на расипување. Исто така, аналитичарот треба да има нормално развиени сетила, способност јасно и прецизно вербално да ги изразува своите впечатоци, високо ниво на концентрација и постојана практична ангажираност.

За да се обезбеди објективност на резултатите, аналитичарите не треба да пушат, да конзумираат алкохол, ниту да внесуваат зачинета храна. Дополнително, тие не треба да боледуваат од заболувања како дијабетес, адренална инсуфициенција, цистична фиброза, А-авитаминоза, како и одредени физиолошки состојби, како што е гравидитетот.

Органолептичката анализа се врши во определени услови (просторија, светло, температура, мир и др.) со користење соодветен прибор (нож, штица, чаша, прибор за пишување, формулари и др.)

ОЦЕНУВАЧКИ ЛИСТ

Дескриптивен тест за оценување – еден производ

ID на примерокот:

Име:

Пред вас е поставен примерок од сладолед. Ве молиме да го оцените и да го рангирате примерокот за секој од наведените атрибути и да го означите бројот што најдобро го опишува вашиот избор на дадената скала.

1 = непривлечно, 2 = потребно подобрување, 3 = во ред, 4 = привлечно, 5 = многу привлечно

А Т Р И Б У Т И

Изглед

1 — 2 — 3 — 4 — 5

Боја

1 — 2 — 3 — 4 — 5

Конзистенција

1 — 2 — 3 — 4 — 5

Вкус

1 — 2 — 3 — 4 — 5

Мирис

1 — 2 — 3 — 4 — 5

Боја и изглед

Човечкото око врши квалитативна диференцијација на боите во опсег на видливиот спектар од 400 (виолетова) до 700 (црвена) милимикрони. Во тој опсег човечкото око е најосетливо во зелено-жолто поле (520-580 милимикрони). Поимот изглед, покрај боја опфаќа и друга визуелна сензација. Така, на пример, една површина, покрај одредена боја, може да биде мазна или рапава, еднолична или неправилна, сјајна или мат итн.

Млекото е со бела боја, непровидно, без сјај, а ако содржи поголема количина млечна маст е со светложолта боја. Неговата боја доаѓа од рефлексивната на светлината од колоидно дисперзираниот казеин, млечната маст и калциум фосфатот. Обезмастеното и разводнетото млеко имаат синкава боја и зголемена провидност, што воедно е и доказ дека мастите учествуваат во формирањето на бојата. Бојата на млекото можеме да ја одредиме со ставање на млекото во сад од прозирно стакло, а во друг сад заради споредба се става млеко што не покажува никакви промени. Притоа е многу важно да се следи дали се издвојува талог на дното. Талогот може да биде резултат на груба нечистотија, гној, присуство на еритроцити итн.



Слика 3. Одредување боја на млекото

Бојата на млекото може да биде расна одлика (кај раси како церзеј и буша), но може да варира и во зависност од видот на крмата и количината каротин во исхраната на животните. Во летниот период млекото има поинтензивна жолтеникава боја, што особено се забележува кај кајмакот, додека во зимскиот период бојата е посветла. Покрај каротинот, во млекото можат да бидат присутни и други пигменти од храната, како што е рибофлавиноот, кои можат да му дадат зелено-жолтеникава нијанса.

Млекото од биволица, овца и коза нема изразена жолта нијанса поради помалата содржина на каротин, бидејќи кај овие животни речиси целата количина каротин се трансформира во витамин А. Промена на бојата на млекото може да настане и како резултат на присуство на одредени конзерванси, микроорганизми што продуцираат пигменти, како и при одредени здравствени состојби кај животните (жолтица, пироплазмоза, лептоспироза).

Опис на производ во однос на бојата и изгледот: својствен изглед и боја, жолта, бела, црвена, розова, несвојствен изглед или боја .

Мирис

Мирисот на млекото е карактеристичен за животинскиот вид од кој потекнува и претставува значаен елемент во оценувањето на квалитетот на производот. Воопшто, мирисот го создаваат различни хемиски соединенија, кои содржат водород, јаглерод, азот, кислород, сулфур, халогени, фосфор, арсен, селен, антимон и силициум, како и карбонилни соединенија, естери, амини, имини и лактони. Хемиската целина што придонесува за создавање на мирисот се нарекува осмофорна група.

Интензитетот и карактерот на мирисот зависат од градбата, обликот, големината и поларноста на молекулите.

Свежото млеко има слабо изразен, својствен мирис. Со текот на времето, мирисот станува поизразен – најпрво кисел, а подоцна може да се јави и мирис на скапано. Млекото е супстанција што лесно прима туѓи мириси, па неговиот мирис може да биде променет под влијание на крмива со интензивен мирис, заболувања кај животните, употреба на лекови, присуство на мувли, како и поради условите на чување, при што може да поприми и мирис на штала.



Слика 4. Одредување мирис на млекото

Мирисот се регистрира со сетилото за мирис преку олфакторните рецептори, кои се наоѓаат во предните дишни патишта, односно на внатрешните површини на *concha superior* и на септалната површина на носот. Овие региони содржат приближно 10-20 милиони биполарни неврони со овален облик, распоредени на површина од околу 2,5 cm². Сетилото за мирис е секундарно во однос на видот, но е околу 10.000 пати почувствително од сетилото за вкус. Човекот може да разликува повеќе од десет илјади различни мириси, од кои некои може да ги памети со години.

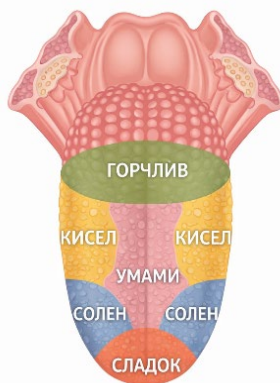
Оценувањето на мирисот на млекото се врши со претходно загревање на млекото во сад со поклопец на температура од околу 50 °C, при што поклопецот краткотрајно се подигнува за да се изврши мирисањето.

При описот на производот во однос на мирисот се користат термини како: својствен, чист, нечист, пријатен, непријатен, полн, празен, ароматичен, сладок, кисел, остар, вжегнат, мирис на оцет, квасец, бел лук, риба, загорено, мирис на штала, застоен и слично.

Одредување вкус

Нормалниот вкус на млекото е солено-сладок. Слаткиот вкус потекнува од лактозата, додека солениот е резултат на присуството на натриум хлорид. Чувството за вкус се јавува под дејство на густативните материи, растворени во плунката или во соковите од храната, кога тие ќе дојдат во контакт со густативните пупки (клеточни рецептори) сместени во папилите на јазикот.

Различните вкусови се регистрираат на различни делови од јазикот: чувството за солено најизразено се перципира на врвот и на страните на јазикот, киселото на страните, слаткото на врвот, умами во средината, додека горчливото претежно се чувствува во базалниот дел на јазикот.



Слика 5. Распределба на основни вкусови на јазикот

Вкусот на млекото се оценува на тој начин што, доколку станува збор за сурово млеко, тоа претходно се пастеризира, а потоа се дегустира на температура од околу 20 °C. Кај другите млечни производи, оценувањето на вкусот исто така се врши на температура од 20 °C.

Промени во вкусот на млекото можат да бидат предизвикани од присуство на одредени микроорганизми, како *Pseudomonas fluorescens* и *Streptococcus maltigenes*, од типот и квалитетот на крмата, особено при користење вжегнати погачи, како и од одредени заболувања кај животните (нимфоманија, маститис). Дополнително, вкусот може да биде нарушен и од присуство на хемиски препарати (ДДТ, линдан), како и од миграција на материи од садовите во кои се чуваат млекото или млечните производи, при што може да се појави вкус на пластика, бакар или железо.

Опис на производ во однос на вкус: полн, специфичен, својствен, кисел, солен, непријатен, горчлив, блуткав, сапунест, вкус на метал.

Конзистенција

Конзистенција е сложен поим што опфаќа повеќе физички својства какви што се: цврстина (сила способна да се спротивстави на деформација), кохезија (јачина на интерни врски способни да го држат производот како целина), жилавост (енергија потребна за цвакање до голтање), вискозност (брзина за протекување по единици сила), еластичност (брзина со која деформираниот производ се враќа во првобитна состојба), адхезија (работа што е потребна да се раскинат привлечните сили помеѓу површината на производот и другата контактна површина). Во создавањето на сензацијата заkonzистенција учествуваат организирани слободни нервни завршетоци, кои се наоѓаат на јазикот, на мекото и на тврдото непце, на забите и на вилицата, како и рефлексот за цвакање. Конзистенцијата се оценува со помош на повеќе сетила: сетилото за слух, сетилото за вид, палпација и тактилни сензации, вклучувајќи го и сетилото за болка.

Кај млекото и кај другите течни млечни производи,konzистенцијата се утврдува во садови, најчесто со префрлање од сад во сад, додека кај цврстите млечни производи, покрај палпацијата, се применуваат и техники како кршење, цвакање, како и употреба на конзистометри.



Слика 6. Одредување konzистенција на млеко (лево) и на кашкавал (десно)

При опишување на konzистенцијата на млекото и на млечните производи најчесто се користат следните термини: течен, воденест, слузав, згрутчен, сочен, вискозен, зрнест, влакнест, налик на масло, масен, мек, цврст, груб, нежен, кршлив, гумест, еластичен, сув, брашнест и други.

4. Испитување физички карактеристики на млекото

Дел од испитувањата насочени кон определување на квалитетот на млекото претставуваат испитувањата на физичко-хемиските својства. Меѓу нив најважни се:

- киселост на млекото;
- површински напон;
- специфична тежина;
- густина;
- вискозитет;
- точка на замрзнување;
- точка на вриење;
- осмотски притисок;
- коефициент на прекршување (рефракција на млечен серум);
- електрична спроводливост;
- оксидо-редукциски потенцијал.

Методи со кои се докажува евентуалното присуство на додадена вода (докажување фалсификување на млекото со додавање вода) се:

- одредување волуменска маса (густина);
- одредување специфична тежина;
- одредување рефракција на млечен серум;
- одредување точка на замрзнување;
- докажување присуство на нитрати.

4.1 Одредување волуменска маса (густина) и специфична тежина на млекото

Густина е физичка величина што претставува однос на маса во единица волумен на хомогено тело при одредена температура и одреден притисок, а се изразува во килограм по метар кубен (kg/m^3).

$$\rho = \frac{m}{V} \quad \rho = \text{густина; } m = \text{маса; } V = \text{волумен}$$

Во млечната индустрија се одредува релативна густина. Релативната густина е однос на густина на некоја материја (млеко) и густина на стандардна или референтна материја (вода). Може да се дефинира и како однос на маса на ист волумен на млеко на 20°C и вода на 4°C . Се изразува во g/mL .

Специфичната тежина е уште една карактеристика на супстанциите, која може да се дефинира како тежина на зафатнина (волумен) на едно хомогено тело, додека релативна специфична тежина е однос на тежина на зафатнина на некое тело наспроти тежина на зафатнина на вода со иста температура. Се мери во N/m^3 . Специфичната тежина има иста

бројна вредност како и густината. Густината како својство овозможува определување на масата на различни супстанции или масата на една иста супстанција при различни услови. Кај кравјото млеко на 20 °C релативната густина се движи од 1,028-1,034 g/mL, кај овчето млеко 1,034-1,042 g/mL, а кај козјото млеко 1,024-1,040 g/mL. Врз густината на млекото влијаат многубројни фактори, меѓу кои најзначаен е составот на млекото. Млекото во просек содржи 87,5 % вода и 12,5 % сува материја. Во сувата материја има во просек 3,5 % млечна маст и 9,0 % безмасна сува материја. Во безмасна сува материја има во просек 3,5 % белковини (3,0 % казеин, 0,55 % албумини, 0,05 % глобулини), 4,7 % млечен шеќер (лактоза) и 0,7 % пепел. Со додавање или одземање која било од наведените состојки се менува густината на млекото, при што таа може да излезе над или под граничните вредности. Со додавање вода во млекото, густината се намалува, а се зголемува доколку на млекото му се одземат мастите.

Белковините, лактозата и минералните материи имаат поголема густина од просечната густина на млекото. Со зголемување на овие состојки во млекото се зголемува и густината на млекото. Мастите и водата имаат помала густина од просечната густина на млекото, па со нивно зголемување се намалува густината. Густината на водата на температура од 0 °C изнесува 0,999841 g/mL, додека, пак, на 15 °C изнесува 0,999102 g/mL. Кога во млекото ќе се додаде 5 % вода, тогаш густината му се намалува за 0,00145, кога ќе се додаде 10 % вода, се намалува за 0,003 g/mL.

Густината на млечната маст изнесува 0,93 g/mL, па со нејзино одземање од млекото се зголемува неговата густина. Во случај на едно млеко да му се додаде вода и во исто време да му се одземат масти, густината на млекото ќе се задржи во исти граници (двоен фалсификат). Поради тоа овој метод не може да биде единствен за докажување на фалсификување на млекото со додавање вода, па мора да се дополни со одредување процент (%) на масти или, пак, преку одредување физички константи (индекс на прекршување на светлина, точка на замрзнување).

Исто така, важно е да се напомене дека, покрај расата, врз густината на млекото влијаат и начинот на исхрана, условите на одгледување на кравите, начинот на измолзување, како и времето на вршење на испитувањето.

Густината на млекото се одредува со лактодензиметар или со пикнометар.

4.2 Одредување на густината на млекото со лактодензиметар

Прибор:

- лактодензиметар со калибрирана скала од 1,015-1,025 и 1,02-1,035 g/mL
- мензура со ширина од 10 mm и волумен 250 mL

Постапка:

Одредувањето на густината на млекото со лактодензиметар е на ист принцип како и сите аерометри, бидејќи и самиот претставува аерометар, т.е. колку е помала специфичната тежина на течноста во која ќе го потопиме лактодензиметарот толку тој повеќе потонува.

Секој лактодензиметар се состои од една стаклена цевка со неколку проширувања. Во долниот дел има едно проширување во облик на топче исполнето со ситна сачма или некој

друг материјал што овозможува да потоне лактодензиметарот во млекото. Над него се наоѓа уште едно помало топчесто проширување во кое се наоѓа живата што е дел од термометарот вграден во лактодензиметарот и служи за мерење на температурата на млекото. Средниот дел е пловка со чија помош лактодензиметарот плива слободно во млекото. На неа се впишани лактодензиметарски броеви и степени.



Слика 7. Лактодензиметар и мензура



Слика 8. Одредување густина на млекото со лактодензиметар

За одредување на густината на млекото, потребно е минимум од 250 mL млеко, кое по темелно мешање се истура полека во мензура, по сидот на мензурата. Со тоа спречуваме создавање пена, која може да попречи во читањето. Мензурата треба да биде доволно широка за да може лактодензиметарот да плива слободно и да не ги допира сидовите од мензурата (приближно на растојание од 0,5 cm). Лактодензиметарот треба да се спушти полека во млекото за да не се скрши доколку нагло потоне. Кога лактодензиметарот ќе се смири, се чита лактодензиметарскиот број во висина на горниот менискус.

Доколку температурата на млекото отстапува од назначената температура (20 °C), прочитаната вредност мора да се коригира. За секој степен повеќе од 20 °C се додава 0,0002, а за секој степен помалку од 20 °C се одзема 0,0002.

пр. Доколку млекото има температура од 25 °C, а специфична тежина е 1,030

$$25\text{ °C} - 20\text{ °C} = 5\text{ °C}$$

$$5 \times 0,0002 = 0,001$$

$$1,030 + 0,001 = 1,031 \text{ за } 20\text{ °C}$$

Корекција се врши затоа што млекото при повисоки температури се шири и лактодензиметарот пропаѓа подлабоко. Затоа при повисока температура млекото треба да се лади, а при пониска да се загрева.

Свежото млеко треба да има густина од најмалку 1,028 g/mL при 20 °C

4.3 Одредување на густината со помош на пикнометар

Пикнометарот е крушковидно шишенце со чеп низ кој поминува капиларно цевче. Се користи за прецизно одредување на густината (специфичната тежина) на одредена течност при одредена температура од 20 °C.



Слика 9. Пикнометар

Прибор:

- пикнометар
- пипета
- водена бања, t 20 °C
- термометар (t од 0 до 50 °C)
- сушилица (t 102 $\pm$ 2 °C)
- ексикатор
- рачки

Постапка: Чист, исушен во сушилица и оладен во ексикатор, пикнометарот се става на аналитичка вага и му се мери масата (t). Потоа пикнометарот се полни со млеко на 20 °C, а вишокот се брише со сува крпа. Наполнетиот пикнометар се мери, млекото се одлева, па потоа се измива со дестилирана вода. На крај пикнометарот се полни со дестилирана вода, притоа заостанатите капки се бришат. Важно е температурата на млекото и дестилираната вода да бидат исти. За да се добие масата на истите волумени на двете течности се одзема масата на празниот пикнометар од масата на полниот (измерениот) пикнометар. Густината на млекото се добива кога ќе ја поделиме масата на млекото со масата на водата со ист волумен при иста температура.

$$\rho = \frac{t - t_2}{t_1 - t_2}$$

t = маса на пикнометар со млеко;

t_1 = маса на пикнометар со вода;

t_2 = маса на празен пикнометар.

4.4 Одредување на рефракција на млечен серум

Рефракција претставува прекршување на светлината при нејзино преминување од една средина во друга со различна оптичка густина (на пример, од воздух во серум). Како мерка за прекршувањето на светлината се користи индексот на рефракција, кој претставува однос меѓу синусот на упадниот агол и синусот на аголот на прекршување.

Индексот на рефракција на млекото е поголем од оној на водата. На него најмногу влијаат лактозата и минералните материи, кои се релативно константни компоненти, па затоа рефракцијата на млечниот серум се движи во тесни граници. Степенот на рефракција на млекото изнесува околу 39° при температура од $17,5^\circ\text{C}$, со варијации од 38 до 42.

Додавањето вода во млекото ја намалува концентрацијата на лактоза и минералните материи, што доведува до намалување на степенот на рефракција. Овој метод е многу чувствителен и овозможува не само квалитативно туку и квантитативно утврдување на присуството на додадена вода.

Притоа, за негово одредување не се користи млекото како целина, поради неговата непропустливост за светлина, туку млечниот серум. Таложението на белковините се постигнува со додавање CaCl_2 , а по потреба може да се користат и бакарен сулфат, оцетна киселина или ацетатен пуфер.

Степенот на рефракција се одредува со рефрактометар (слика 10).



Слика 10. Рефрактометар

Прибор:

- рефрактометар
- епрувета со гумена тапа низ која е провлечена стаклена цевка
- пипета градуирана
- водена бања (Т 17 °C)
- термометар
- 20 % раствор на калциум хлорид

Постапка:

Во епрувета се додаваат 30 mL млеко и 0,25 mL раствор на калциум хлорид. Содржината добро се меша, по што епруветата се затвора со гумена тапа низ која поминува стаклена цевка (заради кондензација на пареата). Потоа епруветата се поставува во водена бања со зовриена вода, така што нивото на млекото во епруветата да биде под нивото на водата во садот.

По 25 минути, епруветата се лади под млаз вода, а издвоениот серум се филтрира. Од добиениот бистар серум, со градуирана пипета се нанесува капка на предниот дел на рефрактометарот, по што се отчитува рефрактометрискиот степен.

39 = средна вредност на рефрактометриски број за нормално кравјо млеко

4.5 Определување на точката на смрзнување

Со намалување или зголемување на температурата, се менува и агрегатната состојба на супстанциите. Точката на смрзнување на млекото претставува температура при која млекото преминува од течна во цврста агрегатна состојба. Нејзината вредност најчесто се движи од -0,52 °C до -0,59 °C, со просечна вредност од околу -0,55 °C. Вредности над овие граници укажуваат на веројатно фалсификување на млекото со додавање вода.

Точката на смрзнување на млекото е директно поврзана со осмотскиот притисок и претставува релативно стабилна величина. При секрецијата, млекото го задржува осмотскиот притисок кој е сличен на оној на крвта, при што тој најмногу зависи од односот меѓу лактозата и хлоридите.

Оваа вредност може да биде под влијание и на исхраната: при потхранетост на животното, точката на смрзнување се намалува, додека при додавање поголеми количини вода, доаѓа до нејзино привремено зголемување. Тоа укажува дека млекото е изоосмотско во однос на крвта.

Поголеми отстапувања може да се јават и кај крави со маститис (поради нарушена секреција), како и при додавање конзерванси, други туѓи материи или при зголемување на киселинскиот степен.

Снижување на точката на смрзнување на млекото настанува при зголемување на неговата киселост, бидејќи млечно-киселинските бактерии трансформираат еден мол лактоза во четири мола млечна киселина, со што се зголемува бројот на растворени молекули.

При додавање вода се намалува концентрацијата на лактозата и на минералните материи, од кои зависи точката на смрзнување. Како резултат на тоа, доаѓа до разредување на млекото и до зголемување на точката на смрзнување, односно нејзино приближување кон вредноста на замрзнување на водата (0 °C).

Точката на смрзнување се одредува со криоскоп.

Прибор за работа:

- епрувети соодветни за апаратот
- раствори за калибрација
- пастер пипета
- чашка за млеко
- криоскоп



Слика 11. Криоскоп за определување точка на смрзнување

5. Одредување киселост на млекото

Според својот состав и својства, млекото претставува извонредна средина во која, при оптимални услови, е овозможен непречен развој на микроорганизми. На ова во голема мера придонесува високата содржина на вода, како и присуството на лактоза, белковини и млечна маст, кои служат како извор на хранливи материи неопходни за нивниот развој.

Дополнително, присуството на многубројни витамини, умерено киселата реакција и високиот пуферски капацитет создаваат поволни услови за размножување на микроорганизмите во млекото.

За нивниот развој придонесуваат и хигиенските услови при добивањето на млекото, при што, дури и при строго спроведена хигиена, секогаш постои можност за присуство на одреден број микроорганизми.

Кај суровото млеко, неговиот состав е таков што во одреден период по молзењето не дозволува размножување на микроорганизмите, што се должи на присуството на одредени антимикробни фактори (лактенини, лактоферин, лизозим, лактопероксидазен систем, имуноглобулини). Тие претставуваат непротеински азотни материи и биолошко активни компоненти во млекото. Оваа фаза се нарекува бактерицидна фаза и нејзиното траење зависи од почетниот број микроорганизми и од условите за нивно размножување, пред сè од температурата.

Доколку веднаш по молзењето не се изврши ладење на млекото на температура под 8 °C (при пократко чување) или под 4 °C (при подолго чување), доаѓа до брз развој на мезофилни микроорганизми, кои предизвикуваат промени во физичките, хемиските и органолептичките својства на млекото.

Во почетната фаза се размножуваат анаеробни и спорогени микроорганизми, кои поседуваат протеолитички ензими и ги разградуваат белковините, при што се создаваат азотни соединенија. По нивното појавување следува интензивно размножување на млечно-киселинските бактерии, кои ја разложуваат лактозата до млечна киселина. Во почетокот, млечната киселина се врзува со алкалните компоненти, а подоцна се ослободува како слободна киселина, што, заедно со другите органски киселини, доведува до зголемување на киселоста на млекото.

Од друга страна, психрофилната микрофлора, која главно ја сочинуваат микрококи и аспорогени бактерии, не ја разградува лактозата. Овие микроорганизми како извор на енергија ги користат белковините и млечната маст, што резултира со појава на горчлив вкус и промена на мирисот, без значително закиселување на млекото. Поради тоа, оладеното млеко не треба да се чува подолго од еден-два дена.

Преку определување на киселоста на млекото се оценуваат неговата хигиенска исправност и свежина. Притоа, важно е да се напомене дека потполно свежото млеко не содржи слободна млечна киселина.

Киселоста на млекото може да биде примарна и секундарна. Примарната киселост е природна и потекнува од составните компоненти на млекото, какви што се казеинот, фосфатите, цитратите, растворениот јаглороден диоксид, аскорбинската киселина и слободните аминокиселини, додека секундарната киселост е резултат на микробиолошката

активност. Секундарната киселост настанува како резултат на микробиолошка активност, односно ферментација на лактозата до млечна киселина при складирање на млекото.

Киселоста се изразува како активна (потенциометриска) киселост, која се одредува преку рН-вредноста, и како титрациска (потенцијална) киселост, која ја претставува вкупната способност на млекото да неутрализира база.

Помеѓу овие два вида киселост постои суштинска разлика: активната киселост е условена од концентрацијата на слободни водородни јони, додека титрациската киселост зависи од присуството на потенцијално дисоцирачки компоненти, односно оние што при титрација со NaOH се ослободуваат во растворот.

5.1 Титрациска киселост

Примарна киселост – Кај кравјото млеко изнесува од 6,5 до 7,5 °SH. Таа не е константна вредност и зависи од повеќе фактори, какви што се концентрацијата на соли и белковини, староста на животното, периодот на лактација, видот на животното, начинот на исхрана (летна или зимска), пашата, како и евентуален недостиг на калциум.

Секундарна (стекната) киселост – Настанува под дејство на микроорганизмите по завршувањето на бактерицидната фаза и е условена од температурата и условите на чување на млекото. Нејзиното зголемување ја нарушува стабилноста на системот во млекото, при што доаѓа до негово згрутчување. Овие новонастанати својства негативно влијаат врз правилниот тек на процесите на обработка и преработка на млекото. Така, на пример, при киселост од 11 до 12 °SH варењето на млекото е отежнато или невозможно, додека при 24-28 °SH млекото се згрутчува спонтано.

Титрациската киселост се одредува со квантитативни титрациски методи

- метод по Soxhlet-Henkel
- метод по Thörner
- метод по Dornic

5.1.1 Метод по Soxhlet-Henkel

Киселоста по Soxhlet-Henkel се изразува во степени (°SH), кои го означуваат бројот на потрошени милилитри 0,25 mol/l раствор на NaOH за неутрализација на 100 mL млеко. Во реакцијата како индикатор се користи 2 % раствор на фенолфталейн.

Прибор и хемикалии

- Ерленмаєрова колба од 100 mL или стаклена чаша од 100 mL
- градуирани пипети
- бирета
- 0,25 mol/l натриумова база (NaOH)
- 2 % алкохолен раствор на фенолфталейн (C₂₀H₁₄O₄)

Постапка

Во стаклена чаша или во Ерленмаєрова тиквичка се одмеруваат 50 mL млеко, се додаваат неколку капки (2 mL) на 2 % раствор на фенолфталеин и се титрира со 0,25 mol/l натриум хидроксид. За време на титрацијата млекото перманентно се меша. Титрацијата завршува кога млекото ќе добие розова боја, а на биретата се чита бројот на потрошени милилитри на NaOH. Секој потрошен милилитар раствор на NaOH (при титрација на 100 mL млеко) одговара на 1° киселост по SH. Добиениот број милилитри се множи со два.

При одредување на степенот на киселост на млекото со овој метод можат да се добијат различни вредности, бидејќи преминот во розова боја не е многу впечатлив. За да се усогласат резултатите, се прави титрација до стандардна боја. Како стандардна боја се користи кобалт сулфат ($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Најчести грешки што можат да се направат при мерењето се: бавна титрација, несоодветно светло, многу воздух во примерокот, стар раствор, додавање конзерванси.

Киселински степен под 6 укажува на присуство на патолошко млеко или на извршена неутрализација со база или фалсификување со вода. Постојат и крави што даваат млеко со висока киселост како резултат на висока концентрација на казеин. Во вакви случаи е важно да се докаже дека станува збор за природна киселост.

Пресметување:

$$\text{Киселост } (^{\circ}\text{SH}) = V(\text{NaOH}) \times 2$$

$V(\text{NaOH})$ – средна вредност на потрошен NaOH во две титрации (ml)

Според Правилникот („Сл. весник“ бр. 96/2011), млекото треба да ги исполнува следниве вредности за киселинскиот степен:

Сурово млеко:

- кравјо млеко 6,6 до 6,8 °SH
- овчо млеко 8,0 до 12,0 °SH
- козјо млеко 6,5 до 8,0 °SH

Конзумно млеко (пастеризирано):

Киселински степен до 8,0 °SH

Во практика, за одредување на степенот на киселост се користи и модификација по Morres каде што се употребува децимоларен раствор на натриум хидроксид (0,1 mol/l) за неутрализација на 20 mL млеко со индикатор фенолфталеин и стандард 2 % кобалт сулфат.



Слика 12. Одредување степен на киселост (лево – пред титрација, средина – во тек на титрација, десно – по титрација)

5.1.2 Метод по Thörner

Киселоста по Thörner претставува број на 0,1 mol/L NaOH потрошен за неутрализација на 10 mL млеко со 5 % раствор на фенолфталеин. Свежото млеко има 16 до 18 °T, а отстапувањата се движат од 12 до 21 °T.

Прибор и хемикалии

- Ерленмаєрова колба од 100 mL или стаклена чаша од 100 mL
- градуирани пипети
- бирета
- 0,1 mol/l натриум хидроксид
- 5 % алкохолен, (95 %) раствор на фенолфталеин

Начин на изведување

Се земаат 10 mL млеко и се додаваат 5 капки индикатор фенолфталеин. Се титрира до појава на розова боја. Бројот на потрошени милилитри на натриум хидроксид се множи со 10.

$$^{\circ}\text{T} = a \times F \times 10$$

a = mL на 0,1 mol/l NaOH потрошени за титрација

F = фактор

10 = за титрација е земено 10 mL млеко

5.1.3 Метод по Dornic

Киселоста по овој метод се изразува во ($^{\circ}\text{D}$) и претставува десетти дел на бројот на милилитри 0,9 mol/l натриум хидроксид за неутрализација на 10 mL млеко со 1 % раствор на фенолфталеин. Свежото млеко има од 15 до 17 $^{\circ}\text{D}$.

Прибор и хемикалии

- Ерленмаєрова колба од 100 mL или стаклена чаша од 100 mL
- градуирани пипети
- бирета
- 0,9 mol/l натриум хидроксид
- 1 % раствор на фенолфталеин

Начин на изведба

Во Ерленмаєрова колба се става 10 mL млеко и се додава 1 капка фенолфталеин. Се титрира до појава на розова боја. Бројот на десеттите делови на mL натриум хидроксид потрошени за неутрализација се означува како киселост по Dornic.

$$^{\circ}\text{D} = \frac{a \times F}{10}$$

$^{\circ}\text{SH}$	% киселост	$^{\circ}\text{T}$	$^{\circ}\text{D}$
1	0,0225	2,5	2,25
2	0,0450	5	4,50
3	0,0675	7,5	6,75
4	0,0900	10,0	9,00
5	0,1125	12,5	11,25
6	0,1350	15,0	13,50
7	0,1575	17,5	15,75
8	0,1800	20,0	18,00
9	0,2025	22,5	20,25
10	0,2250	25,0	22,50
20	0,4500	50,0	45,00
30	0,6750	75,0	67,50

Табела 1. Споредбена табела на единици за изразување на киселоста на млекото

5.2 Ориентациони методи за докажување киселост во млекото

Со овие методи приближно го определуваме киселинскиот степен на млекото. Овие методи обично се засноваат на таложење на белковините на млекото (казеинот), кои како резултат на зголемена киселост станале термолабилни (проба со варење) или нестабилни на дејството на етанолот (алкохолна проба). Во оваа група методи за испитување на киселоста на млекото спаѓаат и оние во кои се користат индикатори (проба со ализарол) и скратена постапка на неутрализација на присуството на фенолфталейн (црвена проба).

Сите овие методи се само приближно одредување киселост. Во одредени случаи можат да дадат позитивна реакција (проба со варење, алкохолна проба) и при нормална киселост. Тоа обично се случува кога доаѓа до дестабилизација на колоидниот систем како резултат на нарушена функција на млечната жлезда. Поради сите горенаведени причини овие методи не можат да се употребат при процена и квалитет на млекото.

5.2.1 Алкохолна проба

Принципот се заснова на својството на алкохолот да врши дехидратација на мицелите на белковините (казеинот) на млекото при што тие преминуваат од сол (течност) во гел (коагулум) состојба. Брзината и интензитетот на згрутчување зависи од јачината на алкохолот и од киселоста. Заради избегнување субјективност се користат повеќе концентрации на алкохол. При високи концентрации на етанол дехидратацијата настапува брзо, додека при пониски концентрации настапува дури кога хидратацијата на колоидните мицели е помала како резултат на снижување на рН на млекото. Алкохолната проба може да биде позитивна и кај некои физиолошки и патолошки промени во секрецијата на млекото.

Прибор и хемикалии

- епрувета
- пипета градуирана 1 mL, 2 mL
- 44 %, 52 %, 68 %, етил алкохол (на пример, за да се добие 68 % алкохол треба да се стават 68 mL 96 % алкохол и се додава 28 mL вода и се добиваат 96 mL на 68 % алкохол. Ако сакаме да направиме 500 mL 68 % алкохол, тогаш $(500: 96 = 5,208)$. Факторот што го добива 5,21 го множиме со (68 и 28). Тоа значи дека треба да земеме 354,2 mL 96 % алкохол и 145,8 mL вода за да добијат 500 mL на 68 % алкохол)
-

Концентрација на алкохол	8,0 °SH	8,0-9,0 °SH	9,0-10 °SH	10-11 °SH
68 %	-	+	++	+++
52 %	-	-	+	++
44 %	-	-	-	+

Табела 2. Интензитет на згрутчување при различни концентрации на алкохол
(- = без снегулки; + = ситни снегулки; ++ = снегулки; +++ = крупни снегулки)

Постапка

Во три епрувети се става по 2 mL млеко, потоа во трите епрувети се додаваат различните проценти на етил алкохол. Содржината на епруветата се меша и на сидот се набљудува евентуална појава и интензитет на згрутчување врз чија основа можеме да го одредиме ориентационо степенот на киселост.



Слика 13. Стабилно млеко – лево и нестабилно млеко со грутки – десно

5.2.2 Постапка со ализарол

Ализаролот е заситен раствор на 68 % алкохол (етанол) кому му е додадена индикаторска боја – ализарин. Ализаринот има жолто-кафена боја, а растворен во етанол покажува црвено-кафена боја.

Бојата на ализаринот во кисела средина е жолта, а во алкална средина виолетово-црвена. Смесата на млекото и ализаролот различно се бои во зависност од степенот на киселоста на млекото.

Прибор и хемикалии

- епрувета
- градуирана пипета
- раствор на ализарол (во волуметриска колба од 100 mL се додаваат 0,04-0,1 g ализарин $C_{11}H_6O_2(OH)_2$ и до половина колба 68 % етил алкохол, кога ќе се раствори се додава алкохол од ознаката)
- стандардна боја на ализарол

Постапка

Во епрувета се ставаат 2,0 mL млеко и потоа 2 mL раствор на ализарол. Содржината во епруветите се меша и на сидот се набљудува евентуална појава и интензитет на згрутчување, а потоа променетата боја може да се спореди со стандардот.

Јачина на згрутчување	Боја на млеко	°SH на млеко	pH на млеко
без згрутчување	виолетово-црвена	7	6,65
многу ситни снегулки	бледо црвена	8	6,45
ситни снегулки	кафено-црвена	9	6,30
средни снегулки	жолто-црвена	10	6,15
големи снегулки	кафено-жолта	14	5,7
крупни снегулки	жолта	16	5,2

Табела 3. Интензитет на згрутчување и промена на боја индикатор кај различен степен на киселост и pH на млеко

5.2.3 Црвена проба

Името на методот потекнува од безбојниот раствор на NaOH кому му е додаден индикатор фенолфталеин, кој на реагенсот му дава црвена боја. Овој црвен раствор може да се приспособи да реагира на различни степени на киселост, така што по мешање со млеко со повисок киселински степен од оној на кој е наместен растворот, бојата исчезнува, додека кај млеко со понизок киселински степен бојата се задржува.

Начин на работа: Црвениот раствор се подготвува од основен раствор приспособен на одреден киселински степен. Бидејќи растворот е нестабилен, потребно е да се подготвува непосредно пред употреба.

Киселост на млеко °SH	Количина на основен р-р NaOH во mL што треба да се земе за црвениот р-р со волумен од 250 до 1000 mL			
	за 250 mL	за 500 mL	за 750 mL	за 1000 mL
6	5,2	10,4	15,6	20,8
6,5	5,7	11,4	17,1	22,8
7	6,2	12,4	18,6	24,8
7,5	6,7	13,4	20,1	26,8
8	7,2	14,4	21,6	28,8
8,5	7,7	15,5	23,1	30,8
9	8,2	16,4	24,6	32,8
9,5	8,7	17,4	26,1	34,8
10	9,2	18,4	27,6	36,8
10,5	9,7	19,4	29,1	38,8
2 % фенолфталеин	+ 10 mL	+ 20 mL	+30 mL	+40 mL

Табела 4. Приказ на начин на подготовка на црвен раствор за различни количини млеко

Пример: Доколку сакаме да провериме дали млекото има киселост поголема од 9°SH , се подготвува црвен раствор на следниот начин: во 250 mL раствор се додаваат 8,2 mL основен раствор и 10 mL 2 % раствор на фенолфталеин, по што се дополнува со дестилирана вода до вкупен волумен од 250 mL.

Од вака подготвениот раствор се земаат 2 mL и се мешаат со 2 mL млеко, по што добро се промешува и се следи промената на бојата.

Појавата на бела (обезбоена) боја укажува дека млекото има киселост поголема од 9°SH , бидејќи киселината е во вишок и го обезбојува индикаторот. Од друга страна, појавата на црвена боја означува дека киселоста е пониска од 9°SH , бидејќи киселината е неутрализирана, а натриум хидроксидот се наоѓа во вишок, што му дава црвена боја на фенолфталеинот.

5.2.4 Проба со варење

Пробата со варење претставува едноставен ориентационен метод за процена на стабилноста на млекото при термичка обработка и индиректна процена на неговата киселост.

Постапката се изведува во епрувета во која се ставаат 5 mL млеко, по што примерокот се загрева до вриење. За време на загревањето се набљудува појавата на згрутчување. Заради полесно воочување на евентуалните снегулки, епруветата благо се наведнува и се следи слевањето на млекото по сидовите.

Доколку дојде до згрутчување со појава на ситни снегулки, киселинскиот степен најчесто е малку над 11°SH . Појавата на крупни снегулки укажува на значително зголемена титрациска киселост (значително над 11°SH).

При зголемена киселост, лактозата под дејство на микроорганизмите се разградува до млечна киселина. Поради зголемената концентрација на водородни јони се нарушува мицеларната структура на казеинот, што доведува до негова дестабилизација и коагулација. Загревањето дополнително го забрзува процесот на денатурација и таложување на протеините, што станува видливо со голо око.

Треба да се има предвид дека во одредени патолошки состојби, како што е маститис, млекото може да покаже позитивна реакција при пробата со варење, иако титрациската киселост е под 11°SH . Колострумот, поради својот изменет состав и повисока содржина на протеини, исто така може да се згрутчи при загревање.

5.3 Активна киселост

Активната киселост (pH) претставува негативен декаден логаритам од концентрацијата на водородните јони. Кај свежо млеко pH-вредноста изнесува приближно 6,6 (во граници од 6,5 до 6,7).

Промени на pH-вредноста можат да настанат при воспалителни процеси на млечната жлезда или при микробиолошка активност, па одредувањето на pH може да послужи како индикатор за нарушувања во секрецијата и квалитетот на млекото.

Активната киселост се определува:

електрометриски – со рН-метар, преку мерење на потенцијалната разлика помеѓу две електроди (прецизен и референтен метод),

колориметриски – со употреба на индикатори, како што е бромтимол сино, што претставува ориентационен метод.

Бромтимол сино при рН 6,7 дава жолто-зелена боја. Со зголемување на рН-вредноста, бојата преминува кон зелено-сина и сина, додека со намалување на рН-вредноста преминува кон жолта боја.

Важно е да се нагласи дека промените во титрациската киселост не мора секогаш да бидат проследени со соодветни промени во активната киселост. Ова се должи на пуферските системи на млекото (казеин-фосфатен, протеински и бикарбонатен систем), кои до одреден степен ја амортизираат промената на рН-вредноста.

6. Одредување млечна маст во млекото

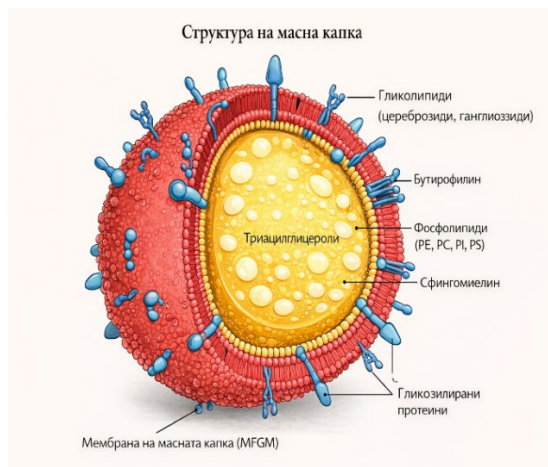
Млечната маст има најголема енергетска вредност од сите состојки на млекото и значајно влијае врз неговиот вкус, арома, конзистенција и текстура на млечните производи. Таа претставува комплекс од различни липидни материи, од кои дел (слободни стероли, слободни масни киселини и фосфолипиди) се наоѓаат во слободна состојба во млечната плазма (млеко без млечна маст).

Млечната маст главно се состои од триацилглицероли, со помали количества диацилглицероли и моноацилглицероли. Другите компоненти вклучуваат витамини растворливи во масти (A, D, E и K), како и ароматични соединенија, меѓу кои каротиноидни пигменти, кои иако се присутни во мали количини, имаат значителна улога во хранливата вредност и во сензорните својства на млекото.

Составот и количината на масните киселини зависат од стадиумот на лактација и од исхраната на животното. Од заситените масни киселини најзастапена е палмитинската ($C_{16}H_{32}O_2$), додека од незаситените доминира олеинската киселина ($C_{18}H_{34}O_2$).

Млечната маст во млекото се наоѓа во форма на ситни капки (глобули), рамномерно распределени во водената фаза. Овие капки се обвиткани и заштитени со нежна мембрана, позната како мембрана на млечната масна глобула.

Млечната маст претставува важна компонента на млекото, а нејзината застапеност е значаен показател за квалитетот. Таа значително варира меѓу различни видови животни, како и помеѓу единки од ист вид.



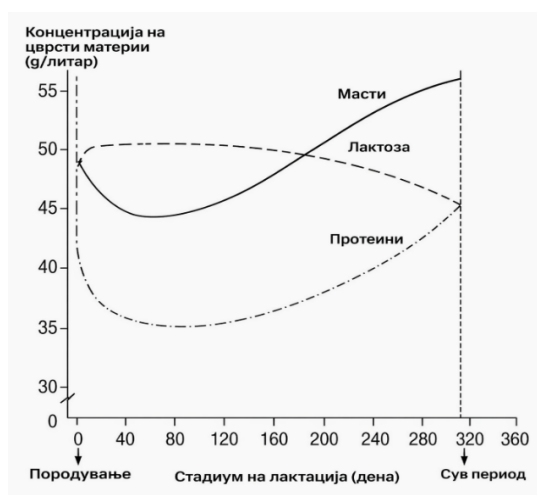
Слика 14. Структура на масна капка

Количината на мастите во млекото е под влијание на наследните фактори (расна predisпозиција), кондицијата на животното, здравствената состојба, географското подрачје на произведување на млекото, годишното време, начинот на држење на кравите, времето на лактација, начинот на хранење на животните и видот на сточна храна со која се хранат животните, молзењето (млекото од млечната цистерна содржи 1 % масти, а резидуалното и до 10 %).

Количината на млечната маст е **расна предиспозиција**, на пример расата Холштајн има помала количина масти од расата Џерзеј.

Староста на животното исто така влијае врз процентот на мастите во млекото, од првата година на лактација па натаму процентот на масти опаѓа за 0,2 % годишно. Причина за тоа е поголемата продукција на млеко и сè повеќе инфекции на вимето.

Периодот на лактација исто така влијае врз количината на мастите во млекото; во почетокот на лактацијата количината на мастите е највисока, но кога ќе помине периодот на колострумот (14 дена по породување), содржината на масти е во опаѓање, кое продолжува со иста тенденција од 10 до 12 недели, а потоа почнува полека да се покачува така што кон крајот на лактацијата се зголемува и ја достигнува физиолошката вредност пред да се засуши вимето.



Слика 15. Промена на концентрација на протеини, масти и лактоза во период на лактација

Процентот на масти во млекото зависи од **годишното време**. Во просек, најниската количина маст во млекото е во топлите и влажни месеци (од јуни до септември). Наглите **временски промени** во кои доаѓа до брзо опаѓање и пораст на барометарски притисок со нагли промени на температурата и влажност на воздухот прават стресна состојба кај кравата, поради што доаѓа до намалена синтеза на масти во млекото.

Количината на масти зависи и од **структурата односно од избалансираноста на оброкот**, количината на енергија (лесно сварливи јаглехидрати) и количината на сурови влакна што животното ги добива во оброкот. Квалитетни сена и правилно избалансирани крмни смеси ја зголемуваат количината на мастите во млекото, додека сточни храни со малку сурови влакна, енергија и сува материја (трева, зелена крма, силажа) ја намалуваат количината на мастите во млекото. Причината за ваквото намалување е отсуството на целулоза во зелената храна, која е главен прекурсор за синтеза на ацетати и β -хидроксипутерна киселина во бурагот, кои, пак, се прекурсори за синтеза на масти во млекото.

Одредени патолошки состојби како **маститис** можат да доведат до опаѓање на процентот на масти и **механички грешки** (агитација на млекото во цевководите, одредени проблеми при ладење на млекото и друго).

Постојат повеќе методи и постапки за одредување на млечната маст во млекото, а методите можат да се поделат на гравиметриски и волуметриски. Покрај тоа, за рутинско тестирање на мастите се користи и Милкотестер и Ултра Х. За рутинска контрола сè уште се користи референтниот метод за одредување на млечна маст – метод по Gerber.

6.1 Ацидобутирометрија по Gerber

При одредување на содржината на масти во млекото се опфаќаат сите видови масти што заеднички се издвојуваат од млекото во текот на вообичаените постапки на анализа на млекото. Најмногу употребуван метод за одредување на содржината на мастите во млекото е ацидобутирометрискиот метод по Gerber. Постапката е воведена уште од 1892 година. Оваа постапка е опишана во МКС ISO 19662:2024 Млеко – Определување содржина на масти – Ацидобутирометриска метода (метода по Гербер) и претставува референтен метод.

Методот е едноставен и брз и дава резултати со занемарлива разлика во однос на другите методи со кои се постигнува сосема точно одредување на содржината на мастите во млекото (метод по Röse Gottlib и метод по Babcock).

Предности на методот се:

- нема големи трошоци;
- брз метод;
- може да се применува за сите видови млеко.

Негативноста на методот е тоа што користи сулфурна киселина што е доста корозивна, токсична и може да предизвика изгореници доколку не се работи внимателно.

Со цел да се сепарираат целосно мастите, заштитниот слој околу масниот капак мора да биде разорен. Тоа се постигнува со концентрирана сулфурна киселина. Сулфурната киселина ги оксидира и ги хидролизира органските компоненти при што доаѓа до загревање на бутирометарот. Продуктите на оксидација ја менуваат бојата на растворот во кафена, поточно под дејство на сулфурната киселина се разоруваат белковините и се врши карамелизација на млечниот шеќер. Издвојувањето на масните капки со помош на центрифугална сила се забрзува со додавање амил алкохол, кој го намалува површинскиот напон на масните капки и на тој начин овозможува нивно слепување. Мастите се утврдуваат со директно отчитување на процентот на масти на скалата од бутирометарот.

Важно е да се напомене дека при одредување на млечна маст во овчо и во млеко од биволици се користи бутирометар со вредности до 12 %. Доколку не е достапен овој вид бутирометар, се врши разредување во однос 1:1, а по отчитувањето на резултатот се множи со 2.

Прибор и реагенси

- бутирометар
- гумена тапа
- додатен метален дел за нагонување на бутирометарот

- Герберова центрифуга
- водена бања (Т 64 °С)
- волуметриски пипети
- концентрирана сулфурна киселина (H_2SO_4)
- амил алкохол ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{OH}$)



Слика 16. Бутирометар



Слика 17. Видови бутирометри

Постапка:

- Во бутирометарот, со помош на пипета, се одмеруваат 10 mL сулфурна киселина (специфична тежина 1,820 g/mL) при што треба да се внимава да не се навлажни отворот на бутирометарот, бидејќи во спротивно затвораот може да се лизга и да не се обезбеди добро затворање.



Слика 18. Додавање сулфурна киселина во бутирометар

- Со пипета се додаваат 11 mL млеко, кое претходно треба добро да се промеша, при што треба да се внимава да не се инкорпорира воздух. Млекото прво треба да биде загреано на 40 °С, а потоа оладено на температура од 20 °С и добро хомогенизирано (измешано). При додавањето треба да се внимава да не се навлажни вратот на бутирометарот.
За да не дојде до нагло мешање на млекото со сулфурната киселина, млекото се истура внимателно по сидот на закосениот бутирометар, така што формира јасно одвоен слој над сулфурната киселина бидејќи има помала густина. (Јасно видлива граница помеѓу млекото и сулфурната киселина укажува дека постапката е правилно изведена.)



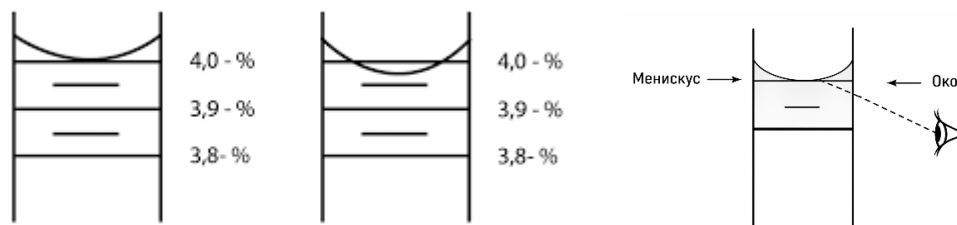
Слика 19. Додавање млеко во бутирометарот

- Во бутирометарот се додава 1 mL амил алкохол. (Се пребришува грлото на бутирометарот со крпа за да бидеме сигурни дека е сув.)
- Бутирометарот се затвора со гумена тапа.
- Бутирометарот неколкупати силно се проматува во поширокиот дел од бутирометарот за да може наталожениот казеин да се раствори, потоа уште неколкупати се превртува за да може целосно да се измеша киселината што се наоѓа во стеснетиот дел од бутирометарот.
- Бутирометарот се става во водена бања нагодена на 65 °C.
- Бутирометрите се ставаат во центрифуга со затвораците свртени кон надворешниот крај од центрифугата, а притоа бутирометрите треба да се распоредени еден спроти друг за да се постигне рамнотежа во центрифугата. Центрифугирањето се врши 5 минути на 1000-1200 вртежи во минута.



Слика 20. Центрифугирање на примероците

- По центрифугирањето, бутирометрите се ставаат во водена бања загреана на 65 °C – 10 минути, при што стеснетиот дел на бутирометарот, во кој се издвоени масите, треба да биде свртен нагоре.
За полесно отчитување на процентот на масти, столбот од масти се придвижува со помош на затвораот, така што неговиот долен раб се порамнува со поделокот на скалата што одговара на најниската точка на конвексниот менискус.

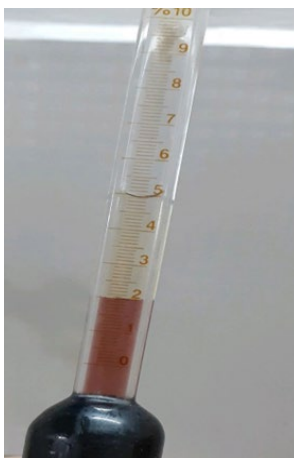


Слика 21. Правилно читање на бутирометарот

Скалата е поделена од 0 до 7, а секој поделок означува еден процент масти. Овие поделоци се поделени на уште 10 дела, што овозможува читање децимали.

Пресметка:

$\% \text{ на масти} = \text{горната вредност на отчитување} - \text{долната вредност на отчитување}$



Слика 22. Бутирометар со примерок подготвен за читање

Интерпретација:

Сурово млеко:

- Кравјото млеко треба да содржи најмалку 3,2 % млечна маст
- Овчето млеко треба да содржи најмалку 4,0 % млечна маст
- Козјото млеко треба да содржи најмалку 2,8 % млечна маст

Термички обработено млеко наменето за консумација:

- Полномасното млеко треба да содржи најмалку 3,5 % млечна маст
- Делумно обезмастеното млеко треба да содржи најмалку 1,5 %, а најмногу 1,8 % млечна маст
- Обезмастеното млеко треба да содржи најмногу 0,50 % млечна маст.

6.2 Автоматизирани и брзи методи за определување масленост

Современите автоматизирани техники претставуваат неопходна алатка во современата млечна индустрија и аналитика, особено кога се бара брза и репродуцибилна анализа со минимален човечки фактор.

Покрај класичниот метод по Gerber, кој претставува официјална и најшироко прифатена референтна техника за рутинска анализа на масленоста на млеко и млечни производи, во современите лаборатории сè поголема примена имаат автоматизирани и инструменталните методи. Овие методи обезбедуваат значително пократко време на анализа, намалена употреба на хемикалии, подобра репродуцибилност и поголема ефикасност при обработка на голем број примероци.

Предности на автоматизирани методи:

- добивање резултати во период од неколку секунди до неколку минути,
- минимална манипулација со примерокот,
- намалена можност за субјективни, операторски грешки,
- дигитално чување и трансфер на податоци,
- погодни за примена во откупни центри, млекарници и контролни лаборатории со висок дневен обрт на примероци.

Инфрацрвена спектроскопија (IR, FTIR, NIR)

Инфрацрвената спектроскопија се заснова на апсорпција на карактеристични бранови должини од страна на компонентите во млекото, при што масите имаат специфични апсорпциони зони. Со соодветна калибрација, со едно мерење може истовремено да се определи содржината на масти, протеини, лактоза, сува материја и други параметри на квалитет. Пример уреди: MilkoScan, Lactoscope.

Овие уреди се користат претежно за:

- рутинска индустриска контрола
- прием и стандардизација на сурово млеко
- постојан надзор во процесни линии

Преносливи NIR-анализатори (теренска употреба)

Преносливите NIR-системи се користат за брз „скрининг“ на фарми и пунктови за откуп. Не е потребна подготовка на примерокот, а добиените резултати овозможуваат брза процена на квалитетот без лабораториска инфраструктура. Податоците може да се поврзат со компјутерски системи и автоматски да се обработуваат.

Автоматизирани системи засновани на Gerber/Babcock принцип

Овие уреди го задржуваат основниот хемиски принцип на Gerber методот (сулфурна киселина + амил алкохол + центрифугирање), но целосно ги автоматизираат процесите на дозирање, греење, центрифугирање и читање на резултатите. Погодни се за лаборатории со голем број примероци каде што е потребна висока пропусност во краток период.

Предности:

- постабилни услови на работа,
- елиминирање на визуелно читање на мензурите,
- намалена манипулација со концентрирани киселини.

Автоматизирани системи со екстракција и гравиметрија (Soxhlet)

За комплексни производи, како сирење, путер, јогурт и ферментирани производи со висока содржина на сува материја, сè уште се користат методи засновани на екстракција. Современите системи го автоматизираат класичниот Soxhlet метод, намалувајќи ги времетраењето и количината на растворувачи.

Карактеристики:

- висока прецизност,
- применливост кај матрици богати со протеини и масти,
- погоден за референтни анализи и верификација на резултати.

7. Одредување суви материи во млекото

Сувата материја во млекото ги опфаќа сите негови составни компоненти, освен водата и испарливите гасови. Нејзината содржина во млекото се движи од 10 до 16 %, со просечна вредност од околу 12,5 %. Во практиката најчесто се определува сувата материја без масти, која кај кравјото млеко изнесува околу 8,5 %, а кај овчето околу 10,5 %.

Сувата материја без масти, составена од белковини, лактоза и минерални материи, исто така варира под влијание на исхраната, но во помал обем. На вкупната содржина на сува материја влијаат повеќе фактори, какви што се исхраната, генетиката, здравствената состојба, фазата на лактација и годишното време.

Сувата материја може да се одреди гравиметриски, со сушење на примерокот (во сушница или со специјализиран уред, како UltraX), како и пресметковно, со примена на формули (на пример, Флајшманова формула), врз основа на измерената густина (специфична тежина) и содржината на млечни масти.

Дополнително, содржината на сува материја може да се одреди и со апарати како Milkoscan, кој работи на принцип на инфрацрвена спектрофотометрија. Со овој уред се определуваат мастите, белковините и лактозата, а со додавање константна вредност за минералните материи се пресметува вкупната сува материја во млекото.

7.1 Постапка со сушење

Оваа постапка е пропишана со меѓународниот стандард МКС ISO 6731:2012. Се заснова на гравиметриски принцип, односно сушење на одредена количина примерок од млеко (околу 3 g) на температура од 102 ± 2 °C до постигнување константна маса.

По сушењето, врз основа на разликата во масата пред и по постапката, со соодветна формула се пресметува процентот на сува материја во млекото. Овој метод претставува референтна и широко применувана постапка за определување на вкупната сува материја во лабораториски услови.

Прибор и хемикалии

- сушница
- сад (алуминиум, никел или стакло) со капак (со димензии од 6-7 cm и висина 3cm)
- пипета од 5 mL
- аналитичка вага
- ексикатор
- водена бања
- етил алкохол (96 %)
- кварцен песок (испан со 5 % раствор на солна киселина, потоа со вода, исушен и спален).

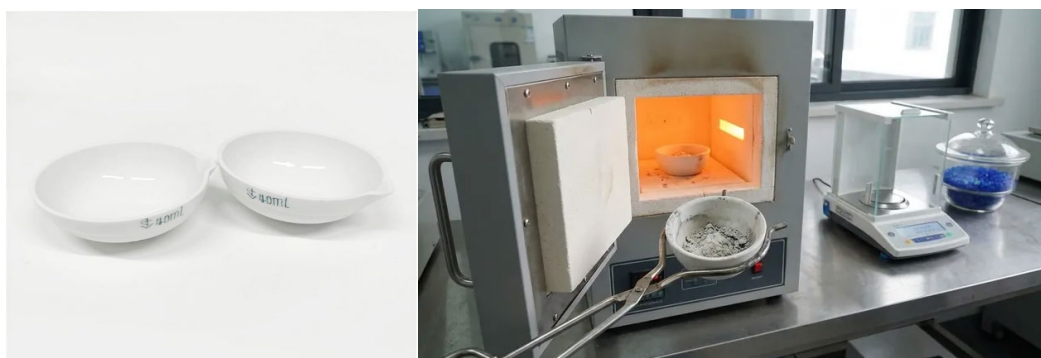
Постапка: Во чист и сув сад се додаваат 10-15 g кварцен песок, кој со помош на стаклено стапче и лесно протресување рамномерно се распоредува на дното. Потоа садот се става во сушница со полуотворен капак на температура од 102 ± 2 °C во траење од 30 минути. По

сушењето, садот се префрла во ексикатор околу 10 минути, а потоа се мери на аналитичка вага (t_1).

Со пипета се додаваат околу 3 mL млеко, при што мерењето се врши со точност од 0,001 g (t_1). Се додаваат неколку капки етил алкохол (за спречување на создавање скрама), по што содржината добро се меша. Садот, со полуотворен капак, се става во водена бања на температура од околу 70 °C во траење од 30 минути, сè додека не испари поголемиот дел од водата.

Потоа садот се пренесува во сушница (102 ± 2 °C) и се суши 2 часа, по што се става во ексикатор 10 минути и повторно се мери (t_2). Постапката на сушење (1 час), ладење (10 минути) и мерење се повторува сè до постигнување константна маса, односно додека разликата помеѓу две последователни мерења не биде помала од 0,5 mg или не се изедначи.

За пресметување на процентот на сува материја се зема најмалата вредност добиена од последователните мерења.



Слика 23. Порцелански садови за евапорација (лево), ставање примерок во сушница (десно)

Содржината на сува материја се пресметува по формула:

$$\text{Содржина на сува материја (\%)} = \frac{(t_2 - t_1) \times 100}{(t_2 - t_1)}$$

t = масата на исушениот сад, песокот, стакленото стапче и капакот

t_1 = масата на садот, песокот, стакленото стапче и млекото

t_2 = најмалата маса по сушење

Напомена: Од истиот примерок млеко мора да се направат најмалку две одредувања на сува материја паралелно или непосредно еднопосредно во исти услови (лабораторија, аналитичар, постапка и др.), а разликата не смее да биде поголема од ±0,05 % релативна вредност. Со одземање на вредноста за сува материја од 100, се добива процентот на вода во млекото.

7.2 Постапка со пресметување со формула

Сувата материја може да се одреди и по пат на пресметка (на пример, со Флајшманова формула и други), кога е познат лактодензиметарскиот број, односно густината (специфичната тежина) и содржината на млечна маст. Помеѓу овие три параметри постои меѓусебна корелација што овозможува индиректно определување на сувата материја.

$$\% \text{ на сува материја} = \frac{4,8 (m + d)}{4} + 0,25$$

m = процент на млечна маст

d = лактодензиметарски степен

Напомена: Доколку наместо специфична маса (на T 15 °C) се одредува на T 20 °C, тогаш за пресметување на сува материја се користи следнава формула:

$$\% \text{ на сува материја} = 1,311 \times m + 2,737 \frac{(100s - 100)}{s}$$

s = специфична маса на млекото

7.3 Одредување безмасна сува материја

Безмасната сува материја е релативно константна вредност и обично се движи во опсег од 8 до 11 %, со просечна вредност од околу 9,0 %. Според Правилникот („Сл. весник“ бр. 96/2011), пропишано е дека кравјото млеко треба да содржи најмалку 8,5 % безмасна сува материја, козјото најмалку 7,5 %, овчето најмалку 9,5 %, а млекото од биволица најмалку 11 %.

Како и вкупната сува материја, така и безмасната сува материја може да се одреди гравиметриски или по пат на пресметување, а може и да се отчитува од посебни табели врз основа на познати вредности.

7.3.1 Гравиметриска постапка

На сувиот остаток што останува по определувањето на вкупната сува материја во млекото, со примена на растворувачи (етер, петрол етер и др.) се врши екстракција на млечната маст. Притоа, преку филтер-хартија се одвојува маста, а по последователно

сушење и вагање на преостанатиот сув остаток, се пресметува содржината на безмасна сува материја.

Постапка со пресметување

Безмасната сува материја во млекото може да се пресмета со помош на различни формули врз основа на познати вредности за содржината на сува материја, млечна маст, специфична тежина, односно густина и лактодензиметарски степен.

Од сува материја

% на безмасна сува материја = % на сува материја – % масти

Хојбергова формула

$$\% \text{ безмасна сува материја} = \frac{d+m}{4}$$

Формула по Babcock

$$\% \text{ на безмасна сува материја} = \frac{d}{4} + 1,2$$

8. Докажување пастеризација на млекото

Во млекото се присутни повеќе од 60 различни ензими што имаат двојно потекло. Ендогените ензими потекнуваат од млечната жлезда и претставуваат природна компонента на млекото, додека екзогените ензими потекнуваат од микроорганизмите што можат да навлезат во млекото за време на молзењето, транспортот или складирањето.

Според својот хемиски состав, ензимите се протеини со сложена молекуларна структура на која често се врзува непротеински дел. Овој дел може да биде цврсто врзан за протеинската молекула (простетична група) или лабаво врзан (коензим). Заедно тие формираат активен ензимски систем, кој учествува во различни биохемиски реакции.

Функционално, ензимите се биохемиски катализатори што ја забрзуваат брзината на хемиските реакции во млекото. Нивната активност е условена од температурата и pH-вредноста на средината. Голем број ензими можат да ја задржат својата активност и при ниски температури, дури и околу 0 °C, но нивната оптимална активност најчесто се постигнува во температурен опсег од 30 до 50 °C. При повисоки температури активноста на ензимите постепено се намалува, а температурата на нивна инактивација зависи од видот и стабилноста на конкретниот ензим.

При процесот на пастеризација најголемиот број ензими се инактивираат како резултат на денатурација на нивната протеинска структура. Сепак, кај одредени ензими инактивацијата може да биде делумно реверзибилна. Ензимската активност во млекото може да доведе до значајни промени во неговиот состав и квалитет, особено во случај на липолитички и протеолитички ензими, кои предизвикуваат разградување на мастите и на протеините. Овие процеси резултираат со појава на несакани промени во вкусот, мирисот и стабилноста на млекото.

Содржината и активноста на одредени ензими може да варира во зависност од здравствената состојба на млечната жлезда. Затоа, одредувањето на нивната активност често се користи како индикатор за проценка на здравствената состојба на вимето, но и за оценување на хигиенската исправност на млекото. Во одредени случаи, присуството на специфични ензими може негативно да влијае врз технолошките својства на млекото, особено врз стабилноста на протеините.

Присуството на висока ензимска активност најчесто укажува на намален квалитет на млекото. Од друга страна, одредувањето на активноста на одредени ензими по термичка обработка на млекото, се користи како индикатор за проверка на ефикасноста на термичката обработка. Така, при ниска и краткотрајна пастеризација се инактивира алкалната фосфатаза, додека при повисоки температури се инактивира и пероксидазата.

Пастеризација на млекото

Пастеризацијата претставува контролирана термичка обработка на млекото при точно дефинирани температурни и временски услови, со цел уништување на патогените микроорганизми и намалување на вкупната микробиолошка контаминација, без значително нарушување на хранливата и сензорната вредност на производот.

Основната цел на пастеризацијата е инактивација на патогени микроорганизми какви што се *Mycobacterium bovis*, *Brucella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* и *Escherichia coli*. Истовремено, процесот доведува до намалување на сапрофитната микрофлора и делумна инактивација на ензимите, при минимални промени во составот на протеините, мастите, лактозата и минералните материи.

Во практиката се применуваат неколку типови пастеризација:

Долготрајна (нискотемпературна) пастеризација

Млекото се загрева на температура од 63 до 65 °C во тек на 30 минути. Овој метод се применува претежно во мали млекарници и во лабораториски услови.

Краткотрајна (високотемпературна) пастеризација

Млекото се загрева на температура од 72 до 75 °C во тек на 15-20 секунди. Ова е најчесто применуваниот индустриски метод за пастеризација на млеко.

Моментална и ултра висока пастеризација

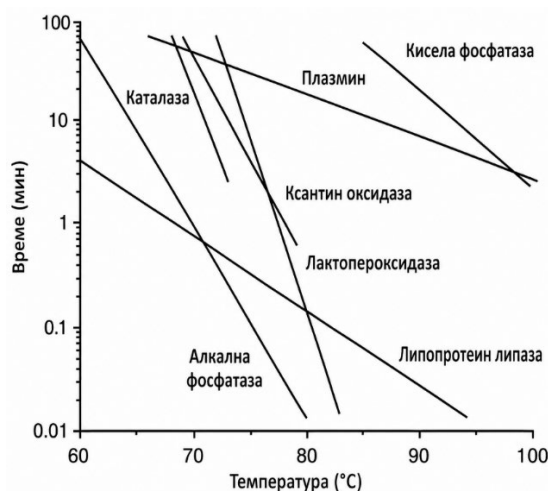
Млекото се загрева на температура од 80 до 138 °C во тек на неколку секунди, со што се постигнува поголем степен на микробиолошка инактивација.

Варено и стерилизирано млеко

Варено млеко претставува млеко што се загрева до температура на вриење (околу 100 °C) и се одржува во состојба на вриење најмалку 3 минути, при постојано мешање.

Стерилизирано млеко е млеко што најдоцна 24 часа по молзењето се прочистува (со филтрација или центрифугирање), по што се подложува на директно или на индиректно загревање на температури од 135 до 150 °C. По загревањето млекото брзо се лади и асептично се полни во стерилни амбалажи.

Пастеризираното, вареното и стерилизираното млеко мора да покажат негативна реакција на алкална фосфатаза и пероксидаза, бидејќи овие ензими се инактивираат при наведените термички обработки и нивното отсуство претставува индикатор за успешно спроведен технолошки процес.



Слика 24. Приказ на инактивација на ензимите при различни температури и време на изложеност

Ензимите грубо можат да се поделат на две групи:

Оксидоредуктази

- пероксидаза
- каталаза
- супероксид дисмутаза
- редуктаза
- ксантин оксидаза

Хидролази

- фосфатаза
- протеаза
- липаза
- амилаза
- β -галактозидаза (лактаза)
- лизозим

8.1 Пероксидаза

Пероксидазата претставува ендеген ензим што природно е присутен во свежото млеко. Пероксидазата го катализира разградувањето на водородниот пероксид до вода и кислород. За разлика од другите пероксидази, пероксидазата што ја излучува млечната жлезда во својот молекул содржи два атома на железо и се нарекува лактопероксидаза.

Лактопероксидазата во присуство на водороден пероксид го оксидира тиоцијанатниот јон (SCN) до интермедијарни производи на оксидација што имаат антимикробно дејство.

Својството на пероксидазата да се инактивира при температури на висока пастеризација е искористено за контрола дали млекото е обработено на температура повисока од 80 °C. При чувањето пастеризирано млеко на температура од 30 °C, доаѓа до реактивирање на пероксидазата (со потекло од леукоцитите), но реактивираната пероксидаза е помалку стабилна од оригиналната. При киселење на млекото дава негативна реакција. Во методите за докажување на пероксидазата, акцептор на кислород е боена материја што во реакцијата ја менува бојата.

8.1.1 Докажување на активноста на пероксидазата – Метод по STORCH

Прибор и хемикалии

- епрувета
- градуирана пипета
- 2 % раствор на парафенилендиамин (во одмерителна колба од 100 mL се додаваат 2 g парафенилендиамин (C₆H₅)₂NH и до половина колба се додава вода, се меша и се дополнува со вода до ознаката)
- 1 % водороден пероксид

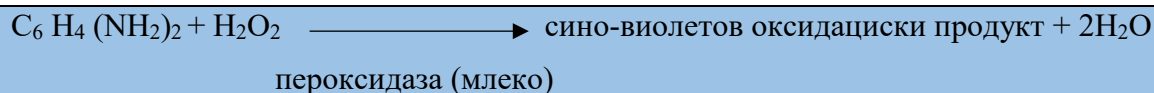
Постапка

Принципот се состои во тоа што лактопероксидазата го разградува водородниот пероксид на вода и активен кислород. Ослободениот кислород го оксидира безбојниот парафенилендиамин во индофенол. Интензитетот на бојата е пропорционален со концентрацијата на ензимот.

Со пипета се одмеруваат 5,0 mL млеко и се ставаат во епруветата. На тоа се додаваат 2 капки на 2 % раствор на парафенилендиамин и 1 капка водороден пероксид. Содржината се меша и се остава 1 минута.

Пероксидаза позитивна реакција – кога млекото не е правилно пастеризирано (висока пастеризација), доаѓа до сина боја.

Пероксидаза негативна реакција – нема промена на бојата по мешање на пробата.



8.2 Фосфатаза

Фосфатазите претставуваат група ензими што се широко распространети во сите живи организми и имаат значајна улога во метаболизмот на фосфорните соединенија. Во млекото тие потекнуваат првенствено од секреторните клетки на млечната жлезда, но можат да бидат присутни и како резултат на метаболичката активност на микроорганизмите што се наоѓаат во млекото.

Во млекото се среќаваат повеќе видови фосфатази што меѓусебно се разликуваат според видот на супстратот врз кој дејствуваат, како и според оптималната pH-вредност при која ја постигнуваат својата максимална ензимска активност.

Во млекото се разликуваат три основни вида фосфатази: алкална фосфатаза, бактериска (микробиолошка) фосфатаза и кисела фосфатаза. Од технолошки аспект, за млечната индустрија најголемо значење има алкалната фосфатаза, чија оптимална pH-вредност на активност изнесува околу 9,6.

Алкалната фосфатаза е особено значајна бидејќи условите за нејзина инаktivација се многу слични на условите на температура и времетраење што се потребни за уништување на патогената бактерија *Mycobacterium tuberculosis* и *Brucella melitensis*. Поради оваа карактеристика, алкалната фосфатаза се користи како индикатор за проверка на ефикасноста на термичката обработка на млекото, односно за утврдување дали млекото е подложено на ниска пастеризација или краткотрајна (средна) пастеризација.

Докажувањето на активноста на алкалната фосфатаза се заснова на нејзината способност во алкална средина да ја катализира хидролизата на естрите на фосфорната киселина, како што е динатриумфенилфосфатот, при што се ослободува фенол. Ослободениот фенол реагира со специфичен индикатор за фенол, како што е дибромхинон хлоримид, при што се формира обоено соединение и реакцијата станува видлива.

Покрај динатриумфенилфосфатот, за докажување на активноста на фосфатазата можат да се користат и други супстрати, какви што се фенолфталеин фосфат и р-нитрофенил фосфат, кои исто така се разградуваат под дејство на алкалната фосфатаза.

Реакцијата за докажување на фосфатаза е исклучително чувствителна и овозможува детекција дури и на 0,1 % додавање сурово млеко во пастеризирано млеко, како и отстапувања во температурата на пастеризација од 0,1 до 1 °C под пропишаните услови.

При изведување на оваа проба, важно е да се има предвид можноста за реактивација на фосфатазата. До реактивација може да дојде при краткотрајна изложеност на високи температури, што се должи на фактот дека алкалната фосфатаза делумно се наоѓа во слободна форма, а делумно е врзана за белковините од адсорпциониот слој на масната глобула. Слободната фосфатаза се инактивира при термичка обработка, додека врзаната форма може да остане стабилна.

При подолго складирање на млекото, особено во присуство на Mg^{2+} јони, може да дојде до одвојување на врзаната фосфатаза и нејзино преминување во слободна, активна форма.

При анализа на реактивираната фосфатаза потребно е да се исклучи присуството на фосфатаза од микробно потекло. Бактериската фосфатаза е потермостабилна и се инактивира на повисоки температури (70-75 °C во текот на неколку минути), додека киселата фосфатаза се инактивира при рН околу 4,0 и температура од 98,4 °C во текот на околу 4 минути.

8.2.1 Докажување на алкална фосфатаза според метод на Andersen-Petersen

Принципот на методот се заснова на докажување на активноста на алкалната фосфатаза, ензим што ја катализира хидролизата на естрите на фосфорната киселина. При оваа реакција се ослободува фенол, кој понатаму реагира со 2,6-дибромхинонхлоримид, при што се формира сино обоено соединение.

Појавата на сина боја претставува доказ за присуство на активна алкална фосфатаза во примерокот.

Прибор и хемикалии

- прибор
- Ерленмаерова колба
- градуирана пипета
- мензура
- водена бања
- хемикалии
- пуферски раствор А

Во одмерителна колба од 1000 mL се додаваат 2,2 g анхидриран натриум карбонат (Na_2CO_3) и 8,7 g натриум бикарбонат ($NaHCO_3$). Се додава вода до половина од волуменот на колбата и се меша додека супстанциите целосно се растворот. Потоа се дополнува со дестилирана вода до ознаката.

- Супстратен раствор В

Во одмерителна колба од 1000 mL се додава 1,1 g динатриумфенилфосфат ($C_6H_5OPO(ONa)_2 \cdot 2H_2O$). Се додава вода до половина од волуменот на колбата и се меша до целосно растворање, по што се дополнува со вода до ознаката.

- Раствор С – реагенс за фенол

Во епрувета се ставаат 8,0 mL 96 % етанол, на што се додаваат 50 mg 2,6-дибромхинонхлоримид ($C_2H_2Br_2ClNO$). Смесата се меша до целосно растворање на реагенсот, при што се добива жолт раствор.

Начин на работа

Се подготвува реакциона смеса од раствор А и раствор В, при што 50 mL од растворот А се мешаат со 5 mL од растворот В. Смесата добро се хомогенизира.

Од подготвената смеса се земаат 10 mL и се пренесуваат во епрувета, по што се додава 1 mL млеко. Содржината се меша, а епруветата се става во водена бања на температура од 38 °C во траење од 15 минути.

По истекот на времето се додаваат неколку капки од растворот С.

Појавата на сина боја претставува позитивна реакција, што укажува на присуство на активна алкална фосфатаза, односно дека млекото е сурово или недоволно пастеризирано.

Отсуството на обоеност укажува дека алкалната фосфатаза е инактивирана, што значи дека млекото е правилно пастеризирано.

8.2.2 Докажување на алкална фосфатаза со Fluorophos метод

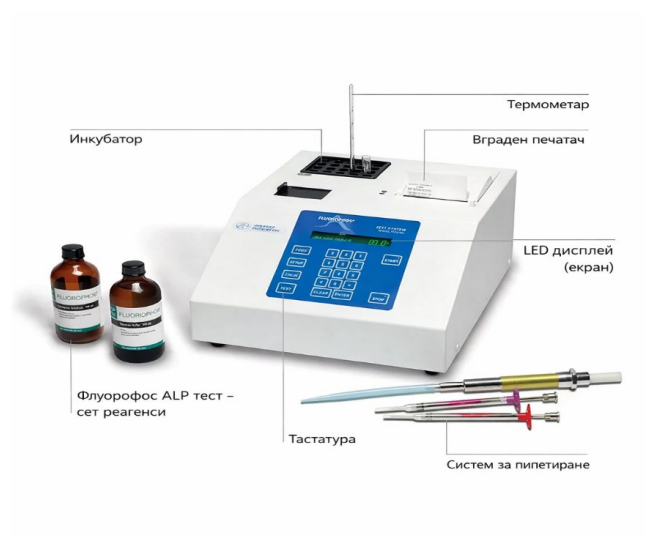
Принцип на методот

Методот за докажување на алкалната фосфатаза во млекото со Fluorophos се заснова на флуорометриско мерење на ензимската активност.

Во реакцијата се користи Fluorophos, кој претставува ароматичен моноестер на ортофосфорна киселина и во почетна состојба е нефлуоресцентен супстрат. Под дејство на алкалната фосфатаза присутна во млекото, од молекулата на Fluorophos се одделува фосфатната група, при што се формира силно флуоресцентно соединение – Fluoroyellow.

Интензитетот на создадената флуоресценција е пропорционален на активноста на алкалната фосфатаза во примерокот. Мерењето се изведува со флуорометар, обично при температура од 38 °C, во текот на неколку минути.

Доколку млекото е правилно пастеризирано, алкалната фосфатаза е инактивирана и не доаѓа до хидролиза на супстратот, па не се појавува флуоресценција. Во случај на сурово или недоволно пастеризирано млеко, присутната алкална фосфатаза ја катализира реакцијата и се појавува флуоресцентен сигнал.



Слика 25. Апарат Fluorophos за определување на активноста на алкалната фосфатаза во млеко – флуорометриски метод.

9. Одредување протеини во млекото

Од нутритивен аспект, белковините на млекото претставуваат многу вредна хранлива компонента, бидејќи ги содржат сите есенцијални аминокиселини потребни за човечкиот организам. Во кравјото млеко нивната содржина се движи од 2,6 до 4,1 %, при што просечната вредност изнесува околу 3,5 %.

Содржината на белковини варира и во зависност од видот на животното. Така, во овчото млеко содржината на белковини се движи од 5,7 до 7,3 % (просечно 6,2 %), во млекото од биволица од 3,6 до 5,2 % (просечно 4,5 %), додека во козјото млеко се движи од 2,8 до 3,7 % (просечно 3,1 %).

Млекото содржи околу 100 различни азотни соединенија, од кои поголемиот дел се присутни во многу мали концентрации. Од вкупната количина азотни материи во млекото, приближно 95 % се протеини, додека околу 5 % претставуваат непротеински азотни материи. Во групата непротеински азотни материи спаѓаат мали пептиди, слободни аминокиселини, аминокиселини, креатин, урична киселина, уреа и амонијак.

Белковините во млекото се поделени во две главни групи: казеини и протеини на сурутката. Во протеините на сурутката спаѓаат α -лактоалбумин, β -лактоглобулин, албумин на крвниот серум, имуноглобулини, протеози и пептони, како и мала количина протеини што се составен дел од мембраната на масниот глобул.

Најголемиот дел од млечните белковини се синтетизираат во млечната жлезда, од аминокиселините и белковините што се транспортираат со крвта. Жлездените клетки ги користат овие соединенија за време на протокот на крвта низ млечната жлезда и од нив синтетизираат специфични млечни протеини.

Казеинот е специфична белковина карактеристична за млекото и во природни услови се среќава речиси исклучиво во оваа секреција. Во кравјото млеко тој сочинува приближно 80 % од вкупната содржина на протеини. Поголемиот дел од α -лактоалбуминот и β -лактоглобулинот исто така се синтетизира во млечната жлезда.

Мал дел од белковините во млекото потекнуваат од крвните протеини, кои преминуваат низ бариерата помеѓу луменот на крвните садови и алвеоларната шуплина на млечната жлезда. Дел од овие протеини (околу 1 %) се имуноглобулини (γ -глобулини), какви што се IgG и IgA, односно антитела. Нивната концентрација е особено висока во колострумот, особено во првите 48 часа по породувањето, кога имаат важна улога во обезбедување пасивен имунитет кај новороденото.

Содржината на белковини во млекото е тесно поврзана со исхраната на животните, особено со енергетската вредност на оброкот и со аминокиселинскиот состав на храната.

Во колострумот содржината на протеини може да достигне околу 15,8 %, додека во човечкото млеко просечната содржина на протеини изнесува околу 1,0 %

9.1 Одредување содржина на белковини во млекото

Класичен начин за одредување на белковините во млекото и во млечните производи е методот по Kjeldahl. Принципот на одредување на белковините со оваа постапка се

заснова на разорување на органските материи со сулфурна киселина, при што во присуство на катализатор органскиот врзан азот преминува во амониумсулфат.

Потоа со помош на натриум хидроксид се истиснува амонијакот, чија количина по дестилацијата се одредува со титрација со вишокот на киселина во која амонијакот е предестилиран. Врз основа на количината на киселина потрошена за неутрализација на амонијакот се пресметува содржината на азотот, која се множи со соодветен фактор за секоја белковина со цел да се добие процент на белковини во испитуваниот примерок. За белковините на млекото има различни фактори:

- за вкупни протеини 6,38
- за казеин 6,45
- за албумини и глобулини 6,34

Покрај овој метод постојат и други методи за одредување на белковините во млекото, кои се поедноставни, побрзи, но не се доволно прецизни. Поради тоа, ако е потребна апсолутна точност на резултатот, се користи методот по Kjeldahl.

9.1.1 Докажување на вкупен азот во млекото по Kjeldahl

Разликата помеѓу вкупни протеини и вистински протеини во млекото е важна во аналитиката и технологијата на млекото, бидејќи не сите азотни соединенија во млекото се протеини. Вкупните протеини претставуваат количина што се добива со одредување на вкупниот азот во млекото, најчесто со Kjeldahl метод, и негово пресметување во протеини со фактор 6,38. Оваа вредност ги опфаќа:

- вистинските протеини и
- непротеинските азотни соединенија

Вкупни протеини = вистински протеини + непротеински азотни материи (NPN)

Вистинските протеини ги претставуваат реалните млечни белковини, односно азотните соединенија што се наоѓаат во форма на протеини и можат да се преципитираат со трихлороцетна киселина или со други реагенси. Тука спаѓаат:

- казеините (α 1-казеин, α 2-казеин, β -казеин, κ -казеин)
- протеините на сурутката
- α -лактоалбумин
- β -лактоглобулин
- серумски албумин
- имуноглобулини

Во млекото, вистинските протеини сочинуваат околу 95 % од вкупните азотни материи, односно околу 3,0-3,3 % во кравјото млеко.

Непротеински азотни материи (NPN)

Другите околу 5 % од азотните материи се:

- уреа
- слободни аминокиселини
- мали пептиди
- амонијак
- креатин и креатинин
- урична киселина

Овие соединенија не се протеини, но содржат азот и затоа влегуваат во пресметката на вкупните протеини при Kjeldahl анализа.

Прибор и хемикалии:

- уред за дестилација
- одмерителна колба од 100 mL
- колба по Kjeldahl од 100 mL
- Ерленмаєрова колба од 100 mL
- бирета
- градуирана пипета
- концентрирана сулфурна киселина (H_2SO_4 мол. маса 98,08)
- бакарен сулфат ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - мол. маса 249,69)
- калиум сулфат (K_2CO_4 – мол. тежина 174,27)
- 1 % алкохолен раствор на фенолфталеин ($\text{C}_6\text{H}_4 - \text{C}_2\text{O}_2 = (\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$ - мол. маса 318,31
- 3 % NaOH – мол. маса 40,01
- 0,01 M натриумова база
- октил алкохол ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$ – густина 0,82 g/mL, мол на маса 130,23)

Принцип на работа

Методот се заснова на три главни фази:

- дигестија (разорување)
- дестилација
- титрација

Подготовка на растворот за дигестија

Во колба за дигестија се додава K_2SO_4 и $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ како катализаторска мешавина. Потоа се додаваат 8-10 амфотерни гранули за да се поттикне рамномерното вриење.

Се загреваат 5 mL млеко на 38 °C и темелно се меша. Подготвениот примерок се додава во Kjeldahl колбата за дигестија. Потоа се додава концентрирана H_2SO_4 (сулфурна киселина) и растворот внимателно се меша.

1. Дигестија

Колбата се поставува во накосена положба под агол од околу 40° на уредот за загревање. На почетокот се загрева внимателно за да се избегне создавање пена.

Кога ќе се појави бела пена, растворот се загрева на повисока температура и се врши разорување околу 15 минути со силно вриење, сè додека течноста не стане бистра и светлозеленикава.

На крајот, дигестатот треба да биде целосно бистар и без неразорени честички. Откако дигестатот ќе се олади, се додаваат околу 300 mL дестилирана вода и растворот се меша.

Во текот на овој процес азотот од протеините преминува во амониум сулфат $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.



Слика 26. Дигестор со колби



Слика 27. Дигестат после дигестија

2. Дестилација

Колбата со дигестатот не мора веднаш да се подложи на дестилација, туку може да се дестилира и подоцна.

Во Ерленмаерова колба со волумен од 500 mL се додаваат 50 mL раствор на борна киселина, измерени со одмерителна мензура, и 4 капки индикаторски раствор. Растворот се меша, а Ерленмаеровата колба се поставува на апаратот за дестилација така што излезната цевка од апаратот е потопена во течноста.

Во колбата по Kjeldahl се додаваат 75 mL 50 % раствор на NaOH. Колбата се поврзува со апаратот за дестилација и растворот се загрева со мешање сè додека амонијакот целосно не се издестилира.

Ослободениот амонијак (NH_3) се дестилира во приемната колба, која содржи раствор на борна киселина и индикатор. Процесот на дестилација може значително да се поедностави со користење автоматски Kjeldahl дестилатор.



Слика 28. Автоматски дестилатор

3. Титрација

Добиениот дестилат се титрира со стандарден раствор на HCl или H_2SO_4 сè до првата појава на розова боја, што означува крајна точка на титрацијата. При титрацијата се запишува волуменот на потрошената киселина.

Истовремено се изведува и слепа проба (blank) заради попрецизно пресметување.

Пресметување на процентот на азот

$$\% \text{ N} = \frac{(V_1 - V_0) \times c \times 14,007 \times 100}{m}$$

Процентот на азот се пресметува според формулата:
каде што:

V_1 – волумен на киселина потрошен за примерокот (mL)

V_0 – волумен на киселина потрошен за слепата проба (mL)

c – концентрација на киселината (mol/L)

14.007 – атомска маса на азот

m – маса на примерокот (g)

Пресметување на протеини во млекото

Содржината на протеини се добива со множење на % азот со фактор 6.38:

$$\% \text{ протеини} = \%N \times 6,3$$



Слика 29. Титрација на дестилат од млеко

10. Одредување на лактоза во млекото

Лактозата е млечен шеќер присутен во различни количества во млекото од различни видови животни. Таа се синтетизира исклучиво во млечната жлезда од глюкозата која потекнува од крвта. Синтезата на лактозата во текот на лактацијата е релативно константна. Во свежото кравјо млеко, кај повеќето раси, нејзината содржина изнесува околу 4,7 %.

Оваа компонента на млекото значително се намалува при заболувања на вимето, како што е маститисот. Во такви случаи, поради воспалителниот процес се намалува снабдувањето на жлезденото ткиво (паренхимот) со крв, што доведува до намалена синтеза на лактоза. Намалувањето на лактозата се јавува уште пред појавата на клиничките знаци на маститис, поради што следењето на нејзината концентрација може да послужи како ран индикатор за супклинички воспалителни процеси во вимето.

За определување на содржината на лактоза во млекото се применуваат различни аналитички методи. Најчесто користени се полариметриските и гравиметриските методи, инфрацрвената спектроскопија, колориметриските методи, гасно-течната хроматографија, како и високоефикасната течна хроматографија (HPLC). Изборот на методот зависи од потребната точност, чувствителност и условите во лабораторијата.

10.1 Гравиметриски метод

Принцип

Методот се заснова на способноста на редуцирачките шеќери, пред сè лактозата, да редуцираат комплекс на бакар (II) јони до бакар (I) оксид (Cu_2O) под точно определени услови. Притоа се формира црвен талог на Cu_2O , чија количина е пропорционална на содржината на лактоза во анализираниот примерок.

Прибор и хемикалии:

- чаша од 500 mL
- мензура
- пипета
- одмерителна колба
- лакмус-хартија
- стаклен филтер G-4 или Гучов филтер со азбест
- саатно стакло
- сушница ($t=102 \pm 2^\circ\text{C}$)
- ексикатор
- фаќалки
- аналитичка вага
- Фелинг I раствор (69,378g бакарен сулфат - CuSO_4 - се раствора во вода во одмерителна колба од 1000 mL и се дополнува со вода до ознаката)

- Фелинг II раствор (364g калиум натриум тартарат - $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$ и 100g на NaOH се раствора во вода во одмерителна колба од 1000 mL и се дополнува со вода до ознаката)
- заситен раствор на натриум флуорид (NaF - со моларна маса 42,00)
- етил алкохол ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ – 96 %)
- етер ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2$ – 99,5 % со моларна маса 74,08)

Постапка за гравиметриско определување на лактоза со Фелингов реагенс

Во чаша од 600 mL се ставаат 25 mL млеко. Потоа се додаваат 400 mL дестилирана вода и 10 mL раствор Фелинг I, кој предизвикува таложење на казеинот и врзување на мастите. Содржината добро се меша.

По мешањето, растворот се неутрализира со 0,1 M NaOH , додавајќи капка по капка, при што неутрализацијата се контролира со лакмус-хартија.

Потоа се додаваат 20 mL заситен раствор на натриум флуорид (NaF), кој ги таложи калциумовите соли. Содржината повторно се меша и се остава да стои 30 минути.

По мирувањето, растворот се пренесува во одмерителна колба и се дополнува со дестилирана вода до ознаката, по што се филтрира.

Од добиениот филтрат се мерат 100 mL и се ставаат во колба. На нив се додаваат по 25 mL Фелинг I и Фелинг II раствор. Содржината се меша и колбата се покрива со саатно стакло.

Растворот се загрева до вриење и се остава да врие 6 минути, при што лактозата го редуцира бакар (II) јонот и се формира талог од бакар (I) оксид (Cu_2O).

По варењето, содржината се филтрира низ стаклен филтер G-4 или Гучов филтер, кој претходно е исушен, изладен во ексикатор и измерен.

Добиениот талог се плакне со врела вода, потоа со алкохол, а на крај со етер. Филтерот со талогот се суши во сушница, потоа се лади во ексикатор и се вага на аналитичка вага до константна маса.

Од измерената маса на бакар (I) оксид (Cu_2O), со помош на табела за пресметка, се определува количината на лактоза (како хидрат).

Процентуалната содржина на лактоза се пресметува според формулата:

$$\% \text{ лактоза} = \frac{A \times 100}{B}$$

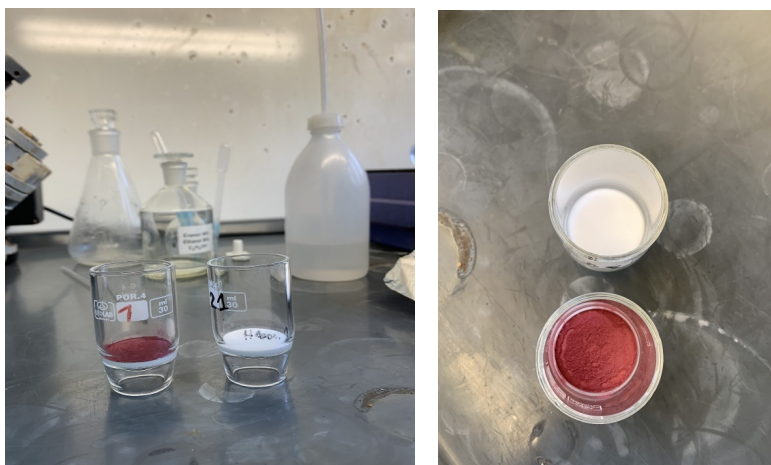
Каде што е:

A = количината на лактоза што одговара на количината на одмерен оксид

B = количината на млеко што одговара на количината на одмерен бакар оксид



Слика 30. Реакција за определување лактоза: лево – позитивна Фелингова реакција (формирање црвен талог на Cu_2O), десно – негативна Фелингова реакција (син раствор на Cu^{2+} јони)



Слика 31. Приказ на позитивна (со црвена боја) и на негативна (со бела боја) реакција

11. Одредување на бројот на соматски клетки и дијагностика на маститис

Воспалението на вимето (маститис) претставува сериозен проблем во сточарското производство, млечната индустрија и во преработката на млечни производи. Тоа предизвикува значителни економски загуби, кои се манифестираат преку намалено производство (секреција) на млеко, привремено исклучување на кравите од производството поради оштетување поединечни делови (четвртини) од вимето, нагло угинување или принудно колење на заболените животни, како и зголемени трошоци за лекување.

Дополнително, млекото за време на лекувањето и одреден период по него (каренца) не е соодветно за исхрана на луѓето ниту за индустриска преработка. Млекото, односно патолошкиот секрет од заболено виме, може да претставува ризик по здравјето на луѓето, бидејќи може да содржи патогени микроорганизми и нивни токсини. Воедно, поради променетиот изглед и намалениот квалитет, ваквото млеко е неприфатливо за потрошувачите.

Дијагностиката на маститисот има особено значење поради високиот процент на супклинички форми, кои претставуваат сериозен проблем во млечното производство. Супклиничките маститиси се особено важни од аспект на хигиената на млекото, бидејќи ваквото млеко, иако на прв поглед изгледа непроменето, може да влезе во промет и да го наруши неговиот квалитет и безбедност.

Главни карактеристики на субклиничкиот маститис:

- нема видливи промени на вимето;
- нема видливи промени во млекото;
- во млекото се присутни микроорганизми;
- постои воспалителен процес со зголемен број соматски клетки;
- вимето претставува резервоар на микроорганизми;
- најчесто се јавува кај млечните грла.

Поради тоа, за откривање на супклиничките маститиси, покрај бактериолошкиот преглед на млекото, се применуваат и други методи со кои се утврдува нарушувањето на секрецијата на млечната жлезда.

Факторите што придонесуваат за појава на маститис можат да се поделат на директни и индиректни.

Директни фактори

- неправилно молзење;
- неисправност на системот за молзење;
- преголем или слаб вакуум при молзење;
- лоша хигиена при молзење;
- лоша хигиена на кравите во шталата;
- неповолна микроклима во шталата;

- несоодветна исхрана на кравите и др.

Индиректни фактори

- микроорганизми: вируси, бактерии (стрептококи, стафилококи, колиформни бактерии, коринебактерии), микоплазми, хламидии и габи;
- механички фактори (трауми);
- термички фактори;
- хемиски фактори.

Дијагностички постапки

За откривање на нарушувањата во секрецијата на млечната жлезда се применуваат следните дијагностички методи:

- клинички преглед;
- органолептички преглед на млекото (испитување на првите млазови на млекото);
- одредување на количината на млеко;
- цитолошки методи:
 - директни (броење клетки под микроскоп),
 - индиректни (каталаза тест, Whiteside тест, Калифорнија маститис тест, микробиолошки тест);
- поретко се применуваат и:
 - одредување на количината на хлориди,
 - мерење на рН-вредноста,
 - мерење на електричната спроводливост на млекото.

Промени во млекото при маститис

При воспаление на вимето (маститис) настануваат значајни хемиски и физички промени во составот на млекото, кои директно влијаат врз неговиот квалитет и технолошка вредност.

Промени во минералниот состав

Кај маститис се забележуваат следните промени во минералниот состав на млекото:

- зголемена концентрација на натриум и хлориди;
- намалена концентрација на калциум и калиум.

Овие промени се резултат на зголемената пропустливост на ткивото на млечната жлезда, што овозможува навлегување на компоненти од крвта во млекото.

Промени во општите својства и во составот на млекото

Покрај минералниот состав, при маститис се јавуваат и значајни промени:

- зголемување на рН-вредноста на млекото;
- намалување на содржината на лактоза;

- намалување на содржината на млечна маст;
- промени во протеинскиот состав, и тоа:
- намалување на казеинот;
- зголемување на имуноглобулините;
- зголемување на серум-албумините;
- зголемување на трансферинот.

Овие промени се последица на воспалителниот процес, при што доаѓа до преминување на компоненти од крвта во млекото и нарушување на нормалната функција на млечната жлезда.

11.1 Преглед на млекото на црна подлога (предмолзна проба)

Во текот на лактацијата, пред секое молзење, млекото треба да се прегледа на црна подлога, со цел да се утврди дали постојат видливи промени.



Слика. 32 Предмолзна проба на црна подлога

При оваа постапка, молзачот треба да измолзи неколку први млазови млеко на црната подлога и внимателно да го прегледа измолзеното млеко, односно секретот од вимето. Со прегледот на првите млазови се оценуваат:

- конзистенцијата на млекото,
- бојата,
- мирисот,
- присуството на примеси,
- количината на секретот.

Доколку постои воспаление на млечната жлезда, доаѓа до згрутчување на млекото, при што може да се забележат примеси од слуз, густ гној, а понекогаш и присуство на еритроцити. Млекото може да добие изглед сличен на крвен серум, да има црвеникава боја, или пак да биде воденесто со синкава нијанса.

Мирисот на млекото исто така може да се промени. Кај тешки гнојни инфекции може да се појави мирис на сулфуроводород. При инфекции предизвикани од анаеробни бактерии се јавува слатко-гнил мирис, додека при инфекции предизвикани од микроорганизми од коли-групата може да се почувствува мирис сличен на овошје.

Во млекото од воспалено виме можат да се сретнат различни видливи примеси, какви што се: парченца, снегулки, гнојни грутки, згрутчена крв, фибрин.

11.2 Откривање воспаление на вимето преку содржината на хлориди во млекото

Раното воспаление на вимето може да се открие со одредување на концентрацијата на натриумот и на хлоридите во млекото. Во млекото од здрава крава се наоѓаат приближно 40 mg/100 mL натриум и 80-110 mg/100 mL хлориди.

Како горна физиолошка граница за содржината на натриум се смета 50 mg/100 mL (≈ 22 mmol/L), а за хлориди 120 mg/100 mL (≈ 34 mmol/L). Вредности над овие граници може да укажуваат на воспалителен процес во вимето.

Нормално покачени вредности на хлориди може да се сретнат во колострумот и во млекото од крави при крајот на лактацијата. Во тие случаи, зголемената концентрација на хлориди е присутна во сите четвртини на вимето.

Кај маститисот, пак, не е карактеристично општо зголемување на хлоридите во целото млеко, туку разлика во содржината на хлориди помеѓу поединечните четвртини на вимето, бидејќи воспалението најчесто зафаќа една или две четвртини, а поретко три или сите четири. Разликата во количината на хлориди помеѓу поединечните четвртини не смее да биде поголема од 3 mmol/L кај здрави животни.

Причината за зголемувањето на концентрацијата на хлориди лежи во фактот што тие, заедно со лактозата, учествуваат во регулирањето на осмотскиот притисок и пропустливоста на клеточните мембрани. При воспаление на млечната жлезда се намалува синтезата на лактоза, поради што хлоридите преминуваат од крвта во млекото со цел да се одржи осмотската рамнотежа.

11.3 Метод по Дрост

Методот се заснова на реакцијата на хлоридните јони од млекото со сребро-нитрат (AgNO_3). При оваа реакција се додава вишок од сребро-нитрат, при што дел од него останува слободен. Преостанатата количина на сребро-нитрат се определува со титрација со амониум-тиоцијанат (NH_4SCN) во присуство на фeroамониум-сулфат, кој служи како индикатор.

Количината на хлориди се пресметува врз основа на разликата помеѓу вкупната додадена количина на сребро-нитрат и количината што реагира со амониум-тиоцијанатот.

Прибор и хемикалии

- Ерленмаєрова колба
- бирета (за титрација)
- пипети (за мерење на 1 mL, 5 mL и 10 mL)

- мерен цилиндар (по потреба)
- стаклено стапче (за мешање)
- млеко (примерок)
- азотна киселина (HNO_3)
- раствор на фeroамониум-сулфат (индикатор)
- раствор на сребро-нитрат (AgNO_3)
- раствор на амониум-тиоцијанат (NH_4SCN)

Начин на работа

Во Ерленмаєрова колба се додаваат: 10 mL млеко, 5 mL азотна киселина (HNO_3), 1 mL раствор на фeroамониум-сулфат (индикатор)

По добро мешање се додаваат 5 mL раствор на сребро-нитрат (AgNO_3). Потоа растворот се титрира со амониум-тиоцијанат до појава на трајна црвено-кафеава боја.

Откако ќе се потроши целата количина слободен сребро-нитрат, амониум-тиоцијанатот реагира со фeroамониум-сулфатот и формира црвено-кафеав комплекс – фero-тиоцијанат (феророданид), што претставува крајна точка на титрацијата.

Количината на хлориди се пресметува според следната формула:

$$\% \text{ на хлор} = \frac{(a-b) \times 0,00355 \times 100}{s}$$

a – количина (mL) на 0,1 mol/L AgNO_3 земена за анализа

b – количина (mL) на 0,1 mol/L амониум-тиоцијанат потрошена при титрацијата

(a – b) – количина на 0,1 mol/L AgNO_3 што реагира со хлоридните јони

0,00355 – количина хлор (g) што ја врзува 1 mL 0,1 mol/L AgNO_3

s – количина на анализираното млеко (mL)

11.4 Модифицирана постапка

Методот може да се изведе и во модифицирана форма, при што се користи Martius-Lutke раствор, кој содржи: сребро-нитрат, азотна киселина, заситен раствор на фeroамониум-сулфат, дестилирана вода.

При оваа постапка се земаат 5 mL од Martius-Lutke растворот и 10 mL млеко, а понатамошната анализа се изведува на ист начин како и кај претходно опишаниот метод.

11.5 Брз метод за определување на хлориди во млекото

Во епрувета се одмеруваат 10 mL млеко, по што се додаваат неколку капки 10 % воден раствор на калиум-бихромат ($K_2Cr_2O_7$) и 1 mL 0,1 mol/L раствор на сребро-нитрат ($AgNO_3$).

Доколку се појави жолта боја, тоа укажува дека количината на хлориди е поголема од дозволената во млекото. Жолтата боја потекнува од слободниот калиум-бихромат што не реагира.

Доколку се појави портокалова боја, тоа означува нормална содржина на хлориди во млекото. Во овој случај, вишокот на сребро-нитрат реагира со калиум-бихроматот, при што се формира соединение со портокалова боја.

Овој метод е брз и ориентационен, и се користи за приближна проценка на содржината на хлориди во млекото.

11.6 Откривање маститис преку определување pH на млекото

Млекото од здраво виме има нормална (физиолошка) pH-вредност од 6,4 до 6,8. Со појавата на воспаление на млечната жлезда, pH-вредноста на млекото се зголемува и преминува во алкална реакција ($pH > 7$). Само во исклучителни случаи pH-вредноста може да се намали под 6,5.

pH-вредноста на млекото може лесно да се одреди со:

- индикаторски хартиени ленти,
- специјални апарати – pH-метри.

Овој метод нема големо практично значење во раната дијагностика на маститисот, бидејќи промените во pH-вредноста најчесто се забележуваат дури кога веќе постојат органолептички промени во млекото и клинички знаци на воспаление на вимето.

Најсоодветен индикатор за ова испитување е бромтимол сино (bromothymol blue), кој може да се користи:

- во раствор (т.н. тибромол проба во епрувета),
- во сува состојба на индикаторска хартија.

Тибромол проба

Тибромол пробата е ориентационен тест и не може да се користи како единствен метод за целосна дијагноза на маститис.

Од секоја четвртина на вимето се измолзуваат по 5 mL млеко во посебна епрувета, по што се додава 1 mL 0,15 % раствор на индикаторот бромтимол сино.

Доколку вимето е здраво, млекото во сите четири епрувети покажува жолто-зелена боја.

Доколку некоја четвртина е заболена, ќе се појави:

- сино-зелена боја – алкална реакција,

- жолта боја – кисела реакција.

Карактеристично за маститисот е што промената на бојата најчесто се јавува само во една или две четвртини, а поретко во сите четири.

Доколку станува збор за колострално млеко или млеко при крајот на лактацијата, промените се појавуваат во сите четири четвртини.

Индикаторска хартија за докажување маститис

Во овој тест индикаторот бромтимол сино се наоѓа во сува форма на специјална индикаторска хартија. На хартијата се наоѓаат четири одделни полиња во форма на круг со дијаметар од околу 15 mm. Секое поле е означено за соодветната четвртина на вимето.

При испитувањето, на означеното поле се става по една капка млеко од соодветната четвртина.

Ако вимето е здраво, сите четири полиња ќе покажат жолто-зелена боја.

Ако некоја четвртина е заболена, ќе се појави жолта или зелена боја, во зависност од рН-вредноста.

Со овој метод се добиваат слични резултати како со тибромол пробата во епрувета, но постапката е побрза и поедноставна за практична примена.

11.7 Откривање воспаление на вимето според електричната спроводливост на млекото

Млекото има специфична електрична спроводливост, која зависи од содржината на електролити (главно јони на натриум, калиум и хлориди). Словите ткива што се наоѓаат помеѓу капиларите и алвеолите на млечната жлезда ја регулираат концентрацијата на овие електролити и ја одржуваат во релативно постојан однос.

Со појавата на воспаление на вимето доаѓа до промена на пропустливоста (пермеабилитетот) на овие ткива, што овозможува зголемен премин на јоните на натриум и хлориди од крвта во млекото, додека количината на лактоза се намалува.

Овие промени доведуваат до зголемување на електричната спроводливост на млекото, што може да се регистрира со специјални апарати за мерење на спроводливоста. Поради тоа, мерењето на електричната спроводливост претставува корисен индикатор за рано откривање на маститис.

11.8 Одредување на количината на млеко од поединечни четвртини

Со мерење на количината на млекото од секоја четвртина на вимето одделно, може да се постави сомнеж за постоење маститис.

Во нормални услови:

- предните две четвртини даваат приближно еднаква количина млеко,
- задните две четвртини исто така даваат слична количина млеко.

Доколку постои значајна разлика во количината на млеко помеѓу четвртините, обично заболена е онаа четвртина што дава помала количина млеко.

11.9 Цитолошки методи

Млекото во нормални услови содржи приближно од 10.000 до 250.000 соматски клетки во 1 mL млеко.

Под поимот соматски клетки се подразбираат:

- епителни клетки од млечните канали,
- леукоцити (клетки на имунолошкиот систем).

Зголемувањето на бројот на соматски клетки укажува дека млекото потекнува од заболени крави или од животни кај кои дошло до задржување на млекото поради нецелосно измолзување или стрес.

При воспаление на вимето се зголемува главно бројот на леукоцити, додека бројот на епителните клетки не се менува значително. Зголемувањето на бројот на леукоцити е во директна корелација со интензитетот и обемот на воспалителниот процес. Колку повеќе се зафатени млечните канали и жлезденото ткиво, толку е поголем бројот на леукоцити во млекото.

Според важечките прописи („Сл. весник“ бр. 26/2012 и „Сл. весник“ бр. 197/2016), млеко што содржи повеќе од 400.000 соматски клетки во 1 mL се смета за неисправно.

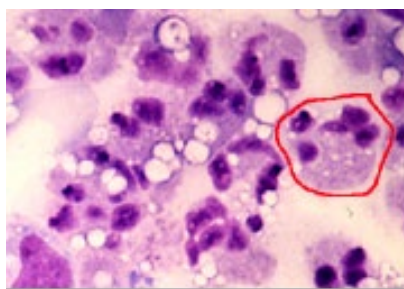
Во нормални услови, од вкупниот број соматски клетки:

- околу 70 % потекнуваат од епителот на вимето,
- околу 30 % се леукоцити од крвта.

При маститис, овој однос се менува во корист на леукоцитите, односно нивниот број значително се зголемува.

11.10 Директно микроскопско одредување на соматските клетки

Директното микроскопско одредување на соматските клетки во млекото претставува цитолошки метод што овозможува процена на здравствената состојба на вимето. Со овој метод се утврдува вкупниот број соматски клетки, кои главно го сочинуваат леукоцити и епителни клетки од млечните канали.



Слика 33. Изглед на леукоцити под светлосен микроскоп.

Зголемениот број соматски клетки во млекото укажува на воспалителен процес во млечната жлезда (маститис).

Начин на изведување

На предметно стакло се нанесуваат 0,01 mL млеко на површина од 1 cm². Подготвениот размас се остава да се исуши на воздух. Потоа се изведуваат следните постапки:

- Обезмастување со ксилол во траење од околу 5 минути.
- Фиксирање со етанол.
- Боење со боја за клетки (смеса од етил алкохол, метиленско сино, фуксин и анилин).
- По боењето, препаратот се прегледува под светлосен микроскоп со имерзионен објектив.
- Се пребројуваат клетките во 30-50 видни полиња, по што се пресметува средниот број клетки во едно видно поле (X).

Прибор, апаратура и реагенси

- предметни стакла
- пипета (за 0,01 mL)
- стаклено стапче (по потреба)
- светлосен микроскоп со имерзионен објектив
- имерзионо масло
- млеко (примерок)
- ксилол (за обезмастување)
- етанол (за фиксирање)
- боја за клетки (смеса од етил алкохол, метиленско сино, фуксин и анилин)

Пресметување

Бројот на соматски клетки во 1 mL млеко се пресметува како производ од:

- факторот на микроскопот,
- средниот број клетки во едно видно поле,
- корекциониот фактор поради нанесената количина млеко.

$$\text{Број клетки / mL} = X \times F \times 100$$

X – среден број клетки во едно видно поле

F – фактор на микроскопот

100 – фактор на корекција, бидејќи за анализата се користи 0,01 mL млеко (1/100 од 1 mL).

11.11 Автоматско определување на соматски клетки со Fossomatic

Во современите лаборатории за контрола на квалитетот на млекото, бројот на соматски клетки најчесто се определува со автоматски апарати, од кои најшироко применуван е Fossomatic. Овој апарат овозможува брзо, прецизно и автоматизирано броење на соматските клетки во млекото.



Слика 34. Апарат Fossomatic за автоматско определување на соматски клетки

Принцип на методот

Методот се заснова на флуоресцентна микроскопија. Во примерокот од млеко се додава флуоресцентна боја што се врзува за ДНК на клетките. Кога обоените клетки ќе поминат низ ласерски зрак, тие емитуваат флуоресцентна светлина.

Овој светлосен сигнал се регистрира со фотоелектричен детектор, кој секој сигнал го претвора во електричен импулс. Секој импулс претставува една соматска клетка, по што апаратот автоматски го пресметува вкупниот број соматски клетки во 1 mL млеко.

Начин на работа

Примерокот од млеко најпрво се хомогенизира, по што автоматски се меша со реагенс што содржи флуоресцентна боја. Потоа примерокот се пропушта низ тенок капиларен канал, каде што клетките поминуваат една по една низ ласерски зрак.

Флуоресцентниот сигнал што го емитуваат клетките се регистрира и се претвора во дигитални податоци, кои апаратот ги обработува и го прикажува резултатот како број соматски клетки во 1 mL млеко.

Предности на методот

Методот со Fossomatic има повеќе предности:

- брза анализа (голем број примероци во кратко време);
- голема точност и повторливост на резултатите;
- автоматска обработка на податоците;
- можност за рутинска анализа на голем број примероци во млекарниците и во лабораториите.

11.12 Калифорнија маститис тест – СМТ, Schalm-ов тест

Калифорнија маститис тестот најчесто се применува во самата фарма и претставува рутинска дијагностичка постапка, која се користи за откривање супклинички инфекции на вимето. Кај клинички видливите воспаленија на вимето, овој тест нема поголемо практично значење.

Со помош на овој тест се открива зголемениот број соматски клетки во млекото, кои претставуваат индикатор за воспаление на млечната жлезда и за нарушување во секрецијата на млекото.

СМТ овозможува приближно определување на бројот на соматски клетки, додека точниот број се определува со автоматски апарати како Fossomatic.

Принцип на тестот

За изведување на тестот се користи маститис реагенс, кој претставува мешавина од алкиларил-сулфонат (детергент) и индикатор бромкрезол пурпур.

Под дејство на реагенсот доаѓа до:

- зголемување на површинската напнатост,
- разградување на мембраната на леукоцитите,
- ослободување на деоксирибонуклеинската киселина (ДНК).

Ослободената ДНК се полимеризира, при што се формира желатинозна маса слична на белка од јајце, како резултат на денатурација на протеините.

Интензитетот на оваа реакција зависи од бројот на соматските клетки (пред сè леукоцити) во млекото.

За да се појави оваа реакција, потребно е присуство на живи леукоцити со функционална ДНК. Поради тоа, реакцијата може да изостане кај млеко што подолго време стоело, оладено млеко, бидејќи овие фактори негативно влијаат врз виталноста на леукоцитите.

Со зголемување на бројот на леукоцити, односно со зголемување на интензитетот на воспалението на вимето, по додавање на маститис реагенсот во млекото брзо се формира желатинозна маса.

Улога на индикаторот

Маститис реагенсот содржи индикаторска боја – бромкрезол пурпур, со која се следи промената на рН-вредноста на млекото како последица на воспалението.

Промената на бојата има следно значење:

- сиво-црвена со траги на сино – рН 6,4–6,8 → здраво виме
- сина (модра) боја – рН $\geq 7,0$ → нарушена секреција на млеко, намалена лактација или крај на лактација
- валкано жолта до жолта боја – рН $\approx 6,2$ → присуство на бактерии со млечно-киселинска ферментација или тешки оштетувања на жлезденото ткиво

Начин на изведување

Тестот се изведува во специјален сад (СМТ-тестатор), кој има четири вдлабнувања, по едно за секоја четвртина на вимето. Од секоја четвртина се измолзува мала количина млеко во соодветното вдлабнување, по што тестаторот се навалува за да се отстрани вишокот и да се изедначи количината на млеко во сите полиња. Во секое вдлабнување остануваат приближно 2 mL млеко, на кои се додаваат 2 mL маститис реагенс. Содржината се меша со лесни кружни движења, а по 1-2 минути се оценува реакцијата врз основа на конзистенцијата на добиената смеса.

Реакција	Опис	Приближен број соматски клетки (1 mL)	Оцена
(-) негативна	смесата останува течна или со тенки нишки	0 – 300.000	вимето е здраво
(+) слабо позитивна	се формираат мали грутки без гел	300.000 – 600.000 (до ~800.000)	латентно (субклиничко) воспаление
(++) позитивна	по неколку секунди се создава згругчување како белка	600.000 – 1.000.000 (до ~2.000.000)	субклиничко воспаление
(+++) јако позитивна	густ желатинозен гел	1.000.000 – 15.000.000	клинички видлив маститис

Табела 5. Интерпретација на резултатите од Калифорнија маститис тест

Ограничувања на тестот

Маститис тестот не се спроведува:

- во првите 10-14 дена по телењето (колострум),
- пред крајот на лактацијата,
- во периодот на засушување.

Во овие периоди е нормално да постои зголемен број леукоцити во млекото, што може да даде лажно позитивни резултати.

Доколку тестот покаже позитивна реакција, потребно е да се земат примероци од млеко од секоја четвртина за бактериолошко испитување.

Понекогаш кај одредени крави може во подолг период да се регистрира зголемен број соматски клетки, а бактериолошкиот наод да биде негативен. Во такви случаи причината најчесто се должи на грешки при молзењето или механичко надразнување на вимето.

Тестот се применува само на свежо измолзено млеко, поединечно од секоја боска и не треба да се изведува на збирно млеко од млекарски канти или ладилни цистерни, бидејќи во тој случај не може да се утврди од која крава (или боска) потекнува позитивната реакција.



Слика 35. Приказ на позитивна проба на млеко во пластични садови

11.13. Whiteside test

Овој тест се заснова на реакцијата на натриум-хидроксидот со нуклеинската киселина од леукоцитите, при што се формира натриумова сол на нуклеинската киселина.

Пробата се изведува на микроскопска плочка со црна позадина, на која се ставаат 5 капки млеко и 2 капки NaOH. Потоа течноста се меша со стаклено стапче на површината на плочката.

Доколку млекото потекнува од здраво виме, течноста останува хомогено заматена. Кај млеко со зголемен број клетки, по неколку секунди се издвојуваат ситни или крупни снегулки во бистра или во заматена течност, додека кај силно позитивни случаи се образува густа слузеста маса.



Слика 36. Лево – негативен резултат (здроаво виме), десно – позитивен резултат (зголемен број клетки)

Оценување на реакцијата:

– (хомогено заматување)

+ (ситни грутчиња во матна течност) – околу 1 милион клетки/mL

++ (покрупни грутчиња во матна течност) – околу 5 милиони клетки/mL

+++ (многу крупни грутчиња и конци во матна течност) – околу 7 милиони клетки/mL

++++ (густа слузеста маса во бистра течност) – околу 10 милиони клетки/mL

11.14 CAMP тест

Цел на тестот

CAMP тестот се користи за идентификација на *Streptococcus agalactiae* (Lancefield група В) и за негова диференцијација од други стрептококи како *Streptococcus pyogenes* (група А) и други не-група В стрептококи што се CAMP негативни. Овој тест има големо значење во ветеринарната микробиологија бидејќи *S. agalactiae* е еден од главните причинители на маститис кај говедата.

Историја на тестот

Литичниот феномен меѓу *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* – кој претставува основа на CAMP тестот – првпат бил забележан при испитување култури од млеко за присуство на хемолитични стрептококи за време на епидемија на шарлах.

Било забележано дека колониите на стрептококи биле опкружени со зона на целосна хемолиза само кога растеле во близина на β -хемолитични колонии на *Staphylococcus aureus*. Подоцнежните истражувања покажале дека ова засилено лизирање на еритроцитите се должи на топлински стабилен, филтрабилен фактор, произведен исклучиво од *Streptococcus agalactiae*.

Другите стрептококи не ја покажувале оваа реакција кога растеле во близина на β -хемолитичен *Staphylococcus aureus*.

Мунх-Петерсен го искористил овој феномен за развивање тест за идентификација на *S. agalactiae*, кој е важен причинител на маститис кај говедата. Подоцна, во 1952 година, Murray го нарекол овој тест CAMP тест, по научниците што ја откриле реакцијата: Christie, Atkins, Munch-Petersen.

Принцип на тестот

β -лизинот (β -хемолизин) произведен од β -хемолитичен *Staphylococcus aureus* делува синергистички со CAMP факторот, екстрацелуларен протеин произведен од *Streptococcus agalactiae*.

Оваа синергистичка реакција доведува до засилена и јасно видлива зона на β -хемолиза во областа помеѓу двете култури.

Резултатот се манифестира како карактеристична зона на хемолиза во форма на „глава од стрела“ (arrowhead), насочена кон линијата на *Staphylococcus aureus*.

Оваа реакција не се јавува кај стрептококи од групите А, С и G, па затоа тие се CAMP негативни.

Подлога за изведување на тестот

CAMP тестот се изведува на овчи крвен агар.

Состав на подлогата:

Trypticase Soy Agar + 5 % sheep blood – обезбедува еритроцити потребни за хемолиза

Ескулин (0,1 %) – гликозид што некои бактерии го хидролизират до глюкоза и ескулетин

Железен цитрат (0,05 %) – реагира со ескулетин и создава темнокафеав или црн талог

Ова овозможува дополнителна диференцијација на стрептококите, бидејќи:

- ескулин позитивни бактерии → темни (кафеави/црни) колонии
- ескулин негативни бактерии → сиво-сини колонии

Постапка (протокол)

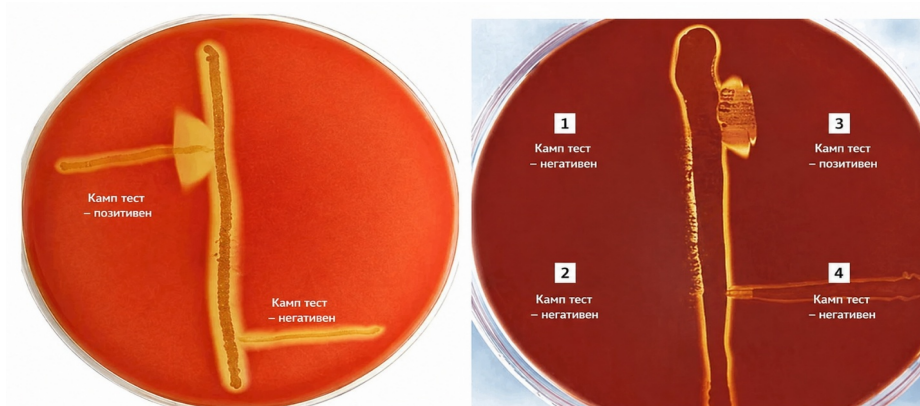
На плоча со овчи крвен агар се прави тесна линија на *Staphylococcus aureus* по средината на плочата.

Испитуваната култура на *Streptococcus* се засејува во права линија под прав агол на линијата на *S. aureus*.

Линијата на стрептококот треба да биде на околу 2 mm од линијата на стафилококот, но да не ја допира.

Плочата се инкубира 24 часа на 35-37 °C во нормална атмосфера.

Интерпретација на резултатите



Слика 37. CAMP тест интерпретација

Позитивен CAMP тест

Се појавува засилена зона на β -хемолиза во форма на глава од стрела, насочена кон линијата на *Staphylococcus aureus*.

Овој резултат е карактеристичен за:

Streptococcus agalactiae (група В)

Негативен CAMP тест

Нема појава на засилена зона на хемолиза.

Овој резултат се јавува кај:

Streptococcus pyogenes (група А)

други не-група В стрептококи

Примена на CAMP тестот

CAMP тестот се користи за идентификација на *Streptococcus agalactiae*, дијагностика на маститис кај говедата, диференцијација на стрептококи во клиничка микробиологија.

12. Контрола на хигиенската исправност на садови за млеко, млекарски уреди, работни површини и воздух во млечната индустрија

Хигиенската исправност во погоните на прехранбената индустрија, како и хигиенската исправност на храната за време на транспортот и дистрибуцијата, има големо технолошко, економско и здравствено значење.

Производните линии, опремата, приборот, работните површини, па дури и амбалажата во прехранбената индустрија често претставуваат отворени или полуотворени системи, во кои е можна контаминација со микроорганизми од околината.

Во оваа микробна популација, покрај сапрофитните микроорганизми, можат да бидат присутни и патогени микроорганизми. Поради тоа е неопходно постојано одржување високо ниво на хигиена во производните погони. Тоа се постигнува со редовно механичко чистење, миење и дезинфекција на опремата, на садовите и на работните површини.

Садовите што се користат за прифаќање и транспорт на млекото, како и целокупната опрема за обработка и преработка на млекото, мора редовно да се мијат и да се дезинфицираат. Ова е особено важно во производството на кисело-млечни производи, бидејќи и најмали количества несакани микроорганизми можат да го нарушат растот и активноста на стартер културите што се користат за ферментација.

За утврдување на присуството на микроорганизми на работните површини, опремата, садовите, амбалажата и во воздухот се применуваат различни микробиолошки методи, како што се:

- метод на брисови од површини
- метод на агар отпечаток (contact plate method)
- метод на експозиција на Петриева плоча за испитување на воздухот
- метод на испирање садови

Со овие методи се врши засевање на примероците на хранливи подлоги, по што се врши броење на израснатите колонии на микроорганизми. На овој начин се оценува степенот на микробиолошка контаминација и ефикасноста на применетите мерки за чистење и дезинфекција во млечната индустрија.

12.1 Микробиолошка контрола на канти за млеко

Подготовка на примерокот

Во канта за млеко се додава стерилна дестилирана или пуферирана вода во количина од 10 % од волуменот на кантата. Кантата се затвора и се превртува неколкупати за да се исперат внатрешните ѕидови и бактериите присутни на површината да преминат во водата за испирање.

Земање на примерокот

Под асептични услови се зема водата од кантата и се пренесува во стерилен Ерленмаеров сад. Микробиолошкиот преглед мора да се изврши во рок од 24 часа од земањето на примерокот.

Засевање на Петриеви плочи

Со стерилна пипета се зема по 1 mL од примерокот и се засева на две Петриеви плочи. Плочите се прелеваат со Plate count agar (неселективен агар) за да се стимулира растот на сите присутни бактерии од примерокот.

Инкубација и броење

Плочите се инкубираат на температура од 30 °C во траење од 72 часа. По инкубацијата, се бројат колониите и се пресметува бројот на микроорганизми во 1 mL од примерокот.

12.2 Микробиолошка контрола на шишиња за млеко

За испитување на хигиенската исправност на шишиња се користат две методи:

- Директно броење колонии во шишињата и
- Испирање на шишињата

12.2.1 Директно броење колонии во шишињата

Начин на работа:

Се зема шише во кое се додаваат 15 mL хранлива подлога (агар). Шишето се поставува хоризонтално и нежно се тркала за да може агарот рамномерно да се распореди по внатрешните сидови и да формира тенок слој.

Важно е температурата на агарот да не надмине 45 °C за да не се уништат микроорганизмите.

Потоа шишињата се затвораат и се ставаат на инкубација 3 дена на 30 °C, што овозможува раст на микроорганизмите и формирање видливи колонии.

По инкубацијата, се брои бројот на колонии на површина од 1 cm². За тоа се користи шаблон (на пример, 1×1 cm) што се поставува на внатрешниот сид на шишето.

Се анализираат најмалку 30 вакви полиња за да се добие репрезентативен резултат. Потоа се пресметува просекот:

$$\text{вкупен број изброени колонии} \div \text{број анализирани полиња} = \text{среден број колонии по 1 cm}^2.$$

Процената и интерпретацијата на резултатите се врши на следниот начин:

Хигиенска оценка

Број колонии по 1 cm²

Многу добро испрани

< 1 колонија

Добро испрани	1 колонија
Средно испрани	2-3 колонии
Недоволно испрани	> 3 колонии

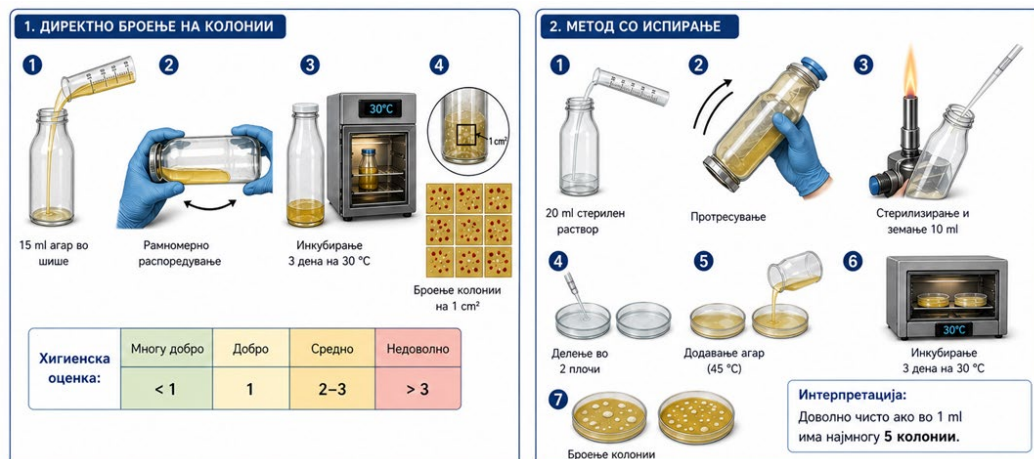
12.2.2 Метод со испирање шишиња

Начин на работа:

1. Во испитуваното шише се истура 20 mL стерилна вода, физиолошки раствор или Рингеров раствор.
2. Шишето се протресува силно за темелно испирање на внатрешните површини.
3. Грлото на шишето се стерилизира со пламеник, а со стерилна пипета се земаат 10 mL од течноста.
4. Примерокот се дели во две Петриеви плочи.
5. Плочите се прелеваат со Plate count agar, оладен на 45 °C, добро се меша и се остава да се зацврсти агарот на собна температура.
6. Плочите се инкубираат 3 дена на температура од 30 °C.
7. По инкубацијата се бројат израснатите колонии. Добиениот број претставува број бактерии во испитуваното шише.

Интерпретација:

- Внатрешната површина на шишето (или на другите садови за млеко) се смета за доволно чиста ако во 1 mL волумен од садот нема повеќе од 5 колонии на микроорганизми.



Слика 38. Микробиолошка контрола на шишиња за млеко

12.3 Испитување микробиолошка контаминација на воздухот

Воздухот во погоните на прехранбената индустрија е потенцијален извор на контаминација на сировините, на полупроизводите и на готовите производи со микроорганизми. Поради тоа е неопходно:

- постојано проветрување на просториите,
- одржување константна температура и релативна влажност,
- користење УВ-ламби.

Овие мерки помагаат да се регулира бројот на микроорганизми во атмосферата и да се спречи дополнителна контаминација на производите.

Метод за испитување

За утврдување присуство на микроорганизми во воздухот и нивниот број, се користат различни методи. Наједноставен метод е:

1. Експозиција на Петриева плоча со одредена стерилна микробиолошка подлога (на пример, обичен агар) во траење од 10 до 15 минути.
2. По завршување на експозицијата, плочата се затвора и се инкубира 3 дена на температура од 30 °C.

Овој метод е едноставен, лесно применлив и економичен. Со него може да се утврди присуство на микроорганизми во воздухот на работните простории.



Слика 39. Испитување микробиолошка контаминација на воздухот

12.4 Микробиолошка контрола со метод на брисови

Во микробиолошката контрола на погоните во прехранбената индустрија значајно место зазема методот на брисови. Со примена на овој метод може да се добие реална слика за хигиенските услови во текот на производниот процес, како и при транспортот и дистрибуцијата на производите.

Брисовите можат да се земаат од различни рамни површини, какви што се:

- машини и опрема,
- работни површини,
- прибор,
- амбалажа,
- рацете на вработените.

Брисовите се земаат од места во погонот што би можеле да претставуваат извор на контаминација на млекото и на млечните производи. За земање брис се користат стапчиња со намотана вата од неапсорбирачки памук. Памукот е намотан на дрвено или на пластично стапче, кое се наоѓа во стерилна, запечатена пластична епрувета.

При земање брисови се користат метални шаблони (рамки) со одредена површина, кои мора да бидат стерилни пред употреба. Пред почетокот на постапката се подготвуваат стерилни чашки со 10 mL стерилен физиолошки раствор или пептонска вода.

Пред земањето на брисот, ватата се потопува во подготвената течност и се остава да се натопи околу 5 секунди. Потоа се притиснува на сидот од чашката за да се исцеди вишокот течност, по што се пристапува кон бришење на испитуваната површина во рамките на шаблонот.

Испитуваната површина се пребришува со умерен притисок 10 пати во секоја насока:

- најпрво хоризонтално,
- потоа вертикално
- и на крај дијагонално.

Истата постапка се повторува и со сув брис.

По земањето на брисот, стапчето со ватата се става во епрувета со стерилен течен медиум (најчесто физиолошки раствор) со точно познат волумен. Епруветата се проматува добро за да се овозможи микроорганизмите од ватата да преминат во течноста.

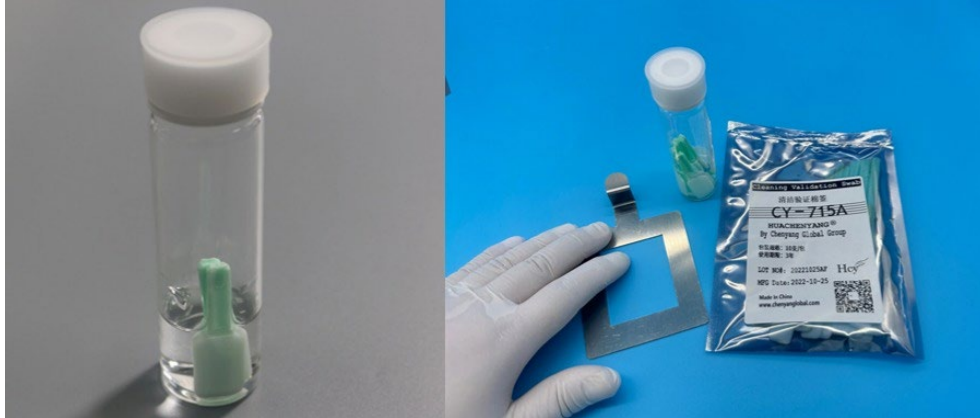
Од ова иницијално разредување се подготвуваат понатамошни сериски разредувања. Од избраното разредување се зема по 1 mL и се засева во две Петриеви плочи, по што се прелева со соодветна хранлива подлога:

- Plate count agar – за определување на вкупниот број аеробни мезофилни бактерии,
- Violet red bile agar – за определување на ентеробактерии.

Плочите се инкубираат под следните услови:

- 37 °C во траење од 24 часа – за ентеробактерии,
- 30 °C во траење од 72 часа (3 дена) – за аеробни мезофилни бактерии.

По инкубацијата се бројат израснатите колонии. Добиениот број колонии се дели со површината од која е земен брисот, со што се добива бројот на микроорганизми на 1 cm² испитувана површина.



Слика 40. Прибор за земање брисови



Слика 41. Земање брис од млекарски сад

12.5 Алтернативни методи за земање површински примероци

Како алтернатива на методот со брисови, за микробиолошка контрола на површини можат да се користат сунѓери и стерилни гази. Покрај нив постојат и други методи за земање површински примероци, какви што се:

- самолепливи ленти
- агар колбаси
- отпечаток плочи

12.6 Метод на земање брисови со сунѓери и гази

Овој метод се користи за микробиолошко испитување поголеми површини, нерамни површини и тешко достапни места каде што контактните методи не се практични.

Начин на работа:

Се користи стерилен сунѓер или стерилна газа навлажнета со стерилен физиолошки раствор, пептонска вода или друг соодветен дилуент. Со сунѓерот или газата се пребришува претходно определена и измерена површина, најчесто 100 cm².

Бришењето се врши хоризонтално, вертикално и дијагонално за да се обезбеди подобро земање на примерокот. По земањето, сунѓерот или газата се ставаат во стерилен сад или кеса со одредена количина разредувач. Примерокот се хомогенизира со рачно мешање или лабораториски хомогенизатор. Потоа се прават соодветни разредувања и се засејуваат на хранливи подлоги.

Инкубација:

- 3 дена на 30 °C – за определување вкупен број аеробни мезофилни микроорганизми
- по потреба и на други температури/подлоги за специфични микроорганизми

Предности:

- погоден за големи и нерамни површини
- овозможува земање примероци од агли, пукнатини и опрема



Слика 42. Метод на земање брисови со сунѓери и газы

12.7 Самолепливи ленти

Адхезивните (самолепливи) ленти се користат за земање површински примерок со притискање на лентата врз определена и претходно измерена површина. По земањето на примерокот, лентата се нанесува на соодветна хранлива подлога.

Подлогата се инкубира 3 дена на температура од 30°C за аеробни мезофилни бактерии или 24 часа на температура од 37°C, по што се утврдува присуството и бројот на микроорганизми.

12.8 Агар колбаси

Овој метод на земање отпечатоци е особено погоден за хигиенска контрола на рамни површини. Хранливата подлога е разлеана во црево изработено од пластичен материјал, во кое подлогата се стерилизира.

За полнење на „агар колбасот“ може да се користат различни хранливи медиуми, во зависност од тоа кои микроорганизми се очекува да се детектираат во примерокот.

Кога подлогата ќе се зацврсти, со стерилен нож се отсекува врвот на цревото, а со откриената површина на агарот се зема отпечаток од испитуваната површина.

Ножот што се користи за сечење на колбасот се стерилизира на пламеник, а помеѓу последователните сечења се потопува во 70 % етил алкохол за да се спречи контаминација.

По земањето на примерокот, со стерилен нож се отсекува дел од агарот со дебелина од околу 1 cm, кој се поставува во Петриева плоча, така што контактната површина е свртена нагоре.

Инкубацијата се врши:

- 3 дена на 30 °C – за определување на вкупниот број аеробни мезофилни микроорганизми
- 24 часа на 37 °C – за определување на ентеробактерии

12.9 Отпечаток плочи

Овој метод претставува модификација на методот со агар во црево. Се состои од стерилни пластични плочи за еднократна употреба, со внатрешно правоаголно вдлабнување со површина од 10 cm², исполнето со агар што формира конвексен менискус.

Земањето на примерокот се врши со притискање на агарната површина врз испитуваната површина. Потоа плочата се поставува во Петриева плоча и се инкубира на соодветни температури за определување на:

- аеробни мезофилни бактерии
- ентеробактерии

Кај внатрешните површини на амбалажата (на пример, тетрапак или пергапак), на површина од 1 cm² не смее да има повеќе од една колонија микроорганизми.

Недостатоци на контактните методи

- не се погодни за земање примероци од нерамни површини
- при присуство на голем број микроорганизми може да дојде до прераснување на колониите, што ја отежнува интерпретацијата на резултатите

12.7 САМОЛЕПЛИВИ ЛЕНТИ

- 1 Притискање на самолеплива лента на површина
- 2 Нанесување на лентата на хранлива подлога
- 3 Инкубирање 3 дена на 30 °C
- 4 Броење на колонии и интерпретација

✓ Утврдување на присуство и број на микроорганизми

12.8 АГАР КОЛБАСИ

- 1 Агар во црево се стерилизира
- 2 Сечење на врвот со стерилан нож
- 3 Земање отисок од површината
- 4 Сечење на парче агар (околу 1 cm)
- 5 Поставување на парчето во Петриева плоча
- 6 Инкубирање

30 °C
3 дена

37 °C
24 часа

• 3 дена на 30 °C – вкупен број на аеробни мезофилни микроорганизми
 • 24 часа на 37 °C – ентеробактерии

12.9 ОТИСОК ПЛОЧИ

- 1 Притискање на агарната плоча врз површината
- 2 Поставување на плочата во Петриева плоча
- 3 Инкубирање на соодветна температура

30 °C
3 дена

37 °C
24 часа

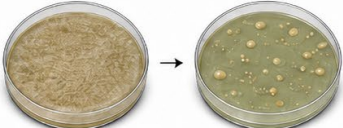
Интерпретација:
 На површина од 1 cm² не смее да има повеќе од 1 колонија.

Недостатоци на контактните методи

✗ Не се погодни за земање примероци од нерамни површини



✗ При присуство на голем број микроорганизми може да дојде до прераснување на колониите, што ја отежнува интерпретацијата на резултатите



Слика 43. Контактни методи за микробиолошка анализа на површини

13. Методи за детекција и докажување присуство на антибиотици

Резидуите претставуваат остатоци од супстанции со фармаколошко или хемиско дејство, нивни метаболити или производи на разградба, кои можат да заостанат во храната од животинско потекло и за кои постои докажан или потенцијален ризик за здравјето на човекот. Во производството на храна од животинско потекло, тие најчесто потекнуваат од употреба на ветеринарни лекови, пестициди, средства за дезинфекција, како и од контаминенти од животната средина. Ветеринарните лекови се применуваат за терапевтски и профилактички цели, а во одредени случаи и како фактори за стимулирање раст. Во групата резидуи не спаѓаат само првично применетите супстанции, туку и нивните метаболити и крајни производи од нивната хемиска и биохемиска разградба во организмот. Овие супстанции можат да се акумулираат во ткивата, во млекото и во другите производи од животинско потекло.

Најзначајни резидуи за хигиената на млекото се ветеринарните лекови, особено антибиотиците, антипаразитите и хормоните, потоа пестицидите како инсектициди, фунгициди и хербициди, дезинфициенсите, тешките метали како кадмиум и олово, како и микотоксините, особено афлатоксините. Присуството на овие резидуи може да предизвика токсични и алергиски реакции, развој на антимикробна резистенција, нарушување на цревната микрофлора, како и други долгорочни штетни ефекти врз здравјето на човекот. Поради тоа, нивната контрола е од суштинско значење за обезбедување на безбедноста на храната и заштита на јавното здравје.

Антибиотиците претставуваат хемотерапевтски средства, кои најчесто се присутни како инхибиторни материи во млекото и имаат негативно влијание врз здравјето на човекот, како и врз технолошките својства и квалитетот на млекото и на млечните производи. Тие можат да го нарушат процесот на ферментација при производство на јогурт, сирење и други млечни производи, бидејќи го инхибираат растот на корисните млечно-киселински бактерии. Во зависност од концентрацијата на антибиотските остатоци, коагулацијата на млекото може да се продолжи и до 3 часа, а во одредени случаи може и целосно да изостане.

Антибиотиците во млекото најчесто доспеваат по нивна примена кај животните преку различни начини на администрација, какви што се парентерална, перорална, интравенска, интрамускулна и интрамамарна апликација. Парентерално внесените антибиотици релативно брзо се излачуваат преку млекото, додека интрамамарно аплицираните се задржуваат подолго време и се излачуваат во повисоки концентрации. Иако резидуите од антибиотици можат да се појават при лекување различни заболувања, тие најчесто се поврзани со третман на маститис (воспаление на млечната жлезда).

Млекото што содржи резидуи од антибиотици не смее да се користи за исхрана на луѓето, туку треба безбедно да се отстрани сè додека не истече пропишаниот период на каренца. Важно е да се нагласи дека антибиотиците не се уништуваат со пастеризација, а при стерилизација можат само делумно да се разградат.

Со цел да се обезбеди високо квалитетно млеко за преработка и истовремено да се заштити здравјето на потрошувачите, Европската Унија има утврдено максимално дозволени концентрации на остатоци од антибиотици во млекото (MRLs – maximum residue limits). Овие вредности се дефинирани врз основа на фармакокинетичките и токсиколошките

својства на лековите и на нивните метаболити, како и врз основа на прифатливиот дневен внес (ADI – acceptable daily intake), при што се гарантира дека нема да настанат штетни последици по здравјето на човекот.

Тестовите за детекција на антибиотски резидуи во млекото и во другите производи од животинско потекло се делат на скрининг и потврдувачки методи. Скрининг тестовите се користат за брзо утврдување на присуството на антибиотици и даваат квалитативен резултат, односно дали примерокот е позитивен или негативен. Во оваа група спаѓаат микробиолошките тестови, кои се засноваат на инхибиција на раст на чувствителни микроорганизми, при што присуството на антибиотици го спречува нивниот развој, како и имунохемиските тестови што се засноваат на специфична реакција помеѓу антиген и антитело. Особено значајни се брзите, односно теренските тестови, кои овозможуваат добивање резултати за неколку минути и можат да се применуваат директно на фарми, откупни места и во млекарници. Овие тестови најчесто се засноваат на имунохемиски принцип (lateral flow тестови) и овозможуваат брза и едноставна процена на присуството на одредени групи антибиотици без потреба од лабораториска опрема. Поради својата практичност, тие се широко користени за првична контрола на квалитетот на млекото, но нивен недостаток е што се специфични за одредени антибиотици и не даваат точна концентрација, па затоа постои можност за лажно позитивни или негативни резултати.

Потврдувачките тестови се користат за прецизна идентификација и квантитативно определување на антибиотите во примерокот. Овие методи се засноваат на напредни аналитички техники, најчесто хроматографски, какви што се високоефикасна течна хроматографија (HPLC) и течна хроматографија спрегната со масена спектрометрија (LC-MS/MS), кои овозможуваат точно определување на видот и на концентрацијата на антибиотикот. Покрај нив, се користат и други методи како тенкослојна хроматографија и спектрометриски техники. Потврдувачките методи се поскапи, бараат специјализирана опрема и стручен кадар, но обезбедуваат висока точност и сигурност на резултатите. Затоа, во практиката најчесто се користи комбинација од скрининг и потврдувачки тестови, при што скрининг методите служат за почетна контрола, а потврдувачките за конечна анализа и потврда на резултатите.

13.1 Брзи теренски методи (скрининг методи)

За брза контрола на антибиотски резидуи директно на терен, на фарми или во млекарници се користат брзи тестови, кои овозможуваат навремена детекција без потреба од сложена лабораториска опрема. Овие методи се особено важни за спречување на внесување контаминирано млеко во преработката и обезбедување квалитет и безбедност на производите.

13.1.1 Латерални-флоу тестови (Strip tests)

Ова се имунохроматографски тестови, слични на тестовите за бременост, кои се засноваат на реакција помеѓу антибиотикот и специфични антитела.

Принцип:

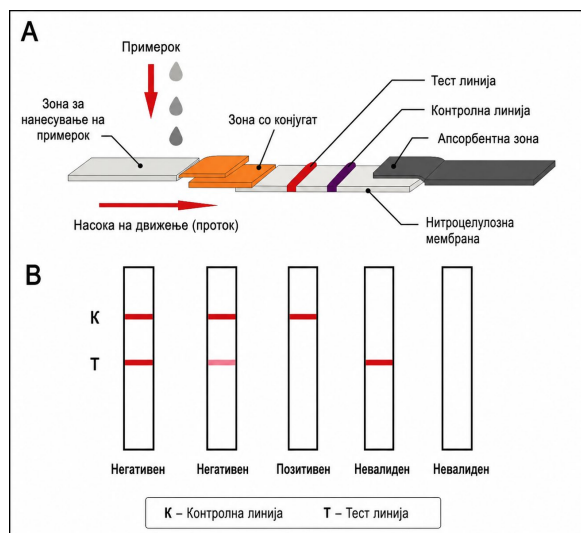
Примерок од млеко се нанесува на тест-лента, каде што евентуално присутниот антибиотик реагира со специфични антитела. Во зависност од концентрацијата, се појавуваат една или повеќе линии што визуелно го прикажуваат резултатот (позитивен или негативен).

Предности:

- многу брз резултат (5-10 минути)
- едноставна и практична употреба
- не е потребна лабораториска опрема
- погодни за теренска примена

Недостатоци:

- даваат полуквантитативни или квалитативни резултати
- помала точност во споредба со лабораториски методи
- најчесто се специфични за одредени групи антибиотици



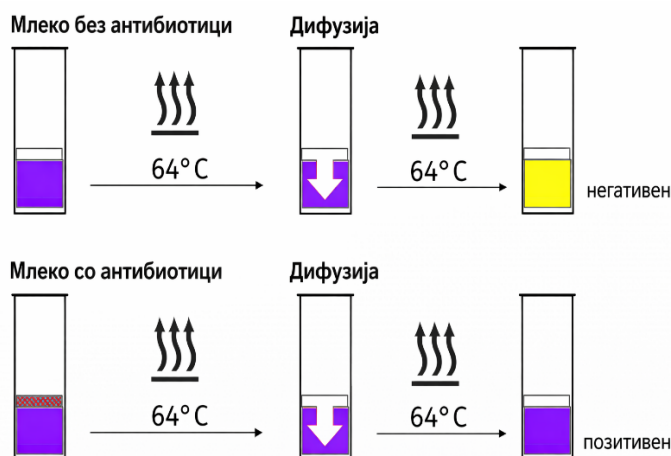
Слика 44. Брзи тестови за антибиотици со приказ на позитивен и негативен примерок

13.2 Микробиолошки тестови

Микробиолошките тестови за детекција на антибиотски резидуи во млекото претставуваат скрининг методи што се засноваат на инхибиција на раст на чувствителни микроорганизми. Тие се широко применувани во рутинската контрола на квалитетот на млекото поради нивната сигурност, едноставност и способност да детектираат широк спектар на антибиотици. Најпознат претставник од оваа група е Delvotest.

Принципот на работа на овие тестови се заснова на присуство на хранлива подлога во која има стандарден број спори од термофилната бактерија *Geobacillus stearothermophilus*, како и pH-индикатор бромкрезол виолетово, кој му дава виолетова боја на медиумот. Хранливата

подлога содржи материи неопходни за раст на бактериите, какви што се јаглехидрати (особено лактоза), аминокиселини, витамини и минерали. По додавање примерок од млеко и инкубација на температура од 64 ± 2 °C, доколку во примерокот нема антибиотски резидуи, бактериите почнуваат да растат и да ги користат достапните хранливи материи. Притоа тие создаваат органски киселини што ја намалуваат рН-вредноста и предизвикуваат промена на бојата на индикаторот од виолетова во жолта, што означува негативен резултат.



Слика 45. Позитивен и негативен резултат на млеко добиен со примена на Delvotest

Доколку во млекото се присутни антибиотици во концентрации еднакви или повисоки од детекцискиот лимит, тие го инхибираат растот на бактериите. Во таков случај не доаѓа до ферментација и создавање киселини, рН-вредноста останува непроменета, а бојата на медиумот останува виолетова, што означува позитивен резултат, односно присуство на антибиотски резидуи.

За правилно функционирање на тестот, потребни се соодветни услови на инкубација. Бидејќи се користат термофилни бактерии, тестот се инкубира на температура од околу 64°C . Млекото има важна улога, бидејќи обезбедува дополнителни хранливи материи, особено лактоза, која бактериите ја користат за раст и метаболизам. Во отсуство на млеко, метаболизмот на бактериите е побавен и може да дојде до различна промена на бојата, но тоа не е резултат на присуство на антибиотски резидуи.



Слика 46. Негативен Delvotest после инкубација

Покрај микробиолошките и брзите имунохемиски тестови, за детекција на антибиотски резидуи во млекото и во другите производи од животинско потекло се применуваат и други современи методи што обезбедуваат поголема специфичност и точност. Една од најважните групи се имуноензимските методи, како ELISA, кои се засноваат на специфична реакција помеѓу антибиотикот и антитело, при што се добива сигнал што може да се мери спектрофотометриски. Овие методи се чувствителни и погодни за анализа на поголем број примероци, но се ограничени на одредени групи антибиотици.

Покрај нив, широко се применуваат и хроматографските методи, како високоефикасна течна хроматографија (HPLC) и течна хроматографија спрегната со масена спектрометрија (LC-MS/MS). Овие методи овозможуваат прецизна идентификација и квантитативно определување на поединечни антибиотици дури и во многу ниски концентрации. Поради нивната висока точност и сигурност, тие се сметаат за референтни методи, но бараат скапа опрема и обучен кадар.

Дополнително, се користат и биосензорни методи што комбинираат биолошки елементи, како ензими или рецептори, со физички сензори за детекција на антибиотиците. Овие методи овозможуваат брза и автоматизирана анализа и се сметаат за перспективни технологии во современата контрола на храната.

Во практиката, најчесто се применува комбинација од различни методи, при што брзите и микробиолошките тестови се користат за скрининг, а имунохемиските и хроматографските методи – за потврда и прецизна анализа на резултатите.

14. Методи за детекција на микотоксини во млеко

Микотоксините се токсични секундарни метаболити продуцирани од мусли од родовите *Aspergillus*, *Penicillium* и *Fusarium*. Најчесто се присутни во пченка, памучно семе, соја и кикирики. Тие имаат значително токсиколошко дејство, вклучувајќи канцерогени, мутагени и имуносупресивни ефекти. Поради тоа, нивното присуство постојано се следи и се контролира во храната.

Во млекото најчесто се среќава афлатоксин М1 (AFM1), кој настанува како метаболит на афлатоксин В1 внесен преку контаминирана добиточна храна. По неговото формирање, афлатоксинот М1 се излачува преку млекото. Овој микотоксин е релативно стабилен при процесите на пастеризација, што претставува дополнителен ризик за безбедноста на храната.

Максимално дозволената концентрација на афлатоксин М1 во млекото изнесува 0.05 µg/kg (50 ng/kg). На пример, крава во лактација која консумира храна што содржи 20 ppb или повеќе афлатоксин В1, може да произведе млеко во кое концентрацијата на афлатоксин М1 ги надминува дозволените граници.

По прекинување на внесот на контаминирана храна, потребни се приближно два-три дена исхрана со безбедна храна за концентрацијата на афлатоксин М1 во млекото да се намали под дозволените граници. Времето потребно за целосно елиминирање на микотоксинот зависи од количеството на внесениот афлатоксин преку храната.

14.1 Брзи теренски методи (скрининг методи)

За брза контрола на микотоксини директно на терен или во млекарници се користат брзи тестови, кои овозможуваат рана детекција без сложена лабораториска опрема.

14.1.1 Латерални-флоу тестови (Strip tests)

Види поглавје 13.1.1

Принцип:

Млекото се нанесува на тест-лента, каде што микотоксинот реагира со специфични антитела и дава видлив резултат (линија). Тест-лентите за микотоксини се засноваат на компетитивен имуноаналитички метод, при што анализот во примерокот (на пример, афлатоксин) конкурира со врзаниот афлатоксин на тест-линијата.

Негативен резултат:

Доколку во примерокот нема афлатоксин, се појавува линија во тест-зоната. Ова укажува на негативен резултат.

Позитивен резултат:

Доколку во примерокот има афлатоксин, се случува конкуренција и при достигнување на граничната (cut-off) концентрација, линијата во тест-зоната исчезнува. Ова укажува на позитивен резултат.

Контролна зона:

Покрај тест-линијата, секогаш се појавува и линија во контролната зона, која потврдува дека тестот е правилно изведен.

Доколку контролната линија не се појави, резултатот се смета за невалиден и тестот треба да се повтори.

Предности:

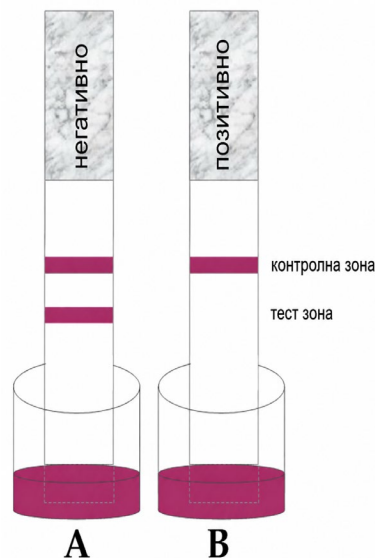
- многу брз резултат (5-10 минути)
- едноставна употреба
- не е потребна лабораторија

Недостатоци:

- полуквантитативни резултати
- помала точност од лабораториските методи



Слика 47. VICAM тест-ленти со латерален проток



Слика 48. Интерпретација на резултати од тест-лента

14.2 ELISA метод за определување на афлатоксин M1 во млеко

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) е имунохемиски метод што широко се користи за детекција и квантитативно определување на микотоксини, особено афлатоксин M1 (AFM1) во млеко и млечни производи. Поради својата чувствителност, едноставност и релативно ниската цена, ELISA методот е особено погоден за рутинска лабораториска контрола и скрининг.

Принцип на методот

Методот се заснова на специфична реакција помеѓу антиген (афлатоксин M1) и антитело.

Кај афлатоксините најчесто се користи компетитивна ELISA, бидејќи микотоксините се мали молекули.

Компетитивен принцип:

1. афлатоксинот од примерокот и означен афлатоксин (со ензим) се натпреваруваат за врзување за ограничен број антитела
2. колку повеќе афлатоксин има во примерокот → толку помалку означен афлатоксин се врзува
3. резултатот е обратнопропорционален на концентрацијата

Постапка

1. Во микротитарска плоча обложена со антитела се додава:
 - примерок од млеко
 - ензимски означен афлатоксин
2. Се врши инкубација за да се овозможи врзување
3. Се измива плочата за да се отстранат неврзаните компоненти
4. Се додава супстрат за ензимот
 - се развива боја
5. Се додава стоп-реагенс
6. Се мери апсорбанцата со спектрофотометар (ELISA читач)

Интерпретација на резултатите

- интензитетот на бојата е обратнопропорционален на концентрацијата на AFM1
- се користи калибрациона крива за пресметка
- резултатите се изразуваат во ng/kg или во µg/kg

Подготовка на примерок

Млекото пред анализа:

- се центрифугира (за отстранување масти)
- понекогаш се разредува
- директно се користи или по дополнително прочистување

Предности

- брз метод (резултати за 1-2 часа)
- висока чувствителност
- едноставна примена
- погоден за анализа на голем број примероци

Недостатоци

- можни лажно позитивни или негативни резултати
- помала специфичност во споредба со HPLC или LC-MS
- потребна е потврда со референтен метод

Примена

ELISA методот се користи за:

- рутинска контрола на млеко во млекарници
- мониторинг на безбедност на храна
- брз скрининг пред лабораториска анализа
-



Слика 49. ELISA кит за афлатоксини

14.3 Имуноафинитетни колони за определување на афлатоксини

Имуноафинитетните колони (IAC – Immunoaffinity Columns) претставуваат високо селективна техника за прочистување и концентрирање на афлатоксини од сложени матрици какви што се млеко, добиточна храна и други прехранбени производи. Тие најчесто се користат како подготвителен чекор пред инструментална анализа (HPLC или LC-MS/MS).

Принцип на методот

Методот се заснова на специфична интеракција антиген – антитело.

Во колоната се наоѓа гел (најчесто агароза или силика) на кој ковалентно се врзани специфични антитела за афлатоксини (на пример, AFM1).

Кога примерокот се пропушта низ колоната:

- афлатоксинот селективно се врзува за антителата
- другите компоненти од матрицата (протеини, масти, шеќери) се испираат

- на крај, афлатоксинот се ослободува (елуира) со органски растворувач

Постапка

1. Подготовка на примерок

- млекото се центрифугира (за отстранување масти)
- се филтрира или се разредува

2. Апликација на примерок

- примерокот се пропушта низ IAC колоната
- афлатоксинот се врзува за антителата

3. Миене

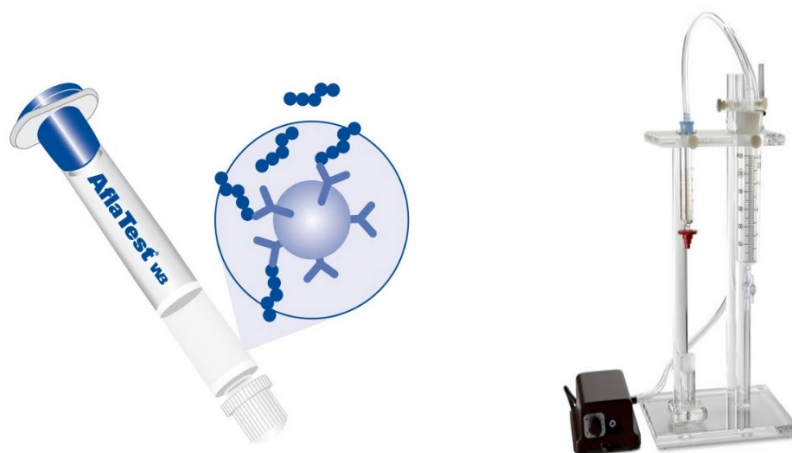
- колоната се мие со вода или пуфер
- се отстрануваат несакани материи

4. Елуција

- се додава органски растворувач (метанол или ацетонитрил)
- афлатоксинот се одвојува од антителата

5. Анализа

- елуатот се анализира со:
 - HPLC
 - LC-MS/MS



Слика 50. Имуноафинитетна колона со моноконални антитела (лево) и апаратура за прочистување на микотоксини (десно)

15. Микробиолошки преглед на млеко и млечни производи

Млекото претставува идеална средина за раст и размножување на микроорганизми, поради што може да биде контаминирано со различни патогени и непатогени видови. Во одредени услови, какви што се заболувања на вимето или контаминација од околината, млекото може да содржи и неспецифични факултативни и патогени микроорганизми. Овие микроорганизми потекнуваат или од самото виме или од надворешната средина, при што нивната застапеност во голема мера зависи од хигиенските и микроклиматските услови за време на молзењето, чувањето и транспортот на сурово млеко, како и од условите при обработката и преработката на млекото.

Опстанокот, размножувањето и активноста на микроорганизмите во млекото и во млечните производи се условени од повеќе фактори. Особено значајни се: иницијалниот број микроорганизми, нивните биолошки својства (способност за раст и размножување, продукција на ензими и токсини, како и отпорност кон условите на средината), како и својствата на самата средина. Покрај тоа, големо влијание имаат и применетите постапки на третман (термички, хемиски, радиолошки) и преработка, како и микроклиматските фактори, кои заедно ја одредуваат микробиолошката стабилност и безбедноста на млекото.

Како контаминенти на суровото млеко најчесто се среќаваат родовите *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Pseudomonas*, како и патогени микроорганизми како *Salmonella*, *Clostridium perfringens* и *Listeria monocytogenes*. Покрај бактериите, од млекото можат да се изолираат и квасци и мувли. Микроорганизмите и нивните метаболити можат да предизвикаат алиментарни инфекции и интоксикации, како и промени во сензорните својства на млекото и на млечните производи. Поради тоа, микробиолошката контрола претставува клучен елемент во обезбедувањето на квалитетот и безбедноста на овие производи.

Зголемувањето на бројот на бактерии во млекото може да биде резултат на присуство на микроорганизми во мамарните канали, на површината на вимето, на површината на приборот за молзење или, пак, на рацете на молзачот. На микробиолошкиот квалитет на млечните производи, пак, влијае хигиената на погонот, на опремата и на приборот за производство (пример сирење), личната хигиена на работниците, распространетоста на микроорганизмите во воздухот, хигиенската исправност на водата и др.

15.1 Одредување на вкупен број микроорганизми

Постојат повеќе методи за одредување на вкупниот број микроорганизми:

Директни

- директно микроскопско броење
- засејување на хранлива подлога

Индириектни

- редуктаза тест (метиленско плаво, резазурин)
- одредување на количина пирувати

15.1.1 Одредување на вкупен број бактерии во млеко со микроскоп

Метод по Breed

Прибор:

- пипета
- предметно стакло
- Breed-ова боја
- микроскоп

Постапка

Со пипета се зема 0,01 mL млеко. Млекото од пипетата се капнува на предметно стакло над квадратот (1x1). Со еза рамномерно се рапределува по целата површина на квадратот. Размаската се остава да се исуши (5-10) минути. Се потопува во боја по Breed неколку секунди. Размазот се суши и се мие со вода. Се одредува факторот на микроскопот. Бактериите според методот на Breed се бојат азурно сино. Површината на видното поле со промер од 205 микрони изнесува приближно $1/3000 \text{ cm}^2$ што значи дека факторот на микроскопот е 300 000 (површината на видното поле е $1/300 \text{ cm}^2$, а количината на млекото е 0,01 mL т.е $3\ 000 \times 100 = 300\ 000$).

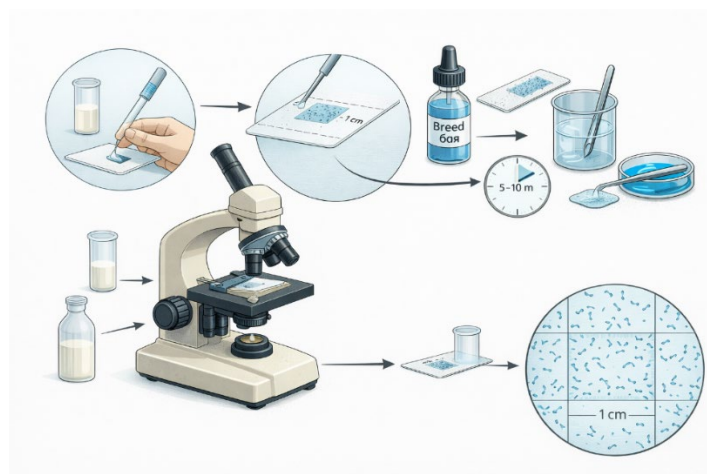
Потребно е да се прегледаат најмалку 10 видни полиња, да се одреди средната вредност на бактериите и тој број да се помножи со факторот на микроскопот. Добиените резултати го даваат бројот на бактерии во 1 mL. Резултите добиени на овој начин не се во корелација со резултатите добиени со броење микроорганизми на хранлива подлога. Разликата е во тоа што со овој метод се одредуваат и мртвите и живите микроорганизми, а со методот на засевање само живите микроорганизми.

Пресметка

$$\text{Број бактерии/mL} = \bar{x} \text{ UB} \times \text{FM}$$

FM - фактор на микроскопот

$\bar{x} \text{ UB}$ – средна вредност на бројот на бактерии во 10 видни полиња



Слика 51. Постапка на боење микроорганизми по Breed

15.2 Одредување на бројот на бактерии со индиректна постапка

Редуктазна проба

Методите за индиректно одредување на бројот на микроорганизми во млекото се засноваат на мерење на биохемиската активност на микроорганизмите, односно на промените во оксидоредукцискиот потенцијал. Со овие методи може да се оцени степенот на бактериско загадување на млекото.

Редуктазниот тест е рутинска лабораториска постапка, која овозможува утврдување на релативниот број бактерии во примерок млеко. Принципот се темели на тоа дека времето потребно за промена на бојата на индикаторот е пропорционално со бројот на живи бактерии во млекото.

Ензимот редуктаза, кој се наоѓа во бактериските клетки, може да редуцира индикаторски бои. Колку е поголем бројот на бактерии, толку е поинтензивна ферментацијата на лактозата, а со тоа и побрза редукцијата на бојата на индикаторот.

За појасна ориентација на степенот на бактериска контаминација, во практика се користат различни индикаторски бои, најчесто метиленско сино или резазурин.

Со овој метод, за релативно кратко време може да се добие приближна оценка на бројот на бактерии во млекото. Предноста на методот е што е брз и ефикасен, но треба да се земат предвид и некои ограничувања:

- Температурата за изведување е 37 °C, која не е оптимална за раст на сите групи микроорганизми.
- Оксидоредукцискиот потенцијал не го менуваат сите микроорганизми.
- Поради тоа, млеко што содржи висок број психрофилна или термофилна микрофлора може да се оцени како поквалитетно од млеко со помал број микроорганизми, што е ограничување на методот.

15.2.1 Редуктазен тест со метиленско сино

Реагенси и прибор

- стерилен раствор на метиленско сино ($C_{16}H_{18}N_3SCl$)
- стерилни епрувети
- стерилни пипети
- метални држачи за епрувети
- саат/часовник
- водена бања ($37\text{ }^{\circ}C$)

Напомена: Светлината го разградува метиленското сино, затоа постапката се изведува при слаба светлина

Постапка

1. Во епрувета се пипетираат 10 mL млеко и се додаваат 0,25 mL метиленско сино. Епруветата се затвора и се протресува за добро мешање.
2. Епруветата се става во водена бања на $37\text{ }^{\circ}C$, се затвора капакот или водената бања се покрива со алуминиумска фолија.
3. Се следи промената на бојата, односно времето потребно за обезбојување на млекото. Набљудувањето треба да трае минимум 2 часа. Доколку млекото се обезбои порано од предвиденото време, тоа е знак за голем број бактерии. За прекумерно загадено млеко, се смета примерокот каде што 4/5 од примерокот се обезбојуваат пред истекот на вториот час.
4. Понекогаш на површината на млекото може да се појави сина боја со висина од 1-2 mm, што е резултат на оксидација со воздухот. Оваа сина боја се занемарува и се гледа само долниот обезбоен дел за оценка на бактериската контаминација.



Слика 52. Редукција на метиленско сино

Време потребно да се изгуби пигментот	Квалитет	Класа	Бактерии/cm ³
>5 ч. и 30 мин.	Добар	I	<500.000
2-5 1/2 ч.	задоволителен	II	500.000 - 4.000.000
20 мин. – 2 ч.	Лош	III	4 - 20.000.000
<20 мин.	многу лош	IV	>20.000.000

Табела 6. Процена на тестот со метиленско плаво

15.2.2 Метод со резазурин

Методот се заснова на редукција на бојата резазурин, при што доаѓа до промена на бојата на растворот. Во текот на реакцијата се појавуваат различни нијанси, кои се споредуваат со компаратор за да се одреди степенот на бактериска контаминација. Резазуринскиот тест е посензитивен од тестот со метиленско сино и појасно го прикажува степенот на бактериска контаминација.

Реагенси и прибор

- 0,01 % раствор на резазурин ($C_{12}H_7NO_4$)
- стерилни епрувети
- стерилни пипети
- метални држачи за епрувети
- водена бања (37 °C)

Постапка

Во стерилна епрувета се додаваат 10 mL млеко, по што се внесува 1 mL 0,01 % раствор на резазурин. Епруветата се затвора и внимателно се протресува за да се измеша содржината, а потоа се поставува во водена бања на 37 °C. Тестот трае 60 минути, при што постепено се забележува промена на бојата од сина, преку розова, до бела, што укажува на степенот на редукција.

Интерпретација на резултатите

Сина боја: нема или минимална редукција → низок степен на бактериско загадување

Розова боја: делумна редукција → умерен степен на бактериско загадување

Бела боја: целосна редукција → висок степен на бактериско загадување

Предноста на методот е што тестот трае пократко од класичниот тест со метиленско сино, а резултатите се добиваат брзо и јасно.



Слика 53. Приказ на редукција на резазурин

Промена на боја на резазурин	Набљудување по	Ориентациски број бактерии во 1 mL	Квалитет на млеко
темносива до пастелно сива	1 час	$<5 \times 10^5$	добар
виолетово-сива	1 час	$5 \times 10^5 - 4 \times 10^6$	среден
виолетово-црвена	1 час	$4 \times 10^6 - 22 \times 10^7$	лош
розеникаво-црвена	20 мин.	$>2 \times 10^7$	многу лош
Бела	10 мин.	$>2 \times 10^7$	екстремно лош

Табела 7. Процена на резултати од тестот со резазурин

15.3 Автоматски метод за определување на вкупниот број микроорганизми во млекото

BactoScan е лабораториски апарат што се користи за брзо и прецизно одредување на бројот на бактерии во млекото и во млечните производи. Тој е современа алтернатива на класичното микроскопско броење бактерии (како стандардниот метод на Plate Count).

Принцип на работа

BactoScan користи флуоресцентна технологија: бактериите во млекото се обоени со флуоресцентни бои што се врзуваат за ДНК или за други клеточни компоненти.

Примерокот од млеко минува низ автоматски читач (flow cytometry принцип), кој ги брои флуоресцентно обоените бактерии.

Резултатот се прикажува како број бактерии по милилитар млеко, обично во логаритамска форма (log CFU/mL).

Предности на BactoScan

Брзина – Резултатот се добива за неколку минути, додека класичниот метод трае од 24 до 48 часа.

Прецизност и доверливост – Автоматското броење го намалува човечкиот фактор на грешка.

Следење на квалитетот на млекото – Овозможува брза контрола на хигиената и на микробиолошката чистота на млекото пред обработка.

Стандарди и усогласеност – Резултатите се во согласност со меѓународните стандарди за контрола на млекото.



Слика 54. Автоматски уред за броење микроорганизми (BactoScan)

16. Ферментирани течни млечни производи

Ферментираните млечни производи се добиваат со преработка на сурово млеко. Во промет се пласираат под различни називи, какви што се: кисело млеко, јогурт, ајран, матеница, кефир, сурутка, павлака, путер, течен путер, казеини, масло или безводна млечна маст (eng. Ghee), сирење, кашкавал, кумис.

Ферментираните течни млечни производи се прехранбени производи добиени со модификација на сурово кравјо, овчо, козјо, биволско, кобилско или магарешко млеко под дејство на специфични микроорганизми. Тие можат да се произведуваат од полномасно, делумно или потполно обезмастено млеко, како и од концентрирано, супституирано млеко или млеко во прав. Млекото може да биде хомогенизирано или нехомогенизирано, пастеризирано или стерилизирано.

Овие производи меѓусебно се разликуваат по вкус и текстура, како и според видот на млекото од кое потекнуваат, а нивната подолга трајност се должи на дејството на специфичните млечнокиселински култури што учествуваат во ферментацијата.

16.1 Органолептичка анализа

Види поглавје 3

16.2 Физичко-хемиски испитувања

16.2.1 Одредување степен на киселост

Реагенси и прибор

види поглавје 5

- дестилирана вода

Постапка

Во Ерленмаеров сад се ставаат 20 g добро измешан јогурт, по што се додаваат 20 mL дестилирана вода за разредување. Со пипета се внесуваат 2 mL фенолфталеин, а смесата добро се промешува. Потоа се врши титрација со постојано мешање, сè до појава на светлорозова боја што останува стабилна околу 30 секунди.

Пресметување

$$\text{Киселост } (^{\circ}\text{SH}) = V(\text{NaOH}) \times 2$$

$V(\text{NaOH})$ – средна вредност на потрошен NaOH од две титрации (mL)

Напомена:

Степенот на киселост не смее да биде повисок од 55 $^{\circ}\text{SH}$

16.2.2 Одредување рН-вредност

Реагенси и прибор

- стандардни раствори за пуфер за калибрација на рН-метар
- дестилирана вода
- рН-метар
- Ерленмаєрова тиквичка или соодветен лабораториски сад
- лабораториска лажица

Постапка

Пред мерењето, рН-метарот се калибрира со соодветни стандардни пуферски раствори, според упатството на производителот.

Со лабораториска лажица се зема репрезентативен примерок од јогуртот и се става во чист и сув сад. Примерокот внимателно се промешува за да се обезбеди негова хомогеност.

рН-електродата се исплакнува со дестилирана вода и внимателно се отстранува вишокот вода. Електродата се потопува директно во хомогенизираниот примерок од јогурт, без додавање вода или други реагенси. По стабилизирањето на отчитувањето, се запишува измерената рН-вредност.

По мерењето, електродата повторно се исплакнува со дестилирана вода и се постапува со неа согласно упатството на производителот.

16.2.3 Одредување на млечна маст по Gerber

Види поглавје 6.1

Реагенси и прибор

- реагенси за одредување на млечна маст во млеко
- 10-процентна амонијева база ($\text{NH}_4 \text{OH}$)
- сулфурна киселина сп. тежина 1,816
- прибор за одредување на млечна маст
- Ерленмаєрова тиквичка (250 mL)
- мензура (100 mL)

Подготовка на примерокот

Јогуртот се разрежува со амонијак на следниот начин: во Ерленмаєрова тиквичка се пренесуваат 90 mL јогурт, по што во мензура се одмеруваат 10 mL 10 % амониумова база и се додаваат во тиквичката. Смесата внимателно се промешува до целосно хомогенизирање.

Постапките се исти како за одредување млечна маст во млекото. Види поглавје 6.1

16.2.4 Одредување на слободна јаглородна киселина (CO₂) во кефирот

Во текот на производството на кефир и кумис, во составот на микробната култура, покрај бактериите на млечна киселина, присутни се и квасци. Поради тоа, во овие производи се одвива млечнокисела и алкохолна ферментација.

Како резултат на овие процеси, покрај млечната киселина, се создаваат и алкохол и јаглород диоксид (CO₂). Создадениот CO₂ реагира со водата и формира јаглородна киселина (H₂CO₃). Оваа киселина може да се одреди со директна титрација со натриум хидроксид (NaOH), во присуство на индикатор фенолфталеин.

Со оваа постапка се определува масената концентрација на CO₂ во кефирот.

Реагенси и прибор

- натриумова база (NaOH; c=0,1 mol/L)
- фенолфталеин
- Ерленмаєрова тиквичка
- градуирани пипети (10 mL, 20 mL)

Постапка

Во Ерленмаєрова тиквичка, со градуирана пипета, се внесуваат 10 mL хомогенизиран примерок од кефир. Потоа, со друга градуирана пипета, сидовите на тиквичката се измиваат со 20 mL дестилирана вода, по што содржината се промешува. Во смесата се додаваат 2-3 капки фенолфталеин и повторно добро се меша. Потоа се врши титрација со постојано мешање сè додека не се појави светлорозова боја што се задржува околу 30 секунди.

Пресметување

Масената концентрација на слободната јаглородна киселина се пресметува според формулата:

$$\gamma = \frac{V_1 \times F \times 2,2}{V_2}$$

γ – масена концентрација на јаглородна киселина (mg/L)

V_1 – среден волумен (mL) на потрошен 0,1 NaOH помеѓу две титрации

V_2 – волумен на земен примерок од кефир во mL во постапката

F – базен фактор на концентрацијата на c(NaOH)= 0,1mol/L

Интерпретација

Уделот на слободна јаглородна киселина во кефирот треба да биде од 650 до 1330 mg/L

16.2.5 Микробиолошко испитување (одредување на *Streptococcus thermophilus* и *Lactococcus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)

Хранливи подлоги и бујони

- пуферирана пептонска вода (Buffered peptone water)
- агар De Man, Rogosa and Sharpe (MRS)
- агар M17 (за *Streptococcus thermophilus*)

Прибор

- стерилни епрувети
- стомахер
- стомахер кеси
- Петриеви плочи
- стерилни пипети (1 mL, 10 mL)
- стерилни пастер пипети
- хокеј стапчиња
- инкубатор (30 °C)

Постапка

Стерилно се одмеруваат 10 g јогурт и се пренесуваат во стомахер кеса, по што се додаваат 90 mL пуферирана пептонска вода. Примерокот се хомогенизира во стомахер, а потоа од основното разрежување се подготвуваат сериски децимални разрежувања до 10^{-6} .

Од разрежувањата 10^{-4} , 10^{-5} и 10^{-6} се засеваат по 0,1 mL на MRS агар и M17 агар. Инокулумот рамномерно се распределува по површината на агарот со стерилно хокеј-стапче. Плочите се инкубираат во анаеробни услови на 30 °C во тек на 72 часа.



Слика 55. Колонии на *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* на MRS агар (лево) и колонии на *Streptococcus thermophilus* на M17 агар (десно)

17. Павлака

Павлаката е млечен производ што претставува концентрат на млечна маст, при што масните капки (масни глобули) се обвиткани и заштитени со природна мембрана. Поради високиот удел на млечна маст, кој се движи од 10 до 48 %, секоја несакана состојка или непријатен вкус присутен во мастите може значително да се изрази. Затоа, за производство на квалитетна павлака е неопходно да се користи хигиенски исправно и органолептички беспрекорно млеко.

Павлаката се произведува со издвојување на млечната маст од кравјо, овчо, козјо или биволско млеко. Во зависност од технолошкиот процес, може да се произведува со употреба на starter култури или без нив.

На пазарот постојат различни видови павлака, кои се класифицираат според:

- уделот на млечна маст,
- начинот на термичка обработка (пастеризирана или стерилизирана павлака),
- според намената на производот.

Според намената, се разликуваат павлака за готвење, павлака за матење, павлака за кафе, кисела павлака и десертна павлака.

Киселата павлака припаѓа во групата ферментирани млечни производи и најчесто содржи 10-20 % или 20-30 % млечна маст. Таа се одликува со мазна структура, сјајна и вискозна текстура, како и со благ до умерено кисел вкус.

Видови павлака според % на млечна маст	Мин. % на млечна маст
Павлака	18
Полумасна павлака	10-18
Полномасна павлака	45
Павлака за матење	28-45

Табела 8. Класификација на павлаката според процентот на млечна маст

17.1 Органолептичка анализа на павлака

Види поглавје 3.

17.2 Тест за пастеризација (пероксидазна проба со бензидин)

Тестот се темели на способноста на пероксидазата да ослободи кислород од водороден пероксид што се додава во млекото. Кислородот реагира со бензидин дихидрохлорид ($C_{12}H_{14}Cl_2N_2$; 4-(4-аминофенил) анилин дихидрохлорид) и мангезиум хлорид произведувајќи сина до синосива боја ако павлаката е термички обработена на недоволно висока температура. Приборот и реагенсите заедно со постапката се исти како во поглавје 8.1

Подготовка на примерокот:

- се меша 20 g павлака со 20 g топла вода
- се остава да се излади
- се одвојува слојот вода што ќе се употребува во понатамошната постапка (pH на водата 6-7)

Интерпретација

Појава на сина до сино-сива боја е доказ за неправилно изведена пастеризација на павлаквата.

17.3 Физичко-хемиско испитување

17.3.1 Докажување на додадено брашно и скроб

Реагенси и прибор

- Луголов раствор или јоден раствор
- епрувети
- пипети

Постапка

- Во епрувета се мешаат 2 g павлака и 2 mL на вода.
- Се проварува мешавината во водена бања 2-3 минути.
- Се остава да се олади и се додаваат неколку капки Луголов раствор или јоден раствор.

Интерпретација

Содржината на епруветата се обојува сино ако во павлаквата се додавани брашно и скроб

17.3.2 Одредување на степенот на киселост на кисела павлака

Реагенси и прибор

- реагенси за одредување на степенот на киселост во млекото (види поглавје 5)
- бирета
- пипета

Постапка:

- да се одмерат 25 g павлака во тиквичка за филтрација
- да се додаде 2 mL фенолталеин
- да се помеша
- да се титрита со 0,25 mol/L раствор на натриумова база додека течноста не добие лесно розова боја што треба да се задржи најмалку 1 минута.

Пресметување

$$\text{Киселост (SH } ^\circ) = V (\text{NaOH}) \times 4$$

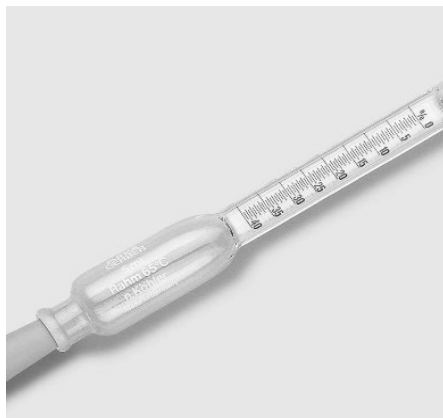
$V (\text{NaOH})$ – е средна вредност на потрошен NaOH од две титрации (mL)

17.3.3 Одредување на млечна маст во павлака со ацидобутирометриски метод

Млечната маст во павлака се одредува со бутирометар за павлака. Може да се одреди и во бутирометар со млеко доколку павлаката се разреди со дестилирана вода (однос 1:5).

Реагенси и прибор

- види во поглавје 6.1
- дестилирана вода
- бутирометар за одредување на млечна маст
- Ерленмаерова тиквичка (250 mL)
- лабораториска лажица
-



Слика 56. Бутирометар за павлака

Подготовка на примерокот

- се загрева со мешање во водена бања на температура од 35 до 40 °C
- се лади на температура од 20 °C

Постапка

Во чист и сув бутирометарот се ставаат 10 mL концентрирана сулфурна киселина и 5 mL подготвен примерок на павлака. Пипетата со која е додадена павлаката се промива во бутирометарот со 5 mL дестилирана вода. Потоа со соодветна пипета се додава амил алкохол. Понатамошната постапка е иста како во поглавје 6.1.

Пресметка

$$\text{Удел на млечна маст (\%)} = \text{горна вредност на отчитување} - \text{долната вредност на отчитување}$$

Напомена:

Уделот на млечна маст во павлаката може да се одредува и со други методи со помош на бутирометар за млеко. Тогаш примерокот од павлака потребно е да се разреди со вода пред анализа (во Ерленмаерова тиквичка да се одмерат 20 g примерок од павлака и да се разредат со 80 mL вода; 1:5; смесата се хомогенизира со загревање на 40 °C и се лади на 20 °C), а самата постапка се изведува исто како за одредување на млечна маст во млеко.

Пресметка

$$\text{Удел на млечна маст во павлака (\%)} = a \times 5 \times 1,030$$

a – удел на млечна маст отчитана на бутирометарот (%)

1,030 – стандардна густина на млеко (g/cm^3) прочитана на калибрираниот бутирометар (бидејќи павлаката е разредена, густината ќе биде $1,000\text{g/cm}^3$ па резултатот прочитан на бутирометарот со множи со 1,030)

5 – заради разредување 1:5

18. Путер

Путерот е млечен производ што се состои од млечна маст (минимум 82 %), вода (околу 16 %) и безмасна сува материја (околу 2 %). Безмасната (безмаслената) сува материја ја сочинуваат белковини (0,6-0,8 %), лактоза (0,7-0,8 %), минерални материи (околу 0,2 %) и други состојки што се присутни во мали количини. Според својата структура, путерот претставува емулзија од вода во маст.

Путерот се произведува со матење павлака (кисела или слатка), со или без додаток на сол, при што се формираат путерни зрна, кои потоа се гмечат за да се добие хомогена маса.

Освен стандардниот путер, денес на пазарот се нудат и варијанти со пониска содржина на млечна маст (39-62 %). Путерот може да се произведува и со додатоци како зачини или други состојки (на пример, ореви или риба), кои му даваат специфичен вкус, како и со дозволени адитиви.

Производите со понизок процент на млечна маст не смеат да се означуваат само како „путер“, туку мора да содржат дополнителен опис, како „лесен путер“, „ $\frac{3}{4}$ путер“, „ $\frac{1}{2}$ путер“ и слично, со цел точно да се прикаже нивниот состав.

Примероците од путер што треба да се анализираат, треба да се држат барем два часа пред анализата на температура од 25 °C. Потоа путерот се меша како би добиле еднолична маса.

18.1 Органолептичка анализа

Види поглавје 3.

18.2 Физичко-хемиска анализа

18.2.1 Одредување на уделот на вода во путерот со метод на испарување (технички метод)

Водата е оној дел од масата на путерот што се губи со негово загревање. Оваа анализа е соодветна за брза поединечна или анализа на повеќе примероци.

Прибор

- аналитичка вага
- алуминиумски сад
- штипка

Постапка:

- да се измерат 10 g на примерок во измерен, оладен и сув алуминиумски сад
- садот да се фати со штипка и да се загрева над пламен со кружни движења и лесно да се меша сè додека растворениот путер не престане да создава меурчиња; путерот треба да е бистар, а седиментот на дното од садот со кафена боја
- да се измери садот откако ќе се олади
- да се пресмета уделот на вода во путерот во проценти според следната формула:

Пресметка

Уделот на вода (%) се пресметува според формулата:

$$w(\text{H}_2\text{O}, \text{примерок}) = \frac{(m_1 - m_2)}{(m_1 - m_0)} \times 100$$

$w(\text{H}_2\text{O}, \text{примерок})$ – удел на вода во примерокот (%)

m_0 – масата на алуминиумскиот сад (g)

m_1 – масата на алуминиумскиот сад со неисушен примерок (g)

m_2 – масата на алуминиумскиот сад со исушениот примерок (g)

18.2.2 Одредување на уделот на вода во путерот со метод на сушење (стандарден метод)

Примерокот помешан со песок се суши на константна маса на температура од 103 до 105 °C.

Прибор:

- аналитичка вага
- порцелански сад, висина околу 2 cm и промер од 6-8 cm
- стаклени стапчиња
- ексикатор
- силиконски песок
- сушница
- штипка

Постапка:

Во садот се одмеруваат околу 12-15 g песок, по што се мери масата на садот заедно со песокот и стакленото стапче. Потоа садот со песокот и стакленото стапче се суши во сушница на температура од 103 до 105 °C во траење од 30 минути.

По сушењето, садот се лади во ексикатор и повторно се мери. Во изладениот сад се додаваат 5 g примерок со температура од 18 до 20 °C, по што содржината внимателно се меша.

Садот со мешавината се суши на температура од 103 до 105 °C во тек на 2 часа. По сушењето, садот повторно се лади во ексикатор и се мери.

Постапката на сушење (30 минути), ладење во ексикатор и мерење се повторува сè додека разликата помеѓу две последователни мерења не биде помала од 0,5 mg.

Пресметка

Уделот на вода (%) се пресметува според формулата:

$$w(\text{H}_2\text{O}, \text{примерок}) = \frac{(m_1 - m_2)}{(m_1 - m_0)} \times 100$$

$w(\text{H}_2\text{O}, \text{примерок})$ – удел на вода во примерокот (%)

m_0 – масата на алуминиумскиот сад (g)

m_1 – масата на алуминиумскиот сад со неисушен примерок (g)

m_2 – масата на алуминиумскиот сад со исушениот примерок (g)

18.3 Одредување на уделот на соли според Mohr

Методот се темели на аргентометриска титрација – NaCl со раствор на сребро (I) нитрат (AgNO_3).

Реагенси и прибор

- врела вода
- заситен раствор на калиум хромат (K_2CrO_4 , индикатор)
- сребро (I) нитрат (AgNO_3); $c = 0,1 \text{ mol/L}$
- калциум карбонат (CaCO_3)
- хомогенизатор
- аналитичка вага
- водена бања
- лабораториска лажица
- Петриева плоча
- одмерителна тиквичка со капак (100 mL)
- Ерленмаерова тиквичка (100 mL со тесно грло и 50 mL)
- филтер-хартија
- одмерителна пипета
- Пастерова пипета

Постапка

Во Ерленмаерова тиквичка се одмеруваат 5 g примерок од путер, по што се додаваат 100 mL врела вода. Содржината се емулгира со интензивно мешање. По ладење на смесата до 50°C , се додаваат 2 mL 5 % раствор на калиум хромат.

Доколку се анализира путер произведен од кисела павлака, дополнително се додаваат 0,1 g калциум карбонат. Потоа содржината се титрира со $0,1 \text{ mol/L}$ раствор на сребро (I) нитрат сè до појава на црвеникаво-кафена боја.

Титрацијата се изведува трипати, а од добиените вредности се пресметува средната вредност на потрошениот 0,1 mol/L раствор на сребро (I) нитрат. Истовремено се подготвува и слепа проба, при што целата постапка се спроведува на ист начин, но без додавање примерок од путер.



Слика 57. Изглед пред титрација со сребро нитрат и по титрација со сребро нитрат

Пресметка:



$$m(\text{NaCl}) = 4 \times c(\text{AgNO}_3) \times V_s \times M(\text{NaCl})$$

$$w(\text{NaCl, примерок}) = \frac{m(\text{NaCl})}{m} \times 100$$

$w(\text{NaCl, примерок})$ – масен удел на NaCl во примерокот (%)

V_s – среден волумен од сите титрации со AgNO_3 (L)

$m(\text{NaCl})$ – маса на NaCl (g)

m – маса на примерокот (g)

18.4 Одредување на млечна маст во путер според Gerber

Реагенси и прибор

- реагенси за одредување на млечна маст
- разредена сулфурна киселина (H_2SO_4 : H_2O -512 mL:388 mL)
- бутирометар за путер
- гумен чеп
- волуметриска пипета
- пипета
- аналитичка вага
- водена бања

Постапка:

Се одмеруваат 5 g од примерокот и се пренесуваат во чашката на бутирометарот заедно со стаклено стапче. Потоа чашката со примерокот внимателно се внесува во волуметрискиот дел на бутирометарот.

Со волуметриска пипета се додаваат 20 mL сулфурна киселина, а потоа и 1 mL амил алкохол преку горниот тесен дел на бутирометарот. Содржината се хомогенизира со внимателно протресување. Доколку е потребно, се додава уште сулфурна киселина до ознаката 70 %.

Бутирометарот се поставува во водена бања на температура од 65 °C во траење од 5 минути.



Слика 58. Бутирометар за путер

Висината на содржината на бутирометарот треба да биде под висината на водата во бањата.

Бутирометарот се центрифугира 5 минути при 1000-1200 вртежи во минута. По центрифугирањето се отчитуваат горниот и долниот менискус, а врз основа на добиените вредности се пресметува процентот на млечна маст.

Пресметка:

Уделот на млечна маст (%) = горна вредност на отчитување – долна вредност на отчитување

19. Сирење

Сирењето претставува свеж или зрел производ добиен со згрутчување на сурово или термички обработено млеко (полномасно, полумасно или обезмастено и реконституирано), павлака, сурутка или нивна комбинација, при што се врши издвојување на сурутката. Според Правилникот 140/10 и 53/11, сирењата се делат на сирења со зреење, сирења со мувли, сирења во саламура, сирења со парено тесто и сирења без зреење.

Според начинот на зреење можат да се поделат на оние што зреат претежно со бактерии во внатрешноста, оние што зреат претежно со бактерии на надворешноста, оние што зреат претежно со мувли во внатрешноста и оние што зреат претежно со мувли на надворешноста.

Во зависност од кое млеко се изработени, сирењата можат да бидат кравји, козји, овчи или мешани. Во производството на сирења се користат: сирило (ферменти за коагулација како химозин или комбинација на химозин со пепсин добиени од желудникот на домашните животни, потоа рекомбинантен химозин или ферменти од бактериско потекло), калиум хлорид (CaCl_2), готварска сол и стартер култури специфични за видот на сирење.

Според видот на белковини, сирењата можат да се поделат на: казеински, албумински и казеинско-албумински, а според начинот на коагулација се делат на: кисели – произведени со помош на млечно-киселински бактерии или киселина – и слатки – произведени со додаток на сирило.

Според количината на млечна маст во сува материја сирењето може да биде:

- Екстра масно сирење ако содржи најмалку 60 % масти во сува материја
- Полномасно сирење ако содржи најмалку 45 % масти во сува материја
- Полумасно сирење ако содржи најмалку 25 % масти во сува материја
- Нискомасно сирење ако содржи најмалку 10 % масти во сува материја
- Обезмастено сирење ако содржи помалку од 10 % масти во сува материја

Според уделот на вода во безмасна сува материја, сирењето може да биде:

- Екстра тврдо сирење што не може да има повеќе од 51 % вода во безмасна сува материја
- тврдо сирење што може да има од 49 до 56 % вода во безмасна сува материја
- полутврдо сирење кое може да има од 54 до 69 % вода во безмасна сува материја
- меки сирења што не можат да имаат повеќе од 67 % вода во безмасна сува материја

Стартер културите за производство на сирење можат да се класифицираат според неколку критериуми:

Според начинот на подготовка: култури на база на млеко или на сурутка.

Според обликот на подготовка: течни, суви, смрзнати или лиофилизирани култури.

Според метаболичките својства и производството на арома: хомоферментативни и хетероферментативни култури.

Според температурата на технолошкиот процес во кој се применуваат: мезофилни и термофилни култури.

Според составот на микроорганизмите: единечни култури (содржат еден сој), сложени култури (содржат различни соеви од ист вид микроорганизми) и комбинирани култури (содржат различни соеви од различни видови микроорганизми).

Основна улога на корисните микроорганизми во сирењето е контролирана ацидификација (ферментација на лактоза до млечна киселина), која пак од друга страна го спречува растот на патогени микроорганизми, а ензимите и метаболитите од starter културата учествуваат во формирање на вкусот, аромата и сензорните својства во текот на зреењето.

Во зависност од видот на сирење, микробните култури можат да се групираат во неколку групи:

- млечно-киселински бактерии, одговорни за производство на млечна киселина, арома и мал дел од нив произведуваат CO₂
- бактерии на пропионска киселина, одговорни за специфична арома и најголем дел од нив произведуваат CO₂
- соеви на *Brevibacterium linens* одговорни за создавање слузавост на површината на сирењето, а влијаат и врз бојата и типичната арома на сирењето;
- благородни мувли што можат да бидат на површина на сирењето (бели мувли) или внатре во сирењето (синозелени мувли) што даваат интензивен вкус и мирис на сирењето.

19.1 Органолептички преглед на сирење

Изгледот на кората (површината) на сирењето: треба да биде хомогена, мазна, сјајна со еднолична боја по целата површина.

Текстура и дополнителен вкус во устата: сирењето треба да е компактно, хомогено, со тврдина својствена за производот, пресекот да му е мазен и правилен, без нерамнини, еднолична боја по целиот пресек, целата маса еднолична, без грутки.

Мирисот: пријатен, ни прејак ни преслаб, карактеристичен по млекото, без туѓи примеси.

Вкус: јасно изразен, карактеристичен за производот, без невообичаени вкусови, умерена арома, умерено солени.

За сè друго види поглавје 3.

19.2 Физичко-хемиски испитувања

Подготовка на примерокот

Тврди и полутврди сирења

- се отстранува кората (1 cm)
- се одвојува потребната количина за испитување
- се ренда, се меле или се сече соодветно сирењето

Меки сирења и топени сирења за мачкање

- примерокот се хомогенизира во аван, а доколку се издвојува течност, таа рамномерно се меша

19.2.1 Одредување на натриум хлорид во сирење според методот на Mohr

Види поглавје 18.3

19.2.2 Одредување степен на киселост на сирење

Реагенси и прибор:

- натриумова база (NaOH); $c = 0,1 \text{ mol /L}$
- 2 % раствор на фенолфталеин ($\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$) во етанол
- дестилирана вода загреана на 50°C
- Ерленмаєрова тиквичка (100 mL)
- бирета
- мензура
- пипета
- аван
- вага

Постапка:

Да се одмерат 5 g од подготвениот примерок на сирење (претходно хомогенизирано во аван со толчник). Се разредува со дестилирана вода загреана на 50°C (најмногу 100 mL). Потоа се пренесува во Ерленмаєрова тиквичка, со пипета се додава 1 mL на фенолфталеин, се меша и се титрира со натриум хидроксид сè додека не добие константна розова боја што мора да се задржи 2 минути.

Пресметка:

$$\text{Киселост } (^{\circ}\text{SH}) = V(\text{NaOH}) \times 8$$

$V(\text{NaOH})$ – средна вредност на потрошениот NaOH од две титрации (mL)

Интерпретација

Киселоста на свежото сирење не смее да е поголема од 90°SH

19.2.3 Одредување на млечна маст во сирењето

Реагенси:

Види поглавје 6.1

Прибор:

- бутирометар за сирење
- гумена тапа
- волуметриска пипета (20 mL)
- пипета
- центрифуга по Gerber
- аналитичка вага
- водена бања

Постапка:

Во бутирометар се ставаат 3 g од подготвениот примерок со помош на стаклено стапче, при што се користи перфорираната чашка и таа се поставува во волуметрискиот дел на бутирометарот. Потоа преку горниот тесен отвор со волуметриска пипета се додаваат 10 mL сулфурна киселина (сп. теж. 1,5220). Бутирометарот внимателно се протресува за да се измеша содржината.

Потоа се става во водена бања на 65 °C, при што нивото на содржината мора да биде под нивото на водата. Повремено бутирометарот се вади и внимателно се протресува за подобро дејство. Кога ќе се изврши разградување на белковините, се додава 1 mL амил алкохол преку горниот отвор.

Потоа се додава сулфурна киселина до ознаката 35 и повторно се меша содржината. Следува центрифугирање на бутирометарот 5 минути при 1000-1200 вртежи во минута.

По тоа, примерокот повторно се става во водена бања и се изведува уште едно центрифугирање. На крај се отчитуваат горниот и долниот менискус на просирниот столб од масти, при што се добива резултатот.

Пресметка:

Удел на млечна маст (%) = горна вредност на отчитување – долна вредност на отчитување

$$\text{Удел на млечна маст во сува материја (\%)} = \frac{\text{удел на млечна маст (\%)} \times 100}{\text{удел на сува материја (\%)}}$$

Удел на сува материја во сирење (%) = 100 – удел на вода (%)

19.2.4 Одредување на вода во сирењето:

Види поглавје 18.2.2

19.3 Одредување на број липолитички бактерии во сирењето

Хранливи подлоги и прибор

- солена пептонска вода
- агар трибутирин
- стерилни епрувети
- стомахер кеси
- Петриеви плочи
- стерилни Пастерови пипети
- инкубатор (30 °C)

Постапка:

Стерилно се земаат 10 g сирење и се ставаат во стомахер кеса, се додаваат 90 mL пептонска вода и се хомогенизираат. Се разредува најчесто до 10^{-6} . 0,1 mL разредување од 10^{-6} , 10^{-5} и 10^{-4} се нанесува на површината на трибутирин агарот во Петриева плоча. Се инкубира аеробно 72 часа на 30 °C.

20. Млеко во прав

Млекото во прав се произведува со сушење на полномасно, полумасно и обезмастено млеко на кое може да се додаде до 0,3 % во однос на нето-маса на готов производ натриум цитрат и натриум ортофосфат како емулгатори. Исклучок кон ова правило се прави доколку се употребува за деца. Според количината на млечна маст, млекото во прав може да биде млеко во прав со висока содржина на млечна маст, полномасно млеко во прав, делумно обезмастено млеко во прав и обезмастено млеко во прав.

Според Правилник 96/2011, млекото во прав мора да ги исполнува следниве услови:

- Да има бела боја со жолтеникава нијанса
- Да има својствен мирис и вкус
- Да има конзистенција на ситен прав, гранули или луспи
- Да содржи најмалку 26 % а најмногу 42 % млечна маст
- Да не содржи повеќе од 5 % вода
- Киселоста на млекото добиено од реконституирано млеко во прав да не е поголема од 8,5 °SH
- Индексот на растворливост на млекото да изнесува 1 mL
- Пробата на алкална фосфатаза на млеко реконституирано од млеко во прав да е негативна
- Да содржи најмалку 34 % на протеини во безмасна сува материја

Млекото во прав се реконституира со вода во сооднос 12,5 : 87,5 (полномасно млеко), 11 : 89 (делумно обезмастено) и 9 : 91 (обезмастено)

20.1 Органолептичка анализа

Види поглавје 3

20.2 Доказ за присуство на фосфатаза

Види поглавје 8.2.1

20.3 Физичко-хемиски испитувања

Подготовка на реконституирано млеко

Реагенси и прибор

- дестилирана вода загреана на 50 °C
- одмерителна тиквичка

Постапка

Се одмеруваат 12,5 g полномасно млеко во прав, односно 9 g обрано млеко во прав, по што примерокот се пренесува во аван. Со додавање мала количина дестилирана вода загреана на 50 °C, внимателно се раствора млекото во прав. Добиениот раствор потоа се пренесува во одмерителна тиквичка од 100 mL. На крај растворот се остава да се олади и се дополнува со дестилирана вода до ознаката од 100 mL.

20.3.1 Одредување на уделот на сува материја во млеко во прав

Уделот на сува материја во млеко во прав се одредува со метод со сушење.

Види поглавје 7.3

Постапка

Во претходно измерен, ладен и сув сад со капак се мерат 2-3 g од примерокот. Потоа примерокот се суши во сушница 6 часа на температура од 87 ± 2 °C. По сушењето, садот со примерокот се лади во ексикатор, а потоа повторно се мери. Постапката на сушење, ладење и мерење се повторува сè додека не се постигне константна маса.

Пресметка

Уделот на сувата материја (%) се пресметува според следнава формула

$$w \text{ (сува материја, примерок)} = \frac{(m_2 - m_0)}{m_1 - m_0} \times 100$$

w (сува материја, примерок) – удел на сува материја во примерок (%)

m_0 – масата на садот со кварцниот песок и капакот (g)

m_1 – масата на садот со песокот и неисушениот примерок со капакот (g)

m_2 – масата на садот со исушениот примерок и капакот (g)

20.3.2 Одредување степен на киселост во млекото во прав (реконституирано млеко)

Степенот на киселост на млекото во прав се опишува како број милилитри 0,25 mol/L натриум хидроксид потребни за титрација на 100 mL растворено млеко во прав со константно одредена вредност за уделот на безмасна сува материја која е 8,8 %.

Реагенси и прибор

Реагенси

(Види поглавје за сирење 19.2.2)

- мензура
- сад за титрација
- бирета
- пипета
- вага
- лабораториска лажица

Постапка:

Во тиквичка се ставаат 20 mL реконституирано млеко во прав, по што се додава 1 mL фенолфталеин како индикатор. Потоа растворот се титрира со натриум хидроксид сè до појава на константна розова боја, што претставува крајна точка на титрацијата.

Пресметка:

$$\text{Киселост (}^{\circ}\text{SH)} = V(\text{NaOH}) \times 2$$

$V(\text{NaOH})$ – средна вредност на потрошен NaOH од две титрации (mL)

20.3.3 Докажување на додадено брашно и скроб во млеко во прав

Реагенси и прибор

- Луголов раствор
- саатно стакло
- лабораториска лажица
- стаклено стапче
- градуирана пипета

Постапка:

На конкавната страна од саатното стакло со лажица се мерат 0,5 g млеко во прав. Потоа примерокот се прелива со Луголов раствор и внимателно се меша со стаклено стапче за да се добие рамномерна смеса.

Интерпретација

Содржината ќе добие сина боја доколку во млекото во прав е додадено брашно или скроб.



Слика 59. Реакција на брашно со Луголов раствор

20.3.4 Одредување на млечна маст во млекото во прав

Уделот на млечна маст може да се одреди директно во млекото во прав или во реконституирано млеко.

Постапка во реконституирано млеко според Gerber

Откако ќе се подготви реконституираното млеко, понатамошната постапка за одредување е иста како во Поглавје 6.1 во сурово млеко

Пресметка

Добиениот резултат се помножува со 8, а кај обезмастено млеко со 11.

20.3.5 Директно одредување на млечна маст во бутирометар за павлака

Реагенси и прибор

Види поглавје 17.3.3 павлака

- дестилирана вода
- бутирометар за павлака со гумен чеп
- аналитичка вага

Постапка

Во бутирометарот со пипета се додаваат 10 mL сулфурна киселина. Потоа внимателно се додаваат 7,5-8 mL дестилирана вода и 1 mL амил алкохол. Се мерат 2,5 g млеко во прав и се пренесуваат во бутирометарот. Бутирометарот се затвора со чеп и внимателно се протресува за целосно растворање на содржината.

Потоа бутирометарот се става во водена бања, при што нивото на содржината во него треба да биде под нивото на водата во бањата. Кога млекото во прав целосно ќе се раствори, бутирометарот се центрифугира 5 минути при 1000-1200 вртежи во минута. На крај се отчитуваат горниот и долниот менискус во горниот дел од бутирометарот.

Пресметка

Уделот на млечна маст (%) = горна вредност на отчитување – долна вредност на отчитување

Напомена:

Добиениот резултат се множи со два бидејќи бутирометрите се градуирани за 5 mL павлака.

20.3.6 Одредување степен на вжегнатост на млеко во прав

Реагенси и раствори

- вода
- ацетон (C_3H_6O)
- N,N-dimetil-*p*-fenilediamin hidrohlorid ($((CH_3)_2NC_6H_4NH_2 \times HCl)$)
- α naftol ($C_{10}H_8O$)
- порцеланска плоча

- пипета

Постапка:

Подготовка на реагенс (во смеса од 1 mL вода и 9 mL ацетон се раствораат 0,02g N,N-dimetil-p-fenilediamin hidrohlorid и 0,1g α naftol).

На порцеланска плоча се ставаат 0,2 g млеко во прав, а во средината се капнува 1 капка од реагенсот.

Интерпретација

Појавата на модра боја упатува на вжегнатост, а интензитетот на таа боја е правопрпорционален со степенот на вжегнатост.

21. Кондензирано млеко

Кондензирано млеко е производ добиен со евапорација односно испарување на дел од водата (околу 60 %) од млекото со вакуум.

Стерилизирано кондензирано млеко се добива со стерилизација во пакување на високи температури или со асептично пакување по стерилизација со ултрависока температура (анг. Ultrahigh temperature sterilization, UHT). Производот може да се пакува во лименки, шишиња или пластични чаши.

Засладеното кондензирано млеко се конзервира со додаток на шеќер. За да се спречи развој на микроорганизми, потребна е концентрација на шеќер во вода од најмалку 63,5 до 64 %. Производот најчесто се пакува во лименки.

И двата производа се произведуваат како полномасно млеко и обезмастено млеко.

Подготовка на примерокот

- за анализа се зема оригинално пакување
- пакуваната лименка пред отворање да се држи во водена бања на 40 °C
-

21.2 Органолептичко тестирање

Види поглавје 3

21.2 Одредување степен на киселост

Реагенси и прибор

Види поглавје за одредување киселост на млеко 5.1.1

Постапка

- се одмеруваат 20 g кондензирано млеко во одмерителна тиквичка
- примерокот се титрира со 0,1 mol/l натриум хидроксид сè додека не се добие светлорозова константна боја

Пресметка

$$\text{Киселост (°SH)} = V (\text{NaOH}) \times 2$$

V (NaOH) – средна вредност на потрошениот натриум хидроксид од две титрации (mL)

21.3 Одредување на млечна маст според Gerber

Подготовка на примерокот

- во одмерителна тиквичка од 100 mL се мерат 30 g кондензирано млеко (со додаден шеќер) или 50 g (без додаток на шеќер)
- со мешање се додава вода до ознаката
- понатамошната постапка е иста како за одредување на млечна маст во млеко според Gerber (види поглавје 6.1)

Пресметка:

Стерилизирано концентрирано млеко – добиениот резултат од скалата на бутирометарот се множи со 2

Засладено концентрирано млеко (или кондензирано млеко)

$$w \text{ (млечна маст, примерок)} = \frac{B}{m} \times 100$$

w (млечна маст, примерок) – удел на млечна маст во примерокот од засладено кондензирано млеко (%)

B – отчитаниот процент на млечна маст во бутирометарот

m – маса на кондензирано млеко

21.4 Одредување на сува материја во кондензирано млеко

Прибор

- види прибор за одредување на вода во путер (стандарден метод, поглавје 18.2.2)

Постапка

- се одмеруваат 25 g на песок во садот
- садот заедно со стакленото стапче и капакот (садот е откlopen) се суши 2 часа на температура од 98 до 100 °C
- по сушењето се лади во ексикатор и се мери садот
- во садот се ставаат 1,5 g ($\pm 0,001$ g) на згуснато млеко
- се додаваат 5 mL дестилирана вода и добро се мешаат
- се сушат во откlopen сад 1,5 час на температура од 103 до 105 °C
- садот да се поклопи и да се олади во ексикатор и потоа да се мери
- повторно се суши 1 час
- наизменично да се повторува сушењето, ладењето и мерењето сè додека разликата помеѓу две наизменични мерења не е помала од 0,5 mg

Пресметување

Удел на сува материја (%) се пресметува според формулата

$$w (\text{сува материја, пример}) = \frac{(m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)} \times 100$$

w (сува материја, примерок) – удел на сува материја во примерок (%)

m_0 – масата на садот со кварцен песок и поклопец (g)

m_1 – масата на садот со песок и неисушен примерок со поклопецот (g)

m_2 – масата на садот со исушениот примерок и поклопецот (g)

22. Сладолед

Сладоледот претставува делумно или потполно замрзнат производ добиен од емулзија на масти и белковини, при што протеините и емулгираните масти се исклучиво од млечно потекло. Се произведува од млеко (пастеризирано или стерилизирано) или од млечни производи како млеко во прав, згуснато млеко, павлака или путер, на кои им се додаваат различни немлечни состојки, со цел да се приспособат вкусот, аромата, бојата, мирисот и конзистенцијата.

Во составот на сладоледот се влегуваат средства за засладување како сахароза, декстроза, фруктоза, гликоза и нивни сирупи, како и ароматични компоненти (ванилин, етил ванилин, какао, чоколада, кафе, овошје) и природни бои. За постигнување стабилна структура се користат средства за емулгирање и стабилизација, како агар-агар, желатин и пектин, како и вода и инкорпориран воздух.

Според Правилникот 96/11 во промет, сладоледот може да се сретне во повеќе форми, и тоа како млечен сладолед, крем сладолед и нискомаслен сладолед.

Крем сладолед треба да ги исполнува следниве стандарди

- да содржи најмалку 8 % млечна маст
- да содржи најмалку 2,5 % млечен протеин
- да содржи најмалку 30 % вкупна сува материја
- да има изедначена боја
- да има својствен, пријатен мирис и освежителен вкус
- да има нежна конзистенција, без грутки и кристали од мраз

Млечен сладолед треба да ги исполнува следниве стандарди

- да содржи најмалку 2,5 % млечна маст
- да содржи најмалку 2,5 % млечен протеин
- да содржи најмалку 26 % вкупна сува материја
- да има изедначена боја
- да има својствен, пријатен мирис и освежителен вкус
- да има нежна конзистенција, без грутки и кристали од мраз

Нискомаслен сладолед треба да ги исполнува следниве стандарди

- да содржи помалку од 2,5 % млечна маст
- да содржи најмалку 2,5 % млечен протеин
- да содржи најмалку 26 % вкупна сува материја
- да има изедначена боја
- да има својствен, пријатен мирис и освежителен вкус
- да има нежна конзистенција, без грутки и кристали од мраз

22.1 Одредување на внатрешна температура на сладолед

Се одредува во текот на технолошката обработка, складирањето, транспортот и сортирањето на производот

Прибор

- термометар што отчитува ниски температури во 0,5 °C
- прибор за мострирање

Постапка

Температурата се мери со термометар што се става во средината на пакувањето откако ќе се земе примерокот за испитување

Во голема картонска амбалажа, која се наоѓа близу сидовите на возилото, температурата се мери со термометар што се става во аголот од кутијата.

Кога се испитува коцка, со прибор за мострирање се прави шуплина и по 3 минути се мери температурата.

Во случај на цилиндар температурата се мери по 5 минути.

22.2 Сензорна анализа

Анализата се прави на температура од -10 до -12°C.

Види поглавје 3.

22.3 Физичко-хемиска анализа

Постапка со примероците – подготовка на сладолед за испитување

Прибор

- водена бања

Постапка

- да се одмрзнат примероците во водена бања на температура од 30 до 35 °C
- примерок за испитување да се земе по темелно мешање и на температура од 20 °C
- ако производот содржи чоколадна глазура, таа треба да се отстрани.

22.3.1 Одредување на вкупна сува материја во сладолед

Постапката е иста како при одредување на вкупна сува материја во кондензирано млеко. Види поглавје 21.4 кондензирано млеко.

22.3.2 Одредување на млечна маст во сладолед според Gerber

Подготовката на примерокот на сладолед за испитување е еднаква со подготовката на павлака. Види поглавје 17.3.3.

Име и презиме	
Група	
Назив на вежбата	ОДРЕДУВАЊЕ НА ГУСТИНА НА МЛЕКО ФАЛСИФИКУВАЊЕ НА МЛЕКО
Датум	
Означување и опис на примерок	
Резултат од испитувањето	
Сензорно испитување -оценка на боја, мирис и конзистенција	
Одредување на удел на млечна маст	
Одредување на густина, g/dm ³	
Фалсификување на млеко -Удел на сува материја % -Удел на безмасна сува материја % -Удел на млечна маст во сува материја % -Удел на додадена вода % -Докажување на скроб	
Мислење	
Потпис на студент	
Потпис на одговорен наставник	

Име и презиме	
Група	
Назив на вежбата	ХИГИЕНА И ТЕХНОЛОГИЈА НА ФЕРМЕНТИРАНИ МЛЕКА
Датум	
Означување и опис на примерок	
Резултат од испитувањето	
Сензорно испитување -оценка на боја, мирис и конзистенција	
Одредување на свежина -Soxhlet-Henkel	
Фалсификување -Додаден скроб	
Микробиолошко испитување -Одредување на број на бактерии <i>Lb.delbruckeii</i>	
Мислење	
Потпис на студент	
Потпис на одговорен наставник	

Име и презиме	
Група	
Назив на вежбата	ХИГИЕНА И ТЕХНОЛОГИЈА НА СИРЕЊЕ
Датум	
Означување и опис на примерок	
Резултат од испитувањето	
Сензорно испитување -оценка на боја, мирис и конзистенција	
Одредување на удел на млечна маст	
Одредување на сол според Mohr	
Мислење	
Потпис на студент	
Потпис на одговорен наставник	

Име и презиме		
Група		
Назив на вежбата	ХИГИЕНА И ТЕХНОЛОГИЈА НА ДРУГИ МЛЕЧНИ ПРОИЗВОДИ	
Датум		
Означување и опис на примерок		
Резултат од испитувањето	ПРИМЕРОК	ПРИМЕРОК
Сензорно испитување		
Одредување степен на киселост		
Фалсификување Додаден скроб		
Микробиолошка анализа - да се избере еден производ (опис на метода)		
Мислење		
Потпис на студент		
Потпис на одговорен наставник		

23. Литература

Закон за безбедност на храната („Службен весник на Република Македонија" број 157/10, 53/11, 1/12, 164/13, 187/13, 43/14, 72/15, 84/15, 129/15, 213/15, 39/16, 64/18 и „Службен весник на РСМ“ бр. 209/2023 година)

Mikulec, Nataša; Zamberlin, Šimun; Horvat Kesić, Iva; Radeljević, Biljana; Kalčićek, Mateja; Plavljanić, Dijana; Špoljarić, Jasminka; Antunac, Neven. (2023). Analize mlijeka i mliječnih proizvoda. Agronomski fakultet Sveuciliste u Zagrebu

Kozačinski, L., Zdolec, N., Cvrtila, Ž., Dobranić, V., Mikuš, T., Kiš, M. (2022). Laboratorijske vježbe iz higijene i tehnologije hrane. Veterinarski fakultet Sveuciliste u Zagrebu

Правилник за барања за квалитетот на суровото млеко, стандардите за квалитет на конзумното млеко, млечните производи и употребата на нивните називи, квалитетот и активноста на starter културите, сирилата и други специфични материи и начинот на нивна употреба, начинот на дополнително означување на млекото и млечните производи како и дозволеното отстапување на тежината во однос на декларираната („Службен весник на РМ“ бр. 96/2011 година)

Правилник за изменување на правилникот за посебните барања за безбедност и хигиена и начинот и постапката на вршење на службените контроли на млекото и млечните производи („Службен весник на РМ“ бр. 197/2016 година)

Правилник за посебните барања за безбедност и хигиена и начинот и постапката на вршење на службените контроли на млекото и млечните производи („Службен весник на РМ“ бр. 26/2012 година)

МКС ISO 19662:2024 Млеко – Определување содржина на масти - Ацидо-бутирометриска метода (метода по Гербер)

МКС ISO 6731:2012 Млеко, павлака и млеко во прав – Определување вкупни суви материи (референтен метод)

ISO 9232:2003 Yogurt- Identification of characteristic microorganisms (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*).

IDF (1972): Determination of salt content of cheese. IDF standard 17A. International dairy federation, Brussels.

Bozanic, R., Jelacic, I., Bilusic, T (2010) Analiza mlijeka i mlijecnih proizvoda. Prirucnik. Udzbenici Sveucilista u Zagrebu, Plejada, Zagreb

Katic, V (2007) Praktikum iz higijene mleka. Univezitet u Beogradu. Fakultet veterinarske medicine. Beograd

Samarzija, D. (2011) Fermentirana mlijeka, vrhnje i maslac. Agronomski fakultet Sveucilista u Zagrebu.

Tratnik, Lj. (1998) Mlijeko, tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Udzbenik Sveucilista u Zagrebu. Hrvatska mlijekarska udruga, Zagreb. "Obis" dd Zagreb.

Milanovic, A., (2006) Mlijeko i proizvodi od mlijeka. Veterinarski fakultet univerziteta u Sarajevu.

Практикум

по Хигиена и технологија на
млеко и млечни производи



Проф. д-р Сандра Мојсова



Издавач:
Факултет за ветеринарна медицина – Скопје,
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје



Рецензенти:

Проф. д-р Павле Секуловски, Факултет за ветеринарна медицина – Скопје, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

Проф. д-р Соња Србиновска, Факултет за земјоделски науки и храна – Скопје, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

Лектор:

Виолета Карацовска- Стојанова

Уредник:

Проф. д-р Сандра Мојсова

CIP – Каталогизација во публикација

.....

.....

Национална и универзитетска библиотека „Св. Климент Охридски“, Скопје

Практикум по Хигиена и технологија на млеко и млечни производи

ISBN 978-9989-774-51-5

COBISS.MK-ID