

OSNOVA PŘEDMĚTU

I. ZÁKLADNÍ ROZBOR MLÉKA I.

1. Stanovení měrné hmotnosti (hustoty)
2. Stanovení obsahu laktózy polarimetricky na polarimetru s kruhovou stupnicí
3. Stanovení obsahu tuku acidobutyrometrickou metodou
4. Výpočet obsahu sušiny, tukuprosté sušiny, tuku v sušině z korigovaných hodnot měrné hmotnosti a tuku

II. ZÁKLADNÍ ROZBOR MLÉKA II.

1. Senzorické hodnocení mléka
2. Stanovení cizích pachů podle Lehmana a Bassetta
3. Stanovení bílkovinného titru (formolová titrace)
4. Rozlišení, zda se jedná o mléko syrové nebo pasterované
5. Stanovení kyselosti mléka

III. PRŮKAZ PORUŠENÍ MLÉKA

1. Stanovení měrné hmotnosti (hustoty)
2. Stanovení obsahu tuku acidobutyrometrickou metodou
3. Informativní stanovení kyselosti mléka
4. Stanovení titrační kyselosti mléka
5. Dokladná zkouška na přítomnost dusičnanů
6. Výpočet obsahu sušiny, tukuprosté sušiny, tuku v sušině z korigovaných hodnot měrné hmotnosti a tuku
7. Porušení mléka

IV. DŮKAZ CIZORODÝCH A INHIBIČNÍCH LÁTEK V MLÉCE A KONTROLA KONCENTRACE ROZTOKŮ POUŽÍVANÝCH K SANITACI

1. Kysací schopnost mléka
2. Důkaz přídatku konzervačních látek
 - a) Důkaz přídatku peroxidu vodíku – zkouška s p-fenylendiaminem
 - b) Důkaz přítomnosti dichromanů – zkouška s dusičnanem stříbrným
3. Důkaz neutralizace mléka alkalicky reagujícími látkami – zkouška s bromthymolovou modří
4. Důkaz přítomnosti dezinfekčních prostředků – průkaz chlorovaných dezinfekčních prostředků
5. Ověření koncentrace dezinfekčních prostředků kyselých a zásaditých

V. HODNOCENÍ KVALITY SYROVÉHO MLÉKA

1. Stanovení aktivity amylázy
2. Stanovení obsahu laktózy polarimetricky na polarimetru s kruhovou stupnicí
3. Stanovení obsahu chloridů
4. Výpočet chlor-cukrového čísla
5. Informativní zjištění počtu somatických buněk v mléce N-testem, NK-testem
6. Zkouška kyselosti varem
7. Důkaz přítomnosti kozího mléka

VI. STANOVENÍ MIKROBIOLOGICKÉ KVALITY MLÉKA A POČTU SOMATICKÝCH BUNĚK

1. Orientační stanovení somatických buněk Wisconsin mastitis testem
2. Orientační stanovení somatických buněk N-testem
3. Stanovení somatických buněk v mléce přímým počítáním pod mikroskopem
4. Stanovení počtu mikroorganismů v mléce přímým počítáním pod mikroskopem
5. Stanovení mikrobiologické kvality mléka resazurinovým testem
6. Stanovení mikrobiologické kvality mléka reduktázovou zkouškou

I.

ZÁKLADNÍ ROZBOR MLÉKA I.

1. Stanovení měrné hmotnosti (hustoty)
 2. Stanovení obsahu laktózy polarimetricky na polarimetru s kruhovou stupnicí
 3. Stanovení obsahu tuku acidobutyrometrickou metodou
 4. Výpočet obsahu sušiny, tukuprosté sušiny, tuku v sušině z korigovaných hodnot měrné hmotnosti a tuku
-

1. STANOVENÍ MĚRNÉ HMOTNOSTI (HUSTOTY)

a) Teoretický úvod

Hustota mléka je důležitým kontrolním faktorem, v praxi běžně stanovovaným. Podstatně závisí na chemickém složení mléka. Hustota kravského mléka se obvykle pohybuje v rozmezí 1,026 - 1,036 g·cm⁻³. Z obsahových složek ovlivňuje hustotu mléka především tukový podíl. Na bázi hustoty a obsahu tuku lze vypočítat sušinu mléka. Slouží jako nepřímý ukazatel přidání vody do mléka, a tím ke kontrole falšování mléka vodou. Např. přidáním vody v množství 10 % dojde ke snížení hustoty mléka o 0,003 g·cm⁻³.

Změny specifické hmotnosti mléka (hustoty) může způsobit řada dalších faktorů, ovlivňujících složení mléka – zhoršený zdravotní stav dojníc, zejména mastitidy, dietetické a metabolické poruchy, stádium laktace atp.

b) Princip úlohy

Pro účely měření hustoty mléka byly zkonstruovány speciální mléčné hustoměry, nazývané **mlékoměry** nebo též **laktodenzimetry**. Hustota mléka se vyjadřuje se v tzv. **mléčných stupních** (stupně laktodenzimetrické nebo °L₂₀), odpovídajících počtu tisícín, o které je hustota mléka vyšší než hustota vody.

Pokud např. hodnota na mlékoměru vystoupá na 30 °L, naměřená hustota mléka činí 1,030 g·cm⁻³.

Hustota mléka je ovlivněna jeho složením a teplotou, kdy s rostoucí teplotou hustota mléka klesá. Nejvyšší hustotu má kravské mléko při teplotě -3 °C. Sterilizace, pasteurace ani homogenizace nemají na hustotu mléka vliv.

Mlékoměry jsou cejchovány pro teplotu 20 °C (proto °L₂₀). **Korekce na 1 °C** pod nebo nad danou teplotu činí **±0,2 °L** (viz **Tab. 1**).

c) Postup práce

- Vzorek mléka vytemperujte ve vodní lázni na 35 – 40 °C (po dobu 3 až 5 minut) – odstranění vzduchových bublin, převedení tuku do roztaveného stavu. (Převedení tuku do rovnovážného roztaveného stavu je nutné, poněvadž různý stupeň tuhnutí mléčného tuku ovlivňuje zjištěnou hodnotu měrné hmotnosti mléka.) – ***již bylo uděláno***
- Rychle zchlad'te na 20 °C. (Během ohřívání a chlazení mléko udržujte v mírném pohybu, avšak nesmí pěnit.) – ***již bylo uděláno***
- Opatrně převed'te vzorek do odměrného válce (nalévejte po stěnách, aby nepěnilo).
- Válec naplňte tak, aby po vnoření hustoměru malá část mléka přetekla přes okraj do podstavné misky. (Tímto se odplaví nečistoty, které snižují povrchové napětí mléka a snižují meniskus na stonku mlékoměru, což ovlivňuje chybu výsledku.)
- Opatrně ponořte hustoměr do mléka, po vyrovnaní teploty mezi mlékem a hustoměrem odečt'ete hodnotu měrné hmotnosti ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) na stupnici hustoměru (horní okraj menisku) a současně odečt'ete i teplotu mléka na teploměru. POZOR! Při ponořování hustoměru je potřeba postupovat opatrně tak, aby se jeho stonek smočil max. 10 mm nad předpokládanou hodnotou.
- Jestliže teplota mléka nebude při měření dosahovat přesně 20 °C, je nutné provedení korekce měrné hmotnosti na teplotu podle tabulky 1.

d) Zpracování výsledků

Ze zjištěné hodnoty měrné hmotnosti vypočtete stupně laktodenzimetrické °L dle vztahu (1).

$$^{\circ}\text{L} = (\rho_{20} - 1) \cdot 1000 \quad (1)$$

kde ρ_{20}hustota odečtená na hustoměru [$\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$]

Proběhlo-li měření při jiné teplotě než 20 °C (nejvýše však v rozmezí 15–25 °C), stanoví se korekce hustoty na teplotu dle **Tab. 1.** – vyhledáte průsečík vypočtené hodnoty °L a aktuální teploty a hodnotu °L upravíte o daný koeficient.

Tab. 1: Korekce na hustotu plnotučného mléka při normální teplotě 20 °C (KNĚŽ)

Hustota mléka [°L]	Teplota mléka [°C]													
	15	16	17	18	18,5	19	19,5	20,5	21	21,5	22	23	24	25
	tyto hodnoty se odečítají (-)							tyto hodnoty se připočítají (+)						
15	1,0	0,9	0,7	0,5	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3	0,4	0,5	0,8	1,1	1,4
16	1,0	0,9	0,7	0,5	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3	0,4	0,5	0,8	1,1	1,4
17	1,1	0,9	0,7	0,5	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6	0,9	1,2	1,5
18	1,1	0,9	0,7	0,5	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6	0,9	1,2	1,5
19	1,1	0,9	0,7	0,5	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6	0,9	1,2	1,5
20	1,1	0,9	0,7	0,5	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6	0,9	1,2	1,5
21	1,1	0,9	0,7	0,5	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6	0,9	1,2	1,5
22	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,3	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,9	1,2	1,6
23	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,6	0,9	1,3	1,6
24	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,6	0,9	1,3	1,6
25	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,6	1,0	1,3	1,6
26	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,6	1,0	1,3	1,7
27	1,3	1,1	0,8	0,6	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,7	1,0	1,4	1,7
28	1,3	1,1	0,9	0,6	0,5	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,7	1,0	1,4	1,7
29	1,3	1,1	0,9	0,6	0,5	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,7	1,0	1,4	1,8
30	1,3	1,1	0,9	0,6	0,5	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,7	1,1	1,4	1,8
31	1,3	1,1	0,9	0,6	0,5	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,7	1,1	1,4	1,8
32	1,4	1,2	0,9	0,6	0,5	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,7	1,1	1,5	1,8
33	1,4	1,2	0,9	0,7	0,5	0,4	0,2	0,2	0,4	0,5	0,7	1,1	1,5	1,9
34	1,4	1,2	0,9	0,7	0,5	0,4	0,2	0,2	0,4	0,6	0,7	1,1	1,5	1,9
35	1,4	1,2	1,0	0,7	0,5	0,4	0,2	0,2	0,4	0,6	0,7	1,1	1,5	1,9

Příklad výpočtu a korekce:

- měrná hmotnost mléka změřená hustoměrem je $\rho = 1,0300 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ při teplotě 18 °C
- přepočet na stupně laktodenzimetrické $^{\circ}L_t = 1000 \cdot (1,0300 - 1,000) = 30,0$
- korekce na teplotu 20 °C – v tabulce (**Tab. 1**) vyhledáme průsečík $^{\circ}L_{20} = 30,0$ a 18 °C = 0,6 (jedná se o teplotu pod 20 °C, proto odečítáme)
- výsledná hustota je potom $^{\circ}L_{20} = 30,0 - 0,6 = 29,4$
- vypočítanou hodnotu $^{\circ}L_{20}$ použijeme pro další výpočty – obsah sušiny, sušiny tukuprosté

e) Vyhodnocení

Podle výsledné hodnoty $^{\circ}L$ určete, zda se jedná o mléko plnotučné, odstředěné nebo narušené přidávkem vody. S ohledem na množství tuku kolísá měrná hmotnost u vybraných typů mléka v následujícím rozmezí:

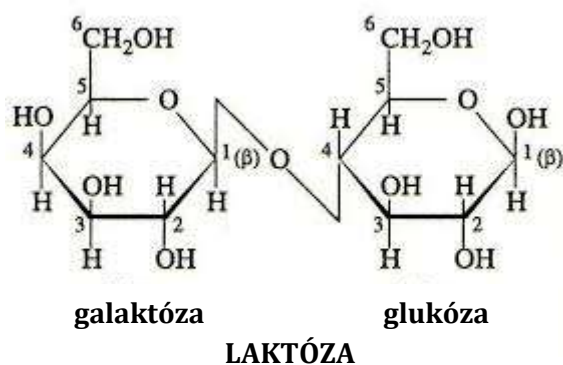
- | | | |
|--|--|--------------------------------|
| → mléko odstředěné (pod 0,3 % tuku) | nad $1,0325 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ | ($^{\circ}L_{20} > 32,5$) |
| → plnotučné mléko (nad 3,5 % tuku) | $1,028 - 1,032 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ | ($^{\circ}L_{20} = 28 - 32$) |
| → mléko porušené vodou | do $1,0275 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ | ($^{\circ}L_{20} < 27,5$) |

2. STANOVENÍ OBSAHU LAKTÓZY POLARIMETRICKY NA POLARIMETRU S KRUHOVOU STUPNICÍ

a) Teoretický úvod

Laktóza je redukující disacharid, označovaný jako mléčný cukr, složený ze dvou monosacharidů – **D-glukózy** a **D-galaktózy**, spojených β -(1 \rightarrow 4) glykosidickou vazbou (vzniká 4-O- β -D-galaktosyl- β -D-glukopyranóza; viz **Obr. 1**). To, že se jedná o redukující cukr, znamená, že při tepelném ošetření reaguje s volnými aminoskupinami bílkovin za vzniku Maillardových reakcí, jejichž produkty způsobují změnu chuti a hnědnutí sterilovaného mléka.

Obsah laktózy tvoří podle druhu mléka 2–8 %, v kravském mléce je to 4,5 – 5,0 % a je ovlivněn zejména plemenem, stadiem a pořadím laktace, dojivostí, zdravotním stavem mléčné žlázy krav.



Obr. 1: Strukturní vzorec laktózy

b) Princip úlohy

Polarimetrická metoda se využívá k rychlému stanovení laktózy v mléce, je založena na měření optické otáčivosti laktózy ve vzorku mléka po jeho vyčerení (vysrážení nežádoucích látek – nesacharidové opticky aktivní látky – bílkoviny, aminokyseliny, odstranění zákalu). Stupeň stáčení roviny polarizovatelného světla je úměrný koncentraci laktózy v roztoku. Vyjadřuje se jako množství **monohydrátu laktózy v g·(100 g)⁻¹ mléka**.

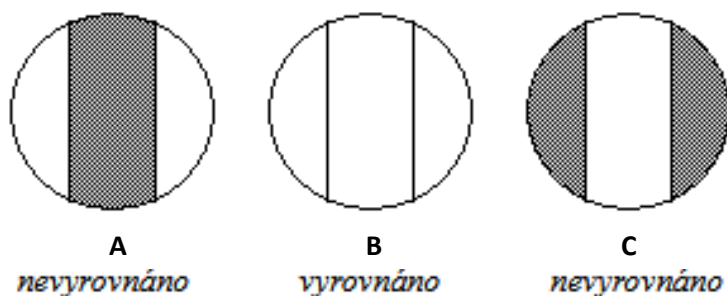
Vztažení k monohydrátu α -laktózy se používá proto, že se jedná o nejstabilnější formu laktózy. Je důležité brát do úvahy, že laktóza vykazuje tzv. mutarotaci, což je jev, kdy ve vodném roztoku monosacharidů dochází ke štěpení poloacetalové vazby a molekula sacharidu se mění na lineární. Tato lineární molekula přechází na jiné anomery (formy heterocyklických sacharidů). Důsledkem toho pak je, že laktóza se vyskytuje ve dvou optických izomerech (anomerech), označovaných jako **α -** a **β -laktóza**, které se liší svou rozpustností. V mléce jsou obě formy v rovnováze, ale jejich poměr se mění v závislosti na teplotě (při nižších teplotách je pomalejší). Proto je nutné měření provádět **při konstantní teplotě (20 °C)**.



Obr. 2: Kruhový polarimetr

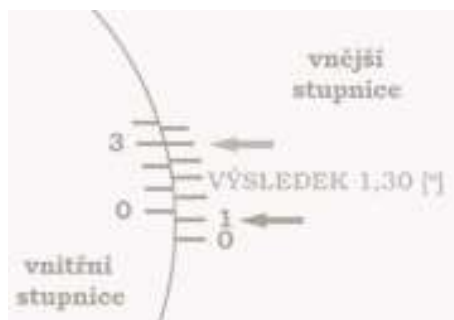
c) Postup práce

- Do 100ml odměrné baňky na navažte 50 g mléka – do odměrného válce nalejte 50 ml mléka, odměrnou baňku postavte na váhy, vytárujte na nulu, sundejte z vah a nalejte 50 ml mléka do baňky bez pomoci nálevky, postavte zpět na váhy a запиšte hmotnost.
- Přidejte 5 ml roztoku $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3 H_2O$ (Carrezovo činidlo I) a promíchejte krouživým pohybem až tekutina zhoustne.
- Přidejte 5 ml roztoku $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ (Carrezovo činidlo II) a opět důkladně promíchejte.
- Doplněte destilovanou vodou po rysku a převrácením důkladně promíchejte, nechte stát (alespoň 5 minut).
- Zfiltrujte přes suchý skládaný filtrační papír do suché Erlenmayerovy baňky s rovným dnem, první podíl filtrátu vylijte. (Filtrát musí být zcela čirý, proto se jeho první podíly vylévají. V opačném případě by bylo nutno provést příslušné kroky čerení znova.)
- Odměrnou baňku, Erlenmayerovu baňku a nálevku neoplachujte.
- Čirým filtrátem opatrně naplňte polarimetrickou trubici o délce 200 mm (nesmí se vyskytovat žádná bublina a obě sklíčka, kterými prochází světlo, musí zůstat čistá a suchá) a odečtěte úhel otočení při 20 °C.
 - sledujte kruhové pole v okuláru
 - otáčením nastavovacím kotoučem (viz **Obr. 2** – ovladač) upravte pole do polohy B, podle obrázku **Obr. 3** (Musí být nalezena taková poloha, aby všechny 3 části zorného pole byly stejně žlutavě osvětlené, bez náznaku pruhu.)
 - na stupnici odečtete úhel otočení α



Obr. 3: Detail třídičného zorného pole polarimetru během měření

- Stupnice polarimetru je tvořená vnější a vnitřní částí (viz **Obr. 4**). Hodnota "0" stupnice vnitřní ukazuje **jednotky stupňů** – ty se odečítají **na stupnici vnější**. Stupeň vnitřní stupnice, který je přesně proti stupni stupnice vnější, pak vyjadřuje **desetiny či setiny stupně**, a ty se odečítají **na stupnici vnitřní**.



Obr. 4: Stupnice polarimetru (odečtená hodnota na této ukázce je 1,30°)

d) Zpracování výsledků a vyhodnocení

- **Obsah laktózy** monohydrátu **L** v % (w/w) se vypočítá ze vztahu:

$$L = \frac{0,9518 \cdot \alpha \cdot 100 \cdot F}{m} [\%]$$

(2)

- kde
- m navážka vzorku mléka [g]
 - α odečet na kruhovém polarimetru [°]
 - F faktor pro objemovou korekci na sraženinu vzniklou vyčeřením, při navážce 50 g mléka
 - pro plnotučné mléko 0,954
 - pro polotučné mléko 0,965
 - pro odstředěné mléko 0,976
 - pro syrovátku 0,993

Pozn.

V případě bezvodé laktózy by se do vzorce (2) dosadil koeficient 0,3134.

e) Vyhodnocení

Obsah laktózy v mléce zdravých a dobře krmených krav dosahuje hodnot 4,5 – 5 %.

3. STANOVENÍ OBSAHU TUKU ACIDOBUTYROMETRICKOU METODOU (PROVOZNÍ METODA)

a) Teoretický úvod

Mléčný tuk je přítomen ve formě emulze v tzv. mléčné plazmě. Je dispergován ve formě tukových kuliček, kdy nepolární triacylglyceroly jsou obklopeny vrstvou povrchově aktivních látek, především fosfolipidů a membránových lipoproteinů. Mléčný tuk má nižší měrnou hmotnost než mléčná plazma ($0,9160 \text{ g.cm}^{-3}$ vs. $1,0333 \text{ g.cm}^{-3}$, při 20°C) – při stání mléka tak dochází k samovolnému vyvstávání tuku, čehož se využívá při odtučnění mléka a získávání smetany odstředováním.

Mléčný tuk je tvořen převážně nasycenými mastnými kyselinami (60–70 %), zbytek tvoří nenasycené mastné kyseliny. Důsledkem tohoto poměrně širokého spektra mastných kyselin s odlišnými fyzikálními vlastnostmi je i široké rozmezí teploty tuhnutí ($19\text{--}26^\circ\text{C}$) a tání ($28\text{--}35^\circ\text{C}$) mléčného tuku, který je tedy tvořen směsí tuhého a tekutého podílu. Spektrum nenasycených mastných kyselin s nižším bodem tuhnutí se v průběhu roku mění v závislosti na krmení dojníc – s minimem v zimních a maximem v letních měsících. Ve srovnání s jinými tuky vykazuje stabilnější polymorfismus ve směsných krystalech triacylglycerolů, proto také podíl tuhého tuku a teplota tání navíc závisí významně na rychlosti chlazení.

Mléčný tuk obsahuje narozdíl od jiných živočišných tuků i nasycené mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které jsou dobře stravitelné. Obsahuje také nepatrné množství trans-mastných kyselin, které vznikají působením mikroorganismů v zažívacím traktu dojníc. Mléčný tuk snadno podléhá autooxidaci za vzniku chuťových vad (lojovitá, kovová, rybí aj.). Obsah, složení a vlastnosti mléčného tuku ovlivňuje zejména výživa dojníc, jejich zdravotní stav, plemeno, stadium laktace aj.

Obsah mléčného tuku v neupraveném mléce činí v průměru kolem 3,8 – 4 %. Jedná se o podíl tuku, který se oddělí v butyrometru po rozpuštění fosfolipidové membrány tukových kuliček (tzv. globulí) působením kyseliny sírové (dle Gerbera, 90–91 %) za podmínek metody.

b) Princip úlohy

Metoda butyrometrická je vhodná jako orientační. Působením kyseliny sírové se rozruší bílkoviny, hlavně obaly tukových kuliček mléka, takže se tuk kvantitativně uvolní a následně oddělí odstředěním. Přídavkem amylalkoholu se dosáhne ostrého rozhraní. Odečte se objem tuku na stupnici butyrometru. Odečtený obsah tuku v g na 100 ml mléka je nutno přepočítat na obsah tuku v g na 100 g mléka podle vztahu (3).

Metoda je vhodná pro mléko; pro stanovení tuku ve smetaně nebo v sýru je nutné použít modifikované butyrometry.

Pozn.

Acidobutyrometrické stanovení obsahu tuku v mléce (podle Gerbera) se používá pro jeho hodnocení, při provádění mlékárenské kontroly a pro tzv. zkrácený rozbor mléka.

*Rozhodčí metodou pro stanovení obsahu tuku v mléce je gravimetrické stanovení dle **Röse-Gottlieba**, jehož podstatou metody je rozpuštění bílkovin amoniakem a následná extrakce tuku ethyletherem a petroletherem za přídavku ethanolu. Po oddestilování rozpouštědel a vysušení se stanoví hmotnost vyextrahovaných látek (považovaných za podmínek metody za tuk) v $\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$ mléka.*

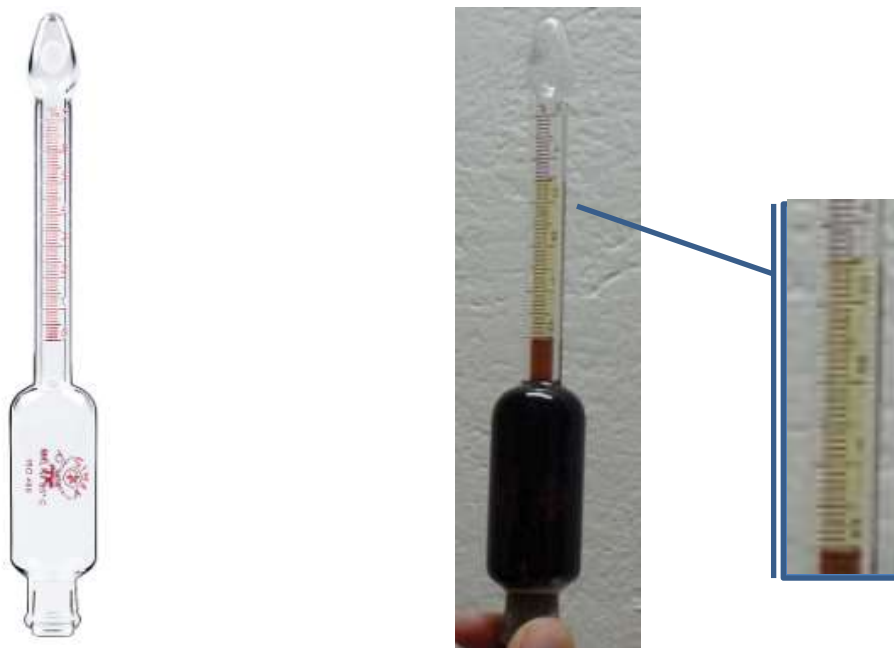
c) Postup práce

!!!PRACUJTE POUZE POD DOHLEDEM CVIČÍČÍHO!!!

- Do butyrometru odměřte poloautomatickou byretou 10 ml kyseliny sírové (dle Gerbera).
- Speciální mléčnou pipetou, po stěně butyrometru, nadávkuje 11 ml mléka tak opatrně, aby se obě kapaliny nesmísily (kyselina se tzv. navrství). Optimálně toho dosáhnete tak, že pipetu držíte svisle pod úhlem 45° a její špičku přiložíte ke stěně butyrometru v místě, kde hrdlo přechází v rozšířenou část, aby se nesmočilo samotné hrdlo butyrometru.
- Jakmile mléko z pipety vyteče, počká se asi 3 sekundy. Teprve poté odejměte pipetu od stěny, a hlavně zbytek mléka ve špičce pipety se nevyfukujte!
- Poté dávkovačem opatrně přidejte 1 ml amylalkoholu (zajistí ostré rozhraní).
- Butyrometr uzavřete pryžovou zátkou a jeho obsah prudce protřepejte, až jsou veškeré bílkoviny mléka rozpuštěny a nezůstávají žádné bílé částičky. Promíchejte převrácením butyrometru.

!!!POZOR, butyrometr se silně zahřívá!!!

- Posunováním zátky upravte stav hladiny v butyrometru tak, aby sahala až k nejvyššímu dílku stupnice, případně i několik dílků nad poslední rysku. Tím se zajistí, že po odečtení a vytemperování bude celý sloupec tuku v rozmezí stupnice a zamezí se chybám, které mohou vzniknout, je-li tukový sloupec po odstředění příliš posunován.
- Po protřepání butyrometru je ještě za horka vložte zátku dolů do odstředivky, vyhřáté na $65-68^\circ\text{C}$, a odstřed'ujte je 5 minut při 1100 otáčkách za minutu. Butyrometry je nutno rozložit v odstředivce tak, aby zatížení odstředivky bylo rovnoměrné.
- Po odstředění butyrometr vyjměte a mírným pohybem zátky spodní konec tukového sloupce posuňte tak, aby se kryl s nulou nebo nejbližší ryskou, která označuje celé procento tuku.
- Na stupnici butyrometru se odečtete nejnižší bod menisku tukového sloupce s přesností na $\frac{1}{2}$ nejmenšího dílku stupnice (viz **Obr. 5**) – zjistíte tak **obsah tuku v $\text{g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$ mléka**. Při odečítání je nutno držet butyrometr ve svislé poloze, meniskus ve výši očí, a postupovat bez zbytečných prodlev (musí být zachována teplota $65 \pm 2^\circ\text{C}$).
- POZOR!!! Pokud dojde při posunování tukového sloupce k jeho porušení rozstříknutím nebo odtržením kapek tuku, je nutno butyrometr znovu vyhřát a odstředit, aby došlo k opětovnému spojení tuku.



Obr. 5: Butyrometr na mléko, butyrometr při odečítání výšky tukového sloupce (zde značí hodnotu 3,5 g tuku ve 100 ml mléka)

d) Zpracování výsledků a vyhodnocení

- Odečtená hodnota značí **obsah tuku T v $\text{g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$ mléka**, s přesností na **2 desetinná místa**. Na hodnotu v $\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$ mléka je třeba obsah přepočítat podle vztahu (3). Výpočet ověřte dle **Tab. 2**.

$$T = \frac{T_B + 0,04}{1,04} \quad (3)$$

kde T_B obsah tuku stanovený butyrometricky [$\text{g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$ mléka]
 T obsah tuku [$\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$]

- Opakovatelnost stanovení je $\frac{1}{2}$ nejmenšího dílku stupnice na butyrometru. Uplatňuje-li se ředění, je třeba počítat s příslušným znásobením odchylky.

Tab. 2: Korekce obsahu tuku na hmotnostní procenta při použití 11ml pipety na mléko (ČERNÁ a kol.)

Hodnota odečtená na butyrometru [%]	Korekce na hmotnostní % tuku v mléce
0,11 – 0,36	+0,03
0,37 – 0,61	+0,02
0,62 – 0,87	+0,01
0,88 – 1,13	0
1,14 – 1,39	-0,01
1,40 – 1,65	-0,02
1,66 – 1,91	-0,03
1,92 – 2,17	-0,04
2,18 – 2,43	-0,05
2,44 – 2,69	-0,06
2,70 – 2,95	-0,07
2,96 – 3,21	-0,08
3,22 – 3,47	-0,09
3,48 – 3,73	-0,10
3,74 – 3,99	-0,11
4,00 – 4,25	-0,12
4,26 – 4,51	-0,13
4,52 – 4,77	-0,14
4,78 – 5,03	-0,15
5,04 – 5,29	-0,16
5,30 – 5,55	-0,17
5,56 – 5,81	-0,18
5,82 – 6,07	-0,19
6,08 – 6,33	-0,20
6,34 – 6,59	-0,21
6,60 – 6,85	-0,22
6,86 – 7,11	-0,23

e) Zpracování výsledků a vyhodnocení

Průměrný obsah tuku v syrovém kravském mléce je 3,8 %. Obsah tuku v závislosti na standardizaci mléka se může pohybovat v rozmezí až 0,05 – 5,6 %.

4. VÝPOČET OBSAHU SUŠINY, TUKUPROSTÉ SUŠINY, TUKU V SUŠINĚ Z KORIGOVANÝCH HODNOT MĚRNÉ HMOTNOSTI A TUKU

a) Teoretický úvod

Sušina představuje bezvodý podíl hmoty výrobku, zbývající po vysušení při teplotě 102 ± 2 °C do konstantní hmotnosti za podmínek metody, zahrnující všechny komponenty s výjimkou vody. Podle požadované přesnosti výsledku se obsah sušiny stanovuje buď vážkově (tj. gravimetricky = rozhodčí metoda) nebo výpočtem. Sušina mléka, z ní vypočtená tukuprostá sušina a obsah tuku v sušině jsou základními hodnotami pro posouzení mléka, ke zjištění jeho případného porušení a pro určení jeho technologické kvality.

Obsah sušiny v mléce se pohybuje mezi 12 a 13 %. Obsah sušiny tukuprosté v mléce je více než 8,5 %. Obsah tuku v sušině plnotučného mléka se pohybuje okolo 30 %.

➤ STANOVENÍ OBSAHU SUŠINY VÝPOČTEM

b) Princip

Obsah sušiny mléka stanovený výpočtem je podíl všech složek mléka, kromě volné vody, zjištěný výpočtem z měrné hmotnosti a z obsahu tuku v mléce. Výsledek se vyjádří v g na 100 g mléka (hmotnostní %).

c) Postup práce

- Hustota mléka se stanoví metodou laktodenzimetrickou ve stupních laktodenzimetrických ($^{\circ}L_{20}$) – viz **Úkol 1**.
- Obsah tuku mléka se stanoví metodou acidobutyrometrickou dle Gerbera v hmotnostních procentech – viz **Úkol 3**.

d) Zpracování výsledků

- Obsah **celkové sušiny S [%]** se vypočte podle vzorce (4):

$$S = 1,21 \cdot T + 0,25 \cdot {}^{\circ}L_{20} + 0,82 \quad (4)$$

kde T obsahu tuku v $g \cdot (100 g)^{-1}$ (hmotnostní %)
 ${}^{\circ}L_{20}$ stupně laktodenzimetrické při 20 °C

- Výpočty hmotnostních procent se provádí na dvě desetinná místa se zaokrouhlením na 0,05 %.

e) Vyhodnocení

Obsah sušiny v mléce se má pohybovat **mezi 12 a 13 %**.

➤ STANOVENÍ OBSAHU SUŠINY TUKUPROSTÉ VÝPOČTEM

f) Princip

Sušina tukuprostá (STP, %) je beztuký podíl mléčné sušiny.

g) Postup práce

Hodnota tukuprosté sušiny se stanoví výpočtem – buď odečtením tuku od celkové sušiny, nebo výpočtem z hustoty a obsahu tuku.

h) Zpracování výsledků a vyhodnocení

- Sušina tukuprostá STP [%] se vypočítá podle vztahu (5):

$$STP = S - T \quad (5)$$

kde S obsah sušiny, stanovený gravimetricky [$\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$; hm. %]
 T obsah tuku, stanovený acylbutyrometrickou metodou dle Gerbera [$\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$]

- Sušinu tukuprostá STP [%] lze vypočítat i podle vztahu (6):

$$STP = 0,21 \cdot T + 0,25 \cdot {}^{\circ}L_{20} + 0,82 \quad (6)$$

kde T obsah tuku, stanovený acylbutyrometrickou metodou dle Gerbera [$\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$]
 ${}^{\circ}L_{20}$ stupně laktodenzimetrické při 20 °C

- Hodnota STP se vyjadřuje v hmotnostních % (g ve 100 g mléka).
- Pro kontrolu výpočtu tukuprosté sušiny mléka podle vzorce (6) lze využít **Tab. 3 a 4**.

i) Vyhodnocení

Obsah sušiny tukuprosté v mléce je nejméně **8,5 %**.

Tab. 3: Hodnota výrazu $0,21 \cdot T$ (pro $T = 2,00$ až $5,09$ %) ve vzorci (6) (KNĚZ)

hmot. % tuku T [hm. %]	setiny %									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2,0	0,420	0,422	0,424	0,426	0,428	0,431	0,433	0,435	0,437	0,439
2,1	0,441	0,443	0,445	0,447	0,449	0,452	0,454	0,456	0,458	0,460
2,2	0,462	0,464	0,466	0,468	0,470	0,473	0,475	0,477	0,479	0,481
2,3	0,483	0,485	0,487	0,489	0,491	0,494	0,496	0,498	0,500	0,502
2,4	0,504	0,506	0,508	0,510	0,512	0,515	0,517	0,519	0,521	0,523
2,5	0,525	0,527	0,529	0,531	0,533	0,536	0,538	0,540	0,542	0,544
2,6	0,546	0,548	0,550	0,552	0,554	0,557	0,559	0,561	0,563	0,565
2,7	0,567	0,569	0,571	0,573	0,575	0,578	0,580	0,582	0,584	0,586
2,8	0,588	0,590	0,592	0,594	0,596	0,599	0,601	0,603	0,605	0,607
2,9	0,609	0,611	0,613	0,615	0,617	0,620	0,622	0,624	0,626	0,628
3,0	0,630	0,632	0,634	0,636	0,638	0,641	0,643	0,645	0,647	0,649
3,1	0,651	0,653	0,655	0,657	0,659	0,662	0,664	0,666	0,668	0,670
3,2	0,672	0,674	0,676	0,678	0,680	0,683	0,685	0,687	0,689	0,691
3,3	0,693	0,696	0,697	0,699	0,701	0,704	0,706	0,708	0,710	0,712
3,4	0,714	0,716	0,718	0,720	0,722	0,725	0,727	0,729	0,731	0,733
3,5	0,735	0,737	0,739	0,741	0,743	0,746	0,748	0,750	0,752	0,754
3,6	0,756	0,758	0,760	0,762	0,764	0,767	0,769	0,771	0,773	0,775
3,7	0,777	0,779	0,781	0,783	0,785	0,788	0,790	0,792	0,794	0,796
3,8	0,798	0,800	0,802	0,804	0,806	0,809	0,811	0,813	0,815	0,817
3,9	0,819	0,821	0,823	0,825	0,827	0,830	0,832	0,834	0,836	0,838
4,0	0,840	0,842	0,844	0,846	0,848	0,851	0,853	0,855	0,857	0,859
4,1	0,861	0,863	0,865	0,867	0,869	0,872	0,874	0,876	0,878	0,880
4,2	0,882	0,884	0,886	0,888	0,890	0,893	0,895	0,897	0,899	0,901
4,3	0,903	0,905	0,907	0,909	0,911	0,914	0,916	0,918	0,920	0,922
4,4	0,924	0,926	0,928	0,930	0,932	0,935	0,937	0,939	0,941	0,943
4,5	0,945	0,947	0,949	0,951	0,953	0,956	0,958	0,960	0,962	0,964
4,6	0,966	0,968	0,970	0,972	0,974	0,977	0,979	0,981	0,983	0,985
4,7	0,987	0,989	0,991	0,993	0,995	0,998	1,000	1,002	1,004	1,006
4,8	1,008	1,010	1,012	1,014	1,016	1,019	1,021	1,021	1,025	1,027
4,9	1,029	1,031	1,033	1,035	1,037	1,040	1,042	1,044	1,046	1,048
5,0	1,050	1,052	1,054	1,056	1,058	1,061	1,063	1,065	1,067	1,069

Tab. 4: Hodnota výrazu $0,25 \cdot L_{20} + 0,82$ (pro $L_{20} = 15$ až 35) ve vzorci (6) (KNĚŽ)

L (20 °C)	desetiny L_{20}									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
15	4,570	4,595	4,620	4,645	4,670	4,695	4,720	4,745	4,770	4,795
16	4,820	4,845	4,870	4,895	4,920	4,945	4,970	4,995	5,020	5,045
17	5,070	5,095	5,120	5,145	5,170	5,195	5,220	5,245	5,270	5,295
18	5,320	5,345	5,370	5,395	5,420	5,445	5,470	5,495	5,520	5,545
19	5,570	5,595	5,620	5,645	5,670	5,695	5,720	5,745	5,770	5,795
20	5,820	5,845	5,870	5,895	5,920	5,945	5,970	5,995	6,020	6,045
21	6,070	6,095	6,120	6,145	6,170	6,195	6,220	6,245	6,270	6,295
22	6,320	6,345	6,370	6,395	6,420	6,445	6,470	6,495	6,520	6,545
23	6,570	6,595	6,620	6,645	6,670	6,695	6,720	6,745	6,770	6,795
24	6,820	6,845	6,870	6,895	6,920	6,945	6,970	6,995	7,020	7,045
25	7,070	7,095	7,120	7,145	7,170	7,195	7,220	7,245	7,270	7,295
26	7,320	7,345	7,370	7,395	7,420	7,445	7,470	7,495	7,520	7,545
27	7,570	7,595	7,620	7,645	7,670	7,695	7,720	7,745	7,770	7,795
28	7,820	7,845	7,870	7,895	7,920	7,945	7,970	7,995	8,020	8,045
29	8,070	8,095	8,120	8,145	8,170	8,195	8,220	8,245	8,270	8,295
30	8,320	8,345	8,370	8,395	8,420	8,445	8,470	8,495	8,520	8,545
31	8,570	8,595	8,620	8,645	8,670	8,695	8,720	8,745	8,770	8,795
32	8,820	8,845	8,870	8,895	8,920	8,945	8,970	8,995	9,020	9,045
33	9,070	9,095	9,120	9,145	9,170	9,195	9,220	9,245	9,270	9,295
34	9,320	9,345	9,370	9,365	9,420	9,445	9,470	9,495	9,520	9,545
35	9,570	9,595	9,620	9,645	9,670	9,695	9,720	9,745	9,770	9,795

➤ STANOVENÍ OBSAHU TUKU V SUŠINĚ

j) Princip

Tuk v sušině (TVS) je podíl tuku z celkové sušiny mléka vyjádřený v procentech. Obsah tuku v sušině není údajem o absolutním podílu tuku v mléce – ve skutečnosti je totiž tuku v mléce méně.

k) Postup práce

Obsah tuku v sušině se zjistí se výpočtem z obsahu sušiny a obsahu tuku a vyjádří se v hmotnostních %.

l) Zpracování výsledků

- Obsah tuku v sušině TVS [%] se vypočítá podle vztahu (7):

$$TVS = \frac{T \cdot 100}{S} \quad (7)$$

kde TVS sušina tukuprostá [hm. %]
 T obsah tuku [$\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$; hm. %]
 S obsah sušiny [$\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$; hm. %]

m) Vyhodnocení

Obsah tuku v sušině TVS [%] plnotučného mléka se pohybuje okolo 30 %.

II.

ZÁKLADNÍ ROZBOR MLÉKA II.

1. Senzorické hodnocení mléka
 2. Stanovení cizích pachů podle Lehmana a Bassetta
 3. Stanovení bílkovinného titru (formolová titrace)
 4. Rozlišení, zda se jedná o mléko syrové nebo pasterované
 5. Stanovení kyselosti mléka
-

1. SMYSLOVÉ (SENZORICKÉ) HODNOCENÍ MLÉKA

a) Teoretický úvod

Senzorická analýza patří mezi základní kontrolní metody kvality potravin. Je to vědecká disciplína vyvolávající, měřící, analyzující a interpretující reakce na ty vlastnosti a charakteristiky potravin či surovin, které jsou postřehnutelné lidskými smysly – chutí, čichem, zrakem, hmatem a sluchem. Využívají ji výrobci potravin a je i nepostradatelnou součástí výkonu hygienického dozoru příslušných orgánů státní správy. Její význam spočívá zejména v rychlosti získání relevantních informací a zpravidla v relativně nízkých nákladech na jejich pořízení. Na jejím základě je tedy možné za určitých okolností přímo korigovat technologické fáze výroby potravin, resp. surovin.

Hodnocení provádí školení posuzovatelé, kteří musí mít normální schopnost smyslového vnímání. Musí prokazatelně rozlišovat všechny základní typy chutí (sladká, slaná, kyselá, hořká, umami) s ohledem na určité koncentrace roztoků a musí mít dostatečné znalosti oboru. Smyslové zkoušky jsou subjektivní a jejich výsledek je silně ovlivněn zkušeností a dispozicí posuzovatele. Různí posuzovatelé mohou docházet k rozdílným výsledkům. Proto má být zkušební komise složena z lichého počtu členů, přičemž nejmenší počet jsou tři posuzovatelé.

Zkušebna má být tichá, světlá místnost, s jednoduchým zařízením, kde je minimalizováno působení vnějších faktorů. Musí být zajištěno, aby se posuzovatelé navzájem neovlivňovali.

b) Princip úlohy

U výrobků v drobném spotřebitelském balení hodnotí každý posuzovatel jeden kus, při větším spotřebitelském nebo průmyslovém balení se hodnotí část (reprezentativní vzorek). Vzorky mají mít teplotu 18-20 °C. Senzorické hodnocení se zaměřuje na zjišťování odchylek chuti, vůně, barvy a konzistence. Popisují se zjištěné odchylky a hledají se příčiny vzniku defektu, vady. Syrové mléko je třeba při posuzování chuti nejprve zahřát k varu a rychle ochladit.

Při otevření spotřebitelského balení či vzorkovnice se ihned posoudí vůně a částečně i vzhled. Další hodnocení se provádí po převedení do bezbarvých skleněných nádobek (např. kádinek).

c) Postup

- Vzorek mléka důkladně promíchejte (stejněměrné rozdělení všech složek, zejména tuku, který se snadno odděluje a vytváří vrstvu smetany).
- Mléko vytemperujte asi na 20 °C.
- Nalijte mléko do čisté skleněné nádoby z bezbarvého čirého skla.
- Posuzujte nejprve jeho vzhled (barva, konzistence), poté pach.
- Chuť nehodnoťte – **nevíte, co je to za vzorek!!!!** Chuť je možné hodnotit pouze po laboratorní pasteraci vzorku. Navíc chemicky konzervované vzorky se chuťově neposuzují.

d) Vyhodnocení

- **Barva**
Barva normálního mléka je bílá, případně se slabě nažloutlým odstínem (smetanově bílá). Jiné (netypické, cizí) zabarvení může být způsobeno znečištěním, krmivem, onemocněním mléčných žláz nebo mikrobiálními pochody v mléce. Nejčastěji se vyskytuje zbarvení nažloutlé, růžové, až červené. U odstředěného mléka může být odstín lehce namodralý.
- **Konzistence**
Normální mléko je tekutina stejnorodé konzistence bez usazenin, vloček a hrubých nečistot. Je poněkud hustší než voda. U nehomogenizovaného mléka se připouští vyvstálá vrstva tuku. Změny v konzistenci mohou nastat při onemocnění dojníc, působením mikroorganismů nebo enzymů, porušením nebo znečištěním mléka. Nejčastější změny konzistence mléka jsou mléko slizké, hlenovité, lepkavé táhlovité, vločkovité (výskyt vloček bílkovin na stěnách), sražené, sedlé, kašovité, zpěněné, krupičnaté, písčité, vodnaté nebo částečně stlučené.
- **Pach**
Čerstvé mléko má slabou, čistě mléčnou specifickou vůni bez cizích pachů. Mléko je ovšem velmi náchylné k přijímání rozličných pachů ze svého okolí, jako jsou rozmanité sklepní, chlěvní a podobné pachy. Přejímá i pachy z krmiva dojnice, jako jsou pach řepový, výpalkový, rybí, česnekový, slanečkový apod. Léčením dojníc jsou zaviněny pachy po lécích, pach hnilobný, sirovodíkový apod. Znečištěné nádoby na mléko nebo neopatrná manipulace s mlékem může v mléce způsobit nepříjemné pachy jako například petrolejový, sýrovitý, olejovitý apod. Účinkem některých mikroorganismů vzniká pach kyselý, pižmový, po kyselině máselné, sýrovitý, hnilobný, lojovitý, slanečkový apod.
- **Chuť**
Čerstvé mléko má příjemnou, nasládlou, typicky mléčnou chuť. Změny v chuti nastávají znečištěním (slaná, mýdlovitá, hořká, po petroleji, po naftě, chloru apod.), působením mikroorganismů (kyselá, hnilobná, dřevitá, sladová, mýdlovitá, hořká apod.), onemocněním dojníc a jejich léčením nebo porušením sekrece mléka (slaná, hořká, žluklá apod.), případně vlivem krmiv (sladová, hořká, krmivová apod.). Netypická chuť může být kvalifikována též jako nevýrazná, prázdná.

2. STANOVENÍ CIZÍCH PACHŮ PODLE LEHMANA A PODLE BASSETTA

a) Teoretický úvod

Pokud je mléko vystaveno styku s okolní atmosférou, existuje riziko, že na velký povrch tukových kuliček se adsorbují různé těkavé látky, které mohou mléku dodat nepříjemné pachy či pachuti. Prevencí je přeprava a manipulace s mlékem v uzavřených nádobách. Možné příčiny vzniku pachutí a pachů mléka mohou pocházet též z krmiva. Dále mohou mít svůj původ v tepelném ošetření mléka (zejména v případě vysoké pasterace či sterilačních záhřevů), vystavení UV a krátkovlnnému viditelnému záření, proteolýze a lipo|ýze a reakci volných aminokyselin a volných mastných kyselin, rozvoji kontaminující mikroflóry či oxidaci přítomných látek (zejména mastných kyselin).

2.1 Stanovení cizích pachů podle Lehmana

b) Princip

Metoda je založena na srovnání pachu vzorku při různých teplotách. Skryté vady vůně syrového mléka vynikají při ohřevu na 30–35 °C.

c) Postup:

- Do dvou Erlenmayerových baněk odeberte dvakrát 20 ml mléka a uzavřete zátkou.
- Jeden vzorek vytemperujte na pokojovou teplotu (20 °C) a druhý zahřejte na 40 °C – předejte učiteli k zahřátí na 40 °C v mikrovlnné troubě.
- Poté zátku odstraňte a ihned posuzujte pach mléka v obou vzorcích.

d) Vyhodnocení:

- | | |
|------|---|
| - | bez cizího pachu |
| + | slabý pach, ne vždy opakovatelně prokazatelný |
| ++ | prokazatelný cizí pach |
| +++ | silný cizí pach |
| ++++ | velmi silný až nesnesitelný pach |

Kromě intenzity pachu určete i jeho druh.

2.2 Stanovení cizích pachů podle Bassetta

e) Princip:

Pach mléka vynikne po přidání 1 granule pevného hydroxidu draselného (přibližně 0,1 g) k 20 ml mléka v uzavřené vzorkovnici a hodnocení po 5 minutách stání. Rozlišení se porovnává se stejně ošetřeným nezávadným mlékem. Hodnotí se ve škále od nulového rozdílu se srovnávaným mlékem, přes zřetelný pach, po odlišný až odporný.

f) Postup:

- Do Erlenmayerovy baňky se zábrusem odměřte 20 ml mléka.
- Přidejte jednu granuli KOH (0,1 g), uzavřete zátkou a mírně promíchejte.
- Nechejte stát 5 minut při pokojové teplotě.
- Zátku odstraňte a ihned posuzujte pach mléka.
- Vzorek mléka zahřejte ve vodní lázni na 40 °C a opět proveďte hodnocení pachu.

g) Vyhodnocení:

- bez cizího pachu
- + slabý pach, ne vždy opakovatelně prokazatelný
- ++ prokazatelný cizí pach
- +++ silný cizí pach
- ++++ velmi silný až nesnesitelný pach

Kromě intenzity pachu určete i jeho druh.

3. STANOVENÍ BÍLKOVINNÉHO TITRU (FORMOLOVÁ TITRACE)

a) Teorie

Bílkoviny kravského mléka tvoří velmi komplexní složku mléka, která spoluurčuje fyzikálně-chemické vlastnosti mléka i jeho nutriční hodnotu. Mléčný protein se skládá z velkého množství proteinů s různou molekulovou hmotností. Velká část proteinů mléka jsou specifické produkty mléčné žlázy, syntetizovány sekrečními epiteliálními buňkami a vylučovány do mléka.

Substrátem pro syntézu mléčného proteinu jsou aminokyseliny, které přecházejí do mléčné žlázy z krve dojnice.

Z celkového obsahu dusíkatých látek v kravském mléce (3,2 – 3,6 % hmotnostních, přepočteno z celkového obsahu dusíku) připadá přibližně 90–95 rel. % celkového dusíku na tzv. čisté bílkoviny (3,0 – 3,3 % hmotnostních). Zbytek dusíkatých látek připadá na tzv. ostatní dusíkaté (nebílkovinné) látky, kam se řadí např. močovina, amoniak, kreatin, kyselina močová, lipoproteiny, enzymy aj. Tyto látky zůstávají v roztoku po vysrážení veškerých bílkovin mléka 12% kyselinou trichloroctovou.

Podle rozpustnosti při pH prostředí = 4,6 lze bílkoviny mléka rozdělit na kaseinové a syrovátkové (sérové) proteiny. V případě kravského mléka se jedná o poměr kaseinových a sérových bílkovin přibližně na úrovni 4:1. To znamená, že bílkoviny kravského mléka jsou tvořeny z 80 % kaseinem a z 20 % syrovátkovými bílkovinami. Hodnota pH = 4,6 je uzančně stanovený izoelektrický bod kaseinu (při 30 °C). Kaseinové i sérové bílkoviny jsou heterogenní skupinou proteinů a obsahují několik individuálních bílkovin. Základními frakcemi kaseinu jsou α_s -, β - a κ -kasein; syrovátkové bílkoviny jsou tvořeny hlavně β -laktoglobulinem a α -laktalbuminem.

Základní metodou stanovení bílkovin mléka je metoda dle Kjeldahla, metoda velmi přesná, avšak pracově náročná. Pro sériová stanovení se používá metod s roztokem amidočerni 10 B nebo spektrofotometrického stanovení v infračervené oblasti spektra (kupř. přístroje Multispek, Milkoscan). V provozní praxi se také používá jednoduché stanovení bílkovinného titru.

b) Princip

Aminokyseliny obsažené v bílkovinách mají amfoterní povahu (obsahují kyselou i zásaditou skupinu), není možné je běžně stanovit alkalimetrickou nebo acidometrickou titrací. Po přidavku formaldehydu, který se naváže na aminoskupinu aminokyselin a tím ji zablokuje, se uplatní kyselý charakter karboxylové skupiny. Takto upravené aminokyseliny je pak možné titrovat roztokem hydroxidu sodného.

Bílkovinný titr je spotřeba $0,143 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku hydroxidu sodného v mililitrech na titraci 25 ml po přidavku fenolftaleinu za podmínek metody. U mléka s kyselostí do 8 SH bílkovinný titr udává orientačně procento bílkovin.

Stanovení bílkovin může být i v tomto případě ovlivněno, došlo-li k enzymatickému rozkladu mléka, který se projeví zvýšenou kyselostí, zředěním vodou, stupněm laktace apod.

c) Postup

- Do titrační baňky odpipetujte 25 ml mléka.
- Přidejte 0,25 ml 2% ethanolového roztoku fenolftaleinu a 1 ml nasyceného roztoku šťavelanu draselného.
- Počkejte 2 minuty.
- Titrujte roztokem NaOH ($0,143 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) do růžového zbarvení (stejná intenzita jako srovnávací roztok, připravený před titrací – tj. 25 ml mléka + 1 ml roztoku šťavelanu draselného + 0,5 ml 5% roztoku síranu kobaltnatého) – dochází k neutralizaci vzorku.
- Přidejte 5 ml roztoku formaldehydu (40%) – POZOR TOXICKÝ, promíchejte.
- Nechte stát 2 minuty.
- Titrujte roztokem NaOH ($0,143 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) do růžového zbarvení (opět stejná intenzita jako srovnávací roztok).
- Odečtěte spotřebu roztoku NaOH.

d) Výpočet:

Obsah bílkovin B [%] se stanoví podle vztahu (8):

$$B = V(\text{NaOH}) \quad (8)$$

kde V spotřeba roztoku NaOH ($0,143 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na titraci zneutralizovaného mléka po přidavku formaldehydu (při druhé titraci) v ml

e) Vyhodnocení:

Obsah bílkovin v mléce je v rozmezí **3,2 – 3,6 %**.

Poznámka:

Toto stanovení je pouze orientační a obsah bílkovin stanovený tímto postupem se může lišit od výsledků získaných Kjeldahlovou metodou o více než 0,2 %. Metoda je použitelná pouze pro mléka s kyselostí do 8 SH.

Rozhodčí metoda – Stanovení bílkovin Kjeldahlovou metodou

Touto metodou se stanoví celkový obsah dusíku (bílkovinný i nebílkovinný původ) v mléce, a ten je potom přepočítán na obsah bílkovin.

Vzorek mléka se mineralizuje za varu s kyselinou sírovou, a tím se veškeré dusíkaté látky převedou na amoniak ve formě síranu amonného. Přídavkem hydroxidu se amoniak uvolní. Uvolněný amoniak se destiluje vodní parou a pohltí se v kyselině borité. Vzniklý boritan amonný se poté titruje roztokem kyseliny chlorovodíkové.

Obsah bílkovin B se vypočítá podle vztahu:

$$B(\%) = N(\%) \cdot 6,38$$

kde hodnota 6,38 přepočítávací faktor, který vychází z průměrného obsahu dusíku v mléčných bílkovinách (15,67 %)

4. STANOVENÍ KYSELOSTI MLÉKA

a) Teorie:

Kyselost mléka lze vyjádřit jako **titrační kyselost** (stanovení titrací kyselce reagujících složek mléka odměrným roztokem hydroxidu sodného) nebo **aktivní kyselost** – hodnoty pH (koncentrace vodíkových iontů). Mezi titrační a aktivní kyselostí mléka není absolutní závislost, neboť hodnoty závisejí na pufrací schopnosti přítomných solí a bílkovin. V běžné provozní praxi se používá pouze titrační vyjádření, poněvadž pH u mléka od zdravých dojnic velmi málo kolísá.

Ke stanovení kyselosti mléka jsou využívány i **orientační metody** – měření indikátorovými papírky, zkouška varem, lihová a alizarolová zkouška.

4.1 Stanovení titrační kyselosti (rozhodčí metoda)

b) Princip:

Podstatou metody je neutralizace kyselce reagujících látek mléka roztokem hydroxidu sodného (NaOH), za přídavku fenolftaleinu do růžového zbarvení.

Kyselost čerstvého mléka je způsobena přítomností kyselých reagujících složek – přítomností fosfátů, citrátů. Narůstající kyselost mléka je způsobena rozkladem laktózy na kyselinu mléčnou působením mikroorganismů.

Titrační kyselost se tradičně udává v jednotkách dle Soxhlet-Henkela (SH), která vyjadřují počet ml NaOH o koncentraci $0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ potřebných na neutralizaci 100 ml mléka při použití fenolftaleinu jako indikátoru.

Pro vyjádření těchto jednotek v soustavě SI je možné použít následující převodní vztah (9):

$$\begin{aligned} 1 \text{ SH} &= 1 \text{ ml NaOH } (c = 0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}; \text{ vztaženo na 100 ml mléka}) = \\ &= 2,5 \text{ mmol H}^+ \cdot \text{l}^{-1} = \\ &= 2,5 \text{ mmol kyseliny mléčné} \cdot \text{l}^{-1} = \\ &= 0,02252 \text{ g kyseliny mléčné (vztaženo na 100 ml mléka)} \end{aligned} \quad (9)$$

c) Postup:

- Do titrační baňky odpipetujte 50 ml mléka.
- Přidejte 2 ml roztoku fenolftaleinu (2% roztok v ethanolu).
- Titrujte roztokem hydroxidu sodného ($0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) do trvalého slabě růžového zbarvení (stejná intenzita zbarvení jako u srovnávacího roztoku).

d) Výpočet:

Titrační kyselost SH (Soxhlet-Henkel) se vypočítá podle vztahu (10):

$$SH = 2 \cdot V \cdot f \quad [\text{SH nebo mmol} \cdot \text{l}^{-1}] \quad (10)$$

kde V spotřeba odměrného roztoku NaOH ($0,25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) na titraci 50 ml vzorku, v ml
 f faktor odměrného roztoku NaOH ($0,25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)

Výsledek se zaokrouhlí na 0,05 SH.

e) Vyhodnocení:

- Normální titrační kyselost syrového mléka se pohybuje v rozmezí **6,2 – 7,8 SH**.
- Mléko s kyselostí $< 5 \text{ °SH}$ je vodnaté a pochází obvykle od dojníc se zánětem vemene.
- Mléko s kyselostí $> 8 \text{ °SH}$ je obvykle od dojníc po otelení.
- Přesahuje-li kyselost čerstvě nadojeného mléka 9 °SH , jedná se většinou o mlezivo nebo mléko od dojnice s akutním zánětem vemene.

4.2 Stanovení aktivní kyselosti

b) Princip:

Aktivní kyselost pH je dána koncentrací vodíkových iontů v mléce – je definována jako záporný dekadický logaritmus vodíkových iontů. Měří pomocí pH-metru, vyjadřuje se v hodnotách pH. Stanovení pH čerstvě nadojeného mléka, ale není úplně vhodným měřítkem hodnocení kvality. Je to dáno pufrací schopností mléka, která způsobí, že přidání malého množství kyseliny nebo zásady do mléka se na hodnotě pH nijak neprojeví. Při zvyšující se titrační kyselosti (vznikající kyselina mléčná) nedochází zprvu, vlivem pufrací schopnosti mléka, ke změnám hodnoty pH. Pro posouzení kvality mléka je proto lepší stanovit jeho titrační kyselost.

c) Postup:

- Nakalibrujte pH-metr v rozsahu pH 4–7 pomocí kalibračních roztoků.
- Vzorek mléka nalijte do kádinky.
- Elektrodu vložte přímo do mléka a odečtěte hodnotu pH při teplotě 20 °C.
- Po každém měření elektrodu opláchněte destilovanou vodou a osušte.

d) Výhodnocení:

Zavedení, soustavného měření kyselosti mléka v SH bylo umožněno sledovat poměrně jednoduchým způsobem důležitý faktor jakosti v mlékárenském průmyslu.

- Hodnota pH čerstvého mléka je v rozmezí **6,5 – 6,7**.
- Kyselost pod 4 SH – indikuje silný katar nebo katar vemene; barva mléka je vodově bílá.
- Kyselost 4–5 SH – mléko trpké, nažluklé, barvy mléčné nebo namodralé, nesráží se syřidlem.
- Kyselost 5–6 SH – mléko je jen slabě nažluklé a nakyslé, barvy namodralé, sráží se zřídka syřidlem.
- Kyselost málo přes 6 SH – mléko dosud trochu natrpklé a nažluklé, pochází od starodojných krav; syřidlem se srazí zřídka. U mléka kyselého je hodnota pH nižší než 6,3. U mléka nakyslého je pH 6,3–6,4.
- Kyselost 6,5–7,5 SH – normální mléko.
- Kyselost 8–9 SH – mléko často od krav po otelení, sráží se dobře a rychle.
- Kyselost 9 a více – upozorňuje na příliš mladé mléko se značným obsahem mleziva (mlezivo má až 18 SH) nebo na akutní zánět vemene.
- Kyselost nad 6,8 SH však může poukazovat i na mléka od nemocných dojníc, mléka porušená přidáním vody, mléka procházející proteolytickým rozkladem nebo mléka s přísadkou alkálií.

III.

PRŮKAZ PORUŠENÍ MLÉKA

1. Stanovení měrné hmotnosti (hustoty)
 2. Stanovení obsahu tuku acidobutyrometrickou metodou
 3. Informativní stanovení kyselosti mléka
 4. Stanovení titrační kyselosti mléka
 5. Dokladná zkouška na přítomnost dusičnanů
 6. Výpočet obsahu sušiny, tukuprosté sušiny, tuku v sušině z korigovaných hodnot měrné hmotnosti a tuku
 7. Porušení mléka
-

1. STANOVENÍ MĚRNÉ HMOTNOSTI (HUSTOTY)

a) Teoretický úvod

Hustota mléka je důležitým kontrolním faktorem, v praxi běžně stanovovaným. Podstatně závisí na chemickém složení mléka. Hustota kravského mléka se obvykle pohybuje v rozmezí 1,026 - 1,036 g·cm⁻³. Z obsahových složek ovlivňuje hustotu mléka především tukový podíl. Na bázi hustoty a obsahu tuku lze vypočítat sušinu mléka. Slouží jako nepřímý ukazatel přidání vody do mléka, a tím ke kontrole falšování mléka vodou. Např. přidáním vody v množství 10 % dojde ke snížení hustoty mléka o 0,003 g·cm⁻³.

Změny specifické hmotnosti mléka (hustoty) může způsobit řada dalších faktorů, ovlivňujících složení mléka – zhoršený zdravotní stav dojníc, zejména mastitidy, dietetické a metabolické poruchy, stádium laktace atp.

b) Princip úlohy

Pro účely měření hustoty mléka byly zkonstruovány speciální mléčné hustoměry, nazývané **mlékoměry** nebo též **laktodenzimetry**. Hustota mléka se vyjadřuje se v tzv. **mléčných stupních** (stupně laktodenzimetrické nebo °L₂₀), odpovídajících počtu tisícín, o které je hustota mléka vyšší než hustota vody.

Pokud např. hodnota na mlékoměru vystoupá na 30 °L, naměřená hustota mléka činí 1,030 g·cm⁻³.

Hustota mléka je ovlivněna jeho složením a teplotou, kdy s rostoucí teplotou hustota mléka klesá. Nejvyšší hustotu má kravské mléko při teplotě -3 °C. Sterilizace, pasteurace ani homogenizace nemají na hustotu mléka vliv.

Mlékoměry jsou cejchovány pro teplotu 20 °C (proto °L₂₀). **Korekce na 1 °C** pod nebo nad danou teplotu činí ±0,2 °L (viz **Tab. 5**).

c) Postup práce

- Vzorek mléka vytemperujte ve vodní lázni na 35–40 °C (po dobu 3 až 5 minut) – odstranění vzduchových bublin, převedení tuku do roztaveného stavu. (Převedení tuku do rovnovážného roztaveného stavu je nutné, poněvadž různý stupeň tuhnutí mléčného tuku ovlivňuje zjištěnou hodnotu měrné hmotnosti mléka.) – **již bylo uděláno**
- Rychle zchladte na 20 °C. (Během ohřívání a chlazení mléko udržíte v mírném pohybu, avšak nesmí pěnit.) – **již bylo uděláno**
- Opatrně převedte vzorek do odměrného válce (nalévejte po stěnách, aby nepěnilo).
- Válec naplňte tak, aby po vnoření hustoměru malá část mléka přetekla přes okraj do podstavné misky. (Tímto se odplaví nečistoty, které snižují povrchové napětí mléka a snižují meniskus na stonku mlékoměru, což ovlivňuje chybu výsledku.)
- Opatrně ponořte hustoměr do mléka, po vyrovnání teploty mezi mlékem a hustoměrem odečtěte hodnotu měrné hmotnosti (g·cm⁻³) na stupnici hustoměru (horní okraj menisku) a současně odečtěte i teplotu mléka na teploměru. POZOR! Při ponořování hustoměru je potřeba postupovat opatrně tak, aby se jeho stonek smočil max. 10 mm nad předpokládanou hodnotou.
- Jestliže teplota mléka nebude při měření dosahovat přesně 20 °C, je nutné provedení korekce měrné hmotnosti na teplotu podle **Tab. 5**.

d) Zpracování výsledků

Ze zjištěné hodnoty měrné hmotnosti vypočtete stupně laktodenzimetrické °L dle vztahu (11).

$$^{\circ}\text{L} = (\rho_{20} - 1) \cdot 1000 \quad (11)$$

kde ρ_{20}hustota odečtená na hustoměru [g·cm⁻³]

Proběhlo-li měření při jiné teplotě než 20 °C (nejvýše však v rozmezí 15–25 °C), stanoví se korekce hustoty na teplotu dle **Tab. 5**. – vyhledáte průsečík vypočtené hodnoty °L a aktuální teploty a hodnotu °L upravíte o daný koeficient.

Tab. 5: Korekce na hustotu plnotučného mléka při normální teplotě 20 °C (KNĚZ)

Hustota mléka [°L]	Teplota mléka [°C]													
	15	16	17	18	18,5	19	19,5	20,5	21	21,5	22	23	24	25
	tyto hodnoty se odečítají (-)							tyto hodnoty se připočítají (+)						
15	1,0	0,9	0,7	0,5	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3	0,4	0,5	0,8	1,1	1,4
16	1,0	0,9	0,7	0,5	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3	0,4	0,5	0,8	1,1	1,4
17	1,1	0,9	0,7	0,5	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6	0,9	1,2	1,5
18	1,1	0,9	0,7	0,5	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6	0,9	1,2	1,5
19	1,1	0,9	0,7	0,5	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6	0,9	1,2	1,5
20	1,1	0,9	0,7	0,5	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6	0,9	1,2	1,5
21	1,1	0,9	0,7	0,5	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6	0,9	1,2	1,5
22	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,3	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,9	1,2	1,6
23	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,6	0,9	1,3	1,6
24	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,6	0,9	1,3	1,6
25	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,6	1,0	1,3	1,6
26	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,6	1,0	1,3	1,7
27	1,3	1,1	0,8	0,6	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,7	1,0	1,4	1,7
28	1,3	1,1	0,9	0,6	0,5	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,7	1,0	1,4	1,7
29	1,3	1,1	0,9	0,6	0,5	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,7	1,0	1,4	1,8
30	1,3	1,1	0,9	0,6	0,5	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,7	1,1	1,4	1,8
31	1,3	1,1	0,9	0,6	0,5	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,7	1,1	1,4	1,8
32	1,4	1,2	0,9	0,6	0,5	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,7	1,1	1,5	1,8
33	1,4	1,2	0,9	0,7	0,5	0,4	0,2	0,2	0,4	0,5	0,7	1,1	1,5	1,9
34	1,4	1,2	0,9	0,7	0,5	0,4	0,2	0,2	0,4	0,6	0,7	1,1	1,5	1,9
35	1,4	1,2	1,0	0,7	0,5	0,4	0,2	0,2	0,4	0,6	0,7	1,1	1,5	1,9

Příklad výpočtu a korekce:

- měrná hmotnost mléka změřená hustoměrem je $\rho = 1,0300 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ při teplotě 18 °C
- přepočet na stupně laktodenzimetrické $^{\circ}\text{L}_t = 1000 \cdot (1,0300 - 1,000) = 30,0$
- korekce na teplotu 20 °C – v tabulce (**Tab. 5**) vyhledáme průsečík $^{\circ}\text{L}_{20} = 30,0$ a 18 °C = 0,6 (jedná se o teplotu pod 20 °C, proto odečítáme)
- výsledná hustota je potom $^{\circ}\text{L}_{20} = 30,0 - 0,6 = 29,4$
- vypočítanou hodnotu $^{\circ}\text{L}_{20}$ použijeme pro další výpočty – obsah sušiny, sušiny tukuprosté

e) Vyhodnocení

Podle výsledné hodnoty $^{\circ}L$ určete, zda se jedná o mléko plnotučné, odstředěné nebo narušené přidavkem vody. S ohledem na množství tuku kolísá měrná hmotnost u vybraných typů mléka v následujícím rozmezí:

- mléko **odstředěné** (pod 0,3 % tuku) nad $1,0325 \text{ g.cm}^{-3}$ ($^{\circ}L_{20} > 32,5$)
- **plnotučné** mléko (nad 3,5 % tuku) $1,028 - 1,032 \text{ g.cm}^{-3}$ ($^{\circ}L_{20} = 28 - 32$)
- mléko **porušené vodou** do $1,0275 \text{ g.cm}^{-3}$ ($^{\circ}L_{20} < 27,5$)

2. STANOVENÍ OBSAHU TUKU ACIDOBUTYROMETRICKOU METODOU (PROVOZNÍ METODA)

a) Teoretický úvod

Mléčný tuk je přítomen ve formě emulze v tzv. mléčné plazmě. Je dispergován ve formě tukových kuliček, kdy nepolární triacylglyceroly jsou obklopeny vrstvou povrchově aktivních látek, především fosfolipidů a membránových lipoproteinů. Mléčný tuk má nižší měrnou hmotnost než mléčná plazma ($0,9160 \text{ g.cm}^{-3}$ vs. $1,0333 \text{ g.cm}^{-3}$, při 20°C) – při stání mléka tak dochází k samovolnému vyvstávání tuku, čehož se využívá při odtučnění mléka a získávání smetany odstředováním.

Mléčný tuk je tvořen převážně nasycenými mastnými kyselinami (60–70 %), zbytek tvoří nenasyčené mastné kyseliny. Důsledkem tohoto poměrně širokého spektra mastných kyselin s odlišnými fyzikálními vlastnostmi je i široké rozmezí teploty tuhnutí ($19\text{--}26^{\circ}\text{C}$) a tání ($28\text{--}35^{\circ}\text{C}$) mléčného tuku, který je tedy tvořen směsí tuhého a tekutého podílu. Spektrum nenasyčených mastných kyselin s nižším bodem tuhnutí se v průběhu roku mění v závislosti na krmení dojníc – s minimem v zimních a maximem v letních měsících. Ve srovnání s jinými tuky vykazuje stabilnější polymorfismus ve směsných krystalech triacylglycerolů, proto také podíl tuhého tuku a teplota tání navíc závisí významně na rychlosti chlazení.

Mléčný tuk obsahuje narozdíl od jiných živočišných tuků i nasycené mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které jsou dobře stravitelné. Obsahuje také nepatrné množství trans-mastných kyselin, které vznikají působením mikroorganismů v zažívacím traktu dojníc. Mléčný tuk snadno podléhá autooxidaci za vzniku chuťových vad (lojovitá, kovová, rybí aj.). Obsah, složení a vlastnosti mléčného tuku ovlivňuje zejména výživa dojníc, jejich zdravotní stav, plemeno, stadium laktace aj.

Obsah mléčného tuku v neupraveném mléce činí v průměru kolem 3,8 – 4 %. Jedná se o podíl tuku, který se oddělí v butyrometru po rozpuštění fosfolipidové membrány tukových kuliček (tzv. globulí) působením kyseliny sírové (dle Gerbera, 90–91 %) za podmínek metody.

b) Princip úlohy

Metoda butyrometrická je vhodná jako orientační. Působením kyseliny sírové se rozruší bílkoviny, hlavně obaly tukových kuliček mléka, takže se tuk kvantitativně uvolní a následně oddělí odstředěním. Přídavkem amylalkoholu se dosáhne ostrého rozhraní. Odečte se objem tuku na stupnici butyrometru. Odečtený obsah tuku v g na 100 ml mléka je nutno přepočítat na obsah tuku v g na 100 g mléka podle vztahu (2).

Metoda je vhodná pro mléko; pro stanovení tuku ve smetaně nebo v sýru je nutné použít modifikované butyrometry.

Pozn.

Acidobutyrometrické stanovení obsahu tuku v mléce (podle Gerbera) se používá pro jeho hodnocení, při provádění mlékárenské kontroly a pro tzv. zkrácený rozbor mléka.

*Rozhodčí metodou pro stanovení obsahu tuku v mléce je gravimetrické stanovení dle **Röse-Gottlieba**, jehož podstatou metody je rozpuštění bílkovin amoniakem a následná extrakce tuku ethyletherem a petroletherem za přídavku ethanolu. Po oddestilování rozpouštědel a vysušení se stanoví hmotnost vyextrahovaných látek (považovaných za podmínky metody za tuk) v $g \cdot (100 g)^{-1}$ mléka.*

c) Postup práce

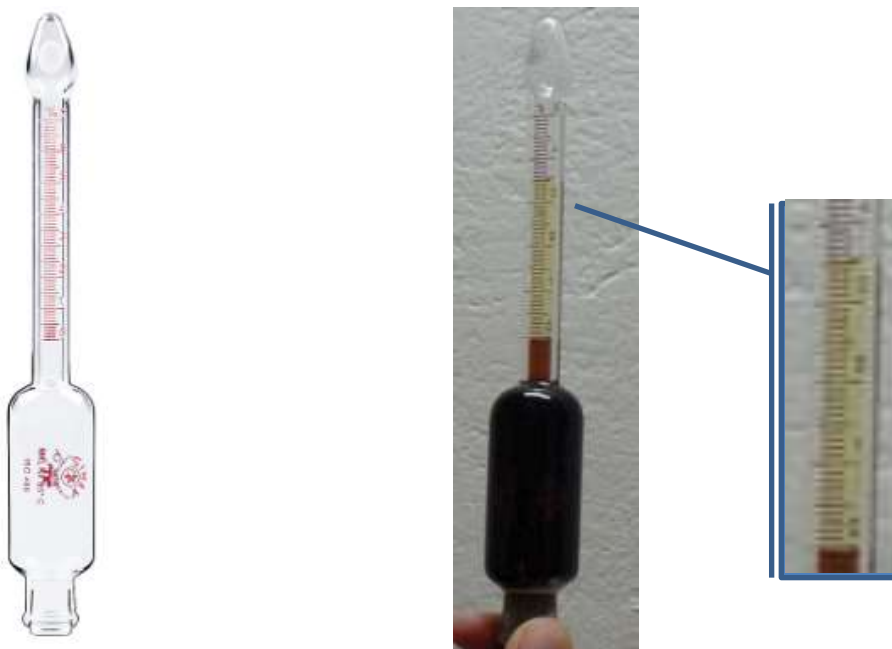
!!!PRACUJTE POUZE POD DOHLEDEM CVIČÍČÍHO!!!

- Do butyrometru odměřte poloautomatickou byretou 10 ml kyseliny sírové (dle Gerbera).
- Speciální mléčnou pipetou, po stěně butyrometru, nadávkuje 11 ml mléka tak opatrně, aby se obě kapaliny nesmísily (kyselina se tzv. navrství). Optimálně toho dosáhnete tak, že pipetu držíte svisle pod úhlem 45° a její špičku přiložíte ke stěně butyrometru v místě, kde hrdlo přechází v rozšířenou část, aby se nesmočilo samotné hrdlo butyrometru.
- Jakmile mléko z pipety vyteče, počká se asi 3 sekundy. Teprve poté odejměte pipetu od stěny, a hlavně zbytek mléka ve špičce pipety se nevyfukujte!
- Poté dávkovačem opatrně přidejte 1 ml amylalkoholu (zajistí ostré rozhraní).
- Butyrometr uzavřete pryžovou zátkou a jeho obsah prudce protřepejte, až jsou veškeré bílkoviny mléka rozpuštěny a nezůstávají žádné bílé částičky. Promíchejte převrácením butyrometru.

!!!POZOR, butyrometr se silně zahřívá!!!

- Posunováním zátky upravte stav hladiny v butyrometru tak, aby sahala až k nejvyššímu dílku stupnice, případně i několik dílků nad poslední rysku. Tím se zajistí, že po odečtení a vytemperování bude celý sloupec tuku v rozmezí stupnice a zamezí se chybám, které mohou vzniknout, je-li tukový sloupec po odstředění příliš posunován.

- Po protřepání butyrometru je ještě za horka vložte zátku dolů do odstředivky, vyhřáté na 65-68 °C, a odstřed'ujte je 5 minut při 1100 otáčkách za minutu. Butyrometry je nutno rozložit v odstředivce tak, aby zatížení odstředivky bylo rovnoměrné.
- Po odstředění butyrometr vyjměte a mírným pohybem zátky spodní konec tukového sloupce posuňte tak, aby se kryl s nulou nebo nejbližší ryskou, která označuje celé procento tuku.
- Na stupnici butyrometru se odečtete nejnižší bod menisku tukového sloupce s přesností na ½ nejmenšího dílku stupnice (viz **Obr. 6**) – zjistíte tak **obsah tuku v g·(100 ml)⁻¹ mléka**. Při odečítání je nutno držet butyrometr ve svislé poloze, meniskus ve výši očí, a postupovat bez zbytečných prodlev (musí být zachována teplota 65 ± 2 °C).
- POZOR!!! Pokud dojde při posouvání tukového sloupce k jeho porušení rozstříknutím nebo odtržením kapek tuku, je nutno butyrometr znovu vyhřát a odstředit, aby došlo k opětovnému spojení tuku.



Obr. 6: Butyrometr na mléko, butyrometr při odečítání výšky tukového sloupce (zde značí hodnotu 3,5 g tuku ve 100 ml mléka)

d) Zpracování výsledků a vyhodnocení

- Odečtená hodnota značí **obsah tuku T v g·(100 ml)⁻¹ mléka**, s přesností na **2 desetinná místa**. Na hodnotu v **g·(100 g)⁻¹ mléka** je třeba obsah přepočítat podle vztahu (12). Výpočet ověřte dle **Tab. 6**.

$$T = \frac{T_B + 0,04}{1,04}$$

(12)

kde T_B obsah tuku stanovený butyrometricky [$\text{g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$ mléka]
 T obsah tuku [$\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$]

Tab. 6: Korekce obsahu tuku na hmotnostní procenta při použití 11ml pipety na mléko (ČERNÁ a kol.)

Hodnota odečtená na butyrometru [%]	Korekce na hmotnostní % tuku v mléce
0,11 – 0,36	+0,03
0,37 – 0,61	+0,02
0,62 – 0,87	+0,01
0,88 – 1,13	0
1,14 – 1,39	-0,01
1,40 – 1,65	-0,02
1,66 – 1,91	-0,03
1,92 – 2,17	-0,04
2,18 – 2,43	-0,05
2,44 – 2,69	-0,06
2,70 – 2,95	-0,07
2,96 – 3,21	-0,08
3,22 – 3,47	-0,09
3,48 – 3,73	-0,10
3,74 – 3,99	-0,11
4,00 – 4,25	-0,12
4,26 – 4,51	-0,13
4,52 – 4,77	-0,14
4,78 – 5,03	-0,15
5,04 – 5,29	-0,16
5,30 – 5,55	-0,17
5,56 – 5,81	-0,18
5,82 – 6,07	-0,19
6,08 – 6,33	-0,20
6,34 – 6,59	-0,21
6,60 – 6,85	-0,22
6,86 – 7,11	-0,23

e) Zpracování výsledků a vyhodnocení

Průměrný obsah tuku v syrovém kravském mléce je **3,8 %**. Obsah tuku v závislosti na standardizaci mléka se může pohybovat v rozmezí až **0,05 – 5,6 %**.

3. INFORMATIVNÍ ZJIŠTĚNÍ KYSELOSTI MLÉKA

a) Teorie

Kyselost mléka je dána jednak obsahem organických kyselin, hlavně kyseliny mléčné, dále pak obsahem a složením přítomných minerálních látek a bílkovin. Patří mezi základní ukazatele uváděné jakostními normami. Metody informativního zjištění kyselosti mléka (tzv. orientační rychlometody) slouží k rychlému a orientačnímu stanovení kyselosti mléka např. při jeho přejímce.

Vyšší kyselost mléka může indikovat jeho vyšší stáří nebo nedodržení skladovacích podmínek. Naopak zásaditější hodnoty často ukazují na výskyt mastitidy (zánětu vemene).

3.1 MĚŘENÍ INDIKÁTOROVÝMI PAPÍRKY

b) Princip:

Indikátorový papírek se používá k rychlému orientačnímu stanovení kyselosti mléka při jeho dalším zpracování nebo výkupu. *Laktotest* je indikátorový papírek se čtyřmi barevnými srovnávacími pruhy a jedním pruhem indikátorovým (obvykle nejširší, žlutě zbarvený proužek, viz **Obr. 7**). Podle zbarvení měrného proužku s barevným indikátorem se určuje kyselost mléka.

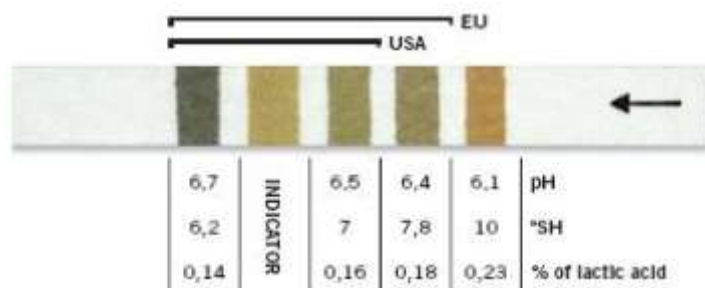
Existují indikátorové papírky od různých dalších firem, vyhodnocení se provádí dle přiložených návodů na krabici indikátorových papírků

c) Postup:

- Indikátorový papírek ponořte do testovaného mléka na 1 sekundu tak, aby všechny pruhy byly ponořené.
- Po vyjmutí porovnejte vybarvení indikátorového proužku s ostatními barevnými proužky na papírku.

d) Vyhodnocení:

Stanoví se shodnost vybarvení. Hodnota kyselosti mléka v jednotkách pH, SH (tj. ml 0,025 mol·l⁻¹ NaOH) nebo v % kyseliny mléčné se zjistí porovnáním zbarvení papírku s tabulkou uvedenou na obalu.



Obr. 7: LAKTOTEST – přirovnání indikátorového papírku ke stupnici na obalu. Hledáme zbarvení shodné se zbarvením indikátoru. V tomto případě nejvíce odpovídá poslední sloupeček – testované mléko má tedy pH = 6,1, SH = 10 a obsahuje 0,23 % kyseliny mléčné).

3.2 ZKOUŠKA VAREM

b) Princip:

Čerstvé mléko se varem nesráží. Je to způsobeno přítomností termostabilního kaseinu. Pokud ale dojde ke zvýšení kyselosti mléka (nad 9,5 SH), naruší se povrchové vrstvy kaseinových micel, dojde k uvolnění kaseinu a jeho denaturaci. Kyselé mléko se proto varem sráží. Rovněž i mlezivo nebo mléko od dojnic se záněty mléčné žlázy dává podobné výsledky.

c) Postup:

- Do zkumavky odměřte asi 5 ml mléka.
- Za stálého protřepávání zahřejte k varu.

d) Vyhodnocení:

Pozorujte případnou změnu konzistence mléka. Podle vzhledu sraženiny lze usuzovat kyselost mléka. U mléka s kyselostí 9,5 SH se tvoří jemné vločky a při kyselosti 12 SH se mléko sráží. Čerstvé mléko se varem nesráží.

Pozn.:

Zkouška není zcela přesná, protože se varem sráží nebo vločkovatí právě i mlezivo nebo mléko s přísadkou mleziva a mléko nemocných dojnic.

3.3 LIHOVÁ ZKOUŠKA

b) Princip:

Kyselé mléko se přidavkem zředěného ethanolu sráží. Smícháním mléka s ethanolem lze vytřídit mléka nakyslá, která se za podmínek zkoušky sráží.

Pozn.:

Zkouška není zcela přesná, poněvadž se takto sráží i mléka stará, respektive mléko s přidavkem mleziva nebo mléka od dojnic se záněty mléčné žlázy. Tímto způsobem se proto třídí i mléko s normálními hodnotami titrační kyselosti, které by se v důsledku změněného složení sráželo při sterilaci mléčných výrobků. V tomto případě označujeme zkoušku jako zkoušku termostability.

c) Postup:

- Do zkumavky odměřte asi 5 ml mléka.
- Přidejte 5 ml 68% ethanolu, smíchejte a pozorujte případnou tvorbu vloček nebo srážení.

Pozn.:

Citlivost reakce můžeme zvýšit smícháním mléka s ethanolem v poměru 1:2 (pro rozpoznání mlék s počínajícím kysnutím).

d) Vyhodnocení:

Čerstvé mléko zůstane beze změny. Mléko s kyselostí vyšší než 9 SH zanechává na stěnách zkumavky jemné vločky nebo při vyšší kyselosti klky až sraženinu. Směs mléka s ethanolem (1:2) se sráží již od kyselosti 8 SH. Platí, že při vyšší kyselosti mléka se tvoří i větší klky.

Pozn.:

Zkouška není zcela přesná, protože se tímto způsobem sráží nebo vločkovatí i mlezivo nebo mléko s přidavkem mleziva a mléko nemocných dojnic.

3.4 ALIZAROLOVÁ ZKOUŠKA (PODLE MORRESE)

b) Princip:

Kyselost mléka se posuzuje podle změny barvy a vzhledu mléka po přidání alizarolového roztoku (ethanolový roztok alizarolu, zneurealizovaný NaOH), pH 5,8 – 6,3). Nakyslé až kyselé mléko mění barvu a tvoří vločky.

c) Postup:

- Do zkumavky odměřte 2 ml vzorku mléka.
- Přidejte 2 ml roztoku alizarolu a promíchejte.
- Sledujte vznik barvy i tvorbu sraženiny.

d) Vyhodnocení:

Pozorujte vznik barvy (**Obr. 3**) a tvorbu sraženiny, sledované jevy porovnejte s příloženou tabulkou (**Tab. 7**).

Tab. 7: Zjišťování kyselosti mléka alizarolem podle Morrese (ČERNÁ a kol.)

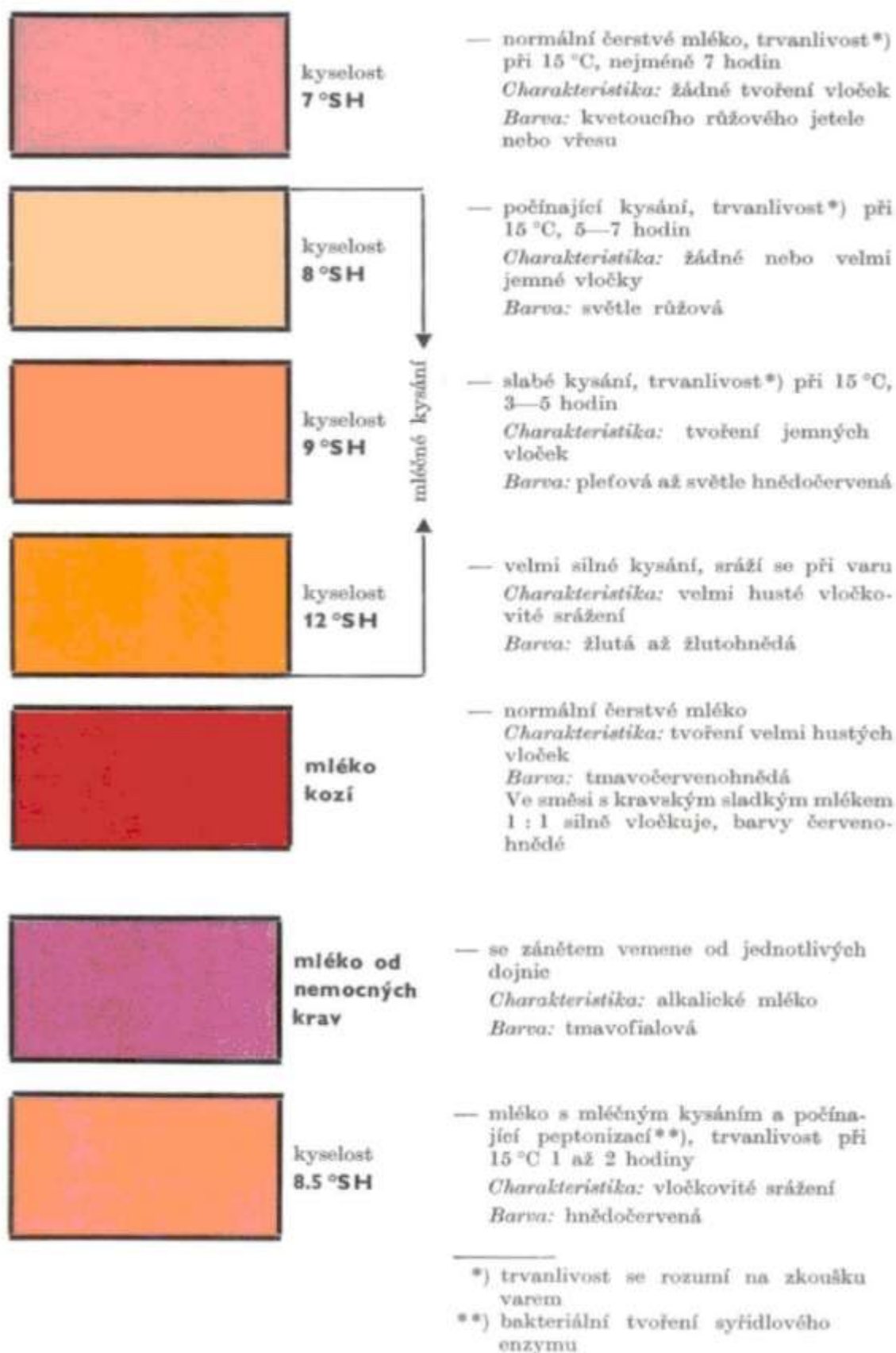
Mléko	SH	Konzistence	Barva
Čerstvé	7	nesráží se, hladce tekuté	růžová až vřesová
Počínající kysání	8	žádné nebo velmi jemné vločky	světle růžová
Slabé kysání	9	jemné vločky	pleťová až světle hnědočervená
Velmi silné kysání	12	husté vločkovité srážení až klkovitá sraženina	žlutá až žlutohnědá
	>20	klkovitá směs	světle žlutá
Alkalické mléko		nesráží se	fialová

Při této zkoušce je možné rozlišit i mléka se sníženou kyselostí, která bývají alkalická a alizarolem se barví tmavofialově a tvoří sraženinu. Jsou to mléka nemocných dojníc, mlezivo a mléka neutralizovaná.

Pozn.:

Zkouška je citlivější než zkouška lihová, u mlék s kyselostí 7,8 – 9 SH dává spolehlivé výsledky s přesností 0,2 – 0,5 SH. Při vyšších kyselostech spolehlivost klesá.

Kozí mléko poskytuje tmavočervené zbarvení s hustými vločkami.



Obr. 8: Barevné změny mléka po přidání alizarolu s odpovídající kyselostí mléka v SH

4. STANOVENÍ TITRAČNÍ KYSELOSTI MLÉKA

a) Teorie:

Kyselost mléka lze vyjádřit jako **titrační kyselost** (stanovení titrací kyselých reagujících složek mléka odměrným roztokem hydroxidu sodného) nebo **aktivní kyselost** – hodnoty pH (koncentrace vodíkových iontů). V běžné provozní praxi se používá pouze titrační vyjádření, poněvadž pH u mléka od zdravých dojnic velmi málo kolísá.

Ke stanovení kyselosti mléka jsou využívány i **orientační metody** – měření indikátorovými papírky, zkouška varem, lihová a alizarolová zkouška.

b) Princip:

Podstatou metody je neutralizace kyselých reagujících látek mléka roztokem hydroxidu sodného (NaOH), za přídavku fenolftaleinu do růžového zbarvení.

Kyselost čerstvého mléka je způsobena přítomností kyselých reagujících složek – přítomností fosfatů, citrátů. Narůstající kyselost mléka je způsobena rozkladem laktózy na kyselinu mléčnou působením mikroorganismů.

Titrační kyselost se tradičně udává v jednotkách dle Soxhlet-Henkela (SH), která vyjadřují počet ml NaOH o koncentraci $0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ potřebných na neutralizaci 100 ml mléka při použití fenolftaleinu jako indikátoru.

Pro vyjádření těchto jednotek v soustavě SI je možné použít následující vztah:

$$1 \text{ SH} = 1 \text{ ml NaOH } (c = 0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}; \text{ vztaženo na } 100 \text{ ml mléka}) =$$

$$= 2,5 \text{ mmol H}^+ \cdot \text{l}^{-1} =$$

$$= 2,5 \text{ mmol kyseliny mléčné} \cdot \text{l}^{-1} =$$

$$= 0,02252 \text{ g kyseliny mléčné (vztaženo na } 100 \text{ ml mléka)}$$

c) Postup:

- Do titrační baňky odpipetujte 50 ml mléka.
- Přidejte 2 ml roztoku fenolftaleinu (2% roztok v ethanolu).
- Titrujte roztokem hydroxidu sodného ($0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) do trvalého slabě růžového zbarvení (stejná intenzita zbarvení jako u srovnávacího roztoku).

d) Výpočet:

Titrační kyselost SH (Soxhlet-Henkel) se vypočítá podle vztahu (13):

$$SH = 2 \cdot V \cdot f \quad [SH \text{ nebo } \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}]$$

(13)

kde V spotřeba odměrného roztoku NaOH ($0,25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) na titraci 50 ml vzorku, v ml
 f faktor odměrného roztoku NaOH ($0,25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)

Výsledek se zaokrouhlí na 0,05 SH.

e) Vyhodnocení:

Zavedení, soustavného měření kyselosti mléka v SH bylo umožněno sledovat poměrně jednoduchým způsobem důležitý faktor jakosti v mlékárenském průmyslu.

- Hodnota pH čerstvého mléka je v rozmezí **6,5–6,7**.
- Kyselost pod 4 SH – indikuje silný katar nebo katar vemene; barva mléka je vodově bílá.
- Kyselost 4–5 SH – mléko trpké, nažlукlé, vodnaté, barvy mléčné nebo namodralé, nesráží se syřidlem.
- Kyselost 5–6 SH – mléko je jen slabě nažlукlé a nakyslé, barvy namodralé, sráží se zřídka syřidlem.
- Kyselost málo přes 6 SH – mléko dosud trochu natrpklé a nažlукlé, pochází od starodojných krav; syřidlem se srazí zřídka. U mléka kyselého je hodnota pH nižší než 6,3. U mléka nakyslého je pH 6,3–6,4.
- Kyselost 6,5–7,5 SH – normální mléko.
- Kyselost 8–9 SH – mléko často od dojníc po otelení, sráží se dobře a rychle.
- Kyselost 9 a více – upozorňuje na příliš mladé mléko se značným obsahem mleziva (mlezivo má až 18 SH) nebo na akutní zánět vemene.
- Kyselost nad 6,8 SH však může poukazovat i na mléka od nemocných dojníc, mléka porušená přidáním vody, mléka procházející proteolytickým rozkladem nebo mléka s přísádkem alkálií.

5. DOKLADNÁ ZKOUŠKA NA DUSIČNANY

a) Teorie

Jedná se o laboratorní zkoušky, které jsou doložením (důkazem) porušení mléka. To se zjišťuje podle změn složení a vlastností oproti normálnímu složení mléka. Porušení mléka lze usoudit stanovením refrakce mléčného séra (metodou dle Ackermanna), kdy přidavkem 1 % vody se sníží refrakce séra o 0,25 dílku ponorného refraktometru. Další možností je stanovení bodu mrznutí mléka. Vychází se z toho, že požadovaná hodnota bodu mrznutí mléka je $\geq -0,520\text{ }^{\circ}\text{C}$ a pokud je k mléku přidána voda, dojde k jeho zvýšení (přídavek 1 % vody zvýší bod mrznutí cca o $0,006\text{ }^{\circ}\text{C}$). Dokladnou zkouškou na dusičnany se sleduje přítomnost dusičnanů v mléce, neboť ta může poukazovat na porušení mléka přidáním vody – obsahuje-li přidaná voda dusičnany, dostanou se tyto také do mléka, avšak v množství velmi rozdílném, podle toho, kolik jich přidaná voda obsahuje a kolik ji bylo k mléku přidáno.

b) Princip:

Zkouška je založena na barevných reakcích, vznikajících oxidací některých organických sloučenin přítomnými dusičnany.

c) Postup:

- Do zkumavky opatrně nalijte 5 ml roztoku difenylaminu ve zředěné kyselině sírové (bez dusíku).
- Po stěně zkumavky **opatrně** přilévejte 5 ml mléka (**navrstvit, nemíchat!**).
- Nechte v klidu stát, maximálně 30 minut – v přítomnosti dusičnanů vznikne na rozhraní do 30 minut modrý proužek.

d) Vyhodnocení:

Pozorujte zbarvení rozhraní:

→ modrý proužek – pozitivní výsledek (tj. přítomnost dusičnanů)

→ bez modrého proužku – negativní výsledek

Zkouška je velmi citlivá, reakci je však na závadu přítomnost peroxidu vodíku, dvojchromanu draselného a solí železitých, poněvadž dávají stejné zbarvení jako dusičnany.

V případě pozitivního výsledku zkoušky není porušení mléka přidáním vody ještě úplně prokázáno. Dusičnany se mohou do mléka dostat i jiným způsobem, například při zkrmování zelené píče.

Obsah dusičnanů v pitných vodách je rozdílný. Může se proto stát, že i u mléka porušeného vodou bude výsledek zkoušky negativní. Pozitivní zkouška může však podepřít jiné dokladné zkoušky, které na zvodnění mléka poukazují.

6. STANOVENÍ OBSAHU SUŠINY, SUŠINY TUKUPROSTÉ, TUKU V SUŠINĚ VÝPOČTEM

a) Teoretický úvod

Sušina představuje bezvodý podíl hmoty výrobku, zbývající po vysušení při teplotě 102 ± 2 °C do konstantní hmotnosti za podmínek metody, zahrnující všechny komponenty s výjimkou vody. Podle požadované přesnosti výsledku se obsah sušiny stanovuje buď vážkově (tj. gravimetricky = rozhodčí metoda) nebo výpočtem. Sušina mléka, z ní vypočtená tukuprostá sušina a obsah tuku v sušině jsou základními hodnotami pro posouzení mléka, ke zjištění jeho případného porušení a pro určení jeho technologické kvality.

Obsah sušiny v mléce se pohybuje mezi 12 a 13 %. Obsah sušiny tukuprosté v mléce je více než 8,5 %. Obsah tuku v sušině plnotučného mléka se pohybuje okolo 30 %.

➤ STANOVENÍ OBSAHU SUŠINY VÝPOČTEM

b) Princip

Obsah sušiny mléka stanovený výpočtem je podíl všech složek mléka, kromě volné vody, zjištěný výpočtem z měrné hmotnosti a z obsahu tuku v mléce. Výsledek se vyjádří v g na 100 g mléka (hmotnostní %).

c) Výpočet

Obsah **celkové sušiny S [%]** se vypočte podle vzorce (14):

$$S = 1,21 \cdot T + 0,25 \cdot {}^{\circ}L_{20} + 0,82 \quad (14)$$

kde T obsahu tuku v $\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$ (hmotnostní %)
 ${}^{\circ}L_{20}$ stupně laktodenzimetrické při 20 °C

Výpočty hmotnostních procent se provádí na dvě desetinná místa se zaokrouhlením na 0,05 %.

d) Vyhodnocení

Obsah sušiny v mléce se má pohybovat **mezi 12 a 13 %**.

➤ STANOVENÍ OBSAHU SUŠINY TUKUPROSTÉ VÝPOČTEM

b) Princip

Sušina tukuprostá (STP, %) je beztuký podíl mléčné sušiny.

c) Výpočet

Hodnota tukuprosté sušiny se stanoví výpočtem – buď odečtením tuku od celkové sušiny, nebo výpočtem z hustoty a obsahu tuku.

Sušina tukuprostá STP [%] se vypočítá podle vztahu (15):

$$STP = S - T \quad (15)$$

kde S obsah sušiny, stanovený gravimetricky [$\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$; hm. %]

T obsah tuku, stanovený acylbutyrometrickou metodou dle Gerbera [$\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$]

- Sušinu tukuprostá STP [%] lze vypočítat i podle vztahu (16):

$$STP = 0,21 \cdot T + 0,25 \cdot {}^{\circ}L_{20} + 0,82 \quad (16)$$

kde T obsah tuku, stanovený acylbutyrometrickou metodou dle Gerbera [$\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$]

${}^{\circ}L_{20}$ stupně laktodenzimetrické při 20 °C

- Hodnota STP se vyjadřuje v hmotnostních % (g ve 100 g mléka).
- Pro kontrolu výpočtu tukuprosté sušiny mléka podle vzorce (6) lze využít **Tab. 8 a 9**.

e) Vyhodnocení

Obsah sušiny tukuprosté v mléce je nejméně **8,5 %**.

Tab. 8: Hodnota výrazu $0,21 \cdot T$ (pro $T = 2,00$ až $5,09$ %) ve vzorci (6) (KNĚŽ)

hmot. % tuku T [hm. %]	setiny %									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2,0	0,420	0,422	0,424	0,426	0,428	0,431	0,433	0,435	0,437	0,439
2,1	0,441	0,443	0,445	0,447	0,449	0,452	0,454	0,456	0,458	0,460
2,2	0,462	0,464	0,466	0,468	0,470	0,473	0,475	0,477	0,479	0,481
2,3	0,483	0,485	0,487	0,489	0,491	0,494	0,496	0,498	0,500	0,502
2,4	0,504	0,506	0,508	0,510	0,512	0,515	0,517	0,519	0,521	0,523
2,5	0,525	0,527	0,529	0,531	0,533	0,536	0,538	0,540	0,542	0,544
2,6	0,546	0,548	0,550	0,552	0,554	0,557	0,559	0,561	0,563	0,565
2,7	0,567	0,569	0,571	0,573	0,575	0,578	0,580	0,582	0,584	0,586
2,8	0,588	0,590	0,592	0,594	0,596	0,599	0,601	0,603	0,605	0,607
2,9	0,609	0,611	0,613	0,615	0,617	0,620	0,622	0,624	0,626	0,628
3,0	0,630	0,632	0,634	0,636	0,638	0,641	0,643	0,645	0,647	0,649
3,1	0,651	0,653	0,655	0,657	0,659	0,662	0,664	0,666	0,668	0,670
3,2	0,672	0,674	0,676	0,678	0,680	0,683	0,685	0,687	0,689	0,691
3,3	0,693	0,696	0,697	0,699	0,701	0,704	0,706	0,708	0,710	0,712
3,4	0,714	0,716	0,718	0,720	0,722	0,725	0,727	0,729	0,731	0,733
3,5	0,735	0,737	0,739	0,741	0,743	0,746	0,748	0,750	0,752	0,754
3,6	0,756	0,758	0,760	0,762	0,764	0,767	0,769	0,771	0,773	0,775
3,7	0,777	0,779	0,781	0,783	0,785	0,788	0,790	0,792	0,794	0,796
3,8	0,798	0,800	0,802	0,804	0,806	0,809	0,811	0,813	0,815	0,817
3,9	0,819	0,821	0,823	0,825	0,827	0,830	0,832	0,834	0,836	0,838
4,0	0,840	0,842	0,844	0,846	0,848	0,851	0,853	0,855	0,857	0,859
4,1	0,861	0,863	0,865	0,867	0,869	0,872	0,874	0,876	0,878	0,880
4,2	0,882	0,884	0,886	0,888	0,890	0,893	0,895	0,897	0,899	0,901
4,3	0,903	0,905	0,907	0,909	0,911	0,914	0,916	0,918	0,920	0,922
4,4	0,924	0,926	0,928	0,930	0,932	0,935	0,937	0,939	0,941	0,943
4,5	0,945	0,947	0,949	0,951	0,953	0,956	0,958	0,960	0,962	0,964
4,6	0,966	0,968	0,970	0,972	0,974	0,977	0,979	0,981	0,983	0,985
4,7	0,987	0,989	0,991	0,993	0,995	0,998	1,000	1,002	1,004	1,006
4,8	1,008	1,010	1,012	1,014	1,016	1,019	1,021	1,021	1,025	1,027
4,9	1,029	1,031	1,033	1,035	1,037	1,040	1,042	1,044	1,046	1,048
5,0	1,050	1,052	1,054	1,056	1,058	1,061	1,063	1,065	1,067	1,069

Tab. 9: Hodnota výrazu $0,25 \cdot L_{20} + 0,82$ (pro $L_{20} = 15$ až 35) ve vzorci (6) (KNĚZ)

L (20 °C)	desetiny L_{20}									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
15	4,570	4,595	4,620	4,645	4,670	4,695	4,720	4,745	4,770	4,795
16	4,820	4,845	4,870	4,895	4,920	4,945	4,970	4,995	5,020	5,045
17	5,070	5,095	5,120	5,145	5,170	5,195	5,220	5,245	5,270	5,295
18	5,320	5,345	5,370	5,395	5,420	5,445	5,470	5,495	5,520	5,545
19	5,570	5,595	5,620	5,645	5,670	5,695	5,720	5,745	5,770	5,795
20	5,820	5,845	5,870	5,895	5,920	5,945	5,970	5,995	6,020	6,045
21	6,070	6,095	6,120	6,145	6,170	6,195	6,220	6,245	6,270	6,295
22	6,320	6,345	6,370	6,395	6,420	6,445	6,470	6,495	6,520	6,545
23	6,570	6,595	6,620	6,645	6,670	6,695	6,720	6,745	6,770	6,795
24	6,820	6,845	6,870	6,895	6,920	6,945	6,970	6,995	7,020	7,045
25	7,070	7,095	7,120	7,145	7,170	7,195	7,220	7,245	7,270	7,295
26	7,320	7,345	7,370	7,395	7,420	7,445	7,470	7,495	7,520	7,545
27	7,570	7,595	7,620	7,645	7,670	7,695	7,720	7,745	7,770	7,795
28	7,820	7,845	7,870	7,895	7,920	7,945	7,970	7,995	8,020	8,045
29	8,070	8,095	8,120	8,145	8,170	8,195	8,220	8,245	8,270	8,295
30	8,320	8,345	8,370	8,395	8,420	8,445	8,470	8,495	8,520	8,545
31	8,570	8,595	8,620	8,645	8,670	8,695	8,720	8,745	8,770	8,795
32	8,820	8,845	8,870	8,895	8,920	8,945	8,970	8,995	9,020	9,045
33	9,070	9,095	9,120	9,145	9,170	9,195	9,220	9,245	9,270	9,295
34	9,320	9,345	9,370	9,365	9,420	9,445	9,470	9,495	9,520	9,545
35	9,570	9,595	9,620	9,645	9,670	9,695	9,720	9,745	9,770	9,795

➤ STANOVENÍ OBSAHU TUKU V SUŠINĚ

b) Princip

Tuk v sušině (TVS) je podíl tuku z celkové sušiny mléka vyjádřený v procentech. Obsah tuku v sušině není údajem o absolutním podílu tuku v mléce – ve skutečnosti je totiž tuk v mléce méně.

c) Výpočet

Obsah tuku v sušině se zjistí se výpočtem z obsahu sušiny a obsahu tuku a vyjádří se v hmotnostních %.

Obsah tuku v sušině TVS [%] se vypočítá podle vztahu (17):

$$TVS = \frac{T \cdot 100}{S}$$

(17)

kde TVS sušina tukuprostá [hm. %]
T obsah tuku [g·(100 g)⁻¹; hm. %]
S obsah sušiny [g·(100 g)⁻¹; hm. %]

f) Vyhodnocení

Obsah tuku v sušině TVS [%] plnotučného mléka se pohybuje okolo **30 %**.

7. PORUŠENÍ MLÉKA

a) Teorie

Za porušení mléka se považuje každá změna v jeho původním složení, vyjma změn, vyplývajících ze standardizace a technologických postupů při ošetření a zpracování na finální mlékárenský výrobek.

Porušení mléka může být způsobeno úmyslnými nebo i neúmyslnými zásahy, případně zkrmováním nevhodných krmiv apod. V praxi se vyskytuje porušení syrového mléka přídavkem vody, syrovátky, podmáslí, odstředěného mléka, případně mléka jiného než kravského; dále se za porušení považuje i odebrání tuku (smetany), neutralizace a přídavek látek, které by měly zakrývat zhoršenou jakost výrobku.

Porušení mléka – přehled:

- přidáním vody do mléka
- odebráním tuku z mléka nebo přídavkem odstředěného mléka
- kombinované porušení (přidání vody i odebrání tuku mléka)
- přítomnost inhibičních látek v mléce
 - léčiva – antibiotika
 - zbytky čistících a dezinfekčních prostředků
 - mykotoxiny (ze silně zaplísňených krmiv)
 - konzervační a neutralizační látky
 - pesticidy, insekticidy, těžké kovy
- přídavek mleziva nebo mastitidního mléka

Porušení se zjišťuje podle změn složení a vlastností oproti normálnímu složení. Mléko od individuálních dojnic a mléko směsné (bazénové, cisternové) má rozdílné složení. Bezpečné závěry lze činit porovnáním s tzv. stájovým či odpovídajícím referenčním vzorkem. U mlékárensky ošetřeného mléka se berou v potaz údaje příslušné jakostní normy. Porušení přídavkem jiných mlék se zjišťuje chemickými či imunologickými testy.

Nejčastějším případem úmyslného porušení mléka je přídavek vody do mléka, odebrání tuku (nebo přidání odstředěného mléka) nebo kombinované porušení mléka, tj. jak přídavek vody, tak i přídavek odstředěného mléka nebo odebrání tuku.

7.1 PORUŠENÍ MLÉKA PŘIDÁNÍM VODY, ODEBRÁNÍM TUKU (KOMBINOVANÉ PORUŠENÍ)

b) Princip:

Zjištění, o jaký druh z těchto porušení se jedná je prováděno na základě tzv. zkráceného rozboru mléka. Základními kritérii pro rozhodnutí je **sušina tukuprostá** a **obsah tuku v sušině**. **Tyto získáme výpočtem z hodnoty měrné hmotnosti a obsahu tuku v mléce**. Na základě výsledků těchto stanovení lze vyhodnotit druh porušení mléka.

Tab. 10: Přehled hodnoty sušiny tukuprosté a obsah tuku v sušině u normálního a porušeného mléka (KNŽZ)

mléko	sušina tukuprostá STP [%]	obsah tuku v sušině TVS [%]
normální	vyšší než 8,50	min. 25 a vyšší
podezřelé ze sbírání	vyšší než 8,50	21–25
sbírané	vyšší než 8,50	nižší než 20
podezřelé ze zředění vodou	8,00 – 8,50	vyšší než 25
zředěné vodou	nižší než 8,00	vyšší než 25
podezřelé ze sbírání i zředění vodou	8,00 – 8,50	21–25
sbírané a zředěné vodou	nižší než 8,00	nižší než 20

c) Postup:

- Stanovte měrnou hmotnost mléka, vyjádřete ji ve stupních laktodenzimetrických při 20 °C.
- Stanovte obsah tuku acidobutyrometricky, hodnotu vyjádřete v $\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$.
- Vypočtete obsah sušiny tukuprosté a obsah tuku v sušině.
- Zjistěte druh porušení mléka porovnáním hodnot tukuprosté sušiny a tuku v sušině (viz dále).

➤ PŘÍDAVEK VODY DO MLÉKA

Přidáním vody k mléku se sníží jeho hustota pod hodnotu $1,0285 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, obsah tuku, sušina tukuprostá a index refrakce séra. Zvyšuje naopak bod mrznutí. Každým 1 % přidané vody se sníží hustota mléka ρ_{20} asi o $0,0003 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, sušina tukuprostá téměř o 0,1 %, refrakce séra podle Ackermanna o 0,25 dílku na ponorném refraktometru a bod mrznutí mléka se zvýší cca o $0,006 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Hodnoty při porušení mléka přídavkem vody:

sušina tukuprostá **STP < 8,5 %**

tuk v sušině **TVS > 25 %**

Množství přidané vody x_1 [%]

$$x_1 = \frac{100 (STP_1 - STP_2)}{STP_1}$$

(18)

Množství přidané vody na 100 dílů mléka původního x_2 [%]

$$x_2 = \frac{100 (STP_1 - STP_2)}{STP_2}$$

(19)

kde STP_1 obsah sušiny tukuprosté u neporušeného mléka [%] (stájová hodnota)
 STP_2 obsah sušiny tukuprosté u mléka porušeného [%]

➤ ODEBRÁNÍ TUKU NEBO PŘÍDAVEK ODSTŘEDĚNÉHO MLÉKA

Mléko, jemuž byl odebrán tuk částečným nebo úplným odsmetaněním (sebráním, odstředěním), má vyšší hustotu a také vyšší sušinu tukuprostou než původní mléko, z něhož byl tuk odebrán. Snížení obsahu tuku o 1 % zvýší hustotu asi o $1 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ a sušinu tukuprostou asi o 0,09 %. Sníží se i % tuku v sušině mléka, avšak hustota mléčného séra se nezmění.

Obsah tuku kolísá ze všech složek mléka nejvíce, proto důkaz odebrání menšího množství tuku je značně obtížnější než důkaz menšího porušení vodou a nejspolehlivěji může být proveden jen při použití stájového vzorku. Je-li u smíšeného mléka rozdíl proti podezřelému nejméně 0,3 % tuku a u obsahu tuku v sušině nejméně 1 %, je porušení prokázáno. U mléka individuálních dojníc se

mohou uplatnit i jiné okolnosti, za nichž dochází ke snížení tučnosti, např. náhlá změna krmení, neuropsychické vlivy (i když tyto působí jenom přechodně).

Hodnoty při porušení mléka odebráním tuku nebo přidavkem odstředěného mléka:

sušina tukuprostá STP > 8,5 %

tuk v sušině TVS < 25 %

Množství odebraného tuku y_1 [%]

$$y_1 = \frac{100 (t_1 - t_2)}{t_1}$$

(20)

Množství přidaného odstředěného mléka na 100 l mléka původního y_2 [%]

$$y_2 = \frac{100 (t_1 - t_2)}{t_2}$$

(21)

kde t_1 obsah tuku v neporušeném mléce [%] (stájová hodnota)
 t_2 obsah tuku v mléce porušeném odsmetaněním [%]

➤ KOMBINOVANÉ PORUŠENÍ MLÉKA (PŘÍDAVEK VODY I ODEBRÁNÍ TUKU)

Současným porušením mléka přidáním vody i odebráním tuku se snižuje obsah tuku, sušiny tukuprosté a množství tuku v sušině. Hustota se pozmění různě podle způsobu porušení (přidání vody – snížení, odebrání tuku – zvýšení), ale může zůstat i nezměněna. 3 % přidané vody přibližně vyrovnají zvýšení hustoty, způsobené snížením tučnosti o 1 %.

Hodnoty při kombinovaném porušení:

sušina tukuprostá STP < 8,5 %

tuk v sušině TVS < 25 %

Celkové porušení mléka (CP) y [%]

$$y = \frac{100 (t_1 - t_2)}{t_1}$$

(22)

kde t_1 obsah tuku v neporušeném mléce [%] (stájová hodnota)

t_2 obsah tuku v mléce porušeném [%]

Množství přidané vody x [%]

$$x = \frac{100 (STP_1 - STP_2)}{STP_1}$$

(23)

kde STP_1 obsah tukuprosté sušiny neporušeného mléka [%] (stájová hodnota)

STP_2 obsah tukuprosté sušiny mléka porušeného [%]

Množství odebraného tuku z [%]

$$z = y - x$$

(24)

kde y celkové porušení mléka [%]

x přídavek vody do mléka [%]

IV.

DŮKAZ CIZORODÝCH A INHIBIČNÍCH LÁTEK V MLÉCE A KONTROLA KONCENTRACE ROZTOKŮ POUŽÍVANÝCH K SANITACI

1. Kysací schopnost mléka
 2. Důkaz přídavku konzervačních látek
 3. Důkaz přídavku peroxidu vodíku – zkouška s p-fenylendiaminem
 4. Důkaz přítomnosti dichromanů – zkouška s dusičnanem stříbrným
 5. Důkaz neutralizace mléka alkalicky reagujícími látkami – zkouška s bromthymolovou modří
 6. Důkaz přítomnosti dezinfekčních prostředků – průkaz chlorovaných dezinfekčních prostředků
 7. Ověření koncentrace dezinfekčních prostředků kyselých a zásaditých
-

1. KYSACÍ SCHOPNOST MLÉKA

a) Teorie

Kysací schopnost mléka je rozhodujícím kritériem, zda v mléce bude zajištěn dobrý růst přidaných čistých mlékařských kultur (ČMK), potřebných pro zdárný průběh všech mikrobiologických procesů. Mléko musí obsahovat všechny potřebné složky pro rozvoj přidaných kultur a nesmí obsahovat látky, které tento rozvoj potlačují (inhibiční látky).

V syrovém mléce jsou přítomné přirozené obranné látky, které inhibují i růst bakterií mléčného kvašení. Kromě specifických faktorů imunity mléčné žlázy působí i další nespecifické antimikrobiální látky, jako jsou imunoglobuliny, lysozym, laktoferin, systém laktoperoxidáza – sulfokyanid – peroxid vodíku, případně další bakteriostaticky působící proteiny, lipidy a organické kyseliny. V normálním mléce se nacházejí v nepatrném množství a inhibičně působí jen krátkou dobu (cca 2–3 hodiny). Zvýšené koncentrace byly pozorovány v mlezivu, mléce mastitidních dojnic, starodojnic dojnic, ale i po vakcinaci. V čerstvě nadojeném, syrovém mléce vykazují inhibiční efekt i leukocyty. Se zvyšujícím se počtem somatických buněk v mléce jeho inhibiční účinek stoupá a jsou inhibovány především streptokoky. Technologicky stejně nevhodné je i mléko od dojnic s metabolickými poruchami.

Dalším faktorem, který ovlivňuje kysací schopnost mléka, tj. být zkvašováno bakteriemi mléčného kvašení za tvorby kyselin, je hygiena získávání mléka, jeho následné ošetření po nadojení, doba a podmínky dalšího skladování. Kontaminující mikroflóra může spotřebovat důležité živiny pro ČMK a vyprodukované metabolity mohou vykazovat vůči ČMK inhibiční účinek.

Bez ohledu na mikrobiologickou kvalitu mléka dochází i vlivem chlazení k fyzikálně-chemickým změnám mléka (rozpad kaseinových micel, zmenšení stupně jejich hydratace, změna v rovnováze jednotlivých forem minerálních látek, zvyšování pH), které ve svém důsledku též vedou ke zhoršování podmínek pro růst bakterií mléčného kvašení.

Významné riziko (nejen technologické) představují cizorodé (kontaminující) inhibiční látky. Efektivní zemědělská výroba s sebou přináší používání různých chemických přípravků, a to jak při výrobě krmiv, tak i na farmách při chovu zvířat. Tyto látky se v důsledku nedodržování správných technologických postupů mohou dostat i do mléka. Z dodávek mléka k mlékárenskému ošetření k dalšímu zpracování musí být mléko s obsahem reziduí inhibičních, pesticidních a kontaminujících látek (RIL) vyloučeno. Pro tyto účely je legislativně stanovený **maximální reziduální limit** inhibičních látek (MRL – vyjádřený v $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Mléko pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků musí vykazovat výbornou kysací schopnost. K jejímu vyjádření se používá technologický test stanovení kysací aktivity, který zjišťuje, zda je mléko z hlediska svého složení a vlastností vhodným médiem pro růst a množení mléčných kultur.

b) Princip

Ke zjišťování kysací aktivity mléka jako substrátu se používá jogurtová kultura, která je na vnější vlivy z běžných mlékařských kultur nejcitlivější. Mléko se předem zahřívá na 85 °C, případně i výše, aby se vyloučil případný vliv přirozených inhibičních látek. Aktivita kultury se zjišťuje podle titrační kyselosti (dle Soxhlet-Henkela), dosažené po stanovené době kultivace.

c) Postup

- Do Erlenmeyerovy baňky odpipetujte 50 ml vzorku syrového mléka – ***již bylo provedeno***.
- Pasterujte vzorek ve vodní lázni po dobu 5 minut při teplotě 85 °C – ***již bylo provedeno a vychlazeno na 25 °C***.
- Zahřejte na teplotu 43 ± 2 °C a zaočkujte 2 ml jogurtové kultury, uzavřete hliníkovou folií a opatrně promíchejte.
- Inkubujte 3,5 hodiny v termostatu při teplotě 43 ± 2 °C.
- Stanovte titrační kyselost dle Soxhlet-Henkela:
 - ochlaďte na laboratorní teplotu
 - přidejte 2 ml roztoku fenolftaleinu (2 % v ethanolu)
 - titrujte odměrným roztokem NaOH ($0,25 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) do stálého, slabě růžového zbarvení (stejného, jako má připravený srovnávací roztok, tvořený 50 ml mléka a 1 ml roztoku síranu kobaltnatého)
- Současně, stejným postupem proveďte slepý pokus (s použitím mléka prostého inhibičních látek).

d) Výpočet

Kysací schopnost mléka **K** se vyjadřuje dosaženou titrační kyselostí (SH) podle podmínek metody, tzn. odpovídá množství 0,25 mol·l⁻¹ roztoku hydroxidu sodného v ml, spotřebovaného při titraci **100 ml** mléka (pracujete s 50 ml, proto je třeba zjištěnou titrační kyselost při výpočtu se vynásobit dvěma), viz vzorec (25).

$$K = 2 \times V \times f$$

[SH nebo mmol·l⁻¹]

(25)

kde V spotřeba odměrného roztoku NaOH (0,25 mol·l⁻¹) na titraci 50 ml vzorku [ml]
f faktor odměrného roztoku NaOH (0,25 mol·l⁻¹)

e) Vyhodnocení

- Slepý pokus – titrační kyselost má dosáhnout hodnoty minimálně 36 °SH (optimálně 40 °SH).
- Syrové mléko musí při kysací zkoušce dosáhnout hodnoty **minimálně 25 °SH**.
- Jestliže je titrační kyselost zkoušeného vzorku mléka o 10 °SH nižší než u slepého pokusu, je přítomnost inhibičních látek v mléce prokázána.

2. DŮKAZ PŘÍDAVKU KONZERVAČNÍCH LÁTEK

2.1 DŮKAZ PŘÍDAVKU PEROXIDU VODÍKU – ZKOUŠKA S P-FENYLENDIAMINEM

a) Teorie

Peroxid vodíku je chemická sloučenina, která vykazuje hlavně bělicí, oxidační a letální účinky na mikroorganismy. Používá se při dezinfekci. Peroxid vodíku však může být přidán do mléka i záměrně, pro zamaskování nehygienických podmínek při výrobě mléka a následně k prodloužení jeho trvanlivosti. Tyto kroky jsou však z legislativního hlediska nepřipustné.

b) Princip

Důkazovou reakcí přítomnosti peroxidu vodíku v mléce je tzv. peroxidázová zkouška s p-fenylendiaminem. Enzym peroxidáza, obsažený v syrovém mléku, odštěpuje z peroxidu vodíku kyslík, který dává s p-fenylendiaminem modré zbarvení (oxidace). Průkaz přídatku peroxidu vodíku se zde zjišťuje kvalitativně právě na základě změny zbarvení mléka po přidavku reagenčního činidla.

c) Postup

- Do zkumavky odpipetujte 5 ml zkoušeného mléka.
- Přidejte na špičku nože p-fenylendiaminové směsi (směs s pískem 1:1)
- Protřepejte.
- Po 2 minutách vyhodnoťte zbarvení mléka ve zkumavce.

d) Vyhodnocení

Jako pozitivní průkaz přítomnosti peroxidu vodíku v mléce se vyhodnocuje modré až šedomodré zbarvení.

2.2 DŮKAZ PŘÍTOMNOSTI DICHROMANŮ – ZKOUŠKA S DUSIČNANEM STŘÍBRNÝM

a) Teorie

Mléko jako potravina nesmí obsahovat konzervační látky, nicméně v určitých situacích bývá třeba vzorky mléka konzervovat. Nejlépe je to chladem, obvyklá je i konzervace přídavkem konzervačního prostředku. Ke vzorkům určeným k mikrobiologickému a senzorickému vyšetření a k některým chemickým zkouškám se zpravidla konzervační prostředek přidávat nesmí. V dnešní době existuje řada širokospektrálních konzervačních prostředků, účinných již ve velmi malých koncentracích; dříve byly čteně používány dichroman draselný a formaldehyd.

Konzervace vzorků se řídí základními pravidly:

- aplikaci při dodržení specifických podmínek doporučí zkušební laboratoř,
- konzervační činidlo neovlivní výsledky analýzy,
- z konzervovaného vzorku se nebude provádět zkoušení textury, chuti a vůně,
- druh a množství konzervačního prostředku bude nedílnou součástí specifikace vzorku.

b) Princip

Po přídavku dusičnanu stříbrného k mléku, konzervovaného dichromany, vznikne oranžovo-hnědé zbarvení.

c) Postup

- Do zkumavky odměřte 2 až 3 ml vzorku mléka.
- Přidejte stejný objem 2% roztoku AgNO_3 .
- Pozorujte vzniklé zbarvení.

d) Vyhodnocení

Přítomnost dichromanů se projeví oranžovo-hnědým zbarvením.

3. DŮKAZ NEUTRALIZACE MLÉKA ALKALICKY REAGUJÍCÍMI LÁTKAMI – ZKOUŠKA S BROMTHYMOLOVOU MODŘÍ

a) Teorie

Kyselost je ukazatelem čerstvosti mléka a jeho vhodnosti pro další zpracování, protože nakyslé, kyselé nebo alkalické mléko se obtížně zpracovává. Přirozená kyselost je způsobena kyselou povahou bílkovin (kaseinu) a přítomností fosforečnanů a citronanů. Získaná kyselost vzniká mikrobiální činností v mléce (rozkladem laktózy a vznikem zejména kyseliny mléčné).

Alkálie (např. soda – hydrogenuhličitan sodný) mohou být do mléka přidávány úmyslně, a to za účelem snížení kyselosti a zastření jeho zhoršení jakosti. Tyto alkálie pak přecházejí i do finálních výrobků.

Zbytky alkálií se mohou do mléka dostat i jako rezidua čisticích prostředků, použitých buď v prvovýrobě či při mlékárenském zpracování.

Existují i typy výrobků, u nichž je přídavek alkálií součástí technologického postupu – v tomto případě však musí být tento krok ošetřen příslušnou normou.

Faktory ovlivňující zvýšenou kyselost mléka:

- nedostatečná hygiena při získávání mléka (výskyt bakterií střevní mikroflóry → vznik kyseliny mléčné, octové, CO₂),
- nedostatečné ošetření mléka po nadojení, špatné chlazení (pomnožení bakterií mléčného kvašení → tvorba kyseliny mléčné),
- akutní zánět mléčné žlázy,
- příměs mleziva v mléce.

b) Princip

Průkaz neutralizace mléka se provádí pomocí přídavku barevných indikátorů a následné změně jejich zbarvení v závislosti na pH roztoku. Tímto způsobem je možné prokázat přídavek 0,1 % alkalicky reagujících látek (odpovídá neutralizaci mléka o kyselosti 2 až 4 SH, nižší přídavek je možné stanovit kolorimetricky podle obsahu neutralizované kyseliny mléčné).

c) Postup

- Do zkumavky odměřte 5 ml mléka.

- Opatrně, po stěně nakloněné zkumavky přidejte 5 kapek 0,04% roztoku bromthymolové modři.
- NETŘEPAT, opatrným nakláněním zkumavky se indikátor rozlije po celém povrchu bez rozmíchání.
- Zhodnoťte zbarvení na rozhraní.

d) Vyhodnocení:

U neporušeného mléka je rozhraní zbarveno žluto-zeleně.

Dle stupně neutralizace (tj. u mléka porušeného přidáním neutralizačního prostředku) se zbarvení mění přes zelenou, modrozelenou až k modré.

4. DŮKAZ PŘÍTOMNOSTI DEZINFEKČNÍCH PROSTŘEDKŮ – PRŮKAZ CHLOROVANÝCH DEZINFEKČNÍCH PROSTŘEDKŮ

a) Teorie

Průkaz se provádí na základě specifických charakteristik základních, v mlékárenství a prvovýrobě používaných sanitačních přípravků, které se mohou do mléka dostat buď jako rezidua po nesprávně provedeném sanitačním postupu (nedokonalé vypláchnutí, selhání automatiky či ruční obsluhy při čištění bez demontáže), případně i jako úmyslné porušení.

b) Princip

Jedná se o orientační zkoušku přítomnosti dezinfekčních prostředků s aktivním chlórem v mléce. Může se jednat např. o chlornan sodný, chloramin, chlorové vápno... Důkaz je založen na barevné reakci jódu, který se uvolní z přidaného jodidu draselného právě působením aktivního chloru.

c) Postup

Podle níže uvedeného postupu proveďte důkaz přítomnosti chlorovaných dezinfekčních prostředků a jejich přibližné koncentrace.

Postup je koncipován jako několikastupňový, přičemž jsou za sebou řazeny reakce se vzrůstající citlivostí. Není tedy nezbytně nutné realizovat všechny kroky, pokud již bylo dosaženo pozitivního výsledku.

➤ Krok 1

- Do zkumavky odměřte 5 ml mléka.
- Přidejte 1,5 ml 7% roztoku KI.
- Vzniklé zbarvení hodnotte podle **Tab. 11**, první řádek.

V případě, že byla reakce negativní (zbarvení vzorku neodpovídá žádnému zbarvení uvedenému v **Tab. 11.** v prvním řádku), pokračujte v postupu dalším krokem.

➤ Krok 2

- Do zkumavky z kroku 1 dále přidejte 4 ml roztoku HCl
- Pozorujte zbarvení vzniklé sraženiny, porovnejte s **Tab. 11**, druhý řádek.

V případě negativní reakce (zbarvení neodpovídá žádnému zbarvení v tabulce ve 2. řádku), pokračujte v postupu dalším krokem.

➤ Krok 3

- Zkumavku zahřívejte 10 minut při 85 °C.
- Zhodnoťte zbarvení sraženiny a vodné vrstvy, podle **Tab. 11**, třetí řádek.

V případě negativní reakce (zbarvení neodpovídá žádnému zbarvení v **Tab. 11** ve 3. řádku) pokračujte v postupu dalším krokem.

➤ Krok 4

- Ochlad'te obsah zkumavky.
- Přidejte 1 ml 1% škrobového mazu.
- Zhodnoťte výsledné zbarvení.

d) Vyhodnocení

Podle zbarvení mléka v jednotlivých krocích odečteme z tabulky odpovídající podíl přidaného dezinfekčního roztoku. Pokud žádné zbarvení vzorku v jednotlivých krocích neodpovídá tabulce, nejsou chlorované dezinfekční prostředky ve vzorku přítomny.

Tab. 11: Vyhodnocení zbarvení dle koncentrace aktivního chloru v mléce (ČERNÁ a kol.)

TEST / citlivost	1:1000	1:2000	1:5000	1:10000	1:25000	1:50000
Krok 1	žluto-hnědý	tmavě žlutý	velmi světle žlutý			
Krok 2	žluto-hnědý	tmavě žlutý	žlutý	světle žlutý		
Krok 3	žluto-hnědý	tmavě hnědý	žlutý	žlutý	světle žlutý	nažloutlý
Krok 4	modro- purpurový	modro- purpurový	modro- purpurový	tmavočervený- purpurový	červený, do purpurové	světle červený, do purpurové

Pozn.

Podobné reakce dává i peroxid a přípravky jej obsahující. Je-li nutné prokázat, že se jedná o preparát na bázi chloru, bylo by nutné stanovovat ještě chloridy ve srovnání s referenčním vzorkem.

5. OVĚŘENÍ KONCENTRACE DEZINFEKČNÍCH PROSTŘEDKŮ KYSELÝCH A ZÁSADITÝCH

a) Teorie

Cílem čištění a dezinfekce mlékárenských zařízení je odstranit organické a anorganické nečistoty, mikrobiální znečištění (patogenní i průvodní mikroflóru) tak, aby hygienicky získané mléko bylo ochráněno od následné nežádoucí kontaminace. V praxi jsou předepsány jednak závazné postupy, dané platnými normami, a jednak tyto postupy navrhují pro svá zařízení i samotní výrobci.

Procesy bývají vícestupňové a nejčastěji se používají:

- studená, teplá a horká voda,
- horké alkalické přípravky,
- dezinfekční přípravky na bázi aktivního chloru nebo jodu, popř. kvarterní amonné sloučeniny,
- horké kyselé přípravky (zředěné anorganické a organické kyseliny, popř. speciální kyselé směsi).

Tyto procesy jsou nedílnou součástí správné hygienické praxe (GHP), které musí podléhat každý výrobní proces v potravinářství.

Samotná dezinfekce, finální krok v programu hygieny, závisí na celé řadě proměnných, jako jsou:

- efektivita předchozích kroků v programu čištění,
- metoda a účinnost aplikace produktu,
- výběr použitého dezinfekčního prostředku,
- následné činnosti po dezinfekci v závodě, které mohou vést k opětovné kontaminaci.

V každém případě je potřeba používat pouze schválené čisticí a dezinfekční prostředky, a kromě řady dalších faktorů znát a pravidelně kontrolovat jejich účinnost.

5.1 STANOVENÍ KONCENTRACE KYSELÝCH PRACOVNÍCH ROZTOKŮ

b) Princip

Titrace slouží ke kontrole potřebné koncentrace kyselého čisticího roztoku nebo zda je třeba po rozředění, resp. neutralizaci doplnit ztráty dodatečným zvýšením.

c) Postup

- Do Erlenmayerovy baňky napipetujte 10 ml rozborovaného pracovního roztoku.
- Přidejte 2-3 kapky fenolftaleinu.

- Titrujte 0,1 mol·l⁻¹ roztokem hydroxidu sodného do změny zbarvení z bezbarvého do růžového, stálého minimálně 30 s.

d) Výpočet

$$c = V (0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaOH}) \times f$$

(26)

kde c koncentrace roztoku [%]

V spotřeba 0,1 mol·l⁻¹ NaOH [ml]

f faktor odměrného roztoku NaOH (0,1 mol·l⁻¹)

5.2 STANOVENÍ KONCENTRACE ZÁSADITÝCH A CHLOR OBSAHUJÍCÍCH PRACOVNÍCH ROZTOKŮ

b) Princip

Titrace slouží ke kontrole potřebné koncentrace zásaditého čistícího roztoku nebo zda je třeba po rozředění, resp. neutralizaci doplnit ztráty dodatečným zvýšením.

Stanovení ALKALITY

c) Postup

- Do Erlenmayerovy baňky napipetujte 10 ml rozborovaného pracovního roztoku.
- Přidejte thiosíran sodný (na špičku nože).
- Přidejte 10 ml 10% roztoku chloridu barnatého.
- Přidejte několik kapek fenolftaleinu.
- Titrujte 0,1 mol·l⁻¹ kyselinou chlorovodíkovou z růžového do bezbarvého nebo bílého zbarvení (tvorba BaCO₃).

d) Výpočet

$$c = V (0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ HCl}) \times f$$

(27)

kde c koncentrace roztoku [%]

V spotřeba 0,1 mol·l⁻¹ HCl [ml]

f faktor odměrného roztoku HCl (0,1 mol·l⁻¹)

Stanovení aktivního Chlору titrací roztokem THIOSÍRANU SODNÉHO

c) Postup

- Do Erlenmayerovy baňky odměřte 100 ml rozborovaného pracovního roztoku.
- Přidejte 1 g jodidu draselného nebo sodného.
- Okyselte kyselinou – vzorek se zbarví do žluta až hněda.
- Přidejte 1 ml roztoku škrobu.
- Titrujte 0,1 mol·l⁻¹ roztokem thiosíranu sodného z modrého do bezbarvého zbarvení.

d) Výpočet

$$c = V (0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) \times M (\text{Cl})$$

(28)

kde c koncentrace aktivního chlóru [mg·l⁻¹]

V spotřeba 0,01 mol·l⁻¹ thiosíranu sodného Na₂S₂O₃ [ml]

$M (\text{Cl})$ molární hmotnost atomu chlóru (35,45 g·mol⁻¹)

V.

HODNOCENÍ KVALITY SYROVÉHO MLÉKA

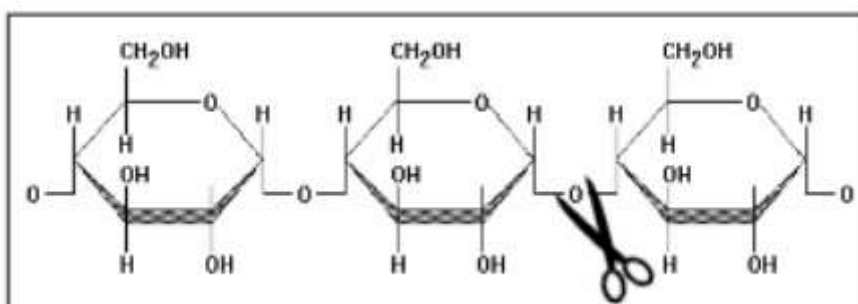
- 5.1 Stanovení aktivity amylázy
- 5.2 Stanovení obsahu laktózy polarimetricky na polarimetru s kruhovou stupnicí
- 5.3 Stanovení obsahu chloridů
- 5.4 Výpočet chlor-cukrového čísla
- 5.5 Informativní zjištění počtu somatických buněk v mléce N-testem, NK-testem
- 5.6 Zkouška kyselosti varem
- 5.7 Důkaz přítomnosti kozího mléka

1. STANOVENÍ AKTIVITY AMYLÁZY

a) Teoretický úvod

Amylázy jsou enzymy ze skupiny hydroláz, které štěpí polysacharidy (škrob nebo glykogen) na jednodušší sacharidy (maltózu, maltotriózu, α -dextrin). V mléce byla zjištěna přítomnost dvou amyláz:

- α -amyláza (α -1,4-D-glukanglukonohydroláza), která katalyzuje hydrolýzu α -1,4-D-glykosidické vazby v polysacharidech obsahujících nejméně tři D-glukózové jednotky spojené α -1,4-vazbou
- β -amyláza (β -1,4-D-glukanmaltohydroláza), která převážně štěpí škrob na maltózu.



Obr. 9: α -amyláza štěpí α -1,4-glykosidické vazby uvnitř polysacharidového řetězce (tj. patří mezi endohydrolázy)

V kravském mléce převažuje α -amyláza, která je identická s amylázou produkovanou lidskými slinnými žlázami. Enzym je produkován buňkami mléčné žlázy po předchozí hormonální stimulaci a v mléce jsou převážně vázány na membrány tukových kuliček. Optimální aktivita tohoto enzymu je při pH 6,5-7,5 a teplotě 44 °C. Amyláza je enzym termolabilní a ošetřením mléka během pasterace svoji aktivitu ztrácí. Aktivita amylázy je zvýšena v kolostru, po čtyřech dnech klesá na minimum a ke konci laktačního období se opět zvyšuje. Aktivita tohoto enzymu je závislá na mnoha faktorech, jako jsou např. plemeno, stádium laktace, výživa, věk dojnice nebo zdravotní stav mléčné žlázy. Substrátem pro tento enzym jsou v mléce oligosacharidy obsahující 5-14 sacharidových jednotek.

Aktivita amylázy je vyšší též v mléce od nemocných dojnic. Stanovení aktivity amylázy se proto využívá ke zjištění mléka od nemocných dojnic nebo zjištění mleziva.

b) Princip úlohy

Průkazem aktivity je rozložení škrobu amylázou přítomnou v mléce/mlezivu. Aktivitu amylázy zjistíme na základě barevné reakce škrobu s jodovým roztokem (= Lugolův roztok). V mléce, ve kterém není amyláza aktivní, se škrob nerozloží, a proto se po přidání Lugolova roztoku zbarví modře (to je projev reakce škrobu s jodem). Mléko s aktivní amylázou se zbarví žlutě, tzn. Lugolův roztok nedá pozitivní reakci, neboť v roztoku není škrob, s nímž by zreagoval (protože škrob byl rozložen právě tou aktivní amylázou).

V principu se využívá zředovací metoda, kterou se prokáže obsah nerozloženého škrobového mazu jodidovou zkouškou.

c) Postup práce

- Do 6 zkumavek odpipetujte následující množství škrobového mazu (1% roztok škrobu):

Tab. 12: Přídavek škrobového mazu pro stanovení aktivity amylázy zředovací metodou (JANŠTOVÁ a kol.)

zkumavka č.	1	2	3	4	5	6
objem škrobového mazu [ml]	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30	0,50

- Do každé zkumavky přidejte 10 ml vzorku mléka a promíchejte.
- Směs inkubujte 30 minut při laboratorní teplotě.
- Následně do každé zkumavky přidejte 1 ml Lugolova roztoku a opět promíchejte.
- Pozorujte vzniklé zbarvení.

d) Zpracování výsledků a vyhodnocení

- modré (příp. modrohnědé) zbarvení = mléko s nerozloženým škrobem, tj. mléko s nulovou nebo velmi nízkou aktivitou amylázy
- žluté zbarvení = mléko s rozloženým škrobem, tj. mléko s vyšší aktivitou amylázy (nebo mlezivo)

Aktivita amylázy se vyjadřuje množstvím ml rozloženého škrobu na jednotku objemu.

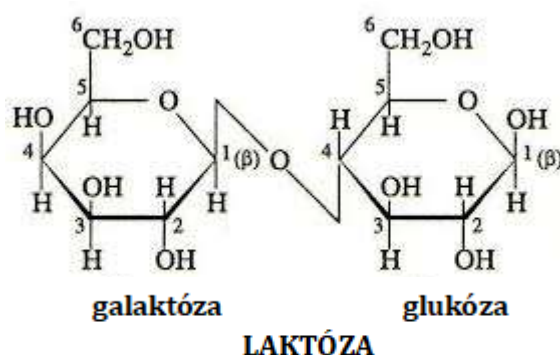
Podobně jako mlezivo i mléko od nemocných dojníc vykazuje vyšší aktivitu = více rozloženého škrobu. U zralého mléka od zdravých dojníc je za podmínek zkoušky rozloženo **maximálně 0,15 ml škrobového mazu**.

2. STANOVENÍ OBSAHU LAKTÓZY POLARIMETRICKY NA POLARIMETRU S KRUHOVOU STUPNICÍ

a) Teoretický úvod

Laktóza je redukující disacharid, označovaný jako mléčný cukr, složený ze dvou monosacharidů – **D-glukózy** a **D-galaktózy**, spojených β -(1 \rightarrow 4) glykosidickou vazbou (vzniká 4-O- β -D-galaktosyl- β -D-glukopyranóza; viz **Obr. 10**). To, že se jedná o redukující cukr, znamená, že při tepelném ošetření reaguje s volnými aminoskupinami bílkovin za vzniku Maillardových reakcí, jejichž produkty způsobují změnu chuti a hnědnutí sterilovaného mléka.

Obsah laktózy tvoří podle druhu mléka 2–8 %, v kravském mléce je to 4,5–5,0 % a je ovlivněn zejména plemenem, stadiem a pořadím laktace, dojivostí, zdravotním stavem mléčné žlázy krav.

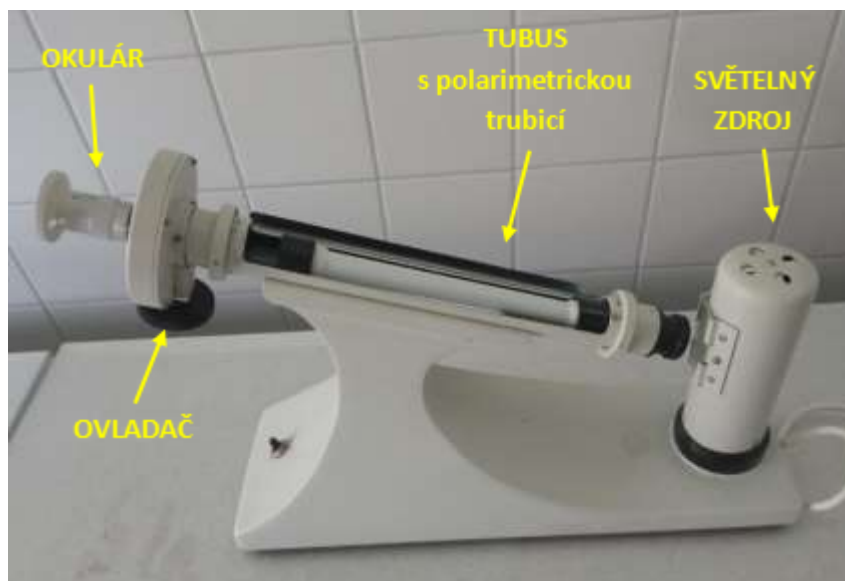


Obr. 10: Strukturní vzorec laktózy

b) Princip úlohy

Polarimetrická metoda se využívá k rychlému stanovení laktózy v mléce, je založena na měření optické otáčivosti laktózy ve vzorku mléka po jeho vyčeření (vysrážení nežádoucích látek – nesacharidové opticky aktivní látky – bílkoviny, aminokyseliny, odstranění zákalu). Stupeň stáčení roviny polarizovatelného světla je úměrný koncentraci laktózy v roztoku. Vyjadřuje se jako množství **monohydrátu laktózy v $g \cdot 100 g^{-1}$ mléka**.

Vztažení k monohydrátu α -laktózy se používá proto, že se jedná o nejstabilnější formu laktózy. Je důležité brát do úvahy, že laktóza vykazuje tzv. mutarotaci, což je jev, kdy ve vodném roztoku monosacharidů dochází ke štěpení poloacetalové vazby a molekula sacharidu se mění na lineární. Tato lineární molekula přechází na jiné anomery (formy heterocyklických sacharidů). Důsledkem toho pak je, že laktóza se vyskytuje ve dvou optických izomerech (anomerech), označovaných jako **α -** a **β -laktóza**, které se liší svou rozpustností. V mléce jsou obě formy v rovnováze, ale jejich poměr se mění v závislosti na teplotě (při nižších teplotách je pomalejší). Proto je nutné měření provádět **při konstantní teplotě (20 °C)**.



Obr. 11: Kruhový polarimetr



Obr. 12: Polarimetrická trubice



Obr. 13: Kruhový polarimetr – čelní pohled

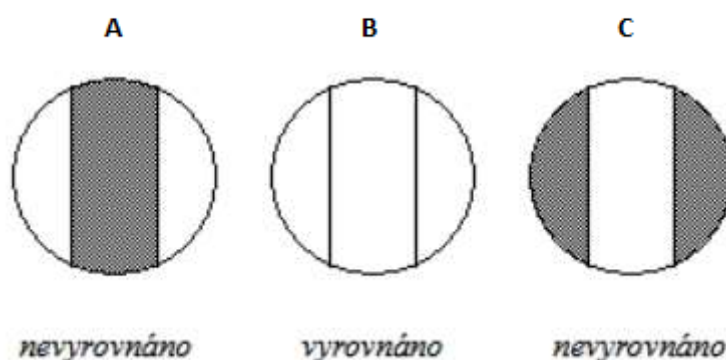


Obr. 14: Kruhový polarimetr – detail stupnice

c) Postup práce

- Do 100ml odměrné baňky na navažte 50 g mléka – do odměrného válce nalejte 50 ml mléka, odměrnou baňku postavte na váhy, vytárujte na nulu, sundejte z vah a nalejte 50 ml mléka do baňky bez pomoci nálevky, postavte zpět na váhy a zapište hmotnost.

- Přidejte 5 ml roztoku $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3 H_2O$ (Carrezovo činidlo I) a promíchejte krouživým pohybem až tekutina zhoustne.
- Přidejte 5 ml roztoku $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ (Carrezovo činidlo II) a opět důkladně promíchejte.
- Doplněte destilovanou vodou po rysku a převrácením důkladně promíchejte, nechte stát (alespoň 5 minut).
- Zfiltrujte přes suchý skládaný filtrační papír do suché Erlenmayerovy baňky s rovným dnem, první podíl filtrátu vylijte. (Filtrát musí být zcela čirý, proto se jeho první podíly vylévají. V opačném případě by bylo nutno provést příslušné kroky čerení znova.)
- **Odměrnou baňku, Erlenmayerovu baňku a nálevku neoplachujte!**
- Čirým filtrátem opatrně naplňte polarimetrickou trubici o délce 200 mm (viz **Obr. 12**; nesmí se vyskytovat žádná bublina a obě sklíčka, kterými prochází světlo, musí zůstat čistá a suchá) a odečtěte úhel otočení při 20 °C.
 - sledujte kruhové pole v okuláru
 - otáčením nastavovacím kotoučem (viz **Obr. 11** – ovladač) upravte pole do polohy B, podle obrázku **Obr. 15** (Musí být nalezena taková poloha, aby všechny 3 části zorného pole byly stejně žlutavě osvětlené, bez náznaku pruhu.)
 - na stupnici odečtete úhel otočení α



Obr. 15: Schematický detail třídielného zorného pole polarimetru během měření

- Stupnice polarimetru je tvořená vnější a vnitřní částí (viz **Obr. 16**). Hodnota "0" stupnice vnitřní ukazuje **jednotky stupňů** – ty se odečítají **na stupnici vnější**. Stupeň vnitřní stupnice, který je přesně proti stupni stupnice vnější, pak vyjadřuje **desetiny či setiny stupně**, a ty se odečítají **na stupnici vnitřní**.



Obr. 16: Stupnice polarimetru (odečtená hodnota na této ukázce je 1,30°)

d) Zpracování výsledků

Obsah laktózy monohydrátu L v % (w/w) se vypočítá ze vztahu:

$$L = \frac{0,9518 \cdot \alpha \cdot 100 \cdot F}{m} [\%]$$

(29)

kde m navážka vzorku mléka [g]

α odečet na kruhovém polarimetru [°]

F faktor pro objemovou korekci na sraženinu vzniklou vyčeřením, při navážce 50 g mléka

- pro plnotučné mléko 0,954
- pro polotučné mléko 0,965
- pro odstředěné mléko 0,976
- pro syrovátku 0,993

Pozn.

V případě bezvodé laktózy by se do vzorce (29) dosadil koeficient 0,3134.

e) Vyhodnocení

Obsah laktózy v mléce zdravých a dobře krmených krav dosahuje hodnot 4,5–5 %.

3. STANOVENÍ CHLORIDOVÝCH IONTŮ

a) Teoretický úvod

Vysoké hladiny Cl^- se nachází v mlezivu, během několika dní po porodu se jejich obsahy snižují a dosáhnou fyziologických hodnot. Průměrná hodnota chloridů v mléčné plazmě je $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. (Obvyklý rozsah se pohybuje mezi $0,8\text{--}1,4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Jen pro srovnání – v krevní plazmě obsah chloridů dosahuje hodnot cca 2-3x vyšších.) Ke konci laktace se koncentrace Cl^- v mléce opět zvyšuje. Nadměrné hodnoty mohou též poukazovat na zánět mléčné žlázy či jiná onemocnění dojnice. Příjmem v krmné dávce naopak koncentrace chloridů v mléce ovlivněna nebývá.

b) Princip úlohy

Stanovení chloridových iontů v mléce argentometrickou titrací je referenční metodou. Spočívá v přidavku kyseliny dusičné a následném vysrážení chloridů dusičnem stříbrným. Jeho přebytek se pak stanoví zpětnou titrací, kdy nezreagovaný AgNO_3 se ztitruje roztokem thiokyanatanu draselného KSCN (nebo amonného NH_4SCN), za použití indikátoru dodekahydrátu síranu železitoamonného $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, do trvale červenohnědého zbarvení. Samotná titrace by měla probíhat bez zbytečných prodlev, neboť chlorid stříbrný na světle šedne a barevný přechod pak pozbývá na ostrosti. Případně lze do titrační baňky vložit i pár skleněných kuliček.

Pozn.

Metoda je po malé modifikaci využitelná též jako provozní, a to jak pro mléko, tak i pro tekuté a obnovené mléčné výrobky. Při těchto aplikacích pak hodnoty obsahu chloridů bývají tabelované.

c) Postup práce

- Do titrační baňky o objemu 100 ml navažte asi 10 g vzorku mléka – přesnou hmotnost zapište.
- Přidejte 5 ml 25% HNO_3 , promíchejte.
- Přidejte 1 ml nasyceného roztoku $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, promíchejte.
- Přidejte 10 ml roztoku AgNO_3 ($c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), promíchejte.
- Za stálého míchání titrujte roztokem KSCN ($c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) do červenohnědého zbarvení. (Důsledné míchání je žádoucí zejména kvůli tomu, aby vznikající staženina příliš nebránila titraci právě onoho nespotřebovaného AgNO_3).

d) Zpracování výsledků

Obsah chloridových iontů Cl^- se uvádí **v g na 1000 g mléka** a vypočítá se podle vztahu (30):

$$Cl^- = \frac{(10 - V) \cdot 3,5465 \cdot f}{m}$$

(30)

kde m navážka mléka [g]
 V spotřeba roztoku $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KSCN při zpětné titraci v [ml]
 f faktor odměrného roztoku KSCN

e) Vyhodnocení

Průměrný obsah chloridových iontů v mléce je přibližně **1 g na 1000 g mléka**.

4. VÝPOČET CHLOR-CUKROVÉHO ČÍSLA

a) Teoretický úvod

Při zánětech mléčné žlázy vykazuje mléko změněné složení, takže podle některých parametrů pak lze usuzovat na jeho kvalitu a zdravotní nezávadnost.

Chlor-cukrové číslo je definováno jako poměr mezi obsahem chloridových iontů (v mg na 100 g mléka) a obsahem laktózy ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$). Tato hodnota bývá využívána jako vhodný indikátor mléka od mastitidních dojníc, kdy právě při zánětech mléčné žlázy (ale i při ostatních onemocněních dojníc) dochází ke zvýšení obsahu chloridových iontů a současně k poklesu obsahu laktózy v mléce, čímž toto chlor-cukrové číslo nabývá na hodnotě.

b) Princip úlohy

Je třeba stanovit obsah chloridových iontů ve vzorku mléka (argentometricky) a současně i obsah laktózy (polarimetricky). Hodnota chlor-cukrového čísla se pak zjistí výpočtem z poměru obou hodnot.

c) Postup práce

- Stanovte obsah chloridových iontů v mléce argentometrickou titrací, dle výše uvedeného postupu v kapitole 3.
- Stanovte obsah laktózy v mléce polarimetricky, dle výše uvedeného postupu v kapitole 2.
- Z poměru obou hodnot zjistěte chlor-cukrové číslo a vzorek mléka z tohoto hlediska vyhodnoťte.

d) Zpracování výsledků

Chlor-cukrové číslo (x) se vypočítá podle vzorce (31):

$$x = \frac{Cl^- \cdot 100}{L \cdot 10}$$

(31)

kde Cl^- obsah chloridových iontů v mléce v $g \cdot 1000 g^{-1}$
 L obsah laktózy v mléce [$g \cdot 100 g^{-1}$; hm. %]

e) Vyhodnocení

Tabelované hodnoty chlor-cukrového čísla:

1,7 – 2,2 směsné mléko od zdravých dojnic
1,5 – 2,5 mléko od individuálních dojnic nebo od malého počtu dojnic (nejvýše 5)
> 2,5 sekreční poruchy v mléčné žláze

5. INFORMATIVNÍ ZJIŠTĚNÍ POČTU SOMATICKÝCH BUNĚK – N-TEST, NK-TEST

a) Teoretický úvod

Somatické buňky jsou obecně všechny tělní buňky s výjimkou buněk pohlavních. V mléce však pod pojmem somatické buňky jsou chápány především bílé krevní elementy (leukocyty), které přecházejí do mléka z krve, a buňky epitelu mléčné žlázy. Jejich množství v mléce poměrně dobře vypovídá o zdravotním stavu dojnice.

Při **mastitidách** se mění celkové složení mléka a zvyšuje se i obsah somatických buněk, které obsahují mj. komplexní enzymatické systémy, a jsou tak příčinou zhoršené zpracovatelnosti mléka.

Zánět mléčné žlázy nemusí být vždy vyvolán jen infekčním agens, ale mohou se na něm podílet i vlivy prostředí (iritace struků nadměrným vydojováním, nešetrnou apod.), které mohou způsobit tzv. aseptické mastitidy. Při nich je **počet somatických buněk** (zkr. **SCC**, z angl. *Somatic Cells Count*) sice nad limitní hodnotou, ale není izolován patogen, který by onemocnění mléčné žlázy způsobil. Kromě výše uvedených zdrojů zvýšeného počtu somatických buněk se na jejich množství v mléce také odráží onemocnění dojnice ať již celkového (například metabolického charakteru), nebo lokalizovaného právě v mléčné žláze. Dále mají vliv na počet somatických buněk:

- pořadí laktace (věkem obvykle roste degenerace tkáně mléčné žlázy a zvyšuje se SCC),
- stadium laktace (zvýšené počty na začátku a konci laktační periody mohou dávat falešně pozitivní výsledek v NK-testu – viz dále),
- dojitelnost (vyšší SCC u lehce dojitelných krav),
- doba dojení (večer vyšší SCC než ráno),
- plemenná příslušnost, tvar vemene, sezónnost, krmení, ustájení a stres.

K analýze počtu somatických buněk je možné využívat tři typy vzorků:

Prvním typem jsou individuální vzorky z jednotlivých čtvrtí (vemene) u každé dojnice, které vypovídají o zdravotním stavu každé čtvrtě zvlášť. Počty somatických buněk se v tomto případě stanovují nepřímo po oddojení prvních stříků mléka rychlými stájovými testy založenými na obsahu nukleových kyselin. Nejčastěji se používá tzv. **NK-test** (modifikovaný *California Mastitis Test*; CMT). Na diagnostickou paletu se oddojí mléko (následně se slije tak, aby na paletě zůstaly 2 ml), přidá se stejné množství reakčního činidla (detergenty obsahující barevný indikátor fenolovou červen) a krouživými pohyby palety se směs promíchá. Počátek reakce nastává cca ve 30-ti sekundách. DNA uvolněná ze somatických buněk vytváří s detergenty viskózní reakční směs. Podle její viskozity a barvy je možné semikvantitativně vyhodnotit, zda se jedná o mléko s vysokým počtem somatických buněk, případně mléko mastitidní, nehodící se do společného nádoje. Detekční limit NK-testu je cca 200 000 buněčných elementů v 1 ml směsi, což odpovídá 400 000 buněčných elementů v 1 ml mléka.

Druhým vzorkem, který se hodnotí na obsah somatických buněk, je individuální vzorek každé dojnice (tzv. konvový vzorek). Vzniká smísením mléka z jednotlivých čtvrtí. Tyto typy vzorků jsou využívány především chovateli a veterinárními lékaři v jednotlivých chovech, například k možnému šlechtění prevence mastitid.

Třetím typem vzorku jsou tzv. bazénové vzorky. Jedná se o směs mléka všech krav ve stádě dojených do společné nádrže. Právě bazénové vzorky slouží jako jakostní parametr syrového mléka od daného dodavatele. Vzorek je získáván při přečerpávání mléka z mléčnice do cistemy. V mlékárně se pak odebírá a vyšetřuje tzv. cisternový vzorek, který pochází z cisterny převážející mléko do mlékárny. Počty somatických buněk v bazénových vzorcích mléka se stanovují různými metodami. Využívá se buď přímá mikroskopická metoda (referenční metoda) nebo spíše častěji jsou to nepřímé metody, jako je fluorescenční mikroskopie či průtoková cytometrie, resp. jejich modifikace. Lze využít i jednoduchých testů (N-test, NK-test, *Whiteside Test*).

Počet somatických buněk v bazénových vzorcích mléka vypovídá o celkovém zdravotním stavu stáda, dává nepřímou informaci o hygienických podmínkách při produkci mléka a je považován za dobrý ukazatel vhodnosti syrového mléka ke konzumaci nebo zpracování.

Se zvýšeným počtem somatických buněk (a s tím spojenými změnami v chemickém složení mléka) lze očekávat i negativní změny v jeho organoleptických vlastnostech:

- zvýšení hořkosti
- zvýšení slanosti mléka
- ztráta typicky nasládlé mléčné chuti.

- Při pokročilejších zánětech mléčné žlázy lze pozorovat:
- změny vůně
- změny barvy (mléko nažloutlé, narůžovělé)
- obsah příměsí (hnisavé vločky, krev).

Z fyzikálních vlastností mléka jsou v důsledku zvýšení počtu somatických buněk popisovány následující změny:

- klesá měrná hmotnost mléka,
- klesá bod mrznutí mléka,
- kyselost mléka – mění se směrem k alkalickým hodnotám,
- roste viskozita,
- roste konduktivita (elektrická vodivost; standardní hodnota je 4-5,5 mS·cm⁻¹).

Technologické vlastnosti mléka se s rostoucím počtem somatických buněk zhoršují, především klesá:

- kysací schopnost mléka,
- syřitelnost mléka,
- termostabilita mléka.

Počet somatických buněk se vyjadřuje se jako klouzavý geometrický průměr za tříměsíčního období s alespoň jedním vzorkem měsíčně. Výpočet klouzavého geometrického průměru (x_g) se provádí podle vztahu (32):

$$x_g = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdot \dots \cdot x_n}$$

(32)

kde x_1 až x_n počet somatických buněk
npočet vzorků

Počet somatických buněk musí být **< 400 000 v 1 ml** syrového kravského mléka. Pro srovnání – syrové mléko ze zdravé mléčné žlázy neobsahuje více než 200 000 somatických buněk v 1 ml.

f) Princip úlohy

Působením reakčního činidla (povrchově aktivní látky) dochází k destrukci cytoplazmatické membrány somatických buněk, k následnému uvolňování nukleových kyselin a dalších složek buněčného obsahu, a tím i k vytvoření gelovité konzistence testovaného vzorku mléka. Čím více bude somatických buněk, tím bude i konzistence hutnější.

Tyto metody vyšetření jsou považovány za orientační – používají se pro kontrolu v zemědělské prvovýrobě a označují se jako nepřímé, „stájové“. Korelace s přesnými metodami je asi 0,8.

N-test

Je založen na změně konzistence směsi mléka a reagens při zvýšeném počtu somatických buněk, kdy dochází k vytvoření různě viskózního gelu. Test je určen pro směsné vzorky mléka, ve kterých jsou rozdíly v pH překryty.

NK-test (dle Neumanna a Kudělků)

NK-test byl vyvinut modifikací jiných testů, které jsou však založené na podobném principu – vlivem činidla, které obsahuje povrchově aktivní látku (detergent) a acidobazický indikátor (fenolovou červen), dojde k prasknutí plazmatické membrány somatických buněk v mléce, despiralizaci jaderné DNA a její vazbě na bílkoviny, čímž vznikne hlen. NK-test se od výše uvedeného N-testu odlišuje tím, že navíc využívá barevného indikátoru, který zjišťuje změny pH. Používá se tak pro hodnocení vzorků mléka, u kterých dochází i ke změně v hodnotách pH (zvýšení pH právě u mastitidního mléka). Zvýšený počet buněk se hodnotí po smísení mléka z prvních stříků s reagenčním roztokem. Provádí se na posuzovací paletě se 4 miskami (pro vzorky ze všech čtvrtí).

c) Postup práce

- Na Petriho misku napipetujte 2 ml mléka.
- Přidejte 2 ml diagnostického reagens a nakláněním misky promíchejte.
- Pozorujte:
 - v šikmo dopadajícím světle, za současného pomalého, střídavého naklánění misky ve směru optické osy pohybu
 - v kolmém pohledu, za současného pomalého, střídavého naklánění misky
 - v kolmém pohledu při krouživém pohybu v horizontální rovině

N-test

- Pozorujte **změnu konzistence** a charakter filmu při naklánění misky (do 30 sekund)
 - pozitivní reakce = tvorba vloček, vláken až gelu
 - silně pozitivní reakce = stahování gelu do středu misky

NK-test

- Pozorujte **změnu konzistence i změnu barvy** – NK-test
 - pleťová barva = mléko od zdravé dojnice
 - žlutá barva = mlezivo
 - karmínově červená barva = zánětlivý sekret a starodojné mléko

d) Vyhodnocení

Mléko se hodnotí podle změn konzistence a přiřazuje se do jednotlivých tříd podle **Tab. 13**.

Tab. 13: Hodnocení N-testu

N-test	Popis reakce a vzhled filmu při pohybu palety/misky
0	Beze změny viskozity, netvoří se žádný ulpívající film na dně misky.
(1) +	Ulpívající a opožděně stékající film na dně misky se zvlněným povrchem s tendencí vymizet během 60 sekund.
(2) ++	Výrazně odlišitelný, na dně ulpívající a opožděně stékající film se zvlněným povrchem, tvorba závoje na dně misky.
(3) +++	Velmi výrazná tvorba na dně ulpívajícího, opožděně stékajícího filmu se zvlněným povrchem, výrazná tvorba závoje na dně misky.
(4) ++++	Velmi výrazná tvorba na dně ulpívajícího, opožděně stékajícího filmu se zvlněným povrchem, výrazná tvorba závoje na dně misky, shlukování gelu do středu misky.

6. ZKOUŠKA VAREM

a) Teoretický úvod

Před použitím vysokých teplot při tepelném ošetření a zpracování mléka je třeba zjistit, zda bílkoviny syrového mléka mají dostatečnou termostabilitu (nesmějí se srážet ve vložkách). Čerstvé mléko se varem nesráží (to je zapříčiněno přítomností termostabilního kaseinu). Pokud ale dojde ke zvýšení kyselosti mléka (nad 9,5 SH), naruší se povrchové vrstvy kaseinových micel, dojde k uvolnění kaseinu a jeho následné denaturaci. Proto se kyselé mléko varem sráží. Rovněž i mlezivo nebo mléko od dojníc se záněty mléčné žlázy dávají podobné výsledky.

b) Princip úlohy

Působením konkrétních parametrů teploty a času, které se používají při ošetření či zpracování mléka, se stanoví odolnost bílkovin mléka vůči této teplotě a časové expozici.

c) Postup práce

- Do zkumavky odměřte asi 5 ml mléka.
- Za stálého protřepávání zahřejte k varu.
- Pozorujte konzistenci mléka v závislosti na teplotě a času.

d) Vyhodnocení

Pozorujte případnou změnu konzistence mléka. Sraženina na stěně zkumavky vypovídá o nedostatečné tepelné stabilitě bílkovin mléka. Podle vzhledu sraženiny lze usuzovat kyselost mléka. U mléka s kyselostí 9,5 SH se tvoří jemné vločky a při kyselosti 12 SH se mléko sráží. Čerstvé mléko se varem nesráží.

Pozn.:

Zkouška není zcela přesná, protože se varem sráží nebo vločkovatí právě i mlezivo nebo mléko s přísadkou mleziva a mléko nemocných dojníc.

7. PRŮKAZ PŘÍDAVKU KOZÍHO MLÉKA

a) Teoretický úvod

Rozlišení mléka jiných druhů zvířat se provádí senzorickými zkouškami, stanovením fyzikálně-chemických parametrů mléka a analýzou bílkovinného složení. Je též možno využít sérologického stanovení na základě reakce antigen-protilátka (aglutinace nebo precipitace). Tímto způsobem lze zjistit přítomnost už 1-5 % přidaného mléka jiného zvířete.

Jednou z fyzikálně-chemických charakteristik, které mohou indikovat rozličný druh mléka, je jeho termostabilita, tj. schopnost mléka odolat vysokým teplotám bez viditelné koagulace či gelovatění. Termostabilita se vyjadřuje jako čas, za který dojde ke sražení mléka při 140 °C. Tuto vlastnost mléka ovlivňuje mnoho faktorů jako například pH mléka, obsah a složení proteinů (zvýšení obsahu syrovátkových bílkovin může vést ke zhoršení tepelné stability), obsah solí, močoviny, laktózy aj.

Tab. 14: Základní složení kravského a kozího mléka (JANŠTOVÁ a kol.)

ukazatel	mléko kravské	mléko kozí
hustota [$\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$]	1,028-1,033	1,035-1,036
sušina [%]	11,9-14,2	11,9-13,2
tuk [%]	3,3-6,1	3,8-4,2
bílkoviny [%]	2,8-3,7	3,7
kasein [%]	2,2-2,8	3,0-3,2
laktóza [%]	4,5-5,0	4,5-4,8

Kozí mléko obsahuje ve srovnání s kravským méně bílkovin a kaseinu, také méně vápníku a fosfátu. Obsah volných aminoskupin je naopak u kozího mléka významně vyšší než u mléka kravského. Všechny tyto rozdíly oproti kravskému mléku jsou zodpovědné za nižší tepelnou stabilitu kozího mléka.

b) Princip úlohy

Přídavek kozího mléka k mléku kravskému se prokazuje rozdílným chováním bílkovin obou mlék. Metoda je založena právě na **nižší teplené stabilitě kozího mléka** ve srovnání s mlékem kravským. Tímto způsobem lze zjistit přítomnost jiného mléka od 5 %. Spolehlivost metody je ovlivněna celkovým množstvím přidaného kozího mléka a lze ji zlepšit srovnávací reakcí, provedenou u stájového vzorku.

c) Postup práce

- Do zkumavky napipetujte 10 ml mléka.
- Přidejte 2 ml 25% vodného roztoku hydroxidu amonného (NH_4OH).
- Směs zahřívejte ve vodní lázni na 50 °C.
- Pozorujte konzistenci mléka.

d) Vyhodnocení

- **kozí** mléko – vysráží se, tvoří hrudky (hrubé klky)
- **kravské** mléko – zůstává tekuté, může zhnědnout

VI.

STANOVENÍ MIKROBIOLOGICKÉ KVALITY MLÉKA A POČTU SOMATICKÝCH BUNĚK

- 6.1 Orientační stanovení somatických buněk Wisconsin mastitis testem
 - 6.2 Orientační stanovení somatických buněk N-testem
 - 6.3 Stanovení somatických buněk v mléce přímým počítáním pod mikroskopem
 - 6.4 Stanovení počtu mikroorganismů v mléce přímým počítáním pod mikroskopem
 - 6.5 Stanovení mikrobiologické kvality mléka resazurinovým testem
 - 6.6 Stanovení mikrobiologické kvality mléka reduktázovou zkouškou
-

a) Teoretický úvod

Počet somatických buněk (neboli buněčných elementů) v mléce je množství částic buněk, zjištěných v mléce, **v přepočtu na 1 ml**. Metody jsou určeny ke kontrole zdravotního stavu dojníc, ke sledování postupu tlumení mastitid, k posuzování jakosti nakupovaného mléka. Pro sériovou kontrolu se používá moderních automatizovaných přístrojů nebo orientačních rychlozkoušek. Srovnání se provádí s mikroskopickou metodou, která sama není vhodná pro sériové rozbory.

SOMATICKÉ BUŇKY jsou obecně všechny tělní buňky s výjimkou buněk pohlavních. V mléce však pod pojmem somatické buňky jsou chápány především bílé krevní elementy (leukocyty), které přecházejí do mléka z krve, a několik procent pak tvoří i buňky odloupané z epitelu mléčné žlázy. Jejich množství v mléce poměrně dobře vypovídá o zdravotním stavu dojnice.

Při **mastitidách** se mění celkové složení mléka a zvyšuje se i obsah somatických buněk, které obsahují mj. komplexní enzymatické systémy, a jsou tak příčinou zhoršené zpracovatelnosti mléka.

Zánět mléčné žlázy nemusí být vždy vyvolán jen infekčním agens, ale mohou se na něm podílet i vlivy prostředí (iritace struků nadměrným vydojováním, nešetrnou apod.), které mohou způsobit tzv. aseptické mastitidy. Při nich je **počet somatických buněk** (zkr. **SCC**, z angl. *Somatic Cells Count*) sice nad limitní hodnotou, ale není izolován patogen, který by onemocnění mléčné žlázy způsobil. Kromě výše uvedených zdrojů zvýšeného počtu somatických buněk se na jejich množství v mléce také odráží onemocnění dojnice ať již celkového (například metabolického charakteru), nebo lokalizovaného právě v mléčné žláze. Dále mají vliv na počet somatických buněk:

- pořadí laktace (věkem obvykle roste degenerace tkáně mléčné žlázy a zvyšuje se SCC),
- stadium laktace (zvýšené počty na začátku a konci laktační periody mohou dávat falešně pozitivní výsledek v NK-testu),
- dojitelnost (vyšší SCC u lehce dojitelných krav),

- doba dojení (večer vyšší SCC než ráno),
- plemenná příslušnost, tvar vemene, sezónnost, krmení, ustájení a stres.

Se zvýšeným počtem somatických buněk (a s tím spojenými změnami v chemickém složení mléka) lze očekávat i negativní změny v jeho organoleptických vlastnostech:

- zvýšení hořkosti
- zvýšení slanosti mléka
- ztráta typicky nasládlé mléčné chuti.
- Při pokročilejších zánětech mléčné žlázy lze pozorovat:
- změny vůně
- změny barvy (mléko nažloutlé, narůžovělé)
- obsah příměsí (hnisavé vločky, krev).

Z fyzikálních vlastností mléka jsou v důsledku zvýšení počtu somatických buněk popisovány následující změny:

- klesá měrná hmotnost mléka,
- klesá bod mrznutí mléka,
- kyselost mléka – mění se směrem k alkalickým hodnotám,
- roste viskozita,
- roste konduktivita (elektrická vodivost; standardní hodnota je 4-5,5 mS·cm⁻¹).

Technologické vlastnosti mléka se s rostoucím počtem somatických buněk zhoršují, především klesá:

- kysací schopnost mléka,
- syřitelnost mléka,
- termostabilita mléka.

Počet somatických buněk se vyjadřuje se jako klouzavý geometrický průměr za tříměsíčního období s alespoň jedním vzorkem měsíčně. Výpočet klouzavého geometrického průměru (x_g) se provádí podle vztahu (33):

$$x_g = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdot \dots \cdot x_n}$$

(33)

kde x_1 až x_n počet somatických buněk
 n počet vzorků

Počet somatických buněk musí být **< 400 000 v 1 ml** syrového kravského mléka. Pro srovnání – syrové mléko ze zdravé mléčné žlázy neobsahuje více než 100 000 somatických buněk v 1 ml.

MIKROORGANISMY jsou jednobuněčné, jen mikroskopicky (popř. pouze elektronmikroskopicky) pozorovatelné organismy. Mezi mikroorganismy se řadí převážně prokaryota (bakterie, archebakterie), patří k nim také plísně, kvasinky, některé řasy a prvoci. Díky rozmanitosti metabolických drah, rychlosti rozmnožování a schopnosti dlouho přežívat nepříznivé podmínky se mikroorganismy vyskytují téměř všude. Mikroorganismy často tvoří kolonie, shluky, případně symbiotická společenstva s jinými organismy. Některé druhy mají technologický význam nebo jako původci lidských onemocnění. Zvláště nebezpečné jsou patogenní mikroorganismy.

Mléko je díky svému chemickému složení a pH vhodným prostředím pro růst a množení mikroorganismů. Celková jakost mléka závisí na mnoha faktorech, mezi které lze zařadit podmínky jeho tvorby, získávání a ošetření v prvovýrobě, kde musí být kladen důraz na hygienu a sanitaci. Při mikrobiologickém posuzování mléka se sleduje především počet mikroorganismů, jejich druhové zastoupení, kvalitativní a kvantitativní podíl produktů jejich metabolismu a též výše zmiňovaný obsah somatických buněk.

Mikroorganismy, které se vyskytují v mléce, se mohou využívat (mohou být přínosné) při výrobě fermentovaných mléčných výrobků. Mohou však též způsobovat kažení mléka a mléčných výrobků a v neposlední řadě mohou být řazeny mezi patogenní a toxinogenní mikroorganismy.

Primární mikroflóra se do mléka dostává ještě před dojením, a to buď vnitřní cestou – krevním oběhem, nebo vnější cestou – strukovým kanálem. Mikrobiální kontaminace mléka zdravých dojnic vnitřní cestou (krevním oběhem) je nepatrná, neboť složky imunitního systému (především fagocytující buňky a protilátky) zabraňují průniku mikroorganismů z povrchu těla i z trávicího traktu do krve a dále do mléka. Do mléka se mikroorganismy ještě před dojením častěji dostávají strukovým kanálem. Primární mikroflóra nemá příliš velký technologický význam a vliv na jakost a trvanlivost mléka, protože je poměrně brzy potlačena **sekundární mikroflórou**, která kontaminuje mléko při dojení a během dalšího zpracování. Svou roli sehrává i tzv. *antimikrobiální systém mléka*. Mléko bezprostředně po nadojení obsahuje celou řadu přirozeně se vyskytujících látek, které dokáží mléko „bránit“ vůči méně intenzivní kontaminaci okolní mikroflórou a stabilizovat jej pár hodin po nadojení. Po cca 2-3 hodinách efektivita tohoto systému rapidně klesá.

Hlavními zdroji sekundární kontaminace mléka jsou povrch těla dojnice, dojící zařízení, nádoby a nádrže na dojení a uchovávání mléka, dojiči, krmivo, stelivo, voda a vzduch. Sekundární mikroflóra může být významně redukována správně provedenou sanitací, tj. mechanickým čištěním i dezinfekcí.

Tyto mikroorganismy se mohou podílet na degradaci složek mléka, především sacharidů, což může vést ke změnám organoleptických vlastností výsledného výrobku, ale také ke zvyšování kyselosti mléka, což může mít zásadní vliv na technologické vlastnosti mléka. Nežádoucí změny mléka (a následně i mléčných výrobků) jsou zpravidla způsobeny metabolickými pochody mikroorganismů, např. v důsledku mléčného, máselného nebo propionového kvašení, hydrolýzy proteinů nebo lipidů.

Na kažení mléka se mohou podílet psychrotrofní, termorezistentní, sporulující nebo případně koliformní bakterie – proto je třeba sledovat jejich výskyt v mléce. Kromě bakterií mohou nežádoucí změny jakosti mléka způsobovat také kvasinky a plísňe.

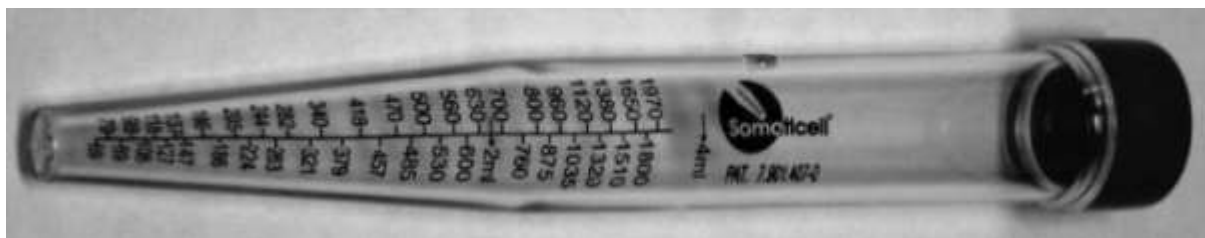
1. ORIENTAČNÍ STANOVENÍ SOMATICKÝCH BUNĚK WISCONSIN MASTITIS TESTEM

b) Princip úlohy

Wisconsin Mastitis Test je zkouška založená na změnách viskozity mléka po promíchání vzorku se stejným množstvím činidla. Tyto změny se hodnotí podle rychlosti, s jakou vytéká směs z kalibrované trubice (kapiláry) otvorem o průměru 1,2 mm. Výstupem je výška sloupce roztoku zbývajícího v kalibrované trubici po uplynutí stanovené doby vytékání (15 s). Hodnocení mléka s ohledem na množství somatických buněk metodou Wisconsin Mastitis Test je objektivnější než při využití N-testu či NK-testu. Výsledky této metody dobře korelují s druhou odmocninou počtu leukocytů (korelační koeficient se rovná 0,91).



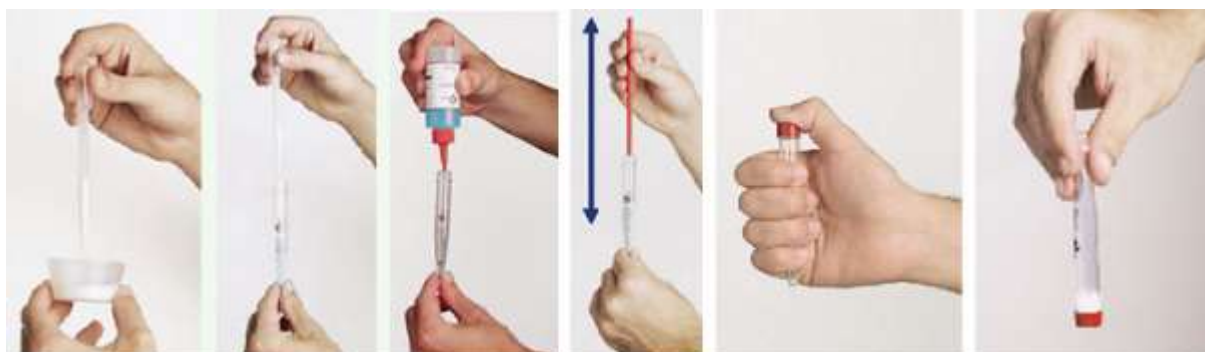
Obr. 16: Příklad kalibrované trubice pro Wisconsin Mastitis Test
(komerční materiál fy Nelson & Jameson Inc.)



Obr. 17: Příklad modifikované kalibrované trubice (zkumavky) pro Wisconsin Mastitis Test

c) Postup práce

- Do speciální zkumavky (kalibrované kapiláry) odměřte 2 ml mléka o teplotě 20 °C.
- Přidejte 2 ml reagens (z N-testu).
- Uzávěřte zkumavku speciální zátkou s otvorem.
- Promíchejte převrácením (netřepat!!) – přesně 10krát (Pozor, otvor uprostřed zkumavky při tom musí být směrem nahoru, aby obsah zkumavky nevytekl!)
- Nechte stát ve vertikální poloze – přesně 30 sekund (zátká s otvorem směřuje nahoru).
- Obráťte a nechte vytékat – přesně 15 sekund.
- Obráťte zkumavku zpět a změřte výšku sloupce, který nevytekl ze zkumavky.



Obr. 18: Ilustrační provedení Wisconsin Mastitis Testu (komerční materiál)

d) Vyhodnocení

Čím více somatických buněk ve vzorku je, tím větší je i viskozita, a vytékání z trubice je tak pomalejší. To znamená, že výška sloupce směsi zbylé ve zkumavce po výtoku bude tím vyšší, čím více buněčných elementů mléko obsahuje.

- negativní výsledek: výška sloupce < 10 mm
- pozitivní výsledek: výška sloupce > 10 mm

Orientační počet somatických buněk v 1 ml mléka se odečte na základě změřené výšky sloupce z tabulky přiložené k testovací sadě.

2. INFORMATIVNÍ ZJIŠTĚNÍ POČTU SOMATICKÝCH BUNĚK – N-TEST

b) Princip úlohy

Působením reakčního činidla (povrchově aktivní látky) dochází k destrukci cytoplazmatické membrány somatických buněk, k následnému uvolňování nukleových kyselin a dalších složek buněčného obsahu, a tím i k vytvoření gelovité konzistence testovaného vzorku mléka. Čím více bude somatických buněk, tím bude i konzistence hutnější.

Tyto metody vyšetření jsou považovány za orientační – používají se pro kontrolu v zemědělské prvovýrobě a označují se jako nepřímé, „stájové“. Korelace s přesnými metodami je asi 0,8.

N-test je založen na změně konzistence směsi mléka a reagens při zvýšeném počtu somatických buněk, kdy dochází k vytvoření různě viskózního gelu. Test je určen pro směsné vzorky mléka (bazénové vzorky), ve kterých jsou rozdíly v pH překryty.

Stanovení probíhá v Petriho miskách. Testovacím roztokem je roztok detergentu v destilované vodě. Jedná se o průhledný, mírně opaleskující roztok, který po protřepání silně pění. Mírné zbarvení do žlutohněda je dáno barvou detergentu.

Vzorky se odebírají před svozem mléka na farmě z každé nádoby či nádrže jednotlivě. Před odběrem je nutné provést důkladné promíchání mléka. Použití konzervačních prostředků je nepřipustné. Z odebraných vzorků je možné poměrným mísením připravit průměrný vzorek pro jednu stáj.

Vzorek se vytemperuje na 20 °C. Na Petriho misku se napipetují 2 ml vzorku a 2 ml testovacího činidla. Krouživým pohybem se obě tekutiny smíchají a současně se sleduje reakce. Hodnocení reakce se provádí proti tmavému pozadí v šikmo procházejícím světle za současného naklánění misky. Sleduje se charakter filmu na dně misky (viskozita, vlákna, shluky).

c) Postup práce

- Na Petriho misku napipetujte 2 ml mléka.
- Přidejte 2 ml diagnostického reagens a nakláněním misky promíchejte.
- Pozorujte:
 - v šikmo dopadajícím světle, za současného pomalého, střídavého naklánění misky ve směru optické osy pohybu
 - v kolmém pohledu, za současného pomalého, střídavého naklánění misky
 - v kolmém pohledu při krouživém pohybu v horizontální rovině
- Pozorujte **změnu konzistence** a **charakter filmu** při naklánění misky (do 30 sekund)
 - pozitivní reakce = tvorba vloček, vláken až gelu
 - silně pozitivní reakce = stahování gelu do středu misky

d) Vyhodnocení

Mléko se hodnotí podle změn konzistence a přiřazuje se do jednotlivých tříd podle **Tab. 14 a 15**.

Tab. 14: Vyhodnocení N-testu

Stupeň pozitivity	Popis reakce a vzhled filmu		
	ze šikmého pohledu	v kolmém pohledu	při krouživých pohybech
0	nevzniká ulpívající film	netvoří se závoj na dně misky	směs se rozprostírá po obvodu misky
(1) +	opožděně stékající film se zvlněným povrchem, obvykle se během 60 sekund ztrácí	není vidět závoj na dně	směs se rozprostírá po obvodu misky
(2) ++	výrazněji odlišitelný, opožděně stékající film se zvlněným povrchem	je možno pozorovat tvorbu závoje na dně	směs se stejnoměrně rozprostírá po obvodu misky
	oba znaky trvají déle než 1 minutu a postupně slábnou		
(3) +++	velmi výrazná tvorba filmu se zvlněným povrchem ulpívajícího na dně	výrazný závoj	směs se stejnoměrně rozprostírá po obvodu misky
	oba znaky neztrácejí na intenzitě		
(4) ++++	velmi výrazný film, na dně ulpívající, opožděně stékajícího, se zvlněným povrchem	velmi výrazný závoj	silně viskózní směs (gel) se shlukuje uprostřed misky

Tab. 15: Vyhodnocení stupně positivity N-testu

Stupeň positivity	Počet somatických buněk
0	do 150 000
(1) +	150 000 až 350 000
(2) ++	350 000 až 500 000
(3) +++	500 000 až 900 000
(4) ++++	nad 900 000

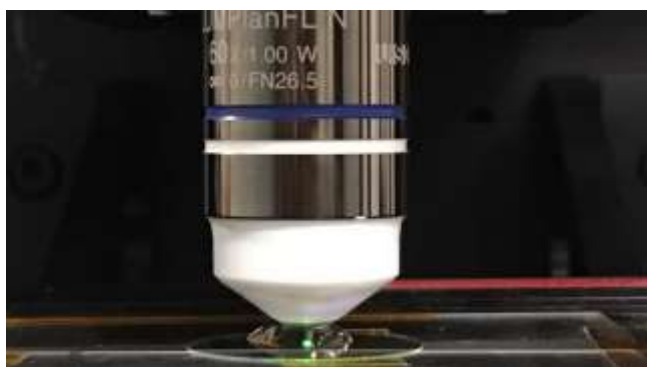
- Pro dobré mléko je mezní hodnota 400 000 leukocytů v 1 ml mléka. Tomuto požadavku odpovídají stupně 0 až 2.
- Stupeň positivity 3 až 4 je typický pro mastitidní mléka a mléka porušená vlivem sekrečních poruch mléčné žlázy.

3. PŘÍMÉ POČÍTÁNÍ SOMATICKÝCH BUNĚK MIKROSKOPEM

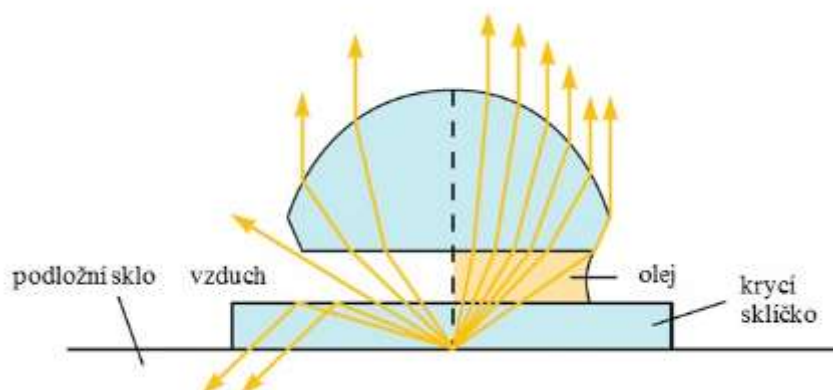
a) Princip úlohy

Přímé mikroskopické vyšetření somatických buněk v mléce je referenční metodou, která se používá také pro kalibraci přístrojů na stanovení počtu somatických buněk (PSB). Konkrétní druh přítomných somatických buněk se pak stanovuje kvalitativním vyšetřením.

Mikroskopická metoda spočívá v přípravě preparátu (jeho fixaci a barvení) a následném pozorování mikroskopem v olejové imerzi. Paprsek přecházející ze skla do imerzního prostředí svůj směr nemění, takže na vzniku obrazu se může podílet více paprsků (viz. **Obr. 19** a **20**). Imerzní objektiv (na rozdíl od objektivu suchého) vyžaduje, aby optické prostředí mezi preparátem a čelní plochou čočky bylo homogenní. Toho se docílí kápnutím imerzního oleje na preparát a následným opatrným vnořením objektivu do této kapky. Imerzní prostředí je tak tvořeno kapalinou o stejném indexu lomu jako krycí sklíčko – k tomuto účelu se často používá cedrový olej.



Obr. 19: Imerzní objektiv – detail



Obr. 20: Průchod světelných paprsků suchým a olejovým imerzním objektivem

b) Postup práce

- Podložní sklíčko vyčistěte lihem a osušte bezprašným papírem.
- Mikropipetou naneste 10 µl mléka do vyznačené plošky 1 cm² tak, že se mléko vypustí do středu plošky, poté rozetřete po obvodu, a nakonec rovnoměrně vyplňte celý obsah.
- Nechte zaschnout ve vodorovné poloze (teplota max. 50 °C).
- Fixujte fixačním roztokem 5 minut, nechte zaschnout při laboratorní teplotě.
- Naneste barvivo methylenovou modř, nechte působit 2 až 3 minuty.
- Opláchněte barvivo pod tekoucí vodou, usušte.
- Naneste kapku imerzního oleje na nátěr.
- Pozorujte mikroskopem v olejové imerzi (zvětšení 100x, objektiv je ponořen do imerzního oleje).

c) Výpočet

Počítají se pouze buňky, které mají jádro a které jsou minimálně z poloviny viditelné v zorném poli. Buňky se počítají v tolika náhodně zvolených zorných polích, až je jejich počet celkově vyšší než 400. Počet hodnocených zorných polí se zapíše.

Počet somatických buněk (SB) v 1 ml zkoušeného mléka se vypočítá dle následujícího vztahu:

$$SB = \frac{F \cdot a}{n}$$

(34)

kde F pracovní (přepočítávací) faktor pro zvolený roztěr při zachování plochy přesně 1 cm² (uvedeno u každého mikroskopu)
 a celkový počet zjištěných buněčných elementů v n zorných polích
 n počet sledovaných zorných polí

d) Vyhodnocení

Limitní počet somatických buněk v bazénovém vzorku mléka je **400 000 v 1 ml** mléka.

Pozn.

Má-li mikroskopická metoda splňovat požadavky na referenční metodu pro kalibraci mechanizovaných až automatizovaných přístrojů, smí být její variační koeficient maximálně 5 %. Pro tyto účely se musí v každém pruhu spočítat právě nejméně 400 buněk a musí to být provedeno minimálně na 2 nátěrech.

Pro hodnocení běžných vzorků mléka stačí obvykle počítat jen 100 somatických buněk na odpovídajícím počtu zorných polí.

4. STANOVENÍ POČTU MIKROORGANISMŮ V MLÉCE PŘÍMÝM POČÍTÁNÍM

b) Princip úlohy

Mezi přímé metody stanovení počtu mikroorganismů patří stanovení počtu buněk pomocí mikroskopu – počítání samotných buněk v preparátu ze vzorku, bez kultivace. Výhodou je rychlost stanovení.

Pro počítání buněk v preparátu je třeba mít suspenzi s vhodnou hustotou buněk. Pracujeme s určitým objemem vzorku (ze známého objemu se pak dopočítává počet mikroorganismů v 1 ml).

Důležitá je správná, většinou několikastupňová, příprava preparátů pro mikroskopické pozorování. Nejčastěji se využívá fixace bakterií, kdy bakterie se usmrtí, zafixují na podložním sklíčku a vhodným způsobem obarví.

Podstatou fixace je vysrážení buněčných koloidů, zejména bílkovin. Fixací buňky lépe přilnou ke sklíčku, nespláchnou se aplikací barviva či rozpouštědla a lépe přijímají barvivo. Preparát se fixuje až ve chvíli, kdy je nátěr buněk suchý, aby nedošlo k uvaření buněk. Fixace se provádí protažením podložního skla s nátěrem buněk, který je umístěn na horní straně sklíčka, nesvítivou částí plamene. Fixace i barvení mírně buňku deformují, jejich charakteristický tvar zůstává.

Pozn.

Buňky kvasinek a plísňů jsou větší než buňky bakterií, tepelná fixace může pozměnit jejich tvar. Proto se většinou fixují chemikáliemi.

Samotné mikroskopické pozorování je realizováno pomocí imerzního objektivu, v imerzním prostředí. Tímto postupem zjistíme celkový počet mikroorganismů ve vzorku, avšak bez ohledu na jejich vitalitu.

c) Postup práce

- Podložní sklíčko vyčistěte lihem a osušte bezprašným papírem.
- Mikropipetou naneste 10 µl mléka do vyznačené plošky 1 cm² tak, že se mléko vypustí do středu plošky, poté rozetřete po obvodu, a nakonec rovnoměrně vyplňte celý obsah.
- Nechte zaschnout na vzduchu ve vodorovné poloze.
- Fixujte protažením nad plamenem, nechte vychladit na laboratorní teplotu.
- Naneste roztok methylenové modři (barvivo) a nechte působit 3 minuty.
- Opláchněte barvivo důkladně pod tekoucí vodou, usušte.
- Naneste kapku imerzního oleje na nátěr.
- Pozorujte mikroskopem v olejové imerzi (zvětšení 100x, objektiv je ponořen do imerzního oleje).

d) Výpočet

Počítají se mikroorganismy v zorném poli. Počítejte v náhodně vybraných zorných polích, nejlépe křížově v horizontálním a vertikálním směru. U každého pole se zapíše počet nalezených mikroorganismů.

Celkový počet mikroorganismů (CPM) v 1 ml zkoušeného mléka se vypočítá:

$$CPM = \frac{F \cdot a}{n}$$

(35)

kde F pracovní (přepočítávací) faktor pro zvolený roztěr při zachování plochy přesně 1 cm² (uvedeno u každého mikroskopu)
 a celkový počet zjištěných mikroorganismů v n zorných polích
 n počet sledovaných zorných polí

e) Vyhodnocení

Stanovení počtu mikroorganismů se provádí v daném objemu a přepočítává se obvykle na 1 ml původního vzorku. Těmito výsledky jsou pak korigovány získané výsledky experimentů.

Limitní počet mikroorganismů (CPM) v bazénovém vzorku mléka je **100 000 KTJ v 1 ml mléka**.

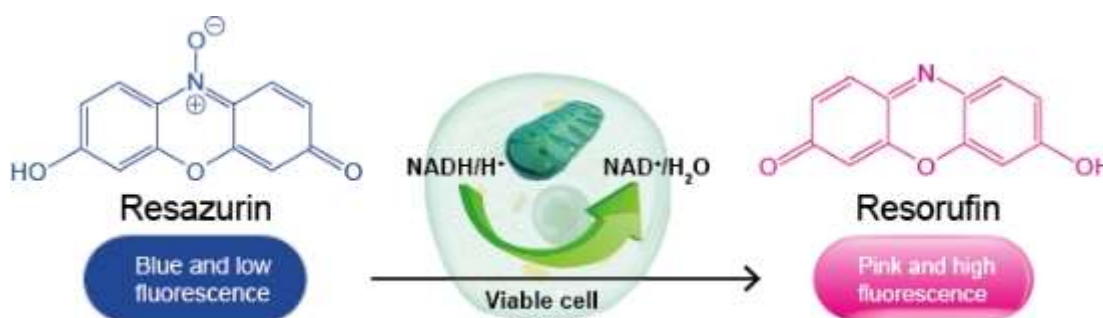
5. RESAZURINOVÝ TEST

b) Princip:

Resazurinový test patří mezi tzv. enzymové metody stanovení počtu mikroorganismů v mléce. Je založen na průkazu bakteriálních reduktáz. Většina mikroorganismů kontaminujících syrové mléko produkuje enzymy, které redukují modrý resazurin přes červenorůžový resorufin až na bezbarvý dihydroresorufin. Zbarvení mléka s indikátorem se tak mění z modré na růžovou, případně dojde k úplnému odbarvení. Zvýšený počet mikroorganismů v mléce vykazuje tedy zvýšenou redukční schopnost, a s tím spojené i rychlejší a výraznější barevné změny.

Resazurin (známý také jako „Alamar Blue”) je redukční barvivo, které se využívá například pro posouzení životaschopnosti buněk a jejich počtu. Resazurin, přidaný do mléka, je převeden mitochondriálními reduktázami přítomných mikroorganismů na fluorescenční barvivo resorufin. Zdravé buňky redukují resazurin účinněji než mrtvé nebo umírající buňky. Reakce je doprovázena

změnou barvy z indigo modré na fluorescenční růžovou. V extrémnějším případě (výrazná mikrobiální kontaminace) může dojít až k odbarvení směsi.



Obr. 21: Princip resazurinového testu

c) Postup:

- Do zkumavky odměřte 10 ml vzorku mléka.
- Přidejte 1 ml roztoku resazurinu (barvivo), protřepejte.
- Inkubujte ve vodní lázni při teplotě 37 °C po dobu 120 minut.
- Vyhodnoťte změnu zbarvení roztoku a stanovte pravděpodobný počet viabilních mikroorganismů ve vzorku mléka.




d) Vyhodnocení:

Vzniklé zbarvení vyhodnoťte podle **Tab. 16**.

Celkový počet mikroorganismů (CPM) v mléce má být **nižší než 100 000 KTJ v 1 ml** mléka.

Poněvadž všechny mikroorganismy, kontaminující syrové mléko, vykazují různou viabilitu, nacházejí se v různé fázi své růstové křivky a taktéž nemají jednotnou schopnost redukovat resazurin, lze uvedenou resazurinovou zkoušku považovat pouze za orientační ohledně určení stupně mikrobiálního znečištění mléka.

Tab. 16: Vyhodnocení resazurinového testu

Třída	Zbarvení	Pravděpodobný počet zárodků v 1 ml mléka
I. třída	ocelově modré (původní barva) až modrofialové 	< 500 000
II. třída	fialové až růžově načervenalé 	< 2 500 000
III. třída	růžové až bílé 	> 2 500 000

6. REDUKTÁZOVÁ ZKOUŠKA

b) Princip:

Tato zkouška je založena na schopnosti mikroorganismů, přítomných v syrovém mléce, produkovat enzymy, které redukují barvivo methylenovou modř na její bezbarvou leukoformu (oxidačně redukční indikátor reaguje na změnu redox-potenciálu, ke které dochází tím, že přítomné bakterie spotřebovávají rozpuštěný kyslík). Rychlost redukce (projevující se odbarvením barviva) je závislá na metabolické aktivitě přítomných mikroorganismů, a je tedy v přímém vztahu s jejich počtem a vitalitou. Čím více vitálních mikroorganismů je v mléce obsaženo, tím je čas odbarvení kratší.

c) Postup:

- Do zkumavky odměřte 10 ml vzorku mléka.
- Přidejte 0,25 ml roztoku methylenové modři, promíchejte.
- Inkubujte ve vodní lázni při 37 °C do odbarvení.
- Sledujte čas a zaznamenejte, po jaké době došlo k odbarvení roztoku.

d) Vyhodnocení:

Stanovuje se rychlost, s jakou dojde k odbarvení vzorku. Podle změřeného času odečtete v **Tab. 17** pravděpodobný počet zárodků obsažených v 1 ml mléka.

Tab. 17: Vyhodnocení reduktázové zkoušky

Doba potřebná k redukci (odbarvení)	Pravděpodobný počet zárodků v 1 ml mléka	Jakost mléka	Jakostní třída
> 4 hodiny	< 100 000	výborná	I.
2 – 4 hodiny	100 000 – 1 000 000	dobrá	II.
1 – 2 hodiny	1 milion – 7 milionů	méně vhodná	II.
20 minut – 1 hodina	7 milionů – 20 milionů	nevhodná	III.
< 20 minut	více než 20 milionů	zcela nevyhovující (závadná)	III.

Pozn.

Po odečtení se mohou zkumavky ponechat v termostatu nebo vodní lázni do druhého dne. Po 24 hodinách se podle povahy sraženiny posuzuje charakter mikroflóry mléka – viz kvasná zkouška.

POUŽITÁ LITERATURA:

Buňka, F. a kol. Mlékárenská technologie I. Zlín: UTB, 2013, 254 s. ISBN 978-80-7454-254-1

Cell Viability Assay based on Metabolic Activity. Dostupné z <https://www.abpbio.com/product/cell-viability-assay-based-on-metabolic-activity/> [cit. 2021-04-01]

Černá, E., Cvak, Z. Analytické metody pro mléko a mléčné výrobky. Díl I. – Chemie. Praha: VÚPP, 1986, 439 s.

Fyziologie živočichů. Dostupné z http://rum.prf.jcu.cz/public/fyziologie_zivocichu/04_Traveni.pdf [cit. 2021-02-20]

Gajdůšek, S., Laktologie. Brno: MZLU, 2003, 78 s. ISBN 80-7157-657-3

Chen, W.T. et al. Immersion Meta-Lenses at Visible Wavelengths for Nanoscale Imaging, *Nano Lett.* (2017) 17 (5): pp. 3188–3194. Doi: 10.1021/acs.nanolett.7b00717

Janštová, B. a kol. Hygiena a technologie mléka a mléčných výrobků – praktická cvičení I. Brno: VFU, 2009, 88 s.

Janštová, B. a kol. Technologie mléka a mléčných výrobků. Brno: VFU, 2012, 143 s.

Kadlec, P. a kol. Technologie potravin II. Praha: VŠCHT, 2002, 234 s. ISBN 80-7080-510-2

Kherbeche, A. et al. Multi-scale analysis of the influence of physicochemical parameters on the hydrodynamic and gas–liquid mass transfer in gas/liquid/solid reactors. *Chemical Engineering Science* (2013) 100: pp. 515–528. Doi: 10.1016/j.ces.2013.06.025

Kleckerová, A. Chemie potravin – laboratorní cvičení. Brno: MENDELU, 2014, 92 s. ISBN 978-80-7509-170-3

Kněz, V. a kol. Mlékárenská příručka. Praha: SNTL, 1974, 448 s.

Kopecká, J. a kol. Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií. Masarykova univerzita v Brně [online]. Dostupné z https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/prace_mikroskop.html [cit. 2021-03-06]

Kratochvíl, L. Výroba mléka. Praha: SZN, 1988, 270 s.

Kroger, D. et al. Relationships Between Wisconsin Mastitis Test Scores and Cell Counts in Milk. *Journal of Dairy Science* (1967) 50 (8), P1226–1233. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(67)87604-5

Laktotest. Produktová specifikace. Dostupné z: http://www.avsista.lt/TvsDocs/Naujenos/Laktotest_New.pdf [cit. 21-02-21]

Mastitis test. Dostupné z <http://www.creativos.com.br/idexx-somaticell-scc-test/> [cit. 2021-03-02]

Matějčíková, R. Mikrobiologie mléka a mléčných výrobků – cvičení. Výukový materiál. 2018. Dostupné z <https://www.vovcr.cz/odz/tech/300/page06.html>.

Polarimetrie. Dostupné z https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?close_menu=1;cast=52956;content=1 [cit. 2021-01-21]

Racek, J. a kol. Klinická biochemie. 2. vydání. Praha: Galén, 2006. 329 s. s. 87. ISBN 80-7262-324-9.

Rodrigues, A. O. C. et al. Evaluation of an on-farm test to estimate somatic cell count. *Journal of Dairy Science* (2008) 92: 990–995. Doi: 10.3168/jds.2008-1216

Thompson, D. I. et al. The Wisconsin Mastitis Test-An Estimation Of Leucocytes In Indirect Milk. *Journal of Milk and Food Technology* (1964) 27 (9): 271–275. Doi: 10.4315/0022-2747-27.9.271

Šustová, K. Mlékárenské technologie (návody do cvičení). Brno: MZLU, 2015, 126 s. ISBN 978-80-7509-248-9

Wisconsin Mastitis Test Concentrate. Dostupné z <https://nelsonjameson.com/Wisconsin-Mastitis-Test-Concentrate-p16498.html> [cit. 2021-03-02]

Velíšek, J. Chemie potravin II. Praha: OSSIS, 2009, 644 s. ISBN 978-80-86659-16-9

Xiao, J. et al. Monitoring of Cell Viability and Proliferation in Hydrogel-Encapsulated System by Resazurin Assay. *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2010) 162 (7), pp. 1996-2007. ISSN 0273-2289