

Informacije međunarodne mljekarske organizacije FIL-IDF**BULLETIN OF THE INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION N° 265/1991****Bulletin N° 265/1991 sadrži monografiju o
ODREĐIVANJU SLOBODNIH MASNIH KISELINA U MLIJEKU I
MLJEČNIM PROIZVODIMA**

Monografija je rad skupštine stručnjaka IDF/ISO/AOAC (grupa E39) koju su sačinjavali: Ir A. Jellema (NL), predsjednik, Ir A. Van Reusel (BE), zamjenik predsjednika, te Mr R. H. Cracknell i Dr K. Versteeg (AU), Prof. dr W. Heeschen i Dr G. Suhren (DE), Dr. J. Jaworski (PL), Dr S. Kuzdzal-Savoie (FR), Prof. S. H. Lombard (ZA), Dr K. N. M. Narayanan (IN), Dr J. F. Connolly (IE), Dra M. Juárez (ES), Dr H. A. Morris i Dr D. Firestone (US), Dr G. Mac Eachern (CA), Dr. M. Anderson (zajedno s Dr E. C. Needs) (GB), Dr P. M. Toppino i Mrs A. Bocca (IT).

Monografija je posvećena uspomeni Madame Simonne Kuzdzal-Savoie, koja je umrla u proljeće 1990.

Materijal je razvrstan u slijedeća poglavlja:

Poglavlje 1. — Osnovna informacija

Poglavlje 2. — Opći aspekti određivanja slobodnih masnih kiselina

Poglavlje 3. — Osnovni principi metoda korištenih za određivanje slobodne masne kiseline

Poglavlje 4. — Razmatranja o biranju metode

Poglavlje 5. — Rutinske metode određivanja slobodnih masnih kiselina u mlijeku

Poglavlje 6. — Određivanje pojedinih slobodnih masnih kiselina
Standardna metoda

Poglavlje 7. — Proizvodi od mlječne masti i maslac — Određivanje kiselosti masti

Prilog A: Lipoliza u mlijeku i mlječnim proizvodima. Rezultati ankete
282/A:B-Doc 105 (1983)

Autori su: Dr M. Anderson, Prof. dr W. Heeschen, Ir A. Jellema, Dr S. Kuzdzal-Savoie, Dr E. C. Needs, Dr G. Suhren i Ir A. Van Reusel.

Izdvajamo: IDF Standard 6B (1989) Određivanje kiselosti masti proizvođa od mlječne masti i maslaca.

Rutinske metode određivanja slobodnih masnih kiselina u mlijeku

a) BDI metodu (Bureau of Dairy Industries)

b) Metodu analitičkog sistema neprekinutog protjecanja

IDF STANDARD 6B (1989):

PROIZVODI OD MLJEČNE MASTI I MASLAC
– ODREĐIVANJE KISELOSTI MASTI

Bulletin of the International Dairy Federation N° 265/1991

1. SVRHA

U ovom se Internacionalnom standardu opisuje metoda određivanja kiselosti masti sadržane u proizvodima od mlječne masti (kako ih definira IDF Standard 68A i FAO/WHO Standard A-2) i u maslacu.

2. REFERENCE

IDF Standard 50B : 1985 — Mlijeko i mlječni proizvodi — Metode uzimanja uzoraka.

IDF Standard 68A : 1977 — Mlječna mast bez vode, ulje maslaca bez vode ili mast maslaca bez vode, ulje maslaca ili mast maslaca, ghee. Standardi identiteta.

FAO/WHO Standard A-2. 1984. Proizvodi od mlječne masti.

ISO 2446 : 1976 — Mlijeko — Određivanje količine masti (rutinska metoda).

3. DEFINICIJA

Ovaj Međunarodni Standard primjenjuje slijedeću definiciju:

Kiselost masti proizvoda od mlječne masti ili maslaca: količina lužine potrebna za neutralizaciju slobodnih masnih kiselina sadržanih u masi masti, prisutnoj u pokusnoj količini, određenih opisanom metodom, podijeljenih masom pokusne količine.

Kiselost masti je izražena u mmol na 100 g masti.

4. PRINCIP

U posebnom slučaju maslaca, prethodno se centrifugiranjem odvoji mast iz otopljenog maslaca.

Otopljeni proizvod mlječne masti ili mast maslaca filtrira se kroz filter papir u termostatu.

Otopiti filtrat u smjesi 2-propanola i petroleja i titrirati standardnom otopinom tetra-n-butil amonijum hidroksida koristeći kao indikator timol modru boju.

5. REAGENCIJE

Sve reagensije moraju biti p.a.

5.1. Tetra-n-butil amonijum hidroksid ($C_{16}H_{37}NO$), 0,1 mol/l standardna otopina u 2-propanol/metanol smjesi, 3 + 1 (v/v).

(Opaska: Koncentracija standardne otopine tetra-n-butil amonijum hidroksida se može promijeniti za skladištenja ili kad se prelijeva u biretu. Zbog toga

se stvarna koncentracija otopine mora odrediti, na četiri decimale, neposredno prije upotrebe titracijom sa standardnom otopinom kalium hidrogen ftalata ($\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$) koristeći kao indikator timol modru boju.

Ipak, ako je bireta opremljena tako da se lako isključi ulaz ugljičnog dioksida, koncentracija je dulje stabilna. U tom se slučaju stvarna koncentracija može provjeravati za svaku seriju određivanja kontrolnom analizom (8.5) standardne masti (5.4).

5.2. Timol modra ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{S}$), 0,1 g/l otopina indikatora u 2-propanolu.

Otopiti 0,1 g timol modre natrijeve soli u 100 ml 2-propanola da bi se pripremila osnovna otopina. Prije upotrebe, razrijediti dio te osnovne otopine s devet dijelova 2-propanola.

5.3. Otapalo masti

Izmiješati jedan dio timol modre otopine (5.2) s četiri dijela lakog benzina (raspon vrenja 60 do 80°C). Smjesu valja čuvati u mraku, do najviše mjesec dana.

(Opaska: Ako su rezultati slijepih pokusa (8.4) visoki, neutralizirati otapalo za mast standardnom otopinom tetra-n-butil amonijum hidroksida (5.1) dok se ne pojavi blijeda zelenkasta boja).

5.4. Standardna mast

(Opaska: Standardna se mast koristi za povremenu kontrolu čitavog postupka titracije).

Pripremiti standardnu mast od oprane mlječne masti (vidi niže) kiselosti $< 0,01$ mmol u 100 g masti. Otopiti poznate količine palmitinske kiseline ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$) u masti, prikladne su koncentracije u rasponu 0,5 – 2,0 mmol u 100 g masti. Izračunati kiselost ove standardne masti u mmol dodane palmitinske kiseline po masi mlječne masti, izražene u mmol u 100 g masti.

Pripremiti opranu mlječnu mast od mlječne masti dobre kvalitete. Za specifikaciju »dobre kvalitete« vidjeti: FAO/WHO Standard A-2, Sekcija A. Oprati mlječnu mast vodenom otopinom kalium hidroksida, $c(\text{KOH}) = 0,1$ mol/l, zatim prati vodom, centrifugirati i profiltrirati kroz suhi filter papir.

Kiselost standardne masti treba odrediti kako je opisano u 8.2 do 8.4. Taj rezultat može varirati 5% od izračunate vrijednosti i treba udovoljiti zahtjevima o ponovivosti (10.1).

Ova standardna mast će se podijeliti u poduzorke i uskladištiti u hermetски zatvorene boce u tamnoj prostoriji do 4 tjedna uz maksimalne uvjete temperature 5 °C. U slučajevima duljeg skladištenja valja uzorke smjesta zamrznuti.

6. UREĐAJI

Obična laboratorijska oprema i naročito slijedeći uređaji.

6. 1. **Vaga**, preciznosti približno 5 mg.
6. 2. **Centrifuga**, sposobna da razvije radijalno ubrzanje najmanje 350 g_n , rotorom, kao na primjer, takozvana Gerber centrifuga (vidi ISO 2446).
6. 3. **Cijevi centrifuge** (tubusi)

6. 4. **Stakleni lijevci i filter papir** (srednja kvaliteta).
6. 5. **Odmjerne pipete ili štrcaljke** kapaciteta 5 do 10 ml.
6. 6. **Odmjerne pipete ili štrcaljke** kapaciteta $50 \pm 0,5$ ml.
6. 7. **Posude za titraciju**, na primjer, konične tikvice približnog kapaciteta 100 do 250 ml.
6. 8. **Bireta**, graduirana, podjela 0,02 ml.
6. 9. **Dušik**, bez ugljičnog dioksida.
6. 10. **Termostat**, zagrijavan strujom s termostatom (50 ± 2 °C).

7. UZIMANJE UZORKA

Vidi IDF Standard 50B/1985.

8. POSTUPAK

8. 1. Priprema uzorka koji valja analizirati

8. 2. Maslac

Otopiti prikladnu količinu uzorka u termostatu 50 ± 2 °C (6. 10) i odijeliti mast centrifugiranjem radijalnom akceleracijom najmanje $350 g_n$ u centrifugi (6. 2 i 6. 3) 5 min. Filtrirati u toplom, odvojiti mast kroz navorani, suhi filter papir u termostatu (6. 10) u uvjetima 50 °C. Filtirana mast maslaca će biti svjetla i jasno oslobođena vode i nemasnih sastojaka.

8. 1. 2. **Proizvodi od mlječne masti** (bezvodna mlječna mast, ulje maslaca bez vode ili bezvodna mast maslaca, ulje maslaca ili mast maslaca, ghee).

Otopiti prikladnu količinu proizvoda od mlječne masti u uvjetima temperature 50 ± 2 °C i filtrirati kroz navorani, suhi filter papir u termostatu (6. 10) (50 ± 2 °C).

8. 2. Količina za analizu

Vagnuti 5 do 10 g uzorka za analizu, do točnosti 0,01 g (8.1) u posudu za titraciju (6.7). Mast prenositi u posudu za titraciju pipetom ili štrcaljkom (6.5).

8. 3. Određivanje

8. 3. 1. U uzorak za analizu (8. 2) dodati 50 ml otapala za mast (5. 3) pipetom ili štrcaljkom (6. 6) i otopiti mast.

8. 3. 2. Titrirati otoplenu mast standardnom otopinom tetra-n-butil amonijum hidroksida (5. 1) u struji dušika (6. 9) dok se žuta do svjetlo zelenkasta boja ne zadrži najmanje 5 s.

Određiti utrošak volumena otopine (5. 1), točnost 0,01 ml i zabilježiti podatak.

Opaske:

- I Da bi se udovoljilo zahtjevima točnog mjerenja bitno je isključiti ugljični dioksid iz posude za titraciju za trajanja postupka titracije. To se postiže titriranjem u atmosferi dušika.
- II Kao alternativa može se postupak titracije izvesti korištenjem automatskog uređaja za titraciju i kolorimetrijsko određivanje završetka titracije (Driessen et al., 1977, Cartier et al., 1984, Jellema et al., 1988).

8. 4. Slijepi pokus

Istovremeno s određivanjem kiselosti izvesti i slijepi pokus koristeći isti postupak i iste reagensije, ali izostavivši količinu uzorka koji se analizira.

Određena vrijednost u slijepom pokusu mora biti manja od 5% najniže vrijednosti utvrđene titracijom analiziranih uzoraka. Kad se utvrde veće vrijednosti slijepog pokusa, potrebno je neutralizirati otapalo za mast prije upotrebe (vidi opasku uz 5. 3).

8. 5. Kontrolni pokus

Kontrolni pokus izvesti na početku svake serije određivanja korištenjem istog postupka i istih reagensija, ali sa standardnom masti (5. 4) kao pokusnim uzorkom. Kontrolni pokus mora uključiti bar dva određivanja za jednu standardnu mast.

Kao rezultat uzeti aritmetičku sredinu očitavanja. Rezultat se može razlikovati od izračunate vrijednosti za manje od 5%, uz maksimum od 0,05 mmol u 100 g masti (vidjeti 5. 4).

Ako rezultat ne udovoljava ovom zahtjevu, valja odvojeno provjeriti reagensije, uređaje i postupke.

9. IZRAŽAVANJE REZULTATA

9. 1. Metoda izračunavanja

Kiselost masti u milimolima u 100 g masti jednaka je:

$$\text{kiselost masti} = \frac{(V_1 - V_2) c}{m} \cdot 100$$

V_1 je volumen standardne otopine tetra-n-butil amonijum hidroksida (5. 1), u mililitrima, upotrebljen za titraciju otopljene količine uzorka koji se analizira (8. 3. 2);

V_2 je volumen, u mililitrima, standardne otopine tetra-n-butil amonijum hidroksida (5. 1) utrošen za titraciju slijepog pokusa (8. 4);

c je točna koncentracija, u molima po litri, standardne otopine tetra-n-butil amonijum hidroksida (5. 1).

m je masa, u gramima, količine uzorka (8. 2).

Izračunati kiselost masti na dvije decimale.

Opaska — U interesu onih koji koriste drugačije izraze za kiselost masti (primjedba uz točku 3), navode se druge metode izračunavanja.

a. Kiselina, u miligramima kalijevog hidroksida u gramu masti:

$$\frac{56,1 \times \text{kiselost masti}}{100}$$

gdje je 56,1 relativna molekularna masa kalijevog hidroksida ($M_r(\text{KOH}) = 56,1$).

b. Postotak (m/m) slobodnih masnih kiselina (SMK%), izražen kao grami oleinske kiseline u 100 g masti, je:

$$\frac{282 \times \text{kiselost masti}}{1000}$$

gdje je 282 relativna molekularna masa oleinske kiseline / M_r (oleinska kiselina) = 282/.

10. TOČNOST

Zahtjevi preciznosti odnose se na uzorke kiselosti masti u rasponu od 0,20 do 2,00 mmol na 100 g masti. Za više razine kiselosti ovi zahtjevi nisu uvijek dokučivi.

Opaska — Vrijednost ponovivosti i ponovne izvodivosti izvedene su iz rezultata međulaboratorijskog pokusa (Jellema et al., 1988) u skladu s ISO 5725 — Točnost metoda analize — Određivanje ponovnosti i ponovne izvedivosti za standardnu metodu analize izvodi se međulaboratorijskim testovima.

10. 1. Ponovivost

Apsolutna razlika između rezultata dva pojedinačna određivanja, izvedena istovremeno ili u brzom slijedu, koja izvodi isti analitičar pod istim uvjetima, identičnim pokusnim materijalom ne bi trebao prelaziti 0,05 mmol po 100 g masti.

Odbaciti valja oba rezultata, ako je razlika veća od 0,05 mmol u 100 g masti, pa izvesti dva nova pojedinačna određivanja.

10. 2. Ponovna izvodivost

Apsolutna razlika između dva pojedinačna i neovisna rezultata koju utvrde dva analitičara koji rade u različitim laboratorijima provjeravajući identičan pokusni materijal, ne treba preći 0,08 mmol u 100 g masti.

11. IZVJEŠTAJ O POKUSU

Izvještaj o pokusu treba ukazati na metodu koja se koristila te postignute rezultate. U izvještaju će se napomenuti da li se provjeravala ponovivost. Sadržat će također, napomenu o svim pojedinostima rada, koje ne spominje ovaj Internacionalni Standard, ili ako se ostavi na volju, zajedno s pojedinostima zbivanja, koja su mogla utjecati na rezultat.

Izvještaj će uključiti sve informacije potrebne za potpunu identifikaciju uzorka.

Literatura

- DRIESEN, F. M., JELLEMA, A. Van LUIN, F. J. P., STADHOUDERS, J. and WOLBERS, G. J. M. (1977): The estimation of the fat acidity in raw milk. An adaptation of BDI method, suitable for routine assays. *Neth. Milk Dairy J.* 31, 40—55.
- Dutch Standard NEN 6854, (1989): Milk — Determination of titratable acidity of fat (in Dutch).
- CARTIER, P., CHILLIARD, Y. and CHAZAL, M. P. (1984): Dosage de l'activité lipasique et des acides gras libres du lait par titration automatique colorimétrique. *Le Lait*, 64, 340—355.
- PERRIN, D. R. and PERRIN, D. D. (1958): The determination of free fatty acids in milk. *J. Dairy Res.* 25, 221—227.
- JELLEMA, A., OGER, R., Van REUSEL, A. Milk products and butter — Determination of fat acidity. Collaborative study by joint IDF/ISO/AOAC Group E39. *Bulletin of IDF No. 235/1988*, pp. 81—91.
- VAN REUSEL, A. (1989): Contribution à l'étude de la détermination des acides gras libres dans le lait et les produits laitiers. *Mémoire No. 12*, Centre de Recherches Agronomiques de l'Etat, Gembloux, Belgique, ISBN 2-87286-600-2.

RUTINSKE METODE ODREĐIVANJA SLOBODNIH MASNIH KISELINA U MLIJEKU

Članovi IDF Grupe E39 nisu smatrali potrebnim opisivanje svih raspoloživih rutinskih metoda određivanja ukupne količine slobodnih masnih kiselina u mlijeku ili njihovih modifikacija. Odlučili su da opišu samo tri metode koje se obično koriste, a temelje na različitim principima.

Osim točnog opisa metoda raspravljaju i o nekim mogućnostima te problemima koje postavlja izvođenje navedenih metoda.

Navodimo samo točne opise dvije rutinske metode:

a) BDI METODA

Metoda pripada skupini u kojoj se slobodne masne kiseline izoliraju iz mlijeka zajedno s masti u obliku ulja. Tekuća mast djeluje kao organsko otapalo u ekstraktu slobodnih masnih kiselina iz uzorka. Slobodna se masna kiselina određuje titracijski, a izolirana se mast zbog toga otapa prikladnim otapalom.

BDI su inicijali za Bureau of Dairy Industries (Ured mljekarske industrije), američkog ureda u kome je izrađena prva standardizirana verzija metode (Standardne metode, 1985).

Opis BDI metode

1. DOMET I PODRUČJE PRIMJENE

Ovaj Internacionalni standard pobliže označava metodu određivanja titracijske kiselosti masti u sirovom mlijeku. Metoda se može primijeniti za određivanje titracijske kiselosti masti grijanog mlijeka, vrhnja i rekonstituiranog mlijeka u prahu. Titracija mlječnog proizvoda se može izvesti poslije izdvajanja masti različitim metodom. Standard je namijenjen za seriju od pet do više stotina uzoraka dnevno.

Metoda se može primijeniti za:

- sirovo mlijeko,
- grijano mlijeko i rekonstituirano mlijeko u prahu. Nekada je potrebno snažnije mućkati da se postigne temeljito odvajanje masti,
- vrhnje s bilo kojom količinom masti, pod uvjetom da se proizvod razrijedi tako da sadrži 4—6% masti,
- postupak titracije je primjenjiv za mast izdvojenu iz različitih mljećnih proizvoda.

Opaska: Za mlijeko i druge proizvode koji sadrže $\leq 2\%$ masti u kojima je bakteriološka ili enzimatska aktivnost dostigla razinu koagulacije te fermentirane mlječne proizvode ova se metoda ne primjenjuje.

2. REFERENCE

IDF Standard 50B/1985 — Mljeko i mlječni proizvodi — Metode uzimanja uzoraka.

3. DEFINICIJA

Ovaj Internacionalni standard primjenjuje slijedeću definiciju:

Titracijska kiselost masti: količina tvari lužine potrebna za neutralizaciju slobodnih masnih kiselina sadržanih u masi masti prisutnoj u pokusnom uzorku prema uputama opisanog postupka. Kiselost masti se izražava u mmol u 100 g masti.

Opaska — Metoda neće tako potpuno obuhvatiti masne kiseline kratkog lanca datog mlijeka ili mlječnog proizvoda kao masne kiseline dugog lanca. Količina slobodnih masnih kiselina kako je određena ovim standardom specifična je za opisanu metodu odvajanja masti i titraciju i nije sasvim uporediva s vrijednostima određenim drugim metodama.

4. PRINCIP

Određena količina mlijeka se temeljito izmiješa s otopinom koja sadrži natrium tetrafosfat i površinski aktivnu tvar te zagrije u vodenoj kupelji koja vri da bi se odijelila mast. Odvagnuta količina masti otopi se u organskom otapalu i titrira.

Opaska — Metoda opisana u ovom standardu je modifikacija BDI metode (Standardne metode, 1985)

5. REAGENCIJE

Sve regeneracije moraju biti priznate analitičke klase ili kvalitete koja osigurava rezultate jednake onim utvrđenim p.a. kvalitetom.

5.1. BDI reagens

Izmiješati 30 g Triton X-100 i 70 g Na-tetrafosfata pa tu smjesu rastopiti u oko 700 ml destilirane vode bez zagrijavanja. Podesiti pH do 6,6 s otopinom fosforne kiseline (H_3PO_4) = 1 mol/l. Dopuniti do 1 litre destiliranom vodom, promiješati i, ako je potrebno, ponovno podesiti pH. Reagencija je stabilna mjesec dana, ako se skladišti na tamnom mjestu u hladnjaku.

Opaska — Na-tetrafosfat je polifosfat koji sadrži natrium tetrafosfat ($NaPO_3$)₄ kao glavni sastojak pored još nekih polifosfata.

5.2. Timol modra boja ($C_{27}H_{30}O_5S$). 0,1 g/l indikator otopine u 2-propanolu.

Otopiti 0,1 g timol modre natrijeve soli u 100 ml 2-propanola da bi se pripremila skladišna otopina. Prije upotrebe razrijediti jedan dio (volumen) ove otopine s devet dijelova 2-propanola.

5.3. Otapalo masti

Izmiješati jedan dio (volumen) timol modre otopine (5.2) s četiri dijela lakog benzina (raspon vrelišta 60 do 80°C). Skladištiti smjesu u tamnom, do najviše mjesec dana.

5.4. Tetra-n-butil amonijum hidroksid ($C_{16}H_{37}NO$), 0,01 mol/l otopine u smjesi 2-propanol/metanol.

Razrijediti jedan dio (volumen) otopine tetra-n-butil amonijum hidroksida (0,1 mol/l 2-propanol/metanol smjese) s 9 dijelova 2-propanola do konačne

koncentracije c ($C_{16}H_{37}NO$) 0,01 mol/l. Opaska — Koncentracija standardne volumetrijske otopine tetra-*n*-butil amonijum hidroksida može se izmijeniti za skladištenja i kada se prenosi u biretu. Zbog toga se stvarna koncentracija otopine mora odrediti neposredno prije upotrebe, na četiri decimale, titracijom sa standardnom otopinom kalium hidrogen ftalata ($KHC_8H_4O_4$) koristeći kao indikator timol modru boju. Ipak, ako je bireta opremljena uređajem koji isključuje ulaz ugljičnog dioksida, koncentracija je stabilna za nešto duljih razdoblja. U tom se slučaju stvarna koncentracija može provjeravati za svaku seriju određivanja izvođenjem kontrolnog pokusa koristeći standardnu mast (5.5) kao uzorak.

5.5. Standardna masti

Standardna se mast povremeno koristi za kontrolu čitavog postupka titracije.

Pripremiti standardnu mast od oprane mlječne masti (kao dolje) kiselosti $< 0,01$ mmol/100 g masti. Otopiti poznate količine palmitinske kiseline ($C_{16}H_{32}O_2$) u masti, prikladne su koncentracije u rasponu 0,5 — 2,0 mmol u 100 g masti. Kiselost standardne masti se izračuna u mmol palmitinske kiseline koja je dodana u masu mlječne masti i izrazi u mmol u 100 g masti. Ova izračunata vrijednost može služiti kao standardna vrijednost.

Oprana se mlječna mast priprema od mlječne masti dobre kvalitete. (Specifikacije »dobre kvalitete« pronaći u: FAO/WHO Standard A-2, Sekcija A.) Mlječna mast se pere vodenom otopinom kalium hidroksida, c (KOH) = 0,1 mol/l, a iza toga vodom, centrifugira i filtrira kroz filter papir.

Kiselost standardne masti treba odrediti kako je opisano u 8.2. Ovaj će se rezultat razlikovati za manje od 5% od izračunate vrijednosti i udovoljiti zahtjeve o ponovivosti (10.1).

Standardnu masu valja podijeliti u poduzorke i uskladištiti u hermetiski zatvorenoj boci na tamnom mjestu do 4 tjedna uz maksimalnu temperaturu 5°C. Ako valja dulje skladištiti, uzorci se moraju smjestiti zamrznuti.

6. UREĐAJI

6.1. Odmjerne pipete ili štrcaljke kapaciteta 10 i 25 te 60 ml.

6.2. Epruveta za odvajanje masti, MONED epruveta (na slici), ili butirometar za određivanje količine masti u siru van Gulik (ISO 3432:1975 — Sir — Određivanje količine masti — butirometar za metodu van Gulik).

6.3. Vodena kupelj koja ključa

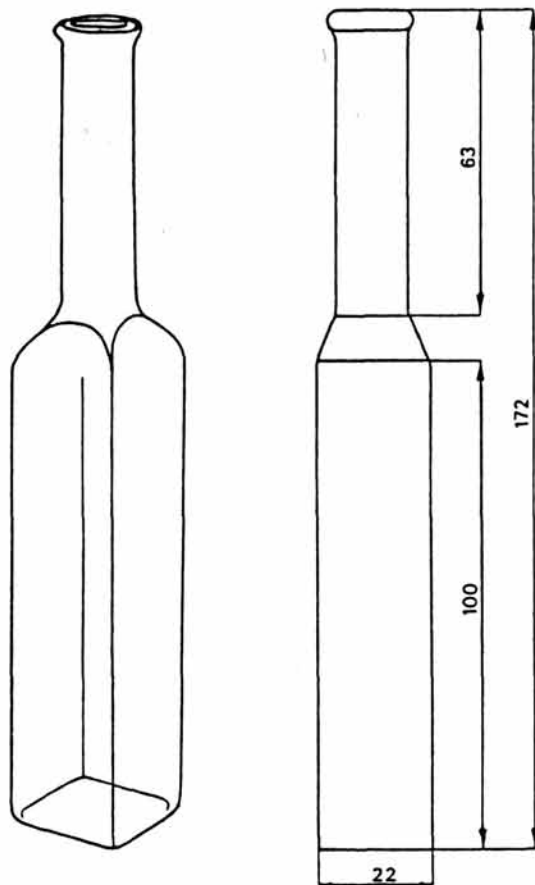
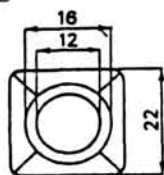
6.4. Vodena kupelj, 45 ± 1 °C

6.5. Kalibrirana štrcaljka, podešena da izdvaja poznatu količinu mlječne masti (oko 0,25 g) temperature 45 °C uz preciznost do 2 mg mlječne masti. Količina masti u pipeti koja se prenosi u slijedeći uzorak mora biti manja od 3% pipetirane količine.

6.6. Posuda za titraciju, kapaciteta koji može varirati od 10 do 100 ml, ovisno o količini uzoraka koje valja titrirati u neprekidnom slijedu.

6.7. **Mikrobireta**, graduirana s odjelima od najmanje 0,005 ml.

6.8. **Snabdijevanje dušikom**, bez ugljičnog dioksida.



MONED: epruveta za odvajanje masti, otkrivena u laboratoriju Stanice za kontrolu mlijeka 'Oost-Nederland', Zutphen. Može se nabaviti u Centrali Aankoop FNZ, Arnhem Netherlands. Dimenzije u mm.

6.9. **Boca za pranje plina**, sadrži laki benzin (raspon vrenja 60 do 80°C), a povezana je s obskrbljivanjem dušikom (6.8) i posudom za titraciju (6.6).

6.10. **Kolorimetar sa sondom za uranjanje**, prikladan za mjerenja na duljina-ma između 600 i 620 nm, koji se može priključiti na komplet za titraciju (6.11).

6.11. **Komplet za titraciju**, koji se može povezati na kolorimetar (6.10) za automatsko djelovanje mikrobirete (6.7).

Opaska — Kolorimetar (6.10) i komplet za titraciju (6.11) nisu potrebni za određivanje, ali olakšavaju postupak s velikim serijama uzoraka.

7. UZIMANJE UZORAKA I PRETHODNI POSTUPAK S UZORCIMA

7.1. Uzimanje uzoraka

Prema metodama uzimanja uzoraka: IDF Standard 50B/1985 — Mlijeko i mlječni proizvodi — Metode uzimanja uzoraka.

7.2. Konzerviranje uzoraka

Uzorci se moraju čuvati i prenositi u uvjetima temperature 0 do 1°C i moraju se analizirati unutar 36 sati. Za dulje čuvanje i/ili čuvanje u hladnjaku (oko 5°C) epruvete moraju sadržati otopinu vodikovog superoksida konačne koncentracije 0,02% H₂O₂. S ovim se konzervansom uzorci mogu čuvati jedan tjedan.

7.3. Priprema uzorka

Ako je potrebno, promiješati uzorak, ali bez povećavanja temperature.

8. POSTUPAK

8.1. Odvajanje masti

U svim se slučajevima mora postići omjer 3,5 dijelova mlijeka na 1 dio reagensa.

- Ako se koristi butirometar Van Gulik, prije punjenja zatvoriti mali otvor.
- Koristiti: za MONED epruvetu, 31 ± 1 ml mlijeka i 8,9 ± 0,1 ml BDI reagensije, a za Van Gulik butirometar, 16,0 ± 0,5 ml mlijeka i 4,5 ± 0,1 BDI reagensije.
- Odmah poslije punjenja zatvoriti epruvetu za odvajanje i promiješati sadržine. Za sirovo je mlijeko dovoljno 10 puta okrenuti epruvetu pod kutom od 180°, a ostale uzorke je potrebno intenzivno mućkati za trajanja miješanja.
- Kad se koriste butirometri, sadržinu valja podići do gornje strane uske cijevi potiskivanjem gumenog čepa.
- Čim je to moguće (unutar 5 minuta) smjestiti epruvetu u kipuću vodenu kupelj i ostaviti je tamo 15 minuta.
- Temperatura vodene kupelji ne smije pasti ispod 95°C i mora ponovno ključati unutar 5 minuta. Razina vode će biti u razini gornje ravnine ili iznad razine sadržine epruvete.

- Kad je mast odvojena (poslije 15 min) epruveta se premjesti u vodenu kupelj temperature $45 \pm 1^\circ\text{C}$ s razinom vode u visini ili iznad vrha stupca masti.
- Osim za sirovo mlijeko centrifugiranje može biti nužno zbog postizanja boljeg odvajanja masti prije stavljanja u kupelj temperature 45°C .

Opaska — U slučajevima u kojima se mast teško odvaja poslije zagrijavanja, epruvete se mogu staviti u hladnjak da bi se mast skrutnula. Kuglice masti će se sjediniti, a mast odvojiti kad se epruvete smjeste u vodenu kupelj temperature $45 \pm 1^\circ\text{C}$.

Mast uzorka za analizu je pripravljena za titraciju kad temperatura masti padne do 45°C .

8.2. Titracija

- Titrira se u atmosferi bez ugljičnog dioksida. Dušik se diže u obliku mjehurića kroz bocu za pranje plina (6.9) koja sadrži laki benzin (vrelišta $60\text{--}80^\circ\text{C}$). Boca se puni u pravilnim razmacima zbog toga što laki benzin hlapi.
- U posudu za titraciju prenijeti prikladnu količinu otapala za mast i oko 0,25 g standardne masti. Osloboditi od ugljičnog dioksida komplet za titraciju.
- Kontrolirati duljinu vala postavljanjem i podešavanjem kolorimetra uz transmisiju 0 i 100%.
- Podesiti završnu točku titracije na 70% transmisije i neutralizirati standardnom otopinom tetra-n-butil amonijum hidroksida (5.4).
- Pomoću kalibrirane štrcaljke dodati oko 0,25 g standardne masti (odmjerene precizno) i titrirati. Ova vrijednost titracijske kiselosti masti mora biti suglasna s izračunatom vrijednosti standardne masti (5.5). Ako je potrebno, ponavljati postupak dok se rezultat ne uskladi s vrijednosti određenom za standard.
- Pomoću kalibrirane štrcaljke dodati oko 0,25 g masti (točno izmjerene) uzorka koji se analizira u posudu za titraciju i titrirati.
- Otapalo za mast se mora zamijeniti svježim kada su za svaka 2 ml prisutnog otapala za mast bile izvedene tri titracije.

Opaska — Za jednostavan postupak titracije (za malen broj uzoraka) može se i vizualno prosuditi promjena boje (žute u svjetlo zelenkastu) i odrediti krajnju točku titracije. Otapalo masti neutralizirati prije dodavanja uzorka za analizu. Najmanje dvije titracije valja izvesti u 5 ml otapala za mast.

9. ISTRAŽIVANJE REZULTATA

9.1. Metoda izračunavanja

Kiselost masti uzorka koji se analizira, u milimolima na 100 g masti, izračunava se korištenjem formule:

$$\text{BDI} = \frac{100 \times V \times c}{m}$$

gdje je:

BDI brojčana vrijednost kiselosti masti u mmol na 100 g masti,

c brojčana vrijednost točne koncentracije, u molima po litri, standardne volumne otopine tetra-n-butil amonijum hidroksida (5.4),

V numerička vrijednost obujma, u mililitrima, standardne otopine tetra-n-butil amonijum hidroksida (5.4) korištene za titraciju masti uzorka koji se analizira (8.2),

m brojčana vrijednost mase masti uzorka za analizu prenijeta kalibriranim štrcaljkom u posudu za titraciju.

10. TOČNOST

Zahtjevi o preciznosti odnose se na uzorke kiselosti masti u rasponu od 0,20 do 2,00 mmola na 100 g masti. Za više razine kiselosti ovi se zahtjevi ne mogu uvijek dokučiti.

10. 1. Ponovivost

Apsolutna razlika između rezultata dva pojedinačna određivanja koja izvodi, istovremeno ili brzo uzastopce u jednakim uvjetima, isti analitičar koristeći identičan materijal za analizu ne smije biti veća od 0,05 mmol za 100 g masti.

Odbacuju se oba rezultata ako razlika prelazi 0,05 mmol za 100 g masti pa se izvedu dva nova pojedinačna određivanja.

10. 2. Ponovna izvodivost

Apsolutna razlika između dva pojedinačna neovisna rezultata koja su odredila dva analitičara u različitim laboratorijima analizirajući isti pokusni materijal ne smiju prelaziti 0,08 mmol u 100 g masti.

Opaska — Praktično iskustvo:

Godine 1981. u pravilnim je razmacima šest puta dostavljeno pet duplikata podijeljenih uzoraka u 9 laboratorija u Nizozemskoj.

Standardna devijacija za 270 dvostrukih određivanja bila je 0,026 (raspon između laboratorija 0,011 — 0,034).

Poslije izračunavanja standardne vrijednosti za svaki uzorak bila je standardna devijacija razlike za 270 uzoraka 0,058 (raspon između laboratorija 0,031 — 0,087).

Ručna titracija i vizuelno prosuđivanje određivanja završetka titracije usporedivo je s postupkom IDF Standarda 6B/1989. O točnosti brojki referirali su JELLEMA et al. (1988).

11. IZVJEŠTAJ O POKUSU

Izvještaj o pokusu mora specificirati metodu koja se koristila i postignut rezultat. Napomenut će da li je bila kontrolirana ponovna izvodivost. Također valja spomenuti svaku pojedinost rada koja nije opisana u ovom Internacionalnom standardu ili se smatra stavljenom na volju, zajedno s pojedinostima o okolnostima koje su mogle utjecati na rezultate.

Izvještaj o pokusu će uključiti sve informacije potrebne za potpunu identifikaciju uzorka.

Literatura

- CARTIER, P., CHILLIARD, Y. et CHAZAL, M. P. (1984): Dosage de L'activité lipasique et des acides gras libres du lait par titration automatique colorimétrique. *Le Lait*, 64, 340—355.
- DRIESSEN, F. M., JELLEMA, A., Van LUIN, F. J. P., STADHOUDERS, J. and WOLBERS, G. J. M. (1977): The estimation of the fat acidity in raw milk. An adaptation of the BDI method, suitable for routine assays. *Neth. Milk Dairy J.* 31, 40—55.
- IDF Standard 6B/1989. Milkfat products and butter — Determination of fat acidity.
- JELLEMA, A. (1979): Automatische titratie met behulp van een colorimeter bij de bepaling van de zuurtegraad van het vet. Verslag van een oriënterend onderzoek, MOC te Wageningen in samenwerking met Instrumentenhandel •Zuid Holland• v/h A. Höfelt BV te 's-Gravenhage.
- JELLEMA, A., OGER, R. and Van REUSEL, A. (1988): Milkfat products and butter — Determination of fat acidity. Collaborative study by Joint IDF/ISO/AOAC Group E39. *Bulletin of IDF* N° 235, 81—91.
- KUZDZAL-SAVOIE, Simone. Determination of free fatty acids in milk and milk products. In *Bulletin of IDF* N° 118/1980, pp. 53—56.
- PERRIN, D. R. and PERRIN, D.D. (1958): The determination of free fatty acids in milk. *J. Dairy Res.* 25, 221—227.
- Standard methods for the examination of dairy products. *American Public Health Association* Inc, New York, 15th ed. 327—329.
- Van RUSEL (1989): A Contribution à l'étude de la détermination des acides gras libres dans le lait et les produits laitiers. Mémoire n° 12, Centre de Recherches Agronomiques de l'Etat, Gembloux, Belgique, ISBN 2-87286-000-2.

b) METODA ANALITIČKOG SISTEMA NEPREKINUTOG PROTJECANJA

Metoda analitičkog sistema neprekinutog protjecanja temelji na jednom načinu ekstrakcije, koji su prvi opisali DOLE i MEINERTZ (1960) a primjenjivao se za određivanje slobodnih masnih kiselina u krvnoj plazmi. Kasnije je postupak ekstrakcije pojednostavljen, a smjesa otapala modificirana za analizu mlijeka i mlječnih proizvoda. Poslije ekstrakcije slobodnih masnih kiselina one se određuju na temelju promjene fenol crvene boje u otopini kojoj je dodan pufer.

Opis metode analitičkog sistema neprekinutog protjecanja:

ODREĐIVANJE SLOBODNIH MASNIH KISELINA U MLJEKU, VRHNJU I REKONSTITUIRANOM MLJEKU U PRAHU

1. DOMET I PODRUČJE PRIMJENE

Ovaj Međunarodni standard opisuje rutinsku metodu određivanja slobodnih masnih kiselina u mlijeku, vrhnju i rekonstituiranom mlijeku u prahu, korištenjem Technicon Auto-analizatora II. Standard je podešen za serije uzoraka od 20 do nekoliko stotina u jednom danu.

Metoda se može primijeniti za:

- mljeko, obrano mljeko i rekonstituirano obrano i punomasno mljeko u prahu,
- vrhnje ili bilo koju mast, pod uvjetom da je proizvod razrijeđen toliko da se količina slobodnih masnih kiselina uklopi u raspon za koji je uređaj kalibriran,
- druge tekuće proizvode nastale od mlijeka.

Opaska — Mlijeko i drugi proizvodi koji se razgrađuju bakteriološki ili enzimatski do te mjere da je pH ispod 6,3 ne mogu biti podvrgnuti analizi primjenom ove metode.

2. REFERENCE

IDF Standard 50B/1985 — Mlijeko i mlječni proizvodi — Metode uzimanja uzorka.

3. DEFINICIJA

Količina slobodnih masnih kiselina mlijeka i mlječnih proizvoda: količina masne supstance ekstrahirane opisanom metodom, odmjerena pH indikatorom i izražena u miliekvivalentima/litra.

Opaska: Metodom će se manje točno odrediti masne kiseline kratkog lanca nego masne kiseline dugog lanca. Osim toga male će se količine mlječne kiseline izlučiti i praktički povećati rezultat. Količina slobodnih masnih kiselina, kako se određuju standardnom, specifična je za opisanu metodu, ali rezultati nisu usporedivi s odgovarajućim vrijednostima određenim drugim metodama.

4. PRINCIP

Uzorak se pomiješa s otopinom za ekstrakciju dvostruke namijene da zaustavi enzimatsku lipolitičku aktivnost i da izluči slobodne masne kiseline iz uzorka. Smjesa se može čuvati do 7 dana prije analize. Analizira se analitičkim sistemom neprekinutog protoka, najprije uklanjanjem iz uzorka ugljičnog dioksida koji smeta i obojenog reagensa, a tada miješanjem dijelova ekstrakta s indikator-pufer otopinom u prethodno određenim proporcijama iza čega slijedi kolorimetrijsko mjerenje i bilježenje promjene boje izazvano ekstrahiranim kiselinama. Poblize se određivanje provede usporedbom s otopinama koje sadrže poznate količine palmitinske kiseline.

5. REAGENCIJE

Reagencije moraju biti p. a. kvalitete ili odgovarajuće čistoće. Kvaliteta vode mora odgovarati dva puta destiliranoj u staklenom uređaju.

5. 1. Otopalo za ekstrakciju

| | |
|-------------------------------|---------|
| Izopropanol | 1000 ml |
| Heptan | 1000 ml |
| Sumporna kiselina (0,5 mol/l) | 80 ml |

5. 2. Rezerva otopine pufer-indikatora

| | |
|------------------|-----------|
| Natrium barbital | 2,5 g |
| Fenol crvena | 1,0 g |
| Voda | do 100 ml |

Otopiti natrium barbital u oko 50 ml vode temperature 60—70° C, tada otopiti fenol crvenu u otopini, ohladiti i dopuniti u 100 ml. Čuvati u mraku.

5. 3. Radna otopina pufer-indikatora

| | |
|-----------------------------------|---------|
| Rezervna otopina pufer-indikatora | 3,2 ml |
| Etanol (94—95% v/v) | 1000 ml |

Otopinu valja pripremiti svakog dana i držati je u tamnoj boci.

5. 4. Otopina za pranje, analitičar je koristi za pranje i razrijeđivanje

| | |
|-------------|---------|
| Heptan | 1000 ml |
| Izopropanol | 20 ml |

5. 5. Tekućina za uklanjanje ugljičnog dioksida koristi se za pranje plina dušika

50%-tna otopina kalijevog hidroksida (w/w)

Heptan za stvaranje sloja iznad otopine hidroksida u uređaju za pranje

N₂.

5. 6. Otopina zalihe masne kiseline (2,0 meq/l)

| | |
|----------------------|----------|
| Palmitinska kiselina | 0,160 ml |
| Otapalo (5. 1) | 1000 ml |

5. 7. Radni standardi masne kiseline

| Masna kiselina rezervna otopina (5. 6) ml | Otopina za ekstrakciju (5. 1) ml | meq/l |
|---|-------------------------------------|-------|
| 10,0 | 0 | 2,0 |
| 7,5 | 2,5 | 1,5 |
| 5,0 | 5,0 | 1,0 |
| 3,0 | 7,0 | 0,6 |
| 2,0 | 8,0 | 0,4 |
| 1,0 | 9,0 | 0,2 |

Pripremiti standardne epruvete, analogno epruvetama za uzorak, mješanjem u epruveti (6. 2) 1,5 ml vode i 5 ml svake masne kiseline radnih standarda.

Standardi se mogu čuvati u zatvorenim epruvetama u uvjetima temperature hladnjaka 4 tjedna bez primjetivih promjena svojstava.

6. UREĐAJ

6. 1. Analitički sistem neprekidnog protoka, na primjer, **sistem Auto-analizatora II**, koji uključuje model napravu za ubacivanje mjehurića pročišćenog N₂ kroz uzorak prije uzimanja uzorka, adekvatan sistemima crpke, kolorimetar

s kivetama za protok $1,5 \times 15$ mm i filterom 560 nm, te registrator. U slučaju velikog broja uzoraka dnevno po izboru, jednolinijski stolni sistem računara za kontrolu analitičkog postupka i rezultata serije procjenjivanja.

6. 2. **Epruvete**, 16×100 mm, s kapicama za šarafljenje, bolje obloženih politetrafluoretilenom premazanim umetcima i namještenom model Auto-Analizatora (Sovirel, France : epruvete 4.611.52, kapice 4.708.67 ili ekvivalentne).

6. 3. **Kutije**, za prenos epruveta s konzerviranim uzorcima.

6. 4. **Tresilica**, za cijele kutije s epruvetama ili za odgovarajući broj pojedinačnih epruveta.

6. 5. **Boca za pranje plina**

6. 6. **Štrcaljke**, kapaciteta 1,5 i 5,0 ml.

6. 7. **Graduirane pipete**, kapaciteta 5 i 10 ml s raspodjelom 0,1 ml, koje udovoljavaju ISO/R 835, klasa A.

6. 8. Volumetrijske odmjerne tikvice, kapaciteta 100 i 1000 ml.

7. UZIMANJE UZORKA

Prema IDF Standardu 50B/1985.

8. POSTUPAK

8. 1. Konzerviranje uzorka

U epruvetu prenijeti 1,5 ml uzorka, koji već sadrži 5,0 ml otopine za ekstrakciju. Zamijeniti kapicu i hermetiski zatvoriti. Sadržina se promućka kratko ali snažno. Epruvete se mogu čuvati u kutiji za prevoz u uvjetima sobne temperature do analize.

8. 2. Ekstrakcija

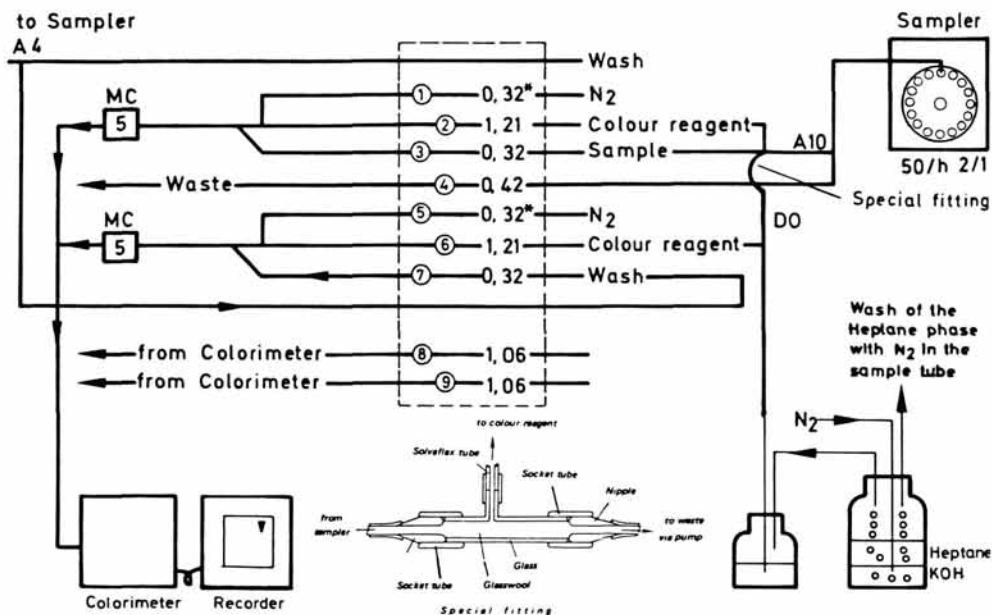
Čitave se kutije s epruvetama u kojima se nalaze uzorci i otapalo za ekstrakciju mogu staviti na tresilicu. Izmjenično se pojedine epruvete smještaju u držače tresilice. Epruvete se tada tresu 30 min tako da se dva sloja otapala potpuno izmiješaju.

8. 3. Analiza

Epruvete moraju mirovati 60 min poslije ekstrakcije kako bi se dovršilo razdvajanje faza, poslije čega se smjeste na kolut držača uzorka analizatora. Slijed epruveta treba dati prednost rasporedu: 6 epruveta standarda, od kojih svaka predstavlja koncentracije iz odjeljka 5. 7., tada uzorcima za ostatak tablice. Ako valja analizirati više od 34 uzorka, svaki novi kolut mora ponovno počinjati sa 6 standardnih epruveta.

Auto-Analizator valja postaviti kako je označeno na slici. Instrukcije o izvodenju analize Auto-Analizatorom valja slijediti kako se navodi u priručnicima.

Kako ugljični dioksid u uzorcima i u pufer-indikatoru znatno utječe na rezultat, izvanredno je bitan uređaj za raspored dušika koji ne sadrži ugljični dioksid, u bocu za pufer-indikator i uzorak.



Slika: Određivanje slobodnih masnih kiselina Auto-Analizatorom II — sistem MC = zavoj za miješanje, epruvete = Solvalflex/Tygon, količina = ml/min, protočna kiviteta = 1,5 mm × 15 mm, filter = 560 nm.

Jedan se kanal fotometra puni strujom uzorak-reagensija, a standardni kanal strujom otopine za pranje bez ugljičnog doksida kako bi se nadoknadio različite promjene i naplavine. Mjeri se uz valnu duljinu 560 nm.

Punovivost rezultata utvrđena u 9. 2. odnosi se na analizu 40 uzoraka/sat. Ako je obim analiza veći, mora se provjeravati ponovivost u uvjetima navedenim kao devijacija od ovog standarda.

Heptanom zasićeni dušik bez ugljičnog dioksida izbacuje uzorak i reagens boju. Da bi se izbjegla para iz vodene faze i mjehurići u struji za analizu, struja je uzorka podijeljena posebnim uređajem, ispunjenim staklenom vnom, pa se samo 0,32 ml uzetog uzorka miješa s 1,21 ml reagensa boje i razdijeli u odsječke s 0,23 ml dušika. U standardnom kanalu koji prijeći otjecanja izazvana promjenama indikatora koristi se umjesto uzorka smjesa za pranje u kojoj nema ugljičnog dioksida. Mjeri se u protočnoj kivetu 15 mm uz 560 nm poslije miješanja u zavoj za miješanje.

9. IZRAŽAVANJE REZULTATA

9. 1. Računanje

Ako analizator radi jednom linijom sa stolnim računarom, odobreni će program izračunati i ispisati rezultate.

Kad rezultate valja računati rukom, potrebno je skicirati krivulju kalibriranja koristeći svaki niz od 6 standarda. Krivulja obično neznatno skreće od ravne linije, a količine slobodne masne kiseline valja procijeniti grafički na krivulji.

Ako je dostupan odvojeni računar i program s prikladnom krivuljom to se može koristiti za interpoliranje na krivulji i ocjenu rezultata. Rezultati se izražavaju u miliekvivalentima u litri.

9. 2. Točnost

9. 2. 1. Ponovivost rezultata

Razlike između rezultata dva ponavljanja izvedena kao dvije uzastopne analize unutar serije uzoraka u kolutu za uzorke ne smiju prelaziti koeficijent varijacije 4%.

9. 2. 2. Ponovno utvrđivanje masnih kiselina

Ponovno određivanje različitih masnih kiselina standardnim postupkom trebalo bi slijediti rezultate u Tabeli.

Opaska — Vrijednosti u Tabeli su rezultati serije pokusa u kojima se koristilo, koliko je to bilo moguće, iste postupke kojima se pripremaju i analiziraju standardi (4. 7). Masne kiseline su bile otapane u propanolu, a dvije koncentracije svake kiseline dodane su u uzorak mlijeka.

| Masna kiselina Fatty acid | meq/l | Ponovno određeno % — Recovery in % | |
|------------------------------|-------|------------------------------------|-----------------|
| | | Određeno Observed | Prosjek Mean |
| C ₄ | 0,5 | 67,0 | 60,0 |
| | 1,0 | 53,0 | |
| C ₆ | 0,5 | 70,9 | 64,9 |
| | 1,0 | 58,8 | |
| C ₈ | 0,5 | 77,7 | 72,2 |
| | 1,0 | 66,7 | |

| | | | |
|-----------------|-----|-------|-------|
| C ₁₀ | 0,5 | 77,7 | 77,1 |
| | 1,0 | 76,5 | |
| C ₁₂ | 0,5 | 78,6 | 81,5 |
| | 1,0 | 84,3 | |
| C ₁₄ | 0,5 | 95,2 | 94,0 |
| | 1,0 | 92,8 | |
| C ₁₆ | 0,5 | 99,0 | 98,2 |
| | 1,0 | 97,4 | |
| C ₁₈ | 0,5 | 101,0 | 101,0 |
| | 1,0 | 101,0 | |

10. IZVJEŠTAJ O POKUSU

Izvještaj o pokusu treba ukazati na upotrijebljenu metodu i postignute rezultate. Također valja napomenuti svaku pojedinost postupka koja nije naznačena u Međunarodnom standardu ili se smatra stavljenom na izbor, zajedno sa svim pojedinostima slučajeva koji bi vjerojatno mogli utjecati na rezultate.

Izvještaj će uključiti i sve informacije potrebne za potpunu identifikaciju uzorka.

Literatura

- DOLE, V. P. and MEINERTZ, H. (1960): *J. Biol. Chem.* 325 (9), 2595—2599
LINDQUIST, B., ROOS, T. and FUJITA, H. (1975): *Milchwiss.* 30 (1), 12—17.
SUHREN, G., HEERSCHEN, W. and TOLLE, A. (1977) *Milchwiss.* 32 (11), 641—643.
WORSTORFF, H., HEESCHEN, W., REICHMUTH, J. and TOLLE, A. (1972): *Milchwiss.* 27 (8), 447—480.

Redakcija