

Vrijednosti, na koje obraćamo pažnju čitalaca, ne predstavljaju apsolutni standard. Poznato je — a i naši pokusi potvrđuju to — da brzina umnažanja mikroorganizama u mlijeku zavisi o mnogim činiocima i varira od mjesta do mjesta i u sezonama. Ipak mogu ti prosječni podaci dobro poslužiti za opću orijentaciju.

Brojke i točke te linije u dijagramu govore same, zato ne bih trošio mnogo riječi u komentiranje, nego bih preporučio čitaocu, neka ih desetak minuta proučava. Čitalac će tako vidjeti među ostalim, kako je za kvalitet večernjeg mlijeka sudbonosna noć, koju ono odleži poslije mužnje; vidjet će na pr. i to, da se između šest i dvanaest sati poslije mužnje broj klica u mlijeku samo malo promijenio kod 12°C, a da se u istom razdoblju povećao 2 do 5 puta, kad je mlijeko imalo 17°C; nadalje da je kod 22°C (t. j. približno kod temperature, kod koje mlijeko često prenoći kod proizvođača) broj klica narastao za to vrijeme 25 do 75 puta.

Pisac bit će sretan, ako predloženi podaci pomognu našim mljekarskim stručnjacima riješiti odgovorni gospodarski i organizacioni problem, kako će što racionalnije iskorišćivati napor i materijalna sredstva za saniranje higijenskih prilika proizvodnje mlijeka, za rano i dovoljno hlađenje i za ekspeditivno sabiranje mlijeka.

**Dr. Silvija Miletić, Zagreb**

Zavod za laktologiju PŠF

## ANALIZA KAZEINA

(određivanje sadržine vode, masti, pepela te stupnja kiselosti i topljivosti)

### 1. Određivanje sadržine vode

Sadržina vode, slatkog ili kiselog kazeina određuje se sušenjem 3 grama dobro pripremljenog uzorka kazeina (usitnjenog do veličine glavice pribadače i dobro promiješanog) u plitkoj posudici od platine, aluminija, nikla ili nezardivog čelika, poznate težine u sušioniku na temperaturi 101—102°C tokom 5 do 6 sati, odnosno dok se ne otpari sva voda (težina posudice i kazeina dva uzastopna vaganja jednaka). Prije vaganja treba posudice s uzorcima ohladiti u eksikatoru. Sadržina vode svakog uzorka određuje se u duplikatu.

Sadržina vode kazeina % =  $\frac{\text{razlika težine prije i poslije sušenja}}{\text{težina uzetog uzorka}} \times 100$

### 2. Određivanje sadržine masti

Sadržina masti, slatkog i kiselog kazeina može se grubo odrediti nekim volumetrijskim metodama, a točnije gravimetrijskim metodama.

#### a) Volumetrijske metode:

Rochaix i Tapernoux smatraju, da je za industrijske potrebe dovoljno informativna acidobutirometrijska metoda, koju je Teichert uveo za određivanje sadržine masti u mlijeku u prahu. Taj postupak nešto

dulje traje, ako se umjesto mlijeka ispituje kazein, naročito, ako je to kiseli kazein, koji se dosta teško otapa.

**Pribor:** precizna vaga, Gerber centrifuga, vodena kupelj, pipete od 10, 8 i 1 ccm, Teichert-butirometri za mlijeko u prahu (do 35%) i lijevci za prah.

**Reagencije:** tehnički čista sumporna kiselina sp. težine 1,820 do 1,825 i amilni alkohol bez furfurola sp. težine 0,815.

**Postupak:** U butirometar stavimo 10 ccm sumporne kiseline, dodamo 8 ccm vode i 1 ccm amilnog alkohola. Vagnemo 2,5 grama dobro pripremljenog uzorka kazeina i uspemo kazein u butirometar (s pomoću posve suhog lijevca za prah ili posudice za vaganje). Začepimo butirometar i energično mućkamo, dok se kazein ne otopi. Centrifugiramo 5 minuta (1.200 okretaja). Stavimo butirometre u vodenu kupelj s temperaturom 65°C i poslije deset minuta očitamo sadržinu masti na dnu meniskusa. Dobro je centrifugirati i stavljati u vodenu kupelj nekoliko puta uzastopce, tada očitavamo na sredini meniskusa.

Pien preporučuje slijedeću acidobutirometrijsku metodu:

**Pribor:** sav pribor potreban za određivanje sadržine masti u mlijeku po Gerberu, precizna vaga i specijalni butirometri tipa »Fermiers Réunis«, koje proizvodi tvrtka Gerber u Zürichu (ti su butirometri vrlo slični Siegfeldovim butirometrima za obrano mlijeko).

**Reagencije:** Gerberova sumporna kiselina (sp. tež. 1,820 do 1,825) i amilni alkohol.

**Postupak:** U suh i čist butirometar stavimo 20 ccm sumporne kiseline, 20 ccm vode i dva (2) grama dobro pripremljenog uzorka kazeina, dodamo 1 ccm amil-alkohola. Začepimo butirometar i temeljito promućkamo. Stavimo u vodenu kupelj s temperaturom 65—70°C tokom 10 minuta i povremeno mućkamo. Centrifugiramo 5 minuta, stavimo u vodenu kupelj te ponovno centrifugiramo, a zatim ostavimo butirometre 24 sata na sobnoj temperaturi, te sutradan ponovno ugrijemo u vodenoj kupelji na 65—70°C, zatim centrifugiramo 5 minuta i najzad očitamo sadržinu masti na temperaturi 65°C (prethodno treba držati butirometre u vodenoj kupelji).

b) Gravimetrijska metoda: Gottlieb-Röse.

**Reagencije:** ammonium hidroksid (10%-tna otopina), 96%-tni etil alkohol, etil-eter (sp. težina 0,718 kod 20°C), petrol-eter (vrelšte 40—60°C). (Eter i petrol-eter ne smiju ostaviti taloga, ako se 100 ccm njihove smjese suši i otpari kod 101—102°C).

**Pribor:** staklene cijevi za ekstrakciju s uređajem za prelijevanje otopine masti u eteru i petrol-eteru (siphon); posudice za kristalizaciju.

**Postupak:** vagnemo točno 0,58—0,78 grama dobro pripremljenog uzorka kazeina i prenesemo ga u epruvetu za ekstrakciju (iz vatro-stalnog stakla), dodamo 9 ccm tople vode i 1 ccm otopine amonijaka. Grijemo, dok se kazein potpuno ne otopi. Ohladimo. Dodamo 10 ccm alkohola i energično promućkamo. Ostavimo epruvetu, dok se slojevi ne odijele, zatim odlijemo u posudicu za kristalizaciju (poznate težine) sloj masti otopljene u eteru i petrol-eteru. Ako je otopina mutna, možemo je pročitati dodavši par kapi do 2 ccm alkohola. Ponovimo ekstrakciju eterom i petrol-eterom, te odlijemo ekstrakt u posudicu za kristalizaciju najmanje jednom, a po mogućnosti i dva puta. Otparimo eter i petrol-

eter iz posudice za kristalizaciju, zatim sušimo kod 101—102°C do konstantne težine (2 sata).

Napomena: Ako ispitujemo slatki kazein u epruvetu dodat ćemo 7 ccm vode i 3 ccm otopine amonijeva hidroksida. Grijemo, dok se suvišak amonijaka ne ispari, onda dodamo alkohol i radimo prema datoj uputi.

### 3. Određivanje sadržine pepela (ukupnog)

a) Slatki kazein:

Vagnemo točno jedan gram kazeina u porculanskom lončiću poznate težine (prethodno ugrijan do crvene boje, ohlađen u eksikatoru i vagnut). Lagano zagrijavamo na plameniku 10—15 minuta, zatim smjestimo u električnu peć ugrijanu do temperature 850°C ± 20°C i žarimo do konstantne težine. Svaki uzorak treba spaljivati u dva primjerka.

$$\text{Sadržina pepela } \% = \frac{\text{težina lončića i pepela} - \text{težina lončića}}{\text{težina uzorka kazeina}} \times 100$$

b) Kiseli kazein:

U platinskoj posudici poznate težine (prethodno izarenu, ohlađenu u eksikatoru i vagnutu) vagnemo oko 2 grama kazeina, dodamo 5 ccm otopine kalcijeva acetata (koja sadrži 30 grama CaO na litru otopine). Ostavimo smjesu 20 minuta, a zatim sadržinu posudice osušimo i polagano spalimo i izarimo, dok ne dobijemo bijeli pepeo. Ohladimo i vagnemo. Od težine pepela odbijemo 0,15 grama, što odgovara težini dodatnog CaO.

### 4. Određivanje stupnja kiselosti

Stupanj kiselosti kazeina ne može se lako odrediti, a rezultati analiza vrlo variraju i u velikoj mjeri zavise o upotrebnoj metodi. Dok se direktnom titracijom određuje slobodna kiselost, ukupna kiselost određuje se titracijom kazeina otopljenog u standardnoj lužini.

Titraciju možemo izvršiti ovako: vagnemo jedan gram dobro pripremljenog uzorka kazeina i otopimo ga u 25 ccm 0,1 n NaOH i retitriramo sa 0,1 n HCl u nazočnosti indikatora fenolftaleina. Kiselost kazeina izražava se kao broj ccm 0,1 n NaOH upotrebljene za neutralizaciju kiseline u jednom gramu kazeina. Taj broj dobijemo, ako od 25 oduzmemo broj za retitraciju potrošenih ccm 0,1 n HCl. Američki propisi (USA) zahtijevaju, da se kiselost preračunava na suhu tyar kazeina bez masti i bez pepela, pa da za kvalitetan kazein dobivena brojka ne prelazi 10,5.

Određivanje pH:

U čašicu sadržine 60 ccm vagnemo 5 grama kiselog ili slatkog kazeina, dodamo 30 ccm svježih prokuhane i ohlađene destilirane vode (biretom) dobro promiješamo i ostavimo 20 minuta, zatim dodamo 0,25 grama kinhidrona, dobro promiješamo i odredimo pH zlatnom elektrodom.

### 5. Određivanje topljivosti

Jedan gram uzorka kazeina, samljevenog u fini prah, stavimo u epruvetu. Dodamo 15 ccm vode, dobro promućkamo, ugrijemo na 50°C

i ponovno mućkamo. Topljivi (slatki) kazein mora se otopiti. Ako se kazein ne otopi, dodamo 0,125 grama natrijeva karbonata na 5 grama kazeina, dobro promiješamo i ispitujemo topljivost. Dobar kazein mora se sada otopiti.

Topljivost kiselog kazeina određuje se u otopini boraksa. M u m e r y i B i s h o p predlažu slijedeću metodu:

R e a g e n c i j e: Otopinu boraksa — 20,833 grama otopimo u vodi i dopunimo do jedne litre.

Bromotimol modar indikator: 0,1 grama praha izmiješamo u tario-niku sa 3,2 ccm 0,05 n NaOH zatim dolijemo destilirane vode do 250 ccm.

P o s t u p a k: dva grama kiselog, mljevenog kazeina stavimo u epru-vetu, dodamo 12 ccm otopine boraksa i stavimo epruvetu u kupelj s tem-peraturom 70°C. Temeljito i često mućkamo 45 minuta. Za to se vrijeme dobar kiseli kazein mora potpuno otopiti. Ako nakon tog postupka kazein nije otopljen, smatra se, da je dokazana nedovoljna topljivost.

Ako se kazein otopi, treba doliti destilirane vode do 100 ccm i od te otopine odmjeriti pipetom 1 ccm, staviti u novu epruvetu, zatim do-dati 10 ccm destilirane vode (čiji je pH 6,0) i 5 kapi bromotimol modrog indikatora, te odrediti pH uspoređujući boju sa standardnim otopinama (pripremljenim sa kalijevim hidrogen fosfatom i kaustičnom sodom pre-ma formuli C l a r k a i L u b a). Na osnovu određenog pH otopine nakon razređivanja vodom, autori predlažu slijedeću diferencijaciju:

Indeks topljivosti	vrijednost pH	boja
vrlo dobra topljivost	iznad 6,8	modra
dobra „	6,8—6,4	zelena
osrednja „	ispod 6,4	žuta

Radi poredbe navodimo specifikaciju koju su za kazein propisale SAD god. 1919.:

boja: bijela ili svijetlo žućkasta,  
 miris: gotovo bez mirisa ili tragovi mirisa po kiselom,  
 sadržina vode: ne više od 10%,  
 sadržina masti: ne više od 1% u suhoj tvari,  
 sadržina pepela: ne više od 4% u suhoj tvari,  
 kiselost: ne više od 10,5 ccm 0,1 n NaOH za jedan gram.

N a p o m e n a: Kako standardni propisi u našoj zemlji još nisu odredili analitičke metode za kazein, opisani postupci mogu privremeno poslužiti kod utvrđivanja kvaliteta kazeina.

#### Literatura:

1. British Standard Methods »Sampling and Analysis of Casein« CF(C) 2098 No. 259.
2. Davis and MacDonald: »Richmond's Dairy Chemistry«, London, 1953.
3. Dornic et Chollet: »Lait, Beurre et Dérivés« I, Paris, 1947.
4. Rochaix et Tapernoux: »Le Lait et ses Dérivés«, Paris, 1948.
5. Schneider: »Traité pratique des essais du lait«, Berne, 1946.