

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Petra RUSJAN

**PRIMERNOST SISTEMA FOODLAB ZA ANALIZE  
MLEKA IN MLE NIH IZDELKOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Petra RUSJAN

**PRIMERNOST SISTEMA FOODLAB ZA ANALIZE MLEKA IN  
MLE NIH IZDELKOV**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**SUITABILITY OF FOODLAB SYSTEM FOR ANALYSIS OF MILK  
AND DAIRY PRODUCTS**

GRADUATION THESIS  
University Studies

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Inštitutu za mlekarstvo in probiotike, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana doc. dr. Andreja Čanžek Majheni in za recenzentko prof. dr. Terezija Golob.

Mentorica: doc. dr. Andreja Čanžek Majheni

Recenzentka: prof. dr. Terezija Golob

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

lan:

lan:

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Strinjam se z objavo svoje diplomske naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Petra Rusjan

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 543.42:637.1/.3.04(043)=163.6 analizne metode/referenčne analize/hitre analize/sistem
KG	FOODLAB/mleko/sir/surovo maslo/sečina/kloridi/proste maščobne kisline/spektrofotometrične metode/primerjava metod/ujemanje rezultatov
AV	RUSJAN, Petra
SA	ANŽEK MAJHENI, Andreja (mentorica) / GOLOB, Terezija (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2013
IN	PRIMERNOST SISTEMA FOODLAB ZA ANALIZE MLEKA IN MLEČNIH IZDELKOV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 57 str., 12 pregl., 17 sl., 39 vir.
IJ	Sl
JJ	sl/en
AI	V okviru diplomske naloge smo ugotovljali primerljivost rezultatov sistema FOODLAB za določanje vsebnosti sečnine v mleku, kloridov v siru in kislosti surovega masla z rezultati referenčnih oz. standardnih analiz. Sistem FOODLAB spada med hitre analize in deluje na principu spektrofotometrije. Vsebnost sečnine v mleku smo določili ali z referenčno metodo ISO 14637/IDF 195 (2004), ki deluje na principu pH-metrije. Vsebnost kloridov v siru smo določili ali z referenčno metodo ISO 2970 (1974), katere princip je obarjalna titracija. Kislost surovega masla pa smo določili ali s titracijo s standardno metodo SIST EN ISO 660 (2009). Na podlagi rezultatov meritev posameznega parametra s sistemom FOODLAB in referenčne/standardne metode smo izračunali korelacije med metodami. Ugotovili smo, da je najboljša korelacija med hitro in referenčno metodo pri določanju vsebnosti sečnine v mleku, kjer je koeficient korelacije znašal $R = 0,98$ . Podobno dobro ujemanje med metodama smo ugotovili tudi pri določanju vsebnosti kloridov v sirih, s koeficientom korelacije $R = 0,91$ . Slabše ujemanje med metodama pa smo ugotovili pri določanju kislosti masla, saj je koeficient korelacije znašal $R = 0,72$ . Na podlagi rezultatov smo zaključili, da je sistem FOODLAB primerno nadomestilo referenčne metode določanja vsebnosti sečnine v mleku in kloridov v sirih, medtem ko pri določanju kislosti masla lahko služi le za rutinsko analizo.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 543.42:637.1/.3.04(043)=163.6 analytical methods/reference analysis/rapid analysis/ <i>FOODLAB</i>
CX	system/milk/cheese/butter/urea/chlorides/free fatty acid/spectrofotometric methods/comparison of methods/matching results
AU	RUSJAN, Petra
AA	ANŽEK MAJHENI , Andreja (supervisor) / GOLOB, Terezija (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY	2013
TI	SUITABILITY OF <i>FOODLAB</i> SYSTEM FOR ANALYSIS OF MILK AND DAIRY PRODUCTS
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	IX, 57 p., 12 tab., 17 fig., 39 ref.
LA	Sl
AL	sl/en
AB	The aim of our study was to evaluate the suitability of <i>FOODLAB</i> system for the determination of urea content in milk, chloride content in cheese and the acidity of butter by comparison the results of <i>FOODLAB</i> method to the results obtained with reference/standard methods. <i>FOODLAB</i> is a rapid system and bases on the principle of spectrophotometry. The urea content in milk was determined by the reference method ISO 14637/IDF 195 (2004), which operates on the principle of difference in pH. Chloride content in cheese was determined by the reference method ISO 2970 (1974), which operates on precipitation titration. Acidity of butter was determined by titration with standard method EN ISO 660 (2009). Based on the results of measurements of each parameter with the <i>FOODLAB</i> system and reference/standard methods, we calculated the correlation between the methods. Results revealed that the best correlation between the rapid and the reference method was for the determination of urea content in milk, where the coefficient of correlation was $R = 0.98$ . Similarly good agreement between the two methods was also established for the determination of chloride content in cheese, with a coefficient of correlation $R = 0.91$ . Low agreement between the two methods was found in determining the acidity of butter, because the coefficient of correlation was $R = 0.72$ . Our results suggest that the <i>FOODLAB</i> system adequately substitute the reference method for determining the urea content in milk and the chloride content in cheese, while in determining the acidity of butter it can only be used for routine analysis.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE .....	V
KAZALO PREGLEDNIC .....	VII
KAZALO SLIK .....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	IX
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 OPIS SISTEMA <i>FOODLAB</i> .....	3
<b>2.1.1 Ostali sistemi podjetja CDR S.r.l. ter njihova uporaba .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1.2 Lastnosti sistema <i>FOODLAB</i> .....</b>	<b>6</b>
2.2 MLEKO .....	8
<b>2.2.1 Kemijska sestava mleka .....</b>	<b>8</b>
<b>2.2.2 Sečnine v mleku .....</b>	<b>10</b>
2.2.2.1 Določanje vsebnosti sečnin v mleku .....	10
2.3 SIRI .....	11
<b>2.3.1 Soljenje sirov .....</b>	<b>13</b>
2.3.1.1 Določanje vsebnosti soli v siru .....	13
2.4 SUROVO MASLO .....	14
<b>2.4.1 Negativne spremembe mlečne maščobe .....</b>	<b>15</b>
2.4.1.1 Določanje vsebnosti prostih maščobnih kislin masla .....	16
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>17</b>
3.1 VZORENJE .....	18
<b>3.1.1 Vzorci mleka, sira in surovega masla .....</b>	<b>18</b>
3.1.1.1 Vzorci mleka za določanje vsebnosti sečnin .....	18
3.1.1.2 Vzorci sira za določanje vsebnosti kloridov .....	18
3.1.1.3 Vzorci surovega masla za določanje kislosti .....	18
3.2 KEMIJSKE ANALIZE .....	19
<b>3.2.1 Določanje vsebnosti sečnin v mleku .....</b>	<b>19</b>
3.2.1.1 Določanje vsebnosti sečnin z analitskim sistemom <i>FOODLAB</i> (CDR, 2008) .....	19
3.2.1.2 Določanje vsebnosti sečnin z referenčno metodo (ISO 14637/IDF 195, 2004) .....	20
<b>3.2.2 Določanje vsebnosti kloridov v siru .....</b>	<b>22</b>
3.2.2.1 Določanje vsebnosti kloridov z analitskim sistemom <i>FOODLAB</i> (CDR, 2008) .....	22
3.2.2.2 Določanje vsebnosti kloridov z referenčno metodo (ISO 2970, 1974) .....	23
<b>3.2.3 Določanje kislosti surovega masla .....</b>	<b>26</b>
3.2.3.1 Določanje kislosti surovega masla z analitskim sistemom <i>FOODLAB</i> (CDR, 2008) .....	26
3.2.3.2 Določanje kislosti surovega masla s standardno metodo (SIST EN ISO 660, 2009) .....	28
<b>4 REZULTATI .....</b>	<b>32</b>
4.1 REZULTATI ANALIZ .....	32
<b>4.1.1 Rezultati določanja vsebnosti sečnin v mleku .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1.2 Rezultati določanja vsebnosti kloridov v sirih .....</b>	<b>36</b>

<b>4.1.3 Rezultati dolo anja kislosti surovega masla.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2 ZVEZA MED METODO <i>FOODLAB</i> IN REFERENČNO OZ. STANDARDNO METODO .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2.1 Zveza med rezultati vsebnosti se nine v mleku dolo ene z dvema metodama ...</b>	<b>40</b>
<b>4.2.2 Zveza med rezultati vsebnosti kloridov v siru dolo ene z dvema metodama .....</b>	<b>41</b>
<b>4.2.3 Zveza med rezultati kislosti surovega masla dolo ene z dvema metodama.....</b>	<b>42</b>
<b>4.3 PRIMERJAVA METODE <i>FOODLAB</i> Z REFERENČNIMI OZ. STANDARDNIMI METODAMI .....</b>	<b>43</b>
<b>4.3.1 Primerjava metode <i>FOODLAB</i> in referenčne metode za dolo anje vsebnosti se nine v mleku .....</b>	<b>43</b>
<b>4.3.2 Primerjava metode <i>FOODLAB</i> in referenčne metode za dolo anje vsebnosti kloridov v siru .....</b>	<b>44</b>
<b>4.3.3 Primerjava metode <i>FOODLAB</i> in standardne metode za dolo anje kislosti surovega masla.....</b>	<b>46</b>
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>48</b>
<b>5.1 RAZPRAVA.....</b>	<b>48</b>
<b>5.2 SKLEPI.....</b>	<b>51</b>
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>52</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>54</b>

**ZAHVALA**

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Barve različnih območij vidnega spektra (Skoog in sod., 2004: 725).....	6
Preglednica 2: Temperatura, koncentracija in kislost slanice pri posameznih tipih sira (Mavrin in Oštir, 2002: 155).....	13
Preglednica 3: Meje detekcije in občutljivosti sistema <i>FOODLAB</i> in referenčnih oz. standardnih metod za določanje vsebnosti sečnine v mleku, kloridov v siru in kislosti surovega masla .....	32
Preglednica 4: Rezultati določanja vsebnosti sečnine v mleku s sistemom <i>FOODLAB</i> in z referenčno metodo .....	34
Preglednica 5: Povprečna razlika in standardni odklon rezultatov določanja vsebnosti sečnine .....	35
Preglednica 6: Rezultati določanja vsebnosti kloridov v siru s sistemom <i>FOODLAB</i> in z referenčno metodo .....	36
Preglednica 7: Povprečna razlika in standardni odklon rezultatov določanja vsebnosti kloridov v siru.....	37
Preglednica 8: Rezultati določanja kislosti surovega masla s sistemom <i>FOODLAB</i> in s standardno metodo.....	38
Preglednica 9: Povprečna razlika in standardni odklon rezultatov določanja kislosti surovega masla.....	39
Preglednica 10: Koraki izvedbe metode <i>FOODLAB</i> in referenčne metode za določanje vsebnosti sečnine v mleku .....	43
Preglednica 11: Koraki izvedbe metode <i>FOODLAB</i> in referenčne metode za določanje vsebnosti kloridov v siru .....	44
Preglednica 12: Koraki izvedbe metode <i>FOODLAB</i> in standardne metode za določanje kislosti surovega masla.....	46



## KAZALO SLIK

Slika 1: Slika sistema FOODLAB (aparatus, komplet kivet in priložena pipeta) (GROSSERON, 2012).....	3
Slika 2: Vsebnost prostih maščobnih kislin v surovem maslu (Douma, 2008).....	15
Slika 3: Diagram poteka analize določanja vsebnosti sečnine v mleku, vsebnosti kloridov v siru ter kislosti surovega masla.....	17
Slika 4: Določanje vsebnosti sečnine v mleku s sistemom FOODLAB .....	20
Slika 5: Izpis rezultatov vsebnosti sečnine na sistemu FOODLAB .....	20
Slika 6: Kivete z reagenti na inkubaciji za določanje vsebnosti kloridov v siru .....	23
Slika 7: Reprezentativni vzorci sira, pripravljene za določanje vsebnosti kloridov .....	24
Slika 8: Segrevanje vzorcev sira v mešanici srebrovega nitrata ter dušikove kisline .....	25
Slika 9: Segrevanje vzorcev sira, srebrovega nitrata in dušikove kisline do vrenja ter dodatek kalijevega permanganata.....	25
Slika 10: Odstranitev presežka permanganata z dodatkom glukoze in razredčenje z destilirano vodo .....	25
Slika 11: Priprava vzorcev surovega masla .....	27
Slika 12: Določanje kislosti surovega masla s sistemom FOODLAB .....	27
Slika 13: Kiveta z naprej pripravljenim reagentom R1 pred inkubacijo (desno), kiveta z reagentom R1 in vzorcem po inkubaciji (levo). Rezultat je sprememba barve.....	27
Slika 14: Vzorec surovega masla po titraciji (rožnata barva) in pred titracijo (rumena barva).....	29
Slika 15: Zveza med rezultati določanja vsebnosti sečnine v mleku s sistemom FOODLAB (FL) in z referenčno metodo (RF) .....	40
Slika 16: Zveza med rezultati določanja vsebnosti kloridov v siru s sistemom FOODLAB (FL) in z referenčno metodo (RF) .....	41
Slika 17: Zveza med rezultati določanja kislosti surovega masla s sistemom FOODLAB (FL) in s standardno metodo (ST) .....	42

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava ali simbol:	Pomen:
c	množinska koncentracija
dL	deciliter
FL	metoda <i>FOODLAB</i>
g	gram
IR	infrardeča svetloba
KŠ	kislinsko število
L	liter
LED	light-emitting diode; svetleča dioda
L-mlečna kislina	levosni mlečni kislina
M	molarost
mg	miligram
mL	mililiter
mmol	milimol
m/s.s	vsebnost maščobe v suhi snovi
nm	nanometer
ole. kisl.	oleinska kislina
R	koeficient korelacije
R <sup>2</sup>	koeficient determinacije
rcf	relativna centrifugalna sila
RF	referenčna metoda
S <sup>2</sup>	varianca
Sd	standardni odklon
SH	kislinska stopnja po Soxhlet-Hencklu
ST	standardna metoda
UHT	ultra-high-temperature; ultra visoka temperatura
UV	ultravijolična svetloba
V	volumen
Vis	vidna svetloba
v/n.s.	vsebnost vode v nemastni snovi
μL	mikroliter
$\bar{x}$ , $\bar{d}$	povprečna vrednost ali aritmetična sredina

## 1 UVOD

Predpisane referen ne metode za dolo anje kemijske, fizikalne in mikrobiološke kakovosti živil so navadno dolgotrajne ter zaradi uporabe specifi nih kemikalij pogosto drage in obremenjuje e za okolje. eprav zagotavljajo pravilnost in ponovljivost merjenega parametra, pa zaradi omenjenih pomanjkljivosti raziskovalni laboratoriji iš ejo nove, hitrejše in cenovno ugodnejše metode analiz živil, ki ob minimalni uporabi kemikalij izpolnjujejo še zahteve referen nih analiz.

Podjetje CDR S.r.l. (analisi e sviluppo sistemi cibernetici, Firenze) je razvilo analiti ni sistem za živila *FOODLAB*, ki temelji na spektrofotometri ni tehnologiji. S sistemom *FOODLAB* lahko opravimo številne kemijske analize dolo anja vrednosti parametrov, kot so L-mle na kislina, alkalna fosfataza, amoniak. Med drugim analiti ni sistem podpira tudi kemijsko analizo nekaterih parametrov mleka in mle nih izdelkov. V okviru diplomske naloge smo ugotavljali primernost sistema *FOODLAB* za dolo anje vsebnosti kloridov v siru, se nine v mleku ter kislosti surovega masla.

Z dolo anjem vsebnosti soli (NaCl) v siru kontroliramo proces izdelave in soljenja sirov. Nekateri standardi koli ino soli predpisujejo tudi glede na tip sira. Sire v praksi solimo predvsem zato, da so okusnejši, varnejši ter obstojnejši. Sol namre deluje selektivno na mikroorganizme, omogo a in pospešuje nabrekanje beljakovin ter dokon no oblikuje skorjo sira.

Dolo anje vsebnosti se nine v mleku je prakti en pripomo ek za preverjanje primernosti krmljenja krav molznic z beljakovinskimi in energetskimi viri. Na ta na in rejci na enostaven na in spremljajo prebavo in presnovo surovih beljakovin, ki igra pomembno vlogo pri vodenju reje krav molznic.

Nastanek razgradnih produktov mle ne maš obe v surovem maslu je nezaželen, saj dajejo izdelku neprijeten vonj in okus. Do tega pride, ko je mle na maš oba podvržena hidroliti nemu delovanju lipaz oz. oksidativnim procesom. Posledica je tvorba razli nih nezaželenih komponent, ki jih zaznamo kot žarkost surovega masla.

Analizirani parametri, kakor tudi ostali parametri, so za samo tehnologijo predelave in kakovost mleka in mle nih izdelkov ter ostalih živil zelo pomembni. Zato je klju nega pomena, da analize parametrov izvedemo hitro, zanesljivo in enostavno, morda že v hlevu ali pred za etkom proizvodnje, da ne pride na primer do izgub surovin ali nestalne kakovosti živil oz. izdelkov.

Prav možnost uporabe na razli nih mestih, v hlevu, v zbiralnih ali predelovalnih obratih ter neposredno v proizvodnji, pa daje analiti nemu sistemu *FOODLAB* dolo eno prednost pred standardnimi oz. referen nimi metodami. Vendar moramo, s primerjavo rezultatov za posamezen parameter, dobljenih z referen nimi oz. standardnimi analizami in z analiti nim sistemom *FOODLAB* potrditi, ali so rezultati analiz s tem hitrim sistemom tudi pravilni ter ponovljivi.

## 1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Namen diplomskega dela je bil določiti primernost sistema *FOODLAB* za analize nekaterih parametrov mleka in mlečnih izdelkov s primerjavo z rezultati referenčnih oz. standardnih analiz. V okviru diplomske naloge smo določili vsebnost sečnine v mleku, vsebnost kloridov v sirih in kislost surovega masla. Predvideli smo, da bomo z uporabo sistema *FOODLAB* za omenjene parametre dobili take rezultate, ki bodo enakovredni in primerljivi z zahtevami, podanimi v referenčnih materialih.

Pri našem delu smo izpostavili le eno hipotezo, in sicer:

- da je sistem *FOODLAB* primeren za hitro določevanje vsebnosti sečnine v mleku, vsebnosti kloridov v sirih in kislosti surovega masla.

Vrednosti, dobljene s sistemom *FOODLAB*, bodo od vrednosti, dobljenih z referenčnimi oz. standardnimi metodami, odstopale v mejah, ki jih navaja proizvajalec. Z analizo pravilnosti pa bomo določili stopnjo uporabnosti metode kot nadomestilo referenčne oz. standardne metode za analizirani parameter ali pa zgolj za orientacijsko oz. rutinsko uporabo.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 OPIS SISTEMA FOODLAB

Podjetje CDR S.r.l. iz Firenc v Italiji je razvilo nov analitični sistem za živila FOODLAB. Sistem temelji na spektrofotometrični tehnologiji in kompletih kivet, ki so napolnjene s specifičnimi inovativnimi reagenti za posamezno analizo (CDR, 2008).

Prednost tega analitičnega sistema pred standardnimi referenčnimi metodami je v tem, da ga lahko tako reko uporabljamo kjerkoli, predvsem na terenu, na primer v hlevu, v zbiralnicah mleka ali neposredno v sami proizvodnji. Sistem potrebuje za svoje delovanje le električno omrežje, na katerega ga priključimo. Rokovanje z aparatom je zelo preprosto, navodila pa jasno in razumljivo podana. Rezultati analize se v nekaj sekundah avtomatsko izpišejo v standardni merilni enoti in se tako lahko takoj uskladijo z referenčnimi vrednostmi. FOODLAB je vnaprej kalibriran, kalibracija pa je enostavna in dokaj hitra. Samega aparata ni potrebno isticati, izpirati ali kako drugače vzdrževati, ker pri spektrofotometrični tehnologiji z LED oddajniki ne pride do stika med napravo in vzorcem. Na koncu analize rabljeno kiveto preprosto zavržemo (CDR, 2008).

Reagenti v kivetah so zaradi nizke toksičnosti varni, zato omogočajo enostavno odstranjevanje. S sistemom FOODLAB minimiziramo količino odpadkov, saj je volumen kivete z reagentom le 1 mL. Za analizo so potrebne majhne količine vzorca (5-100  $\mu$ L). Predpriprava vzorca je večinoma enostavna, je pa odvisna od same analize (CDR, 2008).

Analiza s sistemom FOODLAB je enostavna predvsem zato, ker nam poleg aparata sistem ponuja še napolnjene testne kivete z reagenti, specifičnimi za posamezno analizo, in pipete za izvedbo testa (Slika 1). S priloženo pipeto vzorec enostavno prenesemo v predpripravljeno kiveto in pri nemo z analizo. Kivete so pakirane v zaprtih vrečkah po 10 kivet in imajo ob pravilnem shranjevanju ter v zaprti embalaži rok trajanja eno leto (CDR, 2008).



Slika 1: Slika sistema FOODLAB (aparatus, komplet kivet in priložena pipeta) (GROSSERON, 2012)

Kot je razvidno s slike 1, je na levi polovici aparata FOODLAB 12 inkubacijskih celic, pod katerimi so 3 spektrofotometrične celice s tremi različnimi žarnicami. Na desni polovici pa je ekran, izpis rezultatov na papirju ter tipkovnica za izbiro in vodenje programov.

Ne glede na vrsto analize, se vsi testi izvajajo tako, da dodamo v kiveto definirano minimalno količino vzorca, ki reagira s specifičnim reagentom - kolorimetrična reakcija (CDR, 2008).

S sistemom FOODLAB lahko opravimo kemijske analize za določitev:

- L-mlečne kisline v mleku, sirih, smetani, jajcih in zelenjavnih pirejih,
- alkalne fosfataze v mleku,
- sečnine v mleku,
- peroksidaze v mleku,
- kloridov v mleku, sirih, vodnih raztopinah, zelenjavnih pirejih in omakah,
- amoniaka v mleku, smetani in sirih,
- vodikovega peroksida v mleku,
- furozina v mleku,
- glukoze, fruktoze, reducirajočih sladkorjev v paradižniku,
- kislosti jedilnih masel, olj, masla, margarine, smetane ter polpredelanih masel,
- kislosti in peroksidnega števila v suhem sadju in olivah,
- peroksidnega števila jedilnih masel, olj, masla, margarine, smetane ter polpredelanih masel,
- števila umiljenja jedilnih masel in olj ter smetane,
- jodnega števila v palminem olju,
- polifenolov v olivnem olju,
- holesterola in D-3-hidroksibutanojske kisline v jajcih (CDR, 2008).

Podjetje CDR S.r.l. pa ni razvilo samo sistema FOODLAB, ampak še nekatere druge aparature oziroma sisteme za hitre analize živil.

### 2.1.1 Ostali sistemi podjetja CDR S.r.l. ter njihova uporaba

Poleg sistema FOODLAB je podjetje CDR S.r.l. razvilo še 5 sistemov, ki omogočajo naslednje kemijske analize:

a) FOODLAB *Fat* za določanje:

- p-anizidina v jedilnih maščobah in olju,
- jodnega števila v palminem olju,
- števila umiljenja jedilnih maščob in olj ter smetane,
- peroksidnega števila jedilnih maščob, olj, masla, margarine, smetane ter polpredelanih maščob,
- kislosti jedilnih maščob, olj, masla, margarine, smetane ter polpredelanih maščob (CDR, 2008).

b) FOODLAB *Wine* za določanje:

- optične gostote (pri 420, 520 in 620 nm) vina,
- barve in intenzitete vina,
- antocianov v vinu in moštu,
- skupne vsebnosti polifenolov v vinu (CDR, 2008).

c) miniFOODLAB za določanje:

- sečnine v mleku,
- kloridov v sirih in vodnih raztopinah (CDR, 2008).

d) OxiTester za določanje:

- kislosti rastlinskih olj,
- peroksidnega števila rastlinskih olj,
- polifenolov/antioksidativne aktivnosti rastlinskih olj (CDR, 2008).

e) MiniFood za določanje:

- kislosti rastlinskih olj,
- peroksidnega števila rastlinskih olj (CDR, 2008).

## 2.1.2 Lastnosti sistema FOODLAB

Spektrofotometrične metode se razvijajo in uporabljajo v analitiki že 40 let. Njihovo tehniko se v analizi kemije uporablja za kvantitativno in kvalitativno določitev organskih ali neorganskih spojin in je tako postala najbolj pomembna analitska tehnika v modernih laboratorijih (Abadi in sod., 2012; Skoog in sod., 2004).

Zaradi velikega tehnološkega napredka (ob utljivosti detektorjev, optičnih vlaken, visokofrekvenčne elektronike in programske opreme) razvijajo vedno nove generacije spektrofotometrov, ki so visoko občutljivi, hitri, tihi, kompaktni, konstantno obsegajo celoten merjen spekter, poleg tega so robustni in cenovno dosegljivi. Problem se pojavi pri kompleksnih vzorcih, kot so na primer živila, v katerih so posamezni analiti prisotni lahko v zelo nizkih koncentracijah. Te, tako imenovane realne kompleksne vzorce je tudi z najnovejšimi spektrofotometri težko analizirati. Da se izognemo neselektivnosti metode, moramo pred meritvami obvezno opraviti korak priprave vzorca. Na ta način izboljšamo selektivnost in občutljivost metode. Priprava vzorca je tako kritičen korak v celotnem postopku analize in ima neposreden vpliv na meje pravilnosti, ponovljivosti in kvantifikacije (Abadi in sod., 2012).

Spektrofotometrija je tudi ena izmed najbolj pogosto uporabljenih metod v analizi živil. Meritve lahko izvajamo v infrarde (IR), vidnem (Vis) ali ultravijoličnem (UV) spektru elektromagnetnega valovanja (Hmelak Gorenjak, 2010).

Fotometrično območje sistema FOODLAB je vidnega spektra in je primerno za kvantitativne meritve.

V preglednici 1 so prikazane valovne dolžine vidnega spektra.

Preglednica 1: Barve različnih območij vidnega spektra (Skoog in sod., 2004: 725)

Valovna dolžina (nm)	Absorbirana barva	Prepuščena barva
<u>400-435</u>	<u>vijolična</u>	rumeno-zelena
435-480	modra	rumena
480-490	modro-zelena	oranžna
490-500	zeleno-modra	rdeča
<u>500-560</u>	<u>zelena</u>	škrlatna
560-580	rumeno-zelena	vijolična
580-595	rumena	modra
595-650	oranžna	modro-zelena
<u>650-750</u>	<u>rdeča</u>	zeleno-modra

Legenda: Pod črtane so valovne dolžine in njim ustrezne absorbirane barve, ki jih za izvajanje analiz uporablja sistem FOODLAB



Sistem FOODLAB je opremljen s tremi fotometričnimi celicami, v katerih so vijolična, zelena in rdeča žarnica. Vsaka celica zato meri pri različnih valovnih dolžinah ter vzdržuje temperaturo 37 °C (CDR, 2008).

Princip Vis- spektrofotometrične metode FOODLAB je:

- potek kolorimetrične reakcije med analitom in specifičnim reagentom,
- osvetlitev obarvane raztopine z virom svetlobe (žarnice različnih barv oz. različne valovne dolžine),
- merjenje intenzitete nastale barve pri določeni valovni dolžini, ki je proporcionalna koncentraciji analita v raztopini (CDR, 2008).

Spektrometrično merjenje je tako osnovano na razliki med absorbanco svetlobe reaktantov in absorbanco svetlobe produktov (Hmelak Gorenjak, 2010).

Valovno dolžino izbiramo glede na to kakšna je obarvanost našega analita, kakšne so funkcionalne skupine analita (različne strukturne skupine molekul), ki absorbirajo v vidnem spektru in če so v raztopini prisotne še druge snovi, ki absorbirajo enako svetlobo kot analit. Paziti pa moramo, da so vzorci raztopine praktično bistri in skoraj brezbarvni. (Hmelak Gorenjak, 2010).

Z merjenjem absorbance vzorca še ne izvemo podatka o koncentraciji analita. Zato je potrebno pripraviti standardne raztopine s standardnimi koncentracijami in narisati umeritveno krivuljo, iz katere odčitamo koncentracijo preiskovanega analita (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007).

Druga možnost pa je, da za merjenje absorbance uporabimo take sisteme oz. aparate, ki so s pomočjo standardnih raztopin kalibrirani in imajo izrisane umeritvene krivulje. Na tak način nam aparat sam izračuna vrednosti koncentracij. Po slednjem principu deluje tudi sistem FOODLAB, ki je kalibriran, iz izmerjenih absorbanc pa zato lahko sam preračuna koncentracijo analita v vzorcu (CDR, 2008).

Sistem FOODLAB ima vgrajen še ekran in tiskalnik. Na ekranu razločno vidimo izbrane programe in rezultate, ki nam jih tiskalnik po končani analizi natisne. Izbiramo lahko tudi med angleščino, nemščino, francosko, špansko in italijansko jezikom. Temperatura okolice, kjer izvajamo analizo, mora biti med 15 in 35 °C. Za samo delovanje pa potrebujemo le električno omrežje, na katerega priključimo sistem FOODLAB (CDR, 2008).

## 2.2 MLEKO

Po pravilniku je mleko čist, nespremenjen in svež proizvod mlečne žleze v času laktacije sesalcev. Dobiti ga moramo s popolno in redno molžo zdravih in pravilno krmljenih molznic živali. Takemu mleku ne smemo nič dodati ali odvzeti. Mleko sesalcev ima zelo pestro sestavo hranil, vitaminov, mineralov, encimov, zaščitnih snovi in rastnih faktorjev, zato je zelo pomembno za uspešen razvoj novorojenega sesalca (Rogelj, 2003).

Vse vrste mleka vsebujejo enake sestavine, razlikujejo se le po prehranskih, fizikalno-kemijskih in tehnoloških lastnostih. Ker je kravje mleko najbolj razširjeno, z izrazom mleko navadno opisujemo kravje mleko, medtem ko je potrebno ostale vrste mleka posebej označiti (Fox in McSweeney, 1998).

### 2.2.1 Kemijska sestava mleka

Mleko sestavlja več 100 sestavin, katerih vsebnosti se razlikujejo med vrstami mleka posameznih sesalcev, saj mora le-to pokrivati različne prehranske potrebe mladičev znotraj posameznih vrst. Med glavne sestavine mleka prištevamo vodo ter beljakovine, maščobno mleko, sladkor, minerale in vitamine (Tratnik, 1998).

#### - Voda:

Največji delež mleka predstavlja voda, in sicer od 86-89 %. V mleku se nahaja v dveh oblikah. Največje je proste vode, okoli 96 %. V njej so raztopljene polarne sestavine mleka. Ostala voda je vezana na beljakovine in fosfolipide (Tratnik, 1998).

#### - Mlečna maščoba:

Mleko v povprečju vsebuje 3,5 % mlečne maščobe, ker pa je vsebnost odvisna od številnih faktorjev, kot so pasma, prehrana, obdobje laktacije, starost in zdravje živali, lahko vrednosti nihajo v območju od 3,3-4,7 %. V naši prehrani je mlečna maščoba pomemben vir energije, esencialnih maščobnih kislin in v maščobi topnih vitaminov (Fox in McSweeney, 1998).

Takoj po molži, ko je mleko še toplo in ima temperaturo okoli 37 °C, je mlečna maščoba v tekočem stanju kot emulzija, v obliki drobnih kapljic. Med ohlajanjem mleka prihaja do strjevanja in kristalizacije mlečne maščobe, pri čemer kapljice postanejo kroglice in emulzija preide v suspenzijo. Med mirovanjem mleka pa se zaradi manjše gostote od vode dvignejo na površje in naredijo plast smetane (Bajt in Golc-Teger, 2011).

Maščobne kroglice so različnih velikosti, obdane z dvoplastno membrano, ki je sestavljena iz fosfolipidov in proteinov. Naloga membrane maščobne kroglice je, da stabilizira hidrofobne lipide v vodni fazi mleka, preprečuje združevanje maščobnih kroglic in ščiti pred delovanjem encimov, ki povzročajo oksidacijo in lipolizo (Fox in McSweeney, 1998).

Mlečna maščoba je tudi nosilec arome in okusa mleka in mlečnih izdelkov. Sestavljena je pretežno iz triacilglicerolov (97-98 %), preostanek pa predstavljajo di- in mono-gliceroli, fosfolipidi, glikolipidi, steroli ter proste maščobne kisline (Fox in McSweeney, 1998).

- Beljakovine:

Beljakovine so organske snovi, katerih osnovni gradniki so aminokisljine, ki pa so lahko esencialne ali neesencialne. Prav zaradi visokih vsebnosti esencialnih aminokisljin pa je mleko biološko visokovredno živilo, saj je vir tistih aminokisljin, ki jih loveško telo ne more tvoriti samo, a jih nujno potrebuje, zato jih mora pridobiti s hrano. V mleku najdemo dve vrsti mlečnih beljakovin. To sta kazein (80 %), ki je prava sirarska beljakovina in ga je v mleku največ, ter serumske beljakovine (20 %), ki jih sestavljajo predvsem albumini in globulini (Bajt in Golc-Teger, 2011).

V mleku je okoli 3,5 % beljakovin, njihova vsebnost pa se najbolj spremeni med laktacijo, predvsem v prvih dneh po telitvi. Primarna naloga beljakovin je preskrba novorojenega sesalca z esencialnimi aminokisljinami, ki so potrebne za normalen razvoj mišičnega tkiva in delovanje organizma. Zelo pomembna pa je tudi tehnološka funkcija beljakovin, saj pri predelavi mleka v fermentirane mlečne izdelke vplivajo na oblikovanje in lastnosti koaguluma (Fox in McSweeney, 1998).

- Laktoza:

Glavni ogljikov hidrat v mleku je mlečni sladkor ali laktoza, ki s 4,5-4-8 % predstavlja najbolj zastopano sestavino suhe snovi mleka. Laktoza je disaharid, ki ga sestavljata glukoza in galaktoza. Po okusu je laktoza manj sladka od fruktoze in saharoze. Laktoza je vir hrane mlečnim bakterijam, ki jih uporabljamo kot starterske kulture pri izdelavi fermentiranih mlečnih izdelkov. Laktozo fermentirajo do mlečne kisline (Bajt in Golc-Teger, 2011).

- Minerali in vitamini:

Mleko vsebuje vseh 20 mineralov, ki jih loveško telo potrebuje za normalen razvoj in delovanje. Delimo jih na makro minerale (natrij, kalij, klor, kalcij, magnezij in fosfor) in elemente v sledih (železo, baker, cink, mangan, selen, jod, krom, kobalt, molibden, fluor, arzen, nikelj, silicij in bor). Njihova koncentracija v mleku je variabilna, saj je odvisna od obdobja laktacije, vrste in zdravja živali, letnih obdobjev, prehrane živali ter okolja, v katerem živijo. Na koncentracijo mineralov v mlečnih izdelkih pa vpliva tudi tehnološki proces njihove izdelave (Rogelj in sod., 2009).

Makro minerali se v mleku nahajajo kot prosti ioni (topna faza) ter v koloidni obliki (koloidna faza). Njihova porazdelitev med topno in koloidno fazo ter njihova interakcija s proteini mleka ima namreč pomembno vlogo pri vzdrževanju stabilnosti mleka in mlečnih izdelkov (Rogelj in sod., 2009).

V mleku se lahko nahajajo tudi potencialno toksični elementi, kot so aluminij, kadmij in svinec. Slednje lahko živali zaužijejo s hrano ali vodo zaradi možnega onesnaženja okolja (Sola-Larrañaga in Navarro-Blasco, 2009).

V mleku najdemo vse poznane vitamine, njihova vsebnost pa je lahko zelo različna. Tako je vsebnost v maščobni topnih vitaminov A, D, E in K v mleku odvisna od njihove količine v krmi ter od vsebnosti mlečne maščobe. Na vsebnost v vodi topnih vitaminov B in C v

mleku pa predvsem vpliva mikrobiota sirišnika ali pravega želodca, ki sintetizira omenjena encima. Lahko rečemo, da je mleko bogat vir vitaminov B<sub>2</sub> in B<sub>12</sub>. Vitamin A je v mleku v obliki vitamina in provitamina, medtem ko je vitamin D pretežno v obliki provitamina. Manj je v mleku vitamina E, ki je dober antioksidant, in vitamina K. Vitamina C, ki je tudi antioksidant, je največ v sveže pomolzenem mleku, vendar zaradi občutljivosti za toploto in svetlobo se njegova vsebnost v mleku hitro zmanjša (Tratnik, 1998).

### 2.2.2 Sečina v mleku

Sečina ali urea spada med dušikove snovi. To so vse sestavine mleka, ki vsebujejo dušik, delimo pa jih v dve skupini. V prvo skupino spadajo proteinske dušikove snovi (95 %), kamor prištevamo kazein in serumske beljakovine, drugo skupino pa sestavljajo neproteinske dušikove snovi (5 %), kamor poleg sečnine prištevamo še proste aminokisliline, kreatin, kreatinin in amoniak (Mavrin in Oštir, 2002).

Z določanjem vsebnosti sečnine v mleku ugotavljamo primernost krmljenja krav z beljakovinskimi in energetskimi viri. Je zelo praktičen pripomoček pri vodenju reje krav molznic, saj lahko na razmeroma enostaven način spremljamo presnovo surovih beljakovin. Na vsebnost sečnine v mleku pa posredno ali neposredno vplivajo še mlečnost krav, teža živali, obdobje laktacije, starost in pasma živali ter sezonske spremembe (Štoka in Lavrenčič, 2009; Babnik in sod., 2004).

Sečina v urinu, mleku in krvi izvira predvsem iz presežkov amoniaka, ki se tvori v vampu. Znano je, da številni mikroorganizmi v vampu beljakovine razgrajujejo do amoniaka, ki ga, ob primerni količini razpoložljive energije v vampu, izkoristijo za svojo rast. V primeru, da nastane več amoniaka kot so ga mikroorganizmi v vampu sposobni zajeti, le-ta preide v steno vampa in potuje s krvnim obtokom v jetra, kjer se pretvori v sečnino. Nastala sečina se v glavnem izloči s sečem, deloma pa tudi z mlekom. Povečana vsebnost sečnine v mleku je pokazatelj presežka amoniaka v vampu (Štoka in Lavrenčič, 2009).

Pri kravah s prenizko vsebnostjo sečnine v mleku lahko pričakujemo zmanjšano mlečnost ter zmanjšano vsebnost maščob, beljakovin in laktoze v mleku. Preveč zaužitih beljakovin lahko vodi do motenj v plodnosti in povečuje potrebo po energiji za sintezo sečnine v jetrih. Vsekakor pa velja, da so tako previsoke kot prenizke vsebnosti beljakovin v obrokih neugodne tako z vidika gospodarnosti reje kot tudi z vidika samega počutja živali in varovanja okolja. Priporočena vsebnost sečnine v mleku naj bi bila od 15-30 mg sečnine na 100 mL mleka (Štoka in Lavrenčič, 2009; Babnik in sod., 2004).

#### 2.2.2.1 Določanje vsebnosti sečnine v mleku

Na zanesljivost merjenja količine sestavin mleka vpliva veliko različnih dejavnikov. Na končni rezultat lahko vplivajo pravilnost, čas in način vzorčenja, temperatura, pri kateri so vzorci shranjeni do analize (razmere pri transportu) in vrsta analize, ki jo uporabimo v laboratoriju. Za določanje sečnine v mleku je najbolj pravilna encimska metoda, ki temelji na merjenju spremembe vrednosti pH, ki je posledica delovanja encima ureaze, ki pretvori sečnino v amoniak in ogljikov dioksid (Arunvipas in sod., 2003).

Hitrejše analize določanja se vsebine v mleku pa temeljijo na principu infrarde tehnologije. Pri IR spektrofotometriji potuje IR svetloba skozi filter, kjer se ustvari specifičen žarek svetlobe, potreben za določitev želene sestavine mleka. Ustvarjeni žarek nato potuje skozi vzorec, količino svetlobe, ki jo vzorec absorbira, pa računalniški algoritem priredi na vsebnost se vsebine. Rezultat mora prirediti zato, ker so v mleku prisotne tudi druge snovi, ki absorbirajo svetlobo enake valovne dolžine kot se vsebina (Godden in sod, 2000; Robyt in White, 1990).

V diplomski nalogi smo vsebnost se vsebine v mleku določali ali z analitskim sistemom FOODLAB, ki temelji na vidni spektrofotometriji (Vis) in z referenčno metodo ISO 14637/IDF195 (2004), ki temelji na principu diferencialne pH-metrije kot posledice delovanja encima.

Ker lahko na zanesljivost merjenja sestavin mleka vplivajo tudi razmere pri transportu (temperatura) ter čas od vzorčenja do izvedbe analize, bi lahko bila uporaba sistema FOODLAB, v določenih primerih, primernejša od referenčnih oz. standardnih analiz. Rejci bi tako izvajali sproten nadzor kvalitete krme za posamezno kravo molznico. Ker pa na zanesljivost rezultatov vpliva tudi vrsta in izvajalec analize, je potrebno ugotoviti tudi pravilnost in ponovljivost sistema FOODLAB.

### 2.3 SIRI

Siri so, poleg različnih vrst fermentiranega mleka, druga velika in zelo pestra skupina fermentiranih mlečnih izdelkov (Rogelj in Perko, 2003).

Sir je lahko svež ali zoren, vrst ali pol vrst izdelek. Zaradi množice različnih tehnoloških postopkov izdelave sirov, ki pa v glavnem temeljijo na enakem principu, se po svetu izdelujejo najrazličnejši siri, saj sta tip in kakovost sira odvisna že od malenkostnih razlik. Razvrščanje sirov ponekod temelji na posamezni značilnosti, navadno pa na kombinaciji dveh ali več. Najpogostejši razdelitvi sirov sta glede na teksturo sirnega testa in na vsebnost maščobe v suhi snovi (Slanovec, 1982).

Pri opredelitvi tipa sirov po teksturi testa upoštevamo vsebnost vode v nemastni snovi:

- zelo trdi siri (51 % v/n.s),
- trdi siri (49-56 % v/n.s),
- poltrdi siri (54-63 % v/n.s),
- mehki siri (67 % v/n.s) (Slanovec, 1982).

Po vsebnosti maščobe v suhi snovi (m/s.s) pa delimo sire na naslednje tipe:

- prekmasten (60 % m/s.s),
- polnomasten (45-60 % m/s.s),
- polmasten (25-45 % m/s.s),
- trtmasten (10-25 % m/s.s),
- pust (10 % m/s.s) (Slanovec, 1982).

Poleg tipa sira, ki torej določa skupne lastnosti (tekstura sira, vsebnost maščobe v suhi snovi) opredelimo pri sirih še vrsto. Vrsta označuje znan in tehnološko ustaljen sir določene enega tipa (npr. gauda, ementalski sir) (Slanovec, 1982).

Za izdelavo kakovostnega sira je potrebno uporabiti mleko, ki ima primerno primarno in sekundarno dispozicijo mleka. Dispoziciji predstavljata celoto in ju označujemo kot sposobnost mleka za usirjanje. Pod primarno dispozicijo mleka opisujemo kemijsko-fizikalne lastnosti mleka ter vse dejavnike, ki vplivajo na dejavnost mikroorganizmov od molže dalje. Kadar so dejavniki pozitivni, govorimo o ustrezni dispoziciji in obratno. Sekundarno dispozicijo mleka pa predstavlja biološka slika mleka v sirarskem kotlu, ko pri nemo s tehnološkim postopkom izdelovanja sira (Slanovec, 1982).

Sir izdelujemo vedno iz mešanega mleka zato, da zmanjšamo morebitne napake mleka posameznih krav, saj se mleko lahko razlikuje že zaradi različnih obdobjev laktacij posameznih krav in slabših ali boljših koagulacijskih lastnosti proteinov mleka (Slanovec, 1982).

Mleka ne smemo nikoli grobo obdelovati, saj večkratno prebravanje ali premo no mešanje mleka v času pridobivanja poškoduje membrane maščobnih kroglic in beljakovinskih micel. Mleka na maščoba je tako bolj izpostavljena delovanju lipaz in pojavi žarkosti, zaradi poškodovanih beljakovin pa je sirno testo mehko in gobasto (Slanovec, 1982).

Tudi tehnološke faze obdelave in priprave mleka za sir, kot so pasterizacija, posnemanje in homogenizacija, lahko negativno vplivajo na kakovost mleka z vidika sposobnosti usirjanja. Prav tako pa na kakovost sira vplivajo nadaljnje tehnološke faze izdelave sira, kot so koagulacija mleka, obdelava koaguluma in sinereza, soljenje in zorenje sira (Slanovec, 1982).

- Tehnološki postopek izdelave sira:

Mleko za sir toplotno obdelamo (termiziramo, pasteriziramo) in ohladimo na temperaturo usirjanja. Sledi dodatek sirišča in starterske kulture, po potrebi pa lahko dodamo tudi druge dodatke (kalcijev klorid, kalijev ali natrijev nitrat). Z dodatkom sirišča vplivamo na potek usirjanja (encimska koagulacija beljakovin), s startersko kulturo pa na znižanje vrednosti pH (proizvodnja kisline) in kasneje na zorenje sira (lipoliza in proteoliza). Nato sledi obdelava koaguluma, s katero omogočimo izstopanje sirotke oz. sinerezo in izdelamo sirno zrno. Na potek sinereze vplivajo sirišča, temperatura, kislina, kalcij in obdelava koaguluma. Slednja je sestavljena iz dveh faz, in sicer iz faze predsirjenja, ki sestoji iz rezanja in drobljenja koaguluma, ter iz faze dosirjanja, v kateri dogrevamo in sušimo sirno zrno. Ko je sirno zrno primerno osušeno oz. postane kleno, ga ločimo od sirotke in prenesemo v oblikovalca. Sledi stiskanje sira, s katerim odstranimo prosto vodo, omogočimo hitrejše spajanje zrn in prispevamo k dokončni oblikovanju sira in nastajanju skorje. Predvsem pa v tej fazi poteka poglobljen dogodek v sirarski tehnologiji mleka – nokislinska fermentacija. Po stiskanju sira solimo (Slanovec, 1982).

### 2.3.1 Soljenje sirov

Soljenje sira je pomembna faza v tehnološkem postopku izdelave sira, saj vpliva na kakovost in lastnosti sira. Njena prisotnost prispeva k oblikovanju skorje ter pospešuje sinerezo in nabrekanje beljakovin. Sol deluje tudi selektivno na mikroorganizme, s čimer sodeluje pri usmerjanju zorenja sira, oblikovanju okusa in podaljšuje obstojnost sira (Slanovec, 1982).

Najpogostejši način je soljenje sira v slanici, ki poteka v betonskih, plastičnih ali kombiniranih koritih ob upoštevanju naslednjih dejavnikov: koncentracija slanice se giblje med 16 in 22 % NaCl, temperatura od 14 do 18 °C in kislost v območju vrednosti pH od 5,2-5,6. Na splošno je čas soljenja sira odvisen od tipa sira, pri katerem je pomembna njegova velikost in zahtevane senzorične lastnosti (Renčelj in sod., 1995).

Neustrezno pripravljena slanica preprečuje normalno vpijanje soli. Zaradi prenizke temperature slanice so siri prekisli in za nejo pokati, površina sira pa postane vlažna in mazava. Če je slanica pretopla, se hitreje pokvari, siri pa so preslani, počasneje zorijo in grenijo. Zato višja kot je temperatura, krajši mora biti čas soljenja (Bajt in Golc-Teger, 2011).

Soljenje sira poteka po zakonitostih osmoze in difuzije. Med soljenjem se sol v siri najprej zgosti v zunanjih plasteh ter od tam pronica proti sredini (difuzija), medtem ko sirotka in v njej raztopljeni minerali potujejo iz notranjosti proti površini (osmoza). V slanici je sira potrebno obrabiti ter jih po potrebi dosoljevati. S tem omogočimo enakomerno porazdelitev soli v siru (Slanovec, 1982).

V preglednici 2 so prikazani pogoji soljenja trdih, poltrdih in mehkih tipov sirov.

Preglednica 2: Temperatura, koncentracija in kislost slanice pri posameznih tipih sira (Mavrin in Oštir, 2002: 155)

Tip sira	Temperatura slanice (°C)	Koncentracija slanice (% NaCl)	Kislost slanice (pH)
Trdi sir	10 do 14	20-22	5,6
Poltrdi sir	12 do 14	18-20	5,4
Mehki sir	15 do 20	15-16	5,2

#### 2.3.1.1 Določanje vsebnosti soli v siru

Z določanjem vsebnosti soli v siri kontroliramo proces izdelave in soljenja, poleg tega pa predpisujejo nekateri standardi količino soli glede na tip sira. Vsebnost soli je eden od analitskih podatkov, ki vpliva na kakovost in senzorične lastnosti sira (Slanovec, 1982).

Najpogostejša metoda določanja vsebnosti kloridov v siri je referenčna metoda ISO 2970 (1974), ki smo jo zato tudi uporabili v diplomski nalogi. Metoda temelji na obarjalni titraciji, kjer titrant tvori z analitom netopen produkt (oborino).

Kot primerjalno metodo smo uporabili analitski spektrofotometrični sistem za živila FOODLAB. S primerjavo rezultatov obeh analiz smo ugotavljali, ali je metoda FOODLAB primerna kot nadomestilo referenčne metode ali zgolj za rutinsko uporabo.

## 2.4 SUROVO MASLO

Po Pravilniku o kakovosti mleka, mlečnih izdelkov, siril in ostalih cepiv (1993) je surovo maslo izdelek, dobljen s predelavo smetane, pasterizirane smetane, fermentirane smetane ali fermentirane pasterizirane smetane. Industrijsko izdelano surovo maslo sme vsebovati do 2 % kuhinjske soli in sme biti obarvano z naravnimi barvili.

Izdelava surovega masla poteka v pinjah, kjer se, zaradi intenzivne mehanske obdelave imenovane metenje, smetana speni. Namen metenja je približevanje maščobnih kroglic, kar pripelje do njihovega zlepljanja in tvorbe skupke oz. aglomerate. Med oblikovanjem maslenega zrna odteka pinjenec, v katerem so pretežno laktoza, beljakovine, minerali. Ko dosežemo primerno velikost maslenih zrn, prekinemo metenje, odcedimo pinjenec in, za podaljšanje obstojnosti surovega masla, maslena zrna speremo z neoporeno vodo, da odstranimo zaostali pinjenec, ki je idealna hrana mikroorganizmom. Sledi gnetenje surovega masla, ki poteka v dveh fazah. V prvi fazi z mokrim gnetenjem odstranimo odvečno vodo in zagotovimo homogenost surovega masla, v nadaljevanju pa s suhim gnetenjem enakomerno porazdelimo preostalo vodo v surovem maslu (Šabec, 1965).

Za surovo maslo lahko rečemo, da je emulzija vode v maščobi, v kateri so razpršene maščobne kapljice, kristali maščobe, vodne kapljice ter zrakni mehurčki (Mortensen, 2011).

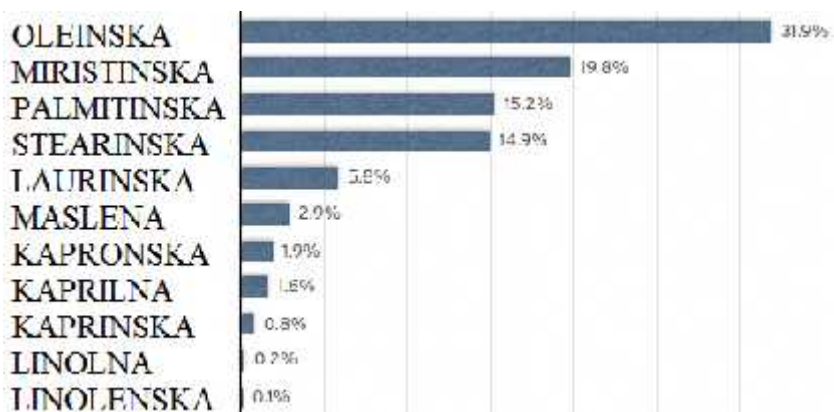
Kakovost surovega masla je odvisna od lastnosti in sestave mleka. Na sestavo mleka ne maščobe najbolj vpliva prehrana živali. Od nje je odvisna konsistenca maslenega testa ter nagnjenost mleka na maščobni kvar. Krma s preveliko vsebnostjo ogljikovih hidratov (sladkorja, škroba) povzroča drobljivost in krhkost maslenega testa. V taki mleku ni maščobe prevladujejo nasičene maščobne kisline. Mehkemu in mazavemu maslenemu testu je navadno vzrok krma, bogata z maščobami ali krma, sestavljena pretežno iz sveže zelene krme. V taki krmi je veliko nenasičenih maščobnih kislin, zaradi katerih se surovo maslo lepši in maščobe hitreje kvari. Za optimalno masleno testo pa mora prehrana živali vsebovati obroke iz sveže krme (trava, detelja) ter zmerne dodatke krmil in surovih vlaknin (celuloza). Pozimi, ko primanjkuje sveže zelene krme, pa mora biti silaža dobre kakovosti, ne sme biti plesniva, gnila (Šabec, 1965).

V normalnem kravjem mleku predstavljajo nasičene maščobne kisline približno 70 % od skupnih maščobnih kislin, enkrat nenasičene okoli 27 % in večkrat nenasičene okoli 3 %. Predvsem večkrat nenasičene maščobne kisline lahko vplivajo na kvar surovega masla (Tratnik, 1998).

Glavnino, približno 85 %, maščobnih kislin v surovem maslu predstavljajo nasičene maščobne kisline C4:0-C18:0, enkrat nenasičene C14:1, C16:1 in C18:1 ter večkrat nenasičene C18:2 in C18:3. Seveda pa so vsebnosti posameznih maščobnih kislin sezonsko in geografsko pogojene. Tako lahko na primer vsebnost oleinske in palmitinske kisline niha od 20 – 28 % oz. 22 – 37 % (Taylor in MacGibbon, 2011).



Na sliki 2 je prikazan primer vsebnosti glavnih maščobnih kislin v surovem maslu.



Slika 2: Vsebnost prostih maščobnih kislin v surovem maslu (Douma, 2008)

Od zgoraj navzdol se na sliki 2 vrstijo oleinska, miristinska, palmitinska, stearinska, laurinska, maslena, kapronska, kaprilna, kaprinska, linolna in linolenska maščobna kislina (Douma, 2008).

#### 2.4.1 Negativne spremembe mlečne maščobe

Pravi so triacilgliceroli precej nereaktivni, pa lahko pride do njihovega kvara zaradi lipolize in oksidacije.

Pri lipolizi poteka v triacilglicerolih hidroliti na cepitev esterske vezi med maščobnimi kislinami in glicerolom. Reakcija je posledica delovanja lipolitičnih encimov oz. lipaz, bodisi endogenih lipaz mleka oz. eksogenih lipaz, ki jih v mleku tvorijo mikroorganizmi, predvsem psihrotrofne bakterije. Za endogene lipaze mleka je znano, da so toplotno občutljive in jih inaktivira postopek pasterizacije, kar pa ne velja za eksogene bakterijske lipaze, ki so navadno toplotno stabilne. Predvsem sprošene kratke in srednje veržne maščobne kisline prispevajo k oblikovanju neprijetnega vonja in okusa takoj, kakor hitro njihove koncentracije presežejo mejne vrednosti sprejemljivih vsebnosti. Tako so za morebiten lipolitičen kvar mleka pred predelavo običajno odgovorne lipaze mleka, medtem ko lipolitičen kvar mleka po predelavi pripisujemo predvsem bakterijskim lipazam. Lipoliza je lahko inducirana ali spontana. O inducirani lipolizi govorimo, kadar zaradi nepravilne mehanske obdelave mleka pride do poškodb membrane maščobnih kroglic, kar olajša delovanje lipaz. Druga je spontana lipoliza, ki je odvisna od genetskih in fizioloških dejavnikov živali. Zaradi sprošanja kratkoveržnih maščobnih kislin mleka, kot so maslena, kapronska in kaprilna (C4:0, C6:0, C8:0), zaznamo morebitne in neprijetne vonjave. Okusimo pa jih kot žarke, grenke, rezke in trpke okuse (Deeth, 2011).

Do oksidacije maščob surovega masla najpogosteje pride med skladiščenjem, obseg sprememb pa je odvisen od danih razmer. Oksidativne spremembe maščobe so pravzaprav posledica reakcije med kisikom in lipidi, kjer se molekularni kisik veže na dvojne vezi nenasičenih maščobnih kislin. Poleg kisika vplivajo na potek oksidacije nenasičenih maščobnih kislin še: svetloba in neprimerna temperatura, prisotnost prooksidantov (kovine) oz. antioksidantov, encimov ksantin oksidaze ter stopnja nenasičenosti maščobnih

kislin. Nastali produkti oksidacije so nezaželeni, saj povzročijo žarek vonj in okus. Oksidativne spremembe lahko upoštevamo z ustreznim shranjevanjem surovega masla pri nizkih temperaturah, na temnem ter s pravilnim embaliranjem, s čimer preprečimo delovanje encimov, kisika in svetlobe. Za dodatno zaščito pred oksidacijo pa se v maslo lahko dodajajo tudi antioksidanti, kot sta vitamina C in E (O'Brien in O'Connor, 2011).

#### 2.4.1.1 Določanje vsebnosti prostih maščobnih kislin masla

Povečano vsebnost prostih maščobnih kislin zaradi spremenjenega vonja, okusa in izgleda zelo hitro zaznamo kot žarkost masla. Strokovno jo ovrednotimo s senzorično analizo, kjer na podlagi dobljenih ocen barve, vonja, okusa, arome in teksture razvrstimo surovo maslo v kakovostne razrede (Šabec, 1965).

Najpogosteje uporabljana kvantitativna metoda za ugotavljanje obsega lipolize v mleku in mlečnih izdelkih je določanje vsebnosti prostih maščobnih kislin, in sicer rutinsko z ekstrakcijsko-titracijskimi metodami ter natančno z določanjem vsebnosti posameznih maščobnih kislin s kromatografskimi metodami (Hmelak Gorenjak, 2010; De Jong in Badings, 1990).

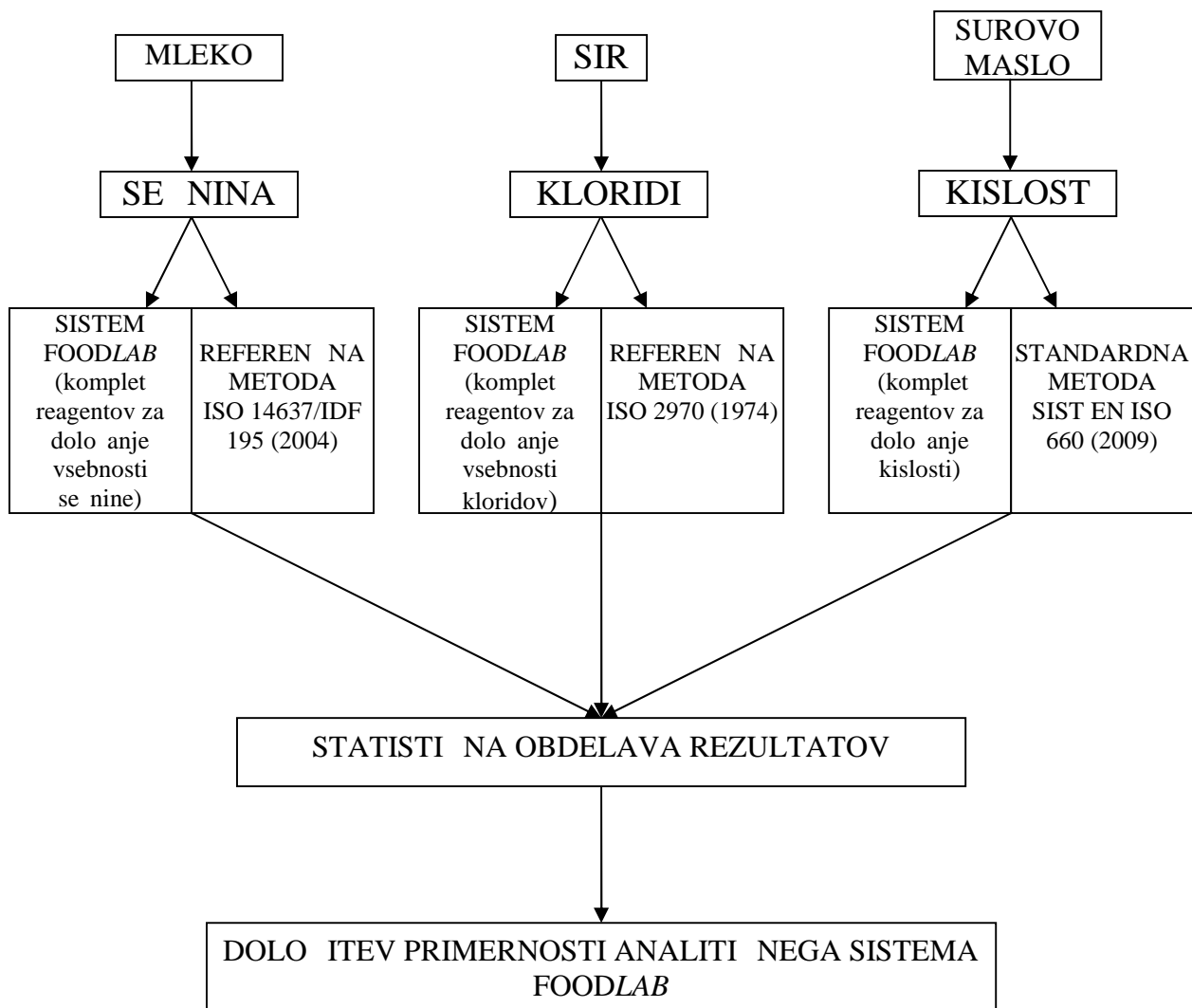
Z določanjem vsebnosti prostih maščobnih kislin surovega masla določimo stopnjo razgradnje mlečne maščobe, ki jo lahko izrazimo kot kislost oz. kislinsko število. S podajanjem kislinskega števila izrazimo porabo KOH potrebno za nevtralizacijo prostih maščobnih kislin v 1 g vzorca oz. s podajanjem kislosti opredelimo vsebnost prostih maščobnih kislin, preračunanih na izbrano maščobno kislino. Če ni drugače zahtevano, temelji kislost na vsebnosti oleinske kisline. V diplomski nalogi smo vsebnost maščobnih kislin surovega masla določili ali s standardno metodo SIST EN ISO 660 (2009), ki je bila za nas standardna metoda. Kot primerjalno metodo pa smo uporabili analitski spektrofotometrični sistem za živila FOODLAB.

S primerjavo rezultatov obeh analiz smo ugotavljali, ali je metoda FOODLAB primerna za nadomestilo standardne metode ali nam služi zgolj za rutinsko uporabo.

### 3 MATERIALI IN METODE

Eksperimentalni del naloge je obsegal določanje vsebnosti kloridov v siru, se nine v mleku in kislosti surovega masla. Omenjene parametre smo pri istih vzorcih sira, mleka oziroma surovega masla določali tako s pomočjo predpisanih referenčnih oz. standardiziranih metod, kot tudi z uporabo sistema FOODLAB za hitro in enostavno analizo vzorcev. Analizo mleka in mlekih izdelkov smo izvajali v laboratoriju Inštituta za mlekarstvo in probiotike, Oddelka za zootehniko, Univerze v Ljubljani.

V nalogi nas pravzaprav niso toliko zanimale posamezne vrednosti merjenih parametrov ampak predvsem skladnost rezultatov pri istih vzorcih, dobljenih z metodo FOODLAB in s predpisano referenčno oz. standardno metodo. Za vsako analizo smo imeli 15 vzorcev, za vsak vzorec pa smo analizo naredili v dveh paralelkah. Na sliki 3 je prikazan diagram poteka dela.



Slika 3: Diagram poteka analize določanja vsebnosti se nine v mleku, vsebnosti kloridov v siru ter kislosti surovega masla

### 3.1 VZOR ENJE

Kakovost mleka in mlečnih izdelkov ovrednotimo s pomočjo analiz, ki jih opravimo na odvzetem vzorcu. Vzorec mora biti odvzet tako, da predstavlja celoto mleka oziroma mlečnega izdelka. Za tak vzorec rečemo, da je reprezentativen. Samo pravilno vzorec in pripravljen vzorec nam zagotovi zanesljive rezultate. Ker je torej vzorec eden najpomembnejših korakov v postopku analize, so navodila za vzorec mleka in mlečnih proizvodov podana celo s standardom SIST EN ISO 707/IDF 50 (2008).

#### 3.1.1 Vzorci mleka, sira in surovega masla

V raziskavo smo vključili ali naključno izbrane vzorce mleka, surovega masla ter sira, s čimer smo zagotovili čim bolj reprezentativne podatke.

##### 3.1.1.1 Vzorci mleka za določanje vsebnosti sestavin

Za določanje vsebnosti sestavin v mleku smo uporabili naključno izbrane vzorce mleka, prinesene s strani rejcev. Za vsako analizo smo imeli na razpolago 50 mL vzorca mleka, ki smo ga konzerviranega do analize hranili v hladilniku pri 2 do 4 °C.

##### 3.1.1.2 Vzorci sira za določanje vsebnosti kloridov

Za določanje vsebnosti kloridov v siru smo uporabili naključno izbrane vzorce sirov, ki so bili vzorci ali v mlekarnah. Za vsako analizo smo imeli 500 g kose sira, zavite v folijo. Do etike analize smo tako zaščitene vzorce sira hranili v hladilniku pri temperaturi 2 do 4 °C.

##### 3.1.1.3 Vzorci surovega masla za določanje kislosti

Za določanje kislosti surovega masla smo uporabili naključno izbrane vzorce surovega masla, ki so bili vzorci ali v mlekarnah. Za vsako analizo smo imeli na razpolago surovo maslo v standardnih pakiranjih po 250 g, ki smo jih do analize hranili v hladilniku pri 2 do 4 °C.

## 3.2 KEMIJSKE ANALIZE

### 3.2.1 Določanje vsebnosti sečnine v mleku

Vsebnost sečnine v mleku smo določali s sistemom FOODLAB in z referenčno metodo ISO 14637/IDF 195 (2004).

#### 3.2.1.1 Določanje vsebnosti sečnine z analitskim sistemom FOODLAB (CDR, 2008)

Princip analize:

Ureaza pretvori sečnino v amoniak. Amonijevi ioni reagirajo s fenolnim derivatom, pri čemer nastane zeleno-modri kompleks. Intenziteta barve, merjena pri valovni dolžini 700 nm, je sorazmerna vsebnosti sečnine v vzorcu mleka. Merilno območje instrumenta je od 5 do 100 mg/dL.

Reagenti:

Komplet reagentov za določanje UREA/milk (CDR S.r.l., Italija, kat. št. 300004).

- R1: fenolni derivat (pripravljeno v kivetih),
- R2: alkalna raztopina.

Oprema:

- plastične epruvete,
- pipeta,
- kivete.

Priprava vzorca:

Pred analizo smo vzorec mleka segreti na 38 °C in premešali. Pri tem smo pazili, da se mleko ne peni.

Potek analize:

Na sistemu FOODLAB izberemo program za določanje vsebnosti sečnine v mleku. Nato odpipetiramo 5 µL pripravljenega vzorca mleka v kiveto z reagentom R1. Vsebinsko takoj ročno premešamo ter vstavimo v celico za inkubacijo. Tako naredimo za vsako kiveto posebej. Inkubacija poteka 5 min pri 37 °C. Po končani inkubaciji kiveto dobro premešamo ter ustavimo v celico za odčitavanje pri valovni dolžini 700 nm (zeleni žarnica). Tako izmerimo valovno dolžino slepe vrednosti. Določitev slepe vrednosti je pomembna predvsem zato, da izločimo napake zaradi morebitne prisotnosti nečistoč v kemikalijah ali na opremi. Nato v posamično kiveto dodamo 200 µL reagenta R2, dobro premešamo in

ustavimo v celico za inkubacijo, kjer poteka kolorimetrična reakcija. Po končani 3-minutni inkubaciji, kivetke z mlekom in reagentom R2 dobro premešamo ter enega za drugim ustavimo v celico z zeleno žarnico ter izmerimo absorbanco vzorcev. Na koncu se rezultati razlik izmerjene absorbance slepega ter analiziranega vzorca izpišejo kot mg se-nine na dL mleka.



Slika 4: Določanje vsebnosti se-nine v mleku s sistemom FOODLAB

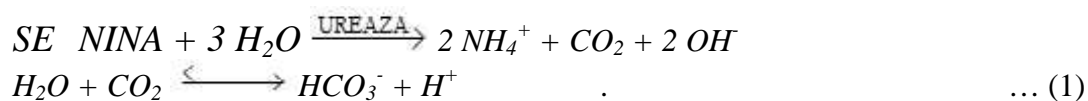


Slika 5: Izpis rezultatov vsebnosti se-nine na sistemu FOODLAB

### 3.2.1.2 Določanje vsebnosti se-nine z referenčno metodo (ISO 14637/IDF 195, 2004)

#### Princip analize:

Vsebnost se-nine v mleku določamo z instrumentom, ki deluje na principu diferencialne pH-metrije. Ureaza pretvori se-nino v amoniak in ogljikov dioksid, pri čemer je sprememba vrednosti pH sorazmerna koncentraciji se-nine. To pomeni, da merimo razliko v vrednosti pH pred in po encimski reakciji z encimom ureazo, kot prikazuje ena od reakcij (1). Sprememba koncentracije  $H^+$  ionov je sorazmerna vsebnosti se-nine v vzorcu. Merilno območje instrumenta je od 0 do 400 mg/dL.



#### Oprema :

- instrument Microlab<sup>®</sup> EFA (BioControl),
- merilni valj (250 mL) za pripravo istilne raztopine,
- erlenmajerica (250 mL) za pripravo istilne raztopine,
- vodna kopel (~ 40 °C),
- pipeta za prenos vzorca in nastavki,
- kivete,
- računalnik in tiskalnik.

#### Reagenti:

Komplet reagentov EC-Line<sup>®</sup> Milk UREA EFA KIT MEA 549 (RASIO diagnostic, BioControl) pripravljenih po navodilih standarda (ISO 14637/IDF 195, 2004) (za analizo 100 vzorcev):

- R1: pufer (pH 6,7),
- R2: encim ureaza (aktivnost 2100 enot/mL),
- R3: kalibracijski vzorec (100 mg/dL sečnine).

#### Priprava vzorca:

Vzorec mleka, ki je lahko surov, pasteriziran, UHT, nekonzerviran ali konzerviran z dovoljenim konzervansom (Na-azid, azidiol, bronopol), najprej segrejemo v vodni kopeli na temperaturo 38 °C, tik pred analizo pa ga premešamo in ohladimo na 20 °C. Pri tem pazimo, da se mleko med mešanjem čim manj peni. Pred pipetiranjem vzorec ponovno premešamo ter odpipetiramo 0,8 mL vzorca v kiveto. Tako pripravljen vzorec vstavimo v stojalo za vzorce.

Pri delu z instrumentom za določanje vsebnosti sečnine v mleku je potrebno dosledno upoštevati navodila proizvajalca instrumenta Microlab<sup>®</sup> EFA (BioControl) in navodila za delo po referenčni metodi ISO 14637/IDF 195 (2004). Analizo določanja vsebnosti sečnine je z uporabo aparature Microlab<sup>®</sup> EFA izvajala za to pooblaščen oseba.

#### Potek analize:

Pred samim začetkom analize je potrebno pripraviti računalnik in instrument Microlab<sup>®</sup> EFA v skladu z navodili referenčne metode ISO 14637/IDF 195 (2004). Reagente namestimo v stojala za reagente, odpipetiramo potrebno količino vzorca v kivete ter jih namestimo v stojalo za vzorce, kjer je slepi vzorec prvi, sledijo pa mu vzorci. V program je potrebno vpisati količino vzorcev in potrditi s tipko "ok". S tem ukazom instrument prične z analizo vzorcev, kjer samodejno odvzame potrebno količino vzorca in encima ureaza, zaradi česar pride do razgradnje sečnine v mleku in posledično do spremembe vrednosti pH.

Rezultate shranimo v računalniški program Microsoft office Excel in delo instrumenta zaključimo v skladu z navodili ISO 14637/IDF 195 (2004). Kalibracija instrumenta je potrebna vsakič pred začetkom dela, ko je računalnik izklopljen. Med samim delom pa je potrebna kalibracija instrumenta, če je vrednost slepega (blank) in/ali kontrolnega (kalibracijskega) vzorca izven predpisanih mej.

Izrazi in rezultati:

Vrednosti za vsebnost se izpiše v vzorcu mleka izpiše instrument sam v enotah miligram na deciliter (mg/dL).

### **3.2.2 Določanje vsebnosti kloridov v siru**

Vsebnost kloridov v sirih smo določili ali s sistemom FOODLAB in z referenčno metodo ISO 2970 (1974).

#### **3.2.2.1 Določanje vsebnosti kloridov z analitskim sistemom FOODLAB (CDR, 2008)**

Princip analize:

Kloridni ioni reagirajo z živosrebrom tiocianatom. Pri tem nastanejo tiocianatni ioni, ki ob dodatku železovega (III) nitrata tvorijo oranžen kompleks. Intenziteta nastale barve, merjena pri 505 nm, je sorazmerna koncentraciji kloridov v vzorcu sira. Merilno območje sistema FOODLAB je od 0,02 do 7 % NaCl.

Oprema:

- plastične epruvete,
- analitska tehtnica,
- pinceta,
- steklena palčka,
- pipeta,
- kivetice.

Reagenti:

Komplet reagentov za določanje kloridov/milk, dairy products, vegetable mashes, sauces (CDR, Italija, kat. št. 300204).

- R1: živosrebrov (II) tiocianat (pripravljen v kivetici),
- R2: železov (III) nitrat.

Reagent, ki ni vključen v sistem FOODLAB:

- R3: NaOH (0,25 M).



#### Priprava vzorca:

Pred analizo smo bloke sira odvili in prerezali na dveh mestih vzporedno s stranicami kosa sira. Nato smo vsako površino ploskve posebej in enakomerno nastrgali v petrijeve ploščice. V plasti no epruveto smo odtehtali 1 g vzorca sira ter dodali 10 mL 0,25 M NaOH. Vsebino, ogreto na 40-50 °C, smo zelo dobro in natančno premešali.

#### Potek analize:

Na sistemu FOODLAB izberemo program za določanje vsebnosti kloridov v siru. V kiveto z reagentom R1 dodamo 20 µL homogene zmesi vzorca sira, takoj ročno premešamo ter vstavimo v celico za inkubacijo. Tako ponovimo za vsak vzorec posebej. Inkubacija kivet z reagentom R1 in homogene zmesi sira poteka 5 min pri 37 °C. Kivete nato eno za drugo dobro premešamo ter vstavimo v celico za odčitavanje pri valovni dolžini 505 nm (zelena žarnica). Tako izmerimo absorbanco slepe vrednosti. Nato dodamo v vsako kiveto še 50 µL reagenta R2. Vsebino dobro premešamo ter ponovno vsako kiveto vstavimo v celico z valovno dolžino 505 nm in izmerimo absorbanco. Stabilnost barve je 30 minut. Lahko pride tudi do opalescentne barve, vendar to ne moti dobljenega rezultata. Na koncu analize se rezultati razlik izmerjene absorbance izpišejo kot % NaCl.



Slika 6: Kivete z reagenti na inkubaciji za določanje vsebnosti kloridov v siru

#### 3.2.2.2 Določanje vsebnosti kloridov z referenčno metodo (ISO 2970, 1974)

##### Princip analize:

NaCl sprostim iz organskih snovi s pomočjo dušikove kisline in kalijevega permanganata. Kloridne ione določimo s titracijo presežka srebrovih ionov s tiocianatom ob prisotnosti amonijevega feri sulfata kot indikatorja.

##### Oprema:

- analitska tehtnica,
- erlenmajerica,
- pipete,
- merilni valj,
- bireta.

#### Reagenti:

- R1: dušikova kislina ( $\text{HNO}_3$ ),
- R2: kalijev permanganat (nasi ena raztopina  $\text{KMnO}_4$ ),
- R3: amonijev feri sulfat (nasi ena raztopina  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ ),
- R4: glukoza ali oksalna kislina,
- R5: srebrov nitrat (0,1 M  $\text{AgNO}_3$ ),
- R6: kalijev ali amonijev tiocianat (0,1 M  $\text{KSCN}$  ali 0,1 M  $\text{NH}_4\text{SCN}$ ).

#### Priprava vzorca:

Pred analizo smo bloke sira odvili in prerezali na dveh mestih vzporedno s stranicami kosa sira. Nato smo vsako površino ploskve posebej in enakomerno nastrgali v petrijeve plošče (Slika 8). Za analizo smo nato zatehtali 2 g reprezentativnega vzorca sira.



Slika 7: Reprezentativni vzorci sira, pripravljene za določanje vsebnosti kloridov

#### Potek analize:

Od predhodno pripravljenega reprezentativnega vzorca sira, odtehtamo  $2 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$  v erlenmajerice, dodamo 25 mL 0,1 M raztopine srebrovega nitrata in 25 mL koncentrirane dušikove kisline ter premešamo. Zmes segrevamo in med vrenjem dodamo 10 mL kalijevega permanganata. Vse skupaj dobro premešamo in pustimo, da rahlo vre dokler se vsebina ne razbarva. Nato dodajamo kalijev permanganat toliko časa, da se raztopina ne razbarva več (običajno še 5-10 mL). Presežek permanganata (rjava barva) odstranimo z dodatkom glukoze ali oksalne kisline. Prisotnost presežka permanganata nam kaže na to, da je razgradnja organskih snovi končana. Sledi razreditev s 100 mL destilirane vode in dodatek 5 mL amonijevega ferisulfata. Vsebino erlenmajerice dobro premešamo in takoj titriramo presežek srebrovega nitrata z raztopino 0,1 M tiocianata. Ko postane raztopina rdeče rjave barve, se titracija zaključi. Barva je obstojna približno 30 sekund.



Slika 8: Segrevanje vzorcev sira v mešanici srebrovega nitrata ter dušikove kisline



Slika 9: Segrevanje vzorcev sira, srebrovega nitrata in dušikove kisline do vrenja ter dodatek kalijevega permanganata



Slika 10: Odstranitev presežka permanganata z dodatkom glukoze in razreditev z destilirano vodo

Izračun vsebnosti % NaCl po enačbi (2):

$$\% NaCl = \frac{(V_1 - V_2) \cdot f \cdot T}{m}$$

...(2)

- V<sub>1</sub> ... poraba (mL) raztopine tiocianata za slepi vzorec
- V<sub>2</sub> ... poraba (mL) raztopine tiocianata za testni vzorec
- T ... normalnost raztopine tiocianata
- m ... masa (g) zatehtanega vzorca sira
- f ... faktor (5,85 za % NaCl)

### 3.2.3 Določanje kislosti surovega masla

Kislost surovega masla smo določali s sistemom FOODLAB in s standardno metodo SIST EN ISO 660 (2009).

#### 3.2.3.1 Določanje kislosti surovega masla z analitskim sistemom FOODLAB (CDR, 2008)

Princip analize:

Maščobne kisline v vzorcu, pri vrednostih pH pod 7, reagirajo s kromogenom in tvorijo barvni kompleks. Intenziteta nastale barve, merjene pri valovni dolžini 630 nm, je proporcionalna koncentraciji prostih maščobnih kislin v vzorcu, izrazimo pa jo z deležem oleinske kisline (%). Merilno območje sistema je od 0,01 do 0,71 % oleinske kisline.

Oprema:

- analitska tehtnica,
- širokolistna lopatica,
- plastične epruvete,
- vodna kopel,
- centrifuga,
- pipeta,
- kivetice.

Reagenti:

Komplet reagentov za določanje ACIDITY/oil and fats (CDR S.r.l., Italija, kat. št. 300128)

- R1: mešanica alkoholov in KOH, derivat fenolftaleina (pripravljen v kivetici)

Reagent, ki ni vključen v sistem FOODLAB

- R2: natrijev sulfat anhidrid  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (Merck, Darmstadt, Nemčija; kat. št. 1.06649.0500)

Priprava vzorca:

Iz predhodno pripravljenega reprezentativnega vzorca surovega masla, smo v plastično epruveto odtehtali 1 g surovega masla, mu dodali 200 mg natrijevega sulfata anhidrida in vse skupaj raztopili v vodni kopeli pri 65 °C. Raztopljeno mešanico smo nato centrifugirali 5 minut pri 40 °C in 4000 rcf. Po končanem centrifugiranju smo odpipetirali 5 µL vzorca maščobne. Pazili smo, da nismo zajeli usedline.



Slika 11: Priprava vzorcev surovega masla

#### Potek analize:

Kiveto z reagentom R1 vstavimo v celico za inkubacijo ter ročno merimo absorbance. Po 5 minutni inkubaciji pri 37 °C izberemo na ekranu test za določanje prostih maščobnih kislin v surovem maslu. Kiveto z reagentom po inkubaciji dobro premešamo in ustavimo v celico za odčitavanje pri valovni dolžini 630 nm (zeleno žarnico). Tako naredimo za vsako kiveto posebej in izmerimo absorbanco reagenta R1 (slepa vrednost). Nato v kiveto odpipetiramo 5 µL predhodno pripravljenega vzorca surovega masla ter dobro premešamo. Kiveto z reagentom in vzorcem vstavimo v celico za branje z zeleno žarnico. Tako naredimo za vsako kiveto posebej. Na koncu analize se rezultati razlik izmerjene absorbance slepega ter analiziranega vzorca izpišejo kot % oleinske kisline. Kivete z reagentom ne smemo pustiti na inkubaciji več kot 2 uri.



Slika 12: Določanje kislosti surovega masla s sistemom FOODLAB



Slika 13: Kiveta z naprej pripravljenim reagentom R1 pred inkubacijo (desno), kiveta z reagentom R1 in vzorcem po inkubaciji (levo). Rezultat je sprememba barve

### 3.2.3.2 Določanje kislosti surovega masla s standardno metodo (SIST EN ISO 660, 2009)

#### Princip analize:

Kislost surovega masla smo preračunali iz kislinskega števila, pri katerem smo upoštevali število ml KOH (0,1 M), potrebnih za nevtralizacijo 1 g maščobe ob dodatku fenolftaleina kot barvnega indikatorja in jo izrazili kot vsebnost oleinske kisline.

#### Oprema:

- analitska tehtnica,
- erlenmajerica,
- merilni valj,
- bireta,
- širokolistna lopatica,
- grelnik,
- digestorij,
- zaščitna obleka ter rokavice.

#### Reagenti:

- R1: 0,1 M KOH,
- R2: 96 % etanol,
- R3: toluen,
- R4: fenolftalein.

#### Priprava kemikalij:

- kemikalija A: 96 % etanol,
- kemikalija B: toluen.

Kemikaliji A in B smo zmešali v razmerju 1:3 (25 mL etanola in 75 mL toluena). Dobljeno mešanico smo pred uporabo nevtralizirali s KOH ter dodali 0,3 mL barvnega indikatorja fenolftaleina.

#### Priprava vzorca:

Reprezentativen vzorec surovega masla smo dobili tako, da smo pred analizo s širokolistno lopatico zavrtali v različne dele surovega masla. Dobili smo več manjših enot vzorca, iz katerih smo odtehtali po 20 g reprezentativnega vzorca za analizo.

Vzor enje surovega masla od odvzema in prenosa vzorca v erlenmajerico na analitski tehnici je bil precej zahteven korak. Surovo maslo se je za elo hitro mehčati in se je prijemalo na stene ter rob erlenmajerice. Stene ter rob erlenmajerice smo izpirali z raztopino etanola in toluena, vendar je pri nekaterih rezultatih zaradi tega lahko prišlo do odstopanja med paralelkami.

Potek analize:

V 250 mL erlenmajerico odtehtamo 20 g surovega masla ( $\pm 0,05$  g natančno) in dodamo 50-100 mL predhodno pripravljene raztopine etanola in toluena. Erlenmajerico z vsebino postavimo na grelnik v digestoriju ter segrevamo, dokler se vzorec surovega masla ne raztopi. Nato dodamo indikator fenolftalein (1 g/100 mL) in titriramo z 0,1 mol/L KOH do rahle vendar jasne spremembe barve indikatorja iz rumene v rožnato, ki mora biti obstojna najmanj 15 sekund.



Slika 14: Vzorec surovega masla po titraciji (rožnata barva) in pred titracijo (rumena barva)

Izračun kislinskega števila (KŠ) po enaobi (3):

$$K\check{S} = \frac{56,1 \cdot c \cdot V}{m} \quad \dots(3)$$

56,1 ... molska masa KOH

c ... 0,1 M KOH

V ... poraba (mL) KOH

m ... zatehta (g) masla

Z uporabo enaobe 4, ki jo dovoljuje standard SIST EN ISO 660 (2009), smo iz kislinskega števila preračunali na kislost surovega masla.

Izračun kislosti po enaobi (4):

$$KISLOST = 0,5 \cdot K\check{S} \quad \dots(4)$$

### 3.3 STATISTI NA OBDELAVA PODATKOV

Numerične vrednosti, ki smo jih med eksperimentalnim delom dobili o vsebnosti sečnine v mleku, kloridov v siru in kislosti surovega masla, so bile naše statistične enote, za vsak merjen parameter smo imeli 15 vzorcev. Ker pa smo, zaradi boljše ponovljivosti, meritve opravljali v dveh paralelkah, je statistična obdelava na koncu obsegala 30 enot za sečnino, enako za kloride ter kislost (Adami, 1989).

Dobljene rezultate smo statistično obdelali s pomočjo programa Microsoft Office Excel 2003.

Statistično obdelavo podatkov smo začeli z opisno statistiko, s katero smo dobili vpogled v splošne vrednosti. Zanimalo nas je število vzorcev, povprečne vrednosti in standardni odklon.

V nadaljnji analizi nas je zanimala medsebojna zveza dveh spremenljivk, zato smo rezultate meritev sistema FOODLAB in referenčnih oz. standardnih metod, ovrednotili z regresijsko analizo. Tako smo zvezo med metodama podali z regresijskim modelom (enaka premice) in determinacijskim koeficientom, iz katerega smo izračunali še korelacijski koeficient.

- Povprečna vrednost ali aritmetična sredina ( $\bar{x}$ ,  $\bar{d}$ ):

Aritmetična sredina je najpogosteje uporabljena srednja vrednost, ki jo izračunamo tako, da seštejemo vse vrednosti spremenljivk ( $x_i$ ) in vsoto delimo s številom podatkov ( $n$ ). Vsaka posamezna vrednost  $x_i$  se od  $\bar{x}$  odklanja navzgor ali navzdol: odklon je zato pozitiven ali negativen (Košmelj, 2007).

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i \quad \dots(5)$$

- Standardni odklon:

Standardni odklon ( $S_d$ ) in varianca ( $s^2$ ) sta najpomembnejši meri variabilnosti rezultatov, ki sta opredeljeni na osnovi vsote kvadriranih odklonov od aritmetične sredine (Košmelj, 2007).

Varianca je za statistično analizo podatkov zelo pomembna, kot opisni parameter pa manj, ker se je grafično ne da predstaviti. Pogosteje se zato uporablja kvadratni koren variance, ki ga imenujemo standardni odklon. Varianco izračunamo po enaki (6), kot povprečje je kvadratov odklonov posameznih vrednosti od aritmetične sredine. Standardni odklon pa izračunamo po enaki (7) (Adami, 1989).



$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad \dots(6)$$

$$Sd = s = \sqrt{s^2} \quad \dots(7)$$

- Linearna regresija:

O regresiji govorimo takrat, kadar imamo neodvisno spremenljivko ( $x$ ), katere vrednosti izberemo sami in je vnaprej določena, ter drugo spremenljivko ( $y$ ), ki je odvisna od prve. Regresija je pravzaprav prilagajanje ustrezne matematične funkcije empiričnim podatkom, zato regresijsko analizo najbolje predstavimo v grafični obliki. S tako metodo določimo eno ali več krivulj, ki se najbolje prilega podatkom dveh spremenljivk, pri istih enotah. Pri linearni povezanosti je krivulja na diagramu prikazana s premico (Košmelj, 2007; Adami, 1989).

Ena oblika linearne regresije predstavlja enačba (8), kjer sta  $x$  in  $y$  koordinati posamezne točke na premici. Parameter  $a$  je naklon regresijske premice,  $b$  pa odsek premice na ordinatni osi (Adami, 1989).

$$y = a + bx \quad \dots(8)$$

Kako se posamezne vrednosti parametrov skladajo z eno obliko premice (merilo povezanosti), pa nam pove koeficient determinacije ( $R^2$ ) (Košmelj, 2007).

- Korelacija:

Korelacija je, tako kot linearna regresija, metoda za statistično analizo dveh spremenljivk, vendar obe obravnava kot neodvisni. Vrednosti spremenljivk ne moremo izbirati vnaprej, sta naključni, odvisni od napak pri merjenju in na obe delujejo biološki ter drugi dejavniki variabilnosti. Korelacija je lahko pozitivna ali negativna, velika ali majhna, ali pa sploh ne obstaja. Tako smer in moč korelacije določajo korelacijski koeficienti, med katerimi je tudi Pearsonov korelacijski koeficient ( $R$ ), ki ga izračunamo iz determinacijskega koeficienta po enačbi (9) (Adami, 1989).

$$R = \sqrt{R^2} \quad \dots(9)$$

## 4 REZULTATI

V diplomski nalogi smo določili ali primernost sistema FOODLAB za hitre analize mleka in mle nih izdelkov. Naloga je zajemala primerjavo rezultatov, dobljenih z metodo FOODLAB za vsebnost se nine v mleku, vsebnost kloridov v siru ter kislost surovega masla z rezultati, dobljenimi z referen nimi oz. s standardnimi metodami. Na koncu pa smo primerjali izvedbo metode FOODLAB in referen nih oz. standardnih metod ter izpostavili podobnosti in razlike.

### 4.1 REZULTATI ANALIZ

Ob utljivost metode je sposobnost analitika oz. aparata, ki ga uporabimo za izvedbo analize, da zazna že majhne spremembe v koncentraciji komponente, ki jo določimo. Najmanjša koncentracija komponente, ki jo metoda še lahko izmeri s sprejemljivo pravilnostjo in ponovljivostjo, pa je meja detekcije (James, 1995).

Meje detekcije metode FOODLAB so pri določanju vsebnosti se nine od 5 do 100 mg/dL, pri določanju vsebnosti kloridov od 0,02 do 7 % NaCl in pri določanju kislosti surovega masla 0,01 do 0,71 % oleinske kisline. Ob utljivost metode FOODLAB je enaka spodnji meji detekcije analiz (CDR, 2008).

Meje detekcije referen ne metode določajo vsebnosti se nine v mleku so od 3 do 400 mg/dL. Referen na metoda določajo vsebnosti kloridov v siru in standardna metoda določajo vsebnosti kislosti surovega masla imata mejo detekcije 0 (ISO 14637/IDF 195, 2004; ISO 2970, 1974; SIST EN ISO 660, 2009).

Vrednosti meje detekcije in ob utljivosti metod so podane v preglednici 3, iz katere vidimo, da se metoda FOODLAB (FL metoda) razlikuje od referen nih oz. standardnih metod (RF metoda) tudi glede na ob utljivost in mejo detekcije.

Preglednica 3: Meje detekcije in ob utljivosti sistema FOODLAB in referen nih oz. standardnih metod za določanje vsebnosti se nine v mleku, kloridov v siru in kislosti surovega masla

Parametri zanesljivosti metode	FOODLAB metode			REFEREN NE/STANDARDNE metode		
	se nine (mg/dL)	kloridi (% NaCl)	kislost (% ole.kisl.)	se nine (mg/dL)	kloridi (% NaCl)	kislost (% ole. kisl.)
meja detekcije	5-100	0,02 -7	0,01-0,71	3-400	0	0
ob utljivost	5	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01

Pri izvedbi analize lahko pride do motenj, ki vplivajo na ob utljivost in mejo detekcije metode. Motnje, še posebej v kompleksnih vzorcih, običajno povzročajo komponente, ki so strukturno podobne komponenti, ki jo določimo. Izognemo se jim s pravilno pripravo

vzorca pred analizo. Pri encimski metodi določanje vsebnosti senine v mleku je za to poskrbel specifičen encim ureaza, medtem ko smo pri drugih metodah vzorce pripravili s pomočjo specifičnih reagentov. Vzorce sira oz. surovega masla smo obdelali s specifičnimi kemikalijami tako, da smo pri siru sprostili kloride in pri surovem maslu raztopili in izločili mlečno maščobo. Prisotnost obeh komponent v vzorcu ugotavljamo s standardno raztopino. Za to uporabimo interni standard ali »slepo« raztopino (James, 1995).

V preglednicah 4, 6 in 8 so prikazani rezultati za vsebnost senine v mleku in kloridov v siru ter rezultati kislosti surovega masla, ki smo jih za vsak vzorec v dveh paralelkah določili ali s sistemom *FOODLAB* in z referenčnimi oz. s standardnimi metodami. Iz dobljenih rezultatov smo nato izračunali povprečno vrednost dveh paralelek, razliko med paralelkama ter razlike povprečnih vrednosti posameznih paralelek, dobljenih z metodo *FOODLAB* in z referenčno oz. s standardno metodo. Povprečne razlike in standardni odkloni pa so podani v preglednicah 5, 7 in 9.

#### 4.1.1 Rezultati dolo anja vsebnosti se nine v mleku

V preglednici 4 so prikazani rezultati dolo anja vsebnosti se nine v mleku z metodo FOODLAB in z referen no metodo. Poleg podatkov za obe paralelki, podajamo povpre no vrednost in razliko med paralelkama. V zadnjem stolpcu pa so podane razlike med povpre no vrednostjo rezultatov metode FOODLAB in referen ne metode.

Preglednica 4: Rezultati dolo anja vsebnosti se nine v mleku s sistemom FOODLAB in z referen no metodo

Oznaka vzorca	FOODLAB metoda (mg/dL)			REFEREN NA metoda (mg/dL)			$\bar{x}$ FL - $\bar{x}$ RF
	meritev	$\bar{x}$	r	meritev	$\bar{x}$	r	
n=15							d
ml1	15,40 15,40	15,40	0,00	13,27 12,91	13,09	-0,36	2,31
ml2	13,40 13,80	13,60	0,40	11,93 12,16	12,04	0,22	1,56
ml3	25,00 25,50	25,25	0,50	23,98 23,98	23,98	0,00	1,27
ml4	19,40 19,40	19,40	0,00	18,12 18,26	18,19	0,14	1,21
ml5	13,40 12,40	12,90	-1,00	11,21 10,96	11,08	-0,25	1,82
ml6	11,30 12,00	11,65	0,70	9,26 9,34	9,30	0,08	2,35
ml7	12,00 12,30	12,15	0,30	10,51 10,37	10,44	-0,14	1,71
ml8	17,40 17,60	17,50	0,20	15,70 15,19	15,44	-0,50	2,06
ml9	25,50 25,30	25,40	-0,20	25,55 25,01	25,28	-0,53	0,12
ml10	22,30 22,10	22,20	-0,20	20,53 20,67	20,60	0,14	1,60
ml11	21,60 21,30	21,45	-0,30	20,53 20,39	20,46	-0,14	0,99
ml12	29,40 29,10	29,25	-0,30	28,72 28,58	28,65	-0,14	0,60
ml13	16,20 16,40	16,30	0,20	13,94 14,11	14,02	0,17	2,28
ml14	17,10 17,70	17,40	0,60	15,87 15,87	15,87	0,00	1,53
ml15	28,10 26,80	27,45	-1,30	22,63 22,71	22,67	0,08	1,75

Legenda: mleko (ml), meritev (prva in druga meritev vzorca), povpre je meritev ( $\bar{x}$ ), razlika med paralelkama (r), razlika med povpre no vrednostjo, dobljeno z metodo FOODLAB in povpre no vrednostjo, dobljeno z referen no metodo (d)

V preglednici 5 sta podani izračunani vrednosti povprečne razlike in standardnega odklona rezultatov meritev vsebnosti sečnine.

Preglednica 5: Povprečna razlika in standardni odklon rezultatov določanja vsebnosti sečnine

<b>Povprečna razlika (<math>\bar{d}</math>)</b>	<b>Standardni odklon (<math>S_d</math>)</b>
1,54	0,63

Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da daje metoda *FOODLAB* povprečno za 1,54 mg/dL ( $\bar{d}$ ) višje rezultate od referenčne metode. Razlike med paralelkami so prav tako večje pri metodi *FOODLAB*, in sicer povprečno za 0,41 mg/dL, medtem ko so razlike med paralelkami z referenčno metodo nižje, in sicer za 0,19 mg/dL.

Povprečni standardni odklon rezultatov določanja vsebnosti sečnine  $S_d$  je 0,63 mg/dL. Torej je slučajna napaka metode *FOODLAB* 0,63 mg/dL, sistematična napaka pa  $\pm 1,54$  mg/dL.

#### 4.1.2 Rezultati dolo anja vsebnosti kloridov v sirih

V preglednici 6 so prikazani rezultati dolo anja vsebnosti kloridov v siru z metodo FOODLAB in z referen no metodo. Poleg podatkov za obe paralelki smo v preglednici podali še povpre no vrednost in razliko med paralelkama. V zadnjem stolpcu pa so podane razlike med povpre no vrednostjo rezultatov metode FOODLAB in referen ne metode.

Preglednica 6: Rezultati dolo anja vsebnosti kloridov v siru s sistemom FOODLAB in z referen no metodo

Oznaka vzorca	FOODLAB metoda (%NaCl)			REFEREN NA metoda (%NaCl)			$\bar{x}$ FL - $\bar{x}$ RF
	n=15 meritev	$\bar{x}$	r	meritev	$\bar{x}$	r	
s1	0,79 0,64	0,715	0,15	0,57 0,54	0,553	0,03	0,16
s2	1,56 1,46	1,510	0,10	1,36 1,45	1,404	-0,09	0,11
s3	1,81 1,65	1,730	0,16	1,67 1,65	1,662	0,02	0,07
s4	1,82 1,85	1,835	-0,03	1,91 1,93	1,919	-0,02	-0,08
s5	1,83 1,92	1,875	-0,09	1,88 1,91	1,896	-0,03	-0,02
s6	1,04 0,93	0,985	0,11	1,21 1,24	1,226	-0,02	-0,24
s7	1,47 1,30	1,385	0,17	1,42 1,46	1,440	-0,04	-0,06
s8	1,10 0,90	1,000	0,20	1,10 1,13	1,114	0,00	-0,11
s9	2,27 2,31	2,290	-0,04	3,33 3,35	3,337	-0,02	-1,05
s10	0,51 0,65	0,580	-0,14	0,55 0,54	0,541	0,01	0,04
s11	1,08 1,00	1,040	0,08	1,42 1,37	1,393	0,05	-0,35
s12	1,45 1,42	1,435	0,03	1,53 1,52	1,528	0,01	-0,08
s13	1,63 1,51	1,570	0,12	1,44 1,44	1,440	0,00	0,13
s14	1,71 1,83	1,770	-0,12	1,66 1,71	1,685	-0,06	0,09
s15	1,10 1,15	1,125	-0,05	1,21 1,15	1,180	0,06	-0,06

Legenda: sir (s), meritev (prva in druga meritev vzorca), povpre je meritev ( $\bar{x}$ ), razlika med paralelkama (r), razlika med povpre no vrednostjo, dobljeno z metodo FOODLAB in povpre no vrednostjo, dobljeno z referen no metodo (d)

V preglednici 7 sta podani izraženi vrednosti povprečne razlike in standardnega odklona rezultatov za vsebnost kloridov v sirih.

Preglednica 7: Povprečna razlika in standardni odklon rezultatov določanja vsebnosti kloridov v siru

<b>Povprečna razlika (<math>\bar{d}</math>)</b>	<b>Standardni odklon (<math>S_d</math>)</b>
0,18	0,26

Metoda FOODLAB daje v primerjavi z rezultati referenčne metode enkrat višje enkrat nižje rezultate, in sicer se razlikujejo povprečno za 0,18 %. Tako kot pri določanju vsebnosti se nenehno v mleku se je tudi pri določanju vsebnosti kloridov v sirih izkazalo, da so razlike med paralelkami večje pri metodi FOODLAB, in sicer povprečno za 0,11 %, medtem ko so razlike med paralelkami z referenčno metodo nižje, povprečno za 0,03 %.

Povprečni standardni odklon rezultatov določanja vsebnosti kloridov  $S_d$  je 0,26 %. Torej je slučajna napaka metode FOODLAB 0,26 %, sistematična napaka pa  $\pm 0,18$  %.

#### **4.1.3 Rezultati določanja kislosti surovega masla**

Pri statistični obdelavi rezultatov določanja kislosti surovega masla smo upoštevali rezultate 12 vzorcev. Rezultatov za vzorce sm3, sm4 ter sm7 nismo upoštevali, ker so bile vrednosti za kislost, dobljene s hitrim analitičnim sistemom FOODLAB, nad vrednostjo detekcije maščobnih kislin. Da bi tak vzorec z višjim odstotkom oleinske kisline padel v pravo območje, bi ga bilo potrebno razrediti ter ponovno analizirati oziroma uporabiti drugo eno testni komplet.

V preglednici 8 so prikazani rezultati določanja kislosti surovega masla z metodo FOODLAB in s standardno metodo. Poleg povprečnih vrednosti podajamo razliko med paralelkama, v zadnjem stolpcu pa razlike med povprečnimi vrednostjo rezultatov metode FOODLAB in standardne metode.

Preglednica 8: Rezultati dolo anja kislosti surovega masla s sistemom FOODLAB in s standardno metodo

Oznaka vzorca	FOODLAB metoda (% ole. kisl.)			STANDARDNA metoda (% ole. kisl.)			$\bar{x}$ FL - $\bar{x}$ ST
	meritev	$\bar{x}$	r	meritev	$\bar{x}$	r	
n=15							d
sm1	0,54 0,48	0,51	-0,06	0,480 0,425	0,45	-0,06	0,06
sm2	0,52 0,60	0,56	0,46	0,375 0,365	0,37	-0,1	0,19
sm3	>0,71 >0,71	/	/	0,565 0,540	0,55	-0,03	/
sm4	>0,71 >0,71	/	/	0,895 0,920	0,91	0,03	/
sm5	0,61 0,54	0,58	-0,07	0,415 0,480	0,45	0,07	0,13
sm6	0,45 0,47	0,46	0,02	0,385 0,395	0,39	0,01	0,07
sm7	>0,71 >0,71	/	/	1,280 1,300	1,29	0,02	/
sm8	0,36 0,33	0,35	-0,03	0,345 0,335	0,34	-0,01	0,01
sm9	0,52 0,50	0,51	-0,02	0,445 0,445	0,45	0,00	0,06
sm10	0,50 0,47	0,49	-0,03	0,400 0,405	0,40	0,01	0,09
sm11	0,44 0,47	0,46	0,03	0,360 0,365	0,36	0,01	0,10
sm12	0,48 0,54	0,51	0,06	0,410 0,405	0,41	-0,01	0,10
sm13	0,40 0,40	0,40	0,00	0,360 0,345	0,35	-0,02	0,05
sm14	0,53 0,53	0,53	0,00	0,460 0,455	0,46	-0,01	0,07
sm15	0,21 0,22	0,22	-0,01	0,495 0,525	0,51	0,03	-0,29

Legenda: surovo maslo (sm), meritev (prva in druga meritev vzorca), povpre je meritev ( $\bar{x}$ ), razlika med dvema paralelkama (r), razlika med povpre no vrednostjo, dobljeno z metodo FOODLAB in povpre no vrednostjo, dobljeno z referen no metodo (d)



V preglednici 9 sta podani izraženi vrednosti povprečne razlike in standardnega odklona rezultatov meritev kislosti surovega masla.

Preglednica 9: Povprečna razlika in standardni odklon rezultatov dolžnosti kislosti surovega masla

<b>Povprečna razlika (<math>\bar{d}</math>)</b>	<b>Standardni odklon (<math>S_d</math>)</b>
0,08	0,04

Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da daje metoda FOODLAB povprečno za 0,08 % višje rezultate od standardne metode. Razlike med paralelkami so prav tako večje pri metodi FOODLAB, povprečno za 0,07 %, medtem ko so razlike med paralelkami s standardno metodo nižje, povprečno za 0,03 %.

Povprečni standardni odklon rezultatov dolžnosti kislosti surovega masla  $S_d$  je 0,04 %. Torej je slučajna napaka metode FOODLAB 0,04 %, sistematična napaka pa  $\pm 0,08$  %.

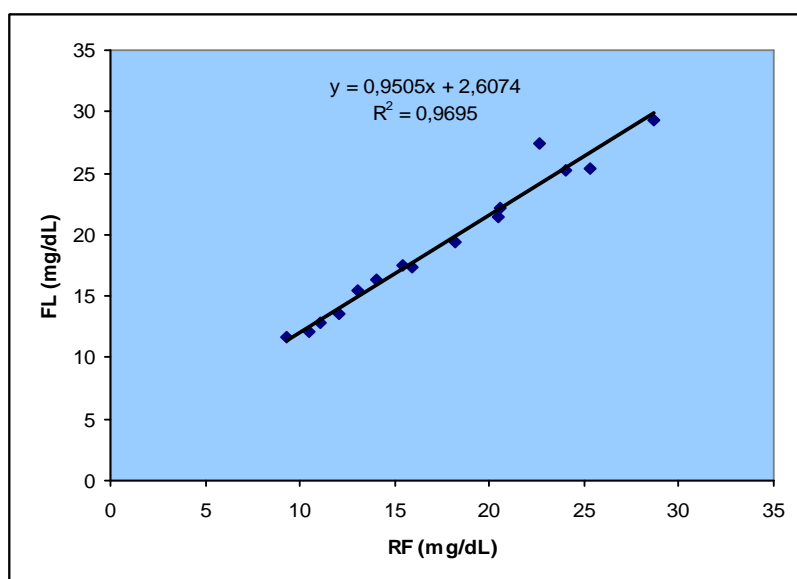
## 4.2 ZVEZA MED METODO FOODLAB IN REFERENČNO OZ. STANDARDNO METODO

Rezultati določanja vsebnosti senine v mleku, kloridov v sirih in kislosti surovega masla, ki smo jih dobili z metodo FOODLAB, so vrednosti, ki smo jih določili ali neodvisno od referenčne oz. standardne metode.

Zvezo med rezultati meritev z metodo FOODLAB in z referenčno oz. s standardno metodo, smo ugotavljali s pomočjo regresijske analize. Podatke o vsebnosti senine v mleku, kloridov v siru in kislosti surovega masla, dobljene z metodo FOODLAB in z referenčno oz. s standardno metodo, smo vnesli v razsevni grafikon.

### 4.2.1 Zveza med vsebnostjo senine v mleku določene z dvema metodama

Zvezo med rezultati določanja vsebnosti senine v mleku, s sistemom FOODLAB in z referenčno metodo ISO 14637/IDF 195 (2004), smo prikazali z modelom linearne regresije.



Slika 15: Zveza med rezultati določanja vsebnosti senine v mleku s sistemom FOODLAB (FL) in z referenčno metodo (RF)

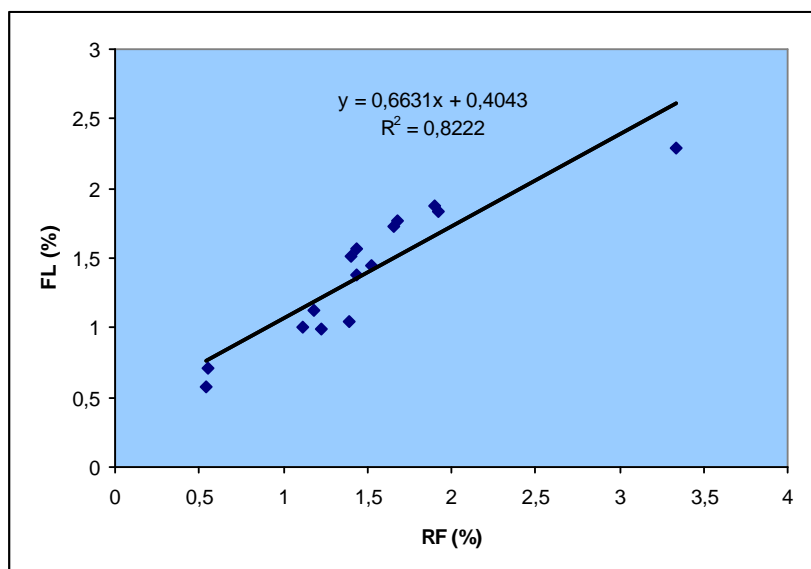
Zvezo med rezultati meritev prikazuje slika 16 in regresijski model  $FL = 0,951 \cdot RF + 2,607$ . Koeficient determinacije ( $R^2$ ) je 0,97, koeficient korelacije ( $R$ ) je 0,98.

Na x-osi so vrednosti, dobljene z referenčno metodo, na y-osi pa vrednosti, ki smo jih dobili z metodo FOODLAB. Vse vrednosti, dobljene z metodo FOODLAB, so višje od vrednosti, ki smo jih dobili z referenčno metodo.

Za določanje senine v mleku lahko rečemo, da obstaja zelo močna pozitivna zveza med rezultati metode FOODLAB in referenčne metode, pri tem pa velja, da 97 % variabilnosti rezultatov metode FOODLAB, lahko pojasnimo z rezultati referenčne metode.

#### 4.2.2 Zveza med vsebnostjo kloridov v siru določene z dvema metodama

Zvezo med rezultati določanja vsebnosti kloridov v sirih, s sistemom FOODLAB in z referenčno metodo ISO 2970 (1974), smo prikazali z modelom linearne regresije.



Slika 16: Zveza med rezultati določanja vsebnosti kloridov v siru s sistemom FOODLAB (FL) in z referenčno metodo (RF)

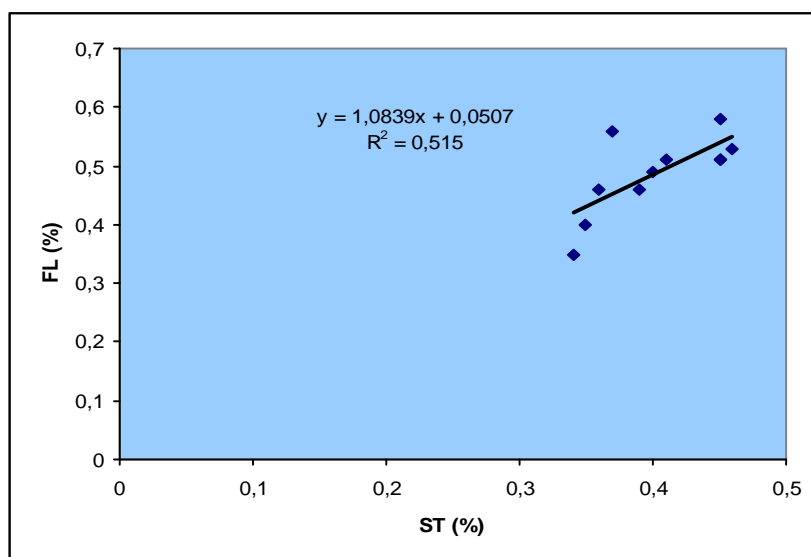
Zvezo med rezultati meritev prikazuje slika 17 in regresijski model  $FL = 0,663 \cdot RF + 0,404$ . Koeficient determinacije ( $R^2$ ) je 0,82, koeficient korelacije ( $R$ ) je 0,91.

Na x-osi so vrednosti, dobljene z referenčno metodo, na y-osi pa vrednosti, ki smo jih dobili z metodo FOODLAB. Vrednosti, dobljene z metodo FOODLAB, so enkrat nižje drugič višje, od vrednosti, ki smo jih dobili z referenčno metodo.

Ugotavljamo, da tudi za vsebnost kloridov v sirih obstaja kar močno pozitivna zveza med rezultati FOODLAB in referenčne metode, pri tem pa velja, da 82 % variabilnosti rezultatov metode FOODLAB lahko pojasnimo z rezultati referenčne metode.

#### 4.2.3 Zveza med rezultati kislosti surovega masla določene z dvema metodama

Zvezo med rezultati določanja kislosti surovega masla, s sistemom FOODLAB in s standardno metodo SIST EN ISO 660 (2009), smo prikazali z modelom linearne regresije. Pri tem nismo upoštevali vzorca sm15, ker je povprečno odstopanje med obema metodama zelo visoko.



Slika 17: Zveza med rezultati določanja kislosti surovega masla s sistemom FOODLAB (FL) in s standardno metodo (ST)

Zvezo med rezultati meritev prikazuje slika 18 in regresijski model  $FL = 1,084 \cdot ST + 0,051$ . Koeficient determinacije ( $R^2$ ) je 0,52, koeficient korelacije ( $R$ ) je 0,72.

Na x-osi so vrednosti standardne metode, na y-osi pa vrednosti, ki smo jih dobili z metodo FOODLAB. Vrednosti, ki smo jih dobili z metodo FOODLAB, so nižje od vrednostih, dobljenih s standardno metodo.

Za določanje kislosti surovega masla lahko rečemo, da obstaja šibka pozitivna zveza med rezultati metode FOODLAB in standardne metode, pri tem pa velja, da 52 % variabilnosti rezultatov metode FOODLAB lahko pojasnimo z rezultati standardne metode.

#### 4.3 PRIMERJAVA METODE FOODLAB Z REFERENČNIMI OZ. S STANDARDNIMI METODAMI

Vsebnost se nine, kloridov in kislost smo določili ali na dva načina, in sicer z avtomatizirano metodo FOODLAB ter z referenčnimi oz. s standardnimi metodami. Avtomatizirana metoda FOODLAB se od referenčnih oz. standardnih metod razlikuje tudi v principu analize, pripravi vzorca, pripravljenih reagentih in opreми. V preglednicah 10, 11 in 12 so prikazane razlike in podobnosti izvedbe analiz s sistemom FOODLAB v primerjavi z referenčnimi oz. s standardnimi metodami. Čas analize pa je omejen zgolj na čas reakcije in ne vključuje časa priprave vzorca, kalibracije.

##### 4.3.1 Primerjava metode FOODLAB in referenčne metode za določanje vsebnosti se nine v mleku

V preglednici 10 smo izpostavili izvedbo obeh metod, in sicer: princip metode, pripravo in količino potrebnega vzorca mleka, reagente in opremo. Čas reakcije metode FOODLAB in referenčne metode je naveden s strani proizvajalca.

Preglednica 10: Koraki izvedbe metode FOODLAB in referenčne metode za določanje vsebnosti se nine v mleku

	FOODLAB metoda	REFERENČNA metoda
Princip	Spektrofotometrija = absorpcija elektromagnetnega valovanja pri specifični valovni dolžini.	Diferencialna pH-metrija = merjenje vsebnosti aktivnih vodikovih ionov v raztopini.
Priprava vzorca	mleko + R1 inkubacija 5 min	mleko + encim inkubacija 10 min
Količina vzorca	5 $\mu$ L	0,8 mL
Reagenti	<ul style="list-style-type: none"><li>- R1: fenolni derivat in ureaza,</li><li>- R2: alkalna raztopina.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- R1: pufer (pH 6,7),</li><li>- R2: encim ureaza,</li><li>- R3: kalibracijski vzorec.</li></ul>
Oprema	<ul style="list-style-type: none"><li>- plastična epruveta,</li><li>- pipeta in nastavki,</li><li>- kivete.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- vodna kopel,</li><li>- merilni valj,</li><li>- erlenmajerica,</li><li>- pipeta in nastavki,</li><li>- kivete,</li><li>- računalnik in tiskalnik.</li></ul>
Čas reakcije	3 min	40 s

Metodi za določanje vsebnosti se nine se razlikujeta v principu, času inkubacije, opreми ter času reakcije analize. S sistemom FOODLAB merimo absorbanco, medtem ko pri referenčni metodi instrument meri spremembo vrednosti pH. Podobnosti med metodama so v pripravi vzorca ter uporabi reagentov, ki jih potrebujemo za analizo. Mleko je potrebno segreti na ustrezno temperaturo, mu dodati potrebne reagente ter pustiti na inkubaciji, ki je

s sistemom FOODLAB za polovico krajši. Prednost referenčne metode z instrumentom Microlab® EFA pa je v tem, da instrument sam odpipetira ustrezno količino vzorca ter dozira encim. Količina vzorca mleka, ki jo potrebujemo za določanje vsebnosti sečnine z metodo FOODLAB je 5 µL, z referenčno metodo pa 0,8 mL. Pri referenčni metodi potrebujemo nekoliko več opreme. Poleg vodne kopeli potrebujemo še ravnilnik in tiskalnik, kar ima sistem FOODLAB že vgrajeno. Kot že omenjeno, je čas reakcije naveden s strani proizvajalca. Čas reakcije pri referenčni metodi je 40 s in pri sistemu FOODLAB 3 min.

#### 4.3.2 Primerjava metode FOODLAB in referenčne metode za določanje vsebnosti kloridov v siru

V preglednici 11 smo izpostavili izvedbo obeh metod, in sicer: princip metode, pripravo in količino potrebnega vzorca sira, reagente ter opremo, ki jih potrebujemo za nemoteno izvajanje analize. Čas reakcije s sistemom FOODLAB je naveden s strani proizvajalca, medtem ko smo čas reakcije z referenčno metodo ocenili sami.

Preglednica 11: Koraki izvedbe metode FOODLAB in referenčne metode za določanje vsebnosti kloridov v siru

	FOODLAB metoda	REFERENČNA metoda
Princip	Spektrofotometrija = absorpcija elektromagnetnega valovanja pri specifični valovni dolžini.	Obarjalna titracija = tvorba težko topne oborine- titracija klorida s standardno raztopino srebrovega nitrata ob prisotnosti indikatorja.
Priprava vzorca	sir + NaOH homogeno mešanje, 40-50 °C	sir + srebrov nitrat + konc. dušikova kislina segrevanje
Količina vzorca	1 g	2 g
Reagenti	<ul style="list-style-type: none"> <li>- R1: živosrebrov (II) tiocianat,</li> <li>- R2: železov (III) nitrat,</li> <li>- R3: NaOH (0,25 M).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- R1: dušikova kislina,</li> <li>- R2: kalijev permanganat,</li> <li>- R3: amonijev ferri sulfat,</li> <li>- R4: glukoza ali oksalna kislina,</li> <li>- R5: srebrov nitrat,</li> <li>- R6: kalijev ali amonijev tiocianat.</li> </ul>
Oprema	<ul style="list-style-type: none"> <li>- plastična epruveta,</li> <li>- analitska tehtnica,</li> <li>- pinceta,</li> <li>- steklena palčka,</li> <li>- pipeta,</li> <li>- kivetec.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- analitska tehtnica,</li> <li>- erlenmajerica,</li> <li>- pipete,</li> <li>- merilni valj,</li> <li>- bireta,</li> <li>- kuhalnik,</li> <li>- digestorij.</li> </ul>
Čas reakcije	5 min	30 min

Metoda FOODLAB in referenčna metoda, za določanje vsebnosti kloridov v siri, se razlikujeta v celotnem postopku. Pri referenčni metodi ima pomembno vlogo analitik, ki presodi o pravi spremembi oz. pravem preskoku barve pri titraciji. S sistemom FOODLAB pa absorbanco vzorca meri aparatura sama. Prednost slednje je tudi v krajšem času reakcije. Priprava vzorca, ki je sicer sestavni del analize, je z referenčno metodo dolgotrajnejša, saj vzorec sira skupaj s potrebnimi reagenti kuhamo do popolnega razklopa, medtem ko z metodo FOODLAB siru dodamo reagent NaOH, segrejemo na ustrezno temperaturo ter vsebino homogeno zmešamo. Vendar pa k sistemu FOODLAB reagent NaOH ni vključen. Za določanje vsebnosti kloridov z metodo FOODLAB potrebujemo 3 reagente in 1 g vzorca, z referenčno metodo pa 6 reagentov in 2 g vzorca. Pri referenčni metodi izvajamo segrevanje vzorcev sira v digestoriju zaradi izhajanja ter ostrega in neprijetnega vonja dodanih reagentov, kar posledično pomeni več opreme. Sistem FOODLAB nam na koncu sam izračuna in izpiše dobljene vrednosti vsebnosti kloridov, medtem ko moramo pri referenčni metodi vsebnost kloridov še preračunati iz rezultatov porabe tiocianata pri titraciji. Čas reakcije s sistemom FOODLAB je naveden s strani proizvajalca (5 min), medtem ko smo čas reakcije z referenčno metodo ovrednotili sami (30 min).

### 4.3.3 Primerjava metode FOODLAB in standardne metode za določanje kislosti surovega masla

V preglednici 12 smo izpostavili izvedbo obeh metod, in sicer: princip metode, pripravo in količino potrebnega vzorca surovega masla, reagente ter opremo, ki jih potrebujemo za nemoteno izvajanje analize. Čas reakcije z metodo FOODLAB je naveden s strani proizvajalca, medtem ko smo čas reakcije s standardno metodo ocenili sami.

Preglednica 12: Koraki izvedbe metode FOODLAB in standardne metode za določanje kislosti surovega masla

	FOODLAB metoda	STANDARDNA metoda
Princip	Spektrofotometrija = absorpcija elektromagnetnega valovanja pri specifični valovni dolžini.	Nevtralizacijska titracija = sprejemanje in oddajanje protonov med kislinami in bazami.
Priprava vzorca	surovo maslo + sultan anhidrid raztopimo v vodni kopeli centrifugiramo odpipetiramo raztopljeni maslo	surovo maslo + razt. etanola in toluena segrevamo
Količina vzorca	1 g	20 g
Reagenti	<ul style="list-style-type: none"> <li>- R1: mešanica alkoholov in KOH, derivat fenolftaleina,</li> <li>- R2: natrijev sulfat anhidrid.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- R1: 0,1 M KOH,</li> <li>- R2: 96% etanol,</li> <li>- R3: toluen,</li> <li>- R4: fenolftalein.</li> </ul>
Oprema	<ul style="list-style-type: none"> <li>- analitska tehtnica,</li> <li>- širokolistna lopatica,</li> <li>- plastična epruveta,</li> <li>- vodna kopel,</li> <li>- centrifuga,</li> <li>- pipeta,</li> <li>- kivete.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- analitska tehtnica,</li> <li>- erlenmajerica,</li> <li>- merilni valj,</li> <li>- bireta,</li> <li>- širokolistna lopatica,</li> <li>- grelnik,</li> <li>- digestorij,</li> <li>- zaščitna obleka ter rokavice.</li> </ul>
Čas reakcije	3-6 min	15 min

Metoda FOODLAB in standardna metoda za določanje kislosti surovega masla se razlikujeta v celotnem postopku. Pri standardni metodi ima pomembno vlogo analitik, ki presodi o pravi spremembi oz. pravem preskoku barve pri titraciji, medtem ko pri metodi s sistemom FOODLAB meri absorbanco sama aparatura. Pri določanju kislosti surovega masla s standardno metodo vzorec surovega masla z dodanimi kemikalijami segrevamo, da se popolnoma raztopi. Ker pri tem iz reakcijske mešanice izhajajo zdravju škodljivi hlapi, je segrevanje potrebno izvajati v digestoriju. Za pripravo vzorca pri metodi FOODLAB potrebujemo centrifugo ter reagent natrijev sulfat anhidrid, ki nista vključena v komplet.



Za izvedbo analize z metodo *FOODLAB* potrebujemo 2 reagenta in 1 g vzorca, za izvedbo analize s standardno metodo pa 4 reagente in 20 g vzorca. Pri standardni metodi moramo kislost surovega masla še prera unati iz porabe KOH pri titraciji in izraziti kot vsebnost oleinske kisline, medtem ko sistem *FOODLAB* sam prera una in izpiše rezultate. Čas reakcije s sistemom *FOODLAB*, naveden s strani proizvajalca, je 3-6 min, medtem ko smo čas reakcije s standardno metodo ovrednotili sami na približno 15 min.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Živilska industrija si vse bolj prizadeva, da bi bili živilski izdelki čim bolj kakovostni ter hkrati cenovno sprejemljivi. Pri tem pa posebno pozornost posveča doseganju in ohranjanju kakovosti, varnosti in stabilnosti proizvoda. Za doseganje in preverjanje kakovosti so potrebne določene kemijske, fizikalne ter mikrobiološke analize surovin ali izdelkov, ki odločajo o pomembnih in ključnih parametrih predelave ali izdelave surovin oz. izdelkov.

Za ovrednotenje določene vrednosti parametra je navadno na voljo več standardiziranih metod, le ena pa je referenčna. Te metode nam zagotavljajo pravilnost in ponovljivost merjenega parametra. Referenčne metode, bodisi za kemijsko, fizikalno ali mikrobiološko analizo živil, so velikokrat dolgotrajne in drage zaradi uporabe specifičnih kemikalij. Slednje pa so lahko obremenilne za okolje in s potencialno zdravju škodljivimi učinki za analitika. Eden najpogostejših primerov z zdravju neugodnimi učinki kemikalij je stik analitika s škodljivimi hlapi, ki se ob analizah sproščajo. V našem konkretnem primeru smo pri standardni analizi določanja kislosti surovega masla delali z zelo hlapnim toluenom. Pri referenčni analizi določanja vsebnosti kloridov v siru pa smo ravnali z agresivno in za sluznico nevarno, dušikovo kislino. Obe analizi smo zato izvajali v digestoriju in uporabili zaščitna oprema ter rokavice.

Zaradi tega je podjetje CDR S.r.l. še posebno zanimivo, saj je razvilo analitični sistem za živila FOODLAB, ki temelji na spektrofotometričnem merjenju. Poleg tega, da je izvedba analiz s sistemom FOODLAB hitra, tudi ni zdravju ali okolju škodljivih odpadkov oz. količin samih odpadkov izredno majhne.

Navedbe proizvajalca so se izkazale za umestne, o čemer smo se prepričali tudi pri našem delu. Ne glede na to, ali smo s sistemom FOODLAB določili vsebnost sečnine v mleku, vsebnost kloridov v sirih ali kislost surovega masla, je bila celotna izvedba analiz res hitra in enostavna, brez dolgotrajne predpriprave vzorca. Kljub temu pa smo opazili nekaj pomanjkljivosti sistema FOODLAB. Pri analizi določanja kislosti surovega masla proizvajalec ne navaja, da sta za pripravo vzorca potrebna centrifuga ter reagent natrijev sulfat anhidrid, ki pa nista vključena v analitični sistem FOODLAB. Omenjena pomanjkljivost lahko predstavlja težavo in nenazadnje dodaten strošek analitikom, ki imajo slabše opremljen laboratorij oziroma ga sploh nimajo. Podobno je bilo pri analizi določanja vsebnosti kloridov, kjer v sistem FOODLAB ni vključen reagent NaOH. Odpadkov je malo, saj volumen predhodno napolnjenih kivet z reakcijsko mešanico znaša le 1 mL. Sama vsebina oz. reagenti so zaradi nizke toksičnosti varni. Plastične embalaže predstavljajo le kivete, ki jih odvržemo v za to namenjene odpadke.

Po končanem praktičnem delu se je izkazalo, da je delo s sistemom FOODLAB izjemno hitro ter "isto" v primerjavi s postopki referenčnih oz. standardnih analiz. Rezultati se izpišejo takoj in preračunavanje ali računanje ni potrebno. Količina vzorca, ki je potrebna

za analizo s sistemom FOODLAB, je manjša od količine vzorca, ki ga potrebujemo pri referenčni oz. standardni metodi. Zato potrebujemo tudi manjše količine reagentov.

Pri določanju vsebnosti se nina v mleku se je izkazalo, da daje metoda FOODLAB povprečno za 1,54 mg/dL višje rezultate od referenčne metode. Razlike med paralelkami so večje pri metodi FOODLAB, in sicer povprečno za 0,41 mg/dL, medtem ko so razlike med paralelkami z referenčno metodo nižje, in sicer za 0,19 mg/dL. Slučajna napaka metode FOODLAB je 0,63 mg/dL, sistematična pa  $\pm 1,54$  mg/dL. Nato smo z analizo linearne regresije določili zvezo med rezultati za določanje vsebnosti se nina v mleku, kjer je regresijski model  $FL = 0,951 \cdot RF + 2,607$ , koeficient determinacije je 0,97, korelacijski koeficient pa 0,98. Med rezultati meritev vsebnosti se nina v mleku lahko rečemo, da obstaja zelo močna pozitivna zveza, pri tem pa velja, da 97 % variabilnosti rezultatov metode FOODLAB, lahko pojasnimo z rezultati referenčne metode. Ker nam metodi dajeta zelo podobne rezultate meritev, metodo FOODLAB lahko sprejmemo kot nadomestilo referenčne metode.

Povezavo rezultatov določanja vsebnosti se nina v mleku med metodo FOODLAB in referenčno metodo ISO 14637/IDF 195 (2004), je ovrednotilo tudi podjetje CDR S.r.l. Uporabnost sistema FOODLAB so ocenjevali v laboratoriju AIA (Laboratorio Standard Latte - Italian Breeders Association) (foodLabline1, 2008). Rezultate testa so ovrednotili na podlagi analize linearne regresije. Testirali so 6 vzorcev in rezultate metode FOODLAB grafično podali kot neodvisno spremenljivko (x-os), rezultate referenčne metode pa kot odvisno spremenljivko (y-os). Ugotovili so tesno zvezo med rezultati, s koeficientom determinacije  $R^2 = 0,995$ . Na podlagi naših rezultatov ( $R^2 = 0,969$  oz. 0,97) smo ugotovili, da sta raziskavi primerljivi, saj se koeficienta determinacije razlikujeta le za 0,026 oz. za 2,6 %

Pri določanju vsebnosti kloridov v sirih z metodo FOODLAB se je izkazalo, da so ti rezultati pri približno polovici meritev višji pri polovici meritev pa nižji kot rezultati referenčne metode. Rezultati med metodama se povprečno razlikujejo za 0,18 %. Razlike med paralelkami so večje pri metodi FOODLAB, in sicer povprečno za 0,11 %, medtem ko so razlike med paralelkami z referenčno metodo nižje, in sicer povprečno za 0,03 %. Slučajna napaka metode FOODLAB znaša 0,26 %, sistematična pa  $\pm 0,18$  %. Zvezo med metodama smo določili z linearno regresijo, kjer je regresijski model  $FL = 0,663 \cdot RF + 0,403$ , koeficient determinacije je 0,82, korelacijski koeficient pa 0,91. Med rezultati meritev tako obstaja kar močna pozitivna zveza in pri tem velja, da 82 % variabilnosti rezultatov metode FOODLAB, lahko pojasnimo z rezultati referenčne metode. Glede na ta rezultat lahko sklepamo, da nam obe metodi dajeta med seboj podobne rezultate meritev, kar nam omogoča, da metodo FOODLAB lahko sprejmemo kot nadomestilo referenčne metode.

Uporabnost sistema FOODLAB za določanje vsebnosti kloridov je, prav tako kot pri se nini, ocenilo tudi podjetje CDR S.r.l. v laboratoriju AIA (Laboratorio Standard Latte - Italian Breeders Association) (foodLabline2, 2008). Vendar so zvezo rezultatov metode FOODLAB in referenčne metode testirali na podlagi določanja vsebnosti kloridov v mleku in ne v siru. Rezultate testa so ovrednotili na podlagi analize linearne regresije. Testirali so 6 vzorcev, rezultate metode FOODLAB so grafično podali kot neodvisno spremenljivko (x-

os), rezultate referenčne metode pa kot odvisno spremenljivko (y-os) ter dolo ali zelo tesno zvezo med rezultati, s koeficientom determinacije  $R^2 = 0,995$ . Glede na to, da je analiza podjetja CDR S.r.l. obsegala določanje vsebnosti kloridov v mleku in ne v siru, rezultatov njihovih raziskav ne moremo neposredno primerjati z rezultati naše analize. Princip analize je sicer enak, vendar se analiza razlikuje predvsem v pripravi vzorca. Mleko ima že homogeno konsistenco, medtem ko smo morali vzorce sira ustrezno pripraviti.

Pri določenju kislosti surovega masla smo na podlagi rezultatov ugotovili, da daje metoda FOODLAB za 0,08 % višje rezultate kot standardna metoda. Razlike med paralelkami so prav tako večinoma pri metodi FOODLAB povprečno za 0,07 %, medtem ko so razlike med paralelkami s standardno metodo nižje, in sicer 0,03 %. Slučajna napaka metode FOODLAB je 0,04 %. Sistematična napaka pa  $\pm 0,08$  %. Zvezo med rezultati smo enako kot pri določenju vsebnosti sečnine in kloridov, določili ali z linearno regresijo, kjer je regresijski model  $FL = 1,084 \cdot ST + 0,051$ . Koeficient determinacije je 0,52, korelacijski koeficient pa 0,72. Med rezultati meritev obstaja šibka pozitivna zveza, pri kateri velja, da 52 % variabilnosti rezultatov metode FOODLAB, lahko pojasnimo z rezultati referenčne metode. Metode FOODLAB ne moremo sprejeti za nadomestilo referenčne metode, lahko pa nam služi za rutinsko uporabo.

Prav tako kot pri določenju vsebnosti kloridov, tudi pri določenju kislosti surovega masla ne moremo primerjati naših rezultatov z rezultati, ki so jih dobili v podjetju CDR S.r.l. (foodLabline3, 2008). Vsebnost oleinske kisline so testirali samo z analitičnim sistemom PalmOilTester za analizo maščob in olj. Ker pa ta sistem deluje na enakem principu kot sistem FOODLAB, smo se odločili, da njihove rezultate vseeno omenimo. Testirali so 4 vzorce in z grafom linearne regresije prikazali rezultate meritev metode PalmOilTester (x-os) in rezultate meritev AOCS metode (y-os), kjer je koeficient determinacije  $R^2 = 0,994$ . Ugotovili so, da med rezultati obeh metod obstaja tesna zveza.

V diplomskem delu smo potrdili postavljeno hipotezo, da z uporabo sistema FOODLAB za določanje vsebnosti sečnine v mleku, kloridov v siru in kislosti surovega masla dobimo rezultate, ki so primerljivi z rezultati, dobljenimi z referenčnimi oz. s standardnimi metodami. Pri določenju vsebnosti sečnine smo ugotovili zelo močno pozitivno zvezo med rezultati obeh metod, medtem ko smo pri določenju vsebnosti kloridov ugotovili tudi kar močno pozitivno zvezo med rezultati določenja. Pri določenju kislosti surovega masla pa postavljena hipoteza ne drži, saj smo med rezultati, dobljenimi z metodo FOODLAB in s standardno metodo, ugotovili le šibko pozitivno zvezo.

Pri podjetju Noack & Co AG, podružnica Maribor, ki je zastopnik podjetja CDR S.r.l. v Sloveniji, za katerega smo naredili analize, so bili z dobljenimi rezultati zadovoljni. Vendar pa menimo, da bi za pravilnejše in ponovljivejše rezultate morali analizirati večje število vzorcev. Tako bi statistična analiza obsegala večje število analiziranih enot, zaradi česar bi se zmanjšale morebitne napake pri izvajanju analiz. Pri metodi FOODLAB, za določanje kislosti, bi morali uporabiti drugačen testni komplet, z višjim merilnim območjem. Naše merilno območje je bilo precej nizko, le do 0,71 % oleinske kisline. Uporabiti pa bi morali komplet z merilnim območjem od 0,01 do 25 % oleinske kisline. Menimo, da je napaka lahko posledica vzorčenja ali kakšne druge motnje, ki je ne moremo definirati.

V podjetju CDR S.r.l. so na podlagi regresijske analize testirali primernost sistema *FOODLAB*. Rezultati, ki so jih dobili, so zelo primerljivi z ustreznimi referenčnimi metodami. Na njihove rezultate pa se lahko opremo le pri analizi vsebnosti sečnine, medtem ko pri določenju vsebnosti kloridov in kislosti ni primerljivih podatkov. Podjetje CDR S.r.l. je z metodo *FOODLAB* določilo vsebnost kloridov v mleku in ne v sirih, medtem ko so kislost masla določili s sistemom *PalmOilTester* in *AOCS* metodo.

## 5.2 SKLEPI

Na podlagi rezultatov analiz in statistične obdelave lahko povzamemo:

- Izvedba analiz s sistemom *FOODLAB* je v primerjavi z referenčnimi oz. s standardnimi metodami enostavnejša in hitrejša.
- Vrednosti za vsebnost kloridov in vsebnost sečnine, dobljene s sistemom *FOODLAB*, so od vrednosti, dobljenih z referenčnimi metodami, minimalno odstopale oziroma so se približale mejam, ki jih navaja standard.
- Sistem *FOODLAB* je primerno nadomestilo referenčnih analiz za hitro določanje vsebnosti sečnine v mleku in vsebnosti kloridov v sirih.
- Pri določenju kislosti surovega masla nam sistem *FOODLAB* lahko služi le za rutinsko oz. okvirno določanje vsebnosti prostih maščobnih kislin v maslu.

## 6 POVZETEK

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti primernost sistema FOODLAB za analize nekaterih parametrov mleka in mlečnih izdelkov in rezultate primerjati z rezultati referenčnih oz. standardnih analiz.

V ta namen smo v dveh paralelkah analizirali po 15 vzorcev mleka, sira in surovega masla. Analize smo opravili v laboratoriju Inštituta za mlekarstvo in probiotike, na Oddelku za zootehniko, Univerze v Ljubljani. Vsi vzorci, vključno s temi, ki so bili namenjeni za analize, so bili naključno izbrani. Seveda smo določili ali spektrofotometrično s sistemom za hitre analize FOODLAB in z referenčno metodo ISO 14637/IDF 195 (2004). Vsebnost kloridov v siru smo prav tako določili ali s sistemom FOODLAB in z referenčno metodo ISO 2970 (1974). Kislost surovega masla pa smo ponovno določili ali s sistemom FOODLAB in s standardno metodo SIST EN ISO 660 (2009).

Referenčne oz. standardne metode, po katerih smo naredili analize mleka ter mlečnih izdelkov, so navadno dolgotrajnejše in v smislu zdravja manj ustrezne, saj lahko vključujejo uporabo doloženih škodljivih kemikalij. S sistemom FOODLAB je bila izvedba teh analiz hitrejša, enostavnejša in manj škodljiva za ljudi ter okolje.

Podatke smo statistično obdelali s programom Microsoft Office Excel 2003. V programu Excel smo izračunali povprečne vrednosti in standardni odklon za vsebnost kloridov v siru, seveda v mleku in kislosti surovega masla. Nato smo z analizo linearne regresije in korelacijskim koeficientom, za vsebnost seveda, kloridov in kislosti, ugotavljali zvezo med metodo FOODLAB in referenčno oz. standardno metodo.

Pri določanju vsebnosti seveda v mleku smo ugotovili, da daje metoda FOODLAB povprečno za 1,54 mg/dL višje rezultate od referenčne metode. Razlike med paralelkami so bile večje pri metodi FOODLAB, in sicer povprečno za 0,41 mg/dL, medtem ko so bile razlike med paralelkami z referenčno metodo nižje, in sicer za 0,19 mg/dL. Slučajna napaka metode FOODLAB je bila 0,63 mg/dL, sistematična pa  $\pm 1,54$  mg/dL. Zvezo med rezultati metode FOODLAB in referenčne metode opisuje regresijski model:  $FL = 0,951 \cdot RF + 2,607$ ;  $R^2 = 0,97$ ;  $R = 0,98$ , kar kaže na močno pozitivno zvezo med rezultati obeh metod. Rezultati naše analize so bili primerljivi z rezultatom podjetja CDR S.r.l. ( $R^2 = 0,995$ ).

Pri določanju vsebnosti kloridov v sirih smo ugotovili, da daje metoda FOODLAB, približno v polovici primerov višje in v polovici primerov nižje rezultate meritev v primerjavi z rezultati referenčne metode. Rezultati med metodama so se povprečno razlikovali za 0,18 %. Razlike med paralelkami so bile večje pri metodi FOODLAB, in sicer povprečno za 0,11 %, medtem ko so bile razlike med paralelkami z referenčno metodo nižje, in sicer povprečno za 0,03 %. Zvezo med rezultati metode FOODLAB in referenčne metode opisuje regresijski model:  $FL = 0,663 \cdot RF + 0,404$ ;  $R^2 = 0,82$ ;  $R = 0,91$ , kar kaže na močno pozitivno zvezo med rezultati obeh metod. Zveze med rezultati nismo mogli primerjati z rezultati podjetja CDR S.r.l., saj so določili vsebnost kloridov v mleku in ne v siru.

Pri določanju kislosti surovega masla smo na podlagi rezultatov ugotovili, da daje metoda FOODLAB povprečno za 0,08 % višje rezultate od standardne metode. Razlike med paralelkami so bile prav tako večje pri metodi FOODLAB, in sicer povprečno za 0,07 %, medtem ko so bile razlike med paralelkami s standardno metodo nižje, in sicer za 0,03 %. Zvezo med rezultati FOODLAB in standardne metode opisuje regresijski model:  $FL = 1,084 \cdot ST + 0,051$ ;  $R^2 = 0,52$ ;  $R = 0,72$ , kar kaže na šibko pozitivno zvezo med rezultati obeh metod. Prav tako kot pri kloridih, zveze rezultatov meritev nismo mogli primerjati z rezultati meritev podjetja CDR S.r.l., saj so vsebnost oleinske kisline določili ali z analitičnim sistemom PalmOilTester za analizo masla in olja in ne s sistemom FOODLAB.

Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo, da je sistem FOODLAB primerno nadomestilo referenčnih analiz za določanje vsebnosti sečnine v mleku in vsebnosti kloridov v sirih, medtem ko nam metoda FOODLAB za določanje kislosti surovega masla lahko služi le za rutinsko uporabo.

## 7 VIRI

- Abadi M., Ashraf N., Chamsaz M., Shemirani F. 2012. An overview of liquid phase microextraction approaches combined with UV-Vis spectrophotometry. *Talanta*, 99: 1-12
- Adami Š. 1989. Temelji biostatistike. Ljubljana, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Inštitut za biomedicinsko informatiko: 195 str.
- Arunvipas P., VanLeeuwen J.A., Dohoo I.R., Keefe G.P. 2003. Evaluation of the reliability and repeatability of automated milk urea nitrogen testing. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 67: 60-63
- Babnik D., Verbi J., Podgoršek P., Jeretina J., Perpar T., Logar B., Sadar M., Ivanovi B. 2004. Priročnik za vodenje prehrane krav molznic ob pomoči rezultatov mlečne kontrole. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 84 str.
- Bajt N., Golc-Teger S. 2011. Izdelava jogurta, skute in sira. Ljubljana, Kmetijski glas: 142 str.
- CDR. 2008. Food diagnostic: FoodLab. Florence, CDR S.r.l.- analisi e sviluppo sistemi cibernetici: 5 str.  
<http://www.cdr-mediated.com/food-diagnostics/foodlab/control-quality-food> (februar, 2012)
- De Jong C., Badings H. T. 1990. Determination of free fatty acids in milk and cheese procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis. *Journal of High Resolution Chromatography*, 13, 2: 94-98
- Deeth H. C. 2011. Lipolysis and hydrolytic rancidity. V: *Encyclopedia of dairy sciences*. Vol. 3. 2<sup>nd</sup> ed. Fuquay J.W., Fox P.F., McSweeney P.L.H. (eds.). Amsterdam, Elsevier, Academic Press: 721-725
- Douma M. (curator). 2008. Butter through the ages. Rockville, Institute for Dynamic Educational Advancement: 1 str.  
<http://www.webexhibits.org/butter/compounds-fatty.html> (februar, 2012)
- foodLabline1. 2008. Food diagnostic analyzers. Milk analysis: Milk urea nitrogen testing. Florence, CDR-analisi e sviluppo sistemi cibernetici: 1 str.  
<http://www.cdrfoodlab.com/food-analysis/urea-milk.html> (december, 2012)
- foodLabline2. 2008. Food diagnostic analyzers. Milk analysis: Chloride test in milk, cheese and aqueous solution. Florence, CDR-analisi e sviluppo sistemi cibernetici: 1 str.  
<http://www.cdrfoodlab.com/food-analysis/chloride-milk-cheese.html> (december, 2012)



- foodLabline3. 2008. Food diagnostic analyzers. Fats and oils: free fatty acid test. Florence, CDR-analisi e sviluppo sistemi cibernetici: 1 str.  
<http://www.cdrfoodlab.com/food-analysis/ffa-fats-oils.html> (december, 2012)
- Fox P.F., McSweeney P.L.H. 1998. Dairy chemistry and biochemistry. London, Blackie academic & Professional: 478 str.
- Godden S.M., Lissemore K.D., Kelton D.F., Lumsden J.H., Leslie K.E., Walton J.S. Analytic validation of an infrared milk urea assay and effects of sample acquisition factors on milk urea results. 2000. Journal of Dairy Science, 83: 435-442
- GROSSERON. 2012. Analyseur CDR FOODLAB. Saint-Herblain, GROSSERON SAS: 1str.  
<http://www.grosseron.com/Assets/Client/images/GROSSERON/photos/225004Z01.jpg> (oktober, 2012)
- Hmelak Gorenjak A. 2010. Živilska kemija z analizo živil in Analiza živil. Ljubljana, Zavod IRC: 117 str.  
[http://www.impletum.zavod.irc.si/docs/Skriti\\_dokumenti/Zivilska\\_kemija\\_z\\_analizo\\_in\\_Analiza\\_zivil-Hmelak.pdf](http://www.impletum.zavod.irc.si/docs/Skriti_dokumenti/Zivilska_kemija_z_analizo_in_Analiza_zivil-Hmelak.pdf) (februar, 2012)
- ISO 14637/IDF 195. Milk - Determination of urea content - Enzymatic method using difference in pH (reference method). 2004: 11 str.
- ISO 2970. Cheese-determination of chloride content (reference method). 1974: 2 str.
- James C.S. 1995. Analytical chemistry of foods. London, Blackie Academic & Professional: 3-12
- Košmelj K. 2007. Uporabna statistika: [elektronski vir]. 2. dopolnjena izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 171 str.  
[http://www.bf.uni-lj.si/agronomija/o-oddelku/katedre-in-druge-org-enote/za-statistiko/studijske-zadeve/Uporabna\\_statistika.pdf](http://www.bf.uni-lj.si/agronomija/o-oddelku/katedre-in-druge-org-enote/za-statistiko/studijske-zadeve/Uporabna_statistika.pdf) (marec, 2013)
- Mavrin D., Oštir Š. 2002. Tehnologija mleka in mle nih izdelkov. 1. natis. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 218 str.
- Mortensen B.K. 2011. Butter and other milk fat products: The product and its manufacture. V: Encyclopedia of dairy sciences. Vol. 1. 2<sup>nd</sup> ed. Fuquay J.W., Fox P.F., McSweeney P.L.H. (eds.). Amsterdam, Elsevier, Academic Press: 492-499
- O'Brien N.M., O'Connor T.P. 2011. Lipid oxidation. V: Encyclopedia of dairy sciences. Vol. 3. 2<sup>nd</sup> ed. Fuquay J.W., Fox P.F., McSweeney P.L.H. (eds.). Amsterdam, Elsevier, Academic Press: 716-720
- Pravilniku o kakovosti mleka, mle nih izdelkov, siril in istih cepiv. 1993. Uradni list Republike Slovenije, 3, 21: 1075-1075

- Renelj S., Perko B., Bogataj J. 1995. Siri nekdanj in zdaj. Ljubljana, Kmečki glas: 186 str.
- Robyt J.F., White B.J. 1990. Biochemical techniques: theory and practice. Prospect Heights, Waveland Press: 40-59
- Rogelj I., Perko B. 2003. Mlečni izdelki. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adami J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 541-577
- Rogelj I. 2003. Mleko. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adami J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 513-539
- Rogelj I., Anžek Majheni A., Perko B. 2009. Mleko in mlečni izdelki kot izvor biološko pomembnih mineralov V: Vloga mineralov v živilski tehnologiji in prehrani. 26. Biten evi živilski dnevi '09, Ljubljana, 26.-27. nov., 2009. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo in Slovensko prehransko društvo: 149-151
- Rudan-Tasi D., Klofutar C. 2007. Fizikalnokemijske metode v živilstvu. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 93-93
- SIST EN ISO 660. Rastlinske in živalske maščobe in olja: določanje kislinškega števila in kislosti=Animal and vegetable fats and oils: determination of acid value and acidity. 3<sup>rd</sup> ed. 2009: 3: 8 str.
- SIST EN ISO 707/IDF 50. Mleko in mlečni proizvodi - Navodila za vzorčenje = Milk and milk products - Guidance on sampling. 3<sup>rd</sup> ed. 2008: 40 str.
- Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Crouch S.R. 2004. Fundamentals of analytical chemistry. 8<sup>th</sup> ed. South Bank, Thomson Learning Academic Resource Center: 710-711, 725-725
- Slanovec T. 1982. Sirarstvo. Ljubljana, ZP Kmečki glas: 175 str.
- Sola-Larrañaga C., Navarro-Blasco I. 2009. Chemometric analysis of minerals and trace elements in raw cow milk from the community of Navarra, Spain. Food Chemistry, 112: 189-196
- Šabec S. 1965. Tehnologija surovega masla. Ljubljana, Državna založba Slovenije, Mlekarski šolski center v Kranju: 127 str.

- Štoka I., Lavrenčič A. 2009. Sečina v mleku. V: Zbornik predavanj. 18. Mednarodno posvetovanje o prehrani domačih živali. Zdravstveni-erjavstveni dnevi, Radenci, 5.-6. nov. 2009. Urednik T., Kapun S., Verbič J., Kramberger B., Steingass H., Steinwider A., Špur M. (ur.). Murska Sobota, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod Murska Sobota: 80-90
- Taylor M.W., MacGibbon A.K.H. 2011. Fatty acids. V: Encyclopedia of dairy sciences. Vol. 3. 2<sup>nd</sup> ed. Fuquay J.W, Fox P.F., McSweeney P.L.H. (eds.). Amsterdam, Elsevier, Academic Press: 655-659
- Tratnik L. 1998. Mlijeko-tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb: 391 str.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se vsem, ki so mi na kakršenkoli način in pomagali pri izdelavi diplomske naloge.