

Predmet: Kontrola i ocjenjivanje mlijeka i mliječnih proizvoda

Predmetni nastavnik: Prof. dr.sc. Jasmina Havranek

Nastavna jedinica: Kontrola i ocjenjivanje fermentiranih
mlijeka

Prof.dr. sc Dubravka Samaržija

Nastavni tekst, 2006.

Agronomski fakultet, Zagreb

Fermentirana mlijeka - analize

1. Sirovo mlijeko

Kvaliteta sirovog mlijeka u mljekari, a za proizvodnju fermentiranih mlijeka prosuđuje se na osnovu **fizikalnih, kemijskih i higijenskih parametara**. Prema opće prihvaćenim kriterijima kvalitete mlijeko mora imati:

- a) temperaturu $< 6^{\circ}\text{C}$
- b) količinu masti $\geq 3,2\%$
- c) količinu bjelančevina $\geq 3\%$
- d) titracijsku kiselost $^{\circ}\text{SH}$ 6,6- 6,8
- e) inhibitornih supstanci $\leq 0,007\text{IU ml}^{-1}$ ($0,004 \mu\text{g ml}^{-1}$)
- f) ukupan broj bakterija $\leq 100\ 000 \text{ ml}^{-1}$
- h) broj somatskih stanica $\leq 400\ 000 \text{ ml}^{-1}$

Premda su svi navedeni parametri kvalitete sirovog mlijeka značajni za dobru kvalitetu fermentiranih mlijeka, test za utvrđivanje **antibiotičkih ostataka** je **obvezan**. Zbog toga, što povećana koncentracija antibiotičkih ostataka može u potpunosti zaustaviti rast mljekarskih mikrobnih kultura. U praksi se za utvrđivanje ostataka antibiotika u mlijeku koriste brojni testovi različite osjetljivosti. Radi jednostavnosti izvođenja i brzine dobivanja rezultata najčešće su u upotrebi **Delvotest-® P** s granicom detekcije $0,004 \text{ IU ml}^{-1}$ kroz 2,5 sata te **Delvo-X-Press®** i **Lac-Tek®** s granicom detekcije $0,006 \text{ IU ml}^{-1}$ za 7 minuta.

1.1 Ukupan broj bakterija

Ukupan broj bakterija u mlijeku može se utvrditi klasičnom metodom brojanja poraslih kolonija na standardnom hranilištu na temperaturi $30^{\circ}\text{C}/72$ sata (referentna metoda) ili automatiziranom protočnom citometrijom npr.

instrumentom Bactoscan FC (90 uzoraka mlijeka/ 1 sat). **Količina bjelančevina** utvrđuje se Kjeldahl metodom (referentna metoda) ili automatiziranom metodom infra-crvene spektrometrije (standardna metoda). **Mliječna mast** u mlijeku određuje se: Rose-Gottlieb metodom (referentna metoda), metodom po Gerberu (butirometrijska metoda - standardna metoda) i automatiziranom metodom infra-crvene spektrometrije (standardna metoda). **Vrijednost točke ledišta** utvrđuje se krioskopskom metodom (referentna metoda). **Broj somatskih stanica** u mlijeku prosuđuje se mikroskopskom metodom (referentna metoda) ili fluoro-opto-elektronskom metodom (standardna metoda). Titracijska kiselost ($^{\circ}\text{SH}$) utvrđuje se metodom po Soxhlet-Henkel.

U procijeni mlijeka za proizvodnju fermentiranih mlijeka veliko značenje ima i utvrđivanje količine suhe tvari radi točnog utvrđivanja stupnja koncentriranja mlijeka i/ili količina ingredienata potrebnih za standardizaciju suhe tvari bez masti. Suhu tvar mlijeka određuje se gravimetrijskom metodom (referentna) ili metodom infra-crvene spektrometrije (standardna).

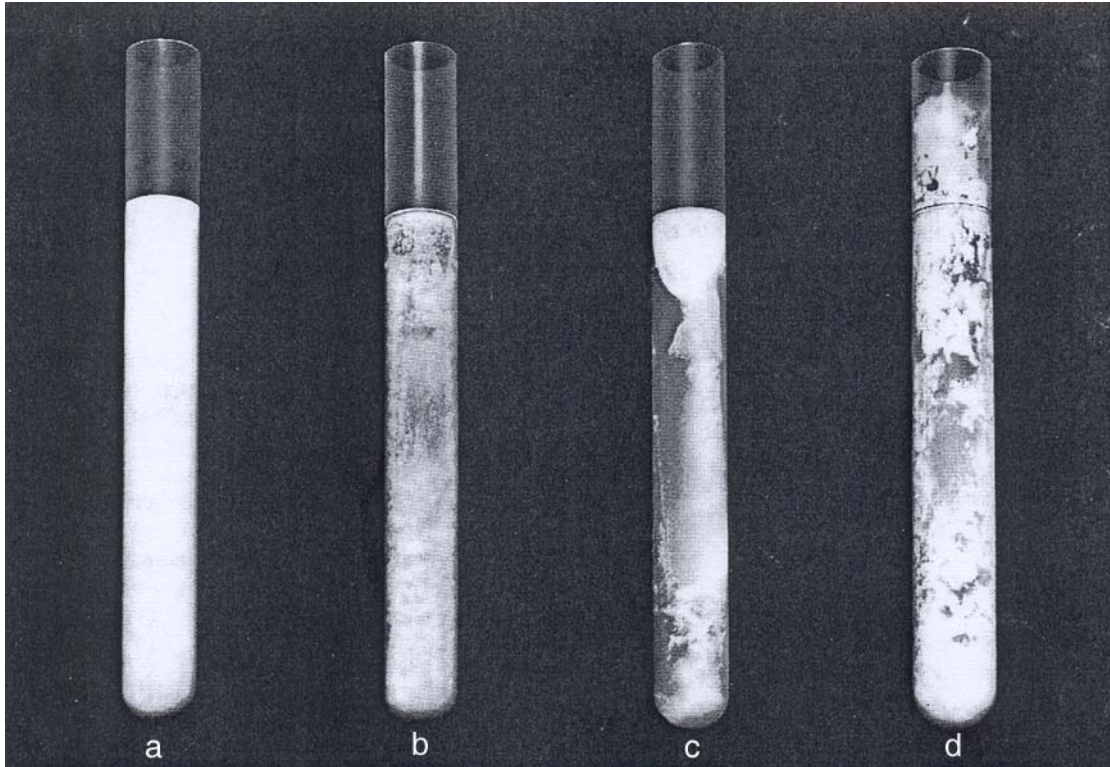
1.2. Fermentacijska proba

Fermentacijska proba kao jednostavna i brza metoda za procjenu kvalitete sirovog mlijeka u izradi fermentiranih mlijeka može se koristiti u mljekarama manjeg kapaciteta. Svrha fermentacione probe je izabrati bakteriološki najkvalitetnije mlijeko za izradu fermentiranih mlijeka.

Postupak: u sterilne epruvete nalije se 40 ml sirovog mlijeka, potom se mlijeko inkubira na temperaturi od 38-40°C/ 12-24 sata, eventualno nastali gruš (gel) procjenjuje se prvi put nakon 12, a drugi put nakon 24. Mlijeko koje je nakon inkubacije od 24 sata ostalo tekuće ili je gruševina galerasta (jednoličana, gladka) smatra se pogodnim za izradu u fermentiranih mlijeka. Nakon inkubacije, ako je gruševina: sirišna (gruševina je stegnuta), pahuljasta (manje

ili veće pahuljice) ili naduta (mjehurići plina, gruša rupičast, pliva na sirutki mlijeko nije pogodno za preradu u fermentirana mlijeka (slika1).

Slika 1. Fermentaciona proba



- a) galerasta gruševina
- b) sirišna gruševina
- c) pahuljasta gruševina
- d) naduta gruševina

2. Fermentirana mlijeka

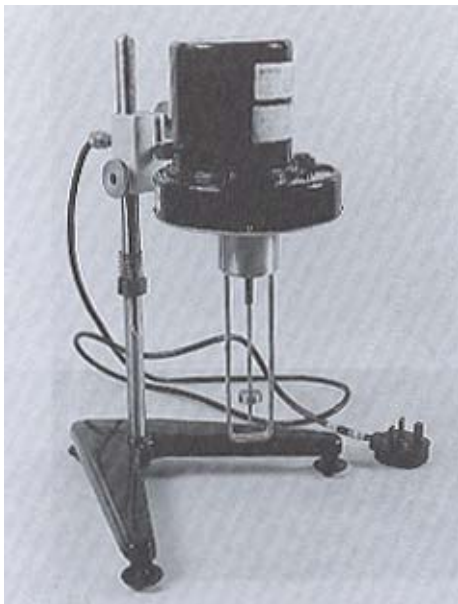
U procijeni kvalitete fermentiranih mlijeka, u praksi, koriste se jednostavne kemijske, fizikalne i senzoričke (organoleptičke) analize. Najčešće su to sljedeće analize:

a) osnovne kemijske analize ingredienata (mliječnog praha, sirutke u prahu, kazeina itd.):kiselost, sadržaja masti, % vlage, topivost i test na prisutnost antibiotika.

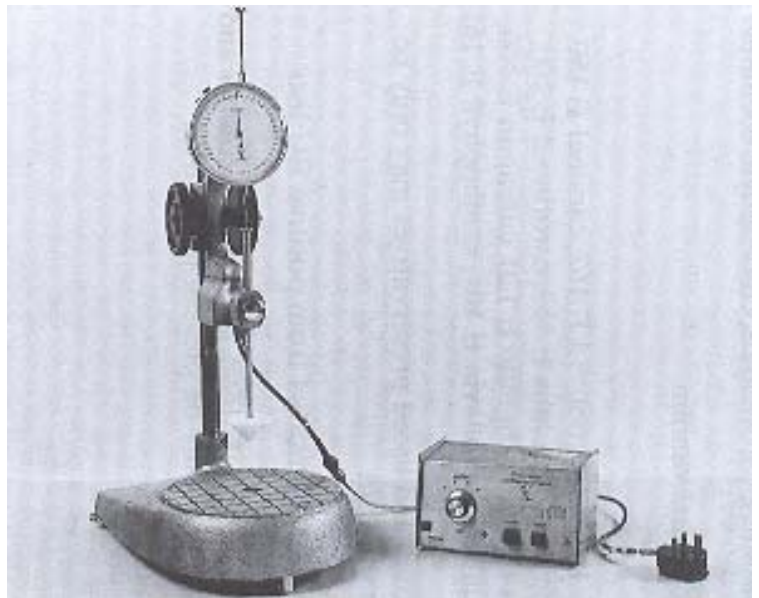
b) osnovne kemijske analize gotovih fermentiranih mlijeka: količina suhe tvari, količina masti i pH vrijednost. Tim analizama potvrđujemo ispravnost tehnološkog procesa u smislu zadovoljenja zadanih standarda (deklaracije proizvoda)

c) viskozitet (konzistencija) polu-tekućih i tekućih fermentiranih mlijeka provjerava se viskozimetrom (slika 2), a čvrstih penetrometrom (slika 3) Viskozoznost (konzistencija) fermentiranih mlijeka određuje specifičnost proizvoda, a ovisna je o upotrijebljenoj kulturi i samom tehnološkom postupku izrade, te zahtjevima potrošača.

d) izgled, okus, miris i tekstura (viskozitet) fermentiranih mlijeka prosuđuje se na osnovu senzoričke (organoleptičke) ocijene proizvoda koju ocjenjuju stručnjaci ocjenjivači.



Slika 2 – viskozimetar



Slika 3 - penetrometar

2.1. Mikrobiološke analize

Mikrobiološke analize fermentiranih mlijeka uključuju procjenu broja živih organizama iz mikrobni kultura, utvrđivanje organizama uzročnika kvarenja i prisustvo patogenih mikroorganizama.

2.1.1. Utvrđivanje broja živih mikroorganizama iz sastava čistih kultura i fermentiranih mlijeka

a) Standardni jogurt

Pojam standardni jogurt označava jogurt koji sadrži sojeve *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Važnost utvrđivanja broj živih organizama u finalnom proizvodu, a koji su sastavni dio mikrobni kultura, značajni su iz dva razloga:

- a) definirani su definicijom (FIL-IDF, FAO/WHO, 1990.g)
- b) na osnovu njihovog broja prosuđujemo ispravnost tehnološkog postupka.

Premala populaciona razina *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* u proizvodu može biti povezana s predugim trajanjem fermentacije, ali i izostankom razvitka karakterističnih aromatskih tvari u proizvodu. Suprotno, prevelika populaciona razina tih organizama uzrokuje previsoku kiselost, sinerezu čvrstog jogurta, ne izbalansiranost okusa i kvarenje uslijed kontinuiranog stvaranja kiseline tijekom čuvanja proizvoda.

Ukupan broj živih organizama iz sastava mikrobni kultura utvrđuje se na selektivnim hranilištima koja odvajaju rast jedne ili druge vrste ili razlikuju

obje vrste na istom hranilištu. **L-S selektivno hranilište** koji sadrži 10% obranog mlijeka u prahu i 2% trifeniltetrazolium klorida, primjer je selektivnog hranilišta za obje vrste organizama. Nakon inkubacije uzoraka na temperaturi od 42°C/48 h ukupan broj i omjer sojeva *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. prosuđuje se prema morfološkim razlikama poraslih kolonija. Kolonije laktobacila su crvene, nepravilnog oblika ("nazubljen rub"), okružene bijelom neprozirnom zonom, a u promjeru su veličine 1,0-1,05 mm. Streptokoki na L-S hranilištu rastu također kao crvene kolonije, ali su kolonije pravilnog okruglog ili ovalnog oblika te upola manje od 0,2-0,5 mm u odnosu na kolonije laktobacila. Nakon brojanja kolonija izračunava se relativni broj svake vrste pojedinačno. Ukupan broj organizama u finalnom proizvodu dobre kvalitete mora biti za svaku pojedinačnu vrstu $> 10^8$ /ml, a omjer podjednak (1:1). Ostala selektivna hranilišta i izgled kolonija prikazuju tablice 1 i 2:

Tablica 1.: Komercijalna selektivna hranilišta za brojanje *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* u mikrobnjoj kulturi i jogurtu

hranilište	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Lee's hranilište	žute kolonije	bijele kolonije
modificirani mliječni agar	male crvene kolonije	velike bijele kolonije
TYP-HGME agar	male svjetlo plave kolonije	velike tamnoplave kolonije
YGLP-YL agar	male briljantno bijele kolonije	velike bijele kolonije

Tablica 2.: Komercijalna selektivna hranilišta za brojanje ili *S. thermophilus* ili *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* u mikrobnjoj kulturi i jogurtu

hranilište	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>

Eugon	ne raste	raste
M17 (pH 6,8)	raste	ne raste
MRS (kiseli)	ne raste	raste
TGV+ Na-acetat	ne raste	raste

Nabrojena komercijalna hranilišta nisu selektivna za ostale termofilne bakterije mliječne kiseline. Važno je napomenuti da niti svi sojevi *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* neće pokazati tipične reakcije.

U praksi, za rutinsko prosuđivanje ukupnog broja i omjera streptokoka i laktobacila u mikrobnoj kulturi za jogurt i finalnom proizvodu se najčešće koristi brza metoda brojanja organizama na predmetnici pod mikroskopom. Postupak je slijedeći:

- a) uzorak se razrijedi u Ringerovoj otopini na razrjeđenje 10^{-1} ,
- b) razrjeđeni uzorak dobro se promiješa 30 s prije nego se izuzme količina uzorka od 0,01 ml,
- c) potom se uzorak nanese na predmetnicu u krugu od 1 cm^2 ,
- d) oboji, najčešće metilenskim modrilom,
- e) mikroskopira.

Za utvrđivanje ukupnog broja organizama u 1 ml dovoljno je brojati 10 nasumično odabranih polja. Međutim, radi tendencije streptokoka da se miješanjem uzorka razdvoje u manje jedinice, za dobar omjer streptokoki: laktobacili uzima se omjer 2,7: 1, kada je temperatura inkubacije 42°C .

b) Fermentirana mlijeka s mezofilnim sojevima bakterija mliječne kiseline

Hranilište **M17** ima bolje karakteristike za utvrđivanje mezofilnih bakterija mliječne kiseline u usporedbi s drugim hranilištima. Koristi se za kultivaciju, brojanje i razlikovanje laktoza pozitivnih od laktoza negativnih sojeva bakterija *Lc. lactis* subsp. *lactis* i subsp. *cremoris* te subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*.

Inkubacija uzoraka traje 48 sati na temperaturi od 30°C. Nakon inkubacije porasle kolonije laktoza pozitivnih laktokoka su bijele i promjera su 3-4 mm, suprotno laktoza negativni mutanti rastu u obliku malih bijelih kolonija promjera manjeg od 1 mm. Osim toga, M17 hranilištem može se uz dodatak β -glicerofosfata utvrditi fag infekcija. Infekcija fagima na M17 hranilištu prepoznaje se po pojavi neprozirnog velikog plaka na bakteriji domaćinu.

c) Fermentirana mlijeka s probiotičkim sojevima (Bakterije mliječne kiseline i Bifidobakterije)

U probiotičke sojeve koji se koriste u proizvodnji fermentiranih mlijeka ubrajamo: *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. gasseri*, *Lb. reuteri* i *Bifidobacterium* spp. Međutim, zbog slabog rasta tih sojeva u mlijeku u proizvodnji fermentiranih probiotičkih mlijeka uz probiotičke sojeve najčešće se koristi i sojevi *S. thermophilus* i *Lb. delbrueckii* supsp. *bulgaricus* Komercijalno na tržištu postoji svega nekoliko fermentiranih mlijeka koja sadržavaju samo sojeve *Lb. acidophilus* i /ili *Bifidobacterium* spp.

Zbog deklariranih terapijskih svojstava ta grupa proizvoda mora sadržavati visoku populacionu razinu probiotičkih sojeva. U trenutku konzumacije proizvoda, broj probiotičkih sojeva svake vrste mora biti $> 10^6$ /ml.

Izbor selektivnog hranilišta koje će omogućiti utvrđivanje broja živih probiotičkih sojeva, a komercijalno su dostupna na tržištu, ovisi o proizvođačkoj praksi stručnjaka mljekare. Naime, reakcija na određenom hranilištu je obično ovisna o korištenom soju, stoga ne postoji idealna analitička metoda, već se komercijalno dostupna hranilišta biraju prema iskustvu mljekarskih stručnjaka. Istovremeno, zbog objektivnosti u prosudbi i usporedivosti rezultata, znanstvenim istraživanjima postojeće metode i hranilišta neprestano se modificiraju. U razlikovanju jogurtne kulture od bifidobakterija i *Lb. acidophilus* u proizvodu, dobrim su se pokazala modificirana TPPYPB i RCPB i HHD hranilišta. S većim ili manjim uspjehom za utvrđivanje broja *Lb.*

acidophilus, kada se u proizvodu nalazi u mono kulturi koriste se MRS, X-Glu, EC i druga hranilišta. Također, broj *Bifidobacterium* spp. sojeva s većom ili manjom točnošću može se utvrditi na slijedećim hranilištima: NPNL, AMC, DP, TOS i dr.

3. Mikroorganizmi uzročnici kvarenja fermentiranih mlijeka

Niska pH vrijednost i visoka koncentracija mliječne kiseline koju sadrže fermentirana mlijeka idealna su sredina za rast kvasaca i plijesni. Iz tih razloga može se ustvrditi da su ti organizmi, a posebice **kvasci** glavni uzročnici kvarenja fermentiranih mlijeka. U proizvod dopijevaju naknadnom kontaminacijom i higijenski lošom kvalitetom voća i /ili drugih ingredijenata. Vrste kvasaca kao što su *Kluyveromyces marxianus* i *Saccharomyces* spp. koje su sposobne fermentirati laktozu i neke druge šećere uzrokuju plinovitu fermentaciju. U slučajevima pojave plinovite fermentacije uzrokovane kvascima nužno je odmah poboljšati higijenske uvjete proizvodnje. Pogreška se prepoznaje po izdignutom poklopcu, napuhnutoj ambalaži, a pri većim kontaminacijama ambalaža proizvoda može se raspuknuti. Vrste kvasaca kao što su *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulasporea*, *Trichosporon* su tzv . oksidativni kvasci koji rastu u proizvodu dok ima raspoloživog kisika. Pogreška se prepoznaje po rastu vlažnih, ravnih kolonija ili kvasci mogu rasti u formi gustog filma na površini proizvoda ili uz rubove ambalaže. Kontaminacija kvascima mora se redovito prati, a najbolje se dokazuje na **malt extract agaru** kome je dodana mliječna kiselina ili na **chloramphenicol agaru** (IDF standard 94B: 1990; Enumeration of Yeast and Mould).

Premda u usporedbi s kvascima, plijesni rjeđe kontaminiraju fermentirana mlijeka, kontaminacija plijesnima predstavlja značajan problem kada se proizvodi drže duže vrijeme na temperaturi oko 0°C prije prodaje. Rastu u zračnom prostoru između površine proizvoda i poklopca u formi vidljivih micela koje slične gustom pokrovu ili velikim gumbima.

4. Patogeni mikroorganizmi

Fermentirana mlijeka upravo radi niske pH vrijednosti i visoke koncentracije mliječne kiseline rijetko su povezana s patogenim organizmima. Infekcija patogenim organizmima ipak je moguća u slijedećim slučajevima:

- a) zbog tehnoloških pogrešaka kada je pH vrijednost proizvoda > 5 ,
- b) u proizvodnji slabo kiselih fermentiranih mlijeka,
- c) u slučajevima reinfekcije pasteriziranog mlijeka i/ili gotovih proizvoda,
- d) zbog kontaminiranih ingredijenata, voća itd.

Iz tih razloga preporuča se povremena kontrola fermentiranih mlijeka na prisustvo izrazito za čovjeka patogenih organizama: *E.coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus* spp. *S. aureus*.

5. Senzorička (organoleptička) ocjena kvalitete fermentiranih mlijeka

Senzoričkim ocjenjivanjem fermentiranih mlijeka prosuđuje se **izgled, boja, konzistencija, miris i okus** proizvoda na osnovu bodovnog sustava. U Hrvatskoj se koristi bodovni sustav od maksimalno 20 bodova. Ocjenjivački raspon za svako svojstvo je 0,25 bodova, što znači da se za svaku pogrešku od maksimalnog broja bodova za određeno svojstvo oduzima minimalno 0,25 bodova. Analiza je **subjektivna** procjena, zato senzoričko ocjenjivanje proizvoda ocjenjuje najmanje pet iskusnih stručnjaka ocjenjivača. Razlika u ocjeni bilo kojeg svojstva koja je veća od 1 prije konačne ocjene mora se uskladiti između ocjenjivača.

5.1. Termini koji određuju senzoričku kvalitetu fermentiranih mlijeka

Pogreške **izgleda** proizvoda opisuju se kao: prepunjeno, premalo napunjeno, skvrčen izgled, nejednolika površina, netipična boja, smeđa boja, mramoriran, zračni mjehurići, strane tvari, pljesniv, pjenušav, odvojene faze (npr. raspuknuti

gruš + izdvojena sirutka), sediment na dnu, slabo- nedovoljno homogenizirani sastojci.

Pogreške **boje** proizvoda opisuju se kao: atipična, previše ili premalo izražena, umjetna (kada se radi o fermentiranim proizvodima s dodacima voća, boja i sl.).

Pogreške **konzistencije** (viskoziteta) proizvoda opisuju se kao: grudičava, pahuljasta, nejednolika, ljepljiva, pregusta, previše tekuća, suha, želatinozna.

Pogreške **mirisa** proizvoda opisuju se kao: strani, atipični, bez mirisa, miris po kvascima, miris po plijesnima, zagoreni, miris po sladu.

Pogreške **okusa** proizvoda opisuju se kao: vodenast, bezličan, gorak, okus po kuhanom, uljast, kemijski okus, strani okus, sirast, okus po sladu, oksidirani okus, kiseli, oštar, mastan, nečist, presladak, pokvaren.

Primjer ocjenjivačke liste za fermentirana mlijeka koja se koristi u Hrvatskoj prikazuje tablica 3. i 4

Tablica 3 Ocjenjivači list za fermentirana mlijeka bez dodataka (primjer: čvrsti jogurt)

Svojstvo	maksimalni broj bodova	Postignuti broj bodova	Napomena
izgled	2	1,75	previše napunjen
boja	1	1	
konzistencija	3	2,5	previše mekana
miris	2	2	
okus	12	10	slabo izražena aroma po diacetilu
ukupno	20	17,25	

Tablica 4. Ocjenjivači list za fermentirana mlijeka s dodacima (primjer: voćni jogurt jagoda)

Svojstvo	maksimalni broj bodova	Postignuti broj bodova	Napomena
izgled	2	1	premalo napunjen, izdvojen stabilizator
boja	2	1,5	blijeda
konzistencija	3	2,25	previše rijetka
miris	3	2	neizražen, ne osjeti se miris jagode
okus	10	8	vodenast
ukupno	20	14,75	

Za ispit iz predmeta "Kontrola" uz ovaj tekst potrebna je i slijedeća literatura D. Sabadoš (II dopunjeno izdanje: J. Havranek i S. Kirin) poglavlja:

1. Ispitivanje vrhnja 125-137
2. Ispitivanje maslaca 144-160
3. Ispitivanje jogurta...166-169
4. Izračunavanja u proizvodnji jogurta 235-236