

lovič-a. Ovo nam govori da sirevi s dodatkom majom imaju u početku intenzivnije i brže zrenje, dok se sa 60. danom stepeni zrelosti približavaju.

Bjelančevine sira, kako ukupne, rastvorljive i njihov međusobni odnos su takođe pokazatelji zrenja sira. Analizirajući ove podatke došli smo do interesantnog podatka. Ogladni sir I, koji je po metodi Šilovič-a pokazivao najveći stepen zrenja, kod procenta rastvorljivosti je kroz cijeli period ispitivanja imao niže vrijednosti. Ovo nas upućuje na ranije izneseno mišljenje Inihov-a o odnosima rastvorljivih bjelančevina i pufernog svojstva sirnih čestica.

Najveći procenat rastvorljivosti tokom cijelog ogleda je bio kod uzoraka oglednog sira II, koji je u surutki imao 3 procenta mase. U ovom ogledu sirevi koji su zreli s 3 procenta mase imali su prema rastvorljivim bjelančevinama najintenzivnije zrenje. Na osnovu ovih rezultata eksperimenta možemo pretpostaviti neke činjenice i utvrditi pozitivni uticaj dodavanja mase kiselog mlijeka surutki u kojoj zrije travnički sir. Zrenje sira u surutki s majom ubrzava zrenje naročito kroz prve 4 sedmice, te bi se sir mogao iznositi ranije na tržište. Na kraju ogleda smo izvršili ocjenu sira koja je pokazala da su ogledni sirevi bili bolji po kvalitetu. Taj pozitivni rezultat ovih prvih eksperimenata nas navodi da taj rad nastavimo i proširimo s novim ispitivanjima.

#### Literatura:

1. Dozet, N. (1963.): Prilog poznavanju proizvodnje bijelih mekih sireva na području Bosne i Hercegovine, Radovi br. 14, Sarajevo;
2. Inihov, G. S. (1970.): Biohemija moloaka i moločnih produktov, Moskva.

## STANDARDIZACIJA KONTROLNIH LABORATORIJSKIH METODA U MLJEKARSTVU MOGUĆNOST PRIMJENE NOVIH RUTINSKIH METODA KOD ODREĐIVANJA MASTI I BJELANČEVINA MLJEKA\*

M. SOTLAR i A. ARSOV

Institut za mlekcarstvo, Biotehniška fakulteta Ljubljana

Određivanje količine makro-sastojaka mlijeka nužno je kako u uzgojno-seleksijskom radu, tako i u mljekarskoj industriji. Plaćanje otkupljenog mlijeka na osnovu količine masti dugogodišnja je praksa i posljedica raspoloživih, jednostavnih rutinskih metoda određivanja masti u mlijeku (Gerber, Babcock). Jednostrana kontrola kvalitete mlijeka ima svoju negativnu stranu, a to je u prvom redu nepridavanje značenja bjelančevinastoj komponenti mlijeka. U cilju poboljšanja i izjednačavanja kemijske kvalitete mlijeka, postavljen je zahtjev za što jednostavnijim i jeftinijim rutinskim metodama određivanja navedenih sastojaka mlijeka. Kako bi se moglo uvesti nove rutinske postupke kod nas, proučavali smo u laboratoriju Instituta za mlekcarstvo, Raziskovalna postaja Rodica, Biotehniške fakultete u Ljubljani, nove metode određivanja % masti i bjelančevina.

\* Referat sa IX Seminara za mljekarsku industriju, februar 1971, Tehnološki fakultet, Zagreb.

## I Određivanje količine masti s aparatom MILKO-TESTER MK II

Određivanje masti mlijeka u brojnim uzorcima otkupljenog mlijeka s pomoću volumetrijske metode po Gerberu, zamoran je i opasan rad. Iako daje metoda dosta točne rezultate, postaje zbog upotrebe opasne sumporne kiseline, sve manje poželjna kod tekuće laboratorijske analize mlijeka. Mogućnost elegantnog određivanja količine masti, uz neopasno i brzo dobivanje rezultata, bila je ostvarena razvojem danske sprave MILKO-TESTER (Foss Electric, Hillerød). Milko tester MK II najjednostavnija je izvedba u seriji Milko testera, koji djeluje po nefelometrijskom principu određivanja % masti. Utjecaj bjelancevinastih djelića, koji bi inače ometali određivanje masti, isključen je njihovim otapanjem u otopini reagenta (Versene). Sprava posreduje s pomoću fotometrijskih mjerenja utvrđene koncentracije mlječne masti, koje se očitavaju direktno u % na skali instrumenata. Ova je podijeljena od 0,0 do 9,2 % i omogućava točnost na 0,1% za mlijeko s 2 do 6% masti, dok su očitavanja kod većih količina masti točna samo još na 0,2%. Druga decimala rezultata ocjenjuje se, dok točnost ocjene zavisi o uvježbanosti i preciznosti osoblja, koje rukuje aparatom. Kako se u prosjeku nalazi masti u otkupljenom mlijeku ispod 6%, može se reći, da je za rutinski rad podjela skale MK II zadovoljavajuća. Primjena reagenta Versene otopine jednostavna je. Komponente NaOH, Titriplex ili Komplexon III dobivaju se na domaćem tržištu, samo je emulgator Tween 20 potrebno uvoziti (Serva-Heidelberg).

### Materijal i metodika rada

Određivanje % masti u sirovom miješanom mlijeku na osnovu brzog fotometrijskog postupka s MK II pratili smo sa slijedećih vidika:

1. reprodukcija rezultata određivanja % masti sa MK II;
2. suglasnost rezultata dobivenih sa MK II s rezultatima dobivenim po metodi Gerber;
3. utjecaj konzerviranja mlijeka na određivanje masti s MK II;
4. utjecaj temperiranja mlijeka prije analize fotometrijskim postupkom;
5. utjecaj kiselosti mlijeka na rad sprave.

### Reprodukcija rezultata fotometrijske metode

Preciznost metode, a time i točnost rezultata određivanja masti s MK II utvrđivali smo s pojedinačnim određivanjima % masti u istom mlijeku. Mlijeko se oduzimalo iz kanta i iz cisterna na prijemu mljekarskog pogona. U sirovom miješanom mlijeku istovremeno smo utvrđivali u više navrata i preciznost Gerberove metode (upotreba 11 ml pipete za mlijeko). Rezultati istraživanih serija pojedinačnih mjerenja iznijeti su u tablici 1.

Tablica 1

Određivanje	% masti $\bar{x}$ od $n = 20$	izvor uzorka	kolebanja % min	max	standardna devijacija %
Milko-tester Gerber	3,30	kanta	0,01 0,05	0,06 0,10	0,031 0,055
Milko-tester Gerber	3,60	cisterna	0,01 0,05	0,06 0,15	0,018 0,094
Milko-tester Gerber	5,30	kanta	0,04 0,05	0,13 0,25	0,067 0,104

Reprodukcija rezultata pojedinih određivanja u istom mlijeku primjetno je bolja kod fotometrijskog postupka određivanja količine masti. Istovremeno zabilježena su kod analize mlijeka s nižim % masti točnija određivanja na MK II nego u slučaju mlijeka s većom količinom masti. Slične rezultate pokazuju i istraživanja Hofferera 1967. i drugih.

Uspoređivanje rezultata određivanja % masti  
na osnovu obadviije metode

Prije ađustiranja MK II, koji je bio odmjeren u vrijednosti metode Röse — Gottlieb, ustanovili smo kod dvokratnog ponavljanja određivanja, u seriji 72 uzoraka sirovog miješanog mlijeka s 3,10 do 5,60% masti, u prosjeku za 0,15% veće rezultate, nego kod Gerberove metode. Nakon baždarenja sprave u suglasnosti s Gerberovom metodom (11 ml mlijeka) pokazala se kod 260 uzoraka sirovog miješanog mlijeka s 3,00 do 5,55% masti, potpuna suglasnost rezultata fotometrijskih mjerenja s određivanjima po Gerberu, u 22,70% slučajeva. Veća pozitivna odstupanja MK II ustanovljena su kod 26,54% uzoraka, dok su kod 50,76% uzoraka bili na Milko-testeru određeni u uspoređenju sa sumporno-kiselom metodom, niži rezultati.

Tablica 2

n — broj uzoraka	Broj uzoraka 260	Relativna vrijednost % 100,00
Suglasnost rezultata	59	22,69
Odstupanja s + oznakom		
0,01 do 0,05	46	17,69
0,06 do 0,10	19	7,32
0,11 do 0,15	3	1,15
0,16 do 0,20	1	0,38
Ukupno	69	26,54
Odstupanja s — oznakom		
0,01 do 0,05	85	32,69
0,06 do 0,10	39	15,00
0,11 do 0,15	4	1,54
0,16 do 0,20	4	1,54
Ukupno	132	50,77

Iz tablice 2 vidi se, da dolazi kod komparativnog određivanja masti u obje metode, kako pozitivna tako i negativna odstupanja. Prevladavanje negativnih odstupanja kod MK II pripisuje se upotrebi 11 ml pipete, upotrijebljene za mlijeko kod Gerberovog postupka. Poznato je, da daje volumetrijska metoda veće rezultate od gravimetrijske metode Röse-Gottlieb i to još češće kod porasta količine masti u mlijeku (Roeder, 1954). Uzimajući u obzir standardnu grešku određivanja po Gerberu  $\pm 0,10\%$ , nađeno je u cjelini samo 12 uzoraka (4,6%) kod kojih su na MK II određeni rezultati odstupali od rezultata po Gerberu u granicama od 0,11 do 0,20%. Time se povećava suglasnost rezultata obje metode na 95,39%. Statističko provjeravanje suglasnosti navedenih metoda vršeno je s pomoću diferencijske metode, M u d r a 1958. Signifikantnost razlika između srednjih vrijednosti istraživane serije uzoraka, određenih po objema metodama, ispitana je t-testom (Tablica 3).

Tablica 3

	Broj uzoraka	Srednja vrijednost
1. Gerber	260	3,768
2. Milko tester razlika greška razlike ( $\bar{Sd}$ )	260	3,754 0,014** 0,0035

\*\*  $p < 0,10 \%$

U prosjeku svih određivanja kod ukupno 260 uzoraka, utvrđena je među metodama razlika od 0,014% masti na uzorak, a opterećena je vrlo malom greškom 0,0035. Iako je kontrola s t-testom pokazala statističku signifikantnost kod  $p < 0,001$  to za praksu nije od bitnog značenja. Točnost fotometrijskog određivanja količine masti u uspoređenju s konvencionalnim određivanjem po Gerberu, označava izračunata standardna devijacija razlike  $Sd = 0,057$  posto. Rezultati pokazuju dobru suglasnost između navedenih metoda i poklapaju se s podacima Senfta 1965, Černe 1966, Schmidta 1966, kao i Bergmanna 1968. i napomenom Foss Electrica 1963. Tvrtka navodi za točnost metode  $Sd = 0,05$  do 0,06% (Brems 1966).

U slučaju upotrebe 11 ml pipete kod određivanja masti po Gerberu dolazi često do većih odstupanja između rezultata obaju postupka. Tako navodi tvrtka u tom slučaju mogućnost odstupanja rezultata od 0,10%. Kod rutinskog određivanja je kontrola jednokratnih paralelnih određivanja % masti u mlijeku primjenom obiju metoda, pokazala kod različitih analiza  $Sd$  od 0,08 do 0,10%.

S obzirom na to, da se iz već navedenih razloga i u svijetu kod Gerberove metode upotrebljava umjesto 11 ml pipete, pipeta od 10,75 ml, izvršili smo komparativna određivanja i u tom smislu. Navedena negativna odstupanja kod Milko-testera snižena su tako, da su sada kod upotrebe 10,75 ml pipete (Gerberova metoda) odstupanja između paralelnih jednokratnih određivanja po objema metodama u granicama od 0,03 do 0,05%, što se poklapa s navodima stranih autora.

#### Utjecaj konzerviranja uzoraka mlijeka za određivanje masti s MK II

U slučaju konzerviranja uzoraka mlijeka s  $K_2Cr_2O_7$  i  $HgCl_2$  nisu utvrđena bitna odstupanja u rezultatima određivanja masti. Ponovna određivanja nakon 3 do 5 dana u prosjeku su pokazala minimalne razlike, koje nisu bile veće od 0,01%.

#### Utjecaj temperature mlijeka na 40°C na određivanje masti s MK II

Zagrijavanje mlijeka prije analize na Milko-testeru pratili smo u normalnom i anormalnom mlijeku (mastitis). Utjecaj zagrijavanja na normalno mlijeko odražava se tek na ocijenjenom drugom decimalnom mjestu rezultata, razlika — 0,01% masti, što je posljedica promjene u volumenu oduzete količine uzorka. Kod 20 uzoraka mastitičnog, termolabilnog mlijeka analiziranih s MK II u odnosu na Gerberovu metodu utvrdili smo naprotiv značajno niže vrijednosti. Ekstremne slučajeve dajemo u tablici. 4.

Tablica 4

Whiteside test	Gerber % masti	MK II % masti	Razlika % masti
**	3,50	3,35	—0,15
***	3,90	3,70	—0,20
****	3,85	3,60	—0,25

### Utjecaj porasta kiselosti mlijeka na određivanje masti s MK II

Granicu normalnog rada aparata, u zavisnosti od kiselosti mlijeka, pratili smo s paralelnim određivanjem titracione kiselosti mlijeka i mjerenjem kiselosti s pomoću indikator papirića Stuphan M. Černa 1966. navodi kao granicu 11 SH<sup>0</sup>, dok mi smatramo na osnovu stečenog iskustva, da kiselost mlijeka ne smije prijeći granicu od 10 SH<sup>0</sup> ukoliko želimo nesmetani rad homogenizatora, odnosno cijele aparature. Posebno u ljetnim mjesecima nužno je konzerviranje uzoraka i egzaktna kontrola mlijeka.

### DISKUSIJA

Brzo fotometrijsko određivanje količine masti na Milko-testeru bilo je ispitano u brojnim institucijama u svijetu. Radovi Senfta 1965, Hännä 1966, Schmidta 1966, Hofferera 1967 i drugih potvrđuju dobru suglasnost fotometrijskog određivanja % masti s Gerberovom metodom. Suglasnost rezultata komparativnih određivanja masti nađena je u 92 do 96% slučajeva. Točnost fotometrijskog postupka i aparata kao cjeline, kod paralelnih određivanja masti u istom mlijeku, bolja je nego kod Gerberove metode. Dobra suglasnost rezultata MK II s rezultatima referencijske metode za uspoređenje (Gerber, Röse-Gottlieb) zavisi u prvom redu o pravilnom ađustiranju aparata na vrijednosti referencijske metode, koja je u pojedinim zemljama propisana za određivanje masti. Kod nas je Pravilnikom o kvaliteti mlijeka propisano određivanje masti po Greberu, a dozvoljena je i upotreba Milko-testera. U dubioznim slučajevima važi rezultat po Gerberu. Kako Pravilnik ne navodi točan postupak izvođenja Gerberove metode (pipeta od 11 ili 10,75 ml) bilo bi poželjno, da se što prije propiše Standard i to zbog bolje suglasnosti u rezultatima metoda: Röse-Gottlieb — Gerber — Milko-tester, s pipetom 10,75 ml.

Na osnovu utvrđenih rezultata i praktičnih iskustava može se zaključiti, da su prednosti fotometrijske metode određivanja masti s Milko-testerom MK II očite. Otpada opasan rad sa sumpornom kiselinom, nema teškoća s odstranjivanjem neagresivne mješavine mlijeka i Versena. U toku radnog vremena može jedna osoba analizirati do 600 uzoraka mlijeka. Svakako je potrebna redovita kontrola rada aparata s paralelnim određivanjem masti prema referencijskoj metodi, čime se povećava točnost i sigurnost određivanja % masti s Milko-testerom.

### II Rutinsko određivanje bjelančevina

Količinu mlječnih bjelančevina određuje se s pomoću različitih metoda, koje baziraju ili na određivanju pojedinih osobina, ili pojedinih grupa ili pak sastojaka bjelančevinaste molekule. S obzirom na raznolikost kriterijuma pojedinih metoda, varijacija u sastavu bjelančevina, varijacija u međusobnom odnosu pojedinih vrsta bjelančevina, kao i s obzirom na udio nebjelančevinastog

N, kojega obuhvaćaju pojedine analize, razumljivo je, da pojedine analize ne daju sasvim jednake podatke o stvarnoj količini bjelančevina u određenom uzorku mlijeka.

Kao referencijska metoda za određivanje bjelančevina u mlijeku priznata je danas Internacionalnim standardom (FIL/IDF 20-1962) klasična metoda po Kjeldahlu. Izbor brze rutinske metode vršio se komparacijom rezultata formolne i acidometrijske titracije, direktnog refraktometrijskog, spektrofotometrijskog i fluoro-metrijskog određivanja, destilacione Kofrcany metode i metoda, koje baziraju na biuret ili folin reakciji ili upotrebi različitih boja. Do nedavno bila je kao rutinski postupak najviše upotrebljavana formolna titracija (po Steinegger-u, modifikacija Schulz, Voss, Kay 1956), dok se u zadnje vrijeme sve više afirmiraju metode, s kojima se vrši određivanje bjelančevina na osnovu vezivanja određene boje. Prednost ove metodike je u postignutoj automatizaciji rada, što omogućava serijsko određivanje količine bjelančevina u velikom broju uzoraka mlijeka s pomoću jednostavnih aparatura, kao npr. PRO-O-MAT (Fucoma) i PRO-MILK (Foss Electric). Kao najupotrebljivije pokazale su se kisele boje amido crno 10 B i orange G, dok druge kao npr. orange 12, diacid green G. S., brilliant orange itd., u praksi nisu prodrle, iako su upotrebljive. Istraživanja Schobera i Hetzela 1956, Steinsholta 1958, te Raadsvelda 1959, dovela su do upotpunjenih modifikacija upotrebom amido crnog 10 B i do mehanizacije navedene kolorimetrijske metode, što garantira primjenu postupka u svakodnevnoj rutinskoj praksi određivanja bjelančevina mlijeka.

Metoda zasnovana je na osobini bjelančevina, da u određenim granicama pH ispod iso-električne točke, reagiraju s određenim kiselim bojama i stvaraju s njima netopiv kompleks bjelančevina — boja. Kako ova ne reagira s nebjelančevinastim N, ovim postupkom određuje se samo stvarna količina bjelančevina. Mlijeku dodaje se u višku boje s točno određenom koncentracijom (u svijetu: 4—6—8 gama/ml puferne otopine sa pH 2.35, dok u našem institutu upotrebljavamo koncentraciju 6,17 gama/ml puferne otopine sa pH 3,30, jer nam ova daje suglasnije rezultate u odnosu na referencijsku metodu). Mjerilo za količinu prisutnih bjelančevina predstavlja onaj dio dodane boje, koji sa strane bjelančevina nije bio apsorbiran. Količine neapsorbirane boje u bistroj tekućini određuje se foto-kolorimetrijski na PROT-O-MAT-u ili PRO-MILK-u. Dok iziskuje prvi pripremu bistre tekućine s pomoću centrifugiranja, dobiva se ova kod Pro-milka s pomoću filtracije. Strane laboratorije daju prednost filtracionom postupku, jer uslovljava manju mogućnost grešaka u postupku i sasvim bistru tekućinu, dok je kod centrifugiranja, odnosno mjerenja na Prot-o-matu preduslov savjestan rad, kako bi se izbjeglo subjektivne greške. Skale na Prot-o-matu i Pro-milku odmjerene su tako, da se očituje rezultat direktno u % bjelančevina, bez ikakvog preračunavanja.

#### Materijal i metodika rada

Reprodukcija rezultata i suglasnost pojedinih metoda određivanja bjelančevina u mlijeku sa standardnom, klasičnom metodom, vršene su na osnovi principa iznijetih kod određivanja mlječne masti. Rezultati amido crnog kolorimetrijskog određivanja bjelančevina (Prot-o-mat) uspoređeni su s rezultatima Kjeldahl metode. Kako se u praksi mnogo upotrebljava i formolna titracija, uključili smo u komparaciju i ovaj postupak.

## Reprodukcija rezultata amido crne metode

Za kontrolu točnosti amido crne metode 20 puta određivala se količina bjelančevine u istom uzorku mlijeka. Izračunata standardna devijacija  $S = \pm 0,037\%$  za pojedine determinacije na Prot-o-matu pokazuju nešto slabiju reprodukciju rezultata, nego što je to bio slučaj kod klasičnog amido crnog postupka, mjerenjem E vrijednosti (baždarna krivulja) na Unicam SP 600 fotometru, gdje je nađena vrijednost  $S = \pm 0.019\%$ . (Sotlar 1967).

### Uspoređivanje rezultata određivanja % bjelančevina na osnovu sve tri analize

Točnost rezultata za % bjelančevina dobivenom s kolorimetrijskim amido crnim postupkom (Prot-o-mat) ispitali smo komparativnim određivanjem bjelančevina s referencijskom metodom po Kjeldahlu i s formolnom titracijom. Izvršene su dvije serije osmatranja: U prvoj seriji s 35 uzoraka mlijeka, u kojima se kretala količina bjelančevina u granicama od 2,80 do 3,80%, izvedeno je komparativno određivanje bjelančevina po Kjeldahlu (i), formolnoj titraciji (ii) i amido crnom postupku (iii), dok je u drugoj seriji pokusa kod 114 uzoraka (s 2,70 do 4,30% bjelančevina) vršeno paralelno određivanje s formolnom titracijom i amido crnim postupkom. Uzorci uzimani su na rampi mljekarskog pogona i predstavljaju miješano mlijeko stada sivo-smeđih i jersey krava. Statistička obrada rezultata s pomoću analize varijance pokazala je, da same metode ne utječu bitno na variranje rezultata (M u d r a 1958). U tablici 5 navedena je šema AV iz koje se vide signifikantne razlike samo za uzorke, što je posljedica diskontinuiranog značenja posmatranja — to jest slučajnog izbora uzoraka mlijeka.

Tablica 5

Izvor variance	Br. stupnjeva slobodne SP	Suma kvadrata VKO	Ocjene varijance $S^2$	F	F <sub>0,01</sub>	F <sub>0,05</sub>
Metode	2	0,0600	0,030	1,76	3,13	4,92
Uzorci	34	4,0022	0,117	10,40**	1,62	1,98
Greška	68	1,1818	0,017			
Ukupno	104	5,2440				

Suglasnost rezultata brzih rutinskih metoda to jest formolne titracije (ii) i amido crnog postupka (iii) s rezultatima referencijske Kjeldahlove (i) metode kao i međusobne odnose metoda (ii) i (iii) provjerili smo s pomoću diferencijske metode (metode parova — B l e j e c 1967). U tablici 6 navedena su standardna odstupanja razlika i srednje greške razlika za pojedina komparativna određivanja.

Tablica 6

Metode	Broj promatranja	Standardno odstupanje razlike Sd	Srednje greške razlike Sd
Kj (i) — FT (ii)	35	0,096	0,016
Kj (i) — AM (iii)	35	0,031	0,005
FT (ii) — AM (iii)	35	0,061	0,010
FT (ii) — AM (iii)	114	0,075	0,007

U prosjeku svih određivanja ( $n = 35$ ) utvrđena razlika između Kjeldahlove metode i amido crnog postupka, bila je  $\bar{x} = + 0,01\%$ , te između Kjeldahlove metode i formolne titracije,  $\bar{x} = + 0,04\%$  (srednje vrijednosti za i, ii, iii; 3,2288%, 3,2328%, 3,2388%). Iako je apsolutna i prosječna razlika, promatrano u cjelini, između vrijednosti dobivena po Kjeldahlu odnosno s formolnom titracijom niža u odnosu na razliku između postupaka (i) te (iii), vidi se iz tablice 6, da je kolorimetrijsko određivanje bjelančevina u boljoj suglasnosti s referencijskom metodom; Sd je niži  $-0,031 : 0,096$ . Dobiveni rezultati u suglasnosti su s navodima Steinsholta 1958, Posthumusa 1961, Eissesa 1961, Wanderzanta 1961, Havea 1962, 1969, te drugih koji utvrđuju dobru suglasnost rezultata kolorimetrijske metode s rezultatima po Kjeldahlu: Sd od 0,03% do 0,05% (ISO/TC, 34/SC 5, 1969).

## DISKUSIJA

Na osnovu vlastitih rezultata kao i rezultata navedenih u literaturi može se kolorimetrijsko određivanje bjelančevina u mlijeku s amido crnim postupkom preporučiti za rutinsko određivanje bjelančevina u miješanom mlijeku, svim većim laboratorijima s dovoljnim brojem dnevnih analiza. Smatramo, da je za našu praksu u prvom redu potrebna standardizacija postupka za određivanje bjelančevina u otkupljenom miješanom mlijeku pojedinih proizvođača, pa stoga ne dolaze do izražaja greške, koje navode Dolby 1964, Hänni i Schmid t 1966. Ovi autori naime tvrde, da daje metoda, kod određivanja bjelančevina u mlijeku pojedinih životinja i to u početnoj i zaključnoj fazi laktacije, veća odstupanja s obzirom na Kjeldahlovu metodu. Može se navesti i Van der Havea 1956, 1969, koji ukazuje na slične poteškoće, ali istovremeno i ističe činjenicu kako je s istom greškom, samo u manjem opsegu, opterećena i metoda po Kjeldahlu. Slična zapažanja utvrđena su i u našem institutu. Treba podvući činjenicu, da je za povećanje sigurnosti rezultata, potrebna kontrola svake novoprimitljene šarže otopine boje, ili određivanjem standardne ekstinkcijske vrijednosti (u nas na Unicam SP 600, kod valne dužine 615 m, kod dvostrukog razrjeđenja tj. 5 : 200.10 : 10, čiste otopine, je  $E = 0.559$ ), ili komparativnim određivanjem bjelančevina po Kjeldahlu.

U vezi s rutinskim određivanjem količine bjelančevina s pomoću formolne titracije, kojom će se barem manji laboratoriji još neko vrijeme služiti, preporučuje se upotreba standardne laboratorijske opreme (bireta, kip-automati, svjetlosno tijelo). Iako ova metoda daje dosta suglasne rezultate s referencijskom metodom, u dosta većoj mjeri podvrgnuta je subjektivnim greškama (određivanje nijansa kod titracija) pa dajemo zbog toga prednost kolorimetrijskom amido crnom postupku određivanja bjelančevina u mlijeku.

### Najvažniji izvori literature:

- Bergmann, J., Giger, W. (1968.): *Milchwiss.*, 23, 12, 731—734.  
Černa, E., Pisecky, J. (1966.): *Prumysl. Potravín*, 17, 298—300.  
Dolby, R. M. (1961.): *J. Dairy Res.*, 28, 43—55.  
Have, A. J. van der (1969.): *ISO/TC 34/SC 5*.  
Raadsveld, C. W. (1959.): *XV. Inter. Dairy Congress*, 3, 1638—1645.  
Senft, B. sa saradnicima (1965.): *Milchwiss.* 20, 11, 594—596.  
Schulz, M. E. sa saradnicima (1956.): *XIV. Inter. Dairy Congress*, 3, 540—549.  
Sotlar, M. (1967.): *Mljekarstvo*, XVII, 1, 4—13.