

# LABORATÓRNA TECHNIKA

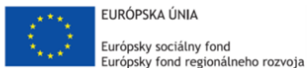
Vyšetrenie potravín živočíšneho pôvodu



Stanovenie cudzorodých látok v mlieku,  
dôkaz pasterizácie mlieka

## NÁRODNÝ PROJEKT

„Zlepšenie stredného odborného školstva v Prešovskom samosprávnom kraji“



„Tento projekt sa realizuje vďaka podpore z Európskeho sociálneho fondu a Európskeho fondu regionálneho rozvoja v rámci operačného programu Ľudské zdroje“

Ing. Martina Lachová



# OBSAH

## 1 Stanovenie cudzorodých látok v mlieku

- **1.1 Skúška na dusičnany**
- **1.2 Dôkaz konzervovania mlieka**
  - 1.2.1 Skúška pridania peroxidu vodíka
  - 1.2.2 Rýchly test peroxidu vodíka BALLYA
  - 1.2.3 Skúška pridania uhličitanu sodného a hydrogénuhličitanu sodného
- **1.3 Testy na stanovenie inhibičných látok v mlieku**
  - 1.3.1 Rýchle testy MilkSafe™

## 2 Reakcie na dôkaz pasterizácie mlieka

- **2.1 Peroxidázový test**
  - **2.2 Fosfatázový test**
    - 2.2.1 Fosfatest s indikačným papierikom
-

# Stanovenie cudzorodých látok v mlieku

- ➔ Za cudzorodé látky v mlieku sa považujú ***prídavné látky, technologické pomocné látky a kontaminanty***.
- ➔ Medzi najčastejšie používané *prídavné látky a technologicky pomocné látky* pri výrobe a spracovaní mlieka patria: farbivá, chemické konzervačné látky, kyseliny, zásady, soli, potravinárske enzýmy, chuťové a aromatické látky, emulgátory, stabilizátory, zahusťovadlá a iné.
- ➔ *Kontaminanty* zahŕňajú: chemické prvky, dusičnany, polyaromatické uhľovodíky, polychlorované bifenyly, reziduá pesticídov, veterinárnych liečiv a endogénne cudzorodé látky.

# Použitie cudzorodých látok

- ➔ zlepšenie podmienok výroby, spracovania, úpravy a uchovania potravín,
- ➔ zníženie zdravotného rizika pre ľudí,
- ➔ zvýšenie odolnosti proti fyzikálnym, chemickým a biologickým zmenám,
- ➔ zlepšenie podmienok výroby, spracovania, úpravy a uchovania potravín,
- ➔ zníženie zdravotného rizika pre ľudí,
- ➔ zvýšenie odolnosti proti fyzikálnym, chemickým a biologickým zmenám,
- ➔ predĺženie trvanlivosti,
- ➔ zachovanie výživovej hodnoty,
- ➔ zlepšenie organoleptických vlastností pri zachovaní charakteristiky, štandardnosti a kvality.



- ❖ Ktoré cudzorodé látky sa môžu vyskytnúť v mlieku a mliečnych výrobkoch?
- ❖ Uveďte, ktoré prídavné látky a technologicky pomocné látky sa používajú pri výrobe a spracovaní mlieka a mliečnych výrobkoch?
- ❖ Z akého dôvodu sa pridávajú cudzorodé látky do mlieka a mliečnych výrobkoch.

# Skúška na dusičnany



# Skúška na dusičnany

Pôsobením dusičnanov nachádzajúcich sa v mlieku vznikajú po pridaní niektorých organických látok farebné reakcie.

**Pomôcky:** skúmavka, mlieko, roztok difenylamínu v kyseline sírovej, zrážací roztok (10% kyselina octová bez dusičnanov).

**Príprava činidla:** - k 0,085 g difenylamínu sa pridá 190 ml kyseliny sírovej zriedenej 1:3,  
- pri premiešaní sa doplní koncentrovanou kyselinou sírovou s hustotou  $1,84 \text{ g.m}^{-3}$  na 500 ml (pri  $20^\circ\text{C}$ ).



# Skúška na dusičnany

## Postup

1. Do skúmavky napipetujeme 5 ml mlieka.
2. Na vzorku v skúmavke navrstvíme 5 ml difenylamínového činidla tak, aby sa roztoky nezmiešali.
3. Vzorku posudzujeme.

## Vyhodnotenie

Ak sa v 1 litri mlieka nachádza aspoň 5 mg dusičnanov ( $\text{NO}_3$ ), vznikne do pol hodiny na rozhraní kvapalín ***modrý krúžok***.

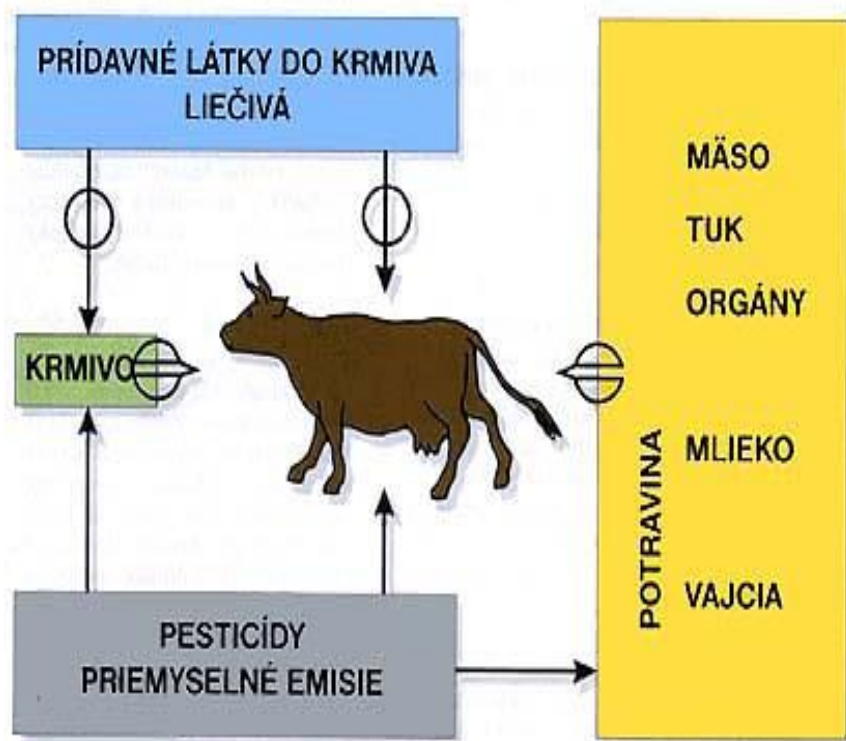


# Skúška na dusičnany

## Zapamätajte si!

Prídavok  $\text{NO}_3^-$  do krmiva alebo intenzívneho hnojenia dusíkatými priemyselnými hnojivami zvyšuje jeho obsah v krvi a v mlieku dojnic.

Nadmerné zvýšenie obsahu  $\text{NO}_3^-$  v krmovinách zhoršuje technologickú akosť mlieka.





- ❖ Ako sa prejavuje prítomnosť dusičnanov v mlieku po pridaní niektorých organických látok?
- ❖ Popíšte postup skúšky mlieka na dusičnany.
- ❖ Akým spôsobom sa kontaminuje mlieko dusičnanmi?

# Dôkaz konzervovania mlieka

- ➔ Skúška pridania peroxidu vodíka
- ➔ Rýchly test peroxidu vodíka BALLYA
- ➔ Skúška pridania uhličitanu sodného a hydrogénuhličitanu sodného



# Dôkaz konzervovania mlieka

## Skúška peroxidu vodíka

- ➔ Analýza peroxidu vodíka v mlieku určuje prítomnosť peroxidu vodíka a chlóru a ďalších oxidačných činidiel, ktoré sa do mlieka zámerne pridávajú.
- ➔ Prídavok 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  do mlieka v množstve 0,05 – 1% konzervuje mlieko 24 hodín uvoľňovaním aktívneho kyslíka enzýmom peroxidáza.



Laboratórna analýza mlieka na peroxid vodíka

# Dôkaz konzervovania mlieka

## Skúška peroxidu vodíka s parafenyléndiamínom

### Pomôcky:

- ✓ skúmavka,
- ✓ pipety,
- ✓ mlieko,
- ✓ čerstvo pripravený roztok parafenyléndiamínu.

### Postup

1. K 5 ml skúšaného mlieka v skúmavke pridáme 3 kvapky 4% etanolového roztoku parafenyléndiamínu.
2. Po 2 minútach posudzujeme.

# Dôkaz konzervovania mlieka

## Skúška peroxidu vodíka s parafenyléndiamínom

### Vyhodnotenie

Prítomnosť peroxidu vodíka v mlieku sa prejaví *sivým až modrým sfarbením* mlieka v skúmavke.

### Zaujímavosť

V niektorých krajinách je peroxid vodíka podmiennečne povolené pridávať do konzumného mlieka. Svetová zdravotnícka organizácia a Organizácia pre výživu a poľnohospodárstvo tiež nie sú podmiennečne proti použitiu peroxidu vodíka.

# Dôkaz konzervovania mlieka

## Rýchly test peroxidu vodíka BALLYA

Rýchly test peroxidu vodíka pre mlieko je založený na imunochromatografii koloidného zlata na detekciu surového, zmiešaného kravského mlieka pri stanovenej tolerancii alebo bezpečných hladinách.



Novinky

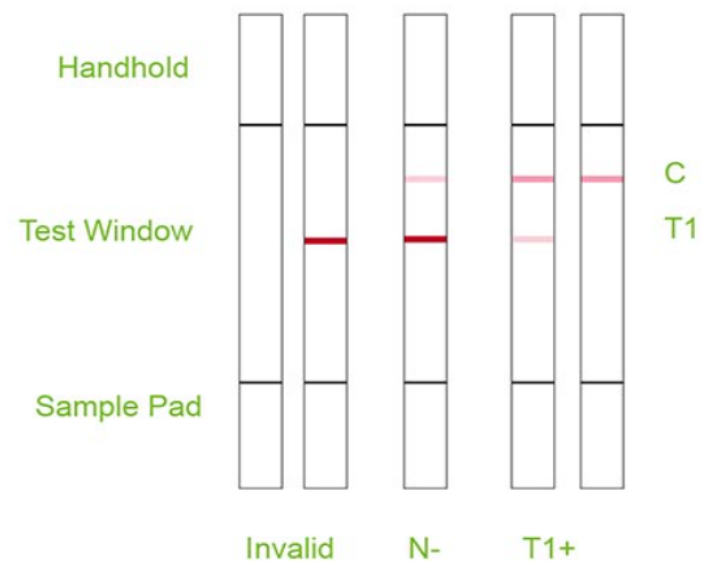
<https://ballyabio.com/sk/hydrogen-peroxide-test-kit-for-milk/>



# Dôkaz konzervovania mlieka

## Rýchly test peroxidu vodíka BALLYA

T/C Comparison	Interpretation	Results
T>C	Negative	No residues or residues lower than LOD regulation
T<C or T Invisible	Positive	Residues exceed LOD regulation



Ukážka príkladov vyhodnotenia

# Dôkaz konzervovania mlieka

Pridaním uhličitanu sodného a hydrogénuhličitanu sodného

Uhličitan sodný a hydrogénuhličitan sodný po pridaní do mlieka spôsobuje jeho neutralizáciu a predlžuje jeho trvanlivosť.

Skúška sa vykonáva s brómtymolovou modrou.

## Pomôcky:

- ✓ skúmavky,
- ✓ pipety,
- ✓ mlieko,
- ✓ brómtymolová modrá.

# Dôkaz konzervovania mlieka

Pridaním uhličitanu sodného a hydrogénuhličitanu sodného

## Postup

1. K 5 ml mlieka v skúmavke opatrne po stenách pridáme 5 kvapiek brómtymolovej modrej.
2. Skúmavkou zakrúžime tak, aby sa tekutiny nezmiešali.
3. Po 2 minútach posudzujeme farbu prstenca pri dopadajúcom dennom svetle.

## Výsledok

*V negatívnom prípade* sa vytvorí **prstenec žltej farby**.  
*V pozitívnom prípade* sa vytvorí **prstenec žltozelený až modrozelený**.

Podľa množstva pridanej látky možno orientačne určiť aj množstvo konzervačnej zložky:

0,03%.....	žltozelené sfarbenie,
0,05%.....	svetlozelené sfarbenie,
0,7 – 0,1%.....	zelené sfarbenie,
0,2%.....	tmavozelené sfarbenie,
0,3%.....	modrozelené sfarbenie.

# Dôkaz konzervovania mlieka

Pridaním uhličitanu sódného a hydrogénuhličitanu sódného

Určité konzervačné látky sa do mlieka pridávajú úmyselne v nehygienických podmienkach, aby zavádzali ľudí, aby sa predĺžila životnosť, alebo aby sa kvalita degradovaného mlieka preukázala ako dobrá. Podľa právnych predpisov je to zakázané, ale nedá sa tomu zabrániť. Takéto prísady sú škodlivé pre zdravie ľudí.



- ❖ Akými skúškami môžeme dokázať prítomnosť konzervačných látok v mlieku?
- ❖ Je dovolené pridávať do mlieka konzervačné látky? Zdôvodnite.
- ❖ Popíšte postup rýchleho testu na dôkaz peroxidu vodíka BALLYA.

# Testy na stanovenie inhibičných látok v mlieku

➔ Rýchle testy MilkSafe™



# Testy na stanovenie inhibičných látok v mlieku

- ➔ Mliekarne sú si viac vedomé nebezpečia rezíduí antibiotík v mlieku, spotrebitelia tlačia na čistejšie mliekarenské výrobky a rozširujú sa požiadavky zákonodarcov na celosvetovú implementáciu detekčných systémov na antibiotiká.
- ➔ Z dôvodu vysokých sankcií sa rozšíril aj počet používateľov týchto testov v radoch producentov mlieka.
- ➔ Aby sa mliekarenský priemysel (tak mliekarne ako i producenti mliekarní) chránil pred negatívnymi účinkami rezíduí antibiotík v mlieku trh ponúka sortiment rýchlych receptorových testov MilkSafe™ a mikrobiálny test CMT+ (predtým Copan).



# Testy na stanovenie inhibičných látok v mlieku



Sortiment pre rýchle stanovenie inhibičných látok v mlieku

# Testy na stanovenie inhibičných látok v mlieku

## Rýchle testy MilkSafe™

- ➔ Výhodou rýchlych testov MilkSage™ sú jednoduché použitie, jednoznačný výsledkov, archivácia výsledkov a **nižšie náklady** na samotné testovanie.
- ➔ Pre spoľahlivé vykonanie testu odporúčame použiť inkubátory špeciálne vyrobené pre tieto testy, nakoľko dodržanie presnej teploty je jedinou podmienkou pre dosiahnutie spoľahlivých výsledkov.
- ➔ Výsledky je možné vyhodnotiť vizuálne alebo pomocou čítačiek (laboratórna s integrovanou tlačiarňou alebo prenosná).

# Testy na stanovenie inhibičných látok v mlieku

## Rýchle testy MilkSafe™

### Verzie:

**MilkSafe™ 2BC** (kombinovaný test na betalaktámy, ceftiofur a cefalexín), citlivosti sú v limitoch MRL EÚ na všetky liečivá zo skupiny  $\beta$ -laktámových antibiotík, s výnimkou liečiva cefazolin (100ppb). Produkt bol validovaný laboratóriami ILVO v Belgicku.

**MilkSafe™ 3BTC** (kombinovaný test na betalaktámy, ceftiofur, cefalexín + tetracyklíny). Citlivosti rovnaké ako verzia 2BC, pričom na ďalšom prúžku detekuje aj liečivá s tetracyklínovej rady. Produkt bol validovaný laboratóriami ILVO v Belgicku.

**MilkSafe™ 3BTS** (kombinovaný test na betalaktámy, ceftiofur, tetracyklíny + sulfonamidy).

**MilkSafe™ 3BTSQ** (kombinovaný test na betalaktámy, tetracyklíny + sulfonamidy, chynolóny).

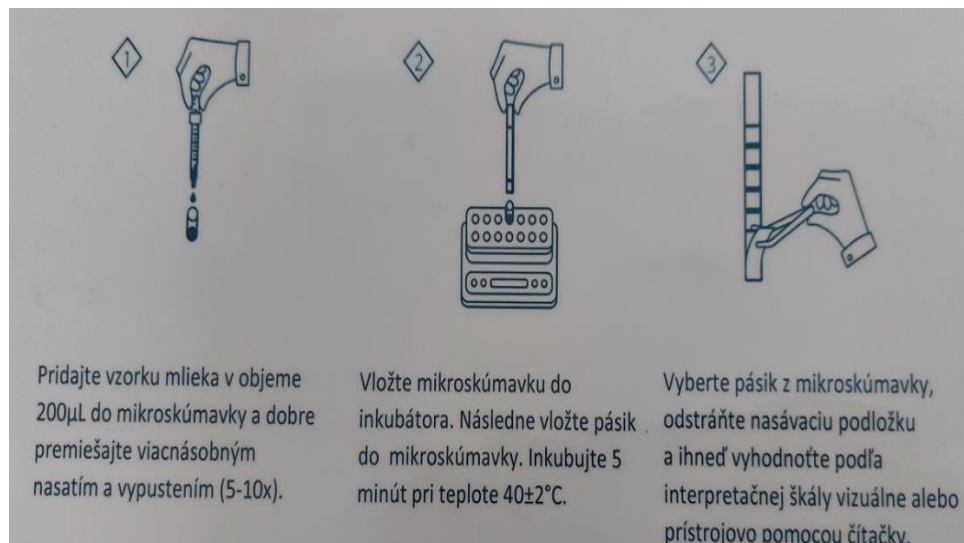
**MilkSafe™ AflaM1** detekuje aflatoxín M1 v mlieku už za 10 minút v rozsahu 15 až 150ppb.



Inkubátor pre rýchle testy

# Testy na stanovenie inhibičných látok v mlieku

Rýchle testy MilkSafe™



Testovací postup testov MilkSafe™

➔ Video postup:

<http://www.syridlo.sk/produkty/testy-na-stanovovanie-inhibicnych-latok-v-mlieku-rychle-milksafetm-a-mikrobiaalne-cmt/>

➔ Informácie o trendoch a novinkách:

<http://www.improvingfood.com/cs/>

# Testy na stanovenie inhibičných látok v mlieku

## Rýchle testy MilkSafe™

- ➔ Odporúča sa vytemperovať tubu s pásikmi na izbovú teplotu po dobu minimálne 10 minút.
- ➔ Používať skúmavky a pásiky z rovnakého balenia, nezamieňať ich medzi sebou.
- ➔ Odstrániť uzáver z mikroskúmaviek bezprostredne pred testovaním, nakoľko sú citlivé na vlhkosť a kontamináciu.
- ➔ Nedotýkať sa rukami dolného konca pásika (v časti nasávacej podložky a v časti zobrazujúcej výsledky), vždy manipulovať s pásikmi iba držaním za horný koniec (s nápisom MilkSafe™).
- ➔ V prípade výsledkov na hranici detekčného limitu testov výsledky odčítať do 5 minút.
- ➔ V prípade testovania vzorky s vyšším obsahom tuku predĺžiť čas inkubácie o 1 minútu, nakoľko tuk spomaľuje migráciu po pásiku.

# Testy na stanovenie inhibičných látok v mlieku

## Rýchle testy MilkSafe™

**Interpretácia výsledkov testu MilkSafe™ 3BTC**  
(betalaktámy, cefalexín, ceftiofur, tetracyklíny)

Control line  
Beta-lactam  
Cephalaxin  
Ceftiofur  
Tetracyclines

Invalid    Beta-lactam positive    Cephalaxin positive    Ceftiofur positive    Tetracyclines positive    Negative

Absorbing pad  
Sample pad

**Vždy porovnávajte intenzitu testovacích prúžkov (Tetracyclines, Ceftiofur, Cephalaxin, Beta-lactam) iba voči referenčnému prúžku (Control line, úplne najvrchnejší), nie medzi sebou navzájom!**

**Po skončení testovania ihneď odstráňte absorpčnú podložku (Sample pad) na spodnom konci pásika! Takto je pásik pripravený na dlhodobú archiváciu.**

Príklady vyhodnotenia výsledkov testu MilkSafe™





- ◇ ? Vysvetlite, z akého dôvodu sa stanovujú inhibičné látky v mlieku.
- ◇ ? Popíšte postup pri stanovení inhibičných látok v mlieku.



# Reakcie na dôkaz pasterizácie mlieka

➔ Peroxidázový test

➔ Fosfatázový test

➔ Fosfatest s indikačným papierikom



# REAKCIE NA DÔKAZ PASTERIZÁCIE MLIEKA

Metódy na dôkaz pasterizácie, prípadne sterilizácie mlieka alebo mliečnych výrobkov sú všeobecne založené na:

- ➔ tepelnej inaktivácii natívnych enzýmov – na ich aktivite v surovom a nedostatočne zahriatom mlieku (peroxidáza, amyláza, fosfatáza),
- ➔ zmenách fyzikálnych alebo fyzikálno-chemických vlastností mlieka zapríčinených zahrevom,
- ➔ iných zmenách vlastnosti mlieka alebo jeho zložiek zapríčinených zahrevom (napr. deformácia tukových guľôčok, obsah CO<sub>2</sub> a pod.).

Pre potreby rýchleho laboratórneho dôkazu zahrevu mlieka a mliečnych výrobkov sa používajú najmä metódy založené na spomenutej tepelnej inaktivácii niektorých natívnych enzýmov, najmä enzýmov peroxidázy a fosfatázy.

---

# Peroxidázový test

- ➔ Dôkaz pasterizácie mlieka sa robí **Storchovou metódou**.
- ➔ Zakladá sa na princípe, že zohriatím mlieka na 80°C sa ničí enzým peroxidáza obsiahnutý v čerstvom mlieku.
- ➔ Deaktiváciou enzýmu sa zabráni uvoľneniu kyslíka z pridaného peroxidu vodíka.
- ➔ Po pridaní paraferenyléndiamínu a peroxidu vodíka k surovému mlieku (prípadne nedostatočne zohriatemu) sa účinkom peroxidázy uvoľní z peroxidu kyslík, ktorý reaguje s paraferenyléndiamínom a vzniká modré sfarbenie.

# Peroxidázový test

## Pomôcky:

- ✓ skúmavka,
- ✓ pipeta
- ✓ 1% roztok  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,
- ✓ parafenyléndiamín,
- ✓ kremenný piesok – zmes v pomere 1:1,
- ✓ mlieko.

## Postup

1. Do skúmavky prelejeme 5 ml mlieka.
2. Pridáme na špičku noža zmes parafenyléndiamínu s kremenným pieskom a premiešame.
3. Pridáme 1 – 2 kvapky 1% roztoku peroxidu vodíka, znova premiešame.
4. Po 2 minútach hodnotíme zafarbenie.

# Peroxidázový test

## Vyhodnotenie:

- tmavomodré zafarbenie  
- surové mlieko,
- sivomodré zafarbenie  
- mlieko zahriate na menej ako 80°C,
- biele, veľmi slabosivé zafarbenie  
- mlieko pasterizované (viac ako 80°C).



Dôkaz pasterizácie mlieka Strochovou metódou

# Fosfatázový test

- ➔ Enzým fosfatáza je pomerne citlivý na teplotu.
- ➔ Dáva kvantitatívne výsledky, čo umožňuje dokonca rozlíšiť aj malé rozdiely v pasterizácii.
- ➔ Mliečna fosfatáza sa inaktivuje:
  - pri 63°C počas 30 minút (dlhodobá pasterizácia),
  - alebo pri 72°C počas 15 – 16 sekúnd (krátkodobá pasterizácia).

# Fosfatázový test

**Princíp** dôkazu pasterizácie mlieka na základe prítomnosti aktivity enzýmu fosfatázy spočíva na farebnej reakcii spôsobenej účinkom fosfatázy na estery kyseliny fosforečnej.

Norma pre dôkaz záhrevu mlieka na 71 až 74°C krátkodobo alebo 62 až 65°C počas 30 minút, predpisuje metódu založenú na princípe, že enzým fosfatázy odštiepuje z fenylesteru kyseliny fosforečnej fenol, ktorého prítomnosť sa následne zistí farebnou reakciou.



# Fosfatázový test

## Pomôcky:

- ✓ pipeta,
- ✓ skúmavky,
- ✓ vodný kúpeľ,
- ✓ voda,
- ✓ Laktognost I, II a III,
- ✓ mlieko.

## Postup

1. Do skúmavky prelejeme 10 ml teplej vody (37 - 39°C) a pridáme 1 tabletu Laktognost I a II.
2. Po rozpustení tabliet, pridáme 1 ml mlieka a dobre premiešame.
3. 10 minút zohrievame pri 37°C.
4. Do roztoku sa pridá 1 g Laktognostu III.
5. Po 10 minútach roztok vyberieme z vodného kúpeľa a premiešame.
6. Po 10 – 15 minútach posudzujeme.

# Fosfatázový test

## Vyhodnotenie

Vznik modrého až modrosivého zafarbenia je dôkazom nedostatočnej pasterizácie.

# Fosfatázový test

Fosfates s indikačným papierikom

## Využitie fosfatestu

- ➔ na zistenie nízkej (šetrnej) pasterizácie mlieka,
- ➔ na rozlíšenie prídavku nepasterizovaného mlieka do mlieka pasterizovaného.

## Postup

1. Reakčné pásiky vyberieme z ochranného polyetylénového (PE) vrečka a **ponoríme ich na 2-3 sekundy do vzorky mlieka.**
2. Pásiky následne vložíme späť do PE vrečka a necháme ich **inkubovať 1 hodinu pri teplote 37 °C.**
3. Výsledok vyhodnotíme.

# Fosfatázový test

## Fosfates s indikačným papierikom

### Vyhodnotenie

Výsledok testu je založený na základe prítomnosti alebo neprítomnosti enzýmu fosfatáza v mlieku.

Test sa vyhodnotí na základe zafarbenia od *bielej farby -pasterizované mlieko,*

po intenzívne žltú - nepasterizované mlieko.

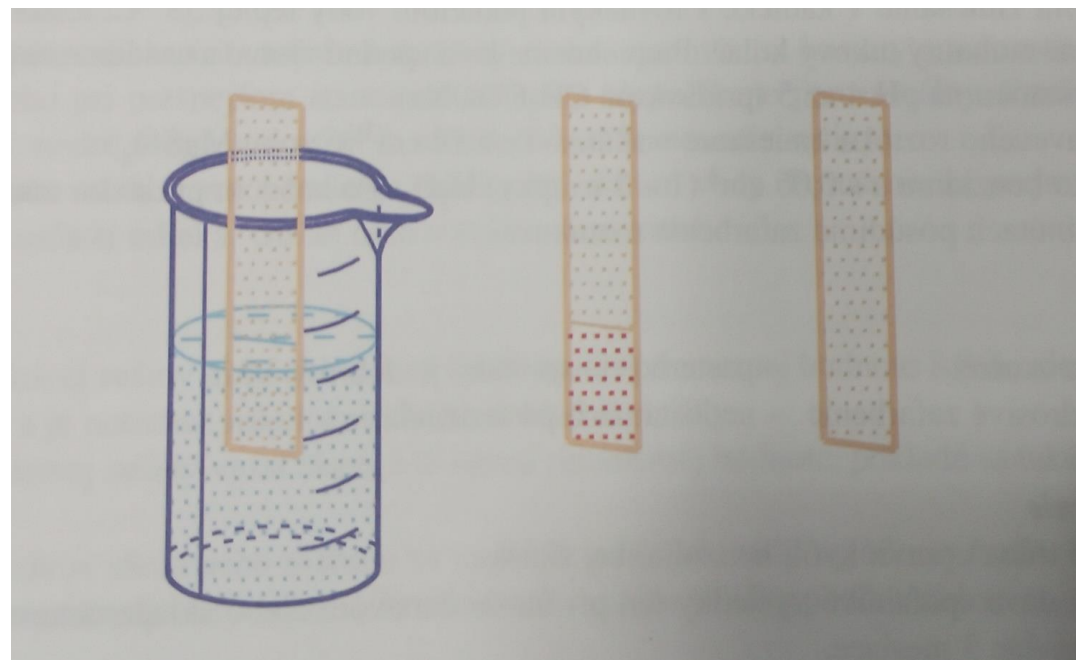
**Intenzita zafarbenia závisí aj od obsahu tuku** v mlieku, farba pri mlieku s obsahom tuku nad 4% je vo všeobecnosti intenzívnejšia ako napr. mlieko s obsahom tuku pod 2 %.

# Fosfatázový test

## Fosfates s indikačním papierikom



Fosfatázový test



Príklad použitia fosfatázového testu

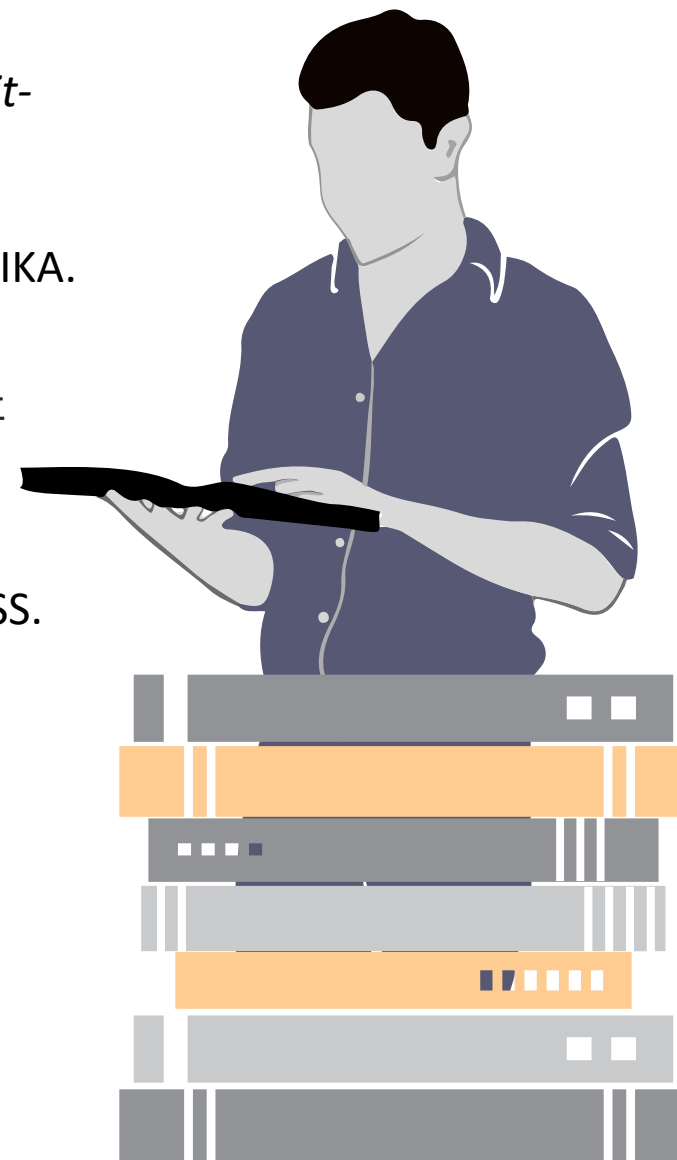


- ❖ Vymenujte princípy, na ktorých sú založené metódy dôkazu pasterizácie/sterilizácie mlieka.
- ❖ Zdôvodnite, na akom princípe sa zakladá Storchova metóda dôkazu pasterizácie.
- ❖ Aké sfarbenie mlieka je dôkazom nedostatočnej pasterizácie mlieka?
- ❖ Na aký účel používame Fosfatest?



# Bibliografia

1. BALLYA. (15. Apríl 2023). <https://ballyabio.com/sk/hydrogen-peroxide-test-kit-for-milk>.
2. Brandšteterová, A., Loffayová, S. (2007). *Analytická chémia pre 2. ročník študijného odboru potravinárska výroba 3. časť*. Bratislava: EXPOL PEDAGOGIKA.
3. EUROLAB. (16. apríl 2023). Dostupné na Internete: <https://www.laboratuvar.com/sk/gida-analizleri/kimyasal-analizler/hidrojen-peroksit-analizi-sutte>
4. Stecová, E. (2007). *Cvičenia z hygieny potravín*. Bratislava: PROXIMA PRESS.
5. Stecová, E., Popelka, P. (2005). *Hygiena z potravín*. Bratislava: PROXIMA PRESS.
6. Syridlo. (12. apríl 2023). Dostupné na Internete: <http://www.syridlo.sk/produkty/testy-na-stanovovanie-inhibicnych-latok-v-mlieku-rychle-milksafetm-a-mikrobiaalne-cmt/>
7. Výskumný ústav mliekarenský, a.s., Žilina. (10. apríl 2023). Dostupné na Internete: <http://www.vumza.sk/eshop/8-testy/63-fosfatesty-50-ks-bal#prettyPhoto>





## Stredná odborná škola agropotravinárska a technická



 **Kušnierska brána 349/2, 060 01 Kežmarok**

 [www.soskezmarok.sk](http://www.soskezmarok.sk)

 [sekretariat@soskezmarok.sk](mailto:sekretariat@soskezmarok.sk)

 +421 52 452 30 40



Učiteľ

**Ing. Martina Lachová**

 [lachova.m@gmail.com](mailto:lachova.m@gmail.com)



Ďakujem za  
pozornosť.

