

Diskuze

Sledované kmeny vykazovaly velmi dobrou odolnost vůči nízkému pH, hovězí žluči a pankreatické šťávě. Simulovaná žaludeční šťáva s pepsinem snížila počty mikroorganismů, u kmene CCDM 821 o 2 řády, u dalších kmenů až 3-5 řádů, kmeny CCDM 145 a 118 byly simulovanou žaludeční šťávou významně inhibovány. Zatímco inhibitory - nízké pH, hovězí žluč a pankreatická šťáva působily na testovaný soubor kmenů vyrovnaně, u sledované odolnosti vůči žaludeční šťávě byly zaznamenány významné rozdíly mezi kmeny. Nejvyšší počty mikroorganismů po působení modelových inhibitorů trávicího traktu byly stanoveny u kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 157.

Závěr

Z dosažených výsledků vyplývá, že kmeny testovaných bakterií *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 198, 199, 422, 650, 157, 158A, 233, 441, 579, 610, 963A, 963B, 821 ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů Laktoflora® jsou rezistentní nebo tolerantní vůči simulovaným podmínkám v trávicím traktu a lze je využít k výrobě probiotických potravin. Testované bakterie mají dobré růstové schopnosti jak v syntetických živných médiích, tak i v mléce, kde dosahují počty 10^8 - 10^9 v 1 ml média.

Výzkum byl řešen v rámci výzkumného záměru MSM 2672286101.

Seznam literatury:

- MAXA, V., RADA, V.: Význam probiotik a prebiotik pro výživu a zdraví. Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2000.
- VAUGHAN, E.E., MOLLET, B.: Probiotics in the new millennium. *Nahrung*, 1999, 43, s. 148-153.
- ROGEJL, I., MATIAŠIČ, B.B., MAJHENIČ, A.Č., STOJKOVIČ, S.: The survival and persistence of *Lactobacillus acidophilus* LF221 in different ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.*, 2002, 76, s. 83-91.
- GIBSON, G.R., BEATTY, E.R., WANG, X., CUMMINGS, J.H.: Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofruktose and inulin. *Gastroenterology*, 1995, 108, s. 975-982.
- KIMOTO-NIRA, H., KOBAYASHI, M., NOMURA, M., SASAKI, K., SUZUKI, C.: *Int. Journal of Food Microbiology*, 2009, 131, s.183-188.
- XIAODONG PAN, FENGIN CHEN, TIANXING WU, HONGGANG TANG, ZHANYU ZHAO: The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control*, 2009, 20, s. 598-602.
- PISANO, M.B., CASULA, M., CORDA, A., FADDA, M.E., DEPLANO, M., COSENTINO, S.: In vitro probiotic characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from Fiore Sardo cheese. *Italian Journal of Food Science*, 2008, 20, s. 505-516.
- MILLETTE, M., LUQUET, F.M., RUIZ, M.T., LACROIX, M.: Characterization of probiotic properties of *Lactobacillus* strains. *Dairy Science & Technology*, 2008, 88, s. 695-705.
- GIRIJA ASWATHY, R., BINDHUMOL ISMAIL, PAPPY JOHN, R., MADHAVAN NAMPOOTHIRI, K.: Evaluation of the probiotic characteristics of newly isolated lactic acid bacteria. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2008, 151, s. 244-255.
- GUGLIELMOTTI, D., MARCO, M.B., VINDEROLA, C., REYES GAVILAN, C.DE LOS, REINHEIMER, J., QUIBERONI, A.: Spontaneous *Lactobacillus delbrueckii* phage-resistant mutants with acquired bile tolerance. *Int. Journal of Food Microbiology*, 2007, 119, s. 236-242.
- MÄTTO, J. ET AL. Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 2004: 97, s. 459-470.

- PIMENTEL-GONZÁLEZ, D.J., CAMPOS-MONTIEL, R.G., LOBATO-CALLEROS, C., PEDROZA-ISLAS, R., VERNON-CARTER, and E.J.: Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 2009, 42, s. 292-297.
- VINDEROLA, C.G., REINHEIMER, J.A.: Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 2003, 36, s. 895-904.

Přijato do tisku 2. 9. 2010

Lektorováno 23. 9. 2010

VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ METODY KONTROLY MANUÁLNÍHO ODBĚRU BAZÉNOVÝCH VZORKŮ MLÉKA

Sojková, K.¹ - Kopunec, P.² - Hanuš, O.³ - Dufek, A.³

¹ Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o., Rapotín;

² Českomoravská společnost chovatelů, a.s., Praha;

³ Agrovýzkum Rapotín s.r.o.

Evaluation of control method results for manual bulk milk sampling

Abstrakt

Vzorkování bazénového mléka je důležité pro kontrolu kvality syrového mléka a podporu bezpečnosti a kvality mléčného potravinového řetězce. Kontrolou kvality syrového mléka je plněna důležitá společenská zakázka. Dodržování metodického pokynu si klade za cíl přispět ke zvyšování kvality činností, které předcházejí hodnocení jakosti mléka v akreditovaných laboratořích. Cílem práce bylo vyhodnotit výsledky, které byly získány od pracovníků, kteří prodělali v ČR oficiální školení podle platné metodiky manuálního vzorkování (MV). Z 86 kontrolních MV 23,3 % nevyhovělo. To je vysokém číslo a zdůrazňuje význam vzorkování pro kontrolu kvality mléka. Údaj potvrzuje nezbytnost kontroly vzorkovací činnosti. Podle kontrolovaných parametrů MV nevyhovělo: 8,1 % MV u tuku (T) obou nádrží; 3,5 % MV u bodu mrznutí mléka (BMM) 2. nádrže; 3,5 a 9,3 % MV u tuku směsných vzorků. Nejnáročnějším kritériem byla homogenita odběru mléka s ohledem na tuk. Celkový počet mikroorganismů (CPM) nebyl problematický. Limity pro splnění MV byly původně odvozeny kvalifikovaným odhadem. Nyní byly odvozeny exaktním postupem na hladině pravděpodobnosti 95 % (konvenčně, směrodatná odchylka $\times 1,96$). Konkrétně by tedy limity odchylek pro budoucí aplikaci metody kontroly a certifikace MV pro T, BMM a CPM mohly činit $\pm 0,1025$ %; $3,7841$ m°C $\times (-1)$; 17,35 %. Nicméně, přísnější předchozí limity (T a BMM, 0,04 a 3) prostřednictvím kvalifikovaného odhadu jsou v praxi užitečnější pro zlepšování MV.

Klíčová slova: bazénové mléko; kvalita syrového mléka; manuální odběr vzorků; metodický pokyn; bezpečnost mléčného potravinového řetězce

Abstract

Sampling of bulk milk is important for raw milk quality control and for support of quality and safety of milk food-stuff chain. Important public order is fulfilled by raw milk quality control. The observance of the guideline is the aim of the raising quality of the activities that forgo the evaluation of the milk quality in the accredited laboratories. The aim of the work was to evaluate results from workers that undergo the official training in CR according to the valid guideline of manual sampling (MS). 23.3% did not satisfy from 86 MS controls. This is high value and it emphasizes the importance of sampling for milk quality control. This information signalizes necessity of sampling control. According to checked MS parameters: 8.1% of MS did not satisfy at fat (F) in both tanks; 3.5% of MS at milk freezing point (MFP) in 2nd tank; 3.5 and 9.3% of MS at fat in mixed samples. The most exacting criterion was homogeneity of milk sampling in consideration of fat. Total bacteria count (TBC) was not questionable. Originally the limits for MS fulfillment were derived due to qualified estimation. Now, the limits were derived by exact procedure on probability level 95% (standard deviation \times 1.96, conventionally). Concretely, the limits of deviations for future application of control method and certification of MS for F, MFP and TBC could be \pm : 0.1025%; 3.7841 m°C \times (-1); 17.35%. However, more strict previous limits (F and MFP, 0.04 and 3) by qualified estimation are more useful for MS improvement in practice.

Key words: bulk milk; raw milk quality; manual sampling; guideline; milk food chain safety

Úvod

Řádný odběr vzorků mléka je jednou z podmínek objektivního zajištění systému hodnocení jakosti nakupovaného mléka. Věrohodné vzorkování bazénového mléka je důležité pro kontrolu kvality syrového mléka a podporu bezpečnosti a kvality mléčného potravinového řetězce. Důsledné dodržování metodického pokynu o manuálním vzorkování si klade za cíl přispět ke zvyšování kvality činností, které předcházejí hodnocení jakosti mléka v akreditovaných laboratořích. Spolehlivý odběr bazénových vzorků syrového kravského mléka je důležitým předpokladem účinné kontroly kvality mléka (HANUŠ et al., 2007) a také kontroly bezpečnosti a kvality mléčného potravinového řetězce. Přitom situace se vzorkováním mléka byla v České republice co do úrovně zajištění a kontroly této činnosti dlouhodobě podceňována a v podstatě zvolna klesala. FOLTYS (2001) podrobně popsal vývoj systému kontroly kvality automatických vzorkovacích zařízení ve slovenském mlékařství. Možnou návaznost laboratorních činností na automatické vzorkování v českém mlékařství zmínil

KOPUNECZ (2001). Dále v ČR provedli úspěšně validaci kontrolního postupu automatického vzorkování bazénového syrového kravského mléka KOPUNECZ et al. (2010). Uvedené bylo zpracováno pro účely autorizace postupu pro tvorbu certifikačního střediska podobně jako výsledky této práce. V evropských podmínkách organizace AFEMA (Arbeitsgruppe zur Förderung von Eutergesundheit und Milchhygiene in Alpenländern, e. V.; pracuje v oblasti podpory kvality mléka a zdraví mléčné žlázy dojníc) zpracovala metodologii korektního odběru vzorků syrového mléka a požadavky na něj (BAUMGARTNER et al., 2000). Automatické vzorkování mléka v Bavorsku objasnil HEIMLER (2001). Způsoby odběru individuálních vzorků mléka v kontrole užítkovosti se zase zabývají materiály ICAR (International Committee for Animal Recording; Mezinárodní výbor pro kontrolu užítkovosti zvířat).

Cílem práce bylo vyhodnotit výsledky, které byly získány od pracovníků, kteří prodělali v ČR oficiální školení podle platné metodiky pro získání certifikátu vzorkaře mléka za účelem stanovení validačních limitů pro takový proces při podpoře bezpečnosti mléčného potravinového řetězce.

Materiál a metody

Pozice manuálního vzorkování (MV) v systému kontroly kvality mléka

Vzorky odebrané vzorkovacím zařízením nebo ručně pro kontrolu správné činnosti vzorkovacího zařízení jsou určeny pro zkoušky v příslušné laboratoři. Naplněné vzorkovnice nesmí být znovu otevírány, zaměňovány a se vzorkovnicemi nesmí být zacházeno tak, aby byl jejich obsah ovlivněn. Zejména musí být dodrženy zásady jednoznačné identifikace odebraných vzorků a odpovídající chlazení vzorku od naplnění vzorkovnice až po předání jiné osobě. Pokud není na prvním sběrném místě každé svozné linky odebírán automatickým vzorkovacím zařízením předvzorek (rozběhový vzorek) je nutno bezprostředně před vzorkem odebíraným vzorkovacím zařízením odebrat ručně vzorek pro kontrolu správnosti funkce vzorkovacího zařízení (kontrolní vzorek). Tento vzorek se odebírá do stejného počtu vzorkovnic jako standardní vzorky z této dodávky a zkouší se nejméně na množství tuku a bílkovin, bod mrznutí a na CPM pokud je u dodavatelů na této lince prováděn odběr vzorku na mikrobiologické zkoušky.

Manuální vzorkování (MV) tak tvoří nejen referenční postup pro kontrolu automatických vzorkovacích zařízení, ale také standardní oficiální postup počátku kontroly kvality mléka v českém mlékařství. Výsledky kontrolního vzorku se v obsahu tuku a bílkovin a CPM nesmí lišit od standardního vzorku o více než je dvojnásobek rozšířené nejistoty měření. Pokud je rozdíl větší je nutno zrušit všechny výsledky na celé svozné lince a případně provést náhradní odběry vzorků.

Vlastní manuální odběr vzorků

Každý zkoušený pracovník používá k odběru vzorků vlastní pomůcky (směšná nádoba, naběračka, případně

míchadlo). Příslušný počet vzorkovnic, chladicí box a tispopisy pro záznamy o odběru vzorků zajistí zkoušející.

Zkoušený pracovník odebere po změření objemu mléka z každé z připravených nádrží standardním postupem 2x sadu dvou dílčích vzorků mléka. Jeden vzorek z každé sady ke stanovení chemicko-fyzikálních vlastností mléka (tuk a bod mrznutí), druhý vzorek ke stanovení celkového počtu mikroorganismů. Poté odebere zkoušený pracovník 2x sadu směsných vzorků ze všech připravených nádrží s mlékem, z nichž byly odebrány dílčí vzorky. Jeden vzorek z každé sady pro stanovení chemicko-fyzikálních vlastností mléka (tuk a bod mrznutí), druhý vzorek pro stanovení celkového počtu mikroorganismů.

Řádně připravené označené a rozmíchané vzorky se stabilizačním činidlem s průvodním dokladem předá zkoušený pracovník zkoušejícímu.

Transport, rozbor vzorků v příslušné laboratoři a vyhodnocení zkoušky zajistí zkoušející.

Vyhodnocení manuálního odběru vzorků

Výsledky laboratorních zkoušek se zapíší do protokolu (ČMSCH, a.s. Praha, Kopunecz) o odběru vzorku mléka. Vypočítají se aritmetické průměry naměřených hodnot a vyhodnotí se odchylky.

Povolená odchylka rozdílů dvou vzorků od jejich střední hodnoty:

| Parametr | Povolená odchylka od průměru |
|-------------|--|
| Tuk | do $\pm 0,04$ g/100g |
| Bod mrznutí | do $\pm 0,003$ °C |
| CPM | ± 50 % v intervalu 0 až 30 tisíc ± 30 % v intervalu 31 až 100 tisíc |

CPM = celkový počet mezofilních mikroorganismů (KTJ/ml)

Zkoušený pracovník uspěl ve zkoušce odběru vzorků za předpokladu, že:

- odchylky ve výsledcích dvou vzorků odebraných z jedné nádrže jsou ve všech sledovaných parametrech menší než přípouští povolená odchylka;
- odchylky ve výsledcích dvou směsných vzorků jsou ve všech sledovaných parametrech menší než přípouští povolená odchylka;
- výsledek tučnosti mléka zjištěný váženým průměrem vzorků 1 až 4 se neliší o více než přípouští povolená odchylka pro tuk od výsledku průměru směsných vzorků.

Použití mlékařské analytické metody

Odebrané chlazené vzorky mléka byly v termoboxu převezeny k analýze do akreditovaných laboratoří (EN ISO 17025) pro rozbor mléka Buštěhrad a Brno (ZL 1312.2, resp. ZL 1312.3). Tyto kooperují v rutinním analytickém systému kontroly kvality mléka v České republice (Českomoravská společnost chovatelů a.s., Praha). V protokolech je z mléčných ukazatelů uvedeno množství mléka, dále obsah tuku (T; % (g/100g)), bod mrznutí mléka (BMM; °C, resp. $m^{\circ}C \times (-1)$), celkový počet mezofilních mikroorganismů (CPM; v tisících kolonie tvořících jed-

notek v ml mléka, 10^3 KTJ/ml) a rezidua inhibičních látek (RIL; mikrobiologické testy ECLIPSE 50, ZEU-INMUNOTEC S. L., Zaragoza, Spain a DELVOTEST SP NT, DSM, Dairy Ingredients, The Netherlands, oba na bázi růstu *Bacillus stearothermophilus* varieta *calidolactis*, pozitivní nebo negativní nález). Tuk byl stanoven na přístrojích Bentley 2500 (filtrová technologie infračervené spektroskopie mléka; Bentley Instruments INC., USA) a MilkoScan FT 6000 (Foss, Denmark; technologie infračervené spektroskopie mléka s celým spektrem a aplikací Fourierových transformací). Přístroje byly kalibrovány a pravidelně podrobeny výkonostnímu testování analytické způsobilosti. BMM byl stanoven na přístrojích CryoStar Automatic (Funke-Gerber, Germany), přístroj byl kalibrován pomocí standardních solných roztoků. CPM byl určen pomocí fluoro-opto-elektronické průtočné cytometrie na zařízení Bactocount IBC (Bentley Instruments INC., USA).

Statistická validace výsledků

Hlavní údaje ze zkušebních protokolů ($n = 86$) roku 2008 byly shrnuty do tabulky, která byla vyhodnocena základními statistickými metodami (Tab. 3). Byly určeny frekvence výskytu (%) vybraných jevů a skutečností, jako pozitivních nebo negativních protokolárních závěrů atp.. Získané výsledky této platné metody byly vyhodnoceny s ohledem na variabilitu a další parametry tak, aby bylo ověřeno, že uvedená metoda je objektivní a je připravena k rutinnímu nasazení v mlékařské praxi, aby byly zabezpečeny uvedené cíle. V modelu hodnocení byly zohledněny přístupy z více teoretických prací. Na základě předpokladu výskytu normální frekvenční distribuce (ECKSCHLAGER, 1961; ECKSCHLAGER et al., 1980; GRAPPIN, 1987; MELOUN a MILITKÝ, 1992, 1994; HANUŠ et al., 1998; FEINBERG a LAURENTIE, 2006) byly z odhadů průměrů a jejich směrodatných odchylek vypočteny limitní hodnoty vybraných ukazatelů kvality vzorkování na hladině pravděpodobnosti 95 %. Použit byl program Microsoft Excel.

Výsledky a diskuse

Výsledky jednotlivých zkoušek jsou zapsány do protokolu (Tab. 1 a 2) spolu s výsledkem zkoušky. V Tab. 1 je znázorněn příklad protokolu zkoušky manuálního odběru bazénového vzorku mléka, který vyhověl podle podmínek metody. V Tab. 2 je tomu naopak. Zde je konkrétním důvodem překročení povolené odchylky od střední hodnoty u tuku při vzorkování druhé nádrže. Z celkem 86 případů přezkušovaných vzorkařů celých 20 (Tab. 3), tj. 23,3 %, nevyhovělo podmínkám metodiky MV. To je překvapivě vysoké číslo, ať již vzorkaři měli nebo neměli předchozí zkušenosti. Zdůrazňuje tak význam vzorkování pro kontrolu kvality syrového mléka a také odhaluje možnost vlivu MV v mnohých případech na objektivitu posouzení kvality mléka. Zároveň tento údaj podtrhuje nezbytnost kontroly vzorkovací činnosti, její certifikace a tím opravňuje činnost

Tab. 1 Výsledek zkoušky odběru bazénového vzorku mléka, který vyhověl podle podmínek metodiky

| Protokol o odběru vzorků mléka | | 2008 / 059 | | | | |
|---|-----------------------------|--------------|-------------------------|----------------------|-----|------------|
| Výsledky zkoušky odběru bazénového vzorku mléka | | | | | | |
| Vzorky odebral: | | | | | | xy |
| Datum odběru: | | | | | | 15.7.2008 |
| Čas odběru: | | | | | | 13:10 |
| Teplota vzorkovaného mléka: | Bazén č. 1 | | 5°C | Bazén č. 2 | | 5°C |
| Číslo vzorku | Popis vzorku | Množství (l) | Tuk (g/100g) (m°C (-1)) | Bod mrznutí (v tis.) | CPM | RIL |
| 91 | první vzorek z první nádrže | 1880 | 3,77 | 528 | 13 | negativní |
| 92 | druhý vzorek z první nádrže | 1880 | 3,77 | 528 | 12 | negativní |
| Průměr vzorků 1 a 2 | | | 3,77 | 528 | 13 | |
| Povolená odchylka od střední hodnoty / skutečná odchylka | | | ±0,040 / 0,000 | ± 3 / 0 | * | 4% |
| 93 | první vzorek z druhé nádrže | 2250 | 3,44 | 535 | 7 | negativní |
| 94 | druhý vzorek z druhé nádrže | 2250 | 3,45 | 529 | 8 | negativní |
| Průměr vzorků 3 a 4 | | | 3,445 | 532 | 8 | |
| Povolená odchylka od střední hodnoty / skutečná odchylka | | | ±0,040 / -0,005 | ± 3 / 3 | * | -7% |
| Vážený průměr vzorků 1 až 4 | | | 3,593 | | | |
| 95 | první směsný vzorek | 4130 | 3,55 | 532 | 12 | negativní |
| 96 | druhý směsný vzorek | 4130 | 3,58 | 533 | 9 | negativní |
| Průměr vzorků 5 a 6 | | | 3,565 | 533 | 11 | |
| Povolená odchylka od střední hodnoty / skutečná odchylka | | | ±0,040 / -0,015 | ± 3 / -0,5 | * | 14% |
| Povolená odchylka od střední hodnoty / skutečná odchylka | | | ±0,040 / -0,028 | | | |

Povolená odchylka pro hodnotu CPM (± 50% v intervalu 0 až 30 tisíc, ± 30% v intervalu 31 až 100 tisíc)

| | |
|-----------------------------|----------------|
| Výsledek vyhodnocení: | vyhověl |
| Dne: | 16.7.2008 |
| Vyhodnocení odběru provedl: | xy |

uvažovaného certifikačního střediska pro vzorkování mléka. Vzorkování je zahrnuto v kontrole kvality jako důležitý prvek. Vyšetřování a hodnocení kvality syrového mléka pomáhá plnit důležitou společenskou zakázku (BAUMGARTNER et al., 2000). Hlavním důvodem pro metodické nevyhovění MV se ukázalo překročení povolené odchylky od střední hodnoty u tuku u druhého směsného vzorku, 9,3 %. Podle kontrolovaných parametrů MV (Tab. 1 a 2) odděleně nevyhovělo: 8,1 % MV u tuku první nádrže, 0 % MV u BMM a CPM 1. nádrže; 8,1 % MV u tuku 2. nádrže, 3,5 % MV u BMM 2. nádrže a 0 % MV u CPM 2. nádrže; 3,5 a 9,3 % MV u tuku směsných vzorků a 0 % MV u BMM a CPM směsného vzorku. Homogenita odběru mléka s ohledem na tuk tak byla logicky nejnáročnějším, resp. rozhodujícím kritériem metody kontroly MV.

Vyšetření vzorků na RIL nepřineslo žádný pozitivní případ, což doložilo, že k testům použité mléko neneslo žádnou nepovolenou antibiotickou nebo jinou reziduální zátěž a také, že samotný proces MV v daném souboru nebyl příčinou zavezení nějaké škodlivé kontaminace. V praxi to však nemusí být vždy stejné a je proto třeba nejvyšší obezřetnosti při péči o použité vzorkovnice, aby se nemohly stát falešným kontaminačním zdrojem.

Limity pro úspěšné splnění metodiky manuálního vzorkování byly nejdříve odvozeny kvalifikovaným odha-

dem. Nyní, po získání relevantního datového souboru, byly odvozeny exaktním postupem a statisticky validovány. Průměrné hodnoty odchylek mléčných ukazatelů (T, BMM, CPM) byly podle očekávání vlivem nahodilosti blízké nule, což dokládají zejména hodnoty mediánu (Tab. 3). Jejich směrodatné odchylky (sd) lze ovšem exaktním způsobem použít pro výpočet rozsahu intervalu spolehlivosti na hladině pravděpodobnosti 95 %. To je vhodné pro validaci limitních hodnot přípustných odchylek mléčných ukazatelů při provádění metody kontroly MV. Příslušné sd (Tab. 3) se vynásobí hodnotou 1,96 (ECKSCHLAGER, 1961; ECKSCHLAGER et al., 1980; GRAPPIN, 1987; MELOUN a MILITKÝ 1992, 1994; KUPKA, 1997) pro oboustranné (±) vymezení. U tukové odchylky první nádrže je to $0,0496 \times 1,96 = 0,0972$, u T odchylky 2. nádrže je to $0,0418 \times 1,96 = 0,0819$ %, u 3. a 4. odchylky směsného vzorku to je $0,0222$ a $0,0955 \times 1,96 = 0,0435$ a $0,1872$ %. U odchylky BMM 1. nádrže je to $0,6965 \times 1,96 = 1,3651$ m°C $\times (-1)$, u 2. nádrže je to $4,2774 \times 1,96 = 8,3837$ m°C $\times (-1)$ atd.. U odchylky CPM 1. nádrže je to $8,59 \times 1,96 = 16,84$ % atd..

Vypočtené limity odchylek byly průměrovány pro jednotlivé ukazatele. Konkrétně by tedy limity odchylek pro budoucí aplikaci metody kontroly a certifikace MV pro relevantní mléčné ukazatele T, BMM a CPM) mohly činit ±: 0,1025 %; $3,7841$ m°C $\times (-1)$; 17,35 %. Vzato čistě z hlediska

Tab. 2 Výsledek zkoušky odběru bazénového vzorku mléka, který vyhověl podle podmínek metodiky

| Protokol o odběru vzorků mléka | | 2008 / 060 | | | | |
|---|-----------------------------|--------------|-------------------------|----------------------|-----|-----------|
| Výsledky zkoušky odběru bazénového vzorku mléka | | | | | | |
| Vzorky odebral: | | | | | | xy |
| Datum odběru: | | | | | | 24.9.2008 |
| Čas odběru: | | | | | | 10:10 |
| Teplota vzorkovaného mléka: | Bazén č. 1 | | 6°C | Bazén č. 2 | | 6°C |
| Číslo vzorku | Popis vzorku | Množství (l) | Tuk (g/100g) (m°C (-1)) | Bod mrznutí (v tis.) | CPM | RIL |
| 101 | první vzorek z první nádrže | 640 | 4,17 | 524 | 134 | negativní |
| 102 | druhý vzorek z první nádrže | 640 | 4,20 | 525 | 130 | negativní |
| Průměr vzorků 1 a 2 | | | 4,19 | 525 | 132 | |
| Povolená odchylka od střední hodnoty / skutečná odchylka | | | ±0,040 / -0,015 | ± 3 / -0,5 | * | 2% |
| 103 | první vzorek z druhé nádrže | 880 | 4,22 | 526 | 284 | negativní |
| 104 | druhý vzorek z druhé nádrže | 880 | 4,39 | 527 | 301 | negativní |
| Průměr vzorků 3 a 4 | | | 4,305 | 527 | 293 | |
| Povolená odchylka od střední hodnoty / skutečná odchylka | | | ±0,040 / -0,085 | ± 3 / -0,5 | * | -3% |
| Vážený průměr vzorků 1 až 4 | | | 4,254 | | | |
| 105 | první směsný vzorek | 1520 | 4,27 | 526 | 204 | negativní |
| 106 | druhý směsný vzorek | 1520 | 4,26 | 526 | 192 | negativní |
| Průměr vzorků 5 a 6 | | | 4,265 | 526 | 198 | |
| Povolená odchylka od střední hodnoty / skutečná odchylka | | | ±0,040 / 0,005 | ± 3 / 0 | * | 3% |
| Povolená odchylka od střední hodnoty / skutečná odchylka | | | ±0,040 / -0,028 | | | |

Povolená odchylka pro hodnotu CPM (± 50% v intervalu 0 až 30 tisíc, ± 30% v intervalu 31 až 100 tisíc)

| | |
|-----------------------------|------------------|
| Výsledek vyhodnocení: | nevyhověl |
| Dne: | 25.9.2008 |
| Vyhodnocení odběru provedl: | xy |

statistických konvencí se jeví, že kvalifikovaný odhad hodnot povolených limitů (Tab. 1 a 2) odchylek parametrů MV byl "tvrďší" pro tuk a téměř srovnatelný pro BMM vůči jejich exaktnímu odhadu na bázi uplatnění modelu normální frekvenční distribuce, který je pro hodnocení rozložení chyb v postupech téměř vždy vhodný, neboť právě na podobném principu vznikl. Vzhledem k hlavnímu problému homogenity výsledků tuku při MV a vzorkování vůbec včetně automatického (KOPUNECZ et al., 2010), lze považovat metodicky "tvrďši" nastavené kritérium pro tuk za v praxi oprávněné k postupnému zlepšování dané činnosti MV. Zároveň je to vysvětlením "vyšší" frekvence nevyhovujících výsledků 23,3 % celkem a od 3,5 do 9,3 % podle odchylek tuku odděleně podle vzorků. Validace v podstatě potvrdila metodický limit odchylky stanovené prostřednictvím kvalifikovaného odhadu pro BMM, ale nepotvrdila pro T.

Závěr

Výsledky vyhodnocení ukázaly poměrně vysokým podílem nevyhovujících případů zkoušek manuálního vzorkování 23,3 % na význam této činnosti pro kontrolu kvality syrového mléka. Statistické zpracování datového souboru protokolárních zkoušek manuálního vzorkování syrového kravského bazénového mléka přispělo podpůrně (také KOPUNECZ et al., 2010) k účelům validace postupu pro tvorbu národního certifikačního střediska pro odběry vzorků mléka. Byly stanoveny validační limity a potvrzeny limity dané předchozím kvalifikovaným odhadem za účelem podpory bezpečnosti mléčného potravinového řetězce kvalitním odběrem mléčných vzorků určených pro analýzy a monitoring kvality suroviny pro mlékárenskou výrobu.

Tab. 3 Základní statistické výsledky protokolárních zkoušek (odchylek) manuálního vzorkování syrového kravského mléka 2008 (n = 86)

| | 1. nádrž | | | 2. nádrž | | | směsný vzorek | | | tuk g/100g |
|----|-------------|---------|-------|------------|---------|-------|---------------|---------|-------|------------|
| | tuk g/100 g | BMM m°C | CPM % | tuk g/100g | BMM m°C | CPM % | tuk g/100g | BMM m°C | CPM % | |
| x | 0,0025 | 0,1628 | 0,96 | -0,00064 | 0,1453 | 1,74 | -0,0018 | -0,1047 | 2,30 | 0,0160 |
| sd | 0,0496 | 0,6965 | 8,59 | 0,04181 | 4,2774 | 8,39 | 0,0222 | 0,8181 | 9,57 | 0,0955 |
| m | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,0035 |

x = aritmetický průměr; sd = směrodatná odchylka ±; m = medián; BMM = bod mrznutí mléka (m°C × (-1)); CPM = celkový počet mezofilních mikroorganismů (tis. KTJ/ml), zde odchylka v % (Tab. 1 a 2).

Příspěvek byl podporován prostředky projektů MŠMT INGO LA 09030, MSM 2678846201 a CZ.1.07/2.3.00/09.0081 a Národní referenční laboratoří pro syrové mléko Rapotín.

Literatura je k dispozici u autorů.

Přijato do tisku 28. 9. 2010

Lektorováno 8. 10. 2010

APLIKACE KMENŮ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ S TVORBOU EXOPOLYSACHARIDŮ DO MLÉKA RŮZNÝCH DRUHŮ A JEJICH VÝZNAM

Snášelová Jana, Zikán Vladimír, Srkalová Simona

Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o.

Application of lactic acid bacteria producing exopolysaccharides into different milk types and their importance

Abstrakt

Předložená práce obsahuje vybrané aspekty použití bakterií mléčného kvašení (LAB) s tvorbou exopolysacharidů (EPS) v lidské výživě a jejich význam. Jde především o výrobu fermentovaných výrobků z kravského, kozího i ovčího mléka, která je v posledních letech často spojována s použitím těchto mikrobiálních kmenů. Jejich přítomnost může příznivě ovlivnit reologické vlastnosti a texturu výrobku a v případě použití probiotických bakterií zvyšuje i nutriční hodnotu výrobku. Nyní jsou studovány i nové možnosti využití těchto kmenů v humánní medicíně.

Abstract

The literature retrieval includes select aspects of using of lactic acid bacteria (LAB) producing exopolysaccharides (EPS) in human nutrition and their importance. First of all it is production of fermented products from cow, goat and sheep milk, which is frequently connected with application of these microbiological strains. Their presence can positively influence rheological characters and texture of product and in case of probiotic bacteria also nutrition value is increased. At present new possibilities about application of these strains in human medicine are under study.

Základní charakteristika polysacharidů

Způsob tvorby a charakteristiku polysacharidů uvádí např. Turková, K. (2007). Polysacharidy (PS) jsou vysoce rozmanitou skupinou polymerů, lišící se molekulární hmot-

ností, typem vazeb, stupněm větvení a chemickou stavbou. Výsledkem je velký počet různých druhů biomolekul. Tato diverzita nabízí množství aplikací polysacharidových polymerů v potravinářském průmyslu a jako zdraví prospěšné látky. Všeobecně se PS dělí na strukturní a nestrukturní. Strukturní PS jsou součástí strukturních a stavebních materiálů u rostlin, hmyzu nebo bakterií (např. celulóza, pektin, chitin, murein). Nestrukturní PS (škrob, glykogen a inulin) většinou slouží jako zásobárny energie. Mnohé PS jsou využívány v potravinářském průmyslu jako zahušťovadla, stabilizátory, tvarovací a želatinační činidla. Jsou běžně získávány z rostlin (škrob, pektin) a mořských řas (alginát). PS mohou být syntetizovány nejen rostlinami a řasami, ale také mnoha druhy mikroorganismů, včetně kvasinek a bakterií. Schopnost produkovat PS je mezi bakteriemi značně rozšířená. Mohou jednak syntetizovat zásobní PS, jako glykogen, který se nachází v cytoplasmě, a jednak strukturní PS buněčné stěny. Jedná se o peptidoglykan a lipoteichoové kyseliny u grampozitivních bakterií a lipopolysacharidy (LPS) vnější membrány u gramnegativních bakterií.

Přehledné poznatky o biochemii, genetice a použití *Streptococcus thermophilus* s tvorbou exopolysacharidů (dále EPS) uvádí Broadbent, J.R. et al. (2003). Z jeho review vyplývá, že mnoho kmenů *Streptococcus thermophilus* syntetizuje extracelulární polysacharidy. Tyto molekuly mohou být produkovány jako slizovitý obal lehce připojený k buňce, nebo mohou být volné v médiu jako volný sliz (tzv. táhlovité polysacharidy). Přítomnost exopolysacharidů neprokázala žádnou prokazatelnou výhodu pro vlastní životaschopnost *Str. thermophilus* v mléce, ačkoli produkce EPS přináší typicky žádanou táhlovitou nebo viskózní texturu fermentovaného mléčného výrobku. Poslední práce také ukazují, že *Str. thermophilus* produkující exopolysacharidy může zvýšit funkční vlastnosti sýra Mozzarella, ale nemá vliv na fagorezistenci. Podle současných znalostí genetiky, fyziologie a funkčnosti bakteriálních EPS kmenů pokračuje jejich zkoumání a následně další nové aplikace EPS kmenů do mléčných výrobků, což souvisí s potřebami zpracovatelů mléka a požadavky spotřebitelů.

Složení tří druhů mlék

Složení mléka, zejména druhově odlišného, výrazně ovlivňuje vlastnosti fermentovaných výrobků, připravovaných za použití LAB s tvorbou EPS. Proto je dále uvedeno zastoupení majoritních složek kravského, kozího a ovčího mléka (viz tabulka 1, 2 a 3).

Sledováním vybraných parametrů mléka bílých krátkosrstých koz ze dvou farem v České republice se zabývala Přidalová, H. et al., (2009). U vzorků mléka

Tab. 1 Složení kravského mléka

| Autor | Sušina % | Tuk % | Bílkoviny % | Laktóza % |
|---------------------------|----------|-------|-------------|-----------|
| Strmiska et al., 1983 | 12,5 | 3,75 | 3,27 | 4,70 |
| Drbohlav, Vodičková, 2002 | 12,85 | 4,06 | 3,29 | 4,77 |
| Kvapilík et al., 2008 | - | 3,90 | 3,33 | 4,84 |