

(2010). V rámci jejich průzkumu pouze 47,4 % dotázaných respektovalo uvedenou informační tabulku.

Na otázku, odkud dotazovaní čerpají informace o kladech a záporech syrového mléka, uvádějí respondenti, že největší podíl má televize, tisk a internet, zatímco letáky a ostatní zdroje mají jen minimální vliv. Polovina všech respondentů (a více než 70 % respondentů nakupujících mléko v MA) vyjádřila zvýšenou potřebu po kvalitních a dostupných informacích, týkajících se syrového mléka (graf 6).

## Závěr

Prodej syrového kravského mléka z mléčných automatů je poměrně novou záležitostí na českém trhu, porovnáme-li jej s jinými zeměmi EU. Tak jako v jiných zemích i u nás byl především reakcí na neuspokojivé poměry ve výkupu mléka od prvovýrobců. Na druhou stranu, s postupem času si řada českých konzumentů uvykla na pravidelný zdroj této suroviny a možnost jejího nákupu z mléčných automatů považují za významnou, jak z hlediska aktivního ovlivňování svého zdraví, tak jednoduše z hlediska "možnosti výběru".

Z odpovědí získaných naším šetřením lze soudit, že řada informací je konzumentům již poměrně známá, kupř. otázka tučnosti či ceny mléka. Na druhou stranu znalosti týkající se zdravotní nezávadnosti a správného zacházení se syrovým mlékem, jsou dosud nedostatečné. Za pozitivní lze považovat zjištění, že mnoho spotřebitelů by více informací k dané problematice uvítalo. Zde tedy zůstává i nadále úkol pro odborníky, aby široké veřejnosti byli schopni tyto informace srozumitelnou a zejména dostupnou cestou přinášet.

## Poděkování

Tato práce byla uskutečněna s podporou projektu OP VK CZ.1.07/2. 3. 00/09.0081 a výzkumného záměru MSM 6007665806.

## Seznam literatury

- DANIEL, R. (2011): *Problematika mléčných automatů*. [Bakalářská práce]. České Budějovice: JU ZF. 44s.
- DE-REU, K., GRIJSPEEDERT, K., HERMAN, L. (2004): A Belgian survey of hygiene indicator bacteria and pathogenic bacteria in raw milk and direct marketing of raw milk farm products. *J. Food Safety*, 24, (1), s. 17-36.
- ELMOSLEMANY, A.M., KEEFE, G.P., DOHOO, I.R., JAYARAO, B.M. (2009a): Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. Part 1: Overall risk factors. *J. Dairy Sci.*, 92, (6), s. 2634-2643.
- ELMOSLEMANY, A.M., KEEFE, G.P., DOHOO, I.R., JAYARAO, B.M. (2009b): Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. Part 2: Bacteria count-specific risk factors. *J. Dairy Sci.*, 92, (6), s. 2644-2652.
- HAUG, A., HOSTMARK, A.T., HARSTAD, O.M. (2007): Bovine milk in human nutrition - a review. *Lipids in Health and Disease*, 6, s. 1-16.
- HLAVÁČEK, J. (2010): Prodej syrového mléka - riziko? Ve: *Produkce a zdravotní nezávadnost mléka*, České Budějovice, JU ZF, s.57-68.
- KVAPILÍK, J., RŮŽIČKA, Z., BUČEK, P. A KOL. (2011): *Ročenka 2010: Chov skotu v České republice*. Praha: VÚŽV, 95 s. ISBN 978-802-904131-6-0.
- LEJEUNE, J.T., RAJALA-SCHULTZ, P.J. (2009): Food safety: unpasteurized milk: a continued public health threat. *Clin. Infect. Dis.*, 48, (1), s. 93-100.
- NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu.

OLIVER, S.P., BOOR, K.J., MURPHY, S.C., MURINDA, S.E. (2009): Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathog. Dis.*, 6, (7), s. 793-806.

SAMKOVÁ, E., SMETANA, P., HLAVÁČEK, J., MRÁZEK, J., ROZSYPAL, R., POSPÍŠIL, M., TRÁVNÍČEK, P. (2009): *Faremní zpracování mléka v ekologickém zemědělství. Kvalita mléka, hygienické požadavky na jeho zpracování, přímý prodej. Zásady ekologického chovu skotu, ovcí a koz*. Metodika pro praxi. 1. vyd. Olomouc: Bioinstitut, 62 s. ISBN 978-80-904174-5-8.

SVS ČR (2011): Registrované subjekty. Pro přímý prodej. Prodejci syrového mléka [online]. Dostupné na [www: http://www.svs.cz/mlako.php](http://www.svs.cz/mlako.php), staženo 30. 6. 2011).

VORLOVÁ, L. A KOL. (2010): Průzkum: Mléko z automatů lidé využívají špatně. [online]. Dostupné na [www: http://www.prvnizpravy.cz/zpravy/zpravy/z-domova/pruzkum-mlako-z-automatu-lide-vyuzivaji-spate/?style=default](http://www.prvnizpravy.cz/zpravy/zpravy/z-domova/pruzkum-mlako-z-automatu-lide-vyuzivaji-spate/), staženo 4. 7. 2011).

VYHLÁŠKA č.77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. Částka 32/2003 Sb.

VYHLÁŠKA č. 289/2007 Sb., o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství (novela č. 61/2009). Částka 95/2007 Sb.

VYHLÁŠKA č. 128/2009 Sb., o přizpůsobení veterinárních a hygienických požadavků pro některé potravinářské podniky, v nichž se zachází se živočišnými produkty. Částka 38/2009 Sb.

Přijato do tisku 5. 7. 2011

Lektorováno 13. 7. 2011

## VÝZNAM SLEDOVÁNÍ MINORITNÍCH SLOŽEK MLÉKA PRO ZDRAVÍ ZVÍŘAT A ANALYTICKÉ MOŽNOSTI JEJICH MONITORINGU

**Hanuš, O. - Manga, I. - Vyletělová, M. - Genčurová, V. - Kopecký, J. - Jedelská, R.**

*Výzkumný ústav pro chov skotu, Rapotín;*

*Národní referenční laboratoř pro syrové mléko Rapotín*

**The importance of monitoring of minor milk components for the health of animals and their analytical possibilities**

## Abstrakt

Dobré zdraví hospodářských zvířat je pro podporu bezpečnosti potravinového řetězce stále důležitější. V mléce je řada složek, podle kterých lze metodou neinvazivního monitoringu kontrolovat zdravotní stav dojnic. Jedná se o majoritní složky: tuk; bílkoviny; laktóza; počet somatických buněk. Důležité jsou také složky minoritní, metabolity s úzkou vazbou na výživový stav dojnic: kyselina citrónová; močovina; volné mastné kyseliny; ketony. Z majoritních složek je nově významný také kasein (kvůli možnosti rutinních analýz). Mléko, na rozdíl od krve nebo moče, zajišťuje snadný odběr vzorků, který je rutinně zvládnut, včetně chladového transportu do laboratoří. Kvalita analytických

výsledků rozhoduje o správnosti jejich praktické interpretace. Cílem bylo vyhodnotit některé referenční a rutinní postupy (zejména MIR a MIR-FT, infračervená technologie (IR) s optickými filtry a IR celého spektra interferometrem s použitím Fourierových transformací) stanovení minoritních složek mléka z hlediska věrohodnosti analytických výsledků pro praktické použití. Byly testovány a prověřovány na věrohodnost výsledků přímé a nepřímé kvantitativní a semikvantitativní metody stanovení močoviny, kyseliny citrónové, volných mastných kyselin a ketonů v mléce.

**Klíčová slova:** kráva, syrové mléko, kasein, močovina, volné mastné kyseliny, kyselina citrónová, ketony, referenční metoda, infraanalýzátor

## Abstract

Good health state of farm animals is always more important for support of foodstuff chain safety. There is whole row of components in milk according to which is possible to control the health state of cows via method of noninvasion monitoring. There are so called majority components: fat; protein; lactose; somatic cell count. Also minority components as metabolites with direct link to dairy cow nutrition state are important: citric acid; urea; free fatty acids; ketones. Also casein is important from majority milk components newly (because of possibility of routine analyses). Milk in contrast to blood or urine offers easy sampling, which is routinely mastered including cold transport into laboratory. The quality of analytical results decides about rightness of their practical interpretation. The goal was to evaluate some reference and routine procedures (in particular MIR and MIR-FT, infrared (IR) technology with optical filters and IR spectroscopy of whole spectrum by interferometer and use of Fourier's transformations) for determination of minority milk components in terms of reliability of analytical results for their practical use. The direct and indirect quantitative and semiquantitative methods of milk urea, citric acid, free fatty acids and ketones determination were tested on reliability of their results.

**Key words:** cow, raw milk, casein, urea, free fatty acids, citric acid, ketones, reference method, infraanalyzer

## Úvod

Zajištění dobrého zdraví hospodářských zvířat pro podporu bezpečnosti potravinového řetězce je stále důležitější. Monitoring zdravotních ukazatelů v mléce může být důležitý pro řízení prevence produkčních poruch dojnic a tím podporu zdraví zvířat. To je významné zejména v době, kdy nově nabyla významu a rozšíření stará alternativa prodeje syrového mléka ze dvora, nyní prostřednictvím mléčných automatů.

V mléce je řada složek, podle kterých lze metodou neinvazivního monitoringu kontrolovat zdravotní stav dojnic. Jedná se o majoritní složky: tuk; bílkoviny; laktóza; sušina tukuprostá; a vlastnosti jako počet somatických buněk nebo elektrická vodivost. Z majoritních složek je nově vý-

znamný také kasein, právě kvůli možnosti rutinních analýz. Důležité jsou také složky minoritní, metabolity s úzkou vazbou na výživový stav dojnic: kyselina citrónová; močovina; volné mastné kyseliny; ketony. Mléko, na rozdíl od krve nebo moče, zajišťuje snadný odběr vzorků, který je rutinně zvládnut, včetně chladového transportu do laboratoří. Kvalita analytických výsledků rozhoduje o správnosti jejich praktické interpretace a účinnosti preventivních nebo léčebných opatření v chovech a o možnostech zajištění kvality mléčného potravinového řetězce. Cílem bylo vyhodnotit některé referenční a rutinní postupy (zejména MIR a MIR-FT, infračervená technologie (IR) s optickými filtry a IR celého spektra interferometrem s použitím Fourierových transformací) stanovení minoritních složek mléka z hlediska věrohodnosti analytických výsledků pro praktické použití. Byly testovány a prověřovány na věrohodnost výsledků přímé a nepřímé kvantitativní a semikvantitativní metody stanovení močoviny, kyseliny citrónové, volných mastných kyselin a ketonů v mléce.

## Stanovení kaseinu (KAS) v mléce a interpretace hodnot

Obsah kaseinu v mléce, stejně jako obsah hrubých bílkovin (Kirchgessner a kol., 1986; Famigli-Bergamini, 1987), může být využit v kombinaci s korespondujícími obsahy močoviny k posuzování energetické dotace dojnic. Jeho pokles pod odhadnuté fyziologické meze může naznačovat malnutrici zvířete (individuální vzorek mléka) nebo stáda (bazénový vzorek mléka) v jeho energetické dotaci výživou s ohledem na dojivost. Zde je proto nutné zohlednit plemeno skotu při interpretaci fyziologického obsahu kaseinu, samozřejmě vedle mléčné užitkovosti. Mimoto je pro zpracovatele mléka kasein důležitý, např. jako ukazatel sýrařské výtěžnosti.

Tradiční metoda stanovení kaseinového dusíku Kjeldahlovou metodou je pracná a tudíž málo efektivní a proto neumožňuje praktický monitoring. Analýzy MIR-FT otevřely dveře k rutinnímu využití obsahu kaseinu při praktickém monitoringu i když některé práce naznačily, že specifita infračervených metod k obsahu kaseinu není a zřejmě ani nebude nijak výrazně vysoká. Přes tento handicap jsou např. analýzy bazénových vzorků mléka poměrně spolehlivé. V našem mlékařském systému je tento typ analýz již využíván během posledních pěti let.

## Stanovení a interpretace kyseliny citrónové (KC) v mléce

Obsah kyseliny citrónové (KC) v mléce je vhodným ukazatelem energetického metabolismu dojnic (Illek a Pechová, 1997; Baticz a kol., 2002; Garnsworthy a kol., 2006) a použitelnosti mléka v sýrařství. Souvisí s efektivitou Krebsova cyklu a přispívá ke kapacitě pufračního systému mléka. KC v mléce pozitivně korelovala s plazmatickou glukózou a negativně s celkovým plasmovým proteinem v krvi (0,46 P < 0,01 a -0,31 P < 0,01; Khaled

a kol., 1999). Kubešová a kol. (2009) našli vliv kyseliny citrónové na luteální aktivitu ovárií u dojníc. Hodnota KC může posloužit v poradenském servisu ke zlepšení výživy dojníc, jejich reprodukce nebo zpracování mléka. Fyziologické rozpětí je 8 až 10 mmol.l<sup>-1</sup> KC v mléce (0,149 až 0,187 %). Nižší hodnoty indikují energetický nedostatek metabolismu krav a vyšší hodnoty přebytek. Proto mléčné laboratoře zavádějí určení KC. Vhodnou rutinní metodou pro stanovení KC může být MIR-FT.

## Stanovení a interpretace močoviny (M) v mléce

Močovina (M) je konečný metabolit bílkovin v organismu a znalost hladiny vylučované močoviny je jedním z důležitých ukazatelů správnosti sestavení krmné dávky (Erbersdobler a kol., 1980; Kirchgessner a kol., 1986; Jonker a kol., 1999; Hojman a kol., 2004). Močovina je zpracovávána kromě jater také v ledvinách, jejichž prostřednictvím je močovina, po syntéze v játrech, do ledvin transportována a vylučována močí. Močovina je transportována z krve také do mléka. Koncentrace močoviny v organismu během dne kolísá, nejvyšších hodnot dosahuje 4 až 6 hodin po nakrmení, nejnižších hodnot před příjmem potravy (Gustafsson a Palmquist, 1993; Carlsson a Bergström, 1994). Za fyziologický obor se nejčastěji považuje rozsah od 18 do 35 mg.100 ml<sup>-1</sup>. Mezi efekty, které koncentraci močoviny v mléce (KMM) ovlivňují patří:

- příjem proteinu a energie (nadměrný obsah hrubého proteinu v krmné dávce zvyšuje obsah M v mléce a vyšší příjem energie KMM často snižuje);
- příjem proteinu degradovatelného a nedegradovatelného v bacheru;
- příjem vody a sušiny v krmné dávce (při dehydrataci organismu lze očekávat vyšší hladiny močoviny);

- zdravotní stav, zvláště funkčnost jater a ledvin;
- některá onemocnění;
- pastva (vyšší obsah močoviny na pastvě);
- doba odebrání vzorků mléka (ve smyslu intervalu mezi krmením a odběrem);
- fyziologické faktory laktace (Hanuš a kol., 1993; Jílek a kol., 2006).

Koncentrace močoviny v mléce (KMM) je tedy respektovaným ukazatelem zdravotního a výživového stavu dojníc (Baker a kol., 1995). Je ve vztahu k jejich reprodukci (Butler a kol., 1996), dlouhověkosti (Hanuš a kol., 2000) a technologickým ukazatelům mléka (Kirst a kol., 1985; Hanuš a kol., 1993), které ve vyšší koncentraci pravidelně zhoršuje.

Existuje mnoho principů analýz KMM s různou věrohodností výsledků. V laboratorní praxi z těchto důvodů byla zaznamenána řada disproporcí. Proto jsou zdroje variability výsledků studovány. V ČR se provádí analýzy vzorků mléka na močovinu jednak ze vzorků určených pro kontrolu mléčné užitkovosti a dále ze vzorků bazénových, určených ke stanovení jakostních ukazatelů mléka. Výsledky využívají zootechnici, veterináři a poradci ve výživě.

Z používaných analytických metod připadají v úvahu metody přímé (Rajamäki a Rauramaa, 1984; Oltner a kol., 1985), zejména specifické (ureolytické diferenční jako např. AFNOR (Lefier, 1999; Francie) Eurochem (Itálie), Chemspec (Broutin, 2000, 2006 a, b; Bentley Instruments, USA) nebo enzymaticko-konduktometrická metoda UREAKVANT (Ficnar, 1997; Hanuš a kol., 1995, 1997, 2001; Klopčič a kol., 1999; ČR) a nepřímé jako MIR (Herre, 1998) a zejména MIR-FT (Peterson a kol., 2004).

Zatímco dřívější pojetí analýz v MIR technologii mělo značné problémy s věrohodností výsledků, řešení MIR-FT přineslo významné zlepšení věrohodnosti, např. vzrůstem

**Tab. 1** Modifikace u vzorků syrového kravského mléka v pozici referenčních standardů pro kalibrace nebo kontrolních vzorků pro výkonnostní testy k vytvoření potřebné hodnotové škály (variačního rozpětí) u metod MIR a zejména MIR-FT v Národní referenční laboratoři pro syrové mléko Rapotín.

Měřená složka mléka	Referenční vzorky (kalibrace)	Kontrolní vzorky (výkonnostní test)	Způsob modifikace a validovaný zdroj postupu
Tuk	Ano	Ano	Snížení odstátím mléka (spodní objem). Snižování ředěním mléka kompozicí specifického roztoku. Zvýšení odstátím mléka (horní objem). * 2010 a 2011.
Hrubé bílkoviny	Ano	Ano	Snižování ředěním mléka kompozicí specifického roztoku. Zvýšení výběrem specifického stáda dojníc s dobrou výživou energií. Mírné zvýšení odstátím mléka (spodní objem). * 2010 a 2011.
Kasein	Ano	Ano	Snižování ředěním mléka kompozicí specifického roztoku. Zvýšení výběrem specifického stáda dojníc s dobrou výživou energií. Mírné zvýšení odstátím mléka (spodní objem). * 2010 d, 2011.
Laktóza	Ano	Ano	Snižování ředěním mléka kompozicí specifického roztoku. Mírné zvýšení odstátím mléka (spodní objem). * 2010 a 2011.
Sušina tukuprostá	Ano	Ano	Snižování ředěním mléka kompozicí specifického roztoku. Zvýšení výběrem specifického stáda dojníc s dobrou výživou energií. Mírné zvýšení odstátím mléka (spodní objem). * 2010 a 2011.
Močovina	Ne	Ano	Zvýšení umělým přídavkem (jen MIR-FT). Mírné zvýšení odstátím mléka (spodní objem). * 1995, 1997, 2001, 2008 b, 2009 a, 2011; Hering et al., 2008.
Kyselina citrónová	Ano	Ne	Zvýšení umělým přídavkem (jen MIR-FT). * 2009 b.
Volné mastné kyseliny	Ano	Ne	Zvýšení mechanickou námahou mléka a výběrem specifického stáda s nedostatečnou výživou krav energií. * 2008 a, c, 2009 c. Genčurová et al., 2009.
Bod mrznutí mléka	Ne	Ano	Snižování přídavkem NaCl do vzorků vody. Zvýšení přídavkem vody do vzorků mléka. * 2009 a, 2010 a.
Aceton	Ano	Ano	Zvýšení výběrem specifického stáda a krav s nedostatečnou výživou energií v počátku laktace. * 2011 a, c.

\* Hanuš a kol.

specifity ve smyslu zlepšení recovery s ohledem na umělé přísady močovin. Existuje však více používaných metod vhodné úpravy hodnot v referenčních vzorcích pro potřeby kalibrace a kontroly metod MIR a MIR-FT při stanovení různých analytů v mléce (Tab. 1).

## Stanovení a interpretace volných mastných kyselin (VMK) v mléce

Malý podíl mastných kyselin v mléce, které nejsou esterifikovány v triglyceridech, je volně rozptýlen hlavně v tukové a mírně ve vodné fázi a je označován za volné mastné kyseliny (VMK). Běžný obsah VMK u mléčného tuku leží mezi 0,5 až 1,2 mmol.100 g<sup>-1</sup>, maximální povolený je 13,0 mmol.kg<sup>-1</sup> pro metodu stlukem nebo 32,0 mmol.kg<sup>-1</sup> pro metodu extrakčně-titrační (ČSN 57 0529). Gerberova acidobutyrometrická metoda zachycuje až 90 % obsahu VMK do tukového podílu mléka, naopak extrakčně-gravimetrická metoda podle Roese-Gottlieba VMK do tukového podílu nezahrnuje tak spolehlivě, resp. ztrácí jich až 70 % (Kerkhoff Mogot a kol., 1982).

Zvýšení VMK znamená negativní vlivy typu lipolýzy, obvykle z důvodů metabolických problémů dojnice. Zvýšená koncentrace VMK způsobuje zhoršení technologických vlastností mléka (Vyletěllová a kol., 2000), ale hlavně zhoršení smyslových (senzorických) vlastností mléka, chuti a vůně. Uvedené má za následek nahořklou pachutí, jež může poškodit kvalitu mlékařenských výrobků. Destrukce tuku je jevem způsobeným v mléce přirozenými enzymy (lipázami) nebo lipázami dodanými bakteriální kontaminací mléka. Lipolýza je proto spontánní nebo indukovaná. Lipázy přitom mohou být termorezistentní a projevit se tak i po tepelném ošetření mléka rozkladem mlékařenských výrobků. Nešetrné zacházení s mlékem, jako časté čerpání a čeření při manipulaci a namrzání, navozuje rovněž vlastní lipolýzu. Dodaná energie tepelná nebo mechanická do multikomponentního systému mléka porušuje blány tukových kapének a uvolňuje mastné kyseliny z esterické vazby triglyceridu. Proto proud mléka by neměl přesáhnout rychlost 1 až 1,5 m.s<sup>-1</sup>. Nedostatečná hygiena ustájení a dojení krav, stejně jako špatné uložení a ošetření syrového mléka, mohou vést k pomnožení nežádoucí psychrotrofní, termorezistentní a sporulující mléčné mikroflóry. Uvedené může zvýšit intenzitu lipolýzy.

VMK, směs lipolýzou uvolněných mastných kyselin z mléčného tuku nebo přešlých z krve poměrově ovlivnitelná výživou zvířat, sezónou nebo jejich zdravotním stavem, je analyticky a tím molárně těžko uchopitelná, vyjádřitelná nebo interpretovatelná. Analyticky se jedná o výsledek titru roztokem alkálie, který není v konstantním poměru k molárním koncentracím jednotlivých mastných kyselin. Jako konvenční interpretace však tento způsob vyjádření dobře vyhovuje praktickým mlékařským účelům. Hodnoty VMK mohou posloužit ke kontrole zdravotního stavu dojníc nebo kvality syrového mléka s ohledem na kvalitu a udržitelnost následných mléčných výrobků. Referenčními

a rutinními metodami analýzy VMK mohou být tzv. metoda extrakčně-titrační, stluková, BDI nebo MIR a MIR-FT.

Metoda MIR-FT je současně studována jako použitelná ke kalibraci a měření i s ohledem na stanovení hlavních nasycených a nenasycených mastných kyselin a jejich poměru v mléčném tuku (hodnocení stupně jeho nenasycenosti) pro možnost hodnocení zdravotní prospěšnosti mléka, mléčných výrobků, resp. mléčného tuku jako potravin (Soyeurt a kol., 2006).

## Stanovení a interpretace ketonů v mléce

Ketóza reprezentuje metabolické onemocnění, které se vyskytuje hlavně u vysoce produktivních dojníc. Základní problém ketóz spočívá v deficitu glukosy v krvi a tkáních, který spolu s nedostatkem vhodných uhlovodíků v krmné dávce vede k odbourávání lipidů v játrech. Zvýšený metabolismus jater vede ke zvýšení hladin vedlejších produktů - ketoláték v krevním séru a následně i v mléce dojnice. Obsah ketoláték (acetonu, acetoacetátu a BHB (betahydroxybutyrátu)) v individuálních vzorcích mléka je indikátorem zdravotního stavu dojníc po porodu a v první třetině laktace ve smyslu výskytu produkčního onemocnění, ketóz. Ketózy jsou, v období vzniku negativní energetické bilance po otelení, způsobené vyšším výdejem živin laktací z organismu oproti nižšímu přívodu. Jsou charakterizovány odbouráváním tělesných energetických (především tukových) rezerv. Tento jev může vést až k poklesu metabolické funkce jater, ale průběžně také ke vzrůstu obsahu ketonových látek v tělních tekutinách. Některé ketony mohou být dále metabolizovány, jiné (např. aceton) odcházejí z organismu zpravidla močí, dechem, potem a mlékem. Ketóza vzniká především u dojníc s vysokou dojivostí a vykazuje plíživý charakter nástupu a setrvačnost průběhu. V průběhu ketóz je redukována dojivost i obranyschopnost (riziko zvýšeného výskytu nových mastitidních infekcí) a zhoršena plodnost krav. Kromě dalších příznaků může onemocnění vyústit i v úhyn zvířete. Léčba je nezbytná, avšak s důsledky všech ztrát nákladná. Názory na kritickou diskriminační hodnotu obsahu acetonu v mléce, resp. limit pro určení subklinické ketózy se značně různí od 4 do 40 mg/l (Unglaub, 1983; Andersson a Emanuelson, 1985; Gravert a kol., 1986; Gustafsson a Emanuelson, 1993; Hanuš, 1994). Obě mezní hodnoty se však jeví být přehnané, nad-, resp. podhodnocené. Na základě předchozích výsledků (Hanus, 1994; Hanuš a kol., 1999) lze považovat za diskriminační hladiny pro odhad subklinické ketózy přibližně následující limity: Ketophan (ketony v moči) >3+ (> 7,5 mmol/l); Ketotest (ketony v mléce) >2+ (> 15 mg/l); aceton v mléce > 10 mg/l. Hladina acetonu je také ovlivnitelná sezónou nebo konzervovanými objemnými krmivy. Prevence zlepšením výživy je efektivnější cestou eliminace výskytu ketóz než léčba. Součástí prevence je monitoring stavu dojníc po otelení, ke kterému slouží právě stanovení koncentrace ketoláték nebo acetonu v tělních tekutinách.

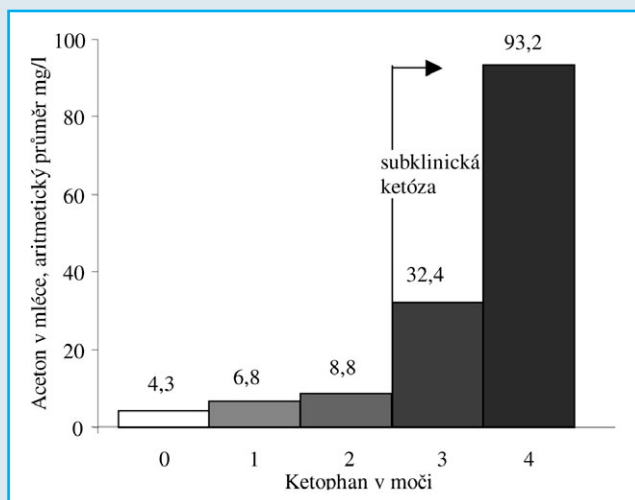
Kvalita mléka od dojníc s metabolickými problémy je zhoršena. V subklinických případech takové mléko nelze ve

stáji z dodávky rutinně vyřazovat, na rozdíl od subklinických mastitid. Bez této možnosti eliminace se dostává do mlékárny. Zde může metabolicky zatížené mléko ohrožovat kvalitu průběhu zpracovatelských technologií. Korelace acetonu k jogurtovému testu činila -0,21 (Hanuš a kol., 1993). Byla však spíše dána souběžně změněnými ostatními vlastnostmi mléka, než samotnou zvýšenou koncentrací acetonu.

Popisované metody stanovení ketonů nebo acetonu v mléce jsou nejčastěji fotometrické metody, MIR-FT, ale také různé semikvantitativní stájové testy, včetně možnosti konstrukce biosenzoru na bázi Clarkova kyslíkového článku pro determinaci beta-hydroxybutyrátu (Jílek, 2008).

Za předpokladu platnosti vztahů uvedených v pracích Andersson (1984, 1988), Andersson a Lundström (1984 a, b), Andersson a Emanuelson (1985) a Vojtíšek (1986) lze z výsledků odhadovat, že poměr mezi obsahy acetonu v mléce a moči, daný fyziologicko-patologickými principy a jejich vzájemnými poměrovými kombinacemi může být, v závislosti na zdravotním stavu organismu, cca 1 : 10 až 1 : 35. Uvedené, při limitu subklinické ketózy 10 mg/l acetonu v mléce, odpovídá 100 až 350 mg/l acetonu v moči. Tolikrát nižší koncentrace v mléce je specifickým konstrukčně-technologickým problémem pro dosažení potřebné citlivosti mléčných testů pro ketózy, resp. na ketony nebo aceton. Proto mnohé snahy o získání takové citlivosti nebyly úspěšné s výjimkou několika málo diagnostik. V případě Ketotestu bylo nezbytné vyvést barevnou nitroprusidovou reakci zamlženou v koloidním roztoku mléka na pevný podklad pro její zvýraznění a zviditelnění. Toho bylo mimo jiné dosaženo precipitací mléčných proteinů na povrchu reakční směsi reagentie a plnidla s mlékem (Jílek, 1999). Aby byl poskytnut efektivní diagnostický prostředek, byl vyvinut mléčný test Ketotest pro usnadnění monitoringu a řízení prevence ketóz. Cílem bylo usnadnit identifikaci subklinické ketózy. Korelace mezi výsledky stanovení ketonů Ketophanem (Obr. 1) v moči a Ketotestem v mléce identických krav činila 0,87 (Hanuš a kol., 1999, 2001; Obr. 2). Rozdíly hladin acetonu v mléce podle tříd Ketotestu v mléce (ketony) od 0 do 4 byly ve všech

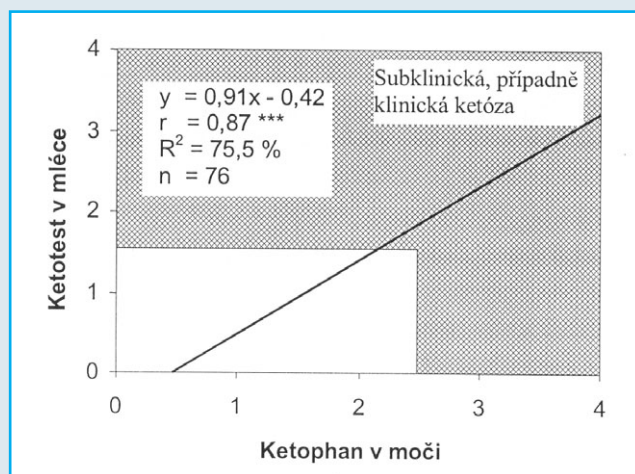
**Obr 1** Obsahy acetonu v mléce pro jednotlivé třídy reakce Ketophanu v moči



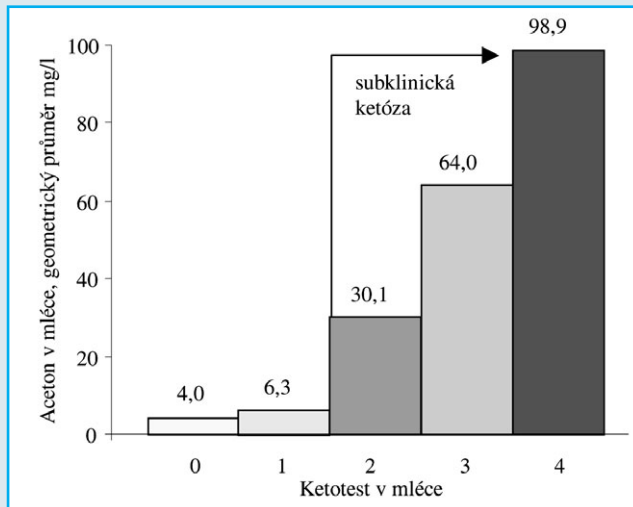
kombinacích vysoce významné a činily:  $4,9 \pm 3,4$  mg/l;  $10,0 \pm 7,7$ ;  $32,5 \pm 10,9$ ;  $67,2 \pm 23,7$ ;  $111,3 \pm 51,7$ . V hodnotách geometrických průměrů to bylo: 4,0 mg/l; 6,3; 30,0; 64,0; 98,9 (Obr. 3). Výsledky potvrdily dobrou diagnostickou účinnost Ketotestu. Použití operativní semikvantitativní metody může vést při organizaci prevence, případně vhodných nápravných opatření ve výživě, nesporně k podpoře zdravotního stavu dojníc, zlepšení jejich reprodukčních vlastností a zajištění vyšší kvality syrového mléka jako potravinářské suroviny. Enjalbert a kol. (2001) uvedli, že určení beta-hydroxybutyrátu v mléce enzymatickou analýzou nebo proužkovým testem Ketolac poskytuje hodnotné výsledky s prahovou koncentrací 70 až 100 mikromol/l. Kladně hodnotili praktickou jednoduchost Ketolacu.

Možnost metod MIR-FT je sice pro ketony uváděna, spolehlivost je však zatím předmětem diskusí. V současné době se příslušné kalibrace testují (van Kneysel a kol., 2010). Roos a kol. (2006) hodnotili na základě odečtu acetonu, acet-acetátu a beta-hydroxybutyrátu v individuálních vzorcích mléka pomocí kalibrované infračervené metody MilkoScan FT 6000 (MIR-FT) sensitivitu (70 %), specifitu (95 %) a procento falešně pozitivních (27 %) a falešně negativních (7 %) odečtů s ohledem na schopnost metody k identifikaci stavu subklinické ketózy dojníc. Použitelnost stádového kontrolního programu je nejvíce ovlivněna citlivostí a pozitivní predikční hodnotou testu stejně jako náklady na test. Výzkum aplikace metody byl označen za ještě vhodný pro praktický monitoring onemocnění. Uvedená čísla by však bylo potřebné zlepšit vývojem účinnější metody. Postup vhodné modifikace kalibrace MIR-FT (jak vytvořit kalibrační sadu s relevantním variačním rozpětím pro docílení přijatelných statistických charakteristik kalibrace, zda na mléce nativním a jak toto selektovat nebo s umělými přísadami ketonů, jak kontrolovat opakovatelnost a recovery, specifikovat a limitovat přijatelné statistické parametry kalibrace) by stále ještě měl být předmětem dalšího výzkumu pro možné zvýšení efektivity. Práci s identifikací acetonu v mléce nebo ketózy u zvířat

**Obr 2** Vztah mezi výsledky stanovení ketonů Ketophanem v moči a Ketotestem v mléce identických krav ( $r = 0,87$ ;  $P < 0,001$ ).



**Obr 3** Obsahy acetonu v mléce pro jednotlivé třídy reakce Ketotestu v mléce.



pomocí kalibrované infračervené spektroskopie na principu MIR-FT provedl rovněž Hansen (1999), který zjistil u vzorků kolísajících od 0 do 2,8 mM acetonu a při koeficientu determinace 0,81 a správnosti 0,27 mM uspokojivou přesnost pro klasifikaci dojníc do dvou skupin, zdravá a pravděpodobně ketózní. Podobně Heuer a kol. (2001), zde byl zjištěn treshold (práh) pro subklinickou ketózu v hodnotě od 0,4 do 1,0 mM.

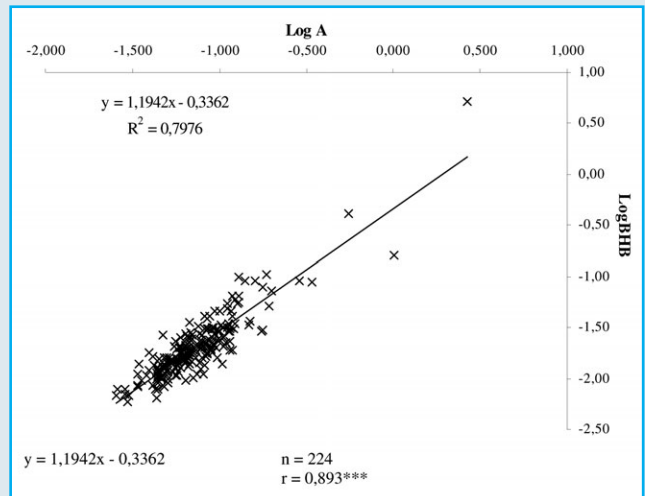
V namátkově vybrané stáji, v individuálních vzorcích mléka, byla stanovena koncentrace ketonů (A aceton, BHB betahydroxybutyrát) v log jednotkách na zařízení Foss 6000 FT technologií MIR-FT, bez referenčních výsledků, na stávajících hladinách kalibrace. Na Obr. 4 je výsledek lineární regrese mezi hodnotami log A a log BHB. Byl zjištěn vysoký a také vysoce významný korelační koeficient 0,893 ( $P < 0,001$ ) pro 224 párových měření vzorků mléka (krav). Hodnota ukazuje, že 79,8 % variability v BHB je vysvětlitelných variabilitou v A. Uvedené potvrzuje logický fakt, že se vzrůstající ketózou u dojníc vzrůstají souběžně koncentrace všech ketonů v tělních tekutinách. Výsledek však nevypovídá o vztahu k referenční metodě. Ten je teprve prověřován. Také nelze usuzovat na prakticky použitelné identifikační limity pro ketózu nebo vztahy těchto hodnot k případným limitům. Výsledek je zatím pouze informací o trendech ketonů v prověřovaném souboru dojníc.

## Shrnutí a závěr

Relativní variabilita individuálních rozdílů při kalibraci (MIR i MIR-FT) pro majoritní složky mléka jako tuk, bílkoviny a laktózu dohromady a minoritní složky jako močovinu, kyselinu citrónovou a obsah volných mastných kyselin (VMK) byla odhadnuta na 1,00 a 6,12 %, 7,20 a 34,40 %. Metody nepřímého stanovení minoritních složek mléka (MIR-FT, případně MIR) byly pak označeny za vhodné screeningové postupy pro účely monitoringu zdravotního stavu krav, včetně stanovení VMK.

Ačkoliv je mléko, jako multikomponentní systém, velmi náročné na simultánní nepřímou analýzu složek (zejména

**Obr 4** Vztah mezi výsledky určení ketonů ve vybrané stáji metodou MIR-FT (Foss 6000 FT).



z hlediska konstrukce metody a provedení relevantních kalibrací), také pro četné možné interferenční efekty mléčné matrice (především z hlediska eliminace interference a tzv. "očistění" signálu), lze v současné době velmi dobře docílit věrohodných výsledků majoritních složek mléka. Slibné (věrohodné a prakticky interpretovatelné) výsledky však mohou zajistit i některé systémy infraanalýzy, především MIR-FT, také u vybraných, prakticky důležitých složek minoritních jako močovina, kyselina citrónová, volné mastné kyseliny nebo případy ketony.

*Použitá literatura je dostupná u autorů příspěvku.*

*Příspěvek byl podporován prostředky vzdělávacího projektu MŠMT-CZ.1.07/2.3.00/09.0081 a aktivitami Národní referenční laboratoře pro syrové mléko Rapotín.*

*Přijato do tisku 11. 4. 2011*

## BIOFILMY A HYGIENA VÝROBY V MLÉKÁRENSKÝCH PROVOZECH

**Gabriela Kunová<sup>1</sup>, Marta Pechačová<sup>2</sup>, Zoran Jaglič<sup>3</sup>, Jarmila Pazlarová<sup>4</sup>, Petr Roubal<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>- MILCOM a.s.

<sup>2</sup>- Výzkumný ústav mlékárenský s r.o.

<sup>3</sup>- Výzkumný ústav veterinárního lékařství Brno, v.v.i.

<sup>4</sup>- Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

### Biofilms and hygiene in milk processing plants

#### Abstrakt

Jedním z nejčastějších problémů, se kterým se mlékaři potýkají, je problém tvorby biofilmů na povrchu technologických zařízení. V rámci řešení výzkumního projektu MŠMT 2B08074 a záměru 2672286101 byla vypracována certifikovaná metodika 2010/5365/SVS pod názvem Detekce a určení kritických míst výskytu biofilmů v mlé-