

Většina výrobků, testovaných SPP v roce 2013, obsahovala deklarované mikroorganismy, počty živých bakterií byly však v některých případech nižší.

Na základě výsledků realizovaných testů uděluje SPP výrobcům právo používat logo společnosti (Obr. 4).

Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory NAZV v rámci grantu QJ1210093 - Nové metody pro výrobu, kontrolu kvality a účinků probiotických potravin.

Literatura

- ISO 29981:2010 (IDF 220: 2010). Milk products - Enumeration of presumptive bifidobacteria - Colony count technique at 37 degrees C.
- ISO 20128:2006 (IDF 192: 2006). Milk products - Enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a selective medium - Colony count technique at 37 degrees C.
- Champagne C.P., Roy D., Lafond A. (1997): Selective enumeration of *Lactobacillus casei* in yoghurt-type fermented milks based on a 15°C incubation temperature. *Biotechnology Techniques* 8, 567-569.
- Gevers D., Huys G., Swings J. (2001): Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 205, 31-36.
- Kaur I.P., Chopra K., Saini A. (2002): Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 15, 1-9.
- Klaenhammer T.R., Kullen M.J. (1999): Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 50, 45-57.
- Kmet V., Drugdova Z. (2012): Antimicrobial susceptibility of microflora from ovine cheese. *Folia Microbiologica*, 57, 291-293.
- Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R. (2003): Genus and species-specific PCR primers for the detection and identification of bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 4, 61-69.
- Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J., Mattila-Sandholm T. (2000): Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* 84, 197-215.
- Vinderola C.G., Reinheimer J.A. (2000): Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic acid starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal* 10, 271-275.

Pozn.: Další literatura je k dispozici u autorů.

Přijato do tisku: 6. 5. 2013

Lektorováno: 22. 6. 2013

STANOVENÍ LAKTOSY V MLÉČNÝCH MATERIÁLECH S UPRAVENÝM OBSAHEM MLÉČNÉ SUŠINY METODOU HPLC

Borková Markéta¹, Marková Marie¹, Mošnová Romana², Elich Ondřej¹

¹ Výzkumný ústav mlékařenský s.r.o., Praha

² MILCOM a.s., Praha

Determination of lactose in dairy materials with modified milk dry matter content by HPLC

Abstrakt

Laktosa byla v mléčných materiálech s upraveným obsahem mléčné sušiny stanovena technikou vysokoučinné

kapalinové chromatografie na koloně Phenomenex Luna NH₂ s refraktometrickou detekcí. Kvantifikace laktosy byla provedena metodou přidavku vnitřního standardu monohydrátu D(+)-melezitose.

Podrobněji byl sledován vliv navýšení obsahu mléčných bílkovin v mléčném vzorku přidavkem tekutých mléčných retentátů, sušeného nízkotučného a plnotučného mléka na obsah laktosy ve vzorku. V případě tekutých retentátů nebyl zaznamenán významný rozdíl v obsahu laktosy. Přidavkem sušeného mléka se obsah laktosy zvýšil z původních 4,65 g/100 g na 4,93 až 5,66 g/100 g. Výsledky stanovení laktosy technikou HPLC odpovídaly předpokládanému obsahu laktosy vypočtenému z hmotnostní bilance výchozí suroviny a jednotlivých přidavků. Získané výsledky potvrdily, že metoda HPLC je vhodná pro stanovení laktosy v mléčných maticích s upraveným obsahem mléčné sušiny.

Klíčová slova: laktosa, HPLC, bílkovinné koncentráty

Abstract

Lactose in milk material with modified milk dry matter content was determined using high pressure liquid chromatography on Phenomenex Luna NH₂ column with refractometric detection. Quantification of lactose was performed by addition of the monohydrate D(+)-melezitose internal standard.

The effect of increase of milk proteins content in milk sample by addition liquid milk retentates, dried skim and whole milk for lactose content of the sample was followed in great detail.

In the case of liquid retentate wasn't observed significant difference in the content of lactose. The content of lactose was increased by addition of dried milk from original 4.65 g/100 g to 4.93 up to 5.66 g/100 g. The results of determination of lactose by HPLC were similar as presumed content of lactose calculated from the mass balance of individual portions. The results verified that the method is suitable for HPLC determination of lactose in dairy materials with modified milk dry matter content.

Keywords: lactose, HPLC, protein concentrates

Úvod

V současné době je v mlékařenském průmyslu patrný trend vývoje nových výrobků, u kterých jsou uplatňovány zdokonalené a nové prvky technologie (např. ultrafiltrace), při kterých dochází ke změně složení obsahu složek mléčné sušiny vstupní suroviny. S tímto rozvíjejícím se trendem zavádění nových mléčných produktů obohacených o jednotlivé složky mléčné sušiny, je nutností zavést a optimalizovat vhodné metody pro stanovení jednotlivých složek mléčné sušiny, které nejsou rušeny změnou matrice vzorku.

V praxi se často používá navýšení obsahu mléčných bílkovin v mléčné matici, a proto byla pozornost zaměřena zejména na vliv přidavku mléčné bílkoviny na obsah laktosy ve finálním produktu. Přidavek bílkovinné složky do vstupní suroviny na výrobu mléčných výrobků může být

realizován přidavkem bílkovinných koncentrátů ve formě sušených preparátů nebo může být vstupní surovina obohacována tekutými produkty z membránových procesů, jako jsou retentáty, s vyšším obsahem bílkovin. Úpravou vstupního vzorku může podle typu použitého bílkovinného koncentráta docházet nejenom k požadované změně obsahu bílkovin, ale také ostatních složek mléčné sušiny včetně laktosy. Tato změna může být nežádoucí, zejména s ohledem na navýšení obsahu laktosy a často se vyskytující laktosovou intoleranci.

Správnost rutinně používaného IR stanovení laktosy v mléčných vzorcích může být významně ovlivněna změnou matrice vzorku. Problematika vhodně a ověřené metody, která není rušena změnou matrice vzorku, pro stanovení obsahu laktosy v mléce a mléčných matricích je důležitá zejména pro kontrolu kvality, a to nejenom vstupní suroviny, v mlékárenském průmyslu. Cílem práce proto bylo testování a optimalizace stanovení laktosy technikou vysokoúčinné kapalínové chromatografie v mléce a v mléčných materiálech se změněným obsahem složek mléčné sušiny.

Materiál a metodika

Použitý materiál

Pasterované odstředěné (dále OM), plnotučné mléko (dále PM) a smetana, bazénové vzorky odebrané v Bohušovické mlékárně, a.s.

Sušené mléko Bohemilk nízkotučné (5 % tuku, dále SNM) a plnotučné (26 % tuku, dále SPM).

Bílkovinný koncentrát LR 85FC (76,4 % bílkoviny).

Retentáty RO z mlékárny OLMA a.s. a RB z Bohušovické mlékárny, a.s. (připraveny ultrafiltrací, koncentrace laktosy a bílkoviny viz Tab. IV).

Referenční materiál muva-RO-0717 (zmrazené syrové mléko), Muva Kempten, doba expirace leden 2013.

Určení základního složení mléčných vzorků

Stanovení obsahu tuku, bílkovin, laktosy a celkové sušiny (TS) bylo provedeno na přístroji Milkoscan FT 2.

Stanovení celkových bílkovin bylo provedeno podle normy ČSN 57 530.

Stanovení laktosy enzymaticky

Obsah laktosy byl stanoven podle IDF 79B:1991 za použití kitu od firmy Megazyme.

Stanovení laktosy metodou HPLC

Vzorek mléka (přibližně 3 g tekutého a 0,3 g sušeného mléka) byl navážen s přesností na 1 mg do 10 ml odměrné baňky. Ke vzorku byl přidán 2 ml standardu vnitřního standardu D(+)-melezitosy a 3 ml deionizované vody. Vzorek byl 15 min zahříván a průběžně míchán na vodní lázni o teplotě 50 °C. Po vytemperování na laboratorní teplotu bylo přidáno srážecí činidlo (0,5 ml roztoku Carrez I a 0,5 ml roztoku Carrez II), směs byla doplněna po rysku a promíchána. Obsah baňky byl zfiltrován přes skládaný

filtr a membránový filtr PVDF (0,45 μm) a takto upravený vzorek analyzován na HPLC.

Obsah laktosy byl stanoven na koloně Phenomenex Luna 5μ NH₂ (250 x 4,6 mm) za izokratických podmínek s mobilní fází acetonitril a deionizovaná voda (75:25, v:v) o průtoku 1,25 ml/min za použití refraktometrické detekce. Teplota kolony byla 35 °C, nástřik vzorku 10 μl a doba analýzy 20 min.

Výsledky a diskuse

Nejčastěji používané metody pro stanovení laktosy jsou metody titrační, biochemické (enzymatické) a instrumentální (infračervená spektroskopie a chromatografické metody) (Cvak a kol., 1992). Pro stanovení laktosy v mléce a mléčných materiálech se změněným obsahem složek mléčné sušiny byla zvolena technika HPLC s refraktometrickou detekcí. Tato technika je obecně považována za metodu rychlou a ekonomickou a její významnou výhodou je možnost souběžného vyhodnocení i dalších přítomných sacharidů.

Ke stanovení laktosy technikou HPLC se běžně používají kolony ionexové nebo na bázi silikagelu s vázanými aminoskupinami (Ferreira a kol., 1998; Chávez-Servín a kol., 2004; Schuster-Wolf-Bühning a kol., 2011). Vhodnost kolony Phenomenex Luna NH₂ byla testována na směsném roztoku standardu monohydrátu α-laktosy (20 mg/ml) a monohydrátu D(+)-melezitosy (50 mg/ml). Stanoven byl optimální průtok a složení mobilní fáze. Složení mobilní fáze bylo testováno v poměru 60:40 (acetonitril:voda), 70:30, 75:25 a 80:20 a optimální průtok v rozsahu 1,0 až 1,6 ml/min. Jako optimální z hlediska účinku separace laktosy a melezitosy a doby analýzy bylo zvoleno složení mobilní fáze 75:25 (acetonitril:voda) a průtok 1,25 ml/min. Mez detekce laktosy byla stanovena 1,74 mg/ml (při nástřiku 10 μl). Protože refraktometrická detekce má také svá omezení jako je relativně nízká citlivost, nemožnost použití gradientové eluce, velká citlivost detektoru na změny teploty a rychlosti průtoku mobilní fáze, byl pro zlepšení přesnosti stanovení a snížení vlivu vnějších podmínek na stanovení použit přidavek vnitřního standardu monohydrátu D(+)-melezitosy (podle postupu ČSN ISO 22662).

Pro vzorky pasterovaného, odstředěného mléka a mléka sušeného nízkotučného a plnotučného byla stanovena opakovatelnost stanovení laktosy z deseti individuálních stanovení jednoho typu vzorku. Výpočet opakovatelnosti byl proveden jednak pro výsledky stanovení bez korekce na vnitřní standard melezitosy, tak s korekcí na vnitřní standard (Tabulka I). S vyhodnocením obsahu laktosy pomocí vnitřního standardu došlo k očekávanému významnému zpřesnění stanovení, které se projevilo snížením hodnoty RSD (Tabulka I).

Mléčné vzorky, které byly použity pro stanovení opakovatelnosti byly zároveň podrobeny analýze na IR analyzátoru FT 2 (Tabulka II). Největší rozdíl mezi průměrnými hodnotami koncentrace laktosy naměřené IR analyzáto-

Tab. I Opakovatelnost stanovení laktosy technikou HPLC pro pasterované (PM), odstředěné (OM), sušené nízkotučné (SNM) a sušené plnotučné mléko (SPM)

Vzorek	PM		OM		SNM		SPM	
	-	s IS	-	s IS	-	s IS	-	s IS
Průměr (g/100 g)	4,75	4,65	5,00	4,96	49,0	48,9	39,5	38,8
SMODCH (g/100 g) ^a	0,06	0,05	0,05	0,03	0,48	0,29	0,39	0,19
RSD ^b	1,36	1,10	0,93	0,60	0,99	0,59	0,99	0,49

^a SMODCH je směrodatná odchylka deseti individuálních stanovení.

^b RSD je relativní směrodatná odchylka.

a technikou HPLC s použitím vnitřního standardu pro tekutá mléka, byl zjištěn ve vzorku odstředěného mléka a to 0,04 g/100 g. U sušeného mléka byl největší rozdíl mezi metodami zjištěn u mléka nízkotučného a to o 1,1 g/100 g. Správnost stanovení obsahu laktosy ve vzorku nízkotučného sušeného mléka byla ověřena referenční enzymatickou metodou (viz Metody a postupy) a výsledná hodnota obsahu laktosy 48,8 g/100 g se lišila od HPLC stanovení pouze o 0,1 g laktosy na 100 g vzorku.

Tab. II Stanovení laktosy IR analyzátozem FT 2 a technikou HPLC ve vzorcích pasterovaného (PM), odstředěného (OM), sušené nízkotučného (SNM) a sušeného plnotučného mléka (SPM)

Vzorek	PM g/100g	OM g/100g	SNM g/100g	SPM g/100g
HPLC	4,65	4,96	48,9	38,8
IR ^a	4,66	5,00	50,0	39,0

^a Výsledky jsou průměrem ze dvou stanovení.

Správnost stanovení HPLC metody byla dále ověřena analýzou referenčního materiálu zmrazeného syrového mléka od firmy Muva Kempen. Deklarovaná hodnota koncentrace laktosy v referenčním materiálu muva-RO-0717 byla 4,730 ± 0,054 g/100 g. Průměrná experimentálně stanovená hodnota obsahu laktosy v referenčním materiálu 4,70 g/100 g (s korekcí na IS, čtyři paralelní stanovení) potvrdila, že zavedená metoda poskytuje správné výsledky. Byla vypočítána hodnota rozšířené kombinované nejistoty

Tab. III Obsah tuku, bílkoviny a celkové sušiny stanovené IR a laktosy stanovené IR a HPLC v mléčných směsích s upraveným obsahem mléčné sušiny

Vzorek	Pasterované mléko			Laktosa		
	tuk g/100 g	bílkovina g/100 g	celk. sušina g/100 g	HPLC g/100g	IR g/100g	přídavek na 1000 ml mléka
1	2,52	3,73	11,73	4,80	4,88	bílk. konc. 1 (6,5 g)
2	2,96	3,51	11,94	4,72	4,79	bílk. konc. 1 (4 g)
3	3,16	3,40	12,07	4,77	4,77	bílk. konc. 1 (3 g)
4	3,49	3,20	12,31	4,97	4,93	laktosa (3 g)
5	4,41	3,01	12,53	4,43	4,39	demi. voda (50 ml)
6	5,01	2,84	12,70	4,18	4,12	demi. voda (125 ml)

Vzorek	Odstředěné mléko			Laktosa		
	tuk g/100 g	bílkovina g/100 g	celk. sušina g/100 g	HPLC g/100g	IR g/100g	přídavek na 1000 ml mléka
7	0,05	3,06	8,42	4,73	4,77	demi. voda (50 ml)
8	0,14	3,33	9,33	5,13	5,17	SNM (4 g)

Výsledky jsou průměrem ze dvou stanovení.

měření 0,093 g laktosy/100 g vzorku z výsledků měření referenčního materiálu s přidavkem vnitřního standardu a jeho udávaných referenčních hodnot.

V modelových vzorcích pasterovaného a odstředěného mléka s upraveným obsahem mléčné sušiny byl stanoven obsah laktosy. Na přípravu modelových vzorků byly použity vzorky pasterovaného mléka různé tučnosti upravené mícháním odstředěného a plnotučného mléka a smetany. Modelové vzorky byly upraveny na tučnost v rozsahu 2,5 až 5,0 g tuku/100 g vzorku. Mléčná sušina vzorků byla dále upravena přidavkem bílkoviny (bílkovinný koncentrát viz Materiál a metody), laktosy a demineralizované vody (Tabulka III). V Tabulce III jsou uvedeny obsahy tuku, bílkoviny a celkové sušiny připravených modelových vzorků stanovené na IR analyzátozem FT 2. Stanovení laktosy u těchto vzorků bylo provedeno souběžně na IR analyzátozem FT 2 a technikou HPLC (Tabulka III). Mezi oběma technikami byla zjištěna dobrá shoda výsledků, kdy nebyl překročen rozdíl v obsahu laktosy u jednotlivých vzorků o 0,08 g/100 g pro pasterované a odstředěné mléko.

Za účelem optimalizace přípravy mléčných materiálů s navýšeným obsahem bílkoviny v sušině byl vyzkoušen přídavek tekutých retentátů RB a RO a sušeného nízkotučného a plnotučného mléka. Použito bylo pasterované mléko (Tabulka I), ke kterému byl přimíchán přídavek RB, RO, SNM a SPM tak, aby v namíchané směsi byl obsah bílkovin

Tab. IV Obsah bílkoviny a laktosy v původním pasterovaném mléce (PM), retentátech (RB a RO) a sušeném nízkotučném (SNM) a plnotučném mléce (SPM)

Vzorek	PM g/100g	RB g/100g	RO g/100g	SNM g/100g	SPM g/100g
Bílkovina ^a	3,12	6,09	9,99	34,2	28,9
Laktosa	PM	RB	RO	SNM	SPM
HPLC	4,65 ^b	4,56	5,53	48,9b	38,8b
Enzymaticky	-	4,59	5,57	48,8	38,6

^a stanoveno podle ČSN 57 0530.

^b průměrná hodnota je stanovena z deseti individuálních stanovení vzorku, ostatní výsledky jsou průměrem ze dvou stanovení.

Tab. V Obsah laktosy v mléčném vzorku s přidavkem retentátů (RB a RO) a sušeného nízkotučného (SNM) a plnotučného mléka (SPM) technikou HPLC

Laktosa g/100 g	RB		RO		SNM		SPM						
	1	2	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
HPLC	4,59	4,60	4,59	4,59	4,65	4,66	4,73	4,93	5,20	5,60	4,94	5,23	5,66
Bilance ^a	4,65	4,64	4,63	4,63	4,67	4,69	4,73	4,89	5,19	5,63	4,90	5,20	5,67

Výsledky jsou průměrem ze dvou stanovení.

^a vypočtená předpokládaná koncentrace laktosy vycházející z hmotnostní bilance hodnot laktosy v původním materiálu a jednotlivých přidavcích stanovené technikou HPLC a ověřené enzymatickým stanovením laktosy.

navýšen na 3,3 % ve vzorcích označených 1 (RB 1, RO 1, SNN 1 a SPM 1); 3,5 % (ve vzorcích označených 2) a 3,8 % (ve vzorcích označených 3). V tabulce IV je uveden obsah bílkovin a laktosy v původních materiálech.

Výsledky stanovení obsahu laktosy v modelových mléčných vzorcích se změněným obsahem bílkoviny v sušině technikou HPLC jsou uvedeny v tabulce V. Při navýšení mléčné bílkoviny přidavkem retentátů a sušeného mléka může docházet ke změně obsahu laktosy v závislosti na jejím obsahu v původním materiálu. Ve vzorcích s přidavkem retentátů k významné změně obsahu laktosy nedochází. V původním mléce byl stanovený obsah laktosy 4,65 g/100 g a v modelových vzorcích byl obsah stanoven v rozmezí 4,59 až 4,73 g/100 g. Výsledky odpovídaly předpokládanému obsahu laktosy vypočítané hmotnostní bilancí z technikou HPLC stanovených hodnot laktosy v původním materiálu (pasterovaném mléce) a v jednotlivých přidavcích. Správnost stanovení laktosy ve vzorku pasterovaného mléka byla ověřena souběžným stanovením obsahu laktosy v referenčním materiálu zmrazeného syrového mléka muva-RO-0717 (viz výše). Ve vzorcích retentátů RO a RB a sušených mlék SNM a SPM byla správnost stanovení laktosy technikou HPLC ověřena enzymatickým stanovením laktosy (viz Materiál a metody; Tabulka IV). Významný nárůst obsahu laktosy, v rozmezí 4,93 až 5,66 g/100 g, byl zaznamenán ve vzorcích s přidavkem sušených mlék. Výsledky stejně jako u přidavku retentátů odpovídaly předpokládané hmotnostní bilanci.

Závěr

Pro stanovení laktosy v mléčných vzorcích se změněným obsahem mléčné sušiny byla úspěšně verifikována a použita metoda stanovení laktosy technikou vysokoučinné kapalinové chromatografie s vnitřním standardem monohydrátu D(+)-melezitosy. Bylo zjištěno a hmotnostní bilancí původních materiálů ověřeno, že testované navýšení obsahu bílkovin v mléčné matici přidavkem retentátu RO a RB nemá významný vliv na obsah laktosy v původním mléce. V případě navýšení obsahu bílkovin sušeným mlékem nízkotučným a plnotučným byl zaznamenán významný nárůst obsahu laktosy, v rozmezí o 0,28 až 1,01 g/100 g v závislosti na přidavku sušeného mléka.

Poděkování

Tato práce vznikla v rámci institucionální podpory VÚM s.r.o., rozhodnutí č. RO 0512.

Literatura

- CVAK Z., PETERKOVÁ L., ČERNÁ E. (1992): *Chemické a fyzikálně-chemické metody v kontrole jakosti mléka a mlékárenských výrobků*. Praha, VÚPP, Středisko potravinářských informací, 221 s.
- ČSN 57 0530 (1979): *Metody zkoušení mléka a mléčných výrobků*, Český normalizační institut, Praha.
- ČSN 57 0536 (1999): *Stanovení složení mléka infračerveným absorpčním analyzátozem*, Český normalizační institut, Praha.
- ČSN ISO 22662 (2008): *Mléko a mléčné výrobky - Stanovení obsahu laktózy vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (Referenční metoda)*, Český normalizační institut, Praha.
- FERREIRA I.M.P.L.V.O., GOMES A.M.P., FERREIRA M.A. (1998): *Determination of sugars, and some other compounds in infant formulae, follow-up milks and human milk by HPLC-UV/RI. Carbohydrate Polymers*, 37, s. 225-229.
- CHÁVEZ-SERVÍN J.L., CASTELLOTE A.I., LÓPEZ-SABATER M.C. (2004): *Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection*, *Journal of Chromatography A*, 1043, s. 211-215.
- IDF 79B:1991 (1991): *Dried Milk, Dried Ice-Mixes & Processed Cheese, Determination of Lactose Content*.
- SCHUSTER-WOLF-BÜHRING R., MICHEL R., HINRICHS J. (2011): *A new liquid chromatography method for the simultaneous and sensitive quantification of lactose and lactulose in milk*, *Dairy Sci. Technol.*, 91, s. 27-37.

Přijato do tisku: 15. 7. 2013

Lektorováno: 12. 8. 2013

HODNOCENÍ BEZPEČNOSTI ČERSTVÝCH SÝRŮ Z POHLEDU MOŽNÉ TVORBY STAFYLOKOVÝCH ENTEROTOXINŮ

Mgr. Ing. Bohdana Janštová, MVDr. Lenka Necedová, Ph.D., Doc. MVDr. Bohumíra Janštová, Ph.D.

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav hygieny a technologie mléka, Brno, Česká republika

Fresh cheeses safety from the prospective of staphylococcal enterotoxin production

Abstrakt

Cílem této studie bylo hodnocení růstu *S. aureus* a tvorby stafylokokových enterotoxinů v podmínkách modelujících prostředí čerstvých sýrů a porovnání výsledných růstových křivek s křivkami programu prediktivní mikrobiologie. Prostředí čerstvých sýrů bylo modelováno v Brain