

MC SWEENEY P.L.H. (2007). Pathogens and food poisoning bacteria. V knize Cheese problems solved (Mc Sweeney P.L.H. ed.), s.133-139, Woodhead Publishing Limited, Cambridge England.

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny.

PIETRACHA D., MISIEWICZ A.: The use of products containing phage in the food industry as a new method for *Listeria monocytogenes* elimination from food. *Czech Journal of Food Sciences* v tisku.

SCHMID-HEMPEL P., FRANK S. A. (2007): Pathogenesis, virulence, and infective dose. *PLoS Pathog.*, 3(10): e147, s. 1372-1373.

ZINK R., LOESSNER M.J. (1992): Classification of virulent and temperate bacteriophages of *Listeria* spp. on the basis of morphology and protein analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, s. 296-302.

Přijato do tisku: 14. 7. 2015

Lektorováno: 2. 8. 2015

POROVNÁNÍ METOD POUŽÍVANÝCH PŘI STANOVENÍ ZASTOUPENÍ ZDRAVOTNĚ VÝZNAMNÝCH MASTNÝCH KYSELIN MLÉČNÉHO TUKU V BAZÉNOVÝCH VZORCÍCH MLÉKA DOJNIC

Oto Hanuš¹, Eva Samková², Jiří Špička²,
Lucie Hasoňová², Robert Kala², Zdeňka Klímová³,
Pavel Kopunec³, Jaroslav Kopecký¹

¹ Výzkumný ústav mlékárenský Praha

² Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Zemědělská fakulta

³ Českomoravská společnost chovatelů a.s., Hradištko

**Comparison of methods used
for the determination of the healthy important
fatty acids of milk fat in bulk milk samples
of dairy cows**

Abstrakt

Ve 13 chovech holštýnského skotu v Olomouckém kraji bylo odebráno 33 bazénových vzorků mléka za účelem porovnání dvou metod stanovení mastných kyselin (MK) - rutinní/nepřímá (pomocí infračervené spektroskopie - MIR-FT) a referenční/přímá (pomocí plynové chromatografie - GC). Těsnost vztahů mezi oběma metodami je silnější v případě skupiny nasycených (SFA) a nenasycených (UFA) MK ($r = 0,7094; 0,9389; p < 0,001$), zatímco u skupiny TFA (*trans* isomery nenasycených MK) a PUFA (polyenasycené MK) jsou korelační koeficienty nižší ($0,5897; 0,5931; p < 0,001$). 50,3 a 88,2 % variability v hodnotách SFA a UFA podle nepřímé rutinní metody MIR-FT je vysvětlitelných variacemi v analýzách přímé referenční

metody GC. Výsledky naznačují, že řadu informací MIR-FT o výskytu MK lze využít pro rutinní stanovení těchto skupin MK a případnou praktickou selekci mléčné suroviny pro specifickou potravinářskou výrobu.

Klíčová slova: stádo krav; bazénový vzorek mléka; plynová chromatografie; infračervená spektroskopie; věrohodnost analytických výsledků; korelace; kalibrace; validace

Abstract

33 bulk milk samples were taken in 13 Holstein dairy cow herds in the Olomouc region to compare two methods for the determination of fatty acids (FAs) - routine / indirect (by infrared (IR) spectroscopy - MIR-FT) and reference / direct (gas chromatography - GC). Tightness of relations between these two methods is stronger in the case of the group of saturated (SFA) and unsaturated (UFA) FAs ($r = 0.7094; 0.9389; p < 0.001$), while for the group of TFA (*trans* isomers of FAs) and PUFA (polyunsaturated FAs) are lower correlation coefficients ($0.5897; 0.5931; p < 0.001$). 50.3 and 88.2% of the variability in the routine values of SFA and UFA according to the indirect method MIR-FT is explainable by variations in the analyses of direct reference method GC. The results indicate that a row of MIR-FT information on the occurrence of FAs can be used for routine determination of such groups of FAs and possible practical selection of raw milk for the specific food production.

Keywords: cow herd; bulk milk sample; gas chromatography; infrared spectroscopy; analytical result reliability; correlation; calibration; validation

Úvod

Mléčný tuk je jednou z nejdůležitějších složek ovlivňujících technologické zpracování mléka. Složení mléčného tuku z hlediska mastných kyselin (MK) přitom zajímá nejen technology v mlékárnách, např. pro stabilitu mléčného tuku nebo pro možnost ovlivnění roztrátenosti másla, ale také odborníky pro humánní výživu. I když celkově vyšší množství (55 - 75 %) nasycených MK (SFA) zajišťuje lepší stabilitu mléčného tuku a následně mléčných výrobků (*Kaylegian a Lindsay, 1995*), z hlediska výživy je méně akceptovatelné (*Dostálová et al., 2009*). Příjem SFA z celkového energetického příjmu by měl být pod 10 % (20 g), polyenových MK (PUFA) 7 - 10 %. Příjem *trans*-nenasycených MK (TFA) by měl být co nejnižší a neměl by překročit 1 % (cca 2,5 g/den).

V současnosti se profil MK mléčného tuku nesleduje, přestože jsou známy faktory příznivě působící na zvýšené zastoupení nenasycených MK (UFA) - *Kalač a Samková (2010)*. Důvodem je mimo jiné pravděpodobně také náročnost analytického stanovení ekonomicky i časově nevýhodnou plynovou chromatografií (GC). GC je příliš nákladná při poskytnutí prakticky zbytečně detailního výsledku v daném ohledu. Tento je vhodný zejména pro vědecko-výzkumné účely. Z literatury jsou však známy

některé rychlejší a levnější způsoby stanovení MK, při nichž se uplatňuje potenciál infračervené (IR) spektroskopie ve středové oblasti vlnových délek IR záření nebo v oblasti IR blízké (Souyert *et al.*, 2006; Coppa *et al.*, 2010). Pro mléko (mléčný tuk) je v dané souvislosti výhodné určení profilu celého IR spektra prostřednictvím Michelsonova interferometru a s následným matematicko-statistickým vyhodnocením signálu Fourierovými transformacemi (MIR-FT). Tyto zvyšují analytickou efektivitu výtěžnosti signálu.

Metoda IR spektroskopie (MIR-FT) je v současnosti využívána v analytice mlékařství pro kontrolu kvality syrového mléka nebo pro stanovení některých minoritních složek mléka (volné MK, močovina, kyselina citrónová, ketony) - Bijgaart van den, 2006; Hering *et al.*, 2008; Hanuš *et al.*, 2009; Drift van der *et al.*, 2012 aj. Je třeba zdůraznit, že věrohodnost výsledků z této rutinní analýzy bude záviset především na kvalitě kalibrací provedených podle výsledků referenční metody.

Cílem práce bylo porovnání zastoupení vybraných MK a jejich skupin v mléčném tuku bazénových vzorků mléka stanovených referenční (přímou) a rutinní (nepřímou) metodou.

Materiál a metodika

Do pokusu bylo zahrnuto 13 chovů dojníc holštýnského plemene v Olomouckém kraji. Stáda zahrnovala 35 až 530 kusů dojníc a nacházela se v nadmořské výšce od 250 do 350 m. Dojivost stád se pohybovala od 7 650 do 11 190 kg mléka za normovanou laktaci. Jednalo se o chovy s volným ustájením zvířat a dojením v dojrně (n = 12), kterým byla zkrmována směsná krmná dávka (TMR, total mixed ration) na bázi konzervované objemné píce a koncentrátů podle dojivosti. Jeden chov (35 krav) byl s vazným ustájením a potrubním dojícím zařízením.

Odběry bazénových vzorků mléka (n = 33) proběhly v období leden až březen 2015 v rámci oficiální kontroly kvality mléka. Získané vzorky byly rozděleny na dvě části a při teplotě 5 °C dopraveny z místa odběru do laboratoře. První část byla použita pro stanovení základního chemického složení mléka a pro rutinní stanovení mastných kyselin.

Analýzy byly provedeny na pravidelně kalibrovaném a kontrolovaném zařízení CombiFoss FT+ (MilkoScan FT+ 76150, Fossomatic FC 79910), 500 vzorků/hod. (Foss Analytical A/S, Denmark) nepřímou (rutinní) metodou MIR-FT (dále jen *MIR*). Druhá část byla využita pro stanovení MK přímou (referenční) metodou plynové chromatografie (dále jen *GC*) po předchozí lyofilizaci vzorků, extrakci tuku petroletherem a převedení na methylestery MK (alkalickou katalýzou) dle předepsaných parametrů (Tabulka 1).

Tab. 1 Parametry chromatografické analýzy

Parametr	Hodnota
Kolona	SelectFAME (Varian), 50 m/0,25 mm
Detektor	FID (plamenově ionizační)
Teplota: - kolona	55 °C - 5 min, 40 °C/min -170 °C, 2 °C/min - 196 °C, 10 °C/min - 210 °C - 8 min
- injektor	250 °C
- detektor	250 °C
Nosný plyn	helium
Průtok helia	1,8 ml/min
Nástřík	1 l, split 10

Tab. 2 Základní statistické charakteristiky chemického složení bazénových vzorků mléka

	\bar{x}	s_x	min.	max.	v%
Tuk (%)	3,98	0,52	2,57	5,15	13,2
Bílkoviny (%)	3,40	0,16	3,12	3,62	4,6
Laktóza (%)	4,95	0,06	4,81	5,02	1,3

\bar{x} = aritmetický průměr; s_x = směrodatná odchylka; v% = variační koeficient = $(s_x/\bar{x}) \cdot 100$;

V programu Microsoft Excel byly hodnoty o obsazích MK získané rutinní metodou přepočítány na hodnoty odpovídající vyjádření referenční metody, tedy plynové chromatografie (g/100 g všech MK) podle vzorce: $(An \cdot 100)/(Bn \cdot 0,95)$, kde *An* je hodnota MK vyjádřená v g/100 g mléka, *Bn* je hodnota obsahu tuku v g/100 g mléka a 0,95 je koeficient přepočtu obsahu tuku na MK.

Pro statistické výpočty (popisné statistiky, korelační a regresní analýza) byla zvolena nabídka programu Statistica 12.0 (StatSoft 2013).

Výsledky a diskuse

Vyváženost souboru dokládají variační koeficienty ukazující variabilitu daného souboru bazénových vzorků mléka. Nejvyšší variabilita byla zjištěna u tučnosti (13,2 %), nejnižší u obsahu laktózy (1,3 %) - Tabulka 2.

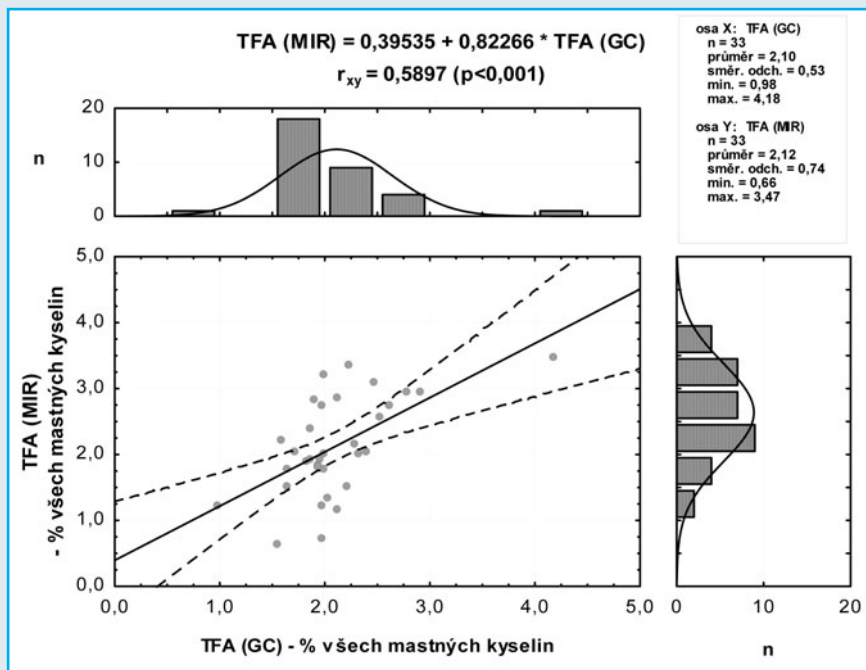
Velmi široké rozpětí minimálních a maximálních hodnot jednotlivých ukazatelů pak bylo nepřímým předpokladem pro zajištění široké variability i ve spektru jednotlivých skupin MK. Vyšší hodnoty variačních koeficientů byly dle souladu s literaturou (Pešek *et al.*, 2006) zjištěny u nenasycených MK (PUFA, TFA, UFA), nižší u nasycených MK (SFA), a to u obou metod stanovení -

Tab. 3 Základní statistické charakteristiky zastoupení vybraných skupin mastných kyselin (MK) při stanovení plynovou chromatografií (GC) a infračervenou spektroskopií přepočtené na shodné jednotky s GC (MIR)

	GC g/100 g všech MK			MIR g/100 g všech MK			r_{xy} ($p < 0,001$)	R^2 (%)
	\bar{x}	s_x	v%	\bar{x}	s_x	v%		
SFA	67,65	2,76	4,08	72,77	3,77	5,18	0,7094	50,3
UFA	28,80	2,90	10,08	27,53	2,52	9,16	0,9389	88,2
TFA	2,10	0,53	25,29	2,12	0,74	34,90	0,5897	34,8
PUFA	3,22	0,63	19,67	4,76	2,95	62,03	0,5931	35,2

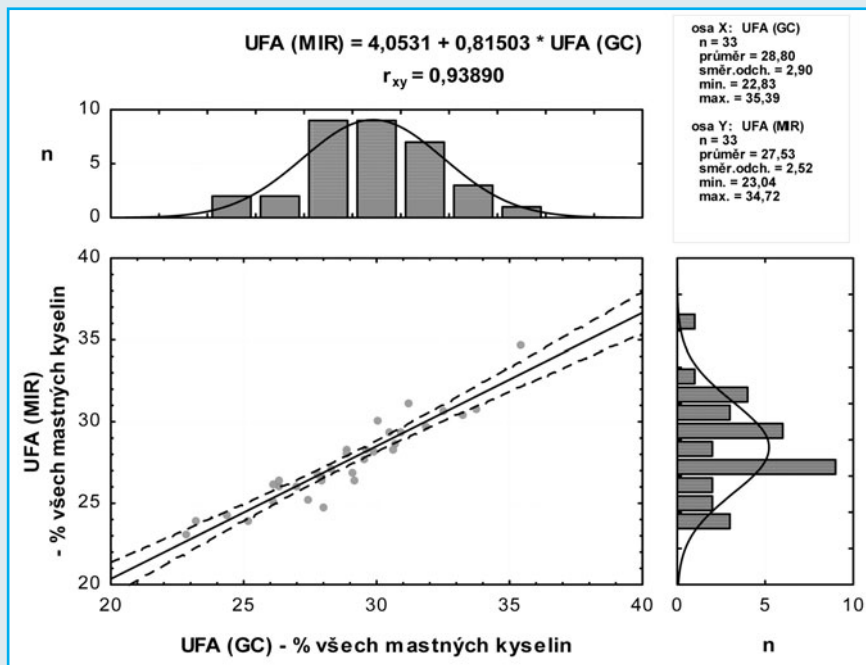
\bar{x} = aritmetický průměr; s_x = směrodatná odchylka; v% = variační koeficient = $(s_x/\bar{x}) \cdot 100$;
 r_{xy} = validační koeficient korelace; R^2 = koeficient determinace = (r_{xy}^2) ;
SFA = nasycené MK se sudým a lichým počtem uhlíků; UFA = nenasycené MK; TFA = trans isomery nenasycených MK; PUFA = polynenasycené MK včetně konjugované kyseliny linolové

Graf 1 Vztah mezi zastoupením trans izomerů nenasycených mastných kyselin (TFA) v mléčném tuku stanovených plynovou chromatografií (GC) a infračervenou spektroskopií (MIR) včetně grafů histogramu četností



Tabulka 3. Průměrná zastoupení výše uvedených skupin zjištěná oběma metodami se liší zejména v případě PUFA. Zastoupení této skupiny bylo v případě stanovení pomocí GC o 48 % nižší (3,22 %) než v případě stanovení pomocí MIR (4,76 %). S tím koresponduje i nižší validační korelační koeficient ($r = 0,5931$; $p < 0,001$), jakkoliv tento není mírou průměrné shody výsledků. Obdobnou hodnotu má i validační korelační koeficient zjištěný v případě skupiny TFA (0,5897; $p < 0,001$). Zde však jsou průměrná zastou-

Graf 2 Vztah mezi zastoupením nenasycených mastných kyselin (UFA) v mléčném tuku stanovených plynovou chromatografií (GC) a infračervenou spektroskopií (MIR) včetně grafů histogramu četností



pení zjištěná oběma metodami prakticky totožná (2,10 %, resp. 2,12 %), což dokládá předchozí konstatování - Graf 1.

Velmi shodné údaje a vyšší těsnost vzájemného vztahu výsledků byly naopak zjištěny u skupin SFA (0,7094; $p < 0,001$) a UFA (0,9389; $p < 0,001$; Graf 2), i když, jak je patrné z průměrných hodnot, rutinní metodou MIR byla stanovena hodnota SFA poněkud vyšší (72,77 %) a hodnota UFA mírně nižší (27,53 %) než tomu bylo při stanovení referenční metodou GC (67,65 %, resp. 28,80 %). Z hodnot koeficientu determinace (R^2) vyplývá, že tedy 50,3 a 88,2 % variability v hodnotách SFA a UFA podle nepřímé rutinní metody (MIR) je vysvětlitelných variacemi v analýzách přímé referenční metody (GC). Uvedené lze označit za přijatelnou a dobrou schopnost analytické výpovědi nepřímé metody, resp. její zcela akceptovatelnou věrohodnost výsledků k praktické interpretaci.

Většina uvedených validačních korelací mezi výsledky sledovaných metod byla v podobných hodnotách (s ohledem na těsnost vztahu a sledované skupiny MK) v porovnání k dosud publikovaným výsledkům (Soyeurt *et al.*, 2006). Nižší hodnotu R^2 v bazénovém vzorku mléka pro skupinu SFA si lze vysvětlit tím, že zastoupení této skupiny je více ovlivněné individualitou dojnice, a lze předpokládat, že v individuálních vzorcích by tato hodnota mohla být vyšší.

Obecně shrnutě, uvedené posuny mezi (MIR a GC) průměrnými hodnotami skupin MK nejsou, při přijatelné těsnosti vztahu výsledků mezi metodami, vážnou překážkou praktického použití výsledků, neboť jsou snadno různými statistickými postupy kompenzovatelné. I výsledky vztahů s nižší determinací (PUFA a TFA), kde jen 35,2 a 34,8 % variací výsledků MIR je vysvětlitelných variabilitou výsledků GC, jsou zajímavé a mohly by být prakticky zohledněny v případné metodice (algoritmu) selekce mléčné suroviny pro specifickou mlékařskou produkci, např. funkčních potravin nebo lépe rozdílného másla, a to v pozici orientačních nebo doplňkových ukazatelů. Skupiny MK nebo MK s vyšší metodickou determinací výsledků by pak byly zohledněny v takovém postupu v pozici ukazatelů hlavních.

Ve většině případů jsou korelace výsledků mezi metodami vyšší pro individuální vzorky mléka (Samková *et al.*, 2015) než pro zde popsání vzorky bazénové. To je pravděpodobně dáno vyšší původní variabilitou a větším variačním rozpětím původních hodnot jednotlivých MK v individuálních vzorcích mléka, oproti bazénovým, což je logické. Uvedený jev se projevuje obecně ve všech kalibračních souborech pro nepřímé metody (i jiné než je IR spektroskopie) u všech složek a vlastností mléka (Sojková *et al.*, 2009; Hanuš *et al.*, 2014). Tuto roli sehrává v podstatě nahodilost výběru mléka. V uvedených souvislostech Coppa *et al.* (2013) uvedli, že v případě predikce profilu MK tuku u bazénových vzorků mléka na základě informací o faremní praxi (zejména složení výživy krav a nadmořská výška) byly dobré ($R^2 > 0,5$) predikční modely např. pro SFA nebo PUFA a velmi dobré ($R^2 > 0,6$) např. pro TFA. Také Soyeurt *et al.* (2006) konstatovali, že pro odhad profilu MK metodou MIR jsou využitelné predikční modely pro SFA nebo MUFA.

Tyto modely by mohly poskytnout farmářům hodnotný prostředek ke zlepšení nutriční kvality jimi produkovaného mléka. Uvedené by mohlo být použito k monitoringu kvality mléčného tuku a následně ke zlepšování kvality mléka např. specifickou výživou krav, příp. k odhadu genetické hodnoty pro jednotlivá zvířata za účelem cílené plemenitby ve stejném smyslu.

Závěr

Validované vztahy mezi výsledky ekonomicky efektivní nepřímé metody infračervené spektroskopie (MIR) a nákladnější referenční plynové chromatografie (GC) při určení profilu MK mléčného tuku, které vykazují různou, avšak zpravidla akceptovatelnou těsnost závislosti pro vybrané strukturální a funkční skupiny MK ukazují, že informace získané prostřednictvím MIR mohou být využity jako hlavní nebo doplňkové ukazatele při cílené selekci syrového mléka. Metodika selekce suroviny, podle koncentrací MK a jejich skupin s předpokládaným zdravotním nebo technologickým benefitem, by tak byla opatřena vahami pro význam informace s ohledem na selekci, právě podle těsnosti vztahu nepřímých výsledků k referenčním. Tím výsledky naznačují, že řadu informací MIR o výskytu MK v mléčném tuku lze využít pro rutinní stanovení těchto skupin MK a případnou praktickou selekci mléčné suroviny pro specifickou potravinářskou výrobu.

Poděkování

Tato práce byla uskutečněna s podporou projektu MZE NAZV KUS QJ1510336 a výzkumných záměrů MŠMT ČR MSM 6007665806 a MZe RO1415. Autoři rovněž děkují majitelům farem za spolupráci při realizaci této studie.

Seznam literatury

- Bijgaart van den H. (2006): New applications of mid-infra-red spectrometry for the analysis of milk and milk products. 2. Free fatty acids. *IDF Bulletin*, 406, 22-28.
- Coppa M., Ferlay A., Leroux Ch., Jestin M., Chilliard Y., Martin B., Andueza D. (2010): Prediction of milk fatty acid composition by near infrared reflectance spectroscopy. *International Dairy Journal*, 20 (3): 182-189.
- Coppa M., Ferlay A., Chassaing C., Agabriel C., Glasser F., Chilliard Y., Borreani G., Barcarolo R., Baars T., Kusche D., Harstad O. M., Verbič J., Goleký J., Martin B. (2013): Prediction of bulk milk fatty acid composition based on farming practices collected through on-farm surveys. *Journal of Dairy Science*, 96 (7): 4179-4211.
- Dostálová J., Hrubý S., Turek B. (2009): Společnost pro výživu. Konečné znění Výživových doporučení pro obyvatelstvo ČR. [online]. 2009. Dostupné na [www: http://www.vyzivaspol.cz/rubrika-dokumenty/konecne-zneni-vyzivovych-doporuceni.html](http://www.vyzivaspol.cz/rubrika-dokumenty/konecne-zneni-vyzivovych-doporuceni.html), staženo 14.12.2009.
- Drift van der S.G.K., Jorritsma R., Schonewille J.T., Knijn H.M., Stegeman J.A. (2012): Routine detection of hyperketonemia in dairy cows using Fourier transform infrared spectroscopy analysis of β -hydroxybutyrate and acetone in milk in combination with test-day information. *Journal of Dairy Science*, 95 (9): 4886-4898.
- Hanuš O., Hulová I., Genčurová V., Štolc L., Kučera J., Kopecký J., Jedelská R., Motyčka Z. (2009): Result interpretation of experimental calibration for milk citric acid determination via infra-red spectroscopy (MIR-FT). (In Czech) *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 57 (5): 87-101.
- Hanuš O., Roubal P., Říha J., Vyletěllová Klimešová M., Samková E., Jedelská R., Kopecký J. (2014): Development in indirect infra-red determination of milk acetone. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 62 (5): 919-927.
- Hering P., Hanuš O., Frelich J., Pytloun J., Macek A., Janů L., Kopecký J. (2008): Relationships between the results of various methods of urea analysis in native and enriched milk. *Czech Journal of Animal Science*, 53 (2): 64-76.
- Kalač P., Samková E. (2010): The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech Journal of Animal Science*, 55 (12): 521-537.
- Kaylegian K.E., Lindsay R.C.: *Handbook of Milkfat Fractionation Technology and Applications*. Champaign, Illinois: AOCS Press, 1995. 657 s. ISBN 0-935315-57-8.
- Pešek M., Samková E., Špička J. (2006): Fatty acids and composition of their important groups in milk fat of Czech Pied cattle. *Czech Journal of Animal Science*, 51 (5): 181-188.
- Samková E., Hanuš O., Špička J., Kala R., Koubová J., Smetana P., Hasoňová L., Křížová Z., Kopunec P., Kopecký J. (2015): Porovnání referenční a rutinní metody stanovení mastných kyselin mléčného tuku v individuálních vzorcích mléka dojníc - dílčí výsledky. *Náš chov, v tisku*.
- Sojková K., Hanuš O., Kučera J., Genčurová V., Jedelská R., Kopecký J. (2009): Určení limitu přijatelnosti pro validační korelační koeficient jako parametr kvality kalibrace infračervené spektroskopie (MIR) při měření základního složení kravského mléka. (In Czech) *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, 51 (4): 50-55.
- Soyeurt H., Dardenne P., Dehareng F., Lognay G., Veselko D., Marlier M., Bertozzi C., Mayeres P., Gengler N. (2006): Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 89 (9): 3690-3695.

Kontaktní adresa:

doc. Ing. Eva Samková, Ph.D., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Česká republika, e-mail: samkova@zf.jcu.cz

Přijato do tisku: 13. 7. 2015

Lektorováno: 1. 8. 2015