

parametrů na mikrostrukturu sýrů, lokalizaci mikroorganismů a jejich interakce během zrání. Využití různých systémů chromatografických metod (GC-MS, GC-O, SPME) umožnilo detekci velkého množství těkavých sloučenin i stanovení jednotlivých aromatických látek v komplexních směsích typických pro buket sýrů.

Mikrobiologie sýrů zaznamenala ohromné změny v přístupu k řešení tradičních problémů spojených s hodnocením kvality sýrů, detekcí mikrobiálních vad i poznáním mikrobiologických a biochemických procesů spojených s výrobou a zráním sýrů, díky aplikaci molekulárně biologických metod analyzujících DNA, RNA, bílkoviny a metabolity. Nové metodické postupy změnily pohled na mikrobiální ekologii sýrů, lokalizaci kolonií na povrchích sýrů, tvorbu biofilmů ve vnitřních strukturách sýrů, vznik zón s různou koncentrací mikrobiálních enzymů. Studium metabolismu "in-situ" umožnilo nové pohledy na zrání sýrů, sledování adaptace mikroorganismů na různé typy stresu, vysvětlení, co se děje během lýze mikroorganismů. Metagenomika používající anonymní sekvenování DNA izolované se studovaného prostředí byla s úspěchem použita pro studium mikrobiální ekologie i k odhalování původců mikrobiálních vad sýrů. Např. Paul Cotter představil, jak byl pomocí metagenomické analýzy odhalen jako původce růžovění sýrů termofilní na běžných agarových půdách nekultivovatelný druh *Thermus thermophilus* produkující karotenoidní pigmenty. Naopak ve srovnání s minulostí prakticky nebyla řeč o bezpečnosti sýrů, riziku výskytu patogenních mikroorganismů a jejich toxinů, které by mohly být příčinou zdravotních problémů konzumentů. Zdá se, že bezpečnost sýrů se již považuje za něco tak samozřejmého, co není zapotřebí řešit.

V řadě přednášek byla zdůrazněna potřeba interdisciplinárního přístupu (nutná spolupráce vědců, výrobců, technologů, gastroenterologů) v oblasti výzkumu trávení sýrů, kdy různá struktura syra ovlivňuje způsob uvolňování živin a jejich absorpci v trávicím traktu i v oblasti poznání zdravotních benefitů sýrů spojených s celou řadou biologicky aktivních komponent včetně bioaktivních peptidů s rozmanitými aktivitami.

Jak bylo zřejmé z přednáškových i posterových sdělení, špičkový výzkum a vývoj v sýrařské oblasti je v současné době prováděn především v zemích s tradičně rozvinutou sýrařskou výrobou jako jsou Dánsko (pracoviště *Department of Food Science, University of Copenhagen, Innovation Centre, Brabrand, Arla Foods Amba*), Francie (zastoupená experty z *INRA Agrocampus Ouest, Rennes*), Švýcarsko (*Agroscope, Institute for Food Sciences, Bern*), Holandsko (*NIZO Food Research, DSM Food Specialities*), Norsko (*Norwegian University of Life Sciences*), USA (*Utah State University, Logan, Midwest dairy Foods Research Centre, South Dakota State University*), Kanada (*STELA Dairy Research Centre, Université Laval, Quebec City*), Austrálie (*The ARC Dairy Innovation Hub, The Bio21, The University of Melbourne, CSIRO Food and Nutrition*), Nový Zéland (*Fonterra Research Development Centre, Palmerston North, Massey University, Palmerston North*).

Velmi početně byla prezentacemi zastoupena pořadající země Irsko, která se vždy intenzivně věnovala výzkumu v sýrařské oblasti. O to více je aktivní v současnosti, kdy má nadbytky mléčné suroviny a má zájem je ve formě výrobků s vysokou přidanou hodnotou vyvážet do celého světa. Pracuje např. na inovačních technologiích pro Saudskou Arábii (rekombinované mléčné výrobky pro výrobu čerstvých bílých sýrů). Samozřejmostí je zde těsná spolupráce zdejších universitních pracovišť (*University College Cork, University College Limerick*) výzkumného a vývojového centra (*Teagasc, Food Research Centre, Moorepark Fermoy Cork*), výrobců (*Kerrygold Company*) a exportérů (*Ornua Dublin*) mlékárenských výrobků.

Literatura:

Programme and Abstracts from IDF Parallel Symposia: Dairy Products Concentration and Drying and Cheese Science and Technology. Dublin, Ireland 11.-13. 4. 2016.

Přijato do tisku: 21. 11. 2016

Lektorováno: 28. 11. 2016

VYBRANÉ METODICKÉ POHLEDY NA NĚKTERÉ MOŽNOSTI POPISU ROZVOJE PROTEOLÝZY BÍLKOVIN MLÉKA

**Oto Hanuš, Irena Němečková, Jana Chramostová,
Marcela Klimešová, Petr Roubal, Radoslava Jedelská,
Jaroslav Kopecký, Ludmila Nejeschlebová,
Eva Vondrušková**

Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o

Chosen methodical view on some possibilities of description of proteolysis development in milk

Abstrakt

Proteolýza a lipolýza v syrovém mléce jsou důležitými faktory senzoričké kvality a údržnosti následných mléčných výrobků i bezpečnosti mléčného potravinového řetězce. Počátek proteolýzy v mléce souvisí také se srážením bílkovin, které je zapříčiněno převážně enzymaticky, nebo změnou kyselosti. Byly vyhodnoceny vztahy mezi ekvivalentem proteolýzy (EPM; koncentrace primárních aminoskupin) a zdravotními, hygienickými a složkovými ukazateli syrového bazénového kravského mléka. U části pokusných vzorků byla iniciována nekulturní spontánní proteolýza = uložení po 24 hod. při 10 °C. Průměrná hodnota EPM činila v nativním souboru $0,9165 \pm 0,063 \text{ mmol l}^{-1}$ (vx 6,9 %). Pokusným zásahem vzrostly geometrické průměry celkového počtu mezofilních (CPM) a počtu psychrotrofních mikroorganismů

(PSY) z 13 713 a 10 728 na 811 927 a 830 819 CFU ml⁻¹ ($P < 0,001$). Mezi log CPM a EPM byl korelační koeficient (r) 0,3651 ($P < 0,01$). Mezi log PSY a EPM byl r 0,4152 ($P < 0,001$). Výsledky vztahů mléčných složek v nativním mléce byly: tuk \times EPM, $r = 0,2236$; bílkoviny \times EPM, 0,2207; laktóza \times EPM, -0,0663; sušina tukuprostá \times EPM, 0,1616 (všechny vztahy $P > 0,05$). Počet somatických buněk \times EPM, $r = 0,0849$ ($P > 0,05$).

Klíčová slova: syrové kravské mléko, celkový počet mikroorganismů, počet somatických buněk, složení mléka, koagulace a rozklad bílkovin

Abstract

Proteolysis and lipolysis in raw milk are important factors in sensory quality and shelf-life of subsequent dairy products and the safety of milk food chain. The beginning of proteolysis in milk is also associated with protein coagulation which is caused mainly enzymatically or by the acidity changing. The relationships between proteolysis equivalent (EPM; the concentration of primary amino groups) and health, hygiene and composition indicators of raw cow's milk were evaluated. The spontaneous uncultured proteolysis was initiated in some of the test samples when stored for 24 hours at 10 °C. The EPM average value was 0.9165 ± 0.063 mmol l⁻¹ (vx 6.9%) in the native file. Experimental intervention increased the geometric mean of the total count of mesophilic (CPM) and psychrotrophic microorganisms (PSY) from 13,713 and 10,728 to 811,927 and 830,819 CFU ml⁻¹ ($P < 0.001$). The correlation coefficient (r) between the log CPM and EPM was 0.3651 ($P < 0.01$) and between log PSY and EPM 0.4152 ($P < 0.001$). Results of relationships of components in native milk were: fat \times EPM, $r = 0.2236$; protein \times EPM, 0.2207; lactose \times EPM, -0.0663; solids non-fat \times EPM, 0.1616 (all relations $P > 0.05$). Somatic cell count \times EPM, $r = 0.0849$ ($P > 0.05$).

Keywords: raw cow milk, total count of microorganisms, somatic cell count, milk composition, protein coagulation and proteolysis

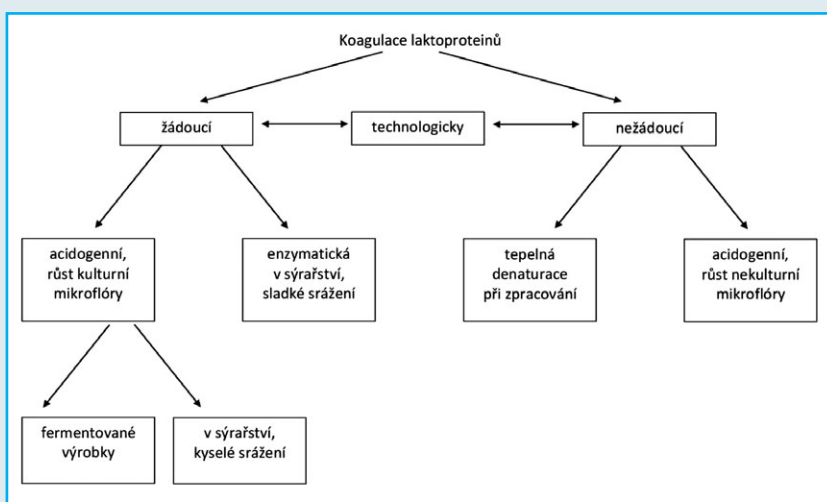
Úvod

Počátek proteolýzy v syrovém kravském mléce souvisí také se srážením (koagulací, změnou prostorové struktury) bílkovin, které je zapříčiněno převážně enzymaticky, nebo změnou kyselosti pH (biochemicky nebo fyzikálně-chemicky). Hydrolyzující enzymy mohou být v mléce podle původu nativní (z epitelu mléčné žlázy), bakteriální nebo přidané (při sýření). Pokud bakteriální, pak mohou mít průběh reakcí spontánní v důsledku nekulturní kontaminující (nežádoucí) mikroflóry nebo záměrný v důsledku přidavku kulturní (ušlechtilé) mikroflóry. Ať nekul-

turní nebo kulturní mikroflóra, existují dále druhové rozdíly mezi bakteriálními druhy v enzymatické výbavě a tím v usměrňování rozkladných (hydrolytických) procesů v mléce. Tyto pak probíhají podle podmínek mnohdy značně odlišně, přičemž se celé mléčné prostředí (mléčná matrice) průběžně, biofyzikálně a biochemicky, značně mění. Již z tohoto obecného popisu vyplývá, že celý jev je velmi komplexní a obtížně postižitelný metodicky a popisem v celé své dynamice. Zabývala se jím řada autorů (Chen et al., 2003; Datta a Deeth, 2003; Gaucher et al., 2008; Button et al., 2011; Baur et al., 2015) z různých aspektů. Přitom obvykle v mléčných mikrobiálních procesech (řízených nebo neřízených) probíhají souběžně, vedle proteolýzy, ještě spontánní nebo cílená lipolýza a acidogenní rozklad laktózy. Přesto má mlékařská technologie ambice a již historicky se uchází o řízení těchto procesů, včetně koagulace bílkovin a s ní spojené proteolýzy. Přitom jsou na mléko, jako surovinu, docela paradoxně, ale reálně, uplatňovány často velmi protichůdné požadavky, podle kterých se diferencuje jeho technologická kvalita. Někdy je požadována snadná, jasná a rychlá koagulace mléčných bílkovin (sýrařství), jindy protichůdně jejich odolnost proti denaturaci (kondenzované mléko), to podle účelu technologie. Tedy srážení bílkovin i proteolýza jsou někdy vnímány negativně (vysoce tepelné postupy ošetření mléka, zhoršení kvality mléka) a jindy pozitivně (sýrařské srážecí a zračí procesy), podle situace (Obr. 1) a v různých fázích zmíněných odbourávacích procesů.

Počáteční proteolýza může přispět ke srážení mléčných bílkovin, pokročilejší pak zhoršovat senzoryckou kvalitu mléka, jindy udělovat mléčné sráženině (sýřenině) žádoucí chuť a vlastnosti, nebo naopak produkovat nežádoucí (někdy zdraví škodlivé) biogenní aminy, záleží podle fáze a stupně jejího průběhu. Obecně pro kvalitu syrového mléka platí, že nekulturní bakteriální kontaminace do mléka, při jeho získávání, nepatří. Proto je kontrolována jeho mikrobiologická kvalita stanovením limitovaného celkového počtu mezofilních mikroorganismů a tak podobně.

Obr. 1 Zjednodušené schéma pohledu na koagulaci mléčných bílkovin v mlékařství / Simplified schematic view of the coagulation of milk proteins in dairy



Jakost syrového mléka je důležitým faktorem kvality následných mléčných výrobků. Musí být pravidelně kontrolována, protože mléko, pro svůj vysoký obsah vody a živin, je ideálním prostředím pro rozvoj mikroorganismů. Mléko je tedy materiálem, který je vysoce ohrožen kažením. Otázka jeho uložení, transportu a zpracování je proto citlivým technologickým procesem. Kvalita mléka ovlivňuje trvanlivost mléčných výrobků. Dobrá jakost syrového mléka vytváří a zajišťuje provozní jistotu pro farmáře (dobrá farmářská cena), pro zpracovatele mléka (prodejnost a trvanlivost mléčných výrobků) a podmiňuje bezpečnost potravinového řetězce s ohledem na konzumenty.

Cílem tohoto sdělení je metodicky diskutovat a komentovat určité vybrané technologické pohledy na popis dynamiky spontánní proteolýzy mléka a dílčí výsledky s tím související, pro možnost kontroly kvality syrového kravského mléka v uvedeném ohledu.

Materiál a metody

Selekce a ošetření experimentálních vzorků mléka

Bazénové vzorky syrového kravského mléka byly odebírány pravidelně dvakrát měsíčně v periodě leden až březen 2015 v Olomouckém kraji. Do pokusu bylo zahrnuto 13 chovů dojníc plemene Holštýn. Stáda zahrnovala od 30 do 500 kusů dojnic a nacházela se v nadmořské výšce od 260 do 360 m. Dojivost stád se pohybovala od 6 700 do 11 050 kg mléka za normovanou laktaci. Jednalo se o chovy s volným ustájením zvířat a dojením v dojírně, kterým byla zkrmována směsná krmná dávka (TMR, total mixed ration) na bázi konzervované objemné píče a koncentrátů podle dojivosti.

Vzorky byly odebírány jednotlivě nebo ve dvou subvzorcích po ranním dojení při teplotě $< 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně byly uchovávány v chladu $< 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ v termoboxu až do laboratoře a při uložení tamtéž. Druhý den (po 24 hod.) byly provedeny chemické analýzy v prvním subvzorku. Vznikly tak soubory I a III (startovací a referenční). Soubor II (původní) pak tvořilo původní mléko (I a III). U části pokusných vzorků byla iniciována nekulturní spontánní proteolýza. Druhý subvzorek byl dále, pro pokusnou iniciaci přirozené proteolýzy (podobně jako u lipolýzy, Vyletěllová et al., 2000 a, b), uložen při $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Chramostová et al., 2014) v temnu po dalších 24 hodin. Pak byl vzorek znovu analyzován na všechny mléčné ukazatele. Vznikl tak soubor IV (pokusný). Dále byl sestaven soubor C (celkový, I + III + IV). Zatímco první analýza (soubory I a III) představovala běžný postup kontroly kvality mléka, druhá analýza (soubor IV) zastupovala zhoršený stav péče o surovinu, případně i možnost chyb v systému kontroly kvality při obdenním svozu mléka. Druhá časově pozdržená varianta analýzy (pokusná, IV) byla použita pro zvýraznění případných závislostí mezi sledovanými mléčnými ukazateli v celkovém souboru (C). Soubor C tak představoval celkový možný vliv hygieny získávání mléka na jeho případnou proteolýzu.

Celkově bylo odebráno 57 vzorků mléka (II). Celkově zpracováno a hodnoceno bylo 104 vzorků (soubor starto-

vací (I), referenční (III) a pokusný (IV); $n = 10 + 47 + 47$) z nichž 57 bylo analyzováno jako nativní mléko (I + III). Ve skupinách analyzovaných párovým způsobem (IV mínus III) bylo 47 a 47 vzorků syrového bazénového kravského mléka.

Použité analytické metody

Odebrané a chladem ošetřené bazénové vzorky mléka byly analyzovány následujícími metodami:

- 1) ekvivalent proteolýzy mléka (EPM, jako koncentrace primárních aminoskupin v mmol l^{-1} ; Čurda a Dryáková, 2003; Prokopová, 2008; Chramostová et al., 2014) byl stanoven spektrofotometrickou metodou na zařízení SPEKOL 11 (Carl Zeiss Jena, Germany), které bylo kalibrováno pro každou vyšetřovanou šarži vzorků mléka pomocí 7 bodové kalibrační přímky ($r =$ od 0,9978 do 0,9998, $P < 0,001$) při vlnové délce 335 nm pomocí metody pro stanovení primárních aminoskupin, založené na reakci primárních aminoskupin s o-ftal-dialdehydem (OPA) za přítomnosti N-acetyl-L-cysteinu (NAC) při vzniku 1-alkylthio-2-alkylisindol;
- 2) počet somatických buněk (PSB v 10^3 ml^{-1}) byl stanoven metodou fluoro-opto-elektronické průtočné cytometrie (FC, flow cytometry, ČSN EN ISO 13366-2) na principu vazby barviva ethidium bromid s leukocytární DNA do komplexu s emisí registrovatelného záření po příslušném ozáření na zařízení Somacount 300 (Bentley Instruments, Chaska, USA), který byl kontrolován prostřednictvím kontrolních standardů (nízký a vysoký) a výkonnostního testování analytické způsobilosti (proficiency testing) ze Státního veterinárního ústavu Praha na přímou mikroskopickou metodu (ČSN EN ISO 13366-1) s dobrými výsledky;
- 3) základní složení mléka (obsahy tuku (T, %), bílkovin (B, % hrubých bílkovin), laktózy (L, % monohydrátu) a sušiny tukuprosté (STP, %)) bylo stanoveno na infračerveném analyzátoru s filtrovou technologií MilkoScan 133 B (Foss Electric, Hillerød, Denmark), který byl pravidelně měsíčně kalibrován na výsledky referenčních metod podle příslušných norem (pro T extrakční metoda podle Roesse-Gottlieba, pro B mineralizačně-destilační metoda podle Kjeldahla, pro L polarimetrická metoda, pro STP gravimetrická metoda podle ČSN 57 0530 1973; ČSN 57 0536 1999; ČSN EN ISO/IEC 17025);
- 4) celkové počty (v CFU ml^{-1}) mezofilních mikroorganismů (CPM) a počty psychrotrofních mikroorganismů (PSY) byly stanoveny mikrobiologickými kulturačními metodami na GTK-M agaru (Milcom Tábor) za teplotních podmínek podle příslušných norem (ČSN EN ISO 4833 a ČSN ISO 8552).

Statistické postupy

V experimentálních databázích mléčných ukazatelů byly stanoveny a vypočteny základní statistické parametry jako aritmetický průměr (\bar{x}), směrodatná odchylka (sd), variační koeficient (v_x v %), medián (m), minimum (min) a maxi-

mum (max). U mléčných ukazatelů s předpokladem absence normální frekvenční distribuce dat v bazénových vzorcích mléka, jako hygienické a mikrobiologické ukazatele (PSB, CPM a PSY), byla provedena logaritmická transformace (\log_{10}) hodnot právě pro získání normální distribuce a případnou linearizaci regresních vztahů. Uvedené umožnilo u relevantních ukazatelů uvádět také správnější geometrické průměry (x_g). Významnost rozdílů mezi průměry mléčných ukazatelů ve skupině vzorků původních (původní stupeň proteolýzy) a déle uložených (zvýšený stupeň proteolýzy) byla ověřena pomocí párového t-testu. Pro vybrané soubory (mléko analyzované první den a po 24 hod. uložení při 10 °C) a kombinace mléčných ukazatelů (zejména proteolýza a hygienické a mikrobiologické ukazatele) byla provedena lineární regresní analýza s vyjádřením koeficientů determinace (R^2) a korelace (r). Statistické vyhodnocení bylo zpracováno v programu MS Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA).

Výsledky a diskuse

Proteolýza (Chramostová et al., 2014) a lipolýza (Vyletřelová et al., 2000 a, b) v syrovém mléce jsou důležitými faktory sensorické kvality a údržnosti následných mléčných výrobků i bezpečnosti mléčného potravinového řetězce. Obě jsou způsobovány příslušnými nativními a bakteriálními enzymy v mléce a proto jejich případný rozsah vypovídá i o úrovni zdraví dojníc a hygieny získávání, uložení a ošetření mléka. Zatímco lipolýza byla již dříve více studována s ohledem na metodickou identifikaci a její příčiny a důsledky (O Brian et al., 1998; Vyletřelová et al., 2000 a, b; Antonelli et al., 2002; Thomson et al., 2005; Wiking et al., 2006; Cempírková a Mikulová, 2009; Mikulová, 2011; Toušová et al., 2013), podobných podkladů k analýze a posouzení proteolýzy existuje nepoměrně méně.

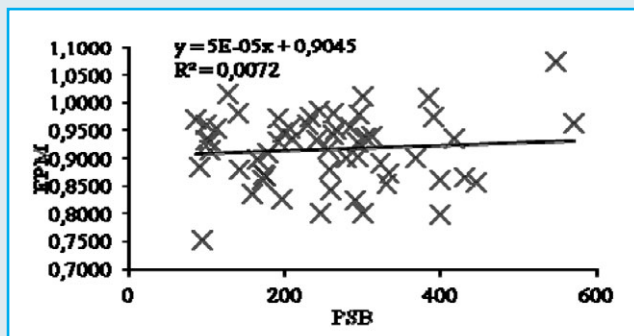
Byly vyhodnoceny a kvantifikovány vztahy mezi ekvivalentem proteolýzy (EPM; koncentrace primárních aminoskupin) a zdravotními, hygienickými a složkovými ukazateli syrového bazénového kravského mléka ($n = 104$). Ukazuje se, že by EPM mohl být vhodným ukazatelem iniciace proteolýzy v mléce (Čurda a Dryáková, 2003; Prokopová, 2008; Chramostová et al., 2014). Průměrná hodnota EPM činila v nativním souboru ($n = 57$; II) $0,9165 \pm 0,063 \text{ mmol l}^{-1}$ (vx 6,9 %). Pokusným zásahem vzrostly x_g CPM a PSY z 13 713 a 10 728 na 811 927 a 830 819 CFU ml^{-1} ($P < 0,001$). Zvýšení kontaminace bylo provázeno ($P < 0,001$) nárůstem hodnoty EPM z 0,9188 na 0,9694, o $0,0506 \pm 0,05 \text{ mmol l}^{-1}$ a o 5,5 %. Selektce experimentálních souborů dat pro provedení regresní analýzy byla provedena podle logického designu pokusu, fyziologických pravidel laktace, technologické podstaty procesu dojení a relevantnosti analytických metod pro daný typ materiálu. Stejně tak pak byl proveden i výběr vztahů k interpretaci, kde byly navíc zohledněny stupně těsnosti posuzovaných závislostí. PSB v nativním mléce nebyl korelovan k EPM ($r = 0,0849$; $P > 0,05$; soubor II; $n = 57$;

Obr. 2), ačkoliv mastitida ($\log \text{ PSB} \times \text{EPM}$; $r = 0,05$; $P > 0,05$; soubor II; $n = 57$) je považována za možný zdroj lipolýzy a zejména proteolýzy (Le Roux et al., 1995). Mezi $\log \text{ CPM}$ a EPM byl korelační koeficient (r) 0,3651 ($P < 0,01$; soubor C). Mezi $\log \text{ PSY}$ a EPM byl r 0,4152 ($P < 0,001$; soubor C). 17,2 % variability v hodnotách EPM bylo vysvětlitelných variacemi v $\log \text{ PSY}$. Kontaminace PSY tak má blíže k proteolytické aktivitě v mléce. Proteolýza je důležitým ukazatelem kvality pro údržnost mléka, roste s mikrobiologickou kontaminací syrového kravského mléka a může být kontrolována metodou stanovení primárních aminoskupin (EPM). Z uvedených výsledků by pravděpodobně bylo možné stanovit limit kvality pro zachycení zvýšené proteolýzy (EPM).

Mimo uvedené vztahy ohledně proteolýzy byly zaznamenány další korelační závislosti. Patří sem negativní korelace mezi PSB a L -0,1628 (soubor II). Přesto, že je v bazénových vzorcích tento vztah nevýznamný ($P > 0,05$), potvrzuje trendem některé předchozí výsledky (Hanuš et al., 2008). Dále jsou významným pozitivním lineárním regresním vztahem ($P < 0,001$) mezi $\log \text{ CPM}$ a $\log \text{ PSY}$ ($r = 0,6484$) potvrzeny některé dřívější výsledky (Vyletřelová et al., 2000 b) pro nativní mléko (II). To znamená, že až 43 % variability v hodnotách hygienické kontaminace $\log \text{ PSY}$ je vysvětlitelných variacemi v hodnotách $\log \text{ CPM}$.

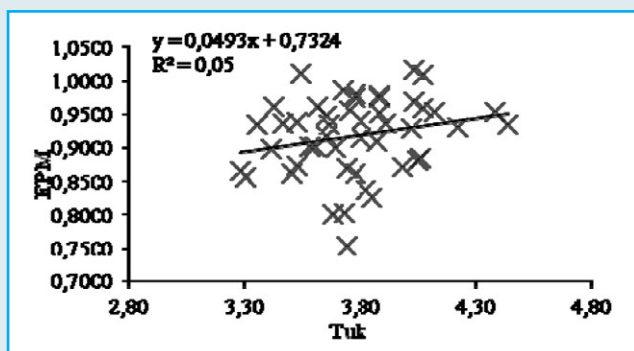
Je zde také oprávněná metodická otázka aplikace analytických mlékařských metod, přímých (referenčních) i nepřímých. Ta je poměrně jasná u syrového (nativního) mléka. Problémy však nastávají s iniciací a zejména průběhem lipolýzy a proteolýzy. Tyto procesy pozmění mléčnou matici, jako pozadí nepřímých i přímých metod v multikomponentním mléčném systému. Přestávají tak často platit kalibrační modely nepřímých metod a dochází k různým driftům výsledků (domnělé změny). Tyto změny však mohou nezřídka zpochybnit i platnost výsledků metod přímých. Výběr metod pro popis dynamiky procesů musí být uvážlivý, opatrný, individuální a se znalostí podstaty věci a možných vlivů na věrohodnost výsledků. Z uvedeného vyplývá, že je to postup metodicky náročný. Zejména je ohrožena věrohodnost výsledků nepřímé infraanalýzy (MIR a MIR-FT, NIR a NIR-FT, tedy ve středové a blízké oblasti IR spektra, s technologií optických filtrů, nebo interferometrem a Fourierovými transformacemi). Principiálně, popsanou interferencí mohou být narušeny i výsledky např. metod chromatografických či elektroforetických. Interpretace výsledků všech metod musí být opatrná, často s relevantními opravnými korekcemi, zjištěnými výzkumem, empiricky nebo teoreticky, a nebo musí být metody nějak vhodně adjustovány na předpokládané změny podmínek měření. Tyto procesy mohou ohrozit např. i věrohodnost výsledků PSB (fluoro-opto-elektronická metoda průtočné cytometrie). Znalost těchto procesů je pak jedním ze základních kritérií výběru statistických metod hodnocení výsledků podobných experimentů s průběhem destruktivních vlivů v biologicky (biochemicky a biofyzikálně) proměnlivé matici. I zde byla použita tato strategie selektce dat podle možného vlivu destrukce na spolehlivost

Obr. 2 Vztah počtu somatických buněk (PSB; 10^3 ml^{-1}) a EPM (mmol l^{-1}) v syrovém kravském mléce / Relationship between somatic cell count (PSB; 10^3 ml^{-1}) and EPM (mmol l^{-1}) in raw cow milk



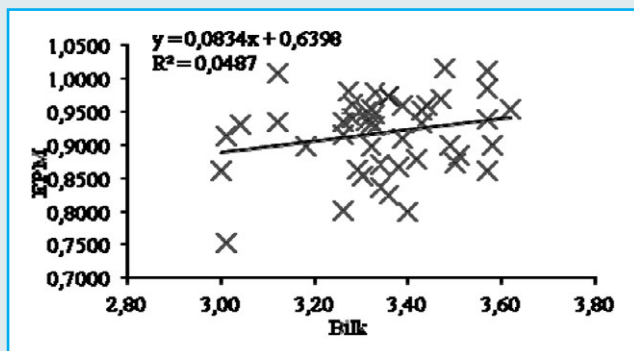
n = 57; r = 0,0849; P > 0,05

Obr. 3 Vztah tuku (%) a EPM (mmol l^{-1}) v syrovém kravském mléce / Relationship between fat (%) and EPM (mmol l^{-1}) in raw cow milk



n = 47; r = 0,2236; P > 0,05

Obr. 4 Vztah bílkovin (%) a EPM (mmol l^{-1}) v syrovém kravském mléce / Relationship between protein (%) and EPM (mmol l^{-1}) in raw cow milk

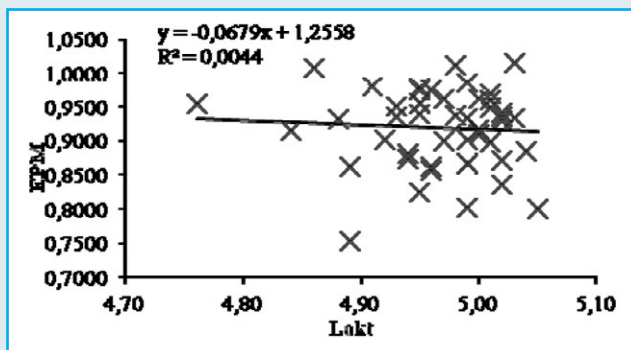


n = 47; r = 0,2207; P > 0,05

výsledků použitých analytických metod. V tomto hodnocení byl uvedený analyticko-metodický problém řešen, tedy, mimo jiné, vhodným separátním výběrem dílčích souborů pro regresní interpretaci vztahů podle vnitřní logiky designu pokusu.

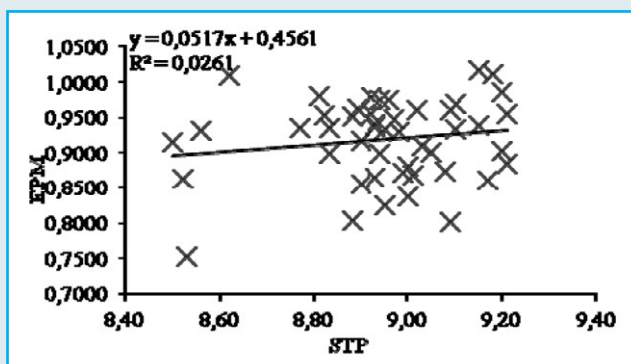
S ohledem na hodnocení popisovaných vztahů konkrétního pokusu by zde mohla být vhodná i vícenásobná regrese, ale vzhledem k výsledkům párových kombinací vztahů, by příliš vysvětlení variability EPM nezvedla. Znaky CPM a PSY jsou vzájemně vztažené, závislé

Obr. 5 Vztah laktózy (%) a EPM (mmol l^{-1}) v syrovém kravském mléce / Relationship between lactose (%) and EPM (mmol l^{-1}) in raw cow milk



n = 47; r = -0,0663; P > 0,05

Obr. 6 Vztah sušiny tukuprosté (STP; %) a EPM (mmol l^{-1}) v syrovém kravském mléce / Relationship between solids non-fat (STP; %) and EPM (mmol l^{-1}) in raw cow milk



n = 57; r = 0,0849; P > 0,05

(metodologicky = jeden obsažen v druhém, podle optimálních růstových teplot skupin mikroorganismů), kterýžto fakt násobnou regresi zvláště nepreferuje. Tato by musela být provedena odděleně s CPM a PSY, což by interpretaci nijak nezjednodušilo. Další znaky, jako složky (T, B, L a STP) a PSB se na variabilitě EPM podílely málo. Pro příklad lze zmínit následující výsledky vypočtených individuálních regresních vztahů v nativním mléce (soubor III; n = 47): - T \times EPM, r = 0,2236, P > 0,05; - B \times EPM, r = 0,2207, P > 0,05; - L \times EPM, r = -0,0663, P > 0,05; - STP \times EPM, r = 0,1616, P > 0,05 (Obr. 3, 4, 5 a 6). S výjimkou tuku platily však podobné vztahy i u souboru II (n = 57) a celého souboru (C; n = 104), tedy včetně destruktční části pokusu: - T \times EPM, r = 0,4462 a 0,346, P < 0,01; - B \times EPM, r = 0,1136 a 0,1204, P > 0,05; - L \times EPM, r = -0,1957 a -0,2258, P > 0,05; - STP \times EPM, r = 0,0387 a 0,0374, P > 0,05. Jak patrně, tyto výsledky by zahrnutím v násobné regresi stupeň vysvětlení variability v EPM příliš nezvýšily. Ještě zbývá otázka vlivu jejich vzájemných interakcí (základu případné synergie), ale podle těchto podílů na individuálních vlivech je zřejmé, že by ani tak tyto interakce významný podíl vysvětlení do variability EPM nevnesly. Proto by podstatu vztahu zase odděleně vysvětlovaly maximálně ukazatele mikrobiologické CPM a PSY. Byl hledán především hygienický vztah na EPM.

Interference do variability EPM od složek mléka by příliš nepomohly a tyto také nejsou nijak součástí hygienicko-kvalitativního hodnocení mléka, ale složení mléka, neboť jsou spíše výstupem výživy, popřípadě plemene.

Závěr

Výsledky pokusu ukázaly, že proteolýza, která je důležitým ukazatelem kvality pro údržnost mléka a mléčných výrobků, roste s mikrobiologickou kontaminací syrového kravského mléka a může být kontrolována metodou stanovení primárních aminoskupin. Hodnoty ekvivalentu proteolýzy mléka jsou významně vázány na hodnoty mikrobiologické kontaminace mléka. Složkové ukazatele mléka a počet somatických buněk vykázaly k ukazateli stavu proteolýzy v nativním mléce nevýznamné vztahy a vysvětlovaly málo této variability. To umožňuje vztahovat odvozený ukazatel proteolýzy a destrukce bílkovin EPM především k hygienické kvalitě mléka.

Poděkování

Príspevek vznikl za podpory projektu MZE NAZV KUS QJ1510339.

Literární reference

- ANTONELLI, M. L.- CURINI, R.- SCRICCIOLO, D.- VINCI, G. (2002): Determination of free fatty acids and lipase activity in milk: quality and storage markers. *Talanta*, 58, 561-568.
- BAUR, C.- KREWINKEL, M.- KRANZ, B.- VON NEUBECK, M.- WENNING, M.- SCHERER, S.- STOECKEL, M.- HINRICH, J.- STRESSLER, T.- FISCHER, L. (2015): Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 49, 23-29.
- BUTTON, P. D.- ROGINSKI, H.- DEETH, H. C.- CRAVEN, H. M. (2011): Improved shelf life estimation of UHT milk by prediction of proteolysis. *Journal of Food Quality*, 34, 229-235.
- CEMPÍRKOVÁ, R.- MIKULOVÁ, M. (2009): Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. *Czech Journal of Animal Science*, 54, 2, 65-73.
- ČSN 57 0530: Methods for testing of milk and milk products (In Czech). Czech Normalization Institute, 1973, Prague.
- ČSN 57 0536: Determination of milk composition by mid-infrared analyzer. (In Czech) Czech Normalization Institute, 1999, Prague.
- ČSN EN ISO/IEC 17025: Conformity assessment - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. (In Czech) Czech Normalization Institute, 2005, Prague.
- ČSN EN ISO 13366-1 (57 0531): Milk - Somatic cell count determination - Part 1: Microscopy method. Czech Normalization Institute, 1998, Prague.
- ČSN EN ISO 13366-2 (57 0531): Milk - Somatic cell count determination - Part 2: Manual for fluoro-opto-electronic instrument operation. Czech Normalization Institute, 2007, Prague.
- ČSN ISO 8552: Estimation of psychrotrophic microorganisms - Colony count technique at 21 °C (Rapid method). Prague, 2005.
- ČSN EN ISO 4833: Microbiology of food and animal feeding stuff's - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony count technique at 30 °C. Prague, 2003.
- ČURDA, L.- DRYÁKOVÁ, A.: Modification of spectrophotometrical method for the determination of primary amino-groups in milk proteins. National cheese competition, 22. 1. 2003, Prague, 2003, Czech Republic. Book of abstracts, 9. ISBN 80-86238-31-8.
- DATTA, N.- DEETH, H. C. (2003): Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 36, 173-182.
- GAUCHER, I.- MOLLÉ, D.- GARNAIRE, V.- GAUCHERON, F. (2008): Effects of storage temperature on physico-chemical characteristics of semi-skimmed UHT milk. *Food Hydrocolloids*, 22, 130-143.

- HANUŠ, O.- VEGRIČHT, J.- FRELICH, J.- MACEK, A.- BJELKA, M.- LOUDA, F.- JANŮ, L. (2008): Analyse of raw cow milk quality according to free fatty acids contents in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*, 53, 1, 17-30.
- CHEN, L.- DANIEL, R. M.- COOLBEAR, T. (2003): Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, 13, 255-275.
- CHRAMOSTOVÁ, J.- RUBINA, N.- ŠEDIVCOVÁ, V.- DRAGON, M.- NĚMEČKOVÁ, I.- ROUBAL, P. (2014): Influence of low temperature on the growth and proteolysis of microorganisms isolated from raw milk. *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 146, 10-13.
- LE ROUX, Y.- COLIN, O.- LAURENT, F. (1995): Proteolysis in samples of quarter milk with varying somatic cell counts. 1. Comparison of some indicators of endogenous proteolysis in milk. *Journal of Dairy Science*, 78, 1289-1297.
- MIKULOVÁ, M.: Content of free fatty acids lipolytic bacteria and somatic cells in relation to milking technology (2011). *Journal of Agrobiolgy*, 28, 1, 49-54.
- O BRIAN, B.- O CALLAGHAN, E.- DILLON, P. (1998): Effect of milking machine systems and components on free fatty acid levels in milk. *Journal of Dairy Research*, 65, 335-339.
- PROKOPOVÁ, B. (2008): Optimalizace přípravy hydrolyzátů syrovátkových bílkovin a jejich aplikace. Diplomová práce VŠCHT Praha.
- THOMSON, N. A.- WOOLFORD, W. M.- COPEMAN, A. P. J. (2005): Milk harvesting and cow factors influencing seasonal variation in the levels of free fatty acids in milk from Waikato dairy herds. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 48, 11-21.
- TOUŠOVÁ, R.- STÁDNÍK, L.- DUCHÁČEK, J. (2013): Effects of season and time of milking on spontaneous and induced lipolysis in bovine milk fat. *Czech Journal of Food Sciences*, 31, 1, 20-26.
- VYLETĚLOVÁ, M.- FICNAR, J.- HANUŠ, O. (2000 a): Vliv lipolytických enzymů *Pseudomonas fluorescens* na uvolňování mastných kyselin z mléčného tuku. *Czech Journal of Food Sciences*, 18, 5, 175-182.
- VYLETĚLOVÁ, M.- HANUŠ, O.- URBANOVÁ, E.- KOPUNECZ, P. (2000 b): Výskyt a identifikace psychrotrofních bakterií s proteolytickou a lipolytickou aktivitou v bazénových vzorcích mléka v podmínkách technologií prvovýrobního uskladnění. *Czech Journal of Animal Science*, 45, 373-383.
- WIKING, L.- NIELSEN, J. H.- BAVIUS, A. K.- EDVARDSSON, A.- SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. (2006): Impact of milking frequencies on the level of free fatty acids in milk, fat globule size, and fatty acid composition. *Journal of Dairy Science*, 89, 1004-1009.

Přijato do tisku: 14. 10. 2016

Lektorováno: 21. 11. 2016

VLIV PŘÍKRMU ŘASY JAPANOCHYTRIUM SP. NA PROFIL MASTNÝCH KYSELIN V OVČÍM MLÉCE A JOGURTU

Markéta Borková¹, Klára Michnová², Ivana Hyršlová¹,
Milena Fantová², Miloslav Šulc²

¹ Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

² Česká zemědělská univerzita v Praze

The influence of *Japanochytrium* sp. algae supplementation on fatty acid profile of sheep milk and yoghurt

Abstrakt

Výživa ovčí patří mezi významné faktory, které mohou ovlivnit zastoupení mastných kyselin v mléce a jeho produktech. Účelem této práce bylo stanovit vliv přísady