

Závěr

Virulentní laktokokový bakteriofág 936 představuje vážný problém mlékárenského průmyslu a výrobci vedou neustálý boj proti tomuto viru, aby jej udrželi pod kontrolou. Kvantifikace tohoto bakteriofága postupy molekulární biologie může být velmi účinnou součástí prevence, neboť nabízí rychlou a citlivou metodu kvantifikace nezávislou na kultivaci viru. Kvantitativní PCR (qPCR) je technologií založenou na tradiční PCR, avšak vykazuje vyšší specifičnost, přesnost a zejména přináší možnost kvantifikace počtu kopií cílové DNA, v tomto případě bakteriofága v mléčných produktech. Navíc qPCR shromažďuje data v reálném čase v celém rozsahu reakce a nikoliv jen v koncovém bodě jako konvenční PCR. Tato metoda proto může být výrazným pomocníkem pro včasnou identifikaci možných problémů ve fermentačních provozech.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory projektu NAZV MZe ČR č. QJ1510338 v programu KUS a projektu CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000460 v programu OP VVV.

Seznam literatury

- ATAMER Z., DIETRICH J., MÜLLER-MERBACH M., NEVE H., HELLER K.J., HINRICHS J. (2009): Screening for and characterization of *Lactococcus lactis* bacteriophages with high thermal resistance. *Int. Dairy J.*, 19, s. 228-235.
- COFFEY A., ROSS R.P. (2002): Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, s. 303-21.
- DEL RIO B., BINETTI A. G., MARTÍN M. C., FERNÁNDEZ M., MAGADÁN A. H., ALVAREZ M. A. (2007): Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiol.*, 24, s. 75-81.
- EMOND E., MOINEAU S. (2007): Bacteriophages in food fermentations. Ve: MCGRATH S., VAN SINDEREN D. (edit.): *Bacteriophage: genetics and molecular biology* (pp. 93-124). Norfolk, UK, Caister Academic Press.
- FLIEGEROVÁ K., MRÁZEK J., KAVKOVÁ M., MARKOVÁ J., KŘEPELKOVA M., NĚMEČKOVÁ I., KOPEČNÝ J. (2017): Přirozené systémy ochrany proti bakteriofágům u bakterií mléčného kvašení. *Mlékařské listy*, 28, s. 21-24.
- KLEPPEN H. P., TINE BANG T., INGOLF F. NES I. F., HELGE HOLO H. (2011): Bacteriophages in milk fermentations: Diversity fluctuations of normal and failed fermentations. *Int. Dairy J.*, 21, s. 592-600.
- MAHONY J., MURPHY J., VAN SINDEREN D. (2012): Lactococcal 936-type phages and dairy fermentation problems: from detection to evolution and prevention. *Front. Microbiol.*, 3, s. 335.
- MURPHY J., BOTTACINI F., MAHONY J., KELLEHER P., NEVE H., ZOMER A., NAUTA A., VAN SINDEREN D. (2016): Comparative genomics and functional analysis of the 936 group of lactococcal Siphoviridae phages. *Sci. Rep.*, 6, s. 21345.
- ŠILHÁNKOVÁ L. (1995): *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. Praha, Victoria Publishing, 361 s. ISBN: 80-85605-71-6.

Korespondenční autor:

RNDr. Kateřina Fliegerová, CSc.,
Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.,
Vítěnská 1083, 142 20 Praha 4, Česká republika,
fliegerova@iapg.cas.cz.

Přijato do tisku: 5. 11. 2018
Lektorováno: 27. 11. 2018

VÝVOJ SOFTWAREHO NÁSTROJE (PM CIS) PRO PREDIKCI MLÉČNÝCH SLOŽEK POMOCÍ SPEKTRÁLNÍCH DAT IMPEDANCE

Jan Říha¹, Oto Hanuš², Jaroslav Kopecký²,
Radoslava Jedelská²

¹ Bentley Czech s.r.o., Praha

² Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

Development of the software tool for prediction of milk components by impedance spectral data (PM CIS)

Abstrakt

Měření impedančního spektra (případně spektra posunu fáze střídavého proudu) je široce používanou metodou pro predikci fyzikálně-chemických parametrů vzorků živočišného původu. Tato práce představuje software PM CIS (Prediction of Milk Components by Impedance Spectral Data), který obsahuje souhrn predikčních modelů pro řadu parametrů složení mléčných vzorků na základě impedančního spektra a spektra posunu fáze. Modely byly vytvořeny s použitím PLS kalibrací a mohou být integrovány do měřicích řešení. Nejlepších výsledků bylo dosaženo pro predikci počtu somatických buněk, obsahu bílkovin a laktózy. Aplikace SW s vhodným měřicím zařízením představuje vhodné screeningové řešení pro predikci mléčných složek.

Klíčová slova: vzorek mléka, tuk, bílkoviny, laktóza, počet somatických buněk, impedanční spektroskopie

Abstract

Impedance and phase shift measurement represent widely used methods for prediction of physical and chemical properties of biological samples. PM CIS (Prediction of Milk Components by Impedance Spectral Data) software incorporates prediction models for milk components parameters based on impedance and phase shift spectra. Models are created by using PLS calibration and they can be incorporated into different technology based measuring devices. The best results have been obtained for somatic cell count, protein and lactose content in the milk samples. SW application together with corresponding technology could be used as screening solution for prediction of milk components.

Keywords: milk sample, fat, protein, lactose, somatic cell count, impedance spectroscopy

Úvod

Měření impedance (bioimpedance) je metoda široce používaná pro charakterizaci vzorků živočišného původu

Tab. 1 Popis souboru analyzovaných vzorků mléka

Složka/Parametr	Počet vz.	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Std. Dev.
Tuk	80	4.9586	4.9450	2.7300	6.840	0.6599
Bílkoviny	80	3.5552	3.4545	2.7660	4.425	0.4219
Laktóza	80	5.2377	5.2485	4.7330	5.657	0.1786
Sušina	80	14.7515	14.6350	12.3600	16.730	0.9251
SNF	80	9.8191	9.7800	8.7400	10.700	0.4613
Močovinový dusík	80	17.2650	17.1500	10.3000	23.100	2.8155
pH	80	-0.1075	-0.0900	-0.2400	0.000	0.0578
Kasein	80	2.8088	2.7800	1.9700	3.640	0.4041
Kyselina citrónová	80	0.1774	0.1740	0.1250	0.279	0.0298
BHBB	80	1.0595	1.0000	0.3700	2.460	0.4553
BHBA	80	0.0357	0.0360	0.0030	0.073	0.0149
Ac_BI	80	0.0857	0.0790	0.0310	0.166	0.0263
Laktoferin	80	121.7875	119.5000	53.0000	208.000	35.5772
FFA	80	0.1895	0.1780	0.0100	0.390	0.0987
MFA	80	1.0001	1.0000	0.8700	1.120	0.0449
PFA	80	0.0085	-0.0025	-0.0630	0.112	0.0411
SFA	80	3.3461	3.3450	1.6900	4.570	0.5178
UFA	80	0.9296	0.8650	0.5100	2.460	0.3361
PA	80	2.0184	2.0550	0.9800	2.950	0.3330
SA	80	0.4473	0.4225	0.2790	0.998	0.1256
Kyselina olejová	80	0.6809	0.6300	0.3600	1.820	0.2402
O-3	80	0.0396	0.0387	0.0167	0.066	0.0081
O-6	80	0.1340	0.1290	0.0550	0.228	0.0308
PSB	80	232.6875	89.0000	3.0000	3146.000	437.3803

SNF, sušina tukuprostá; BHBB a BHBA, formy měření beta hydroxy-butyátu; Ac, aceton; FFA, volné mastné kyseliny; MFA, mononenasyčené mastné kyseliny; PFA, polyenenasyčené mastné kyseliny; SFA, nasycené mastné kyseliny; UFA, nenasycené mastné kyseliny; O-3 a O-6, omega 3 a 6 mastné kyseliny; PSB, počet somatických buněk.

(DAMEZ et al., 2007; DAMEZ a CLERJON, 2013). Obecně se jedná o popis odporových vlastností materiálu, kde jednotlivé složky hrají úlohu rezistorů či kondenzátorů. Impedance je závislá na nosné frekvenci a intenzitě použitého elektrického proudu a také vlastnostech částic (buněk, složek) obsažených ve vzorku. Kapacitance (jalová část impedance součástky s kapacitou odporu proti průchodu proměnlivého elektrického pole nebo střídavého elektrického proudu) částic způsobuje tzv. fázový posun nosné frekvence střídavého proudu, který bývá druhou sledovanou veličinou v charakterizaci zvoleného materiálu. Impedance je často využívanou metodou např. pro sledování vlastností masa - křehkost (LEPETIT a SALE, 2002), obsah tuku (SWANTEK et al., 1992), obsah solí (CHEVALIER et al., 2006) a vlastností jako čerstvost (PÉREZ-ESTEVE et al., 2014). Její použití je však mnohem širší, např. i v diagnostice kožních melanomů (ABERG et al., 2011; MOHR et al., 2013 NARAYANA-MURTHY et al., 2018), nebo při analytice různých anorganických materiálů (TATARKOVIČ et al., 2012).

Metody rychlé analýzy potravin mohou být důležité v řízení technologických zpracovatelských procesů. Operativní znalost složení a vlastností mléka průběžně v technologickém procesu je důležitá výhoda pro možnost efektivního řízení procesu skladování, ošetření a zpracování suroviny na produkty s vyšší přidanou hodnotou (GURRÍA, 2014), která je důležitým marketingovým faktorem konkurenceschopnosti v potravinářství.

V této práci se zaměřujeme na popis fyzikálně-chemického složení mléčných vzorků pomocí spektra impedance a posunu fáze při různých frekvencích nosného elektrického proudu a popis softwarového řešení, které je aplikovaným výsledkem této výzkumné činnosti. Software PMCIS představuje souhrn kalibračních modelů vytvořených v SW Unscrambler X 10.3 (CAMO Software, 2013) pro přímé použití v dalších technologických využívajících impedanční metody. Poskytuje také nezbytný metodický základ pro práci s daty obdobného charakteru.

Materiál a metody

Za účelem vytvoření software PMCIS bylo analyzováno 80 vzorků mléka z chovu plemen České strakaté a Holštýn (40 a 40 vzorků) pomocí metody FTIR spektroskopie (DairySpec FT (složení mléka), Bentley Instruments, USA) a průtokové cytometrie (SomaCount 500 (PSB), Bentley Instruments, USA) na následující

složky a vlastnosti mléka: obsah tuku (%), hrubých bílkovin (%), monohydrátu laktózy (%), sušiny (%), sušiny

Tab. 2 Parametry predikčních modelů SW PMCIS pro jednotlivé parametry mléčných vzorků

Složka/Parametr	RMSE	R-Square	No. of PLS Components
PSB	65.754318	0.977853	28
Tuk	0.3570164	0.6701261	35
Bílkoviny	0.1637953	0.8388631	35
Laktóza	0.0813511	0.7897015	35
Sušina	0.8714994	0.605065	25
SNF	0.754862	0.3518004	25
Močovinový dusík	3.3973455	0.4060381	23
BMM (FPD)	11.221415	0.7715007	28
pH	0.0634849	0.5179407	28
Kasein	0.2189238	0.6810601	25
Kys. citrónová	0.0349	0.482	30
BHBB	0.4275703	0.7154949	30
BHBA	0.462	0.018871	30
Aceton	0.034	0.4205179	28
Laktoferin	23.500925	0.540455	28
FFA	0.96	0.665	30
MFA	0.05267	0.477	28
PFA	0.0408	0.676	28
SFA	0.522	0.564	28
UFA	0.383	0.6249	28
PA	0.358	0.516	28
SA	0.139	0.645	28
O-3	0.01114	0.308	28
O-6	0.04582	0.414	28

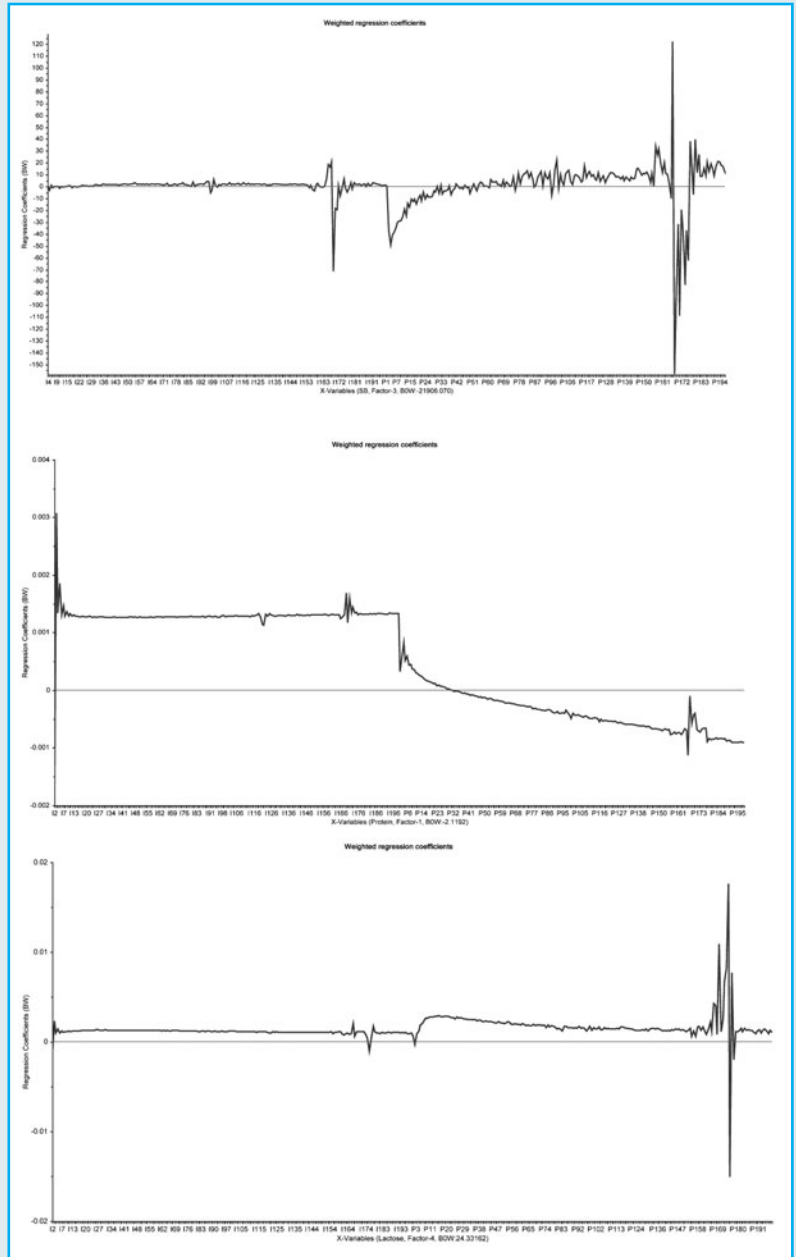
tukuprosté (SNF; %), mléčného močovinného dusíku (mmol/l), bod mrznutí mléka (BMM, FPD; mC), obsah kaseinu (%), kyseliny citrónové (%), BHB v krvi (mmol/l), BHB v mléce (mmol/l), acetonu (mmol/l), volných mastných kyselin (FFA) (mmol/l), a profilu mastných kyselin (MFA, PFA, SFA, UFA, PA, SA, OA, O-3, O-6) (%), laktoferinu (mg/l) a počtu somatických buněk (PSB; 10^3ml^{-1}).

Vzorky byly dále analyzovány za pomoci analyzátoru impedančního spektra (mScope, Bentley Czech s.r.o., CZ) za účelem získání spekter impedance a fázového posunu pro rozmezí 1 kHz - 100 kHz s krokem 500 Hz. Naměřená spektra tak obsahují 200 datových bodů odpovídajících hodnotám impedance a posunu fáze v daných frekvencích. Vzorky mléka byly před analýzou ošetřeny 15 minut ve vodní lázni s teplotou 37 °C.

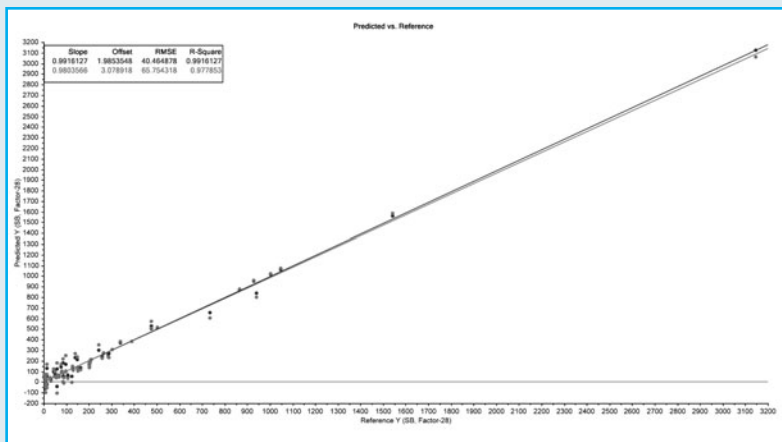
Získaná spektra impedance a posunu fáze byla dále analyzována pomocí SW Unscrambler X 10.3 (CAMO software, 2013) a metody PLS (Partial Least Square) kalibrace s křížovou validací.

Výsledky a diskuse

Vzhledem k cíli této práce je tato kapitola věnována výsledkům dosaženým pro jednotlivé predikční modely SW PMCIS. Jejím předmětem tak není diskuze nad podobou či charakteristikou naměřených dat a důvody, které je způsobují, ale popis predikčních možností složení mléčných vzorků pomocí metody určení impedančního spektra a spektra posunu fáze a možností, které nabízí popsané SW řešení. Proto nebylo použito žádné transformační řešení naměřených dat ani jejich matematické ošetření. Vzhledem k různým základním maticím a různému složení vzorků mléka lze však tato opatření doporučit pro



Obr. 1-3 Regresní koeficienty impedančního spektra a spektra posunu fáze pro parametry: PSB, obsah bílkovin a laktózy (%)



Obr. 4 Predikční parametry modelu pro PSB (trénovací množina a 10-násobná validace)

další výzkum popsané problematiky. Charakteristika vstupního souboru vzorků mléka z hlediska všech sledovaných parametrů je uvedena v Tab. 1. Výsledky predikčních modelů SW PMCIS pro jednotlivé složky mléka, případně další vlastnosti, jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2 uvádí výsledky (Root Mean Square Error, koeficient determinace R-Square a počet komponent PLS) pro jednotlivé predikční modely sledovaných parametrů mléčných vzorků. Tyto modely jsou přímo dostupné v SW balíku PMCIS pro použití se srovnatelnou technologií měření impedančního spektra a spektra posunu fáze pomocí SW Unscrambler X. Regresní koeficienty impedančního spektra a spektra posunu fáze jsou

vyobrazeny na grafech (Obr. 1 - 3). Mezi modely s nejlepšími parametry predikce patří podle Tab. 2 parametry: PSB (Obr. 4), bílkoviny, laktóza. Regresní koeficienty impedančního spektra a spektra posunu fáze jsou vyobrazeny na grafech (Obr. 1 - 3).

Závěr

Na základě prezentovaných výsledků (Tab. 2) lze konstatovat, že metodu predikce parametrů mléčných vzorků pomocí PLS kalibrací s využitím impedančního spektra a spektra posunu fáze v popsáném frekvenčním rozsahu lze považovat za dostatečnou screeningovou metodu v porovnání s FTIR analýzou pro efektivně vybrané složky a vlastnosti mléka.

Poděkování

Práce vznikla za podpory projektů NAZV KUS QJ1510339 a MZE RO 1418.

Seznam literatury

- ABERG, P., BIRGERSSON, U., ELSNER, P., MOHR, P., OLLMAR, S. (2011): Electrical impedance spectroscopy and the diagnostic accuracy for malignant melanoma. *Experimental Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2011.01285.x>
- CAMO software. The Unscrambler X 10.3. 2013. www.camo.com.
- DAMEZ, J. L., CLERJON, S. (2013): Quantifying and predicting meat and meat products quality attributes using electromagnetic waves: An overview. *Meat Science*, 95, s. 879-896.
- DAMEZ, J. L., CLERJON, S., ABOUELKARAM, S., LEPETIT, J. (2007): Dielectric behavior of beef meat in the 1-1500 kHz range: Simulation with the Fricke/Cole-Cole model. *Meat Science*, 77, s. 512-519.
- DOMINIQUE, C., OSSARTB, F., GHOMMIDH, C. (2006): Development of a non-destructive salt and moisture measurement method in salmon (*Salmo salar*) fillets using impedance technology. *Food Control*, 17, s. 342-347.
- GURRÍA, A. (2014): Vláda České republiky. Angel Gurría v Praze prezentoval Hospodářský přehled OECD pro ČR 2014. 18.3.2014. <https://www.vlada.cz/cz/media-centrum/aktualne/angel-gurria-v-praze-prezentoval-hospodarsky-prehled-oecd-pro-cr-2014-116830/>
- CHEVALIER, D., OSSART, F., GHOMMIDH, CH. (2006): Development of a non-destructive salt and moisture measurement method in salmon (*Salmo salar*) fillets using impedance technology. *Food Control*, 17, 5, s. 342-347.
- LEPETIT, J., SALE, P. (2002): Electrical impedance and tenderisation in bovine meat. *Meat Science*, 60, s. 51-62.
- MOHR, P., BIRGERSSON, U., BERKING, C., HENDERSON, C., TREFZER, U., KEMENY, L., SUNDERKÖTTER, C., DIRSCHKA, T., MOTLEY, R., FROHM-NILSSON, M., REINHOLD, U., LOQUAI, C., BRAUN, R., NYBERG, F., PAOLI, J. (2013): Electrical impedance spectroscopy as a potential adjunct diagnostic tool for cutaneous melanoma. *Skin Research and Technology*, 19, s. 75-83.
- NARAYANAMURTHY, V., PADMAPRIYA, P., NOORASAFRIN, A., POOJA, B., HEMA, K., AL'AINA YUHAINIS FIRUS KHAN, NITHYAKALYANIC, N., FAHMI SAMSURIB (2018): Skin cancer detection using non-invasive techniques. *RSC Advances*, 8, s. 28095-28130. DOI: 10.1039/c8ra04164d
- PÉREZ-ESTEVE, E., FUENTES, A., GRAU, R., FERNÁNDEZ-SEGOVIA, I., MASOT, R., ALCANIZ, M., BARAT, J. M. (2014): Use of impedance spectroscopy for predicting freshness of sea bream (*Sparus aurata*). *Food Control*, 35, 1, s. 360-365.
- SWANTEK, P. M., CRENSHAW, J. D., MARCHELLO, M. J., LUKASKI, H. C. (1992): Bioelectrical impedance: a nondestructive method to determine fat-free mass of live market swine and pork carcasses. *Journal of Animal Science*, 70, s. 169-177.
- TATARKOVIČ, M., BRONCOVÁ, G., KRONDÁK, M. (2012): Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Application in Chemical Analysis. *Chemická Listy*, 106, s. 1067-1074.

Korespondující autor: jan@bentleyczech.cz

O využití autorizovaného software (ASW) PMCIS existuje smlouva podepsaná poskytovatelem (Bentley Czech s.r.o., Praha) a uživatelem (Svaz výrobců mléka a.s. Šumperk).

Recenze tohoto příspěvku je zároveň dokladem odborného projednání cíle, metod vývoje, funkcí, výsledků, výhod a otázek praktické aplikace autorizovaného software PMCIS.

S ohledem na srovnání novosti postupu: PMCIS je novým typem vyhodnocovacího nástroje vyplývajícího z výsledků vlastního předchozího výzkumu a relevantních výsledků odborné literatury. S ohledem na registraci RIV se jedná o vytvoření nového algoritmu založeného na rozšíření aplikačních možností impedanční spektroskopie.

Odhad přínosů použití PMCIS byl proveden s následujícími výsledky:

- ušetřené náklady na lidskou práci v porovnání s referenčními metodami při zpracování 100 vz/den: 2000 Kč;
- ušetřené náklady na lidskou práci v porovnání s jinými nepřímými metodami při zpracování 100 vz/den: 250 Kč;
- ušetřené náklady při nákupu technologického zařízení srovnatelného výkonu stovek analýz za den cca 400 000 Kč na kus zařízení.

Povinné zveřejnění a dostupnost výsledků získaných jako produkt vývoje a inovací prostřednictvím veřejných prostředků na VaVal: www.bentleyczech.cz.

Vývoj tohoto ASW s označením PMCIS byl podporován projekty NAZV KUS QJ1510339 a RO 1418.

Přijato do tisku: 16. 11. 2018

Lektorováno: 30. 11. 2018

PAVLÁKOVA ZRACÍ ZKOUŠKA MODELOVĚ KONTAMINOVANÝCH TVAROHŮ

Irena Němečková, Šárka Havlíková, Jana Smolová,

Petr Roubal

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Pavlak's ripening test of model contaminated acid curd

Souhrn

Průmyslový tvaroh je základní surovinou pro výrobu kyselých sýrů zrajících pod mazem. Jeho základními jakostními znaky jsou sušina, titrační kyselost a senzoričné vlastnosti čerstvého tvarohu a tvarohu po Pavlákově zrací zkoušce. Tato zkouška probíhá při 25 °C po dobu 3 dnů a odráží fenotypové projevy přítomných mikroorganismů. Avšak souvislost výsledku této zkoušky s mikrobiologickými parametry tvarohu není přesně známa. Proto byl zjišťován vliv přídatku 41 kmenů různých druhů mikroorganismů na výsledek Pavlákovy zrací zkoušky pro 4 šarže