

KVANTIFIKACE PŘÍPADNÉHO INTERFERENCEČNÍHO VLIVU KONZERVACE MLÉKA AZIDIOLEM NA VÝSLEDKY REFERENČNÍCH A RUTINNÍCH METOD ANALÝZ SLOŽKOVÝCH MLÉČNÝCH UKAZATELŮ A VLASTNOSTÍ

Oto Hanuš¹, Hana Nejeschlebová¹, Josef Kučera²,
Martina Kubínová², Martina Tišnovská², David Lipovský²,
Radoslava Jedelská¹, Jaroslav Kopecký¹

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

² Českomoravská společnost chovatelů a.s., Hradištko

Quantification of the potential interference effect of milk preservation with Azidiol on the results of reference and routine methods of analysis of component milk indicators and properties

Abstrakt

Pro rutinní, komerční, mléčné laboratoře znamená obecně nezbytná aplikace chemické konzervace vzorků mléka z důvodu zachování jeho vlastností během transportu až do okamžiku analýzy, v postupných krocích, vždy testové řešení logistického problému s nejuvhodnější přijatelnou možností kombinace četných faktorů, jako: - účinnost konzervace podle typu a koncentrace konzervující látky, času a teploty uložení a transportu vzorků; - šetrnost konzervace k životnímu prostředí (také zdraví laboratorního personálu); - pracnost konzervace; - snadnost aplikace (forma roztoku, prášku, tablet) a manipulovatelnosti; - náklady na konzervaci; - případně některé další specifické aspekty. Proto byly popsány možné vlivy azidiolové konzervace na výsledky analýz vzorků mléka pro vybrané mlékařské analytické metody. Konzervace Azidiolem proti nekonzervovanému mléku vykázala významné korelace a převážně významné, systematické

(a relativně stabilní) odchylky, které však z hlediska relativního podílu na měřených hodnotách byly zcela zanedbatelné (obvykle pod 1 %) pro majoritní složky mléka (tuk, bílkoviny, kasein, laktóza, sušina tukuprostá, sušina celková) a přijatelné (obvykle pod 5 %) pro minoritní složky mléka (močovina, volné mastné kyseliny, kyselina citronová). U bodu mrznutí mléka byla významná korelace a významná odchylka, která však byla zcela zanedbatelná (1,37 %). Při stanovení počtu somatických buněk mléka byla zjištěna významná korelace a významná odchylka, která však byla zcela zanedbatelná (1,4 %). Výsledky ukázaly vhodnost použití Azidiolu pro ošetření stability rutinních vzorků syrového mléka v mlékařských laboratořích.

Klíčová slova: bazénový vzorek, syrové kravské mléko, Azidiol, tuk, bílkoviny, laktóza, sušina tukuprostá, močovina, volné mastné kyseliny, počet somatických buněk, deprese bodu mrznutí mléka

Abstract

In general, for routine, commercial, dairy laboratories necessary application of chemical preservation of milk samples in order to preserve its properties during transport until the moment of analysis, in successive steps, always means a test solution to the logistical problem with the most suitable acceptable possibility of combining numerous factors, such as: - efficiency of preservation according to type and concentration of preservative, time and temperature of storage and transport of samples; - environmental friendliness of conservation (including the health of laboratory staff); - conservation effort; - ease of application (form of solution, powder, tablet) and handling; - conservation costs; - possibly some other specific aspects. Therefore, the possible effects of azidiol preservation on the results of milk sample analyzes for selected dairy analytical methods were described. Preservation with Azidiol against unpreserved milk showed significant correlations and mainly significant, systematic (and relatively stable) deviations, which, however, in terms of relative share in the measured values, were completely negligible (usually below 1%) for the major milk components (such as fat, proteins, casein, lactose, solids non fat, total solids) and

acceptable (usually below 5%) for minor milk components (urea, free fatty acids, citric acid). For the freezing point of milk, there was a significant correlation and a significant, but negligible, deviation (1.37%). When determining the somatic cell count of milk, a significant correlation was found with a significant deviation which was completely negligible (1.4%). The results showed the suitability of using Azidiol for treating the stability of routine samples of raw milk in dairy laboratories.

Keywords: bulk tank sample, raw cow milk, Azidiol, fat, protein, lactose, solids non fat, urea, free fatty acids, somatic cell count, milk freezing point depression

Úvod

Systém referenčních a rutinních mléčných laboratoří hraje významnou, ne-li zásadní, roli v podpoře kvality a bezpečnosti mléčného potravinového řetězce. Údaje ze vzorku mléka, jako jsou hlavní složky, počet somatických buněk, močovina a ketolátky, hrají stěžejní roli při řízení stáda (LACTANET, 2021). To zvyrazňuje potřebu kontroly kvality ošetření a transportu vzorků mléka. Sledování a vyhodnocování kvality syrového mléka pomáhá plnit důležitou společenskou zakázku (BAUMGARTNER a kol., 2000).

Pořadí náročnosti složek nebo vlastností mléka na podmínky transportu bazénových vzorků v kontrole kvality mléka, podle jejich stability lze, na základě dlouhodobých zkušeností, uvést metodou kvalifikovaného odhadu následovně, v sestupném pořádku: - celkový počet mikroorganismů (CPM); - ostatní mikroorganismy pro kultivační metody; - rezidua inhibičních látek (RIL); - počet somatických buněk (PSB); - volné mastné kyseliny (VMK); - tuk; - bod mrznutí mléka (BMM); - močovina; - laktóza; - bílkoviny; - kasein; - sušina tukuprostá. Je přirozené, z hlediska významu, že limitujícím faktorem pro systém transportu vzorků je samozřejmě náročnost CPM.

Významnou (kritickou) periodou pro vzorky mléka je doba od odběru do analýzy. Konzervace vzorků mléka je jedním z důležitých úkonů při odběru vzorků, jejich transportu a uložení do analýzy v mlékařství. Celosvětově je konzervace využívána ve většině systémů kontroly kvality a složení mléka (bazénové vzorky) a kontrole mléčné užitkovosti (individuální vzorky). Cílem konzervace je udržet složení a kvalitu vzorku mléka v nezměněné podobě až do okamžiku analýzy, aby výsledky mléčných ukazatelů bylo možné pokládat za věrohodné. To je významné proto, že výsledky referenčních a rutinních analýz jsou v mlékařství často používány v řadě zdravotních a hospodářských činností:

- pro kontrolu kvality surovin v potravinářství a potravin v humánní výživě, tedy bezpečnost potravinových řetězců;
- pro zpeněžování mléka podle kvality na rozhraní prvovýroby a zpracovatelského průmyslu;
- pro účely řízení zpracovatelských technologických procesů a kontroly jejich výtěžnosti, tedy efektivitu;

- pro účely hospodářsky determinované selekce při šlechtění mléčného skotu a následně pro obchod s plemenným materiálem;
- pro kontrolu v rámci prevence nedostatků základní (energeticko-dusíkaté) vyváženosti výživy dojníc i zhoršení jejich zdravotního stavu;
- pro poradenství v prvovýrobě mléka;
- v neposlední řadě i pro stanovení podmínek světového obchodu s mlékem.

S postupem procesu akreditací (oficiální uznání způsobilosti k dané činnosti) laboratoří metody konzervace vzorků podléhají validaci, jsou uváděny ve standardních operačních postupech laboratoří a při pravidelných auditech akreditace jsou oficiálně kontrolovány. Proto byly tyto postupy i předmětem řady výzkumných prací. V těch se zpravidla sledovalo:

- pro jaký mléčný ukazatel (složení mléka, počet somatických buněk (PSB), celkový počet mikroorganismů (CPM), atd.) má být konzervant účinný;
- pro principiálně jakou analytickou metodu je konzervant použitelný, aby neblokoval bazální vlastnosti metody;
- vliv koncentrace a použité formy (pevná, tekutá) aplikace konzervantu na údržnost vzorků;
- vliv teploty a času uložení na údržnost vzorků;
- případný interferenční vliv konzervantu na výsledky analýz různých metod, podle jejich principu, který obecně má být minimální, resp. zanedbatelný;
- případné škodlivé vlivy potenciálního konzervantu na technologická zařízení a zejména životní prostředí a zdraví laboratorního personálu, které rovněž mají být minimální;
- definování formy, doby a podmínek použitelnosti konzervace, jak plyne z předchozích bodů.

Obecně se při konzervaci biologického materiálu jedná o zastavení, resp. utlumení, metabolické činnosti mikroorganismů, téměř vždy přítomných v syrovém mléce, jako v jednom z nejvhodnějších živých médií pro vysoký obsah vody a živin v ideálním poměru. Vhodná konzervace na určitý čas, někdy i dlouhý, zabrání destrukci organických struktur mléka a umožní prodloužení zachování vzorku. Z praktického hlediska je jednodušší konzervace pro složkové ukazatele mléka a případně některé jeho fyzikální vlastnosti, kde stačí pouhé blokování činnosti mikroflóry, její inaktivace, případně její usmrcení, než pro ukazatele hygienicko-mikrobiologické, kde pak, zejména při použití kultivačních mikrobiologických analytických metod, je třeba, aby růst mikroorganismů ve vzorku mléka dále pokračoval za podmínek metody.

Z relevantních zdrojů tak lze tradičně za účelově vhodné konzervační prostředky pro vzorky syrového mléka určené k různým typům analýz považovat např.: - dvojjodan draselný ($K_2Cr_2O_7$; KVAPILÍK a SUCHÁNEK, 1974; NG-KWAI-HANG a HAYES, 1982; KROGER, 1985; HANUŠ a kol., 1992 a, b; BARBANO a kol., 2010; ZAJÁC a kol., 2016); - azid sodný (NaN_3 ; BUCHBERGER a KIERMEIER, 1975; ANONYM, 1977); - bron-

pol (2-brom, 2-nitro, 1, 3-propanediol; ARDÖ, 1979 1982; HANUŠ a kol., 1992 a, b; CHALERMSAN a kol., 2004; SÁNCHEZ a kol., 2005; ZAJÁC a kol., 2015, 2016); - benzoan sodný ($C_7H_5NaO_2$); - sorbát draselný ($C_6H_7KO_2$); - kyselinu boritou (H_3BO_3); - kysličník uhličitý (CO_2); - a případně jejich četné komerční směsi, práškové či tabletové a roztoky (RAPP a MÜNCH, 1984; např. Heeschenovo činidlo, Azidiol (SÁNCHEZ a kol., 2005; ZAJÁC a kol., 2016), Bronolab W-II atd.) a někdy i vybraná antibiotika. Účinnost těchto látek v laboratorní mlékařské praxi zpravidla slouží k zachově vzorku mléka v kombinaci s jeho chladovým uložením (SJAUNJA, 1984 a, b; SJAUNJA a kol., 1984; BIGGS a kol., 1984; SZIJARTO a kol., 1990) a jeho co nejkratším transportem k analýze, což metodou optimalizace řeší obvykle logistika konkrétního systému kontroly kvality.

Ostatně, konzervačními postupy v potravinářství se lidstvo zabývalo od počátku své kulturní existence. Za historicky nejstarší a zcela neúspěšnější způsoby konzervace v potravinářství, mnohdy s velmi dlouhodobou účinností, lze považovat sušení, mrazení, chlazení a solení, kterážto postupy umožňovaly již v počátcích případně vhodné přírodní podmínky. Chlazení potravin je jedním z velmi známých, starých, v podstatě biologických, postupů jejich konzervace, tedy prodloužení trvanlivosti. Je průběžně využíváno i při podpoře stabilizace vzorků potravin, včetně mléka, při jejich transportu do laboratoře a uchování ke kontrole kvality. Ačkoliv to není obecně známo, je doloženo, že chlazení potravin ledem bylo využíváno již 400 let před našim letopočtem v Persii, tedy téměř před 2 500 lety, za využití úchoven ledu (systém „kanát - jakčal“), s cílenou údržbou chladu v izolovaných komorách cirkulujícím vzduchem, zachytávaným urbanistickými lapači, a kanalizačním přívodem studené vody z ledu hor do kulturních center lidských sídlišť. To dokládají výsledky archeologického výzkumu architektury starověku. Uvedené bylo a je významné v oblastech s extrémně teplým klimatem nebo s výraznými výkyvy teploty. Konzervace potravin chlazením v severských zemích byla pak vývojovou, technologickou výhodou a rovněž samozřejmostí v oblastech hlavně kolem polárního kruhu, ale mnohdy i mnohem jižněji, např. v jeskynních podmínkách.

Cílem této práce bylo, v praktických podmínkách mléčných analytických laboratoří, za daných metodických podmínek, bez ambice kontroly dalších četných variací konzervace, pro konkrétní mléčné ukazatele, posoudit možný interferenční efekt některých způsobů konzervace na věrohodnost výsledků vybraných analýz složek a vlastností mléka.

Materiál a metody

Použité analytické metody a přístroje a jednotky mléčných ukazatelů

Složení mléka, obsahu T (vysvětlivky zkratk a jednotky mléčných ukazatelů jsou vysvětleny pod Tab. 1), B, KAS, L, STP, TS, M, VMK, KC a hodnota EBMM

byly stanoveny na zařízení MilkoScan 7 RM (Foss Analytical A/S, Hillerød, Denmark) na principu infračervené spektroskopie ve středové oblasti (MIR-FT) za použití Michelsonova interferometru a Fourierovy transformace, se zohledněním konduktivity mléka při stanovení tzv. ekvivalentu BMM, tedy EBMM, v LRM Brno-Tuřany a také na podobném aparátu DairySpec FT (Bentley Instruments, USA) v laboratoři VÚM Praha.

Deprese BMM byla souběžně stanovena ($^{\circ}C \times -10^4$) i referenční metodou kryoskopicky (KRYO) na zařízení CryoStar I (Funke-Dr.N.Gerber Labortechnik GmbH, Berlin, Germany).

PSB byl stanoven ($10^3 \times ml^{-1}$) průtočnou cytometrií (FC) na fluoro-opto-elektronickém čítači částic Fossomatic 7 (Foss Analytical A/S, Hillerød, Denmark) po obarvení buněčného jádra ethidium bromidem a fotometrickém snímání světelného impulsu emitujícího jádra po jeho laserové iniciaci.

Při provedených testech byly rámcově dodržovány požadavky relevantních standardů: ČSN 57 0536; ČSN EN ISO/IEC 17025; ČSN ISO 8196-1 (570536); ČSN ISO 8196-2 (570536); ČSN ISO 8196-3 (570536); ČSN EN ISO 13366-1 (57 0531); ČSN EN ISO 13366-2 (57 0531).

Příprava a měření vzorků

Bazénové vzorky mléka, v dostatečném počtu pro zamýšlené účely testu (více než 20), od dojníc plemen Holštýn a Czech Fleckvieh, z komerční kontroly kvality mléka, byly použity nekonzervované po chladovém transportu ($\leq 8^{\circ}C$) do akreditované laboratoře (LRM) Brno-Tuřany (Českomoravská společnost chovatelů a.s.) a konzervované roztokem Azidiol (PanReac Appli-Chem, ITW Reagents, Darmstadt, Germany, azid sodným (NaN_3) a chloramphenicol) v koncentraci 150 μl roztoku Azidiol na 50 ml mléka. Konzervace byla řádně zamíchána. Následně byly vzorky duplicitně (složky mléka a bod mrznutí mléka (EBMM) na MIR-FT a počet somatických buněk (PSB) průtočnou cytometrií (FC)) nebo jednou (BMM na kryoskopu) měřeny na analytických zařízeních laboratoře podle relevantních standardních operačních postupů akreditované laboratoře (zkušební laboratoř 1312.2 akreditována ČIA podle ČSN EN ISO/IEC 17025:2018, LRM Brno-Tuřany) a podle postupů laboratoře VÚM Praha, pracoviště Šumperk. Vzorky byly měřeny, podle podmínek transportu do té které laboratoře, cca 24 ± 6 hod. po odběru resp. po konzervaci.

Statistické vyhodnocení

S párovými daty vzorků mléka nekonzervovaných (Nekonz) a konzervovaných Azidolem (Konz) pro všechny mléčné ukazatele byly provedeny výpočty základních statistických charakteristik (aritmetický průměr \bar{x} , směrodatná odchylka x_d , variační koeficient v_x , minimum min a maximum max). Dále byly vypočteny lineární regrese (rovnice) Nekonz \times Konz s koeficienty korelace r a determinace R^2 a diferenční statistické parametry pro

individuální diference d z párových vzorků, podobně jako pro původní vzorky (x , x_d , v_x , min a max), kde výsledky vzorků Nekonz byly vždy v referenční (nezávislé) pozici, a to pro všechny sledované mléčné ukazatele. Pro průměrné diference byl rovněž proveden párový t-test. Významnost korelací a diferencí byla posouzena na konvenčních hladinách pravděpodobnosti intervalu spolehlivosti (nevýznamné ns $P > 0,05$; * (významné s) $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$). Vyhodnocení bylo provedeno s použitím programu MS Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Ve vyhodnocení byly zohledněny respektované principy (GRAPPIN, 1987).

Výsledky a diskuse

Průměrné změřené hodnoty sledovaných mléčných ukazatelů a jejich variabilita (Tab. 1) u nekonzervovaných i konzervovaných (Azidiol) vzorků mléka odpovídají dobře běžným poměrům v ČR (BUCEK, 2021; SLÁDEK, 2022) a výsledky jsou proto použitelné pro zamýšlený účel testu vlivu konzervace vzorků. Byly provedeny výpočty základních statistických parametrů vlivu provedené konzervace vzorků mléka Azidiolem na výsledky měření (Tab. 1; Obr. 1 až 6).

Z hlediska složení mléka konzervace Azidiolem proti nekonzervovanému mléku vykázala významně těsné ko-

relace a převážně významné, systematické (a relativně stabilní) odchylky (Tab. 1), které však z hlediska relativního podílu na měřených hodnotách byly zcela zanedbatelné (obvykle pod 1 %) pro majoritní složky mléka (T, B, K, L, STP, TS – jsou významnější pro zpeněžování) a přijatelné (obvykle pod 5 %) pro minoritní složky mléka (M, VMK, KC, včetně EBMM – tyto zpravidla nejsou zahrnuty do zpeněžovacích vzorců, mají tedy jen informativní charakter o kvalitě mléka) pro výsledky metody MIR-FT (pro dvě analytická zařízení). Např. pro zařízení MilkoScan 7 bylo 99,8 % (Tab. 1; Obr 1) variability hrubých bílkovin v konzervovaných vzorcích mléka determinováno variacemi této složky v nativním materiálu, stejně, jako bylo 95,1 % (Tab. 1; Obr 4) variací volných mastných kyselin v tuku v azidiolových vzorcích mléka určeno variabilitou tohoto ukazatele v původním mléce. U EBMM bylo pak 93,9 % (Tab. 1) variability konzervovaných vzorků mléka zapříčiněno proměnlivostí v nekonzervovaném mléce. Konzervace vzorků mléka Azidiolem je tak podle výsledků testů pro složení mléka prakticky přijatelná pro použití.

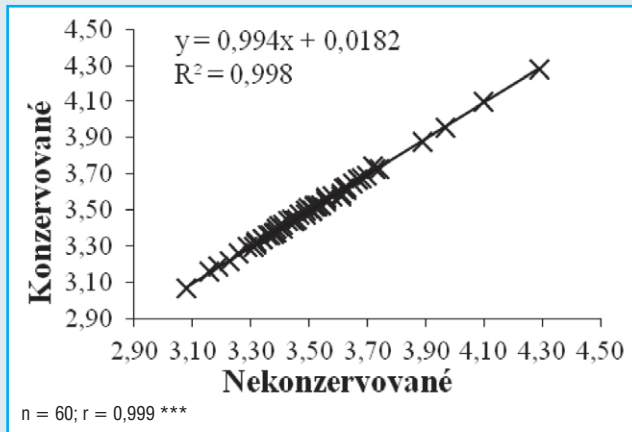
U BMM konzervace Azidiolem proti nekonzervovanému mléku vykázala významně těsnou korelaci a významnou, systematickou (a relativně stabilní) odchylku (Tab. 1), která však z hlediska relativního podílu na měřených hodnotách byla zcela zanedbatelná (1,37 %) pro výsledky kryoskopické metody. Pro zařízení CryoStar I bylo 86,7 % (Tab. 1; Obr 5) variability v kon-

Tab. 1 Statistické vyhodnocení vlivu konzervace vzorků mléka Azidiolem na výsledky měřených mléčných ukazatelů

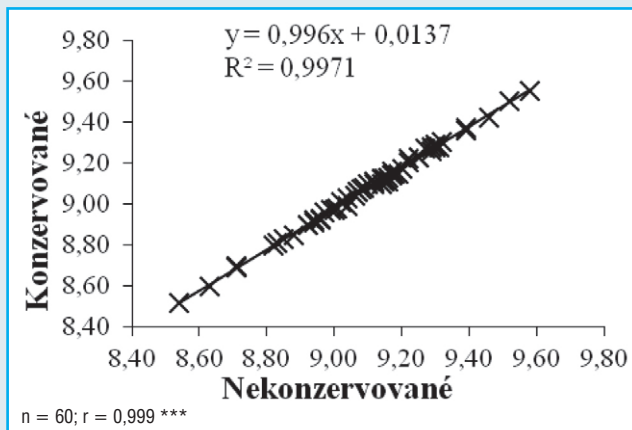
Metoda	Zařízení	Test	Ref.	Ukazatel	n	$x \pm sx$	v_x	$x \pm sx$	v_x	$d \pm sd$	d sig.	D	r	R ²
						Test (y)	%	Ref. (x)	%	Test. – Ref.	%	%	%	
MIR-FT	MilkoScan 7	AZ	NEK	T	60	4,07 ± 0,39	9,5	4,09 ± 0,39	9,6	-0,019 ± 0,012	P < 0,001	0,46	1,0	99,9
				B	60	3,51 ± 0,21	6,0	3,51 ± 0,21	6,0	-0,003 ± 0,009	P < 0,05	0,09	0,999	99,8
				KAS	60	2,75 ± 0,17	6,1	2,77 ± 0,17	6,2	-0,016 ± 0,01	P < 0,001	0,58	0,999	99,7
				L	60	4,85 ± 0,11	2,2	4,87 ± 0,1	2,1	-0,02 ± 0,006	P < 0,001	0,41	0,998	99,7
				STP	60	9,07 ± 0,21	2,3	9,1 ± 0,21	2,3	-0,023 ± 0,011	P < 0,001	0,25	0,999	99,7
				M	60	25,87 ± 5,86	22,6	24,95 ± 5,73	23,0	0,927 ± 0,943	P < 0,001	3,72	0,987	97,4
				VMK	60	1,02 ± 0,25	24,6	0,98 ± 0,25	25,8	0,04 ± 0,056	P < 0,001	4,08	0,975	95,1
				KC	60	0,12 ± 0,009	7,5	0,111 ± 0,009	8,1	0,009 ± 0,001	P < 0,001	8,1	0,988	97,7
				EBMM	106	527 ± 10	1,9	521 ± 10	1,9	5,83 ± 2,38	P < 0,001	1,12	0,969	93,9
MIR-FT	DairySpec FT	AZ	NEK	T	60	4,17 ± 0,9	21,6	4,19 ± 0,91	21,7	-0,021 ± 0,015	P < 0,001	0,5	1,0	99,9
				B	60	3,46 ± 0,2	5,7	3,45 ± 0,2	5,8	0,008 ± 0,011	P < 0,001	0,23	0,998	99,7
				KAS	60	2,7 ± 0,25	9,2	2,68 ± 0,26	9,6	0,025 ± 0,034	P < 0,001	0,93	0,991	98,2
				L	60	4,84 ± 0,16	3,3	4,85 ± 0,16	3,3	-0,006 ± 0,01	P < 0,001	0,12	0,998	99,6
				STP	60	9,01 ± 0,21	2,3	9,0 ± 0,21	2,4	0,016 ± 0,024	P < 0,001	0,18	0,994	98,9
				TS	60	13,81 ± 0,87	6,3	13,82 ± 0,88	6,4	-0,016 ± 0,022	P < 0,001	0,12	1,0	99,9
				M	60	22,12 ± 7,47	33,8	23,15 ± 7,48	32,3	-1,036 ± 0,687	P < 0,001	4,47	0,996	99,2
				VMK	60	0,39 ± 0,05	11,6	0,39 ± 0,04	10,8	-0,001 ± 0,01	P > 0,05	0,26	0,977	95,5
				KC	60	0,198 ± 0,023	11,6	0,195 ± 0,024	12,3	0,003 ± 0,005	P < 0,001	1,54	0,977	95,5
EBMM	60	520,39 ± 7,67	1,5	516,41 ± 8,02	1,5	3,98 ± 1,73	P < 0,001	0,77	0,977	95,4				
KRYO	CryoStar I	AZ	NEK	BMM	106	5 340 ± 101	1,9	5 269 ± 110	2,1	72 ± 40	P < 0,001	1,37	0,931	86,7
FC	Fossomatic 7	AZ	NEK	PSB	60	217 ± 130	59,9	220 ± 132	60,0	-3 ± 7	P < 0,01	1,4	0,999	99,8

Všechny korelační koeficienty $r = P < 0,001$ (na Obr. = ***); Ref. = reference; n = počet případů; x = aritmetický průměr; s_x = směrodatná odchylka průměru; v_x = variační koeficient; d = průměrná diference; sd = směrodatná odchylka průměrné diference; sig. = významnost; D = absolutní hodnota relativní diference (100 % = Ref.); r = koeficient korelace; x a y = osy lineární regrese; R^2 = koeficient determinace; MIR-FT = infračervená spektroskopie ve středové oblasti s Michelsonovým interferometrem a Fourierovou transformací; FC = průtočná cytometrie; KRYO = kryoskop; AZ = Azidiol; HE = Heeschenovo činidlo; NEK = nekonzervované; T = obsah tuku v mléce (%); B = obsah hrubých bílkovin (%); KAS = obsah kaseinu (%); L = obsah monohydrátu laktózy (%); STP = obsah sušiny tukuprosté (%); TS = obsah sušiny celkové (%); M = koncentrace močoviny ($mg \times 100 ml^{-1}$); VMK = obsah volných mastných kyselin v mléčném tuku ($mmol \times 100 g^{-1}$ tuku); KC = koncentrace kyseliny citronové (%); EBMM = ekvivalent bodu mraznutí mléka ($^{\circ}C \times 10^{-3}$); BMM = deprese bodu mraznutí mléka ($^{\circ}C \times 10^{-4}$); PSB = počet somatických buněk ($10^9 \times ml^{-1}$).

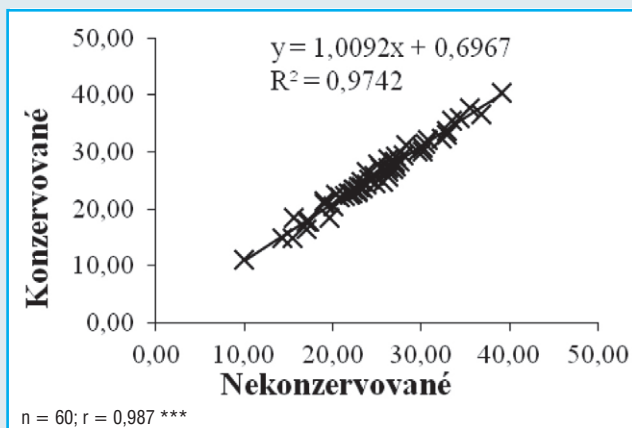
Obr. 1 Vliv konzervace vzorků mléka Azidiolem na hodnotu obsahu hrubých bílkovin (B v %) podle referenčního výsledku (nekonzervované mléko) pomocí infračervené spektroskopie MIR-FT na zařízení MilkoScan 7



Obr. 2 Vliv konzervace vzorků mléka Azidiolem na hodnotu obsahu sušiny tukuprosté (STP v %) podle referenčního výsledku (nekonzervované mléko) pomocí infračervené spektroskopie MIR-FT na zařízení MilkoScan 7

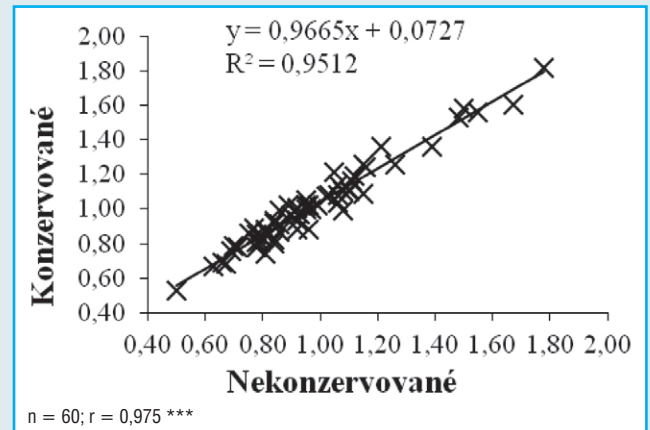


Obr. 3 Vliv konzervace vzorků mléka Azidiolem na hodnotu koncentrace močoviny (M v mg \times 100 ml⁻¹) podle referenčního výsledku (nekonzervované mléko) pomocí infračervené spektroskopie MIR-FT na zařízení MilkoScan 7

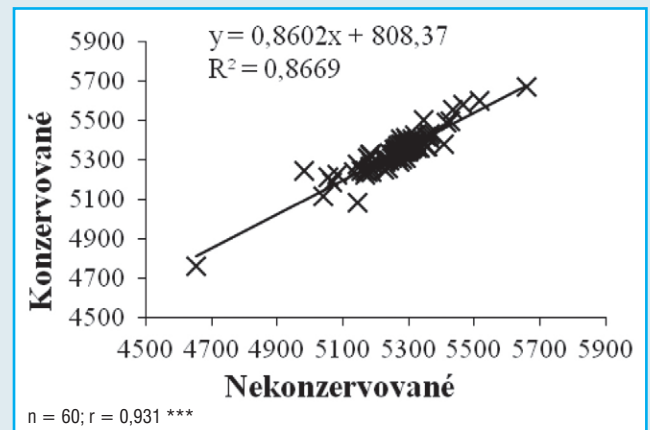


zervovaných vzorcích mléka determinováno variacemi tohoto ukazatele v původním materiálu. Konzervace

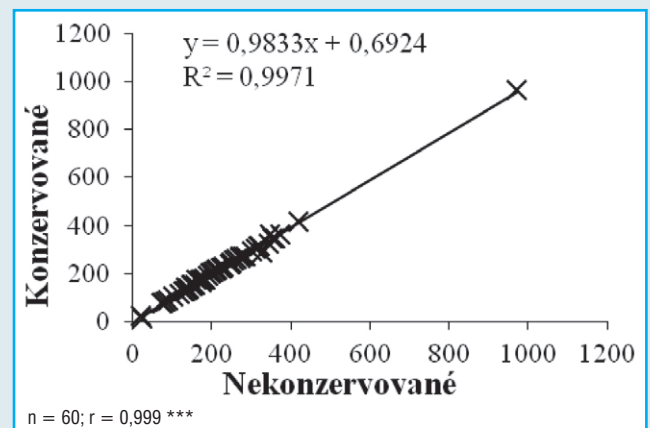
Obr. 4 Vliv konzervace vzorků mléka Azidiolem na hodnotu obsahu volných mastných kyselin (VMK v mmol \times 100 g⁻¹ v tuku) podle referenčního výsledku (nekonzervované mléko) pomocí infračervené spektroskopie MIR-FT na zařízení MilkoScan 7



Obr. 5 Vliv konzervace vzorků mléka Azidiolem na hodnotu deprese bodu mraznutí mléka (BMM v $^{\circ}\text{C} \times -10^4$) podle referenčního výsledku (nekonzervované mléko) pomocí kryoskopie na zařízení CryoStar I



Obr. 6 Vliv konzervace vzorků mléka Azidiolem na hodnotu počtu somatických buněk (PSB v $10^3 \times \text{ml}^{-1}$) podle referenčního výsledku (nekonzervované mléko) pomocí průtočné cytometrie na zařízení Fossomatic 7



vzorků mléka Azidiolem je podle výsledků testů u BMM přijatelná pro použití v laboratorní praxi.

Při stanovení PSB (Fossomatic 7) mléka konzervace Azidolem proti nekonzervovanému mléku vykázala významně těsnou korelaci a významnou, systematickou (a relativně stabilní) odchylku (Tab 1), která však z hlediska relativního podílu na měřených hodnotách byla zcela zanedbatelná (1,4 %) pro výsledky metody průtočné cytometrie (FC). Zde bylo až 99,8 % (Tab. 1; Obr 6) variací v azidiolových vzorcích mléka určeno variabilitou tohoto ukazatele v původním mléce. Konzervace vzorků mléka Azidolem je podle výsledků testů u PSB přijatelná pro praktické použití.

Závěr

Pro rutinní, komerční, mléčné laboratoře znamená obecně nezbytná aplikace chemické konzervace vzorků mléka z důvodu zachování jeho vlastností během transportu až do okamžiku analýzy, v postupných krocích, vždy testové řešení logistického problému s nejvhodnější přijatelnou možností kombinace četných faktorů, jako: - účinnost konzervace podle typu a koncentrace konzervující látky, času a teploty uložení a transportu vzorků; - šetrnost konzervace k životnímu prostředí (také zdraví laboratorního personálu); - pracnost konzervace; - snadnost aplikace (forma roztoku, prášku, tablet) a manipulovatelnosti; - náklady na konzervaci; - případně některé další specifické aspekty.

Analytické laboratoře obecně, tedy i mléčné, zejména, jsou-li akreditovány, tedy pokud tím usilují o oficiální uznávání svých výsledků, musejí své metodické postupy obhajovat u odborného auditu zpracovaným systémem zabezpečení kvality výsledků analýz, jehož součástí jsou standardní operační postupy a validace metodických postupů s odhadem nejistot výsledků měření. Použité postupy tak musí být přesně popsány a validovány prostřednictvím výsledků účelově provedených testů se statistickým vyhodnocením. Proto dává smysl popsat možné vlivy azidiolové konzervace na výsledky analýz vzorků mléka také z oficiálních důvodů.

Výsledky ukázaly vhodnost použití Azidiolu pro ošetření stability rutinních vzorků syrového mléka v mlékařských laboratořích. Tyto výsledky testů konzervantu Azidiol pro posouzení případného interferenčního efektu na výsledky analýz složek a vlastností mléka se stanou, jako přílohy a certifikovaná metodika, součástí standardních operačních postupů a rozšíří praktické portfolio metod ošetření vzorků mléka pro oficiální účely akreditačních auditů mléčné laboratoře.

Práce vznikla za podpory projektů MZe NAZV Země QK 21010123 a MZe RO 1423.

Seznam literatury

ANONYM (1977): Use of sodium azide for the preservation of milk samples for fat and protein determination with Milko-Scan. *Deutsche Molkerei-Zeitung*, 29, s. 910-911.

ARDŐ, Y. (1979): Bronopol as a preservative in milk samples. *Milchwissenschaft*, 34 (1), s. 14-16.

ARDŐ, Y. (1982): Bronopol as a preservative in milk samples for the determination of cell content using Fossomatic. *Milchwissenschaft*, 37, s. 139-142.

BARBANO, D. M., WOJCIECHOWSKI, K. L., LYNCH, J. M. (2010): Effect of preservatives on the accuracy of mid-infrared milk component testing. *Journal of Dairy Science*, 93, 6000-6011. doi: 10.3168/jds.2010-3601

BAUMGARTNER, CH. und Expertengruppe für Qualitätssicherung und Qualitätsmanagement: Qualitäts (2000). *Leitfaden für den Betrieb von Routine – Untersuchungsgeräten in Rohmilch – Prüfungslaboratorien*, 1. Ausgabe, Oktober 2000: s. 32.

BIGGS, D. A., SZIJARTO, L. F., VOORT VAN DE, F. R. (1984): Fresh milk sampling for centralized milk testing. *Journal of Dairy Science*, 67, s. 3085-3092.

BUCEK, P.: VÝSLEDKY KVALITY NAKUPOVANÉHO MLÉKA V ROCE 2020 podle analýz bazénových vzorků. ČMSCH a.s., LRM Brno-Tuřany, Hradištko, 2021.

BUCHBERGER, J., KIERMEIER, F. (1975): Über die Eignung von Natriumazid zur Konservierung von Milchproben. *Deutsche Molkerei-Zeitung* (Kempten Allgäu), F 8, s. 192-194.

ČSN 57 0536: Determination of milk composition by mid-infrared analyzer. (In Czech) 1999: ČNI Praha.

ČSN EN ISO/IEC 17025 (2005). Posuzování shody – Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří. Český normalizační institut, Praha.

ČSN ISO 8196-1 (570536). 2016. Mléko – Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka – Část 1: Analytické atributy alternativních metod.

ČSN ISO 8196-2 (570536). 2016. Mléko – Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka – Část 2: Kalibrace a řízení kvality v laboratoři při analýzách mléka alternativními metodami.

ČSN ISO 8196-3 (570536). 2016. Mléko – Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka – Část 3: Protokol pro hodnocení a validaci alternativních metod pro analýzu mléka.

ČSN EN ISO 13366-1 (57 0531): Mléko – Stanovení počtu somatických buněk – Část 1: Mikroskopická metoda. Český normalizační institut. Červenec 1998.

ČSN EN ISO 13366-2 (57 0531): Mléko – Stanovení počtu somatických buněk – Část 2: Návod pro ovládání fluoro-opto-elektronického přístroje. Český normalizační institut. Červenec 2007.

GRAPPIN, R. (1987): Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis – application to calibration procedure and quality control in dairy laboratory. *Bulletin of the International Dairy Federation*, Doc. 208, IDF Provisional Standard 128, s. 3-12.

HANUŠ, O., GENČUROVÁ, V., ŽVÁČKOVÁ, I. (1992 a): Testování nového konzervačního přípravku vzorků mléka Milkofox pro účely infračervené analýzy základního složení mléka. II. ověření konzervačního účinku ve vztahu k infračervené analýze. *Veterinární Medicína*, 37 (1), s. 33-43.

HANUŠ, O., GENČUROVÁ, V., GABRIEL, B., ŽVÁČKOVÁ, I. (1992 b): Srovnání účinnosti konzervačního přípravku Milkofox s tradičními konzervačními prostředky pro účely stanovení počtu somatických buněk ve vzorcích mléka fluoro-opto-elektronickou metodou. *Veterinární Medicína*, 37 (2), s. 91-99.

CHALERMSAN, N., VIJCHULATA, P., CHIRATTANAYUTH, P., SINTUWANIT, S., SURAPAT, S., ENGKAGUL, A. (2004): Effects of Preservatives on Raw Milk Components Analyzed by Infrared Spectrophotometry. *Kaset-sart J. (National Sciences)*, 38, s. 38-43.

KROGER, M. (1985): Milk sample preservation. *Journal of Dairy Science*, 68, s. 783-787.

KVAPILÍK, J., SUCHÁNEK, B. (1974): Vliv konzervace vzorků mléka na výsledky rozborů. *Živočišná Výroba*, 19 (1), s. 31-38.

LACTANET (2021): Milk sampling in Summer Temperatures, *Lactanet*.

NG-KWAI-HANG, K. F., HAYES, J. F. (1982): Effects of potassium dichromate and sample storage time on fat and protein by Milko-Scan and on protein and casein by a modified Pro-Milk Mk II method. *Journal of Dairy Science*, 65, s. 1895-1899.

RAPP, M., MÜNCH, S. (1984): Neuentwicklung von flüssigen Konservierungsmitteln für Milchproben. *Deutsche Molkerei-Zeitung*, 105, s. 1264-1272.

- SÁNCHEZ, A., SIERRA, D., LUENGO, C., CORRALES, J. C., MORALES, C. T., CONTRERAS, A., GONZALO, C. (2005): Influence of Storage and Preservation on Fossomatic Cell Count and Composition of Goat Milk. *Journal of Dairy Science*, 88, s. 3095–3100.
- SJAUNJA, L. O. (1984 a): Studies on milk analysis of individual cow milk samples. II. Factors affecting milk analyses by infrared technique under laboratory conditions. *Acta Agriculture Scandinavica*, 34, s. 260–272.
- SJAUNJA, L. O. (1984 b): Studies on milk analysis of individual cow milk samples. III. The effect of different treatments on infrared analyses. *Acta Agriculture Scandinavica*, 34, s. 273–285.
- SJAUNJA, L. O., PHILIPSSON, J., LUNDSTRÖM, K., SWENSSON, CH. (1984): Studies on milk analysis of individual cow milk samples. IV. Factors affecting milk analyses in a routine system by automated apparatuses. *Acta Agriculture Scandinavica*, 34, s. 286–299.
- SLÁDEK, M.: VÝSLEDKY KVALITY NAKUPOVANÉHO MLÉKA V ROCE 2021 podle analýz bazénových vzorků. ČMSCH a.s., LRM Brno-Tuřany, Hradištko, 2022.
- SZIJARTO, L. F., HARDING, F., HILL, A. R., MELICHERCIK, J. (1990): Cooling systems for transport of unpreserved milk samples. *Journal of Dairy Science*, 73, s. 2299–2308.
- ZAJÁC, P., ČAPLA, J., VIETORIS, V., ZUBRICKÁ, S., ČURLEJ, J. (2015): Effect of storage on the major constituents of raw milk. *Potravinárstvo*, 9 (1), s. 375–381.
- ZAJÁC, P., ZUBRICKÁ, S., ČAPLA, J., ZELENÁKOVÁ, L., ŽIDEK, R., ČURLEJ, J. (2016): Effect of preservatives on milk composition determination. *International Dairy Journal*, 61, s. 239–244. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.06.008>

Korespondující autor: prof. Ing. Oto Hanuš, PhD.
Výzkumný stav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a,
160 00 Praha 6, e-mail: hanus.oto@seznam.cz

Přijato dne: 2. 2. 2023
Lektorováno: 26. 3. 2023

Izolace a identifikace divokých izolátů bakterií mléčného kvašení z luskovin a hodnocení jejich funkčních vlastností *in vitro* s ohledem na využití v biologické ochraně luskovin

Miloslava Kavková¹, Olga Bazalová¹, Jaromír Cihlář¹,
Andrea Bohatá², Jana Lencová², Petr Konvalina²

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

² Fakulta zemědělská a technologická, Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích

Izolace a identifikace divokých izolátů bakterií mléčného kvašení z luskovin a hodnocení jejich funkčních vlastností *in vitro* s ohledem na využití v biologické ochraně luskovin

Abstrakt

Bakterie mléčného kvašení jsou významnou skupinou mikroorganismů, která, v rámci ochrany rostlin, posky-

tuje rostlinám řadu benefitů včetně posilování rezistentních mechanismů rostlin a přímého protektivního účinku vůči bakteriálním a fungálním patogenům. Protektivní účinek není samozřejmou vlastností druhu či izolátů bakterií mléčného kvašení, ale je podmíněn geny, expremací jejich produktů do substrátu, stabilitou metabolitů a spektrem jejich účinku. Screening izolátů laktobacilů izolovaných z nadzemních a kořenových částí luskovin ukázal na významně nižší produkci kyseliny mléčné a octové oproti vybraným kmenům ze siláží s verifikovaným antifungálním účinkem. Genetická analýza potvrdila u všech izolátů zastoupení genů kódující bakteriociny Třídě 2a a chitinázu. Přítomnost proteinu s chitinolytickou aktivitou (LACO chitin binding protein) o velikosti 22,19 kDa *in vitro* byla potvrzená u bezbuněčného supernatantu z většiny izolátů, pouze u třech izolátů nebyl protein detekován (A, C a G). Antifungální testy ukázaly, že frakce bezbuněčného supernatantu o velikosti 2–30 kDa má významný inhibiční účinek na růst mycelia pěti druhů fusárií a to zejména z izolátů *L. plantarum* (B, J) a *L. pentosus* (G, H).

Klíčová slova: antifungální aktivita, charakterizace izolátů, *Fusarium* spp., laktobacili

Abstract

Lactic acid bacteria represent fermentative microorganisms that, under the application in plant protection, provide many benefits to plants, including induction and reinforcement of protective mechanisms and direct protection against bacterial and fungal pathogens. The protective effect of LAB is a complex of strain-specific traits conditioned by genes and its expression in a substrate, the stability of metabolites and the spectrum of its impact. The screening of strains of lactobacilli from the upper part and roots of legumes showed that the production of lactic and acetic acid was significantly lower compared with strains from silages with verified antifungal activity. Genetic analysis confirmed the presence of genes coding bacteriocins Class 2a and chitinases in all isolates from legumes. The protein (LACO chitin binding protein) 22,19 kDa with chitinolytic activity was detected in cell-free supernatants except for A, C and G isolates. The antifungal tests showed that a fraction of size 2–30 kDa of cell-free supernatants inhibited the mycelia growth of five *Fusarium* species significantly, especially those obtained from isolates *L. plantarum* (B, J) and *L. pentosus* (G, H).

Keywords: antifungal activity, characterisation of isolates, lactobacilli, *Fusarium* sp.

Úvod

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou známé především jako probiotika, mlékařské a pekařské kultury využívané v potravinářském a krmivářském průmyslu a ve farmacii, humánní a veterinární medicíně. Využití BMK