

**Kontakty na autory:**

Ing. Jarmila Watzková (Jarmilaa@email.cz); Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o., Rapotín, Oddělení výživy zvířat a kvality živočišných produktů, Pracoviště Pohořelice, Vídeňská 699, 691 23 Pohořelice  
 Mgr. Jan Říha (jan.riha@vuchs.cz); Agrovýzkum Rapotín s.r.o., Oddělení chovu a šlechtění, Výzkumníků 267, 788 13 Víkřovice  
 Ing. Mgr. Ludmila Křížová, Ph.D. (ludmila.s@seznam.cz); Agrovýzkum Rapotín s.r.o., Oddělení výživy zvířat a kvality živočišných produktů, Pracoviště Pohořelice, Vídeňská 699, 691 23 Pohořelice  
 Ing. Jiří Třináctý, Ph.D. (trinacty@vuvz.cz); Agrovýzkum Rapotín s.r.o., Oddělení výživy zvířat a kvality živočišných produktů, Pracoviště Pohořelice, Vídeňská 699, 691 23 Pohořelice

*Přijato do tisku 10. 3. 2010*

*Lektorováno 12. 5. 2010*

## ANALÝZA VÝSLEDKŮ STABILITY KALIBRACE PRO STANOVENÍ Kyseliny citrónové pomocí nepřímé metody infračervené spektroskopie (MIR-FT)

**Sojková, K.<sup>1</sup> - Hanuš, O.<sup>2</sup> - Samková, E.<sup>3</sup> - Hanušová, K.<sup>1</sup>  
 Dufek, A.<sup>1</sup> - Genčurová, V.<sup>1</sup> - Jedelská, R.<sup>2</sup> - Kopecký, J.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Agrovýzkum Rapotín;

<sup>2</sup> Výzkumný ústav pro chov skotu, Rapotín;

<sup>3</sup> Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,  
 Zemědělská fakulta

**Analysis of results of calibration stability  
for citric acid determination using indirect  
method of infrared spectroscopy (MIR-FT)**

**Abstrakt**

Cílem práce bylo analyzovat stabilitu kalibrace nepřímé metody infračervené spektroskopie MIR-FT a dynamiku hladin adjustace pro stanovení kyseliny citrónové prostřednictvím hodnocení výkonnostních testů pro možnost zavedení postupu v rutinních laboratořích kontroly kvality mléka. Vztahy mezi referenčními a instrumentálními (3) výsledky při kalibraci ( $n = 10$ ) byly: korelační koeficienty od 0,983 do 0,992; průměrné odchylky -0,005, -0,015 a -0,015  $\text{mmol.l}^{-1}$ ; směrodatné odchylky průměru individuálních diferencí od 0,390 do 0,563  $\text{mmol.l}^{-1}$ . Použité analytické technologie (1 a 2, 3) byly u kalibrace efektivní a dobře srovnatelné. U přístroje 1 se v čase po kalibraci (únor 2009, 4 měsíce po kalibraci) ve výkonnostních testech projeví pak již poměrně pravidelné větší a podobné odchylky od přístrojů 2 a 3. Naopak tyto přístroje zůstaly výsledkově po celé pokusné období v poměrně dobré shodě. To lze vysvětlit nějakým blíže neurčeným náhodným projevem technického faktoru přístroje 1 a nelze ho nijak zevšeobecňovat, ale jeho možné opakování v rutinním systému nelze ani apriori vyloučit. Korelační koefi-

cienty mezi přístroji navzájem pro stanovení KC se pohybovaly ve výkonnostních testech po kalibraci po celou dobu 18ti měsíců od 0,294 (1×2) do 0,996 (2×3). Tyto vztahy byly vždy významné ( $P \leq 0,05$ ,  $P < 0,01$  nebo  $P < 0,001$ ). Metodou kvalifikovaného odhadu lze určit pro dobře funkční přístroje maximální kalibrační interval při stanovení KC prostřednictvím metody MIR-FT v systému centrální kalibrace na šest měsíců.

**Klíčová slova:** kráva, mléko, kyselina citrónová, infračervená spektroskopie, výkonnostní testování, Euklidická vzdálenost od počátku

**Abstract**

The goal of the paper was to analyse calibration stability of indirect infrared spectroscopy method MIR-FT and dynamic of adjustment levels for citric acid (CA) determination by evaluation of proficiency testing for possibility of method implementation in routine laboratories for milk quality control. Relationships between reference and instrument (3) results at calibration ( $n = 10$ ) were: correlation coefficients from 0.983 to 0.992; mean deviations -0.005, -0.015 and -0.015  $\text{mmol.l}^{-1}$ ; standard deviations of mean of individual differences from 0.390 to 0.563  $\text{mmol.l}^{-1}$ . Used analytical technologies (1 and 2, 3) were effective and good comparable at calibration. There were regular, larger and similar deviations of instrument 1 from instruments 2 and 3 in proficiency testing in time after calibration (February 2009, 4 months after calibration). On the contrary these instruments were in relatively good result agreement during whole period of investigation. This fact is possible to explain by a random technical effect of instrument 1, which was vague, however it is impossible to generalize this effect, but also possibility of a repetition of such effect can not be excluded in a routine system. Correlation coefficients for CA determination between instruments moved from 0.294 (1×2) to 0.996 (2×3) in proficiency testing after calibration during whole period (18 months). These relationships were always significant ( $P \leq 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ ). In the system of central calibration it is possible to determine the maximal calibration interval as six months at CA investigation via MIR-FT method for troublefree instruments by method of qualified estimation.

**Key words:** cow, milk, citric acid, infrared spectroscopy, proficiency testing, Euclidian distance from origin

**Úvod**

Hladina kyseliny citrónové (KC) v mléce je použitelným indikátorem energetického metabolismu krav (Illek a Pechová, 1997; Baticz et al., 2002; Garnsworthy et al., 2006). Se zvyšováním doživnosti vzrůstá výskyt produkčních poruch (ketóz) a tím vzrůstá i význam energetických ukazatelů k monitoringu a řízení prevence těchto poruch. V práci Hanuš et al. (2009) se zmiňuje fyziologické rozpětí KC v mléce v oboru 8 až 10  $\text{mmol.l}^{-1}$  (nebo 0,149

Tab. 4 Výsledky stanovení stravitelnosti sýrů in vitro vyjádřené jako stravitelnost sušiny (DMD) a organické hmoty (OMD)

Typ měření	Datum	Re mmol.l <sup>-1</sup>	Měření	Přístroje (KC; mmol.l <sup>-1</sup> ) d ± sd			min. r většinou 1×2 a 1×3	max. r většinou 2×3	R = max. - min.
				1 1 - Re	2 2 - Re	3 3 - Re			
Kalibrace	06.11.09	9,22±3,094	PM	0,007±0,608	-1,828±1,021	-1,962±0,999			
			KM	-0,005±0,563	-0,015±0,394	-0,015±0,390			
			r (Re)	0,983	0,992	0,989			
			1 - 2	2 - 3	1 - 3				
Výkonnostní test	12.01.09		VM	-0,387±0,073	-0,040±0,073	-0,427±0,066	0,993	0,996	1,53
	23.02.09		VM	-1,391±0,396	0,091±0,051	-1,300±0,393	0,663	0,990	1,50
	30.03.09		VM	-0,787±0,559	0,273±0,114	-0,514±0,609	0,294	0,970	1,82
	04.05.09		VM	-3,120±0,609	-0,137±0,200	-3,242±0,723	0,432	0,991	2,03
	01.06.09		VM	-2,380±0,564	-0,679±0,151	-3,060±0,648	0,497	0,979	1,77
	29.06.09		VM	-2,472±0,483	-0,128±0,150	-2,600±0,455	0,805	0,958	1,55
	27.07.09		VM	-2,897±0,368	-0,310±0,224	-3,207±0,431	0,425	0,859	1,34
	31.08.09		VM	-2,753±0,444	-0,070±0,076	-2,823±0,437	0,740	0,967	1,23
	05.10.09		VM	-2,718±0,592	-0,235±0,113	-2,953±0,626	0,870	0,986	1,55
	02.11.09		VM	-2,365±0,548	-0,679±0,158	-3,044±0,582	0,718	0,967	1,34
	07.12.09		VM	-2,470±0,476	-0,679±0,169	-3,149±0,525	0,659	0,952	1,77
	11.01.10		VM	-3,314±0,671	-	-	0,873	-	2,25
	22.02.10		VM	-3,822±0,811	-	-	0,913	-	2,89
	29.03.10		VM	-3,274±0,439	0,685±0,109	-2,589±0,424	0,765	0,973	1,34
26.04.10		VM	-3,756±0,346	0,267±0,062	-3,488±0,351	0,577	0,986	1,39	

r = koeficient korelace; d = průměrný rozdíl; sd = směrodatná odchylka individuálních diferencí; min. = minimum; max. = maximum; R = variační obor vzorkové sady; Re = referenční výsledky (metoda); PM = první měření (před kalibrací); KM = kontrolní měření (po kalibraci); VM = výkonnostní měření (test); r (Re) = korelační koeficient k referenčním hodnotám; r = korelační koeficient mezi přístroji.

až 0,187 %) podle práce Illek a Pechová (1997). Nižší hodnoty pak doprovázejí energetický deficit a vyšší přebytek. Fyziologicky z energetického pohledu je KC předmětem Krebsova cyklu a v mléce přispívá svými solemi k pufrací kapacitě a depresi bodu mrznutí mléka (Pijanowski, 1977; Walstra a Jenness, 1984). Kubešová et al. (2009) naznačili také možnost výpovědi sledování KC v mléce k reprodukční způsobilosti dojníc.

Infračervenou spektroskopii (MIR-FT) lze použít jako jednu z metod stanovení koncentrace KC v mléce (Foss, 2004). Nezbytné je ovšem provedení její relevantní kalibrace (Hanuš et al., 2009). Jiné metody jsou pracné a málo

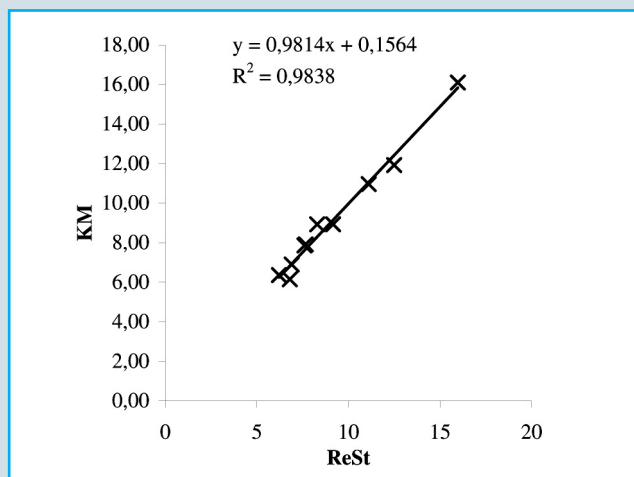
výkonné. Proto řešení automatické MIR-FT je pro praxi efektivní. Především ke stanovení majoritních složek mléka jako tuk (T), bílkoviny (B), laktóza (L) atd. je využívána filtrová technologie infračervené spektroskopie (MIR-F). O této technologii je zmiňováno v řadě prací (Biggs, 1978; Kerkhof-Mogot et al., 1982; Sjaunja, 1984 a, b; Sjaunja et al., 1984; Biggs et al., 1984, 1987; Sjaunja a Andersson, 1985; Grappin, 1987; Hanuš et al., 1992 a, b, c, 2007). Méně úspěšné je použití MIR-F ke stanovení minoritních složek mléka jako močoviny, volných mastných kyselin atp. (Herre, 1998; Hanuš et al., 2001, 2008 a). Proto zde, podobně jako u KC, v praktickém sériovém nasazení dominuje aplikace MIR-FT.

Cílem práce bylo analyzovat stabilitu kalibrace nepřímé metody infračervené spektroskopie MIR-FT a dynamiku hladin adjustace v čase pro stanovení kyseliny citrónové prostřednictvím hodnocení výsledků výkonnostních testů pro možnost zavedení postupu v rutinních laboratořích kontroly kvality mléka a podpory kontroly zdravotního stavu dojníc.

## Materiál a metody

### Metody, kalibrace a vzorky mléka pro výkonnostní testování

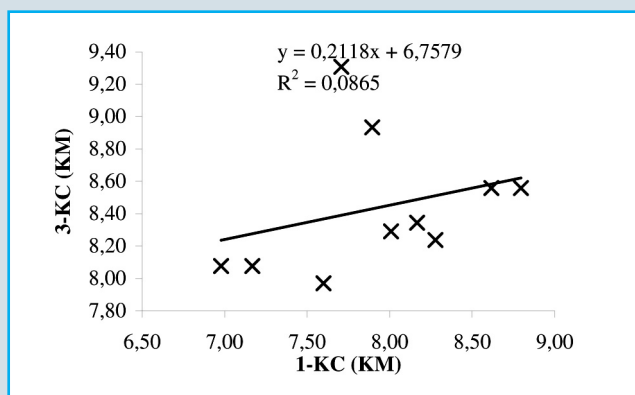
Referenční metodou pro stanovení KC v mléčných standardech a kalibraci MIR-FT byla fotometrická metoda: vlnová délka 428 nm. Mléko bylo sraženo kyselinou trichloroctovou a mléčná bílkovina odfiltrována. Filtrát reagoval s pyridinem (30 min. při 32 °C). KC vytváří v acetanhydridovém médiu s pyridinem žlutě zbarvený komplex. U Specku 11 (Carl Zeiss Jena, Německo) byla vypracována kalibrační křivka v rozmezí od 1,5 do 20,0 mmol.l<sup>-1</sup>, to znamená od 0,028 do 0,373 % (přepočtový (dělicí) faktor



r = 0,992 \*\*\*

Statistická významnost: \* = P ≤ 0,05; \*\* = P ≤ 0,01; \*\*\* = P ≤ 0,001; ns = P > 0,05; r = koeficient korelace; R<sup>2</sup> = koeficient determinace; KM = kontrolní měření; ReSt = referenční standardy.

Obr. 1 Vztah mezi referenčními (přímými) a instrumentálními (nepřímými; 3) výsledky při kalibraci stanovení kyseliny citrónové (KC) metodou MIR-FT.



$r = 0,294$  ns  
KC = kyselina citrónová.

**Obr. 2** Vztah mezi přístroji MIR-FT navzájem pro stanovení KC (1×3).

z  $\text{mmol.l}^{-1}$  na % KC je 53,5). Nepřímá rutinní metoda byla MIR-FT (Lactoscope FTIR, přístroj 1 (Delta Instruments, Holandsko) a MilkoScan FT 6000, dva přístroje 2 a 3 (Foss, Dánsko)). Výsledky KC referenční metodou a MIR-FT byly měřeny v referenční laboratoři a dále MIR-FT v rutinní laboratoři. Rutinní laboratoře pro hodnocení složení a kvality mléka v České republice a zahrnuté v systému centrální kalibrace pracují většinou při absenci referenčních metod. Proto jsou k nim pravidelně rozesílány referenční standardy pro kalibraci přístrojů za existence uvedeného systému centrální kalibrace.

Přístroje v systému centrální kalibrace byly nakalibrovány za podmínek a výsledků popsanych v předchozí práci (Hanuš et al., 2009). Poslední kalibrace byla provedena 6. 11. 2008 (Tab. 1). Poté bylo v měsíčních intervalech prováděno výkonnostní testování stanovení KC. Toto období trvalo 15 kontrolních měsíců (od listopadu 2008 do dubna 2010 včetně, tzn. 18 kalendářních měsíců; Tab. 1). V jednotlivých testech bylo použito vždy deset vzorků mléka, které zároveň sloužily ke kalibraci základních složek mléka (tuk, bílkoviny, kasein, laktóza, sušina tukuprostá).

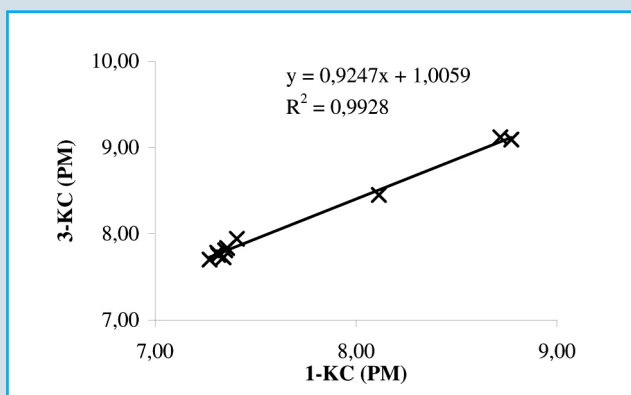
### Statistické vyhodnocení výsledků výkonnostních testů

Výsledky byly hodnoceny systémem výpočtu a řazení laboratoří podle Euklidické vzdálenosti od počátku (Leray, 1993; Hanuš et al., 1998) v programu Excel Microsoft. Uvedený cíl a metodické postupy jsou rámcově v souladu s iniciativami pracovní sítě referenčních mléčných laboratoří organizací ICAR a AFEMA.

### Výsledky a diskuse

Vliv transportu a konzervace vzorků mléka na stanovení KC metodou MIR-FT byl testován již dříve (Hanuš et al., 2009) a byl vyhodnocen jako umožňující proces centrální kalibrace a systém mezilaboratorních výkonnostních testů.

Dosažené vztahy mezi referenčními (přímými) a instrumentálními (3; nepřímými) výsledky při kalibraci (Tab. 1;  $n = 10$ ) byly: korelační koeficienty od 0,983 do 0,992 (Obr. 1);



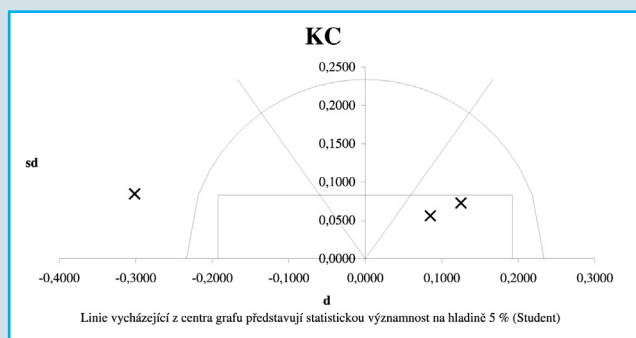
$r = 0,996$  \*\*\*  
PM = první měření.

**Obr. 3** Vztah mezi přístroji MIR-FT navzájem pro stanovení KC (2×3).

průměrné odchylky  $-0,005$ ,  $-0,015$  a  $-0,015$   $\text{mmol.l}^{-1}$ ; směrodatné odchylky průměru individuálních diferencí od 0,390 do 0,563  $\text{mmol.l}^{-1}$ . Tyto hodnoty odpovídaly derivovaným požadavkům (v předchozím období a souběžně) na uvedené parametry akceptovatelné kalibrace pro určení KC v mléce metodou MIR-FT (Hanuš et al., 2009). Shoda hodnot KC metod po kalibraci byla poměrně dobrá. V daném ohledu byly použité analytické technologie (1 a 2, 3) efektivní a dobře srovnatelné.

V období opakovaných výkonnostních testů se vyvíjely difference mezi výsledky analytických přístrojů a jejich možné interpretace následujícím způsobem:

- u přístroje 1 se v čase po kalibraci (únor 2009, 4 měsíce po kalibraci) ve výkonnostních testech projevily pak již poměrně pravidelné, větší a podobné odchylky od přístrojů 2 a 3. Naopak tyto přístroje zůstaly výsledkově po celé pokusné období v poměrně dobré shodě, což lze vysvětlit shodnou technologií. Protože odchylky byly u přístroje 1 od 2 a 3 od února 2009 větší a pravidelně podobné, zatímco mezi přístroji 2 a 3 pravidelně malé a podobné, lze tento efekt vysvětlit nějakým blíže neurčeným náhodným projevem technického faktoru přístroje 1 a nelze ho nijak zevšeobecňovat, ale jeho možné opakování v rutinním systému nelze ani apriori vyloučit;
- variabilita všech mezipřístrojových diferencí byla poměrně vyrovnaná, podobná u diferencí 1-2 a 1-3, zatímco u diferencí 2-3 byla také poměrně vyrovnaná, ale výrazně nižší, což lze opět vysvětlit shodnou technologií;
- korelační koeficienty mezi přístroji navzájem pro stanovení KC se pohybovaly ve výkonnostních testech (příklady Obr. 2 a 3) po celou dobu pokusného sledování od 0,294 (1×2) do 0,996 (2×3). Tyto vztahy byly vždy významné ( $P \leq 0,05$ ,  $P < 0,01$  nebo  $P < 0,001$ );
- mezipřístrojové výsledkové korelace KC byly nižší častěji v případech 1×2 a 1×3 (nejnižší byla 0,294 v březnu 2009 a nejvyšší 0,993 v lednu 2009; Tab. 1), zatímco v případech 2×3 byly pravidelně vyšší (nejnižší byla 0,859 v červenci 2009 a nejvyšší 0,996 v lednu 2009, tři měsíce po kalibraci; Tab. 1);



**Obr. 4** Vyhodnocení provedeného výkonostního testu stanovení kyseliny citrónové (KC) pomocí infračervené spektroskopie MIR-FT určením Euklidické vzdálenosti od počátku (12. 1. 2009).

- ve výkonostních testech byly celkově výrazně nižší variační obory ( $R = \max. - \min.$ ) hodnot KC vzorkových sad (Tab. 1; od 1,12 do 2,89  $\text{mmol.l}^{-1}$  pro přístroj 2) oproti sadě kalibrační (9,77  $\text{mmol.l}^{-1}$ ). Je tomu tak proto, že variační obor byl pro kalibrační vzorkovou sadu záměrně rozšířen, zatímco pro vzorkové sady použité ve výkonostních testech byl dán náhodným kolísáním bazénových vzorků mléka pouze s menšími složkovými úpravami;
- je patrné, že když se vyskytly nižší korelace mezi hodnotami KC metod v určitém kontrolním měsíci (např. březen nebo červenec 2009; Tab. 1), souviselo toto častěji s menším variačním oborem hodnot KC dané sady vzorků, což je logické a jak pro kalibrační účely tak pro výkonostní testy je vzorková sada s širším variačním oborem hodnot KC při rutinní práci vždy výhodou;
- pro kalibrační sadu lze metodou kvalifikovaného odhadu ze studované dynamiky výsledků považovat za minimum variačního oboru KC hodnotu 5,0  $\text{mmol.l}^{-1}$ . Pro sadu ve výkonostním testu by to mohlo být 2,5  $\text{mmol.l}^{-1}$ .

Vyhodnocení jednoho z provedených výkonostních testů pomocí stanovení Euklidické vzdálenosti od počátku je pro příklad na Obr. 4. Celkově, ze všech případů (Tab. 1 a Obr. 4) stanovení individuální variability rozdílů různých metod, nebo rozdílů metod od referenční metody je patrné, že tato variabilita (směrodatné odchylky) představuje relativně poměrně značný podíl na základní hodnotě skutečné koncentrace KC. Tak je tomu však u všech analýz minoritních složek mléka prostřednictvím infračervené spektroskopie. Zatímco u hlavních složek (tuk, bílkovina, kasein, laktóza, sušina tukuprostá, sušina celková) je tato variabilita asi 1 až 2 %, u minoritních složek (kyselina citrónová, močovina, volné mastné kyseliny; Hering et al., 2008; Hanuš et al., 2008 a, 2009) to může být od 5 do 20 %. Zde konkrétně pak u KC to bylo 5,4 %.

## Závěr

Metodou kvalifikovaného odhadu podle dosažených výsledků lze určit pro přístroje, které neprodělaly zásadní poruchy nebo výměny významných funkčních součástí, maximální kalibrační interval při stanovení KC prostřed-

nictvím metody MIR-FT v systému centrální kalibrace na šest měsíců. Delší období je z technických důvodů a pro lepší kontrolu věrohodnosti výsledků zbytečně riskovat.

Tato práce byla podporována projekty MŠMT, MSM 2678846201, INGO LA 09030 a CZ.1.07/2.3.00/09.0081 a také provedena v rámci aktivit NRL-SM.

## Literární reference

- BATICZ, O.- TÖMÖSKÖZI, S.- VIDA, L.: Concentrations of citrate and ketone bodies in cow's raw milk. *Periodica Polytechnica, Ser. Chem. Eng.*, 46, 1-2, 2002, 93-104.
- BIGGS, D. A.: Instrumental infrared estimation of fat, protein, and lactose in milk: collaborative study. *J. AOAC*, 61, 5, 1978, 1015-1034.
- BIGGS, D. A.- SZIJARTO, L. F.- VOORT VAN DE, F. R.: Fresh milk sampling for centralized milk testing. *J. Dairy Sci.*, 67, 1984, 3085-3092.
- FOSS: MILKOSCAN FT 120; Improved milk calibration. Foss *Analytical Application Note* No. 128e, November, P/N 580282, 2004, 1-14.
- GARNSWORTHY, P. C.- MASSON, L. L.- LOCK, A. L.- MOTTRAM, T. T.: Variation of milk citrate with stage of lactation and de novo fatty acid synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 89, 2006, 1604-1612.
- GRAPPIN, R.: Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis - application to calibration procedure and quality control in dairy laboratory. *IDF Bulletin*, Doc. 208, IDF Provisional Standard 128, 1987, 3-12.
- HANUŠ, O.- BENDA, P.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Design and evaluation of the first national qualitative testing of routine milk analyses. (In Czech) *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.* (Brno), ISSN 1211-8516, XLVI, 3, 1998, 33-53.
- HANUŠ, O.- BENDA, P.- GENČUROVÁ, V.: Tests of Milkofix a new preservative substance for milk samples used for the purposes of an infrared analysis of basic milk composition. Part I. Checks of bacteriostatic and bactericidal abilities and interferential effect. (In Czech) *Veter. Med.* (Praha), 37, 1, 1992 a, 21-31.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- GABRIEL, B.: The effect of sample aging on the accuracy of an infrared analysis of basic milk composition. (In Czech) *Veter. Med.* (Praha), 37, 3, 1992 b, 149-160.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- ŽVÁČKOVÁ, I.: Tests of Milkofix a new preservative substance for milk samples used for the purposes of an infrared analysis of basic milk composition. (In Czech) Part II. Checks of preservative effects in relation to the infrared analysis. *Veter. Med.* (Praha), 37, 1, 1992 c, 33-43.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.- MOTYČKA, Z.- ČERNOCKÝ, M.: The interpretation of experimental calibration results of routine IR instruments for determination of free fatty acid contents of milk fat. (In Czech) *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, L, 182, 2, ISSN 0139-7265, 2008 a, 55-62.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- JANŮ, L.- JEDELSKÁ, R.: A framework performance of main elements of QA system of chemical and physical methods in reference and routine laboratories for raw milk quality analyses in the CR. (In Czech) *Sborník přednášek 2 THETA Analytical standards and equipment*, ISBN 978-80-86380-37-7, Komorní Lhotka, 2007, 33-50.
- HANUŠ, O.- HULOVÁ, I.- GENČUROVÁ, V.- ŠTOLC, L.- KUČERA, J.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.- MOTYČKA, Z.: Result interpretation of experimental calibration for milk citric acid determination via infra-red spectroscopy (MIR-FT). (In Czech) *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, ISSN 1211-8516, LVII, 5, 2009, 87-101.
- HANUŠ, O.- SKYVA, J.- HOFBAUER, J.- KLOPČIČ, M.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.: Reliability of analytical methods applicable at milk urea determination. (In Czech) *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.* (Brno), XLIX, 3, 2001, 143-154.
- HERING, P.- HANUŠ, O.- FRELICH, J.- PYTLOUN, J.- MACEK, A.- JANŮ, L.- KOPECKÝ, J.: Relationships between the results of various methods of urea analysis in native and enriched milk. *Czech Journal of Animal Science*, 53, 2, ISSN 1212-1819, 2008, 64-76.
- HERRE, A.: Den Harnstoff-Werten nicht blind vertrauen! *Top Agrar*, 2, 1998, R10.
- ILLEK, J.- PECHOVÁ, A.: Poruchy metabolismu dojníc a kvalita mléka. Metabolic disorders at cows and milk quality. (In Czech) *Farmář*, 6, 1997, 29-30.

- KERKHOF-MOGOT, M. F.- KOOPS, J.- NEETER, R.- SLANGEN, K. J.- HEMERT VAN, H.- KOOYMAN, O.- WOOLDRIK, H.: Routine testing of farm tank milk with the Milko-Scan 203. 1. Calibration procedure and small-scale experiments. *Neth. Milk Dairy J.*, 36, 1982, 115-130.
- KUBEŠOVÁ, M.- FAJMON, T.- FRELICH, J.- TRÁVNÍČEK, J.- MARŠÁLEK, M.: Analysis of milk urea and milk citrate content during the postpartal period and their impact on reproduction in dairy cows. *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, LI, 185, 1, ISSN 0139-7265, 2009, 2-13.
- LERAY, O., CECALAIT: An organization to support analytical quality assurance in dairy laboratories. V: *Proceedings of an International Analytical Quality Assurance and Good Laboratory Practice in Dairy Laboratories*. Sonthofen / Germany, 1992 -05-18/20, Brussels, 1993, 349-360.
- PIJANOWSKI, E.: Základy chémie a technológie mliekárstva. Príroda - Bratislava, 1977, 69.
- SJAUNJA, L. O.: Studies on milk analysis of individual cow milk samples. II. Factors affecting milk analyses by infrared technique under laboratory conditions. *Acta agric. scand.*, 34, 1984 a, 260-272.
- SJAUNJA, L. O.: Studies on milk analysis of individual cow milk samples. III. The effect of different treatments on infrared analyses. *Acta Agric. Scand.*, 34, 1984 b, 273-285.
- SJAUNJA, L. O.- ANDERSSON, I.: Laboratory experiments with a new infrared (IR) milk analyzer, the Milko-Scan 605. *Acta agric. scand.*, 35, 1985, 345-352.
- SJAUNJA, L. O.- PHILIPSSON, J.- LUNDSTRÖM, K.- SWENSSON, C.: Studies on milk analysis of individual cow milk samples. IV. Factors affecting milk analyses in a routine system by automated apparatuses. *Acta agric. scand.*, 34, 1984, 286-299.
- WALSTRA, P.- JENNESS, R.: Dairy Chemistry and Physics, New York - Chichester - Brisbane - Toronto - Singapore, 1984.

Přijato do tisku 10. 6. 2010

Lektorováno 25. 6. 2010

## VLIV FORTIFIKACE SYROVÁTKY A MLÉČNÉHO PERMEÁTU VYBRANÝMI NUTRIENTY NA VÝTĚŽNOST KYSELINY MLÉČNÉ

Drbohlav J.<sup>1</sup>, Šalaková A.<sup>1</sup>, Nehyba A.<sup>1</sup>, Binder M.<sup>2</sup>, Sedlařík V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MILCOM a.s. Praha

<sup>2</sup> Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

<sup>3</sup> Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Effect of whey and milk permeate fortification with selected nutrients on milk acid yield

### Abstrakt

Sladká syrovátka a permeát z ultrafiltrace mléka nebo syrovátky jsou vedlejším produktem při zpracování mléka a současně jsou vhodnou surovinou i pro další zpracování. Jejich fermentací vhodným mikrobiálním kmenem vzniká kyselina mléčná, která může být surovinou pro přípravu polylaktátu a následně pro další zpracování na biodegradovatelné plasty. Aby výtěžnost kyseliny mléčné z těchto substrátů byla co nejvyšší, je vhodná suplementace potřebnými nutrienty pro růst mikrobiálního kmene. V této

práci jsme se zaměřili na sledování vlivu vybraných nutrientů - kvasničného extraktu, sladového výtažku a peptonu na produkci kyseliny mléčné fermentací kmenem *Lactobacillus helveticus*. Bylo zjištěno, že suplementace těmito nutrienty zvýšila produkci kyseliny mléčné ve všech případech. Nejvyšší výtěžnost kyseliny mléčné u fermentovaného permeátu byla zjištěna při použití kvasničného extraktu a to přímo úměrně dávkou přídavku. U syrovátky se osvědčil pepton v dávce 0,75 % a dále též kvasničný extrakt vykázal významný vliv na zvýšení výtěžnosti kyseliny mléčné.

**Klíčová slova:** sladká syrovátka, permeát, suplementace, *Lactobacillus helveticus*

### Abstract

Sweet whey and milk or whey permeate are by-products in milk processing and also raw materials for further processing. Lactic acid forming by LAB strains fermentation can be also raw material for further processing for biodegradable plastics. Supplementation of nutrients is needed for the highest gain of lactic acid. In this work we investigated optimization of nutrient supplementation - yeast extract, peptone and malt extract to increase lactic acid production by *Lactobacillus helveticus* fermentation. Supplementations of these nutrients increased production of lactic acid in all cases. Yeast extract increased production by all permeates fermentations. In whey substrate showed best results peptone in concentration 0,75 % and positive influence was shown also by supplementation of yeast extract.

**Key words:** sweet whey, permeate, supplementation, *Lactobacillus helveticus*

### Úvod

Cílem naší práce bylo maximalizovat produkci kyseliny mléčné z vedlejších produktů mlékárenské výroby resp. odpadních produktů. Při výrobě sýrů vzniká sladká syrovátka, která obsahuje celou řadu cenných živin, jež lze fermentační cestou využít pro tvorbu kyseliny mléčné jako zdroje suroviny pro polymeraci a následnou tvorbu biodegradovatelných plastů. Dalším významným substrátem pro výrobu kyseliny mléčné fermentačním postupem může být permeát z ultrafiltrace mléka nebo syrovátky.

Permeát vzniká při výrobě proteinového koncentráту WPC a dalších aplikací, které jsou zaměřeny na získání mléčných bílkovin. Permeát vzniká ultrafiltrací a obsahuje hlavní podíl laktózy, minerálních látek a nebilkovinných dusíkatých látek. Retentát obsahující mléčné bílkoviny, malý podíl mléčného cukru a minerálních látek je využíván buď přímo jako přídavek do mléka nebo jiných potravinářských surovin nebo se suší. Permeát se tak stává vedlejším produktem a někdy i odpadním produktem. Permeát tím, že obsahuje dostatek nutrientů, lze využít pro fermentační aplikace nebo některými postupy z permeátu separovat laktózu.