

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



**Alkalická fosfatáza jako indikátor tepelného ošetření
mléka pro výrobu sýrů**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Hana Malínská

Vedoucí práce: Ing. Miroslava Potůčková

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Alkalická fosfatáza jako indikátor tepelného ošetření mléka pro výrobu sýrů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne datum odevzdání 7.4.2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Miroslavě Potůčkové za pečlivé odborné vedení, cenné rady, připomínky a osobní přístup, Ing. Janu Rosmusovi, že mi doporučil a umožnil zpracovat diplomovou práci na dané téma, Ing. Markétě Kaňákové za všechnu pomoc, podporu a čas, který mi věnovala a svému příteli a všem blízkým za trpělivost a podporu během celého studia.

Alkalická fosfatáza jako indikátor tepelného ošetření mléka pro výrobu sýrů

Souhrn

Cílem diplomové práce bylo v teoretické části shrnout současné poznatky o hodnocení aktivity alkalické fosfatázy jako indikátoru tepelného záhřevu mléka pro výrobu mléčných produktů. V praktické části pak bylo na 110 výrobcích, 8 tvarozích, 49 čerstvých sýrech, 9 čerstvých sýrech s kořením, 7 sýrech ve slaném nálevu, 7 sýrech plísňových, 5 sýrech zrajících pod mazem a 25 sýrech polotvrdých a tvrdých, provedeno porovnání 2 metodik pro stanovení aktivity tohoto enzymu, původní dle normy ČSN EN ISO 11816-2 (2003), využívající jako extrakční činidlo pasterované mléko a ISO 11816-2/IDF 155-2 (2010) v platném znění, kde je pro extrakci používán pufr.

Alkalická fosfatáza (EC 3.1.3.1) je hydroláza odštěpující fosfátové skupiny na 5. a 3. pozici u mnoha molekul, mezi něž patří zejména nukleotidy a proteiny. Enzym má pH optimum v alkalické oblasti (pH 10), jeho kofaktorem jsou ionty Zn^{2+} , inhibitorem pak Cu^{2+} . Mléčná alkalická fosfatáza pochází z epitelu mléčné žlázy a jiných buněčných útvarů. V tomto médiu je lokalizována na membráně tukových kuliček. Její množství záleží na stádiu laktace (nejvyšší koncentrace jsou obsaženy v mlezivu) a zdravotním stavu zvířete (koncentrace roste při onemocnění, zejména zánětech vemene). Díky své specifické termostabilitě je používána k průkazu pasterace mléka a mléčných výrobků.

V praktické části diplomové práce bylo při srovnání původní a modifikované metodiky zjištěno, že doporučená změna pasterovaného mléka za pufr zlepšuje extrahovatelnost enzymu z matrice sýru a zvyšuje citlivost metody ($p > 0,05$). Byla též potvrzena ($p > 0,05$) nevhodnost fluorometrického stanovení pro plísňové sýry (zejména sýry s plísní v těstě) z důvodu obsahu mikrobiální alkalické fosfatázy. Ze stejného důvodu metoda pravděpodobně nebude vhodná ani pro sýry zrající pod mazem. Naopak byla vyvrácena ($p > 0,05$) nevhodnost analýzy pro sýry zrající v solném nálevu. Pro kategorii čerstvých sýrů s přídavkem koření pak byly výsledky z hlediska její vhodnosti nejednoznačné. Na základě získaných dat lze také potvrdit vhodnost navrženého limitu (10 mU/g) zbytkové aktivity enzymu pro produkty z pasterovaného mléka.

Klíčová slova: alkalická fosfatáza, mléko, pasterace, průkaz tepelného ošetření, sýrařství

Alkaline phosphatase as an indicator for the heat treatment of the milk for cheesemaking

Summary

The aim of this diploma thesis was to summarize current knowledge about the evaluation of alkaline phosphatase activity as an indicator of heat treatment of milk for production of dairy products in theoretical part. In experimental part were compared 2 methods for this enzyme activity determination, the original according to ČSN EN ISO 11816-2 (2003), using pasteurized milk as an extracting agent, and ISO 11816-2/IDF 155-2 (2010), using extraction buffer. For comparison were used 110 cheese samples, 8 quarg products, 49 fresh cheese products, 9 spiced fresh cheese products, 7 white-brined cheese products, 7 *Penicillium* sp. flora cheese products, 5 coryneform flora cheese products and 25 semi-hard and hard cheese products.

Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) is a hydrolase cleaving phosphate groups at the 5th and 3rd position of many molecules including especially nucleotides and proteins. The enzyme has a pH optimum in the alkaline range (pH 10), their cofactors are ions Zn²⁺ and inhibitors Cu²⁺. Dairy alkaline phosphatase derived from mammary epithelium and other cellular residua in milk. In this medium is the enzyme localized on the membrane of fat globules. Their amount depends on the stage of lactation (the highest concentration is in colostrum) and animal health (their concentration increases when disease, especially mastitis, starts). Due to its specific thermostability is alkaline phosphatase used for proof of milk and milk products pasteurization.

In the experimental part of the diploma thesis was found that the recommended substitution of pasteurized milk for buffer improves enzyme extraction process from cheese matrix and so enhances method sensitivity ($p > 0.05$). Method unsuitability for *Penicillium* sp. flora cheese (especially for blue-veined ones) was also confirmed ($p > 0.05$). This unsuitability could be explained by content of microbial alkaline phosphatase. For the same reason might not be this method suitable also for coryneform flora cheese. On the contrary, this analysis is suitable ($p > 0.05$) for white-brined cheese. For spiced fresh cheese were the results in terms of evaluation suitability ambiguous. Based on the obtained data was also confirmed the suitability of proposed limit (10 mU/g) for residual enzyme activity in products from pasteurized milk.

Keywords: alkaline phosphatase, milk, pasteurization, heat treatment proof, cheesemaking

Obsah

1	ÚVOD	8
2	CÍL PRÁCE	9
2.1	HYPOTÉZA	9
2.2	CÍL PRÁCE.....	9
3	LITERÁRNÍ REŠERŠE	10
3.1	TEPELNÉ OŠETŘENÍ SYROVÉHO MLÉKA	10
3.2	PASTERACE SYROVÉHO MLÉKA PRO VÝROBU SÝRŮ	12
3.2.1	<i>Zařízení pro pasteraci syrového mléka</i>	12
3.3	PRŮKAZ PASTERACE SYROVÉHO MLÉKA	14
3.3.1	<i>Mikrobiologické průkazy pasterace</i>	15
3.3.2	<i>Chemické průkazy pasterace</i>	15
3.3.2.1	Průkaz aktivity alkalické fosfatázy	15
3.3.2.1.1	Kvalitativní metody průkazu aktivity alkalické fosfatázy	16
3.3.2.1.2	Kvantitativní metody průkazu aktivity alkalické fosfatázy	16
3.3.2.2	Průkaz aktivity γ -glutamyltransferázy	18
3.3.2.3	Průkaz aktivity laktoperoxidázy	19
3.3.2.3.1	Kvalitativní metody průkazu aktivity laktoperoxidázy	19
3.3.2.3.2	Kvantitativní metody průkazu aktivity laktoperoxidázy	20
3.4	ALKALICKÁ FOSFATÁZA	20
3.4.1	<i>Výskyt alkalické fosfatázy v organismu</i>	20
3.4.2	<i>Výskyt alkalické fosfatázy v mléce</i>	21
3.4.3	<i>Výskyt alkalické fosfatázy v sýrech</i>	23
4	MATERIÁLY A METODY	26
4.1	POUŽITÉ MATERIÁLY	26
4.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	32
4.3	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	32
4.4	ANALYTICKÉ METODY	32
4.4.1	<i>Stanovení aktivity alkalické fosfatázy v sýru dle ČSN EN ISO 11816-2</i>	32
4.4.2	<i>Stanovení aktivity alkalické fosfatázy v sýru dle ISO 11816-2/IDF 155-2</i>	34
4.5	STATISTICKÉ METODY	35
5	VÝSLEDKY	36
5.1	POROVNÁNÍ METOD ČSN EN ISO 11816-2A ISO 11816-2/IDF 155-2 PRO STANOVENÍ AKTIVITY ALKALICKÉ FOSFATÁZY U TVAROHŮ	36
5.2	POROVNÁNÍ METOD ČSN EN ISO 11816-2A ISO 11816-2/IDF 155-2 PRO STANOVENÍ AKTIVITY ALKALICKÉ FOSFATÁZY U ČERSTVÝCH SÝRŮ	38
5.3	POROVNÁNÍ METOD ČSN EN ISO 11816-2A ISO 11816-2/IDF 155-2 PRO STANOVENÍ AKTIVITY ALKALICKÉ FOSFATÁZY U ČERSTVÝCH SÝRŮ S KOŘENÍM	42
5.4	POROVNÁNÍ METOD ČSN EN ISO 11816-2A ISO 11816-2/IDF 155-2 PRO STANOVENÍ AKTIVITY ALKALICKÉ FOSFATÁZY U SÝRŮ SOLENÝCH A VE SLANÉM NÁLEVU.....	44
5.5	POROVNÁNÍ METOD ČSN EN ISO 11816-2A ISO 11816-2/IDF 155-2 PRO STANOVENÍ AKTIVITY ALKALICKÉ FOSFATÁZY U PLÍŠŇOVÝCH SÝRŮ	46
5.6	POROVNÁNÍ METOD ČSN EN ISO 11816-2A ISO 11816-2/IDF 155-2 PRO STANOVENÍ AKTIVITY ALKALICKÉ FOSFATÁZY U SÝRŮ ZRAJÍCÍCH POD MAZEM	48

5.7 POROVNÁNÍ METOD ČSN EN ISO 11816-2A ISO 11816-2/IDF 155-2 PRO STANOVENÍ AKTIVITY ALKALICKÉ FOSFATÁZY U SÝRŮ POLOTVRDÝCH A TVRDÝCH	49
6 DISKUSE.....	52
7 ZÁVĚR	56
8 SEZNAM LITERATURY.....	58
9 SEZNAM ZKRATEK	68
10 SEZNAM TABULEK.....	69

1 Úvod

Jedním z hlavních cílů zemědělské výroby je produkce rostlinných a živočišných komodit. Mezi hlavní živočišné produkty jsou řazeny maso, mléko a vejce. Tyto komodity jsou využívány nejen k přímé spotřebě, ale i k dalšímu zpracování.

V roce 2014 bylo českými mlékárnami odkoupeno celkem 2 350676 l syrového mléka. Z tohoto množství bylo 34285,0 l použito na výrobu tvarohů a 82356,3 l na výrobu přírodních sýrů. Sýrašství tedy v České Republice tvoří 4,97 % mlékárenské produkce.

Výrobci mléka, tedy chovatelé dojeného skotu, však nenabízejí svůj hlavní produkt pouze k výkupu mlékárnám. Jednou z možností samostatného prodeje mléka je mimo jiné i prodej ze dvora. Dále jsou spotřebiteli stále více oblíbeny a využívány mlékomaty.

Samostatnou kapitolou je zpracování mléka na mléčné výrobky přímo v místě produkce. V současnosti dochází k rozvoji malých mlékáren, které jsou přidruženy k chovu skotu. Tohoto způsobu využívají zvláště menší farmy. Takto vzniklé farmářské produkty jsou stále oblíbenější v široké vrstvě spotřebitelské veřejnosti. Vzhledem ke klesajícímu trendu v cenách vykupované suroviny je tento způsob také pro malé zemědělce ekonomicky výhodnější. Mohou díky němu zvýšit rentabilitu produkce mléka, protože rozdíl mezi náklady na výrobu jednoho litru mléka a z něj pocházejícího mléčného výrobku a mezi ziskem z něj je vyšší než při přímém odprodeji syrové suroviny mlékárně.

V České Republice jsou mléčné produkty vyráběny převážně z pasterovaného mléka a to jak v průmyslovém měřítku ve velkých mlékárnách, tak i při farmářské malovýrobě. Evropská legislativa pasteraci mléka pro výrobu mléčných výrobků přímo nenařizuje, avšak výrobce má povinnost výrobek na etiketě označit, že byl vyroben ze syrového mléka. Z tohoto důvodu kontrolní orgány potřebují rychlou, jednoduchou a spolehlivou metodu průkazu tepelného ošetření pro všechny druhy mlékárenských výrobků, aby nedocházelo ke klamání spotřebitele či případnému ohrožení jeho zdraví.

2 Cíl práce

2.1 Hypotéza

V současnosti platná metoda pro stanovení alkalické fosfatázy jakožto průkazu tepelného ošetření mléčné suroviny pro výrobu sýrů v České Republice, ČSN EN ISO 11816-2, je s výhodou nahraditelná za ISO 11816-2/IDF 155-2.

2.2 Cíl práce

Cílem diplomové práce je v teoretické části zpracování literární rešerše shrnující současné poznatky o hodnocení a interpretaci aktivity alkalické fosfatázy jako indikátoru tepelného ošetření mléčné suroviny pro výrobu mléčných produktů. V praktické části pak bude na vybraných vzorcích sýrů dostupných v tržní síti České Republiky provedeno porovnání dvou metod pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy, metod dle norem ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2.

3 Literární rešerše

3.1 Tepelné ošetření syrového mléka

Syrové mléko je dobrým živným médiem pro mnoho mikroorganismů. Ty z nich, které jsou endogenního původu, jsou v této potravinářské surovině obsaženy ihned po nadojení. Další se mohou do syrového mléka dostat nedostatečnou hygienou jeho získávání, uchovávání a převozu nebo nedodržením technologických postupů jeho ošetření při výrobě mléčných produktů. V tomto případě se jedná zejména o patogeny způsobující mastitidu, jež mohou být uvolněny do suroviny z infikovaných vemen, a různé kvasinky a plísně.

K typickým mikroorganismům kontaminujícím syrové mléko patří řada rodů. Z nesporulujících lze jmenovat například rody *Brucella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* a vzácně i *Escherichia*. Zesporulujících mikroorganismů sem patří rody *Bacillus* (*B.cereus*, *circulans*, *coagulans*, *subtilis*) a *Clostridium* (*C. butyricum*, *perfringens*, *sporogenes*, *tyrobutyricum*).

Z mikrobiálních kontaminantů suroviny, které jsou pro lidský organismus zvláště rizikové, lze uvést patogenní druhy *Escherichia coli*, *Clostridium* (*C.botulinum*), *Mycobacterium* (*M.bovis*, *paratuberculosis*, *tuberculosis*), *Salmonella* (*S.paratyphi*, *typhimurium*), *Staphylococcus* (*S.aureus*) a *Listerii monocytogenes*. V současnosti je proto většina vyprodukovaného syrového mléka tepelně ošetřována takovými způsoby, které zajistí nejen snížení celkového počtu v něm obsažených mikroorganismů, ale především usmrcení všech patogenních druhů, čímž je zajištěna jeho zdravotní nezávadnost (Marth et Steele, 2001).

Základním tepelným ošetřením syrového mléka, jež zajistí jeho zdravotní nezávadnost, je pasterace. Tento záhřev je obecně základní metodou ošetření potravin proti znehodnocení. Metodu pasterace vynalezl a zdokonalil francouzský vědec Luis Pasteur. Právě podle něho nese svůj název. Její první definice byla zveřejněna v Ottově slovníku naučném v následujícím znění: „Pasteurizování jest nejjednodušší process částečné sterilisace pokrmů, tj. zbavování jich mikrobů, kteří by jejich trvanlivosti a účelnosti byli na úkor. Víno, pivo, mléko, smetana nesmějí samozřejmě býti znečištěny látkami antiseptickými, kteréž by ovšem neomylně mikroby ubily, ale samy dále překážely, i dokázal Pasteur, že opatrným, volně stoupajícím zahříváním na 55 až 60°C potlačí se v nich životnost škodných mikrobův, aniž utrpí újmy bouquet anebo chuť vína nebo piva. V Tunisu osvědčilo se u vinařství pasteurizování frakcionané, zahřívání totiž stoupá successivně do 50°C, 60°C, ba i

výše, a po každé té fasi nechá se víno ochladiti. Výsledky jsou prý dobré. Posud jest sporno, zdaž pasteurisováním mléka i smetany netrpí výživnost zvláště pro mladé dětské orgány zažívací“ (Otto, 1902).

Jak vyplývá z výše uvedené definice, základním účelem pasterace je likvidace mikroorganismů, které by mohly způsobovat nejen znehodnocení produktu, ale také zdravotní riziko pro spotřebitele. V případě mléka jsou legislativně dané způsoby tohoto tepelného ošetření zakotveny v Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ve znění Nařízení Komise (ES) č. 1662/2006. Pasterace syrového mléka a mléčných produktů je dosaženo 3 základními způsoby kombinace teploty a doby ohřevu. Vysokou teplotou po krátkou dobu (nejméně 72°C po dobu 15 s, tzv. šetrná pasterace), nízkou teplotou po dlouhou dobu (nejméně 63°C po dobu 30 min, tzv. dlouhodobá pasterace) či jakoukoli jinou kombinací času a teploty vedoucí k rovnocennému účinku tak, aby výrobky bezprostředně po tomto ošetření vykazovaly negativní reakci při testu na alkalickou fosfatázu v případech, kdy je test použitelný (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004; Nařízení Komise (ES) č. 1662/2006).

Velká pozornost byla věnována zejména stanovení teplotních a časových režimů inaktivačních procesů, které spolehlivě likvidují termorezistentní mikroorganismy v mléce. Avšak samotná kategorizace termorezistentních mikroorganismů je předmětem diskusí. Například Robinson (2002) mezi ně řadí rody, jež přežívají záhřev na 63 °C po dobu 30 min (dlouhodobá pasterace), tedy *Alcaligenes*, *Microbacterium* a *Micrococcus* sp. a spory rodů *Bacillus* a *Clostridium*. Oproti tomu Stepaniak (2003) zařadil mezi termorezistentní mikroorganismy ty, které přežívají záhřev na 72°C po dobu 15 s (šetrná pasterace). Podle jeho definice do této skupiny patří koryneformní bakterie, rody *Micrococcus*, *Streptococcus* a opět spory rodů *Bacillus* a *Clostridium*. I další vědci posouvali teplotní hranici záhřevu inaktivujícího termorezistentní mikroorganismy v syrovém mléce i dobu, po kterou je ho nutno provádět. Cosentino a kol. (1997) ve své studii použili ošetření při 80 °C po dobu 15 min. Výsledky jejich práce korelovaly s účinností doporučeného záhřevu na 85 °C po dobu 10 min. Tento teplotní a časový režim nejlépe vyhovoval požadavku, aby přítomné spory přežily v původním počtu, zatímco vegetativní buňky a nesporotvorné mikroorganismy byly spolehlivě usmrceny (Cosentino et al., 1997; Havlová et al., 1993; Robinson, 2002; Stepaniak, 2003).

3.2 Pasterace syrového mléka pro výrobu sýrů

Pro výrobu sýrů z pasterovaného mléka je nejčastěji využíván záhřev na teplotu od 71 do 78°C po dobu 15 až 20 sekund, jež se obecně nazývá šetrná pasterace. Konkrétní režim tepelného ošetření je volen podle druhu sýra a tučnosti výchozí suroviny. Šetrná pasterace je v sýrařství používána z důvodu minimální denaturace syrovátkových bílkovin, která dosahuje pouze cca 15 %. Při denuraci hlavního syrovátkového proteinu, β -laktoglobulinu, totiž dochází k jeho vazbě na kaseinovou micelu. Kaseinová micela se tak stává obtížněji přístupná působení syřidlových enzymů a může docházet k negativním změnám procesu sýření. Z hlediska aktivity nativních enzymů mléka je šetrná pasterace charakteristická inaktivací alkalické fosfatázy a zachováním funkce laktoperoxidázy (Walstra, Wouters and Geurts, 2006).

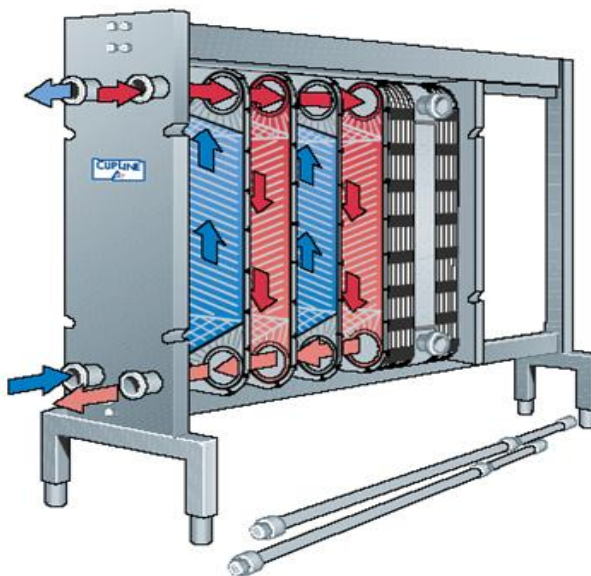
3.2.1 Zařízení pro pasteraci syrového mléka

V České Republice jsou využívány zejména 3 druhy zařízení pro pasteraci. Jedná se o výměníky tepla ve vsádkovém uspořádání (kotlový pastér) a v průtokovém uspořádání (trubkový a deskový pastér).

Konstrukčně je nejjednodušší vsádkové zařízení, jež se v současnosti uplatňuje zejména v malých mlékárnách a pro nízkokapacitní faremní výroby. Kotlový pastér je duplikátorová nádoba a syrové mléko je v něm pasterováno nepřímou, horkou vodou, která je vháněna do prostoru mezi vnější a vnitřní stěnou kotle. K základnímu vybavení tohoto zařízení dále patří míchadlo, teplotní čidlo a regulace teploty.

Velkokapacitní provozy pak využívají průtokové výměníky tepla. Nejčastějším zařízením sloužícím pro pasteraci syrového mléka je deskový pastér, jehož schéma je uvedeno na obrázku 1, z důvodu své vysoké účinnosti. Je složen z tenkých nerezových desek, aby bylo možné dosáhnout co nejefektivnějšího přestupu tepla k pasterované surovině a tím jejího rychlého ohřevu na požadovanou teplotu. Tyto desky jsou dále tvarovány a profilovány z důvodu zajištění turbulentního proudění mléka, které umožňuje jeho dokonalé prohřátí v celém objemu. Deskový pastér je rozdělen do jednotlivých sekcí, které zajišťují nejen vlastní pasteraci suroviny, ale také její přehřev a ochlazení. Většina moderních zařízení používá při pasteračním záhřevu, jenž nemusí být veden v aseptickém režimu, protiproud syrového a tepelně ošetřeného mléka. Tímto způsobem je možno surovinu přehřát za současného

ochlazení produktu. Vlastní pasterace je pak realizována pomocí horké tlakové vody nebo páry a finální dochlazení studenou vodou či dříve hojně využívanou solankou. Nedílnou součástí průtokových pastérů je také výdržník tepla, který zajišťuje adekvátní délku tepelného ošetření mléka. Zařízení pracuje z důvodu co nejšetnějšího ohřevu za vyššího tlaku (Bylund, 1995; Janštová, 2012).



Obrázek 1: Schéma deskového pastéru (Bylund, 1995).

Dalším průtokovým výměníkem tepla, který je možno použít pro pasteraci syrového mléka, je trubkový pastér. V nejjednodušším uspořádání se jedná o soustavu duplikátorových trubek, kdy vnitřními trubkami protéká surovina a vnějšími ohřivací nebo chladící médium. Neboť toto zařízení neumožňuje protiproud suroviny a produktu, je uplatňováno spíše pro aseptické UHT záhřevy. Trubkové pastéry jsou taktéž tlakové výměníky tepla, jež jsou děleny na předeřívací, pasterační a chladicí sekci a obsahují výdržník tepla. Jejich nevýhodou oproti deskovým pastérům je horší přestup tepla na zakřivené teplosměnné ploše a obtížnost čištění trubek. Výhodou naopak delší doba provozu díky nižší citlivosti vůči usazeninám. Mezi další konstrukční možnosti těchto tepelných výměníků, které jejich účinnost přibližují deskovým zařízením, patří svazek trubek v potrubí centrálním či soustava soustředných trubek (Bylund, 1995; Janštová, 2012).

V rámci prověřování účinnosti teplotních a časových režimů pasteračních záhřevů byly zjištěny rozdíly v době, jež je nutná k zajištění zdravotní nezávadnosti syrového mléka a smetany. Bylo zdokumentováno, že v případě smetany nebylo ošetření po dobu 15 s

při teplotě 72°C dostatečně účinné. Proto bylo nutno vyvinout výměník tepla, který umožňuje flexibilně, podle druhu pasterovaného materiálu, upravit dynamiku toku, zvýšit teplotu nebo prodloužit dobu pasterace. Touto problematikou se zabývali například i Rampling a kol. (2004), kteří provedli pokus ve dvou malých mlékárnách, kde byl zjištěn nedostatečný pasterační účinek u vysokotučné smetany. Před úpravou zařízení byly testovány vzorky pasterovaného produktu na přítomnost alkalické fosfatázy. Všechny, u nichž výsledná hodnota aktivity tohoto enzymu přesáhla 100 mU/l, byly potvrzeny a následně u nich byl zjišťován původ alkalické fosfatázy, zda se jednalo o enzym mikrobiální nebo nativní, u nějž došlo k obnově aktivity. Autoři konstrukční problém vyřešili zavedením třícenného kohoutu, jehož pomocí lze pasterované odstředěné mléko ochlazovat v regenerační části výměníku a smetana byla ochlazována ve zvláštním chladičím zařízení. Upravili také dynamiku toku (Knight et al., 1989; Lyster et al., 1962; Rampling et al., 2004).

3.3 Průkaz pasterace syrového mléka

V předchozí kapitole byla podrobně popsána zařízení, která slouží k tepelnému ošetření syrového mléka v průmyslovém měřítku. Tyto tepelné výměníky jsou samozřejmě vybaveny regulací teploty a kontrolou průběhu záhřevu, k níž obvykle slouží teplotní a průtoková čidla umístěná před a za výdržníkem v pasterační sekci. Avšak i po pasteraci suroviny, která proběhla standardním způsobem, je nutno v pravidelných intervalech provádět zkoušky, zda byla dostatečně účinná. Průkazy pasterace také slouží k odhalení či potvrzení podezření na případnou nesprávnou činnost nebo poruchu pastéru. Zkoušky prokazující účinnost pasteračního záhřevu lze rozdělit z několika hledisek. Jedním způsobem je členění dle místa provedení na testy provozní, jimiž lze kontrolovat mléko přímo ve výrobě, a laboratorní, které jsou prováděny v příslušných pověřených laboratořích. Další možností je dělení dle typu stanovení analýzy mikrobiologické a chemické. Obecně jsou průkazy pasterace založeny na potvrzení přítomnosti respektive nepřítomnosti látek, jež měly být příslušným tepelným ošetřením suroviny inaktivovány či, v případě mikroorganismů, zlikvidovány (Cosentino et al.; 1997; Martha et Steele; 2001).

3.3.1 Mikrobiologické průkazy pasterace

Obvyklou mikrobiologickou metodou, jež slouží pro potvrzení účinnosti pasteračního záhřevu syrového mléka, je výpočet pasteračního efektu (PE). Stanovení je založeno na zjištění celkového počtu mikroorganismů v surovině před tepelným ošetřením a v produktu po jeho průběhu. Vzorec pro výpočet pasteračního efektu (1) je uveden níže:

$$PE = \frac{CPM_1 - CPM_2}{CPM_1} \cdot 100 [\%] \quad (1)$$

CPM_1 – celkový počet mikroorganismů před zahřátím

CPM_2 – celkový počet mikroorganismů po zahřátí

Aby mléko bylo vyhodnoceno jako dostatečně pasterované, PE musí být 99,90 až 99,99 % (ČSN 56 9609, 2008).

3.3.2 Chemické průkazy pasterace

V případě chemických zkoušek jsou analýzy obvykle založeny na stanovení přítomnosti specifických enzymů surčitou termostabilitou odpovídající danému záhřevu.

Pro průkaz kvalitně provedené dlouhodobé pasterace (nejméně 63 °C po dobu 30min) byl určen jako indikátor enzym alkalická fosfatáza (ALP). Pro potvrzení správného průběhu šetrné pasterace (nejméně 72 °C po dobu 15 s) slouží enzym γ -glutamyltransferáza.

Pro průkaz vysoké pasterace (teploty 80 °C a více po dobu několika sekund) pak enzym laktoperoxidáza.

3.3.2.1 Průkaz aktivity alkalické fosfatázy

Nativní ALP (mléčného původu) je jeden z nejdůležitějších enzymů z hlediska průkazu účinnosti pasterace, neboť její termostabilita je důležitým vektorem pro růst patogenních mikroorganismů (D'Aoust et al., 1988). Tepelnou inaktivací tohoto enzymu se zabývala řada výzkumných skupin. Bylo potvrzeno, že stanovením aktivity ALP lze určit nejen nedostatečnost pasteračního záhřevu, ale také přídavek syrového mléka v množství od 0,1 % hm. (Harding et al.,2005; Shakeel-Ur-Rehmann et al.,2003; Schlimme et al.,1998). Na základě výsledků provedených studií byla v roce 2006 Evropskou komisí vydána vyhláška

Commission Regulation (EC) No. 1664/2006, v níž je specifikováno maximální přípustné množství ALP v pasterovaném mléce. Její aktivita v produktu nesmí přesáhnout 350 mU/l. Mléko vykazující tuto nebo nižší hodnotu aktivity enzymu je bráno jako dostatečně tepelně ošetřené (Commission Regulation (EC) No. 1664/2006).

Analytické metody pro stanovení ALP lze rozdělit na kvalitativní a kvantitativní. Jejich podrobnější popis je uveden v následujících podkapitolách.

3.3.2.1.1 Kvalitativní metody průkazu aktivity alkalické fosfatázy

Jednou z kvalitativních zkoušek přítomnosti respektive nepřítomnosti aktivní ALP v pasterovaném mléce je použití testu Lactognost. Studií jeho účinnosti a použitelnosti se v České Republice zabýval například Šulc a kol. již v roce 1960. Analýza byla prováděna tak, že do 2 zkumavek byla dávkována 1 tableta Lactognost I a 1 tableta Lactognost II. Po řádném rozpuštění obou tablet v destilované vodě byl do zkumavek přidán 1 ml syrového mléka. Jedna ze zkumavek byla zahřáta na teplotu 74 °C po dobu 1 min. Poté byly obě zkumavky inkubovány 60 min při 37 °C. Následně bylo přidáno činidlo Lactognost III a po 10 min hodnoceno zbarvení vzorku dle barevné škály přiložené k testu výrobcem. Světle hnědá barva detekovala mléko zahřáté nad 71 °C. Autoři na základě získaných výsledků uzavřeli, že tato metoda je schopna detekovat přídavek syrového mléka od 0,5% hm. Je tedy méně citlivá než kvantitativní fluorometrická metoda, avšak pro kvalitativní stanovení je postačující (Šulc et al., 1960)

3.3.2.1.2 Kvantitativní metody průkazu aktivity alkalické fosfatázy

Evropskou komisí i Mezinárodní mlékařskou federací byla pro svou signifikantnost jako referenční metoda průkazu aktivity ALP vybrána metoda fluorometrická. Její podstatou je inkubace nefluorescenčního substrátu obsahujícího aromatický monofosforečný ester při teplotě 38°C, následné přidání vzorku mléka a proměření vzniklé směsi na fluorometru. Je-li ALP aktivní, dochází po smíchání vzorku se substrátem během 3 min k jeho hydrolýze fosfátovými radikály za vzniku fluorescenčního produktu (ISO 11816-1, 2006).

Dumitrasçu a kol. (2014) použili fluorometrickou metodu k popisu kinetiky inaktivace enzymu ve 3 druzích mléka a to konkrétně v kravském, kozím a ovčím. Sledována byla rychlost denaturace ALP při teplotním rozmezí 60 – 72,5°C s krokem po 2,5°C a v čase 0 – 40 min. Autoři zjistili, že průběh inaktivace enzymu je dvoufázový, neboť ALP se vyskytuje ve 2 konformacích lišících se svou tepelnou stabilitou. Obě frakce však denaturují v souladu s kinetikou prvního řádu. Ze získaných experimentálních dat byla vyhodnocena jako tepelně

nejstabilnější ALP kozího mléka. Nižší termostabilitu pak vykazovala ALP ovčího mléka a nejnižší enzym hovězího původu. Popisovaná pozorování jsou v souladu se závěry dalších prací, například Lorentzena a kol. (2010) nebo Vamvakakiho a kol. (2006) (Dumitrascu et al., 2014; Lorentzen et al., 2010; Vamvakaki et al., 2006).

Další kvantitativní metodou pro průkaz aktivity ALP je fenolová spektrofotometrická analýza. Toto stanovení bylo dříve používáno jako referenční (ČSN ISO 3356, 2011). Principem této metody je smíchání vzorku s tlumivým roztokem o pH 10,6, který obsahuje fenylfosfát disodný. Tato směs je dále ponechána při teplotě 37°C po dobu 60 min. Pokud vzorek obsahuje aktivní ALP, dojde během inkubace k uvolnění fenolu z přidaného fenylfosfátu disodného. Následný přídavek činidla obsahujícího dibromchinonchlorimid, jež reaguje s fenolem, pak generuje modře zbarvenou sloučeninu dibromidofenol. Koncentrace enzymu je po spektrofotometrickém proměření vzorku vypočítána z kalibrační křivky a vyjádřena jako množství fenolu (v mg) uvolněného z 1 ml analytu za podmínek daných metodou. Nevýhodami fenolové spektrofotometrické metody jsou její časová náročnost a potřeba přípravy čerstvých reagensů před každým stanovením. Byla použita například ve studii Dinnella a kol. (2004) a Fadilogla a kol. (2006). Tito autoři ji však modifikovali a upravili složení tlumivého roztoku (uhličitan – hydrogenuhličitan o pH 9,6) a činidla, které místo dibromchinonchlorimidu obsahoval nitrosloučeniny. V případě přítomnosti aktivní ALP pak vyloučený fenol reagoval s nitrosloučeninami za vzniku *p*-nitrofenylfosfátu. Enzym pak dále katalyzoval jeho přeměnu na fosfát a žlutě zbarvený *p*-nitrofenol (ČSN ISO 3356, 2011; Dinnella et al., 2004; Fadilogla et al., 2006). Payne a kol. (2009) srovnávali účinnost fenolové spektrofotometrické analýzy se stanovením fluorometrickým. Výsledky této studie potvrdili, že fluorometrická metoda dosahuje vyšší citlivosti je rychlejší a jednodušší na provedení (Payne et al., 2009).

Mezi kvantitativní metody průkazu přítomnosti aktivní ALP lze zařadit také stanovení chemiluminiscenční. Při této metodě je využíván enzymatický fotoaktivovaný substrát (EPAS), který v přítomnosti aktivního enzymu vyzařuje takovou intenzitu světla, která je přímo úměrná jeho množství. Světelné záření je detekováno a měřeno na přístroji Charm novaLUM® (luminometr). Albiollos a kol. (2011) tuto metodu porovnávali s analýzou fluorometrickou. Byly testovány vzorky s přídavky syrového mléka a následnou koncentrací aktivního enzymu v rozmezí hodnot 2 – 5000 mU/l. Výsledky studie ukázaly, že při porovnání obou stanovení nebyly zjištěny větší rozdíly, než je povoleno v rámci mezilaboratorních hodnot opakovatelnosti (Albiollos et al., 2011).

3.3.2.2 Průkaz aktivity γ -glutamyltransferázy

Enzym γ -glutamyltransferáza vykazuje vyšší tepelnou stabilitu než ALP. Jako kvantitativní metoda průkazu jeho aktivity je používána *p*-nitroanilinová spektrofotometrická analýza. Principem tohoto stanovení je naředění vzorku mléka destilovanou vodou v požadovaném poměru a jeho následné smíchání se substrátovým pufrům obsahujícím γ -glutamyl-*p*-nitroanilid, jež je předem předeřtát na 40°C. Vzniklá směs mléka a pufru je inkubována 15 min ve 40°C vodní lázni. Pokud vzorek obsahuje aktivní enzym, dochází během této doby k uvolňování *p*-nitroanilinu. Reakce je zastavena přidavkem glycinového pufru a následné inkubaci za stejných podmínek po dobu 20 min a ochlazení na 20°C ve studené vodní lázni. Množství uvolněného *p*-nitroanilinu je pak nutno spektrofotometricky analyzovat do 30 min. Aktivita γ -glutamyltransferázy je vyjádřena jako mM *p*-nitroanilinu uvolněného za 1 min z 1 ml neředěného vzorku (Zehetner et al., 1995).

Stanovení aktivity tohoto enzymu bylo předmětem mnoha studií. V syrovém mléku byla McKellarem a kol.(1991) a později také Wernerym a kol.(2008) koncentrace γ -glutamyltransferázy naměřena v množství okolo 4300 U/l. Anjos a kol. (1998) však u této suroviny při použití stejné metody došli k nižší hodnotě a to 2880 U/l. Autoři na základě získaných výsledků uzavřeli, že aktivita enzymu může vykazovat variabilitu vzhledem k roční době, plemenu a věku zvířete, popřípadě pořadí laktace (Anjos et al.,1998; McKellar et al, 1991;Wernery et al., 2008). Lorentzen a kol. (2009) analyzovali termostabilitu γ -glutamyltransferázy. Po tepelném ošetření mléka na 62°C po dobu 30 min nebylo zjištěno výrazné snížení aktivity enzymu, neboť zůstalo přítomno okolo 75 % jeho původního množství v syrové surovině. Avšak při pasteraci na 65°C po dobu 32 min již bylo zaznamenáno pouze 14,5 % původní aktivity a při záhřevu mléka na 75°C po dobu 28 s bylo stanoveno pouze 5 % původní koncentrace (Lorentzen et al., 2009). Tyto výsledky korespondovaly se studií Farkye (2003), který prokázal, že aktivita γ -glutamyltransferázy byla snížena o 80 % při pasteraci syrového mléka na 72 – 75°C po dobu 15 s. Kompletní inaktivace enzymu pak byla pozorována při tepelném ošetření suroviny na 70°C po dobu 10 min nebo na 80°C po dobu 1 min. McKellar a kol. (1991) pak také svým výzkumem potvrdili kompletní inaktivaci γ -glutamyltransferázy záhřevem syrového mléka na více než 79 °C po dobu 16 s (Anjos et al., 1998; Farkye, 2003; McKellar, 1991).

3.3.2.3 Průkaz aktivity laktoperoxidázy

Nejvyšší tepelná stabilita v kravském mléce je ze jmenovaných enzymů vykazována laktoperoxidázou. Úplná aktivita tohoto biokatalyzátoru je zachována po dlouhodobé pasteraci (63°C po dobu 30 min), částečně deaktivován je pak po šetrné pasteraci (72 °C po dobu 15 s). Z tohoto důvodu byla laktoperoxidáza navržena jako indikátor pasteračních záhřevů nad 78 °C po dobu 15 s (Griffiths, 1986; Korhonen, 1980; Seifu et al., 2005).

Termostabilita enzymu byla předmětem řady studií. Korhonen (1980) pozoroval, že plemeno skotu má na zachování aktivity laktoperoxidázy po tepelném ošetření mléka jen malý vliv. Významně však její tepelnou stabilitu ovlivňoval obsah tuku. Ke stejnému výsledku došel později také Claeys a kol. (2002) a Marks a kol. (2001), kteří svými experimenty stanovili tepelný režim pro 100% deaktivaci laktoperoxidázy na 80 °C po dobu 2,5 s (Claeys et al., 2002; Korhonen, 1980; Marks et al., 2001). Ve studii Lorentzena a kol. (2009) byla stanovena hodnota aktivity enzymu v syrovém kravském mléce 2015, 2796 a 5190 U/l. Rozptyl hodnot byl autory vysvětlen jako vliv ročního období, plemene a věku dojnice i pořadí laktace (Lorentzen et al., 2009).

3.3.2.3.1. Kvalitativní metody průkazu aktivity laktoperoxidázy

Pro kvalitativní průkaz ošetření mléka teplotou nad 80 °C byla vyvinuta peroxidázová zkouška nazývaná též Storchova. Jejím principem je odštěpení kyslíku z peroxidu vodíku působením aktivní laktoperoxidázy a jeho následná reakce s *p*-fenylendiaminem za vzniku určitého zbarvení. Tmavě modrá barva vzorku indikuje zahřátí mléka pod 80 °C nebo přídavek syrového mléka nad 1 % hm. Bílé nebo slabě šedivé zbarvení pak na správně provedenou vysokou pasteraci (za použití teplot vyšších než 80 °C). Nevýhodou stanovení je jeho krátká průkaznost, která trvá pouze v den tepelného ošetření vzorku a při jeho uchování do 10 °C.

Modifikací Storchovy zkoušky pak je reakce kyslíku uvolněného z peroxidu vodíku působením aktivního enzymu s benzidindihydrochloridem. Modré zbarvení vzorku indikuje jeho zahřátí pod 75 °C nebo přídavek syrového mléka. Bílé nebo olivové zbarvení pak pasteraci na 75 °C a výše. Nevýhodou stanovení je nutnost striktního dodržení pracovního postupu a schopnost hodnotit intenzitu zbarvení, které vyžadují praxi (ČSN 570530, 1974).

3.3.2.3.2. Kvantitativní metody průkazu aktivity laktoperoxidázy

Pro kvantitativní stanovení aktivity laktoperoxidázy v mléce je používána metoda reflektometrická na přístroji Reflectoquant[®] (Merck, DE). Vzorek je naředěn destilovanou vodou v požadovaném poměru a poté je k němu přidáno 5 kapek činidla POD-1. Směs je promíchána a po dobu 2 s je do ní ponořen testovací proužek. Po jeho vyjmutí je přebytečná kapalina odstraněna poklepem, proužek je vložen do přístroje reflektometru a během 10 s je změřena intenzita vzniklého modrého zbarvení. Aktivita enzymu je vyjádřena jako jeho množství schopné přeměnit 1 μM substrátu za 1 min za podmínek metody. Mez detekce této analýzy byla stanovena na 5U/l (Lorentzen et al., 2009; Martin et al., 2005).

3.4 Alkalická fosfatáza

ALP je enzym zařazený dle EC nomenklatury do hlavní třídy 3, což jsou hydrolázy. Zástupci této třídy katalyzují hydrolýzu vazeb, které vznikly kondenzací. Z hlediska dalšího členění patří ALP do podtřídy 1, tedy hydroláz štěpících esterové vazby. Podpodtřídou 3 je biokatalyzátor specifikován jako hydroláza štěpící monoestery kyseliny fosforečné. Poslední číslicí 1 je definováno katalogové číslo enzymu. Kompletní označení ALP dle nomenklatury EC je tedy EC 3.1.3.1.

Z hlediska struktury molekuly je biokatalyzátor glykoproteinem, protože obsahuje glykosidicky vázanou skupinu, jejíž součástí je i kyselina sialová. Jedná se též o metaloprotein, neboť k jeho činnosti je nutná přítomnost iontů kovů v aktivním centru. Kofaktorem ALP jsou ionty Zn^{2+} , inhibítorem naopak Cu^{2+} . Enzym má pH optimum v alkalické oblasti (pH 10) a vykazuje širokou substrátovou specifitu. Ačkoli jeho přesná funkce nebyla doposud přesně objasněna, specificky odstraňuje fosfátové skupiny na 5. a 3. pozici u mnoha molekul, mezi něž patří zejména nukleotidy a bílkoviny (Kvasnicová, 2006).

3.4.1 Výskyt alkalické fosfatázy v organismu

Doposud byly identifikovány 3 isoformy ALP v lidském organismu – placentární, střevní a tkáňově nespecifická. Jako tkáňově nespecifická isoforma jsou označovány jaterní, kostní a ledvinová ALP. V každé ze jmenovaných tělních tkání je enzym vázán na buněčných membránách. V kostech je vázán na membrány osteoblastů. Po jeho aktivaci je prokazatelný v krvi (respektive krevním séru), avšak 100% pouze v případě, jedná-li se o jaterní a kostní isoformu ALP.

Placentární isoforma enzymu je v krevním séru přítomna během těhotenství od jeho 16. týdne. Zcela vymizí obvykle do 3 měsíců po porodu. Velmi nízké hladiny placentární ALP lze též nalézt ve varlatech a brzlíku. Této formě enzymu je též podobná ALP produkovaná nádorovými i zárodečnými buňkami, proto je často nazývána jako karcinoplacentární nebo onkogenní („placenta-like“). Jedná se o jeden ze základních markerů přítomnosti nádoru v těle.

Zajímavostí je skutečnost, že střevní isoformu nelze detekovat v krevním séru jedinců s krevními skupinami A a AB. Tato skutečnost je dána specifickou vlastností střevní ALP vázat se pouze na erytrocyty krevní skupiny A.

Velký diagnostický význam má stanovení jaterní, případně střevní isoformy enzymu. Zvýšené množství jaterní ALP poukazuje na řadu zdravotních problémů, mezi nimiž lze jmenovat například akutní alkoholovou toxickou hepatitidu (v tomto případě je koncentrace enzymu zvýšena 3 – 5×), cirhózu, extra- a intrahepatální cholestázu nebo virovou hepatitidu. Zvýšené množství jaterní isoformy lze také detekovat při jaterních nádorech.

Hladina kostní ALP bývá přirozeně vyšší u dětí v porovnání s dospělými jedinci kvůli vyšší aktivitě osteoblastů v době růstu a vývinu. Fyziologicky nižší hodnoty jsou naopak nalézány u ležících a nepohyblivých pacientů. Větší koncentrace kostní isoformy enzymu může sloužit jako jeden z indikátorů při diagnostice osteomalacie, Pagetovy choroby, primární a sekundární parathyreózy, sekundárních nádorů kostí a rachitidy.

Snížené množství různých isoform ALP bývá charakteristické pro řadu zdravotních obtíží zahrnujících akutní hypofosfatázemii, hypothyreózu, imunosupresivitu, nedostatek vitamínu B₁₂, nemoci z ozáření a těžké anemie. Zvýšené hodnoty celkové ALP v krvi během těhotenství více než o jednu třetinu nad fyziologickou koncentraci pak mohou poukazovat na poškození embrya (Kvasnicová, 2006).

3.4.2 Výskyt alkalické fosfatázy v mléce

V mléce je nativně přítomna řada specifických enzymů. Tyto biokatalyzátory jsou transportovány do mléka z epitelových buněk nebo krve během jeho tvorby. Nativní mléčná ALP pochází z epitelu mléčné žlázy a jiných buněčných útvarů. V mléce je lokalizována na membráně tukových kuliček. Jejimi dalšími zdroji je pak nejčastěji mikrobiální kontaminace suroviny, zejména mikroorganismy rodu *Escherichia* a *Aerobacter* (Fangdong Fan et al., 2003; Kelly et al., 2006).

Nativní enzym mléčného původu má důležitou úlohu při metabolismu glukózy a tuků. Bylo zjištěno, že jeho koncentrace závisí na stádiu laktace. Mléko lze obecně rozdělit na několik typů. Prvním je mlezivo, tedy tekutina produkovaná mléčnou žlázou savců bezprostředně před porodem do cca 6. dne po porodu. Mlezivo je typické vyšším množstvím bílkovin, zejména imunoglobulinů, tuků, vitamínů a minerálů. V další fázi laktace, cca od 7. do 14. dne po porodu, je produkováno takzvané nezralé mléko tvořící přechod mezi mlezivem a zralým mlékem. Od 14. dne po porodu již je produkováno zralé mléko. V experimentu Yanga a kol. (2014) byla zkoumána aktivita ALP v uvedených 3 typech suroviny při různém pH a teplotě. V první fázi pokusu byly vzorky měřeny při teplotě 37 °C a pH v rozmezí od 4,0 do 11,0. Nejnižší hodnoty aktivity byly obecně získány při pH 4,0, nejvyšší pak při pH 10,0. Při pH 11,0 již měla aktivita enzymu klesající tendenci a byla podobná hodnotám naměřeným při pH 8,0. V druhé fázi experimentu byla mléka o nativním pH měřena při různé teplotě v rozsahu od 10 do 60 °C. Nejvyšší aktivita ALP byla prokázána při teplotě 40 °C. Nejvyšší koncentrace enzymu pak byly vždy pozorovány v mlezivu a to 907,2 U/l (pH 10,0, 37 °C) a 936,8 U/l (40 °C, nativní pH mléka). Studie potvrdila, že aktivita enzymu je nejvyšší v mlezivu a optimální podmínky pro jeho působení jsou při teplotě 40 °C a pH 10,0. Práce přispěla ke zlepšení poznání vlastností enzymů v mlezivu oproti zralému mléku a optimalizaci podmínek pro pasteraci a úpravu této suroviny pro použití ve speciální výživě (Babaei et al., 2007; Gajdůšek, 1996; Yang et al., 2014).

Vyšší množství ALP bylo zjištěno při zvýšeném počtu somatických buněk a mastitidách. Při zánětech mléčné žlázy je navíc pozměněna aktivita mnoha dalších enzymů, zejména dehydrogenázy, glutamát-oxalát-transaminázy, katalázy, kyselé fosfatázy i lipázy (Gajdůšek, 1996; Kadlec, 1994). Změnám koncentrace ALP při mastitidách byla věnována například studie Guhya kol. (2012). Autoři se zaměřili na výzkum možnosti využití analýzy množství tohoto enzymu, vybraných stopových prvků a dalších nativních biokatalyzátorů mléka k diagnostice zánětů mléčné žlázy u přežvýkavců. Experimentálními zvířaty bylo celkem 484 buvolů říčních. Jako nejvhodnější parametr pro diagnostiku mastitid byly vyhodnoceny ALP a zinek. V případě mléka zdravých jedinců byly zaznamenané hodnoty enzymu 284 U/l a zinku 3,5 mg/kg. U zvířat v subklinické fázi mastitidy pak byly jmenované parametry indikátorů zvýšeny na 811 U/l, respektive 6,01 mg/kg. Tato práce byla vzhledem k dané problematice průkopnická a další výzkumy v této oblasti budou její výsledky porovnávat a případně vyvracet (Guha et al., 2012).

Hladina mléčné ALP může být ovlivněna také podáváním oxytocinu. Aplikace jmenovaného hormonu mléčnému skotu před dojením byla používána kvůli snadnějšímu průběhu tohoto procesu a ke zvládnání stresu. Dle prací zaměřených na toto téma se jedná o běžnou praxi zvláště v rozvojových zemích. Častá aplikace jakékoliv látky, ačkoli je v organismu přirozeně přítomna, však může být v konečném důsledku příčinou fyziologické nerovnováhy (Bruckmaier, 2005). Výsledky několika studií dokázaly, že při podávání oxytocinu byla naměřena nižší střední hodnota aktivity nativní ALP v mléce a to konkrétně 490 U/l oproti surovině zvířat, jimž hormon aplikován nebyl (průměrně 770 U/l). Hameed a kol.(2010, 2014) tyto nálezy vysvětlují tím, že při podávání oxytocinu dochází ke zvýšení koncentrace mědi, která je jejím přirozeným inhibítorem (Fox et al., 1998; Hameed et al., 2010; Hameed et al., 2014).

3.4.3 Výskyt alkalické fosfatázy v sýrech

Evropská legislativa pasteraci mléka pro produkci mléčných výrobků, respektive sýrů, přímo nenařizuje, avšak výrobce má povinnost na etiketě produktu jasně označit, že byl vyroben ze syrového mléka. Je to z toho důvodu, že sýry ze syrového mléka mohou představovat potenciální hrozbu pro veřejné zdraví a to především z důvodu možnosti přenosu patogenních zárodků. Drtivá většina sýrů na celém světě je proto vyráběna z pasterovaného mléka, neboť toto tepelné ošetření suroviny je nejbezpečnějším procesem k minimalizaci rizika onemocnění, jejichž původcem jsou potraviny. Pasterací jsou eliminovány patogenní mikroorganismy bez významných sensorických a fyzikálně-chemických změn mléka. I v České Republice jsou mléčné výrobky, respektive sýry, produkovány převážně z pasterované suroviny a to jak v průmyslovém měřítku ve velkých provozech, tak i při farmářské malovýrobě. V některých zemích jsou však tradičně určité typy sýrů, zejména zrajících, vyráběny za použití syrového mléka, neboť 60ti denní doba zrání produktu před konzumací je minimálním požadovaným časovým intervalem k inaktivaci patogenních mikroorganismů fyzikálně-chemickými změnami probíhajícími v sýru (Abedini et al., 2007; Kleyn et Goodman, 1977; Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ve znění Nařízení Komise (ES) č. 1662/2006; Zottola et Smith, 1993).

Aby byla zaručena bezpečnost výrobků, je pro kontrolní orgány důležité ověřit dodržení podmínek pasterace s využitím kvalitativních a kvantitativních metod. Jedním ze základních markerů v této oblasti je stanovení aktivity ALP. Koncentrace aktivní formy enzymu však může být v sýrech vyšší než v původní pasterované surovině. Důvodem je

jednak schopnost biochemické reaktivace mléčné ALP a dále může být ve výrobku přítomna také mikrobiální ALP (Rankin et al., 2010).

Řada studií, jejichž cílem bylo charakterizovat aktivitu enzymu v sýrech, použila pro jeho stanovení modifikované metody dle Schärerera. Principem této analýzy je štěpení disodného fenylfosfátového substrátu aktivní ALP za uvolňování fenolu. Fenol následně reaguje s 2,6–dichlorchinonchlorimidem místo tradičního 2,6–dibromchinon-4-chlorftalimidu za vzniku modře zbarvené indofenolové sloučeniny. Intenzita zbarvení, jež je přímo úměrná množství vyloučeného fenolu, a tedy aktivitě enzymu, je stanovena spektrofotometricky (Rankin et al., 2010). Z výsledků práce Murthyho a Coxe (1988) vyplynulo, že toto stanovení je dostačující k určení zbytkové aktivity ALP v sýrech (Murthy et Cox, 1988).

Různé technologické kroky při produkci sýrů mohou být příčinou variability hladin zbytkové ALP. Proto byl Soaresem a kol. (2013) proveden experiment se sýrem Minas, který byl vyroben jednak z čistě pasterovaného mléka a dále bylo do základu tepelně ošetřené suroviny přidáno 0,05, 0,10, 0,20 a 0,50% hm. syrového mléka. Vzorky byly po výrobě podrobeny 20ti dennímu zrání. Aktivita enzymu byla měřena 1. a 20. den zrání. Autoři zaznamenali, že po 20 dnech zrání bylo průměrné množství zbytkové ALP v sýrech s přídatkem 0,10 a 0,20% hm. vyšší než 1 µg fenolu na g výrobku, přičemž tato hodnota je mezinárodně uznané bezpečné zbytkové množství enzymu. U všech vzorků čerstvého sýra bez přídatku syrového mléka však aktivita enzymu referenční hodnotu nepřesáhla. Soarez a kol. (2013) došli k závěru, že spektroskopická metoda dle Schärerera vykazovala určité nepřesnosti a vyžadovala vysoké požadavky na čistotu reagentů, skla, přesnost a dodržování časů a teplot. Navíc byla časově náročnější než fluorometrická metoda (Soarez et al., 2013).

Fluorometrickou metodu (jež je podrobně popsána v kap. 4.4.2) použili ve své studii například Cassidy a kol. (2014) při testování zbytkové ALP v sýrech vyrobených z pasterovaného mléka. Předmětem jejich práce bylo 52 tvrdých, polotvrdých a měkkých sýrů vyrobených ve Velké Británii. Do studie nebyly zařazeny produkty s plísní uvnitř nebo na povrchu z důvodu eliminace možnosti kontaminace enzymem mikrobiálního původu.

Aktivita ALP byla měřena kontinuálním fluorometrickým přímým kinetickým testem za použití nefluorescenčního substrátu obsahujícího aromatický monofosforečný ester 2'-[2-benzothiazolyl]-6'-hydroxybenzothiazolu, který po hydrolyze enzymem vytvářel vysoce fluorescenční produkt. Aktivita ALP byla měřena při 38°C po dobu 2 min po 1 min trvající počáteční ekvilibraci a byla vyjádřena v jednotkách mU/g. Fluorometr byl kalibrován v souladu s pokyny výrobce na jednotlivé matrice analyzovaných vzorků (měkké, polotvrde a

tvrdé sýry). Studií bylo potvrzeno, že produkty vyrobené ve Velké Británii obsahují zbytkový aktivní enzym pod hranicí 10 mU/g. Tato hranice byla neoficiálně určena jako horní limit pro rozlišení, zda je sýr vyrobený ze správně nebo špatně pasterovaného mléka. Získané výsledky by bylo pravděpodobně možno vysvětlit působením startovacích sýrašských kultur, neboť bylo potvrzeno, že některé kmeny rodu *Lactococcus* jsou schopny syntetizovat ALP. Avšak nebylo prokázáno, že tato mikrobiální forma enzymu ovlivnila naměřené hodnoty (Cassidy et al., 2014; Nomura et al., 2006).

4 Materiály a metody

4.1 Použité materiály

V diplomové práci bylo použito celkem 110 vzorků tvarohů a přírodních sýrů dostupných v běžné obchodní síti ČR, na farmářských trzích nebo ve faremních prodejnách. Všechny produkty byly vyrobeny z pasterovaného mléka. Vzorky byly rozděleny do 7 skupin, na tvarohy (8 zástupců), čerstvé sýry (49 zástupců), čerstvé sýry s kořením (9 zástupců), sýry solené a ve slaném nálevu (7 zástupců), plísňové sýry s plísní uvnitř a na povrchu (7 zástupců), sýry zrající pod mazem (5 zástupců) a sýry polotvrdé a tvrdé (25 zástupců). Jejich specifikace je uvedena v tab. 1 až 7.

Ke standardizaci vzorků v metodě ČSN EN ISO 11816-2 bylo použito odstředěné mléko o tučnosti 0,05 % hm. (Mlékárna Čejetičky, ČR).

Tabulka1: Specifikace vzorků tvarohů.

Číslo vzorku	Popis vzorku	DV ¹	DS ²	Výroba
1	Tvaroh z tepelně ošetřeného mléka	N ⁶	N ⁶	B ⁴
2	Tvaroh z kravského mléka	07/10/14	14/10/14	A ³
3	Tvaroh	N ⁶	13/10/14	A ³
4	Tvaroh	21/10/14	09/11/14	A ³
5	Tvaroh polotučný	28/10/14	11/11/14	A ³
6	Tvaroh tučný	04/11/14	12/11/14	C ⁵
7	Tvaroh měkký	N ⁶	20/12/14	C ⁵
8	Tvaroh odtučněný	N ⁶	28/11/14	C ⁵

¹ datum výroby

² datum spotřeby

³ farmářská výroba

⁴ malé a střední mlékárny

⁵ velkokapacitní mlékárny

⁶ neuvedeno

Tabulka 2a: Specifikace vzorků čerstvých sýrů.

Číslo vzorku	Popis vzorku	DV ¹	DS ²	Výroba
9	Sýr typu ricotta	21/09/14	N ⁶	B ⁴
10	Kravský selský sýr, přírodní, měkký	22/09/14	N ⁶	A ³
11	Čerstvý sýr	24/09/14	N ⁶	A ³
12	Čerstvý sýr	23/09/14	28/09/14	B ⁴
13	Čerstvý farmářský sýr	27/09/14	02/10/14	A ³
14	Sýr přírodní nezrající nesolený	30/09/14	N ⁶	A ³
15	Čerstvý sýr	N ⁶	N ⁶	A ³
16	Čerstvý sýr z kravského mléka	N ⁶	18/10/14	A ³
17	Kravský sýr přírodní	29/09/14	N ⁶	A ³
18	Čerstvý sýr	N ⁶	N ⁶	A ³
19	Přírodní sýr	03/10/14	03/01/15	A ³
20	Měkký BIO sýr	07/10/14	19/10/14	A ³
21	Čerstvý přírodní sýr	07/10/14	22/10/14	A ³
22	Čerstvý kravský sýr	30/09/14	N ⁶	A ³
23	Čerstvý sýr přírodní, nezrající	06/10/14	13/10/14	A ³
24	Čerstvý termizovaný sýr	N ⁶	13/11/14	B ⁴
25	Farmářský sýr čerstvý	09/10/14	04/11/14	A ³
26	Čerstvý sýr kravský	N ⁶	30/10/14	A ³
27	Čerstvý kravský sýr	07/10/14	N ⁶	A ³
28	Čerstvý sýr z kravského mléka	03/10/14	29/10/14	A ³
29	Čerstvý přírodní sýr	N ⁶	N ⁶	A ³
30	Přírodní sýr bez příchutě	14/10/14	20/10/14	A ³
31	Čerstvý sýr	N ⁶	23/10/14	A ³
32	Čerstvý sýr	30/09/14	21/10/14	A ³
33	Kravský sýr čerstvý	N ⁶	20/10/14	A ³
32	Čerstvý sýr	30/09/14	21/10/14	A ³
33	Kravský sýr čerstvý	N ⁶	20/10/14	A ³

¹ datum výroby

² datum spotřeby

³ farmářská výroba

⁴ malé a střední mlékárny

⁵ velkokapacitní mlékárny

⁶ neuvedeno

Tabulka 2b: Specifikace vzorků čerstvých sýrů.

Číslo vzorku	Popis vzorku	DV ¹	DS ²	Výroba.
34	Čerstvý sýr	N ⁶	30/10/14	A ³
35	Čerstvý sýr	13/10/14	N ⁶	A ³
36	Čerstvý kravský sýr	16/10/14	22/10/14	A ³
37	Čerstvý bílý sýr	09/10/14	27/10/14	A ³
38	Čerstvý sýr neochucený	N ⁶	05/11/14	A ³
39	Čerstvý sýr	N ⁶	N ⁶	A ³
40	Čerstvý sýr	N ⁶	N ⁶	A ³
41	Sýr farmářský	N ⁶	04/11/14	A ³
42	Čerstvý sýr z farmy	21/10/14	11/11/14	A ³
43	Čerstvý nezrající sýr	23/10/14	30/10/14	A ³
44	Krémový sýr	23/10/15	07/11/14	B ⁴
45	Sýr	24/10/14	22/01/14	A ³
46	Sýr	16/10/14	N ⁶	A ³
47	Sýr	N ⁶	30/10/14	A ³
48	Sýr	N ⁶	31/10/14	A ³
49	Přírodní čerstvý sýr	23/10/14	13/11/14	A ³
50	Čerstvý přírodní sýr, nezrající	30/10/14	13/11/14	A ³
51	Sýr typu ricotta	10/11/14	N ⁶	A ³
52	Čerstvý sýr	11/11/14	N ⁶	A ³
53	Sýr	23/10/14	17/11/14	A ³
54	Čerstvý sýr	11/11/14	21/11/14	A ³
55	Sýr	11/11/14	20/11/14	A ³
56	Přírodní kravský sýr	10/11/14	24/11/14	A ³
57	Čerstvý sýr	N ⁶	N ⁶	A ³

¹ datum výroby

² datum spotřeby

³ farmářská výroba

⁴ malé a střední mlékárny

⁵ velkokapacitní mlékárny

⁶ neuvedeno

Tabulka 3: Specifikace vzorků čerstvých sýrů s kořením.

Číslo vzorku	Popis vzorku	DV ¹	DS ²	Výroba
58	Čerstvý sýr s chilli a papričkou	29/08/14	14/10/14	B ⁴
59	Čerstvý sýr s rukolou	23/09/14	28/09/14	B ⁴
60	Přírodní sýr s příchutí cibule	14/10/14	20/10/14	B ⁴
61	Čerstvý sýr s bylinkami	N ⁶	25/10/14	A ³
62	Čerstvý sýr Pesto	N ⁶	29/10/14	B ⁴
63	Čerstvý sýr pikant	23/10/14	26/11/14	A ³
64	Čerstvý bílý sýr s bylinkami	30/10/14	14/11/14	A ³
65	Čerstvý sýr steakové koření	03//11/14	12/12/14	A ³
66	Kořeněný selský sýr	N ⁶	16/11/14	A ³

¹ datum výroby² datum spotřeby³ farmářská výroba⁴ malé a střední mlékárny⁵ velkokapacitní mlékárny⁶ neuvedeno**Tabulka 4: Specifikace vzorků sýrů solených a ve slaném nálevu.**

Číslo vzorku	Popis vzorku	DV ¹	DS ²	Výroba
67	Sýr typu balkán	04/09/14	N ⁶	A ³
68	Sýr typu balkán	11/09/147	31/12/14	A ³
69	Plnotučný sýr solený - přírodní	09/10/14	21/10/14	A ³
70	bílý sýr typu akawi	08/10/14	N ⁶	B ⁴
71	Sýr typu balkán	21/10/14	N ⁶	B ⁴
72	Sýr typu balkán	20/10/14	10/01/15	C ⁵
73	Sýr typu akawi	21/10/14	N ⁶	C ⁵

¹ datum výroby² datum spotřeby³ farmářská výroba⁴ malé a střední mlékárny⁵ velkokapacitní mlékárny⁶ neuvedeno

Tabulka 5: Specifikace vzorků sýrů plísňových.

Číslo vzorku	Popis vzorku	DV ¹	DS ²	Výroba
74	Sýr s plísní uvnitř hmoty	16/09/14	25/10/14	C ⁵
75	Sýr s plísní na povrchu	N ⁶	31/10/14	C ⁵
76	Sýr s plísní na povrchu	07/10/14	15/11/14	B ⁴
77	Sýr s plísní na povrchu	N ⁶	23/11/14	C ⁵
78	Sýr s plísní uvnitř hmoty	23/09/14	N ⁶	B ⁴
79	Sýr s plísní na povrchu	01/10/14	N ⁶	C ⁵
80	Sýr s plísní uvnitř hmoty	N ⁶	N ⁶	C ⁵

¹ datum výroby² datum spotřeby³ farmářská výroba⁴ malé a střední mlékárny⁵ velkokapacitní mlékárny⁶ neuvedeno**Tabulka 6: Specifikace vzorků sýrů zrajících pod mazem.**

Číslo vzorku	Popis vzorku	DV ¹	DS ²	Výroba
81	Sýr zrající pod mazem	N ⁶	19/11/14	C ⁵
82	Nízkotučný sýr zrající pod mazem	N ⁶	225/11/14	B ⁴
83	Sýr zrající pod mazem	N ⁶	28/11/14	C ⁵
84	Farmářský sýr zrající pod mazem	10/11/14	10/03/15	A ³
85	Sýr zrající pod mazem	29/10/14	19/11/14	A ³

¹ datum výroby² datum spotřeby³ farmářská výroba⁴ malé a střední mlékárny⁵ velkokapacitní mlékárny⁶ neuvedeno

Tabulka 7: Specifikace vzorků polotvrdých a tvrdých sýrů.

Číslo vzorku	Popis vzorku	DV ¹	DS ²	Výroba
86	Sýr polotučný polotvrdý	18/09/14	17/10/14	A ³
87	Sýr typu ementál	N ⁶	N ⁶	B ⁴
88	Přírodní polotvrdý sýr typu eidam	N ⁶	24/12/14	B ⁴
89	Sýr typu gouda	05/09/14	N ⁶	C ⁵
90	Sýr typu ementál	14/08/14	N ⁶	B ⁴
91	Sýr typu eidam	05/09/14	N ⁶	C ⁵
92	Sýr typu eidam	N ⁶	N ⁶	C ⁵
93	Farmářský sýr polotvrdý	09/10/14	08/12/14	A ³
94	Farmářský sýr typu gouda	N ⁶	05/11/14	A ³
95	Sýr polotvrdý	30/08/14	N ⁶	C ⁵
96	Sýr polotvrdý	N ⁶	07/11/14	B ⁴
97	Sýr polotvrdý	N ⁶	N ⁶	A ³
98	Sýr polotvrdý	N ⁶	N ⁶	A ³
99	Sýr z farmy- přírodní polotvrdý	09/10/14	07/11/14	A ³
100	Sýr typu gouda	05/08/14	N ⁶	C ⁵
101	Sýr typu ementál	11/08/14	N ⁶	C ⁵
102	Sýr typu eidam	16/09/14	01/02/15	B ⁴
103	Sýr typu emental	04/09/14	N ⁶	C ⁵
104	Sýr typu eidam	26/08/14	N ⁶	C ⁵
105	Polotvrdý sýr	02/07/14	N ⁶	C ⁵
106	Polotvrdý sýr	N ⁶	N ⁶	B ⁴
107	Sýr typu eidam	14/09/14	N ⁶	B ⁴
108	Sýr typu gouda	N ⁶	N ⁶	B ⁴
109	Tvrdý sýr	N ⁶	N ⁶	B ⁴
110	Tvrdý sýr	N ⁶	12/12/14	B ⁴

¹ datum výroby

² datum spotřeby

³ farmářská výroba

⁴ malé a střední mlékárny

⁵ velkokapacitní mlékárny

⁶ neuvedeno

4.2 Použité chemikálie

Všechny chemikálie použité v diplomové práci měly čistotu p.a. Speciální látky jsou uvedeny níže:

- substrát Fluorophos[®] (2'-(2-benzothiabenzothiazolyl)-6'-hydroxybenzothiazol fosfát) (Advanced Instruments, Inc., USA)
- diethanolaminový tlumivý roztok (Advanced Instruments, Inc., USA)
- roztok pro denní kontrolu fluorimetru Fluoroyellow[®] (Advanced Instruments, Inc., USA)
- pufr pro extrakci sýra Fluorophos[®] (Advanced Instruments, Inc., USA)

4.3. Použité přístroje

Pro provedení experimentální části diplomové práce bylo použito běžné vybavení analytické laboratoře. Speciální přístroje jsou uvedeny níže:

- fluorimetr Fluorophos[®] FLM 200 s příslušenstvím (Advanced Instruments, Inc., USA)
- odstředivka IEC CL31 - CL31R(Thermo Electron Corporation, USA)

4.4. Analytické metody

4.4.1. Stanovení aktivity alkalické fosfatázy v sýru dle ČSN EN ISO 11816-2

Aktivita ALP ve vzorcích sýrů byla stanovena fluorometrickou metodou dle ČSN EN ISO 11816-2 (2003). Mez detekce analýzy je 0,800 mU/g, avšak dohodou mezi jednotlivými laboratořemi, jak českými, tak mezinárodními, je uváděna ve formě <1 mU/g. Pro každý produkt byla provedena 3 paralelní měření.

Příprava vzorku

Vzorky byly před analýzou nejprve zhomogenizovány. U tvrdých a polotvrdých sýrů byla homogenizace provedena jejich nastroháním na jemném plastovém struhadle, měkké sýry byly rozetřeny v třecí misce tloučkem. Z takto připraveného materiálu bylo s analytickou přesností (analytické váhy XSE 205DU, Mettler Toledo, CH) naváženo 0,3 – 0,5g, k nimž bylo přilito 5 ml extrakčního činidla (mléko o tučnosti 0,05 % hm., Mlékárna Čejetický, ČR). Mléko používané jako extrakční činidlo bylo před vlastní analýzou zpasterováno na 95°C po dobu 1 min (termostat láznový, HUBER, USA) a následně zchlazeno na laboratorní teplotu.

Směs syru s mlékem (Mlékárna Čejetičky, ČR) byla ponechána 10 – 20 min v klidu při laboratorní teplotě a poté byla homogenizována (Vortex GVLab, Gilson, DE) po dobu 35 s (měkké a polotvrdé syry) nebo 50 s (tvrdé syry). Homogenizát (extrakt) byl převeden do 25ml odměrné baňky. Ke zbytkům nehomogenizovaného syra bylo přidáno dalších 5 ml extrakčního činidla (Mlékárna Čejetičky, ČR) a směs byla homogenizována (Vortex GVLab, Gilson, DE) po dobu 30 s. Extrakt (homogenizát) byl převeden do 25 ml baňky k prvnímu podílu. Třetí extrakce byla provedena stejným způsobem jako druhá. 25 ml odměrná baňka byla následně doplněna po rysku extrakčním činidlem (Mlékárna Čejetičky, ČR), uzavřena a promíchána. cca 5 ml extraktu syru bylo odlito do skleněné zkumavky a odstředěno po dobu 10 min při 3000 otáčkách a teplotě 4°C (odstředivka IEC CL31 - CL31R, Thermo Electron Corporation, USA). Supernatant byl měřen na fluorimetru Fluorophos[®] FLM 200 (Advanced Instruments, Inc., USA) při 38°C. Pro jeho případné ředění bylo použito opět extrakční činidlo (Mlékárna Čejetičky, ČR).

Kontrola systému a chemikálií

Před vlastním měřením aktivity ALP byla provedena kontrola fluorometru Fluorophos[®] FLM 200 (Advanced Instruments, Inc., USA) a použitých chemikálií pomocí denního A/D testu. Tento test byl zahájen stisknutím tlačítka „SETUP“ přístroje Fluorophos[®] FLM 200 (Advanced Instruments, Inc., USA) a volbou možnosti „A/D Test“ s následným stiskem tlačítka „START“. Fluorometr Fluorophos[®] FLM 200 (Advanced Instruments, Inc., USA) s filtry byl vytemperován na 38°C a jeho držák kyvet byl prázdný. Odečet displeje by měl být za těchto podmínek 302 ± 4 FLU. Do označené kyvety pro jednorázové použití z nefluoreskujícího skla (Advanced Instruments, Inc., USA) bylo poté odebráno 2 ml roztoku pro denní kontrolu přístroje Fluoroyellow[®] (Advanced Instruments, Inc., USA). Kyveta byla vložena do inkubačního bloku pro umístění kyvet (Advanced Instruments, Inc., USA), jež byl nastaven na 38 ± 1 °C, kde byla temperována po dobu 10 min následně vložena do fluorometru Fluorophos[®] FLM 200 (Advanced Instruments, Inc., USA). Odečtená hodnota roztoku pro denní kontrolu přístroje Fluoroyellow[®] (Advanced Instruments, Inc., USA) by se měla pohybovat v rozmezí 602 ± 12 FLU. Pokud se nacházela mimo přípustné meze, byla upravena otočením seřizovacího šroubu potenciometru na hodnotu 602 FLU. Denní A/D test byl ukončen změřením vytemperovaného pracovního substrátu (připraven přidáním 240 ml diethanolaminového tlumicího roztoku (Advanced Instruments, Inc., USA)) ke 144 mg

práškového substrátu Fluorophos[®](Advanced Instruments, Inc., USA), jehož odečet nesměl být vyšší než 1200 FLU.

Analýza vzorku

Do označené kyvety pro jednorázové použití z nefluoreskujícího skla (Advanced Instruments, Inc., USA) bylo odpipetováno (automatická pipeta Biohit Proline 5000 μ l, Sartorius, FIN) 2 ml pracovního roztoku substrátu (připraven přidáním 240 ml diethanolaminového tlumicího roztoku (Advanced Instruments, Inc., USA)) ke 144 mg práškového substrátu Fluorophos[®](Advanced Instruments, Inc., USA) a její obsah byl temperován v inkubačním bloku pro umístění kyvet (Advanced Instruments, Inc., USA) po dobu 15 min na 38°C. Následně bylo přidáno (automatická pipeta Biohit Proline 100 μ l, Sartorius, FIN) 0,075 ml dobře promíchaného extraktu sýru, směs byla okamžitě promíchána (Vortex GVLab, Gilson, DE) po dobu 5 s a měřena (fluorometr Fluorophos[®] FLM 200, Advanced Instruments, Inc., USA) při 38 °C metodou „ALP Dairy“ s označením příslušného typu matrice vzorku. Vlastní analýze o délce 3 min předcházela 60 s temperace obsahu kyvety (Advanced Instruments, Inc., USA). Hodnoty fluorescence byly odečítány ve fluorescenčních jednotkách (FLU), které byly po ukončení analýzy automaticky přepočteny na aktivitu ALP v mU/l, kde jednotka aktivity alkalické fosfatázy je množství enzymu, jež katalyzuje přeměnu 1 μ mol substrátu za 1 min. Enzymová aktivita ALP ve vzorku sýru byla vyjádřena v mU/g dle vztahu (2).

$$EA = (F_p \times 25 \times f) / (1000 \times m) \quad (2)$$

EA– enzymová aktivita ALP v sýru [mU/g]

F_p– enzymová aktivita ALP směsi mléko/sýr nebo pufr/sýr [mU/l]

f– ředění počáteční směsi mléko/sýr nebo pufr/sýr [-]

m – hmotnost navážky sýru [g/25 ml]

Mez stanovitelnosti: 10mU/l

4.4.2 Stanovení aktivity alkalické fosfatázy v sýru dle ISO 11816-2/IDF 155-2

Aktivita ALP ve vzorcích sýrů byla stanovena fluorometrickou metodou dle ISO 11816-2/IDF 155-2 (2010). Mez detekce analýzy je 0,800 mU/g, avšak dohodou mezi jednotlivými laboratořemi, jak českými, tak mezinárodními, je uváděna ve formě <1 mU/g. Pro každý produkt byla provedena 3 paralelní měření

Příprava vzorku

Příprava vzorků sýru byla provedena stejným způsobem jako v kap. 4.4.1. Jediným rozdílem bylo použití pufru pro extrakci sýra Fluorophos[®] (Advanced Instruments, Inc., USA) jako extrakčního činidla místo mléka o tučnosti 0,05 % hm. (Mlékárna Čejetičky, ČR), jež bylo předem zpasterováno na 95 °C po dobu 1 min (termostat lázněový, HUBER, USA) a následně zchlazeno na laboratorní teplotu.

Kontrola systému a chemikálií

Kontrola systému a chemikálií před vlastním měřením byla provedena stejným způsobem jako v kap. 4.4.1.

Analýza vzorku

Analýza vzorků byla provedena stejným způsobem jako v kap. 4.4.1. Enzymová aktivita ALP v sýrech byla vyjádřena v mU/g dle vztahu (2).

4.5 Statistické metody

U souborů získaných dat bylo nejprve provedeno vyloučení odlehlých hodnot pomocí Grubbsova testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Kritická hodnota na zvolené hladině významnosti byla $Q_{3;0,05} = 1,412$. Výsledek byl označen jako odlehlý, pokud výsledek Grubbsova testu byl větší než $Q_{3;0,05}$. Zbylá data byla dále zpracována do formy aritmetického průměru z odpovídajících paralelních měření, u nichž byla též spočítána směrodatná odchylka.

Statistické zhodnocení výsledků bylo provedeno ANOVA testem na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Byla stanovena následující nulová hypotéza $H_0: \mu_1^2 = \mu_2^2$. Proti této H_0 byla postavena alternativní hypotéza $H_1: \mu_1^2 \neq \mu_2^2$. Pro jednotlivé skupiny vzorků byly stanoveny následující kritické hodnoty:

- tvarohy - $F_{\text{krit}} = 3,78704$
- čerstvé sýry - $F_{\text{krit}} = 1,61537$
- čerstvé sýry s kořením - $F_{\text{krit}} = 3,43810$
- sýry solené a ve slaném nálevu - $F_{\text{krit}} = 4,28386$
- plísňové sýry - $F_{\text{krit}} = 4,28386$
- sýry zrající pod mazem - $F_{\text{krit}} = 6,38823$
- sýry polotvrdé a tvrdé - $F_{\text{krit}} = 1,98376$

Druhou metodou statistického vyhodnocení výsledků byl zvolen Studentův t-test pro párové hodnoty na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Byly spočítány difference mezi jednotlivými dvojicemi aktivity ALP, stanovenými 2 zvolenými analýzami, a bylo statisticky hodnoceno, zda jsou mezi nimi statisticky významné rozdíly. Jako nulová hypotéza byla určena $H_0: d = 0$. Proti H_0 byla postavena alternativní hypotéza $H_1: d \neq 0$. Pro jednotlivé skupiny vzorků byly stanoveny následující kritické hodnoty:

- tvarohy - $t_{\text{krit}} = 2,36462$
- čerstvé sýry - $t_{\text{krit}} = 2,01064$
- čerstvé sýry s kořením - $t_{\text{krit}} = 2,30600$
- sýry solené a ve slaném nálevu - $t_{\text{krit}} = 2,44691$
- plísňové sýry s plísní uvnitř i na povrchu - $t_{\text{krit}} = 2,44691$
- sýry zrající pod mazem - $t_{\text{krit}} = 2,77645$
- sýry polotvrdé a tvrdé - $t_{\text{krit}} = 2,06390$

5 Výsledky

5.1. Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u tvarohů

Nahraditelnost v České Republice aktuálně platné normy pro průkaz tepelného ošetření mléka na výrobu tvarohů a sýrů, ČSN EN ISO 11816-2 (2003), za v Evropské Unii všeobecně používanou normu ISO 11816-2/IDF 155-2 (2010) pro tvarohy byla zkoušena na celkem 8 výrobcích o různé tučnosti jak z běžné obchodní sítě, tak od farmářů. Jejich specifikace je uvedena v tab. 1 v kap. 4.1. Výsledky měření jsou uvedeny v tab. 8, výsledky statistického hodnocení pak v tab. 9 a 10.

Tabulka 8: Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity ALP u tvarohů.

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze 3 paralelních měření se směrodatnou odchylkou.

VZ	ČSN EN ISO 11816-2		ISO 11816-2/IDF 155-2	
	EA [mU/g]	SD ¹ [-]	EA [mU/g]	SD ¹ [-]
1	<1 ²	0	<1 ²	0
2	<1 ²	0	<1 ²	0
3	1,53	0,07	3,98	0,06
4	<1 ²	0	<1 ²	0
5	<1 ²	0	<1 ²	0
6	<1 ²	0	<1 ²	0
7	<1 ²	0	<1 ²	0
8	<1 ²	0	<1 ²	0

¹směrodatná odchylka

²aktivita ALP pod mezídetekce

Tabulka 9: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity ALP u tvarohů pomocí ANOVA testu.

$\alpha = 0,05$, $F_{\text{krit}} = 3,787044$.

Parametr	ČSN EN ISO 11816-2	ISO 11816-2/IDF 155-2
Střední hodnota	0,891	1,198
Rozptyl	0,066	1,266
Pozorování	8	8
Rozdíl	7	7
F	19,216	
$P(F \leq F_{\text{krit}})$	0,000455	

Tabulka 10: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity ALP u tvarohů pomocí Studentova *t*-testu pro párové hodnoty.

$$\alpha = 0,05, t_{\text{krit.}} = 2,36462$$

Parametr	Hodnoty
Průměr	0,307
Rozptyl	0,660
SD	0,812
<i>t</i>	2,646

Z výsledků uvedených v tab. 8 je patrné, že kromě vzorku 3 vykázaly všechny hodnocené produkty aktivitu enzymu pod mezí detekce. Stanovená aktivita enzymu byla vyšší v případě použití postupu normy ISO 11816-2/IDF 155-2 a tento rozdíl byl na zvolené hladině pravděpodobnosti statisticky průkazný ($p > 0,05$).

5.2. Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u čerstvých sýrů

Nahraditelnost v České Republice aktuálně platné normy pro průkaz tepelného ošetření mléka na výrobu tvarohů a sýrů, ČSN EN ISO 11816-2 (2003), za v Evropské Unii všeobecně používanou normu ISO 11816-2/IDF 155-2(2010) pro čerstvé sýry byla zkoušena na celkem 49 výrobcích o různé tučnosti jak z běžné obchodní sítě, tak od farmářů. Jejich specifikace je uvedena v tab. 2a a 2b v kap. 4.1. Výsledky měření jsou uvedeny v tab. 11a a 11b, výsledky statistického hodnocení pak v tab. 12 a 13.

Tabulka 11a: Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity ALP u čerstvých sýrů.

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze 3 paralelních měření se směrodatnou odchylkou.

VZ	ČSN EN ISO 11816-2		ISO 11816-2/IDF 155-2	
	EA [mU/g]	SD ¹ [-]	EA [mU/g]	SD ¹ [-]
9	<1 ²	0	<1 ²	0
10	<1 ²	0	<1 ²	0
11	<1 ²	0	<1 ²	0
12	1,048	0,047	2,831	0,002
13	<1 ²	0	<1 ²	0
14	<1 ²	0	<1 ²	0
15	<1 ²	0	<1 ²	0
16	<1 ²	0	<1 ²	0
17	<1 ²	0	<1 ²	0
18	<1 ²	0	1,435	0,033
19	<1 ²	0	<1 ²	0
20	<1 ²	0	<1 ²	0
21	<1 ²	0	<1 ²	0
22	<1 ²	0	<1 ²	0
23	<1 ²	0	<1 ²	0
24	<1 ²	0	<1 ²	0
25	<1 ²	0	<1 ²	0
26	<1 ²	0	<1 ²	0
27	1,007	0,129	2,104	0,093
28	<1 ²	0	<1 ²	0
29	<1 ²	0	<1 ²	0
30	<1 ²	0	<1 ²	0
31	<1 ²	0	<1 ²	0
32	<1 ²	0	<1 ²	0
33	<1 ²	0	<1 ²	0

¹směrodatná odchylka

²aktivita ALP pod mezí detekce

Tabulka 11b: Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity ALP u čerstvých sýrů.

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze 3 paralelních měření se směrodatnou odchylkou.

VZ	ČSN EN ISO 11816-2		ISO 11816-2/IDF 155-2	
	EA [mU/g]	SD ¹ [-]	EA [mU/g]	SD ¹ [-]
34	<1 ²	0	<1 ²	0
35	<1 ²	0	<1 ²	0
36	61,084	0,590	80,460	0,2835
37	<1 ²	0	<1 ²	0
38	18,280	0,259	22,147	0,224
39	<1 ²	0	<1 ²	0
40	5,692	0,093	7,594	0
41	<1 ²	0	<1 ²	0
42	<1 ²	0	<1 ²	0
43	<1 ²	0	<1 ²	0
44	<1 ²	0	1,631	0,004
45	<1 ²	0	<1 ²	0
46	<1 ²	0	<1 ²	0
47	<1 ²	0	<1 ²	0
48	<1 ²	0	<1 ²	0
49	3,670	0,225	5,193	0,013
50	<1 ²	0	<1 ²	0
51	<1 ²	0	<1 ²	0
52	<1 ²	0	<1 ²	0
53	50,277	1,467	65,218	0,393
54	1,652	0,091	3,331	0,103
55	1,409	0,070	3,301	0,155
56	<1 ²	0	<1 ²	0
57	<1 ²	0	<1 ²	0

¹směrodatná odchylka

²aktivita ALP pod mezí detekce

Tabulka12: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity ALP u čerstvých sýrů pomocí ANOVA testu.

$\alpha = 0,05$, $F_{\text{krit}} = 1,61537$.

Parametr	ČSN EN ISO 11816-2	ISO 11816-2/IDF 155-2
Středníhodnota	3,594	4,604
Rozptyl	125,800	215,132
Pozorování	49	49
Rozdíl	48	48
F	1,710	
$P(F \leq F_{\text{krit}})$	0,033	

Tabulka 13: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity ALP u čerstvých sýrů pomocí Studentova t -testu pro párové hodnoty.

$\alpha = 0,05$, $t_{\text{krit}} = 2,01064$.

Parametr	Hodnoty
Průměr	1,011
Rozptyl	11,864
SD	3,444
t	2,033

Z výsledků uvedených v tab. 11a a 11b je patrné, že ve vzorcích 12, 27, 36, 38, 40, 49, 53, 54 a 55 byla detekována oběma metodami zbytková aktivita enzymu vyšší než je mez stanovitelnosti 1 mU/g. Metodou ISO 11816-2/IDF 155-2 byla stanovena aktivita ALP nad mezí detekce navíc u produktů 18 a 44. Naměřená residuální aktivita enzymu byla vždy vyšší v případě použití postupu normy ISO 11816-2/IDF 155-2 a tento rozdíl byl na zvolené hladině pravděpodobnosti statisticky průkazný ($p > 0,05$). Velmi vysoké hodnoty tohoto parametru byly získány u vzorků 36 a 53 ($p > 0,05$).

5.3. Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u čerstvých sýrů s kořením

Nahraditelnost v České Republice aktuálně platné normy pro průkaz tepelného ošetření mléka na výrobu tvarohů a sýrů, ČSN EN ISO 11816-2 (2003), za v Evropské Unii všeobecně používanou normu ISO 11816-2/IDF 155-2 (2010) pro čerstvé sýry s kořením byla zkoušena na celkem 9 výrobcích jak z běžné obchodní sítě, tak od farmářů. Jejich specifikace je uvedena v tab. 3 v kap. 4.1. Výsledky měření jsou uvedeny v tab. 14, výsledky statistického hodnocení pak v tab. 15 a 16.

Tabulka 14: Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity ALP u čerstvých sýrů s kořením.

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze 3 paralelních měření se směrodatnou odchylkou.

VZ	ČSN EN ISO 11816-2		ISO 11816-2/IDF 155-2	
	EA [mU/g]	SD ¹ [-]	EA [mU/g]	SD ¹ [-]
58	4,06	0,32	12,46	0,06
59	1,03	0,04	2,79	0,02
60	<1 ²	0	<1 ²	0
61	<1 ²	0	<1 ²	0
62	<1 ²	0	<1 ²	0
63	<1 ²	0	1,35	0,12
64	3,66	0,06	5,23	0,04
65	1,36	0,08	3,18	0,08
66	<1 ²	0	<1 ²	0

¹směrodatná odchylka

²aktivita ALP pod mezí detekce

Tabulka 15: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity ALP u čerstvých sýrů s kořením pomocí ANOVA testu.

$$\alpha = 0,05, F_{\text{krit}} = 3,43810.$$

Parametr	ČSN EN ISO 11816-2	ISO 11816-2/IDF 155-2
Středníhodnota	1,567	3,134
Rozptyl	1,730	14,566
Pozorování	9	9
Rozdíl	8	8
F	8,418	
$P(F \leq F_{\text{krit}})$	0,003	

Tabulka 16: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity ALP u čerstvých sýrů s kořením pomocí Studentova t -testu pro párové hodnoty.

$$\alpha = 0,05, t_{\text{krit}} = 2,30600.$$

Parametr	Hodnoty
Průměr	1,566
Rozptyl	6,419
SD	2,534
t	1,748

Z výsledků uvedených v tab. 14 je patrné, že ve vzorcích 58, 59, 64 a 65 byla oběma metodami detekována residuální aktivita enzymu vyšší, než je mez stanovitelnosti. Metodou ISO 11816-2/IDF 155-2 byla stanovena aktivita ALP nad mezí detekce navíc u produktu 63. Stanovená zbytková koncentrace aktivního enzymu byla vždy vyšší v případě použití postupu normy ISO 11816-2/IDF 155-2 a tento rozdíl byl na zvolené hladině pravděpodobnosti statisticky průkazný ($p > 0,05$).

5.4 Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u sýrů solených a ve slaném nálevu

Nahraditelnost v České Republice aktuálně platné normy pro průkaz tepelného ošetření mléka na výrobu tvarohů a sýrů, ČSN EN ISO 11816-2 (2003), za v Evropské Unii všeobecně používanou normu ISO 11816-2/IDF 155-2 (2010) pro sýry solené a ve slaném nálevu byla zkoušena na celkem 7 výrobcích jak z běžné obchodní sítě, tak od farmářů. Jejich specifikace je uvedena v tab. 4 v kap. 4.1. Výsledky měření jsou uvedeny v tab. 17, výsledky statistického hodnocení pak v tab. 18 a 19.

Tabulka 17: Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity ALP u sýrů solených a ve slaném nálevu.

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze 3 paralelních měření se směrodatnou odchylkou.

VZ	ČSN EN ISO 11816-2		ISO 11816-2/IDF 155-2	
	EA [mU/g]	SD ¹ [-]	EA [mU/g]	SD ¹ [-]
67	<1 ²	0	<1 ²	0
68	<1 ²	0	<1 ²	0
69	<1 ²	0	<1 ²	0
70	<1 ²	0	<1 ²	0
71	<1 ²	0	1,65	0,09
72	<1 ²	0	<1 ²	0
73	<1 ²	0	1,40	0,00

¹směrodatná odchylka

²aktivita ALP pod mezí detekce

Tabulka 18: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity ALP u sýrů solených a ve slaném nálevu pomocí ANOVA testu.

$\alpha = 0,05$, $F_{\text{krit}} = 4,28387$.

Parametr	ČSN EN ISO 11816-2	ISO 11816-2/IDF 155-2
Střední hodnota	0,800	1,007
Rozptyl	1,438	0,130
Pozorování	7	7
Rozdíl	6	6
F	9,063	
$P(F \leq F_{\text{krit}})$	1,343	

Tabulka 19: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity ALP u sýrů solených a ve slaném nálevu pomocí Studentova t -testu pro párové hodnoty.

$\alpha = 0,05$, $t_{\text{krit}} = 2,44691$.

Parametr	Hodnoty
Průměr	0,207
Rozptyl	0,112
SD.	0,334
t	1,518

Z výsledků uvedených v tab. 17 je patrné, že zbytkové množství enzymu nad mezí stanovitelnosti bylo detekováno pouze metodou ISO 11816-2/IDF 155-2 ve vzorcích 71 a 73. Stanovená aktivita ALP byla tedy vyšší v případě použití postupu normy ISO 11816-2/IDF 155-2 a tento rozdíl byl na zvolené hladině pravděpodobnosti statisticky průkazný ($p > 0,05$).

5.5 Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u plísňových sýrů

Nahraditelnost v České Republice aktuálně platné normy pro průkaz tepelného ošetření mléka na výrobu tvarohů a sýrů, ČSN EN ISO 11816-2 (2003), za v Evropské Unii všeobecně používanou normu ISO 11816-2/IDF 155-2 (2010) pro plísňové sýry s plísní uvnitř i na povrchu byla zkoušena na celkem 7 výrobcích jak z běžné obchodní sítě, tak od farmářů. Jejich specifikace je uvedena v tab. 5 v kap. 4.1. Výsledky měření jsou uvedeny v tab. 20, výsledky statistického hodnocení pak v tab. 21 a 22.

Tabulka 20: Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity ALP u plísňových sýrů.

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze 3 paralelních měření se směrodatnou odchylkou.

VZ	ČSN EN ISO 11816-2		ISO 11816-2/IDF 155-2	
	EA [mU/g]	SD ¹ [-]	EA [mU/g]	SD ¹ [-]
74	60,01	0,94	156,89	0,97
75	<1 ²	0	<1 ²	0
76	5,76	0,22	12,51	0,09
77	1,67	0,10	3,28	0,06
78	75,27	1,53	118,81	1,11
79	<1 ²	0	2,31	0,02
80	3,72	0,51	7,61	0,10

¹směrodatná odchylka

²aktivita ALP pod mezí detekce

Tabulka21: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity ALP u plísňových sýrů pomocí ANOVA testu.

$\alpha = 0,05$, $F_{\text{krit}} = 4,28387$.

Parametr	ČSN EN ISO 11816-2	ISO11816-2/IDF 155-2
Střední hodnota	21,165	43,171
Rozptyl	1030,289	4319,206
Pozorování	7	7
Rozdíl	6	6
F	4,192	
$P (F \leq F_{\text{krit}})$	0,052	

Tabulka 22: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity ALP u plísňových sýrů pomocí Studentova t -testu pro párové hodnoty.

$\alpha = 0,05$, $t_{\text{krit}} = 2,44691$.

Parametr	Hodnoty
Průměr	22,006
Rozptyl	1136,821
SD	33,717
t	1,599

Z výsledků uvedených v tab. 20 je patrné, že ve vzorcích 74, 76, 77, 78 a 80 byla pomocí obou metod detekována zbytková aktivita enzymu vyšší, než je mez stanovitelnosti. Metodou ISO 11816-2/IDF 155-2 byla stanovena aktivita ALP nad mezí detekce navíc u produktu 79. Stanovená aktivita enzymu byla vždy vyšší v případě použití postupu normy ISO 11816-2/IDF 155-2, avšak tento rozdíl nebyl na zvolené hladině pravděpodobnosti statisticky průkazný ani jednou metodou statistické analýzy ($p < 0,05$). Velmi vysoké hodnoty tohoto parametru byly získány u vzorků 74 a 78 ($p > 0,05$).

5.6 Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u sýrů zrajících pod mazem

Nahraditelnost v České Republice aktuálně platné normy pro průkaz tepelného ošetření mléka na výrobu tvarohů a sýrů, ČSN EN ISO 11816-2 (2003), za v Evropské Unii všeobecně používanou normu ISO 11816-2/IDF 155-2 (2010) pro sýry zrající pod mazem byla zkoušena na celkem 5 výrobcích jak z běžné obchodní sítě, tak od farmářů. Jejich specifikace je uvedena v tab. 6 v kap. 4.1. Výsledky měření jsou uvedeny v tab. 23, výsledky statistického hodnocení pak v tab. 24 a 25.

Tabulka 23: Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity ALP u sýrů zrajících pod mazem.

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze 3 paralelních měření se směrodatnou odchylkou.

VZ	ČSN EN ISO 11816-2		ISO 11816-2/IDF 155-2	
	EA [mU/g]	SD ¹ [-]	EA [mU/g]	SD ¹ [-]
81	947,36	9,84	1589,44	14,102
82	<1 ²	0	<1 ²	0
83	136,98	4,32	279,26	4,45
84	<1 ²	0	<1 ²	0
85	<1 ²	0	<1 ²	0

¹směrodatná odchylka

²aktivita ALP pod mezí detekce

Tabulka24: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity ALP u sýrů zrajících pod mazem pomocí ANOVA testu.

$\alpha = 0,05$, $F_{\text{krit}} = 6,38823$.

Parametr	ČSN EN ISO 11816-2	ISO11816-2/IDF 155-2
Střední hodnota	217,349	374,188
Rozptyl	170014,956	476033,993
Pozorování	5	5
Rozdíl	4	4
F	2,800	
$P (F \leq F_{\text{krit}})$	0,171	

Tabulka 25: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity ALP u sýrů zrajících pod mazem pomocí Studentova-testu pro párové hodnoty.

$\alpha = 0,05$, $t_{krit.} = 2,77645$.

Parametr	Hodnoty
Průměr	156,839
Rozptyl	61893,700
SD	248,784
<i>t</i>	1,261

Z výsledků uvedených v tab. 23 je patrné, že ve vzorcích 81 a 83 byla oběma metodami detekována zbytková aktivita enzymu vyšší, než je mez stanovitelnosti. Tyto hodnoty byly navíc u obou produktů velmi vysoké ($p > 0,05$). Stanovená aktivita ALP byla vždy vyšší v případě použití postupu normy ISO 11816-2/IDF 155-2, avšak tento rozdíl nebyl na zvolené hladině pravděpodobnosti statisticky průkazný ani jednou metodou statistické analýzy ($p < 0,05$).

5.7 Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u sýrů polotvrdých a tvrdých

Nahraditelnost v České Republice aktuálně platné normy pro průkaz tepelného ošetření mléka na výrobu tvarohů a sýrů, ČSN EN ISO 11816-2(2003), za v Evropské Unii všeobecně používanou normu ISO 11816-2/IDF 155-2(2010) pro sýry tvrdé a polotvrdé byla zkoušena na celkem 25 výrobcích jak z běžné obchodní sítě, tak od farmářů. Jejich specifikace je uvedena v tab. 7 v kap. 4.1. Výsledky měření jsou uvedeny v tab. 26, výsledky statistického hodnocení pak v tab. 27 a 28.

Tabulka 26: Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity ALP u sýrů polotvrdých a tvrdých.

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze 3 paralelních měření se směrodatnou odchylkou.

VZ	ČSN EN ISO 11816-2		ISO 11816-2/IDF 155-2	
	EA [mU/g]	SD ¹ [-]	EA [mU/g]	SD ¹ [-]
86	<1 ²	0	<1 ²	0
87	<1 ²	0	<1 ²	0
88	<1 ²	0	<1 ²	0
89	<1 ²	0	<1 ²	0
90	<1 ²	0	<1 ²	0
91	<1 ²	0	<1 ²	0
92	<1 ²	0	<1 ²	0
93	<1 ²	0	<1 ²	0
94	<1 ²	0	<1 ²	0
95	1,09	0,10	2,52	0,06
96	2,24	0,13	2,44	0,11
97	<1 ²	0	<1 ²	0
98	<1 ²	0	<1 ²	0
99	<1 ²	0	<1 ²	0
100	<1 ²	0	<1 ²	0
101	<1 ²	0	<1 ²	0
102	<1 ²	0	2,05	0,14
103	<1 ²	0	<1 ²	0
104	<1 ²	0	<1 ²	0
105	<1 ²	0	<1 ²	0
106	<1 ²	0	<1 ²	0
107	<1 ²	0	1,17	0,05
108	<1 ²	0	<1 ²	0
109	<1 ²	0	<1 ²	0
110	<1 ²	0	1,29	0,05

¹směrodatná odchylka

²aktivita ALP pod mezí detekce

Tabulka 27: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity ALP u sýrů polotvrdých a tvrdých pomocí ANOVA testu.

$\alpha = 0,05$, $F_{\text{krit}} = 1,98376$.

Parametr	ČSN EN ISO 11816-2	ISO11816-2/IDF 155-2
Středníhodnota	0,869	1,099
Rozptyl	0,084	0,666
Pozorování	25	25
Rozdíl	24	24
F	7,884	
$P (F \leq F_{\text{krit}})$	1,680	

Tabulka 28: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity ALP u sýrů polotvrdých a tvrdých pomocí Studentova t -testu pro párové hodnoty.

$\alpha = 0,05$, $t_{\text{krit}} = 2,06390$.

Parametr	Hodnoty
Průměr	0,230233
Rozptyl	0,626132
SD	1,118887
t	1,008063

Z výsledků uvedených v tab. 26 je patrné, že ve vzorcích 95 a 96 byla oběma metodami detekována zbytková aktivita enzymu vyšší, než mez stanovitelnosti. Metodou ISO 11816-2/IDF 155-2 byla stanovena aktivita ALP nad mezí detekce navíc u produktů 102,107 a 110. Stanovená zbytková koncentrace aktivního enzymu byla vždy vyšší v případě použití postupu normy ISO 11816-2/IDF 155-2 a tento rozdíl byl na zvolené hladině pravděpodobnosti statisticky průkazný ($p > 0,05$).

6 Diskuse

Enzym ALP a průkaz jeho aktivity v mléce se stal jedním z hlavních témat mnoha studií. Je to zejména z toho důvodu, že jeho koncentrace v syrovém mléce může být dobrým indikátorem mastitid jak v subklinické tak akutní fázi (Gajdůšek, 1996; Guha et al., 2012; Kadlec, 1994) a jeho aktivní množství v pasterovaném mléce zase slouží k určení nejen dostatečnosti použitého záhřevu, ale také přídavku syrového mléka v množství od 0,1 % hm. (Schlimme et al., 1998). V roce 2006 byla proto Evropskou komisí vydána vyhláška Commission Regulation (EC) No. 1664/2006, kde je specifikováno maximální přípustné množství enzymu v pasterovaném mléce, jež činí 350 mU/l. Produkt, vykazující tuto nebo nižší hodnotu ALP, je hodnocen jako dostatečně pasterovaný (Commission Regulation (EC) No. 1664/2006).

Cílem této diplomové práce, stejně jako řady dalších studií, však bylo charakterizovat přítomnost zbytkového aktivního enzymu v mléčných produktech, respektive v sýrech. Celkem bylo zanalyzováno 110 sýrů pocházejících z malo- i velkovýroby, které jsou běžně k dostání v tržní síti České Republiky (v obchodních řetězcích, na farmářských trzích nebo ve faremních prodejnách). Vzorky byly rozděleny do 7 kategorií, na tvarohy (8 výrobků), čerstvé sýry (49 výrobků), čerstvé sýry s kořením (9 výrobků), sýry ve slaném nálevu (7 výrobků), sýry plísňové (7 výrobků), sýry zrající pod mazem (5 výrobků) a sýry polotvrdé a tvrdé (25 výrobků). Aktivita ALP byla stanovena pomocí fluorometrické metody, jež byla určena za referenční k detekci tohoto enzymu v pasterovaném mléce a je vhodná i pro jeho průkaz ve většině dalších mléčných produktů. Její mez detekce je 1 mU/g (ČSN EN ISO 11816-2, 2003; EN ISO 11816-2,2010; IDF 155-2, 2003)

Pro stanovení zbytkové aktivní ALP ve vzorcích byla použita doposud platná ČSN EN ISO 11816-2 (2003), která je českou verzí EN ISO 11816-2 (2003). Jedná se o fluorometrickou metodu používající jako extrakční činidlo mléko zahřáté na 95 °C po dobu 1 min a následně zchlazené na laboratorní teplotu. Pasterované mléko bylo jako extrakční činidlo zvoleno z toho důvodu, že řada studií prokázala jeho vhodnost díky vlastnostem, jež jsou srovnatelné s analyty (ČSN EN ISO 11816-2, 2003; EN ISO 11816-2, 2003; IDF 155-2, 2003 Rola et Sosnowski, 2012). Výsledky tohoto stanovení byly porovnány s upravenou metodikou EN ISO 11816-2 (2010). Ta byla uvedena na 11. workshopu Evropské referenční laboratoře pro mléko a mléčné výrobky ve Vídni (2008). Změna spočívala v nahrazení pasterovaného mléka komerčně vyráběným extrakčním pufrem (Advanced Instruments, Inc.,

USA) speciálně vyvinutým pro získávání zbytkového aktivního enzymu z matrice sýru. Tento pufr má vyšší extrakční sílu oproti mléku díky svému pH (8,0), které je bližší reakční oblasti ALP. Navíc při správném skladování je doba jeho expirace 3 roky. V Evropské referenční laboratoři byl tento výrobek testován v porovnání s doposud používaným pasterovaným mlékem a při jeho užití byly získány zhruba dvojnásobné koncentrace zbytkového enzymu. Bohužel, přímá konfrontace obou způsobů extrakce byla provedena pouze u 8 vzorků sýrů ementálského typu (Nicolas, 2008). Z 25 vzorků zařazených v této práci do skupiny tvrdých a polotvrdých sýrů 2 vzorky extrahované mlékem (vzorky 95 a 96) a dokonce 5 vzorků extrahovaných pufrem (vzorky 95, 96, 102, 107 a 110) vykazovaly hodnotu vyšší než 1 mU/g ($p > 0,05$). Tím bylo dokázáno, že i výsledky získané v této diplomové práci souhlasí se závěry Nicolasové (2008) a upravená metoda dává ve většině případů vyšší hodnoty a je tedy citlivější (Nicolas, 2008). Získané výsledky by bylo pravděpodobně možno vysvětlit působením startovacích sýrařských kultur, neboť bylo potvrzeno, že některé kmeny rodu *Lactococcus* jsou schopny syntetizovat ALP. Avšak nebylo prokázáno, že tato mikrobiální forma enzymu ovlivnila naměřené hodnoty (Cassidy et al., 2014; Nomura et al., 2006).

Na 11. workshopu Evropské referenční laboratoře pro mléko a mléčné výrobky ve Vídni (2008) byly také prezentovány výsledky průkazu aktivní ALP u čerstvých sýrů z pasterovaného mléka extrahovaných pasterovaným mlékem. Počet vzorků u tohoto výzkumu sice nebyl uveden, ale průměrné hodnoty enzymu se v této matrici pohybovaly v rozmezí od 1,3 do 3,4 mU/g (Desbourdes et al., 2008). V této diplomové práci bylo analyzováno celkem 66 odpovídajících vzorků, 49 čerstvých sýrů, 9 čerstvých sýrů s kořením a 8 tvarohů. Z toho mělo 10 čerstvých sýrů (vzorky 3, 12, 27, 36, 38, 40, 49, 53, 54 a 55), 4 čerstvé sýry s kořením (vzorky 58, 59, 64, 65) a 1 tvaroh (vzorek 3) extrahovaných pasterovaným mlékem hodnotu aktivní ALP vyšší než 1 mU/g. Získané koncentrace enzymu se pohybovaly v rozsahu od 1,007 (vzorek 27) do 5,69 mU/g (vzorek 40). Mimořádně vysoké hladiny aktivní ALP pak byly zjištěny u vzorku 36 (61 mU/g), 38 (18 mU/g) a 53 (50 mU/g). Lze tedy říci, že analýza českých čerstvých sýrů a tvarohů potvrdila výsledky prezentované k tomuto typu matrice na 11. workshopu Evropské referenční laboratoře pro mléko a mléčné výrobky ve Vídni (2008). Nadměrně vysoké hodnoty enzymu by mohly být pravděpodobně zapříčiněny mikrobiálním znečištěním nebo reaktivací ALP u příslušných produktů, například z důvodu nesprávného skladování zboží (Desbourdes et al., 2008).

Desbourdes a kol.(2008) sledovaly zbytkovou aktivitu enzymu také v plísňových sýrech z pasterovaného mléka (22 výrobků typu Brie, 39 typu Camembert a 18 typu

Coulommiers). Tyto vzorky byly opět extrahovány pasterovaným mlékem. Druhou skupinu tvořily plísňové sýry z mléka připraveného mikrofiltrací a termizací (10 vzorků). Pro ně autoři použili komerční extrakční pufr. V produktech z pasterovaného mléka byl získán rozsah hodnot koncentrace aktivní ALP od < 2 do 6 mU/g pro sýry typu Brie, od 2 do 5 mU/g pro sýry typu Camembert a od 1 do 5 mU/g pro sýry typu Coulommiers. Ve vzorcích připravených z mikrofiltrované a termizované suroviny se aktivita enzymu pohybovala v rozmezí od 83 do 1542 mU/g. V této diplomové práci bylo analyzováno celkem 7 plísňových sýrů z pasterovaného mléka. 4 z nich (75, 76, 77 a 79) odpovídaly specifikaci jmenovaných francouzských sýrů. Při extrakci pasterovaným mlékem byla v těchto 4 srovnatelných vzorcích stanovena hladina aktivního enzymu v rozsahu od < 1 (výrobky 75 a 79) do 5,79 mU/g (vzorek 76), což je v souladu s výsledky Desbourdese a kol.(2008). Zbylé produkty v této skupině (vzorky 74, 78 a 80) byly sýry s plísní uvnitř hmoty, které vykazovaly při použití obou typů činidel velmi vysoké hodnoty. Výjimkou byl pouze vzorek 80 (7,61 mU/g po extrakci puftrem). Statisticky byly plísňové sýry oběma metodami vyhodnoceny jako neprůkazné ($\alpha < 0,05$). To odpovídá specifikaci EN ISO 11816-2 (2010) i ČSN EN ISO 11816-2(2003), kde je v předmětu norem uvedeno, že metoda není vhodná pro sýry s modrou plísní uvnitř těsta. Důvodem je kontaminace vzorků mikrobiální ALP a díky tomu nebezpečí nesprávné interpretace výsledků. Tuto skutečnost zohlednili ve své studii i Cassidy a kol.(2014), když zpracovávali pro Evropskou národní laboratoř v Paříži vzorky vyrobené ve Velké Británii. Do projektu byly vybrány tvrdé, polotvrdé a měkké sýry a vyjmuty byly právě výrobky s plísní uvnitř i na povrchu (Cassidy et al., 2014; Desbourdes et al., 2008; EN ISO 11816-2, 2010; ČSN EN ISO 11816-2, 2003).

Z výzkumu Nicolasové (2008), která srovnala výsledky původní a upravené metodiky normy EN ISO 11816-2 (2003) u 8 vzorků sýrů ementálského typu, vyplynulo zjištění, že 3 produkty extrahované puftrem a 2 extrahované pasterovaným mlékem měly hodnotu vyšší než 1 mU/g. Z 25 výrobků analyzovaných v této diplomové práci, jež patřily do skupiny tvrdých a polotvrdých sýrů, byla aktivita enzymu vyšší než 1 mU/g pozorována u 2 produktů extrahovaných pasterovaným mlékem (vzorky 95 a 96) a dokonce 5 produktů extrahovaných komerčním puftrem (vzorky 95, 96, 102, 107 a 110), přičemž rozdíl mezi původní a upravenou metodikou byl statisticky průkazný ($p > 0,05$) (ČSN EN ISO 11816-2, 2003; EN ISO 11816-2, 2010; Nicolas, 2008).

Vzhledem k tomu, že do roku 2008 nebyl navržen žádný limit pro množství zbytkové aktivní ALP v sýrech, na 12. workshopu Evropské referenční laboratoře pro mléko a mléčné

výrobky v Paříži (2009) byli Evropskou referenční laboratoří vyzváni národní laboratoře tradičních výrobců sýrů, jako je Francie, Švýcarsko a Itálie, k účasti na studii o zbytkových hladinách tohoto enzymu v produktech z pasterovaného mléka. Cílem tohoto projektu byla příprava na nastavení jeho limitní hodnoty v této potravinářské matrici. Předběžně navrhovaná koncentrace byla 10 mU/g. Zároveň bylo dohodnuto, že pro stanovení bude používána výhradně upravená metodika využívající komerční extrakční pufr (2009 Programme of Work of the Community Reference Laboratory for Milk & Milk Products, 2009).

Egger a kol. (2016) shromáždily a vyhodnotily výsledky průběžných analýz vzorků z národních laboratoří, jež byly osloveny na 12. workshopu Evropské referenční laboratoře pro mléko a mléčné výrobky v Paříži (2009) a na výzvu zareagovaly. Aktivita zbytkové ALP byla stanovena celkem u 700 výrobků zahrnujících 32 různých druhů sýrů, které lze zařadit do kategorií měkkých, polotvrdých a tvrdých. Koncentrace aktivního enzymu v žádném produktu nepřesáhla hranici 10 mU/g, jež byla Evropskou národní laboratoří pro mléko a mléčné výrobky navržena jako limitní pro tuto potravinářskou matrici. Průměrně nejvyšší hodnoty ze všech (5 mU/g) byly zaznamenány v případě italských polotvrdých sýrů Taleggio a Quartirolo Lombardo. Taleggio je sýr zrající v solné lázni a podle specifikace EN ISO 11816-2(2003) není metoda pro tuto skupinu výrobků vhodná. Diskutovaný typ matrice byl zahrnut i do této diplomové práce. Celkem bylo zanalyzováno 7 sýrů ve slaném nálevu. Pouze u 2 z nich (vzorky 71 a 73) byla pozorována aktivita ALP vyšší než 1 mU/g, navíc tyto hodnoty byly detekovány pouze při extrakci pufrem (1,65 mU/g pro vzorek 71 a 1,40 mU/g pro vzorek 73). Získané výsledky byly statisticky průkazné ($p > 0,05$) a v souladu s Eggerovou a kol. (2015). Neboť také splňovaly navržený limit 10 mU/g, lze říci, že původní i modifikovaná metoda je vhodná pro stanovení zbytkové aktivity enzymu u sýrů zrajících v solném nálevu (ČSN EN ISO 11816-2, 2003; Egger et al., 2016; EN ISO 11816-2, 2003; ISO 11816-1/IDF 155-1, 2013; ISO 11816-2/IDF 155-2, 2010).

Dalšími spornými typy výrobků, pro něž není metoda pokládána za vhodnou, jsou sýry s přidavkem koření a bylin a sýry zrající pod mazem. První jmenovaná skupina nebyla do projektu Evropské referenční laboratoře pro mléko a mléčné výrobky zahrnuta. V této diplomové práci bylo analyzováno celkem 9 čerstvých sýrů s kořením, přičemž aktivita ALP vyšší než 1 mU/g byla zjištěna u 4 výrobků extrahovaných pasterovaným mlékem (vzorky 58, 59, 64 a 65) a 5 extrahovaných komerčním pufrem (vzorky 58, 59, 63, 64 a 65). Nalezené koncentrace se pohybovaly v rozmezí 1,36 až 4,06 mU/g pro původní metodiku a 1,35 až

12,46 mU/g pro upravenou metodiku. Hodnota 12,46 mU/g, která přesáhla navrhovaný limit 10 mU/g, byla naměřena u produktu 58. Vzhledem k tomu, že výsledky byly statisticky průkazné ($p > 0,05$), nelze nevhodnost metody pro sýry s přidavkem bylin a koření vyvrátit (ČSN EN ISO 11816-2, 2003; Egger et al., 2016; EN ISO 11816-2, 2003; ISO 11816-1/IDF 155-1, 2013; ISO 11816-2/IDF 155-2, 2010).

Druhou spornou skupinou jsou sýry zrající pod mazem. Na 18. workshopu Evropské referenční laboratoře pro mléko a mléčné výrobky v Paříži (2015) byly prezentovány výsledky experimentální studie, které se zúčastnilo 15 národních referenčních laboratoří, mezi nimi i Národní referenční laboratoř pro mléko a mléčné výrobky České Republiky v Praze. Celkem bylo zanalyzováno 571 vzorků sýrů, z toho 116 původem z České Republiky. 110 z nich bylo předmětem této diplomové práce. Stanovení zahrnovalo též celkem 113 sýrů zrajících pod mazem. 37 z nich prokázalo aktivitu enzymu vysoce přesahující navržený limit 10 mU/g. Hodnoty se pohybovaly ve stovkách až tisících jednotek. V této diplomové práci bylo analyzováno 5 výrobků spadajících do příslušné kategorie. 2 z nich (vzorky 81 a 83) vyšly původní i upravenou metodikou také velmi vysoko nad navrhovaným limitem (aktivita ALP u vzorku 81 dokonce vyšla po extrakci pufrem 1589,4 mU/g). Výsledky však byly statisticky neprůkazné ($p < 0,05$). Referenční laboratoře, ve kterých byly vysoké hodnoty aktivity enzymu naměřeny, byly vyzvány k opakování analýz s jinou šarží produktů. Všechny své výsledky potvrdily. Proto byla vedena diskuse, zda z normy vyjmout celou skupinu sýrů zrajících pod mazem, nebo jen konkrétní druhy, u nichž byla stanovena koncentrace zbytkové ALP vyšší, než navržený limit 10 mU/g. Rozhodnutí bylo předáno organizaci DG Santé, která byla pověřena schvalováním jak nové modifikace normy, tak daného limitu na aktivitu zbytkového enzymu v sýrech vyrobených z pasterovaného mléka (Ghezzal et al., 2015).

7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo v teoretické části zpracování literární rešerše shrnující současné poznatky o hodnocení a interpretaci aktivity ALP jako indikátoru tepelného ošetření mléčné suroviny pro výrobu mléčných produktů. V praktické části pak bylo na vybraných vzorcích sýrů dostupných v tržní síti České Republiky provedeno porovnání 2 metod pro stanovení aktivity ALP, stanovení dle norem ČSN EN ISO 11816-2 (2003) a ISO 11816-2/IDF 155-2 (2010) v platném znění. Hypotézou bylo, že v současnosti platná metoda pro stanovení enzymu jakožto průkazu tepelného ošetření mléčné suroviny pro výrobu sýrů v

České Republice, ČSN EN ISO 11816-2 (2003), je s výhodou nahraditelná za ISO 11816-2/IDF 155-2 (2010) v platném znění.

V praktické části byla původní (dle ČSN EN ISO 11816-2, 2003) metodika, využívající jako extrakční činidlo pasterované mléko, a nový postup, v němž je toto médium nahrazeno komerčním pufrem (ISO 11816-2/IDF 155-2, 2010), porovnána na celkem 110 produktech pocházejících z faremního i průmyslového zpracování, které jsou běžně k dostání v obchodní síti České Republiky (v obchodních řetězcích, na farmářských trzích nebo ve faremních prodejnách). Výrobky byly rozděleny do 7 kategorií, na tvarohy (8 vzorků), čerstvé sýry (49 vzorků), čerstvé sýry s kořením (9 vzorků), sýry ve slaném nálevu (7 vzorků), sýry plísňové (7 vzorků), sýry zrající pod mazem (5 vzorků) a sýry polotvrdé a tvrdé (25 vzorků).

Výsledky měření zbytkové aktivity ALP oběma metodikami korespondovaly s výstupy Evropské referenční laboratoře pro mléko a mléčné výrobky. Všechny získané hodnoty nebyly ale statisticky průkazné na zvolené hladině pravděpodobnosti ($P(\alpha) = 0,05$). Příčinou byl vysoký počet sýrů, jejichž zbytková aktivita enzymu se nacházela pod mezí detekce metody (< 1 mU/g). Avšak výsledky analýz, jejichž hodnota byla vyšší než mez detekce, korespondovaly se základním předpokladem pracovníků Evropské referenční laboratoře pro mléko a mléčné výrobky. Na základě získaných dat lze říci, že komerční pufr zlepšuje extrahovatelnost ALP z matrice sýru, je tedy vhodnějším činidlem a zvyšuje citlivost metody ($p > 0,05$). Dále bylo potvrzeno, že obě metodiky (ČSN EN ISO 11816-2, 2003; ISO 11816-2/IDF 155-2, 2010) nejsou vhodné pro plísňové sýry (zejména s plísní v těstě), pravděpodobně kvůli obsahu aktivního enzymu mikrobiálního původu pocházejícího z použitých sýrařských kultur. Metoda nebude nejspíše ze stejného důvodu doporučena ani pro sýry zrající pod mazem. Na základě získaných výsledků nelze ani vyvrátit její nevhodnost pro sýry s přídavkem koření a bylin. Naopak bylo prokázáno, že obě metodiky lze s výhodou použít pro stanovení zbytkové koncentrace aktivní ALP v případě bílých sýrů. Diplomová práce dále koresponduje s adekvátností navrženého limitu pro množství zbytkového enzymu v produktech vyrobených z pasterovaného mléka (10 mU/g), jež je v současnosti ve schvalovacím řízení.

Závěrem lze tedy říci, že hypotéza diplomové práce byla potvrzena a v současnosti platná metoda pro stanovení ALP jakožto průkazu tepelného ošetření mléčné suroviny pro výrobu sýrů v České Republice, ČSN EN ISO 11816-2 (2003), je s výhodou nahraditelná za ISO 11816-2/IDF 155-2 (2010) v platném znění.

8 Seznam literatury

2009 Programme of Work of the Community Reference Laboratory for Milk and Milk Products

EU CRL for milk and milk product, 2009, Paris

Abedini, F.; Foroutan, T.; Jahangiri, L. - Alkaline phosphatase and CD34 reaction of deciduous teeth pulp stem cells.

Pakistan Journal Biological Sciences, vol 10, 2007, pages 3146-3149

Albillos, S. M., Reddy, R., Salte, r R. – Evaluation of alkaline phosphatase detection in diary products using a modified radid chemiluminescent method and official methods

Journal of Food Protection , vol. 7, 2011, pages 1048 – 1211, 1144 – 1154

Anjos, F.D., Machado, A., Ferro, C., Otto, F., Bogin, E. - γ -glutamyltransferase as a marker for the pasteurisation of raw milk.

Journal. Food Protect, vol 61, 1998, pages 1057–1059

Babaei, H., Mansouri, N., Molaei, M.M., Kheradmand, A., Sharifan, M. - Assessment of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase activities in cow's milk as an indicator of subclinical mastitis.

Veterinary Research Communication., vol 31, 2007, pages 419–425

Bruckmaier, R. M. - Normal and disturbed milk ejection in dairy cows.

Domestic Animal Endocrinology, vol 29, 2005, pages 268-2

Bylund, G. 1995. Dairyprocessing handbook. TetraPackProcessing Systems AB. Lund, Sweden, 1995, ISBN: 9163134276, 436 pages

Cassidy, S., Daly, C., Early, J., Rowe, M.T.-Alkaline phosphatase activity in United Kingdom cheese made from bovine pasteurised milk

International Journal of Dairy Technology, vol 67 (2), 2014, pages 297 – 299

Claeys, W.L., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E.- Kinetics of alkaline phosphatase and lactoperoxidase inactivation and of β -lactoglobulin

denaturation in milk with different fat content. Journal of Dairy Research, vol 69,2002, pages 541–553.

Cosentino, S., Mulargin, A.F., Pisano, B., Tuveri, P., Palmas, F. - Incidence and biochemical characteristics of Bacillus flora in Sardinian dairy products.

International. Journal of. Food Microbiology. vol 38, 1997, pages 235 - 238.

ČSN 56 9609 -. Pravidla správné hygienické a výrobní praxe - Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace, Praha, 2008, Český normalizační institut, 40 stran

ČSN 570530 - Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků, Praha, 1974,

Vydavatelství Úřadu pro normalizaci a měření, 108 stran

ČSN EN ISO 11816-2: Mléko a mléčné výrobky – Stanovení aktivity alkalické fosfatázy –

Část 2: Fluorometrická metoda pro sýry, Praha, 2003, Český normalizační institut, 16 stran

ČSN ISO 3356 (570551) – Mléko – Stanovení alkalické fosfatázy, Praha, 2011, Český

normalizační institut, 12 stran

D'Aoust, J.Y., Park, C.E., Szabo, R.A., Todd, E.C.D., Emmons, D.B., McKellar, R.- Thermal inactivation of Campylobacter species, Yersinia enterocolitica, and hemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in fluid milk.

Journal Dairy Science, vol 71, 1988, pages 3230–3236

Dinnella, C., Monteleone, E., Farenga, M.F., Hourigan, J.M. - The use of enzymes for thermal process monitoring: modification of milk alkaline phosphatase heat resistance by means of an immobilization technique.

Food Control, vol 15, 2004, pages 427–433

Dumitrașcu, L., Stănciuc, N., Stanciu, S., Râpeanu, G. – Inactivation kinetics of alkaline phosphatase from different species of milk using quinolyl phosphase as a substrate, Food Science and. Biotechnology, vol. 23 (6), 2014, page 1773-1778

Desbourdes, C., Nicolas, M. - Phosphatase activity in cheese
11th Workshop of the EU CRL for Milk and Milk Products ,2008, Vienna

Egger, L., Nicolas, M., Pellegrino, L. – Alkaline phosphatase activity in cheese as a tracer for cheese milk pasteurization
Lebensmittel Wissenschaft und Technologie – Food Science and technology Journal, , vol 65, 2016, pages 963 - 968

EN ISO 11816-2:2003 - Milk and milk products — Determination of alkaline phosphatase activity — Part 2: Fluorometric method for cheese
International Dairy Federation INPA,2006, Brussel, 8 pages

Fadiloğlu, S., Erkmen, O., Şekeroğlu, G.S. (2006) Thermal inactivation kinetics of alkaline phosphatase in buffer and milk.
Journal of Food Processing and Preservation, vol 30, 2006, pages 258–268

Fangdong, F., Jidong, Z., Xiuhui Z., - Research status quo of dairy cow mastitis
Journal of animal medical progress, vol 24 (4), 2003, pages 44-45.

Farkye, N.Y., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. - Other enzymes. In: Proteins I.
Advanced Dairy Chemistry. Elsevier Applied Science, 2003, London, pages 571–603.

Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. - Dairy chemistry and biochemistry
1998 London, UK: Chapman and Hall. pages146-239

Gajdůšek, S.: Vliv mastitidního onemocnění na mléčnou produkci, složení, kvalitu a technologické vlastnosti mléka.

In: Sborník ze semináře “Kontrola mastitid při produkci mléka.”, VÚCHS Rapotín, 1996, str. 25-27.

Ghezzal, H. Boitelle, A. - C., Desbourges, C., Nicolas, M. – Fixation of alkaline phosphatase limit in pasteurized cow milk cheeses – EU survey

18th Workshop of the EU CRL for Milk and Milk Products ,2015, Paris

Griffiths, M.W.- Use of milk enzymes as indices of heat treatment.

Journal Food Protect, vol 49, 1986, pages 696–705

Guha, A., Gera, A., Sharma, A. – Evaluation of milk trace elements, lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase activity of subclinical mastitis as and

indicator of subclinical mastitis in riverine buffalo (Bubalus bubalis)

Asian – Australasian Journal of Animal Sciences, vol. 25 (3), 2012, pages 353 - 360

Hameed, A. (2010). Effect of oxytocin on milk composition of sahiwal cow at different lactation (PhD thesis).

Pakistan: National Institute of Food Science And Technology (NIFSAT), University of Agriculture Faisalabad.

Hameed, A., Hussain, R., Zahoor, T., Akhtar, S., Riaz, M., Ismail, T. – Effect of oxytocin on enzyme activities in bovine milk

International Dairy Journal, vol. 39, 2014, page 229-231

Harding, F., Garry, E. - Collaborative evaluation of a fluorometric method for measuring alkaline phosphatase activity in cow's, sheep's, and goat's milk.

Journal Food Protect, vol 68, 2005, pages 1047–1053.

Havlová, J., Jičínská, E., Hrabová, H. - Mikrobiologické metody v kontrole jakosti mléka a mlékárenských výrobků.

Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha, 1993, ISBN 80-85 120-37-2, str. 50 -59, 110 - 113

ISO 11816-1/IDF 155-1:2006 - Milk and milk products -- Determination of alkaline phosphatase activity -- Part 1: Fluorimetric method for milk and milk-based drink
International Organization for Standardization, 2006, Geneva

ISO 11816-1/IDF 155-1: 2013 – Milk and milk products – Determination of alkaline phosphatase aktivity – Part 1: Fluorimetric method for milk and milk drinks
International Dairy Federation INPA, 2013, Brussel, 13 pages.

ISO 11816-2/IDF 155-2,2010 - Milk and milk products – Determination of alkaline phosphatase aktivity – Part 2: Part 1: Fluorimetric method for milk and milk-based drinks.
2010. 2nd ed., International Organization for Standardization. Geneva. 13 pages.

Janštová, B., Vorlová, L., Navrátilová, P., Králová, M., Necidová, L., Mařicová, E.
Technologie mléka a mléčných výrobků, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012, ISBN 978-80-7305-637-7, 141 stran

Kadlec, I.- Záněty mléčné žlázy. In: Kadlec, I. a kol.: Nejčastější příčiny snížené jakosti mléka. Záněty mléčné žlázy. Čištění a dezinfekce v prvovýrobě mléka.
ÚVO Pardubice, 1994, str.. 7-26.

Kelly, A. L., Fox, P. F. - Indigenous enzymes in milk: a synopsis of future research requirements.
International Dairy Journal, vol 16, 2006, pages 707 - 715.

Kleyn, D.H.; Goodman, S.T. - Rapid determination of alkaline phosphatase activity in cheese.
Journal - Association Official Analytical Chemists, Vol 60, 1977, pages 1397-1399,

Knight, A. H., Fryer, S. M. - The development of heatresistant phosphatase activity in raw milk.

Journal of the Society of Dairy Technology, vol 42, 1989, pages 81–86.

Korhonen, H. - A new method for preserving raw milk - The lactoperoxidase antibacterial systém

World Animal. Review journal, vol 35, 1980, pages 23–29.

Kvasnicová, V. – Alkalická fosfatáza

2006, dostupné na : <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/D/KVAAP.htm>

Lorenzen, P.Ch., Martin, D., Clavin – Rã ddecker, I., Barth, K., Knappstein, K.-Activities of alkaline phosphatase, γ - glutamyltransferase and lactoperoxidase in cow, sheep and goat milk in relation to heat treatment

Small Ruminant Research, vol 89, 2010, page 18 – 23

Lyster, R. L. J., Aschaffenburg, R. - The reactivation of milk alkaline phosphatase after heat treatment.

Journal of Dairy Research, vol 29, 1962, pages 21–35.

Marks, N.E., Grandison, A.S., Lewis, M.J., 2001. Challenge testing of the lactoperoxidase system in pasteurised milk.

Journal of Applied. Microbiology., vol 91, 2001, pages 735–741

Marth, E. H., Steel, J. L.- Applied dairy microbiology

2001, Marcel Dekker, New York, 744 pages

Martin, D., Linxweiler, W., Tanzer, D., Vormbrock, R., Olt, R., Kiesner, C., Meisel, H.

Use of Reflectoquant® rapid tests for determination of thermal inactivation of the indigenous milk enzymes lipase, alkaline phosphatase and lactoperoxidase

Deutsche Lebensmittel. Rundschau, vol 101, 2005, pages 281–286.

McKellar, R.C., Emmons, D.B., Farber, J.- γ -glutamyl transpeptidase in milk and butter as indicator of heat treatment.

International Dairy Journal., vol 1, 1991, pages 241–251.

Murthy, G.K., Cox, S.- Evaluation of alkaline phosphatase and AOAC methods for phosphatase in cheese.

Journal of the Association of Official Analytical Chemists, vol 71, 1988, pages 1195-1199

Nariadení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 Regulation (EC) No 853/2004 of The European Parliament and of The Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin

Úřední věstník Evropské unie ze dne 30. 4. 2004, č. L 139, str. 55

Nariadení Komise (ES) č. 1662/2006 - Commission Regulation, 2006. (EC) No. 1664/2006. Official Journal of the European Union, 2006, L 320/13.

Nicolas, M. – Emmental from rasteurized milk

11th Workshop of the EU CRL for Milk and Milk Products ,2008, Vienna

Nomura, M., Kobayashi, M., Narita, T., Kimoto-Nira, H. & Okamoto, T. - Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants.

Journal of Applied Microbiology, vol 101, 2006, pages 396-405.

Otto, J., 1902 Ottův slovník naučný: Illustrovaná encyklopædie obecných vědomostí,

Svazek 19

Ottův slovník naučný: Illustrovaná encyklopædie obecných vědomostí, Ottův slovník naučný:

Illustrovaná encyklopædie obecných vědomost, 1902, dostupné na

<http://www.pdfknihy.maxzone.eu/otto.html>

Payne, C., Wilbey, R.A. – Alkaline phosphatase activity in pasteurised milk: A quantitative comparison of Fluophos and colourimetric procedures

International Journal of Dairy Technology, vol. 62, 2009, pages 308 – 314

- Ramplig, A. M., Greenwoodb, M. H., Gareth, E. N. - Use of a fluorimetric test for bovine alkaline phosphatase to demonstrate under-pasteurisation of skimmed milk and cream
International Dairy Journal, vol 14, 2004, pages 691–695
- Rankin, S.A., Christiansen, A., Lee, W., Banavara, D.S., Lopez – Hernandez, A. – The application of alkaline phosphatase assai for the validation of milk product pasteurization
Journal of Diary Science, vol. 93, 2010, pages 5538 – 5551
- Robinson, R.K. - Dairy microbiology handbook. The microbiology of milk and milk products.
John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, USA, 2002, ISBN 9780471385967, pages 44 - 49
- Rola, J.G., Sosnowski, M. – Alkaline phosphatase in cow and non-cow milk and cheese. Determination of enzyme activity as an indicator for the completeness of the pasteurisation process
Agro Food Industry Hi-Tech, vol. 23, 2012, page 18-20
- Seifu, E., Buys, E.M., Donkin, E.F. - Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review
Trends in Food Science and Technology., vol 16, 2005, pages 137–154.
- Shakeel-Ur-Rehman, Fleming, C.M., Farkye, N.Y., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H
Indigenous phosphatases in milk. In: Proteins, I.,
Advanced Dairy Chemistry. Elsevier Applied Science, London, 2003, pages. 523–543
- Schlimme, E., Kiesner, C., Lorenzen, P.Ch., Martin, D., 1998. Influence of heat treatment of milk on the activities of the indigenous milk enzymes alkaline phosphatase and adenosine deaminase.
FIL-IDF Bulletin., vol 332, 1998, pages 25–31.

Soares, C. F., Fonseca, L. M., Leite, M. O., Oliveira, M. C. P. P. – Application of Scharer's quantitative method for the determination of residual alkaline phosphatase activity in standard Minas cheese

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia vol. 65, 2013, pages 1223-12230

Stepaniak, L. - Psychrotrophic bacteria. Bacteria other than

Pseudomonas spp. In book Roginski, H., Fuquay, J. W., Fox, P. F. (Eds.):

Encyclopedia of dairy science, Academic Press, London, 2003, U.K. ISBN 0-12-227235-8, pages 2344-2351

Šulc, J., Suchomel, J. – Lactognost - nová reagentie na průkaz šetrné pasterace mléka.

Průmysl Potravin, vol. 11 (4), 1960, str. 192-93

Walstra, P., Wouters, J. T. M., Geurts, T. J.- Dairy Science and Technology. 2nd ed. 1st part.

New York: Taylor & Francis Group, 2006. ISBN 0-8247-2763-0. Chapter 1, Milk: Main Characteristics, pages. 3-16.

Vamvakaki, A.-N., Zoidou, E., Moatsou, G., Bokari, M., Anifantakis, E.

Residual alkaline phosphatase activity after heat treatment of ovine and caprine milk.

Small Ruminant Research, vol 65, 2006, pages 237–241.

Wernery, U., Fischbach, St., Johnson, B., Jose, Sh.- Evaluation of alkaline phosphatase,

γ -glutamyl transferase and lactoperoxidase activities for their suitability as markers of camel milk heat inactivation.

Milchwissenschaft, vol 63, 2008, pages 265–267

Yang Mei, Xiqing Yue¹, Xin Xu, Yongxia Wang, Junrui Wu¹, Ri-na Wu

Comparison of Milk Enzyme Activity in Different Lactation Periods.

2014 International Conference on Agricultural and Biosystem Engineering, IERI Procedia, vol 8, 2014, pages 46 – 51

Zehetner, G., Bareuther, C., Henle, T., Klostermeyer, H., 1995. Inactivation kinetics of γ -glutamyltransferase during the heating of milk. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, vol 201, 1995, pages 336–338.

Zottola, E., Smith, B. 1993. Growth and survival of undesirable bacteria in cheese. In: *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology* (Fox, P.F. ed.) 2 Ed. London Press, 1993, pages 471 - 523.

9 Seznam zkratek

ANOVA – analysis of variance, analýza rozptylu, statistická metoda

EC – Enzyme Commission – nomenklatura enzymů

EPAS – enzymatic photoactive substráte – enzymatický fotoaktivní substrát

FLU – fluorescenční jednotka

mM – milimol

mU/l – milijednotky aktivity enzymu na litr

PE – pasterační efekt

POD –1 – peroxidáza – činidlo na stanovení laktoperoxidázy

UHT – ultra high temperature – ultra vysoký záhřev

U/l – jednotky aktivity enzymu na litr

10 Seznam tabulek

Tabulka 1: Specifikace použitých vzorků ve skupině tvarohů

Tabulka 2a: Specifikace použitých vzorků ve skupině čerstvých sýrů

Tabulka 2b: Specifikace použitých vzorků ve skupině čerstvých sýrů

Tabulka 3: Specifikace použitých vzorků ve skupině čerstvých sýrů s kořením

Tabulka 4: Specifikace použitých vzorků ve skupině sýry solené nebo ve slaném nálevu

Tabulka 5: Specifikace použitých vzorků ve skupině sýry s plísní

Tabulka 6: Specifikace použitých vzorků ve skupině sýrů zrajících pod mazem

Tabulka 7: Specifikace použitých vzorků ve skupině sýrů polotvrdých a tvrdých

Tabulka 8: Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u tvarohů

Tabulka 9: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u tvarohů pomocí ANOVY.

Tabulka 10 :Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u tvarohů pomocí Studentova t-testu pro párové hodnoty

Tabulka 11a: Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u čerstvých sýrů

Tabulka 11b: Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u čerstvých sýrů

Tabulka 12: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u čerstvých sýrů pomocí ANOVY

Tabulka 13 Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u čerstvých sýrů pomocí Studentova t-testu pro párové hodnoty

Tabulka 14: Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u čerstvých sýrů s kořením.

Tabulka 15: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u čerstvých sýrů s kořením pomocí ANOVY

Tabulka 16: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u čerstvých sýrů s kořením pomocí Studentova t- testu pro párové hodnoty

Tabulka 17: Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u sýrů solených a ve slaném nálevu

Tabulka 18: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u sýrů solených a ve slaném nálevu pomocí ANOVY

Tabulka 19: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u sýrů solených a ve slaném nálevu pomocí Studentova t-testu pro párové hodnoty

Tabulka 20: Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u plísňových sýrů s plísní uvnitř i na povrchu

Tabulka 21: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u plísňových sýrů s plísní uvnitř i na povrchu pomocí ANOVY

Tabulka 22: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u plísňových sýrů s plísní uvnitř i na povrchu pomocí Studentova t-testu pro párové hodnoty

Tabulka 23: Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u sýrů zrajících pod mazem

Tabulka 24: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u sýrů zrajících pod mazem pomocí ANOVY

Tabulka 25: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u sýrů zrajících pod mazem pomocí Studentova t-testu pro párové hodnoty

Tabulka 26: Porovnání metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u sýrů polotvrdých a tvrdých

Tabulka 27: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u sýrů polotvrdých a tvrdých pomocí ANOVY

Tabulka 28: Statistické hodnocení porovnatelnosti metod ČSN EN ISO 11816-2 a ISO 11816-2/IDF 155-2 pro stanovení aktivity alkalické fosfatázy u sýrů polotvrdých a tvrdých pomocí Studentova t-testu pro párové hodnoty