Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů

Stanovení laktózy v mléce a mléčných výrobcích

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Dr. Ing. Lenka Kouřimská

Konzultant práce: Blanka Dvořáková

Autor práce: Iva Navrátilová

2009

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Stanovení laktózy v mléce a mléčných výrobcích vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne : ……

Podpis autora

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat Dr. Ing. Lence Kouřimské za cenné rady a připomínky při zpracování bakalářské práce a Blance Dvořákové za odborné vedení a pomoc při laboratorních analýzách.

Zároveň bych chtěla poděkovat rodičům, kteří mi umožnili studovat a po celou dobu studia mě velmi podporovali.

Autorský referát

Laktóza se v přírodě vyskytuje pouze v mléce savců a její obsah závisí na živočišném druhu. Z nutričního hlediska je, stejně jako většina ostatních sacharidů, především zdrojem energie pro základní metabolické pochody organismů a dále stimuluje intestinální absorpci vápníku.

V experimentální části bakalářské práce byl sledován průměrný obsah laktózy a kyselost ve fermentovaném mléce pomocí různých analytických metod.

Analýzy se prováděly na plnotučném trvanlivém mléce značky Madeta, které bylo nejdříve fermentováno sušenou jogurtovou kulturou Laktoflora^{R} (Milcom a.s.) podle návodu uvedeným výrobcem. Následně bylo fermentované mléko kultivováno 0, 1, 2 a 3 hodiny v termostatu při teplotě 42 °C.

Stanovení byla prováděna 5 analytickými metodami. Měřily se aktivní kyselost pH metrem, titrační kyselost podle Soxhlet–Henkela, mléčný cukr titrační metodou podle Luff–Schoorla, stanovení laktózy pomocí infračervené spektroskopie na přístroji MilkoScan a metodou HPLC. Nejvyšší aktivní kyselost byla naměřena při fermentaci mléka 0 h, naopak titrační kyselost podle Soxhlet–Henkela byla nejvyšší při fermentaci mléka 3 h. Podle Luff–Schoorla se obsah bezvodé laktózy a mohonydrátu laktózy snižoval se zvyšujícím se počtem hodin fermentace. Pomocí infračervené spektroskopie na přístroji MilkoScan a kapalinové chromatografie bylo zjištěno, že se zvyšujícím se počtem hodin fermentace obsah laktózy ve fermentovaném mléce klesá, ale naopak se zvyšuje obsah glukózy a galaktózy ve vzorku mléka.

Klíčová slova: mléko, laktóza, kyselost, fermentace

Authors report

In nature, lactose can be found only in the milk of mammals and its content depends on the species. From a nutritional point of view lactose is, as well as most other carbohydrates, the main source of energy for basic metabolic processes of organisms and it also stimulates the intestinal absorption of calcium.

In the experimental part of the bachelor thesis, an average laktose content and acidity of fermented milk, using different analytical methods, was monitored.

The analyses were performed on full-cream durable milk of brand name Madeta, which was first fermented by dried yoghurt culture Laktoflora^{R} (Milcom a.s.), according to the instructions given by the producer. Subsequently, the fermented milk was cultivated 0, 1, 2 and 3 hours in the thermostat at 42° C.

The determinations were done using 5 analytical methods. The aktive acidity was measured by pH meter, the titratable acidity according to Soxhlet-Henkel, the milk sugar by Luff-Schoorl titration method, the determination of lactose by using infrared spectroscopy instrument MilkoScan and by HPLC method. The highest active acidity was measured in the fermentation of milk for 0 h, while titratable acidity according to Soxhlet-Henkel was the highest in the fermentation of milk for 3 h. According to Luff-Schoorl, the content of anhydrous lactose and lactose monohydrate was decreasing with increasing numer of hours of fermentation. Using infrared spectroscopy instrument MilkoScan and liquid chromatography, it was found that the laktose content in the fermented milk is decreasing with increasing number of hours of fermentation, whereas the content of glucose and galactose in a sample of milk is increasing.

Keywords: milk, lactose, acidity, fermentation

Obsah

1 ÚVOD....8

2 CÍL PRÁCE....9

3 LITERÁRNÍ REŠERŠE....10

3.1 Složení mléka....10
3.1.1 Hlavní složky....10
3.1.1.1 Voda....10
3.1.1.2 Laktóza....11
3.1.1.3 Mléčný tuk....11
3.1.1.4 Bílkoviny....11
3.1.2 Vedlejší složky....12
3.1.2.1 Minerální látky....12
3.1.2.2 Vitamíny....13
3.1.2.3 Enzymy....13

3.2 Laktóza....13
3.2.1 Vlastnosti....14
3.3.2 Glukóza....15
3.3.3 Galaktóza....15
3.3.4 Laktulosa....16
3.3.5 Laktáza....16
3.3.6 Laktitol....17
3.3.7 Technologie získávání laktózy....17
3.3.8 Vlivy působící na obsah laktózy v mléce....17
3.3.9 Fermentace mléka....19
3.3.9.1 Bakterie mléčného kvašení....20
3.3.9.1.1 Rod Bifidobacterium....20
3.3.9.1.2 Rod Micrococcus....21
3.3.9.1.3 Rod Propionibacterium....21
3.3.10 Problém s trávením laktózy....22
3.3.10.1 Laktózová intolerance....22
3.3.10.2 Alergie na mléko....23

3.4 Metody stanovení laktózy....23
3.4.1 Stanovení laktózy titračně s použitím chloraminu T pro mléko....24
3.4.2 Stanovení laktózy a dalších cukrů vedle sebe v ochucených slazených tekutých mléčných výrobcích....24
3.4.2.1 Metoda podle Luff-Schoorla....24
3.4.2.2 Biochemická metoda stanovení laktózy po enzymovém štěpení....24
3.4.3 Polarometrické stanovení laktózy v mléce....24
3.4.4 Moderní instrumentální metody....25
3.4.4.1 Metoda infračervené spektroskopie....25
3.4.4.2 Metody chromatografické....25

4 METODY....27

4.1 Materiál....27

4.2 Fermentace mléka....27

4.3 Přístroje....27

4.4 Chemikálie....28
4.4.1 Stanovení aktivní kyselosti pH metrem....28
4.4.2 Stanovení titrační kyselosti podle Soxhlet–Henkela....28
4.4.3 Stanovení redukujících cukrů titrační metodou podle Luff–Schoorla....28

4.5 Metody....29
4.5.1 Stanovení aktivní kyselosti pH metrem....29
4.5.2 Stanovení titrační kyselosti podle Soxhlet–Henkela....29
4.5.3 Stanovení redukujících cukrů titrační metodou podle Luff–Schoorla....30
4.5.4 Stanovení laktózy pomocí infračervené spektroskopie na přístroji MilkoScan....30
4.5.5 Stanovení laktózy metodou HPLC....31

5 VÝSLEDKY....32

5.1 Stanovení aktivní kyselosti pH metrem....32

5.2 Stanovení titrační kyselosti podle Soxhlet–Henkela....32

5.3 Stanovení redukujících cukrů titrační metodou podle Luff–Schoorla....34

5.4 Stanovení laktózy pomocí infračervené spektroskopie na přístroji MilkoScan....36

5.5 Stanovení laktózy metodou HPLC....37

6 DISKUZE....43

7 ZÁVĚR....45

8 POUŽITÁ LITERATURA....46

1 Úvod

Mléko je bezesporu jednou z hlavních potravin člověka 20. století, je bohatým zdrojem všech základních složek potravy (bílkoviny, tuky, cukry), minerálních látek a nepostradatelných vitamínů. Mléko obsahuje jednotlivé složky poměrně vyrovnaně, ve vhodných poměrech a v dobře stravitelných formách (Janál, 1974).

Mléko je tekutina, ve které jsou rozpuštěny nebo emulgovány mnohé látky (sušina) a plyny. Obsah vody je průměrně 87,3 %, obsah sušiny 12,7 %. Sušinu tvoří bílkoviny, mléčný tuk, laktóza, minerální látky, vitamíny a další látky (Grieger, 1990).

Laktóza je jednou z hlavních složek mléka (www - 1) a tvoří jeho důležitou součást (www - 2). Z hlediska nutričního je významným zdrojem energie, z hlediska technologického je základem pro výrobu tekutých zakysaných mléčných výrobků, sýrů a másla (www - 2).

Kravské, kozí i ovčí mléko obsahuje ve 100 g průměrně 4,5 až 5,0 g laktózy, mateřské mléko 6,2 až 7,5 g. Laktóza je nejdůležitějším zdrojem energie kojených mláďat. Forma disacharidu umožňuje ve srovnání s monosacharidy při stejném osmotickém tlaku uložit dvojnásobné množství energie. Výhodou je, že laktóza se v trávicím traktu pomalu hydrolyzuje, energie se tak rovnoměrně uvolňuje v období mezi kojením (www - 1).

2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce je v teoretické části zpracování literární rešerše týkající se problematiky obsahu laktózy v mléce, její fermentace, laktózové intolerance a stanovení laktózy v mléce a mléčných výrobcích. V praktické části se nejdříve vzorek mléka fermentuje sušenou jogurtovou kulturou Laktoflora^{R} (Milcom a.s.) a následně se sleduje různými analytickými metodami měnící se obsah laktózy v mléce a kyselost mléka.

3 Literární rešerše

3.1 Složení mléka

Mléko je velmi složitý polydisperzní systém, v němž se jednotlivé složky různě uplatňují a ovlivňují jeho fyzikální vlastnosti a nutriční hodnotu (Teplý a kol., 1979).

Látky obsažené v mléce jsou v různém stupni disperze. Mléčný cukr a minerální soli jsou rozpuštěny v plazmě mléka, bílkoviny jsou ve stavu koloidním a tuk v podobě malých tukových kuliček, rozptýlených v plazmě mléka (Kratochvíl a kol., 1988).

Podle Kadlece (2002) se mléko skládá z původních a cizorodých látek. Mezi cizorodé látky řadíme exogenní a endogenní složky. Původní látky se dále dělí na hlavní a vedlejší složky. Mezi hlavní složky patří voda, laktóza, mléčný tuk a bílkoviny. Do vedlejších složek řadíme minerální látky, kyselinu citrónovou, fosfolipidy, steroly, enzymy, vitamíny, plyny, somatické buňky, atd..

Složení mléka u různých druhů savců je nepatrně rozdílné. V kravském mléce je 40 až 50 g laktózy (Teplý a kol, 1979). Dle Kratochvíla a spol. (1988) se obsah laktózy v kravském mléce pohybuje v rozmezí 4,66 – 4,82 g. K těmto tvrzením se přiklání i Gajdůšek (2003), podle kterého se pohybuje kolem 4,8 %. Obsahy laktózy v mléce různých druhů savců podle Zadražila (2002) jsou uvedeny v tabulce č. 1.

3.1.1 Hlavní složky

3.1.1.1 Voda

Voda je přirozená, nejvíce zastoupená složka mléka (max. 87,25 %). Vyskytuje se ve dvou formách:

a) volná – nejvyšší podíl. Lze ji z mléka odpařit nebo vymrazit.

b) vázaná – 1) koloidní: vázaná na bílkoviny, tvoří ochranný hydratační povrch obalů koloidních částic a zajišťuje tak stabilitu bílkovin v mléce.

2) substituční: obsažená přímo v molekulách laktózy a solí (www - 3).

3.1.1.2 Laktóza

Laktóza je disacharid složený ze dvou hexóz (glukózy a galaktózy). Protože se nikde v přirozené formě galaktóza nevyskytuje, existuje hypotéza o biosyntéze galaktózy v alveolách mléčné žlázy za účasti krevní glukózy a pravděpodobně kyseliny citrónové a následnou kondenzací dvou hexóz vzniká disacharid – laktóza (4–beta–D–galaktopyranozido–beta–D–glukopyranóza) (Zadražil, 2002).

Téměř všechna laktóza je v roztoku v poloacetálové formě, tj. s kyslíkovými můstky mezi prvním a pátým uhlíkem. Asymetrický charakter prvého uhlíku na glukózovém zbytku vytváří dvě modifikace laktózy – alfa a beta. Laktóza otáčí rovinu polarizovaného světla a tudíž existuje ve dvou formách: pravotočivé + a levotočivé – (Zadražil 2002).

3.1.1.3 Mléčný tuk

V syrovém mléce je mléčný tuk obsažen ve formě tukových kapének – mluvíme o disperzi mléčného tuku v mléčné plazmě nebo o emulzi mléčného tuku v odstředěném mléce.

Tukové kapénky mají velikost 0,1 – 12 μm, přičemž kapénky o velikosti kolem 2 až 6 μm tvoří 90 % celkového počtu. V 1 ml mléka jsou asi 3 miliardy tukových kapének.

Tukové kapénky jsou chráněny dvojvrstvou obsahující velké množství fosfolipidů, které zabraňují vzájemnému splynutí tukových kapének:

a) lipofilní (nepolární) vrstva – orientovaná dovnitř tukové kapénky. Obsahuje triacylglyceroly, cholesterol, karoteny a lipofilní vitamíny

b) hydrofilní (polární) vrstva – orientovaná k vodní fázi mléka, nese bílkovinné složky (www - 3).

3.1.1.4 Bílkoviny

Bílkoviny mléka jsou z nutričního hlediska nejvýznamnější složkou mléka, jsou to vysokohodnotné bílkoviny (obsahují nenahraditelné esenciální aminokyseliny) dodávající mléku významnou biologickou hodnotu. Bílkoviny mléka podmiňují rovněž hlavní technologické vlastnosti mléka (kvasnost a sýřitelnost mléka) (Zadražil 2002).

Celkové bílkoviny (hrubé bílkoviny) mléka jsou tvořeny bílkovinami kaseinovými (2,50 – 2,65 %), bílkovinami syrovátkovými (0,75 – 0,85 %) a frakcemi dusíkatými nebílkovinného původu (volné aminokyseliny, kyselina močová, amoniak, vitamíny skupiny B, kreatin, nukleotidy, sulfokyanid, kyselina orotová apod.) v množstvích 0,13 až 0,25 % celkových (hrubých) bílkovin mléka (Zadražil 2002).

Podle Kratochvíla a kol. (1988) se bílkoviny rozdělují podle jejich rozpustnosti při pH 4,6. Kaseinové bílkoviny jsou při uvedeném pH nerozpustné, ovšem syrovátkové jsou při pH 4,6 rozpustné.

3.1.2 Vedlejší složky

3.1.2.1 Minerální látky

Minerální a stopové prvky jsou pro lidský organismus velmi důležité. Ačkoliv jich potřebujeme denně jen velice málo (řádově miligramy či mikrogramy), jsou nepostradatelné, protože ovlivňují důležité biochemické pochody v našem těle (www - 4).

Jako minerální látky považujeme prvky obsažené v popelu po spálení nebo žíhání organických látek mléka. Jejich množství se pohybuje u mléka v rozmezí 0,8 – 1,1 %.

Minerální látky jsou přenášeny do mléka z krve, nejedná se však o pouhý přenos, neboť obsahy jednotlivých prvků se liší (v krevní plazmě je nejvíce sodíku, zatímco v mléce převládají vápník, draslík a kyselina fosforečná).

Podle obsahu v mléce dělíme minerální látky na 3 skupiny:

a) Majoritní prvky = makroelementy - vyskytují se ve stovkách až tisících mg/kg. Řadíme mezi ně vápník, fosfor, draslík, sodík, chlor, hořčík a síru.

b) Minoritní prvky - přechodná skupina mezi makroelementy a mikroelementy. Patří sem železo a zinek.

c) Stopové prvky = mikroelementy - jejich koncentrace jsou velmi nízké – v desítkách $mg \cdot kg^{-1}$, popř. v jednotkách $\mu g \cdot kg^{-1}$, např. bór, kobalt, křemík, měď, mangan, molybden, bróm, hliník a jód (www - 3).

3.1.2.2 Vitamíny

Vitamíny jsou exogenní esenciální biokatalyzátory. Liší se chemickou strukturou i konkrétní funkcí v živém organismu. Některé z nich mají významnou úlohu jako prekursory různých enzymů (hlavně vitamíny skupiny B), jiné se uplatňují v oxidačně redukčních systémech apod.

Vitamíny rozpustné v tucích (A, D, E, K a F) jsou obsaženy v mléčném tuku (po odstředění jsou ve smetaně). Jejich obsah v mléce je variabilní a je ovlivněn řadou intravitálních činitelů (výživa, způsob chovu apod.).

Vitamíny rozpustné ve vodě (B_1, B_2, kyselina askorbová, kyselina listová, vitamín B_6 a další) se nacházejí v odstředěném mléce. Jejich obsah je poměrně stabilní, vliv intravitálních činitelů je malý. V převážném množství jsou vitamíny skupiny B syntetizovány bachorovou mikroflórou (Zadražil, 2002).

3.1.2.3 Enzymy

Enzymy mléka rozdělujeme na nativní a mikrobiální (www - 5) Mléko obsahuje nativní enzymy jednak z leukocytů a jednak z buněk mléčné žlázy. Dále obsahuje mikrobiální enzymy z mikroorganismů v něm přítomných. Záhřevem mléka dochází k denaturaci a inaktivaci enzymů (Zadražil, 2002).

Podle Zadražila (2002) dělíme enzymy na:

a) Oxidoreduktázy – patří sem laktoperoxidáza, xanthinoxidáza a kataláza.

b) Hydrolázy – kam zahrnujeme lipázy, fosfatázy, proteázy, amylázy a lysozymy.

3.2 Laktóza

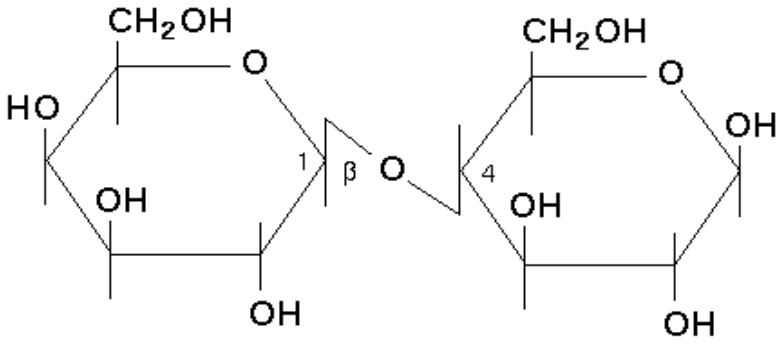
Laktóza (vzorec č. 1) je disacharid skládající se z D–glukózy a D–galaktózy spojenými ß–glykosidovou vazbou (Kadlec, 2002).

Laktóza je redukující oligosacharid, protože ve své molekule obsahuje volný poloacetalový hydroxyl, který vykazuje redukující účinky.

Specificky se vyskytuje jen v mléce, proto je také nazývána mléčný cukr, a nebyla nalezena v žádných dalších tělních tekutinách ani orgánech živočišného organismu (pouze ve vysokém stupni gravidity byla zjištěna ve stopách v krvi, příp. i moči) (Gajdůšek, 2003).

Obsah laktózy v mléce je velice konstantní (Kratochvíl a kol., 1988). Je hlavní složkou obsahu pevných látek v syrovátce (asi 70 %) (www - 6).

Vzorec č. 1: vzorec laktózy (www – 7)



3.2.1 Vlastnosti

Laktóza O–ß–D–galaktopyranosyl–(1→4)–D–glukopyranosa je redukujícím disacharidem (Gajdůšek, 2003). Její empirický vzorec je $C_{12}H_{22}O_{11} . H_2O$ a molekulární hmotnost 342,3 g/mol (www - 8).

Nejstabilnější formou je monohydrát α–laktózy (α–monomeru). V této formě se laktóza krystalizuje z vodných roztoků při teplotě do 93,5 °C. Při sušení ve vakuu při teplotě nad 100 °C vzniká hygroskopický α–anhydrid. Krystalizací z vodných roztoků při teplotě nad 93,5 °C vzniká bezvodá ß–laktóza (ß–anhydrid). Při rychlém sušení roztoků laktózy, např. také při sušení mléka, vzniká amorfní hygroskopická směs α– a ß–laktózy.

Laktóza je tvořena v mléčné žláze z krevní glukózy, galaktóza je tvořena až v mléčné žláze biochemickými procesy také z glukózy. Ve směsném mléce od zdravých a dobře krmených krav se její obsah pohybuje kolem 4,8 % (g/100 g). Je rozpuštěna v přítomné vodě, dodává mléku nasládlou chuť a s ostatními rozpustnými složkami působí osmotický tlak v mléce.

Je využívána v těle jako zdroj energie, její příjem (také galaktózy) vede k výraznému zvýšení hladiny glukózy v krvi. Má poměrně malé kariogenní a laxativní účinky. I v tenkém střevě je laktóza absorbována velmi málo, rychlost je menší než pro glukózu a galaktózu. Proto je hydrolyzována (přednostně je hydrolyzována ß–laktóza) laktázou na glukózu a galaktózu.

Sladkost laktózy je proti sacharóze pouze 27 – 39 % (Gajdůšek, 2003). Vyznačuje se dobrou stravitelností (až 99 %) a stejně jako ostatní sacharidy je zdrojem energie (Grieger, 1990).

Hlavní význam laktózy z hlediska fyziologie výživy je v tom, že kyselina mléčná, která vzniká v intestinálním ústrojí mikrobiální činností, zvyšuje resorpci vápníku.

Laktóza je i ideální zdroj uhlíku pro bakterie mléčného kvašení a prakticky fundamentálním substrátem k výrobě kysaných mléčných výrobků (Grieger, 1990).

3.3.2 Glukóza

Nejdůležitějším a ve formě derivátů i polymerů nejrozšířenějším cukrem z hexóz je D–glukóza (cukr hroznový). Vyskytuje se ve dvou modifikacích alfa a beta. Alfa–D–glukóza je obyčejným hroznovým cukrem sladkého ovoce a nepatrně volně rovněž v krvi – u lidí 0,06 % až 0,1 %. Beta–D–glukóza je vzácnější a je pro tuto formu charakteristické, že všechny atomy vodíku jsou v poloze trans (Zadražil, 2002).

D–(+)–glukóza je v přírodě nejrozšířenější monosacharid, v rostlinách se vyskytuje jednak volná, jednak vázaná ve formě oligosacharidů nebo polysacharidů a heteroglykosidů (Lachman a kol., 2003).

3.3.3 Galaktóza

D(+)galaktóza se nikde jinde než v mléce nevyskytuje. Od glukózy se liší sterickým uspořádáním na čtvrtém atomu uhlíku, čímž dochází ke vzniku cis konfigurace vodíkových atomů. Existuje enzym, který je schopen přeměňovat galaktózu na glukózu – galaktowaldenáza (koenzym je uridindifosfát). Další ze známých přeměn galaktózy je její oxidace koncentrovanou kyselinou dusičnou a tak vzniká kyselina tetrahydroxyadipová. Vedle D–galaktózy byla izolována z agaru rovněž L–galaktóza (Zadražil, 2002).

3.3.4 Laktulosa

Laktulosa (O–ß–D–galaktopyranosyl(1, 4)–D–fruktofuranosa) je disacharid složený z galaktózy a fruktózy spojených ß–glykosidickou vazbou (www - 9).

Je významná ve výživě kojenců, neexistuje sice v nezahřátém kravském ani mateřském mléce, ale po záhřevu mléka, resp. mléčných výrobků pro dětskou výživu, a delším skladování je laktóza částečně konvertována na laktulosu. Laktulosa má také vyšší sladivost než laktóza (48 – 62 % sacharosy), je více rozpustná než laktóza a stimuluje růst bifidogenní mikroflóry.

Laktulosa není hydrolyzována laktázou. Je proto silně absorbována až dosáhne dolní části intestinálního traktu kde je štěpena bakteriemi *Lactobacillus bifidus* a *Lactobacillus acidophilus*, pro které je růstovým faktorem.

Laktulosa se získává z laktózy isomerací v alkalickém prostředí, pro výrobu laktosacharosy, galaktooligosacharidů, laktitolu, galaktózy apod. (Gajdůšek, 2003).

3.3.5 Laktáza

Laktáza je enzym přítomný v epiteliálních buňkách mukosních membrán (Gajdůšek, 2003). Enzym laktáza (beta galaktosidáza) je produktem bakterií mléčného kvašení. Některé tyčinkovité mikroorganizmy mléčného kysání tento enzym nemají a potom musejí využívat produkty hydrolýzy laktózy prostřednictvím jiných bakterií, které tuto schopnost mají (např. *Betabacterium caucasicum* v kefírových zrnech) (Zadražil, 2002).

U kojenců je produktivita laktázy nízká, protože i první kolostrum má méně laktózy. Zvýšení obsahu laktózy pak indukuje zvyšování aktivity laktázy. U mladých savců pak opět klesá aktivita laktázy po jejich odstavení (adaptace na nepřítomnost laktózy). V dospělosti pak u velké části lidské populace tento enzym zcela chybí a konzumace mléka je potom problematická.

Laktázu produkují také bakterie mléčného kysání, které štěpí laktózu až na mléčnou kyselinu (L– nebo D–mléčnou kyselinu nebo racemát) (Gajdůšek, 2003).

3.3.6 Laktitol

Laktitol (4–O–ß–D–galaktopyranosyl–D–sorbitol) (www - 10) je sladidlo vyráběné z mléka. Je třikrát méně sladký než cukr. Má výbornou chuť a je méně kalorický než cukr. V České republice se může používat jako stolní sladidlo a k výrobě potravin s výjimkou dětské výživy. Řadí se mezi emulgátory jako E 966 (www - 11).

3.3.7 Technologie získávání laktózy

Vzhledem k tomu, že se doposud nepodařilo objasnit zákonitosti biosyntézy laktózy, zůstává laktóza jedním z mála cukrů, které organická chemie nedokáže synteticky (laboratorně) a tudíž ani průmyslově připravit.

Zejména farmaceutický a potravinářský průmysl jsou odkázány na pouhou izolaci laktózy ze sladké syrovátky. Sladká syrovátka se zbaví syrovátkových bílkovin a při pH 6,2 se odpařováním vody zahušťuje při teplotě 90 – 95 °C. Zahuštěný koncentrát se zaočkuje krystalky rafinované laktózy a tak se vyvolá spontánní krystalizace. Surová laktóza se čistí – rafinuje (tj. nutné snížení necukrových složek a zvýšení koncentrace laktózy na 95 – 99,7 %).

Obchodní druh laktózy je vlastně α–monohydrát (často označován jako alfahydrát), kdy se vykrystalizuje z koncentrovaných roztoků laktózy při teplotě o 95 °C v podobě drobných bezbarvých romboidů. Sladivost α–laktózy dosahuje pouze necelých 16 % sladivosti klasické sacharózy. Jestliže není uhlídána teplota krystalizace a překročí 95 °C, vykrystalizuje bezvodá forma laktózy zvaná ß–forma (nebo též beta–anhydrid). Tato forma vykazuje vyšší sladivost (asi 32 % sladivosti sacharózy). V porovnání s alfa–hydrátem je snáze rozpustná ve vodě (Zadražil, 2002).

3.3.8 Vlivy působící na obsah laktózy v mléce

Z faktorů, působících na hladinu laktózy v mléce má význam především druh savce (tabulka č. 1). Nejvíce laktózy z mlék všech savců – až 7 % je v mateřském mléce. V kolostru, vylučovaném u všech savců první den po porodu je koncentrace laktózy nižší, s postupující laktací se zvyšuje.

Ačkoliv laktóza společně s minerálními látkami udržuje konstantní osmotický tlak, její koncentrace v mléce není vysoká. Obsah laktózy kolísá především se stadiem a pořadím laktace, dojivostí a zdravotním stavem mléčné žlázy krav. Obsah laktózy nižší než 4,55 % resp. 4,60 % souvisí především s mastitidním onemocněním. Snížená tvorba laktózy z důvodu onemocnění, je pro vyrovnání osmotického tlaku v mléčné žláze nahrazována zvýšeným přechodem chloridu sodného z krve do mléka (zvýšení chlórcukrového čísla). Existuje proto negativní korelace mezi počty somatických buněk (PSB) a obsahem laktózy, která u individuálních vzorků mléka dosahuje hodnoty až – 0,60. K interpretaci vztahu mezi obsahem laktózy v mléce a PSB může sloužit níže uvedená tabulka č. 2. Podstatně méně je obsah laktózy v mléce ovlivňován výživou a klesá až při silně restriktivní energetické výživě krav, kdy současně klesá i dojivost. Běžně však klesá s postupem laktace (pokles dojivosti) a s pořadím laktace (pravděpodobnost prodělání více mastitidních onemocnění) (Gajdůšek, 2003).

Tabulka č. 1: Složení různých druhů mlék v %

Mléko	Voda	Sušina	Laktóza	Tuk	Bílkoviny	Popeloviny
Kozí	84,80 – 88,80	11,20 – 15,20	4,20 – 4,60	3,80 – 4,20	3,60 – 3,80	0,75 – 0,95
Ovčí	77,80 – 81,80	18,20 – 22,20	3,50 – 4,50	7,20 – 10,60	5,40 – 7,10	0,75 – 0,95
Velbloudí	85,40 – 88,40	11,60 – 14,60	4,90 – 5,10	4,30 – 4,50	3,30 – 3,60	0,70 – 0,90
Mateřské	83,80 – 89,80	10,20 – 16,20	4,60 – 8,60	3,80 – 5,80	1,10 – 2,10	0,15 – 0,25
Kravské	85,50 – 89,50	10,50 – 14,50	3,60 – 5,50	2,50 – 6,00	2,90 – 5,00	0,60 – 0,90
Prasnice	79,50 – 82,90	17,10 – 20,50	3,10 – 6,00	3,90 – 9,50	5,30 – 7,30	0,65 – 0,95
Kobylí	87,30 – 91,30	8,60 – 12,60	6,60 – 8,60	1,20 – 1,60	1,50 – 1,90	0,35 – 0,55

Zdroj: Zadražil, 2002

Tabulka č. 2: Interpretační tabulka k obsahu laktózy a počtu somatických buněk ve vzorcích bazénového (resp. individuálního) mléka

% laktózy ≥ 4,60	PSB tis./ml	% laktózy < 4,60
Poměrně zdravé stádo (zdravá dojnice)	< 300	Vliv energetického deficitu krmné dávky
Podezřelý stav, potřebné ověřit dalšími testy, vzrůst subklinických mastitid ve stádě, silná příměs mleziva (subklinická mastitida nebo mlezivo), nebo dietetické resp. metabolické poruchy, popřípadě ↓	301 - 500	Podezřelý stav, nutné ověřit dalšími testy, vzrůst subklinických mastitid ve stádě nebo hromadné ukončování laktace (subklinická mastitida nebo konec laktace), poruchy výživy resp. metabolismu, popřípadě ↓
Možný vliv hromadného stresu (stres)	> 500	Silný výskyt mastitid, zejména subklinických, ale i klinických (mastitida)

Zdroj: Gajdůšek, 2003

3.3.9 Fermentace mléka

Velmi známé změny laktózy nastávají při kysání mléka (fermentace laktózy na kyselinu mléčnou) bakteriemi mléčného kysání – nejprve dochází k hydrolýze laktózy na glukózu a galaktózu. Potom následuje desmolytický proces, kterým se mění glukóza na L(+)kyselinu mléčnou nebo-li alfa–hydroxypropionovou. Z 1 molekuly laktózy vznikají 4 molekuly kyseliny mléčné. Konečné fermentace laktózy na alkohol jsou schopné pouze některé druhy kvasinek (Zadražil, 2002).

Bakterie mléčného kvašení fermentují laktózu dvěma metabolickými cestami. Při prvé z nich, uplatňující se především u rodu *Lactococcus*, je laktóza transportována do buněk fosfoenolpyruvát dependentním fosfotransferasovým systémem a hromaděna zde jako laktóza–6–fosfát, který je hydrolyzován 6–fosfor–ß–D–galaktosidázou za vzniku glukózy a galaktóza–6–fosfátu. Tyto jsou následně metabolizovány na kyselinu mléčnou. Při druhé cestě, uplatňující se především u rodu *Lactobacillus*, je laktóza akumulována specifickou permeasou a pak intracelulárně hydrolyzována ß–galaktosidázou na glukózu a galaktózu.

Glukóza je metabolizována na kyselinu mléčnou, zatímco galaktóza je uvolňována do média (www - 9).

3.3.9.1 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení jsou specifická skupina Grampozitivních eubakterií, které mají vysokou odolnost v kyselém prostředí (do pH = 3), jsou nepatogenní, ovlivňují chuť mléčných produktů a zvyšují jejich trvanlivost (www - 12).

Jsou schopny enzymatické přeměny sacharidů na kyselinu mléčnou (a současně další produkty jako kyselina máselná, propionová, octová, aceton, ethanol, oxid uhličitý aj.).

Mléčné kvašení je jeden z nejvýznamnějších fermentačních procesů v potravinářské biotechnologii. Probíhá-li za vzniku pouze kyseliny mléčné, označuje se jako homofermentativní, vznikají-li vedle kyseliny mléčné i vedlejší produkty, nazývá se heterofermentativní (www - 13).

3.3.9.1.1 Rod Bifidobacterium

Kmeny bifidobakterií se v mlékárenské výrobě používají v kombinaci s dalšími bakteriemi ostatních kmenů při výrobě stále se rozšiřujícího sortimentu kysaných mléčných výrobků.

Převážná většina kmenů tohoto rodu je anaerobního charakteru, avšak přítomností oxidu uhličitého krátkou dobu tolerují kyslík. Bifidobakterie neprodukují CO_2, propionovou ani máselnou kyselinu. Teplotní optimum se pohybuje mezi 37 – 43 °C (některé kmeny rostou i při 28 °C nebo až při 45 °C). Optimální pH živných médií je 6,5 – 7,0.

Hlavními produkty kysání jsou kyselina octová a mléčná. Kyselina mléčná převážně v L(+)formě a je tudíž snadno dětským organizmem metabolizovaná (Zadražil, 2002).

V mlékařství se využívá hlavně druh *Bifidobacterium bifidum* (Plocková a Březina, 1988).

Kmeny *Bifidobacterium bifidum* společně s dalšími kmeny *Bifidobacterium infantis* a *Bifidobacterium longum* jsou nezbytnou součástí zákysových kultur při výrobě mléčných kysaných nápojů.

Kmen *Brevibacterium linens* tvoří součást mazových kultur, používaných pro výrobu měkkých sýrů zrajících pod mazem. Vykazují určitou mikrobiální aktivitu, a tak brání rozmnožování nežádoucích mikroorganismů na povrchu sýrů.

Kmeny *Enterococcus faecalis* a *faecium* jsou využívány v sýrařství jako doplňkové kultury zejména při výrobě sýrů čedarovitého typu, kterým dodávají výraznou chuť. Jsou součástí mikroflóry využívané pro výrobu ovčích sýrů a kysaných mléčných nápojů z ovčího mléka.

Kmeny *Lactobacillus acidophilus* se používají k výrobě acidofilního mléka, podmáslí a smetany. Jsou součástí zákysů pro výrobu kysaných výrobků typu Biokys.

Kmeny *Lactococcus lactis subsp. lactis* nebo *Lactococcus lactis subsp. cremoris* jsou součástí mikroflóry základních smetanových kultur.

Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris a *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum* tvoří aromatickou součást mikroflóry základních smetanových kultur. (Zadražil, 2002).

3.3.9.1.2 Rod Micrococcus

Mikrokoky jsou aerobní mikroorganismy snášející teplotu 25 – 30 °C. Vyskytují se v syrovém mléce, časté jsou i v mléčných výrobcích (Plocková a Březina, 1988).

Mikrokoky tvořící pigmenty jsou vedle základní kultury *Brevibacterium linens* a kvasinek součástí mazové sýrařské kultury. Podílejí se částečně na rozkladu bílkovin, a tím vzniku typické chuti, konzistence a povrchového zabarvení sýrů zrajících pod mazem.

Monokultury kmenů *Pediococcus acidilactici* tvoří součást mikroflóry kultur používaných při výrobě mléčných zakysaných výrobků typu Biokysu. Předpokládá se, že kmeny *Pediococcus* působí na udržení optimálního poměru mezi jednotlivými kulturami (Zadražil, 2002).

3.3.9.1.3 Rod Propionibacterium

Podle Plockové a Březiny (1988) rostou Propionibacterie anaerobně při teplotách 25 až 45 °C.

Vyznačují se tím, že vytváří z mléčného cukru působením enzymů kyselinu mléčnou, mléčnany, kyselinu propionovou, kyselinu octovou, oxid uhličitý a vodu (Kratochvíl, 1988). Oxid uhličitý vzniká při propionovém kysání a vytváří při určitém tlaku oka v těstě (Zadražil, 2002).

3.3.10 Problém s trávením laktózy

Nesnášenlivost laktózy je občas zaměněna s alergií na mléko. Jsou to ovšem úplně jiná onemocnění. Pokud vůbec může být nesnášenlivost laktózy (v současnosti se vyskytuje u dvou třetin světové populace) považována za onemocnění. Nesnášenlivost laktózy se týká především dospělé části populace a je způsobena mléčným cukrem, alergie na mléko se týká téměř výhradně dětí a je způsobena mléčnými bílkovinami. Příznaky se také liší (Shortt and O'Brien, 2004).

3.3.10.1 Laktózová intolerance

Intolerance na mléčný cukr – laktózu začíná již s narozením. Nejedná o "klasickou" potravinovou alergii, ale přesnější je označení - metabolická porucha štěpení mléčného cukru.

Příčinou tohoto onemocnění je malý nebo žádný obsah enzymu laktázy ve střevě. Úkolem laktázy je štěpit laktózu na další jednodušší cukry, které tělo dále využívá. Pokud laktóza není takto zpracována, zůstává ve střevě přebytečná a dochází k jejímu kvašení a průjmům (www - 14).

Osoby s laktózovou intolerancí mohou přijímat mléko jen v malém množství a pokud možno společně s jinou potravinou. Množství mléka, jaké kdo snese, je individuální, ale pokud se příslušný limit překročí, dostaví se okamžitě symptomy jako jsou bolesti žaludku, nadýmání a průjem. Při poruchách trávení laktózy je lépe strávena a tolerována laktóza v jogurtu než ekvivalentní množství laktózy v mléce (Shortt and O'Brien, 2004).

Analýzou DNA u osob s laktózovou intoleranci ve Finsku, Německu, Francii, USA a Koreji byla zjištěna přítomnost variantního genu regulujícího tvorbu laktázy. Tato

skutečnost dokazuje, že tento „variantní gen“ zjištěný u pacientů je vlastně původní formou tohoto genu, zatímco u laktózo-tolerantních osob se vyskytuje genová mutace (www - 15).

V obyčejném mléce se většinou garantuje méně než 20 % laktózy. To znamená, že ve 100 g koncového výrobku je obsah laktózy menší než 1 g. Takto nízkou koncentraci snese bez jakýchkoliv problému většina lidí postižených nesnášenlivostí laktózy (Shortt and O‘Brien, 2004). Při těžkých intolerancích je potřeba dodržovat dietu s úplným vyloučením laktózy. V těchto případech se dobře osvědčuje delaktózované mléko a delaktózované mléčné výrobky, ze kterých se laktóza odstraňuje speciálními technologickými postupy (Grieger, 1990).

3.3.10.2 Alergie na mléko

Alergie na kravské mléko má pestré klinické projevy s postižením systému kožního, trávicího, dýchacího a oběhového. Uvedené příznaky alergického onemocnění se mohou objevovat časně (do 2 hodin) po požití, pokud je reakce zprostředkována IgE protilátkami nebo jde o pozdní reakce za 24 až 48 hodin po požití.

U malých dětí se alergie na kravské mléko projevuje nejčastěji atopickým ekzémem nebo chronickými alergickými záněty trávicího traktu. U dospělých nejsou klinické projevy alergie tak vyhraněné jako u dětí.

Předpokládá se, že alergie na kravské mléko je jako příčina potíží podceňována, protože se u řady případů nedaří prokázat IgE protilátky a neexistuje jiný diagnostický test, který by jednoznačně doložil imunitní mechanismus.

Alergie se může projevovat chronickým zánětem trávicího traktu, který vede k úbytku tělesné váhy a k poruchám výživy. Může docházet k postižení dýchacího systému, infekcím dýchacích cest, chronickým kožním projevům a výjimečně až ke smrti v důsledku křeče průdušek (www - 16).

3.4 Metody stanovení laktózy

3.4.1 Stanovení laktózy titračně s použitím chloraminu T pro mléko

Jedná se o referenční metodu. Podstatou je titrační stanovení halogenu, uvolněného při reakci cukrů s chloraminem T a jodidem draselným. Metoda není vhodná pro ochucené a zakysané výrobky či syrovátku (Cvak a kol., 1992).

3.4.2 Stanovení laktózy a dalších cukrů vedle sebe v ochucených slazených tekutých mléčných výrobcích

3.4.2.1 Metoda podle Luff-Schoorla

Bílkoviny a tuk se ze vzorku odstraní vyčeřením Carezovým činidlem. Ve filtrátu se pak stanoví redukující cukry (laktóza) na základě schopnosti redukovat za varu měďnaté soli z Luffova roztoku na oxid měďný. Nezreagovaný přebytek měďnaté soli se stanoví jodometricky a přepočte se na obsah laktózy, který se vyjádří v g na 100 g mléka (Kouřimská, 2007).

3.4.2.2 Biochemická metoda stanovení laktózy po enzymovém štěpení

Podle Cvaka a kol. (1992) se na extrakt vzorku se působí následujícími enzymy a reagenciemi, přidávanými současně, ale působícími postupně: ß–galaktosidáza – štěpí laktózu na glukózu a galaktózu, hexokináza a adenosintrifosfát (ATP) – fosforylují glukózu na glukózo–6–fosfát (G6P), glukózo–6–fosfát–dehydrogenáza (G6P-DH) za přítomnosti nikotinamid–adenin–dinukleotidfosfátu ($NADP^+$) – katalyzuje oxidaci G6P na 6–fosfoglukonát za převedení $NADP^+$ na redukovanou formu (NADPH). NADPH se stanoví spektrometricky při vlnové délce 340 nm. Obsah laktózy je úměrný NADPH, provede-li se podle slepé zkoušky korekce na původně ve vzorku přítomnou glukózu.

3.4.3 Polarometrické stanovení laktózy v mléce

Ve filtrátu po vyčeření roztoku vzorku mléka se provede polarimetrické měření optické otáčivosti, která je úměrná koncentraci laktózy v roztoku (Cvak a kol., 1992).

3.4.4 Moderní instrumentální metody

Podle principu stanovení je možno instrumentální metody stanovení obsahu laktózy rozdělit do dvou skupin:

a) metody infračervené spektroskopie (MIR, NIR)
b) metody chromatografické (GLC, HPLC) (Cvak a kol., 1992).

3.4.4.1 Metoda infračervené spektroskopie

Analýza vzorku je založena na měření absorpce infračerveného záření při specifických vlnových délkách pro každou stanovovanou komponentu (pro laktózu 9610 nm). Protože je absorpce ovlivňována i ostatními komponentami ve vzorku, musí se naměřené údaje uvést do souladu s referenčními hodnotami pomocí kalibrace (Kouřimská, 2007).

3.4.4.2 Metody chromatografické

HPLC:

Pro stanovení sacharidů bývají jako náplně používány nejčastěji mikrokapilární silikagely s chemicky vázanými $–NH_2$ skupinami a mobilní fáze acetonitril – voda s detekcí obvykle refraktometrickou. Oproti metodě plynové chromatografie odpadá dialýza, čímž se zvyšuje přesnost stanovení a zkracuje se doba analýzy (Cvak a kol., 1992).

Pro stanovení laktózy kapalinovou chromatografií existuje norma: ČSN ISO 22662 Mléko a mléčné výrobky – Stanovení obsahu laktózy vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

Podstata zkoušky:

K naváženému objemu mléka a standardu laktózy se přidá vnitřní standard [D(+)-melezitóza]. Přidá se chemické činidlo (Biggs-Szijarto roztok) k vysrážení tukových a bílkovinných podílů mléka. Před nástřikem se vzorek dvakrát filtruje, nejprve přes papírový filtr a pak přes nylonový filtr s velikostí pórů 0,45 μm. Laktóza a vnitřní standard se oddělí na kationtové výměnné koloně na bázi olova a stanoví se pomocí diferenciálního refraktometrického detektoru nebo jiného vhodného detektoru. Jako mobilní fáze se používá voda odpovídajícího stupně pro HPLC.

Podmínky:

Mobilní fáze: odplyněná voda
Kolona: pryskyřicová, délka 300 mm, vnitřní průměr 7,8 mm
Vnitřní detekční teplota: 35 °C
Teplota předklony: teplota místnosti
Teplota kolony: 85 °C
Průtok: 0,6 ml/min
Nastřikovaný objem: 20 μl

GLC:

Při použití této metody stanovení je nutná předběžná dialýza vzorku – sacharidy se převedou na těkavé trimethylacyléthery a ty se rozdělí plynovou chromatografií za použití plamenově ionizačního nebo tepelně vodivostního detektoru. Ve srovnání s klasickými postupy je plynová chromatografie rychlejší, přesnější, citlivější a vhodná pro sériová stanovení (Cvak a kol., 1992).

4 Metody

4.1 Materiál

K experimentální části bylo použito trvanlivé plnotučné mléko značky Madeta (1 l), do kterého se přidala sušená jogurtová kultura Laktoflora^{R} (Milcom a.s.). Sledoval se obsah laktózy a kyselost mléka různými metodami.

4.2 Fermentace mléka

Trvanlivé plnotučné mléko (1 l) se přelilo do hrnce, ohřálo se na 43 °C, zaočkovalo se 3 g sušené kultury Laktoflora^{R} jogurtová a dobře promíchalo.

Kultivace probíhala v termostatu při 42 °C po dobu 0, 1, 2 a 3 hodiny (první vzorek mléka, tzn. 0 hodin se nekultivoval v termostatu). Po kultivaci se vzorek zahříval ve vodní lázni na 85 °C, hned poté zchladil pod proudem tekoucí vody na 20 °C a dále se prováděly samotné analýzy.

Všechno laboratorní sklo a pomůcky byly sterilní, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku mléka a k následným nepřesným výsledkům.

4.3 Přístroje

Analytické váhy Explorer Pro EP 214 C, max. 210 g, d = 0,1 mg

Sušárna Memmert, 170 – 175 °C, 1 h

Termostat Biological BT 120, 43 °C ± 2 °C

pH metr Snail Instruments 114, pH metr s automatickou teplotní kompenzací

MilkoScan FT 120 (Foss, Dánsko)

Kapalinový chromatograf Varian, (pumpa Varian 9010, detektor Varian RI–4)

4.4 Chemikálie

Všechny uvedené chemikálie byly vyrobené společností Lach-Ner s.r.o.

4.4.1 Stanovení aktivní kyselosti pH metrem

Pufry: např. ftalátový pufr o pH 4 a fosfátový pufr o pH 7

4.4.2 Stanovení titrační kyselosti podle Soxhlet–Henkela

Fenolftalein, 2% etanolový roztok

Hydroxid sodný (NaOH) o koncentraci 0,25 mol/l, faktor 1,118

Síran kobaltnatý, roztok (5 g $CoSO_4 . 7 H_2O$ ve 100 ml vody)

4.4.3 Stanovení redukujících cukrů titrační metodou podle Luff–Schoorla

Ferrokyanid draselný – CAREZ II (příprava: 15 g $K_4Fe(CN)_6 . 3 H_2O$ se rozpustí ve 100 ml odměrné baňce v destilované vodě a po úplném rozpuštění doplní po rysku)

Síran zinečnatý – CAREZ I (příprava: 30 g $ZnSO_4 . 7 H_2O$ se rozpustí ve 100 ml odměrné baňce v destilované vodě a po úplném rozpuštění doplní po rysku)

Thiosíran sodný p. a. (0,1 M roztok: 24,818 g $Na_2S_2O_3 . 5 H_2O$ se rozpustí ve 1000 ml odměrné baňce v destilované vodě a po úplné rozpuštění doplní po rysku), f = 1,0044

Kyselina sírová (25% roztok)

Jodid draselný p. a.

Škrobový indikátor (2% roztok rozpustného škrobu, roztok se musí alespoň 3 minuty vařit)

Luffův roztok (příprava: 25 g krystalického síranu měďnatého p. a. ($CuSO_4 . 5 H_2O$) se rozpustí ve 100 ml destilované vody. 50 g krystalické kyseliny citrónové se rozpustí v 50 ml destilované vody. 142 g bezvodého čistého (nebo p. a.) uhličitanu draselného (K_2CO_3) se

rozpustí v 600 – 650 ml destilované vody. Po ochlazení se roztok K_2CO_3 nalije do 1000 ml odměrné baňky, pomalu se přidá roztok kyseliny citrónové, potom roztok síranu měďnatého a po promíchání se doplní po značku.

4.5 Metody

Vzorky fermentovaného mléka byly měřeny pěti různými analytickými metodami.

4.5.1 Stanovení aktivní kyselosti pH metrem

pH metr byl kalibrován v rozsahu 4 – 7 pH na roztoky o známé hodnotě pH (pufry) při teplotě doporučené výrobcem (obvykle 20 °C). Při vlastním měření bylo nutné postupovat podle pokynů výrobce v návodu pH metru.

Elektroda se ponořila přímo do mléka o teplotě 20 °C a změřila se odpovídající hodnota pH. Po každém měřeném vzorku se vždy elektroda opláchla destilovanou H_2O a osušila například buničitou vatou (Kouřimská, 2007).

4.5.2 Stanovení titrační kyselosti podle Soxhlet–Henkela

25 ml mléka se odpipetovalo do titrační baňky, přidal se 1 ml roztoku fenolftaleinu a titrovalo se roztokem NaOH o koncentraci 0,25 mol/l za stálého míchání do slabě růžového zbarvení, které měl srovnávací roztok. Zabarvení muselo vydržet 30 s.

Srovnávací roztok mléka: k 50 ml mléka se přidal 1 ml síranu kobaltnatého (Kouřimská, 2007).

4.5.3 Stanovení redukujících cukrů titrační metodou podle Luff–Schoorla

Ze zkoumaného vzorku mléka se odvážilo 10 g s přesností na 0,0002 g do 100 ml odměrné baňky, zředilo se cca 30 ml destilované vody, přidali se 3 ml roztoku ferrokyanidu draselného (CAREZ II) a po promíchání 3 ml síranu zinečnatého (CAREZ I). Po dalším promíchání se baňka doplnila destilovanou vodou po rysku. Po 5 minutách se roztok filtroval a prvé podíly se oddělili (cca 25 ml) a vylili. Získaný filtrát, který musel být čirý, se pipetoval k redukci.

Do zabroušené baňky na 250 nebo 500 ml se napipetovalo 25 ml Luffova roztoku, 10 ml čirého filtrátu a 15 ml destilované vody. Roztok v baňce se přivedl během 2 minut k varu. Od této chvíle se vařil mírným varem pod zpětným chladičem přesně 10 minut. Potom se rychle ochladil za stálého míchání pod proudící vodou a po 5 minutách se přidali asi 3 g jodidu draselného a 25 ml 25% kyseliny sírové. Kyselinu bylo třeba přidávat opatrně, aby roztok nevzkypěl.

Vyloučený jód se ihned titroval roztokem 0,1 M thiosíranu sodného. Ke konci titrace se přidalo 5 ml škrobového indikátoru. Titrovalo se do smetanového zbarvení.

Stejným způsobem se provedl slepý pokus (25 ml Luffova roztoku + 25 ml destilované vody) (Kouřimská, 2007).

4.5.4 Stanovení laktózy pomocí infračervené spektroskopie na přístroji MilkoScan

Kysaný mléčný výrobek byl temperován ve vodní lázni na 40 °C. Mezitím se přístroj MilkoScan čistil a nuloval. Poté byl vybrán modul „Improved Milk“. Vytemperovaný vzorek mléka se pečlivě promíchal a dal měřit. Analýza probíhala pro každý vzorek dvakrát.

4.5.5 Stanovení laktózy metodou HPLC

Čirý filtrát získaný analytickou metodou podle Luff–Schoorla byl následně analyzován na kapalinovém chromatografu a získané hodnoty přepočítány rovnicemi lineární regrese na konečné koncentrace laktózy, glukózy a galaktózy ve vzorcích fermentovaného mléka.

HPLC chromatograf Varian:

Pumpa: Varian 9010
Detektor: Varian RI-4
Smyčka: Rheodyne
Analytická kolona: Column, Animex ^{R} HPX-87N, 300 x 7,8 nm
Mobilní fáze: 0,01 M $Na_2HPO_4.12H_2O$
Průtok: 0,6 ml/min
Teplota kolony: 55 °C
Objem nástřiku: 20 µl
Detekce: RI – teplota detektoru 35 °C

5 Výsledky

5.1 Stanovení aktivní kyselosti pH metrem

Hodnota pH byla měřena postupně po 0, 1, 2 a 3 hodinách fermentace v termostatu při teplotě 20 °C a byly zjištěny výsledky uvedené v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Hodnoty aktivní kyselosti mléka během fermentace

Čas (h)	Aktivní kyselost (pH)
0	6,59
1	6,45
2	6,28
3	6,04

Z uvedené tabulky je vidět, že čím delší dobu byl fermentovaný výrobek kultivován, tím více klesala hodnota pH.

5.2 Stanovení titrační kyselosti podle Soxhlet–Henkela

Do titračních baněk bylo pipetováno 25 ml fermentovaného mléka, které bylo titrováno 0,25 M roztokem NaOH do slabě růžového zbarvení. Spotřeba NaOH při titraci je uvedena v tabulce č. 4. Výsledná kyselost podle Soxhlet–Henkela je uvedena v tabulce č. 5.

Kyselost (x) ve stupních Soxhlet–Henkela (SH) na 100 ml mléka byla vypočtena podle vzorce:

$$x = 4 \cdot a \cdot f$$ v případě, že na titraci bylo použito 25 ml vzorku

a - množství roztoku NaOH o přibližné koncentraci 0,25 mol/l spotřebovaného při titraci vzorku mléka
f - faktor titrace (f = 1,118)

Výsledek se zaokrouhlil na 0,05 SH.

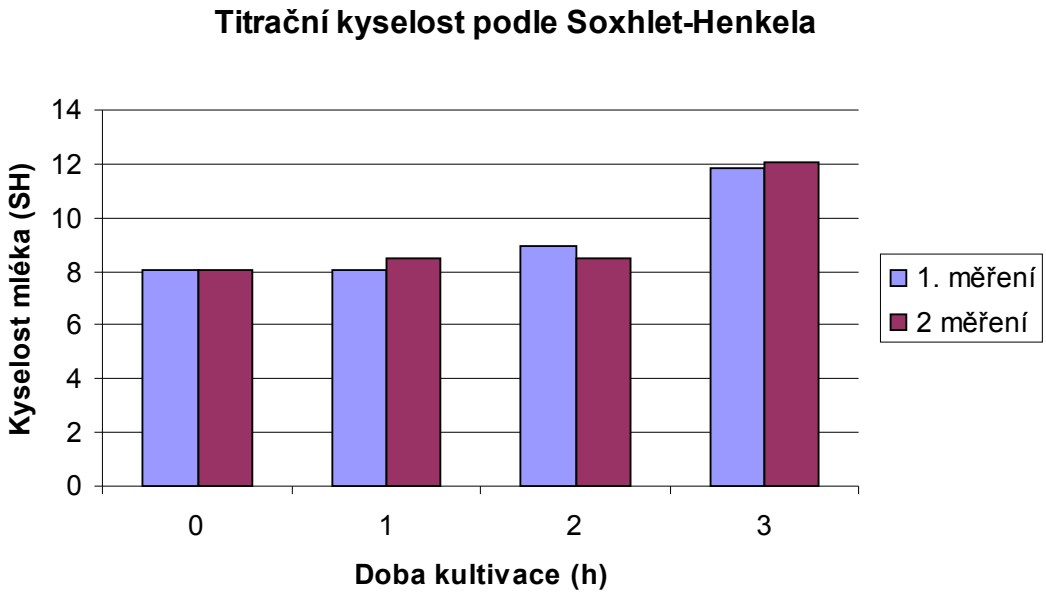
Tabulka č. 4: Spotřeba NaOH při titraci

Čas (h)	1. měření (ml)	2. měření (ml)	Průměr (ml)
0	1,9	1,8	1,85
1	1,8	1,8	1,8
2	2	1,9	1,95
3	2,6	2,7	2,65

Tabulka č. 5: Kyselost vzorků mléka podle Soxhlet-Henkela

Čas (h)	X_1 (SH)	X_2 (SH)	Průměr (SH)
0	8,05	8,05	8,05
1	8,05	8,50	8,30
2	8,95	8,50	8,75
3	11,85	12,05	11,95

Graf č. 1: Titrační kyselost podle Soxhlet–Henkela



Z uvedené tabulky č. 5 a následně grafu č. 1 je vidět, že kyselost narůstá se zvyšujícím se časem kultivace fermentovaného mléka.

5.3 Stanovení redukujících cukrů titrační metodou podle Luff–Schoorla

Mléko bylo pipetováno 10 ml pipetou na analytických vahách do 100 ml odměrné baňky a následně byl proveden přepočet na odpipetovaný podíl (a) podle vzorce č. 2. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Vzorky fermentovaného mléka byly titrovány 0,1 M thiosíranem sodným do smetanového zbarvení. Spotřeby jsou uvedené v tabulce č. 7.

Obsah redukujících cukrů vyjádřený obsahem laktózy byl následně vypočítán jako obsah bezvodé laktózy a monohydrátu laktózy. Výsledné hodnoty jsou v tabulce č. 8.

Vzorec č. 2: Přepočet na odpipetovaný podíl - a

$$a = (\text{napipetovaný podíl mléka v gramech} : 100) \,.\, 10$$

100 – objem odměrné baňky v ml

10 – objem mléka, potřebný k rozboru v g

Tabulka č. 6: Přepočet napipetovaného podílu mléka na odpipetovaný podíl

Čas (h)	Napipetovaný podíl mléka v gramech	Navážka mléka v odpipetovaném podílu v gramech
0	10,1965	1,0197
1	10,1996	1,0199
2	10,2269	1,0227
3	10,1936	1,0194

Tabulka č. 7: Spotřeba $Na_2S_2O_3$. 5 H_2O při titraci

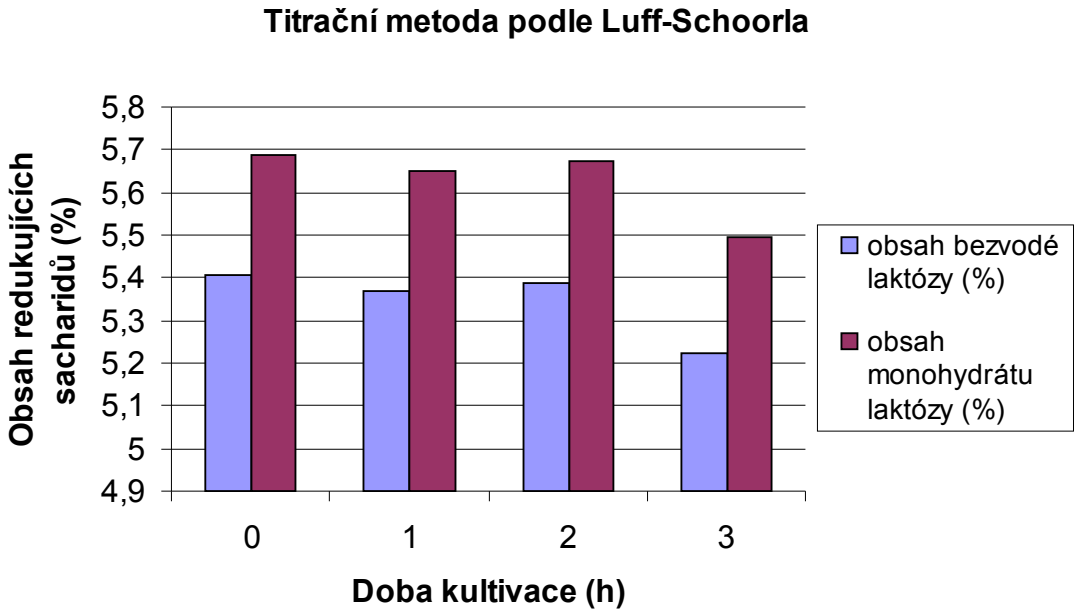
Čas (h)	$Na_2S_2O_3$. 5 H_2O (ml)
0	14,9
1	14,8
2	14,9
3	14,4

Tabulka č. 8: Obsah redukujících sacharidů stanovených podle Luff-Schoorla

Čas (h)	Obsah bezvodé laktózy (%)	Obsah monohydrátu laktózy (%)
0	5,4055	5,6887
1	5,3675	5,6498
2	5,3896	5,6731
3	5,2223	5,4970

Titrační metodou podle Luff–Schoorla bylo zjištěno, že obsah bezvodé laktózy s dobou kultivace nepatrně klesá a to samé platí pro monohydrát laktózy. Pro lepší přehlednost jsou hodnoty uvedené v tabulce č. 8 zaneseny do grafu č. 2.

Graf č. 2: Obsah redukujících sacharidů stanovený titrační metodou podle Luff–Schoorla



5.4 Stanovení laktózy pomocí infračervené spektroskopie na přístroji MilkoScan

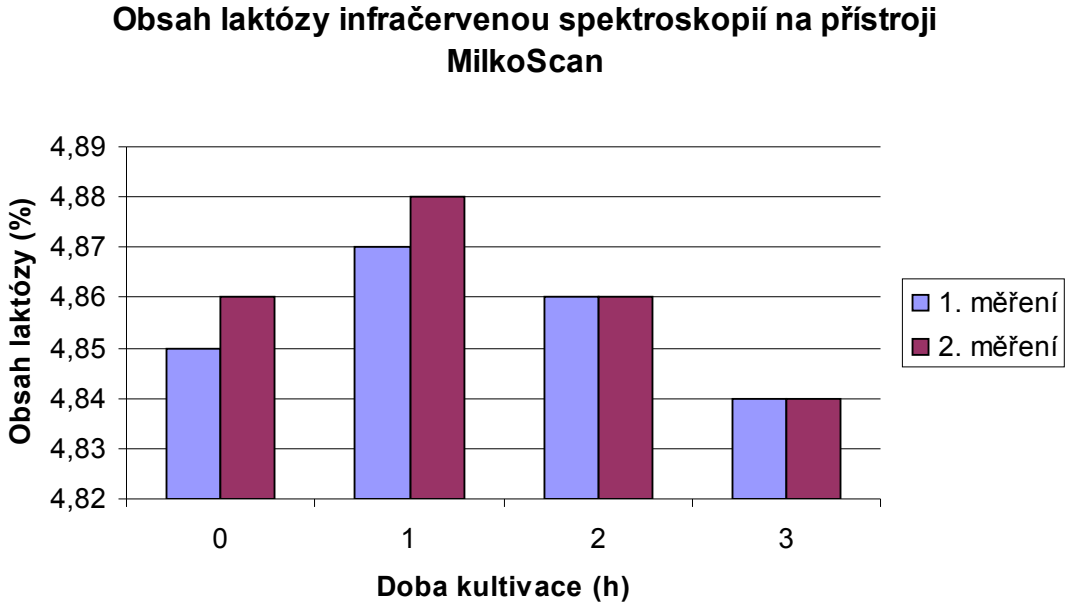
Zkoumané vzorky fermentovaného mléka byly po temperaci na teplotu 40 °C měřeny na přístroji MilkoScan. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 9 a pro grafické znázornění zaneseny do grafu č. 3.

V manuálu pro přístroj MilkoScan výrobce uvádí, že směrodatná odchylka při měření se rovná 0,0077 % hmotnostních.

Tabulka č. 9: Obsah laktózy stanovený přístrojem MilkoScan (% hmotnostní)

Čas (h)	1. měření	2. měření	průměr
0	4,85	4,86	4,855
1	4,87	4,88	4,875
2	4,86	4,86	4,860
3	4,84	4,84	4,840

Graf č. 3: Obsah laktózy stanovený přístrojem MilkoScan



Pomocí infračervené spektroskopie bylo zjištěno, že nejvyšší obsah laktózy ve fermentovaném mléce je při kultivaci 1 h. Se zvyšujícím se počtem hodin kultivace, klesá obsah laktózy ve vzorku.

5.5 Stanovení laktózy metodou HPLC

K analýze na kapalinovém chromatografu byly použity čiré filtráty získané při stanovení redukujících cukrů podle Luff–Schoorla.

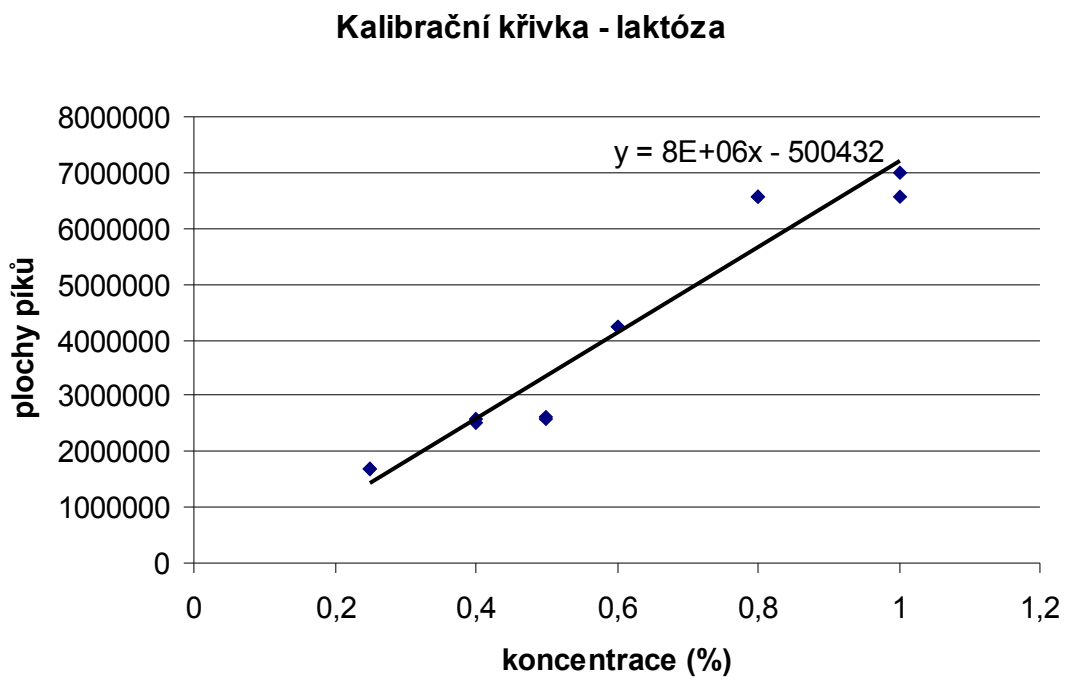
Pomocí kapalinové chromatografie byly zjištěny plochy píků, ze kterých se následně pomocí rovnice lineární regrese, která je uvedena v grafu č. 4, vypočítaly konečné koncentrace laktózy uvedené v tabulce č. 10.

Při kapalinové chromatografii se po píku laktózy objevily další dva píky. Pomocí standardů bylo zjištěno, že se jedná o glukózu a galaktózu. Výsledné plochy píků byly rovnicí lineární regrese pro glukózu (graf č. 5) přepočteny na konečné koncentrace, které jsou pro glukózu uvedeny v tabulce č. 11 a pro galaktózu v tabulce č. 12.

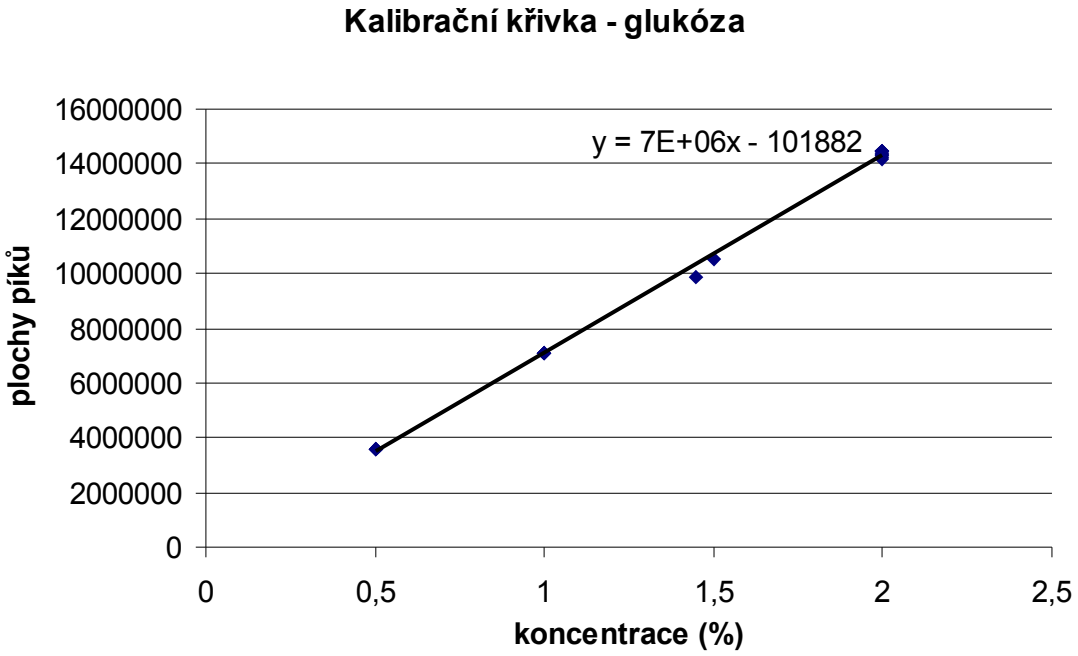
Pro výpočet obsahu galaktózy ve vzorcích fermentovaného mléka byla použita kalibrační křivka pro glukózu.

Konečné koncentrace laktózy jsou graficky znázorněné v grafu č. 6. Koncentrace glukózy byly zaneseny do grafu č. 7 a galaktózy do grafu č. 8.

Graf č. 4: Kalibrační křivka pro výpočet obsahu laktózy ve vzorcích mléka



Graf č. 5: Kalibrační křivka pro výpočet obsahu glukózy ve vzorcích mléka



Tabulka č. 10: Stanovené koncentrace laktózy (%)

Čas (h)	1. měření	2. měření	3. měření	průměr
0	5,38	5,94	5,86	5,73
1	5,47	5,48	5,41	5,45
2	5,59	5,93	5,94	5,82
3	5,49	5,19	5,32	5,33

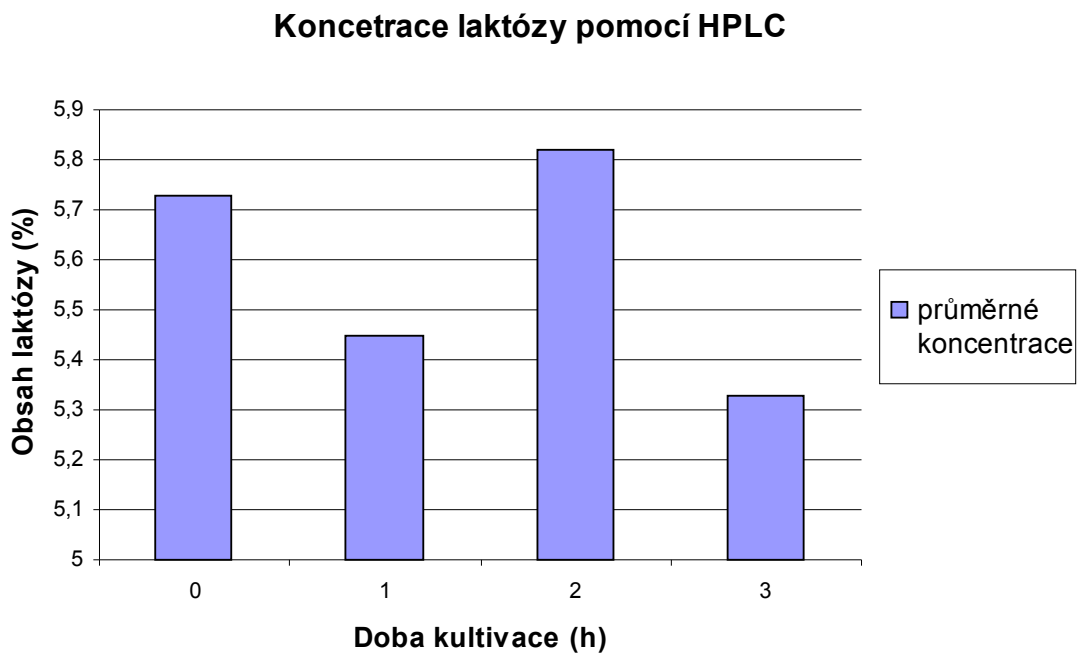
Tabulka č. 11: Stanovené koncentrace glukózy (%)

Čas (h)	1. měření	2. měření	3. měření	průměr
0	0,150	0,192	0,165	0,169
1	< 0,100	0,156	0,159	0,158
2	0,156	0,172	0,157	0,162
3	0,174	0,184	0,153	0,170

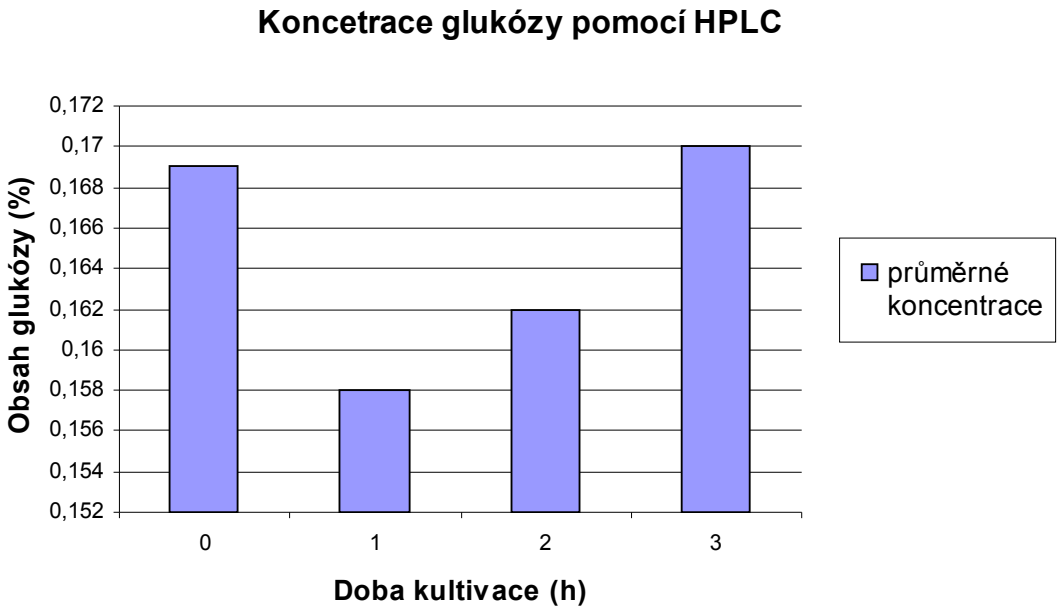
Tabulka č. 12: Stanovené koncentrace galaktózy (%)

Čas (h)	1. měření	2. měření	3. měření	průměr
0	0,193	0,183	< 0,100	0,188
1	< 0,100	0,189	0,183	0,186
2	0,166	0,207	0,209	0,194
3	0,205	0,271	0,313	0,263

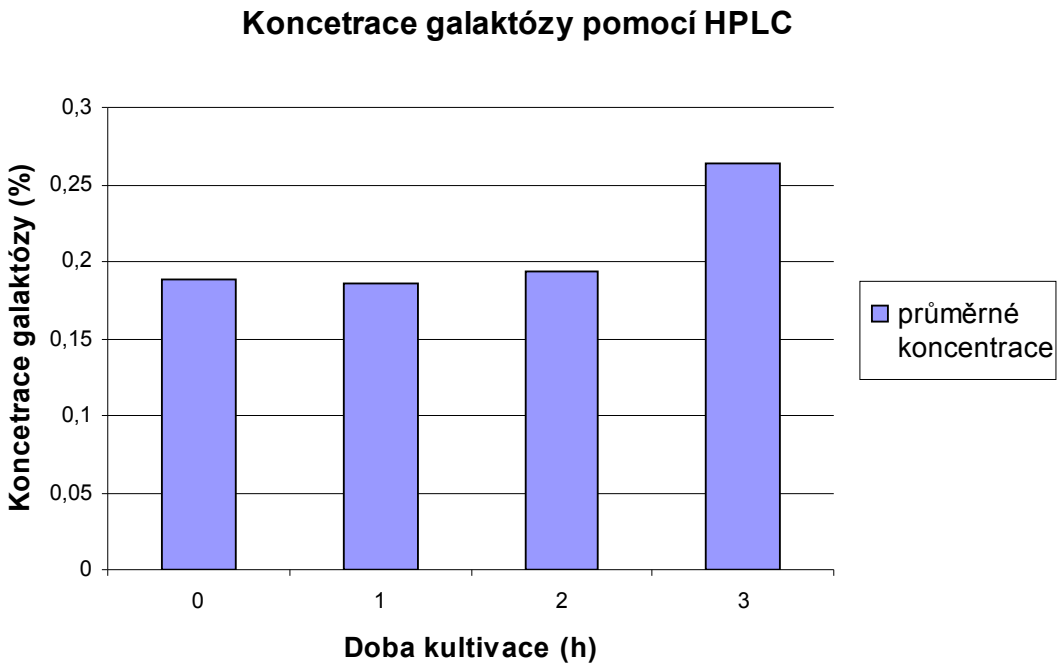
Graf č. 6: Koncentrace laktózy stanovená HPLC



Graf č. 7: Koncentrace glukózy stanovená HPLC



Graf č. 8: Koncentrace galaktózy stanovená HPLC



Metodou HPLC bylo zjištěno, že obsah laktózy kolísal v rozmezí 5,33 – 5,82 %, přičemž ve 3 hodině fermentace se projevil pokles. O celkovém obsahu glukózy a galaktózy ve vzorku fermentovaného mléka by se dalo říct, že s vyšším počtem hodin fermentace se

zvyšuje i jejich obsah. Vyšší obsahy glukózy a galaktózy byly pravděpodobně způsobeny postupným rozkladem disacharidu laktózy na monosacharidy glukózu a galaktózu.

6 Diskuze

Po fermentaci mléka sušenou jogurtovou kulturou Laktoflora^{R} a následné temperaci bylo měřeno pH vzorku a zjistila se aktivní kyselost vzorku mléka. Podle konečných hodnot zjištěných pH metrem bylo vidět, že s rostoucí dobou fermentace klesalo pH vzorku. Při 0 hodinách fermentace bylo pH 6,59 a postupně klesalo na konečných 6,04 pH při 3 hodinové fermentaci mléka.

Titrační kyselost byla zjišťována metodou podle Soxhlet-Henkela a výsledná průměrná kyselost byla zcela opačná než u měření aktivní kyselosti pH metrem. Metodou dle Soxhlet-Henkela kyselost narůstala z původních 8,05 SH na konečných 11,95 SH. Takto vysoká kyselost byla způsobena přidáním jogurtové kultury. Pomocí této metody bylo vidět, že ze vzorku plnotučného trvanlivého mléka se fermentací a kultivací v termostatu postupně stává kysaný mléčný výrobek. V porovnání s fermentovanými výrobky nebyla konečná kyselost ještě pokročilá.

Dle titrační metody podle Luff-Schoorla byl průměrný obsah bezvodé laktózy mezi 5,2 – 5,4 % a monohydrátu laktózy v rozmezí 5,4 – 5,7 %. Naměřené koncentrace laktózy touto metodou byly velice vysoké. Jelikož jde o subjektivní hodnocení bodu ekvivalence je těžké odhadnout barevný přechod a mohlo dojít k chybě v titraci.

Metodou infračervené spektroskopie se průměrné obsahy laktózy ve fermentovaném plnotučném kravském mléce značky Madeta pohybovaly v rozpětí 4,84 – 4,88 %. Na přístroji MilkoScan modul Improved Milk byly naměřeny nejnižší průměrné obsahy laktózy ve fermentovaném kravském mléce. Výsledné obsahy laktózy zjištěné touto metodou se nejvíce přibližují tvrzení Gajdůška (2003), podle kterého je v kravském mléce obsah laktózy kolem 4,8 %.

Kapalinou chromatografií byly naměřeny mnohem vyšší koncentrace laktózy než infračervenou spektroskopií na přístroji MilkoScan. Metodou HPLC dosahují koncentrace laktózy hodnot 5,3 – 5,8 %. Stejně jako u titrační metody podle Luff-Schoorla byly tyto hodnoty velmi vysoké.

Pomocí HPLC nebyla změřena jenom koncentrace laktózy, ale také koncentrace glukózy a galaktózy. Jejich koncentrace byly velmi nízké. U glukózy se pohybovaly mezi 0,15 – 0,18 %, u galaktózy byly o něco vyšší 0,18 – 0,26 %. Koncentrace glukózy a galaktózy s rostoucí dobou fermentace vzorku mléka stoupaly, naopak koncentrace laktózy klesaly z 5,73 na 5,32 %. Koncentrace glukózy byly nízké, protože v korelaci s titrační kyselostí byl vzorek ještě málo prokysaný. Koncentrace laktózy byly velmi vysoké. Důvodem může být, že standardní roztoky použité pro kalibrační křivku nebyly připraveny podle postupu pro stanovení redukujících cukrů podle Luff-Schoorla jako reálné vzorky. Proto jsou tyto hodnoty vyšší a bylo by potřeba sestavit kalibrační křivku, která bude připravena ze stejných roztoků jako reálné vzorky.

Výsledné koncentrace laktózy ve vzorcích fermentovaného mléka byly velmi variabilní podle použitých metod. Metoda podle Luff-Schoorla se zdála být jako nejméně přesná, z důvodu subjektivního hodnocení bodu ekvivalence. Koncentrace laktózy zjištěné metodou infračervené spektroskopie byly nejblíže literatuře, ale MilkoScan nepodchytí proces fermentace. Modul Improved Milk není schopen odlišit laktózu, glukózu a galaktózu. Tato metoda je vhodná pro syrové mléko, ale ne pro fermentované. Kapalinová chromatografie byla schopná zachytit proces fermentace, ale konečné výsledky byly velmi vysoké, takže by bylo potřeba provést přeměření kalibrační křivky pro stanovení laktózy.

7 Závěr

Ke stanovení kyselosti, obsahu laktózy, glukózy a galaktózy ve vzorku mléka bylo použito plnotučné trvanlivé mléko značky Madeta, které bylo před samotnými analýzami fermentováno sušenou jogurtovou kulturou Laktoflora^{R} (Milcom a.s.).

Z naměřených hodnot bylo zjištěno, že s postupující dobou fermentace vzorku mléka klesá aktivní kyselost, ale naopak stoupá titrační kyselost.

Podle Luff-Schoorla byl průměrný obsah bezvodé laktózy 5,34 % a monohydrátu laktózy 5,63 %. Nejnižší průměrná koncentrace laktózy byla naměřena pomocí přístroje MilkoScan 4,86 %, nejvyšší 5,58 % metodou HPLC.

Pomocí kapalinové chromatografie byla ve vzorku mléka zjištěna přítomnost glukózy a galaktózy. Průměrná koncentrace glukózy byla 0,165 %, u galaktózy 0,208 %.

Stanovení byla prováděna několika analytickými metodami. Aktivní kyselost byla měřena pH metrem a titrační kyselost metodou podle Soxhlet-Henkela. Koncentrace laktózy byla měřena titrační metodou podle Luff-Schoorla, infračervenou spektroskopií na přístroji MilkoScan a metodou HPLC. Pozornost byla soustředěna nejen na konečné koncentrace laktózy ve vzorcích mléka zjištěné různými metodami, ale také na postupný rozklad laktózy na glukózu a galaktózu a kyselost vzorku fermentovaného mléka.

8 Použitá literatura

CVAK Z., PETERKOVÁ L., ČERNÁ E. 1992. Chemické a fyzikálněchemické metody v kontrole jakosti mléka a mlékárenských výrobků. 1. vydání, vydal: VÚPP – Středisko potravinářských informací, Praha, 221 s.

GAJDŮŠEK S. 2003. Laktologie. 1. vydání, vydalo: Mendlova zemědělská a lesnická univerzita, Brno, 84 s.

GAJDŮŠEK S. 2002. Mlékařství II. vydal: Mendlova zemědělská a lesnická univerzita, Brno, 142 s.

GRIEGER C., HOLEC J., BURDOVÁ O., KRČÁL Z., LUKÁŠOVÁ J., MATYÁŠ Z., PLEVA J. 1990. Hygiena mlieka a mliečnych výrobkov. 1. vydání, vydalo: Vydavatel'stvo PRÍRODA, Bratislava, 397 s.

JANÁL R., BLAHOVEC J. 1974. Fyzikální vlastnosti mléka. 1. vydání, vydalo: VÚPP - středisko technických informací potravinářského průmyslu v Praze 1, 159 s.

KADLEC P., ČEPIČKA J., ČURDA L., DOSTÁLOVÁ J., FILIP V., MELZOCH K., PLOCKOVÁ M., RYCHTERA M., ŠMIDRKAL J., ŠTĚTINA J., VOLDŘICH M. 2002. Technologie potravin II. 1. vydání, vydal: VŠCHT, Praha, 236 s.

KOUŘIMSKÁ L. 2007. Úvod do mlékařství. Laboratorní cvičení. 1. vydání, vydal: ČZU, Praha, 99 s.

KRAROCHVÍL L., ZADRAŽIL K., TOMAN M. 1988. Mlékařství. 1. vydání, vydal: Vysoká škola zemědělská, Praha, 180 s.

LACHMAN J., JANKOVSKÝ M., ORSÁK M., PIVEC V. 2003. Chemie II, Organická chemie. dotisk 1. vydání z roku 2003, vydalo: ČZU Praha, 224 s.

PLOCKOVÁ M., BŘEZINA P. 1988. Mikrobiologie mléka a tuků. vydalo: VŠCHT Praha, 228 s.

SHORTT C., O'BRIEN J. 2004. Handbook of Functional Dairy Products. London: CRS Press, p. 293.

TEPLÝ M. ČERNÁ E., HAVEL F., HLADÍKOVÁ Z., KOPECKÝ J., MERGL M., SUCHÁNEK B., VÝMOLA J. 1979. Mléko a jeho produkce k průmyslovému zpracování. 1. vydání, vydalo: Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 376 s.

VELÍŠEK J. 2002. Chemie potravin II. vydání 2 upravené, vydalo: nakladatelství OSSIS, 320 s.

ZADRAŽIL K. 2002. Mlékařství. 1. vydání, vydalo: ČZU Praha a ISV Praha, 127 s.

www stránky:

www – 1: ČURDA L. Mléčné výrobky a intolerance laktózy [online], [cit. 26.1.2009]. Dostupné z <www.vscht.cz/document.php?docId=1606>

www – 2: HEJTMÁNKOVÁ A., TESAŘ V., DRAGOUNOVÁ H., TOUŠOVÁ R., LOUDA F. Obsah laktózy v mléce a vybraných mléčných výrobcích [online], [cit. 12.1.2009]. Dostupné z <www.agris.cz/etc/textforwarder.php?iType=2&iId=152778&PHPSESSID=d8>

www – 3: SAMKOVÁ Složení 1 [online], [cit. 26.1.2009]. Dostupné z <home.zf.jcu.cz/~samkova/eamos-1/slozeni1.doc>

www – 4: PERLÍN C. Minerální látky a stopové prvky [online], 4. května 2004, [cit. 14.1.2009]. Dostupné z <http://www.ordinace.cz/clanek/mineralni-latky-a-stopove-prvky/>

www – 5: Chemie mléka – enzymy [online], [cit. 26.1.2009]. Dostupné z <www.vscht.cz/tmt/studium/chemie_mleka/P407_scr.pdf>

www – 6: JELICIC I., BOTANIC R., TRATNIK L. Whey based beverages - New generation of dairy products [online], 7.-10. 2008,[1.3.2009] source: Mljekarstvo, p. 257 – 274. Dostupné z <http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=V1egNfina@icg5Pdk8A&page=1&doc=1>

www – 7: Laktose [online] [cit. 26.1.2009]. Dostupné z <http://www.edinformatics.com/math_science/science_of_cooking/Lactose_structure.gif>

www – 8: Laktóza [online], [cit. 26.1.2009]. Dostupné z <http://laktoza.navajo.cz/>

www – 9: BOHAČENKO I., PINKROVÁ J., PEROUTKOVÁ J., PECHAČOVÁ M. Fermentace směsí laktózy a laktulózy kmenem Lactobacillus acidophilus, [online] 17.4.2007 [cit. 20.1.2009]. Dostupné z <.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_11_911-915.pdf>

www – 10: Chemie mléka – Laktitol [online], [cit. 27.2.2009]. Dostupné z <www.vscht.cz/tmt/studium/chemie_mleka/P403_scr.pdf>

www – 11: Laktitol, [online] 2008, [cit. 18.2.2009]. Dostupné z < http://www.emulgatory.cz/seznam-ecek?prisada=E966>

www – 12: Mikrobiální biotechnologie pro zpracování mléka a masa [online], [cit. 26.1.2009]. Dostupné z <biochemie.upol.cz/stranky/vyuka/btc/2_Lactic.ppt>

www – 13: Bakterie mléčného kvašení [online], [cit. 26.1.2009]. Dostupné z <www.primat.cz/soubory/materialy/47/2525.pdf>

www – 14: Intolerance laktózy [online], [cit. 18.2.2009]. Dostupné z <http://www.potravinova-alergie.info/clanek/intolerance-laktoza-nesnasenlivost.php>

www – 15: SUKOVÁ I. Laktózová intolerance má původ v genech, [online] 12.6.2002, [cit. 18.2.2009]. Dostupné z
<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=148&ch=13&typ=1&val=5953>

www – 16: ETTLEROVÁ K. Alergie na kravské mléko [online]17.4.2007, [cit. 13.1.2009]. Dostupné z <www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/informace/Info_2006_15_deklas_alergie%20mleko.pdf>

Normy:

ČSN 46 7092-23 Metody zkoušení krmiv – část 23: Stanovení obsahu laktózy. 1998. Český normalizační institut, Praha, 7 s.

ČSN 57 0536 Stanovení složení mléka infračerveným absorpčním analyzátorem. 1999. Český normalizační institut, Praha, 12 s.

ČSN 57 0530 ZMĚNA Z3 Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků. 2006. Český normalizační institut, Praha, 1 s.

ČSN 57 0105/Z5 Metody zkoušení mléčných výrobků sušených a zahuštěných. 2003. Český normalizační institut, Praha, 1 s.

ČSN ISO 22662 Mléko a mléčné výrobky – Stanovení obsahu laktózy vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. 2008. Český normalizační institut, Praha, 14 s.

ČSN ISO 11869 Jogurt – Stanovení titrační kyselosti. 2008. Český normalizační institut, Praha, 9 s.

ČSN ISO 5765-1 a ČSN ISO 5765-2 Sušené mléko, sušené zmrzlinové směsi a tavené sýry – Stanovení obsahu laktózy. 2004. Český normalizační institut, Praha, 15s. a 15s.

ČSN ISO 8196-1 a ČSN ISO 8196-2 Mléko – Definice a vyhodnocení celkové přesnosti nepřímých metod pro analýzu mléka. 2002. Český normalizační institut, Praha, 13 s. a 17 s.