

## METODY SLEDOVÁNÍ ZMĚN OBSAHU LAKTOSY A DALŠÍCH ANALYTŮ BĚHEM FERMENTACE SYROVÁTKY

VERONIKA LEGAROVÁ  
a LENKA KOURIMSKÁ

*Katedra kvality zemědělských produktů, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, ČZU, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchbátka  
legarova@af.czu.cz, kourimska@af.czu.cz*

Došlo 12.8.11, přijato 22.8.11.

**Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.**

**Klíčová slova:** laktosa, syrovátka, fermentace, kapalinová chromatografie, bakterie mléčného kvašení, laktosová intolerance

### Úvod

Syrovátka má mnoho pozitivních účinků na lidský organismus. Autoři<sup>1–5</sup> se shodují, že působí detoxikačně a podporuje činnost ledvin, příznivě upravuje metabolismus, kladně ovlivňuje činnost střev, obnovuje střevní mikroflóru a dodává tělu potřebné vitaminy a minerály. Syrovátka vzniká jako vedlejší produkt při výrobě sýrů, tvarohu a kaseinu. Je to zředěný roztok laktosy, proteinů, tuku, solí a vitaminů ve vodě. Hlavní složkou syrovátky je laktosa, která tvoří 70–80 % z celkové sušiny. Laktosa musí být v těle rozštěpena na monosacharidové jednotky, aby mohla být resorbována z tenkého střeva dále do krve. Ke štěpení laktosy dochází v tenkém střevě, kde je mléčný cukr rozkládán enzymem laktasou<sup>6</sup>. Pokud se sníží nebo zcela vymizí produkce tohoto enzymu v kartáčovém lemu tenkého střeva, dochází k deficienci laktosy neboli laktosové intoleranci.

Významné zlepšení tolerance laktosy je pozorováno při konzumaci fermentovaných výrobků. To souvisí jednak se sníženým obsahem laktosy díky fermentaci, ale hlavní roli má přítomnost bakterií mléčného kvašení. Dalším důvodem, který zmírňuje projevy intolerance laktosy, je konzistence fermentovaných výrobků a jejich pomalejší průchod trávicím traktem<sup>7–9</sup>. Právě pro vysoký obsah laktosy se stává syrovátka problémem pro jedince s laktosovou intolerancí. Její fermentace různými mikrobiálními kulturami je jednou z možných řešení, jak alespoň částečně snížit obsah laktosy a zlepšit celkový sensorický profil syrovátkového výrobku.

V současné době existuje celá řada metod (ČSN 57 0105-6-1; ČSN ISO 5765; ČSN 57 0530; ČSN 57 0107; ČSN 57 0536; ČSN ISO 22662) určených pro zjišťování

obsahu laktosy a dalších sacharidů v mléce a mléčných výrobcích. Žádná z těchto metod však není určena pro stanovení sacharidů v čerstvé nebo fermentované syrovátce. Cílem této práce bylo proto najít vhodnou metodu pro sledování změn obsahu laktosy a jejích metabolitů při fermentaci syrovátky, validace takovéto metody a aplikace na reálných vzorcích.

### Experimentální část

V experimentální části byly sledovány změny obsahu laktosy a dalších metabolitů, jako je glukosa, galaktosa a mléčná kyselina, během fermentace syrovátky sušenou jogurtovou kulturou, pomocí běžně používaných metod stanovení sacharidů v mléce a mléčných výrobcích. Mezi zkoušené metody pro sledování obsahu výše uvedených látek byly vybrány: metoda stanovení redukujících cukrů podle Luffa-Schoorla, metoda ČSN 57 0536 Stanovení složek mléka infračerveným absorpčním analyzátozem (MilkoScan FT 120) a metoda stanovení obsahu laktosy a dalších metabolitů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

Metoda dle Luffa-Schoorla se pro analýzu reálných vzorků fermentované syrovátky ukázala jako ne zcela vhodná. Protože je kromě laktosy touto metodou stanovován i obsah fermentací vzniklých redukujících monosacharidů, neprojeví se při sledování procesu fermentace primární rozklad laktosy na glukosu a galaktosu, ale až jejich následná metabolická přeměna na mléčnou kyselinu.

Rovněž použití přístroje MilkoScan FT 120 s programem pro syrové mléko, který je kalibrován i pro měření laktosy, se v případě sledování změn obsahu laktosy probíhajících při jejím štěpení na glukosu a galaktosu během fermentace nejeví jako optimální. Program není schopen odlišit absorpci infračerveného záření vybraných funkčních skupin laktosy od produktů její první fáze fermentace (glukosy a galaktosy). Řešením by bylo zřejmě použití programu pro analýzu složek fermentovaných mlék, který ale bohužel není výrobcem v základní sestavě kalibrován na laktosu.

Jako optimální metoda pro sledování změn obsahu laktosy a během fermentace vznikajících metabolitů byla, v souladu s literaturou<sup>5,10,11</sup>, vyhodnocena metoda HPLC. Před vlastním měřením reálných vzorků byla nejprve validována metoda a byly zhotoveny kalibrační křivky všech sledovaných analytů. Sacharidy v mléce je možno stanovit i metodou plynové chromatografie<sup>12</sup>, která je ale z důvodu derivatizace složitější a časově náročnější.

### Validace metody HPLC

Pro interní validaci analytické metody na stanovení laktosy, glukosy, galaktosy a mléčné kyseliny byl připraven modelový roztok mléka s přidavkem glukosy (0,05 %), galaktosy (0,5 %) a mléčné kyseliny (0,1 %). Koncentrace přidávaných analytů byly zvoleny podle jejich předpokládaného množství ve vzorcích po fermentaci. Pro

Tabulka I  
Retenční časy sledovaných analytů metodou HPLC

Analyt	Retenční čas [min]
Laktosa	8,1
Glukosa	9,5
Galaktosa	10,1
Mléčná kyselina	13,3

validaci metody bylo z modelového roztoku připraveno 10 shodných vzorků, u kterých bylo provedeno číření vždy 10 g mléka, a získány číré filtráty metodou pro stanovení mléčného cukru podle Luffa-Schoorla<sup>13</sup>. Společně s validací HPLC metody byly rovněž stanoveny retenční časy sledovaných analytů, které jsou uvedeny v tab. I. Pro analýzy byl používán HPLC chromatograf Varian (pumpa Varian 9010, Autosampler 9095, detektor Varian RI-4) s analytickou kolonou AminexR HPX-87H, 300 × 7,8 mm za podmínek metody:

mobilitní fáze: 0,005M-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

průtok: 0,6 ml min<sup>-1</sup>

teplota kolony: 65 °C

detekce: RI – teplota detektoru 35 °C

dávkovací smyčka – nástřík 20 μl

Pro ověření shody získaných dat dvěma různými metodami stanovení obsahu laktosy v syrovém kravském nefermentovaném mléce byly hodnoty naměřené pomocí HPLC zároveň porovnány s normovanou metodou dle ČSN 57 0536 (cit.<sup>14</sup>) na přístroji MilkoScan FT 120. V obou případech byly provedeny 3 paralelní analýzy. Z výsledků měření, které jsou uvedeny v tab. II, je patrné, že hodnoty získané metodou HPLC jsou v dobré shodě s hodnotami získanými na přístroji MilkoScan FT 120.

#### Kalibrační křivky

Pro zjištění obsahu sledovaných analytů byly nejprve proměřeny kalibrační křivky roztoků standardů o koncentracích 2–6 % v případě laktosy, 0,01–0,20 % v případě glukosy a 0,01–1,20 % v případě galaktosy a mléčné kyseliny. Všechny připravované roztoky, stejně jako reálné

Tabulka II  
Porovnání stanovení obsahu laktosy dle ČSN 57 0536 a metodou HPLC

Metoda	Průměr [%]	min. – max. [%]	SD [%] <sup>a</sup>	U [%] <sup>b</sup>
MilkoScan	4,95	4,94 – 4,96	0,006	0,012
HPLC	4,89	4,74 – 5,01	0,12	0,24

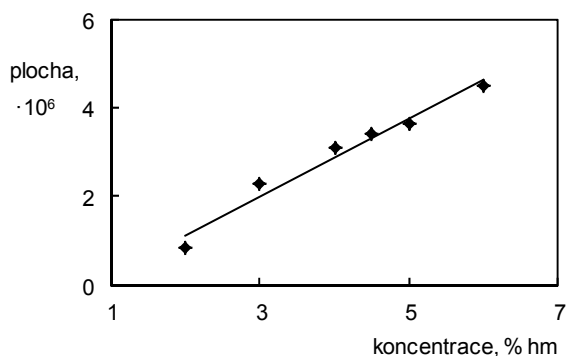
<sup>a</sup> SD = směrodatná odchylka, <sup>b</sup> U = rozšířená nejistota stanovení

vzorky, byly upraveny Carrérovými činidly. Kalibrační křivky jednotlivých analytů jsou uvedeny na obr. 1–4, vždy spolu s vypočtenou lineární rovnicí a s koeficientem determinace (R<sup>2</sup>). Všechny kalibrační křivky vykazovaly lineární přímkovou závislost ve sledovaných koncentračních rozpětích. Výsledné hodnoty koncentrací sledovaných analytů v reálných vzorcích byly uvnitř proměřených rozsahů kalibrace.

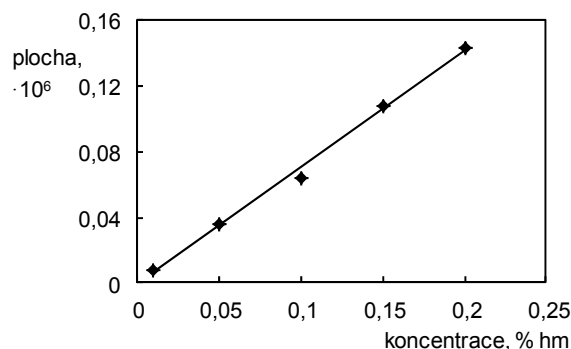
#### Měření vzorků

Po provedené validaci metody HPLC a sestavení kalibračních křivek bylo podstatou práce sledování změn obsahu laktosy a dalších vznikajících metabolitů během fermentace syrovátky sušenou termofilní jogurtovou kulturou.

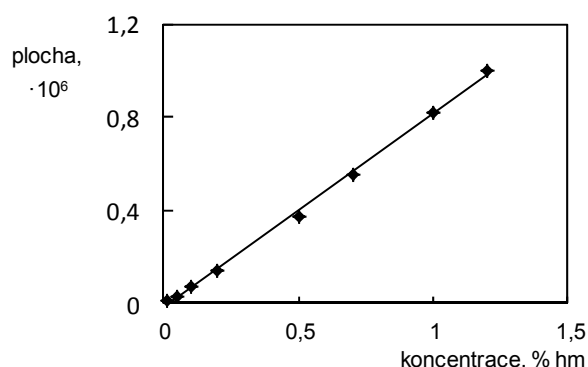
Pro sledování změn laktosy během fermentace byla jako substrát použita sušená syrovátka Lactosérum Moravia Lacto a.s., která obsahuje min. 11 % bílkovin, tuk max. 1 %, a 69,5 % laktosy. Tato syrovátka byla rozmíchána v teplé pitné vodě, v takovém poměru, aby výsledný obsah



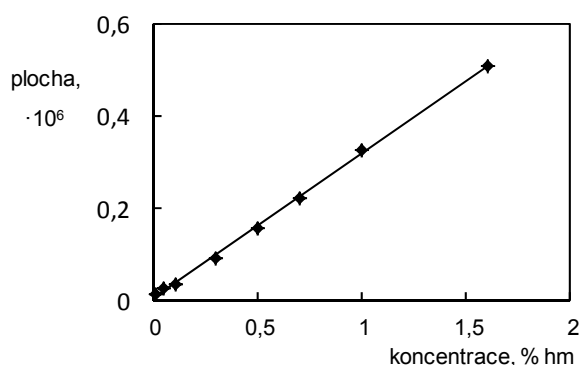
Obr. 1. Kalibrační křivky sledovaných analytů; (laktosa)  
 $y = 880918x - 628959$ ;  $R^2 = 0,9688$



Obr. 2. Kalibrační křivky sledovaných analytů; (glukosa)  
 $y = 715529x - 146,1$ ;  $R^2 = 0,9958$



Obr. 3. Kalibrační křivky sledovaných analytů; (galaktosa)  
 $y = 834389x - 16776$ ;  $R^2 = 0,9984$



Obr. 4. Kalibrační křivky sledovaných analytů; (mléčná kyselina),  $y = 315082x + 3427,9$ ;  $R^2 = 0,999$

laktosy v roztoku odpovídal reálnému obsahu laktosy v čerstvé syrovátce, který se udává okolo 4,9 % laktosy<sup>15</sup>. Stejný poměr sušené syrovátky a pitné vody použili při přípravě syrovátkových nápojů ve své práci i jiní autoři<sup>16</sup>.

Do předem označených (0, 0+, 1, 2, 3, 4) sterilních Erlenmayerových baněk bylo odměřeno 200 ml rekombinované syrovátky. Baňky s tímto roztokem syrovátky byly vloženy do vodní lázně (KAVALIER, EL-20D) a pasterovány tak, aby nedošlo k vysrážení syrovátkových bílkovin (75 °C/10 min). Vzorky určené k fermentaci byly temperovány na optimální teplotu (43 °C) a za aseptických podmínek zaočkovány (3 g sušené kultury na litr suroviny dle doporučení výrobcem) termofilní kulturou (Jogurtová kultura sušená, Milcom a. s. Laktoflora®), která obsahovala sušené mléko, laktosu a mikrobiální kmeny: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*. Při teplotě 43 °C v termostatu (Laboratorní přístroje PRAHA, Biological thermostat BT 120) byly kultivovány pouze baňky označené jako 0+, 1, 2, 3, 4 (označení vzorků souhlasí s dobou fermentace v hodinách). Baňka

označená jako „0“ byla samotná syrovátka bez přidané kultury a ihned po zchlazení (po předchozí pasteraci) byl tento vzorek analyzován. Baňka označená „0+“ byla vyhodnocena ihned po přidání kultury. Po uplynutí doby fermentace byla baňka vždy vyjmuta z termostatu a zahřáta opět na 75 °C po dobu 10 sekund z důvodu zastavení fermentace. Filtráty vzorků získané Carrezovými činidly byly poté analyzovány metodou HPLC za podmínek uvedených v kapitole Validace metody HPLC.

## Výsledky a diskuse

### Výsledky validace metody

Opakovaným měřením 10 vzorků určených pro validaci HPLC metody byly zjištěny průměr, minimální a maximální hodnota, směrodatná odchylka (SD) a rozšířená nejistota stanovení (U), vyjádřená jako dvojnásobek směrodatné odchylky (tab. III, cit. <sup>17</sup>).

Tabulka III  
 Výsledky validace HPLC metody pro jednotlivé analyty

Analyt	Průměr [%]	min. – max. [%]	SD [%] <sup>a</sup>	U [%] <sup>b</sup>
Laktosa	4,69	4,22 – 4,95	0,26	0,52
Glukosa	0,03	0,02 – 0,03	0,003	0,006
Galaktosa	0,32	0,25 – 0,36	0,03	0,06
Mléčná kyselina	0,13	0,11 – 0,15	0,01	0,03

<sup>a</sup> SD = směrodatná odchylka, <sup>b</sup> U = rozšířená nejistota stanovení

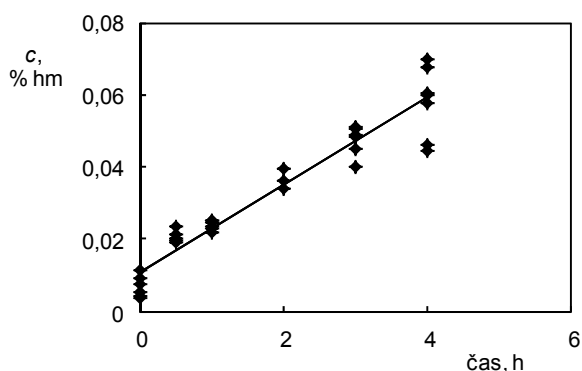
### Výsledky analýz vzorků

Během fermentace vzorků syrovátky sušenou jogurtovou kulturou došlo po přidání fermentačního média, jež je tvořeno převážně laktosou a sušeným mlékem, nejprve k nepatrnému zvýšení obsahu laktosy. V dalších intervalech pak celkově docházelo ke snižování obsahu laktosy, kdy po ukončení čtyřhodinové fermentace klesl průměrný obsah laktosy ve vzorku z původních 5,10 % na 4,35 %, tzn., že úbytek činil cca 0,75 g/100 g (tab. IV). Tento úbytek odpovídá 15 % relativních z celkového obsahu laktosy před fermentací.

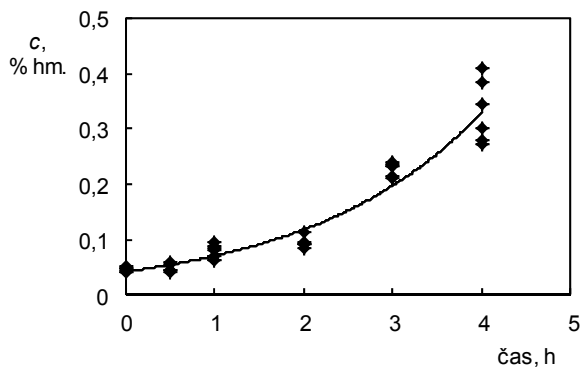
Laktosa se během fermentace štěpí na glukosu a galaktosu, dochází proto k růstu jejich obsahů ve vzorcích, což je znázorněno na obr. 5 a 6. Obsah glukosy byl na počátku analýzy 6,8 mg/100 g a po 4 hodinách fermentace se její obsah zvýšil, a to na 57,7 mg/100 g, což je více než osminásobek původního obsahu. Celkově došlo tedy k nárůstu o 50,9 mg/100 g. Obsah galaktosy má podobnou tendenci, rovněž dochází k růstu obsahu tohoto monosacharidu, a to z původních 46,1 mg/100 g na výsledných

Tabulka IV  
Sledování obsahu laktosy (%) během fermentace syrovátky jogurtovou kulturou (počet měření  $n = 6$ )

Čas [h]	Průměr [%]	SD [%]
0	5,10	0,04
0+	5,15	0,03
1	5,04	0,06
2	4,22	0,05
3	4,69	0,26
4	4,35	0,35

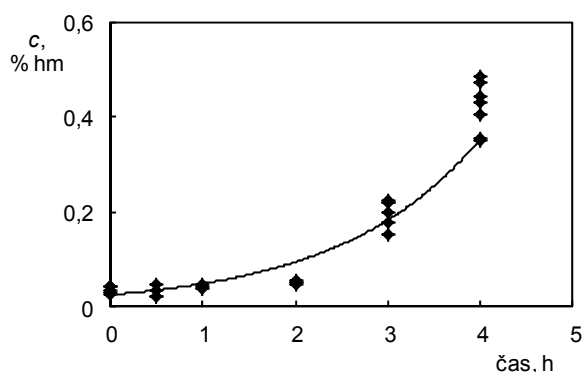


Obr. 5. Změny obsahu glukosy během fermentace syrovátky jogurtovou kulturou  
 $y = 0,0121x + 0,0109$ ,  $R^2 = 0,9201$



Obr. 6. Změny obsahu galaktosy během fermentace syrovátky jogurtovou kulturou  
 $y = 0,0423e^{0,5139x}$ ,  $R^2 = 0,9455$

331,7 mg/100 g. Z obr. 5 je patrný lineární nárůst obsahu glukosy s hodnotou spolehlivosti (koeficient determinace)  $R^2 = 0,9201$ . Změny obsahu galaktosy lze lépe aproximovat



Obr. 7. Změny obsahu mléčné kyseliny během fermentace syrovátky jogurtovou kulturou  
 $y = 0,025e^{0,6632x}$ ,  $R^2 = 0,8974$

exponenciální funkcí s hodnotou koeficientu determinace  $R^2 = 0,9455$  (obr. 6).

V další fázi fermentace byly oba monosacharidy (galaktosa po předchozí přeměně na glukosu) štěpeny na mléčnou kyselinu. Během fermentace docházelo k jejímu nárůstu z průměrné počáteční hodnoty 36,1 mg/100 g na výsledných 431,8 mg/100 g za 4 hodiny fermentace, což je více než desetinásobek původního množství. Průběh nárůstu byl opět aproximován exponenciální křivkou s hodnotou koeficientu determinace  $R^2 = 0,8974$  (obr. 7).

Zjištění úbytku laktosy, jakož i nárůst obsahů jejich meziproductů a metabolitů během fermentace syrovátky termofilními bakteriemi mléčného kvašení je ve shodě se závěry dalších autorů<sup>5,18–20</sup>.

## Závěr

Úprava vzorků syrovátky čířením dle Carreze a následná analýza zvolenou HPLC metodou se ukázaly jako vhodné pro sledování průběhu fermentace vzorků syrovátky termofilní jogurtovou kulturou (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*).

Fermentací syrovátky touto kulturou byla snížena koncentrace laktosy v rekombinované syrovátce o 15 % rel., obsah glukosy, galaktosy a mléčné kyseliny vzrostl na osmi- až desetinásobek původního množství. Zbýlý obsah laktosy po fermentaci je ale stále příliš vysoký na to, aby takovéto nápoje mohly být doporučovány osobám trpícím laktosovou intolerancí jako potraviny s nízkým obsahem laktosy. Pro tyto potraviny platí Vyhláška 54/2004 Sb. resp. Vyhláška 157/2008 Sb., o potravinách určených pro zvláštní výživu a o způsobu jejich použití, která stanovuje limit laktosy v potravinách s nízkým obsahem laktosy na 10 g  $kg^{-1}$  a bezlaktosové potraviny mohou obsahovat pouze 100 mg laktosy na 1 kg.

*Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MŠMT ČR č. MSM 6046070901.*

## LITERATURA

- Katsanos C. S., Kobayashi H., Sheffield-Moore M., Aarsland A., Wolfel R. R.: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291, 381 (2006).
- Madureira A. R., Pereira C. I., Gomes A. M. P., Pintado M. E., Malcata F. X.: *Food Res. Int.* 40, 1197 (2007).
- Jeličić R., Božanić R., Tratnik, L.: *Mljekarstvo* 58, 257 (2008).
- Zoellner S. S., Cruz A. G., Faria J. A. F., Bolini H. M. A., Moura M. R. L., Carvalho L. M. J., Sant'ana A. S.: *Aust. J. Dairy Technol.* 64, 165 (2009).
- Pescuma M., Hebert E. M., Mozzi F., Font de Valdez G.: *Food Microbiol.* 25, 442 (2008).
- Klouda P.: *Základy biochemie*. Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 2000.
- Shortt C., O'Brien J.: *Handbook of Functional Dairy Product*. CRC Press, UK 2004.
- Hamilton E., Whitney E.: *Nutrition, Concepts and Controversies*. West publishing company, Minnesota 1979.
- Čurda L.: *Potravinářská revue* 4, 19 (2006).
- Silveira W. B., Passos F. J. V., Mantovani H. C., Passos F. M. I.: *Enzyme Microb. Technol.* 16, 930 (2005).
- Vinderola C. G., Bailo N., Reinheimer J. A.: *Food Res. Int.* 33, 97 (2000).
- Cvak Z., Peterková L., Černá E.: *Chemické a fyzikálně chemické metody v kontrole jakosti mléka a mlékárenských výrobků*. VÚPP, Praha 1992.
- Davídek J. a kol.: *Laboratorní příručka analýzy potravin*. SNTL, Praha 1977.
- ČSN 57 0536: *Stanovení složení mléka infračerveným absorpčním analyzátozem*. Praha, Český normalizační institut.
- Tratnik L. J.: *Mljekarstvo* 52, 325 (2003).
- Hernandez-Mandoza A., Robles V. J., Angulo J. O., De La Cruz J., Garcia H. S.: *Food Technol. Biotechnol.* 45, 27 (2007).
- Suchánek M.: *Kvalimetrie 6. Stanovení nejistoty analytického měření*. Eurachem-ČR, Praha 1999.
- Pescuma M., Hebert E. M., Mozzi F., Font de Valdez G.: *Int. J. Food Microbiol.* 141, 73 (2010).
- Onwulata C. I., Ramkisham R., Vankineni P.: *Am. J. Clin. Nutr.* 49, 1233 (1989).
- Vesa T. H., Marteau P., Korpela R.: *J. Am. Coll. Nutr.* 19, 165 (2000).

**V. Legarová and L. Kouřimská** (*Department of Quality of Agricultural Products, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences, Prague*): **Methods of Monitoring Lactose and Other Metabolites in Whey Fermentation**

HPLC was the most suitable method for the purpose. It was used for determination of lactose, glucose, galactose and lactic acid produced by thermophilic bacteria in whey fermentation. The resulted in a substantial decrease in the lactose content. It decreased by 0.75 % after 4-h fermentation but still not sufficiently for recommendation of these drinks to people with lactose intolerance.