

REDAKČNĚ UPRAVENÁ ZPRÁVA ZA ROK 2013

Číslo projektu: QJ1210376

Název projektu:

**Kolostrum jako zdroj nových primárních produktů
v potravinách a doplňcích stravy vyznačujících se
zlepšenými dietetickými vlastnostmi a vysokým obsahem
přirozených biologicky aktivních látek.**

Téma:

Udržitelné zemědělské systémy

Priorita:

Projekt nebude využívat zvláštnosti pro zemědělství a rybolov podle článku 9. Rámce Společenství

Řešení od 1. 4. 2012 do 31. 12. 2016

Odpovědný řešitel:

doc. Ing. Ladislav Čurda, CSc.

Příjemce - koordinátor:

Vysoká škola chemicko technologická v Praze

Osnova zprávy a její součásti:

- Organizace účastníků se projektu
- Řešitelský tým
- Náklady za projekt celkem
- Přehled cílů a aktivit řešených v r. 2013
- Zhodnocení průběhu řešení
- Dosažené výsledky
- Popis uplatnění

Organizace účastnící se projektu

- Vysoká škola chemicko-technologická v Praze - příjemce koordinátor
- Výzkumný ústav mlékárenský s. r.o. - příjemce
- Betula Pendula s.r.o. - spolupříjemce
- Ingredia s.r.o. - spolupříjemce
- ZD Kojčice - spolupříjemce

Řešitelský tým

- za Vysokou školu chemicko-technologickou v Praze
 - doc. Ing. Ladislav Čurda, CSc. (odpovědný řešitel)
 - Ing. Šárka Horáčková, CSc. (člen řešitelského týmu)
 - Ing. Iveta Hrádková, Ph.D. (člen řešitelského týmu)
 - doc. Ing. Jiří Štětina, CSc. (člen řešitelského týmu)
 - Ing. Lenka Diblíková (další pracovník)
 - Ing. Erik Pešek (další pracovník)
- Výzkumný ústav mlékárenský s. r.o.
 - Ing. Petr Roubal, CSc. (řešitel)
 - MVDr. Gabriela Kunová (člen řešitelského týmu)
 - Ing. Ivana Lisová (člen řešitelského týmu)
 - Ing. Alexandra Šalaková, CSc. (člen řešitelského týmu)
 - Jana Chmúrová (ostatní osoby podílející se na řešení)
- Betula Pendula s.r.o.
 - Ing. Ladislav Smejkal (další řešitel)
 - MUDr. Radan Gocal (člen řešitelského týmu)
- Ingredia s.r.o.
 - Ing. Anna Kořozová (další řešitel)
 - Aleš Ballon (ostatní osoby podílející se na řešení)
 - Edward Ballon (ostatní osoby podílející se na řešení)
 - Ing. Markéta Vašíčková (další pracovník)
- ZD Kojčice
 - Ing. Jaromír Lisa (další řešitel)
 - Ing. Rudolf Koranda (ostatní osoby podílející se na řešení)
 - Ing. Alena Korandová (ostatní osoby podílející se na řešení)

Náklady za projekt celkem

NÁKLADY	tis. Kč	ZDROJE	tis. Kč
18. UZNANÉ NÁKLADY	3170 <i>Schváleno: 3170:</i>	MZE18 - CELKEM Z MZE	2296 <i>Schváleno: 2296</i>
19. - PŘÍMÉ NÁKLADY	2400 <i>Schváleno: 2399</i>	VRATKA18 - vrácení dotace do SR	0
19.10. - Osobní	1285 <i>Schváleno: 1285</i>	MZE19.10. Osobní z MZE	1056 <i>Schváleno: 1056</i>
19.20. - Pořízení HMM	19 <i>Schváleno: 15</i>	NZF18 - CELKEM Z NZF	874 <i>Schváleno: 874</i>
19.30. - Pořízení NHMM	0 <i>Schváleno: 0</i>	OVZ18 - CELKEM Z OVZ	0 <i>Schváleno: 0</i>
19.40. - Provoz a údržba HMM	0 <i>Schváleno: 0</i>		
19.50. - Služby	54 <i>Schváleno: 40</i>		
19.60. - Materiál	859 <i>Schváleno: 815</i>		
19.70. - Cestovné	176 <i>Schváleno: 224</i>		
19.80. - Specifické náklady	7 <i>Schváleno: 20</i>		
20. - DOPLŇKOVÉ NÁKLADY	770 <i>Schváleno: 771</i>		
30. - PŘEVOD DO fondu účelově určených prostředků	0 <i>Schváleno: 0</i>	30. - POUŽITÍ Z fondu účelově určených prostředků	

Přehled cílů a aktivit řešených v r. 2013

- C001 - Testování složení a vlastností kozího a kravského kolostra.
 - A1301 - Sledování vlivu odběru, skladování a transportu mleziva na mikrobiologickou kvalitu mleziva a obsah biologicky aktivních látek v mlezivu.
 - A1302 - Dokončení implementace analytických metod na sledování chemických parametrů mleziva.
 - A1303 - Testování mikrobiologických parametrů u kravského a kozího mleziva.
- C002 - Sledování vlivu kolostra na růst bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií
 - A1304 - Sledování vlivu mleziva na růst bakterií mléčného kvašení (BMK) a bifidobakterií.

Zhodnocení průběhu řešení

Ve druhém roce řešení projektu aktivity navazovaly na výsledky a poznatky získané v předcházejícím roce. Byly sledovány změny ve složení kravského mleziva a následných nádojů a změny při skladování sušeného mleziva. Pro některé aplikace je využitelný z hlediska obsahu imunoglobulinů i druhý nádoj, z hlediska obsahu laktoferinu třetí až šestý nádoj. Při skladování dochází majoritně k oxidačním změnám nenasycených mastných kyselin, následné oxidační produkty jsou příčinou nežádoucích sensorických změn. Byl stanoven obsah vybraných vitaminů a minerálních látek. Byl dokončen výběr a zavedení metod pro hodnocení kvality, jednak mikrobiologické, jednak s ohledem na obsah biologicky aktivních látek (imunoglobulinů, laktoferinu, oligosacharidů, laktoperoxidasy a lysozymu). Příkladem metod pro rychlou kontrolu kvality mleziva může být měření hustoty nebo indexu lomu. V oblasti zavádění metod zbývá prostor pro nalezení rychlé metody pro stanovení kozího IgG a spolehlivé metody pro sledování reziduí inhibičních látek. Byla testována mikrobiologická kvalita kravského i kozího mleziva. U kravského mleziva je srovnatelná se syrovým mlékem, kozí mlezivo vyžaduje kontrolu přítomnosti rizikových mikroorganismů. Biologicky aktivní látky mleziva ovlivňují růst laktobacilů, bifidobakterií, enterokoků, přičemž enterokoky vykazují nejlepší růstovou schopnost v kravském mlezivu, kozí mlezivo se jeví jako vhodný substrát pro některé kmeny bifidobakterií.

A1301 - Sledování vlivu odběru, skladování a transportu mleziva na mikrobiologickou kvalitu mleziva a obsah biologicky aktivních látek v mlezivu..

Byly sledovány změny ve složení mleziva a dalších 9 postupných nádojů přechodného mléka a mléka ze 7. dne po otelení u 3 dojnic. Kromě základního složení byl sledován obsah imunoglobulinů, laktoferinu. Individuální variabilita je poměrně vysoká, ve 2. a dalším dojení byl zaznamenán výrazný pokles imunoglobulinů, v některých případech může být využitelný i 2. nádoj, jeho kvalitu je však nutné ověřit. Obsah laktoferinu je v mlezivu rovněž vyšší než v mléce, avšak v prvních nádojích se ještě zvyšuje, větší pokles byl pozorován až po 7. dojení.

Byly provedeny rozbory kravského mleziva z hlediska obsahu vitaminu A a E, dále některých minerálních látek (kovů), které se podílejí na biologické aktivitě a nutriční hodnotě mleziva. Bylo zjištěno, že mlezivo obsahuje ve srovnání s mlékem v průměru 5 x vyšší koncentraci obou sledovaných vitaminů, variabilita mezi jednotlivými vzorky je však značná. Výrazně vyšší je i obsah sledovaných minerálních látek (Ca, Mg, Zn, Na, K, Cu).

Předběžné testy i praktické zkušenosti ukázaly, že po skladování sušeného mleziva zejména za vyšších teplot dochází k nepříjemným sensorickým změnám produktu. V rámci této aktivity byla proto vyvinuta metoda pro stanovení těkavých látek sušeného mleziva, která poskytuje informace o míře oxidace lipidů. Byl sledován vývoj těkavých látek (aldehydů a mastných kyselin) pomocí metody SPME (solid phase microextraction) ve spojení s GC/MSD (plynová chromatografie s hmotnostním detektorem) v průběhu skladování vzorků mleziva při 8, 25 a 37 °C. Dle očekávání byl zaznamenán nejvyšší nárůst oxidačních produktů u vzorku mleziva, které bylo skladováno při 37 °C, dále pak při 25 °C a nejnižší obsah oxidačních produktů byl zaznamenán u vzorku, který byl skladován při 8 °C. Při 8 °C docházelo ke vzniku aldehydů a k minimální následné reakci, vzniku mastných kyselin, při 25 °C docházelo k rychlejší následné reakci, obsah aldehydů se jevil jako neměnný.

Další výsledky o složení a obsahu biologicky aktivních látek (imunoglobuliny, laktoferin, lysozym, laktoperoxidasa) vzorků, které byly analyzovány v rámci zavádění nových metod, jsou uvedeny v aktivitě A1302.

A1302 - Dokončení implementace analytických metod na sledování chemických parametrů mleziva.

V rámci této aktivity byly aplikovány nejrůznější metody pro analýzu vybraných biologicky aktivních proteinů a pro základní chemický rozbor vzorků mleziva.

Pro stanovení základních chemických parametrů se ukázaly být vhodné klasické mlékárenské metody: butyrometrické stanovení obsahu tuku, vážkové stanovení sušiny, stanovení celkových bílkovin (Kjeldhalova metoda), měření pH a vodivosti. Naměřené výsledky odpovídají údajům uváděným v odborné literatuře. Průměrné hodnoty kravského mleziva: obsah tuku $4,7 \pm 2,7$ %, obsah hrubých bílkovin $13,86 \pm 3,79$ %, sušina $23,01 \pm 4,47$ %, pH 6,14, vodivost $5,02 \text{ mS.cm}^{-1}$. Obsah laktosy $42,9 \pm 24,7 \text{ g.L}^{-1}$, obsah oligosacharidů $3,4 \pm 2,1 \text{ g.L}^{-1}$, kyselina mléčná $74,7 \pm 28,5 \text{ mg.L}^{-1}$, kyselina citronová $45,9 \pm 28,5 \text{ mg.L}^{-1}$, kyselina mravenčí $43,6 \pm 6,8 \text{ mg.L}^{-1}$. Koží mlezivo: obsah tuku $7,5 \pm 1,2$ %, hrubé bílkoviny $8,24 \pm 2,24$ %, sušina $20,91 \pm 2,41$ %, pH 6,76, vodivost $5,05 \text{ mS.cm}^{-1}$. Využitelnost Milkoscanu pro analýzu základního složení je ještě nutno ověřit srovnávacími standardními rozbory.

Pro stanovení biologicky aktivních látek se osvědčilo několik poměrně rychlých a jednoduchých metod. Imunoglobuliny v kravském mlezivu lze stanovit radiální imunodifuzí, obsah IgG se pohyboval $96,2 \pm 49,7 \text{ mg.mL}^{-1}$. Nejvhodnější je analýza komerčním kitem BindingSite. RID je jednoduchá provozní metoda. Nevýhodou této metody je poměrně dlouhá doba inkubace (72h). Další poměrně rychlou provozní metodou se ukázala být SDS-PAGE

elektroforéza, pomocí této metody je možné provést rychlé vyloučení vzorků s nízkým obsahem imunoglobulinů a také provést kvantifikaci proteinu. Tato metoda je náročnější na přípravu vzorku a samotný průběh analýzy, než je tomu u RID, ale časově jde o mnohem rychlejší metodu. Nejrychlejší provozní metodou se ukázalo být měření hustoty či indexu lomu světla. Obě tyto metody jsou poměrně nenáročné jak časově, tak materiálově.

Radiální imunodifuze se osvědčila i pro stanovení laktoferinu. Průměrný obsah tohoto proteinu v kravském mlezivu se pohybuje kolem $820 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Komerční kit je však dostupný pouze pro kravský laktoferin.

Laktoperoxidasa byla stanovována spektrofotometricky normovanou ISO metodou. Jde o poměrně rychlou provozní metodu. Koncentrace aktivní laktoperoxidasy se v kravském mlezivu pohybuje kolem $245 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$; ($5,7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), v kozím mlezivu potom kolem $14,9 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$; ($0,75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Kapalinová chromatografie byla v rámci této aktivity využita jako doplňková metoda. Analýza profilu bílkovin potvrdila výsledky koncentrace laktoferinu získané radiální imunodifuzí. Koncentrace laktoferinu se dle RP-HPLC pohybuje kolem hodnot $0,76 \pm 1,26 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

V současné chvíli je kolostrum zpracováváno především od prvotetek. Spolehlivé testování přítomnosti antibiotik by umožnilo využívat i kolostrum od dojníc po zaprahování s aplikací antibiotik, tím významně rozšířit množství kolostra určené k výrobě doplňků stravy a jiným účelům. Kolostrum dojníc, které byly zaprahovány antibiotiky, je nutné odebírat každé zvlášť a kontrolovat na přítomnost RIL základním mikrobiologickým testem např. DELVOTEST. Metody používané pro mléko však mohou poskytovat falešně pozitivní výsledky. V testovaném souboru bylo 12,5 % pozitivních vzorků. Další možností, jak rozšířit zdroje kolostra, je využívání k zaprahování přírodních preparátů bez obsahu antibiotik.

A1303 - Testování mikrobiologických parametrů u kravského a kozího mleziva.

V rámci této aktivity bylo analyzováno více než 90 vzorků kravského a 270 vzorků kozího mleziva. U kravského mleziva bylo sledováno zastoupení nejčastěji se vyskytujících kontaminujících bakterií (celkový počet mikroorganismů, kvasinky a plísně, koliformní bakterie a *E. coli*, koagulasa pozitivní stafylokoky). U kozího mleziva byl navíc sledován výskyt *Listeria monocytogenes* a *Salmonella*. U žádného z testovaných vzorků kravského kolostra nebyly detekovány koagulasa pozitivní stafylokoky a u 12 vzorků byl znamenán výskyt *E. coli*. Při dodržení správného postupu odběru mleziva se celkový počet

mikroorganismů pohybuje pod 10^3 KTJ/ ml. Výskyt *E. coli* i celkový počet MO řádu 10^5 až 10^6 KTJ/ml je obvykle zaviněn lidským faktorem při odběru a skladování. Celkový počet mikroorganismů byl v kozím mlezivu o 1 až 2 řády vyšší, častý byl výskyt *S. aureus*, v ojedinělých případech se vyskytuje i *L. monocytogenes*, *Salmonella* nebyla detekována. Mikrobiologická kvalita kolostra jako vstupní suroviny pro další zpracování je velmi důležitá, protože na ošetření kolostra je nutné použít nižší pasterační teploty z důvodu zachování co nejvyššího množství biologicky aktivních látek.

A1304 - Sledování vlivu mleziva na růst bakterií mléčného kvašení (BMK) a bifidobakterií.

Cílem této aktivity sledování schopnosti růstu vybraných potencionálně probiotických kmenů laktobacilů, bifidobakterií a enterokoků v kravském a kozím kolostru, které je zdrojem biologicky aktivních látek s antimikrobiální aktivitou, jako např. lysozym, laktoferin, laktoperoxidasa a další. K testování bylo vybráno 10 vzorků kravského kolostra a dva vzorky kozího kolostra. U mikroorganismů byla sledována jejich růstová aktivita a změna pH po 24 hodinové kultivaci. Při porovnání růstové aktivity testovaných rodů (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Enterococcus*) ve vzorcích kravského kolostra byla nejvýraznější změna v nárůstu buněk i pH zaznamenána u obou testovaných kmenů enterokoků – *E. durans* CCDM 922 a *E. faecium* CCDM 945 ve všech testovaných vzorcích kravského kolostra. V kravském kolostru také velmi dobře rostly kmeny *B. bifidum* JOV a JKM, které byly izolovány ze stolice kojenců. V kozím kolostru byla nejvýraznější změna růstové aktivity i pokles pH zaznamenán u kmenů z rodu *Bifidobacterium*, především kmeny *B. bifidum* JOV a JKM, *B. adolescentis* AVNB3-P1 a *B. animalis* subsp. *animalis* CCDM 229. V kozím kolostru většina testovaných kmenů rostla lépe než v kolostru kravském až na kmeny enterokoků, jejichž růst byl přibližně o řád nižší než v případě kolostra kravského.

Dosažené výsledky

Číslo výsledku: QJ1210376/VUM/2013/1

Sledování vybraných mikrobiálních a chemických parametrů v kolostru českého červenostrakatého skotu

Cílem této studie bylo testování mikrobiologických a chemických ukazatelů kvality kravského kolostra od prvotetek i dojnic českého červenostrakatého skotu. Z mikrobiologických parametrů byly sledovány počty kvasinek, plísňů, koliformních bakterií, *E. coli*, koaguláza pozitivní stafylokoků a celkový počet mikroorganismů. Přibližně u poloviny testovaných vzorků mleziva byla detekována přítomnost koliformních bakterií a *E. coli*. Přítomnost koaguláza pozitivních stafylokoků byla zachycena především v letních měsících. Vyšší počty kvasinek a plísňů (do 1000 KTJ/ml) byly detekovány v zimním období. Celkové počty mikroorganismů odpovídaly počtům u tepelně neošetřeného mléka. U většiny vzorků byly dosaženy zvláště nízké celkové počty (pod 1000 KTJ/ml). Z chemických parametrů byl sledován obsah tuku, bílkovin, sušina, pH, vodivost a obsah vitamínů A a E. Z 36 vzorků testovaných na přítomnost reziduí inhibičních látek u tří vzorků byla prokázána rezidua ampicilinu a cloxacilinu.

Popis uplatnění

Studie přináší rozšíření znalostí o kvalitě a složení kravského kolostra od prvotetek i dojnic českého červenostrakatého skotu pro další zpracování kolostra na doplňky stravy a nové funkční potraviny.