

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Název:

Využití modifikovaných kalibračních vzorků se zvýšeným obsahem základních složek při kalibraci IR přístrojů pro kontrolu složení mléka

Autoři:

Ing. Petr Roubal, CSc. – Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.
Ing. Ondřej Elich – Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.
Ing. Martina Švejcarová – Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.
Ing. Markéta Borková, Ph.D. – Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.
Doc. Ing. Alena Hejtmánková, CSc. – Česká zemědělská univerzita v Praze
Ing. Kateřina Hejtmánková – Česká zemědělská univerzita v Praze
Ing. Vladimír Pivec, CSc. – Česká zemědělská univerzita v Praze

Uživatel:

Českomoravská společnost chovatelů a.s.

Dedikace:

Uplatněná certifikovaná metodika je výstupem z řešení výzkumného úkolu MŠMT MSM 2B08072 Nové postupy systému kontroly syrového mléka a mléčných výrobků v etapách technologického procesu výroby a finalizace a institucionální podpory na rozvoj výzkumné organizace RO0512 poskytované MZe ČR.

Praha, prosinec 2012

1. CÍL METODIKY

Dílčím cílem projektu 2B08072 podporovaného Ministerstvem školství mládeže a tělovýchovy a institucionální podpory RO0512 MZe bylo vyvinout a optimalizovat přípravu standardů s rozšířeným kalibračním rozsahem základních složek mléčné sušiny pro zajištění přesnosti měření IR analyzátorů mléka. Tato modifikace složení kalibračních vzorků umožní standardizovat proces kalibrace a zajistí zvýšení věrohodnosti výsledků při kontrole složení mléka pro účely kontroly užitkovosti, proplácení mléka a pro technologické účely v mlékařských laboratořích.

2. TEORETICKÝ ÚVOD

Měření základního složení mléka, jak pro účely proplácení, tak pro účely technologické je v současnosti realizováno převážně měřením na infračervených analyzátoch. Z hlediska přesnosti a stability měření jsou dominantní přístroje pracující ve střední oblasti infračerveného světla a využívající Fourierovu transformaci (FT-MIR). Pro zajištění správnosti měření je nutné přístroje pravidelně kalibrovat. Jelikož jsou metody FT-MIR založeny na nepřímém chemometrickém výpočtu koncentrací výsledných analytů z optických vlastností vzorku při absorpci světla v oblasti, kde absorbuje velké množství látek, jsou tyto metody vysoce závislé na matici měřených vzorků. Kalibrační vzorky je proto nutné připravovat z materiálů nejvíce podobných měřenému typu vzorků s tím, že klíčové pro kvalitu kalibrace je také zajištění dostatečné variability ve složení vzorků. Vzhledem ke krátké stabilitě mléčných materiálů se v praxi tento požadavek střetává s obtížnou zajištělností rozdílných čerstvých vzorků, ve kterých by zároveň byla zajištěna dostatečná variabilita ve složení. Proto je pozornost věnována přípravě referenčních materiálů pro MIR měření, ve kterých by bylo variability ve složení dosaženo modifikací vzorku. Takový vzorek se ovšem ve své matici liší od přirozených vzorků a je nutné ověřit jeho použitelnost.

3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

3.1 **Materiál**

Syrové mléko

Odstředěné syrové mléko

Smetana 15% tuku

Konzervační tablety - Broad Spectrum Microtabs II

(18 mg tableta obsahuje 8mg 2-bromo-2-nitropropan-1,3-diolu a 0,3 mg natamycinu)

Laktóza potravinářská PP200 MESH – (DMV – Fonterra excipients – Německo)

Bílkovinný koncentrát – koncentrát celkových mléčných bílkovin – (Armor proteines Francie)

3.2 **Přístroje a zařízení**

IR analyzátor mléka – Milkoscan FT2 – FOSS Dánsko

Šokový zchlazovač – CERVINO 10, SIRMAN Itálie

3.3 **Příprava kalibračních vzorků**

Z mlékárny se odeberou vzorky syrového nehomogenizovaného mléka, odstředěného mléka a nízkotučná smetana s cca 15% tuku. Surovina se odebere do předem vysterilovaných PE nádob (autoklávovatelné při 121°C). Při transportu je surovina umístěna do chladicího boxu a udržována při teplotě 4-8°C.

Z dovezených surovin se nejprve po promíchání odeberou vzorky a stanoví se na IR analyzátoru obsahy tuku, bílkovin a laktózy, které se použijí na výpočet podílů pro míchání kalibrační sady vzorků (n=10). Souběžně se ve vodě při teplotě 25-30°C ohřejí suroviny na teplotu 18-22°C.

3.3.1 Nejprve se namíchá 6 % smetana z 15 % smetany a 3,5 % mléka. Promíchané složky se odměří válcem a smíchají v kádince. Pak se 6 % smetana promíchá přeléváním z nádoby do nádoby (nejméně 6x). Před každým dalším použitím se musí smetana promíchat alespoň dvojím přelitím.

3.3.2 Přidávky laktózy a bílkovin se připraví rozpuštěním laktózy a bílkovinného koncentráту v 200 ml plnotučného mléka. Rozpuštění je nutné provádět nejprve v malém množství mléka (cca 20 ml), a to důkladným rozmícháním skleněnou tyčinkou. Do vzniklé hmoty kašovitě konzistence přimícháváme za stálého míchání zbytek mléka. Vzorky se za občasného míchání nechají temperovat při 30°C po dobu 60 minut a následně při 40°C dalších 60 min.

- 3.3.3 Postupně se míchají vzorky 1 - 10 (pozor u vzorků 1 - 5 na přídavek laktózy a bílkovin, nutno počítat při míchání s 200 ml plnotučného mléka, v kterém jsou rozpuštěny! U vzorků 8 a 9 nezapomenout na přídavek vody, s tímž systémem míchání, přičemž je nutno po namíchání každého vzorku nejprve odlít 100 ml do vzorkovnice na stanovení laktózy (nekonzervovaný vzorek), a pak teprve nalít zbytek do kanistru s konzervačním činidlem. Jako konzervační činidlo se použije Broad Spectrum Microtabs II v koncentraci 0,45g na litr mléka. Pro zlepšení rozpustnosti se konzervační činidlo předem namele na jemný prášek. V kanistru se vzorek několikrát s časovým odstupem promíchá, aby se rozpustilo konzervační činidlo. Příklad míchání sady vzorků pro pět přístrojů ukazuje tabulka TAB.I.

TAB. I – míchání kalibrační sady pro pět přístrojů

Vzorek	Mléko 0,03 % tuku	Mléko 3,5 % tuku	Smetana 6 % tuku	Přídavek
1	410	890		Bílk. preparát 4,70 g + 200 ml plnotučného mléka
2	200	1100		Bílk. preparát 3,13 g + 200 ml plnotučného mléka
3	110	1190		Bílk. preparát 1,057 g + 200 ml plnotučného mléka
4	20	1280		Laktóza 2,52 g +200 ml plnotučného mléka
5		1200	100	Laktóza 1,26 g +200 ml plnotučného mléka
6		1060	240	
7		930	370	
8		670	630	Voda 60 ml
9		180	1120	Voda 150 ml
10		70	1230	

Celkový objem vzorku je 1300 ml. Po rozlití do vzorkovnic získáme 3x100 ml vzorky pro analýzy chemického složení a 5x200 ml kalibrační vzorky. U vzorků s přídavky zbytek nad 1300 ml zlikvidujeme.

- 3.3.4 Z kanistru se vzorek rozlévá do tří 100 ml vzorkovnic na stanovení tuku, bílkovin a celkové sušiny, po 200 ml do několika 250 ml vzorkovnic, přičemž jejich počet závisí

na počtu kalibrovaných přístrojů. Po nalití max. 5 vzorkovnic se kanistr uzavře a jeho obsah znovu promíchá!! Tyto 250 ml vzorkovnice se ihned po naplnění uloží do předem vychlazeného šokového zchlazovače a zchladí proudem vzduchu při 2°C na 2-4°C.

- 3.3.5 Nekonzervované vzorky se použijí na enzymatické stanovení laktózy (dle IDF 79B:1991). Z konzervovaných vzorků se naváží vzorek na stanovení bílkovin dle Kjeldahla ČSN 57 0530, pak se zahřejí na 40° C a změří na IR analyzátoru. V dalších vzorcích se stanoví butyrometricky dle ČSN ISO 2446 (případně dle Rose-Gottlieba dle ČSN EN ISO 1211) tuk a celková sušina dle ČSN ISO 6731. Všechny analýzy se provádějí ve dvou paralelních stanoveních.

3.4 Parametry modifikovaných kalibračních vzorků

Modifikované kalibrační vzorky jsou připravovány ze vzorku syrového mléka získaného z velké produkční oblasti. Toto odpovídá hodnotám vzorku č.5-6. Průměrné parametry kalibračních vzorků shrnuje tabulka TAB.II.

TAB. II – Průměrné hodnoty kalibračních vzorků

Vzorek č.	TUK g / 100 g	BÍLKOV. g / 100 g	LAKTOZA g / 100 g	TPS g / 100 g
1	2,57	3,65	4,87	9,04
2	3,05	3,48	4,77	8,85
3	3,21	3,40	4,73	8,72
4	3,50	3,17	4,99	8,81
5	3,68	3,17	4,87	8,72
6	3,96	3,16	4,67	8,44
7	4,17	3,15	4,64	8,48
8	4,64	2,98	4,36	7,96
9	4,82	2,78	4,04	7,31
10	5,55	3,07	4,50	8,27

Testování linearity odezvy na modifikovaných kalibračních vzorcích, bylo provedeno na přístrojích Milkoscan FT120 (n=5). Dosažené hodnoty standardní chyby kalibrace – SEC a hodnoty korelačních koeficientů ukazuje tabulka TAB.III.

TAB. III – Parametry kalibrace

	SEC	R ²
tuk	0,0239	0,9983
bílkoviny	0,0178	0,9964
laktóza	0,0176	0,9947
TPS	0,0316	0,9971

Přípustné hodnoty SEC jsou dle ČSN 57 0536 maximálně 0,06. Průměrné hodnoty kalibrací lze považovat za výborné.

4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Pro zajištění kalibrace IR přístrojů se dosud používá tvorba kalibračních vzorků ze syrového mléka získaného ze dvou odlišných zdrojů (chovů). Získá se tím surovina o rozdílném složení základních složek mléčné sušiny (tuk, bílkovina, laktóza, sušina) a následnou kombinací těchto odlišných vstupních surovin se docílí variability ve složení jednotlivých analytů. Tento postup je závislý na momentálním stavu mléka ve vybraných chovech a zejména snaha o využití mléka s abnormálně vysokými a nízkými obsahy tuku a bílkovin (což je požadavek pro zajištění nejlepší variability ve složení vzorků) vede k možným odchylkám matrice od složení průměrného mléka. Nově navrhovaný postup na využití kalibračních vzorků s modifikovaným složením umožňuje vycházet ze směsného vzorku mléka získaného z velkého počtu chovů. Tím jsou v kalibraci zahrnuty vzorky s průměrným zastoupením jednotlivých složek mléčné sušiny. Následnou modifikací vzorků se zajistí i potřebná variabilita v základním složení vzorků, přičemž je možno zajistit standardnější kalibraci bez ohledu na změny mléka ve vybraných chovech používaných k předešlým typům kalibrací.

5. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena zejména k přípravě kalibračních vzorků pro zajištění přesnosti měření IR přístrojů při analýzách syrového mléka. Proto hlavním uživatelem jsou laboratoře pro rozbor mléka – LRM. Vzhledem k tomu, že modifikované vzorky mohou simulovat i složení technologicky zpracovaného meziprojektu v mlékárenských výrobcích, je možné využít tyto vzorky i pro kontrolu IR analyzátorů mléka v mlékárnách jak při kontrole vstupní suroviny, tak při kontrole výrobního procesu.

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Náklady na tvorbu kalibračních vzorků dle popsané metodiky jsou tvořeny zejména cenou referenčních analýz v akreditované laboratoři, personálními náklady, náklady na transport surovin a vytvořených kalibračních vzorků a v poslední řadě teprve cenou vstupní suroviny. Proto celkové náklady na modifikované kalibrační vzorky jsou shodné s původně používanou variantou.

Odhadované ekonomické přínosy nového přístupu ke kalibraci IR přístrojů vycházejí z předpokladu, že objem produkováného mléka se České republice pohybuje v posledních letech kolem hodnoty 2 600 000 tun/rok. Při odhadované průměrné ceně 8 Kč/kg se tak jedná o obchod ve výši 20,8 mld Kč. U takto vysokých částek je klíčovým faktorem důvěra smluvních stran ve správnost měření základních složek mléka. Výkupní ceny mléka jsou tvořeny dvoustrannými dohodami producentů a zpracovatelů a často obsahují kromě fixní částky na kilogram dodaného mléka též bonusy (případně postihy) za nadstandardní obsah tuku a bílkovin v mléce. Tento příplatek se pohybuje okolo 10 haléřů za navýšení tuku či bílkovin o 0,1%. V důsledku tedy může standardizovaná kalibrace vytvořená pomocí modifikovaných vzorků ušetřit v případě snížení odchylky kalibrace o 0,03 % oproti původní kalibrace ušetřit až 5 haléřů/kg mléka. Což v celkovém objemu propláceného mléka tvoří při měsíční dodávce 520 mil Kč. I za předpokladu, kdy většina dodavatelů nedosáhne na stanovené bonusy, případně je nemá ve smlouvách sjednané, se pohybuje objem plateb zemědělcům dle složení mléka v řádech deseti až stamiliónů měsíčně.

7. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Informace o plnění kvót mléka pro dodávky a přímý prodej za kvóťový rok 2012-2013 červen <http://www.szif.cz/irj/portal/anonymous/komodity/zv/01/01?lyt=zpr&year=2013&page=2&no=0>
- ČSN 57 0536 - Stanovení složení mléka infračerveným absorpčním analyzátořem
- K.E. Kaylegian, J.M. Lynch, G.E. Houghton, J.R. Fleming, D.M. Barbano: Modified Versus Producer Milk Calibration: Mid-Infrared Analyzer Performance Validation; Journal of Dairy Science, Volume 89, Issue 8, August 2006, Pages 2833–2845
- F.R. van de Voort, S. Kermasha, J.P. Smith, B.L. Mills, K.F. Ng-Kwai-Hang: A Study of the Stability of Record of Performance Milk Samples for Infrared Milk Analysis; Journal of Dairy Science, Volume 70, Issue 8, August 1987, Pages 1515–1523
- M.J.M. Rutten, , H. Bovenhuis, J.A.M. van Arendonk: The effect of the number of observations used for Fourier transform infrared model calibration for bovine milk fat composition on the estimated genetic parameters of the predicted data, Journal of Dairy Science, Volume 93, Issue 10, October 2010, Pages 4872–4882
- K.F. Ng-Kwai-Hang, J.E. Moxley, F.R. van de Voort: Factors Affecting Differences in Milk Fat Test Obtained by Babcock, Rose-Gottlieb, and Infrared Methods and in Protein Test from Infrared Milk Analysis, Journal of Dairy Science, Volume 71, Issue 2, February 1988, Pages 290-298

8. SEZNAM PUBLIKACÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍ METODICE

- Elich O., Švejcarová M., Peroutková J., Srkalová S.:Stabilita mléčných matic pro účely IR měření, Mlékařské listy 117(2009),15-18.
- Elich O., Hejtmánková A., Hejtmánková K.:Možnosti prodloužení stability mléčné matrice pro účely IR měření, Mlékařské listy 128(2011),18-20.
- Elich O., Snášelová J., Švejcarová M., Marková M., Zikán V.:Modifikovaný mléčný materiál s navýšeným obsahem bílkovin a laktózy určený pro kontrolu měření infračervených analyzátořů mléka. Užitečný vzor č.23502 - 8.3.2012

9. OPONENTI

Oponent ze státní správy:

MVDr. Jiří Hlaváček
Státní veterinární správa ČR
Slezská 7
120 56 Praha 2

Oponent z oboru:

doc. Ing. Lenka Kouřimská, Ph.D.
Česká zemědělská univerzita v Praze
Kamýcká 129
165 21 Praha 6

V Praze dne 3.12.2012

.....
Ing. Petr Roubal, CSc
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.