

Laktulosa v tržních druzích mlék

LENKA VORLOVÁ - MIRIAM SMUTNÁ - ALENA HALAMÍČKOVÁ

SOUHRN. Ve vzorcích mlék z tržní sítě české provenience byl stanoven obsah laktulosity jako indikátora tepelného ošetření mléka. U jednotlivých druhů mlék byly koncentrace laktulosity signifikantně rozdílné ($P < 0,01$). Velmi nízký obsah (blízko detekčního limitu metody) byl u mléka vysoce pasterovaného ($35,5 \pm 9,7$ mg.l⁻¹). Nízký byl také obsah u mléka sušeného ($229,7 \pm 69,5$ mg.kg⁻¹). U UHT mlék nebyl obsah laktulosity závislý ani na obsahu tuku, ani na obsahu laktosy. Všechny vzorky měly koncentraci laktulosity pod limitem k rozlišení UHT a sterilovaných mlék. Sterilovaná (kondenzovaná) nenařezaná mléka měla mimořádně vysoký obsah laktulosity ($2451,3 \pm 156,8$ mg.l⁻¹).

KLÍČOVÁ SLOVA: laktulosa; tepelné ošetření mléka; enzymová metoda

Důležitým a nezbytným technologickým zákrokem u mléka je jeho tepelné ošetření. Od charakteru tohoto zákroku se odvíjí nejen údržnost, ale i rozsah změn ovlivňujících nutriční hodnotu. Proto je důležité jednoznačně odlišit termického ošetření konzumního mléka.

Pro analytickou kontrolu přicházejí do úvahy látky, které jsou zahrátím mléka odbourávány nebo denaturovány, např. thiamin nebo syrovátkové proteiny. Avšak použití těchto indikátorů je v mnoha případech omezeno neznalostí výchozího stavu těchto komponentů. Další možností je stanovení reakčních produktů vznikajících při zvýšené teplotě reakcemi přítomné laktosy. Nejdůležitější z těchto sloučenin je produkt hydrolýzy laktulosolysinu - furosin a epimer laktosy - laktulosa [1,2].

Furosin jako meziprodukt Maillardovy reakce vzniká přednostně při nízké aktivitě vody, která je charakteristická např. pro sušené mléčné výrobky. Naopak při vyšší aktivitě vody, např. u UHT mléka nebo sterilo-

MVDr. Lenka VORLOVÁ, PhD., Prof. MVDr. Miriam SMUTNÁ, CSc., RNDr. Alena HALAMÍČKOVÁ, Ústav biochemie a biofyziky, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Česká republika.
Korešpondující autor: MVDr. Lenka VORLOVÁ, PhD., e-mail: vorloval@vfu.cz

vaného bude primárně vznikající látkou v závislosti na tepelném ošetření disacharid laktulosa (4-O- β -D-galaktopyranosyl-D-fruktosa).

Laktulosa může vzniknout v mléce dvojitým způsobem. Jednak Lobry de Bruyn-Alberda van Ekensteinovým přesmykem za alkalické epimerace laktosy a jednak štěpením produktů Amadoriho přesmyku (laktulosoaminů) např. laktulosolysinu, které vznikly v reakci laktosy s volnými aminoskupinami mléčných proteinů, zvláště lysinu [2,3]. Vzhledem k tomu, že produkty Amadoriho přesmyku jsou velmi stabilní, je Lobry de Bruyn-Alberda van Ekensteinový přesmyk považován za jedinou možnou cestu vzniku laktosy v mléce. Pro tuto cestu mluví mnoho činitelů, ovlivňujících kinetiku této reakce, např. vysoká koncentrace původního substrátu vzhledem k malé koncentraci vznikajícího produktu. Jako katalyzátory se na reakci podílí fosfáty a citráty.

Mezinárodní mlékařská federace (IDF) a EU přijaly koncentraci laktulosity a nedenaturovaného β -laktoglobulinu jako indikátory k odlišení UHT mléka od mléka sterilovaného. Pro laktulosu je navrhována hranice 600 mg na 1000 ml mléka [2,4,5].

Pro stanovení obsahu laktulosity v tepelně ošetřeném mléku lze použít chromatografii na tenké vrstvě [6], plynovou chromatografii [7], kapalinovou chromatografii [8] resp. kapalinovou chromatografii s pulsní ampérometrickou detekcí [9] a enzymovou spektrofotometrickou metodu [10]. Metodou doporučenou ISO a IDF je metoda stanovení pomocí HPLC s refraktometrickou detekcí [5,11].

Laktulosa kromě toho, že je indikátorem tepelného ošetření mléka, je také produkována ve světě v množství 20000 tun ročně. Je růstovým faktorem pro bifidobakterie a řadí se tedy mezi významná probiotika. Díky enzymorezistentní $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidické vazbě ve své molekule je nízkoenergetická. Současně vykazuje laxativní účinky a používá se v případech léčby systémové encephalopathie. Laktulosu lze používat jako potravinářskou přísadu do široké škály výrobků [12].

Materiál a metody

V práci byla stanovena koncentrace laktulosity u sortimentu mlék českých výrobců v tržní síti (rok 2000). Celkem bylo analyzováno 37 vzorků mlék v tomto zastoupení: UHT mléka s obsahem tuku max. 0,5 % ($n = 9$), s obsahem tuku 1,5 % ($n = 9$), s obsahem tuku 3,5 % ($n = 8$) od šesti výrobců. U čtyř výrobců se podařilo získat mléka všech tří výše zmíněných obsahů tuku současně. UHT mléka byla nakoupena tak, aby doba ohraničená dobou

nákupu a datem minimální trvanlivosti činila tři měsíce. Všechny vzorky UHT mlék byly baleny v kartonovém obalu. Při jejich výrobě byl použit nepřímý ohřev.

Sterilovaná (kondenzovaná) mléka byla zastoupena dvěma vzorky s obsahem tuku 7,5 % a dvěma vzorky s obsahem tuku 9,0 %. Vzorky pocházely od tří výrobců. Jeden vzorek s obsahem tuku 9,0 % byl ve skleněné láhvi, ostatní vzorky sterilovaných mlék byly zabaleny v plechovkách.

Čtyři vzorky vysoce pasterovaných mlék byly zastoupeny dvěma vzorky s obsahem tuku 1,5 % a dvěma vzorky s 3,5 % tuku, každý vzorek pocházel od jiného výrobce a všechny byly baleny v kartonovém obalu.

Sušená mléka pocházela od jednoho výrobce a byla zastoupena třemi vzorky (obsah tuku 1,3 %, 13,6 % a 26 %). Sušená a sterilovaná mléka byla před analýzou obnovena ředěním vodou dle návodu výrobce.

Všechny vzorky mlék byly do doby analýzy skladovány při teplotě 3 ± 1 °C.

Stanovení obsahu laktulosity bylo provedeno enzymovou metodou [13]. Vzorek dobře promíchaného a naředěného mléka v objemu 10,00 ml byl deproteinován přidávkem 1,75 ml roztoku hexakynoželeznanu draselného a síranu zinečnatého. Po přidávku 6,5 ml fosfátového tlumivého roztoku pH = 7,5 byl roztok zfiltrován. Poté bylo k 5,0 ml filtrátu přidáno 50 μ l enzymu β -D-galaktosidasy. Směs byla inkubována přes noc (nejméně však 10 hodin) při teplotě 40 °C. Následně byl k roztoku přidán TRIS - tlumivý roztok pH = 7,6 a inkubován 3 h při teplotě 40 °C s přidávkem 0,1 ml roztoku glukosooxidasy, 0,5 ml NaOH, 0,050 ml peroxidu vodíku a 0,1 ml katalasy. Po filtraci byl pro stanovení laktulosity použit enzymový set pro analýzu potravin D-Glucose/D-Fructose (fy Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, SRN) [14]. Tato souprava je založena na sledu enzymových reakcí vedoucí k fosforečným esterům glukosy a fruktosy. Ty jsou pomocí enzymu glukosa-6-fosfátdehydrogenasy a potřebného koenzymu nikotinamidadenin-dinukleotidfosfátu (NADP) oxidovány a přírůstek zredukovaného koenzymu NADPH je registrován při 340 nm pomocí jednopaprskového spektrofotometru Lambda 11 (fy Perkin Elmer, San Jose, USA).

Současně byla u všech vzorků stanovena laktosa dle ČSN 57 0530 [15]. Vzorek byl deproteinován 5 ml roztoku hexakynoželeznanu draselného a síranu zinečnatého. Po filtraci byl čirý filtrát vytemperován na 20 °C a úhel stočení roviny polarizovaného světla byl stanoven na kruhovém polarimetru P 1000 (fy A-Krüß Optronic GmbH, Hamburg, SRN).

Výsledky byly statisticky zpracovány programem STAT Plus, vypočítáním základních kvalitativních znaků (průměr, směrodatná odchylka), použitím korelační analýzy a Studentova t-testu [16].

Výsledky a diskuse

Výsledky stanovení obsahu laktulose v jednotlivých tržních druzích mlék jsou sumarizovány v tab. 1. Průměrný obsah laktulose ve vysoce pasterovaném mléce ($n = 4$) od různých výrobců byl $(35,5 \pm 9,7)$ mg.l⁻¹. Jeden vzorek měl koncentraci pod mezí detekce. Naše výsledky jsou vyšší než uvádí Akalin a Gonc [17], kteří stanovili pomocí plynové chromatografie v pasterovaném mléce hodnoty laktulose od 12 mg.l⁻¹ do 19 mg.l⁻¹. Naopak Nangpal [18] v pasterovaném mléku německé provenience pomocí enzymové metody neprokázal přítomnost laktulose. Rozdíly, případně nulové hodnoty mohou být způsobeny rozdílnou teplotou pasterace, která není u citovaných autorů uvedena. Enzymová metoda vzhledem k nižšímu detekčnímu limitu (10 mg.l⁻¹) je vhodnější pro odlišení pasterovaného mléka od UHT mléka než metoda HPLC (detekční limit 50 mg.l⁻¹) [19].

Obsah laktulose v UHT mléce byl stanoven u 26 vzorků. U odtučněných UHT mlék byl obsah laktulose $(351,4 \pm 126,1)$ mg.l⁻¹; u polotučných $(308,8 \pm 52,1)$ mg.l⁻¹ a u plnotučných $(350,6 \pm 51,0)$ mg.l⁻¹. Závislost mezi obsahem tuku a laktulose v mléce vyjádřená korelačním koeficientem není statisticky významná ($r = 0,0320$). Tato skutečnost souhlasí s výsledky studie Andrews [3]. Přesto při testování rozdílů v obsahu laktulose u UHT mlék

TAB. 1. Obsah laktulose ve vzorcích mlék.

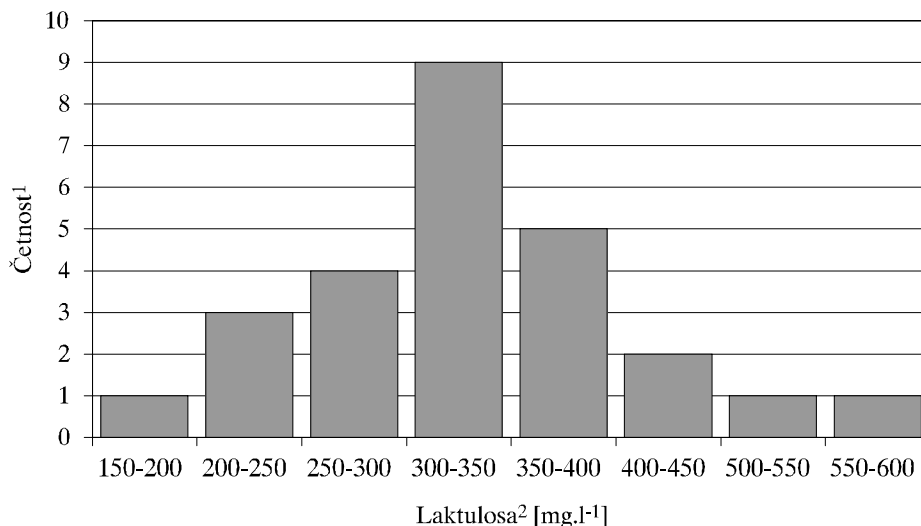
TAB. 1. Lactulose content in milk samples.

	Laktulosa ¹							
	Pasterované mléko ²	UHT mléko ³			Kondenzované mléko ⁴		Sušené mléko ⁵	
		Tuk ⁶			obnovené ⁷	původní výrobek ⁸	obnovené	původní výrobek
		0,5 %	1,5 %	3,5 %				
	[mg.l ⁻¹]	[mg.l ⁻¹]			[mg.l ⁻¹]		[mg.l ⁻¹]	[mg.kg ⁻¹]
n	4	9	9	8	4	4	3	3
m	35,5	351,4	308,8	350,6	964,1	2451,3	29,5	229,7
s	9,7	126,1	52,1	51,0	97,3	156,8	10,9	69,5
min.	22,2	155,7	213,5	278,4	813,5	2254,6	18,5	144,5
max.	45,1	594,9	390,2	426,0	1084,8	2691,7	40,5	314,8

n - počet vzoriek, m - priemer, s - štandardná odchýlka.

n - number of samples, m - mean, s - standard deviation.

1 - lactulose, 2 - pasteurized milk, 3 - UHT milk, 4 - condensed milk, 5 - dried milk, 6 - fat, 7 - reconstituted, 8 - original product.



OBR. 1. Četnost rozdělení obsahu laktulosity ve vzorcích UHT mlék.

FIG. 1. Frequency distribution of lactulose content in the UHT milk samples.

1 - frequency, 2 - lactulose.

s rozdílným obsahem tuku (0,5; 1,5; 3,5 %) jsme zjistily statisticky významně nižší obsah laktulosity u mlék polotučných oproti mlékům plnotučným ($P < 0,05$).

Na obr. 1 je znázorněn histogram četnosti zastoupení jednotlivých koncentrací laktulosity ve vzorcích UHT mléka. Z grafu je zřejmé, že obsah laktulosity jeví normální rozdělení s největší četností vzorků s koncentrací laktulosity 300–350 mg.l⁻¹. V porovnání s IDF navrhovanou hranicí 600 mg.l⁻¹ byly všechny vzorky pod tímto limitem (kromě jednoho vzorku vitaminizovaného mléka, který se limitní hodnotě blížil). Pro porovnání výsledků obsahu laktulosity ve vzorcích UHT mlék z české tržní sítě je k dispozici studie autorů Bohačenko a kol. [5]. Uvedení autoři použili k analýze mlék ve své studii metodu HPLC s refraktometrickou detekcí. U analyzovaných UHT mlék s rozdílným obsahem tuku se hodnoty laktulosity u těchto autorů pohybovaly v rozmezí 250–640 mg.l⁻¹ (v průměru 365 mg.l⁻¹). U našich komerčních vzorků UHT mlék (enzymová metoda) jsme zjistily koncentrace v rozsahu 156–595 mg.l⁻¹ (v průměru 337 mg.l⁻¹) při sumarizaci všech výsledků dosažených pro UHT mléka. To v případě interpretace našich výsledků odpovídá hodnotám doporučeným pro odlišení UHT mlék od mléka sterilovaného, které byly navrženy IDF a EU (600 mg.l⁻¹).

Nárůst koncentrace laktulosy v závislosti na teplotě jsme neověřovaly, ale z literatury je známo, že obsah laktulosy v UHT mléce stoupá v závislosti od teploty skladování. Při teplotě 20 °C je týdenní přírůstek koncentrace laktulosy 0,2 mg/100 g mléka. Je tedy zřejmé, že změny obsahu laktulosy v průběhu skladování mléka budou minimální [2]. Až na dva vzorky by tedy námi analyzovaná UHT mléka po vypršení data minimální trvanlivosti nedosáhla hranice 600 mg.l⁻¹.

Průměrný obsah laktulosy ve sterilovaných (kondenzovaných) mlécích (n = 4) byl výrazně vyšší a činil u mlék obnovených dle návodu výrobce (964,1 ± 97,3) mg.l⁻¹ (rozmezí 813–1085 mg.l⁻¹) a v původním výrobku (2451,3 ± 156,8) mg.l⁻¹. Naše výsledky v obnoveném mléce korespondují s výsledky Boháčenka a kol. [5], kteří pomocí HPLC zjistili obsah laktulosy v rozmezí 835–1258 mg.l⁻¹.

Průměrný obsah laktulosy v sušených mlécích (n = 3) byl nízký (29,5 ± 10,9) mg.l⁻¹ u mlék naředěných dle návodu výrobce a (229,7 ± 69,5) mg.kg⁻¹ v původním výrobku. To je v souladu s literárními údaji, které udávají, že při nízké aktivitě vody, která je charakteristická např. pro sušené mléčné výrobky, vzniká při vyšší teplotě přednostně furosin jako meziprodukt Maillardovy reakce [1]. Naše výsledky v obnovených sušených mlécích jsou přibližně poloviční ve srovnání s výsledky Boháčenka a kol. [5].

TAB. 2. Obsah laktosy ve vzorcích mlék.

TAB. 2. Lactose content in milk samples.

	Laktosa ¹							
	Pasterované mléko ²	UHT mléko ³			Kondenzované mléko ⁴		Sušené mléko ⁵	
		Tuk ⁶			obnovené ⁷	původní výrobek ⁸	obnovené	původní výrobek
		0,5 %	1,5 %	3,5 %				
	[g.l ⁻¹]	[g.l ⁻¹]			[g.l ⁻¹]		[g.l ⁻¹]	[g.kg ⁻¹]
n	4	9	9	8	4	4	3	3
m	47,8	49,0	48,2	48,4	38,8	99,4	56,5	441,3
s	1,1	1,2	0,8	1,1	0,4	14,6	6,6	51,8
min.	41,9	46,2	46,6	46,8	35,4	87,8	47,5	370,7
max.	50,0	50,1	49,5	49,9	44,9	124,4	63,2	493,8

n - počet vzoriek, m - priemer, s - štandardná odchýlka.

n - number of samples, m - mean, s - standard deviation.

1 - lactose, 2 - pasteurized milk, 3 - UHT milk, 4 - condensed milk, 5 - dried milk, 6 - fat, 7 - reconstituted, 8 - original product.

Po statistickém zpracování výsledků je možno konstatovat, že jednotlivé druhy mlék se v obsahu laktulosity od sebe statisticky vysoce významně lišily ($P < 0,01$).

Vedle laktulosity byl u všech vzorků mlék stanoven obsah laktosy. Výsledky stanovení obsahu laktosy jsou sumarizovány v tab. 2. Laktosa je vůči laktulose ve všech druzích mlék ve velkém přebytku a vzhledem k námi dosažené statisticky nevýznamné korelační závislosti mezi těmito sacharidy ($r = 0,0018$) je zřejmé, že její obsah v mlécích nemá vliv na koncentraci vznikající laktulosity.

Práce byla financována z prostředků Vědeckovýzkumného záměru MŠMT č. 162700005.

Literatura

1. CORZO, N. - DELGADO, T. - TROYANO, E. - OLANO, A.: Ratio of lactulose to furosine as indicator of quality of commercial milks. *Journal of Food Protection*, 57, 1994, s. 737-739.
2. CLAWIN-RÄDECKER, I. - KUHLMANN, B. - WEISS, G. - KLOSTERMEYER, H. - SCHLIMME, E.: Lactulosegehalt in UHT-Milchen des Handels. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 44, 1992, s. 121-141.
3. ANDREWS, G. R.: Distinguishing pasteurized, UHT and sterilized milks by their lactulose content. *Journal of Society of Dairy Technology*, 37, 1984, s. 92-95.
4. MOSCONE, D. - BERNARDO, R. A. - MARCONI, E. - AMINE, A. - PALLESCHI, G.: Rapid determination of lactulose in milk by microdialysis and biosensors. *The Analyst*, 124, 1999, s. 325-329.
5. BOHAČENKO, I. - ZÁMEČNÍKOVÁ, I. - VESELÝ, Z.: Průkaz způsobu tepelného ošetření mléka. *Mlékařské listy*, 60, 2000, s. 18-22.
6. MARTINEZ-CASTRO, I. - OLANO, A.: Ready detection of small amounts of lactulose in dairy products by thin-layer chromatography. *Chromatographia*, 14, 1981, s. 621-622.
7. MARTINEZ-CASTRO, I. - CALVO, M. M. - OLANO, A.: Chromatographic determination of lactulose. *Chromatographia*, 23, 1987, s. 132-136.
8. PARRISH, F. W. - HICKS, K. - DONER, L.: Analysis of lactulose preparations by spectrophotometric and high performance liquid chromatographic methods. *Journal of Dairy Science*, 63, 1980, s. 1809-1814.
9. CATALDI, T. R. I. - ANGELOTTI, M. - BUFO, S. A.: Method development for the quantitative determination of lactulose in heat-treated milks by HPAEC with pulsed amperometric detection. *Analytical Chemistry*, 71, 1999, s. 4919-4925.
10. GEIER, H. - KLOSTERMEYER, H.: Enzymatische Bestimmung von Lactulose. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 171, 1980, s. 443-445.
11. BURTON, H.: Bacteriological, chemical, biochemical and physical changes that occur in milk at temperatures of 100–150 °C. Document No. 157. In: *Bulletin of the International Dairy Federation*. Brussels : International Dairy Federation, 1983, s. 3-16.
12. POHLOVÁ, M.: Laktulóza. *Informace o světovém potravinářství*, 20, 1997, s. 16-17.
13. Deutsche Norm DIN 10 461. Bestimmung des Lactulosegehaltes von Milch. 1990.

14. Boehringer Mannheim GmbH., Mannheim, SRN: Methoden der enzymatischen Lebensmittelanalyse. 1995. 157 s.
15. ČSN 57 0530. Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků. Praha : Úřad pro normalizaci a měření, 1974.
16. MATOUŠKOVÁ, O. - CHALUPA, J. - CÍGLER, M. - HRUŠKA, K.: STAT Plus - uživatelská příručka. Brno : Výzkumný ústav veterinárního lékařství, 1992. 168 s.
17. AKALIN, A. S. - GONC, S.: Lactulose and 5-HMF contents in market milks. *Milchwissenschaft*, 52, 1997, s. 377-380.
18. NANGPAL, A.: Bildung von Lactulose und Furosin in Vollmilch während des Ultrahocherhitzens. [Dizertační práce.] Kiel, 1988. 152 s. Universität Kiel SRN.
19. DE BLOCK, J. - MERCHERS, M. - VAN RENTERGHEM, R. - MOERMANS, R.: Evaluation of two methods for the determination of lactulose in milk. *International Dairy Journal*, 6, 1996, s. 217-222.

Do redakcie došlo 22.11.2001.

Lactulose in market milks

VORLOVÁ, L. - SMUTNÁ, M. - HALAMÍČKOVÁ, A.: *Bull. potrav. Výsk.*, 41, 2002, p. 51-58.

SUMMARY. Lactulose content as an indicator of heat treatment of milk was determined in samples of various kinds of milk of Czech provenience. The content of lactulose differed significantly ($P < 0.01$) among various kinds of milk. A very low content (35.5 ± 9.7 mg.l⁻¹, close to the detection limit of the method, was found in highly pasteurized milk (pasteurized at high temperature). Low lactulose content was also found in dried milk (229.7 ± 69.5) mg.kg⁻¹. In UHT milk samples, the lactulose content was dependent neither on lipid nor on lactose contents. Lactulose concentrations were at all samples below the limit necessary for differentiation of UHT from the sterilized milk. Lactulose content was markedly high (2451.3 ± 156.8) mg.l⁻¹ in sterilized (condensed) undiluted milk samples.

KEYWORDS: lactulose; thermal processing; enzymic techniques