

Tab. 1 Účinnost desinfekčních prostředků na vitalitu buněk biofilmu

Nárůst po 22 hodinách (% ΔA_{620})		Doba působení (min)				
Desinfekční prostředek	Způsob aplikace	0	1	5	10	30
Merades Alco	aplikace do suspenze	100,0%	1,3%	0,4%	0,4%	0,2%
	aplikace na biofilm	100,0%	0,0%	0,2%	0,1%	0,1%
50% ethanol	aplikace do suspenze	100,0%	1,0%	2,4%	4,4%	2,2%
	aplikace na biofilm	100,0%	0,6%	0,8%	0,5%	0,4%

jev byl zřejmě způsoben vazbou Merades Alco na strukturu biofilmu. V případě aplikace přímo na biofilm docházelo k jeho částečnému odstranění, ale až po 30 minutách působení. U 50% ethanolu docházelo k podobné situaci.

Zajímalo nás, zda biofilm ošetřený desinfekčním prostředkem je vitální. Proto jsme po obou způsobech aplikace testovaný prostředek odstranili a do jamek vnesli stejné medium, které tam bylo předtím. Po 22 h inkubace při 25 °C jsme měřili kvantitu nárůstu buněk. Výsledky, které jsou shrnuty v tab. 1., ukazují vyšší účinnost přípravku Merades Alco před 50% ethanolom. Míra nárůstu ΔA_{620} při neošetření desinfekčním prostředkem byla průměrně rovna 1,383. K této hodnotě byly poté procentuálně vztaheny míry nárůstu ΔA_{620} při ošetření jednotlivými desinfekčními prostředky. Technika měření množství biofilmu pomocí krystalové violeti, kterou jsme použili, neumožňuje rozlišení mrtvé a živé biomasy. Pouze postupy, kde je možno měřit vitalitu buněk následnou kultivací, prokázaly vysokou účinnost použitých desinfekčních prostředků.

Závěr

Potvrdili jsme, že zvolená metoda podle Djordjevice je vhodná pro kvantitativní hodnocení tvorby biofilmu u *Listeria monocytogenes*. Průmyslový izolát za testovaných podmínek tvořil biofilm lépe. Proto byl použit jako modelový kmen pro hodnocení účinku dvou desinfekčních prostředků. Jako vhodná metoda pro hodnocení účinku desinfekčních prostředků na odstranění biofilmu se jevila technika barvení biofilmu krystalovou violetí. Pro průkaz inaktivace (devitalizace) *Listeria monocytogenes* v biofilmu je třeba použít kultivačních metod.

Poděkování

Tato práce vznikla díky finanční podpoře projektu MŠMT 2B08050 a 6.FP EU Biotracer.

Přijato do tisku: 20. 12. 08

Lektorováno: 10. 1. 09

Literatura

- Borucki M.K., Peppin J.D., White D., Loge F., Call D.R.: Appl. Environ. Microbiol. 69, 7336-7342 (2003).
 Djordjevic D., Wiedman M., McLandsborough L.A.: Appl Environ. Microbiol. 68, 2950-2958 (2002).
 Kalmokoff M.L., Austin J.W., Wan X.-D., Sanders G., Banerjee S., Farber J.M.: J. Appl. Microbiol. 91, 725-734 (2001).
 Lindsay, D., von Holy A.: Food Microbiol. 22, 285-307 (1997).
 Poulsen, V.L.: Lebensm.-Wiss.U.-Technol. 32, 321-326 (1999).
 Tompkin, R.B., Scott V.N., Bernard D.T., Sveum W.H., Gombas K.S.: Food Environ. Sanit. 19, 551-562 (1999).

VLIV OBSAHU *PROTOTHECA ZOPFII* A *CANDIDA LUSITANIAE* NA KVALITU SYROVÉHO MLÉKA

Seydlová R.¹, Snášelová J.¹, Soukupová A.²

¹ Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o.

² Veterinární laboratoř, VEDIA s.r.o.

Abstrakt

Studie z období 2004-2007 shrnuje výsledky negativního působení dvou mastitidních patogenů kvasinky *Candida lusitaniae* a řasy *Prototheca zopfii* na biochemické změny v syrovém mléce. Přítomnost těchto patogenů v mléce může být důsledkem probíhajících mykotických mastitid u dojnic. Přídavek takového mléka k mlékárensky zpracovávané surovině navzdory pasteračnímu efektu má významný vliv na změny bílkovin, tuku, obsahu močoviny a laktózy vzhledem k enzymatické výbavě mikroorganismů. Zejména v koncentracích 10^3 - 10^4 citovaných patogenů vznikají významné biochemické změny složení mléka, kdy dochází i k negativnímu ovlivnění jeho skladovatelnosti a technologické použitelnosti.

Effect of *Prototheca zopfii* and *Candida lusitaniae* level on raw milk quality

Abstract

The study from 2004-2007 of two mastitis pathogens, yeast *Candida lusitaniae* and algae *Prototheca zophii* summarizes the results of negative action on biochemical changes in raw milk. The presence of these pathogens in milk can be caused by mycotic mastitis of milk cows. The addition of such milk to dairy treatment raw milk in spite of pasteurization effect has significant influence on proteins, fat, urea content and lactose changes. This is affected by enzymatic equipment of microorganisms. The significant biochemical changes of milk composition and negatively influences its shelf life and technological applicability was given especially in concentration 10^3 - 10^4 above mentioned pathogens.

Úvod

Kontrola hygienické kvality mléka je principiálně založena na prevenci potenciálního poškození zdraví

konzumenta a jistotě bezpečnosti potravin. Zaměření předložené práce je přispět ke zlepšení jakostních kritérií hygienické kvality syrového mléka, které tímto ovlivňují bezpečnost potravinového řetězce a poukázat na některé patogeny, které mohou významně ovlivnit bezpečnost potravinového řetězce.

Mikrobiologická kvalita syrového mléka a mléčných potravin patří k základním znakům jakosti. Jedním z nejčastěji používaných parametrů při hodnocení jakosti syrového mléka i mléčných potravin je celkový počet mezofilních mikroorganismů vyjádřený v hodnotě cfu. Pochopitelnou snahou prvovýrobců, z titulu maximálního zpeněžení, i zpracovatelů mléka, z titulu kvality finálních výrobků, je dosáhnout v tomto ohledu co nejlepších výsledků.

U některých dodavatelů syrového mléka se objevil problém zhoršené mikrobiologické kvality a provozní kontrola nepřinesla žádné vysvětlení problému.

Při porovnání výsledků hodnot cfu provedených klasickou kultivační metodou a výsledků z přístroje BactoScan (BSc) se zjistilo, že přístrojové hodnoty jsou několikanásobně vyšší než kultivační. Při podrobných rozbořech zastoupení mikroflory syrového mléka v těchto případech byla zjištěna přítomnost kvasinek a řas, které v některých vzorcích tvořily až 100 % mikrobiologické výbavy mléka. Bylo zjištěno, že se nejednalo o následnou kontaminaci mléka z vnějšího prostředí, ale o přirozený zdroj z mléčné žlázy dojnice z důvodu probíhajícího zánětlivého onemocnění. Proto bylo důležité znát přesnou diagnostiku, identifikaci a možnost ovlivnění biochemických reakcí v mléce, ale přednostně i cesty šíření a možnosti likvidace kvasinek a řas jako zdroje nežádoucí kontaminace syrového mléka.

Kvasinky a řasy jsou skupinou mikroorganismů široce rozšířenou v přírodě. Vyskytují se mezi nimi i patogenní rody, přičemž většinou jde pouze o potencionální patogeny vyvolávající onemocnění oslabeného organismu (Costa et al., 1993).

Hlavním problémem onemocnění vyvolaných kvasinkami a řasami je to, že jsou velmi špatně léčitelná - běžná antibiotika působící na prokaryotní buňky jsou nepoužitelná (Chuang Shih Te et al. 2002; Brito M. A. et al. 1997). Používají se proto antimykotické látky jako kyselina boritá a antibiotika působící na úrovni plasmatické membrány nebo buněčné stěny, ale to jen v humánní populaci.

V současné době je hmatatelný zřetelný nárůst onemocnění způsobených kvasinkami, a to jak v humánní, tak zvířecí populaci. K rodům z této kategorie patří např. *Candida*, *Exophiala*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* a organizmy, které kvasinkám pouze podobají - řasa *Prototheca* sp.

Nárůst mykotických infekcí lze připisovat celé řadě faktorů jako jsou vytvoření imunopresivních podmínek jak v lidském, tak zvířecím organismu, dlouhodobá katetrizace pacientů, dlouhodobé užívání širokospektrých antibiotik. Dříve kvasinky a řasy působily patogenně jen za určitých specifických podmínek. Zvýšení odolnosti člověka

(zvířete) je tedy jedinou cestou ochrany před mykotickou infekcí. Některé patogenní kvasinky a řasy mohou být příčinou vzniku zánětlivého onemocnění mléčné žlázy dojnic, mastitid (Jensen et al., 1998; McDonald et al., 1984; Kirk et al., 1986). Mastitidy obecně patří ke zdravotně velice závažným a ekonomicky zatěžujícím onemocněním, které snižují chovnou hodnotu, welfare zvířat a zejména pak kvalitu získávaného mléka (Nappert, G. and Godkin, A., 2001; Gonzales, R. N., 2003). Mají vliv nejenom na snížení kvality úrovně mléčné produkce, ale i na hygienické jakostní znaky nutné ke kvalitnímu zpeněžení mléčné suroviny (Chuang Shih Te et al. 2002). Dojnice s mykotickou mastitidou nevytvářejí jenom problém zdravotní, ale přídavek takového mléka do dodávky může znamenat i významné zhoršení hygienických znaků jakosti jako celkový počet mikroorganismů a počet somatických buněk (Nappert, G. and Godkin, A., 2001, Roesler, U. and Hensel, A., 2003). Incidence zánětlivého onemocnění mléčné žlázy, mastitid, ovlivňuje počet somatických buněk v bazénovém vzorku mléka, mikrobiologickou kvalitu mléka a v neposlední řadě i látkové složení, kdy dochází ke snížení obsahu laktózy a kaseinu, zvyšuje se obsah proteolytických enzymů a imunoglobulinů, dochází ke změnám kvality tuku. Mykotické mastitidy, způsobované zejména kvasinkami a plísněmi, postihující zhruba 2-5 % dojnic. Lze však předpokládat, že skutečné procentické zastoupení bude prokazatelně vyšší, protože identifikace patogenů u mastitidních mlék se u nás provádí všeobecně omezeně, a již vůbec není cílená vůči zmiňovaným zástupcům.

Citlivost in vitro izolátů kmenů *Prototheca zopfii* ke konvenčním fungicidním přípravkům a k těkavým olejům byla zkoumána při výskytu mastitidy způsobené *P. zopfii* ve stádě laktujících krav (Piccinini, R., 2008). Zajímavou aktivitu proti sledovanému mikroorganismu, kromě některých fungicidních přípravků, vykazovaly těkavé oleje použité při výzkumu, zejména bergamot a olej z čajovníku australského. Získané poznatky vyvolávají zájem o další výzkum terapeutického využití těchto nekonvenčních preparátů. Zásadním úkolem výzkumu v prvovýrobě by však mělo být významné zvýšení hygieny získávání mléka, optimalizace chovu dojnic tak, aby cesty šíření jakýchkoli patogenů do mléčné žlázy byly minimalizovány, aby se zabránilo nejenom vzniku onemocnění, ale i kvalitativním změnám mléka.

Pro účely této studie byly ze syrového kravského mléka izolovány a identifikovány dva patogenní mikroorganizmy a to: kvasinka *Candida lusitaniae* a bezbarvá řasa *Prototheca zopfii*.

C. lusitaniae byla poprvé popsána van Udenem a do Carno-Sousem jako běžný organizmus gastrointestinálního traktu teplokrevných živočichů (Blinkhorn, R. J. et al., 2001). Ve vnějším prostředí byla nalezena v kukuřičných výrobcích, na kůře citrusů, ovocných džusech a mléce od dojnic s mastitidami (Gadaga, T. H et al., 2001). *Candida lusitaniae* je obtížně odlišitelná od *Candidy tropicalis* vzhledem k tomu, že mají společný identifikační systém. Na základě dostupné literatury je popisována jako oportun-

ní patogen zejména v humánní medicíně u pacientů s rakovinovým onemocněním, kteří podstoupili chemoterapii a nebo u pacientů, kteří byli dlouhodobě léčeni antibiotiky. Intravaskulární katétr může být rovněž zdrojem *Candida lusitanae*.

Bezbarvá řasa rodu *Prototheca* z čeledi *Chlorellaceae* je jediným známým rostlinným patogenem v humánní a zvířecí populaci. Taxonomické zařazení se vyvíjelo v posledních letech a v současné době jsou určeny tyto druhy: *P. zopfii*, *P. wickermamii*, *P. stagnora*, *P. ulnea* (Möller A. et al., 2005). Pět zatím nepřijatých druhů bylo označeno jako *P. moriformis*.

V roce 1952 byla *Prototheca zopfii* poprvé identifikována jako patogen v souvislosti s mastitidou, která vede ke značným ekonomickým ztrátám v nemocném stáde. Mastitidy, jejichž určujícím patogenem je *P. zopfii*, jsou typickým onemocněním vysokoprodukčních dojníc strojově dojených (Janosi, S. et al., 1998). Biochemické zkoušky izolátů pocházejících z mléka mastitidních dojníc prokázaly zpožděnou produkci galaktózy a zvýšenou produkci aminokyselin (Möller A. et al., 2005). Na základě biochemické klasifikace byla *Prototheca* způsobující mastitidy reklasifikována na poddruh *Prototheca zopfii* ssp. *bovinomastitogenes* (Möller A. et al., 2005). U dojníc je tento typ mastitidy charakterizován jednak vznikem granulomatózní tkáně a jednak oslabenou vodnatou sekrecí s vločkami hnisu. Průběh takovéto mastitidy znamená pro chovatele omezení až absolutní ztrátu produkce mléka u dané dojnice. Zánětlivé onemocnění probíhá jak v akutní, tak i chronické formě (Roesler U. and Hensel A., 2003). Nález specifického imunoglobulinu (IgA, IgG) v mléce laktujících dojníc je důkazem mastitidního onemocnění *P. zopfii*. Tyto protilátky přetrvávají u infikovaných zvířat i v období stání nasucho, tzn., bez produkce mléka, a mohou být detekovány i v příští laktaci. Je potvrzeno, že převážná část nemocných zvířat není schopna eliminovat patogeny z mléčné žlázy (Roesler U. and Hensel A., 2003). Testováním vzorku granulomatózní tkáně technikami elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že tato řasa se převážně vyskytovala uvnitř makrofágů (Jensen et al., 1998).

Mikroorganismus nereaguje na rutinní léčbu a jediný způsob řešení je vyřazení dojnice s pozitivním nálezem ze stáda. *Prototheca zopfii* může být rozšiřována mlékem i výkaly, ale i kontaminovaným krmivem a vodou. Díky svým vnějším morfologickým strukturám přežívá i průchod zažívacím traktem. Řasy rodu *Prototheca* mohou být nalezeny i v půdě zejména pak ve vlhkých lokalitách (Costa E. O. et al., 1997). Někteří zástupci jsou rezistentní nejenom vůči antibiotické léčbě, ale i tepelnému ošetření (Melville P. A. et al., 1999). Výskyt zástupců rodu *Prototheca* v syrovém mléce za určitých podmínek reprezentuje i problém pro mlékárenské výrobky.

Studiem výskytu *Prototheca spp.* v 147 mastitidních vzorcích mléka se zabývali Rapuntean S. et al., 2007. Jejich zjištění provedené v roce 2007 stále poukazuje na nebezpečí tohoto mikroorganismu.

Kromě toho oba sledované mikroorganismy jsou vybaveny metabolicky aktivními enzymy, které se významně podílejí na destrukčních procesech ve skladovaném mléce.

Lipolytická aktivita *P. zopfii* je sledována v práci Rossi (1996). V souvislosti s metabolickou činností *P. zopfii* v mléce dochází ke snižování pH. Bylo prokázáno, že aminokyseliny, aminy a močovina jsou prakticky pro všechny kvasinky a řasy vhodným zdrojem dusíku stejně jako anorganické amonné soli.

Cílem této studie je prokázat kvalitativní i kvantitativní vliv negativního působení zvýšeného zastoupení kvasinek na jakostní znaky syrového mléka a zhoršení jeho technologické využitelnosti. Biochemické změny mléka byly sledovány na dvou vybraných kmenech, a to kvasinky *Candida lusitanae* a řasy *Prototheca zopfii*.

Materiál a metody

Koncentrační řady sledovaných mikroorganismů, ve skutečnosti obrácené ředící řady, byly vytvořeny lineárním zvyšováním koncentrace patogenů obsažených v suspenzi do mléka. K této metodě bylo přistoupeno na základě relativně velkých objemů kontaminovaných vzorků mléka pro biochemické analýzy. V případě metodiky našeho sledování patogeny v koncentrační řadě zvyšují postupně svoji koncentraci. Proto obrácená ředící řada byla označena indexy nárůstu koncentrace patogenů (10^1 je nejnižší koncentrace, 10^6 je nejvyšší koncentrace patogenu). Příprava uměle kontaminovaných vzorků syrového mléka byla provedena v průběhu výzkumu čtyřikrát pro každý ze sledovaných mikroorganismů.

Jako základní médium pro všechna šetření bylo použito syrové kravské mléko získané z konvenčního stáda dojníc jako směsný vzorek nádoje z velkokapacitní stáje, zchlazený na 6°C až 8°C a následně kontaminovaný. Pro kontrolu byl proveden mikrobiologický a bakteriologický rozbor použitého mléčného media, aby byla vyloučena pravděpodobnost kontaminace zkoušenými mikroorganismy. Syrové mléko tyto požadavky ve všech případech splňovalo. Suspenze kvasinek a řas byla získána z kultur uchovávaných na živném agaru a pomnožených v živném bujónu.

Metody na mikrobiologické a chemické analýzy kontaminovaných vzorků mléka

Mikrobiologické metody

Stanovení celkového počtu mikroorganismů (ČSN EN ISO 4833, 2003)

Stanovení kvasinek a plísní (ČSN ISO 7954, 1994)

Prototheca zopfii dobře roste na půdě pro stanovení kvasinek a vytváří drobné matné šedobílé kolonie, které se diferencují od kvasinek testem pod obchodním názvem API-Test 20CAUX od firmy BIOMERIEUX

Chemické a biochemické metody

Složení kontaminovaných vzorků (obsah tuku, bílkovin, laktózy, tukuprosté sušiny, močoviny, kaseinu, volných

masných kyselin) na přístroji MilkoScan FT 120 (výrobce Foss Electric Dánsko).

Měření aktivity lipáz ve vzorcích mléka bylo prováděno rutinní metodou firmy Merck, která sestává z přístroje RQflex (mobilní reflektometr) a testovacího kytu. (Merck Německo)

Stanovení volných aminokyselin AccQ.TAG metodou HPLC. Metodika AccQ.TAG stanovení aminokyselin na reverzní koloně s fluorimetrickou detekcí je dodávána přímo výrobcem přístroje WATERS, USA.

Zastoupení masných kyselin tuku ve vzorcích mléka bylo zjišťováno metodou stanovení methylesterů masných kyselin v mléce a mléčných výrobcích na plynovém chromatografu. Metodika je dodána přímo dovozcem přístroje AMEDIS, ČR.

Stanovení kyseliny máslé bylo prováděno metodou na izotachoforetickém analyzátoru IONOSEP 2003 (dále jen ITP). Metodika je dodávána přímo výrobcem přístroje Recman Laboratorní technika, ČR.

Analýzy byly prováděny po 24 hodinách skladování při chladničkově teplotě od přípravy ředících řad mléka. Vzorky skladované 48 hodin za stejných podmínek byly pro analýzy již nevhodné (vysrážení vzorků).

Výsledky jsou průměrem ze dvou opakovaných stanovení počítačově vyhodnocené.

Experimentální část uvádí tabelované a grafické údaje získané v průběhu experimentů.

V tabulkách a grafech jsou použity následující zkratky:

TPS - tukuprostá sušina

VMK - volné masné kyseliny

cfu - colony form unit (kolonie tvořící jednotky) v 1 ml mléka
BSc - automatizovaný přístroj na stanovení celkového počtu mikroorganismů BactoScan

CPM - celkový počet mikroorganismů

AMK - obsah volných aminokyselin

Výsledky

Koncentrace sledovaných mikroorganismů

Ředící řady kvasinky *C. lusitaniae* a řasy *P. zopfii* byly opakovaně úspěšně připravovány v laboratorních podmínkách veterinární laboratoře.

Nárůstu koncentrace obou mikroorganismů odpovídají odečty klasickou plotnovou metodou, v ojedinělém případě v rámci přípustné chyby rozboru laboratoře (tab. 1 a 2).

Tab. 1 Celkový počet mikroorganismů v mléce a počet kolonií *Candida lusitaniae*

koncentrační řada	cfu/ klasická plotnová metoda	
	kontaminované mléko	<i>Candida lusitaniae</i>
10 ¹	1,6x10 ⁴	9,4x10 ²
10 ²	1,6x10 ⁵	1,4x10 ⁴
10 ³	1,0x10 ⁵	1,0x10 ⁵
10 ⁴	2,2x10 ⁵	1,2x10 ⁵
10 ⁵	3,6x10 ⁵	1,5x10 ⁵
10 ⁶	2,6x10 ⁶	1,9x10 ⁵
K	3,0x10 ⁵	<10

Poznámka: uvedené hodnoty jsou průměrem ze dvou stanovení

Tab. 2 Celkový počet mikroorganismů v mléce a počet kolonií *Prototheca zopfii*

koncentrační řada	cfu/ klasická plotnová metoda	
	kontaminované mléko	<i>Prototheca zopfii</i>
10 ¹	3,1x10 ⁵	1,0x10 ³
10 ²	1,6x10 ⁵	1,5x10 ³
10 ³	6,9x10 ⁴	9,7x10 ²
10 ⁴	2,0x10 ⁴	2,1x10 ³
10 ⁵	9,8x10 ⁴	9,8x10 ³
10 ⁶	1,5x10 ⁵	1,2x10 ⁴
K	3,8x10 ⁵	<10

Poznámka: uvedené hodnoty jsou průměrem ze dvou stanovení

Tab. 3 *Candida lusitaniae* průměrné hodnoty analytů

koncentrační řada	Močovina mg/l	Tuk %	Bílkoviny %	TPS %	Laktóza %	Kasein %	VMK mmol/l	Lipázy µg/l
10 ¹	172,5	3,41	3,29	8,8	4,88	2,62	0,35	310,61
10 ²	202	3,38	3,27	8,77	4,82	2,6	0,35	313,28
10 ³	298	3,16	3,17	8,41	4,58	2,46	0,7	151,3
10 ⁴	416	2,96	3,03	8,05	4,3	2,3	1,06	115,7
10 ⁵	539	2,62	2,84	7,48	3,87	2,07	1,61	110,49
10 ⁶	860,5	1,9	2,45	6,32	2,98	1,58	2,87	81,88
tendence	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓

Poznámka: uvedené hodnoty jsou průměrem ze dvou stanovení

Tab. 3 *Prototheca zopfii* průměrné hodnoty analytů

koncentrační řada	Močovina mg/l	Tuk %	Bílkoviny %	TPS %	Laktóza %	Kasein %	VMK mmol/l	Lipázy µg/l
10 ¹	215	3,51	3,36	8,89	4,91	2,67	0,52	351,55
10 ²	237	3,48	3,35	8,85	4,85	2,65	0,47	289,25
10 ³	343	3,25	3,22	8,5	4,59	2,5	0,97	227,84
10 ⁴	444	3,04	3,09	8,12	4,31	2,35	1,22	167,32
10 ⁵	610	2,63	2,84	7,42	3,78	2,05	1,85	110,36
10 ⁶	787	2,26	2,64	6,8	3,32	1,79	2,49	80,99
tendence	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓

Poznámka: uvedené hodnoty jsou průměrem ze dvou stanovení

Tab. 5 Zastoupení volných aminokyselin v závislosti na koncentraci řasy *Prototheca zopfii*

aminokyselina	kontrola nmol/g	koncentrační řada						rozdíl 10 ⁶ - 10 ¹ nmol/g	poměr 10 ⁶ : 10 ¹ nmol/g
		10 ¹ nmol/g	10 ² nmol/g	10 ³ nmol/g	10 ⁴ nmol/g	10 ⁵ nmol/g	10 ⁶ nmol/g		
Asp	54	59	82	92	103	119	154	95	3
Ser	42	41	102	94	169	252	406	365	10
Glu	198	249	269	339	404	522	675	426	3
Gly	74	93	169	382	641	1078	1798	1705	24
His	14	18	27	36	55	109	107	89	8
Arg	118	118	153	339	377	560	627	509	5
Thr	464	463	521	550	523	493	556	94	1
Ala	56	62	116	266	419	710	1088	1026	19
Pro	18	19	35	124	207	316	459	440	25
Cys	0	0	7	268	584	1108	1238	1238	0
Tyr	18	19	25	67	98	160	263	243	15
Val	68	75	92	81	130	214	317	242	5
Met	0	0	6	46	82	150	225	225	0
Lys	26	30	54	185	266	454	572	542	22
Ileu	4	6	19	63	103	178	316	309	79
Leu	10	13	36	136	237	428	685	672	69
Phe	2	3	12	40	72	140	240	237	120

Poznámka: uvedené hodnoty jsou průměrem ze dvou stanovení

Tab. 6 Zastoupení volných aminokyselin v závislosti na koncentraci kvasinky *Candida lusitanae*.

aminokyselina	kontrola nmol/g	koncentrační řada						rozdíl 10 ⁶ - 10 ¹ nmol/g	poměr 10 ⁶ : 10 ¹ nmol/g
		10 ¹ nmol/g	10 ² nmol/g	10 ³ nmol/g	10 ⁴ nmol/g	10 ⁵ nmol/g	10 ⁶ nmol/g		
Asp	76	72	80	121	140	199	348	276	5
Ser	143	74	69	94	79	118	159	85	1
Glu	199	239	234	358	432	599	829	590	4
Gly	156	134	188	531	810	1338	2618	2484	17
His	28	20	21	44	60	100	200	180	7
Arg	112	114	148	222	294	488	778	663	7
Thr	426	414	494	531	547	675	641	227	2
Ala	93	73	118	378	592	990	1895	1822	20
Pro	28	22	30	102	159	266	556	535	20
Cys	0	0	3	138	281	541	1080	1080	-
Tyr	25	20	26	66	105	170	355	334	14
Val	70	66	87	170	247	305	573	507	8
Met	0	0	6	49	89	155	337	337	-
Lys	32	31	46	136	220	363	757	726	24
Ileu	11	7	15	67	122	208	455	449	41
Leu	18	15	31	137	248	423	920	906	51
Phe	6	4	9	54	92	157	380	376	63

Poznámka: uvedené hodnoty jsou průměrem ze dvou stanovení

Dalším důkazem kvalitní přípravy ředících řad jsou chemické rozbor, které jsou založeny na enzymatickém působení zkoumaných kvasinek a řas (tab. 3 a 4).

V tabulkách 5 a 6 je uveden přehled zastoupení volných aminokyselin v závislosti na koncentraci obou sledovaných mikroorganismů. V jednotlivých ředěních bylo sledováno i zastoupení mastných kyselin tuku v mléce, z nichž jsou v tab. 7 vybrány hodnoty nejvyšší a nejnižší dosažené koncentrace.

Grafy 1, 2, 3, 4 a 5 popisují závislosti změn obsahů jednotlivých analytů na koncentraci sledovaných mikroorganismů.

Diskuze

a) Skladovatelnost mléka se zvýšenou koncentrací mikroorganismů a vliv teploty

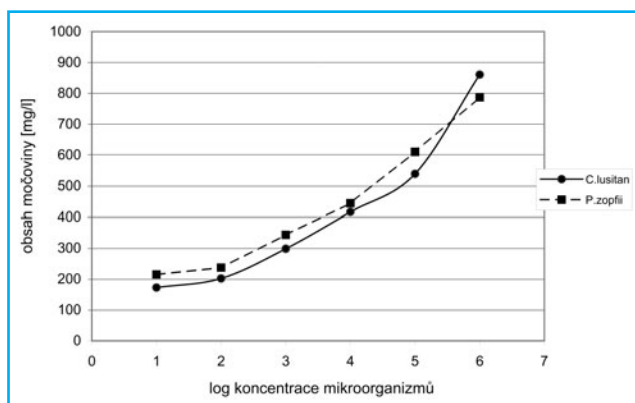
Vzorky s definovanými obsahy mikroorganismů byly k analýzám připraveny po 24 hodinách skladování. Vzorky byly uchovávány při chladničkové teplotě (cca 8 °C). Vzorky skladované po delší dobu (48 hod) při teplotách 8 °C nebo při pokojové teplotě (cca 20 °C) byly již pro analýzy nevhodné vzhledem k nevratným biochemickým změnám. Tento vliv lze přičíst působení i přítomných mikroorganismů a zejména pak jejich enzymů a lze ho dokumentovat experimentálně zjištěnými údaji

Tab. 7 Zastoupení mastných kyselin tuku v mléce v %

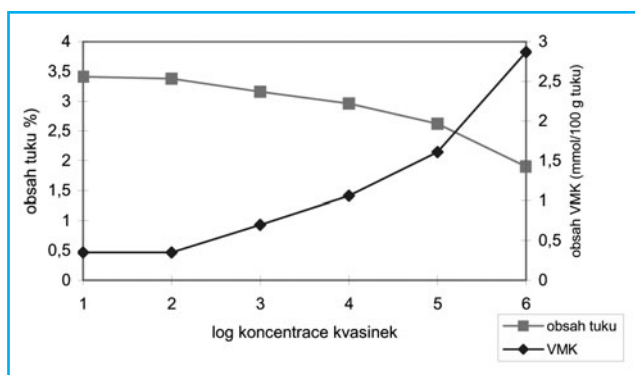
Mastná kyselina zkratka	název	Candida lusitaniae		Prototheca zopfii		kontrola
		10'	10°	10'	10°	
C4	Máselná	2,67	2,56	2,75	2,56	2,85
C6	Kapronová	1,69	1,84	2,16	2,00	2,20
C8	Kaprlóvá	1,04	1,03	1,32	1,20	1,31
C10	Kaprinová	2,79	2,88	3,21	2,94	3,21
C11	Undekanová	0,26	0,28	0,32	0,28	0,30
C12	Laurová	3,24	3,34	3,52	3,36	3,57
C13	Tridekanová	0,16	0,17	0,15	0,16	0,16
C14	Myristová	10,49	10,78	11,35	11,51	11,69
C14:1 trans	trans tetradecenová	0,31	0,33	0,38	0,38	0,37
C14:1	Myristolejová	0,72	0,75	0,84	0,85	0,82
C15	Pentadekanová	1,34	1,38	1,28	1,29	1,28
C15r	rozvětvená pentadekanová	0,14	0,16	0,17	0,15	0,18
C16	Palmitová	30,08	30,52	30,24	30,65	29,83
C16:1 trans	trans hexadecenová	0,75	0,81	0,83	0,77	0,66
C16:1	Palmitolejová	1,97	2,01	2,00	2,08	1,96
C17	Heptadekanová	0,77	0,74	0,70	0,72	0,63
C17:1	Heptadecenová	0,14	0,15	0,13	0,13	0,14
C18	Stearová	9,81	9,58	9,28	9,18	9,52
C18:1 trans	trans oktadecenové kyseliny	1,54	1,57	1,71	1,75	1,72
C18:1	Olejová	24,25	24,21	22,66	23,15	23,11
C18:1 cis izomery	ostatní cis izomery oktadecenové kyseliny	0,96	0,89	0,82	0,92	0,79
C18:2 trans	trans izomery oktadekadienové kyseliny	0,57	0,59	0,50	0,62	0,62
C18:2	Linolová	2,02	1,97	1,86	1,91	1,90
C20	Eikosanová	0,31	0,14	0,18	0,15	0,09
C18:3	Linoleová	0,36	0,36	0,38	0,40	0,43

Poznámka: uvedené hodnoty jsou průměrem ze dvou stanovení

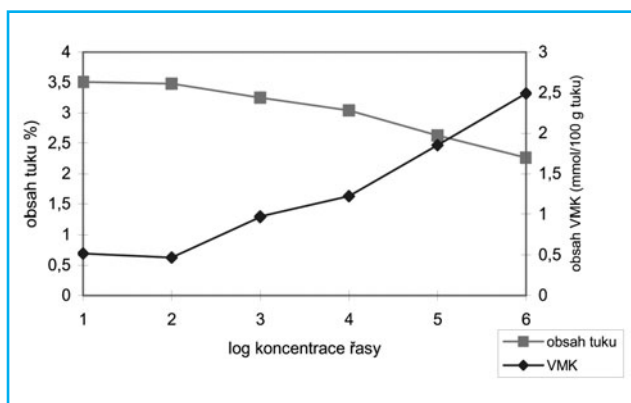
Graf 1 Závislost obsahu močoviny na koncentraci mikroorganismů



Graf 2 Závislost změn obsahu tuku a volných mastných kyselin na koncentraci C. lusitaniae

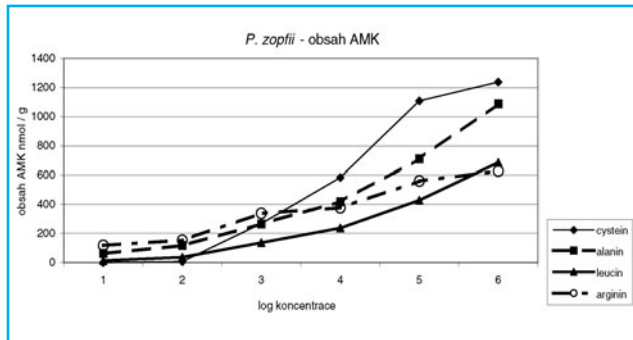


Graf 3 Závislost změn obsahu tuku a volných mastných kyselin na koncentraci P. zopfii



o rozsáhlých změnách složení mléka, poklesu obsahu tuku, bílkovin i laktózy, vzrůstu obsahu močoviny, volných aminokyselin a volných mastných kyselin za současného úbytku množství lipáz (viz grafy 1-5). Z našich zkušeností plyne, že mikrobiologicky kvalitní syrové mléko takovému rozkladu nepodléhá a je možné ho uchovat v chladničkové teplotě po prvotním zchlazení po dobu cca 48 hodin od nadojení bez chemické konzervace. Modelový experiment byl v obou případech sledovaných mikroorganismů vykonstruovaný z hlediska možného záhytu mikroorganismů, ale již i ty nejnižší záchyty a jejich enzymy měly vliv na látkové složení mléka. V současné době se výskyt mikroorganismů této kate-

Graf 4 Závislost obsahu volných aminokyselin na koncentraci *P. zopfii*



gorie neustále zvyšuje. Důvodů je celá řada. V této souvislosti se nelze nezmínit o možném negativním vlivu zvýšené četnosti aplikace intramamárních antibiotik a stejně tak používání antibiotik o stále vyšší účinnosti při léčbě zánětu mléčné žlázy. I když pasterační účinnost je vysoká, enzymatické bílkovinné složky sledovaných patogenů jsou termostabilní a mohou přecházet do mléčné suroviny a tam negativně působit na mléčné komponenty.

b) Změny probíhající v mléce se zvýšenou koncentrací mikroorganismů

Obsah obou sledovaných mikroorganismů má významný vliv na kvalitu syrového mléka a možnosti další technologické zpracovatelnosti. Prokázalo se, že již koncentrace v rozmezí 10^3 - 10^4 způsobuje rozsáhlé změny původního složení mléka, evidentní pokles obsahu tuku, laktózy i bílkovin (viz tab. 3 a 4 - nejvyšší poklesy byly u *C. lusitaniae* tuk a laktóza) a nárůst metabolitů jako je močovina, některé volné aminokyseliny a volné mastné kyseliny (viz grafy 1-5).

c) Vliv koncentrace sledovaných mikroorganismů na změny obsahu volných aminokyselin

Podle literatury (Roostita R. et al., 1996) dochází v průběhu růstu mikroorganismů ke zvyšování množství volných aminokyselin vlivem rozkladu bílkovin. U rodu kvasinek *Candida* je to např. leucin, fenylalanin, lysin, arginin, glutamin. Může dojít i k výraznému zvýšení obsahu i jiných aminokyselin. Toto bylo potvrzeno i naším šetřením, což ilustrativně dokumentují výše uvedené grafy 4 a 5 a tab 5 a 6.

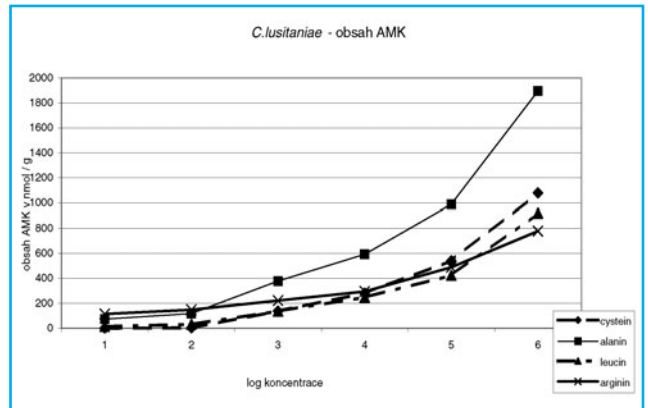
Významné zvýšení obsahu aminokyselin bylo u *P. zopfii* zaznamenáno u isoleucinu, leucinu a fenylalaninu (až 50ti násobné zvýšení proti kontrole) a u *C. lusitaniae* u stejným aminokyselin dokonce až 70ti násobné zvýšení proti kontrole.

K nejvyššímu nárůstu obsahu aminokyselin došlo mezi koncentrací kvasinek 10^3 a 10^4 .

d) Vliv koncentrace sledovaných mikroorganismů na obsah volných mastných kyselin

Analýzy vzorků mléka s definovaným obsahem mikroorganismů potvrdily produkci lipolytických enzymů, které štěpí tuk, úbytek u nejvyšší koncentrace činil 1,25 % tuku,

Graf 5 Závislost obsahu volných aminokyselin na koncentraci *C. lusitaniae*.



za enormního nárůstu obsahu volných mastných kyselin (viz tab 3 a 4). Stejně jako v předchozím případě k nejvyššímu nárůstu došlo mezi koncentracemi 10^3 a 10^4 .

Podle literatury (Buchvaldková T. et al., 2006) nativní i bakteriální lipáza způsobuje uvolňování volných mastných kyselin z mléčného tuku. K nejintenzivnějšímu štěpení tukových kuliček dochází v průběhu prvních 6 hodin působení a výsledné množství volných mastných kyselin je odvislé od kvality tukových kuliček. Výsledky modelové lipolýzy s komerčně dodávanou lipázou bakterií rodu *Pseudomonas* ukazují přímou závislost mezi vzrůstem obsahu volných mastných kyselin a poklesem obsahu tuku a poklesem koncentrace lipáz. Po počátečním rychlém růstu obsahu volných mastných kyselin a úbytku aktivity lipázy dochází k postupné inhibici lipázy přímo volnými mastnými kyselinami.

Z provedené analýzy složení triglyceridů mastných kyselin plyne, že ani u *C. lusitaniae* ani u *P. zopfii* nebyla zjištěna výraznější změna v zastoupení mastných kyselin mléčného tuku (viz tab. 7). Provedené analýzy mastných kyselin (v mléčném tuku, který nebyl činností mikroorganismů rozložen, u vzorků s připravenými koncentracemi mikroorganismů), neprokázala ani u *C. lusitaniae* ani u *P. zopfii* výraznější změnu. Výše uvedené mikroorganismy tuk pravděpodobně rozkládají rovnoměrně a nejsou specifické na určité typy mastných kyselin.

Obsah kyseliny máselné (%) v kontaminovaných vzorcích mléka stanovený na ITP analyzátoru vykazuje zřetelný vzrůst, nejvyšší hodnota byla zaznamenána u *C. lusitaniae* (koncentrační řada 106 - 0,6142 %), kontrola 0,0021 %.

Závěr

Příčin zhoršování mikrobiologické kvality mléka a mléčných potravin je celá řada. Je skutečností, že syrové mléko, které má vysokou hodnotu cfu, může mít i vysokou hodnotu počtu somatických buněk. Při podrobných rozbořech zastoupení mikroflóry syrového mléka v těchto případech byla zjištěna přítomnost konkrétně kvasinek a řas, které v některých případech tvořily až 100% mikrobiologické výbavy mléka. Zásadně se přitom nejednalo o následnou kontaminaci mléka z vnějšího prostředí, ale zdro-

jem mikroorganismů byly zánětlivé procesy probíhající v mléčné žláze. A proto vzhledem ke specifčnosti dané problematiky je důležité znát přesnou diagnostiku, identifikaci a možnost ovlivnění biochemických reakcí v mléce, cesty šíření a možnosti likvidace kvasinek jako zdroje nežádoucí kontaminace syrového mléka.

Pro modelové laboratorní experimenty byly ze syrového mléka izolovány a identifikovány 2 patogenní kmeny, a to kvasinka *Candida lusitanae* a bezbarvá řasa *Prototheca zopfii*, která je jediným známým rostlinným patogenem v humánní a zvířecí populaci. *Prototheca zopfii* byla identifikována jako patogen, který zapříčiňuje mykotické mastitidy, což způsobuje značné ekonomické ztráty v nemocném stádě. Tito zástupci jsou rezistentní nejenom vůči antibiotické léčbě, ale i tepelnému ošetření. Výskyt zástupců rodu *Prototheca* v syrovém mléce může tedy za určitých podmínek reprezentovat problém při finalizaci mléka.

Předložená práce se zabývala biochemickými vlastnostmi syrového mléka s vysokými koncentracemi kvasinek a řas způsobujícími nevratné negativní změny mléka a následně poškozují technologickou zpracovatelnost mléka.

Analýzami vzorků mléka u měle kontaminovaných výše uvedenými mikroorganismy byly kvantifikovány proběhlé změny v mléce. Bylo konstatováno, v souladu s pracemi jiných autorů, že oba kmeny a to *Candida lusitanae* (kvasinka) a *Prototheca zopfii* (jednobuněčná řasa) svou enzymatickou činností poškozují původní složení syrového mléka (snižování obsahu tuku, bílkovin a nárůst obsahu močoviny, volných aminokyselin, volných mastných kyselin a kyseliny máselné) a to zejména v případech, kdy se vyskytují v mléce ve vyšších koncentracích.

Poděkování

Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (výzkumný záměr MSM2672286101).

Přijato do tisku: 10. 1. 09

Lektorováno: 25. 1. 09

Literatura

- Blinkhorn, R. J.; Adelstein, D. and Spagnuolo, P. J. (1989) Emergence of a New Opportunistic Pathogen, *Candida lusitanae*. *Journal of Clinical Microbiology* 27(2): 236-240.
- Brito, M. A. V. P.; Veiga, V. M. O.; Paiva-Brito, M. A. V. and Oliveira-Veiga, V. M. (1997) Clinical bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii*: a case study. *Ciencia Rural*. 27(4): 681-684; ref. 14.
- Buchvaldová, T., Snášelová, J., Bartoňová, J. (2006) Sledování aktivity lipáz v mléce, *Mlékařské listy Zpravodaj*, 94, 12-14

- Costa, E. O.; Gandra, C. R.; Pires, M. F.; Coutinho, S. D.; Castilho, W. and Teixeira, C. M. (1993) Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of Sao Paulo, Brazil. *Mycopathologia* 124(1): 13-17, ref. 28.
- Costa, E. O.; Melville, P. A.; Ribeiro, A. R.; Wantanabe E. T. and Parolari, M. C. F. F. (1997) Epidemiologic study of environmental sources in a *Prototheca zopfii* outbreak of bovine mastitis. *Mycopathologia* 137: 33-36.
- Gadaga, T. H.; Mutukurmira, A. N. and Narvhus, J. A. (2001) The growth and interaction of yeasts and lactic acid bacteria isolated from Zimbabwean naturally fermented milk in UHT milk. *Int J Food Microbiol.* 68(1-2): 21-32.
- Gonzalez, R. N. (2003) *Prototheca*, Yeast, and Bacillus as a Cause of Mastitis. National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings, p. 82.
- Chuang-Shih Te; Shyu-Ching Ling; Chan-Peng Wen-[Chan-P. W. J.]; Fung-Hang Pong; Chuang, S. T.; Shyu, C. L.; Chan, P. W. J. and Fung, H. P. (2002) Isolation and identification of *Prototheca zopfii* from bovine mastitis in Taiwan. *Taiwan Veterinary Journal* 28(2): 94-98, ref. 18.
- Janosi, S.; Ratz, F.; Scigeti, G.; Kulcsar, M.; Kerenyi, J.; Lauko, T.; Katona, F. and Huszenicza, G. (2001) Review of the microbiological, pathological and clinical aspects of bovine mastitis caused by the algae *Prototheca zopfii*. *Veterinary Quarterly* 23(2): 58-61, ref. 57.
- Jensen, H. E.; Aalbaek, B.; Bloch, B. and Huda, A. (1998) Bovine mammary protothecosis due to *Prototheca zopfii*. *Medical Mycology (United Kingdom)* 36(2): 89-95.
- Kirk, J. H. and Bartlett, P. C. (1986) Bovine mycotic mastitis. The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian (USA) 8(11): F106-F111.
- McDonald, J.S.; Richard, J.L.; Anderson, A.J.: Antimicrobial susceptibility of *Prototheca zopfii* isolated from bovine intramammary infection. *American Journal of Veterinary Research (USA)* (Jun 1984). v.45(6)p.1079-1080.
- Melville, P. A.; Watanabe, E. T.; Benites, N. R.; Ribeiro, A. R.; Silva, J. A. B.; Garino Jr., F. and Costa, E. O. (1999) Evaluation of the susceptibility of *Prototheca zopfii* to milk pasteurization. *Mycopathologia* 146: 79-82.
- Möller, A.; Truyen, U.; Hensel, A. and Rösler, U. (2005) Bovine Protothecal Mastitis is caused by a pathogenic subspecies of *Prototheca zopfii*. *ISAH - Warsaw, Poland, Vol. 1.*
- Nappert, G. and Godkin, A. (2001) Investigation of elevated bulk tank milk bacteria counts associated with cow infections. *Large Animal Veterinary Rounds* 1(8).
- Piccinini, R.; Dapra, V.; Tortorano, A. M., Viviani, M. A. *Large Animal Review*, 2008; 14(1), 7-9.
- Rapuntean, S., Fit, N., Calina, D., Nadas, G. *Revista Romana de Medicina Veterinara*. 2007; 17(2): 228-234.
- Roesler, U. and Hensel, A. (2003) Longitudinal Analysis of *Prototheca zopfii* - Specific Immune Responses: Correlation with Disease Progression and Carriage in Dairy Cows. *Journal of Clinical Microbiology* 41(3): 1181-1186.
- Roostita R., Fleet G.H.: Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition, *Int. J. of Food Microbiology*, 31 (1996) 205-219.
- Rossi, J., Buzzini, P., Ribaldi, M. (1996): Isolation of *Prototheca zopfii* from several sources and evaluation of its technological significance in milk. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 14: 31 - 37.
- ČSN EN ISO 4833 (56 0083): *Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C*, ČNI, Praha 2003
- ČSN ISO 7954 (56 0087): *Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení počtu kvasinek a plísni. Technika počítání kolonií vykultivovaných při 25 °C*, ČNI, Praha 1994.

INFORMACE

MLÉKAŘSKÉ KONFERENCE A VELETRHY

13th AUSTRALIAN FOOD MICROBIOLOGY CONFERENCE

Ve dnech 24. - 26. března 2009 se koná v Melbourne 13. australská konference potravinářských mikrobiologů. První den bude zaměřen na praktické workshopy na odběr vzorků, testování hygieny, rychlometody a průmyslové studie. Další program bude věnován poznatkům z průmyslu - výrobní hygieně, laboratorním metodám, kvalitě vody, kvalitativní analýze ve výrobě, interpretaci mikrobiologických výsledků, dále pak poznatkům z výzkumu - přezívání mikroorganismů v potravinovém řetězci, novým výrobkům, procesům a technologií pro kontrolu potravin a detekci a identifikaci mikroorganismů.

Agronavigátor 8. 1. 2009 (ben)