

I když probiotické účinky byly potvrzeny i u jiných mikroorganismů (např. *Enterococcus faecium*, *E. coli* Nissle 1917, *Saccharomyces boulardii*), je z přehledu patrné, že tyto účinky jsou připisovány a zkoumány převážně u bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií. Tím se mlékárenské výrobky stávají hlavní potravinovou matricí k přenosu prospěšných mikroorganismů do organismu člověka, což dává velký potenciál výrobcům těchto produktů.

Kromě potravin s probiotickými mikroorganismy je v současné době na našem trhu registrováno přes 90 druhů probiotik jako doplňků stravy. Je třeba zdůraznit, že u těchto výrobků současná legislativa nepožaduje potvrzení klinických účinků, podléhají předpisům o potravinách a k uvedení na trh je potřebná pouze notifikace (oznámení na Ministerstvo zemědělství ČR a Ministerstvo zdravotnictví ČR týkající se zdravotních a výživových tvrzení), na rozdíl od probiotik, která se mají používat jako léčiva a která jsou schvalována Státním ústavem pro kontrolu léčiv (Michalová, 2007). Tato praxe by měla být změněna - v roce 2009 by na základě Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1924/2006 měl vzniknout schválený seznam zdravotních tvrzení, která budou moci používat všichni výrobci potravin. Zdravotní tvrzení týkající se snížení rizika onemocnění a tvrzení týkající se vývoje a zdraví dětí dle čl. 14 Nařízení č. 1924/2006 podléhají zvláštnímu schvalování Evropské komise na základě doporučení EFSA. K této žádosti je zapotřebí doložit pozitivní i negativní vědecké studie založené na již výše uvedených zásadách (klinické studie) (Winklerová, 2008).

### Poděkování

Práce byla podpořena grantem MSM 6046137305.

### Literatura

- Collins M.D., Gibson G.R.: American Journal of Clinical Nutrition 69, 1052-1057 (1999).
- D'Aimmo M.R., Modesto M., Biavati B.: International Journal of Food Microbiology 115, 35-42 (2007).
- Dave R.I., Shah N.P.: International Dairy Journal 7, 31 - 41 (1997).
- Donkor O. N., Henriksson A., Vasiljevic T., Shah N.P.: International Dairy Journal 16, 1181 - 1189 (2006).
- Flint S.: Encyclopedia of Dairy Sciences. 1st ed. London: Academic Press, 2002, s. 904 - 907. ISBN 0-12-227237-4.
- Gibson G.R.: Journal of Nutrition 129, 1438 - 1441 (1999).
- Giraffa G.: FEMS Microbiology Reviews 26, 163 - 171 (2002).
- Gomez A.M.P., Malcata F.X.: Trends in Food Science and Technology 10, 139 - 157 (1999).
- Guarner F., Schaafsma G.J.: International Journal of Food Microbiology 39, 237 - 238 (1998).
- Havenaar R., Spanhaak S.: Current Option in Biotechnology, 5, 320 - 325 (1994).
- Horáčková Š.: Mlékařské listy - Zpravodaj 111, 23 - 25 (2008).
- Kalač P., Špička J., Křížek M., Pelikánová T.: Food Chemistry 70, 355 - 359 (2000).
- Ozogul F., Ozogul Y.: European Food Research Technology, 225, 385 - 394 (2007).
- Marteau P., Rambaud J-C.: FEMS Microbiology Reviews 12, 207 - 220 (1993).
- Mathur S., Singh R.: International Journal of Food Microbiology 105, 281-295. (2005).
- Mercenier A., Lenoir-Wijnkoop I., Sanders M. E.: Bulletin of the International Dairy Federation 429, 1 - 6, 2008.
- Michalová I.: Průvodce spotřebitele - Doplňky stravy 12, 15 - 16 (2007). ISBN 978-80-903930-1-1.
- Morelli L.: International Dairy Journal 17, 1278 - 1283 (2007).

- Saarela M., Morgensen G., Fondén R., Matto J., Mattila-Sandholm T.: Journal of Biotechnology 84, 197 - 215 (2000).
- Shah P.N.: International Dairy Journal 17, 1262-1277 (2007).
- Vasiljevic T., Shah N.P.: International Dairy Journal 18, 714-728 (2008).
- Zubillaga M., Weill R., Postaire E., Goldman C., Caro R., Boccio J.: Nutrition Research 21, 569 - 579 (2001).
- Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food (2002): [http://www.who.int/entity/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/entity/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf), staženo 15. 1. 2009.
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1924/2006 ze dne 20.12.2006 o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin.
- Probiotics and Prebiotics (2008): <http://www.worldgastroenterology.org/probiotics-prebiotics.html>, staženo 15. 1. 2009.
- Winklerová D.: Přednáška na semináři Aktuální informace 2008 o vývoji potravinového práva EU a ČR a nových povinnostech provozovatelů potravinářských podniků, Institut profesní přípravy, Praha 4. 12. 2008.

Přijato do tisku 20. 1. 2009

Lektorováno 30. 1. 2009

## PLOTNOVÉ METODY STANOVENÍ PROTEOLYTICKÝCH MIKROORGANISMŮ A JEJICH ENZYMŮ V MLÉCE

I. Němečková<sup>1</sup>, L. Červenková<sup>1</sup>, M. Pechačová<sup>2</sup>, P. Roubal<sup>2</sup>

<sup>1</sup> - MILCOM a.s., Praha

<sup>2</sup> - Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

### Plate methods for proteolytic microorganisms and their enzymes determination in milk

### Souhrn

Testovány byly jednoduché, levné a v provozních podmínkách dostupné plotnové metody stanovení proteolytických mikroorganismů a jejich enzymů.

Porovnány byly půdy pro kultivační stanovení proteolytických mikroorganismů - Calcium Caseinate agar, Calcium Caseinate agar s přidaným mlékem a GTK agar s 10 % obj. sterilního mléka. Všechny tři poskytly kvantitativně srovnatelné výsledky, navíc počet všech mikroorganismů narostlých na GTK agaru s mlékem odpovídal celkovému počtu mikroorganismů podle ČSN EN ISO 4833 (2003).

Difuzní agarová metoda stanovení proteolytických enzymů je vhodná zejména ke studiu vlastností jednotlivých enzymů. Aplikace metody na mléko je limitována relativně nízkou koncentrací enzymů a rozdílnými podmínkami pro jejich aktivitu.

### Summary

Simple, cheap and dairy plant laboratories available plate methods for proteolytic microorganisms and their enzymes determination were tested.

Cultivation media - Calcium Caseinate Agar, Calcium Caseinate Agar with added milk and Glucose-Trypton-Yeast Extract Agar with 10 % vol. of sterile milk - for proteolytic microorganisms determination were compared. All of them exhibited quantitatively comparable results. Thereto, total count of microorganisms grown on the Glucose-Trypton-Yeast Extract Agar with added milk corresponded to the total mesophilic count according to norm EN ISO 4833 (2003).

Diffuse agar method for proteolytic enzymes determination is suitable especially for separate enzymes characterization. Application of this method for milk is limited by relatively low enzymes concentration and by variable activity conditions.

## Úvod

Proteolytické enzymy v mléce se podle původu dělí na nativní a mikrobiální. Nejvýznamnější nativní, tj. vyskytující se v mléce již při sekreci, proteasou je plasmin (EC 3.4.21.7) - serinová proteasa štěpící peptidové vazby za lysinem popř. za argininem. Aktivita plasminu se projevuje obecně úbytkem kaseinového dusíku a vznikem  $\gamma$ -kaseinu (Chen a kol., 2003). Přestože má plasmin optimální podmínky 37 °C a pH 7,5, způsobuje proteolytické změny také během chlazení a skladování syrového mléka (Ma a kol., 2003). Vzhledem k rozsahu proteolýzy způsobené mikroorganismy je však jeho význam druhořadý (Guinot-Thomas a kol., 1995).

Nejběžnějšími producenty proteas v mléce jsou bakterie rodů *Pseudomonas*, *Bacillus*, a další. Ke zvýšené tvorbě enzymů dochází na konci exponenciální fáze, kdy se nedostatek živin stává limitujícím faktorem růstu mikroorganismů. Začátek tvorby a výsledná koncentrace proteas závisí však také na teplotě. Např. při 2 °C byla proteolytická aktivita pseudomonád detekována už při denzitě v řádu  $10^4$  -  $10^5$  JTK/ml, při 20 °C byla nutná přítomnost řádově  $10^7$  JTK/ml. Při nižší teplotě je navíc syntetizováno větší množství enzymů, aby se tím kompenzovala jejich snížená aktivita a růstová rychlost zůstala zachována (Braun a Sutherland, 2003).

Proteolytické enzymy bacilů jsou více odolné k záhřevu než nativní proteasy, po záhřevu 72 °C/2 min si zachovávají 50 % původní aktivity. Záhřev na nižší teplotu některé proteasy dokonce aktivuje (Chen a kol., 2004). Nejvíce termorezistentní jsou enzymy pseudomonád - po záhřevu 77 °C/17 s si zachovávají 55 - 65 % původní aktivity, po záhřevu 140 °C/5 s 20 - 40 % (Chen a kol., 2003).

V důsledku činnosti proteolytických enzymů vznikají nejčastější vady tekutých mléčných výrobků (hořknutí, houstnutí, srážení nebo gelovatění) (Hayes a Boor, 2001), objevují se funkční defekty a senzorické vady sušeného mléka (Chen a kol., 2004), snižuje se termostabilita mléka a v důsledku toho se rychleji zanášejí tepelné výměníky (Jeurnink, 1991).

Cílem této práce je doporučit jednoduchou, levnou a pro provozní laboratoře mlékáren dostupnou metodu hodnocení kvality syrového mléka popř. mléčných meziproductů a finálních výrobků z hlediska obsahu nežádoucích prote-

olytických enzymů nebo mikroorganismů, které jsou schopné je tvořit.

## Postup práce

### Stanovení proteolytických mikroorganismů

Analýzou 25 vzorků syrového kravského mléka (jeden rozbor z každého vzorku) byly porovnány kultivační metody stanovení proteolytických mikroorganismů - na Calcium Caseinate agaru (Merck), na Calcium Caseinate agaru s 10 g/l sušeného odstředěného mléka (přidává se před rozvařováním pudy pro zvýšení jejího zákalu) a na GTK agaru (MILCOM a.s.), do kterého bylo po rozehrání přidáno 10 % obj. sterilního odstředěného mléka. (Poznámka: Výsledná koncentrace mléka je vyšší než v GTK-M agaru pro stanovení celkového počtu mikroorganismů v mléce, který obsahuje 1 g/l sušeného odstředěného mléka.) Kultivace probíhala 3 dny při 30 °C, počítány byly kolonie s vyjasněnou proteolytickou zónou. Kromě toho byly počítány také všechny narostlé kolonie a výsledky byly porovnány s celkovým počtem mikroorganismů zjištěným podle ČSN EN ISO 4833 (2003).

### Stanovení proteolytických enzymů

Pro svou jednoduchost a nenáročnost na vybavení byla z potenciálně vhodných metod pro další testování vybrána difuzní agarová metoda (DAM), kterou ke studiu proteolytických enzymů použili např. Braun a Sutherland (2003). Protože však reálné vzorky obsahují nejen enzymy, ale i mikroorganismy, musí být tyto nejprve odstraněny, aby nerušily stanovení.

Postup získávání bezbuněčného supernatantu z bujónu odstředováním při zrychlení 4000 g po dobu 12 minut (Tůma a kol., 2005, Dave a Shah, 1997) není dostatečně účinný pro mléko. Osvědčilo se odstředování při 6700 g po dobu 15 minut, odstranění vrstvy odstředěného tuku a filtrace přes sterilní filtry s póry o velikosti 0,2  $\mu$ m (Minisart<sup>®</sup>, Sartorius).

Vlastní stanovení probíhalo vždy paralelně dvojmo na GTK agaru s 10 % obj. sterilního odstředěného mléka, do kterého byly sterilním korkovrtem udělány komůrky o průměru 9 mm (dávkováno tam bylo 0,03 ml upraveného vzorku). Doba (1, 2, 3 a 4 dny) a teplota (25, 30 a 44 °C) inkubace byly ověřovány s využitím enzymového preparátu ALCALASE<sup>®</sup> *Bacillus licheniformis* (CALBIOCHEM<sup>®</sup>, kat. č. 126741, obsahuje zejména subtilisin A, EC 3.4.21.14, aktivita 3,137 AU/ml), měřen byl průměr vyjasněných proteolytických zón.

Poté byla metoda aplikována na vzorky s proteolytickými mikroorganismy (izolát ze stěru z dojícího zařízení *B. cereus* SPA 12, izolát ze syrového mléka *B. licheniformis* SPA 9, *Proteus mirabilis* CCM 7188, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955) naočkovanými do sterilního mléka a kultivovanými 24 h při 30 °C, aby vytvořily enzymy.

## Výsledky a diskuse

Z hlediska snadné manipulace a odečítání nakultivovaných ploten byl GTK agar s přidaným mlékem hodnocen

lépe než obě testované varianty Calcium Caseinate agarů, které je nutné před nalitím na plotny důkladně promíchat, aby nerovnoměrná distribuce precipitátu kaseinátu vápenatého neznemožňovala odečet.

Při porovnání výsledků na Calcium Caseinate agarů a na GTK agarů s mlékem se 85 % získaných výsledků lišilo o méně než 30 % z logaritmu nižšího výsledku a zbývající naměřené výsledky byly vyšší. Podobně vyšlo i porovnání Calcium Caseinate agarů s mlékem a GTK agarů s mlékem: o méně než 30 % z logaritmu nižšího výsledku se lišilo 88 % získaných výsledků a ostatní naměřené výsledky byly vyšší. Všechny tři pudy fungují na srovnatelném principu, ale výsledky na Calcium Caseinate agarů a na Calcium Caseinate agarů s mlékem mohou být navýšeny v důsledku chybného vyhodnocení ploten (záměna oblastí s nižší koncentrací precipitátu kaseinátu vápenatého za vyjasněnou proteolytickou zónu). Přelití ploten 5 - 10% kyselinou octovou před vlastním počítáním kolonií - tak, jak je doporučováno výrobcem - ke zlepšení odečitelnosti vyjasněných zón nepřispělo.

V tab. 1 jsou porovnány také počty všech mikroorganismů vykultivovaných na GTK s mlékem vzhledem k výsledkům stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM) podle normy (ČSN EN ISO 4833, 2003) na samotném GTK agarů.

**Tab. 1** Porovnání metod pro stanovení proteolytických mikroorganismů

Vzorek	proteolyty Calcium Caseinate (JTK/ml)	proteolyty Calcium Caseinate s mlékem (JTK/ml)	proteolyty GTK s mlékem (JTK/ml)	celkem na GTK s mlékem (JTK/ml)	podíl na CPM (%)*
1	-	$5 \times 10^3$	$1 \times 10^3$	$3 \times 10^4$	105
2	-	$4 \times 10^3$	$< 1 \times 10^3$	$1 \times 10^3$	86
3	$2,2 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$3 \times 10^3$	$7 \times 10^3$	91
4	$3,5 \times 10^4$	-	$1,5 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$	102
5	-	$2 \times 10^3$	$1,7 \times 10^4$	$3,7 \times 10^4$	134
6	$3,2 \times 10^5$	$8,4 \times 10^4$	$6,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$	110
7	$2 \times 10^3$	$5 \times 10^3$	$1,6 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	100
8	$1,9 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$2 \times 10^3$	$2,3 \times 10^4$	101
9	$3,5 \times 10^4$	$4,7 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	101
10	$5 \times 10^3$	$2,5 \times 10^4$	$2 \times 10^3$	$5 \times 10^3$	84
11	-	$< 1 \times 10^3$	$1 \times 10^3$	$7 \times 10^3$	101
12	-	-	$1 \times 10^3$	$2 \times 10^3$	94
13	$2,2 \times 10^4$	$< 1 \times 10^3$	$3 \times 10^3$	$1,6 \times 10^4$	99
14	$8 \times 10^3$	$9 \times 10^3$	$1 \times 10^3$	$9 \times 10^3$	107
15	$1,5 \times 10^4$	-	$1,3 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	103
16	$6 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4$	$9 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	101
17	$2,6 \times 10^5$	-	$2,4 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	101
18	$4,3 \times 10^4$	$4 \times 10^3$	$6 \times 10^3$	$4,6 \times 10^4$	106
19	$1,0 \times 10^4$	-	$< 1 \times 10^3$	$< 1 \times 10^3$	$< 70$
20	$1,9 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$	97
21	$1,4 \times 10^5$	-	$6 \times 10^5$	$4,1 \times 10^6$	91
22	$8 \times 10^3$	-	$< 1 \times 10^3$	$< 1 \times 10^3$	$< 76$
23	$1,8 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$4,8 \times 10^4$	98
24	$3 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4$	$6 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4$	100
25	$1,4 \times 10^4$	-	$5 \times 10^3$	$1,8 \times 10^4$	102

\* vypočteno podle vztahu:  $100 \times \log(\text{počet všech MO na GTK s mlékem}) / \log(\text{CPM})$

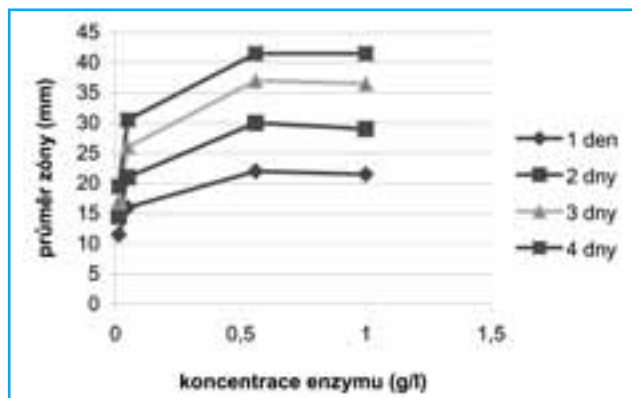
Poznámka: Kde nejsou uvedena konkrétní data, nebylo možné plotny vyhodnotit z důvodu nadměrné nebo nedostatečné koncentrace precipitátu kaseinátu vápenatého.

U 88 % vzorků byl rozdíl počtu všech mikroorganismů zjištěných na GTK s mlékem oproti CPM nižší než 30 % z logaritmu CPM a dokonce u 80 % vzorků byl tento rozdíl nižší než 10 %. Nabízí se tedy možnost, jak při analýzách pro interní účely získat z jednoho rozboru dva výsledky. Na plotnách s GTK s mlékem (10 % obj.) lze po kultivaci při 30 °C 3 dny vedle sebe stanovit celkové počty a počty proteolytických mikroorganismů s tím, že budou použita ředění vhodná pro stanovení celkového počtu mikroorganismů. Tímto postupem lze odhalit vzorky, kde proteolytické mikroorganismy převažují, i vzorky, kde jsou tyto mikroorganismy v řádově nižších počtech.

Testování difuzní agarové metody (DAM) probíhalo nejprve s enzymovým preparátem ALCALASE®, který byl přidáván do sterilního mléka tak, aby vznikla koncentrační řada 0,005, 0,014, 0,050, 0,56, 1,0, 10 a 24 g/l. Plotny s těmito vzorky byly inkubovány při 25, 30 a 44 °C, průměr zón byl měřen po 1, 2, 3 a 4 dnech. Teploty 25 a 30 °C byly vybrány, aby vyhovovaly co nejširšímu spektru mikrobiálních enzymů, teplota 44 °C je vhodná pro některé bacilární enzymy s vyšším teplotním optimem. Optimální teplota pro extracelulární proteasy pseudomonád je mezi 17,5 a 30 °C (Braun a Sutherland, 2003), pro bacilární proteasy nejčastěji mezi 30 a 37 °C (Braun a kol., 1999), ale např. proteasa *B. cereus* má teplotní optimum při 40 °C a proteasa *B. pumilus* při 50 °C (Matta a Punj, 1998).

Použitá koncentrace enzymu lze charakterizovat takto (obr. 1):

**Obr. 1:** Difuzní agarová metoda pro vzorky mléka s přidáním preparátu ALCALASE®, inkubace ploten při 30 °C.



Koncentrace enzymového preparátu 0,005 g/l (mléko se srazilo během 48 h při 30 °C) leží pod mezí detekce DAM, a to při všech testovaných teplotách. Průměr zóny bylo možné změřit až pro koncentraci 0,014 g/l, při které se mléko srazilo během 24 h při 30 °C. Pomocí DAM lze tedy detekovat pouze koncentrace proteas, které vyvolávají vizuálně patrnou změnu mléka během přibližně 24 h, a je proto nevhodná k průkazu enzymového původu vad, které vzniknou v průběhu skladování mléčných výrobků.

Při koncentracích nad 0,05 g/l byl výsledek DAM ovlivněn rychlostí difuze, nad 0,5 g/l už prakticky nezávisel na koncentraci enzymu. Vzorek s 24 g/l enzymového preparátu se srazil dříve než za 1 h při 30 °C.

Při dané koncentraci enzymu a v daném čase odečtu měly zóny největší průměr po inkubaci při 44 °C, menší při 30 °C a nejmenší při 25 °C. Tento výsledek byl dán spolupůsobením dvou faktorů - optimální teplota použitého enzymu (37 °C, dle aplikačního listu) a zvýšení rychlosti difúze inkubací při vyšší teplotě. Jsou-li plotny inkubovány při 44 °C, existuje však riziko rozpraskání agarů v důsledku vysychání.

Čím déle byly plotny inkubovány, tím byly zóny větší. Rychlost růstu jejich průměru však s časem klesala, protože plocha závisí na průměru kvadraticky. Z praktického hlediska nemá význam dobu inkubace příliš prodloužovat - prodloužila by se tím i doba, než budou získány výsledky, zvýšilo by se riziko růstu případných kontaminujících mikroorganismů, a odečitelnost výsledků by se tím podstatně nezlepšila.

Výsledky DAM pro čisté kmeny proteolytických mikroorganismů jsou shrnuty v tab. 2. Nejpriznivějšího výsledku bylo dosaženo s *B. cereus* - vlivem proteolýzy došlo k vysrážení vzorku a proteolytické enzymy byly pomocí DAM detekovány (tab. 3). Oproti preparátu ALCALASE® vznikly v případě *B. cereus* větší zóny při 30 °C než při 44 °C, což bylo způsobeno rozdíly v optimální teplotě pro jednotlivé enzymy.

Přestože byl *B. licheniformis* na začátku i na konci inkubace přítomen v obdobné denzitě jako *B. cereus*, nebyla jeho proteolytická aktivita za podmínek pokusu prokázána ani pomocí DAM ani pozorovatelnými změnami vzorku.

*Proteus mirabilis* mohl způsobit vznik hnilobného zápachu metabolizováním nebiřkovinových dusíkatých látek a během doby pokusu vytvořit jen malé, DAM nedetekovatelné, množství proteas.

Naproti tomu se zdá, že *P. aeruginosa* vytvořila velké množství enzymů. Přestože vzorek nebyl viditelně vysrážen, k určitým změnám bílkovin došlo - při odstředování vzorku pro DAM vznikl čirý supernatant, který se lišil od mléčné zakaleného supernatantu málo hydrolyzovaných vzorků. Po 3 dnech inkubace však ke vzniku proteolytických zón nedošlo. Teprve při dalším odečtu po 6 dnech byla zjištěna nevýrazná zóna o průměru 26 mm, a to pouze po inkubaci při 44 °C. To je rozdíl oproti literatuře (Braun a Sutherland, 2003), která uvádí optimální teplotu pro extracelulární proteasy pseudomonád mezi 17,5 a 30 °C.

**Tab. 2** Detekce proteolytické aktivity čistých kmenů pomocí DAM

	počáteční denzita (JTK/ml)	denzita po 24 h při 30 °C (JTK/ml)	změny vzorku	detekce proteas pomocí DAM
<i>B. cereus</i>	$6,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^7$	sraženo	ano
<i>B. licheniformis</i>	$2,3 \times 10^5$	$7,0 \times 10^7$	beze změn	ne
<i>Prot. mirabilis</i>	$2,8 \times 10^7$	$3,0 \times 10^8$	beze změn konzistence, výrazný hnilobný zápach	ne
<i>P. aeruginosa</i>	$8,9 \times 10^6$	$4,0 \times 10^8$	změna odstínu mléka u hladiny, destabilizace bílkovin patrná při odstředování vzorku	částečně

**Tab. 3** Hodnocení vzorku s *B. cereus* pomocí DAM - průměr vzniklých zón (mm)

doba odečtu	25 °C	30 °C	44 °C
3 dny	22,5	23,5	21
6 dnů	32	34	28

## Závěr

Testovány byly jednoduché, levné a v provozních podmínkách dostupné plotnové metody stanovení proteolytických mikroorganismů a jejich enzymů.

Pro kultivační stanovení mikroorganismů s proteolytickou aktivitou byly porovnány tři půdy: komerčně dostupný Calcium Caseinate agar, Calcium Caseinate agar s přidaným mlékem a klasický GTK agar, do kterého se po rozehrání přidá 10 % obj. sterilního mléka. Všechny tři poskytly kvantitativně srovnatelné výsledky, avšak z hlediska jednoduchosti přípravy a eliminace rizika nerovnoměrné distribuce precipitátu vyhověl nejlépe GTK agar s přidaným mlékem. Jestliže jsou na něm počítány nejen kolonie s vyjasněnou zónou, ale i ty ostatní, výsledky se velmi dobře shodují s celkovým počtem mikroorganismů stanoveným podle normy. Kultivace na GTK agaru s 10 % obj. mléka 3 dny při 30 °C tedy umožňuje v rámci jedné analýzy pro provozní účely určit jak celkový počet mikroorganismů, tak počet proteolytických mikroorganismů.

Stanovení samotných proteolytických enzymů v mléce je komplikováno jak jejich nízkou koncentrací, tak rozdílnými podmínkami aktivity. V této práci byla testována difúzní agarová metoda. Bylo zjištěno, že je využitelná za těch podmínek (enzym, teplota), kdy dojde k okem pozorovatelné změně vzorku mléka během přibližně 24 h, a to i když jsou plotny inkubovány déle, neboť při difúzní agarové metodě probíhá nejen vlastní enzymatická reakce, ale i difúze enzymů.

Kromě toho nemusí být difúzní agarovou metodou detekovány enzymy všech mikroorganismů kultivačně stanovených jako proteolytické, protože mikroorganismy tvoří na plotnách takové enzymy a v takové koncentraci, aby jim zajistily dostatek potřebných živin, avšak podmínky difúzní agarové metody nemusejí vyhovovat enzymům vytvořeným ve vzorku. Navíc se jednotlivé enzymy svými požadavky liší. Z výše uvedeného vyplývá, že je testovaná metoda vhodná pro výzkumné účely - studium izolovaných enzymů.

## Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory MŠMT, projekt 2B06048 "Mikrobiologická rizika v mlékárenských výrobcích - detekce a preventivní opatření" a výzkumný záměr 2672286101 "Mléko - významná součást zdravé a bezpečné výživy".

## LITERATURA

Braun, P., Sutherland, J.P. (2003): Predictive modelling of growth and enzyme production and activity by a cocktail of *Pseudomonas* spp., *Shewanella putrefaciens* and *Acinetobacter* sp. Int. J. Food Microbiol. 86: 271 - 282

- Braun, P., Fehlhaber, K., Klug, C., Kopp, K. (1999): Investigations into the activity of enzymes produced by spoilage-causing bacteria: a possible basis for improved shelf-life estimation. *Food Microbiol.* 16: 531 - 540.
- Chen, L., Daniel, R.M., Coolbear, T. (2003): Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *Int. Dairy J.* 13: 255 - 275.
- Chen, L., Coolbear, T., Daniel, R.M., (2004): Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines. *Int. Dairy J.* 14: 495 - 504.
- Dave, R.I., Shah, N.P. (1997): Characteristics of bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LA-1. *Int. Dairy J.* 7: 707 - 715.
- Guinot-Thomas, P., Al Ammouy, M., Le Roux, Y., Laurent, F., (1995): Study of proteolysis during storage of raw milk at 4 °C: effect of plasmin and microbial proteinases. *Int. Dairy J.* 5: 685 - 697.
- Hayes, M.C., Boor, K. (2001): Raw milk and fluid milk products. V knize Marth, E. H., Steel, J. L. *Applied Dairy Microbiology*, 2<sup>nd</sup> edition, str. 59 - 76. Marcel Dekker, Inc., New York, USA. ISBN 0-8247-02536-X.
- Jeurnink, Th.J.M. (1991): Effect of proteolysis in milk on fouling in heat exchangers. *Neth. Milk Dairy J.* 45: 23 - 32.
- Ma, Y., Barbano, D.M., Santos, M., (2003): Effect of CO<sub>2</sub> addition to raw milk on proteolysis and lipolysis at 4 °C. *J. Dairy Sci.* 86: 1616 - 1631.
- Matta, H., Punj, V. (1998): Isolation and partial characterization of a thermostable extracellular protease of *Bacillus polymyxa* B-17. *Int. J. Food Microbiol.* 42: 139 - 145.
- Tůma, Š., Vogensen, F.K., Ardö, Y. (2005): Antiklostridiální aktivita laktobacilů izolovaných z polotvrdých sýrů. *Mlékařské listy* 93: 18 - 21.
- ČSN EN ISO 4833 Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. ČNI, Praha, 2003.

Přijato do tisku 20. 2. 2009

Lektorováno 15. 3.2009

## HUSTOTA MLÉKA A SMETANY V ZÁVISLOSTI NA TEPLOTĚ A OBSAHU TUKU

**Snášelová Jana, Motyčková Markéta, Zikán Vladimír**  
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

### Depending of milk and cream density on temperature and fat content

#### Abstrakt

Znalosti o hustotě mléka a smetany jsou důležitou součástí přípravy technologických a technických návrhů zařízení a kontrol mlékárenských procesů.

Provedená měření hustoty byla shrnuta do formy tabulek, ve kterých jsou uvedeny závislosti hustot mléka a smetany na teplotě (5 °C až 40 °C) a obsahu tuku pro mléko (0,6 % až 5,6 %) a smetanu (12 % až 43 %). Vybrané výsledky měření vykazovaly dobrou shodu s literárními referencemi.

Publikace je určena zejména pracovníkům mlékařských laboratoří pro praktické použití.

#### Abstract

Knowledge on density of milk and cream is important part of technological and technical dairy equipment proposal preparing and checking of dairy processes.

Dependences of milk and cream density on temperature (5 °C to 40 °C) and content of fat in milk (0,6 % to 5,6 %) and fat in cream (12 % to 43 %) was showed in the summary sheets from performance measuring of density. Selected results of measuring showed good conformity with references.

The publication is addressed namely to dairy laboratory workers for practical application.

#### Úvod

Příspěvek je určen pracovníkům mlékárenských laboratoří, kteří se v provozu setkávají s měřením hustoty mléka a smetany ve standardních podmínkách, a pokud se jedná o příjem mléka v hmotnostních jednotkách namísto objemových i v podmínkách příjmu syrového mléka.

Mléko je komplexní koloidní disperze, jehož fyzikální a fyzikálně chemické vlastnosti závisí na vnitřních kompozičních a strukturálních faktorech a externích faktorech jako je teplota a celkové zatížení mléka od nadojení. Nelze udělat jasnou linii mezi fyzikálními a fyzikálně chemickými vlastnostmi.

Znalosti o fyzikálních vlastnostech, tedy i hustotě, jsou důležitou součástí technologických a technických návrhů a kontrol mlékárenských procesů a výrobního zařízení. Tyto znalosti jsou jednou z podmínek pro vhodné návrhy a plánování nových metod analýzy mléka, stanovení mléčné mikrostruktury a objasnění komplexních chemických reakcí mléka.

#### Literární souhrn - hustota mléka a smetany

##### *Hustota obecně*

Hustota ( $\rho$ ) je definována jako hmotnost na jednotku objemu a obvykle je vyjadřována v  $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$  nebo v  $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  (2). Hustota mléka a mléčných výrobků se používá k přepočtu objemového měření na gravimetrické a naopak, a k výpočtu dalších fyzikálních vlastností, jako je kinematická viskozita a tepelná difuzivita. Měření hustoty je také nepřímý postup měření koncentrace celkové sušiny, vhodný i pro kontrolu falšování mléka vodou. Měření hustoty in-line se často používá pro účely kontroly technologických mlékárenských procesů, mimo jiné pro celkovou sušinu mléčných koncentrátů z odparek nebo pro standardizaci mléka na výrobu sýrů.

Hustota mléka je výslednicí hustot jeho tří hlavních složek: vody, tukuprosté sušiny (bílkovin, laktózy a solí) a tuku, které jsou v běžném mléce obsaženy v poměru 87:9:4. S jakoukoliv změnou jedné ze složek se hustota mléka mění. Obecně platí, že s rostoucím obsahem tuku a s klesajícím obsahem sušiny hustota mléka klesá. Hustota mléka je rovněž ovlivněna teplotou, kdy s rostoucí teplotou hustota mléka klesá. Čerstvě nadojené mléko dosahuje hustot 1027,7 - 1032,0  $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ , které se rychle mění se změnou obsahu plynů v mléce. Dále může hustota záviset i na plemenu dojníc a fázi laktace. Sterilizace, pasterace ani homogenizace nemají na hustotu mléka vliv (2).