

VLIV PODMÍNEK SKLADOVÁNÍ NA MIKROBIOLOGICKOU KVALITU PASTEROVANÉHO MLÉKA

I. Němečková, N. Zhaxenbay, P. Roubal

Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o., Ke Dvoru 12a, 160 00 Praha 6

Influence of storage conditions on microbiological quality of pasteurized milk

Souhrn

Sledován byl vliv podmínek skladování na mikrobiologickou kvalitu pasterovaného mléka jako meziprojektu v mlékárenských technologiích. Stanovován byl celkový počet mikroorganismů, psychrotrofní mikroorganismy, pseudomonády, termorezistentní mikroorganismy a *Bacillus cereus*. Při použití mikrobiologicky kvalitního syrového mléka, dosažení požadovaného pasteračního efektu a při účinné prevenci rekontaminace by mohlo být pasterované mléko skladováno nejdéle 2 - 3 dny při teplotě do 12 °C, aby splňovalo legislativní požadavky na mikrobiologické parametry. Z hlediska rizika vzniku vad způsobených psychrotrofními mikroorganismy a jejich enzymy lze však doporučit skladování nejdéle 2 dny při 6 °C, popř. jen několik hodin při 12 °C.

Summary

Influence of storage conditions on microbiological quality of pasteurized milk as semi-product in dairy technologies was studied. Total bacteria count, psychrotrophic micro-organisms, pseudomonades, heat-resistant micro-organisms and *Bacillus cereus* were determined. If raw milk of high microbiological quality is used, desired pasteurization effect is achieved and re-contamination is effectively prevented, pasteurized milk could be stored up to 2 - 3 days at 12 °C to fulfill legislative demands on microbiological parameters. In terms of risk of undesirable changes by spoilage psychrotrophic micro-organisms and their enzymes it can be recommended to store pasteurized milk no longer than 2 days at 6 °C or only a few hours at 12 °C.

Úvod

Podmínky skladování syrového mléka jsou limitovány legislativními předpisy. Nařízení ES č. 853/2004 ve znění pozdějších předpisů (Nařízení (ES) č. 1020/2008) udává, že mléko musí být po přijetí ve zpracovatelském závodě rychle zchlazeno na teplotu nepřekračující 6 °C a tato teplota se musí udržet až do doby zpracování. Provozovatelé potravinářských podniků však mohou uchovávat mléko i při

vyšší teplotě, pokud ke zpracování dojde ihned po nadojení nebo do 4 hodin od přijetí ve zpracovatelském závodě.

Nařízení dále udává, že provozovatelé potravinářských podniků musejí zajistit, aby bezprostředně před zpracováním byl v syrovém kravském mléce používaném pro výrobu mléčných výrobků obsah mikroorganismů při teplotě 30 °C nižší než 300 000 na mililitr, v tepelně ošetřeném kravském mléce používaném na výrobu mléčných výrobků nižší než 100 000 na mililitr.

Pokud tedy bude syrové mléko s celkovým počtem mikroorganismů (CPM) $3,0 \times 10^5$ JTK/ml podrobena šetrné pasteraci (72 - 75 °C/15 - 20 s, běžný pasterační efekt 99,9 %), bude CPM po pasteraci $3,0 \times 10^2$ JTK/ml. Po vysoké pasteraci (80 - 85 °C/4 - 5 s, běžný pasterační efekt 99,99 %) bude CPM $3,0 \times 10^1$ JTK/ml. Tyto hodnoty jsou v porovnání se syrovým mlékem nízké, avšak nezanedbatelné. Cílem této práce je zjistit, za jakých podmínek by mělo být mléko po pasteraci (meziprojektu při výrobě mléčných výrobků) skladováno, aby nedošlo k nežádoucímu opětovnému nárůstu technologicky nežádoucí mikroflóry.

Postup práce

Pokus byl proveden s deseti vzorky syrového odstředěného mléka (odběr před pastérem), u kterých byly stanoveny počáteční mikrobiologické parametry. Vzorky byly rozplněny po 150 ml do skleněných lahvíček a na vodní lázni podrobena záhřevu 72 °C/30 s. Tímto způsobem sice není možné dosáhnout tak vysokého pasteračního efektu, jako má deskový výměník, ale cílem provedeného tepelného ošetření bylo pouze pozměnit poměr přítomných mikroorganismů ve prospěch termorezistentní mikroflóry. Aby bylo možné pokus vyhodnotit, bylo zapotřebí, aby i na počátku skladování byla ve významné míře přítomna mikroflóra méně rezistentní k teplotě, která se v reálných podmínkách může dostat do pasterovaného mléka jako popasterační kontaminace, např. z biofilmů na povrchích technologických zařízení.

Výsledky z rozboru po záhřevu byly přiřazeny době skladování 0 hodin. Poté byly vzorky rozděleny na dvě skupiny po pěti kusech a uchovávány v termostatech nastavených na 6 ± 1 °C (simulace vhodných podmínek skladování) a na 12 ± 1 °C (simulace nedostatečného chlazení). Ve zvolených časových intervalech bylo odbíráno pro rozbor po 10 ml z každého vzorku.

Prováděny byly tyto mikrobiologické rozborů:

- celkový počet mikroorganismů (CPM) - GTK, přelivem, 30 °C/3 dny, podle ČSN EN ISO 4833 (2003)
- psychrotrofní mikroorganismy - GTK, přelivem, 21 °C/25 h, podle ČSN ISO 8552 (2005)
- termorezistentní mikroorganismy (TRM) - GTK, přelivem, 30 °C/3 dny, po inaktivaci vzorků 85 °C/10 min, podle ČSN 56 0100 (1994)
- *B. cereus* - MYPA, 0,1 ml roztěrem, 30 °C/24 - 48 h, po inaktivaci vzorků 85 °C/10 min, podle ČSN ISO 7932 (2005)
- pseudomonády - *Pseudomonas* agar s C-F-C Supplementem (Oxoid), 0,1 ml roztěrem, 30 °C/48 h

Použité metody byly dále testovány na čistých kmenech mikroorganismů s cílem zjistit, jak jsou výsledky ovlivněny vnějšími podmínkami, kterým jsou mikroorganismy vystaveny. U pseudomonád byly navíc plotny inokulovány jak přelivem, tak roztěrem, aby byl ověřen také vliv teploty agaru.

Kmeny *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Pseudomonas fluorescens* CCM 2826 a *Bacillus cereus* SPA12 (izolát VÚM) byly jednotlivě naočkovány do sterilního mléka (0,5 % tuku) na počáteční denzitu $10^7 - 10^8$ JTK/ml a proveden byl rozbor. Poté byly vzorky podrobeny záhřevu na vodní lázni 72 °C/30 s, analyzovány, skladovány 24 h při 6 °C a znovu analyzovány.

U vzorků mléka s pseudomonádami byly stanovovány podle výše uvedených postupů celkové počty mikroorganismů (přelivem i roztěrem), psychrotrofní mikroorganismy (přelivem i roztěrem) a pseudomonády (roztěrem), u vzorků s bacily celkové počty mikroorganismů (přelivem), termorezistentní mikroorganismy (přelivem), *B. cereus* (roztěrem, po inaktivaci a bez provedené inaktivace).

Výsledky a diskuse

Mikrobiologická kvalita výchozího syrového mléka je popsána v tab. 1. Z důvodů popsaných výše byl průměrný pasterační efekt, tj. procento mikroorganismů usmrcených při pasteraci, relativně nízký (99,2 %).

Tab. 1 Mikrobiologická kvalita výchozího syrového odstředěného mléka

	CPM (JTK/ml)	psychrotrofní MO (JTK/ml)	termorezistentní MO (JTK/ml)	<i>B. cereus</i> (JTK/ml)	pseudomonády (JTK/ml)
1	$7,2 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	$2,0 \times 10^1$	< 10	5×10^3
2	$1,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	$3,0 \times 10^1$	< 10	5×10^3
3	$1,5 \times 10^5$	$1,9 \times 10^4$	$5,0 \times 10^2$	< 10	5×10^3
4	$1,3 \times 10^5$	$1,7 \times 10^4$	$9,0 \times 10^1$	< 10	< 10
5	$7,1 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$6,4 \times 10^1$	< 10	3×10^3
6	$2,7 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$2,1 \times 10^1$	< 10	$1,9 \times 10^4$
7	$2,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$3,4 \times 10^1$	< 10	$1,1 \times 10^4$
8	$2,7 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	$6,9 \times 10^1$	< 10	$8,2 \times 10^4$
9	$5,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$2,1 \times 10^1$	< 10	$3,6 \times 10^4$
10	$3,2 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$	6×10^1	< 10	$1,0 \times 10^4$

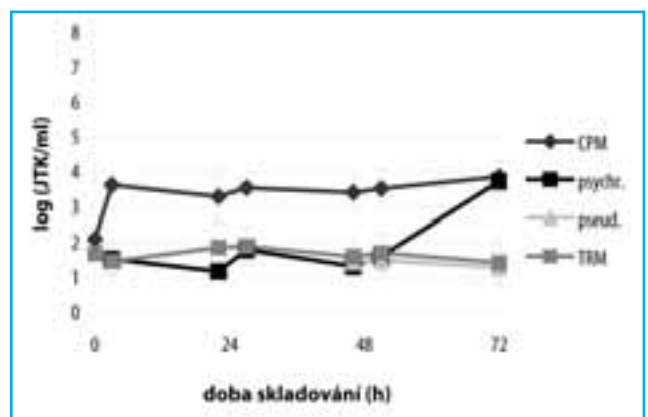
Sorhang a Stepaniak (1997) uvádějí, že při 2 - 7 °C je generační doba psychrotrofních bacilů mnohem delší než generační doba běžná pro pseudomonády, avšak už při 10 °C se růstová rychlost těchto bacilů zvyšuje. Nejvýznamnějším psychrotrofním bacilem v mléce je *B. cereus* (Chen a kol., 2003), avšak v analyzovaných vzorcích nebyl *B. cereus* ve významné míře detekován ani při 6 °C ani při 12 °C, a to ani po cíleném prodloužení doby skladování na 5 dnů. Růstu *B. cereus* ve všech vzorcích skladovaných 5 dnů při 12 °C však nasvědčuje vznik sraženiny, která svým charakterem odpovídá právě aktivitě tohoto bakteriálního druhu. Vysvětlením může být, že vegetativní buňky termorezistentů adaptované na nízkou teplotu jsou citlivé k záhřevu v důsledku změn cytoplazmatické membrány. Aby mohla membrána plnit svou funkci, nesmí ztuhnout.

Toho lze při nízkých teplotách dosáhnout snížením bodu tání přítomných lipidů, tedy zvýšením podílu nenasyčených a krátkých mastných kyselin. Na druhou stranu při záhřevu se tato cytoplazmatická membrána snadno rozteče, a tak dojde k usmrcení adaptovaných mikroorganismů (Adams a Moss, 2000).

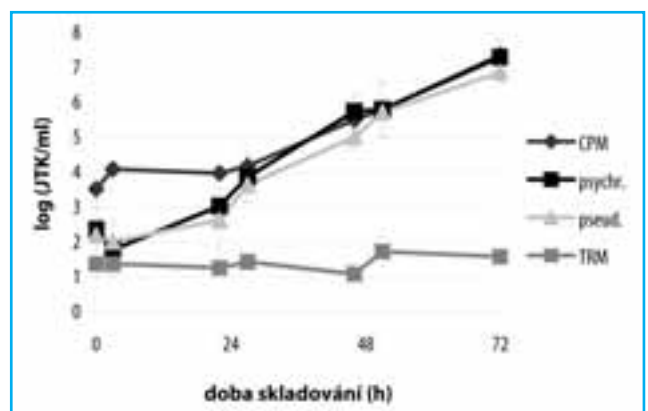
Výsledky dalších rozborů v průběhu skladování jsou znázorněny na obr. 1 a 2. Během třídenního skladování při 6 °C nedošlo k významnému nárůstu CPM v pasterovaném mléce. První dva dny se psychrotrofní mikroorganismy postupně adaptovaly na nízkou teplotu, mezi druhým a třetím dnem se denzita psychrotrofů zvýšila až na úroveň CPM a předpokládá se výrazný nárůst CPM a psychrotrofů po třech dnech skladování při 6 °C. K obdobným výsledkům dospěl i Guinot-Thomas a kol. (1995) pro syrové mléko - během skladování při 4 °C byly přítomné mikroorganismy asi 2 dny v lag-fázi a za 4 - 6 dnů se dostaly na počátek stacionární fáze růstu, kde dosáhly $10^6 - 10^7$ JTK/ml. V této práci nedošlo ke zhoršení mikrobiologických parametrů mléka skladovaného při 6 °C kvůli nárůstu pseudomonád (obr. 1), ale psychrotrofních mikroorganismů tvořících oranžovo-žlutý pigment (identifikace nebyla provedena).

Naproti tomu při skladování při 12 °C rostly psychrotrofní mikroorganismy i jejich zástupci pseudomonády jen s krátkou lag-fází a úroveň CPM dosáhly během

Obr. 1 Mikrobiologická kvalita pasterovaného mléka během skladování při 6 °C (n = 5)



Obr. 2 Mikrobiologická kvalita pasterovaného mléka během skladování při 12 °C (n = 5)



Tab. 2 Mikrobiologická kvalita výchozího syrového odstředěného mléka

	CPM přelivem (JTK/ml)	CPM roztěrem (JTK/ml)	psychrotrónní MO přelivem (JTK/ml)	psychrotrónní MO roztěrem (JTK/ml)	pseudomonády roztěrem (JTK/ml)
Pseudomonas aeruginosa CCM 3955					
po naočkování	$9,3 \times 10^7$	$4,0 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$
po záhřevu	$1,5 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$
po skladování	$6,0 \times 10^4$	$7,1 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$
Pseudomonas fluorescens CCM2826					
po naočkování	$8,2 \times 10^7$	$4,7 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$
po záhřevu	$2,5 \times 10^6$	-	$5,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$5,8 \times 10^4$
po skladování	$3,9 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$6,9 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	$2,0 \times 10^5$

Tab. 3 Rozbor kultury *Bacillus cereus* SPA 12 různými metodami

	CPM (JTK/ml)	TRM (JTK/ml)	<i>B. cereus</i> po inaktivaci (JTK/ml)	<i>B. cereus</i> bez inaktivace (JTK/ml)
po naočkování	$1,2 \times 10^7$	$4,1 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$	$2,4 \times 10^7$
po záhřevu	$2,4 \times 10^6$	$2,7 \times 10^4$	$9,4 \times 10^4$	$2,5 \times 10^6$
po skladování	$9,1 \times 10^6$	$5,8 \times 10^4$	$3,9 \times 10^4$	$3,1 \times 10^7$

prvního dne. Poté tyto tři parametry narůstaly stejným tempem. Předpokládá se proto, že pseudomonády tvořily většinu přítomných psychrotrofních i celkových mikroorganismů. Po třech dnech se CPM zvýšilo v průměru o 3,5 řádu, počty psychrotrofů o 5 řádů.

Denzita termorezistentních mikroorganismů se během tří dnů při 6 °C ani při 12 °C významně neměnila - pravděpodobně přítomné spory (s výjimkou *B. cereus* - viz výše) za daných podmínek neklíčily.

V tab. 2 a 3 jsou výsledky rozborů kultur technologicky nežádoucích mikroorganismů po naočkování do sterilního mléka, po záhřevu 72 °C/30 s a po skladování 6 °C/24 h. Z tab. 2 je patrné, že výsledky získané přelivem a roztěrem jsou srovnatelné, popř. roztěrem velmi mírně vyšší. Proto lze soudit, že sledování změn mikroflóry v průběhu skladování pasterovaného mléka nebylo významně ovlivněno citlivostí psychrotrofních mikroorganismů vůči teplotě rozehrátého agaru při inokulaci přelivem.

Metody pro stanovení celkového počtu mikroorganismů a psychrotrofních mikroorganismů poskytly pro oba druhy pseudomonád srovnatelné výsledky. Kultura *P. fluorescens* byla ale po záhřevu (a také po skladování) citlivá k cefalosporinovému antibiotiku v *Pseudomonas* agaru, a tak stanovení pseudomonád poskytlo o 1 - 2 řády nižší výsledky. Určit, jak častý je tento jev u pseudomonád vyskytujících se v mléce, není cílem této práce. Avšak ani za předpokladu, že by většina pseudomonád byla srovnatelně citlivých s *P. fluorescens* CCM 2826, nestačilo by to k vyvrácení tvrzení, že mají na nárůstu psychrotrofů po 3 dnech při 6 °C dominantní podíl jiné mikroorganismy.

Pokud jde o testovanou kulturu *B. cereus*, je vliv antibiotika polymyxinu v MYPA agaru zanedbatelný. Celkové počty mikroorganismů jsou srovnatelné s počty zjištěnými na MYPA agaru bez inaktivace vzorku a počty termorezistentů srovnatelné s počty na MYPA agaru po inaktivaci.

Nízká záchytnost *B. cereus* při skladování pasterovaného mléka nebyla tedy způsobena nevhodným složením půdy, ale citlivostí vegetativních buněk psychrotrofních kmenů *B. cereus* k použitému inaktivačnímu záhřevu.

Závěr

Za předpokladu, že mléko bude po pasteraci obsahovat CPM $3,0 \times 10^1$ až $3,0 \times 10^2$ JTK/ml (viz Úvod), znamená dosažení horního limitu během skladování pasterovaného meziproductu $1,0 \times 10^5$ JTK/ml dle Nařízení č. 1020/2008 nárůst o 3 - 4 řády. Pokud nedojde k popasterační kontaminaci, lze za uvedených podmínek pasterované mléko skladovat maximálně tři dny při 12 °C, při 6 °C déle. Pokud však nebude mít mléko za pastěrem výše uvedenou kvalitu nebo dojde k rekontaminaci, bude nutné dobu (teplotu) skladování zkrátit (snížit). Toto se vztahuje na splnění legislativních požadavků, avšak z hlediska snížení rizika vzniku vad způsobených psychrotrofními mikroorganismy a jejich enzymy lze doporučit skladování pasterovaného mléka nejdéle dva dny při 6 °C, popř. pouze několik hodin při 12 °C.

Mikrobiologická kvalita pasterovaného mléka je dána zejména vyšší kontaminací a druhovým zastoupením v rámci skupiny psychrotrofů. Při důkladném chlazení se uplatňují zejména pseudomonády a další bakterie, které nevykazují významnou rezistenci k teplotě (do mléka se mohou dostat jako popasterační kontaminace), při teplotách nad 10 °C mohou navíc růst (i když pomaleji než pseudomonády) také psychrotrofní bacily, které ve formě spor přežily pasterační záhřev.

Poděkování

Tato práce vznikla s finanční podporou Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky při řešení výzkumného záměru 2672286101 Mléko - významná součást zdravé a bezpečné výživy.

Literatura

- Adams, M.R., Moss, M.O. (2000): Food Microbiology, 2nd Edition, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. ISBN 0-85404-611-9.
- Chen, L., Daniel, R.M., Coolbear, T. (2003): Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. Int. Dairy J. 7: 129 - 140.
- 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.
- ČSN ISO 7932 Mikrobiologie - Všeobecné pokyny pro stanovení počtu *Bacillus cereus*. Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. ČNI, Praha, 2005.
- ČSN ISO 8552 Mléko - Stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů - Technika stanovení počtu kolonií při 21 °C (Rychlá metoda), ČNI, Praha, 2005.
- ČSN 56 0100 Mikrobiologické zkoušení poživatin, předmětů běžného užívání a prostředí potravinářských provozoven. ČNI, Praha, 1994.
- Guinot-Thomas, P., Al Ammouy, M., Le Roux, Y., Laurent, F. (1995): Tudy of proteolysis during storage of raw milk at 4 °C: effect of plasmin and microbial proteases. Int. Dairy J. 5: 685 - 697.
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví specifické hygienické předpisy pro potraviny živočišného původu, ve znění Nařízení č. 1020/2008.
- Sorhang, T., Stepaniak, L. (1997): Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. Trends Food Sci & Technol. (8): 35 - 41.

Přijato do tisku 10. 11. 2009, lektorováno 7. 12. 2009