

OVĚŘENÍ ÚČINNOSTI ANTILISTERIÁLNÍCH PŘÍPRAVKŮ PŘI TECHNOLOGICKÉM POSTUPU VÝROBY SÝRŮ ZRAJÍCÍCH POD MAZEM

Havlíková, Š.¹, Kvasničková, E.², Pechačová, M.¹

¹ MILCOM a.s., ² Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o.

Verification of activity antilisterial agents in technological production of smear surface ripening cheese

Abstrakt

Cílem práce bylo ověření účinnosti bakteriocinů produkovaných pediokoky a enterokoky při zrání sýrů zrajících pod mazem. Sýry byly kontaminovány listeriemi před začátkem zrání nebo před aplikací mazové kultury. Testované přípravky byly aplikovány v různých fázích zrání a poté sledována koncentrace listerií. Nejlepší výsledek byl dosažen po úplném dozrání u sýrů kontaminovaných před aplikací mazové kultury a ošetřených enterokokovou kulturou. Ale i u těchto sýrů byla překročena hranice infekčnosti 10^2 KTJ/g pro rizikové skupiny konzumentů. V ostatních případech byla koncentrace listerií ještě vyšší. Výsledky potvrdily účinnost bakteriocinů, ale v podmínkách zrání sýrů pod mazem zároveň zdůraznily význam sanitace a zásad HCCP ve výrobě.

Klíčová slova: Listerie, bakteriociny, sýry zrající pod mazem, zrání sýrů, pediokoky, enterokoky.

Úvod

Cílem této práce bylo ověřit účinnost bakteriocinů produkovaných pediokoky a enterokoky (GÁLVEZ a kol., 2007; IZQUIERDO a kol., 2009) testovanou předem in vitro na kmenech listerií, v reálných podmínkách zrání sýrů. V literatuře se uvádí snížení počtu listerií účinkem bakteriocinů produkovaných mléčnými bakteriemi až o 2,3 řádu (HARTMANN a kol. 2011) u různých potravin, u sýra Munster zrajícího pod mazem o 2 řády (IZQUIERDO a kol. 2009)

Nejvíce ohrožené výskytem listerií jsou sýry zrající pod mazem. Podmínky na povrchu těchto sýrů s dostatečnou vlhkostí, dostatkem živin i teplotou během zrání jsou ideální pro rozmnožování a rychlý růst počtu buněk listerií. Proto byla pokusná zrání realizována se sýry malé velikosti zrajícími pod mazem, u nichž je velký povrch a lze předpokládat nejrychlejší rozvoj populace listerií. Jako modelové mikroorganismy byly použity dva kmeny *Listeria innocua*.

Materiál a přístroje

Listeria innocua CCM Brno, sb. číslo 4030 a NCTC, sb. číslo 11288

Enterococcus faecium CCDM 945

FARGO 37, sušená kultura *Pediococcus acidilactici*, AMEREX Praha spol. s r. o.

Olomoucké tvarůžky velké, odebrané po naformování z výroby 17. 8. 2011.

Kvasinkový koncentrát *Candida valida* JHY-23, AGRO-LA, spol. s r. o., Jindřichův Hradec, v textu dále označení CV
Bakteriologický koncentrát *Brevibacterium linens* JHB-16, AGRO-LA, spol. s r. o., Jindřichův Hradec, dále v textu označení BBL

Brain Heart Infusion, OXOID CM0225

Brilliance™ Listeria Agar Base, OXOID CM1080

Brilliance™ Listeria Selective Supplement, OXOID SR0227^E

Brilliance™ Listeria Differential Supplement, OXOID SR0228^E

Slanetz Bartley Medium, OXOID CM 0377

M 17 Broth, MERCK 1.15108

MRS Agar, MERCK 1.10660

Klimatická programovatelná komora APT.Line KBF s mikroprocesorem pro řízení teplotních a vlhkostních cyklů, BINDER GmbH, Tuttlingen, Germany

Pracovní postup

Dovezené naformované tvarůžky byly rozděleny po 20 ks do zrajících beden a ošetřeny takto:

- I. Sýry ošetřeny suspenzí CV, 20 ml/20 ks sýrů, po omytí oxidační mikroflóry ošetření koncentrátem BBL 20 ml na 20 ks sýrů. Bez kontaminace.
- II. Před začátkem zrání ošetření suspenzí CV s přídavkem listerií (0,2 ml směsi obou kmenů v poměru 1:1 o koncentraci $1,41 \times 10^5$ KTJ/ml na 20 ml suspenze CV), po omytí ošetření suspenzí BBL 20 ml/20 ks.
- III. Před začátkem zrání ošetření suspenzí CV s přídavkem listerií (0,2 ml směsi obou kmenů v poměru 1:1 o koncentraci $1,41 \times 10^5$ KTJ/ml na 20 ml suspenze CV), po omytí ošetřeno postřikem BBL 20 ml/20 ks sýrů s přídavkem 2 ml kultury *E. faecium* 945 na 20 ml suspenze.
- IV. Sýry před začátkem zrání ošetřeny CV s přídavkem listerií (0,2 ml směsi obou kmenů v poměru 1:1 o koncentraci $1,41 \times 10^5$ KTJ/ml na 20 ml suspenze CV) a přídavku FARGO 37 (1 ml kultury/20 ml suspenze), po omytí ošetřeno suspenzí BBL 20 ml na 20 ks sýrů.
- V. Před začátkem zrání ošetření CV s přídavkem listerií (0,2 ml směsi obou kmenů v poměru 1:1 o koncentraci $1,41 \times 10^5$ KTJ/ml na 20 ml suspenze CV) a přídavkem FARGO 37 (1 ml kultury/20 ml suspenze), po omytí ošetřeno postřikem BBL 20 ml/20 ks sýrů s přídavkem 2 ml kultury *E. faecium* 945 na 20 ml suspenze.
- VI. Před začátkem zrání ošetření suspenzí CV 20 ml/20 ks sýrů, po omytí suspenzí BBL 20 ml na 20 ks sýrů s přídavkem listerií (0,2 ml směsi obou kmenů v poměru 1:1 o koncentraci $1,41 \times 10^5$ KTJ/ml na 20 ml suspenze) a přídavkem FARGO 37 (1 ml/20 ml

suspenze).

VII. Před začátkem zrání ošetření suspenzí CV 20 ml/20 ks sýrů, po omytí suspenzí BBL 20 ml na 20 ks sýrů s přidavkem listerií (0,2 ml směsi obou kmenů v poměru 1:1 o koncentraci $1,41 \times 10^5$ KTJ/ml na 20 ml suspenze) a s přidavkem 2 ml kultury *E. faecium* 945 na 20 ml suspenze.

VIII. Před začátkem zrání ošetření suspenzí CV 20 ml/20 ks sýrů, po omytí suspenzí BBL 20 ml na 20 ks sýrů s přidavkem listerií (0,2 ml směsi obou kmenů v poměru 1:1 o koncentraci $1,41 \times 10^5$ KTJ/ml na 20 ml koncentráту CV).

V jednotlivých fázích technologického postupu zrání byly odebrány vzorky (2 celé sýry) z každé skupiny a stanoven u nich počet listerií. Sýry byly odebrány a pro stanovení homogenizovány celé, protože vzhledem k jejich velikosti nebylo možné rozlišovat povrch a vnitřek sýrů. Všechny výsledky se tedy vztahují k celkové hmotě sýra.

Další vzorky byly odebrány a analyzovány stejným způsobem po ukončení zrání a před zabalením do expediční fólie po 6 ks.

Poslední vzorky byly odebrány po skladování, tj. úplném dozrání sýrů, z celého balení po 6 ks průměrný vzorek.

Zrání probíhalo v klimatické komoře Binder v oddělených kontejnerech překrytých mikrotenovou fólií pro mikrovlnné trouby (s perforací). Podmínky zrání: sušení 23 °C, 85% rel. vlhkosti, 3 dny; zrání 18 °C 85% rel. vlhkosti, 4 dny; skladování 15 °C a 85% rel. vlhkosti, 10 dní.

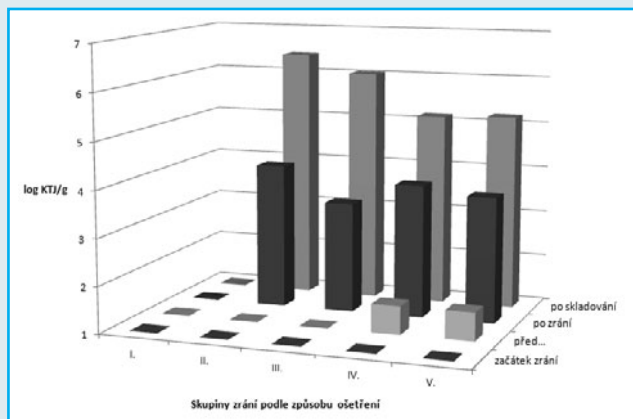
Koncentrace ošetřujícího přípravku Fargo 37 byla stanovena podle doporučení výrobce 2 g na 1 kg sýra a před aplikací ověřena denzita na MRS agaru. Enterokoková kultura byla nakultivována v obnoveném odstředěném mléce s přidavkem kvasničného autolyzátu a denzita před použitím ověřena na Slanetz-Bartley agaru. Během zrání nemohla být denzita přidaných bakterií stanovována, protože sýry obsahovaly už po formování enterokoky a laktobacily a kultivačně nebylo možné rozlišit původní a přidanou mikroflóru. Pro stanovení pediokoků v povrchovém mazu sýrů, které navíc obsahují laktobacily, v průběhu rychlého zrání nebylo žádné doporučované kultivační médium dostatečně selektivní.

Výsledky a diskuse

Ve skupině kontrolních sýrů zrajících bez kontaminace I. byl ve všech fázích zrání obsah listerií nižší než 10 KTJ/g. Lze předpokládat, že buňky listerií nebyly v naformovaných sýrech přítomny vůbec a že výsledky dalších skupin sýrů se týkají pouze kontaminace námi zanesené.

Skupiny II. až V. byly kontaminovány malým množstvím listerií. V suspenzi CV použité k ošetření těchto sýrů byla koncentrace listerií $1,41 \times 10^3$ KTJ/ml a před začátkem zrání v sýrech byla stanovena nižší než 10 KTJ/g. U skupiny IV. a V. byl do suspenze CV kromě kontaminace přidán ještě přípravek FARGO 37.

Na konci oxidační fáze se koncentrace listerií zvýšila na detekovatelnou mez 10 KTJ/g u skupiny II. a III., u dalších dvou skupin IV. a V. na 40 KTJ/g. Po smytí oxidační

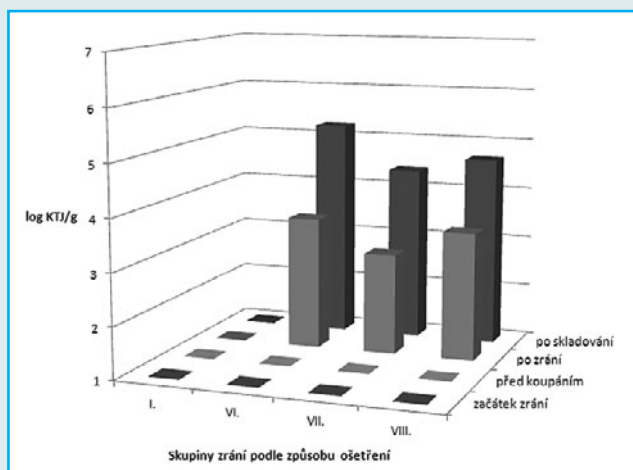


Graf č. 1 Změny počtu listerií v průběhu zrání sýrů kontaminovaných na začátku zrání podle způsobu ošetření.

mikroflóry byla u skupiny III. a V. přidána do suspenze BBL ještě kultura enterokoků. Koncentrace listerií u takto ošetřených sýrů byla po zrání nižší (u skupiny III. $2,33 \times 10^3$ KTJ/g a u skupiny V. pak $4,95 \times 10^3$ KTJ/g) než u sýrů ošetřených jenom přidavkem přípravku FARGO 37 (skupina IV. - $7,14 \times 10^3$ KTJ/g) a vůbec neošetřených (skupina II. - $1,28 \times 10^4$ KTJ/g). Po úplném dozrání zabalených a skladovaných sýrů byla koncentrace listerií u sýrů ošetřených na začátku celého procesu zrání přípravkem FARGO 37 (skupina IV.) o 1 řád nižší než u sýrů ošetřených enterokoky v suspenzi BBL a téměř o 1,5 řádu nižší než sýry neošetřené žádným přípravkem. Stanovené počty listerií jsou znázorněny v grafu č. 1.

Skupiny VI. až VIII. byly kontaminovány po omytí oxidační mikroflóry přidavkem listerií do suspenze BBL (koncentrace listerií v suspenzi byla 10^3 KTJ/ml). Do suspenze BBL s kontaminací byl u skupiny VI. přidán přípravek FARGO 37, u skupiny VII. enterokoková kultura a sýry ze skupiny VIII. nebyly ošetřeny žádným přípravkem.

Koncentrace listerií po zrání byla nejnižší u skupiny sýrů ošetřených enterokokovou kulturou (skupina VII.) $8,80 \times 10^2$ KTJ/g a i po dozrání zabalených sýrů byl obsah listerií u této skupiny nejnižší - $2,41 \times 10^4$. Sýry ze skupiny



Graf č. 2 Změny počtu listerií v průběhu zrání sýrů kontaminovaných po omytí podle způsobu ošetření.

VI. ošetřené přípravkem FARGO 37 vykazovaly koncentraci listerií po zrání o 2 řády vyšší než předcházející skupina - $3,6 \times 10^4$ a po dozrání nejvyšší ze skupin kontaminovaných tímto způsobem - $1,71 \times 10^5$ KTJ/g sýra. Sýry pouze kontaminované a neošetřené žádným přípravkem měly po zrání $2,94 \times 10^3$ a po dozrání $4,62 \times 10^4$ KTJ/g listerií. Výsledky jsou uvedeny v grafu č. 2.

Závěr

Výsledky všech pokusných zrání s kontaminací a přídávky ošetřujících přípravků s antilisteriální aktivitou testované při modelových zráních ukázaly, že jejich účinnost v této fázi výroby je prokazatelná, ale nedostačující k potlačení listerií pod limit uváděný jako zdraví ohrožující. Právě u sýrů zrajících pod mazem, které mají nejlepší podmínky pro růst a rozmnožování listerií, dochází při jejich použití jenom k částečnému omezení jejich rozvoje o jeden nebo dva řády, ale pokud kontaminace listeriem nastala už před vlastním zráním nebo v jakékoliv další fázi zrání, vždy se listerie rozmnožily a byly zjištěny v sýrech v různém stupni zralosti v rozmezí 10^2 až 10^6 . Nařízení komise (ES) č. 2073 z roku 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny, platné od 1. 1. 2006, uvádí jako povolený limit 100 KTJ/g. Za infekční dávku *Listeria monocytogenes* lze považovat hodnoty nad tuto hranici především pro rizikové skupiny obyvatelstva. Prakticky ve všech skupinách pokusného zrání, kromě sýrů kontaminovaných až po omytí a ošetřených enterokokovou kulturou před úplným dozráním, obsah buněk listerií vyjádřený jako počet KTJ/g po dozrání přesáhl tuto hranici nezávadnosti pro rizikové skupiny obyvatelstva.

Přitom je nutné uvést, že technologický postup výroby sýrů zrajících pod mazem nelze upravit tak, aby byla vytvořena teplotní nebo jiná fyzikální bariéra, aniž by byl změněn charakter sýra. Stejně tak nelze změnit bakteriální složení mazu např. ve prospěch bakterií produkujících bakteriociny účinné proti listeriím aniž by se změnila typická vlastnosti sýra. Jediným možným zásadním opatřením při výrobě měkkých sýrů zrajících pod mazem proti výskytu listerií tedy zůstává důsledné dodržování sanitčních předpisů a zásad HACCP.

Práce byla umožněna díky finanční podpoře MŠMT v rámci grantu 2B08050 a výzkumného záměru MSM 2672286101.

Literatura:

- NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny, s. 3.
 GÁLVEZ, A.; ABRIQUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. B. (2007): Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 120, s. 51-70.
 IZQUIERDO, E.; MARCHIONI, E.; AOUDE-WERNER, D.; HASSELMANN, C.; ENNAHA, R. S. (2009): Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.*, 26, s. 16-20.
 HARTMANN, H. A.; WILKE, T.; ERDMANN, R. (2011): Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *Int. J. Food Microbiol.*, 142, s. 192-9.

Přijato do tisku 15. 12. 2011

STANOVENÍ MIKROBIOLOGICKÝCH PARAMETRŮ MLÉKA ZA ÚČELEM VÝKUPU A PROPLÁČENÍ

Peroutková Jitka, Elich Ondřej, Pechačová Marta,
Chmúrová Jana
MILCOM a.s.

Determination of microbiological parameters of milk for the purchase and payment

Abstrakt

V této práci byl sledován vliv skladovacích podmínek tj. teploty, délky skladování a použití dvou možných konzervačních činidel, jejichž použití vychází z ČSN, na jednotlivé skupiny mikroorganismů, které tvoří běžnou mikroflóru syrového mléka. Testovanými mikroorganismy byly kmeny z České sbírky mikroorganismů v Brně *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *St. aureus* CCM 4516, *E. coli* CCM 3954 a mikroorganismy ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora® *Lactobacillus helveticus* CCDM 447 a smetanová kultura CCDM 1. Stanovení byla prováděna instrumentálně i klasickou metodou. Teplota skladování 2 a 6 °C, stejně tak prodloužení doby skladování z 24 na 48 hodin neovlivnilo denzitu mikroorganismů. Simulací nešetřného zacházení s mlékem byla zjištěna vyšší denzita u kmene *St. aureus* o 1 řád, ale až po 48 hodinách skladování. Použitá konzervační činidla, Heschenovo činidlo a Azidiol, nevykazují rozdíly v konzervačních účincích.

Klíčová slova: mléko, skladovací podmínky, teplota, konzervační činidlo

Abstract

In this work was the storage conditions as temperature, time of storage and using two preservatives used in accordance with the standard in relation to individual groups of microorganisms, which constitute normal micro flora of raw milk was monitored. Tested microorganisms were strains from Czech collection of microorganisms Brno *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *St. aureus* CCM 4516, *E. coli* CCM 3954 and next from Culture collection of dairy microorganisms Laktoflora® *Lactobacillus helveticus* CCDM 447 and cream culture CCDM 1. Analyses were performed by instrumental and classical method. The temperature storage 2 and 6 °C and as well as prolonged storage time from 24 to 48 hours doesn't influence the density of bacteria. The simulation of inconsiderate manipulation with milk leads to a risen density of *St. aureus* one order of magnitude, but up to 48 hours. Using of preservatives, Heschen and Azidiol, doesn't show differences in preservation effect.