

KULTIVAČNÍ METODY STANOVENÍ BAKTERIÍ RODU *PSEUDOMONAS* V MLÉCE

Irena Němečková, Erik Pešek, Jana Hanušová,
Petr Roubal

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Cultivation methods for determination of genera *Pseudomonas* in milk

Souhrn

Porovnány byly kultivační metody stanovení pseudomonád v syrovém mléce, a to na půdě podle ČSN P ISO/TS 11059 (2009) s penicilinem a pimaricinem, na půdě GSP s penicilinem a pimaricinem, na půdě s CFC supplementem (cetrimid, fucidin, cefalotin) a na půdě s CN supplementem (cetrimid, kyselina nalidixová). Půda s CN supplementem je určena pro stanovení *P. aeruginosa*, a proto poskytovala systematicky nižší výsledky, zatímco výsledky získané na ostatních půdách byly srovnatelné.

Izolováno bylo 25 kmenů tvořících na testovaných půdách odlišné kolonie. 44 % z nich bylo potvrzeno jako pseudomonády. Vybrané kmeny byly rovněž identifikovány pomocí sekvenace 16S rRNA. Oxidáza pozitivní kmeny nefermentující glukosu (vyhovující při konfirmaci) byly identifikovány jako *P. fluorescens* a *Chryseobacterium indolgenes*, zatímco kmeny nevyhovující při konfirmaci byly identifikovány jako *Acinetobacter* sp., *Serratia marcescens* a *Enterobacter cloacae* x *hormaechei*. Proteolytické nebo lipolytické enzymy při 6 °C tvořily *P. fluorescens*, *Ch. indolgenes* a *Acinetobacter* sp., zatímco zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* při 6 °C ani za 21 dní nerostly.

Klíčová slova: mikroflóra syrového mléka, selektivní supplemety, tvorba proteolytických a lipolytických enzymů, *Pseudomonas fluorescens*, *Chryseobacterium*, *Acinetobacter*

Summary

Cultivation methods for determination of pseudomonades in raw milk were compared, namely using medium according to ČSN P ISO/TS 11059 (2009) with penicillin and pimaricin, medium GSP with penicillin and pimaricin, medium with CFC supplement (cetrimid, fucidin, cefalotin) and medium with CN supplement (cetrimid, nalidixic acid). The last one is intended for determination of *P. aeruginosa* hence it provided systematically lower results while results obtained on the other media were comparable.

25 strains forming various colonies on the media tested were isolated. 44 % of them were confirmed as pseudomonades. Chosen strains were identified by sequen-

tion of 16S rRNA, as well. Oxidase-positive strains that didn't ferment glucose (fulfilling confirmation) were identified as *P. fluorescens* and *Chryseobacterium indolgenes* while the strains that didn't fulfill confirmation as *Acinetobacter* sp., *Serratia marcescens* a *Enterobacter cloacae* x *hormaechei*. *P. fluorescens*, *Ch. indolgenes* and *Acinetobacter* sp. produced proteolytic or lipolytic enzymes at 6 °C while members of family *Enterobacteriaceae* didn't grow at 6 °C for 21 days.

Keywords: microflora of raw milk, selective supplements, production of proteolytic and lipolytic enzymes, *Pseudomonas fluorescens*, *Chryseobacterium*, *Acinetobacter*

Úvod

Rod *Pseudomonas* tvoří Gram-negativní pohyblivé nesporetné aerobní striktně respiratorní bakterie, které jsou kataláza-pozitivní a obvykle oxidáza-pozitivní (Liao a kol., 2006). Tento rod zahrnuje celou škálu bakterií, které jsou jak metabolicky tak biochemicky odlišné. Velké množství obsažených genů předpokládá možnost zapojovat se do mnoha metabolických drah, z čehož vyplývá určitá univerzálnost tohoto rodu (Rehm a kol., 2010).

S kažením potravin jsou nejčastěji spojovány *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. lundensis*, *P. putida*, *P. chlororaphis* a *P. viridiflava*, přičemž v mléce se nejčastěji vyskytuje *P. fluorescens* (Liao a kol., 2006). Kažení másla (povrchové kažení, hydrolytické žluknutí) kromě *P. fluorescens* způsobují často i *P. putrefaciens* a *P. fragi* (Frank a Hasan, 2003).

Z mlékařského hlediska spočívá nežádoucí aktivita pseudomonád ve schopnosti růst při chladírenských teplotách a tvořit vysoce termostabilní proteolytické a lipolytické enzymy, které si zachovávají část své aktivity i po UHT ošetření (Guinot-Thomas a kol., 1995) nebo sušení (Chen a kol., 2003).

Ke zhoršení sensorických vlastností pasterovaného mléka dochází, jestliže bylo vyrobeno ze syrového mléka obsahujícího 10^5 - 10^6 KTJ/ml pseudomonád. Denzita před pasterací 10^7 - 10^8 KTJ/ml pak vede ke zvýšené tvorbě usazenin v pastéru. Významné je rovněž snížení termostability rekonstituovaného sušeného mléka, jestliže bylo ve výchozím syrovém mléce přítomno 10^6 - 10^7 KTJ/ml pseudomonád (Sørhang a Stepaniak, 1997). Ke gelovatění UHT mléka dochází, jestliže bylo ve vstupní surovině přítomno minimálně 1×10^7 KTJ/ml pseudomonád (Grieve a Kitchen, 1985). Fermentované mléčné nápoje vyrobené z mléka obsahujícího vysoký počet pseudomonád, mohou mít hořkou, nečistou nebo ovocnou pachů (McPhee a Griffiths, 2003). Degradace bílkovin pseudomonádami v syrovém mléce snižuje výtěžnost při výrobě sýrů (Raynal-Ljutovac a kol., 2005).

Bakterie rodu *Pseudomonas* lze stanovit a identifikovat různými metodami, např. na základě růstu v médiu obsahujícím selektivní činidla (krystalovou violet, kyselinu nalidixovou, erythromycin, novobiocin, ampicilin, chloramphenicol a další), pomocí PCR, sekvenace rRNA, ribo-

typizace, aj. (Liao a kol., 2006). Další možností, jak identifikovat tyto bakterie, je sledování proteolytické či lipolytické aktivity na speciálních půdách, detekce specifických biochemických produktů pomocí API testů (Dogan a Boor, 2002), použití fluorescenční spektrofotometrie nebo profilování schopností metabolizovat (či ne) organické substráty (Leriche a kol., 2004).

Hlavním cílem této práce je porovnat kultivační metody stanovení pseudomonád a posoudit jejich selektivitu.

Materiál a metody

Testované půdy

Porovnávány byly čtyři půdy lišící se zejména použitým selektivním supplementem a přidavkem glycerolu:

- půda podle ČSN P ISO/TS 11059 (2009) obsahuje *Pseudomonas* selective agar base (Merck), penicilin G (100 000 IU/l) a pimaricin (0,01 g/l) (MILCOM a.s., závod Tábor)
- půda s CFC supplementem podle ISO 13720 (2000) obsahuje *Pseudomonas* selective agar base (Merck), glycerol (10 ml/l), cetrimid (10 mg/l), fucidin (10 mg/l) a cefalotin (50 mg/l) (Merck)
- půda s CN supplementem podle DIN/EN 12780 (2002) pro stanovení *P. aeruginosa* ve vodě s využitím membránové filtrace obsahuje *Pseudomonas* selective agar base (Merck), glycerol (10 ml/l), cetrimid (200 mg/l) a kyselinu nalidixovou (15 mg/l) (Merck)
- GSP půda (MILCOM a.s., závod Tábor) pro průkaz pseudomonád a aeromonád v potravinách, odpadních vodách a zařízeních potravinářského průmyslu, do které se přidává penicilin G (100 000 IU/l) a pimaricin (0,01 g/l) (MILCOM a.s., závod Tábor)

Na rozdíl od ostatních testovaných půd je podle specifikace výrobce v půdě GSP jediným zdrojem živin glutamát a škrob, které řada jiných mikroorganismů neumí využít. Aeromonády odbourávají škrob za vzniku kyselin (což se projeví změnou barvy acidobazického indikátoru na žlutou), pseudomonády tuto schopnost nemají (tvorí čereno-fialové kolonie).

Analýza syrového mléka na testovaných půdách

Ve 30 cisternových vzorcích syrového kravského mléka byla stanovena suma psychrotrofních mikroorganismů podle ČSN ISO 8552 (2005) na GTK-M 21 °C/25 h a pseudomonády testovanými metodami:

- na půdě podle ČSN P ISO/TS 11059 (2009) při 25 °C/48 h
- na půdě s CFC supplementem při 25 °C/48 h
- na půdě s CN supplementem při 37 °C/48 h
- na GSP půdě při 28 °C/3 dny

Izolace, identifikace a charakterizace mikroorganismů

Z ploten pro stanovení pseudomonád v syrovém mléce bylo vybráno 25 různých kolonií, které byly izolovány. Takto získané kmeny byly přeočkovány na živný agar (25 °C/24 - 48 h), prověřen byl jejich růst na testovaných

půdách za podmínek jednotlivých metod a provedena byla konfirmace podle ČSN P ISO/TS 11059 (2009):

- oxidázový test - komerční kit (Merck) (pseudomonády vykazují pozitivní reakci)
- fermentace glukosy - bromkresol purpur glukosový agar (Sigma Aldrich), inokulace vpichem, inkubace 25 °C/24 h (pseudomonády vykazují negativní reakci)

Vybrané kmeny byly dále zaslány na identifikaci pomocí sekvenace 16S rRNA na Ústav technologie mléka a tuků, VŠCHT Praha. Otestována byla také jejich schopnost při různých teplotách tvořit proteolytické a lipolytické enzymy. Mikroorganismy byly naočkovány na povrch předsušeného GTK agaru s 10 % obj. sterilního odstředěného mléka (hodnocení proteolytické aktivity) nebo tributyrin agaru (hodnocení lipolytické aktivity) a kultivovány při 30, 25, 12 a 6 ± 1 °C. Ve zvolených časových intervalech bylo hodnoceno, zda byly vytvořeny kolonie, popř. i vyjasněné proteolytické nebo lipolytické zóny.

Výsledky a diskuze

Množství psychrotrofních mikroorganismů stanovených na GTK-M bez použití selekčních činidel se pohybovala v rozmezí od $< 1 \times 10^3$ KTJ/ml do $2,2 \times 10^8$ KTJ/ml (v průměru $3,2 \times 10^7$ KTJ/ml), počet mikroorganismů rostoucích na půdě pro stanovení pseudomonád podle ČSN P ISO/TS 11059 (2009) od 4×10^2 KTJ/ml do $5,0 \times 10^6$ KTJ/ml (v průměru $1,5 \times 10^6$ KTJ/ml). Metoda stanovení psychrotrofních mikroorganismů podle ČSN ISO 8552 (2005) poskytuje systematicky vyšší výsledky (zjištěno u 90 % vzorků) než metoda stanovení pseudomonád podle ČSN P ISO/TS 11059 (2009), protože jsou v syrovém mléce přítomny také další psychrotrofní mikroorganismy neschopné růst na selektivních půdách. Tento rozdíl může činit až 2 řády. Stepaniak (2003) řadí mezi psychrotrofní mikroorganismy syrového mléka jiné než pseudomonády např. koryneformní bakterie, některé druhy bacilů, mikrokoky, enterokoky, zástupce rodů *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Achromobacter* a některé zástupce čeledi *Enterobacteriaceae*.

Jestliže uvažujeme standardní opakovatelnost kultivačních metod $r = 0,3$ log počtu mikroorganismů v jednom mililitru, a jako referenční metodu uvažujeme metodu podle ČSN P ISO/TS 11059 (2009), pak byly na GSP půdě získány srovnatelné výsledky u 47 % vzorků, u 33 % vzorků byly vyšší a u 20 % vzorků byly nižší. Velmi podobně ve srovnání dopadla půda s CFC supplementem (50 % výsledků srovnatelných, 33 % vyšších a 17 % nižších). Naproti tomu půda s CN supplementem poskytla srovnatelné výsledky pouze u 27 % vzorků (pravděpodobně se jednalo o vzorky s vysokým zastoupením *P. aeruginosa* v rámci rodu *Pseudomonas* spp.), vyšší u žádného ze vzorků a nižší u 73 % vzorků. Tento rozdíl v některých případech činil i více než 2 řády.

Jestliže porovnáme navzájem výsledky získané na půdách s CFC supplementem a GSP půdě, srovnatelných

výsledků bylo dosaženo u 66 % vzorků, u 17 % vzorků byly vyšší výsledky získány na GSP půdě a u 17 % vzorků na půdě s CFC supplementem. Rozdíl mezi výsledky však byl nižší než 1 řád. Mezi půdami GSP, s CFC supplementem a podle ČSN P ISO/TS 11059 (2009) tedy nebyl prokázán systematický rozdíl.

Při posuzování dosažených výsledků je nutné vzít v úvahu, že vzorek byl inokulován roztěrem 0,1 ml, a tedy pro získání vypovídajících výsledků je velmi důležitá důkladná homogenizace vzorku a následných desítkových ředění i důkladné rozetření na povrch půdy. V opačném případě jsou tyto úkony významnou příčinou nepřesnosti stanovení. Z praktického hlediska se proto jeví jako výhodnější suplementy penicilin a pimarin, které lze koupit ve formě vialek pro 180 ml rozehráté půdy. V tom případě je totiž možné použít i metodu přelivu. Ostatní testované suplementy se dávají do půdy v minimálním objemu 0,5 l, což znamená nutnost rozlítí půdy na misky a použití metody roztěru.

Ze vzorků syrového mléka bylo na půdách pro stanovení pseudomonád izolováno celkem 25 kmenů, které byly naočkovány na ostatní testované půdy a podrobeny confirmaci. Výsledky jsou shrnuty v tab. I.

44 % kmenů by bylo možné stanovit při použití všech testovaných metod a vyhovělo by při confirmaci (oxidáza pozitivní, fermentace glukosy negativní), 4 % kmenů nerostly na půdě s CN supplementem, avšak v ostatních parametrech vyhověly. 20 % kmenů nerostlo na půdě s CN supplementem a mělo negativní reakci na oxidázu, 12 %

kmenů naopak vykazovalo pozitivní reakci na fermentaci glukosy a 8 % kmenů nevyhovělo ani v jednom confirmacním testu. Každý ze zbývajících 12 % kmenů (tj. 3 kmeny z 25) poskytl jinou kombinaci pozitivních a negativních reakcí při kultivaci na půdách a při confirmaci.

Žádná z vykultivovaných kolonií nebyla na GSP půdě vyhodnocena jako suspektní *Aeromonas*. Výsledky identifikace vybraných kmenů pomocí sekvenace 16S rRNA jsou uvedeny rovněž v tab. I. z 6 kmenů, které se na půdách a při confirmaci jeví jako pseudomonády, byly identifikovány jako *Chryseobacterium indolgenes*. Jak bylo zjištěno, tyto kmeny by bylo možné od pseudomonád rozlišit tak, že při kultivaci na živném agaru nebo na GTK agaru 25 °C/24 - 48 h tvoří charakteristický žluto-oranžový pigment (který není na selektivních půdách tvořen). Dva kmeny byly podle očekávání identifikovány jako *P. fluorescens*. Vybrané kmeny, které sice rostou na půdách pro pseudomonády, avšak nevyhovují při confirmaci, byly identifikovány jako *Acinetobacter* sp. (2 kmeny), *Enterobacter cloacae* x *hormaechei* a *Serratia marcescens*. Všechny tyto mikroorganismy patří mezi Gram-negativní bakterie.

Otázkou je, zda mikroorganismy, které rostou na půdách pro stanovení pseudomonád, představují srovnatelné riziko kažení jako pseudomonády. Proto byla u identifikovaných kmenů testována schopnost růst a tvořit proteolytické nebo lipolytické enzymy při různých teplotách. Výsledky jsou shrnuty v tab. II.

U kmene *Enterobacter cloacae* x *hormaechei* P19 byla detekována proteolytická aktivita, u kmenů *Acinetobacter* sp.

Tab. 1 Identifikace kmenů izolovaných ze syrového mléka a jejich růst za podmínek různých metod stanovení pseudomonád

kmen	půda GSP	půda podle ČSN P ISO/TS 11059 (2009)	půda s CFC supplementem	půda s CN supplementem	oxidáza	fermentace glukosy	identifikace
P3	+	+	+	+	+	-	<i>Chryseobacterium indolgenes</i>
P10	+	+	+	+	+	-	ND
P12	+	+	+	+	+	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
P13	+	+	+	+	+	-	ND
P14	+	+	+	+	+	-	ND
P15	+	+	+	+	+	-	ND
P16	+	+	+	+	+	-	<i>Chryseobacterium indolgenes</i>
P17	+	+	+	+	+	-	ND
P22	+	+	+	+	+	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
P23	+	+	+	+	+	-	ND
P25	+	+	+	+	+	-	<i>Chryseobacterium indolgenes</i>
P1	+	+	+	+	+	+	ND
P2	+	+	+	-	ND	+	ND
P4	+	+	+	-	ND	+	ND
P6	+	ND	+	-	+	-	<i>Chryseobacterium indolgenes</i>
P7	+	+	+	-	+	+	ND
P8	+	+	+	-	-	-	ND
P9	+	-	+	-	ND	-	ND
P18	+	+	+	-	-	-	<i>Acinetobacter</i> sp.
P19	+	+	+	-	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i> x <i>hormaechei</i>
P20	+	+	+	-	-	-	ND
P21	+	+	+	+	-	+	<i>Serratia marcescens</i>
P24	+	+	+	-	-	-	ND
P26	+	+	+	-	-	-	<i>Acinetobacter</i> sp.
P5	+	+	-	-	ND	+	ND

+ za podmínek metody roste, pozitivní reakce, - za podmínek metody neroste, negativní reakce, ND - nestanoveno

Tab. 2 Posouzení rizika kažení u izolovaných a identifikovaných kmenů

kmen	identifikace	30 °C		25 °C		12 °C			6 °C		
		2 dny	4 dny	2 dny	4 dny	2 dny	4 dny	10 dnů	10 dnů	17 dnů	21 dnů
P3	<i>Chryseobacterium indolgenes</i>	P	P	P	P, L	R	P	P	N	N	N
P6	<i>Chryseobacterium indolgenes</i>	P	P	P	P, L	R	P	P	N	N	N
P12	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	P	P, L	P	P, L	R	P, L	P, L	N	P, L	P, L
P16	<i>Chryseobacterium indolgenes</i>	L	P, L	L	P, L	N	L	P, L	N	R	L
P18	<i>Acinetobacter</i> sp.	L	L	R	L	L	L	L	N	R	L
P19	<i>Enterobacter cloacae</i> x <i>hormaechei</i>	P	P	R	R	N	R	P	N	N	N
P21	<i>Serratia marcescens</i>	P	P, L	P	P, L	N	P	P, L	N	N	N
P22	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	P	P, L	P	P, L	R	P	P, L	N	P, L	P, L
P25	<i>Chryseobacterium indolgenes</i>	P	P, L	L	P, L	N	R	P	N	P	P
P26	<i>Acinetobacter</i> sp.	L	L	R	L	R	L	L	N	L	L

P - proteolytická aktivita; L - lipolytická aktivita; R - roste, avšak nevytvořil vyjasněné proteolytické nebo lipolytické zóny; N - neroste

P18 a P26 lipolytická aktivita a u ostatních testovaných kmenů obě enzymové aktivity.

Ani *Enterobacter cloacae* x *hormaechei* P19 ani *Serratia marcescens* P21 nerostly při 6 °C/21 dnů. Při 12 °C byl u kmene P19 zaznamenán růst po 4 dnech a po 10 dnech tvorba proteolytických enzymů, a u kmene P21 tvorba proteolytických a lipolytických enzymů po 4 - 10 dnech.

Naproti tomu oba testované kmeny *Acinetobacter* sp., oba kmeny *P. fluorescens* a dva ze čtyř kmenů *Chryseobacterium indolgenes* při 6 °C rostly a po 17 nebo 21 dnech byla u nich detekována tvorba enzymů. Při 12 °C byly enzymové aktivity zaznamenány většinou po 4 dnech (u jednoho kmene už po 2 dnech, u jednoho až po 10 dnech). Použitými metodami byl u těchto glukosu nefermentujících kmenů zjištěn srovnatelný potenciál způsobovat kažení mléčných výrobků. Tento potenciál je vyšší, než u glukosu fermentujících kmenů *Enterobacter cloacae* x *hormaechei* P19 ani *Serratia marcescens* P21. Otázkou pro další výzkum je rezistence vytvořených proteolytických a lipolytických enzymů vůči pasteračnímu, UHT či sterilačnímu záhřevu.

Závěr

Mikroorganismy rostoucí za podmínek metody na půdách pro stanovení pseudomonád tvoří řádově 1 - 100 % psychrotrofních mikroorganismů v syrovém mléce. Půda podle ČSN P ISO/TS 11059 (2009), GSP půda a půda s CFC supplementem neposkytují systematicky odlišné výsledky. Půda s CN supplementem je primárně určena pro stanovení *P. aeruginosa*, což vede k systematicky nižším výsledkům, než poskytují ostatní půdy.

Při inokulaci půd roztěrem je důležité dbát o správné provedení (homogenizace vzorku i jednotlivých ředění, předsušení povrchu půdy, důkladné rozetření očkovaného ředění, atd.). Z hlediska manipulace se jeví jako výhodnější použít metody využívající suplementy ve formě, která je vhodná pro přidání do jedné lahvičky půdy (GSP půda nebo půda podle ČSN P ISO/TS 11059 (2009)).

Mezi mikroorganismy, které rostou na půdách pro stanovení pseudomonád, bylo izolováno 25 kmenů, z nichž 44 % bylo potvrzeno jako pseudomonády. Vybrané

kmeny byly identifikovány pomocí sekvenace 16S rRNA. Zjištěno bylo, že bakterie rodu *Pseudomonas* mohou být i po confirmaci zaměněny s *Chryseobacterium indolgenes*, které však může být od pseudomonád odlišeno na základě tvorby žluto-oranžového pigmentu na živném agaru nebo GTK agaru (25 °C/24 - 48 h).

Kmeny, které by byly confirmací vyloučeny, avšak na půdách pro stanovení pseudomonád rovněž rostou, byly identifikovány jako *Acinetobacter* sp., *Serratia marcescens* a *Enterobacter cloacae* x *hormaechei*. Všechno to jsou Gram-negativní bakterie s proteolytickou a/nebo lipolytickou enzymovou aktivitou. Na rozdíl od zde uvedených zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*, kteří fermentují glukosu, jsou akinetobaktery, chryseobakterie i pseudomonády schopné růst a tvořit enzymy i při 6 °C.

Poděkování

Tato práce vznikla s finanční podporou NAZV MZe ČR na základě rozhodnutí č. RO0511 o poskytnutí institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace.

Literatura

- 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, s. 255-275.
- ČSN ISO 8552 (2005) Mléko - Stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů - Technika stanovení počtu kolonií při 21 °C (Rychlá metoda).
- ČSN P ISO/TS 11059 (2009) Mléko a mléčné výrobky - Metoda stanovení počtu bakterií rodu *Pseudomonas*.
- DIN/EN 12780 (2002): Water quality - Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* by membrane filtration.
- DOGAN B., BOOR K.J. (2002): Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, s. 130-138.
- FRANK J. F., HASSAN A. N. (2003): Microorganisms associated with milk. Ve ROGINSKI H., FUQUAY J.W., FOX P.F. (edit): Encyclopedia of dairy science (pp.1786-1796). London, U. K., Academic Press.
- GRIEVE P.A., KITCHEN B.J. (1985): Proteolysis in milk: the significance of proteinases originating from milk leukocytes and a comparison of the action of leukocyte, bacterial and natural milk proteinases on casein. *J. Dairy Res.*, 52, s. 101-112.
- GUINOT-THOMAS P., AL AMMOURY 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, s. 685-697.
- ISO/WD 13720 (2000): Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of *Pseudomonas* spp.

- LERICHE F., BORDESSOULES A., FAYOLLE K., KAROUI R., LAVAL K., LEBLANC L., DUFOUR E. (2004): Alteration of raw-milk cheese by *Pseudomonas* spp.: monitoring the sources of contamination using fluorescence spectroscopy and metabolic profiling. *J. Microbiol. Methods*, 59, s. 33-41.
- LIAO C.H. (2006): *Pseudomonas* and related genera. Ve BLACKBURN C.W. (edit): *Food spoilage microorganisms* (pp. 507-540). Cambridge, U. K., Woodhead Publishing.
- MCPHEE J. D., GRIFFITHS M. W. (2003): Psychrotrophic bacteria. *Pseudomonas* spp. Ve ROGINSKI H., FUQUAY J.W., FOX P.F. (edit): *Encyclopedia of dairy science* (pp. 2340-2345). London, U. K., Academic Press.
- RAYNAL-LJUTOVAC K., GABORIT P., LAURET A. (2005): The relationship between quality criteria of goat milk, its technological properties and the quality of the final products. *Small Ruminant Res.*, 60, s. 167-177.
- REHM B.H.A. (2010): *Pseudomonas* applications. Ve FLICKINGER M.C. (edit): *Encyclopedia of industrial biotechnology, bioprocess, bioseparation, and cell technology* (pp. 4186-4196). USA, John Wiley&Sons.
- SØRHANG T., STEPANIAK L. (1997): Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends Food Sci. & Technol.*, 8, s. 35-41.
- STEPANIAK L. (2003): Psychrotrophic bacteria. Bacteria other than *Pseudomonas* spp. Ve ROGINSKI H., FUQUAY J.W., FOX P.F. (edit): *Encyclopedia of dairy science* (pp. 2345-2351). London, U. K., Academic Press.

Přijato do tisku: 24. 2. 2012-03-22

Lektorováno 6.3. 2012-03-22

VLIV STÁDIA LAKTACE NA SLOŽENÍ A VLASTNOSTI KOZÍHO MLÉKA A KVALITU SÝRŮ VYRÁBĚNÝCH NA FARMĚ

Lužová T.¹, Šustová K.¹, Kozelková, M.¹, Vyskočil I.², Kuchtík J.³

¹ Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00, Brno

² Ústav výživy zvířat a pícninářství, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00, Brno

³ Ústav chovu a šlechtění zvířat Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00, Brno

The influence of lactation on composition and quality of goat milk and on composition and sensory quality of goat's cheese

Abstrakt

V naší práci byl sledován vliv stádia laktace na složení a technologické vlastnosti kozího mléka a na složení a senzorní vlastnosti z něj vyrobených kozích sýrů. Vzorky mléka a sýrů byly odebírány ve dvoutýdenních intervalech v období od dubna do listopadu. Prováděna byla fyzikálně-chemická analýza mléka i sýrů a senzorní analýzy sýrů. Významný pokles obsahu sušiny, tuku a bílkovin mléce byl evidentní v červnu. Zatímco obsah laktózy ve stejném období žádnou výraznou změnu nezaznamenal. Vzorky sýru analyzované v letních měsících měly nižší obsah tuku, což koresponduje s obsahem tuku v mléce, ze kterého byly

sýry vyrobeny. I přesto nebyly zjištěny žádné významné statistické korelace mezi sledovanými obsahovými složkami mléka a sýrů. Sýry byly hodnoceny jako dobře vonící a chutné po celé sledované období, přesto i zde byla zaznamenána variabilita především v texturních vlastnostech vázaná na variabilitu obsahu TvS. Sýry s vyšším obsahem tuku měly vyšší mazlavost a vyšší soudržnost a byly posuzovány jako chutově méně příjemné.

Klíčová slova: kozí mléko, kozí sýr, složení, senzorní analýza

Abstract

The aim of this article was the determination of the effect of lactation stage on composition and technological properties of goat milk and on composition and sensory properties of goat cheese. The milk and cheese samples were taken away in two weeks intervals in the period from April to October. In laboratory at the Department of Food technology were analyzed chemical and physical milk and cheese properties, also on the same department were realized sensory analyze of goat cheeses. A significant decrease of dry matter, fat and protein content in milk was evident during July. In the course of the same period the lactose content wasn't significantly changed. The cheese samples from June had lowest fat content which is in agreement with lower fat content in the milk. In spite of this fact, no significant statistic correlations were found even in other observed components of milk and cheese. The evaluated cheese had good harmony quality, pleasant smell and taste in the whole observed period. The changes of the cheese texture connected especially with fat content were shown.

Keywords: goat milk, goat cheese, composition, sensory analyze

Úvod

Díky rostoucímu zájmu o zdravou výživu se u nás zvyšuje počet chovatelů koz, kteří prodávají čerstvé mléko nebo se zabývají výrobou kozích sýrů. Sýry se většinou prodávají přímo na farmách nebo jsou dodávány do specializovaných prodejen. Na trhu dochází k postupnému zvětšování objemu i sortimentu těchto sýrů. Můžeme se setkat nejen s čerstvými, ale i tvrdými sýry, sýry s plísní na povrchu i v těstě, uzenými sýry, které mohou být ochuceny různými příchuťmi (kmín, paprika, česnek aj.).

Kozí mléko bývá často vyhledáváno spotřebiteli, kteří ze zdravotních důvodů nemohou konzumovat mléko kravské. V publikaci se HADJIPANAYIOTOU (1995) zabýval složením nejen kozího, ale i ovčího, kravského mléka a také kozího a ovčího kolostra. Autoři SORYAL a kol. (2004) zkoumali, zda mají na složení kozího mléka a následně sýrů z něj vyrobených vliv různá plemena koz, což se v jejich studiu nepotvrdilo. Složením mléka, tvrdých a polotvrdých sýrů koz během laktace a rovněž senzorní analýzou sýrů se zabýval FEKADU a kol. (2005). Zjistili, že zatímco