

VĚDA, VÝZKUM

Ideový návrh provozního zařízení pro výrobu sterilovaného výrobku na bázi mléčných složek se zvýšeným obsahem syrovátkových bílkovin:

- Ultrafiltrační zařízení,
- deskový ohříváč a chladič, tank na vmíchání práškových ingrediencí do tekutého podílu s míchadlem (min. 100 ot/min) a možností cirkulace nebo násypka do potrubí s cirkulací směsi přes vyrovnávací tank,
- zásobní tanky s míchadlem,
- deskový výměník na ohřev a chlazení,
- homogenizátor pístový, 2 stupňový, tlak až 20 MPa,
- plnička do obalů vhodných pro šaržovou sterilaci,
- uzavíračka,
- šaržový sterilizátor s možností rotace obalů, s regulací teploty a s chlazením.

Ideový návrh technologického postupu výroby sterilovaného výrobku na bázi mléčných složek se zvýšeným obsahem syrovátkových bílkovin:

Pasterace odtučněného mléka > Ultrafiltrace odtučněného mléka > Diafiltrace retentátu > Chlazení na 4-6°C > Skladování v tanku > Ohřev směsi pro rozpuštění složek > Vmíchání práškovitých složek > Ohřev na 60-70°C a homogenizace 2 st., 20 MPa > Chlazení na 8-10°C a přidavek vitamínů a minerálních látek > Skladování před plněním do obalů a uzavření > Šaržová sterilace 118-120°C/18-20 min > Chlazení na 25-30°C > Etiketování a značení > Skladování do 25°C.

Závěr

Cílem práce bylo navrhnout trvanlivý mléčný nápoj obohacený o funkční složku - syrovátkové bílkoviny. Na základě měření času koagulace v olejové lázni byl v pokusech s diafiltrátem s přidanými syrovátkovými bílkoviny zjištěn vhodný maximální obsah 8,6 % celkových bílkovin, z toho 4,6 % syrovátkových, u DF s přidaným kaseinátem je tento limit 9,8 % celkových bílkovin stabilních i při sterilaci 117°C s výdrží 18 min. Měření termostability u bází stabilizovaných fosfáty a/nebo citráty ukázalo, že fosfáty lze z 50 % nahradit při zachování tepelné stability. U bází fortifikovaných z důvodů nutričních došlo ke snížení termostability v důsledku zvýšení sušiny. Pro návrh výrobku byl zvolen kompromis mezi obsahem syrovátkových bílkovin a vhodnou provozní termostabilitou.

Navrhovaný výrobek je na bázi tekutého diafiltrátu obohaceného koncentrátem syrovátkových bílkovin, kaseinátem sodným, mléčným a rostlinným tukem, maltodextriny a dalšími složkami potřebnými pro využití nápoje jako komplexní funkční potraviny, tj. vitaminy a minerálními látkami. Výrobek je stabilizován směsí fosforečnanu a citranu ve váhovém poměru 1:1 a v množství 0,65 g/kg produktu.

Sterilovaný nápoj na bázi mléčných složek pro zvláštní lékařské účely obsahuje celkem 6 % bílkovin, podíl syrovátkových činí 30 %. Podíl rostlinného tuku je 63 %. Výrobek obsahuje méně než 0,8 % laktózy. Nápoj byl hod-

nocen po 6 měsících skladování smyslově a mikrobiologicky. Nápoj byl chuťově i konzistenčně stabilní a udržel si po celou dobu skladování sterilitu.

Tato práce vznikla díky finanční podpoře projektu QI101B090 Národní agenturou pro zemědělský výzkum.

Literatura

- DMV bulletin: Outline of Milk Protein Concentrate MPC 80
 KVASNIČKOVÁ A. (2000): Sacharidy pro funkční potraviny. Probiotika-Prebiotika-Synbiotika, ÚZPI Praha s.2,5, 39-40.
 LAYMAN, WALKER (2006): Potential importance of leucine in treatment of obesity and the metabolic syndrome. J. Nutr.136, 319-323.
 LORENZEN P. (1987): Marketing & Technology, 10-13.
 LUHOVY B., AKHAVON T., ANDERSEN H. (2007): Whey Proteins in the Regulation of Food Intake and Satiety, Journal of the Am. College of Nutrition, Vol. 26, No. 6, 704-712.
 REIMERDES E.H., DIEKMAN F.W. (1979), Molkereitechnik 43, 5-14.
 RENNER E. (1982): Milch und Milchprodukte in der Ernährung des Menschen, Regensburg, 168.
 SAARELA M. (2007): Functional Dairy Product, Vol. 2, WPL England, 265, 443-453.
 VELÍŠEK J. (2002): Chemie potravin, díl I, 34.
 Whey Ingredients, webové stránky Dairy Management Inc., 2011.

Lektorováno dne 13. 11. 2012

Přijato k tisku dne 7. 12. 2012

LABORATORNÍ OVĚŘENÍ ÚČINNOSTI PŘÍRODNÍHO PŘÍPRAVKU PRO HYGIENU VEMENE

Říha Jan^{1,2}, Kadlec Robert¹, Foltys Vladimír³

¹ Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

² Bentley Czech s.r.o.

³ CVŽV Nitra

Laboratory evaluation of the effectiveness of natural udder postdip

Abstrakt

Cílem práce je laboratorní stanovení účinnosti přírodního přípravku pro postdipping pomocí vhodné metodiky - určení zón inhibice a určení schopnosti inhibice růstu vybraných bakteriálních kmenů.

Testovaný přípravek vykazuje antimikrobiální aktivitu v obou typech laboratorních experimentů. Průměrná zóna inhibice činila v pokusu 9,667 mm. Výsledky také ukazují vyšší antibakteriální účinek přípravku při přímé aplikaci na bakteriální kolonie.

Přípravek inhibuje růstovou schopnost všech vybraných bakteriálních kmenů v závislosti na jeho koncentraci v kultivačním médiu. Koncentrace 500 µl/ml přípravku ApiBalm Dip efektivně inhibuje růst všech zkoumaných bakteriálních kmenů.

Laboratorní metodika navržená v práci byla experimentálně ověřena a je ji možno využít pro základní testování účinnosti podobných přípravků před provozním ověřením účinnosti.

Abstract

The aim of paper is to evaluate effectiveness and usability of natural postdip with usage of proper laboratory methods. Measurement of zones of inhibition and growth inhibition abilities of dip were evaluated within 5 selected bacterial mastitis pathogens.

Dip showed antibacterial activity in both of experiments. Average zone of inhibition equals 9.667 mm overall all of pathogens. When dip is applied directly on the surface of colonies, inhibition effect grows.

Dip effectively inhibits growing abilities of all of selected pathogens from concentration of 500 µl/ml.

Methods used were tested experimentally and can be recommended for usage as a basic methods before on-farm testing of similar products.

Úvod

Dezinfekce struků skotu po dojení je důležitou součástí standardních preventivních postupů proti mastitidě dojnic. Důležitý je dezinfekční účinek proti kontaktním patogenům jako jsou např. *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus agalactiae*. Jakkoli je účinek proti environmentálním patogenům jako např. *Escherichia coli* sporný, je dezinfekce struků po dojení efektivním manažerským postupem ve většině stád. Přejít ze stání na sucho do období laktace je vysoce rizikovým obdobím pro dojnice z hlediska mastitid, přičemž největší nebezpečí představují environmentální bakterie. Jalovice bývají převážně infikovány koagulázo negativními stafylokoky, přičemž koliformní bakterie způsobují infekci především u dojnic v dalších laktacích (5).

V současné době převládají tzv. "environmentální" mastitidy dojnic, vyvolané bakteriálními patogeny lehce přežívajícími v prostředí prvovýroby. Nejvýznamnější změnou v epizootologii mastitid dojnic v posledním období je výrazný nárůst výskytu mastitid vyvolaných především jinými streptokoky, jako např. *Streptococcus agalactiae*. Nejčastěji se uvádí výskyt bakterií *Streptococcus uberis* a *Escherichia coli*. *Streptococcus uberis* je původcem mastitid především ve velkých stádech dojnic. K masovému rozšíření *S. uberis* přispěla i jeho schopnost získávat odolnost vůči účinku antibiotik a některých dezinfekčních přípravků. Etiologii environmentálních mastitid doplňují i bakterie *Staphylococcus* spp. a *Serratia* spp. V posledních letech byl mezi patogenními původci mastitid zaznamenán pokles výskytu *Staphylococcus aureus* (z 30 na 10 %), nárůst výskytu *Streptococcus agalactiae* (z 15 na 20 %), *Streptococcus uberis* (z 9 na 16 %), *Escherichia coli* (z 15,5 na 28 %), a poměrně stabilní 8% výskyt *Enterococcus* spp. (6, 7, 8, 9).

Účelem postdippingu struků vemena bezprostředně po dojení je zneškodnění kontaktních, mastitidu způsobujících patogenních mikroorganismů, které mohou infikovat povrch struku, včetně otevřeného strukového kanálku. Pro nejlepší možný efekt je důležité aplikovat postdipping bezprostředně po sejmutí dojícího zařízení, dříve, než se

strukový kanálek začne uzavírat, a pro redukcí času umožňujícího rozmnožení bakterií. Do přípravků pro postdipping se používá např. následujících chemikálií (jodofory, chlorhexidin, hypochloridy, kvarterní amoniové báze, dodecyl benzenové deriváty a barierové látky, které z gelovitých substancí přechází na plastifikované povlaky). Při použití těchto přípravků vzniká při nesprávné manipulaci určité riziko průniku reziduí použitých chemikálií do mléka. Ekologicky a z hlediska bezpečnosti potravin jsou proto vhodnější přípravky na bázi přírodních složek (2, 3, 4). Výběr dezinfekčního prostředku by měl být založen na prokázané účinnosti, která je vyžadovaná i pro registraci přípravku na veterinární použití (1). Cílem práce je laboratorní stanovení účinnosti přírodního přípravku pro postdipping a vytvoření vhodné metodiky, která v laboratorních podmínkách simuluje interakce prostředí při reálné aplikaci.

Cíl práce

FarmGuard ApiBalm Dip[®] je přípravek na přírodní bázi, který je určen pro provádění tzv. postdippingu u dojících krav. Výrobce uvádí, že přípravek pomáhá ošetření vemene po dojení a vytváří na strucích vemene antibakteriální film. Cílem tohoto pokusu je ověřit antimikrobiální účinek popsaného přípravku a vytvoření vhodné laboratorní metodiky pro tento účel. Bylo využito různých koncentrací prostředku v médiu - živné pěstě a ověření možnosti růstu 5 mastitidních bakteriálních kmenů v tomto médiu. Dále byly u pěti bakteriálních kmenů určeny zóny inhibice způsobené prostředkem ApiBalm Dip[®]. Experiment tak ověřuje antibakteriální bariérový efekt v případě povrchu ošetřeného prostředkem v infekčním prostředí, stejně jako jeho inhibiční efekt na růstové schopnosti 5 vybraných mastitidních bakteriálních kmenů.

Materiál a metody

FarmGuard ApiBalm Dip[®] 11 - šarže č. 10546, doba expirace: 12/12.

Bakteriální kmeny - čisté kultury - Česká sbírka mikroorganismů (CMM, <http://www.sci.muni.cz>). Byly použity následující bakteriální kultury s koncentrací bakterií v roztoku 108/1 ml:

Enterococcus faecalis CCM4224,
Streptococcus agalactiae CCM6187,
Serratia marcescens CCM303,
Staphylococcus aureus CCM3953,
Escherichia coli CCM3954.

Pro účely kultivace byl použit: krevní agar, Mueller-Hinton agar jako médium pro roztok přípravku s adicí bakterií. Standardní mikrotitrační destička s terčíky o rozměru 12 x 8. 7mm k určení zón inhibice. Experiment probíhal s využitím běžného vybavení mikrobiologické laboratoře. Čas/teplota kultivace: 20 h/37 °C.

Za účelem určení růstových schopností bakteriálních kmenů při přítomnosti různých koncentrací ApiBalm Dip[®] byl navržen následující design destičky:

VĚDA, VÝZKUM

Sloupce

1. *Enterococcus faecalis*, 2. *Streptococcus agalactiae*, 3. *Serratia marcescens*, 4. *Staphylococcus aureus*, 5. *Escherichia coli*, 6. prázdná pozice, 7. kontrolní vzorek - bez bakterií, 8. *Enterococcus faecalis*, 9. *Streptococcus agalactiae*, 10. *Serratia marcescens*, 11. *Staphylococcus aureus*, 12. *Escherichia coli*.

Řádky

Různé koncentrace přípravku ApiBalm Dip®:

1. ApiBalm Dip 100 µl:100 µl HM broth = 500 µl/ml,
2. ApiBalm Dip 10 µl:190 µl HM broth = 50 µl/ml,
3. ApiBalm Dip 1 µl:200 µl HM broth = 5 µl/ml,
4. ApiBalm Dip 0,1 µl:200 µl HM broth = 0.5 µl/ml,
5. ApiBalm Dip 0,01 µl:200 µl HM broth = 0.05 µl/ml,
6. ApiBalm Dip 0,001 µl:200 µl HM broth = 0.005 µl/ml,
7. kontrola - bez adice ApiBalm Dip - 200 µl HM broth,
8. prázdná pozice.

Z popsané mikrotitrační destičky byly následně provedeny dva typy kultivace:

- určení zóny inhibice (vzorky ze sloupců 1-4, 7. řádek byly kultivovány na Petriho miskách s krevním agarem a 7 mm terčíky s nanesenými 10, 15 a 30 µl přípravku ApiBalm Dip. Miska dále obsahovala kontrolní terčík s přímou adicí ApiBalm Dip ve formě 2 kapek 15 µl umístěných mimo terčíky. Misky byly kultivovány podle popsaných podmínek. Tato část experimentu popisuje interakci povrchu ošetřeného pomocí přípravku s infekčním prostředím bakteriální povahy.
- stanovení CPM po kultivaci vzorků s různými koncentracemi přípravku v roztoku HM agaru a bakteriálních kmenů - řádky 1-4 pro všechny vybrané kmeny. Tato část experimentu je zaměřena přímo na antibakteriální schopnosti přípravku a efektu jeho koncentrace na schopnost inhibice růstu vybraných kmenů mastitidních bakterií. Všechny vzorky byly kultivovány na agarových miskách pro všechny zvolené koncentrace a kmeny bakterií.

Výsledky a diskuze

Stanovení zón inhibice

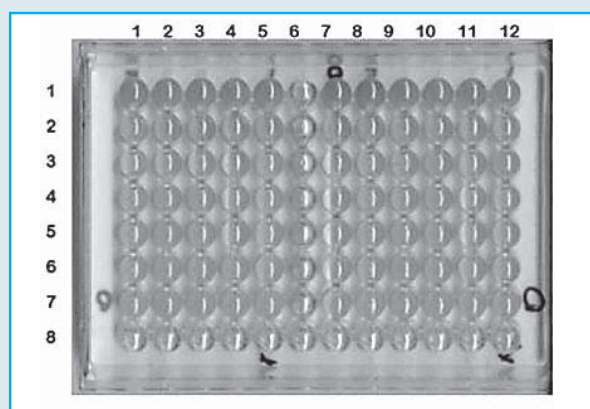
Obecně lze říci, že průměr zón inhibice je přímo úměrný množství přípravku aplikovaného na terčík. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo pro množství 15 µl přípravku u kmene *Staphylococcus aureus* CCM3953 (15 mm) (Obr. 2) a kmene *Streptococcus agalactiae* CCM6187 (12 mm).

Tab. 1 Výsledky stanovení zón inhibice pro různá množství přípravku ApiBalm Dip

Množství ApiBalm Dip	Zóna inhibice (mm, 7mm terčík)				
	Bakteriální kmen				
	1	2	3	4	5
10 µl	8	7	8	9	8
15 µl	9	7	10	15	10
30 µl	10	12	10	11	11
15 µl bez terčíku	11	8	15	22	18

Tab. 2 Počet CPM po kultivaci roztoků HM agaru a bakterií s různými koncentracemi ApiBalm Dip.
***** - maximální počet CPM

Koncentrace ApiBalm Dip	Bakteriální kmen				
	1	2	3	4	5
500 µl/ml	-	-	**	*	*
50 µl/ml	*	*	***	*	***
5 µl/ml	**	**	*****	***	*****
0.5 µl/ml	*****	**	*****	*****	*****



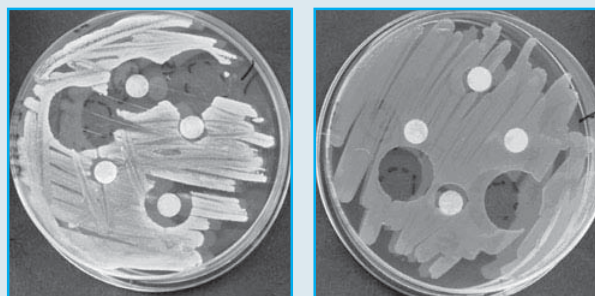
Obr. 1 Design pokusu - mikrotitrační destička.

Průměrná zóna inhibice pro různá množství přípravku byla 11,667 mm pro *Staphylococcus aureus* CCM3953, 9,667 mm pro *Escherichia coli* CCM3954 (Obr. 3), 9,333 mm pro *Serratia marcescens* CCM303, 9,000 mm pro *Enterococcus faecalis* CCM4224, 8,667 mm pro *Streptococcus agalactiae* CCM6187. Kapky přípravku umístěné přímo do kultivačního média vykazují vyšší schopnost inhibice růstu bakterií (větší zóny inhibice) než stejná množství umístěná na terčíky.

Stanovení CPM

Roztoky o různých koncentracích přípravku v roztoku HM agaru a bakteriálních kmenů byly kultivovány na miskách s krevním agarem po dobu 20 hodin a teplotě 37 °C. Obrázky 3 - 7 ukazují výsledky kultivace, tabulka 2 shrnuje výsledky stanovení CPM pro všechny provedené kultivace.

Z výsledků uvedených v tabulce 2 je zřejmé, že různé koncentrace ApiBalm Dip ovlivňují růstové schopnosti vybraných bakteriálních kmenů. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u *Enterococcus faecalis* CCM4224 a *Streptococcus agalactiae* CCM6187, kde byl CPM po kultivaci pod hranicí detekce ve vzorku s 500 µl/ml koncentrací ApiBalm Dip. Zvláště je patrný vliv koncentrace přípravku pro inhibici růstu u *Enterococcus faecalis* CCM4224, ApiBalm Dip v závislosti na koncentraci v roztoku redukoval CPM z úrovně ***** pod úroveň detekce. Růst kmene *Streptococcus agalactiae* CCM6187 byl inhibován na úroveň ** již od koncentrace 0.5 µl/ml. *Enterococcus faecalis* CCM4224 byl inhibován na stejné úrovni od koncentrace 5 µl/ml. *Serratia marcescens* CCM303 prokázal nejvyšší rezistenci pro účinek ApiBalm Dip - z úrovně



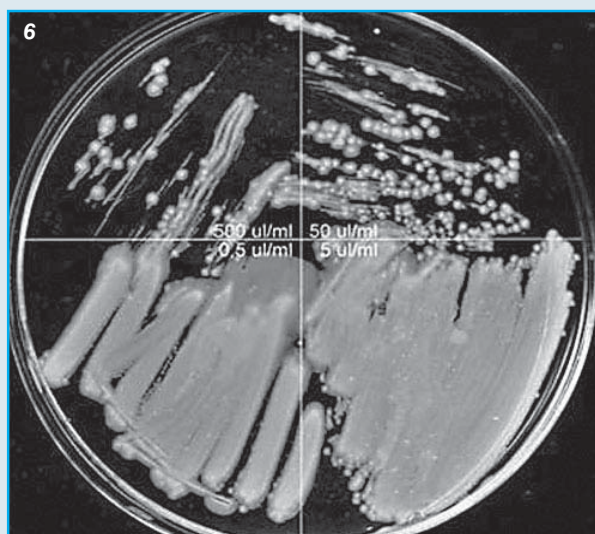
Obr. 2, 3 Výsledky určení zón inhibice pro *Staphylococcus aureus* (CCM3953), *Escherichia coli* (CCM3954).

***** na úroveň ** v závislosti na koncentraci přípravku v roztoku. Růstové schopnosti *Staphylococcus aureus* CCM3953 a *Escherichia coli* CCM3954 byly inhibovány na úroveň *** od koncentrace 50 μ l/ml resp. 500 μ l/ml.

Závěr

Přípravek ApiBalm Dip vykazuje antimikrobiální aktivitu v obou typech laboratorních experimentů popsanych v práci. Množství aplikovaného přípravku má vliv na velikost zón inhibice u 5 vybraných kmenů mastitidních bakterií. Průměrná zóna inhibice určené pomocí terčíkové metody činila v pokusu 9,667 mm. Výsledky také ukazují vyšší antibakteriální účinek přípravku při přímé aplikaci na bakteriální kolonie. Byl tedy prokázán jak bariérový efekt přípravku, tak přímá antimikrobiální aktivita.

ApiBalm Dip inhibuje růstové schopnosti všech vybraných bakteriálních kmenů v závislosti na jeho koncentraci v kultivačním médiu s bakteriemi. Výsledky pro různé koncentrace závisí na typu jednotlivých bakteriálních kmenů, ale na základě výsledků je možno tvrdit, že koncentrace 500 μ l/ml přípravku ApiBalm Dip efektivně inhibuje růst všech zkoumaných bakteriálních kmenů.



Laboratorní metodika navržená v práci byla experimentálně ověřena a je ji možno využít pro základní testování účinnosti podobných přípravků před provozním ověřením účinnosti. Výrazně tak může redukovat především náklady při vývoji přípravků určených k desinfekci vemene. Další práce bude metodicky zaměřena na provedení provozního stanovení účinnosti ve vztahu k získaným výsledkům, které umožní určit, do jaké míry jsou laboratorně získané výsledky vhodné k zobecnění v praktické aplikaci.

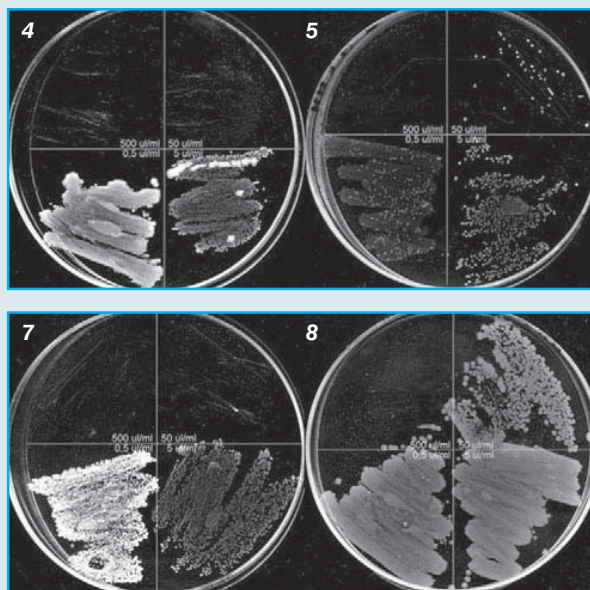
Článek vznikl s podporou projektů MV0/VG20102015023 a MZE/QJ1210301.

Literatura

- Lam T. J. et al.: Udder disinfection and mastitis in cattle. Tijdschr. Diergeneeskd. 1995 Jul 1;120(13):392-9.
- Salerno T. et al.: In vitro algacide effect of sodium hypochlorite and iodine based antiseptics on Prototheca zoppii strains isolated from bovine milk. Res. Vet. Sci. 2010 Apr;88(2):211-3.
- Castro S. I. et al.: Effects of iodine intake and teat-dipping practices on milk iodine concentrations in dairy cows. J. Dairy Sci. 2012 Jan; 95(1):213-20.
- www.dairyco.org.uk
- Pyörälä S.: Mastitis in post-partum dairy cows. Reprod. Domest. Anim. 2008 Jul;43 Suppl 2:252-9
- Bushnell R. B.: The importance of hygienic procedures in controlling mastitis. Vet. Clin Anim. Pract. 1984 Jul;6(2):361-70.
- Foltys V. - Kirchnerová K.: Changes in mastitis pathogens development and their sensitivity to antibiotics in dairy industry. In: Biotechnology 2006, Medzin. ved. konf. České Budějovice, ČR, 15.-16.2.2006: Scientific Pedagogical Publishing, Č. Budějovice, s. 811-813. CD, ISBN 8085645-53-X
- Foltys V. - Kirchnerová K.: Vývoj výskytu mastitidních patogénů a nové metody ich stanovenia v prvovýrobe mlieka. In: Hygiena alimentorum. XXVIII medzinárodná vedecká konferencia. Štrbské Pleso - Vysoké Tatry, SR, 2.-4.5.2007. Recenzovaný zborník, Košice, UVL, 2007, s. 106-110, ISBN: 978-80-8077-055-6
- Foltys V. - Kirchnerová K.: Etiológia mastitíd v priebehu laktácie. Acta fytotechnica et zootechnica, 12, 2009 s. 21-22. ISSN 1335-258X

Lektorováno dne 13. 11. 2012

Přijato k tisku dne 7. 12. 2012



Obr. 4-8 Výsledky stanovení CPM po kultivaci s různými koncentracemi ApiBalm Dip. *Enterococcus faecalis* CCM4224 (Obr. 4), *Streptococcus agalactiae* CCM6187 (Obr. 5), *Serratia marcescens* CCM303 (Obr. 6), *Staphylococcus aureus* CCM3953 (Obr. 7), *Escherichia coli* CCM3954 (Obr. 8).