

Materiál

Tab. 1 Kmeny laktobacilů ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora®

| Pořadí | Kmen | Sbírkové číslo |
|--------|---|----------------|
| 1 | <i>Lactobacillus acidophilus</i> | CCDM 151 |
| 2 | <i>Lactobacillus casei</i> | CCDM 198 |
| 3 | <i>Lactobacillus casei</i> | CCDM 199 |
| 4 | <i>Lactobacillus helveticus</i> | CCDM 62 |
| 5 | <i>Lactobacillus helveticus</i> | CCDM 92 |
| 6 | <i>Lactobacillus helveticus</i> | CCDM 98 |
| 7 | <i>Lactobacillus helveticus</i> | CCDM 447 |
| 8 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | CCDM 182 |
| 9 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | CCDM 385 |
| 10 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | CCDM 388 |
| 11 | <i>Lactobacillus paracasei</i> | CCDM 818 |
| 12 | <i>Lactobacillus paracasei</i> | CCDM 819 |
| 13 | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | CCDM 66 |
| 14 | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | CCDM 767 |
| 15 | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | CCDM 156 |
| 16 | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | CCDM 821 |

Živná média a pomocné látky:

Mléko 1,5 % tuku
MRS bujón Merck 1.10661.0500
Glycerin bezvodý p.a. Lach:ner

Zařízení:

Mrazicí box Electrolux (-40 °C)
Mrazicí a chladič box Elektrolux
Zamrazovací zařízení Shirman
Mikroskop Axio Zeiss

Výsledky a diskuze

Substrát pro kultivaci kmenů byl připraven z mléka 1,5 % tuku s přidávkou 10 % MRS bujónu. Jednotlivé složky byly sterilovány při 121 °C po dobu 15 minut. Po zchlazení na kultivační teplotu byly substráty zaočkovány kmeny laktobacilů v dávce 2 % obj., u kmenů č. 1, 5, 13, 14 byla dávka inokula zvýšena na 5 % obj.. Poté byly kmeny kultivovány v termostatu při 37 °C po dobu 16 hodin.

Po kultivaci bylo provedeno stanovení morfologických znaků mikroskopicky. Preparáty byly obarveny methylenovou modří. Dále byla změřena aktivní kyselost a byl stanoven počet KTJ/ml. Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Poté byly fermentované substráty rozplněny do sterilních zkumavek. Do poloviny zkumavek byl přidán kryoprotekční roztok 85 % glycerolu v dávce 15 % tj. 12,75 % glycerolu. Zkumavky byly nejprve zchlazeny na teplotu 4 °C, poté rychle zmrazeny v zamrazovacím zařízení Shirman, určeném pro rychlé mrazení, na sledovanou teplotu a pak umístěny do mrazicích boxů o teplotách -18 a -40 °C. Za 24 hodin po zamrazení byla první část zkumavek šetrně rozmrazena ve vodní lázni o teplotě 30 °C. Následná kontrola byla zaměřena na porovnání počtu KTJ/ml s a bez přidavku glycerolu v závislosti na vlivu teploty zamrazení. Tyto výsledky ukazuje tabulka č.3.

Tab. 2 Stanovení aktivní kyselosti a počtu KTJ/ml před mražením

| Kmen č. | pH | KTJ/ml |
|---------|------|---------------------|
| 1 | 4,55 | 2,8.10 ⁸ |
| 2 | 4,34 | 3,7.10 ⁹ |
| 3 | 4,33 | 5,4.10 ⁹ |
| 4 | 4,16 | 3,5.10 ⁸ |
| 5 | 3,47 | 3,6.10 ⁷ |
| 6 | 3,52 | 6,8.10 ⁹ |
| 7 | 3,42 | 2,2.10 ⁹ |
| 8 | 4,27 | 2,5.10 ⁹ |
| 9 | 4,20 | 9,0.10 ⁸ |
| 10 | 4,25 | 2,3.10 ⁹ |
| 11 | 4,33 | 2,5.10 ⁹ |
| 12 | 4,27 | 2,2.10 ⁹ |
| 13 | 4,11 | 3,0.10 ⁸ |
| 14 | 4,28 | 8,0.10 ⁸ |
| 15 | 4,19 | 7,9.10 ⁸ |
| 16 | 4,13 | 3,2.10 ⁹ |

Tab. 3 Stanovení počtu KTJ/ml testovaných kmenů po rozmrazení s a bez přidavku 12,75 % glycerolu deponovaných při -18 °C a -40 °C po dobu 24 hodin

| Kmen č. | KTJ/ml při teplotě skladování -18 °C bez glycerolu | KTJ/ml při teplotě skladování -18 °C s glycerolem | KTJ/ml při teplotě skladování -40 °C bez glycerolu | KTJ/ml při teplotě skladování -40 °C s glycerolem |
|---------|--|---|--|---|
| 1 | 2,0.10 ⁸ | 3,0.10 ⁸ | 2,0.10 ⁸ | 2,0.10 ⁸ |
| 2 | 3,5.10 ⁹ | 2,7.10 ⁹ | 3,9.10 ⁹ | 3,4.10 ⁹ |
| 3 | 4,7.10 ⁹ | 2,7.10 ⁹ | 5,7.10 ⁹ | 3,8.10 ⁹ |
| 4 | 3,1.10 ⁸ | 5,0.10 ⁸ | 4,0.10 ⁸ | 3,0.10 ⁸ |
| 5 | 2,2.10 ⁷ | 1,0.10 ⁷ | 3,0.10 ⁷ | 2,0.10 ⁷ |
| 6 | 6,0.10 ⁸ | 6,0.10 ⁸ | 6,1.10 ⁸ | 6,1.10 ⁸ |
| 7 | 1,1.10 ⁹ | 3,6.10 ⁹ | 1,2.10 ⁹ | 5,1.10 ⁸ |
| 8 | 1,8.10 ⁹ | 2,8.10 ⁹ | 2,3.10 ⁹ | 3,3.10 ⁹ |
| 9 | 2,0.10 ⁹ | 1,7.10 ⁹ | 3,1.10 ⁹ | 6,0.10 ⁸ |
| 10 | 3,0.10 ⁹ | 2,8.10 ⁹ | 2,4.10 ⁹ | 1,8.10 ⁹ |
| 11 | 3,5.10 ⁹ | 3,1.10 ⁹ | 3,5.10 ⁹ | 2,5.10 ⁹ |
| 12 | 3,5.10 ⁹ | 1,9.10 ⁹ | 3,4.10 ⁹ | 2,7.10 ⁹ |
| 13 | 3,4.10 ⁸ | 9,0.10 ⁸ | 3,0.10 ⁸ | 2,0.10 ⁸ |
| 14 | 8,0.10 ⁸ | 6,0.10 ⁸ | 1,3.10 ⁹ | 6,0.10 ⁸ |
| 15 | 7,0.10 ⁸ | 8,0.10 ⁸ | 1,3.10 ⁹ | 5,0.10 ⁸ |
| 16 | 2,6.10 ⁹ | 3,3.10 ⁹ | 3,2.10 ⁹ | 2,8.10 ⁹ |

U kmenů č. 2, 3, 5, 9, 10, 11, 12 a 14, kde bylo přidáno kryoprotekční médium a kmeny byly deponovány při teplotě -18 °C, byl počet KTJ/ml nižší než u kmenů bez přidavku. Rozdíly v hodnotách jsou v rámci stejného řádu.

Snižovaný počet KTJ/ml byl zaznamenán i u kmenů s kryoprotekčním médiem deponovaných při teplotě -40 °C a to u kmenů č. 2, 3, 4, 5, 10, 11, 12, 13 a 16. Rozdíly jsou minimální a lze konstatovat, že zjištěné hodnoty mají odchylku v rámci mikrobiologické chyby.

Z těchto výsledků vyplývá, že po 24 hodinách mrazení při teplotách -18 a -40 °C nebyl zaznamenán významný pozitivní vliv použitého kryoprotekčního média na počet KTJ/ml.

Po třech měsících skladování byly mražené kultury opětovně testovány, jak přežívají mikroorganismy za testovaných podmínek skladování při teplotách -18 a -40 °C a výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 4.

Tab. 4 Stanovení počtu KTJ/ml testovaných kmenů po rozmrazení s a bez přidavku 12,75 % glycerolu deponovaných při -18 °C a -40 °C po dobu 3 měsíce

| Kmen č. | KTJ/ml při teplotě skladování -18 °C bez glycerolu | KTJ/ml při teplotě skladování -18 °C s glycerolem | KTJ/ml při teplotě skladování -40 °C bez glycerolu | KTJ/ml při teplotě skladování -40 °C s glycerolem |
|---------|--|---|--|---|
| 1 | 2,2.10 ⁸ | 5,2.10 ⁸ | 4,7.10 ⁷ | 4,3.10 ⁷ |
| 2 | 4,4.10 ⁹ | 1,8.10 ⁹ | 4,1.10 ⁹ | 6,4.10 ⁸ |
| 3 | 2,8.10 ⁸ | 3,6.10 ⁹ | 4,9.10 ⁹ | 3,5.10 ⁹ |
| 4 | 4,0.10 ⁸ | 5,0.10 ⁸ | 5,0.10 ⁸ | 3,0.10 ⁸ |
| 5 | 5,0.10 ⁷ | 5,0.10 ⁷ | 2,5.10 ⁷ | 4,9.10 ⁷ |
| 6 | 6,4.10 ⁸ | 6,0.10 ⁸ | 6,0.10 ⁸ | 6,0.10 ⁸ |
| 7 | 6,2.10 ⁸ | 1,1.10 ⁹ | 2,1.10 ⁸ | 7,0.10 ⁸ |
| 8 | 1,0.10 ⁹ | 2,3.10 ⁹ | 2,0.10 ⁹ | 2,0.10 ⁹ |
| 9 | 1,1.10 ⁹ | 2,2.10 ⁹ | 1,5.10 ⁹ | 5,9.10 ⁸ |
| 10 | 2,1.10 ⁹ | 1,4.10 ⁹ | 1,1.10 ⁹ | 2,6.10 ⁹ |
| 11 | 4,5.10 ⁹ | 1,9.10 ⁹ | 1,8.10 ⁹ | 1,4.10 ⁹ |
| 12 | 2,8.10 ⁹ | 3,1.10 ⁹ | 2,6.10 ⁹ | 7,0.10 ⁸ |
| 13 | 1,8.10 ⁸ | 1,2.10 ⁸ | 2,9.10 ⁸ | 1,4.10 ⁸ |
| 14 | 2,6.10 ⁸ | 8,7.10 ⁸ | 6,0.10 ⁸ | 6,0.10 ⁸ |
| 15 | 1,3.10 ⁸ | 1,0.10 ⁸ | 1,5.10 ⁹ | 4,5.10 ⁸ |
| 16 | 3,3.10 ⁹ | 2,2.10 ⁹ | 3,5.10 ⁹ | 2,5.10 ⁹ |

Na základě zjištěného počtu mikroorganismů lze konstatovat, že teplota -18 °C je vhodnou teplotou pro úchovu mlékařských kultur po dobu 3 měsíců. Významné rozdíly mezi kulturami bez a s přidávkou 12,75 % glycerolu nebyly zjištěny. Pouze u kmenů č. 7 a č. 14 přidavek glycerolu výrazněji pozitivně působil tím, že nedošlo ke snížení počtu MO, zatímco kultury bez glycerolu snížily počet o půl řádu KTJ/ml.

Obdobné výsledky jsme zaznamenali při použití konzervační teploty -40 °C. Ani zde nebyly zjištěny významné rozdíly mezi kulturou skladovanou 24 hodin a 3 měsíce. I tato teplota je vhodná pro dlouhodobé skladování laktobacilů.

Závěr

Na základě zjištěných výsledků lze konstatovat, že vybraný soubor laktobacilů lze deponovat dvoufázovým ošetřením - zchlazením a poté rychlým zmrazením a uchováváním za teplot -18 °C a -40 °C po dobu 3 měsíců bez významné ztráty na počtu KTJ/ml. Mezi sledovanými teplotami nebyly zjištěny výrazné rozdíly. Použitý směsný substrát na bázi mléka s peptonem, masovým a kvasničným extraktem je vhodnou kultivační půdou a i kryoprotekčním médiem. Přídavek glycerolu v dávce 12,75 % měl pozitivní vliv na počet KTJ/ml kmenů *Lactobacillus helveticus* CCDM 447 a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCDM 767 při teplotě skladování -18 °C.

Literatura

- Conrad P.B. a kol.(2000): Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology*, Volume 41, Issue 1, Pages 17-24
- Sinn D.H.a kol.(2008): Therapeutic effect of *Lactobacillus acidophilus* - SDC 2012,2013 in patients with irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 50:2714-2718
- Fernandez Murga M.L. a kol.(1998): Survival rate and Enzyme activities of *Lactobacillus acidophilus* following frozen storage. *Cryobiology*. Volume 36, Issue 4, Pages 315-319
- Fonseca F.a kol.(2006): Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in glycerol suspensions: Freezing kinetics and storage temperature effects. *Appl. Environ. Microbiol.* Volume 72, 6474-6482
- Gotz V.a kol.(1979): Prophylaxis against ampicillin-associated diarrhea with a lactobacillus preparation. *Am. J. Hosp. Pharm.* June 1, vol 36 (6) 754-757
- Gotteland M, Cruchet S.(2003): Suppressive effect of frequent ingestion of *Lactobacillus johnsonii* La1 on *Helicobacter pylori* colonization in asymptomatic volunteers. *J.Antimicrob.Chemother.* May 51(5):1317-9
- Hickson M. a kol. (2007): Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ*, Jul 14, 335(7610):80.
- Sakamoto I. a kol. (2001): Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans. *J. Antimicrob. Chemother* 47 (5): 709-710

Výzkum byl podpořen v rámci projektů QJ1210093 a RO 0513.

Přijato do tisku 4. 11. 2013

Lektorováno 29. 11. 2013

SLEDOVÁNÍ VYBRANÝCH MIKROBIÁLNÍCH A CHEMICKÝCH PARAMETRŮ V KOLOSTRU ČESKÉHO ČERVENOSTRAKATÉHO SKOTU

Ivana Lisová¹, Gabriela Kunová¹, Lenka Diblíková², Ladislav Čurda³, Tereza Michlová²

¹ - Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha;

² - Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze;

³ - Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Study of selected microbial and chemical parameters in colostrum from the Czech red cattle

Abstrakt

Cílem této studie bylo testování mikrobiologických a chemických ukazatelů kvality kravského kolostra od prvotek i dojníc českého červenostrakatého skotu. Z mikrobiologických parametrů byly sledovány počty kvasinek, plísňů, koliformních bakterií, *E. coli*, koaguláza pozitivních stafylokoků a celkový počet mikroorganismů.

Přibližně u poloviny testovaných vzorků mleziva byla detekována přítomnost koliformních bakterií a *E. coli*. Přítomnost koaguláza pozitivních stafylokoků byla zachycena především v letních měsících. Vyšší počty kvasinek a plísň (do 1000 KTJ/ml) byly detekovány v zimním období. Celkové počty mikroorganismů odpovídaly počtům u tepelně neošetřeného mléka. U většiny vzorků byly dosaženy zvláště nízké celkové počty (pod 1000 KTJ/ml). Z chemických parametrů byl sledován obsah tuku, bílkovin, sušina, pH, vodivost a obsah vitamínů A a E. Z 36 vzorků testovaných na přítomnost reziduí inhibičních látek u tří vzorků byla prokázána rezidua ampicilinu a cloxacilinu.

Klíčová slova: Kolostrum, mikrobiální kvalita, český červenostrakatý skot

Abstract

The aim of this study was to test some of the qualitative indicators of cow's colostrum originating from the breed Czech red cattle. From microbiological parameters, yeasts, molds, coliforms, *E. coli*, coagulase positive staphylococci, as well as total bacterial counts were monitored. Approximately in the half of samples assayed, the presence of coliform bacteria and *E. coli* as well as the presence of yeasts and molds (to 1000 cfu/ml) was detected. The presence of coagulase-positive staphylococci mainly during the summer months was noted. Total bacterial counts correspond to the bacterial counts in thermally untreated milk. In most samples low total numbers (less than 1000 cfu/ml) were noted. From the chemical parameters, fat, proteins, solids, pH, conductivity, and vitamins A and E were monitored. In 3 out of 36 samples tested for the presence of residues of inhibitory substances ampicillin and cloxacillin residues were detected.

Keywords: Colostrum, microbial quality, czech red cattle

Úvod

Kolostrum je první mléko s unikátním nutričním profilem produkované několik hodin po porodu savců. Při porovnání s mlékem kolostrum obsahuje vyšší obsah bílkovin, nebílkovinného dusíku, vitamínů a minerálních látek (Kelly, 2003). Další významnou složkou jsou imunoglobuliny (IgG, IgA, IgM), které se podílejí na rozvoji imunitního systému a jejich obsah je téměř 100x vyšší než v mléce. Mlezivo je také zdrojem biologicky aktivních látek s antimikrobiální aktivitou, jako např. lysozym, laktoferin, laktoperoxidasa a další. Všechny tyto látky mohou mít vliv na přežívání zde přítomných mikroorganismů, jak nežádoucích, tak prospěšných (zejména laktobacilů a bifidobakterií). Laktoferin byl jednou z prvních složek mléka, které byly izolovány a komerčně využívány jako doplněk do kojenecké výživy a dalších potravin (Wakabayashi a kol., 2006). Kromě antimikrobiálních látek jsou v mlezivu významně zastoupeny také oligosacharidy (Gopal a kol. 2000), které se

vyznačují prebiotickými vlastnostmi a mohou tak podporovat růst určitých skupin mikroorganismů (laktobacilů, bifidobakterií). Bylo prokázáno, že kolostrum a peptidy v něm obsažené mohou napomáhat při léčbě gastrointestinálních onemocnění (Playford, 2001). Kromě imunomodulačních a antimikrobiálních účinků se kolostrum podílí na reparaci svalově-kosterního aparátu a je také jediným přírodním zdrojem růstových faktorů (TGF- α a β). Těchto vlastností je možné využívat v doplňcích stravy pro sportovce nebo jako nutriční suplement pro starší osoby (Uruakpa a kol., 2002; Pouliot&Gauthier, 2006).

Cílem této studie bylo otestovat mikrobiologickou a chemickou kvalitu složení kravského kolostra od prvotek i dojníc českého červenostrakatého skotu. Pro zachování co nejvyššího množství biologicky aktivních látek, je na ošetření kolostra nutné použití nižší pasterační teploty, a proto je mikrobiologická kvalita kolostra jako vstupní suroviny velmi důležitá. U odebraných vzorků bylo sledováno množství kvasinek, plísň, koliformních bakterií, *E. coli* a celkový počet mikroorganismů. Dále byla testována přítomnost koaguláza pozitivních stafylokoků. Do této skupiny se řadí *Staphylococcus aureus*, který spolu s *E. coli* a dalšími kmeny, je původce klinických a subklinických mastitid, které vedou ke kontaminaci syrového mléka i mleziva. Z chemických parametrů byl sledován obsah tuku, bílkovin, sušina, pH, vodivost, obsah vitamínů A a E. Dále byla u vzorků také sledována rezidua inhibičních látek.

Metodika a Materiál

Kolostrum

Vzorky kravského kolostra od prvotek i dojníc českého červenostrakatého skotu byly odebírány pracovníky ZD Kojčice v období od června 2012 do ledna 2013. Celkově bylo v tom období odebráno 90 vzorků kolostra. Po prvotním testování vhodného způsobu odběru s co nejnižším rizikem bakteriální kontaminace byl zvolen způsob, kdy je hned po otelení vzorek oddojen z dezinfikovaného struku (70 % isopropyl alkohol) do sterilní vzorkovnice. Vzorek byl poté zamrazen na teplotu - 18 °C.

Mikrobiologická stanovení

U vzorků kravského kolostra byly stanovovány především technologicky a zdravotně nežádoucí mikroorganismy (kvasinek, plísň, koliformních bakterií, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*). V tabulce 1 jsou zobrazeny média (Milcom Tábor, ČR) a kultivační podmínky sledovaných mikroorganismů.

Tab. 1 Kultivační podmínky sledovaných skupin mikroorganismů

| testované mikroorganismy | podmínky kultivace |
|---|--|
| kvasinky a plísň (KTJ/ml) | půda GKCH, aerobně, 25 °C, 72 hod. |
| koaguláza pozitivní stafylokoky (KTJ/ml) | půda B-P + RPF suplement, aerobně, 37 °C, 24 hod |
| celkový počet mikroorganismů (KTJ/ml) | půda GTK, aerobně, 30 °C, 72 hod. |
| koliformní bakterie <i>E. coli</i> (KTJ/ml) | Chromogenní agar, aerobně, 37 °C, 24 hod. |

Přibližně u poloviny testovaných vzorků mleziva byla detekována přítomnost koliformních bakterií a *E. coli*. Přítomnost koaguláza pozitivních stafylokoků byla zachycena především v letních měsících. Vyšší počty kvasinek a plísní (do 1000 KTJ/ml) byly detekovány v zimním období. Celkové počty mikroorganismů odpovídaly počtům u tepelně neošetřeného mléka. U většiny vzorků byly dosaženy zvláště nízké celkové počty (pod 1000 KTJ/ml). Z chemických parametrů byl sledován obsah tuku, bílkovin, sušina, pH, vodivost a obsah vitamínů A a E. Z 36 vzorků testovaných na přítomnost reziduí inhibičních látek u tří vzorků byla prokázána rezidua ampicilinu a cloxacilinu.

Klíčová slova: Kolostrum, mikrobiální kvalita, český červenostrakatý skot

Abstract

The aim of this study was to test some of the qualitative indicators of cow's colostrum originating from the breed Czech red cattle. From microbiological parameters, yeasts, molds, coliforms, *E. coli*, coagulase positive staphylococci, as well as total bacterial counts were monitored. Approximately in the half of samples assayed, the presence of coliform bacteria and *E. coli* as well as the presence of yeasts and molds (to 1000 cfu/ml) was detected. The presence of coagulase-positive staphylococci mainly during the summer months was noted. Total bacterial counts correspond to the bacterial counts in thermally untreated milk. In most samples low total numbers (less than 1000 cfu/ml) were noted. From the chemical parameters, fat, proteins, solids, pH, conductivity, and vitamins A and E were monitored. In 3 out of 36 samples tested for the presence of residues of inhibitory substances ampicilin and cloxacillin residues were detected.

Keywords: Colostrum, microbial quality, czech red cattle

Úvod

Kolostrum je první mléko s unikátním nutričním profilem produkované několik hodin po porodu savců. Při porovnání s mlékem kolostrum obsahuje vyšší obsah bílkovin, nebílkovinného dusíku, vitamínů a minerálních látek (Kelly, 2003). Další významnou složkou jsou imunoglobuliny (IgG, IgA, IgM), které se podílejí na rozvoji imunitního systému a jejich obsah je téměř 100x vyšší než v mléce. Mlezivo je také zdrojem biologicky aktivních látek s antimikrobiální aktivitou, jako např. lysozym, laktoferin, laktoperoxidasa a další. Všechny tyto látky mohou mít vliv na přežívání zde přítomných mikroorganismů, jak nežádoucích, tak prospěšných (zejména laktobacilů a bifidobakterií). Laktoferin byl jednou z prvních složek mléka, které byly izolovány a komerčně využívány jako doplněk do kojenecké výživy a dalších potravin (Wakabayashi a kol., 2006). Kromě antimikrobiálních látek jsou v mlezivu významně zastoupeny také oligosacharidy (Gopal a kol. 2000), které se

vyznačují prebiotickými vlastnostmi a mohou tak podporovat růst určitých skupin mikroorganismů (laktobacilů, bifidobakterií). Bylo prokázáno, že kolostrum a peptidy v něm obsažené mohou napomáhat při léčbě gastrointestinálních onemocnění (Playford, 2001). Kromě imunomodulačních a antimikrobiálních účinků se kolostrum podílí na reparaci svalově-kosterního aparátu a je také jediným přírodním zdrojem růstových faktorů (TGF- α a β). Těchto vlastností je možné využívat v doplňcích stravy pro sportovce nebo jako nutriční suplement pro starší osoby (Uruakpa a kol., 2002; Pouliot&Gauthier, 2006).

Cílem této studie bylo otestovat mikrobiologickou a chemickou kvalitu složení kravského kolostra od prvotek i dojníc českého červenostrakatého skotu. Pro zachování co nejvyššího množství biologicky aktivních látek, je na ošetření kolostra nutné použití nižší pasterační teploty, a proto je mikrobiologická kvalita kolostra jako vstupní suroviny velmi důležitá. U odebraných vzorků bylo sledováno množství kvasinek, plísní, koliformních bakterií, *E. coli* a celkový počet mikroorganismů. Dále byla testována přítomnost koaguláza pozitivních stafylokoků. Do této skupiny se řadí *Staphylococcus aureus*, který spolu s *E. coli* a dalšími kmeny, je původce klinických a subklinických mastitid, které vedou ke kontaminaci syrového mléka i mleziva. Z chemických parametrů byl sledován obsah tuku, bílkovin, sušina, pH, vodivost, obsah vitamínů A a E. Dále byla u vzorků také sledována rezidua inhibičních látek.

Metodika a Materiál

Kolostrum

Vzorky kravského kolostra od prvotek i dojníc českého červenostrakatého skotu byly odebrány pracovníky ZD Kojčice v období od června 2012 do ledna 2013. Celkově bylo v tom období odebráno 90 vzorků kolostra. Po prvotním testování vhodného způsobu odběru s co nejnižším rizikem bakteriální kontaminace byl zvolen způsob, kdy je hned po oteplení vzorek oddojen z dezinfikovaného struku (70 % isopropyl alkohol) do sterilní vzorkovnice. Vzorek byl poté zamrazen na teplotu - 18 °C.

Mikrobiologická stanovení

U vzorků kravského kolostra byly stanovovány především technologicky a zdravotně nežádoucí mikroorganismy (kvasinek, plísní, koliformních bakterií, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*). V tabulce 1 jsou zobrazeny média (Milcom Tábor, ČR) a kultivační podmínky sledovaných mikroorganismů.

Tab. 1 Kultivační podmínky sledovaných skupin mikroorganismů

| testované mikroorganismy | podmínky kultivace |
|---|--|
| kvasinky a plísně (KTJ/ml) | půda GKCH, aerobně, 25 °C, 72 hod. |
| koaguláza pozitivní stafylokoky (KTJ/ml) | půda B-P + RPF suplement, aerobně, 37 °C, 24 hod |
| celkový počet mikroorganismů (KTJ/ml) | půda GTK, aerobně, 30 °C, 72 hod. |
| koliformní bakterie <i>E. coli</i> (KTJ/ml) | Chromogenní agar, aerobně, 37 °C, 24 hod. |

Základní chemická stanovení

U vzorků po rozmrazení bylo změřeno pH a vodivost kombinovaným přístrojem pH/Cond 340i (WTW, Německo). Dále byla stanovena sušina vázkovou metodou a obsah hrubých bílkovin Kjeldahlovou metodou na přístroji Kjeltac 8420 (Foss, Dánsko). Stanovení sušiny a bílkovin bylo opakováno třikrát. Byl rovněž analyzován obsah tuku butyrometricky.

Stanovení vitamínu E a A

Množství vitamínu A a E bylo stanoveno ve vzorcích kravského kolostra metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí, resp. spektrofotometrickou detekcí. Na analytickou koncovku byl použit chromatografický systém Ultimate 3000 (Dionex, USA). Byla použita analytická kolona s předkolonou Develosil 5u RPAQUEOUS (250x4.6 mm); Develosil 5u C30-UG 100A (10x4 mm), (Phenomenex, USA), která umožňuje separaci všech forem tokoferolů a tokotrienolů. Mobilní fázi byla směs MeOH: deionizovaná voda (97:3, v/v) o průtoku 1 ml/min, eluce byla prováděna izokraticky.

Výsledky a diskuze

Výsledky mikrobiologických stanovení jsou zobrazeny v tabulce 2, ze kterých je patrný vliv lidského faktoru na odběr vzorků, doba odběru a skladování na kvalitu odebraného kolostra. Celkové počty mikroorganismů odpovídaly počtům u tepelně neošetřeného mléka. U většiny vzorků byly dosaženy zvláště nízké celkové počty (pod

Tab. 2 Průměrné výsledky mikrobiologických stanovení v období červen-leden (log KTJ/ml)

| | Kvasinky | Plísně | Stafylokoky | CPM | CB | <i>E. coli</i> |
|----------|----------|--------|-------------|------|------|----------------|
| červen | 0,43 | 0,11 | neg. | 2,88 | 0,99 | 0,60 |
| červenec | neg. | neg. | 0,49 | 3,28 | 1,61 | 1,57 |
| srpen | 1,43 | 0,45 | 0,38 | 3,15 | 1,96 | 0,77 |
| září | 0,52 | 0,18 | neg. | 4,18 | 2,34 | 1,53 |
| říjen | 2,38 | 0,85 | 0,08 | 4,26 | 1,38 | neg. |
| listopad | 2,15 | 0,58 | neg. | 4,90 | 2,28 | 0,45 |
| prosinec | 1,94 | 0,30 | neg. | 3,15 | 1,23 | neg. |
| leden | 2,86 | 2,43 | neg. | 5,56 | 1,90 | neg. |
| únor | 3,08 | 1,65 | neg. | 5,30 | neg. | 2,65 |

CPM - celkový počet mikroorganismů; CB - koliformní bakterie

Tab. 3 Průměrné výsledky základních chemických stanovení v období od července do února

| | tuk (% hm.) | s | sušina (% hm.) | s | hrubé bílkoviny (% hm.) | s | pH | κ (μ S/cm) |
|----------------|-------------|------|----------------|------|-------------------------|------|------|------------------------|
| červenec | 4,96 | 0,00 | 22,42 | 0,10 | 13,18 | 0,06 | 6,31 | 4,77 |
| srpen | 3,97 | 0,02 | 23,31 | 0,29 | 15,15 | 0,06 | 6,09 | 5,03 |
| září | 4,06 | 0,02 | 25,34 | 0,05 | 16,51 | 0,10 | 6,37 | 4,85 |
| říjen | 4,07 | 0,00 | 24,22 | 0,09 | 16,69 | 0,06 | 6,23 | 4,79 |
| prosinec | 4,01 | 0,00 | 23,56 | 0,36 | 13,94 | 0,05 | 6,01 | 4,25 |
| leden | 4,64 | 0,10 | 23,35 | 0,34 | 14,61 | 0,10 | 6,53 | 4,69 |
| únor | 5,21 | 0,00 | 23,17 | 0,16 | 14,07 | 0,04 | 6,26 | 4,99 |
| $\bar{\sigma}$ | 4,42 | 0,02 | 23,62 | 0,20 | 14,88 | 0,07 | 6,26 | 4,77 |

s - směrodatná odchylka

1000 KTJ/ml). Zvýšené hodnoty (10^5 až 10^6 KTJ/ml) byly způsobeny především nevhodným způsobem odběru a způsobem skladování, protože při pomalém zchlazení dochází k nárůstu nežádoucích mikroorganismů. Přibližně u poloviny vzorků byla zaznamenána přítomnost plísní a kvasinek (max. 10^3 KTJ/ml). Přibližně u poloviny testovaných vzorků mleziva byla detekována přítomnost koliformních bakterií a *E. coli*, které slouží jako indikátory hygienické kvality. Počty dosahovaly v průměru 10^1 KTJ/ml. Avšak vzhledem k tomu, že se jedná o tepelně neošetřené mlezivo, nejsou tyto počty zvláště znepokojující. Přítomnost koaguláza pozitivních stafylokoků byla zachycena především v letních měsících.

Stanovení reziduí inhibičních látek (RIL) je důležitým technologickým a zdravotním parametrem (zvýšení rezistence MO k antibiotikům) pro kvalitu mléka a v podstatě i kolostra. Pochází-li kolostrum od prvotek, není u něj riziko výskytu reziduí inhibičních látek, protože zvíře ještě nebylo zasušováno antibiotickými preparáty. V současné chvíli je zpracováno především kolostrum od prvotek, ale při možnosti vhodného testování RIL v kolostru od dojníc by bylo možné zpracovávat daleko větší množství kolostra. Rezidua inhibičních látek ve 36 vzorcích kolostra od dojníc odebraných pracovníky ZD Kojčice byly zkoušeny v akreditované zkušební laboratoři č. 1129 Státního veterinárního ústavu Jihlava mikrobiologickými (ECLIPSE, čtyřplotnová metoda, pl. metody s *E. coli* a *Geobacillus stearotherm.* v. c.) i metodou radioimunodifuze systémem CHARM II. Ze stanovených výsledků pouze tři vzorky nevyhovovaly Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 470/2009. U nevyhovujících vzorků byla prokázána rezidua ampicilinu a cloxacilinu, které jsou součástí používaného preparátu k zasušování Kloxerate (Pfizer, USA).

O kvalitě mleziva kromě mikrobiologických odpovídají i fyzikálně-chemické parametry. Při stanovení základních chemických parametrů (Tab. 3) byl u vzorků sledován obsah tuku, bílkovin a sušiny. Dále bylo měřeno pH a vodivost. U vzorků kolostra odebraných v dubnu byl stanoven i obsah vitamínu A a E (Tab. 4). Získané výsledky v této studii odpovídají literárním pramenům (Kehoe a kol., 2007; Tsioulpas a kol., 2007), které uvádějí průměrné hodnoty sušiny 20,0 hm. %, tuku 5,2 hm. % a bílkovin 10,7 hm. %. Vyšší hodnoty sušiny a bílkovin jsou způsobeny především

Tab. 4 Výsledky stanovení obsahu vitamínu A a E

| Číslo vz. | vitamin A (mg/kg) | vitamin E (mg/kg) |
|-----------|-------------------|-------------------|
| 1 | 2,77 | 9,89 |
| 2 | 0,75 | 1,35 |
| 3 | 1,60 | 2,57 |
| 4 | 1,29 | 1,63 |
| 5 | 4,83 | 13,32 |
| 5 | 3,29 | 6,20 |
| 7 | 0,82 | 1,00 |
| 8 | 19,22 | 12,63 |
| 9 | 9,18 | 5,62 |
| 10 | 6,54 | 13,06 |
| Ø | 5,0 | 6,7 |

výběrem plemene (českého červenostrakatého) a složením krmiva. Na stanovení tuku mohlo mít velký vliv předchozí zmrazení a rozmrazení vzorku i případná nedokonalá homogenizace vzorku, proto jsou námi zjištěné hodnoty nižší než je literárně uváděný průměr. V mléce červenostrakatého skotu se obsah tuku pohybuje okolo 4,0 hm %. Obsahy vitamínů A a E uváděné v tabulce 4 ukazují velkou variabilitu u každého z testovaných zvířat, která závisí na zdravotním stavu zvířete i složení krmiva. V mléce je vitamin A obsažen průměrně v množství 0,3-1,0 mg/kg a vitamin E 0,2 - 1,2 mg/kg (Ingr, 2003). V porovnání s průměrnými hodnotami v kravském kolostru jsou v průměru až 5 krát menší. Ontsouka a kol. (2003) ve své studii uvádějí hodnotu vodivosti kravského kolostra $5,6 + 0,2 \mu\text{S}/\text{cm}$, které je v porovnání s průměrnou vodivostí naměřenou v této studii o $0,8 \mu\text{S}/\text{cm}$ nižší. Hodnota pH kravského kolostra se během sledování pohybovala v rozmezí 6,01 - 6,53.

Závěr

Získané výsledky mikrobiologických a chemických parametrů tepelně neošetřeného kolostra poukazují na vyhovující kvalitu, ale je třeba zdůraznit, že výsledky, jak mikrobiologických i fyzikálně-chemických stanovení jsou v značné míře ovlivněny způsobem odběru vzorků, následnou manipulací a skladováním kolostra.

Poděkování

Tato práce vznikla v rámci institucionální podpory VÚM s.r.o., rozhodnutí č. RO 0513 a projektu Ministerstva Zemědělství č. QJ1210376.

Literatura

- Gopal K. P., Gill H. S. (2000): Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *British Journal Of Nutrition* (84): 69-74.
 Ingr. I. *Zpracování zemědělských produktů*. Brno: MZLU, 2003, 249 s., ISBN 8071575208
 Kehoe S. I., Jayarao B. M., Heinrichs A. J. (2007): A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on Pennsylvania dairy farms. *Journal Dairy Science* (90): 4108-4116.
 Kelly G. S. (2003): Bovinecolostrums: a review of clinical uses. *Alternative Medicine Review* (4): 378-394.
 Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 470/2009
 Ontsouka C. E., Bruckmaier R. M., Blum J. W. (2003): Fractionized milk composition during removal of colostrum and mature milk. *Journal of Dairy Science* (86): 2005-2011.

- Playford R. J. (2001): Peptide therapy and the gastroenterologist: colostrum and milk-derived growth factors. *Clinical Nutrition* (20): 101-106.
 Pouliot Y., Gauthier S. F. (2006): Milk growth factors as health products: Some chronological aspects. *International Dairy Journal* (16): 1415-1420.
 Tsioulpas C., Grandison A. S., Lewis M. J. (2007): Changes in physical properties of bovine milk from the colostrum period to early lactation. *Journal Dairy Science* (90): 5012-5017.
 Wakabayashi H., Yamauchi K., Takase M. (2006): Lactoferrin research, technology and applications. *International Dairy Journal* (16): 1241-1251.

Přijato do tisku 13. 11. 2013
 Lektorováno 30. 11. 2013

APLIKACE PROBIOTICKÝCH LAKTOBACILŮ DO MLÉKÁRENSKÝCH FERMENTOVANÝCH VÝROBKŮ A JEJICH SELEKTIVNÍ STANOVENÍ

Andrea Mühlhansová, Iva Jebavá, Šárka Horáčková, Milada Pločková

Ústav mléka, tuků a kosmetiky, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT v Praze

Application of probiotic lactobacilli in fermented dairy products and their selective determination

Souhrn

Vybrané kmeny rodu *Lactobacillus* spp. patří mezi významné probiotické bakterie. Využívají se jako startovací či doplňkové probiotické kultury do fermentovaných mlékařenských výrobků, a to zejména do fermentovaných mlék, kysaného podmaslí, kefirů, jogurtů a sýrů. V České republice se do fermentovaných mléčných výrobků aplikují především probiotické kmeny druhů *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei* a *L. rhamnosus*. Mnoho výrobců však na svém produktu deklaruje pouze obsah probiotické kultury bez specifikace druhu a konkrétního kmene *Lactobacillus* spp., což vede k nesnadné orientaci a nemožné zpětné kontrole a kvantifikaci přítomných probiotických bakterií.

Z hlediska technologických i zdravotně-funkčních vlastností těchto probiotických bakterií by měl být jejich počet v mlékařenských produktech kontrolován. Klasické kvantitativní stanovení pomocí plotnových metod sice zachycuje pouze živé buňky, je však časově náročné a může obecně vykazovat odchylku až 30 %. Navíc bývá toto stanovení nespecifické, jelikož použitá kultivační média nejsou dostatečně selektivní vůči vybraným druhům laktobacilů.