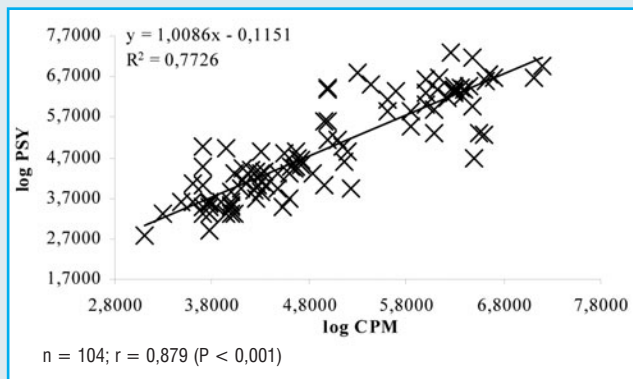


Obr. 10 Lineární regresní vztah mezi log CPM a log PSY v syrovém bazénovém mléce



Obr. 11 Lineární regresní vztah mezi log CPM a log PSY v syrovém bazénovém mléce nativním a po prodlouženém uložení

vyřazeného z důvodu podezření a léčby mastitid v souladu s logikou vyšetření.

Ve 2. FAHZM pro potrubní dojicí zařízení je podle výsledků rovněž možné konstatovat, resp. specifikovat, některé současné limitní hodnoty. Stěry z vizuálně dobře sanitovaných vnitřních míst (mléčný tank, horní díl přerušovače podtlaku a vnitřek dolního dílu pouzdra sítkového mléčného filtru) měly $1\,801 \pm 2\,094$ KTJ/ml ($n = 3$; možný limit pak $5\,235$ KTJ/ml). Stěr tužšího biofilmu bílého voskového vzhledu z vnitřku horního pouzdra sítkového mléčného filtru vykázal překvapivě poměrně nevýraznou kontaminaci CPM $55\,500$ KTJ/ml. Podobný stěr měkkého až tekutého biofilmu krémově-jogurtového vzhledu velmi špatně sanitovaného vnitřku odnímatelné trubky od přerušovače podtlaku do mléčného tanku měl hrubě závažnou kontaminaci CPM $2\,300\,000\,000$ KTJ/ml. Tyto výsledky, odpovídající vizuální charakteristice podezřelého materiálu, ač individuální, mohou mít určitou predikční hodnotu s ohledem na další interpretační praxi FAHZM. Fázová mléka (potrubí a tanky) vykázala CPM $43\,833 \pm 33\,986$ KTJ/ml ($n = 6$; x_g $33\,543$ KTJ/ml). Tyto vyhovující hodnoty mohou pro další interpretaci u jiných podobných technologií poskytnout limitní hodnotu ($x + sd \times 1,64$) $99\,570$ KTJ/ml. Voda proplachu po dojení a sanitaci měla CPM 18 ± 3 KTJ/ml ($n = 4$). Voda uchovaná v mléčném potrubí po sanitaci a proplachu mezi dojením (6 hod.) vzorkovaná před následným dojením měla CPM

568 ± 615 ($n = 4$) s maximem $1\,100$ KTJ/ml. Dokazovala tak dobrou účinnost sanitace a hygienickou způsobilost potrubí a nebyla významným zdrojem kontaminace mléka. Tyto vyhovující hodnoty proplachových vod mohou poskytnout limitní hodnotu ($x + sd \times 1,64$) $1\,110$ KTJ/ml ($n = 8$). Voda z hygienicky neadekvátně uložených molitanových potrubních stěrek vykázala CPM $11\,000\,000$ KTJ/ml.

Závěr

Výsledky sledování upřesnily význam vztahů a některé rizikové limity mikrobiologických hodnot pro praktickou interpretaci metody fázové analýzy hygieny získávání mléka pro současné podmínky, u tekutých vzorků zejména pro potrubní výplachy a dále pro stěry hygienicky kritických bodů technologie dojení. Tato poradenská metoda FAHZM je účelově v podstatě, ovšem s určitou rezervou (nepravdivost a dobrovolnost provedení v případě hygienických rizik), nepravidelnou variantou (modifikací či odnoží) oficiálně uznávané regulérní metody kontroly zdravotní bezpečnosti v potravinářství zvané HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points - Systém analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů). Tato je ve výrobě potravin považována za jeden ze základních nástrojů, jak účinně předcházet rizikům ohrožujícím bezpečnost potravin.

Poděkování

Tato práce byla podpořena projekty MZe NAZV KUS QJ1210301 a MZe RO 1415.

Použitá literatura je u autorů příspěvku.

Přijato do tisku: 13. 7. 2015

Lektorováno: 26. 7. 2015

VYUŽITÍ BAKTERIOFÁGŮ K ELIMINACI *LISTERIA MONOCYTOGENES* Z POVRCHU MĚKKÝCH SEKUNDÁRNĚ ZRAJÍCÍCH SÝRŮ

Plocková Milada, Horáčková Šárka

Ústav mléka, tuků a kosmetiky,

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 168 00 Praha 6, milada.plockova@vscht.cz

Use of bacteriophages for *Listeria monocytogenes* elimination from the soft cheeses surface

Abstrakt

Standardní metody používané pro eliminaci *Listeria monocytogenes* z potravin zahrnující tepelné ošetření surovin pasterací, snížení pH potraviny přísadkou kyseliny nebo fermentací, přísadkou NaCl a využití bakteriocinů bak-

terii mléčného kvašení s antilisteriální aktivitou nemusí být vždy dostatečně účinné. V poslední době se v odborné literatuře objevuje nová možnost využívající přírodních antagonistů patogenních bakterií, kterými jsou specifické bakteriofágy. V článku jsou charakterizovány bakteriofágy účinné proti *Listeria monocytogenes*, komerční přípravky na jejich bázi a uveden úspěšný příklad použití specifického bakteriofágu A511 k potlačení růstu *Listeria monocytogenes* na povrchu sýrů s plísní i s mazem na povrchu v průběhu tří týdnů jejich zrání.

Klíčová slova: listerie, bakteriofágy, sýry s plísní na povrchu, sýry s mazem na povrchu

Abstract

Standard methods used for elimination of *Listeria monocytogenes* from food products, including pasteurization of raw materials, acidification by acid addition or by use of fermentation, NaCl addition or use of antilisterial active bacteriocins of lactic acid bacteria may however, be unreliable. Recently, a new possibility to use natural antagonists of pathogenic bacteria, as are specific bacteriophages, has been published. Bacteriophages effective against *Listeria monocytogenes* and commercial phage preparations are characterized in the present paper. Furthermore, a sample of successful application of specific bacteriophage A511 for reduction of growth of *Listeria monocytogenes* on the surface of white mould and smear cheese during 3 weeks ripening period is described.

Key words: listeria, bacteriophages, white mould cheese, smear cheese

Riziko výskytu *Listeria monocytogenes* v sýrařství

Sýry jsou v celosvětovém měřítku považovány za relativně bezpečné potraviny. Přesto existuje nízký počet případů zdravotních problémů spojených s výskytem patogenních bakterií v sýrech. Pokud se v souvislosti s konzumací sýrů tyto problémy vyskytnou, jedná se především o měkké sýry, často s plísní nebo s mazem na povrchu, u nichž pH během zrání roste z původních hodnot kolem 5,5 až na hodnoty převyšující pH 7. Mezi nejvíce sledované patogenní bakterie v sýrařství patří vedle *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* a shigatoxigenní *Escherichia coli* především *Listeria monocytogenes* (Mc Sweeney, 2007).

Nebezpečí kontaminace potravin *Listeria monocytogenes* spočívá ve vysoké mortalitě osob postižených listeriózou, pohybující se mezi 20 - 30 %. Přibližná infekční dávka *Listeria monocytogenes* se liší pro zdravé osoby a pro rizikové skupiny osob (děti, staří lidé, těhotné ženy, osoby se sníženou imunitou), v poslední době se udává hodnota 10^3 (Schmid-Hempel, Frank (2007)). Dle legislativy EU nesmí počet *Listeria monocytogenes* v 1 g potravin nepodporující její růst přesáhnout 100 KTJ po celou dobu trvanlivosti výrobku. V případě potravin určených k přímé spotřebě, které podporují růst *Listeria monocytogenes*

(např. měkké sýry zrající pod mazem), nesmí být tato detekovatelná ve 25 g vzorku potravin před tím, než potravina opustí bezprostřední kontrolu výrobce, a dále v produktu uvedený na trh během doby udržitelnosti nesmí rovněž přesáhnout limit 100 KTJ/g (Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ve znění pozdějších předpisů).

Bakteriofágy pro potlačení *Listeria monocytogenes*

Využití bakteriofágů představuje atraktivní způsob potlačování patogenních bakterií v potravinách bez ovlivnění důležitých parametrů (organoleptické vlastnosti, nutriční hodnota nebo probiotický charakter) a bez nutnosti používání chemické konzervační prostředky nebo bakteriociny bakterií mléčného kvašení, které mohou potlačovat technologicky potřebnou mikroflóru důležitou pro výrobu, zrání a zajištění charakteristických parametrů konkrétních sýrů.

Bakteriofágy jsou nejobvyklejší viry vyskytující se v přírodním prostředí. Obecně se rozlišují dva typy životních cyklů bakteriofágů - cyklus virulentní (lytický) a cyklus lysogenní. Fágy virulentní během virulentního cyklu napadají bakterie, vstupují do jejich cytoplasmy a využívají genetickou informaci hostitelské bakterie pro svou replikaci, což vede ke smrti bakteriální buňky a uvolnění množství zralých fágových částic schopných atakovat další bakteriální buňky do prostředí. Fágy mírné v rámci lysogenního cyklu vstupují do bakteriální buňky, integrují svou nukleovou kyselinu do bakteriálního chromozomu (vzniká tzv. profág) nebo zůstávají v bakteriální buňce ve formě plasmidu, ale nezpůsobují smrt hostitelské bakteriální buňky. Pro účely eliminace nežádoucích patogenních bakterií z potravin se používají fágy virulentní (Chibani-Chenoufi S. a kol., 2004).

Bakteriofágy se vyznačují extrémní specifitou pro své hostitele, jsou široce rozšířené v prostředí a tvoří součást přírodní mikrobiální flóry přítomné v potravinách. To je předurčuje pro dokonalou eliminaci patogenů bez jakéhokoli ovlivnění mikroflóry sýrů včetně kyselých kultur nebo ostatních mikroorganismů podílejících se na výrobě a zrání sýrů (Guenther a Loessner, 2011).

Účinnost bakteriofágů je závislá na několika vnitřních a vnějších faktorech prostředí, na typu potravin, v níž je požadovaná redukce počtu nebo úplná eliminace *L. monocytogenes*. Bylo prokázáno, že počet *L. monocytogenes* v tekutinách (mléko, solný roztok, v němž je uložena mozzarella) ošetřených bakteriofágovým preparátem může být snížen pod mez detekce. V pevných potravinách (sýry, drůbeží maso, uzeniny, zelí) lze počet *L. monocytogenes* snížit až o 5 řádů (Carlton a kol., 2005). Dále závisí účinnost bakteriofágových preparátů také na momentu aplikace preparátu a teplotě skladování potravin ošetřené preparátem. Lytická aktivita bakteriofágů je obvykle studována při optimální teplotě růstu *L. monocytogenes*. Pro reálné posouzení účinku je třeba prověřit účinnost i při konkrétní teplotě zrání sýra. Co se týče času aplikace, nejvhodnější je okamžik, kdy je možná kontaminace pro-

duktu *L. monocytogenes*. Jestliže je bakteriofág aplikován příliš pozdě, když již došlo k pomnožení *L. monocytogenes*, je jeho účinnost snížena (Mahony a kol., 2011).

Mezi konkrétní bakteriofágy účinné proti *L. monocytogenes* se řadí A511, P100 a A118, jejichž genomy jsou popsány v databázi NCBI (The National Centre for Biotechnology Information (Dorscht a kol., 2009)).

Na trhu jsou dva komerční přípravky na bázi bakteriofágů použitelné v mlékárenství. První přípravek s označením LMP 102 List Shield (výrobce Intralytics, Inc., USA) obsahuje směs 6 bakteriofágů s aktivitou proti *L. monocytogenes*. Druhý komerční přípravek Listex TM P100 (Microcos, BV, Holandsko) obsahuje virulentní bakteriofág P100. Oba preparáty mají GRAS status (generally recognised as safe) a kromě sýrařství nacházejí uplatnění v konzervaci potravin s krátkou dobou trvanlivosti (povrchy syrových ryb, drůbeže, ovoce a zeleniny). Oba typy bakteriofágových preparátů jsou široce využívány při výrobě potravin v USA. Jsou povoleny FDA (Food and Drug Administration) a USDA (U.S. Department of Agriculture) pro přímou aplikaci do potravin a k ošetření povrchů výrobního zařízení. V Kanadě je pro výrobu potravin se zvýšeným rizikem výskytu *L. monocytogenes* možno využít Listex P100. V Evropě je povoleno používat preparát Listex P100 jako potravinářské aditivum pouze v Dánsku a ve Švýcarsku. Ostatní evropské země nemají dosud oficiální legislativní rámec umožňující použití fágových preparátů při výrobě potravin (Pietracha D. a Misiewicz A., v tisku).

Příklad použití bakteriofágu pro potlačení růstu *Listeria monocytogenes* v průběhu zrání měkkých sekundárně zrajících sýrů s plísní a s mazem na povrchu

Švýcarští pracovníci z Institute of Food, Nutrition and Health, ETH Zurich s úspěchem v experimentu otestovali účinnost fágu A511 proti *L. monocytogenes* během tří týdnů zračního procesu u měkkých sýrů s plísní na povrchu a u měkkých sýrů s mazem a s omývaným povrchem (Guenther a Loessner, 2011). Vědci použili velký virulentní fág A511 z taxonomické skupiny Myoviridae (Zink a Loessner, 1992) se známým genomem. Tento fág má široké hostitelské spektrum v rámci rodu *Listeria* a je pro tento rod striktně specifický (Loessner a Busse, 1990). Na povrch průmyslově vyrobených sýrů s plísní na povrchu nadávkovali na počátku zrání kmen *L. monocytogenes* Scott A v koncentraci $1 \cdot 10^3$ KTJ/cm² povrchu sýra. Bakteriofág A511 nadávkovali ve třech režimech: i) v koncentraci $3 \cdot 10^8$ PTJ (plak tvořící jednotky)/cm² povrchu sýra 1 h po aplikaci listerie, ii) ve stejné koncentraci po 1 h a po 20 h po aplikaci listerie a iii) v koncentraci $1 \cdot 10^9$ PTJ/cm² povrchu sýra po 1 h po aplikaci listerie. Nejúčinnější byla varianta iii). Po třech týdnech zrání (10 dní při 12-13 °C, relativní vlhkost vzduchu 95% a následně 10 dní při 6 °C) došlo ke snížení počtu *L. monocytogenes* Scott A o 3,1 log KTJ/cm² oproti kontrole bez fágu (10^5 KTJ/cm² povrchu sýra). Důležitá byla rovněž počáteční koncentrace

listerie. Pokud byla nižší než 10^2 KTJ/cm², došlo pomocí bakteriofágového ošetření v průběhu zrání k jejímu potlačení pod limit detekce.

U sýrů s mazem na povrchu byla na povrch průmyslově vyrobených sýrů nadávkována buď *L. monocytogenes* Scott A nebo *L. monocytogenes* CNL 103/2005 vždy v koncentraci $1 \cdot 10^3$ KTJ/cm² povrchu sýra. Bakteriofág A511 byl nadávkován do suspenze mikroorganismů k omývání sýrů a s ní na povrch sýrů v režimech: i) v koncentraci $3 \cdot 10^8$ PTJ/cm² povrchu sýra 1 h po aplikaci listerie, ii) ve stejné koncentraci po 1 h a po 6 dnech aplikace listerie, iii) ve stejné koncentraci po 1 h, po 3 dnech a po 6 dnech po aplikaci listerie. Podobně jako u sýrů s plísní na povrchu po aplikaci fágů došlo během prvních 6 dnů zrání (režim zrání: 11 dní při 12-13 °C, relativní vlhkost vzduchu 95 %, 11 dní při 6 °C), k redukci listerie o 2 řády. Pak následovala fáze opětovného nárůstu listerií na počet 10^4 KTJ/cm² povrchu sýra. Bez ohledu na počet aplikací bakteriofágu při omývání sýrů během zrání byl výsledek po 22 dnech zrání podobný, ve srovnání s kontrolou asi o 2,5 řádu nižší.

Podstatné bylo rovněž zjištění, že bakteriofág neovlivnil růst Gram-pozitivních bakterií, kvasinek a plísní potřebných pro výrobu a zrání obou typů sýrů (Guenther a Loessner, 2011).

Závěr

Použití bakteriofágových preparátů v porovnání s jinými metodami eliminace *Listeria monocytogenes* z potravin a prostředí výroby potravin je relativně nové a dosud málo v celosvětovém měřítku využíváné. Efektivní může být aplikace na povrch sekundárně zrajících sýrů s plísní nebo s mazem, zvláště v případech nižší počáteční koncentrace *Listeria monocytogenes* (10^1 - 10^2 KTJ/cm² povrchu sýra), kde je možné dosáhnout redukce *L. monocytogenes* pod limit detekce ve srovnání s kontrolou bez použití bakteriofágů, kde za stejných podmínek zrání dochází ke zvýšení jejího počtu cca o 6 řádů.

Literatura

- CARLTON R.M., NOORDMAN W.H., BISWAS B., DE MEESTER E.D., LOESSNER M.J. (2005): Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 43, s. 301-312.
- CHIBANI-CHENNOUFI S., BRUTTIN A., DILLMANN M.L., BRUSSOW H. (2004): Phage-host interactions: an ecological perspective. *Journal of Bacteriology*, 186, s. 3677-86.
- DORSCHT J., KLUMPP J., BIELMAN R., SCHMELCHER M., BORN Y, ZIMMER M., CALENDAR R., LOESSNER M.J. (2009): Comparative genome analysis of *Listeria bacteriophages* reveals extensive mosaicism, programmed translational frameshifting and a novel prophage insertion site. *Journal of Bacteriology*, 191, s. 7206-7215.
- GUENTHER S., LOESSNER M. J. (2011): Bacteriophage biocontrol of *Listeria monocytogenes* on soft ripened white mould and red smear cheeses. *Bacteriophage*, 1, s. 94-100.
- LOESSNER M. J., BUSSE M. (1990): Bacteriophage typing of *Listeria* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, s. 1912-8.
- MAHONY J., MC AULIFFE O., ROSS R.P., VAN SINDEREN D. (2011): Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, s. 157-163.

MC SWEENEY P.L.H. (2007). Pathogens and food poisoning bacteria. V knize Cheese problems solved (Mc Sweeney P.L.H. ed.), s.133-139, Woodhead Publishing Limited, Cambridge England.

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny.

PIETRACHA D., MISIEWICZ A.: The use of products containing phage in the food industry as a new method for *Listeria monocytogenes* elimination from food. *Czech Journal of Food Sciences* v tisku.

SCHMID-HEMPEL P., FRANK S. A. (2007): Pathogenesis, virulence, and infective dose. *PLoS Pathog.*, 3(10): e147, s. 1372-1373.

ZINK R., LOESSNER M.J. (1992): Classification of virulent and temperate bacteriophages of *Listeria* spp. on the basis of morphology and protein analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, s. 296-302.

Přijato do tisku: 14. 7. 2015

Lektorováno: 2. 8. 2015

POROVNÁNÍ METOD POUŽÍVANÝCH PŘI STANOVENÍ ZASTOUPENÍ ZDRAVOTNĚ VÝZNAMNÝCH MASTNÝCH KYSELIN MLÉČNÉHO TUKU V BAZÉNOVÝCH VZORCÍCH MLÉKA DOJNIC

Oto Hanuš¹, Eva Samková², Jiří Špička²,
Lucie Hasoňová², Robert Kala², Zdeňka Klímová³,
Pavel Kopunec³, Jaroslav Kopecký¹

¹ Výzkumný ústav mlékárenský Praha

² Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Zemědělská fakulta

³ Českomoravská společnost chovatelů a.s., Hradištko

**Comparison of methods used
for the determination of the healthy important
fatty acids of milk fat in bulk milk samples
of dairy cows**

Abstrakt

Ve 13 chovech holštýnského skotu v Olomouckém kraji bylo odebráno 33 bazénových vzorků mléka za účelem porovnání dvou metod stanovení mastných kyselin (MK) - rutinní/nepřímá (pomocí infračervené spektroskopie - MIR-FT) a referenční/přímá (pomocí plynové chromatografie - GC). Těsnost vztahů mezi oběma metodami je silnější v případě skupiny nasycených (SFA) a nenasycených (UFA) MK ($r = 0,7094; 0,9389; p < 0,001$), zatímco u skupiny TFA (*trans* isomery nenasycených MK) a PUFA (polyenasycené MK) jsou korelační koeficienty nižší ($0,5897; 0,5931; p < 0,001$). 50,3 a 88,2 % variability v hodnotách SFA a UFA podle nepřímé rutinní metody MIR-FT je vysvětlitelných variacemi v analýzách přímé referenční

metody GC. Výsledky naznačují, že řadu informací MIR-FT o výskytu MK lze využít pro rutinní stanovení těchto skupin MK a případnou praktickou selekci mléčné suroviny pro specifickou potravinářskou výrobu.

Klíčová slova: stádo krav; bazénový vzorek mléka; plynová chromatografie; infračervená spektroskopie; věrohodnost analytických výsledků; korelace; kalibrace; validace

Abstract

33 bulk milk samples were taken in 13 Holstein dairy cow herds in the Olomouc region to compare two methods for the determination of fatty acids (FAs) - routine / indirect (by infrared (IR) spectroscopy - MIR-FT) and reference / direct (gas chromatography - GC). Tightness of relations between these two methods is stronger in the case of the group of saturated (SFA) and unsaturated (UFA) FAs ($r = 0.7094; 0.9389; p < 0.001$), while for the group of TFA (*trans* isomers of FAs) and PUFA (polyunsaturated FAs) are lower correlation coefficients ($0.5897; 0.5931; p < 0.001$). 50.3 and 88.2% of the variability in the routine values of SFA and UFA according to the indirect method MIR-FT is explainable by variations in the analyses of direct reference method GC. The results indicate that a row of MIR-FT information on the occurrence of FAs can be used for routine determination of such groups of FAs and possible practical selection of raw milk for the specific food production.

Keywords: cow herd; bulk milk sample; gas chromatography; infrared spectroscopy; analytical result reliability; correlation; calibration; validation

Úvod

Mléčný tuk je jednou z nejdůležitějších složek ovlivňujících technologické zpracování mléka. Složení mléčného tuku z hlediska mastných kyselin (MK) přitom zajímá nejen technology v mlékárnách, např. pro stabilitu mléčného tuku nebo pro možnost ovlivnění roztrátenosti másla, ale také odborníky pro humánní výživu. I když celkově vyšší množství (55 - 75 %) nasycených MK (SFA) zajišťuje lepší stabilitu mléčného tuku a následně mléčných výrobků (*Kaylegian a Lindsay, 1995*), z hlediska výživy je méně akceptovatelné (*Dostálová et al., 2009*). Příjem SFA z celkového energetického příjmu by měl být pod 10 % (20 g), polyenových MK (PUFA) 7 - 10 %. Příjem *trans*-nasycených MK (TFA) by měl být co nejnižší a neměl by překročit 1 % (cca 2,5 g/den).

V současnosti se profil MK mléčného tuku nesleduje, přestože jsou známy faktory příznivě působící na zvýšené zastoupení nenasycených MK (UFA) - *Kalač a Samková (2010)*. Důvodem je mimo jiné pravděpodobně také náročnost analytického stanovení ekonomicky i časově nevýhodnou plynovou chromatografií (GC). GC je příliš nákladná při poskytnutí prakticky zbytečně detailního výsledku v daném ohledu. Tento je vhodný zejména pro vědecko-výzkumné účely. Z literatury jsou však známy