

Interference do variability EPM od složek mléka by příliš nepomohly a tyto také nejsou nijak součástí hygienicko-kvalitativního hodnocení mléka, ale složení mléka, neboť jsou spíše výstupem výživy, popřípadě plemene.

Závěr

Výsledky pokusu ukázaly, že proteolýza, která je důležitým ukazatelem kvality pro údržnost mléka a mléčných výrobků, roste s mikrobiologickou kontaminací syrového kravského mléka a může být kontrolována metodou stanovení primárních aminoskupin. Hodnoty ekvivalentu proteolýzy mléka jsou významně vázány na hodnoty mikrobiologické kontaminace mléka. Složkové ukazatele mléka a počet somatických buněk vykázaly k ukazateli stavu proteolýzy v nativním mléce nevýznamné vztahy a vysvětlovaly málo této variability. To umožňuje vztahovat odvozený ukazatel proteolýzy a destrukce bílkovin EPM především k hygienické kvalitě mléka.

Poděkování

Príspevek vznikl za podpory projektu MZE NAZV KUS QJ1510339.

Literární reference

- ANTONELLI, M. L.- CURINI, R.- SCRICCIOLO, D.- VINCI, G. (2002): Determination of free fatty acids and lipase activity in milk: quality and storage markers. *Talanta*, 58, 561-568.
- BAUR, C.- KREWINKEL, M.- KRANZ, B.- VON NEUBECK, M.- WENNING, M.- SCHERER, S.- STOECKEL, M.- HINRICH, J.- STRESSLER, T.- FISCHER, L. (2015): Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 49, 23-29.
- BUTTON, P. D.- ROGINSKI, H.- DEETH, H. C.- CRAVEN, H. M. (2011): Improved shelf life estimation of UHT milk by prediction of proteolysis. *Journal of Food Quality*, 34, 229-235.
- CEMPÍRKOVÁ, R.- MIKULOVÁ, M. (2009): Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. *Czech Journal of Animal Science*, 54, 2, 65-73.
- ČSN 57 0530: Methods for testing of milk and milk products (In Czech). Czech Normalization Institute, 1973, Prague.
- ČSN 57 0536: Determination of milk composition by mid-infrared analyzer. (In Czech) Czech Normalization Institute, 1999, Prague.
- ČSN EN ISO/IEC 17025: Conformity assessment - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. (In Czech) Czech Normalization Institute, 2005, Prague.
- ČSN EN ISO 13366-1 (57 0531): Milk - Somatic cell count determination - Part 1: Microscopy method. Czech Normalization Institute, 1998, Prague.
- ČSN EN ISO 13366-2 (57 0531): Milk - Somatic cell count determination - Part 2: Manual for fluoro-opto-electronic instrument operation. Czech Normalization Institute, 2007, Prague.
- ČSN ISO 8552: Estimation of psychrotrophic microorganisms - Colony count technique at 21 °C (Rapid method). Prague, 2005.
- ČSN EN ISO 4833: Microbiology of food and animal feeding stuff's - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony count technique at 30 °C. Prague, 2003.
- ČURDA, L.- DRYÁKOVÁ, A.: Modification of spectrophotometrical method for the determination of primary amino-groups in milk proteins. National cheese competition, 22. 1. 2003, Prague, 2003, Czech Republic. Book of abstracts, 9. ISBN 80-86238-31-8.
- DATTA, N.- DEETH, H. C. (2003): Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 36, 173-182.
- GAUCHER, I.- MOLLÉ, D.- GARNAIRE, V.- GAUCHERON, F. (2008): Effects of storage temperature on physico-chemical characteristics of semi-skimmed UHT milk. *Food Hydrocolloids*, 22, 130-143.

- HANUŠ, O.- VEGRIČHT, J.- FRELICH, J.- MACEK, A.- BJELKA, M.- LOUDA, F.- JANŮ, L. (2008): Analyse of raw cow milk quality according to free fatty acids contents in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*, 53, 1, 17-30.
- CHEN, L.- DANIEL, R. M.- COOLBEAR, T. (2003): Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, 13, 255-275.
- CHRAMOSTOVÁ, J.- RUBINA, N.- ŠEDIVCOVÁ, V.- DRAGON, M.- NĚMEČKOVÁ, I.- ROUBAL, P. (2014): Influence of low temperature on the growth and proteolysis of microorganisms isolated from raw milk. *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 146, 10-13.
- LE ROUX, Y.- COLIN, O.- LAURENT, F. (1995): Proteolysis in samples of quarter milk with varying somatic cell counts. 1. Comparison of some indicators of endogenous proteolysis in milk. *Journal of Dairy Science*, 78, 1289-1297.
- MIKULOVÁ, M.: Content of free fatty acids lipolytic bacteria and somatic cells in relation to milking technology (2011). *Journal of Agrobiolgy*, 28, 1, 49-54.
- O BRIAN, B.- O CALLAGHAN, E.- DILLON, P. (1998): Effect of milking machine systems and components on free fatty acid levels in milk. *Journal of Dairy Research*, 65, 335-339.
- PROKOPOVÁ, B. (2008): Optimalizace přípravy hydrolyzátů syrovátkových bílkovin a jejich aplikace. Diplomová práce VŠCHT Praha.
- THOMSON, N. A.- WOOLFORD, W. M.- COPEMAN, A. P. J. (2005): Milk harvesting and cow factors influencing seasonal variation in the levels of free fatty acids in milk from Waikato dairy herds. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 48, 11-21.
- TOUŠOVÁ, R.- STÁDNÍK, L.- DUCHÁČEK, J. (2013): Effects of season and time of milking on spontaneous and induced lipolysis in bovine milk fat. *Czech Journal of Food Sciences*, 31, 1, 20-26.
- VYLETĚLOVÁ, M.- FICNAR, J.- HANUŠ, O. (2000 a): Vliv lipolytických enzymů *Pseudomonas fluorescens* na uvolňování mastných kyselin z mléčného tuku. *Czech Journal of Food Sciences*, 18, 5, 175-182.
- VYLETĚLOVÁ, M.- HANUŠ, O.- URBANOVÁ, E.- KOPUNECZ, P. (2000 b): Výskyt a identifikace psychrotrofních bakterií s proteolytickou a lipolytickou aktivitou v bazénových vzorcích mléka v podmínkách technologií prvovýrobního uskladnění. *Czech Journal of Animal Science*, 45, 373-383.
- WIKING, L.- NIELSEN, J. H.- BAVIUS, A. K.- EDVARDSSON, A.- SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. (2006): Impact of milking frequencies on the level of free fatty acids in milk, fat globule size, and fatty acid composition. *Journal of Dairy Science*, 89, 1004-1009.

Přijato do tisku: 14. 10. 2016

Lektorováno: 21. 11. 2016

VLIV PŘÍKRMU ŘASY JAPANOCHYTRIUM SP. NA PROFIL MASTNÝCH KYSELIN V OVČÍM MLÉCE A JOGURTU

Markéta Borková¹, Klára Michnová², Ivana Hyršlová¹,
Milena Fantová², Miloslav Šulc²

¹ Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

² Česká zemědělská univerzita v Praze

The influence of *Japanochytrium* sp. algae supplementation on fatty acid profile of sheep milk and yogurt

Abstrakt

Výživa ovčí patří mezi významné faktory, které mohou ovlivnit zastoupení mastných kyselin v mléce a jeho produktech. Účelem této práce bylo stanovit vliv přídavku

mořské mikrořasy *Jananochytrium* sp. do krmné dávky ovcí na profil mastných kyselin v mléce a jogurtu. Stádo dvaceti čtyř Východofřízských ovcí bylo na začátku jejich druhé laktace rozděleno do pokusné a kontrolní skupiny po dvanácti kusech. Pokusná skupina byla denně přikrmována 5 g granulované mikrořasy *Jananochytrium* sp. s vysokým obsahem kyseliny dokosaheptaenové. Sledováno bylo zastoupení mastných kyselin v ovčím mléce a jogurtu na začátku pokusu a po sedmi týdnech příkrmu. Příkrm řasy způsobil v ovčím mléce statisticky významné zvýšení obsahu kyseliny eikosatrienové, dokosaheptaenové a myristové a snížil obsah kyseliny stearové a olejové. Pro ovčí jogurt bylo v důsledku příkrmu zjištěno zvýšení obsahu nasyčených mastných kyselin a snížení obsahu monoeno- vých mastných kyselin.

Klíčová slova: Ovčí mléko, mastné kyseliny, kyselina dokosaheptaenová, mořské mikrořasy, *Jananochytrium* sp.

Abstract

The feed composition is an important factor affecting fatty acid profile of sheep milk and its products. The purpose of this research was to investigate the effect of *Jananochytrium* sp. (a marine microalgae) addition into sheep feed on fatty acid profile of the milk and yoghurt. Twenty four East Friesian sheep were divided into the experimental and control groups at the beginning of their second lactation. The feed of the experimental group was enriched with 5 g/day of granulated *Jananochytrium* sp. being high in docosaheptaenoic acid. The fatty acid profile of both sheep milk and yoghurt was studied at the beginning of the experiment and after seven weeks of feeding the microalgae. The algae addition has led to a statistically significant increase in the contents of eicosatrienoic, docosaheptaenoic and myristic acids and to the decrease in the stearic and oleic acids in sheep milk. In the yoghurt, the levels of saturated fatty acids have increased whereas monounsaturated fatty acid content decreased.

Keywords: Sheep milk, fatty acids, docosaheptaenoic acid, marine microalgae, *Jananochytrium* sp.

Úvod

V posledních letech roste zájem o potraviny s pozitivním vlivem na lidské zdraví. Možnost navýšení obsahu zdravotně prospěšných omega-3 a omega-6 mastných kyselin (MK) v mléce je předmětem mnoha výzkumů. Mastné kyseliny vyskytující se v triacylglycerolech mléčného tuku mají původ ze dvou zdrojů. Prvním je syntéza *de novo* v sekrečních buňkách mléčné žlázy. Tato *de novo* syntéza v mléčné žláze je zdrojem všech MK od C4:0 do C12:0, téměř všech C14:0 (cca 95 %) a přibližně 50 % C16:0. Dalším zdrojem je jejich příjem z krve a to z cirkulujících plazmatických lipoproteinů, které pocházejí jednak z krmné dávky a dále z tukových zásob. Což se týká všech MK s 18 a více uhlíky (Shingfield a kol., 2013). Výživa zvířat s použitím krmných aditiv proto patří mezi hlavní

faktory, kterými je možné dosáhnout změn v obsahu nutričně významných omega-3 a omega-6 MK (Papadopoulos a kol., 2002).

Vhodným doplňkovým krmivem se zdají být řasy, které jsou zdrojem nutričně cenných lipidů s vysokým obsahem omega-3 a omega-6 MK (Otleš a Pire, 2001). Někteří zástupci řas z čeledi *Thraustochytriaceae* jsou významným zdrojem vzácné kyseliny dokosaheptaenové (all-cis-4,7,10,13,16,19-C22:6; DHA) (Jasuja a kol., 2010). Kyselina DHA je omega-3 MK, která je důležitá zejména pro optimální růst a vývoj mozku kojenců a pro udržení normální funkce mozku dospělých. Snížení obsahu DHA v mozku je spojováno s poklesem kognitivních funkcí v průběhu stárnutí a s nástupem sporadické Alzheimerovy choroby (Horrocks a Yeo, 1999). Tato role DHA v mechanismech Alzheimerovy choroby je předmětem aktivních výzkumů (Cederholm a kol., 2013).

Studovaná mořská mikrořasa *Jananochytrium* sp. patří podle taxonometrického pojetí do čeledi *Thraustochytriaceae* a lze předpokládat, že je významným zdrojem DHA. Účelem této práce bylo ověření, zda přídavek řasy do krmné dávky ovcí ovlivní profil MK a zvýší obsah DHA v ovčím mléce a jogurtu.

Materiál a Metody

Metodika pokusu

Na začátku pokusu bylo stádo 24 Východofřízských ovcí na druhé laktaci rozděleno na dvě skupiny po 12 kusech. Zvířata byla do pokusu vybrána podle věku (3 roky) a načasování porodu (25. až 31. 4. 2015). Pokusné skupině ovcí (skupina J) bylo k základní krmné dávce přidáváno denně při ranním dojení 5 g granulované řasy *Jananochytrium* sp.. Kontrolní skupina (skupina K) byla krmená bez přídavku. Základní krmná dávka zvířat byla složena z lučního sena ad libitum a čerstvého lučního porostu v množství 2 kg/kus/den. V dojrně byla dávkovaná jadrná směs v celkovém množství 100 g/kus/den a granulovaný preparát v množství 200 g/kus/den. Přídavek řasy *Jananochytrium* sp. pro pokusnou skupinu byl realizován od 2. 6. 2015. Složení krmiva a řasy je uvedeno v tabulce 1.

Odběr mléka a příprava ovčího jogurtu

Mléko od jednotlivých zvířat bylo odebíráno při ranním nádoji 1. 6. a 22. 7. 2015, kdy bylo také zaznamenáno nadojené množství mléka od každé ovce s přesností 0,01 l.

Tab. 1 Základní složení krmiva a řasy (v % sušiny)

| Ukazatel | Luční seno | Luční porost | Jadrná směs ¹ | Granule ² | Řasa ³ |
|----------------|------------|--------------|--------------------------|----------------------|-------------------|
| Dusíkaté látky | 8,69 | 16,5 | 10,1 | 13,0 | 9,75 |
| Dusík | 1,39 | 2,64 | 1,62 | 2,08 | 1,56 |
| Tuk | 1,09 | 1,93 | 3,35 | 0,72 | 0,56 |
| Vláknina | 37,1 | 22,7 | 4,83 | 5,51 | 1,46 |
| Popeloviny | 5,05 | 11,0 | 1,98 | 13,9 | 2,53 |

¹ kukuřice (50 %), ječmen (25 %), oves (25 %).

² kukuřice (50 %), ječmen (18 %), oves (17 %) a pšenice (15 %).

³ *Jananochytrium* sp.

Tab. 2 Základní složení směsného ovčího mléka ve skupině krmené řasou (J) a kontrolní skupině K (v g/100 g)

| | 1. 6. 2015 | | 20. 7. 2015 | |
|----------------|------------|------|-------------|------|
| | J | K | J | K |
| Bílkovina | 5,42 | 5,51 | 4,89 | 5,22 |
| Tuk | 5,10 | 5,16 | 5,14 | 5,68 |
| Laktóza | 4,91 | 5,06 | 4,90 | 4,84 |
| Celková sušina | 16,0 | 16,3 | 15,6 | 16,4 |

Individuální vzorky byly použity na analýzu profilu MK v mléčném tuku a také ihned v den odběru k přípravě směsných mlék pro výrobu jogurtů. Mléka byla namíchána za laboratorních podmínek podle nádoje jednotlivých zvířat v den odběru - směsné mléko ovčí krmených základní krmnou dávkou (K) a směsné mléko ovčí přikrmovaných řasou *Jananochytrium* sp. (J). Výsledky základního složení směsných mlék jsou uvedeny v tabulce 2. Pro zlepšení nutričních a sensorických vlastností ovčího jogurtu byl vyráběn jogurt s přidavkem probiotických bakterií a prebiotik. Ke směsným mlékům K a J bylo přidáno 5 % (w/w) prebiotika Orafit P95 na bázi čekankového inulinu (BENEO-Orafit, Belgie; sušina 95,3 %). Pasterace mléka probíhala při teplotě 74 °C po dobu 5 min a fermentace při 30 °C po dobu 16 až 18 hod. Při fermentaci byla využita jogurtová kultura CCDM 528 a probiotický kmen *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 a *L. acidophilus* CCDM 151.

Stanovení základních složek a MK

Postupy stanovení základních složek v krmivech a řase včetně analýzy MK jsou podrobně uvedeny v článku Kubelková a kol. (2013). Mléko bylo analyzováno na přístroji Dairy Spec FT (Bentley Instruments, Inc.). Mléčný tuk byl ze vzorků mléka extrahován podle ČSN EN ISO 1211 a MK v mléčném tuku byly stanoveny za podmínek a postupem uvedeným v článku Borková a kol. (2015a).

Statistická analýza

Pro vyhodnocení rozdílů v zastoupení MK při dvou odběrech ovčího mléka skupiny K a J byla použita ANOVA pro opakovaná měření (STATISTICA 12, StatSoft, Inc). Post-hoc Tukey HSD testem ($P < 0,05$) byly podrobně vyhodnoceny rozdíly ve sledovaných skupinách.

Výsledky a diskuse

Kvalita krmiva může významně ovlivnit složení ovčího mléka. Přehled základního složení krmiva a řasy v sušině je uveden v tabulce 1. Jedním z důležitých faktorů, který může způsobit změny v profilu MK mléka, je obsah a složení lipidové složky použitého aditiva. Z dostupných informací bylo zjištěno, že mořské řasy z čeledi *Thraustochytriaceae* jako např. *Schizochytrium* mohou obsahovat významné množství tuku v sušině a to až desítky procent (Gupta a kol., 2012). Řasa *Jananochytrium* sp. patří mezi málo prozkoumané zástupce této čeledi. V našem experimentu byl pro použitou řasu *Jananochytrium* sp. stanoven obsah tuku v sušině pouze 0,56 %

Tab. 3 Zastoupení významných MK v základní krmné dávce a v řase (v g/100 g celkových MK)

| Ukazatel | Luční seno | Luční porost | Jadrná směs ¹ | Granule ² | Řasa ³ |
|--|-----------------|-----------------|--------------------------|----------------------|-------------------|
| C14:0 | 1,42 | 0,47 | 0,15 | 1,00 | 1,89 |
| C16:0 | 22,8 | 14,8 | 11,6 | 19,6 | 22,9 |
| C18:0 | 5,84 | 1,99 | 1,80 | 4,31 | 1,47 |
| <i>cis</i> -9-C18:1 | 21,6 | 6,35 | 23,4 | 27,2 | 14,9 |
| all- <i>cis</i> -9,12-C18:2 | 17,9 | 15,4 | 58,3 | 36,2 | 1,68 |
| all- <i>cis</i> -6,9,12-C18:3 | 0,28 | 0,18 | 0,02 | 0,08 | 0,12 |
| all- <i>cis</i> -9,12,15-C18:3 | 22,0 | 56,1 | 2,18 | 3,84 | 0,09 |
| all- <i>cis</i> -8,11,14-C20:3 | 0,10 | ND ⁴ | 0,01 | 0,06 | 0,17 |
| all- <i>cis</i> -11,14,17-C20:3 | ND ⁴ | 0,13 | 0,004 | 0,02 | ND ⁴ |
| all- <i>cis</i> -5,8,11,14-C20:4 | ND ⁴ | 0,01 | 0,003 | 0,04 | 0,21 |
| all- <i>cis</i> -5,8,11,14,17-C20:5 | 0,55 | 0,34 | 0,12 | 0,22 | 0,58 |
| all- <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-C22:6 | 0,19 | 0,09 | 0,09 | 0,19 | 42,0 |

¹ kukuřice (50 %), ječmen (25 %) a oves (25 %).

² kukuřice (50 %), ječmen (18 %), oves (17 %) a pšenice (15 %).

³ *Jananochytrium* sp.

⁴ nedetekován.

(tabulka 1). Rozdíly v obsahu tuku mohly být způsobeny jednak původem jednotlivých řas (příslušnost k různým rodům) a dále také různými způsoby kultivace řas (Jakobsen a kol., 2008). Nejvíce tuku v krmné dávce (3,35 %) bylo obsaženo v jadrné směsi, která se skládala z kukuřice (50 %), ječmene (25 %) a ova (25 %).

Pro posouzení vlivu přidávaných řas na profil MK ovčího mléka a jeho produktů je důležité znát výsledky profilu MK v základní krmné dávce a v použitém aditivu. Zastoupení významných MK v řase *Jananochytrium* sp. a v krmivu je uvedeno v tabulce 3. Podle předpokladu z literatury (Jasuja a kol., 2010) byla řasa použitá v tomto experimentu významným zdrojem DHA (42 %). Tuto skutečnost bylo potřeba ověřit, protože autoři ve své předchozí práci (Borková a kol., 2015b) zjistili, že *Jananochytrium* sp. bylo pouze nevýznamným zdrojem DHA (0,8 %). Zjištěné poznatky odpovídají skutečnosti, že způsob kultivace řasy může mít významný vliv nejenom na obsah tuku, jak je zmíněno výše, ale také na obsah DHA.

Z výsledků analýzy individuálních mlék je patrné, že na začátku experimentu 1. 6. 2016 nebyly mezi sledovanými skupinami K a J zjištěny statisticky významné rozdíly v obsahu MK a jejich skupin (tabulky 4a, 4b). Tímto poznatkem bylo ověřeno, že zastoupení MK v mléce obou skupin nebylo ovlivněno případnými biologickými faktory (jako např. individualita zvířat nebo vliv genetického polymorfismu lipogenních enzymů). Na konci experimentu 20. 7. 2016, tedy po sedmi týdnech příkrmu řasou *Jananochytrium* sp., byly zjištěny statisticky významné rozdíly, jak v obsahu jednotlivých MK, tak jejich skupin. Příkrmem řasy došlo v porovnání se skupinou K v pokusné skupině J ke zvýšení obsahu kyseliny myristové (C14:0; o 11,0 %) a poklesu obsahu kyseliny stearové (C18:0; o 12,1 %) a kyseliny olejové (*cis*-9-C18:1; o 14,1 %). I přes významný pokles C18:0 byl v červenci zjištěn statisticky průkazný nárůst obsahu všech nasycených MK (SFA) o 4,3 %. Tento efekt je způsoben nejen nárůstem obsahu C14:0 v pokusné skupině J, ale také souhrnným příspěvkem navýšení obsahu

Tab. 4a Vliv příkrmu řasy na zastoupení významných nasycených a monoenoových MK v ovčím mléce (v g/100 g celkových MK)

| MK | Skupina ¹ | Odběr 1. 6. 2015 | Odběr 20. 7. 2015 | Skupina S | Čas T | S × T |
|----------------------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------|----------|-------|
| C4:0 | J | 2,58 ± 0,22 | 2,80 ± 0,33 | * | *** | NS |
| | K | 2,72 ± 0,17 ^a | 3,08 ± 0,32 ^b | | | |
| C6:0 | J | 2,45 ± 0,14 ^a | 2,16 ± 0,13 ^b | NS | *** | NS |
| | K | 2,51 ± 0,08 ^a | 2,01 ± 0,24 ^b | | | |
| C8:0 | J | 2,40 ± 0,24 ^a | 1,74 ± 0,17 ^b | NS | *** | NS |
| | K | 2,37 ± 0,14 ^a | 1,53 ± 0,27 ^b | | | |
| C10:0 | J | 7,73 ± 0,90 ^a | 5,41 ± 0,68 ^b | * | *** | NS |
| | K | 7,33 ± 0,62 ^a | 4,68 ± 1,00 ^b | | | |
| C12:0 | J | 4,37 ± 0,35 ^a | 2,96 ± 0,24 ^b | * | *** | NS |
| | K | 4,09 ± 0,40 ^a | 2,68 ± 0,53 ^b | | | |
| C14:0 | J | 10,7 ± 0,4 | 11,1 ± 0,5 ^A | ** | NS | * |
| | K | 10,6 ± 0,5 | 10,0 ± 1,1 ^B | | | |
| C16:0 | J | 22,7 ± 1,0 ^a | 29,4 ± 1,1 ^b | NS | *** | NS |
| | K | 22,9 ± 1,0 ^a | 27,9 ± 2,7 ^b | | | |
| C18:0 | J | 10,1 ± 0,8 | 8,45 ± 0,67 ^A | *** | NS | NS |
| | K | 10,9 ± 0,5 | 9,61 ± 1,08 ^B | | | |
| <i>trans</i> -C18:1 ² | J | 4,47 ± 0,62 ^a | 3,81 ± 0,36 ^b | NS | *** | NS |
| | K | 4,59 ± 0,41 ^a | 3,86 ± 0,72 ^b | | | |
| <i>cis</i> -9-C18:1 | J | 18,7 ± 0,8 | 17,0 ± 0,5 ^A | * | NS | ** |
| | K | 18,2 ± 0,8 | 19,4 ± 2,6 ^B | | | |

¹ J mléko ovcí krmených řasou *Japanochytrium* sp.; K mléko ovcí bez příkrmu řasy.

² *Trans*-C18:1 suma *trans* isomerů C18:1 (včetně např. kyseliny vakcenové *trans*-11-C18:1).

Průměr ± směrodatná odchylka (N = 12).

Hodnoty označené odlišnými horními indexy (a, b) jsou v daném řádku statisticky rozdílné (P < 0,05); hodnoty označené odlišnými horními indexy (A, B) jsou pro skupiny J a K v daném měsíci statisticky rozdílné (P < 0,05).

* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; NS statisticky nevýznamné (P > 0,05).

Tab. 4b Vliv příkrmu řasy na zastoupení polyenoových MK a skupin MK v ovčím mléce (v g/100 g celkových MK)

| MK | Skupina ¹ | Odběr 1. 6. 2015 | Odběr 20. 7. 2015 | Skupina S | Čas T | S × T |
|--|----------------------|--------------------------|---------------------------|--------------|----------|-------|
| all- <i>cis</i> -9,12-C18:2 | J | 2,42 ± 0,15 | 2,61 ± 0,13 | NS | ** | NS |
| | K | 2,28 ± 0,17 ^a | 2,54 ± 0,29 ^b | | | |
| all- <i>cis</i> -6,9,12-C18:3 | J | 0,08 ± 0,01 ^a | 0,07 ± 0,01 ^a | NS | *** | NS |
| | K | 0,07 ± 0,01 | 0,07 ± 0,01 | | | |
| all- <i>cis</i> -9,12,15-C18:3 | J | 1,32 ± 0,14 ^a | 1,73 ± 0,20 ^b | * | *** | NS |
| | K | 1,37 ± 0,15 ^a | 1,91 ± 0,20 ^b | | | |
| CLA ² | J | 1,56 ± 0,25 ^a | 1,28 ± 0,13 ^b | NS | * | NS |
| | K | 1,53 ± 0,15 | 1,50 ± 0,32 | | | |
| all- <i>cis</i> -8,11,14-C20:3 | J | 0,02 ± 0,00 ^a | 0,06 ± 0,01 ^{BA} | *** | *** | *** |
| | K | 0,02 ± 0,00 | 0,03 ± 0,01 ^B | | | |
| all- <i>cis</i> -11,14,17-C20:3 | J | 0,09 ± 0,01 ^a | 0,15 ± 0,02 ^{BA} | * | *** | *** |
| | K | 0,09 ± 0,01 ^a | 0,12 ± 0,02 ^{BB} | | | |
| all- <i>cis</i> -5,8,11,14-C20:4 | J | 0,11 ± 0,01 ^a | 0,15 ± 0,01 ^b | NS | *** | NS |
| | K | 0,11 ± 0,01 ^a | 0,15 ± 0,02 ^b | | | |
| all- <i>cis</i> -5,8,11,14,17-C20:5 | J | 0,13 ± 0,02 ^a | 0,11 ± 0,01 ^b | NS | * | * |
| | K | 0,12 ± 0,01 | 0,13 ± 0,03 | | | |
| all- <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-C22:6 | J | 0,04 ± 0,00 ^a | 0,10 ± 0,01 ^{BA} | ** | *** | *** |
| | K | 0,04 ± 0,01 ^a | 0,07 ± 0,02 ^{BB} | | | |
| SFA ³ | J | 66,2 ± 1,7 | 67,7 ± 1,3 ^A | * | NS | * |
| | K | 66,7 ± 1,1 | 64,9 ± 3,2 ^B | | | |
| MUFA ⁴ | J | 26,4 ± 1,3 | 24,5 ± 0,9 ^A | * | NS | * |
| | K | 26,1 ± 0,8 | 26,9 ± 2,6 ^B | | | |
| PUFA ⁵ | J | 7,36 ± 0,54 | 7,82 ± 0,51 | NS | ** | NS |
| | K | 7,25 ± 0,36 ^a | 8,13 ± 0,71 ^b | | | |

¹ J mléko ovcí krmených řasou *Japanochytrium* sp.; K mléko ovcí bez příkrmu řasy; ² konjugovaná kyselina linolová;

³ nasycené mastné kyseliny; ⁴ mononenasycené mastné kyseliny; ⁵ polynenasycené mastné kyseliny

Další informace jsou uvedeny pod tabulkou 4a.

dalších MK s krátkým řetězcem (jako např. C10:0 a C8:0). Statisticky významný pokles *cis*-9-C18:1 se projevil ve snížení obsahu celkových mononenasycených MK (MUFA) v ovčím mléce pokusné skupiny J.

Pro polyenoové MK byl zjištěn nárůst obsahu kyseliny all-*cis*-8,11,14-C20:3, all-*cis*-11,14,17-C20:3 a DHA. Zjištěné navýšení DHA a isomerů eikosatrienové kyseliny (C20:3) je v souladu s jejich vyšším obsahem v řase *Japanochytrium* sp. Je ovšem nutno uvést, že celkové zastoupení těchto MK v ovčím mléce je i na konci experimentu velmi nízké a příkrmem s řasou nedošlo k nutričně významnému navýšení obsahu DHA. Podobný krmený pokus uskutečnil ve své práci Papadopoulos (2002). Přídavek řasy *Schyzochytrium* sp. do krmné dávky ovcí (plemeno Karagouniko) způsobil obdobný trend jako v našem experimentu, a to pokles obsahu C18:0 a *cis*-9-C18:1 a nárůstu obsahu C14:0 a DHA. Navýšení obsahu DHA i zde nebylo nutričně významné a maximální dosažená hodnota byla 0,12 %. V této práci byly zjištěny změny v profilu i dalších MK, což je pravděpodobně způsobeno větší dávkou podávané řasy a jejím složením s vyšším podílem tuku (38,5 % v sušině).

V našem experimentu příkrm s vysokým podílem DHA způsobil pravděpodobně inhibiční efekt na biohydrogenaci nenasycených MK v bachoru, a tím pokles obsahu C18:0 a *cis*-9-C18:1. Krmná dávka přežvýkavců je tvořena zejména tuky bohatými na polyne-nasycené MK (PUFA) s počtem uhlíků C18 (jako kyselina linolová a α-linolenová), které jsou v bachoru značně metabolizovány a biohydrogenovány (Chilliarda kol., 2007). Výsledkem je tvorba nejenom C18:0, ale také velkého množství různých izomerů PUFA a MUFA, zejména *trans*- a konjugovaných MK (jako např. *trans*-11-C18:1, *cis*-9 *trans*-11-CLA a *trans*-10 *cis*-12-CLA). Tyto meziproducty bachorové biohydrogenace se do značné míry liší podle složení MK krmiva. Nejvíce jsou známy hlavní meziproducty bachorové biohydrogenace kyseliny linolové, a to *cis*-9, *trans*-11-CLA

Tab. 5 Základní složení krmiva a řasy (v % sušiny)

| jogurt ¹ | SUFA ² | | MUFA ³ | | PUFA ⁴ | | omega-6 | | omega-3 | |
|---------------------|-------------------|-------|-------------------|-------|-------------------|-------|---------|-------|---------|-------|
| | 1.6. | 20.7. | 1.6. | 20.7. | 1.6. | 20.7. | 1.6. | 20.7. | 1.6. | 20.7. |
| J | 66,3 | 67,7 | 26,3 | 24,4 | 7,45 | 7,91 | 2,81 | 3,02 | 1,60 | 2,12 |
| K | 66,7 | 65,0 | 26,0 | 26,8 | 7,31 | 8,20 | 2,62 | 2,90 | 1,68 | 2,26 |

¹ J jogurt z mléka ovcí krmených řasou *Japanochytrium* sp.; K jogurt z mléka ovcí bez příkrmu řasy; ² nasycené mastné kyseliny; ³ mononenasycené mastné kyseliny; ⁴ polynenasycené mastné kyseliny

a *trans*-11-C18:1 a dále kyseliny α -linolenové, a to *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15-CLA, *trans*-11, *cis*-15-CLA a *trans*-11-C18:1 (Chilliard a kol., 2007). Bylo zjištěno, že některé meziproducty biohydrogenace působí jako regulátory nebo inhibitory lipogeneze, čímž mohou ovlivnit nejen množství tvořeného mléčného tuku, ale také složení MK (Chilliard kol., 2007; Manso a kol., 2016). Z výše popsaných důvodů se domníváme, že pokles obsahu C18:0 je přímým důsledkem inhibice biohydrogenace MK v bacheru. Nízká dostupnost C18:0 pro endogenní syntézu *cis*-9-C18:1 je pravděpodobnou příčinou snížení obsahu *cis*-9-C18:1. Podobný účinek na zastoupení MK kozího mléka vlivem příkrmu rybího oleje popisuje ve své práci Toral (2014). Kromě již zmíněných změn v profilu MK byl v našem experimentu zjištěn také pokles obsahu tuku v pokusné skupině v porovnání se skupinou kontrolní (pro J 5,14 %; pro K 5,68 %; tabulka 2).

Inhibice biohydrogenace PUFA v bacheru na C18:0 je většinou provázena zvýšením obsahu *trans*-C18:1 a/nebo konjugovaných MK, což v našem případě nebylo zjištěno. I přes množství studií popisujících, že DHA je v bacheru značně metabolizována, nejsou zatím dobře známy meziproducty bacherové biohydrogenace DHA (Manso a kol., 2016). Ve studiích z poslední doby je věnována velká pozornost vlivu příkrmu řas nebo rybích olejů, které mohou vést k efektu pod názvem „milk fat depression“, tedy produkci mléka s nízkým obsahem tuku (Toral kol., 2016). Tento efekt byl patrný i v našem případě (viz výše). Toral (2016) ve své práci uvádí nové potenciálně antilipogenní meziproducty biohydrogenace, jako např. 10-oxo-C18:0 a *trans*-10 *cis*-15-C18:2), kterým je potřeba věnovat pozornost, a které by mohly mít vliv jednak na množství tuku v mléce, tak na jeho složení. V našem experimentu nebylo sledováno zastoupení všech těchto MK a je potřeba se nadále touto problematikou zabývat.

Zastoupení SFA, MUFA, PUFA, omega-6 a omega-3 MKv ovčím jogurtu vyrobeném ze směsného mléka ovcí krmených řasou *Japanochytrium* sp. (J) a ovcí krmených bez příkrmu řasy (K) je shrnuto v tabulce 5. Příkrmem řasou *Japanochytrium* sp. došlo na konci experimentu k nárůstu obsahu o 4,2 % SFA a poklesu MUFA o 6,5 % (pro skupinu J a pro K) v ovčích jogurtech v porovnání s kontrolou. Tyto změny v obsahu SFA a MUFA odpovídají výše uvedeným výsledkům zjištěným v ovčím mléce ovcí krmených řasou *Japanochytrium* sp.

Závěr

Krmná dávka obohacená přídavkem mořské mikrořasy *Japanochytrium* sp. ovlivnila profil mastných kyselin

v ovčím mléce a jogurtu. Jako pozitivní lze v důsledku příkrmu řasy hodnotit statisticky významné zvýšení obsahu tří polynenasycených mastných kyselin, jednalo se o all-*cis*-8,11,14-C20:3, all-*cis*-11,14,17-C20:3 a DHA. Současně příkrmem bohatým na vysoký obsah DHA došlo k nárůstu obsahu C14:0 a ke snížení obsahu C18:0 a *cis*-9-C18:1. Zvýšení obsahu SFA a pokles MUFA v ovčím mléce a jogurtu nelze z nutričního hlediska považovat za pozitivní přínos toho experimentu. Zjištěné výsledky jsou důležité pro studium vlivu krmné dávky se zvýšeným obsahem DHA na profil mastných kyselin v ovčím mléce. Touto složitou problematikou je potřeba se dále zabývat.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory Ministerstva zemědělství České republiky v rámci projektu NAZV č. QJ1310107.

Literatura

- BORKOVÁ M., FANTOVÁ M., SYROVÁTKOVÁ K., MICHNOVÁ K., NOHEJLOVÁ L. ELICH O. (2015a): Změny profilu mastných kyselin v kozím mléce po přidávku řas do krmné dávky, *Mlékařské listy*, 150, s. IV-VIII.
- BORKOVÁ M., HYRŠLOVÁ I, MICHNOVÁ K., FANTOVÁ M., ŠULC M., ELICH O. (2015b): Zastoupení mastných kyselin v kozím mléce, jogurtu a čerstvém sýru koz příkrmovaných řasami, *Mlékařské listy*, 152, s. XXVI-XXX.
- CEDERHOLM T., SALEM N., PALMBLAD J. (2013): ω -3 fattyacids in the prevention of cognitive decline in humans, *Adv. Nutr.*, 4, s. 672-676.
- ČSN EN ISO 1211 (2011): Mléko - Stanovení obsahu tuku - Vážková metoda (Referenční metoda), Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha.
- GUPTA A., BARROW C.J., PURI M. (2012): Omega-3 biotechnology: Thraustochytrids as a novel source of omega-3 oils, *Biotechnol. Adv.*, 30, s. 1733-1745.
- HORROCKS L.A., YEO Y.K. (1999): Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA), *Pharmacol. Res.*, 40, s. 211-225.
- CHILLIARD Y., GLASSER F., FERLAY A., BERNARD L., ROUEL J., DOREAU M. (2007): Diet, rumen biohydrogenation and nutrition al quality of cow and goatmilk fat, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 109, s. 828-855.
- JAKOBSEN A.N., AASEN I.M., JOSEFSEN K.D., STRØM A.R. (2008): Accumulation of docosahexaenoic acid-rich lipid in thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. strain T66: effects of N and P starvation and O2 limitation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 80, s. 297-306.
- JASUJA N.D., JAIN S., JOSHI S.C. (2010): Microbial production of docosahexaenoic acid (Ω 3-PUFA) and their role in human health, *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 3, s. 83-87.
- KUBELKOVÁ P., JALČ D., HOMOLKA P., ČERMÁK B. (2013): Effect of dietary supplementation with treated amaranth seeds on fermentation parameters in anartificial rumen, *Czech J. Anim. Sci.*, 58, s. 159-166.
- MANSO T., GALLARDO B., GUERRA-RIVAS C. (2016): Modifying milk and meat fat quality through feed changes, *Small Rum. Res.*, 142, s. 31-37.
- OTLEŠ S., PIRE R. (2001): Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species, *J. AOAC Int.*, 84, s. 1708-1714.
- PAPADOPOULOS G., GOULAS CH., APOSTOLAKI E., ABRIL R. (2002): Effects of dietary supplements of algae, containing polyunsaturated-fattyacids, on milkyield and the composition of milk products in dairy ewes, *J. Dairy Res.*, 69, s. 357-365.

- SHINGFIELD K.J., BONNET M., SCOLLAN N.D. (2013): Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods, *Animal*, 7, s. 132-162.
- TORAL P.G., ROUEL J., BERNARD L., CHILLIARD Y. (2014): Interaction between fish oil and plant oils/starchy concentrates in the diet: Effects on dairy performance and milk fatty acid composition in goats, *Anim. Feed Sci. Tech.*, 198, s. 67-82.
- TORAL P.G., HERVÁS G., CARRENO D., FRUTOS P. (2016): Does supplemental 18:0 alleviate fish oil-induced milk fat depression in dairy ewes? *J. Dairy Sci.*, 99, s. 1133-1144.

Kontaktní informace: Ing. Markéta Borková, Ph.D.,
Ke Dvoru 12a, 160 00 Praha 6, email: borkovam@gmail.com

Přijato do tisku: 14. 11. 2016
Lektorováno: 30. 11. 2016

IDENTIFIKACE POTRAVINÁŘSKÝCH PRŮMYSLOVÝCH IZOLÁTŮ RODU *ACINETOBACTER* POMOCÍ METODY PCR S ORIGINÁLNĚ NAVRŽENÝMI, RODOVĚ-SPECIFICKÝMI PRIMERY

Eva Šviráková¹, Andrea Mühlhansová¹,
Sabina Purkrtová¹, Irena Němečková²,
Markéta Jelínková³, Jürgen Felsberg³

¹ Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

² Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o.

³ Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky, v. v. i.

Identification of food industrial isolates of the *Acinetobacter* genus using the PCR method with originally designed genus-specific primers

Abstrakt

Buňky rodu *Acinetobacter* tvoří gramnegativní, nesporující, nepohyblivé, enkapsulované kokobacilové tyčinky se striktně aerobním metabolismem. Nejčastěji se vyskytují ve vodě nebo v půdě, ovšem nalézány jsou také v potravinářských surovinách a výrobcích, včetně lidských zdrojů. V mlékárenském průmyslu mají statut technologicky rizikových bakterií způsobujících různé sensorické vady a texturní defekty výrobků typu mléko UHT, bryndza, sýry bílé zrající v solném nálevu a jiné. U imunokompromitovaných jedinců představují závažné zdravotní riziko často spojované s nozokomiálními infekcemi. *Acinetobacterie* mohou být identifikovány s vysokou spolehlivostí na úrovni rodu s využitím různých moderních molekulárně biologických metod. Tato práce byla věnována identifikaci *acinetobakterií*, izolovaných z mlékárenských surovin

a výrobků, včetně výrobního zařízení a pomůcek pomocí metody polymerázové řetězové reakce (PCR) s využitím nových, originálně navržených, rodově-specifických primerů AcinetoFor1 a AcinetoRev1. Získané výsledky mohou být užitečné při screeningovém zajišťování hygienické úrovně nejenom mlékárenských, ale i jiných potravinářských výrob s ohledem na eliminaci výskytu rizikových *acinetobakterií*.

Klíčová slova: *acinetobakterie*, rod *Acinetobacter*, technologické riziko, zdravotní riziko, mlékárenské suroviny a výrobky, výrobní zařízení a pomůcky, identifikace, metoda PCR, rodově-specifické primery.

Abstract

Bacteria of the *Acinetobacter* genus belong to the Gram-negative, non-spore-forming, non-motile, encapsulated coccobacilli rods with strictly aerobic metabolism. There are important soil and water bacteria with occurrence in raw food materials and food products, including human sources also. These bacteria represent a significant technological risk in the dairy industry where causing different sensory problems and texture defects in final products as are UHT milk, May bryndza cheese, brined cheeses and the others. They represent serious health risk bacteria causing in immunocompromised individuals mostly nosocomial infections. *Acinetobacteria* can be identified with high reliability at the genus level using different modern molecular-biological methods. This work was aimed at the identification of *acinetobacteria*, which were isolated from raw dairy materials and products including production facilities and aids, using the polymerase chain reaction (PCR) method with new originally designed genus-specific primers AcinetoFor1 and AcinetoRev1. Obtained results may have been useful for screening assurance hygienic level of not only dairy productions, but also others food productions, in connection with elimination of occurrence of risky *acinetobacteria*.

Key words: *acinetobacteria*, *Acinetobacter* genus, technological risk, health risk, raw dairy materials and products, production facilities and aids, identification, PCR method, genus-specific primers.

Úvod

Buňky rodu *Acinetobacter* tvoří gramnegativní, nesporující, nepohyblivé, nefermentující, enkapsulované kokobacilové, striktně aerobní tyčinky (Doughari a kol., 2011). Nejčastěji se vyskytují v přírodních zdrojích typu půda a voda (Krizova a kol., 2014), nalézány jsou také v potravinářských surovinách a výrobcích (Percival a kol., 2014), na výrobním zařízení (Hamouda a kol., 2011), včetně lidských zdrojů (Tamang a kol., 2014). V mlékárenském průmyslu mají statut technologicky rizikových bakterií způsobujících různé sensorické vady a texturní defekty koncových výrobků (Pangallo a kol., 2014). U imunokompromitovaných jedinců představují závažné zdravotní