



## VLIV CHLORIDU VÁPENATÉHO A CHLORIDU SODNÉHO NA SYŘITELNOST MLÉKA A NÁSLEDNOU VÝTĚŽNOST SÝŘENINY

Roman Pytel, Květoslava Šustová

Mendelova univerzita v Brně

### THE EFFECT OF CALCIUM CHLORIDE AND SODIUM CHLORIDE TO RENNET CLOTTING TIME AND FOLLOWING YIELD OF CURD

#### Abstrakt

Cílem práce bylo zjistit vliv přídavku  $\text{CaCl}_2$  a  $\text{NaCl}$  na čas koagulace mléka, resp. na jeho syřitelnost a následně na jakost sýřeniny. U mléka, které bylo tepelně ošetřeno, dochází k prodloužení času syřitelnosti mléka. Pro mléko, u kterého byla provedena pasterace, všeobecně platí, že se zvyšující se koncentrací  $\text{NaCl}$  a  $\text{CaCl}_2$  se snižuje čas koagulace mléka. Přídavek  $\text{NaCl}$  a  $\text{CaCl}_2$  způsobuje změny v jakosti vzniklé sýřeniny. Toho lze využít například k optimalizaci času srážení mléka nebo k ovlivnění výtěžnosti sýřeniny z mléka dle technologie vyráběného syru.

Nejdelší čas syřitelnosti mléka (142,8 s) byl u mléka pasterovaného (pasterace při 72 °C po dobu 20 s), nejkratší pak u mléka pasterovaného s přídavkem 40  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  (87,8 s). Pevnost vzniklé sýřeniny byla nejlepší u mléka syrového a mléka pasterovaného bez přídavku  $\text{NaCl}$  a  $\text{CaCl}_2$ . Nejhorší jakosti dosahovaly sýřeniny vzniklé z pasterovaného mléka s přídavkem  $\text{NaCl}$ . Výtěžnost byla nejvyšší u pasterovaného mléka (76,9 g/100 ml mléka), nejnižší pak byla u mléka syrového (63,33 g/100 ml mléka). Přídavek 20  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  k pasterovanému mléku dával výtěžnost 70,92 g, stejně jako přídavek 5 ml  $\text{NaCl}$  do 100 ml mléka.

**Klíčová slova:** jakost sýřeniny, pasterované mléko, syřidlo

#### Abstract

The aim of the experiment was determined the effect of the concentration of  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{NaCl}$  on the rennet clotting time, and the curd quality. For milk that has been heat-treated, is rennet clotting time prolonged. For pasteurized milk, it is generally believed that increasing the concentration of  $\text{NaCl}$  and  $\text{CaCl}_2$  reduces the rennet clotting time. The addition of  $\text{NaCl}$  and  $\text{CaCl}_2$  causes changes in the curd quality. This can be used, for example, for to optimalization the rennet clotting time or for the influence milk curd yield according the technology which will be used for cheese production.

The rennet clotting time (142.8 s) was longest for pasteurized milk (pasteurization for 72 °C 20 s), the shortest rennet clotting time for milk pasteurized with the addition of 40  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  (87.8 s). The curd quality was best for raw milk and pasteurized milk without addition of  $\text{NaCl}$  a  $\text{CaCl}_2$ . The worst curd quality was achieved from pasteurized milk with the addition of  $\text{NaCl}$ . The yield was highest for pasteurized milk (76.9 g / 100 ml of milk), the lowest for raw milk (63.33 g / 100 ml of milk). When we add 20  $\mu\text{l}$  of  $\text{CaCl}_2$  into the pasteurized milk we had the yield 70.92 g as well as the addition of 5 ml of  $\text{NaCl}$  into 100 ml of milk.

**Key words:** curd quality, pasteurized milk, rennet

Syřitelnost je vlastnost mléka, která vyjadřuje schopnost mléka reagovat s přidaným syřidlem a vytvářet gelovitou sraženinu. Syřitelnost mléka může být ovlivněna mnoha faktory, které ovlivňují jak primární, tak sekundární fázi při výrobě sýrů (Sojková et al., 2011).

Hlavním faktorem ovlivňující syřitelnost je složení mléka. Optimální složení mléka má vliv na koagulaci mléka a celkovou výtěžnost sýrů. Významný je zejména obsah dusíkatých látek (bílkovin), obsah laktózy, tuku a dále pak obsah solí mléka (Sojková et al., 2011). Složení mléka je ovlivněno složením krmné dávky. Krmná dávka by měla pokrýt celkovou energetickou potřebu dojnice a splňovat požadavky na potřebné živiny ve vyváženém stavu (Auldust et al., 2002). Zdravotní stav dojnice je dalším důležitým faktorem, který ovlivňuje složení mléka. Při zánětech mléčné žlázy dochází k mikrobiálním,

chemickým a fyzikálním změnám mléka. Zvyšuje se především obsah solí a bílkovin, jako odezva imunitního systému, ale zároveň se snižuje obsah tuku, a tím i sušiny. Dochází také ke změně poměru vápníku a fosforu, který vede až k neschopnosti mléka srazit se (Fox, 2000). Plemenná příslušnost dojníc významným způsobem ovlivňuje zastoupení jednotlivých složek mléka (Ikonen, 2000). Plemena šlechtěná k vysoké produkci mléka produkují mléko s nižším obsahem tuku a bílkovin, kdežto plemena s nižší produkcí mléka mají vyšší obsah tuku a bílkovin v mléce. V České republice se nejvíce chovají plemena Holštýnské a České strakaté (Skýpala et al., 2010). Dalšími z vnějších faktorů jsou sezónnost dojení a pořadí laktace.

Velký význam má i obsah vápníku, který ovlivňuje tvorbu a konzistenci gelu. Frakce kaseinu  $\alpha_s$  i  $\beta$  jsou citlivé na srážení  $\text{Ca}^{2+}$  v mléce, jelikož obsahují zbytky fosfoserinu, který se snadno váže na vápník. Frakce kaseinu ( $\alpha_s$ ,  $\beta$ ) jsou vůči vysrážení vápníkem chráněny na povrchu  $\kappa$ -kaseinem, který obsahuje jen málo fosfoserinových zbytků a tudíž nemá k vápníku tak vazebnou afinitu jako výše zmíněné frakce (Roginski et al., 2003).

Dalšími zásadními faktory, ovlivňující syřitelnost mléka, je teplota syření, dávka syřidla, doba syření, použité syřidlo a jiné (Roginski et al., 2003). Teplota syření je u většiny sýrů v rozmezí 30 - 35 °C. V teplotní hranici 21 - 40 °C je srážení tím rychlejší, čím vyšší je teplota mléka. Při teplotě syření nad 60 °C se mléko nesráží vůbec (Šustová a Sýkora, 2013).

Při výrobě sýrů se používají syřidlové enzymy - hlavně proteázy (ze skupiny hydroláz). Základním znakem proteáz je hydrolýza peptidické vazby bílkovinných substrátů (Gajdůšek a Klíčnický, 1993). Při teplotách nad 80 °C se proteázy inaktivují. Mezi významné proteázy v mlékárenském průmyslu řadíme pepsin a chymozin, získávané ze žaludků nebo mikrobiálně (Gajdůšek a Klíčnický, 1993). V mléce je veškerá aktivita proteáz vázaná na kasein. Vlivem enzymu nebo nízkého pH dochází k destabilizaci kaseinové micely a tvorbě koagulátu (Šustová a Sýkora, 2013).

Pro výrobu sýrů se v některých zemích používají i rostlinné proteolytické enzymy vyznačující se vyšší tepelnou stabilitou než proteolytické enzymy živočišné, což je způsobeno přítomností glykosidických řetězců v molekule enzymu (Beka et al., 2014). Rostlinné i živočišné druhy syřidel štěpí peptidový řetězec  $\kappa$ -kaseinu mezi aminokyselinami Phe<sub>105</sub> a Met<sub>106</sub>. Rostlinná syřidla se vyznačují větší specifičností k  $\alpha_{s1}$  a  $\beta$  kaseinu oproti chymozinu (Abellán et al., 2012). Mléko sražené rostlinnými syřidly se za nižší teploty srazí rychleji (Esteves et al., 2003).

Na aktivitu enzymů má vliv i ošetření mléka před vlastním zasýřením, které může mít pozitivní, ale i negativní vliv na syřitelnost mléka. Při použití membránové filtrace dochází ke zvyšování koncentrace jednotlivých složek mléka. V tomto případě se jedná o zvýšení obsahu bílkovin (kaseinu) v mléce. Úpravou obsahu bílkovin se zlepší účinnost syřidlových enzymů, a tím se získá i kvalitnější sýřenina (Tamime, 2006). Použitá teplota pasterace má pak vliv

na kaseinové micely a na rozpustnost/nerozpustnost vápníku. Při vysokých teplotách dochází k denaturaci  $\beta$ -laktoglobulinu, který se váže na kaseinové micely (Šustová a Sýkora, 2013). Při šetrné pasteraci (tj. 72 °C) dochází k přeměně rozpustné formy vápníku na formu nerozpustnou, což negativně ovlivňuje čas koagulace. Pokud se tedy mléko pasteruje, musí se vápník dodávat do mléka ve formě  $\text{CaCl}_2$  (Tamime, 2006). Čím je obsah rozpustných vápenatých solí vyšší, tím rychleji se mléko srazí a tím pevnější a tužší je sraženina, která dobře uvolňuje syrovátku (Šustová a Sýkora, 2013). Přidaný roztok chloridu vápenatého při výrobě sýrů z pasterovaného mléka napomáhá lepšímu srážení mléka, zlepšuje pevnost, konzistenci a především výtěžnost sýřeniny. Přídavek  $\text{CaCl}_2$  by měl být volen i podle typu použitého syřidla (Pytel et al., 2016).

Přídavek  $\text{NaCl}$  má vliv na čas koagulace mléka, u kterého byly nastaveny konstantní podmínky pro srážení mléka jako je pH, teplota, přídavek  $\text{CaCl}_2$  a koncentrace syřidla (Sbdio et al., 2006). Přídavek soli do mléka nebo kaseinového systému podporuje disociaci vápníku a fosfátu (Casiraghi a Luciano, 1991).

Cílem práce bylo vyhodnocení vlivu přídavku  $\text{CaCl}_2$  a  $\text{NaCl}$  na čas koagulace mléka, resp. na jeho syřitelnost a následně na jakost sýřeniny.

## MATERIÁL A METODIKA

Vzorky syrového kravského mléka byly zakoupeny v brněnském mléčném automatu, přepraveny do laboratoří Ústavu technologie potravin Mendelovy univerzity, kde bylo mléko zanalyzováno a byla stanovena syřitelnost tohoto mléka. Před analýzami bylo mléko vytemperováno na teplotu 42 °C, protřepáno a následně zchlazeno na teplotu 20 °C pro rovnoměrnou disperzi mléčného tuku.

Výsledky práce byly zpracovány na přístrojovém vybavení financovaném z projektu OP VaVpI CZ.1.05/4.1.00/04.0135 Výukové a výzkumné kapacity pro biotechnologické obory a rozšíření infrastruktury.

U mléka byl stanoven obsah celkové sušiny dle normy ISO 6731:2010 pro mléko, smetanu a zahuštěné neslazené mléko, kdy vzorky mléka jsou sušeny do konstantní hmotnosti při teplotě  $102 \pm 2$  °C. Obsah mléčného cukru (laktózy) byl stanoven polarimetricky ve filtrátu z mléka vyčeřením podle ČSN 57 0530. Obsahu mléčného tuku byl stanoven acidobutyrometricky dle normy ISO 2446:2008. Obsahu bílkovin byl stanoven metodou dle Kjeldahla podle normy EN ISO 8968-1:2002. Obsah vápníku se stanovoval podle normy ČSN 57 0530 pomocí komplexometrické titrace Chelatonem III za pomoci barevného indikátoru fluorexonu. Dále bylo stanoveno pH mléka a titrační kyselost mléka dle ČSN 57 0530.

Mléko bylo rozděleno do 2 skupin, a to na mléko syrové a na mléko, které bylo pasterováno šetrnou pasterací (72 °C po dobu 20 sekund). Následovalo chlazení mléka na teplotu 35 °C, což byla teplota syření mléka. Následně byly přidávány do mléka různá množství roztoků  $\text{NaCl}$  a  $\text{CaCl}_2$ .

Přídavek 36 % roztoku  $\text{CaCl}_2$  byl zvolen tak, aby se koncentrace vápenatých iontů postupně v daných vzorcích mléka zvyšovala (20, 30 a 40  $\mu\text{l}/100$  ml mléka). Roztok 1 M NaCl byl k vzorkům mléka přidán v množství 1, 3 a 5 ml/100 ml mléka.

### Příprava a přidavek syřidla

Pro zasýření mléka byl použit tekutý mikrobiální enzym "HANNILASE® L 2000" obsahující enzymy produkované plísní *Rhizomucor miehei*. Syřidlo bylo ředěno destilovanou vodou na 2 % roztok syřidla. Ředění syřidla bylo zvoleno tak, aby čas koagulace mléka byl v rozmezí 120 až 240 sekund, což je optimální doba pro zasýření mléka (Příbyla a Čejna, 2006).

Stanovení koagulace mléka bylo prováděno vizuální metodou v laboratoři Mendelovy univerzity v Brně na Ústavu technologie potravin.

Ke 100 ml mléka byl přidán roztok  $\text{CaCl}_2$  (20, 30 a 40  $\mu\text{l}$ ) nebo NaCl v množství 1, 3, 5 ml. Vzorky mléka byly vytemperovány na teplotu 35 °C, poté byl přidán 1 ml 2 % roztoku syřidla a byl měřen čas do objevení prvních vloček vysráženého kaseinu (čas syřitelnosti).

Zasýřené mléko bylo ponecháno v klidovém stavu v termostatu při teplotě 35 °C. Po uplynutí 60 minut byly vzorky vyhodnoceny podle Gajdůška (1997) a Kuchtíka et al. (2008), kde kvalita sýřeny odpovídá:

- I - Sýřenina je velmi dobrá, pevná, po vyklopení zachovává tvar.  
Syravátka je čirá, žlutozelené barvy.
- II - Sýřenina je dobrá, je poněkud méně pevná, méně dobře zachovává tvar.  
Vylučování syrovátky není dokonalé, je bělavé, nazelenalé barvy
- III - Sýřenina je špatná, je měkká, částečně nedrží pohromadě.  
Syravátka je mlékovitě bílá.
- IV - Sýřenina je velmi špatná, vůbec nedrží pohromadě.  
Syravátka je mlékovitě bílá.
- V - Nežřetelné nebo žádné vylučování kaseinu.

Po vyhodnocení jakosti sýřeniny byla sýřenina ponechána 60 sekund odkapávat, a poté byla sýřenina zvážena.

Stanovení syřitelnosti mléka, jakost sýřeniny a hmotnost sýřeniny bylo prováděno dvakrát ve čtyřech opakováních.

Výsledky byly statisticky zpracovány v programu MS Excel a STATISTICA verze 10 pomocí Tukeyova testu.

## VÝSLEDKY A DISKuze

Mléko použité k analýzám syřitelnosti mléka mělo následující složení: sušina 12,48 %, tuk 3,55 %, bílkoviny 3,10 %, laktóza 5,25 %, pH 6,68, SH 6,98, obsah vápníku 1,08 g/l.

Do mléka byly přidány různé koncentrace NaCl a  $\text{CaCl}_2$  a byly měřeny hodnoty syřitelnosti mléka syrového, pas-

**Tab. 1** Porovnání syřitelnosti mléka (v sekundách) s přidavky NaCl a  $\text{CaCl}_2$

Tepelné ošetření	Přídavek	Průměr	Minimum	Maximum	Směrodatná odchylka	Variační koeficient
Syrové	0	109,5 <sup>a</sup>	109,0	110,0	0,6	0,5
Pasterované	0	142,8 <sup>e</sup>	136,0	149,0	6,7	4,7
Pasterované	1 ml NaCl	125,8 <sup>d</sup>	125,0	126,0	0,5	0,4
Pasterované	3 ml NaCl	114,0 <sup>a</sup>	113,0	115,0	0,8	0,7
Pasterované	5 ml NaCl	108,3 <sup>a</sup>	107,0	110,0	1,5	1,4
Pasterované	20 $\mu\text{l}$ $\text{CaCl}_2$	109,3 <sup>a</sup>	109,0	110,0	0,5	0,5
Pasterované	30 $\mu\text{l}$ $\text{CaCl}_2$	98,8 <sup>c</sup>	98,0	99,0	0,5	0,5
Pasterované	40 $\mu\text{l}$ $\text{CaCl}_2$	87,8 <sup>b</sup>	86,0	89,0	1,3	1,4

<sup>a, b, c, d, e</sup> ... hodnoty s rozdílnými indexy ve sloupci Průměr se statisticky významně liší na hladině  $p < 0,05$

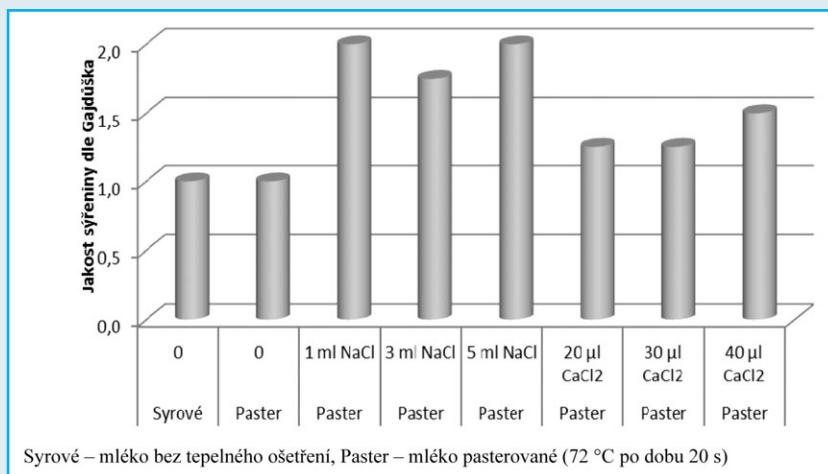
terovaného a mléka pasterovaného s přidavkem NaCl a  $\text{CaCl}_2$ . Naměřené výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 1.

U mléka, které bylo tepelně ošetřeno, dochází k prodloužení času syřitelnosti mléka. Nejdelší čas koagulace mléka byl u mléka pasterovaného (142 s). Pro mléko, u kterého byla provedena pasterace mléka všeobecně platí, že se zvyšující se koncentrací NaCl a  $\text{CaCl}_2$  se snižuje čas koagulace mléka. K největší změně času syřitelnosti dochází při přidání 40  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  do pasterovaného mléka, kdy dochází ke zkrácení času koagulace až o 56 s oproti pasterovanému mléku bez přidavku  $\text{CaCl}_2$ . Stejně tak dochází i ke snížení času koagulace mléka při přidavku 5 ml NaCl do pasterovaného mléka. Tato změna není ovšem tak výrazná - dojde ke zkrácení času koagulace o 35 s. Z výsledků měření vyplývá, že se zvyšujícím se množstvím  $\text{CaCl}_2$  dochází ke zkrácení času koagulace mléka, stejně jako uvádí Nájera et al. (2003). Nájera et al. (2003) ve své práci uvádí, že změna času koagulace je statisticky průkazná na hladině pravděpodobnosti  $p < 0,001$ . Stejně tak i Landfeld et al. (2002) uvádí, že při přidavku 7 obj. % roztoku  $\text{CaCl}_2$  dojde ke zkrácení času koagulace průměrně o 28 %. McMahon et al. (1984) uvádějí, že čas syřitelnosti se může prodlužovat při koncentracích  $\text{CaCl}_2$  nad 0,3 M. Sbodio et al. (2006) uvádí, že čas syřitelnosti je také ovlivněn syřidlem i finální koncentrací NaCl. Na základě výsledků našich pozorování platí, že pro dosažení stejného času koagulace mléka jako je čas koagulace syrového mléka, je nutné k pasterovanému mléku přidat buď 5 ml NaCl nebo 20  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$ . Na obrázku č. 1 je porovnání jakosti sýřeniny, které vznikly z mléka syrového a pasterovaného, do kterého byly přidány přidavky NaCl a  $\text{CaCl}_2$ .

Sýřeniny s nejvyšší pevností dle Gajdůška vznikly z mléka syrového a pasterovaného bez přidavku NaCl a  $\text{CaCl}_2$ , kde vzniklá sýřenina byla velmi dobrá, pevná, soudržná a syrovátka měla čirou, žlutozelenou barvu.

Sýřeniny vzniklé s přidavkem  $\text{CaCl}_2$ , byly ve všech případech méně pevné, než sýřeniny ze syrového mléka, ale zachovávaly si tvar. Naše výsledky odpovídají práci Nájera et al. (2003), kdy zjistili, že pevnost sýřeniny byla průkazně ovlivněna  $\text{Ca}^{2+}$  a hodnotou pH. Ovšem námi zjištěné výsledky paradoxně ukazují, že při nejvyšším přidavku  $\text{CaCl}_2$  byla sýřenina nejméně pevná. Syrovátka byla mírně bělavá, nazelenalá.





Obr. 1 Vliv tepelného ošetření mléka a přídavku NaCl a CaCl<sub>2</sub> na jakost sýřeny

Sýřeniny, které vznikly po přídavku NaCl, měly horší jakost - sýřenina byla dobrá, nicméně méně pevná a hůře držela tvar. Uvolňovaná syrovátka byla bělavá, nazelenalé barvy. Přídavek NaCl statisticky prokazatelně snižuje pevnost sýřeniny i konzistenci. Stejně výsledky uvádí i Awad (2007), který uvádí, že nejpevnější jsou sýřeniny vzniklé z mléka bez přídavku NaCl při pH 6,2 a sýřeniny vzniklé při pH 6,4 s přídavkem soli.

V tabulce č. 2 jsou uvedeny hmotnosti sýřenin, které byly připraveny s různými přídavky NaCl a CaCl<sub>2</sub>. Hmotnost sýřeniny (63,33 g) byla nejnižší u mléka syrového, kde vznikla velmi dobrá sýřenina, u které docházelo k dobrému odlučování syrovátky. Toho se využívá při výrobě technologicky náročných sýrů (s vysokou sušinou), kde potřebujeme dokonalé oddělení syrovátky. Z tohoto pohledu bývá pro výrobu sýrů nevhodnější syrové (nepasterované) mléko. Nejvyšší hmotnost (76,90 g) mají sýřeniny vzniklé z pasterovaného mléka (100 ml) bez přídavku soli. Při vyšší teplotě pasterace denaturují syrovátkové bílkoviny, které se navazují na kasein a zadržují tak syrovátku uvnitř sýřeniny. Pokud byl do mléka přidán NaCl nebo CaCl<sub>2</sub> způsobil pokles hmotnosti sýřenin o 2,03 g - 6,89 g. Sýřeniny se stejnou hmotností vznikají z mléka pasterovaného s přídavkem buď 5 ml NaCl nebo 20 µl CaCl<sub>2</sub>. Nižší přídavek NaCl než 5 ml způsobují jen mírný pokles hmotnosti. Stejně tak přídavek 40 µl CaCl<sub>2</sub> způsobuje vyšší hmotnost sýřeniny.

Tab. II Porovnání hmotnosti vzniklé sýřeniny (g) s přídavky NaCl a CaCl<sub>2</sub> ze 100 ml mléka

Tepelné ošetření	Přídavek	Průměr	Minimum	Maximum	Směrodatná odchylka	Variační koeficient
Syrové	0	63,33 <sup>b</sup>	58,38	68,78	5,52	8,71
Pasterované	0	76,90 <sup>b</sup>	69,81	82,75	5,75	7,48
Pasterované	1 ml NaCl	72,38 <sup>ab</sup>	68,13	76,73	4,36	6,02
Pasterované	3 ml NaCl	74,87 <sup>b</sup>	73,01	75,83	1,29	1,73
Pasterované	5 ml NaCl	70,92 <sup>bc</sup>	69,07	72,65	1,81	2,56
Pasterované	20 µl CaCl <sub>2</sub>	70,92 <sup>ab</sup>	66,02	74,09	3,85	5,43
Pasterované	30 µl CaCl <sub>2</sub>	70,01 <sup>ab</sup>	64,73	74,32	4,98	7,11
Pasterované	40 µl CaCl <sub>2</sub>	73,07 <sup>ab</sup>	68,64	76,82	4,32	5,91

a, b, c ... hodnoty s rozdílnými indexy ve sloupci Průměr se statisticky významně liší na hladině p < 0,05

## ZÁVĚR

U mléka, kde byla použita pasterace, došlo k prodloužení času koagulace o 33 sekund. Stejně tak bývá ovlivněna i jakost vzniklé sýřeniny a následná výtěžnost sýřeniny. Přídavkem NaCl a CaCl<sub>2</sub> se dají tyto vlastnosti sýřeniny ovlivnit. Přídavek 1 M roztoku NaCl v koncentracích od 1 do 5 ml/100 ml mléka způsobí malé změny těchto vlastností, přídavkem 36 % roztoku CaCl<sub>2</sub> se dosáhne větších změn. Toho lze využít například k optimalizaci času srážení mléka tak, aby syřitelnost mléka byla v rozmezí 120 sekund - 240 sekund, nebo k ovlivnění výtěžnosti sýřeniny z mléka dle technologie vyráběného sýru. Nejvíce pevná sýřenina byla zjištěna u mléka syrového. Pokud bychom chtěli dosáhnout stejné kvalitní sýřeniny, je zapotřebí přidat 20 - 30 µl CaCl<sub>2</sub>.

## POUŽITÁ LITERATURA

- ABELLÁN, A., CAYUELA, J. M., PINO, A., MARTÍNEZ-CACHÁ, A., SALAZAR, E., TEJADA, L. (2012): Free amino acid content of goat's milk cheese made with animal rennet and plant coagulant. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(8), 1657-1664.
- AULDIST, M., MULLINS, C., O' BRIEN, B., O' KENNEDY, B., GUINEE, T. (2002): Effect of cow breed on milk coagulation properties. *Milchwissenschaft*, 57(3), 140-143.
- AWAD, S. (2007): Effect of sodium chloride and pH on the rennet coagulation and gel firmness. *LWT - Food Science and Technology*, 40(2), 220 - 224.
- BEKA, R. G., KRIER, F., BOTQUIN, M., GUIAMA, V. D., DONN, P., LIBOUGA, D. G., GUILLOCHON, D. (2014): Characterisation of a milk-clotting extract from *Balanites aegyptiaca* fruit pulp. *International Dairy Journal*, 34(1), 25-31.
- CASIRAGHI, E., LUCISANO, M. (1991): Rennet coagulation of milk retentates. Effect of the addition of sodium chloride and citrate before ultra-filtration. *Milchwissenschaft*, 46, 775-778.
- ČSN 57 0530. (1974). Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků Praha: Vydavatelství Úřadu pro normalizaci a měření, 108 p.
- ČSN EN ISO 8968-1. (2001). Mléko - Stanovení obsahu dusíku. Praha: Technická komise, 15p.
- ESTEVES, C., LUCEY, J., WANG, T., PIRES, E. (2003): Effect of pH on the gelation properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin. *Journal of Dairy Science*, 86(8), 2558-2567.
- FOX, P. (2000): Fundamentals of cheese science. USA: Springer Science & Business Media.
- GAJDŮŠEK, S., KLÍČNÍK, V. (1993): *Mlékařství*. Brno: VŠZ. 2. vyd., 128 s. ISBN 80-7157-073-7.
- GAJDŮŠEK, S. (1997): *Mlékařství II (cvičení)*, 1. vyd., Brno: MZLU, 84 s. ISBN 80-7157-278-0.
- IKONEN, T. (2000). *Possibilities of genetic improvement of milk coagulation properties of dairy cows: Citeaser*. Academic dissertation. University of Helsinki, 34 p.
- ISO 2446:2008. Mléko - Stanovení obsahu tuku, Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 16 p.
- ISO 6731:2010. Mléko, smetana a zahuštěné neslazené mléko - Stanovení obsahu celkové sušiny, Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 12 p.
- LANDFELD, A., NOVOTNA, P., HOUSKA, M. (2002): Influence of the amount of rennet, calcium chloride addition, temperature, and high-pressure treatment on the course of milk coagulation. *Czech Journal of Food Sciences*, 20(6), 237-244.

- KUCHTÍK, J., ŠUSTOVÁ, K., URBAN, T., ZAPLETAL, D. (2008): Effect of the stage of lactation on milk composition, its properties and the quality of rennet curdling in East Friesian ewes. *Czech Journal of Animal Science*, 53(2), 55-63.
- MCMAHON, D. J., RICHARDSON, G. H., BROWN, R. J. (1984): Enzymic milk coagulation: Role of equations involving coagulation time and curd firmness in describing coagulation. *Journal of Dairy Science*, 67, 1185-1193.
- NÁJERA, A., DE RENOBLES, M., BARRON, L. (2003): Effects of pH, temperature, CaCl<sub>2</sub> and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. *Food Chemistry*, 80(3), 345-352.
- PŘIBYLA, L., ČEJNA, V. (2006): Porovnání vizuální a nefelo-turbidimetrické metody pro měření syřitelnosti mléka. In: *Den mléka*, Praha: ČZU, s. 110-111, ISBN 80-213-1498-2.
- PYTEL, R., ŠUSTOVÁ, K., KUMBÁR, V., NEDOMOVÁ, Š. (2016): A comparison of the determination of the rennet coagulation properties of bovine milk. *Potravinářstvo*, 10(1), 366-371.
- ROGINSKI, H., FUQUAY, J. W., FOX, P. F. (2003): *Encyclopedia of dairy sciences*. Volumes 1 - 4. London: Academic press. ISBN 978-0-12-374402-9.
- SBODIO, O., TERCERO, E., COUTAZ, R., REVELLI, G. (2006): Effect of rennet and sodium chloride concentration on milk coagulation properties efecto de la concentración de enzima y cloruro sódico sobre la coagulación de la leche. *CYTA-Journal of Food*, 5(3), 182-188.
- SKÝPALA, M., PŘIBYLA, L., FALTA, D., CHLÁDEK, G. (2010): Posouzení vlivu vybraných technologických parametrů na syřitelnost kravského mléka. In: *Celostátní přehlídka sýrů 2010*, Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 149-152, ISBN 978-80-7080-760-6.
- SOJKOVÁ, K., HANUŠ, O., GENČUROVÁ, V., VYLETĚLOVÁ, M., MANGA, I., KOPECKÝ, J., JEDELSKÁ, R. (2011): Nefelometricky a tradičně stanovená syřitelnost mléka. In: *Farmářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků VIII*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 33 - 35, ISBN 978-80-7375-509-6.
- ŠUSTOVÁ, K., SÝKORA, V. (2013): *Mlékárenské technologie*. Brno: Mendelova univerzita, 223 s., ISBN 978-80-7375-704-5.
- TAMIME, A. Y. (2006): *Brined cheeses*. Oxford: Blackwell Pub., 324 s. ISBN 978-1-4051-2460-7.

**Korespondující autor:** Ing. Roman Pytel  
Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta,  
Ústav technologie potravin, Zemědělská 1, 613 00 Brno,  
r.pytel@seznam.cz

Přijato do tisku 11. 6. 2017

Lektorováno 15. 7. 2017

## IZOLACE A IDENTIFIKACE BAKTERIOCIN PRODUKUJÍCÍCH ENTEROKOKŮ ZE SÝRŮ A KVASŮ

Jaroslava Marková<sup>1</sup>, Markéta Markvartová<sup>2,1</sup>

<sup>1</sup> Milcom a.s.

<sup>2</sup> Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

### Isolation and identification of bacteriocin-producing *Enterococci* from cheeses and sourdoughs

#### SOUHRN

Tato práce se zabývala problematikou izolace a identifikace enterokoků a detekcí genu pro tvorbu bakteriocinu z IIa třídy. Testované kmeny byly izolovány z jedenácti sýrů a dvou kvasů. Určeny byly pomocí sekvenování, které se opírá o amplifikaci oblasti genu pro 16S rDNA a na

úroveň druhu byly identifikovány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) s primery navrženými do variabilní oblasti genu pro superoxid dismutázu (*sodA*), případně MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií (MALDI-TOF MS). Nejčastěji zastoupenými enterokoky byly: *Enterococcus (E.) faecium*, *E. faecalis* a *E. durans*. Dále byl identifikován *E. gilvus*, který je možné označit jako nežádoucí mikroorganismus. Amplifikace genů pro tvorbu bakteriocinu byla potvrzena na základě sekvenování a porovnávání s databází BLAST na přítomnost genu pro tvorbu enterocinu A u všech izolátů *E. faecium*.

**Klíčová slova:** *Enterococcus*, identifikace, bakteriocin třídy IIa

#### SUMMARY

This work was dedicated to issues of isolation and identification enterococci and detection of class IIa bacteriocin-coding genes. Tested strains were isolated from eleven cheeses and two sourdoughs. They were determined by sequencing, based on an amplification of the 16S rDNA gene and identified at species level by means of the polymerase chain reaction (PCR) with species-specific primers based upon the superoxide dismutase gene (*sodA*), alternatively the MALDI-TOF Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). The most frequently represented species were *Enterococcus (E.) faecium*, *faecalis* a *durans*. Another identified strain was *E. gilvus*, which can be describe as an unwanted microorganism. PCR amplification of class IIa bacteriocin-coding genes, sequencing and BLAST search results confirmed that all strains *E. faecium* contained the enterocin A gene.

**Key words:** *Enterococcus*, identification, bacteriocin class IIa

#### ÚVOD

Enterokoky patří mezi gram pozitivní koky izolované z nejrůznějších materiálů. Jejich optimální teplota růstu se většinou pohybuje mezi 35-37 °C (Ludwig a kol., 2009). Některé enterokoky se vyznačují tvorbou bakteriocinů. Těto schopnosti se v potravinářském průmyslu využívá k omezení nebo zastavení růstu technologicky nežádoucích i patogenních mikroorganismů (Íspirili a kol., 2017). Enterokoky nejsou běžnou součástí matečných kultur. V posledních letech jsou stále častěji sledované vlastnosti nezákysových bakterií mléčného kvašení (NSLAB). Výzkumy ukazují, že některé tyto bakterie by se mohly stát součástí zákysových kultur. Při zrání některých druhů sýrů mohou hrát velmi specifickou roli při tvorbě sensorických vlastností (Íspirili a kol., 2017). Spolu s těmito vlastnostmi mohou mít enterokoky také předpoklady k tomu stát se probiotickými bakteriemi (Maia a kol., 2017).

Identifikace izolovaných kmenů vyžaduje polyfázový přístup stanovení kombinující fenotypové a genotypové metody. Tyto metody se často zakládají na polymerázové řetězové reakci (PCR) a sekvenování 16S rRNA oblasti.