

vyobrazeny na grafech (Obr. 1 - 3). Mezi modely s nejlepšími parametry predikce patří podle Tab. 2 parametry: PSB (Obr. 4), bílkoviny, laktóza. Regresní koeficienty impedančního spektra a spektra posunu fáze jsou vyobrazeny na grafech (Obr. 1 - 3).

Závěr

Na základě prezentovaných výsledků (Tab. 2) lze konstatovat, že metodu predikce parametrů mléčných vzorků pomocí PLS kalibrací s využitím impedančního spektra a spektra posunu fáze v popsáném frekvenčním rozsahu lze považovat za dostatečnou screeningovou metodu v porovnání s FTIR analýzou pro efektivně vybrané složky a vlastnosti mléka.

Poděkování

Práce vznikla za podpory projektů NAZV KUS QJ1510339 a MZE RO 1418.

Seznam literatury

- ABERG, P., BIRGERSSON, U., ELSNER, P., MOHR, P., OLLMAR, S. (2011): Electrical impedance spectroscopy and the diagnostic accuracy for malignant melanoma. *Experimental Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2011.01285.x>
- CAMO software. The Unscrambler X 10.3. 2013. www.camo.com.
- DAMEZ, J. L., CLERJON, S. (2013): Quantifying and predicting meat and meat products quality attributes using electromagnetic waves: An overview. *Meat Science*, 95, s. 879-896.
- DAMEZ, J. L., CLERJON, S., ABOUELKARAM, S., LEPETIT, J. (2007): Dielectric behavior of beef meat in the 1-1500 kHz range: Simulation with the Fricke/Cole-Cole model. *Meat Science*, 77, s. 512-519.
- DOMINIQUE, C., OSSARTB, F., GHOMMIDH, C. (2006): Development of a non-destructive salt and moisture measurement method in salmon (*Salmo salar*) fillets using impedance technology. *Food Control*, 17, s. 342-347.
- GURRÍA, A. (2014): Vláda České republiky. Angel Gurría v Praze prezentoval Hospodářský přehled OECD pro ČR 2014. 18.3.2014. <https://www.vlada.cz/cz/media-centrum/aktualne/angel-gurria-v-praze-prezentoval-hospodarsky-prehled-oecd-pro-cr-2014-116830/>
- CHEVALIER, D., OSSART, F., GHOMMIDH, CH. (2006): Development of a non-destructive salt and moisture measurement method in salmon (*Salmo salar*) fillets using impedance technology. *Food Control*, 17, s. 342-347.
- LEPETIT, J., SALE, P. (2002): Electrical impedance and tenderisation in bovine meat. *Meat Science*, 60, s. 51-62.
- MOHR, P., BIRGERSSON, U., BERKING, C., HENDERSON, C., TREFZER, U., KEMENY, L., SUNDERKÖTTER, C., DIRSCHKA, T., MOTLEY, R., FROHM-NILSSON, M., REINHOLD, U., LOQUAI, C., BRAUN, R., NYBERG, F., PAOLI, J. (2013): Electrical impedance spectroscopy as a potential adjunct diagnostic tool for cutaneous melanoma. *Skin Research and Technology*, 19, s. 75-83.
- NARAYANAMURTHY, V., PADMAPRIYA, P., NOORASAFRIN, A., POOJA, B., HEMA, K., AL'AINA YUHAINIS FIRUS KHAN, NITHYAKALYANIC, N., FAHMI SAMSURIB (2018): Skin cancer detection using non-invasive techniques. *RSC Advances*, 8, s. 28095-28130. DOI: 10.1039/c8ra04164d
- PÉREZ-ESTEVE, E., FUENTES, A., GRAU, R., FERNÁNDEZ-SEGOVIA, I., MASOT, R., ALCANIZ, M., BARAT, J. M. (2014): Use of impedance spectroscopy for predicting freshness of sea bream (*Sparus aurata*). *Food Control*, 35, 1, s. 360-365.
- SWANTEK, P. M., CRENSHAW, J. D., MARCHELLO, M. J., LUKASKI, H. C. (1992): Bioelectrical impedance: a nondestructive method to determine fat-free mass of live market swine and pork carcasses. *Journal of Animal Science*, 70, s. 169-177.
- TATARKOVIČ, M., BRONCOVÁ, G., KRONDÁK, M. (2012): Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Application in Chemical Analysis. *Chemická Listy*, 106, s. 1067-1074.

Korespondující autor: jan@bentleyczech.cz

O využití autorizovaného software (ASW) PMCIS existuje smlouva podepsaná poskytovatelem (Bentley Czech s.r.o., Praha) a uživatelem (Svaz výrobců mléka a.s. Šumperk).

Recenze tohoto příspěvku je zároveň dokladem odborného projednání cíle, metod vývoje, funkcí, výsledků, výhod a otázek praktické aplikace autorizovaného software PMCIS.

S ohledem na srovnání novosti postupu: PMCIS je novým typem vyhodnocovacího nástroje vyplývajícího z výsledků vlastního předchozího výzkumu a relevantních výsledků odborné literatury. S ohledem na registraci RIV se jedná o vytvoření nového algoritmu založeného na rozšíření aplikačních možností impedanční spektroskopie.

Odhad přínosů použití PMCIS byl proveden s následujícími výsledky:

- ušetřené náklady na lidskou práci v porovnání s referenčními metodami při zpracování 100 vz/den: 2000 Kč;
- ušetřené náklady na lidskou práci v porovnání s jinými nepřímými metodami při zpracování 100 vz/den: 250 Kč;
- ušetřené náklady při nákupu technologického zařízení srovnatelného výkonu stovek analýz za den cca 400 000 Kč na kus zařízení.

Povinné zveřejnění a dostupnost výsledků získaných jako produkt vývoje a inovací prostřednictvím veřejných prostředků na VaVal: www.bentleyczech.cz.

Vývoj tohoto ASW s označením PMCIS byl podporován projekty NAZV KUS QJ1510339 a RO 1418.

Přijato do tisku: 16. 11. 2018

Lektorováno: 30. 11. 2018

PAVLÁKOVA ZRACÍ ZKOUŠKA MODELOVĚ KONTAMINOVANÝCH TVAROHŮ

Irena Němečková, Šárka Havlíková, Jana Smolová,

Petr Roubal

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Pavlak's ripening test of model contaminated acid curd

Souhrn

Průmyslový tvaroh je základní surovinou pro výrobu kyselých sýrů zrajících pod mazem. Jeho základními jakostními znaky jsou sušina, titrační kyselost a senzoričké vlastnosti čerstvého tvarohu a tvarohu po Pavlákově zrací zkoušce. Tato zkouška probíhá při 25 °C po dobu 3 dnů a odráží fenotypové projevy přítomných mikroorganismů. Avšak souvislost výsledku této zkoušky s mikrobiologickými parametry tvarohu není přesně známa. Proto byl zjišťován vliv přídatku 41 kmenů různých druhů mikroorganismů na výsledek Pavlákovy zrací zkoušky pro 4 šarže

tvorohu. Získané výsledky naznačují, že spíše než zaměření se na nějakou konkrétní skupinu mikroorganismů bude pro zdárný průběh zrání tvarohu důležitější převaha kulturní kyselotvorné mikroflóry a vyvážené zastoupení různě biochemicky vybavených kontaminujících mikroorganismů fungujících v metabióze.

Klíčová slova: kyselý sýr, empirický zrací test, mikroorganismy způsobující kažení, kontrola surovin

Summary

Acid curd is a raw material for the production of smear-ripened acid curd cheeses. Its basic quality parameters are dry matter, titratable acidity and the sensory characteristics of fresh acid curd as well as acid curd after Pavlak's ripening test. This test is performed at 25 °C during 3 days and it reflects the phenotypical manifestations of present microorganisms. However, the relation of test result and the microbiological parameters of curd is not well understood. Therefore, we tested the influence of 41 strains of various microbial species added to 4 batches of acid curd on the result of Pavlak's ripening test. The obtained results suggest that rather than focus on some particular microbial group the predominance of cultural acidifying microflora and well-balanced ratio of various biochemically active contaminating microorganisms operating in metabiosis would be more important for the successful ripening process.

Keywords: acid curd cheese, empirical ripening test, spoilage microorganisms, raw materials control

Úvod

Základní surovinou nakupovanou tuzemskými mlékárnami je syrové mléko, avšak existují i výjimky; např. průmyslový tvaroh je základní surovinou pro výrobu kyselých sýrů zrajících pod mazem typu olomoucké tvarůžky. Zatímco precizaci a aktualizaci systému kontroly kvality syrového mléka je na tuzemské i mezinárodní úrovni věnována značná pozornost, systém kontroly kvality průmyslového tvarohu stojí mimo ohnisko hlavního zájmu. Z literárních pramenů je dostupná prakticky jen starší odborná literatura typu učebnic či metodických příruček. Aktuální znění pak vyplývá ze smluvně podchycených dodavatelsko-odběratelských vztahů a je tak ostatní mlékařské veřejnosti nedostupné.

Forman a Strmiska (1984) uvádějí tyto znaky průmyslového tvarohu: sušina 30-35 %, kyselost

Tab. 1 Mikrobiologické parametry (KTJ/g) použitých tvarohů

	Šarže 1	Šarže 2	Šarže 3	Šarže 4
Celkový počet alkaligenních MO	$1,3 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5$	$9,0 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4$
Celkový počet kyselinotvorných MO	$2,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$	$< 1 \times 10^3$	$3,6 \times 10^3$
Gram-negativní aerobní bakterie	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$
<i>Enterobacteriaceae</i>	$4,5 \times 10^3$	$< 1 \times 10^1$	$3,7 \times 10^2$	$< 1 \times 10^1$
Kvasinky	$5,0 \times 10^4$	$6,0 \times 10^2$	$2,3 \times 10^4$	$7,8 \times 10^2$
Plísně	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^3$	$< 1 \times 10^1$
Proteolytické MO	$3,8 \times 10^5$	$4,8 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$6,6 \times 10^4$

120-160 °SH, chuť čistě mléčně nakyslá a konzistence hrudkovitá. Kromě toho se při přejímce tvarohu provádí i zrací zkouška podle Pavláka, kterou se hodnotí vhodnost tvarohu pro výrobu tvarůžků. Princip této zkoušky spočívá v tom, že se 50 g sterilně odebraného tvarohu dá do Petriho misky o průměru 9 cm tak, aby třetina dna zůstala volná. Tvaroh se v misce inkubuje 3 dny při 25 °C, pak následuje sensorické posouzení.

Výhodou Pavlákovy zrací zkoušky je její jednoduché a na přístrojové vybavení nenáročné provedení a také to, že se v jednom kroku hodnotí souhrnný fenotypový projev všech přítomných mikroorganismů za podmínek metody. Výsledek tak odráží přítomnost či nepřítomnost i relativní zastoupení jednotlivých skupin, rodů a druhů mikroorganismů, včetně individuálních projevů více či méně růstově a metabolicky aktivních kmenů. Uplatní se rovněž vzájemné vztahy přítomných mikroorganismů - antagonismus, symbióza, metabióza, a další. V hodnocení takto komplexních projevů velmi jednoduchým způsobem spočívá i nevýhoda této metody, a sice neznalost vlivu jednotlivých rodů či druhů mikroorganismů na výsledek Pavlákovy zrací zkoušky. Cílem této práce proto je přispět k objasnění vlivu mikrobiologické kvality průmyslového tvarohu na výsledek Pavlákovy zrací zkoušky a na průběh zrání tvarohu.

Materiál a metody

Mikroorganismy

Do testovaného souboru bylo zařazeno 41 kmenů izolovaných ve VÚM, a to zejména z průmyslového tvarohu

Tab. 2 Výsledky Pavlákovy zrací zkoušky modelově kontaminovaných tvarohů šarže 1

Kmen	Výsledek identifikace	Počáteční denzita v tvarohu (KTJ/g)	Zrání	Aroma	Poznámka
L31	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	$4,8 \times 10^5$	1	3	Netypické, cizí
L32	<i>Enterobacter cloacae</i>	$9,2 \times 10^4$	1	3	Mírně nečisté
L33	<i>Escherichia coli</i>	$2,9 \times 10^4$	1	2	-
L34	<i>Enterobacter cloacae</i>	$1,1 \times 10^5$	1	3	Mírně nečisté
L35	<i>Serratia liquefaciens</i>	$5,9 \times 10^5$	2	4	Nečisté, fekální
L36	<i>Escherichia coli</i>	$2,7 \times 10^4$	1	3	Netypické
L37	<i>Escherichia coli</i>	$5,8 \times 10^4$	1	2	-
L38	<i>Serratia liquefaciens</i>	$6,2 \times 10^4$	1	3	Mírně nečisté
L39	<i>Enterobacter cloacae</i>	$1,3 \times 10^4$	1	3	Mírně nečisté
L40	<i>Enterobacter cloacae</i>	$5,0 \times 10^5$	1	3	Mírně nečisté
Kontrola	-	-	1	1	-

Zrání: 1 - zraje, 2 - zraje místy, 3 - nezraje, 4 - s vadou

Aroma: 1 - tvarůžkové, 2 - mírně tvarůžkové, 3 - mírně netypické, 4 - netypické

Tab. 3 Výsledky Pavlákovy zrací zkoušky modelově kontaminovaných tvarohů šarže 2

Kmen	Výsledek identifikace	Počáteční denzita v tvarohu (KTJ/g)	Zrání	Aroma	Poznámka
L7	<i>Enterobacter asburiae</i>	$1,0 \times 10^4$	1	2	-
L13	<i>Lactococcus lactis</i>	$8,2 \times 10^4$	1	2	-
L21	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	$2,7 \times 10^3$	1	3	Po kyselině
L22	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	$2,1 \times 10^5$	1	3	Po kyselině
L6	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	$7,1 \times 10^4$	1	3	Po kyselině
L24	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	$1,2 \times 10^4$	1	3	Po kyselině
L41	<i>Bacillus mycoides</i>	$4,2 \times 10^4$	1	4	Hnilobné
Kontrola	-	-	1	3	Po kyselině

Zrání: 1 - zraje, 2 - zraje místy, 3 - nezraje, 4 - s vadou

Aroma: 1 - tvarůžkové, 2 - mírně tvarůžkové, 3 - mírně netypické, 4 - netypické

Tab. 4 Výsledky Pavlákovy zrací zkoušky modelově kontaminovaných tvarohů šarže 3

Kmen	Výsledek identifikace	Počáteční denzita v tvarohu (KTJ/g)	Zrání	Aroma	Poznámka
L26	<i>Yarrowia lipolytica</i>	$3,8 \times 10^4$	2	3	Mírně hnilobné, prozralá místa mírně roztékající
A2	<i>Debaryomyces hansenii</i>	$1,1 \times 10^5$	3	3	Mírně kvasničné
75S	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	1×10^6	3	2	-
N26	<i>Serratia marcescens</i>	$5,9 \times 10^4$	3	2	-
L2	<i>Trichospora asahii</i>	$2,3 \times 10^4$	3	2	-
H1	<i>Clavospora lusitanae</i>	$3,0 \times 10^2$	3	3	Mírně kvasničné
B7B	<i>Klebsiella oxytoca</i>	$3,5 \times 10^4$	3	2	-
E8	<i>Bacillus pumilus</i>	$1,9 \times 10^5$	3	2	-
L52	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	$1,9 \times 10^4$	3	4	Kvasničné
45S	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	$2,4 \times 10^4$	3	2	-
L4	<i>Pichia cactophila</i>	$2,2 \times 10^3$	3	3	Mírně po rozpouštědle
32Z	<i>Hafnia alvei</i>	$1,8 \times 10^5$	3	2	-
Kontrola	-	-	3	2	-

Zrání: 1 - zraje, 2 - zraje místy, 3 - nezraje, 4 - s vadou

Aroma: 1 - tvarůžkové, 2 - mírně tvarůžkové, 3 - mírně netypické, 4 - netypické

(22 kmenů označených písmenem L). Pro rozšíření druhového spektra byly zařazeny kmeny izolované ze syrového mléka a mléčných výrobků. Identifikovány byly pomocí metody MALDI-TOF MS ve Státním veterinárním ústavu Jihlava. Pro potřeby experimentu byly mikroorganismy pomnoženy na BHI agaru za vhodných podmínek - kvasinky při 25 °C/3 dny, *Enterobacteriaceae* při 37 °C/1 den a ostatní bakterie při 30 °C/2 dny. Následně byla jedna očkovací klička suspendována v 9 ml fyziologického roztoku.

Pavlákova zrací zkouška modelově kontaminovaných tvarohů

Protože nelze dopředu odhadnout, zda použitý tvaroh jako takový nebude sám o sobě intenzivně prozrávat či vykazovat nějakou vadu, do testování byly zařazeny čtyři šarže průmyslového tvarohu. Od každé šarže byl navážen 1,5 kg,

kteří byl důkladně promíchán v zařízení Thermomix (Vorwerk). Do Petriho misky bylo odebráno 50 g tvarohu jako kontroly bez modelové kontaminace. Dále bylo do sterilních širokohrdlých vzorkovnic odebráno po 100 g tvarohu, který byl naočkován vždy 1 ml suspenze testovaného kmene ze souboru výše popsaných izolátů. Po důkladném promíchání bylo do Petriho misek odebráno po 50 g modelově kontaminovaných tvarohů. Následovala inkubace při 25 °C po dobu 3 dnů podle Formana a Strmisky (1984). Pak byl výsledek zrací zkoušky zhodnocen sensoricky vždy třemi stejnými pracovníky. V jednotlivých deskriptorech byly přiřazovány známky z předem definovaných stupnic: zrání (1 - zraje, 2 - zraje místy, 3 - nezraje, 4 - s vadou, např. hniloba, roztékání, apod.) a aroma (1 - tvarůžkové, 2 - mírně tvarůžkové, 3 - mírně netypické, 4 - netypické). Zrání bylo hodnoceno zrakem, aroma čichem.

Mikrobiologické analýzy

V každé šarži průmyslového tvarohu byly stanoveny tyto parametry:

- celkový počet mikroorganismů, s rozlišením mikroorganismů kyselinotvorných a alkaligenních - na půdě GTK-AB po kultivaci při 30 °C/3 dny podle ČSN EN ISO 4833-1 (2014),
- Gram-negativní aerobní bakterie - na půdě Leeds *Acinetobacter* agar po kultivaci při 30 °C/1-2 dny podle Němečkové a kol. (2018),

Tab. 5 Výsledky Pavlákovy zrací zkoušky modelově kontaminovaných tvarohů šarže 4

Kmen	Výsledek identifikace	Počáteční denzita v tvarohu (KTJ/g)	Zrání	Aroma	Poznámka
B1C	<i>Bacillus subtilis</i>	$8,8 \times 10^3$	3	3	Nezrající
E11	<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	$4,2 \times 10^4$	3	2	-
B2A	<i>Bacillus licheniformis</i>	$1,9 \times 10^4$	3	3	Nezrající
O56	<i>Sphingobacterium faecium</i>	$2,5 \times 10^4$	3	3	Nezrající
L29	<i>Bacillus mycoides</i>	$1,0 \times 10^3$	3	2	-
PM5	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	$4,2 \times 10^4$	3	2	-
PM13	<i>Acinetobacter baumannii</i>	$2,2 \times 10^4$	3	2	-
PM4	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	$1,8 \times 10^4$	3	3	Nezrající
PM28	<i>Pseudomonas putida</i>	$2,2 \times 10^4$	3	3	Nezrající
B10D	<i>Bacillus coagulans</i>	$7,3 \times 10^4$	3	3	Nezrající
B12A	<i>Bacillus cereus</i>	$7,2 \times 10^2$	3	2	-
PM9	<i>Pseudomonas fulva</i>	$2,1 \times 10^4$	3	3	Nezrající
kontrola	-	-	3	3	Nezrající

Zrání: 1 - zraje, 2 - zraje místy, 3 - nezraje, 4 - s vadou

Aroma: 1 - tvarůžkové, 2 - mírně tvarůžkové, 3 - mírně netypické, 4 - netypické

- *Enterobacteriaceae* - na půdě VČŽG po kultivaci při 37 °C/1 den podle ČSN ISO 21528-2 (2006),
- proteolytické mikroorganismy - na GTK půdě s přídavkem 10 % obj. sterilního mléka po kultivaci při 30 °C/3 dny podle Němečkové a kol. (2009),
- kvasinky a plísně - na GKCH půdě po kultivaci při 25 °C/3-5 dnů podle ČSN ISO 6611 (2009).

Denzita suspenze testovaného kmene byla stanovena na GKCH půdě po kultivaci při 25 °C/3-5 dnů (kvasinky) nebo na VČŽG půdě po kultivaci při 37 °C/1 den (*Enterobacteriaceae*) nebo na GTK půdě po kultivaci při 30 °C/3 dny (ostatní bakterie). Denzita testovaného kmene po naočkovaní do tvarohu byla poté dopočítána.

Enzymové aktivity a další vlastnosti použitých kmenů

Pro jednotlivé testy byla suspenze mikroorganismů očkovaná 1 % obj. do tekutého média, resp. ve formě 1 ml z 3. a 4. desetnásobného ředění přelivem tuhými médii. Jednalo se o tyto testy:

- růst při 25 °C/3 dny - v BHI bujónu,
- fermentace sacharidů - na fenol red agaru s disky napuštěnými dextrosou, laktosou a galaktosou,
- proteolytická aktivita - na GTK půdě s 10 % obj. sterilního mléka,
- lipolytická aktivita - na tributyrin agaru.

S výjimkou hodnocení růstové aktivity za podmínek zrací zkoušky byly jednotlivé testy vyhodnocovány po kultivaci za vhodných podmínek uvedených výše, v kapitole Mikroorganismy.

Výsledky a diskuze

V tab. 1 jsou shrnuty mikrobiologické parametry všech čtyř použitých šarží průmyslového tvarohu a patrně z ní je, že se tyto šarže navzájem lišily. Výsledky Pavlákova zracího testu modelově kontaminovaných tvarohů jsou uvedeny v tab. 2 až 5. Z porovnání tab. 1 až 5 vyplývá, že se podařilo, aby testované mikroorganismy zaujímaly kvantitativně významný podíl na mikroflóře tvarohu a zároveň významně nepřevyšovaly přirozenou mikroflóru tvarohu, která se tak také mohla během zrání uplatnit.

Tvaroh ze šarže 1 obsahoval nejvyšší denzity všech stanovovaných skupin mikroorganismů, avšak celkově v něm převažovala kyselinotvorná mikroflóra. Tento tvaroh velmi dobře prozrával. Přídavek různých kmenů bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* vedl ke zhoršení aroma, většinou na mírně nečisté. Nutno je však uvážit, že denzita této čeledi v řádu 10⁴-10⁵ KTJ/g už představuje zdravotní riziko, a tedy takovýto tvaroh by neměl být zpracováván. Naproti tomu denzita čeledi *Enterobacteriaceae* v řádu 10³ KTJ/g, jak byla přítomna v kontrolním vzorku, se na výsledném hodnocení zrací zkoušky nijak negativně neprojevila.

Rovněž tvaroh z šarže 2 dle vizuálního hodnocení prozrával dobře, avšak zjištěn u něj byl ostře kyselý pach. Tento pach se zmínil a dosaženo bylo tvarůžkového aroma po přídavku kmene *Lactococcus lactis* izolovaného z tvarohu. Lze spekulovat o tom, zda by to mohlo být díky zvýšení

relativního zastoupení kulturní mikroflóry na úkor přirozeně se vyskytujících kontaminujících mikroorganismů. Další zajímavý výsledek byl získán po přídavku silně růstově i enzymaticky aktivního (tab. 6) kmene *Bacillus mycooides*. Tento kmen způsobil vznik velmi silného hnilobného zápachu. Jeho vliv na vzhled a konzistenci nebyl patrný, avšak mohlo to být maskováno tím, že i výchozí tvaroh bez modelové kontaminace velmi dobře prozrával.

V šarži 3 byl tvaroh, který dle vizuálního hodnocení vůbec neprozrával, nicméně počínající zrání bylo detekováno jako slabé tvarůžkové aroma. Ze všech použitých surovin měl tento tvaroh nejnižší celkový počet mikroorganismů a v jeho mikroflóře převažovaly proteolytické mikroorganismy a kvasinky. To by mohlo znamenat, že je zdárný průběh zrání způsoben metabiózou mikroorganismů s různou biochemickou aktivitou, přičemž v tomto vzorku nebyl některý z klíčových mikroorganismů přítomen v dostatečné míře. Přídavek kvasinek k tvarohu z této šarže způsobil vznik různých kvasinkových pachů. Intenzivnější či nepříjemnější pachy vznikaly po přídavku kvasinek s nižší fermentační aktivitou (tab. 6), a nejhůře byl hodnocen vzorek s kvasinkou *Yarrowia lipolytica*, ve kterém byly zaznamenány lokální projevy počínajícího roztékání.

Tab. 6 Růst a enzymové aktivity testovaných kmenů

Kmen	Výsledek identifikace	Růst při 25 °C/3 dny	Fermentace dextrosy	Fermentace laktosy	Fermentace galaktosy	Proteolytická aktivita	Lipolytická aktivita
L39	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	-	-	+	+
L32	<i>Enterobacter cloacae</i>	+++	+	-	-	+	+
L40	<i>Enterobacter cloacae</i>	++	+	-	-	-	-
L34	<i>Enterobacter cloacae</i>	++	+	-	+	+	+
L7	<i>Enterobacter asburiae</i>	++	+	-	+	+	+
L33	<i>Escherichia coli</i>	+++	+	-	+	+	+
L36	<i>Escherichia coli</i>	+++	+	-	-	+	+
L37	<i>Escherichia coli</i>	+++	+	-	-	+	+
L38	<i>Serratia liquefaciens</i>	+	+	+	-	+	+
L35	<i>Serratia liquefaciens</i>	+	+	+	-	-	+
N26	<i>Serratia marcescens</i>	+	-	-	-	-	-
B7B	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	-	-	-	+
32Z	<i>Hafnia alvei</i>	+	-	-	-	-	+
L6	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	+	+	+	+	-	+
PM13	<i>Acinetobacter baumannii</i>	+++	-	-	-	-	+
PM28	<i>Pseudomonas putida</i>	+++	-	-	-	+	+
PM9	<i>Pseudomonas fulva</i>	+++	-	-	-	+	+
PM4	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	+++	+	+	+	+	+
PM5	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+++	-	-	-	+	+
75S	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	+	-	-	-	-	+
45S	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	+	-	-	-	-	+
O56	<i>Sphingobacterium faecium</i>	++	-	-	-	-	-
E11	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	++	-	-	-	+	+
L13	<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	-	-	+	+

Růstová aktivita: + slabý nárůst, ++ středně silný nárůst, +++ silný nárůst, ostatní aktivity: + aktivita detekována, - aktivita nedetekována

V poslední testované šarži byl tvaroh, který prakticky nejevil známky zrání. V porovnání s tvarohem ze šarže 3 v tomto tvarohu rovněž převažovaly proteolytické mikroorganismy, avšak tvaroh obsahoval relativně méně kvasinek. Přídavek některých kmenů s proteolytickou aktivitou přispěl k alespoň mírnému rozvoji tvarůžkového aroma, avšak nelze to zevšeobecnit. Zřejmě závisí na celkové biochemické vybavenosti jednotlivých kmenů a na tom, které biochemické aktivity, resp. jejich původci, ve výchozí surovině chyběly.

Závěr

Na souboru 4 šarží průmyslového tvarohu a 41 kmenů bakterií a kvasinek byl studován vliv jednotlivých mikroorganismů na výsledek Pavlákovy zrači zkoušky. Výsledek této zkoušky byl ovlivněn jak přirozenou mikroflórou daného vzorku tvarohu, tak vlastnostmi naočkovaného kmene. Predikce výsledku Pavlákovy zrači zkoušky na základě zastoupení jednotlivých mikrobiálních čeledí, rodů, druhů nebo skupin s danou enzymatickou aktivitou se jeví jako obtížná. Pravděpodobně důležitější bude převaha kulturní kyselinotvorné mikroflóry a vyvážené zastoupení různě biochemicky vybavených kontaminujících mikroorganismů, aby se během zrání mohla plně rozvinout metabióza. Pochopení těchto procesů v celé své komplexnosti je však výzvou pro další studie.

Poděkování

Tato práce vznikla s finanční podporou Národní agentury pro zemědělský výzkum Ministerstva zemědělství České republiky při řešení projektu QJ1210300 v programu KUS a s využitím institucionální podpory na rozvoj výzkumné organizace dle rozhodnutí MZE-RO1418.

Literatura

- ČSN EN ISO 4833-1 (2014): Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů - Část 1: Technika převlívem a počítáním kolonií vykultivovaných při 30 °C.
- ČSN ISO 6611 (2009): Mléko a mléčné výrobky - Stanovení počtu jednotek vytvářejících kolonie kvasinek a/nebo plísní - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 25 °C.
- ČSN ISO 21528-2 (2006): Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metody pro průkaz a stanovení bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* - Část 2: Technika počítání kolonií.
- FORMAN L., STRMISKA J. (1984): Výroba tvarohu, tvarohových výrobků a kyselých sýrů. *Mlékárenství II pro 3. ročník SOU* (s. 17-44). ČR, SNTL - Nakladatelství technické literatury.
- NĚMEČKOVÁ I., CHRAMOSTOVÁ J., KLIMEŠOVÁ M., NEJESCHLEBOVÁ L., SMOLOVÁ J., HAVLÍKOVÁ Š., ROUBAL P. (2018): Kultivační metoda pro stanovení Gram-negativních aerobních bakterií v syrovém mléce. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 169, s. 8-12.
- NĚMEČKOVÁ I., PECHAČOVÁ M., ROUBAL P. (2009): Problems with detection of proteolytic micro-organisms and their undesirable activities in milk. *Czech Journal of Food Sciences*, 27, s. S2/82-S2/89.

Korespondující autor: Ing. Irena Němečková, Ph.D.,
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a,
160 00 Praha 6, Česká republika, nemeckova@milcom-as.cz.

Přijato do tisku: 16. 11. 2018

Lektorováno: 30. 11. 2018

VYUŽITÍ MALDI-TOF MS PRO IDENTIFIKACI BAKTERIÍ ZPŮSOBUJÍCÍCH KAŽENÍ MLÉKÁRENSKÝCH VÝROBKŮ

Sabina Purkrťová¹, Lenka Zdeňková¹, Petr Fanta¹,
Petra Junková¹, Šárka Havlíková², Irena Němečková²,
Kateřina Demnerová¹

¹ Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola
chemicko-technologická v Praze

² Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o.

Application of MALDI-TOF MS for the identification of bacteria causing spoilage of dairy products

Abstrakt

Identifikace bakterií patří mezi důležité úkony laboratorní mikrobiologické praxe mlékárenského průmyslu. Metoda MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, hmotnostní spektrometrie pomocí laserové desorpce/ionizace za účasti matrice s analyzátozem doby průletu) je rychlou a moderní metodou identifikace mikroorganismů, zvláště pak bakterií. V této práci byla provedena MALDI-TOF MS identifikace celkem 711 bakteriálních izolátů z mlékárenských výrobků a provozoven. Celkem 91 % izolátů bylo spolehlivě identifikováno na alespoň rodové úrovni. Úroveň spolehlivosti rodové a druhové identifikace ovlivňuje nejen výběr vhodné metody přípravy vzorku pro danou taxonomickou skupinu, ale i fylogenetické vztahy v rámci rodů a přítomnost odpovídajících proteinových profilů v referenční databázi. Druhá identifikace je poté více náročná pro jednotlivé druhy druhových skupin (např. *Bacillus cereus* group, *Enterobacter cloacae* komplex, druhové skupiny *Pseudomonas* spp.). Bylo zjištěno, že databáze Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, Německo) rodově i druhově dostatečně pokrývá běžnou bakteriální mikroflóru mlékárenských výrobků, kdy s využitím této databáze byly metodou MALDI-TOF MS identifikovány bakteriální izoláty patřící do celkem 39 rodů.

Klíčová slova: MALDI-TOF MS, Biotyper, identifikace, bakterie způsobující kažení, mlékárenské výrobky.

Abstract

The identification of bacteria belongs to important operations in laboratory microbiological practice in dairy industry. The MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) method is a rapid and reliable method for microorganisms identification, specially for the identification of bacteria. In