

- KUČERA, J. (2018): Aktuality z provádění terénní a laboratorní kontroly mléčné užitkovosti skotu. Dny prvovýroby mléka, ČMSCH a.s., Hustopeče, 8. a 9. 11. 2018. <https://www.cmsch.cz/laboratore/lrm-laboratore-pro-rozbor-mleka/nabidka-sluzeb-lrm/dny-prvovyroby-mleka-2018-seznam-referatu/>
- KVAPILÍK, J., BUCEK, P., KUČERA, J. et al. (2019): Chov skotu v České republice. Ročenka 2018. ČMSCH a.s. Praha, s. 78.
- KVAPILÍK, J., KUČERA, J., BUCEK, P. et al. (2017): Chov skotu v České republice. Ročenka 2016. ČMSCH a.s. Praha, s. 106.
- KVAPILÍK, J., PYTLOUN, J., BUCEK, P. et al. (2007): Chov skotu v České republice. Ročenka 2006. ČMSCH a.s. Praha, s. 98.
- KVAPILÍK, J., RŮŽIČKA, Z., BUCEK, P. et al. (2014): Chov skotu v České republice. Ročenka 2013. ČMSCH a.s. Praha, s. 96.
- LÍZAL, F. (1988): Využití imunoanalýz v chovu hospodářských zvířat. *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, 2, ISSN 0139-7265, s. 20-22.
- OPSOMER, F., GRÖHN, Y. T., HERTL, J., CORYN, M., DE KRUIF, A. (2000): Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: A field study. Elsevier Sci. Inc., 53, s. 841-857.
- PRAKASH, B. S., MEYER, H. H. D., VAN DE WIEL, D. F. M. (1988): Sensitive enzyme immunoassay of progesterone in skim milk using second-antibody technique. *Animal Reproduction Science*, 16, s. 225-235. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(88\)90016-4](https://doi.org/10.1016/0378-4320(88)90016-4)
- SAKAGUCHI, M., SASAMOTO, Y., SUZUKI, T., TAKAHASHI, Y., YAMADA, Y. (2004): Postpartum ovarian follicular dynamics and estrous activity in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87, 7, s. 2114-2121. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70030-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70030-2)
- SHEARER, J. K. (2003): Reproductive anatomy and physiology of dairy cattle. University of Florida, IFAS Extension, DS 57, 1992, s. 4. <https://ufdc.ufl.edu/IR00004752/00001>
- SKYVA, J. (2005): Detekce a stanovení progesteronu v kravském mléce – metoda AGROS ELISA KIT. Sborník příspěvků: Možnosti využití molekulární a populační genetiky pro šlechtění skotu na vyšší kvalitu produktů. Výzkumný ústav pro chov skotu, Rapotín, listopad, ISBN: 80-903142-5-2, s. 133-136.
- STRNAD, M., SIMERSKÝ, T. (2005): AGROS ELISA KIT, Validace metody, Ústav experimentální botaniky AV ČR, Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého Olomouc, 16. 5. 2005, s. 7.
- THATCHER, W. W., SILVESTRE, F. T., SANTOS, J. E. P., STAPLES, C. R. (2008): The Impact of lactation on reproductive performance. *WCDS Advances in Dairy Technology*, 20, s. 17-31. <http://www.dairyweb.ca/Resources/WCDS2008/Thatcher.pdf>
- THATCHER, W. W., BILBY, T. R., BARTOLOME, J. A., SILVESTRE, F., STAPLES, C. R., SANTOS, J. E. P. (2006): Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology*, 65, 7, s. 30-44. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.004>
- WITTEN, I. H. et al. (2007): WEKA: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Third Edition.
- ZAORAL, J. (1987): Základní principy radioimunoanalýzy. *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, 2, ISSN 0139-7265, s. 60-62.
- ZAORAL, J. (1991): Nabídka oddělení radioimunologie. *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, 4, ISSN 0139-7265, s. 27-28.

Korespondující autor: Dr. Ing. Oto Hanuš,
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke dvoru 12a,
160 00 Praha 6, e-mail: hanus.oto@seznam.cz

*Přijato do tisku: 20. 2. 2020
Lektorováno: 16. 3. 2020*

PSYCHROTROFNÍ MIKRO-ORGANISMY JAKO PRODUCENTI NEŽÁDOUCÍCH ENZYMŮ V SYROVÁTCE PRO DALŠÍ POTRAVINÁŘSKÉ ZPRACOVÁNÍ

Irena Němečková, Šárka Havlíková, Jana Smolová
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Psychrotrophic microorganisms as producers of undesirable enzymes in whey for further food processing

Abstrakt

Psychrotrofní mikroorganismy, jako např. příslušníci rodu *Pseudomonas*, jsou významnými původci technologických problémů při zpracování mléka a kažení finálních mléčných výrobků díky jejich schopnosti růst při chladírenských teplotách a produkovat vysoce termostabilní proteolytické a lipolytické enzymy. Otázkou však je, zda k podobným problémům může docházet také v syrovátce určené pro další potravinářské zpracování. V této práci jsme ze syrovátky vyizolovali šest potenciálně rizikových kmenů a otestovali jejich růst za podmínek modelujících skladování syrovátky při 5; 10 a 15 °C před pasterací a následným zahušťováním. Dynamika růstu jednotlivých kmenů byla rozdílná, přesto lze formulovat doporučení, aby byla syrovátka postupně sbíraná z jednotlivých šarží výroby sýrů zpasterována nejpozději během 48 h, lépe však během 24 h.

Klíčová slova: zpracování sladké syrovátky, *Pseudomonas* spp., proteolýza, lipolýza, mikrobiální růst

Abstract

Psychrotrophic microorganisms, as e.g. strains of genus *Pseudomonas*, are important causes of technological problems during milk processing and spoilage of final dairy products due to their ability to grow at refrigerating temperatures and produce highly heat-stable proteolytic and lipolytic enzymes. Our question is whether similar problems can also set in whey for further food processing. In this work, we isolated six potentially hazardous strains and tested their growth under the conditions simulating whey storage at 5; 10 and 15 °C before pasteurization and subsequent concentration. The growth dynamics of particular strains differed. Nevertheless, it can be recommended to pasteurize successively collected whey from particular cheesemaking batches utmost within 48 hrs, optimally within 24 hrs.

Keywords: sweet whey processing, *Pseudomonas* spp., proteolysis, lipolysis, microbial growth

Úvod

Psychrotrofní mikroorganismy jsou mikroorganismy schopné růst za chladírenských teplot, přestože optimální teplota pro jejich růst je vyšší. Mezi psychrotrofní mikroorganismy bývají zařazovány např. některé druhy rodů *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Bacillus*, někteří zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*, a další (Hayes a Boor, 2001). Pokud se o psychrotrofních mikroorganismech mluví v souvislosti s kvalitou syrového mléka a rizikem technologických problémů či kažení finálních výrobků, obvykle má mluvčí na mysli jen pseudomonády. Jak uvádí Chen a kol. (2003), pseudomonády tvoří 70-90 % psychrotrofních mikroorganismů syrového mléka. S rozvojem moderních identifikačních metod se však jeví, že je zastoupení rodu *Pseudomonas* v psychrotrofní mikroflóře syrového mléka nižší (Němečková a kol., 2012). Nicméně význam právě tohoto rodu je v mlékárenství značný, a to nejen díky jeho schopnosti růst za chladírenských teplot, ale také kvůli jeho vysoké enzymové aktivitě.

Pseudomonády totiž obvykle mají schopnost tvořit vysocetermostabilní proteolytické a lipolytické enzymy, které mohou určitou měrou přetrvávat všechna v mlékárenství používaná tepelná ošetření a ovlivňovat tak průběh výroby i senzoryckou, konzistenční či funkční kvalitu prakticky všech typů mléčných výrobků. Konkrétní příklady detailněji rozepisuje Němečková a kol. (2012). Souvislost mezi zastoupením psychrotrofních mikroorganismů, resp. pseudomonád v syrovém mléce a podmínkami jeho skladování v návaznosti na kvalitu finálních výrobků je již známa (Chramostová a kol., 2014), avšak málo se ví o dopadu těchto mikroorganismů na kvalitu syrovátky. Syrovátka totiž byla dlouhou dobu považována za odpadní produkt z výroby sýrů a teprve nedávno začala být oceňována jako hodnotná surovina pro další potravinářskou výrobu (mléčné výroby, pečivo, výživa pro sportovce, aj.).

Naše úvaha je takováto: Psychrotrofní mikroorganismy, resp. pseudomonády ze syrového mléka jsou při výrobě sýrů inaktivovány pasterací, technologií výroby sýrů mohou procházet jen jejich enzymy. Tyto enzymy jsou však přítomny v nízké koncentraci, která je v reálných vzorcích mimo detekční schopnost dostupných metod (Němečková a kol., 2009). Pro účely této práce tento zdroj enzymů v syrovátce zanedbejme. Syrovátka z jednotlivých šarží výroby sýrů je postupně sbírána a za chladírenských teplot skladována až do doby, kdy je zpasterována. Pokud by v období mezi pasterací mléka a pasterací syrovátky docházelo ke kontaminaci syrovátky psychrotrofními mikroorganismy, resp. pseudomonádami, mohly by se tyto mikroorganismy pomnožovat a produkovat své enzymy, které by opět mohly procházet pasterací. Je to tedy situace obdobná skladování syrového mléka. Úskalí pak může spočívat v dalším zpracování syrovátky, která je zakoncentrovává-

na, popř. jsou z ní vyráběny koncentráty či izoláty bílkovin. Se sušinou syrovátky, resp. bílkovinami syrovátky by se tak mohly zakoncentrovávat i nežádoucí enzymy. Dokonce i mikrobiologicky kvalitní syrovátkový produkt by tak s sebou do dalšího zpracování vnášel riziko vad a problémů způsobovaných enzymy.

Cílem této práce je zjistit, zda se psychrotrofní producenti nežádoucích enzymů v syrovátce opravdu vyskytují a zda za podmínek skladování syrovátky před pasterací mohou tyto enzymy produkovat. Pokud ano, tak podnítit další výzkum kvality syrovátky v tomto směru.

Materiál a metody

Izolace, identifikace a výběr kmenů

Na provoze, kde se vyrábějí sýry a následně se zpracovává syrovátka, byly provedeny dva fázové odběry syrovátky. Ve vzorcích byly stanoveny psychrotrofní proteolytické mikroorganismy, a to na živné půdě GTK (MILCOM a.s., CZ) s 10 % obj. sterilního mléka. Kultivace byla provedena při 6,5 °C po dobu 10 dnů. Počítány byly kolonie s vyjasněnou proteolytickou zónou. Vybrané kolonie byly následně vyizolovány, přečištěny na BHI agaru (Merck, G) a předány na identifikaci metodou MALDI-TOF MS na Státní veterinární ústav v Jihlavě.

Charakteristika kmenů byla doplněna posouzením jejich lipolytické aktivity. Kultivace byla provedena na Tributyrin agaru (Sigma-Aldrich, CZ) při 30 °C po dobu 3 dnů a při 10 °C po dobu 10 dnů a sledováno bylo, zda došlo k vytvoření vyjasněných lipolytických zón.

Měření růstu v syrovátce

Vzorek dodané jedné šarže nezahuštěné syrovátky z výroby sýrů byl do doby použití uchován při -18 °C. Pro modelové pokusy byla vždy část syrovátky rozmrazena a tepelně ošetřena při 108 °C po dobu 7 min, aby došlo k vysrážení bílkovin. Následně byla syrovátka vychlazená a zfiltrována (filtrační papír KA4, Papírna Pernštejn, CZ), čímž bylo získáno čiré syrovátkové médium umožňující spektrofotometrické měření. Mikrobiologická čistota média byla zajištěna následným tepelným ošetřením při 110 °C po dobu 15 min.

Kmeny pro modelové pokusy byly připraveny kultivací v syrovátkovém médiu při 25 °C po dobu 16-18 h. Následně byl testovaný kmen v očkovací dávce 1 % obj. zaočkován do 70 ml syrovátkového média. Médium bylo důkladně promícháno a rozplněno po 20 ml do tří 50ml falkonek pro vlastní měření růstu, 5 ml ve zkumavce bylo na 72 h vloženo do termostatu nastaveného na 10 °C a zbytek byl použit pro stanovení počtu log KTJ/ml na začátku pokusu.

Měření růstu probíhalo v laboratorním kontinuálním bioreaktoru RTS-1C (BioSan, Lotyšsko), který pracuje na principu optické spektrofotometrie a v reálném čase měří optickou denzitu při 850 nm. Nastaven byl mód kontinuálního míchání, jenž omezuje vznik klků, sedimentů a jiných defektů zkreslujících měřené hodnoty. Konkrétní nastavení přístroje je specifikováno v tab. 1.

Po 72 h kultivace byly stanoveny dosažené počty log KTJ/ml, a to jak ve falkonkách, v kterých byl za dynamických podmínek měřen růst, tak ve zkumavce staticky kultivované v termostatu. Počty KTJ/ml testovaných kmenů byly stanoveny na GTK agaru (MILCOM a.s., CZ) po kultivaci při 25 °C po dobu 3 dnů.

Tab. 1 Nastavení kontinuálního reaktoru RTS-1C pro měření růstu testovaných kmenů v syrovátkovém médiu

Parametr	Nastavení
Teplota kultivace	5; 10 a 15 °C
Typ kultivace	Aerobní
Typ míchání	Dynamický
Otáčky rotující falkonky	100 rpm
Změna směru rotace falkonky	60 s
Odečet optické denzity (OD)	60 min
Kultivační objem suspenze	20 ml
Doba kultivace	72 h
Objem inokula	1 %

Výsledky a diskuze

Provedeny byly dva fázové odběry syrovátky, ve které byly stanoveny psychrotrofní mikroorganismy vykazující za chladírenských teplot (zde 6,5 °C) proteolytickou aktivitu. Výsledky jsou shrnuty v tab. 2. Zatímco v prvním odběru byly některé z fázových vzorků pozitivní, ve druhém odběru byly všechny vzorky negativní. Nepravidelné záchyty cílových mikroorganismů v dané fázi v průběhu času mohou znamenat, že ke kontaminaci dochází uvolňováním těchto mikroorganismů z biofilmů. A například o pseudomonádách je známo, že schopnost tvořit biofilmy některé kmeny nejenže mají, ale dokonce je tato schopnost přítomností mezofilní laktokokové kultury stimulována (Kives a kol., 2005). Ve zde sledovaném provozu psychrotrofní proteolytické mikroorganismy syrovátku kontaminovaly již při lisování, následně se až do pasterace pomnožovaly a pasterací byly inaktivovány.

Ze syrovátky bylo vyizolováno šest kmenů, které všechny náležely do rodu *Pseudomonas*. Detailnější charakteristika těchto kmenů je uvedena v tab. 3. Všechny kmeny byly schopné růst a tvořit proteolytické enzymy při chladírenských teplotách. Lipolytické enzymy při chladírenských teplotách tvořily jen čtyři ze šesti kmenů, avšak při 30 °C již byly všechny kmeny lipolyticky aktivní. Na větším souboru (82 kmenů) pseudomonád izolovaných z mléka a mléčných výrobků Scatamburlo a kol. (2015) došli k podobným závěrům. Při 7 °C proteolytickou aktivitu vykazovalo 69,5 % kmenů, při 25 °C 100 % kmenů.

Proteolytické a lipolytické enzymy jsou za optimální teploty tvořeny až na konci exponenciální a během stacionární fáze růstu, kdy počty pseudomonád dosahují řádově 7-8 log KTJ/ml (Grieve a Kitchen, 1985). Avšak při chladírenských teplotách (2 °C) byly tyto enzymy

Tab. 2 Výsledky stanovení psychrotrofních proteolytických mikroorganismů (log KTJ/ml) ve fázových vzorcích syrovátky

	Odběr 1	Odběr 2
Výrobek sýřenyiny	neg.	neg.
Předlisovací vana	neg.	neg.
Dolis	< 1	neg.
Skladovací tank na směsnou syrovátku	2,15	neg.
Nádržka před pasterací	2,56	neg.
Po pasteraci	neg.	neg.
Nádržka před zahušťováním	neg.	neg.
Po zahušťování	neg.	neg.
Skladovací tank na zahuštěnou syrovátku	neg.	neg.

Tab. 3 Charakterizace izolovaných kmenů pseudomonád

Označení kmene	Identifikace	Proteolytická aktivita (6,5 °C/10 dnů)	Lipolytická aktivita (10 °C/10 dnů)	Lipolytická aktivita (30 °C/3 dny)
Ps1	<i>P. libanensis</i>	+	+	+
Ps2	<i>P. fragi</i>	+	+	+
Ps3	<i>P. fragi</i>	+	+	+
Ps4	<i>P. fragi</i>	+	+	+
Ps5	<i>P. fulva</i>	+	-	+
Ps6	<i>P. monteilii</i>	+	-	+

+ pozitivní reakce, - negativní reakce

v modelových vzorcích detekovány už při dosažení počtů pseudomonád v řádu 4-5 log KTJ/ml a jejich koncentrace byla vyšší než za optimální teploty pro růst. Jedná se o adaptační mechanismus pseudomonád, jak si zajistit dostatek živin a zvýšit svou růstovou rychlost při chladírenských teplotách (Braun a Sutherland, 2003).

Z tab. 4 je patrné, že za podmínek našeho experimentu došlo během 72 h k nárůstu počtu pseudomonád řádově o 2-3 log KTJ/ml, a to při všech experimentálních teplotách (5; 10 a 15 °C). Lze se tedy domnívat, že jsme se tím přiblížili nejvyššímu dosažitelnému nárůstu a tedy i růstové fázi, při které jsou již nežádoucí enzymy produkovány. Alespoň zpomalení růstu, popř. dokonce přechod z exponenciální do stacionární fáze na konci 72 h kultivace je vidět rovněž na obr. 1 až 6.

Kromě toho z porovnání tab. 4 a obr. 1 až 6 vyplývá, že nelze pro všechny kmeny použít jeden univerzální přepočec mezi počty log KTJ/ml a optickou denzitou. Obrázky by proto měly být interpretovány pouze na základě tvaru naměřených křivek, a nikoliv porovnáním nejvyšších optických denzit dosažených pro jednotlivé kmeny. Kromě toho měření při nízkých teplotách, zejména při 5 °C, v některých vzorcích vykazovalo určité nestabilitu, a tak by se mohlo zdát, že zde mikroorganismy prakticky nerostly, přestože mikrobiologický rozbor ukázal opak.

V tab. 4 za pozornost dále stojí, že při stejné teplotě bylo vyšších počtů pseudomonád dosaženo při dyna-

Tab. 4 Výsledky stanovení počtů (log KTJ/ml) šesti kmenů pseudomonád po 72 h kultivace v syrovátkovém médiu

Kmen	Ps1	Ps2	Ps3	Ps4	Ps5	Ps6
Před kultivací	6,61	6,95	5,98	6,63	6,26	6,57
Po kultivaci v RTS při 5 °C	8,82	9,08	8,65	8,59	8,34	8,49
Po kultivaci v RTS při 10 °C	8,66	8,94	8,72	8,69	8,40	8,56
Po kultivaci v RTS při 15 °C	8,40	9,04	8,60	8,67	8,48	8,61
Po kultivaci v termostatu při 10 °C	8,58	8,65	7,86	8,04	7,71	8,26

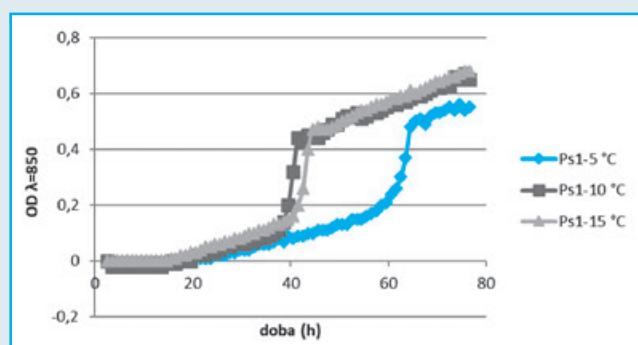
RTS – dynamická kultivace v kontinuálním bioreaktoru RTS-1C

mické než při stacionární kultivaci. Důvodem může být zlepšení dostupnosti kyslíku díky promíchávání.

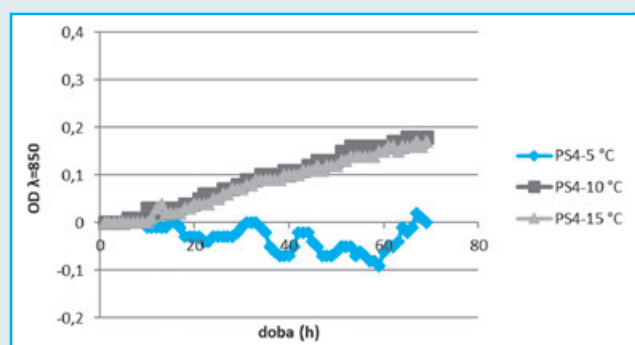
V reálném provozu daného výrobce je syrovátka z jednotlivých šarží výroby sýrů postupně sbírána a uchována po dobu maximálně 3 dnů při průměrné teplotě 10 °C (nádrž je chlazená, avšak další teplá syrovátka přitéká). Po nasbírání určitého množství je syrovátka zpasterována

a zahuštěna. Tvary křivek na obr. 1 až 6 naznačují, že při skladování syrovátky po dobu 24 h vznik nežádoucích proteolytických a lipolytických enzymů významné riziko nepředstavuje. Při skladování 48 h se již tyto enzymy mohou začít tvořit. A skladování 72 h se z tohoto pohledu jeví jako rizikové.

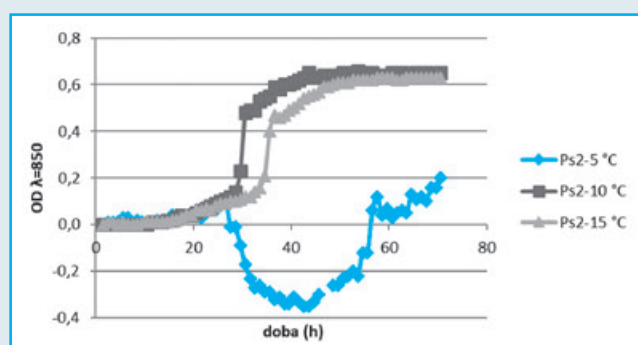
Riziko tvorby nežádoucích enzymů v syrovátce však může být relativně nižší než v syrovém mléce skladovaném za stejných podmínek, protože tvorba těchto enzymů je indukována přítomností vhodných substrátů. Proteolytické enzymy pseudomonád štěpí kaseiny přednostně před bílkovinami syrovátky (Shamsuzzaman a McKellar, 1987). Navíc je tvorba nejen lipolytických, ale i proteolytických enzymů pseudomonád stimulována přítomností mléčného tuku (Zhang a kol., 2020).



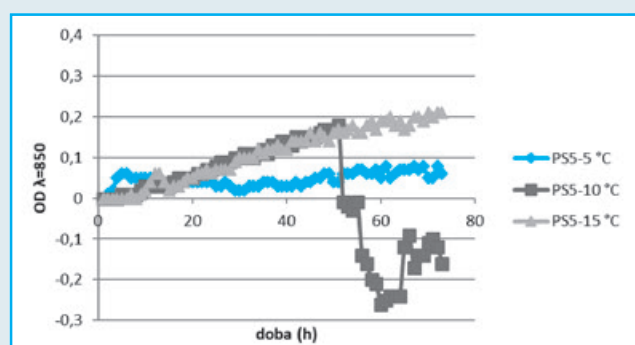
Obr. 1 Růstová aktivita kmene *P. libanensis* Ps1 v syrovátkovém médiu



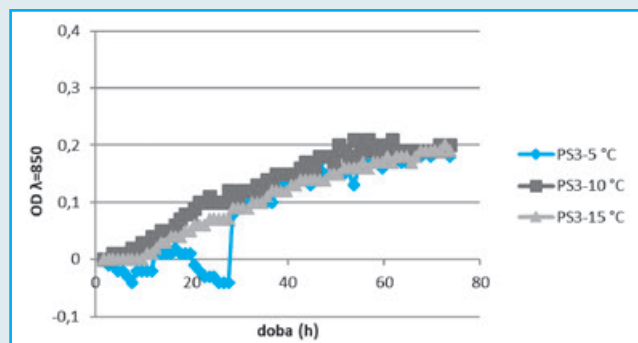
Obr. 4 Růstová aktivita kmene *P. fragi* Ps4 v syrovátkovém médiu



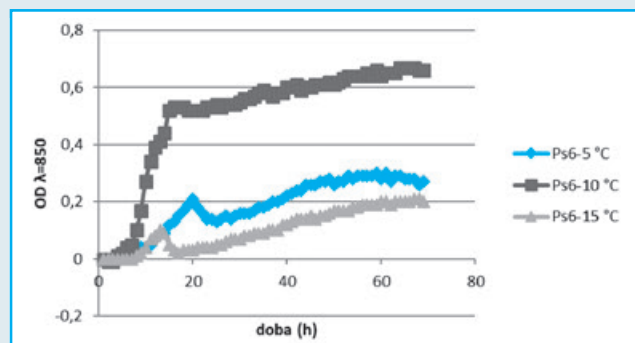
Obr. 2 Růstová aktivita kmene *P. fragi* Ps2 v syrovátkovém médiu



Obr. 5 Růstová aktivita kmene *P. fulva* Ps5 v syrovátkovém médiu



Obr. 3 Růstová aktivita kmene *P. fragi* Ps3 v syrovátkovém médiu



Obr. 6 Růstová aktivita kmene *P. monteilii* Ps6 v syrovátkovém médiu

Závěr

Diskutovány byly různé aspekty analyticky obtížně průkazné problematiky – rizika tvorby termostabilních proteolytických a lipolytických enzymů v syrovátce určené pro další potravinářské zpracování. Zjištěno bylo, že syrovátka sbíraná z výroby sýrů může obsahovat bakterie rodu *Pseudomonas*, jakožto producenty těchto enzymů. Pseudomonády se v syrovátce za reálných podmínek skladování pomnožovat mohou a teoreticky existuje i riziko, že nežádoucí enzymy tvoří. Doporučit lze proto, aby byla syrovátka zpasterována nejpozději během 48 h, lépe však do 24 h. Další opatření by mohla být např. v souvislosti s mikrobiologickou kvalitou syrového mléka či s výskytem biofilmů pseudomonád na provozu. Uvážena by měla být, pokud by přídavek syrovátky či koncentrátu/izolátu syrovátkových bílkovin do finálního potravinářského výrobku působil „nevysvětlitelné“ problémy se zpracováním, sensorickými, konzistenčními či funkčními vlastnostmi.

Poděkování

Tato práce vznikla s finanční podporou Národní agentury pro zemědělský výzkum Ministerstva zemědělství České republiky při řešení projektu QK1710156 v programu ZEMĚ.

Literatura

- BRAUN P., SUTHERLAND J.P. (2003): Predictive modelling of growth and enzyme production and activity by a cocktail of *Pseudomonas* spp., *Shewanella putrefaciens* and *Acinetobacter* sp. *International Journal of Food Microbiology*, 86, s. 271-282.
- GRIEVE P.A., KITCHEN B.J. (1985): Proteolysis in milk: The significance of proteinases originating from milk leucocytes and a comparison of the action of leucocytes, Bacterial and natural milk proteinases on casein. *Journal of Dairy Research*, 52, s. 101-112.
- HAYES M.C., BOOR K. (2001): Raw milk and fluid milk products. MARTH E.H., STEEL J.L.: *Applied Dairy Microbiology*, 2. vydání (s. 59-76). USA, Marcel Dekker, Inc.
- 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, s. 255-275.
- CHRÁMOSTOVÁ J., RUBINA N., ŠEDIVCOVÁ V., DRAGON M., NĚMEČKOVÁ I., ROUBAL P. (2014): Vliv chladiřenských teplot na růst a proteolytickou činnost mikroorganismů syrového mléka. *Mlékařské listy – zpravodaj*, 146, s. X-XIII.
- KIVES J., GUADARRAM D., ORGAZ B., RIVERA-SEN A., VAZQUEZ J. SAN-JOSE C. (2005): Interactions in biofilms of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* and *Pseudomonas fluorescens* cultured in cold UHT milk. *Journal of Dairy Science*, 88, s. 4165-4171.
- 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/S2-S2/S89.
- NĚMEČKOVÁ I., PEŠEK E., HANUŠOVÁ J., ROUBAL P. (2012): Kultivační metody stanovení bakterií rodu *Pseudomonas* v mléce. *Mlékařské listy – zpravodaj*, 131, s. I-V.
- SCATAMBURLO T.M., YAMAZI A.K., CAVICCHIOLI V.Q., PIERI F.A. (2015): Spoilage potential of *Pseudomonas* species isolated from goat milk. *Journal of Dairy Science*, 98, s. 759-764.
- SHAMSUZZAMAN K., MCKELLAR R.C. (1987): Peptidases from two strains of *Pseudomonas fluorescens*: partial purification, properties and action on milk. *Journal of Dairy Research*, 54, s. 283-293.

ZHANG D., PALMER J., TEH K.H., CALINSIAN M.M.A., FLINT S. (2020): Milk fat influences proteolytic enzyme activity of dairy *Pseudomonas* species. *International Journal of Food Microbiology*, 320, č. 108543.

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

Přijato do tisku: 29. 3. 2020

Lektorováno: 2. 4. 2020

SLEDOVÁNÍ TVORBY BIOFILMU A TERMOREZISTENCE U ŘAS *PROTOTHECA* SPP. IZOLOVANÝCH Z BAZÉNOVÝCH VZORKŮ MLÉKA

Marcela Klimešová¹, Ivana Kucharovičová²,
Monika Morávková³, Romana Bačová³, Petr Roubal¹,
Růžena Seydlová¹, Ludmila Nejeschlebová¹

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

² Státní veterinární ústav, Jihlava

³ Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

Monitoring of biofilm production and thermoresistance of *Prototheca* spp. isolated from bulk milk

Abstrakt

V bazénových vzorcích mléka (n = 266) byl sledován výskyt *Prototheca* spp. Z 26 získaných izolátů *Prototheca* spp. byla většina izolátů identifikována pomocí multiplexní PCR jako *P. zopfii* genotyp 2 a jeden kmen jako *P. blaschkeae*. Z těchto izolátů bylo následně vybráno pět izolátů *P. zopfii* genotyp 2 a jeden izolát *P. blaschkeae* pro následné studium tvorby biofilmu a termorezistence. Pro testování byly zvoleny teploty 47, 50, 55, 57 a 60 °C po dobu 1 až 90 minut. Všechny kmény produkovaly biofilm. Nejvýrazněji tvořily biofilm dva kmény *P. zopfii*, kde u jednoho kmene byla stanovena hodnota 8 a u druhého kmene hodnota 12, následoval kmen *P. blaschkeae* s hodnocením 4 a ostatní kmény *P. zopfii* s tvorbou biofilmu 1-1,5. Rezistence k testovaným teplotám byla u všech kménů téměř shodná. Všechny kmény přežily teplotu 50 °C po dobu 90 minut, kdy byl pozorován pokles viability buněk o 99,5 %. Negativní růst byl zjištěn při teplotě 55 °C po 15 minutách a teplotě 60 °C již po 1 minutě. D-hodnoty se pro všechny kmény *P. zopfii* pohybovaly v rozmezí pro D₄₇ 72-83 min, D₅₀ 52-54 min a D₅₅ 3 min. D-hodnota pro *P. blaschkeae* byla D₄₇ 59 min, D₅₀ 54 min a D₅₅ 3 min. Z-hodnoty se pohybovaly v rozmezí 5,3 až 5,5 °C pro *P. zopfii* a pro *P. blaschkeae* byla 5,9 °C.

Klíčová slova: kravské mléko, řasy, biofilm, termorezistence