

DOPORUČENÍ MIKROBIOLOGICKÝCH ANALÝZ SYROVÉHO OVČÍHO MLÉKA PŘI PŘERUŠENÍ TEPLOTNÍHO ŘETĚZCE

Marcela Klimešová, Hana Nejeschlebová, Oto Hanuš,
Ludmila Nejeschlebová

Výzkumný ústav mlékárenský, Praha

Recommendations for microbiological analysis of raw sheep milk in case of interruption of the temperature chain

Abstrakt

Byl modelován vliv úložné teploty 8, 11, 14, 17, 20 a 25 °C a času na mikrobiologické ukazatele v syrovém ovčím mléku bez konzervačního přípravku. Vzorky mléka byly uchovány při dané teplotě a analyzovány po 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3 a 4 hodinách. Po každé analýze byly vzorky uloženy do lednice při teplotě 8 °C a znovu analyzovány po 3 a 24 hodinách. Z výsledků a mezí reprodukovatelnosti bylo vypracováno doporučení, kdy je možné ještě vzorky analyzovat v případě porušení transportní teploty.

Klíčová slova: ovce; nekonzervované mléko; mezofilní mikroorganismy; počet psychrotrofních mikroorganismů; koliformní bakterie; *Staphylococcus aureus*

Abstract

The effect of storage temperature 8, 11, 14, 17, 20 and 25 °C and time on microbiological indicators in raw sheep's milk without preservative was monitored. Milk samples were kept at the given temperature and analyzed after 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 and 4 hours. After each analysis, the samples were stored in a refrigerator at 8 °C and reanalyzed after 3 and 24 hours. Based on the results and limits of reproducibility, a recommendation was made when it is still possible to analyze the samples in case of a violation of the transport temperature.

Keywords: sheep; non-preserved milk; mesophilic microorganisms; psychrotrophic microorganisms; coliforming microorganisms; *Staphylococcus aureus*

Úvod

Dle nařízení ES č. 853/2004 nesmí mléko malých přežvýkavců určené k výrobě konzumního tepelně ošetřeného mléka nebo mléčných výrobků přesáhnout hodnotu 1 500 000 KTJ/ml (pro obě hodnoty se jedná o geometrický průměr za dobu 2 měsíců, alespoň 2 vzorky za měsíc). Vedle toho nesmí být u mléka malých přežvýkavců určeného pro výrobu výrobků ze syrového mléka postupem, který nezahrnuje tepelnou úpravu, překročen limit 500 000 KTJ/ml. Ostatní mikrobiologické parametry toto nařízení nebo jiné předpisy neřeší. V práci Klimešová a kol. (2019) je navržena implementace limitního počtu mezofilních mikroorganismů v syrovém ovčím mléce do praxe během pěti a více let, kde je uvedena jedna standardní třída a hodnota CPM $\leq 300 \times 10^3$ KTJ/ml jako skutečný hygienický limit pro syrové mléko. Pro mléko určené pro výrobu výrobků ze syrového mléka postupem, který nezahrnuje tepelnou úpravu, je navržena v posledním období implementace hodnota $\leq 200 \times 10^3$ KTJ/ml, která odpovídá skutečné hodnotě geometrických průměrů a mediánů.

Počet mezofilních mikroorganismů je závislý na teplotě, při které se mléko uchovává, transportuje do laboratoře nebo do mlékárny. Podle nařízení ES č. 853/2004 musí být mléko v případě, že je sváženo každý den, ihned zchlazeno na teplotu nejvýše 8 °C, a v případě, že svoz není prováděn každý den, zchlazeno na teplotu nejvýše 6 °C. Během přepravy musí být zachován chladicí řetězec a při přepravě nekonzervovaného vzorku mléka je nutné jeho doručení do laboratoře v co nejkratší době dodání do cílového zařízení, přičemž teplota mléka nesmí přesáhnout 8 °C (ČSN EN ISO 707).

Práce je zaměřena na stanovení a kontrolu celkového počtu mezofilních mikroorganismů (CPM), psychrotrofních mikroorganismů (CPP), koliformních mikroorganismů (Koli) a *Staphylococcus aureus* (SA) v syrovém nekonzervovaném ovčím mléce při porušení chladového režimu, tj. při zvýšení teploty úchovy vzorku z 8 °C na teplotu 11, 14, 17, 20 a 25 °C při různé době expozice 0,5 až 4 hodiny.

Materiál a metody

Původ vzorků

V průběhu let 2022 až 2023 bylo analyzováno celkem pět bazénových mlék, u kterých byly stanoveny mezofilní, psychrotrofní a koliformní mikroorganismy. Vzhledem k absenci *S. aureus* v bazénových vzorcích, byla pro jeho analýzu zakoupena s odstupem času čtyři pastеровaná ovčí plnotučná mléka (Statek Horní Dvorce), která pak byla v laboratoři zaočkována sbírkovým kmenem *S. aureus* (CCM 3953) tak, aby výchozí koncentrace byla $3,5$ až $5,5 \times 10^2$ KTJ/ml. Bazénové mléko bylo odebíráno vždy po ranním dojení a vychlazené na teplotu 6 ± 1 °C. Transport mléka do laboratoře bazénového i komerčních mlék probíhal v termoboxech při teplotě $6,5 \pm 1$ °C.

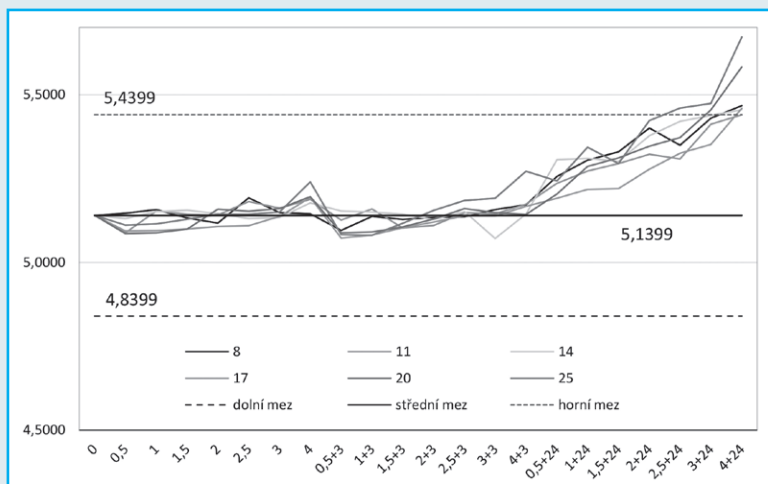
Stanovení mikrobiologických ukazatelů

V laboratoři byla modelována situace zacházení se vzorky od jejich odběru, transportu a následném zacházení se vzorky od přijetí do laboratoře po jejich analýzu. Mléko bylo rozlito do vzorkovnic o objemu 100 ml, poté byly vzorkovnice uloženy do termostatů o testovaných teplotách 8, 11, 14, 17, 20 a 25 °C tak, že pro každý čas expozice (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 a 4 hodiny) byl sledován vždy samostatný vzorek mléka. Výchozí počet mikroorganismů CPM, CPP, Koli, SA (kontrola, 0 hodin) byl

Tab. 1 Hodnoty reprodukovatelnosti pro stanovení horního a dolního limitu pro měření CPM, CPP, Koli a SA

	průměrná vypočtená reprodukovatelnost (R log)
CPM	0,30
CPP	0,25
Koli	0,25
SA	0,09

stanoven ihned po rozliti mléka a uložení vzorkovnic do termostatů. Vzorek mléka byl po každém testovaném čase uložen do lednice při teplotě 8 ± 1 °C a znovu analyzován po 3 hodinách, poté opět uložen do lednice a znovu ana-



Graf 1 Vývoj CPM (log CPM) v ovčím mléce a mezní hodnoty reprodukovatelnosti ($5,1399 \pm 0,30$ log)

Tab. 2 Výsledné hodnoty CPM (geometrický průměr) a log CPM v ovčím mléce

teplota (°C)	8	11	14	17	20	25	8	11	14	17	20	25
čas (hod)	geometrický průměr CPM (v tis. KTJ/ml)						log CPM					
0	138,0	138,0	138,0	138,0	138,0	138,0	5,1399	5,1399	5,1399	5,1399	5,1399	5,1399
0,5	140,2	122,6	135,0	124,2	122,0	129,2	5,1469	5,0886	5,1302	5,0940	5,0862	5,1111
1	143,6	142,4	141,7	124,4	122,5	130,3	5,1573	5,1534	5,1514	5,0949	5,0882	5,1149
1,5	135,6	139,3	143,1	125,9	125,6	134,6	5,1321	5,1438	5,1555	5,0999	5,0990	5,1289
2	130,9	138,4	139,8	127,9	144,2	139,3	5,1170	5,1410	5,1456	5,1069	5,1589	5,1438
2,5	155,7	151,9	135,1	128,7	142,2	139,2	5,1921	5,1815	5,1305	5,1095	5,1530	5,1435
3	140,7	145,2	136,2	137,1	144,8	141,4	5,1484	5,1619	5,1343	5,1370	5,1607	5,1505
4	139,5	154,3	150,4	156,1	156,9	173,7	5,1447	5,1884	5,1772	5,1934	5,1957	5,2398
0,5+3	124,7	133,7	142,4	118,2	122,5	121,0	5,0957	5,1262	5,1536	5,0726	5,0882	5,0828
1+3	137,0	144,3	141,3	120,7	123,2	120,6	5,1368	5,1593	5,1500	5,0818	5,0905	5,0813
1,5+3	134,4	126,8	139,3	126,9	127,7	130,8	5,1283	5,1030	5,1438	5,1036	5,1061	5,1167
2+3	136,2	128,8	134,1	131,9	134,7	143,0	5,1341	5,1098	5,1273	5,1201	5,1292	5,1553
2,5+3	136,8	140,8	141,8	137,7	144,8	152,9	5,1359	5,1485	5,1518	5,1389	5,1607	5,1845
3+3	143,7	139,7	118,0	137,7	140,8	155,2	5,1576	5,1452	5,0716	5,1390	5,1486	5,1910
4+3	148,6	149,2	139,4	147,0	139,0	186,9	5,1720	5,1737	5,1441	5,1672	5,1431	5,2716
0,5+24	172,2	177,3	202,2	155,4	159,8	175,0	5,2563	5,2360	5,3058	5,1914	5,2037	5,2430
1+24	187,3	193,7	204,3	165,0	193,3	220,4	5,3051	5,2724	5,3102	5,2174	5,2862	5,3432
1,5+24	197,0	202,2	200,2	166,0	205,0	197,2	5,3295	5,2945	5,3014	5,2202	5,3118	5,2949
2+24	209,9	216,2	238,6	189,6	222,1	264,6	5,4005	5,3221	5,3776	5,2778	5,3466	5,4226
2,5+24	203,5	206,4	263,2	211,5	235,8	288,3	5,3492	5,3086	5,4203	5,3253	5,3725	5,4599
3+24	258,1	258,1	274,5	224,7	284,9	297,7	5,4299	5,4118	5,4385	5,3517	5,4547	5,4738
4+24	274,8	275,4	285,1	288,2	382,7	470,0	5,4674	5,4400	5,4550	5,4597	5,5829	5,6719

Vysvětlivky: zvýrazněná hodnota překračuje horní mez reprodukovatelnosti $R = 5,4399$

Tab. 3 Doporučení měření CPM pro praxi

A	B	C	D	E
teplota při transportu	doba expozice během transportu (max. 4 hodiny)	analýza vzorků ihned po svozu do laboratoře	analýza vzorků po svozu do laboratoře a uložení do lednice při teplotě 8 °C (max. 3 hodiny)	analýza vzorků po svozu do laboratoře a uložení do lednice při 8 °C (max. 24 hodin)
8 °C – 17 °C	≤ 3	ANO	ANO	ANO
8 °C – 17 °C	> 3 – ≤ 4	ANO	ANO	NE
20 °C	< 2,5	ANO	ANO	ANO
20 °C	> 2,5 – ≤ 4	ANO	ANO	NE
25 °C	< 2	ANO	ANO	ANO
25 °C	> 2 – ≤ 4	ANO	ANO	NE

Tab. 4 Výsledné hodnoty CPP (geometrický průměr) a log CPP v ovčím mléce

teplota (°C)	8	11	14	17	20	25	8	11	14	17	20	25
čas (hod)	geometrický průměr CPP (v tis. KTJ/ml)						log CPP					
0	16,4	16,4	16,4	16,4	16,4	16,4	4,2145	4,2145	4,2145	4,2145	4,2145	4,2145
0,5	13,5	16,1	15,2	14,9	12,9	15,0	4,1300	4,2074	4,1830	4,1740	4,1106	4,1748
1	11,9	14,6	16,4	17,6	13,5	15,4	4,0751	4,1655	4,2144	4,2445	4,1295	4,1877
1,5	13,7	15,1	17,8	17,5	14,2	18,4	4,1377	4,1780	4,2512	4,2423	4,1511	4,2643
2	14,0	17,4	18,5	20,4	20,3	34,3	4,1455	4,2403	4,2676	4,3097	4,3066	4,5353
2,5	20,7	16,0	16,7	19,8	25,8	36,0	4,3150	4,2047	4,2222	4,2973	4,4114	4,5559
3	17,1	14,1	19,0	25,9	37,1	41,5	4,2335	4,1505	4,2788	4,4130	4,5697	4,6179
4	19,8	13,2	16,1	26,7	58,9	59,3	4,2959	4,1208	4,2070	4,4272	4,7699	4,7733
0,5+3	16,4	18,4	19,5	17,2	16,4	17,3	4,2141	4,2640	4,2899	4,2349	4,2161	4,2378
1+3	19,0	22,0	21,7	20,0	17,7	27,9	4,2793	4,3417	4,3374	4,3021	4,2488	4,4459
1,5+3	23,4	22,7	21,5	8,1	24,8	32,1	4,3688	4,3556	4,3316	4,3622	4,3952	4,5071
2+3	23,3	27,1	26,3	30,7	34,4	32,1	4,3675	4,4324	4,4197	4,4872	4,5364	4,5065
2,5+3	21,5	23,8	27,8	29,2	43,2	36,9	4,3318	4,3758	4,4447	4,4653	4,6354	4,5668
3+3	23,8	24,0	30,2	38,0	45,8	46,9	4,3758	4,3796	4,4794	4,5802	4,6609	4,6707
4+3	24,5	25,9	32,2	45,9	61,8	99,2	4,3890	4,4128	4,5081	4,6617	4,7910	4,9965
0,5+24	146,6	84,2	97,8	105,5	118,5	142,2	5,1662	4,9254	4,9902	5,0231	5,0739	5,1528
1+24	137,5	95,5	100,5	107,9	113,4	169,5	5,1383	4,9802	5,0022	5,0328	5,0547	5,2291
1,5+24	198,9	104,1	115,5	114,4	132,3	231,0	5,2987	5,0173	5,0625	5,0585	5,1214	5,3636
2+24	196,6	104,7	125,0	114,2	150,4	240,6	5,2936	5,0200	5,0969	5,0577	5,1772	5,3814
2,5+24	189,7	114,1	152,8	149,8	179,9	308,4	5,2780	5,0573	5,1842	5,1755	5,2551	5,4892
3+24	227,8	149,6	177,3	187,0	222,0	346,5	5,3576	5,1750	5,2488	5,2719	5,3463	5,5397
4+24	270,8	183,4	173,8	211,9	350,9	457,0	5,4327	5,2633	5,2401	5,3262	5,5451	5,6599

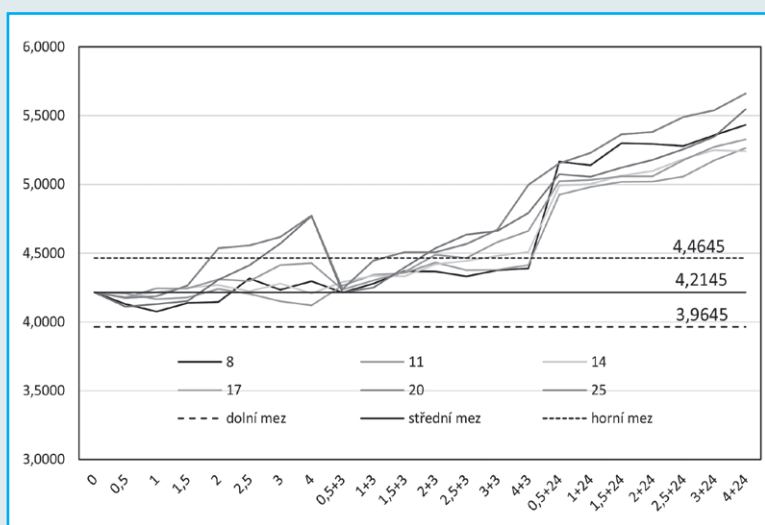
Vysvětlivky: zvýrazněná hodnota překračuje horní mez reprodukovatelnosti $R = 4,4645$

lyzován po 24 hodinách. Kultivace a vyhodnocení probíhala podle platných norem (CPM - ČSN EN ISO 4833-1, CPP - ČSN ISO 17410, Koli - ČSN ISO 4832, SA - ČSN EN ISO 6888-1, ČSN EN ISO 7218).

Výsledky a diskuse

Výpočet hodnoty reprodukovatelnosti R (nejistoty měření)

Pro každé stanovení mikrobiologických ukazatelů byla podle vzorce stanovena hodnota reprodukovatelnosti. V našem případě byla stanovena průměrná (z deseti měření) rozšířená nejistota z reprodukovatelnosti, tedy jako rozdíl mezi dvěma jednotlivými výsledky, získanými toutéž metodou, ale měřené různými pracovníky, a vypočtena podle



Graf 2 Vývoj CPP (log CPP) v ovčím mléce a mezní hodnoty reprodukovatelnosti ($4,2145 \pm 0,25 \log$)

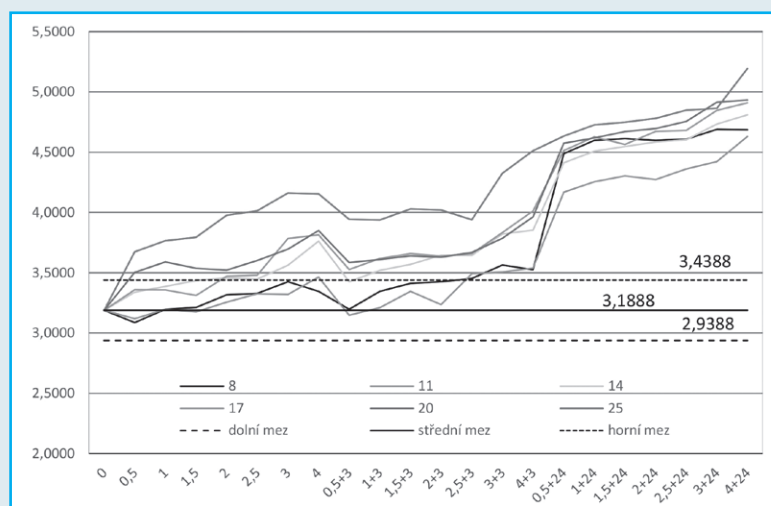
Tab. 5 Doporučení měření CPP pro praxi

A	B	C	D	E
teplota při transportu	doba expozice během transportu (max. 4 hodiny)	analýza vzorků ihned po svozu do laboratoře	analýza vzorků po svozu do laboratoře a uložení do lednice při teplotě 8 °C (max. 3 hodiny)	analýza vzorků po svozu do laboratoře a uložení do lednice při 8 °C (max. 24 hodin)
8 °C – 11 °C	≤ 4	ANO	ANO	NE
14 °C	≤ 2,5	ANO	ANO	NE
14 °C	> 2,5 – ≤ 4	ANO	NE	NE
17 °C – 20 °C	≤ 1,5	ANO	ANO	NE
17 °C – 20 °C	> 1,5 – ≤ 4	ANO	NE	NE
25 °C	≤ 1	ANO	ANO	NE
25 °C	> 1 – ≤ 4	ANO	NE	NE

Tab. 6 Výsledné hodnoty Koli (geometrický průměr) a log Koli v ovčím mléce

teplota (°C)	8	11	14	17	20	25	8	11	14	17	20	25
čas (hod)	geometrický průměr Koli (v tis. KTJ/ml)						log Koli					
0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	3,1888	3,1888	3,1888	3,1888	3,1888	3,1888
0,5	1,2	1,3	2,2	2,3	3,2	4,7	3,0863	3,1195	3,3389	3,3599	3,5033	3,6742
1	1,6	1,6	2,4	2,3	3,9	5,8	3,1967	3,1963	3,3866	3,3575	3,5886	3,7661
1,5	1,6	1,5	2,8	2,1	3,4	6,2	3,2114	3,1754	3,4362	3,3122	3,5374	3,7945
2	2,1	1,8	2,9	3,0	3,3	9,5	3,3178	3,2555	3,4579	3,4703	3,5214	3,9761
2,5	2,1	2,1	2,8	3,0	4,0	10,3	3,3293	3,3247	3,4474	3,4803	3,6014	4,0138
3	2,7	2,1	3,6	6,1	5,0	14,5	3,4250	3,3211	3,5620	3,7844	3,6960	4,1608
4	2,2	2,9	5,8	6,5	7,1	14,2	3,3459	3,4635	3,7624	3,8147	3,8499	4,1538
0,5+3	1,6	1,4	2,7	3,4	3,8	8,8	3,1976	3,1471	3,4254	3,5267	3,5842	3,9430
1+3	2,2	1,6	3,3	4,2	4,1	8,7	3,3459	3,2108	3,5197	3,6183	3,6091	3,9372
1,5+3	2,6	2,2	3,7	4,6	4,4	10,7	3,4110	3,3452	3,5685	3,6591	3,6403	4,0296
2+3	2,7	1,7	4,4	4,3	4,2	10,5	3,4247	3,2355	3,6454	3,6378	3,6279	4,0206
2,5+3	2,8	3,1	4,4	4,6	4,7	8,7	3,4518	3,4920	3,6443	3,6595	3,6696	3,9399
3+3	3,7	3,2	6,6	6,8	6,1	21,1	3,5635	3,5074	3,8219	3,8326	3,7862	4,3252
4+3	3,3	3,5	7,1	10,3	9,2	32,5	3,5248	3,5384	3,8539	4,0129	3,9634	4,5112
0,5+24	30,7	14,7	25,8	32,6	37,4	43,0	4,4872	4,1680	4,4114	4,5134	4,5734	4,6331
1+24	39,6	18,0	32,2	42,3	41,6	53,2	4,5979	4,2551	4,5081	4,6262	4,6188	4,7263
1,5+24	41,1	20,1	35,3	36,6	46,8	56,0	4,6137	4,3030	4,5476	4,5640	4,6703	4,7485
2+24	39,6	18,7	38,4	47,1	49,6	60,4	4,5972	4,2724	4,5846	4,6732	4,6953	4,7807
2,5+24	40,5	23,0	40,1	48,0	56,9	70,6	4,6075	4,3617	4,6036	4,6811	4,7553	4,8487
3+24	48,8	26,4	54,0	70,2	82,1	73,1	4,6886	4,4213	4,7326	4,8463	4,9145	4,8639
4+24	48,6	42,7	64,4	81,2	85,7	156,1	4,6866	4,6306	4,8090	4,9096	4,9329	5,1935

Vysvětlivky: zvýrazněná hodnota překračuje horní mez reprodukovatelnosti R = 3,4388



Graf 3 Vývoj Koli (log Koli) v ovčím mléce a mezní hodnoty reprodukovatelnosti (3,1888 ± 0,25 log)

vzorce. V Tabulce 1 jsou uvedeny průměrné hodnoty deseti výsledků s_x , hodnota reprodukovatelnosti je vyjádřena jako R log.

$$s_{x_n} = \sqrt{\frac{\sum d^2}{a}} \cdot 1,96,$$

kde s_{x_n} = nejistota měření; d = hodnota diference; a = počet naměřených hodnot.

Výsledky CPM

V Tabulce 2 a Grafu 1 jsou uvedeny výsledné hodnoty CPM a jejich limitní hodnoty (dolní a horní meze) reprodukovatelnosti $R = 0,30$ log. Výchozí (kontrolní) hodnota CPM je 5,1399 log, dolní mez reprodukovatelnosti je 4,8399 log a horní 5,4399 log CPM. Z výsled-

ných hodnot je zřejmé, že pokud dojde k porušení teploty během transportu vzorků mléka až na teplotu 25 °C po dobu 4 hodin, je možné stanovit CPM po svozu mléka do laboratoře nebo i po jeho uložení do lednice při 8 °C po dobu 3 hodin. Analýza vzorků, uložených po jejich svozu v lednici po dobu 24 hodin, je možná jen v některých případech (Tabulka 3).

Během měření dochází u ovčího mléka k výrazně pomalejšímu nárůstu CPM (0,5 log CPM) s teplotou a časem uchování vzorků než ve srovnání s kravským mlékem (1,5 log), jak popisují ve své dřívější práci Klimešová a kol. (2022; 2023). Příčina zjištěného jevu

pomalejšího nárůstu CPM oproti kravskému může být v důsledku aktivity některých bakteriostatických látek, jako např. laktoperoxidáza, lysozym, laktoferin a jiné bioaktivní peptidy (Haddadin a kol., 1996; Atanasova a Ivanova, 2010). Z výsledků je i zřejmé, že naměřené hodnoty splňují i navržené limity pro CPM ovčího mléka podle Klimešové a kol. (2019).

Výsledky CPP

V Tabulce 4 a Grafu 2 jsou uvedeny výsledné hodnoty CPP a jejich limitní hodnoty (dolní a horní meze) reprodukovatelnosti $R = 0,25$ log. Výchozí (kontrolní) hod-

Tab. 7 Doporučení měření Koli pro praxi

A	B	C	D	E
teplota při transportu	doba expozice během transportu (max. 4 hodiny)	analýza vzorků ihned po svozu do laboratoře	analýza vzorků po svozu do laboratoře a uložení do lednice při teplotě 8 °C (max. 3 hodiny)	analýza vzorků po svozu do laboratoře a uložení do lednice při 8 °C (max. 24 hodiny)
8 °C	≤ 2	ANO	ANO	NE
8 °C	> 2 – ≤ 4	ANO	NE	NE
11 °C	≤ 2	ANO	ANO	NE
11 °C	> 2 – ≤ 3	ANO	NE	NE
11 °C	> 3 – ≤ 4	NE	NE	NE
14 °C	≤ 0,5	ANO	ANO	NE
14 °C	> 0,5 – ≤ 1,5	ANO	NE	NE
14 °C	> 1,5 – ≤ 4	NE	NE	NE
17 °C	≤ 1,5	ANO	NE	NE
17 °C	> 1,5 – ≤ 4	NE	NE	NE
20 °C – 25 °C	= 0	ANO	NE	NE
20 °C – 25 °C	> 0 – ≤ 4	NE	NE	NE

Tab. 8 Výsledné hodnoty SA (geometrický průměr) a log SA v ovčím mléce

teplota (°C)	8	11	14	17	20	25	8	11	14	17	20	25
čas (hod)	geometrický průměr SA (v tis. KTJ/ml)						log SA					
0	431	431	431	431	431	431	2,6340	2,6340	2,6340	2,6340	2,6340	2,6340
0,5	374	400	444	405	446	475	2,5733	2,6016	2,6469	2,6070	2,6489	2,6767
1	381	426	453	460	417	475	2,5804	2,6298	2,6558	2,6629	2,6200	2,6769
1,5	411	427	444	460	483	505	2,6139	2,6308	2,6469	2,6626	2,6838	2,7033
2	421	487	453	505	504	493	2,6247	2,6879	2,6563	2,7034	2,7022	2,6926
2,5	451	452	445	447	510	562	2,6544	2,6554	2,6480	2,6499	2,7080	2,7497
3	465	465	490	491	524	550	2,6675	2,6673	2,6901	2,6907	2,7194	2,7406
4	489	489	505	468	519	681	2,6893	2,6891	2,7034	2,6705	2,7155	2,8332
0,5+3	495	411	470	473	442	485	2,6949	2,6134	2,6719	2,6748	2,6457	2,6861
1+3	493	462	514	439	413	432	2,6927	2,6645	2,7113	2,6429	2,6164	2,6358
1,5+3	500	454	507	445	467	520	2,6991	2,6575	2,7050	2,6479	2,6698	2,7162
2+3	495	464	500	487	464	522	2,6949	2,6665	2,6992	2,6876	2,6661	2,7180
2,5+3	507	458	507	467	492	559	2,7053	2,6608	2,7053	2,6693	2,6924	2,7477
3+3	500	419	477	529	493	614	2,6991	2,6224	2,6781	2,7236	2,6925	2,7881
4+3	520	450	501	508	472	637	2,7156	2,6530	2,7002	2,7058	2,6737	2,8044
0,5+24	403	375	363	379	426	466	2,6052	2,5740	2,5603	2,5791	2,6291	2,6679
1+24	409	414	420	402	413	526	2,6117	2,6169	2,6231	2,6046	2,6161	2,7209
1,5+24	429	397	387	463	418	497	2,6320	2,5993	2,5878	2,6651	2,6215	2,6966
2+24	446	415	415	444	419	509	2,6496	2,6178	2,6178	2,6477	2,6218	2,7064
2,5+24	438	396	421	468	454	535	2,6414	2,5975	2,6245	2,6704	2,6571	2,7286
3+24	436	414	411	440	444	545	2,6398	2,6169	2,6134	2,6439	2,6478	2,7361
4+24	410	449	422	485	486	588	2,6131	2,6526	2,6254	2,6859	2,6865	2,7696

Vysvětlivky: zvýrazněná hodnota překračuje horní mez reprodukovatelnosti $R = 2,7240$

Tab. 9 Doporučení měření SA pro praxi

A	B	C	D	E
teplota při transportu	doba expozice během transportu (max. 4 hodiny)	analýza vzorků ihned po svozu do laboratoře	analýza vzorků po svozu do laboratoře a uložení do lednice při teplotě 8 °C (max. 3 hodiny)	analýza vzorků po svozu do laboratoře a uložení do lednice při 8 °C (max. 24 hodin)
8 °C – 25 °C	≤ 4	ANO	ANO	ANO
25 °C	≤ 2	ANO	ANO	ANO
25 °C	> 2 – ≤ 4	NE	NE	NE

nota CPP je 4,2145 log, dolní mez reprodukovatelnosti je 3,9645 log a horní 4,4645 log CPP. Z výsledných hodnot lze konstatovat, že pokud dojde k porušení teploty během transportu vzorků mléka až na teplotu 25 °C po dobu 4 hodin, je možné stanovit CPP ihned po svozu mléka do laboratoře. Analýza vzorků uložených v lednici po dobu 3 hodin je různá pro každou sledovanou teplotu a dobu expozice a analýza vzorků, uložených do lednice po dobu 24 hodin, se nedoporučuje (Tabulka 4).

Výsledky Koli

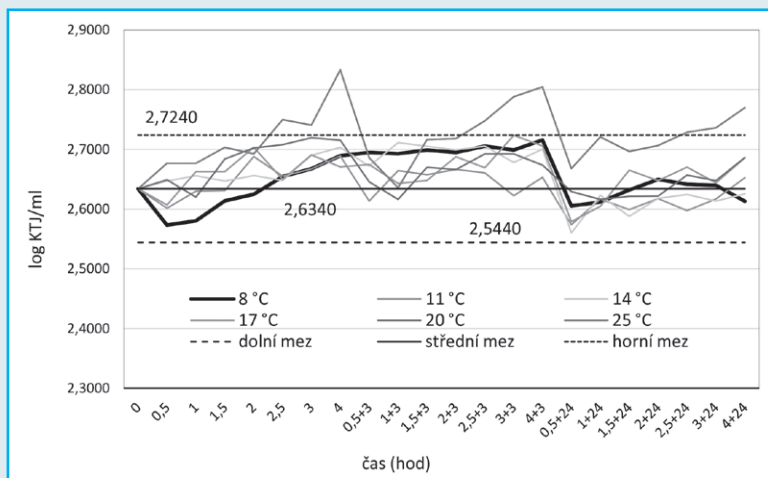
V Tabulce 6 a Grafu 3 jsou uvedeny výsledné hodnoty Koli a jejich limitní hodnoty (dolní a horní meze) reprodukovatelnosti $R = 0,25$ log. Výchozí (kontrolní) hodnota Koli je 3,1888 log, dolní mez reprodukovatelnosti je 2,9388 log a horní 3,4388 log Koli. Koliformní bakterie byly na porušení teploty během transportu nejcitlivější. Z výsledných hodnot je evidentní, že i při teplotě 8 °C je vhodnější analyzovat vzorky ihned po převzetí do laboratoře. Ostatní příklady doporučených analýz vzorků mléka při porušení teploty jsou podrobněji popsány v Tabulce 7. V tabulce je např. uvedeno, že při zvýšení teploty na 20 a 25 °C po dobu 0 až < 0,5 hodin, není vhodné vzorky analyzovat ani bezprostředně po svozu do laboratoře.

Výsledky SA

V Tabulce 8 a Grafu 4 jsou uvedeny výsledné hodnoty SA a jejich limitní hodnoty (dolní a horní meze) reprodukovatelnosti $R = 0,09$ log. Výchozí (kontrolní) hodnota SA je 2,6340 log, dolní mez reprodukovatelnosti je 2,5440 log a horní 2,7240 log SA. Z výsledných hodnot lze konstatovat, že pokud dojde k porušení teploty během transportu vzorků mléka až na teplotu 20 °C po dobu 4 hodin, je možné stanovit SA po svozu mléka do laboratoře a rovněž i po jeho uložení do lednice po dobu 3 až 24 hodin. Pro teplotu 25 °C se doporučují analýzy tak, jak je uvedeno v Tabulce 9.

Závěr

Z výsledků CPM a SA je zřejmé, že hodnoty ovčího mléka byly většinou v mezích reprodukovatelnosti a nejvyšší naměřený rozdíl byl u CPM 0,5 logaritického řádu a u SA 0,1. Hodnoty CPP a Koli se pohybovaly více



Graf 4 Vývoj SA (log SA) v ovčím mléce a mezní hodnoty reprodukovatelnosti ($2,6340 \pm 0,09$ log)

mimo mez reprodukovatelnosti a byly pro CPP 1,4 a Koli 2,0 log. Vzhledem k tomu, že každá laboratoř pracuje s určitými nejistotami měření, lze tyto mezní hodnoty modifikovat a přizpůsobit na podmínky každé laboratoře.

Poděkování:

Příspěvek vznikl za podpory projektů MZe ZEMĚ QK21020245 a MZe RO1424.

Literatura

- ATANASOVA J., IVANOVA I. (2010): Antibacterial peptides from goat and sheep milk proteins, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24 (2), s. 1799–1803. doi:10.2478/V10133-010-0049-8.
- ČSN EN ISO 4833-1 (2014): *Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů – Část 1: Technika přelivem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C.*
- ČSN EN ISO 6888-1 (2000): *Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků (Staphylococcus aureus a další druhy) – Část 1: Technika s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera*
- ČSN ISO 17410 (2020): *Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů*
- ČSN ISO 4832 (2010): *Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu koliformních bakterií – Technika počítání kolonií*
- ČSN EN ISO 707 (2009): *Mléko a mléčné výrobky – Návod na odběr vzorků.*
- ČSN EN ISO 7218 (2008): *Mikrobiologie potravin a krmiv – Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologická zkoušení.*
- HADDADIN M. S., IBRAHIM S. A., ROBNSON R. K. (1996): Preservation of raw milk by activation of the natural lactoperoxidase systems. *Food Control*, 7 (3), s. 149–152. doi.org/10.1016/0956-7135(96)00023-0.
- KLIMEŠOVÁ M., HANUŠ O., NEJESCHLEBOVÁ L., JEDELSKÁ R., KOPECKÝ J. (2019): Implementace limitního počtu mezofilních mikroorganismů v syrovém ovčím mléce do praxe (CPM-ovce). Schválená metodika, Vydal MILCOM a.s., Ke Dvoru 12a, Praha, ISBN 978-80-904348-6-8.

KLIMEŠOVÁ M., HANUŠ O., NEJESCHLEBOVÁ H., NECIDOVÁ L., BURSOVÁ Š., VORLOVÁ L., HARUŠTIAKOVÁ D., MARTÍNKOVÁ N. (2023): Transport vzorků pro mikrobiologické vyšetření – doporučení pro postup mikrobiologických analýz v syrovém mléce při porušení chladového režimu během transportu vzorků do laboratoře. Schválená metodika, Vydal MILCOM a.s., Ke Dvoru 12a, Praha. ISBN 978-80-88390-06-0.

KLIMEŠOVÁ M., NEJESCHLEBOVÁ H., VORLOVÁ L., NECIDOVÁ L., BURSOVÁ Š., HANUŠ O., NEJESCHLEBOVÁ L., VONDRUŠKOVÁ E., KOPECKÝ J. (2022): Vliv teploty na vybrané ukazatele syrového mléka. *Mlékařské listy (Zpravodaj)*, 194, 33 (5), s. 16–22.

Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potravinu živočišného původu.

Korespondující autor:

doc. RNDr. Marcela Klimešová, Ph.D.,
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a,
160 00 Praha 6, e-mail: marcela.vyletelova@seznam.cz

Přijato do tisku: 21. 10. 2024

Lektorováno: 13. 11. 2024

FUNKČNÍ VLASTNOSTI EXOPOLYSACHARIDŮ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Jiří Štětina¹, Ilaha Sultanova¹, Veronika Stetsenko¹,
Blanka Vrchotová¹, Ivana Hyršlová², Irena Němečková²

¹ Ústav mléka, tuků a kosmetiky, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze

² Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

Functional properties of exopolysaccharides of lactic acid bacteria

Abstrakt

Byl stanoven obsah exopolysacharidů 4 vybraných kmenů bakterií jogurtové kultury (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCDM 66, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCDM 767, *Streptococcus thermophilus* CCDM 129, *Streptococcus thermophilus* CCDM 144) po kultivaci v mléce a byly charakterizovány reologické vlastnosti a synereze jogurtů s rozmíchaným a nerozmíchaným koagulátem vyrobených pomocí kultur vytvořených jejich kombinací. Obsah exopolysacharidů se pohyboval v rozmezí 13 – 129 mg/L. Nejvyšší pevnosti gelu, zdánlivé viskozity rozmíchaného koagulátu a nejnižší synereze bylo dosaženo při fermentaci kulturou *L. bulgaricus* CCDM 767 a *Str. thermophilus* CCDM 144. Tato kultura ovšem poskytovala nejnižší mez toku rozmíchaného koagulátu. Nejnižší pevnost gelu a zdánlivé viskozity rozmíchaného koagulátu bylo dosaženo při fermentaci kulturou *L. bulgaricus* CCDM 66 a *Str. thermophilus* CCDM 129. Jogurt vyrobený pomocí kul-

tury *L. bulgaricus* CCDM 66 a *Str. thermophilus* CCDM 144 vykazoval významné zvýšení synereze, což ukazuje na riziko nevhodné kombinace exopolysacharidů kmenů bakterií mléčného kvašení.

Klíčová slova: jogurt, exopolysacharidy, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, pevnost gelu, zdánlivá viskozita, synereze

Abstract

The content of exopolysaccharides of 4 selected strains of lactic acid bacteria from yogurt starter (*Lactobacillus bulgaricus* CCDM 66, *Lactobacillus bulgaricus* CCDM 767, *Streptococcus thermophilus* CCDM 129, *Streptococcus thermophilus* CCDM 144) was determined after cultivation in milk, and the rheological properties and syneresis of set-type and stirred-type yogurts produced using cultures created by their combination. The content of exopolysaccharides ranged from 13 to 129 mg/L. The highest gel strength, apparent viscosity of the stirred coagulum and the lowest syneresis were achieved during fermentation with starter *L. bulgaricus* CCDM 767 and *Str. thermophilus* CCDM 144. However, this culture provided the lowest yield stress of the stirred coagulum. The lowest gel strength and apparent viscosity was achieved during fermentation with *Lactobacillus bulgaricus* CCDM 66 and *Streptococcus thermophilus* CCDM 129. Yogurt produced using *Lactobacillus bulgaricus* CCDM 66 and *Str. thermophilus* CCDM 144 showed a significant increase in syneresis, indicating the risk of inappropriate combination of exopolysaccharides of lactic acid bacteria strains.

Key words: yogurt, exopolysaccharides, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, gel strength, apparent viscosity, syneresis

Úvod

Řada bakterií mléčného kvašení produkuje při fermentaci extracelulární polymery tzv. exopolysacharidy (EPS), které ovlivňují texturu mléčných výrobků, zvyšují viskozitu vodné fáze, zvyšují tuhost gelu mléčných bílkovin, vaznost vody a snižují jeho synerezi. Jedná se o velmi různorodou skupinu obvykle heteropolysacharidů tvořených z opakujících se podjednotek 3–8 různých monosacharidů, hlavně glukózy, galaktózy, rhamnózy, N-acetylglukosaminu nebo N-acetylgalaktosaminu, případně kyseliny glukuronové. (Broadbent, McMahon et al. 2003). Podle zastoupení monomerů pak mohou být EPS neutrální, či anionické, což pak určuje jejich interakce s mléčnými bílkoviny. Ke složitosti chemické struktury EPS přispívá variabilita vazebných pozic monosacharidů, velikost opakujících se jednotek a počet a délka postranních řetězců. Další variabilitou EPS je molekulová hmotnost, která se pohybuje v rozmezí od 10 do 1 000 kDa. β -1,4- glykosidické vazby vedou k tužším řetězcům než β -1,2-, β -1,3- nebo β -1,6- vazby