

Vyhláška č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje, Sbírka zákonů České republiky, Částka 162, s. 6261–6285.

WALSTRA P., GEURTS T.J., NOOMEN A., JELLEMA A., van BOEKEL M.A.J.S. (1999): *Dairy technology*. New York: Marcel Dekker, 727 s.

YAMAMOTO E., WATANABE R., TOOYAMA E., KIMURA K. (2021): Effect of fumaric acid on the growth of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* during yogurt fermentation. *Journal of Dairy Science*, 104, s. 9617–9626.

Korespondující autor:

MVDr. Navrátilová Pavlína, Ph.D.

Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, e-mail: navratilovap@vfu.cz

Přijato do tisku: 27. 7. 2023

Lektorováno: 14. 8. 2023

VLIV KVASINEK A PROTOTÉK NA CHEMICKÉ SLOŽENÍ A TECHNOLOGICKÉ VLASTNOSTI MLÉKA

Hana Nejeschlebová, Oto Hanuš, Petr Roubal, Jaroslav Kopecký, Ludmila Nejeschlebová
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

The influence of yeasts and *Prototheca* algae on chemical composition of milk and its technological properties

Abstrakt

Kvasinky a prototéky jsou organismy s ubikvitárním výskytem, ale také původci mykotických mastitid, které jsou v posledních letech na vzestupu. Cílem této práce bylo posoudit vliv přítomnosti kvasinek a prototék na změny ve složení syrového kravského mléka (obsah tuku, bílkovin, laktosu, tukuprosté sušiny, močoviny) a vliv na jeho technologické vlastnosti (pH, titrační kyselost, kysací schopnost a syřitelnost) po inokulaci kulturami těchto mikroorganismů a následné úchově mléka 48 hodin při 6 °C. Přestože izoláty kvasinek a prototék použité k testování disponovaly lipolytickou nebo proteolytickou aktivitou, případně oběma typy lytické aktivity, nebyla zaznamenána výrazná změna mezi složením mléka a technologickými vlastnostmi u původního vzorku mléka a jeho alikvoty inokulovanými různými izoláty kvasinek (n=7) nebo prototék (n=7). Taktéž další testování složení a technologických vlastností neukázalo významný rozdíl ($P > 0,05$) mezi různými vzorky mléka v původním stavu (n=6) a totožnými vzorky po inokulaci izolátem *Yarrowia lipolytica* (*Y. lipolytica*) nebo *Candida famata* (*C. famata*). Rovněž nebyly zjištěny významné rozdíly ($P > 0,05$) při inokulaci *Prototheca bovis* (*P. bo-*

vis). Skladování mléka inokulovaného rozdílnými izoláty kvasinek a prototék nevedlo ani po 48 hodinách úchovy při 6 °C k významné změně jejich počtu ($P > 0,05$), stejně tak nedošlo k navýšení ($P > 0,05$) počtu kvasinek ani prototék po zaočkování *Y. lipolytica*, *C. famata* nebo *P. bovis* do různých vzorků mléka. Lze předpokládat, že poškození mléka se spíše než pouhou přítomností těchto mikroorganismů v mléce projeví vlivem kvasinkové či prototékové mastitidy, případně až u mléčného výrobku v průběhu jeho delšího skladování nebo nedodržení chladiřenského režimu úchovy.

Klíčová slova: kvasinky, prototéky, mastitida, proteolýza, lipolýza, chemické složení, technologické vlastnosti.

Abstract

Yeasts and *Prototheca* are ubiquitous organisms, but also the causative agents of mycotic mastitis, which has been on the rise in recent years. The aim of this work was to assess the influence of the presence of yeasts and *Prototheca* on the composition of raw cow's milk (fat, protein, lactose, non-fat solids and urea content) and its technological properties (pH, titratable acidity, yoghurt test and rennetability) after inoculation by cultures of these microorganisms and subsequent storage of milk for 48 hours at 6 °C. Yeast and *Prototheca* isolates used for the testing showed lipolytic or proteolytic activity, or both types of the lytic activity. Nevertheless, no distinct change was noted between milk composition and technological properties in the original milk sample and its aliquots inoculated with different yeast (n=7) or *Prototheca* isolates (n=7). Also, further composition and technological properties testing did not show a significant difference ($P > 0.05$) between different milk samples in their original state (n=6) and these samples after inoculation with *Yarrowia lipolytica* (*Y. lipolytica*) or *Candida famata* (*C. famata*). Non-significant differences ($P > 0.05$) were also found with *Prototheca bovis* (*P. bovis*) inoculation. Storage of milk inoculated with different yeast and *Prototheca* isolates did not lead to a significant change in colony count for either organism after 48 hours at 6 °C ($P > 0.05$). Likewise, there was no increase ($P > 0.05$) in the yeast or *Prototheca* count after inoculation with *Y. lipolytica*, *C. famata* or *P. bovis* into different milk samples. It can be assumed, that the deterioration of milk may be caused by mycotic mastitis rather than by the mere presence of yeasts or *Prototheca*, or will occur in dairy product during its longer storage or non-compliance with the refrigeration storage regime.

Key words: yeasts, *Prototheca*, mastitis, proteolysis, lipolysis, chemical composition, technological properties.

Úvod

Kvasinky a řasy jsou organismy s ubikvitárním výskytem. Vyskytují se mezi nimi i oportunní patogeny lidí a zvířat, přičemž u kvasinek se jedná zejména o zástupce

rodu *Candida* (Sautour a kol., 2021) a u řas rodu *Prototheca* (Shave a kol., 2021). Do mléka se tyto mikroorganismy mohou dostat kontaminací z vnějšího prostředí nebo přímo z mléčné žlázy postižené mykotickou mastitidou. Právě mykotickým mastitidám začala být v poslední době věnována zvýšená pozornost související s jejich výskytem jako původcem mastitid s prevalencí srovnatelnou s „tradičními“ bakteriálními patogeny (Jagielski a kol. 2019a, b; Lavaee a kol. 2019; Zeconi a kol. 2020).

Kvasinky jsou obvykle zodpovědné za alespoň 10 % případů mastitid ve stádě (Krukowski a kol., 2001; Dworecka-Kaszak a kol., 2012). V bazénových vzorcích mléka se kvasinky většinou vyskytují v řádech 10^1 až 10^3 KTJ/ml (Torkar a Vengušt, 2008; Lavoie a kol., 2012). Kvasinky disponují bohatou enzymatickou výbavou, která je využívána pro biotechnologické aplikace, může však být také příčinou kažení potravin. Kažení mléčných výrobků v důsledku pomnožení kvasinek se projevuje typickým kvasinkovým a fermentačním aromatem, které je patrné, pokud počet kvasinek dosáhne 10^5 až 10^6 KTJ/g. Vzhledem k tomu, že kvasinky jsou za chladových podmínek obvykle rychle přerůstány psychrotrofními mikroorganismy a pasterací jsou devitalizovány, je kažení výrobků v souvislosti s přítomností kvasinek zpravidla způsobeno sekundární kontaminací (Garnier a kol., 2017).

Prototékové mastitidy byly v minulosti popisovány především jako problém tropických a subtropických oblastí, v současné době se jeví jako závažný problém chovů dojníc i v mírném klimatu (Jagielski a kol. 2019a, b). Costa a kol. (1998) zaznamenali na šesti farmách s výskytem *Prototheca* spp. jako mastitidního původce počet kolonií *Prototheca* spp. v bazénových vzorcích mléka v rozmezí 1×10 až 3×10^4 KTJ/ml. Zatímco vliv kvasinek na kvalitu mléka a mléčných výrobků byl podrobně popsán, v případě prototék, kterým donedávna nebyla věnována větší pozornost, jsou tyto informace nedostatečné. U kmenů *Prototheca bovis* (*P. bovis*) izolovaných z mastitidního mléka byla zjištěna enzymatická aktivita fosfatázy, leucin arylamidázy, naftol-AS-BI-fosfohydrolázy, esterázy, lipázy esterázy, valin arylamidázy, alkalické fosfatázy a lipázy C 14 (Krukowski a kol. 2012). Seydlová a kol. (2009) popsali výrazné změny ve složení mléka po jeho masivnější inokulaci kulturou *P. bovis* v důsledku lytické činnosti enzymů. Izoláty prototék vykazují značnou variabilitu v odolnosti vůči pasteračním teplotám. Marques a kol. (2010) zaznamenali úplnou devitalizaci *P. blaschkeae* až při ohřevu infikovaného mléka na 100 °C po dobu 1 sekundy. Melville a kol. (1999) popsali u izolátů *P. bovis* při aplikaci tepelného účinku 72–75 °C/15 s, 72–75 °C/20 s a 62–65 °C/30 minut rezistenci k záhřevu u každého izolátu alespoň k jedné kombinaci teploty a času.

Cílem této práce bylo sledovat vliv izolátů kvasinek a prototék izolovaných z bazénových vzorků mléka na chemické složení a technologické vlastnosti mléka po jeho umělé inokulaci kulturami těchto izolátů.

Metodika

Izoláty kvasinek a prototék

Izoláty kvasinek a prototék vybrané k testování (tabulka 1 a 2) byly získány ze sbírky kvasinek a prototék izolovaných z bazénových vzorků syrového kravského mléka a uchovávaných ve zmrazeném stavu. Vybrané kmeny byly rozmrazeny, pomnoženy v BHI bujonu (Oxoid, Basingstoke, UK) při teplotě 25 °C po dobu 24 hodin, vyočkovány na povrch GKCH agaru (Milcom, Tábor, CZ) a kultivovány při teplotě 25 °C po dobu 72 hodin. Lytická aktivita izolátů byla stanovena dle Klimešové a kol. (2021).

Příprava suspenzí pro inokulaci mléka

Z izolátů kvasinek a prototék vyrostlých na GKCH agaru byly připraveny suspenze o zákalu 4,5 (kvasinky) a 2,5 (prototéky) stupně McFarlanda, které byly následně inkubovány (30 °C, 24 hodin) a poté použity k zaočkování mléka. Jako ředící medium byl použit bujón s glukosou 5 g/L (Lach-Ner, Neratovice, CZ) a kvasničním extraktem 20 g/L (HiMedia, Mumbai, IND). Jako médium pro zaočkování izoláty sloužily bazénové vzorky syrového kravského mléka. Pro ověření kvality byl u tohoto mléka stanoven počet somatických buněk, celkový počet mikroorganismů, počet kvasinek a přítomnost prototék.

Testování vlivu kvasinek a prototék na složení a technologické vlastnosti mléka

Každý ze 2 různých bazénových vzorků mléka byl rozdělen na 8 alikvot. Jeden alikvot byl ponechán ve svém nativním stavu (kontrola) a každý ze zbývajících 7 alikvot byl pak inokulován 0,1 ml (kvasinky) nebo 2,5 ml (prototéky) kultury rozdílných izolátů kvasinek ($n=7$) nebo prototék ($n=7$). Kontrolní a inokulované vzorky byly uloženy do lednice (6 °C) a po 48 hodinách připraveny ke stanovení chemického složení, aktivní kyselosti, titrační kyselosti, kysací schopnosti mléka a syřitelnosti.

Dále bylo provedeno testování s izoláty, které vykazaly vyšší produkci lytických enzymů, a to *Yarrowia lipolytica* (*Y. lipolytica*) 3-1-M5; *Candida famata* (*C. famata*) 3-6-M10; *P. bovis* 3-11-M). Těmito izoláty bylo jednotlivě inokulováno (0,1 ml kultury kvasinek; 2,5 ml kultury prototéky) vždy 6 různých bazénových vzorků mléka. Neinokulované alikvoty každého vzorku byly ponechány jako kontrola. Další postup byl shodný s postupem předchozím.

Po inokulaci a poté po 48 hodinách od inokulace mléka bylo vždy provedeno stanovení počtu kvasinek a prototék.

Mikrobiologické analýzy

Pro stanovení přítomnosti *Prototheca* spp. v nativních vzorcích byl proveden křížový roztěr na GKCH agar. Plotny s GKCH agarem byly následně inkubovány 5 dnů při 25 °C. Konfirmace byla provedena makroskopicky posouzením morfologie vyrostlých kolonií a mikroskopicky po obarvení methylenovou modří. Počet kvasinek byl stanoven dle ČSN ISO 6611:2009. Počet prototék byl

stanoven po inokulaci Petriho misek desetinásobnými ředěními vzorků, zalití GKCH agarem, inkubaci 5 dnů při 25 °C a konfirmaci (viz výše). Přítomnost celkového počtu mikroorganismů byla stanovena dle ISO 4833-1: 2014.

Mléčné analýzy

Tuk (%), hrubé bílkoviny (%), laktosa (monohydrát, %), tukuprostá sušina (%) a močovina (mg/l) byly stanoveny infračerveným spektrometrem s Fourierovou transformací DairySpec FT (Bentley Instruments, Chaska, MN, USA) pravidelně kalibrovaným dle výsledků referenčních metod.

Aktivní kyselost byla stanovena pH-metrem 1100L (VWR, Darmstadt, DE) kalibrovaným na roztoky standardních pufrů (pH 4,0 a 7,0) při 20 °C. Titrační kyselost byla stanovena alkalimetrickou titrací 100 ml mléka roztokem NaOH 0,25 N na indikátor fenolftalein ve stupních podle Soxhlet-Henkela ($^{\circ}\text{SH} = v \text{ ml} \times 2,5 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaOH}$). Kysací schopnost mléka (jogurtový test) byla stanovena alkalimetrickou titrací mléka roztokem NaOH 0,25 N na indikátor fenolftalein ve stupních podle Soxhlet-Henkela. Stanovení bylo provedeno s termofilní jogurtovou kulturou YC-180, 50U (Chr. Hansen, DK), která byla použita jako 1% přídatek k inokulaci 25 ml pasterovaného mléka o teplotě 43 °C, inkubace činila 3,5 hodiny při 43 °C. Syřitelnost byla stanovena jako čas enzymatické koagulace mléka (v sekundách) po přidavku

bakteriálního syřidla Fromase 220 TL BF (Royal DSM, Heerlen, NL) do 50 ml mléka a inkubaci při teplotě 32 °C ve vodní lázni, pevnost syřeniny jako propad (v cm) tělíska koláčem syřeniny za konstantních podmínek (čím méně cm, tím kvalitnější syřenina) a jako objem syrovátky vypuzené koláčem syřeniny z 50 ml mléka v procesu synereze (ml).

Počet somatických buněk byl stanoven průtokovou cytometrií na přístroji Somacount 300 (Bentley Instruments, Chaska, MN, USA).

Statistické postupy

Pro výsledky chemického složení mléka, technologických vlastností a počtu kvasinek a prototék byly vypočteny základní statistické charakteristiky (aritmetický průměr $\bar{x}$, směrodatná odchylka s_x , variační koeficient v_x). Pro testování rozdílů v průměrných hodnotách chemického složení a technologických vlastností původního mléka bez inokulace a inokulovaného mléka a rozdílů v průměrných hodnotách počtu kvasinek a prototék v čase inokulace a po 48 hodinách od inokulace byl použit párový t -test. Výsledky času enzymatické koagulace a počtu kvasinek a prototék byly pro provedení t -testu logaritmicky transformovány ($\log_{10}$). Všechny výpočty byly provedeny v programu MS Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA).

Výsledky

Tab. 1 Testované izoláty kvasinek a jejich lytická aktivita

Označení izolátu	Druh kvasinky	Proteolýza	Lipolýza
3-1-M5	<i>Y. lipolytica</i>	++++	++++
1-26-M	<i>C. rugosa</i>	–	++
3-3-M3	<i>Y. lipolytica</i>	++++	++++
1-6-M	<i>C. kefir</i>	++	+
1-53-M2	<i>C. inconspicua</i>	–	+++
20-1-8-M1	<i>C. lusitanae</i>	–	+
3-6-M10	<i>C. famata</i>	++	–

Y. = *Yarrowia*; C. = *Candida*; – = negativní proteolýza; + = intenzita pozitivní lipolýzy

Tab. 2 Testované izoláty prototék a jejich lytická aktivita

Označení izolátu	Druh prototéky	Proteolýza	Lipolýza
3-10-M3	<i>P. blaschkeae</i>	–	++
3-11-M	<i>P. bovis</i>	–	++
3-20-M5	<i>P. bovis</i>	–	++
21-1-16-M2	<i>P. bovis</i>	–	+
21-1-16-M3	<i>P. bovis</i>	–	++
21-2-31-M2	<i>P. bovis</i>	–	+
21-1-30-M5	<i>P. bovis</i>	–	++

P. = *Prototheca*; – = negativní proteolýza; + = intenzita pozitivní lipolýzy

Tab. 3 Ukazatele nativního mléka použitého k testování

Přítomnost <i>Prototheca</i> spp.	negativní
Celkový počet mikroorganismů (KTJ $\times$ ml $^{-1}$)	$6,3 \times 10^3$ až $2,1 \times 10^4$
Počet kvasinek (KTJ $\times$ ml $^{-1}$)	$9,1 \times 10^1$ až $2,2 \times 10^2$
Počet somatických buněk ($10^3 \times$ ml $^{-1}$)	192 až 205

Testování lytické aktivity ukázalo lipolytickou aktivitu u 6 izolátů kvasinek, přičemž nejintenzivnější lipolýza byla patrná u obou izolátů *Y. lipolytica*. Proteolytickou aktivitu vykázaly 4 izoláty kvasinek, nejintenzivnější proteolýza se vyskytovala rovněž u *Y. lipolytica* (tabulka 1). Každý izolát kvasinek vykázal alespoň jeden typ lytické aktivity. Každý ze 7 izolátů prototék vykázal lipolytickou aktivitu a naopak žádný nevykázal proteolytickou aktivitu (tabulka 2).

Parametry mléka použitého jako médium k zaočkování izoláty kvasinek a prototék jsou uvedeny v tabulce 3. Obsah složek mléka inokulovaného různými izoláty kvasinek ($n=7$) a kontrolního vzorku po 48 hodinách skladování při 6 °C se lišily pouze v rámci relevantních směrodatných odchylek měření. Směrodatná odchylka opakovatelnosti měření základních složek inokulovaných vzorků mléka a kontroly se pohybovala v rozmezí od 0,01 do 0,02 %, směrodatná odchylka opakovatelnosti pro močovinu činila 4,4 mg/l. Rovněž technologické vlastnosti inokulovaných vzorků a kontrolního vzorku se lišily pouze minimálně (tabulka 4).

Podobně se obsah složek mléka inokulovaného různými izoláty prototék ($n=7$) a kontrolního vzorku po 48 hodinách skladování při 6 °C lišil pouze v rámci relevantních směrodatných odchylek opakovatelnosti (od 0,01 do 0,02% pro základní složky, 8,70 mg/l pro močovinu). Technologické vlastnosti inokulovaných vzorků a kontrolního vzorku se taktéž výrazně nelišily (tabulka 5).

Tab. 4 Složení a technologické vlastnosti mléka inokulovaného různými izoláty kvasinek a původního vzorku mléka po skladování 48 hodin při 6 °C

Izolát	T %	B %	L %	TPS %	M mg/l	pH	TK °SH	KS °SH	Č s	P cm	O ml
3-1-M5	4,27	3,45	4,86	9,05	269,2	6,73	9,01	25,16	123	1,9	27
1-26-M	4,27	3,46	4,88	9,09	266,2	6,76	9,33	23,74	124	1,9	23
3-3 M3	4,27	3,47	4,88	9,09	261,5	6,76	8,89	23,29	100	1,9	23
1-6-M	4,27	3,47	4,88	9,10	265,0	6,76	8,93	24,15	96	1,9	26
1-53-M2	4,26	3,47	4,88	9,10	263,8	6,76	9,01	25,40	107	1,9	24
20-1-8-M1	4,25	3,47	4,87	9,09	275,6	6,76	9,05	22,36	98	1,9	25
3-6-M10	4,26	3,47	4,88	9,10	267,9	6,76	9,17	24,23	92	1,9	25
KO	4,25	3,47	4,88	9,10	263,8	6,76	9,25	24,96	104	1,9	25
x	4,26	3,46	4,87	9,09	266,6	6,76	9,08	24,16	106	1,9	25
sx	0,01	0,01	0,01	0,02	4,39	0,01	0,16	1,03	12,02	0,00	1,39
vx	0,2	0,2	0,2	0,2	1,6	0,2	1,7	4,2	11,4	0,0	5,6

x = aritmetický průměr; sx = směrodatná odchylka; vx = variační koeficient; KO = kontrolní (nativní vzorek) mléka bez inokulace; T = obsah tuku; B = obsah hrubých bílkovin; L = obsah monohydrátu laktózy; TPS = obsah tukuprosté sušiny; M = koncentrace **oviny; pH = aktivní kyselost mléka; TK = titrační kyselost mléka; KS = kysací schopnost mléka; Č = syřitelnost jako čas enzymatické koagulace mléka, P = pevnost syřeniny; O = objem syřeniny.

Tab. 5 Složení a technologické vlastnosti mléka inokulovaného různými izoláty prototék a původního vzorku mléka po skladování 48 hodin při 6 °C

Izolát	T %	B %	L %	TPS %	M mg/l	pH	TK °SH	KS °SH	Č s	P cm	O ml
3-10-M3	3,91	3,06	5,03	8,73	175,2	6,72	7,91	28,61	148	2,1	14
3-11-M	3,92	3,05	5,03	8,72	191,6	6,73	7,91	28,53	150	2,1	16
3-20-M5	3,91	3,06	5,03	8,73	196,8	6,72	7,87	28,53	158	2,0	15
21-1-16-M2	3,91	3,06	5,03	8,73	179,8	6,72	7,83	28,61	159	2,0	17
21-1-16-M3	3,90	3,06	5,03	8,73	175,0	6,72	7,63	28,61	137	2,1	16
21-2-31-M2	3,90	3,06	5,03	8,73	172,6	6,72	7,75	28,73	149	2,1	14
21-1-30-M5	3,91	3,06	5,03	8,73	185,0	6,72	7,91	28,08	147	2,1	12
KO	3,90	3,06	5,03	8,74	177,3	6,73	8,12	29	160	2,1	14
x	3,91	3,06	5,03	8,73	181,6	6,72	7,87	28,65	151	2,1	15
sx	0,01	0,00	0,00	0,01	8,70	0,00	0,14	0,38	7,75	0,05	1,58
vx	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,02	0,01	0,05	0,02	0,11

Vysvětlivky jsou uvedeny pod tab. 4.

Tab. 6 Složení a technologické vlastnosti vzorků mléka v původním stavu a inokulovaných *Y. lipolytica* a *C. famata* po 48 hodinách skladování při 6 °C, (n=6)

		T %	B %	L %	TPS %	M mg/l	pH	TK °SH	KS °SH	Č s	logČ	P cm	O ml
KO	x	4,08	3,31	4,91	8,94	248,7	6,70	9,63	30,63	77	1,88	1,9	29
	sx	0,53	0,18	0,03	0,16	74,62	0,03	0,33	3,23	17,94	0,10	0,09	2,55
	vx	13,0	5,5	0,7	1,8	30,0	0,5	3,4	10,6	23,4	5,2	4,6	8,8
<i>Y. lipolytica</i> 3-1-M5	x	4,09	3,31	4,91	8,94	253,8	6,70	9,64	31,09	72	1,85	1,9	30
	sx	0,54	0,18	0,03	0,16	77,09	0,04	0,29	3,86	16,01	0,10	0,00	3,08
	vx	13,2	5,5	0,7	1,8	30,4	0,5	3,0	12,4	22,1	5,4	0,0	10,3
	t_f	0,78	0,89	0,00	1,41	1,67	0,37	0,13	0,92	1,61	1,73	0,89	1,41
	význ.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>C. famata</i> 3-6-M10	x	4,09	3,31	4,91	8,94	252,0	6,70	9,59	30,64	76	1,87	1,9	29
	sx	0,53	0,19	0,04	0,16	76,38	0,03	0,37	4,71	15,18	0,09	0,09	2,77
	vx	13,1	5,6	0,7	1,8	30,3	0,5	3,8	15,4	20,1	4,5	4,6	9,5
	t_f	0,50	0,37	0,48	0,37	0,88	0,00	0,31	0,01	0,69	0,51	0,00	0,48
	význ.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Vysvětlivky jsou uvedeny pod tab. 1 a 4. Počet stupňů volnosti 5. t_f = hodnota kritéria párového t -testu mezi kontrolními vzorky a vzorky inokulovanými *Y. lipolytica*; t_f = hodnota kritéria párového t -testu mezi kontrolními vzorky a vzorky inokulovanými *C. famata*; význ. = statistická významnost: ns = $P > 0,05$.

Různé vzorky mléka (n=6) inokulované izolátem *Y. lipolytica* a vzorky inokulované izolátem *C. famata* se po skladování po dobu 48 hodin při 6 °C významně

nelišíly ($P > 0,05$) v obsahu složek ani technologických vlastnostech od neinokulovaných vzorků, a to v obou případech (tabulka 6). Za stejných podmínek skladování

Tab. 7 Složení a technologické vlastnosti vzorků mléka v původním stavu a inokulovaných *P. bovis* po 48 hodinách skladování při 6 °C, (n=6)

		T %	B %	L %	TPS %	M mg/l	pH	TK °SH	KS °SH	Č s	logČ	P cm	O ml
KO	x	4,07	3,31	4,95	8,93	236,9	6,69	9,58	30,14	85,50	1,91	1,98	25,17
	sx	0,49	0,25	0,05	0,20	72,90	0,04	0,85	0,87	37,31	0,15	0,10	5,88
	vx	12,1	7,5	0,9	2,3	30,8	0,6	8,9	2,9	43,6	8,1	5,0	23,4
<i>P. bovis</i> 3-11-M	x	4,07	3,30	4,94	8,92	244,3	6,68	9,64	30,12	83,25	1,90	1,95	25,83
	sx	0,49	0,25	0,05	0,20	73,26	0,04	0,91	0,94	34,54	0,15	0,12	5,42
	vx	12,1	7,5	1,0	2,2	30,0	0,6	9,4	3,1	41,5	8,1	6,3	21,0
	t	0,36	1,77	1,90	1,98	1,98	0,96	0,57	0,05	0,46	0,36	1,34	1,83
	význ.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Vysvětlivky jsou uvedeny pod tab. 2, 4 a 6. Počet stupňů volnosti 5. *t* = hodnota kritéria párového *t*-testu mezi kontrolními vzorky a vzorky inokulovanými *P. bovis*.

Tab. 8 Počet kvasinek a prototék v mléce po inokulaci mléka různými izoláty a po 48 hodinách při 6 °C (log KTJ/ml), (n=7)

	Počet kvasinek		Počet prototék	
	0 hod	48 hod	0 hod	48 hod
x	4,53	4,52	4,36	4,41
sx	0,15	0,19	0,20	0,21
vx	3,4	4,1	0,05	0,05
<i>t</i>	0,30		1,65	
význ.	ns		ns	

Vysvětlivky jsou uvedeny pod tab. 4 a 6. Počet stupňů volnosti 6. *t* = hodnota kritéria párového *t*-testu mezi počtem kolonií v čase 0 hodin a 48 hodin.

Tab. 9 Počet kvasinek po inokulaci různých vzorků mléka *Y. lipolytica*, *C. famata* a po 48 hodinách při 6 °C (log KTJ/ml), (n=6)

	<i>Y. lipolytica</i>		<i>C. famata</i>	
	0 hod	48 hod	0 hod	48 hod
x	4,54	4,51	4,33	4,38
sx	0,03	0,06	0,03	0,05
vx	0,7	1,4	0,7	1,2
<i>t</i>	1,59		1,58	
význ.	ns		ns	

Vysvětlivky jsou uvedeny pod tab. 4 a 6. Počet stupňů volnosti 6. *t* = hodnota kritéria párového *t*-testu mezi počtem kolonií v čase 0 hodin a 48 hodin.

nebyl zaznamenán významný rozdíl ($P > 0,05$) v obsahu žádné ze sledovaných složek ani v žádné z technologických vlastností ve vzorcích mléka (n=6) inokulovaných izolátem *P. bovis* a neinokulovaných vzorků (tabulka 7).

Skladování vzorků mléka inokulovaných rozdílnými izoláty kvasinek a prototék nevedlo po 48 hodinách skladování při 6 °C k navýšení ($P > 0,05$) počtu kvasinek ani prototék (tabulka 8), stejně tak za těchto podmínek nedošlo k navýšení ($P > 0,05$) počtu kolonií po zaočkování *Y. lipolytica*, *C. famata* ani *P. bovis* do různých vzorků mléka (tabulka 9 a 10).

Diskuze

Produkce lytických enzymů je významnou vlastností kvasinek a rovněž byla zaznamenána u prototék (Krukowski a kol., 2012). Přestože i v rámci našeho testování

Tab. 10 Počet prototék po inokulaci různých vzorků mléka mléka *P. bovis* a po 48 hodinách při 6 °C (log KTJ/ml), (n=6)

	<i>P. bovis</i>	
	0 hod	48 hod
x	4,80	4,82
sx	0,03	0,02
vx	0,6	0,4
<i>t</i>	0,91	
význ.	ns	

Vysvětlivky jsou uvedeny pod tab. 2, 4 a 6. Počet stupňů volnosti 5. *t* = hodnota kritéria párového *t*-testu mezi počtem kolonií v čase 0 hodin a 48 hodin.

byla potvrzena lytická aktivita kvasinek i prototék (testování na agarových plotnách, 25 °C, 5 dnů), za zvolených podmínek skladování mléka (6 °C, 48 hodin) nedošlo k narušení chemického složení, ani technologických vlastností vzorků mléka zaočkovaných izoláty kvasinek nebo prototék. Tato absence poškození kvality mléka koresponduje se skutečností, že uvedený způsob úchovy mléka nevedl k navýšení počtu těchto mikroorganismů v mléce. Teplota 6 °C tak pravděpodobně nebyla dostatečná pro růst a rozvoj metabolické činnosti a produkci lytických enzymů. Během předpomnožení v bujónu při 30 °C rovněž zřejmě nedošlo k dostatečné produkci lytických enzymů. Pokud však enzymy vytvořeny byly, neuplatnily se nejspíše v důsledku následné nízké teploty skladování mléka.

K odlišným výsledkům dospěla Seydlová a kol. (2009), která udává výrazné změny složení mléka po jeho zaočkování kulturami *C. lusitaniae* i *P. bovis* a následném skladování při chladničkové teplotě (přibližně 8 °C), a to již po 24 hodinách, kdy došlo k poklesu obsahu tuku, bílkovin, laktosy a TPS a k nárůstu obsahu močoviny a volných mastných kyselin. Změny v obsahu složek sledovali ve vzorku mléka inokulovaném izolátem *C. lusitaniae* a vzorku inokulovaném izolátem *P. bovis* o postupně se zvyšující koncentraci. Při inokulaci mléka *C. lusitaniae* obsah tuku poklesl z 3,41 % ($9,4 \times 10^2$ KTJ/ml) na 1,9 % ($1,9 \times 10^5$ KTJ/ml). Při inokulaci mléka *P. bovis* došlo k poklesu tuku z 3,51 % ($1,0 \times 10^3$ KTJ/ml) na 2,26 % ($1,2 \times 10^4$ KTJ/ml). Výsledky Seydlové a kol. (2009) tak poukazují na lytickou činnost enzymů *C.*

lusitaniae a *P. bovis* probíhající i při úchově mléka za chladových podmínek. Rozdílnost výsledků Seydlové a kol. (2009) a našich výsledků mohla být způsobena použitím odlišných kmenů, koexistencí doprovodné mikroflóry syrového kravského mléka a testovaných mikroorganismů či mírně vyšší teplotou skladování mléka. Poslední se jeví jako méně pravděpodobné, neboť se obecně uvádí, že kvasinky v chlazených mléčných produktech špatně rostou (Fleet a kol., 1990; Viljoen a kol. 2003; Garnier a kol. 2017), případně k nárůstu jejich počtu dochází až po delší době skladování, nikoliv za 24 hodin. Viljoen a kol. (2003) testováním schopnosti růstu kvasinek v jogurtu zjistili, že jejich celkový počet v prvních 10 dnech skladování při 5 °C ani 10 °C nenarůstal.

Naše výsledky spíše poukazují na to, že ke změnám složení mléka a zhoršení jeho technologické kvality při dodržení chladových podmínek skladování může docházet spíše v důsledku kvasinkové či prototékové mastitidy než pouhou přítomností těchto mikroorganismů v mléce. Obecně v souvislosti s mastitidou dochází ke snížení syntézy tuku, kaseinu a laktosy a naopak ke zvýšení koncentrace sérových bílkovin (Le Maréchal a kol. 2011; Bobbo a kol. 2017). Kvalita mléka je porušována nativními enzymy, které jsou v důsledku infekcí aktivovaného imunitního systému přítomny ve zvýšené míře, což souvisí s nárůstem počtu somatických buněk, a extracelulárními enzymy produkovanými přímo původci mastitidy (Leitner a kol. 2006).

Dále lze předpokládat, že negativní vliv kvasinek či prototék na mléčný produkt se projeví spíše v průběhu delšího skladování hotového mléčného výrobku, který z důvodu nedostatečné pasterace či kontaminace z výroby (např. z biofilmu na výrobním zařízení, ovocné složky jogurtu) obsahoval vysoký počet kvasinek či prototék, případně pokud by nebyly dodrženy skladovací podmínky mléčného produktu. Viljoen a kol. (2003) uvádí, že zatímco v průběhu 30denní inkubace 6 jogurtů při 5 °C nebyly ani z jednoho jogurtu izolovány kvasinky *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Yarrowia lipolytica*, v průběhu inkubace při 10 °C byly kvasinky *Kluyveromyces marxianus* identifikovány ve 4 jogurtech a *Saccharomyces cerevisiae* ve 3 jogurtech. Kvasinky *Yarrowia lipolytica* byly potom izolovány až v průběhu inkubace při 15 °C.

Závěr

Kvasinky a prototéky jsou enzymaticky aktivní mikroorganismy. Při kontaminaci mléka však při krátkodobé úchově a dodržení chladírenských podmínek skladování nemají potenciál narušit kvalitu mléka. Poškození mléka nastane spíše vlivem kvasinkové či prototékové mastitidy, případně u kontaminovaných mléčných výrobků v průběhu delšího skladování nebo nedodržení chladírenského režimu úchovy.

Poděkování:

Příspěvek vznikl za podpory projektů MZe ZEMĚ QK1910092 a MZe RO1423.

Literatura

- BOBBO T., RUEGG P. L., STOCCO G., FIORE E., GIANESSELLA M., MORGANTE M., PASOTTO D., BITTANTE G., CECCHINATO A. (2017): Associations between pathogen-specific cases of subclinical mastitis and milk yield, quality, protein composition, and cheese-making traits in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100, (6), s. 4868–4883.
- COSTA E. O., MELVILLE P. A., RIBEIRO A. R., WATANABE E. (1998): Evaluation of the Occurrence of Algae of the Genus *Prototheca* in Cheese and Milk from Brazilian Dairy Herds. *Toxic Plants and Other Natural Toxicants* (pp. 373–376). Wallingford, UK, CABI Publishing.
- 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 ISO 6611 (2009): Mléko a mléčné výrobky – Stanovení počtu jednotek vytvářejících kolonie kvasinek a/nebo plísní – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 25 °C.
- DWORECKA-KASZAK B., KRUTKIEWICZ A., SZOPA D., KLECZKOWSKI M., BIEGANSKA M. (2012): High prevalence of *Candida* yeast in milk samples from cows suffering from mastitis in Poland. *Scientific World Journal*, 2012, (196347), s. 1–5.
- FLEET, G.H. (1990): Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*, 68, (3), s. 199–211.
- GARNIER L., VALENCE F., MOUNIER J. (2017): Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: An update. *Microorganisms*, 5, (3), s. 1–33.
- JAGIELSKI T., KRUKOWSKI H., BOCHNIARZ M., PIECH T., ROESKE K., BAKUŁA Z., WLAZŁO Ł., WOCH P. (2019a): Prevalence of *Prototheca* spp. on dairy farms in Poland – a cross-country study. *Microbial Biotechnology*, 12, (3), s. 556–566.
- JAGIELSKI T., ROESKE K., BAKUŁA Z., PIECH T., WLAZŁO Ł., BOCHNIARZ M., WOCH P., KRUKOWSKI H. (2019b): A survey on the incidence of *Prototheca* mastitis in dairy herds in Lublin province, Poland. *Journal of Dairy Science*, 102, (1), s. 619–628.
- KLIMEŠOVÁ M., HANUŠ O., NEJESCHLEBOVÁ H., MORÁVKOVÁ M., KUCHAROVIČOVÁ I., BAČOVÁ R., ROUBAL P., SEYDLOVÁ R., NEJESCHLEBOVÁ L. (2021): Vliv nebakteriálních původců mastitidy na technologické vlastnosti mléka – produkce lytických enzymů, *Mlékařské listy – zpravodaj*, 189, 32, (6), s. 7–10.
- KRUKOWSKI H., LISOWSKI A., NOWAKOWICZ-DEBEK B., WLAZŁO Ł. (2012): Enzymatic activity of *Prototheca zopfii* strains isolated from cows with mastitis. *Polish Journal of Microbiology*, 61, (3), s. 217–218.
- KRUKOWSKI H., TIETZE M., MAJEWSKI T., ROZANSKI P. (2001): Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. *Mycopathologia*, 150, (1), s. 5–7.
- LAVAE M., EIDI S., KHORAMIAN B. (2019): High prevalence of *Prototheca* spp. and isolation of fungal species in milk samples from cows suffering from mastitis in Mashhad city, northeast. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 2, (21), s. 21–26.
- LAVOIE K., TOUCHETTE M., ST-GELAIS D., LABRIE S. (2012): Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Science and Technology*, 92, (5), s. 455–468.
- LE MARÉCHAL, C., THIÉRY, R., VAUTOR, E., LE LOIR, Y. (2011): Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products – a review. *Dairy Science & Technology*, 91, s. 247–282.
- LEITNER G., KRIFUCKS O., MERIN U., LAVI Y., SILANIKOVE N. (2006): Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physico-chemical properties of bovine milk. *International Dairy Journal*, 16, (6), s. 648–654.
- MARQUES S., SILVA E., CARVALHEIRA J., THOMPSON G. (2010): Short communication: Temperature sensibility of *Prototheca blaschkeae* strains isolated from bovine mastitic milk. *Journal of Dairy Science*, 93, (11), s. 5110–5113.

- MELVILLE P. A., WATANABE E. T., BENITES N. R., RIBEIRO A. R., SILVA J. A., GARINO JUNIOR F., COSTA E. O. (1999): Evaluation of the susceptibility of *Prototheca zopfii* to milk pasteurization. *Mycopathologia*, 146, (2), s. 79–82.
- SAUTOUR M., LEMAÎTRE J. P., RANJARD L., TRUNTZER C., BASMACIYAN L., DEPRET G., HARTMANN A., DALLE F. (2021): Detection and survival of *Candida albicans* in soils. *Environmental DNA*, 3, (6), s. 1093–1101.
- SEYDLOVÁ R., SNÁŠELOVÁ J., SOUKUPOVÁ A. (2009): Vliv obsahu *Prototheca zopfii* a *Candida lusitanae* na kvalitu syrového mléka. *Mlékařské listy – zpravodaj*, 112, s. 15–22.
- SHAVE C. D., MILLIARD L., MAY R. C. (2021): Now for something completely different: *Prototheca*, pathogenic algae. *PLoS Pathogens*, 17, (4), s. 1–7.
- TORKAR K. G., VENGUŠT A. (2008): The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control*, 19, (6), s. 570–577.
- VILJOEN B., LOURENS-HATTINGH A., IKALAFENG B., PETER G. (2003): Temperature abuse initiated yeast growth in yoghurt. *Food Research International*, 36, (2), s. 193–197.
- ZECCONI A., DELL'ORCO F., RIZZI N., VAIRANI D., CIPOLLA M., POZZI P., ZANINI L. (2020): Cross-sectional study on the prevalence of contagious pathogens in bulk tank milk and their effects on somatic cell counts and milk yield. *Italian Journal of Animal Science*, 19, (1), s. 66–74.

Korespondující autor: Mgr. Hana Nejeschlebová,
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.,
Ke Dvoru 12a, 160 00 Praha 6,
email: hana.nejeschlebova@seznam.cz

Přijato do tisku: 5. 9. 2023
Lektorováno: 22. 9. 2023

HYDROGELY NA BÁZI KARBOXY-METHYLCELULÓZY A KYSELÉ SYROVÁTKY S PŘÍDAVKEM ZEMĚDĚLSKÝCH HNOJIV

Markéta Borková¹; Jitka Peroutková¹;
Alexandra Šalaková¹; Jan Drbohlav¹; Silvie Duřpekova²;
Jarmila Čechmánková³; Ladislav Bár¹

¹ Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.,

² Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická,

³ Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy, v.v.i.

Hydrogels based on carboxymethyl cellulose and acid whey with the addition of agricultural fertilizers

Abstrakt

Hydrogely na bázi kyselé syrovátky mohou být významným zdrojem nejenom vláhy, ale i výživy pro zemědělské plodiny v období klimatické změny. Záměrem této práce bylo vyzkoušet možnost obohacení základní receptury biodegradovatelných hydrogelů na bázi karboxymethylcelulózy a kyselé syrovátky přídatkem komerčně dostupných hnojiv. Testován byl přídatek 7 různých hnojiv.

Nejperspektivnější se jevil hydrogel s přidavkem krystalického hnojiva na plodovou zeleninu (Forestina s.r.o.). Přídatkem 1 g tohoto hnojiva na 100 g hydrogelu se podařilo ve výluhu xerogelu (tj. vysušené formě hydrogelu) v porovnání se základní recepturou zvýšit množství fosforu ve formě kys. fosforečné o 49,3 % a iontů draslíku o 118,6 %, vápníku o 43,8 % a hořčíku o 116,2 %. Kromě základní receptury byl hydrogel s hnojivem porovnán i s variantou ze zahuštěné kys. syrovátky.

Klíčová slova: hydrogel, xerogel, kyselá syrovátka, zahuštěná kyselá syrovátka, karboxymethylcelulóza

Abstract

Acid whey-based hydrogels can be an important source of not only moisture, but also nutrition for agricultural crops in the period of climate change. The aim of this work is to test the possibility of enriching the basic recipe of biodegradable hydrogels based on carboxymethylcellulose and acid whey by adding commercially available fertilizers. The addition of 7 different fertilizers was tested. The hydrogel with the addition of crystalline fertilizer for fruit vegetables (Forestina s.r.o.) appeared to be the most promising. By adding 1 g of this fertilizer to 100 g of hydrogel, it was possible to increase the amount of phosphorus in the form of phosphoric acid by 49.3% and potassium ions by 118.6%, calcium by 43.8% and magnesium by 116.2%. In addition to the basic formula, the hydrogel with fertilizer was also compared to the variant made from concentrated acid whey.

Key words: hydrogel, xerogel, acid whey, concentrated acid whey, carboxymethylcellulose

Úvod

Globální změny klimatu přináší řadu výzev, mezi které patří i zajištění dostatku vláhy v půdě pro pěstování plodin. Řešením tohoto problému může být aplikace hydrogelů, tj. zesíťovaných hydrofilních polymerů schopných absorbovat a zadržet velké množství vody, které jsou tyto materiály schopny v případě potřeby desorbovat (Duřpekova a kol., 2020). Aplikace zmíněných hydrogelů umožňuje zvýšit výnos plodin tím, že zlepšuje půdní propustnost, strukturu a hustotu. Dále pozitivně ovlivňuje rychlost odpařování a infiltraci vody, snižuje odtok vody a erozi (Abobatta, 2018; Narjary a kol., 2013). V našem probíhající výzkumu v rámci projektu QK 1910392 *Ekologicky šetrné materiály pro intenzifikaci rostlinné výroby s půdoochrannými vlastnostmi na bázi obnovitelných zdrojů* jsme již publikovali řadu výsledků (Borková a kol., 2022; Peroutková a kol., 2021) zabývajících se vlastnostmi hydrogelů na bázi karboxymethylcelulózy a vedlejších produktů mlékárenského průmyslu jako kyselá syrovátka, permeát z ultrafiltrace syrovátky a koncentrát z elektrodialýzy syrovátky. Výhodou zvoleného základního materiálu pro výrobu hydrogelů, tj. sodné soli karboxymethylcelulózy, je to, že se jedná o rozpustný biolog-