

## **Dynamika rastu mikroorganizmov v sušenom mlieku v závislosti od vlhkosti**

MÁRIA GREIFOVÁ - FRIDRICH GÖRNER

**Súhrn.** Vo vzorkách odstredeného sušeného mlieka s odstupňovanou vlhkosťou 15,2 %, 20,6 %, 24,1 % a 27,4 % sa sledovala dynamika rastu mikroorganizmov v ňom prirodzene prítomných stanovením: celkového počtu baktérií, počtu enterokokov, počtu termorezistentných baktérií a počtu koliformných baktérií po umelej kontaminácii vzoriek. Celkový počet baktérií vo vzorkách stúpal od vlhkosti 20,6 % a vyššie; za 24 hodín dosiahol priemerne  $10^5$  KTJ.g<sup>-1</sup> a za 48 h  $10^8$  KTJ.g<sup>-1</sup>. Súčasne bol vizuálne pozorovaný rast plesní. Významne rástol aj počet enterokokov, ktorý dosiahol za 24 h hodnoty  $10^3$  KTJ.g<sup>-1</sup> a za 48 h  $10^5$  KTJ.g<sup>-1</sup>. Počet termorezistentných baktérií (ich spór) meraný po devitalizácii termolabilných vegetatívnych foriem s časom klesol, čo súvisí s klíčením spór. Počet koliformných baktérií umelo do sušeného mlieka pridaných s časom klesal.

Jedným z účinných faktorov predlžovania trvanlivosti potravín je ich dehydratácia. Pravdepodobne ide o najstaršiu metódu cielenej ochrany potravín. Dehydratácia sa deje procesom, ktorý využíva zvýšenú teplotu na odstránenie vlhkosti z produktu. Jej hlavným cieľom je zachovanie stability potraviny z mikrobiologického hľadiska. Ďalším cieľom je zníženie objemu produktu, čo zvyšuje efektívnosť pri jeho Transporte a skladovaní [4].

Sortiment sušených výrobkov z mlieka sa delí na tri skupiny. Prvú skupinu, najnáročnejšiu vo všetkých fyzikálnych, chemických a mikrobiologických parametroch, tvoria výrobky detskej výživy. Druhú skupinu tvoria výrobky konzumného charakteru na zásobovanie spotrebiteľského trhu a výživu širšej skupiny obyvateľstva. Treťou sku-

---

Ing. Mária Greifová, Prof. Ing. Dr. Fridrich Görner, DrSc., Katedra mlieka, tukov a hygieny potravín, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

pinou sú výrobky priemyselného charakteru. V poslednej dobe má veľmi progresívne postavenie v podobe krmných zmesí [10].

Mikrobiológiu sušených produktov sa venuje u nás značná pozornosť, aj keď sa často stretávame s názorom, že mikrobiológia sušených potravín nie je problémom.

Obsah vlhkosti sušeného odstredeného mlieka (SOM) je v rozmedzí 2 - 4 % ; ČSN 57 0820 [3] povoľuje max. 6 % a celkový počet baktérií (CPB) 50 000 KTJ.g<sup>-1</sup>. V kontrolnej praxi sa objavujú aj vzorky s vyšším obsahom vlhkosti a CPB. Príčinou môžu byť nedostatočná sanitácia a lokálne zvlhnutie prášku v samotnom sušiarenskom zariadení [8]. Mimoriadne závažnou skutočnosťou je nález plesní, ako na to u nás upozornila Jesenská [17]. Úlohou tejto práce bolo zistiť vplyv nadlimitných vlhkostí SOM na rast baktérií v ňom.

### **Materiál a metódy**

Na základe orientačných predpokusov boli pripravené vzorky SOM s odstupňovanou vlhkosťou: 15,2 %, 20,6 %, 24,1 %, 27,4 %. Pri výpočte množstva pridanej vody sa zohľadňovalo množstvo potrebné na vykryštalizovanie laktózy prítomnej v sušenom mlieku. Výsledná vlhkosť sa overila vážkovou metódou podľa ČSN 57 0105 [2] sušením do konštantnej hmotnosti pri teplote 87 °C. Takto pripravené vzorky s definovanou vlhkosťou sa uchovali v tesne uzavretých vzorkovniciach v termostate pri 30 °C. V pokuse použitá vzorka sušeného mlieka neobsahovala vo vyšetrovanom množstve 2 x 0,1 g zistiteľné koliformné baktérie. Pre možnosť sledovania ich dynamiky v závislosti od času a vlhkosti prikročili sme k umelej kontaminácii odstredeného sušeného mlieka koliformnými baktériami tak, že sme čiastku vody použitej na zvýšenie vlhkosti nahradili suspenziou *Escherichia coli*.

Bakteriologicky sa takto pripravené vzorky SOM vyšetrovali na celkový počet baktérií (CPB), počet koliformných baktérií (KFB), počet enterokokov (ENT) a počet termorezistentných baktérií (TRB) podľa ČSN 57 0101 [1] v určených časových intervaloch.

Na stanovenie CPB sa ako živná pôda použil mäsopeptonový agar, výrobok n. p. Imuna Šarišské Michalany, zloženia: peptón 10 g, NaCl 5 g, destilovaná voda 1000 ml, pH po rozplnení 7,2. Počet KFB sme stanovili na Klimmerovej pôde, zloženia: 500 ml mäsopeptonového

bujónu, 500 ml destilovanej vody, 2,5 g NaCl, 10g laktózy, 20 g agaru, 10 ml 1 %-ného etanolového roztoku bromtymolovej modrej, 5 ml 1 % vodného roztoku trypaflavínu, pH po rozplnení 6,8 - 7,0.

Počet ENT sme stanovili na Slanetz-Bartleyovej pôde, zloženia: peptón 20 g, kvasničný autolýzát 5 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4 g, glukóza 2 g, azid sodný 0,6 g, TTC 0,15 g, agar 12,5 g, destilovaná voda 1000 ml, pH = 7,4.

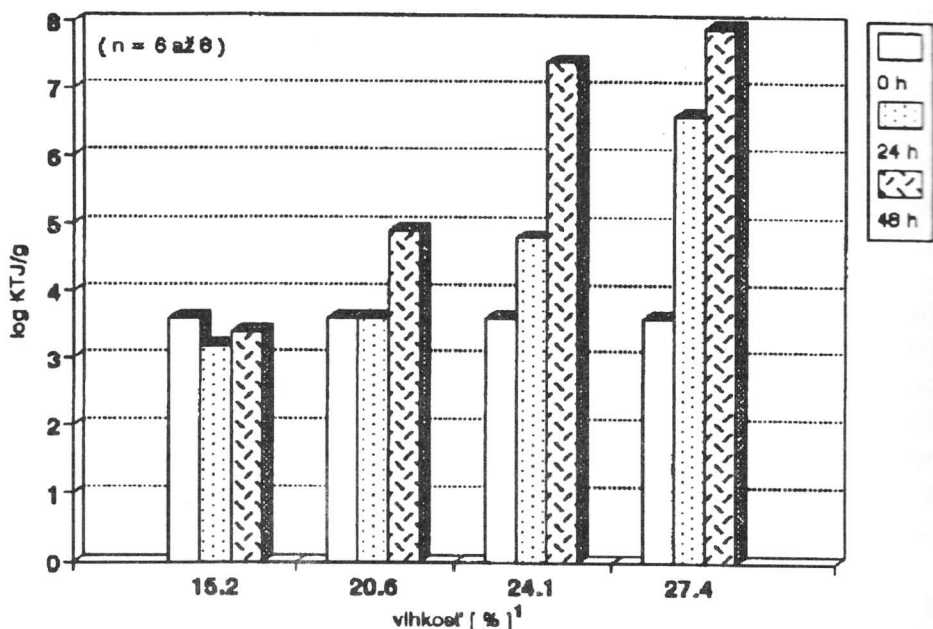
Počet TRB sme stanovili na mäsopeptónovom agare, po devitalizácii vegetatívnych foriem baktérií vzorky pri 80 °C počas 15 minút. Každá vzorka sa v určenom čase skladovania (hneď po prídavku vody a dôkladnom premiešaní, za 24 h a za 48 h) bakteriologicky vyšetrila paralelne 6 až 8 krát na získanie spoľahlivých výsledkov. Zo získaných údajov sme pre uvedené hodnoty vlhkosti vypočítali geometrické priemery výsledkov mikrobiologických vyšetrení  $x_g$ . Výsledky a ich dynamika v závislosti od vlhkosti a času sú znázornené na obr.1 - 4.

Pri sledovaní kvalitatívneho zastúpenia baktérií bol primeraný počet charakteristických kolónií z každej živnej pôdy (pri stanovení počtu KTJ.g<sup>-1</sup> CPB, ENT, TRB) popísaný a preočkovaný na šikmý agar. Získané kolónie boli farbením podľa Grama rozdelené na koky a tyčinky. G<sup>+</sup> sporulujúce tyčinky boli identifikované podľa Bergeyovho manuálu [12]. G<sup>+</sup> nesporulujúce tyčinky neboli ďalej bližšie určované. Koky (väčšinou izolované zo živnej pôdy pre ENT) boli podrobené skúmaniu na Shermanove kritéria a ďalej identifikované ako je uvedené v Bergeyovom manuáli [12] s prihliadnutím k prácam Scheifera a kol. [15], ako aj Görnera a Zemanoviča [9].

## Výsledky a diskusia

*Posúdenie dynamiky CPB (celkového počtu baktérií) a s ním súvisiacich zmien sušeného odstredeného mlieka vzhľadom na vlhkosť a čas.*

Výsledky týchto vyšetrení sú zhrnuté na nasledovných obrázkoch. Na obr.1. je vidno, že CPB sa pri vlhkosti 15,2 % za 24 h a za 48 h významne nezmenil. Rozdiely je možné pripísať na vrub presnosti metódy. Pri ďalšej vyššej vlhkosti 20,6 % za 24 h nebol taktiež zaznamenaný rast, ale za 48 h CPB vzrástol asi o 1,5 log poriadku a vo významnej miere prekročil limit 50 000 KTJ.g<sup>-1</sup>. Pri dvoch ďalších vlhkostiach 24,1 %



Obr. 1. Dynamika rastu celkového počtu baktérií v sušenom odstredenom mlieku v závislosti od vlhkosti a času.

Fig. 1. A dynamics of the growth of "total number of bacteria" in a dried centrifuged milk in dependence upon humidity and time.

1 - Humidity.

a 27,4 % bol významný rast zaznamenaný už po 24 h a markantný za 48 h. Density CPB dosahovali  $10^7$  až  $10^8$  KTJ.g<sup>-1</sup>.

Vzorky sušeného mlieka hneď po pridaní odmeraného množstva sterilnej vody zmenili svoju konzistenciu. Pri nižších vlhkostiach (15,2 % a 20,6 %) bolo pozorované len spekanie, ktoré ešte nevplývalo na rozpustnosť sušeného mlieka. Pri vyšších vlhkostiach (24,1 % a 27,4 %) pôvodne sypký prášok sa premenil po pridaní vody na ťažšie rozdrviteľné agregáty, ktoré boli vo vode už len čiastočne rozpustné. U týchto vzoriek sa farba mlieka zmenila na tretí deň na tmavozltú a neskôr boli pozorované aj sivozelené škvrny plesní.

Pri mikrobiologickom vyšetrení jednotlivých vzoriek na CPB, okrem počítania kolónií, bol sledovaný aj ich vzhľad. Zastúpenie druhov kolónií baktérií zo vzoriek sušeného mlieka bolo pri jednotlivých vlhkostiach

na začiatku ich rastu podobné. So stúpajúcou vlhkosťou a časom sa pozoroval na Petriho miskách okrem rozstrapatených a rozliezavých kolónií, typických pre sporulujúce baktérie, čoraz väčší počet tzv. šošovicovitých kolónií, typických pre baktérie mliečneho kysnutia, preto bola súčasne stanovená kyslosť jednotlivých vzoriek mlieka, v každom vyšetrovanom čase titračne, odmerným roztokom NaOH o koncentrácii  $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol.l}^{-1}$  na fenolftalein a bola vypočítaná titračná kyslosť v °SH. Získané hodnoty sú uvedené v tab.1.

Titračná kyslosť jednotlivých vzoriek sušeného mlieka z pôvodnej hodnoty v nulte hodine klesla za 24 h u všetkých vlhkostí. Za ďalších 24 h opäť mierne stúpala u vlhkostí 15,2 % a 20,6 % a pri vyšších vlhkostiach sa nezmenila (24,1 %) alebo ďalej klesala (27,4 %). Klesanie kyslosti vzoriek sušeného mlieka mohlo byť spôsobené prevládajúcim rastom a metabolizmom oxidačných kvasiniek, ktoré sme nestanovovali. Nárast kyslosti do 48 h pri nižších vlhkostiach poukazuje s najväčšou pravdepodobnosťou na prevládajúci rast a metabolizmus baktérií mliečného kysnutia - enterokokov.

#### *Posúdenie dynamiky počtu ENT vzhľadom na vlhkosť a čas.*

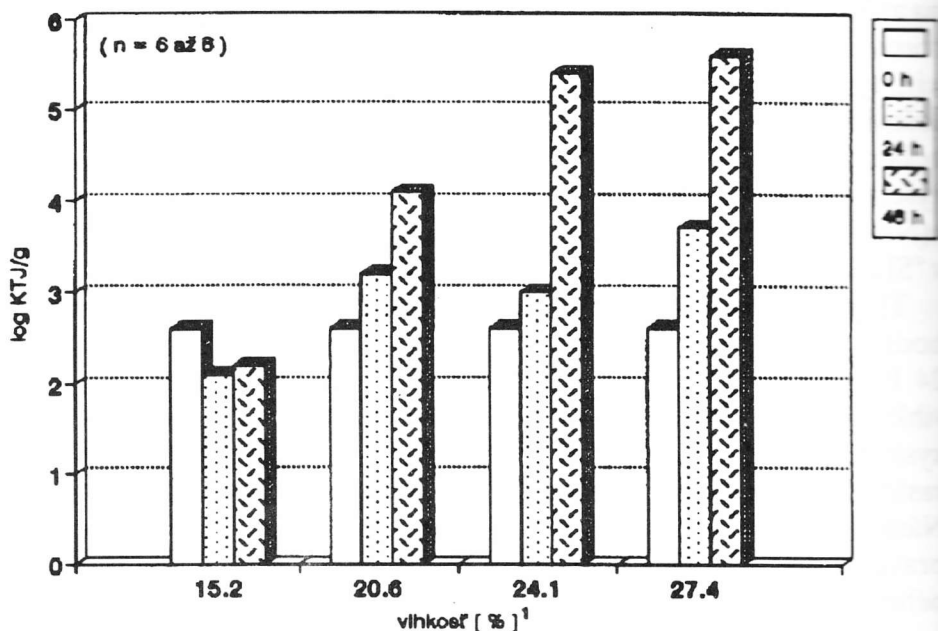
Počet enterokokov (obr.2.) stanovený na Slanetz - Bartleyovej médiu, bol v sušenom mlieku v rámci limitu a pri vlhkosti prášku 15,2 % sa za 24h a za 48 h významne nemenil. Pri vlhkosti 20,6 % stúpol už za 24 h

Tabuľka 1. Titračná kyslosť vzoriek mlieka v °SH  
v závislosti od vlhkosti a času pri stanovení CPB.

Table 1. Titration sourness of milk samples in °SH  
in dependence upon humidity and time during CPB determination.

| ČAS <sup>1</sup><br>[h] | VLHKOSŤ <sup>2</sup> [%]            |       |       |       |
|-------------------------|-------------------------------------|-------|-------|-------|
|                         | 15,20                               | 20,60 | 24,10 | 27,40 |
|                         | TITRAČNÁ KYSLOSŤ <sup>3</sup> [°SH] |       |       |       |
| 0                       | 4,21                                | 3,55  | 3,88  | 2,95  |
| 24                      | 3,03                                | 2,09  | 2,00  | 1,68  |
| 48                      | 3,20                                | 2,26  | 2,00  | 1,32  |

1 - Time, 2 - Humidity, 3 - Titration sourness.



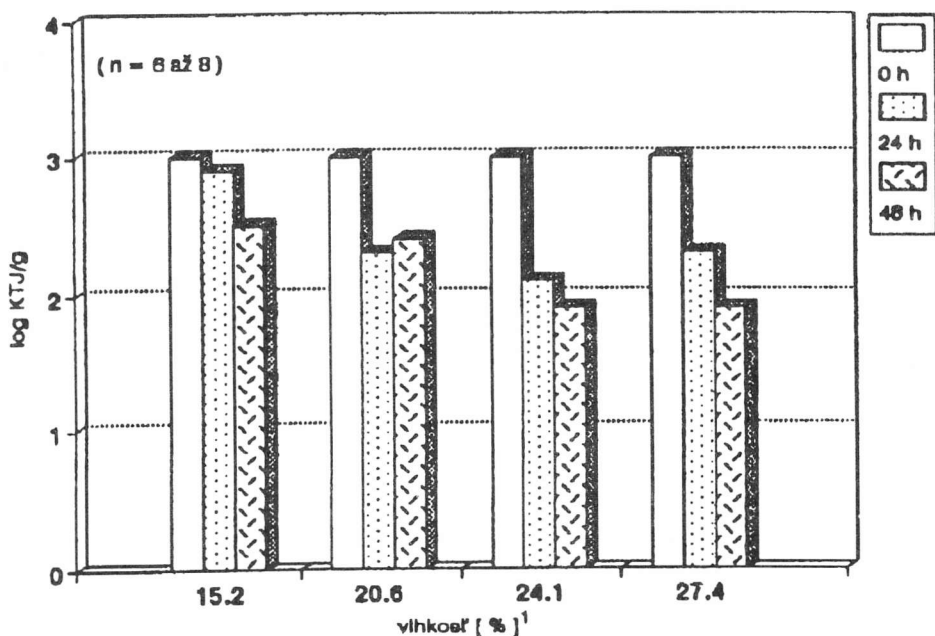
Obr.2. Dynamika rastu enterokokov v sušenom odstredenom mlieku v závislosti od vlhkosti a času.

Fig.2. A dynamics of the growth of "enterococci" in dried centrifuged milk in dependence upon humidity and time.  
1 - Humidity.

nad limit  $600 \text{ KTJ.g}^{-1}$ . Za 48 h pri tejto vlhkosti, ako aj vyšších (24,1 % a 27,4 %) stúpol významne na denzitu až  $10^5 \text{ KTJ.g}^{-1}$ .

Pri porovnaní CPB a počtu enterokokov je vidno, že ich počet tvoril iba istý diel z CPB, v percentuálnom porovnaní asi 10 až 1 %, čo znamená menej o 1 až 2 log poriadky. V CPB sú aj ďalšie baktérie, ktoré dobre rastú vo zvlhnutom sušenom mlieku, ako aj na médiu použitom na stanovenie CPB.

Enterokoky alebo príslušníci rodu *Enterococcus* [9, 15] sú chemo- a termorezistentné kokovité baktérie mliečného kysnutia. V mikrobiológii sušených mliek sú indikátormi sanitácie technologického zariadenia. Ich rastom a metabolizmom vo zvlhnutom sušenom mlieku sa môže vysvetliť rast kyslosti vzoriek zhrnutý v tab.1. Na túto skutočnosť v písomníctve okrem iných upozorňuje aj Stadhouders [16].



Obr. 3. Dynamika obsahu aeróbných spór v sušenom odstredenom mlieku v závislosti od vlhkosti a času.

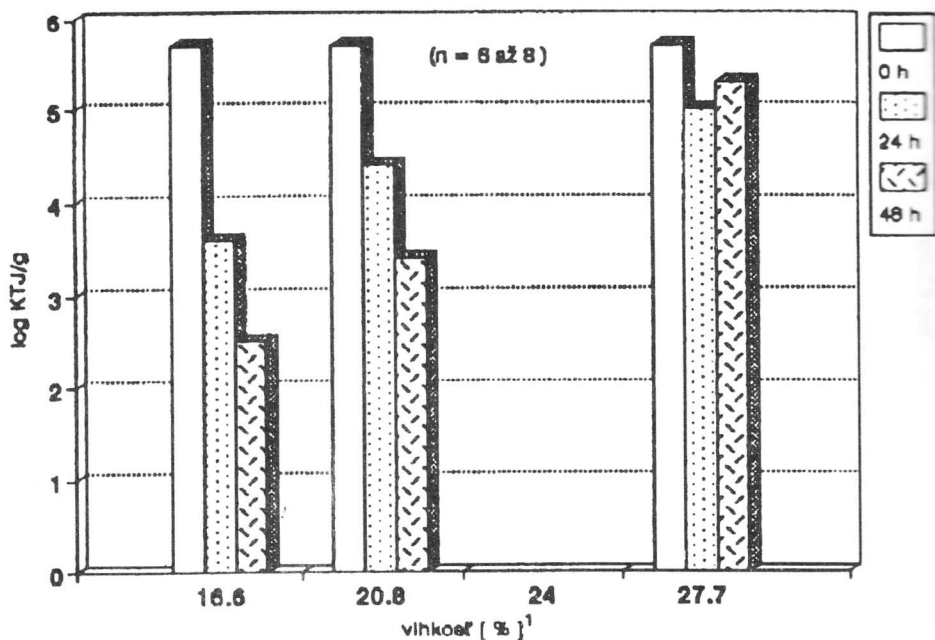
Fig. 3. A dynamics of content of "aerobic spores" in dried centrifuged milk in dependence upon humidity and time.

1 - Humidity.

*Posúdenie dynamiky počtu termorezistentných baktérií vzhľadom na vlhkosť a čas.*

Na obr. 3. je znázornená dynamika počtu spór vzdušných sporulujúcich baktérií. Tieto sme stanovovali po inaktivácii vegetatívnych baktérií zahrevom prvého riedenia na 80 °C, trvajúcim 15 minút. S najväčšou pravdepodobnosťou pritom prežívali iba spóry sporulujúcich baktérií.

Počet spór s časom a so stúpajúcou vlhkosťou klesal. Je to pochopiteľné, lebo spóry klíčili a menili sa na termolabilné formy týchto baktérií. Tieto sa zúčastnili na tvorbe s časom a vlhkosťou narastajúcim celkovom počte baktérií. Je vhodné si povšimnúť, že počiatočný počet spór sporulujúcich baktérií bol vo vyšetrovanom sušenom odstredenom



Obr.4. Dynamika rastu koliformných baktérií v sušenom odstredenom mlieku v závislosti od vlhkosti a času.

Fig.4. A dynamics of the growth of "coliform bacteria" in dried centrifuged milk in dependence upon humidity and time.

1 - Humidity.

mlieku v priemere vyšší ako počet enterokokov. Pohyboval sa blízko okolo  $1 \cdot 10^3 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ , pokiaľ počet enterokokov len okolo  $2,6 \cdot 10^2 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ .

#### *Posúdenie dynamiky počtu KFB vzhľadom na vlhkosť a čas.*

Dynamika počtu koliformných baktérií stanovených na Klimmerovom médiu je znázornená na obr.4. Pri pokuse sme museli do mikroflóry sušeného odstredeného mlieka zasiahnuť umelo, lebo neobsahovala merateľné množstvo koliformných baktérií. Pri príprave vzoriek na posúdenie počtu KFB pri rôznych vlhkostiach, bola preto spolu s vypočítaným množstvom vody pridaná aj ich suspenzia, čiže vzorky boli týmto druhom baktérií umelo kontaminované na denzitu  $7 \cdot 10^5 \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ .

Do sušeného odstredeného mlieka pridané KFB museli prekonať značnú zmenu prostredia. Pôvodne boli v mäsoseptónovom bujóne,



v prostredí, ktoré je pre tieto baktérie optimálne. Po prenesení do sušeného odstredeného mlieka so zvýšenou vlhkosťou 16,6 %, čiže do prostredia s koncentrovaným roztokom laktózy, utrpeli osmotický šok. Následok sa prejavil znížením počtu pri stanovení použitou metódou za 24 h o 2,1 log poriadku a o 48 h o 3,2 log poriadku. Podobný, aj keď menej výrazný jav bol pozorovaný aj v sušenom odstredenom mlieku s vlhkosťou zvýšenou na 20,8 %. Aj v sušenom odstredenom mlieku s vlhkosťou 27,4 % sa za 24 h prejavilo zníženie počtu KFB, ale za 48 h už bol zaznamenaný istý rast.

Je známe, že gramnegatívne baktérie horšie znášajú zníženie  $a_w$ -hodnoty prostredia. Obyčajne sa to pri raste prejavuje predĺžením lag fázy. Až keď sa osmoregulačnými procesmi buniek osmotický tlak v nich vyrovná s prostredím, začnú rásť. Tento jav je možné demonštrovať porovnaním s chovaním sa enterokokov (obr.2.). Enterokoky, ktoré dobre rastú pri znížených  $a_w$ -hodnotách (nášajú v bujóne 6,5 % NaCl) sa v sušenom odstredenom mlieku rozmnožovali už za 24 h, kdežto použitou metódou stanoviteľné KFB za 24 h ako aj za 48 h v počte klesali.

Celkový počet baktérií dosahoval za 48 h v sušenom odstredenom mlieku pri vlhkosti 24,1 % a 27,4 % denzity  $10^7$  až  $10^8$  KTJ.g<sup>-1</sup>. Druhé najvyššie denzity vo zvlhčených vzorkách  $10^5$  KTJ.g<sup>-1</sup> vykazovali v tomto sušenom mlieku za rovnaký čas enterokoky alebo presnejšie kolónie, ktoré rástli na Slanetz-Bartleyovej médiu. Rozdiel medzi týmito skupinami baktérií v navlhčených vzorkách tvorili podľa našich vyšetrení spóry aeróbných sporulujúcich baktérií. Za 48 h ale, ako sme už skôr uviedli, iste rástli aj vegetatívne formy baktérií tvoriacich tieto spóry. Zvyšok do celkového počtu  $10^7$  až  $10^8$  KTJ.g<sup>-1</sup> tvorili samozrejme aj iné termorezistentné baktérie. Podľa vzhľadu kolónií a kyslosti vzoriek sušeného odstredeného mlieka to boli aj acidogénne baktérie. V písomníctve [16] sa vedľa acidogénnych enterokokov uvádza aj *Streptococcus thermophilus*, menovite jeho niektoré zvlášť termorezistentné kmene. Tieto môžu dobre rásť v poslednom stupni odparky, v ktorom býva teplota blízko okolo 45 °C, čo je optimálna teplota pre tento organizmus.

Úvodom tejto práce bola vyslovená domnienka, že nadlimitný počet mikroorganizmov v sušenom mlieku môže byť spôsobený strhávaním jeho lokálnych usadenín v sušiarenskom zariadení, ktoré sa mohli zvlh-

čiť kondenzáciou pary z odchádzajúceho sušiaceho vzduchu. Výsledky tu uvedených pokusov túto teóriu potvrdili. Aj za krátky pozorovací čas 24 a 48 h bolo dokázané, že od vlhkosti 20 % a vyšších, ktoré sa v usadeninách reálne dosahujú, mikroorganizmy stanoviteľné za podmienok "celkového počtu baktérií" v sušenom mlieku dobré rastú a dosahujú denzity  $10^8$  KTJ.g<sup>-1</sup>. Gramnegatívne baktérie na Klimmerovom médiu, stanovené ako koliformné baktérie, rastú až pri vyšších vlhkostiach. Významnú časťku "celkového počtu baktérií" tvorili kolónie na Slanetz-Bartleyovej médiu, považované za enterokoky.

V tejto štúdii sme sa nezaoberali chovaním sa plesní pri zvýšených vlhkostiach. Görner a kol. [7] upozornili, že *Aspergillus flavus* dobre rastie v prostredí pri vyšších teplotách a na vyklíčenie jeho spór v sušenom mlieku bola dostatočná už jeho vlhkosť 13,1 %, čo si však vyžadovalo čas 27 až 35 dní a pri vlhkosti 17,4 % čas 20 až 27 dní. Tieto časy sú v kritických miestach sušiarenskeho zariadenia, ktoré sa dokonale čistí až pri tzv. ročnej odstávke ľahko dosiahnuteľné.

Pre sušiarenskú prax z týchto poznatkov vyplýva potreba zamedzenia vzniku lokálnych usadenín a ich zvlhnutie. Toto spočíva v každodennom suchom čistení a tiež po každom ukončení výrobného cyklu, podľa návodu dodávateľa sušiaceho agregátu. Neustálou kontrolou kritických miest sa musí zamedziť neprimerané ochladenie potrubia vedúceho vlhký, zo sušiarne vystupujúci sušiarenský vzduch.

## Literatúra

1. ČSN 57 0101: Mikrobiologické zkoušení mléka a mléčných výrobků, 1963.
2. ČSN 57 0105: Metody zkoušení mléčných výrobků sušených a zahuštěných, 1965.
3. ČSN 57 0820: Sušené mléčné výrobky. Dojčenecká a dětská výživa, 1980.
4. CHUNG, D. - CHANG, D.I.: J. of Food Protection, 45, 1982, s. 475.
5. GÖRNER, F. - ŠIMKOVICOVÁ, H. - ZDICHOVSKÁ, M.: Čs. hyg., 17, 1972, s. 141.
6. GÖRNER, F. - ŠIMKOVICOVÁ, H. - ZDICHOVSKÁ, M.: Brat. lek. listy, 58, 1972, s. 179.
7. GÖRNER, F. - VOLLEK, W. - HRDINOVÁ, I.: Čsl. hygiena, 25, 1980, s. 481.
8. GÖRNER, F.: Hyd. priemysel, 25, 1983, s. 201.
9. GÖRNER, F. - Zemanovič, J.: Bulletin PV, 32, 1993, s. 109.
10. HRUBÝ, S.: Čítanie o správnej výžive, 1984, s. 112.
11. Bergeys Manual of systematic Bacteriology, 1, 1984, s. 964.
12. Bergeys Manual of systematic Bacteriology, 2, 1986, s. 500.
13. PATSCHE, J.: Wasseraktivität, 11, 1980, s. 26.
14. PÍSECKÝ, J.: Milchwissenschaft, 47, 1992, s. 3.
15. SCHLEIFER, K.N. - KILPPER-BÄLZ, R.: System. Appl. Microbiol., 10, 1987, s. 1.
16. STADHOUDERS, J. - HUP, G. - HASSING, F.: Neth. Milk. Dairy J., 36, 1982, s. 231.

Do redakcie došlo 16.12.1993.

**Dependence of dynamics of the growth  
of microorganisms in dried milk upon humidity**

Summary

In the samples of centrifuged dried milk artificially contaminated, a dynamics of the growth of microorganisms naturally present in it at the gradual humidity of 15.2 %, 20.6 %, 24.1 % and 27.4 % has been investigated by determining : a total number of bacteria, number of enterococci, number of thermo-resistant bacteria and number of coliform bacteria. A total number of bacteria in samples increased when humidity was 20.6 % and higher. Within 24 and 48 hours time this number reached an average figures of  $10^5$  KTJ.g<sup>-1</sup> and  $10^8$  KTJ.g<sup>-1</sup>, respectively. At the same time, a growth of yeasts has been visually observed. Significant increase in a number of enterococcus amounting to  $10^3$  KTS.g<sup>-1</sup> and  $10^5$  KTJ.g<sup>-1</sup> in 24 and 48 hours time, respectively, has been observed. A number of thermo-resistant bacteria (its spores) measured after devitalization of thermolabile vegetative forms decreased with time. This is attributable to a germination of spores. A number of coliform bacteria artificially added to a dried milk decreased with time.