

## Kyslomliečna termorezistentná mikroflóra tepelne ošetrovaného mlieka

JARMILA PREKOPPOVÁ — MARCELA KONTOVÁ

**Súhrn.** V predloženej práci sa uvádzajú výsledky zisťovania obsahu termorezistentnej mikroflóry vo dvoch mliekárskych závodoch, ako aj výsledky izolácie a identifikácie termorezistentných kyslomliečnych mikroorganizmov. Priemerný počet mikroorganizmov prežívajúcich pasterizáciu (72 °C, 20 s) bol 40.103 a 45.103 KTJ.ml<sup>-1</sup>.

Identifikáciou vybraných kmeňov kyslomliečnych termorezistentných mikroorganizmov sa zistili druhy *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus lactis* a *Lactobacillus helveticus*. Pri jednotlivých kmeňoch toho istého druhu sa zistila rozdielna biochemická aktivita.

Pasterizácia ako spôsob ošetrovania mlieka je už dávno prepracovaná, ale pri tom stále aktuálna. Hlavným cieľom pasterizácie mlieka je zabezpečenie jeho zdravotnej nezávadnosti a štandardnej kvality mlieka a mliečnych výrobkov. Nevýhodou tepelného ošetrovania mlieka je inaktivovanie niektorých enzýmov, ktoré môžu priaznivo vplyvať na tvorbu chuti.

Obsah zvyškovej mikroflóry mlieka po pasterizácii je často dosť vysoký. Čím vyšší je počet mikroorganizmov v surovom mlieku, tým vyšší ostáva i ich počet v pasterizovanom mlieku.

Obsah termorezistentných mikroorganizmov ako jeden z ukazovateľov kvality nakupovaného mlieka zisťujú vo viacerých krajinách. V Dánsku napr. mlieko zaradené do I. triedy môže obsahovať maximálne 5.10<sup>3</sup> termorezistentných zárodkov v 1 ml. Mlieko s obsahom 10<sup>5</sup>.ml<sup>-1</sup> týchto zárodkov sa už zaraďuje do 4. triedy. V USA je počet termorezistentných mikroorganizmov pre nakupované mlieko limitovaný, a to od 3.10<sup>3</sup> do 5.10<sup>3</sup>.ml<sup>-1</sup> [1].

V návrhu novelizovanej normy na surové kravské mlieko sa aj u nás vyža-

duje stanovenie obsahu termorezistentných zárodkov pre mlieko výberové, pričom maximálna hranica je  $2 \cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$ . Množstvo termorezistentných zárodkov zistené v surovom mlieku [2] sa pohybovalo od 10 do  $36 \cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$ , teda v mnohých prípadoch vyššie, ako stanovuje návrh novelizovanej normy.

Z uvedeného vyplýva dôležitosť tohto problému a aktuálnosť jeho štúdia.

V predloženej práci sa uvádzajú výsledky zisťovania obsahu termorezistentných mikroorganizmov, ako aj výsledky izolácie a identifikácie termorezistentných kyslomliečnych baktérií a ich biochemická aktivita.

## Materiál a metóda

V dvoch mliekárskych závodoch sme uskutočnili odber vzoriek z mlieka ihneď po pasterizácii ( $72^\circ\text{C}$  počas 20 s) v mesiacoch január až marec, a to celkom osemkrát (4-krát v závode 1 a 4-krát v závode 2). Vzorky mlieka sme naočkovali na tieto živné pôdy: MPAL (celkový počet zárodkov), pôda podľa Pikeho (streptokoky), pôda podľa Rogosa (laktobacily), MPA (mikrokoky sporujúce aeróbne baktérie).

Z narastených kolónií, ktoré sa nachádzali v dostatočnej vzdialenosti od seba, sme robili izolácie odpichnutím kolónie do sterilného mlieka. Inkubácia sa uskutočňovala pri teplote  $37^\circ\text{C}$ . Po zrazení sme mliečnu kultúru prečistili opätovným naočkovaním na Pikeho pôdu a Rogosov agar z príslušných riedení ( $10^{-6}$  až  $10^{-8}$ ).

Izolované kmene mikroorganizmov sme udržiavali v sterilnom kravskom mlieku, raz týždenne preočkovávali a uskutočnili u nich mikroskopickú kontrolu. Pri vyizolovaných kmeňoch sme sledovali čas zrážania, vzhľad zrazeniny, kysaciu aktivitu a mikroskopický obraz. Málo aktívne kmene sme postupne vyradzovali. Po trojmesačnom preočkovaní sme na identifikáciu vybrali 22 kmeňov mikroorganizmov.

Kvôli zaradeniu mikroorganizmov do systému podľa klasifikačného kľúča sme u nich sledovali morfologické znaky (tvar a veľkosť buniek, tvorba spór, pohyblivosť, farbenie podľa Grama), kultivačné znaky (tvar kolónií, charakteristika rastu na šikmom agare, vo vpichu a v mlieku) a fyziologické znaky (skvasovanie C-látok, tvorba plynu, stekucovanie želatíny, zrážanie a redukcia lakmusového mlieka, vzťah k 0,1 % a 0,3 % metylénovej modrej, hemolýza na krvnom agare, vzťah k teplote, termorezistencia, vzťah ku kyslíku, tvorba amoniaku z peptónu, redukcia nitrátov, štiepenie eskulínu, tvorba aromatických látok).

## Výsledky a diskusia

1. *Výskyt a izolácia termorezistentných mikroorganizmov.* V odobraných vzorkách mlieka sme zistili pomerne vysoké celkové množstvo zárodkov, ktoré prežili pasterizáciu pri pasterizačnom efekte od 96,0 do 99,9 %. Priemerný celkový počet dosahoval  $40\,000\text{ KTJ}\cdot\text{ml}^{-1}$  v závode 1 a  $45\,000\text{ KTJ}\cdot\text{ml}^{-1}$  v závode 2. Často sa však vyskytlo množstvo rádovo až  $10^5\text{ KTJ}\cdot\text{ml}^{-1}$  pasterizovaného mlieka.

Množstvo streptokokov zistených po pasterizácii bolo tiež vysoké a tvorilo podstatnú časť celkového počtu zárodkov. V závode 2 streptokoky dosahovali priemerne až 93 % celkového počtu termorezistentných mikroorganizmov a v závode 1 75 %. Oveľa nižšie bolo množstvo laktobacilov, ktoré sme v niektorých vzorkách ani nezistili.

Okrem kyslomliečnych baktérií sme sledovali výskyt sporulujúcich anaeróbnych baktérií a mikrokokov. Počet mikrokokov bol vyšší v mlieku zo závodu 1, a to v priemere až desaťnásobne. Výskyt spór sporulujúcich anaeróbnych baktérií bol v oboch závodoch takmer rovnaký. Z celkového počtu termorezistentných zárodkov tvorili sporulujúce aeróby 0,35 % v závode 2 a 0,30 % v závode 1.

Ďalej sme sa zamerali na podrobnejšie štúdium vlastností kyslomliečnej termorezistentnej mikroflóry. Vyizolovali sme 220 kmeňov, z toho 120 kmeňov zo vzoriek mlieka zo závodu 1 (80 kmeňov streptokokov a 40 kmeňov laktobacilov) a 100 kmeňov zo vzoriek mlieka zo závodu 2 (80 kmeňov streptokokov a 20 kmeňov laktobacilov). Z nich sme na identifikáciu vybrali 20 kmeňov streptokokov a 2 kmene laktobacilov. Vybrané kmene počas trojmesačného preočkovania boli najštandardnejšie v tvorbe kyseliny mliečnej a v čase zrážania.

2. *Identifikácia vybraných kmeňov a ich biochemické vlastnosti.* Podrobným sledovaním sme chceli zistiť, či medzi zvyškovou termorezistentnou kyslomliečnou mikroflórou môžu byť mikroorganizmy, ktoré by mohli priaznivo, prípadne nepriaznivo ovplyvniť vlastnosti syrov pri ich prípadnom pomnožení.

V zvyškovej termorezistentnej kyslomliečnej mikroflóre sme identifikáciou zistili druhy *Streptococcus thermophilus*, *S. faecalis*, *Lactobacillus lactis* a *L. helveticus*.

Naše výsledky potvrdzujú zistenie Martina [3], ktorý vo zvyškovej termorezistentnej mikroflóre zistil druhy *S. faecalis* a *S. thermophilus* a z laktobacilov druh *L. lactis*.

Do akej miery môžu termorezistentné kmene ovplyvniť senzorické vlastnosti syrov, sme zisťovali pomocou sledovania kysacej schopnosti (celková a aktívna

kyslosť, množstvo vytvorenej kyseliny mliečnej), fermentácie niektorých cukrov (laktóza, glukóza) a podľa schopnosti štiepenia bielkovín (dusík amino-zlúčenín). Zistené výsledky uvádza tabuľka 1.

Tabuľka 1. Sledovanie kysacích a zrecích vlastností identifikovaných kmeňov  
Table 1. Acidifying and ripening properties of the identified strains

Číslo kmeňa <sup>1</sup>	Druh <sup>2</sup>	Kyslosť <sup>3</sup>		Dusík amino- zlúčenín [%]
		aktívna (pH) <sup>4</sup>	celková (SH) <sup>5</sup>	
163	<i>S. thermophilus</i>	4,380	32,2	0,035
164	<i>S. faecalis</i>	4,345	32,4	0,033
165	<i>L. lactis</i>	4,000	45,0	0,021
167	<i>S. faecalis</i>	4,525	30,0	0,026
169	<i>S. faecalis</i>	4,890	29,2	0,035
170	<i>S. faecalis</i>	4,950	27,6	0,040
171	<i>S. faecalis</i>	4,885	27,8	0,035
172	<i>S. faecalis</i>	4,500	30,0	0,044
174	<i>S. thermophilus</i>	4,300	32,8	0,035
175	<i>S. faecalis</i>	4,880	26,2	0,023
177	<i>S. thermophilus</i>	5,705	28,4	0,031
178	<i>S. thermophilus</i>	5,175	24,6	0,019
179	<i>S. thermophilus</i>	4,825	26,8	0,035
200	<i>S. faecalis</i>	4,490	30,2	0,037
201	<i>S. faecalis</i>	4,180	40,2	0,039
202	<i>S. thermophilus</i>	4,390	39,0	0,030
205	<i>S. thermophilus</i>	5,000	28,0	0,021
207	<i>S. thermophilus</i>	4,315	37,2	0,017
213	<i>S. faecalis</i>	4,555	30,2	0,028
216	<i>S. faecalis</i>	4,585	32,4	0,026
14	<i>S. helveticus</i>	3,365	94,0	0,042
53	<i>S. thermophilus</i>	4,300	38,4	0,038

SH — spotreba ml 0,25 mol.l<sup>-1</sup> NaOH na 100 ml.

Kmene 163—179 boli vyizolované v závode 1, kmene 200—53 v závode 2.

SH — ml 0.25 mol l<sup>-1</sup> NaOH consumption per 100 ml.

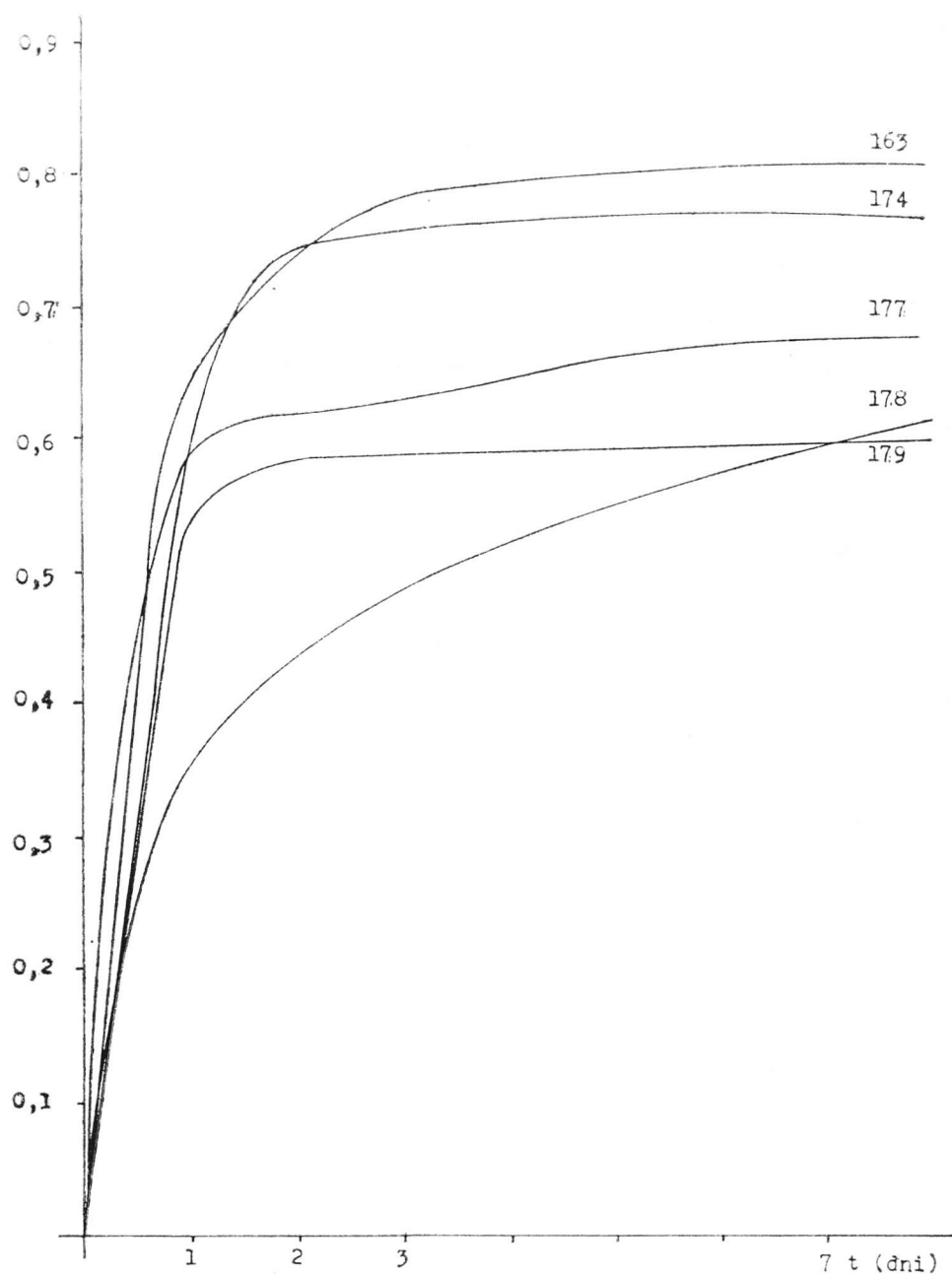
Strains Nos 163—179 were isolated at the dairy plant I, strains Nos 200—53 at the dairy plant II.

<sup>1</sup>Strain No.; <sup>2</sup>Species; <sup>3</sup>Acidity; <sup>4</sup>active (pH); <sup>5</sup>overall (SH); <sup>6</sup>Nitrogen in amino compounds.

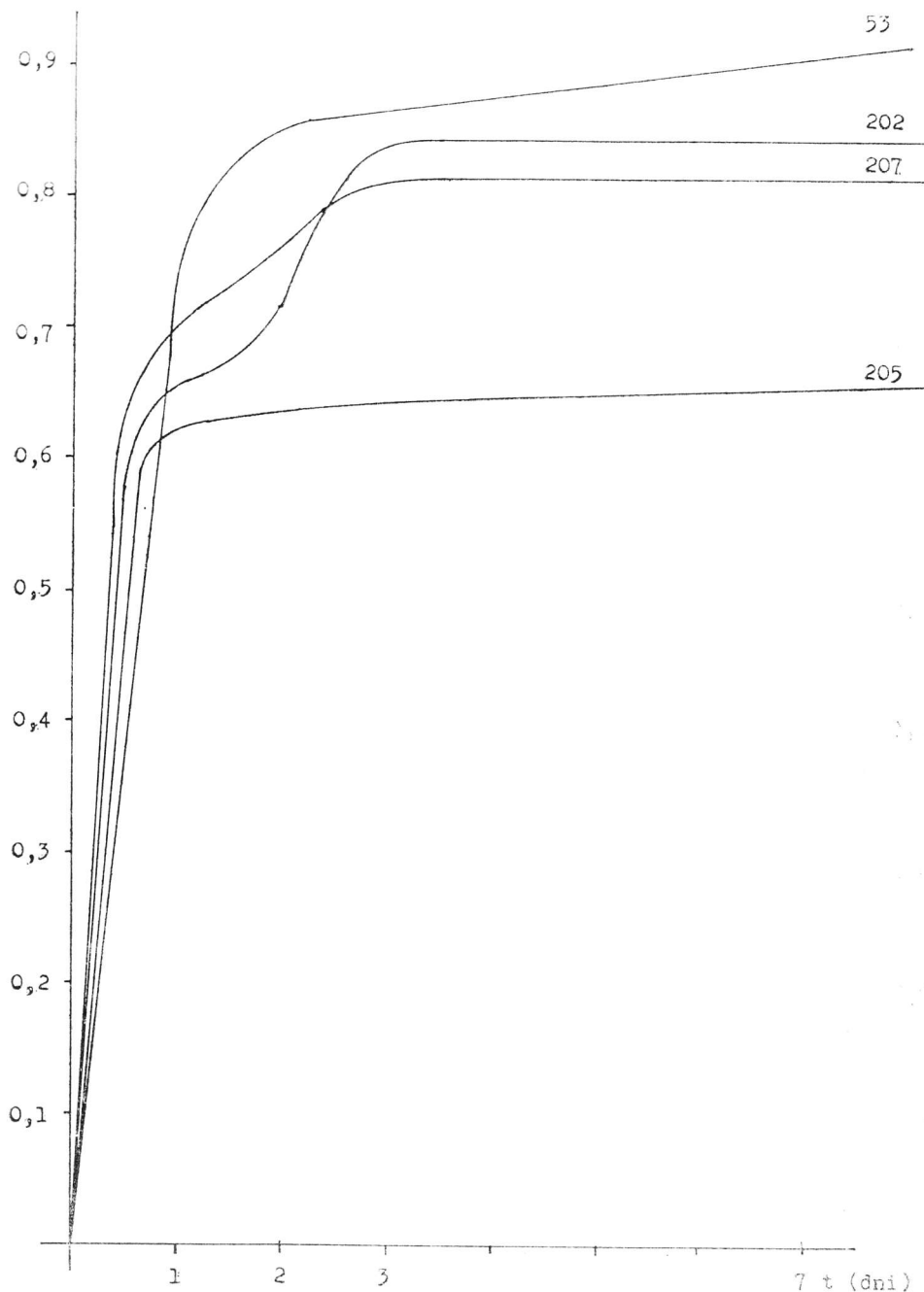
Celková kyslosť kmeňov *S. thermophilus* sa pohybovala od 24,6 do 32,8 ml 0,25 mol.l<sup>-1</sup> NaOH na 100 ml pri kmeňoch vyizolovaných z mlieka v závode 1 a od 28,0 do 39,0 ml 0,25 mol.l<sup>-1</sup> NaOH na 100 ml z mlieka v závode 2. Pri kmeňoch *S. faecalis* to boli korešpondujúce hodnoty od 26,2 do 32,4 a od 30,2 do 40,2 ml 0,25 mol.l<sup>-1</sup> NaOH na 100 ml kultúry.

Priemerné hodnoty aktívnej kyslosti pri kmeňoch *S. thermophilus* z mlieka zo závodu 1 boli pH 4,68 a zo závodu 2 pH 4,50. Pri kmeňoch *S. faecalis* sa zistili rozdielnejšie korešpondujúce hodnoty, a to pH 4,71 a 4,45.

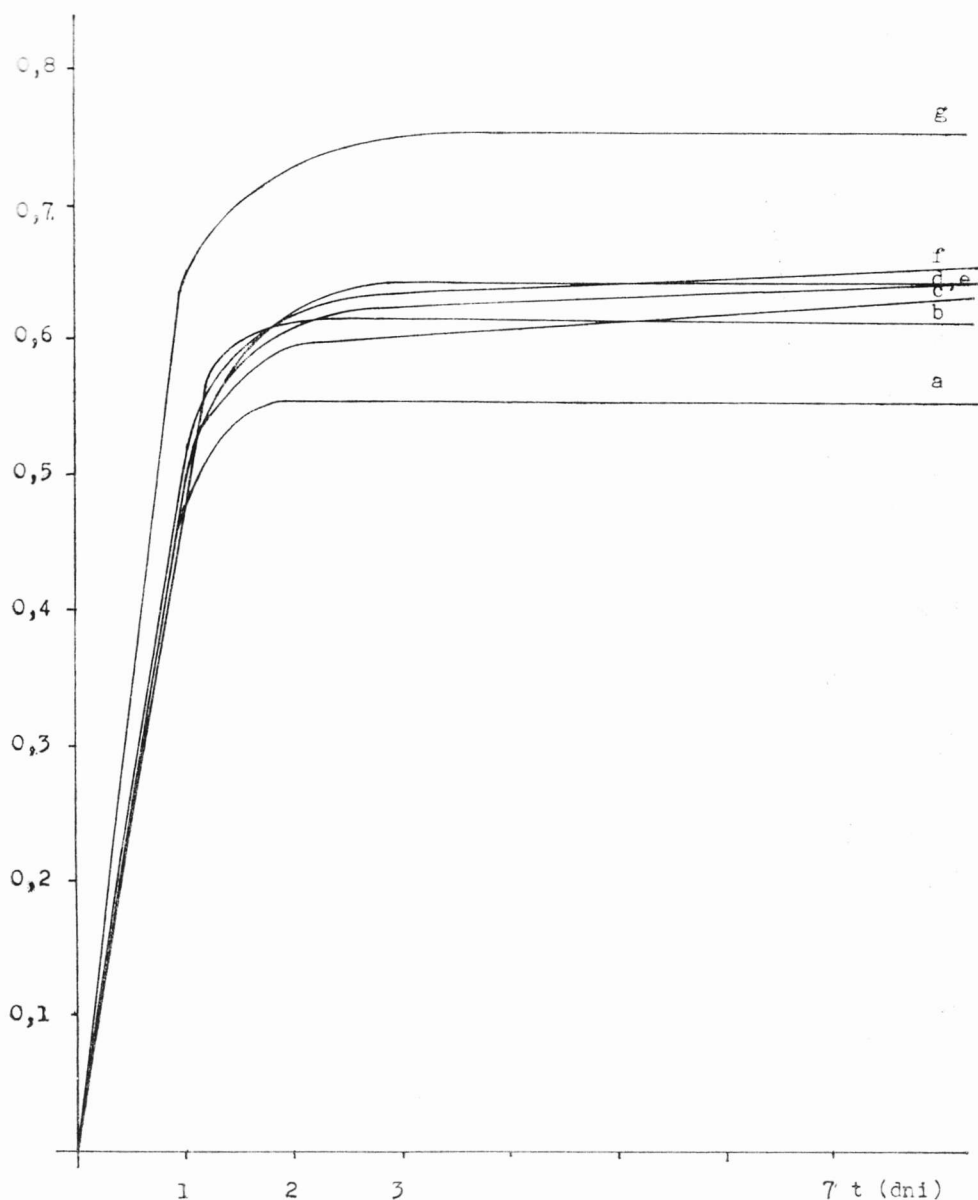
Ešte väčší rozdiel medzi streptokokovými kmeňmi možno pozorovať pri tvorbe kyseliny mliečnej. Kmene vyizolované z mlieka zo závodu 2 produkovali



Obr. 1A. Tvorba kyseliny mliečnej kmeňmi *Streptococcus thermophilus* zo závodu 1.  
 Fig. 1A. Lactic acid produced by the strains of *Streptococcus thermophilus* at the dairy  
 plant 1.

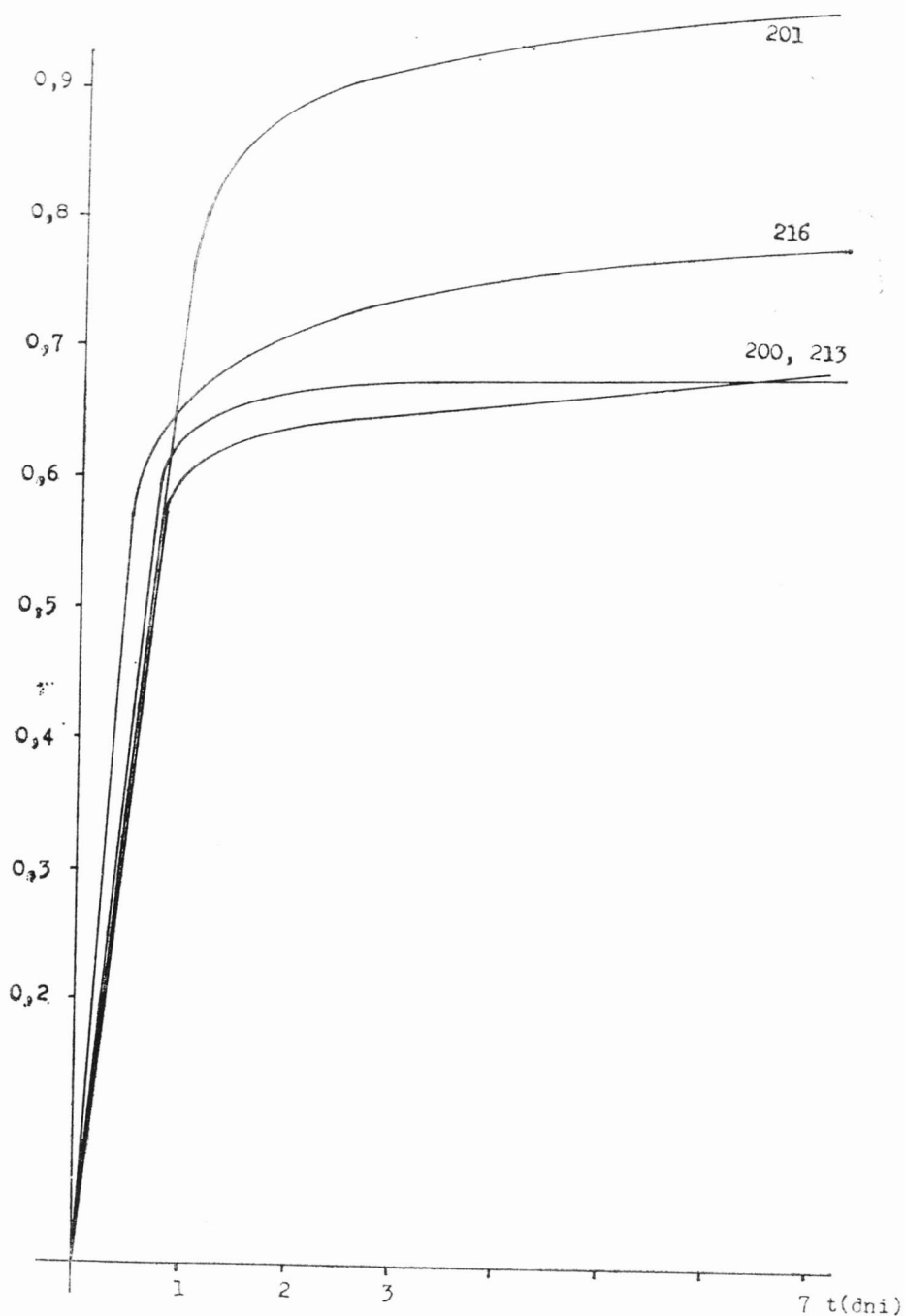


Obr. 1B. Tvorba kyseliny mliečnej kmeňmi *Streptococcus thermophilus* zo závodu 2.  
 Fig. 1B. Lactic acid produced by the strains of *Streptococcus thermophilus* at the dairy  
 plant II.



Obr. 2A. Tvorba kyseliny mliečnej kmeňmi *Streptococcus faecalis* zo závodu 1. a — kmeň 175, b — kmeň 171, c — kmeň 170, d — kmeň 163, e — kmeň 172, f — kmeň 167, g — kmeň 164.

Fig. 2A. Lactic acid produced by the strains of *Streptococcus faecalis* at the dairy plant 1. a — strain No. 175, b — strain No. 171, c — strain No. 170, d — strain No. 163, e — strain No. 172, f — strain No. 167, g — strain No. 164.



Obr. 2B. Tvorba kyseliny mliečnej kmeňmi *Streptococcus faecalis* zo závodu 2.  
 Fig. 2B. Lactic acid produced by the strains of *Streptococcus faecalis* at the dairy plant II.



viac kyseliny mliečnej ako kmene zo závodu 1. Priebeh tvorby kyseliny mliečnej graficky znázorňujú obrázky 1A, B a 2A, B.

Množstvo vytvorenej kyseliny mliečnej po sedemdňovej inkubácii pri kmeňoch *S. thermophilus* vyizolovaných v závode 2 bolo vyššie priemerne o 0,10 % a pri kmeňoch *S. faecalis* o 0,14 % oproti kmeňom vyizolovaným z mlieka zo závodu 1. Pritom treba zdôrazniť, že z 5 kmeňov druhu *S. thermophilus* vyizolovaných z mlieka zo závodu 1 iba tri produkovali percento kyseliny mliečnej v množstve typickom pre tento druh (0,7—0,8 %), dva produkovali menej (0,6 %), kým všetky kmene vyizolované z mlieka zo závodu 2 produkovali kyselinu mliečnu v množstve typickom pre tento druh.

Uvedené zistenia možno potvrdiť rozdielnym množstvom vytvorenej kyseliny mliečnej počas inkubácie. Pri streptokokových kmeňoch vyizolovaných z mlieka zo závodu 2 sme nezistili také veľké rozdiely medzi minimálnou a maximálnou tvorbou kyseliny mliečnej, ako to potvrdzujú výsledky zistené pri kmeňoch vyizolovaných z mlieka zo závodu 1. Pri kmeňoch druhu *S. thermophilus* vyizolovaných z mlieka v závode 2 po prvom dni inkubácie sme zistili rozdiel 13,7 % a po siedmom dni 27,5 % medzi kmeňom vytvárajúcim minimálne a maximálne množstvo kyseliny mliečnej. Pritom zvýšenie percenta kyseliny mliečnej pri kmeni s nízkou produkciou bolo 4,54 % medzi prvým a siedmym dňom a pri kmeni s vysokou produkciou 19,8 %. Väčšiu rozdielnosť sme zistili pri kmeňoch toho istého druhu vyizolovaných z mlieka zo závodu 1; rozdiel medzi kmeňom vytvárajúcim najväčšie a najmenšie množstvo kyseliny mliečnej bol až 44,6 % po prvom dni inkubácie a 25,9 % po siedmom dni inkubácie, pričom prírastok kyseliny mliečnej medzi prvým a siedmym dňom pri kmeni s nízkou tvorbou kyseliny bol 40,0 % a pri kmeni s vysokou tvorbou kyseliny bol 19,7 %.

Podobné rozdiely sme zistili pri kmeňoch druhu *S. faecalis*. V prvom dni inkubácie pri kmeňoch vyizolovaných v závode 2 boli rozdiely 19,6 % a po siedmom dni 28,8 % medzi kmeňmi s minimálnou a maximálnou produkciou kyseliny mliečnej. Pri kmeňoch *S. faecalis* vyizolovaných z mlieka zo závodu 1 boli hodnoty takmer vyrovnané: 29,2 % a 26,3 %. Pri kmeňoch vyizolovaných v závode 2 bol prírastok kyseliny mliečnej medzi prvým a siedmym dňom pri kmeňoch s nízkou tvorbou kyseliny 10,1 % a pri kmeňoch s vysokou tvorbou kyseliny mliečnej 22,7 %. Pri kmeňoch vyizolovaných z mlieka zo závodu 1 boli korešpondujúce hodnoty 17,8 % a 14,5 %.

Pokiaľ ide o intenzitu tvorby kyseliny mliečnej kmeňmi *S. thermophilus*, na začiatku inkubácie boli aktívnejšie kmene vyizolované v závode 2, ktoré po prvom dni inkubácie vytvárali v priemere o 21,7 % viac kyseliny mliečnej ako kmene z mlieka zo závodu 1, pri ktorých intenzívnejšia tvorba kyseliny mliečnej bola medzi prvým a druhým dňom, keď prírastok činil 14,3 %, kým pri kmeňoch zo závodu 2 iba 6,7 %, tieto kmene produkovali najväčšie množstvo

kyseliny mliečnej do tretieho dňa inkubácie, potom sa jej už vytváralo menšie množstvo. Naproti tomu kmene zo závodu 1 mali väčší prírastok kyseliny mliečnej medzi prvým a druhým dňom a, i keď nižší, medzi tretím a siedmym dňom. Najmenší vzrast pri týchto kmeňoch sa zistil medzi druhým a tretím dňom inkubácie. Vytvorené percento kyseliny mliečnej po 7 dňoch bolo vyššie v priemere o 14,8 % pri kmeňoch zo závodu 2.

Podobný priebeh tvorby kyseliny mliečnej sa zistil aj pri kmeňoch druhu *S. faecalis*. Aj v tomto prípade boli na začiatku inkubácie aktívnejšie kmene zo závodu 2, ktoré po prvom dni inkubácie vytvárali priemerne o 22,0 % viac kyseliny mliečnej. Medzi prvým a druhým dňom došlo k intenzívnejšej tvorbe pri kmeňoch zo závodu 1, kde vzrast predstavoval 15,9 % oproti kmeňom zo závodu 2, kde prírastok bol iba 6,8 %. Medzi druhým a tretím dňom bol rast takmer rovnaký pri kmeňoch vyizolovaných v obidvoch závodoch. Percento kyseliny mliečnej po siedmich dňoch bolo vyššie pri kmeňoch zo závodu 2 v priemere o 16,7 %.

Na základe uvedených výsledkov možno konštatovať, že v kysacej aktivite v mlieku sa streptokokové kmene mikroorganizmov vyizolované z pasterizovaného mlieka zo závodu 2 prejavili jednoznačne aktívnejšie a dosahovali priemerne vyššie hodnoty celkovej a aktívnej kyslosti, ale aj v tvorbe kyseliny mliečnej, oproti kmeňom vyizolovaným z pasterizovaného mlieka zo závodu 1.

Na základe týchto výsledkov možno predpokladať, že podobný priebeh prekysávania sa prejaví i počas spracovania a lisovania syrov v prevádzkových podmienkach.

Čo sa týka tvorby kyseliny mliečnej kmeňmi druhu *L. helveticus* a *L. lactis*, zistené výsledky boli typické pre daný druh mikroorganizmov.

Priemerný obsah dusíka aminozlúčenín pri streptokokových kmeňoch bol vyšší pri kmeňoch zo závodu 1 o 9,4 %. Rovnako sa zistili rozdiely medzi obidvoma druhmi. Kmene *S. thermophilus* vyizolované z mlieka zo závodu 1 vytvárali viac dusíka aminozlúčenín o 16,1 % oproti tým istým kmeňom vyizolovaným v závode 2. Naopak, kmene *S. faecalis* vyizolované z mlieka zo závodu 2 vytvárali viac dusíka aminozlúčenín oproti tým istým kmeňom zo závodu 1 o 5,9 %.

#### Literatúra

1. NIEMIERSKI, P. — FEIER, U. — GROSSKLAUS, D.: *Milchwissenschaft*, 37, 1982, č. 3, s. 133.
2. PREKOPPOVÁ, J. — BOROŠ, V.: Zhodnotenie niektorých súčasných kvalitatívnych kritérií nakupovaného mlieka a celého systému hodnotenia. Výskumná správa. Žilina, Výskumný ústav mliekársky 1981.
3. MARTIN, J. H.: *J. Dairy Sci.*, 64, 1981, s. 149.
4. ČSN 57 0529 (návrh). Surové kravské mlieko.

## Кисломолочная термостойкая микрофлора термически обработанного молока

### Резюме

В предлагаемой работе приводятся результаты выявления содержания термоустойчивой микрофлоры на двух молочных заводах, а также результаты изоляции и идентификации термоустойчивых микроорганизмов. Среднее количество микроорганизмов, переживающих пастеризацию (72 °C, 20 секунд), составляло  $40 \cdot 10^3$  и  $45 \cdot 10^3$  КТJ. мл<sup>-1</sup>.

Путем идентификации избранных штаммов кисломолочных термоустойчивых микроорганизмов были выявлены виды *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus lactis* и *Lactobacillus helveticus*. У отдельных штаммов того же вида была выявлена различная биохимическая активность.

## Acidophilous milk thermoresistant microflora in pasteurized milk

### Summary

In the present work results of investigations are given that have been carried out in two dairy plants in order to establish amount of thermoresistant microflora as well as isolate and identify the thermoresistant acidophilous milk bacteria. On average,  $40 \times 10^3$  and  $45 \times 10^3$  colonies-forming units ml<sup>-1</sup> microorganisms have been found to survive pasteurization (72 °C, 20 s).

The identification of selected strains of acidophilous milk thermoresistant microorganisms proved the presence of following bacteria species: *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus lactis* and *Lactobacillus helveticus*. Different biochemical activity was observed with the strains of the same species.