

Rast mikromycét a zmeny v odstredenom sušenom mlieku v závislosti od jeho vlhkosti

MÁRIA GREIFOVÁ - LUBOMÍR VALÍK - FRIDRICH GÖRNER - ERIKA ŠVEDOVÁ

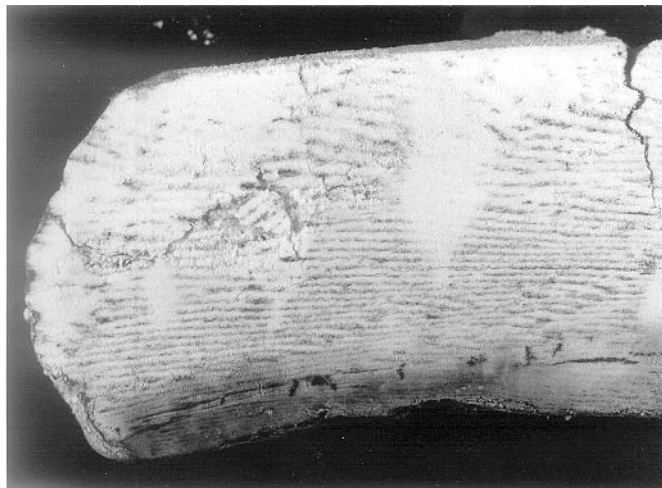
SÚHRN. Vo vzorkách odstredeného sušeného mlieka (OSM) sa upravila ich vlhkosť prídavkom destilovanej vody na 8,0; 13,5; 18,7 a 24,8 %. Pri laboratórnej teplote vo vzorke s obsahom vlhkosti 8,0 % narástol počet mikromycét z pôvodného $1,25 \cdot 10^1$ KTJ.g⁻¹ za 30 dní na $4,3 \cdot 10^2$ KTJ.g⁻¹, ostatné sledované znaky (počet enterokokov, titračná kyslosť, pH-hodnota, obsah amoniaku a senzorické znaky) sa nezmenili. Vo vzorke s obsahom vlhkosti 24,8 % počas 30 dní sa zaznamenali výrazné zmeny sledovaných znakov. Predpokladá sa, že vrstvenie na reze usadeniny OSM bolo spôsobené konštrukciou linky, jej nedostatočným čistením a nedostatočným vysušením po mokrom čistení.

Počas periodickej každoročnej odstávky, pri údržbe a dôkladnom čistení fluidnej sušiarenskej linky boli nájdené v „záveterných miestach“, kde sa prúd vzduchu spomaľuje, usadeniny odstredeného sušeného mlieka (OSM). Na reze jednej bolo vidno vrstvovitú štruktúru (obr. 1.). Orientačným mikrobiologickým vyšetrením usadeniny sa zistilo, že tmavé miesta na reze obsahovali veľké množstvo plesní. Usadeniny boli vlhké, s 10 až 25 % vlhkosťou a ich aktivity vody boli v rozmedzí $a_w = 0,70 - 0,90$.

Pôvod a spôsob vzniku tohto vrstvenia, ako aj rody mikromycét na ňom zúčastnených, bol neznámy. Vyslovili sme názor, že mikromycéty sa mohli rozmnožovať v zvyškoch neodstráneného a neúplne vysušeného OSM v sušiarenskej linke počas medzityždňových odstávok.

Cieľom tejto práce bolo skúmať a objasniť správanie sa mikromycét pôvodne prítomných v OSM a z rekontaminácie, pri vlhkostiach produktu, jeho a_w -hodnotách, teplote a čase, ktoré prichádzajú do úvahy.

Ing. Mária GREIFOVÁ, CSc., Ing. Lubomír VALÍK, CSc., Prof. Ing. Dr. Fridrich GÖRNER, DrSc., Ing. Erika ŠVEDOVÁ, Katedra mlieka, tukov a hygieny potravín, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.



OBR. 1. Rez vrstvovitej usadeniny odstredeného sušeného mlieka nájdenej počas periodickej každoročnej odstávky pri dôkladnom čistení sušiarenskej linky (foto RNDr. Vollek).

FIG. 1. A section of layer-like deposit of dried skim milk found at cleaning of the drying line during a periodic annual standstill (photo RNDr. Vollek).

Materiál a metódy

Pripravili sme vzorky OSM s prídavkom vypočítaného množstva sterilnej destilovanej vody na dosiahnutie vlhkostí asi 8 %, 13 %, 18 % a 24 %. Pri výpočte množstva pridanej vody sme zohľadňovali množstvo potrebné na vykryštalizovanie amorfnej laktózy prítomnej v OSM. Výslednú presnú vlhkosť pripravených vzoriek sme stanovili vážkovou metódou podľa ČSN 57 0105 [1]. Presné vlhkosti vzoriek upraveného OSM boli 8,0 %; 13,5 %; 18,7 % a 24,8 %. Takto pripravené vzorky sme uchovávali v tesne uzavretých sklenených vzorkovniciach pri laboratórnej teplote (24 až 26 °C). Vzorkovnice sme otvárali len na najnutnejší čas na naváženie vzorky.

Aktivitu vody pripravených vzoriek OSM sme stanovili komparačnou gravimetrickou metódou vyvinutou Landrockom a Proctorom [2] a uverejnenou v návrhu STN 56 0030 [3].

Mikrobiologicky sme pripravené vzorky sušeného odstredeného mlieka vyšetrovali najmenej 4-krát na počet mikromycét a počet enterokokov v nepravidelných časových intervaloch.

Na stanovenie počtu mikromycét sme použili GKCH agar (agar s glukózou, kvasničným autolýzátom a chloramfenikolom, výrobok Imuna, Šarišské Michaľany o zložení: glukóza 20 g, kvasničný autolýzát 5 g, chloramfenikol

0,1 g, agar 11 g, voda 1 l, pH po vysterilizovaní $6,5 \pm 0,1$) a ADM agar (*Aspergillus* diferenčiacné médium o zložení: peptón 15 g, kvasničný autolyzát 10 g, citran železitý 0,5 g, chloramfenikol 0,05 g, agar 20 g, destilovaná voda 1 l).

Počet enterokokov sa stanovil na selektívnom agare pre izoláciu „fekálnych streptokokov“ (výrobok Imuna, Šarišské Michaľany o zložení: peptón 20 g, kvasničný autolyzát 5 g, hydrogénfosforečnan sodný 4 g, glukóza 2 g, azid sodný 0,6 g, trifenyltetrazoliumchlorid 0,15 g, agar 12,5 g, destilovaná voda 1 l, výsledné pH $7,2 \pm 0,1$).

Charakteristické kolónie mikromycét vyrastené na ADM agare sme bližšie identifikovali podľa postupov uvedených v publikácii Betina a kol. [4]. Súčasne sme zaznamenávali zmeny vzhľadu vzoriek OSM s upravenou vlhkosťou. Pri kvantitatívnom hodnotení kolónií vyrastených na polotuhých kultivačných médiach sme pokračovali podľa pravidiel publikovaných v práci [5].

Titračnú kyslosť upravených vzoriek OSM pred pokusom a počas neho sme stanovili podľa STN [1].

Potenciálnu kyslosť, pH sme merali pomocou digitálneho pH-metra OP-211/1 Radelkis Budapest.

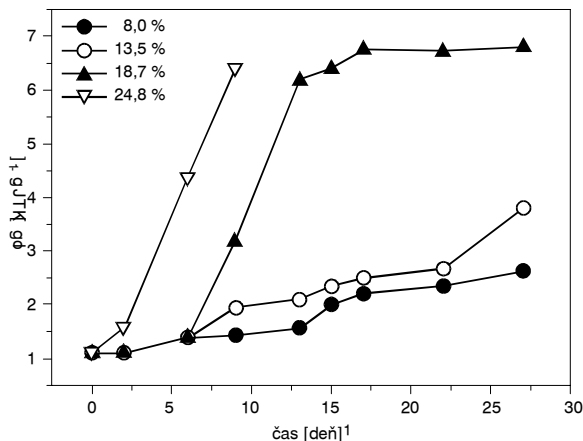
Obsah amoniaku vo vzorkách OSM pred pokusom a počas neho sme stanovili mikrodifúznou metódou [1].

Výsledky

Rast mikromycét a s ním súvisiace zmeny v OSM

Viditeľný rast mikromycét sa objavil najskôr vo vzorke OSM s vlhkosťou 24,8 %, a to 6. deň po zvlhčení. Na povrchu OSM a postupne aj vo vnútri sa objavili náznaky kolónií, ktoré časom narastali. Zároveň sa menila aj farba vzorky z pôvodnej na intenzívnu žltú, čo svedčilo o tvorbe farebných mikrobiálnych metabolitov. Po otvorení vzorkovnice sa zistila výrazná zmena vône OSM na potuchnutú. Na vzorke OSM s vlhkosťou 18,7 % sa kolónie mikromycét objavili až 13. deň po navlhčení. Pri ostatných vzorkách (s 13,5 % a 8,0 % vlhkosťou) sa viditeľný rast mikromycét nezistil do 27. dňa. Kultivačné vyšetrenia svedčili o prítomnosti mikromycét v OSM.

Počet mikromycét stanovený na GKCH médiu bol v čerstvom OSM (nezvlhčenom) $1,25 \cdot 10^1$ KTJ.g⁻¹ a už pri vlhkosti prášku 8,0 % počas 27 dní narástol na $4,3 \cdot 10^2$ KTJ.g⁻¹. Pri ďalšej zvýšenej vlhkosti 13,5 % sa počet mikromycét 15. deň zvýšil o 1 poriadok a 27. deň dosiahol denzitu $6,5 \cdot 10^3$ KTJ.g⁻¹. Vo vzorke s vlhkosťou 18,7 % počet mikromycét stúpol



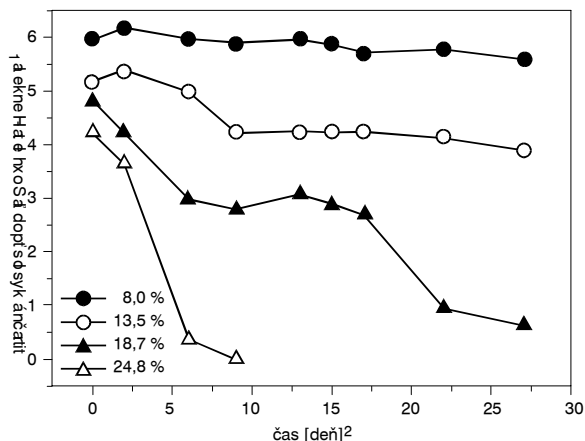
OBR. 2. Rast mikromycét v odstredenom sušenom mlieku v závislosti od jeho vlhkosti a času.
FIG. 2. Growth of micromycetes in dried skim milk in dependence upon humidity and period of time.

1 - period of time [day].

9. deň o dva log poriadky a 13. deň už bol nameraný počet 10^6 KTJ.g⁻¹, čo sa zároveň prejavilo aj viditeľným rastom kolónií na OSM. Pri vlhkosti 24,8 % výrazný rast mikromycét sa zaznamenal už 6. deň. Keďže viditeľný rast mikromycét na tejto vzorke bol každý deň mohutnejší, kultivačne sa od 9. dňa už nevyšetrovala. Rast mikromycét vo zvlhčenom OSM v závislosti od jeho vlhkosti a času je graficky znázornený na obr. 2.

Súčasne s mikrobiologickým vyšetrením zvlhnutých vzoriek OSM sa stanovila v každom vyšetrovanom čase aj ich titračná kyslosť. Stanovené hodnoty sú graficky znázornené na obr. 3.

Titračná kyslosť vo vzorke s vlhkosťou 8,0 % sa s časom výrazne nemenila. Vo vzorkách s vyššou vlhkosťou (13,5 %; 18,7 %; 24,8 %) postupne klesala, pričom dynamika jej poklesu sa zvyšovala s rastom vlhkosti OSM.



OBR. 3. Zmena titračnej kyslosti vzoriek odstredeného sušeného mlieka v závislosti od vlhkosti a času.

FIG. 3. Alteration of titratable acidity of dried skim milk in dependence upon humidity and period of time.

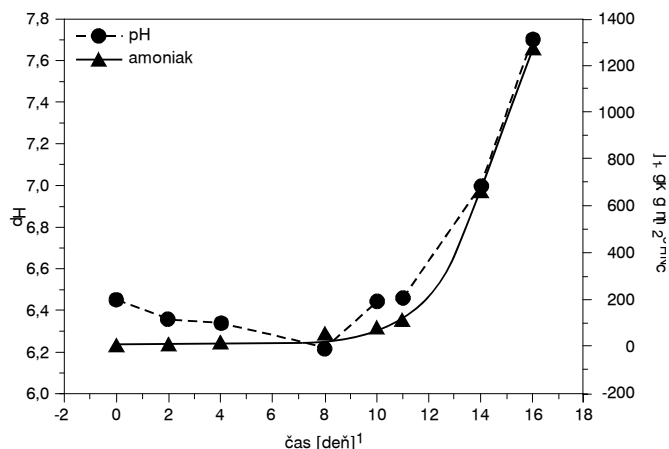
1 - titratable acidity (Soxhlet-Henkel), 2 - period of time [day].

Vo vzorke zvlhčenej na 24,8 % bol pokles titračnej kyslosti najrýchlejší, v deviaty deň inkubácie sa už stala alkalickou.

Počet enterokokov stanovený na selektívnom agare pre izoláciu fekálnych streptokokov bol v OSM s vlhkosťou 24,8 % na začiatku pokusu 50 KTJ.g^{-1} a počas 9 dní sledovania sa ich počet zvýšil o 7 log poriadkov až na hodnotu $1,1 \cdot 10^8 \text{ KTJ.g}^{-1}$.

Produkcia amoniaku vo vzorke zvlhčenej na 24,8 % dosiahla merateľnú hodnotu 4. deň po zvlhčení OSM a ďalej sa jeho koncentrácia zvyšovala (obr. 4).

Pri sledovaní pH hodnoty tohto OSM (24,8 %-nej vlhkosti) sa pozoroval do 8. dňa mierny pokles, potom nárast na hodnotu 7,7.



OBR. 4. Zmena pH a koncentrácie amoniaku v odstredenom sušenom mlieku s vlhkosťou 24,8 %.

FIG. 4. Alteration of the pH values and ammonia concentrations in dried skim milk of 24,8 % humidity .

1 - period of time [day],
2 - ammonia.

Identifikácia kolónií mikromycét

Okrem stanovenia celkového počtu mikromycét v OSM sa identifikovali ich najčastejšie sa vyskytujúce rody. Hodnotili sa morfológicky a ich charakteristické fruktifikačné štruktúry sa pozorovali mikroskopicky v laktofenolových natívných preparátoch a v mikrokultúrach [4]. Pomocou týchto pozorovaní boli určené rody *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces*.

V prvých dňoch po navlhčení sušeného mlieka boli na miskách pozorované vyššie uvedené rody mikromycét. Postupom času vo vzorkách OSM s vyššou vlhkosťou prevládali kolónie *Penicillium* sp., sporadicky *Aspergillus* sp. Najčastejšie sa vyskytovali kmene *Penicillium citrinum*.

Diskusia

Dobré sušené mlieka nemajú mať, podľa obsahu tuku, väčšiu vlhkosť ako 6 % odstredené a 4 % plnotučné.

Na obr. 2. je vidno, že pri umelo upravenej vlhkosti OSM 18,7 %, čo zodpovedalo aktivite vody $a_v = 0,90$, sa zaznamenal významný rast mikromycét asi po 5. dni a pri vlhkosti 24,8 %, čo taktiež zodpovedalo podobným a_v -hodnotám po 2 až 3 dňoch. Ak tieto vlhkosti a a_v -hodnoty porovnáme s tými, ktoré boli namerané v usadeninách v sušiacom zariadení (asi 25 %), môžeme uzatvárať, že mikromycéty v nich rástli počas koncotýždňových odstávok procesu sušenia. Vlhkosť usadeného mliečneho prášku bola spôsobená nedostatočným vysušením zariadenia a mikromycéty mohli rásť na miestach s vhodnou teplotou aj viac dní.

Na obr. 3. je vidno, že s rastom počtu mikromycét súviseli aj chemické zmeny vo zvlhnutom OSM. Jeho titračná kyslosť s rastúcou vlhkosťou a s časom klesala, čiže produkt sa stával alkalickým. Tento jav bol najpravdepodobnejšie spôsobený deamináciou bielkovín za vzniku amoniaku, najmä proteolytickými mikromycétami.

Na obr. 4. je vidno, že do 6 až 8 dní potenciálna kyslosť upravených vzoriek, čiže ich pH-hodnota, klesala. To znamená, že pravdepodobne prebiehala sacharolytická fermentácia laktózy enterokokmi, ako to už bolo namerané v práci Greifovej a Görnera [7]. Po tomto čase už prevládala proteolytická činnosť mikromycét [6], čo sa významne manifestovalo nárastom obsahu amoniaku vo vzorkách, ako aj s tým spojeným rastom pH-hodnoty vzoriek skoro až k neutrálnemu bodu.

Otvorenou ostala otázka, či identifikovaný kmeň *Aspergillus flavus* produkoval alebo neprodukoval mykotoxíny - aflatoxíny. S touto otázkou sa u nás experimentálne zaoberali v minulosti aj autori Görner - Vollek - Hrdinová [8]. Aj títo však dokázali iba rast *A. flavus* v experimentálne navodených podmienkach, ale samotné aflatoxíny nedokázali. Podobne sme ďalej netestovali ani potenciálnu toxigenitu najčastejšie izolovaných kmeňov *Penicillium citrinum* - známych producentov citrinínu.

Výsledky našich pokusov, ako aj vyššie uvedených autorov, však dôrazne upozorňujú na skutočnosť, že v nedostatočne čistených alebo v nevhodne konštruovaných sušiacich linkách na mlieko je možný rast mikromycét a potenciálna možnosť tvorby mykotoxínov.

Literatúra

1. STN 57 0105. Metody zkoušení mléčných výrobků sušených a zahuštěných. Praha 1965.
2. LANDROCK, A. N. - PROCTOR, B. E.: Measuring humidity equilibria. Mod. Packg, 24, 1951, s. 123-186.
3. STN 56 0030. Stanovenie aktivity vody v potravách. Bratislava 1996.
4. BETINA, V. a kol.: Mikrobiologické laboratorné metódy. Bratislava, Alfa 1987, 544 s.
5. VALLUŠOVÁ, M. - GÖRNER, F.: Biometrické hodnotenie stanovenia počtu mikroorganizmov v odstredenom sušenom mlieku. Bull. potrav. Výsk., 26, 1987, s. 77-83.
6. ISMAIL, M. A. - OMAR, S. A.: Factors affecting ureolytic activities of *Penicillium waksmanii* isolated from sewage sludge. Folia microbiol. (Praha), 39, 1994, s. 441-444.
7. GREIFOVÁ - VALLUŠOVÁ, M. - GÖRNER, F.: Dynamika rastu mikroorganizmov v sušenom mlieku v závislosti od vlhkosti. Bull. potrav. Výsk., 33, 1994, s. 99-109.
8. GÖRNER, F. - VOLLEK, W. - HRDINOVÁ, I.: Podmienky rastu *Aspergillus flavus* v sušenom mlieku. Čs. Hyg., 25, 1980, s. 481-488.

Do redakcie došlo 19. 2. 1997.

Dependence of micromycetal growth and dried skim milk alterations on humidity of milk powder

GREIFOVÁ, M. - VALÍK, L. - GÖRNER, F. - ŠVEDOVÁ, E.:
Bull. potrav. Výsk., 36, 1994, p. 27-33.

SUMMARY. Humidity of dried skim milk was adjusted to 8.0; 13.5; 18.7 and 24.8 % with distilled water. In the sample of 8.0 % humidity, the overall number of micromycetes increased from $1.25 \cdot 10^1$ CFU.g⁻¹ to $4.3 \cdot 10^2$ CFU.g⁻¹ at ambient temperature during 30 days. Another characteristics like number of enterococci, titratable acidity, pH, ammonia concentration and organoleptic characteristics remained unchanged. In case of 24.8 % humidity, significant changes of all examined characteristics were observed within 30 days. We assume, that the layers on deposit of dried skim milk were created due to construction of production line as well as to insufficient cleaning and drying of the equipment following its wet cleaning.