

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

**Psychrotrofní lipolytické bakterie a obsah volných mastných kyselin
v bazénových vzorcích syrového kravského mléka**

Psychrotrophic lipolytic bacteria and content of free fatty acids in bulk
samples of cow's raw milk

Magda Mikulová

doktorská disertační práce

Ph.D. Thesis

školitel: **prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.**

školitel specialista: **MVDr. Růžena Cempírková, CSc.**

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Katedra
veterinárních disciplín a kvality produktů

České Budějovice 2012

Doktorská disertační práce / Ph.D. Thesis

Mikulová M., (2012): Psychrotrofní lipolytické bakterie a obsah volných mastných kyselin v bazénových vzorcích syrového kravského mléka. [Psychrotrophic lipolytic bacteria and content of free fatty acids in bulk samples of cow's raw milk]–55 p., Faculty of Agriculture, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace / Annotation:

The objective of the study was to analyze the relationship of psychrotrophic lipolytic bacteria in bulk samples of cow's raw milk and their metabolic activity based on the content of free fatty acids and identifying the factors that may influence their levels. The contents of free fatty acids (FFA) and counts of total bacteria, psychrotrophic lipolytic bacteria (PLiBC) and somatic cells were determined in 150 samples of cow's bulk raw milk on 20 farms with three different milking technologies in South Bohemia during 2008–10. FFA were determined using an extraction-titration method. Within the compared technologies, the highest mean values of FFA ($38,8 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$; $P<0,001$) and PLiBC ($696 \text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$) were observed on farms with pipeline milking in stalls. The lowest mean FFA level ($15,4 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$) was determined on farms with an automatic milking system. Medium values were determined on farms with parlour milking.

From the aspect of the inhibition of an increase in psychrotrophic bacteria, and mainly in psychrotrophic lipolytic bacteria in conditions of cold storage of raw milk the temperature of 4°C seems optimum as it markedly inhibits the growth of mesophilic and psychrotrophic bacteria and at the same time the increase in the values of free fatty acids is slower at this temperature compared to the temperatures of $6,5$ and 10°C .

Práce vznikla za podpory těchto grantů / This study was supported by the following grants:

IG 03/2008

FRVŠ 1576/2009

MSM6007665806

NAZV QH81105

GA JU 022/2010

Prohlašuji, že svoji disertační práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své disertační práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

20. 4. 2012 Magda Mikulová

.....

Prohlášení spoluautorů:

Prohlašujeme, že se Magda Mikulová podstatným způsobem podílela na uvedených publikacích:

Cempírková R., Mikulová M. (2009): Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. Czech Journal of Animal Science, 54, 65–73.

Cempírková R., Mikulová M., Trávníček J. (2009): Counts of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk samples from the aspect of technological quality. Journal of Agrobiology, 26, 113–121.

MVDr. Růžena Cempírková, CSc.

prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

Seznam publikací

Disertační práce vychází z těchto publikací:

I. Cempírková R., **Mikulová M.** (2009): Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. *Czech Journal of Animal Science* 54, 65–73.

II. Cempírková R., **Mikulová M.**, Trávníček J. (2009): Counts of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk samples from the aspect of technological quality. *Journal of Agrobiology* 26, 113–121.

III. **Mikulová M.** (2011): Content of free fatty acids, lipolytic bacteria and somatic cells in relation to milking technology. *Journal of Agrobiology* 28, 49–54.

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu disertační práce prof. Ing. Janu Trávníčkovi, CSc., za pomoc a rady, které mi poskytoval při studiu a za jeho trpělivost a ochotu řešit i situace, které se týkaly nejen mé disertace a studia.

Srdečně děkuji MVDr. Růženě Cempírkové, CSc., za její odbornou pomoc, rady a zkušenosti, které mi poskytovala během celého studia a za to, že důsledně vedla mé kroky od počátku až ke zdárnému dokončení práce.

Vynechat nemohu prof. Ing. Pavla Kalače, CSc., který mi pomáhal při zpracovávání disertační práce a publikací- děkuji!

Mé poděkování náleží také prof. RNDr. Ing. Vlastě Kroupové, CSc. za veškeré odborné zaškolení týkající se nejen metodiky mé práce a za její vstřícnost.

Poděkování patří také všem pracovníkům a doktorandům katedry veterinárních disciplin a kvality produktů za jejich pomoc v průběhu mého studia.

Má práce by nemohla vzniknout bez pomoci laboratoří Madeta a Buštěhrad proto můj dík patří také RNDr. Heleně Pešinové a pracovníkům laboratoře Madeta. Paní Naděždě Turnhöferové a panu řediteli Ing. Milanu Sodomkovi z mlékárny Hlinsko velice děkuji za poskytnutí cenných podkladů pro mou disertaci.

Závěrem, ale nejvíce bych také ráda poděkovala mé rodině a přátelům za jejich podporu.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. CÍL PRÁCE	2
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
Mikrobiologie mléka.....	3
Mikroorganismy syrového kravského mléka.....	4
Faktory přispívající ke kontaminaci mléka.....	4
Zdroje mikroorganismů	5
Psychrotrofní mikroorganismy	5
Termostabilní a sporotvorné mikroorganismy.....	6
Koliformní mikroorganismy	8
Patogenní mikroorganismy v mléce.....	9
Imunita mléčné žlázy	10
Mastitidy a jejich původci.....	11
Požadavky na jakost syrového kravského mléka.....	14
Lipolytické změny mléka.....	16
Spontánní lipolýza	18
Mikrobiální lipolýza.....	19
Proteolytické změny mléka.....	20
Lipidy mléka	21
Mastné kyseliny	22
Struktura a názvosloví mastných kyselin.....	24
Nasycené mastné kyseliny	24
Nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou	25
Nenasycené mastné kyseliny se dvěma a více dvojnými vazbami	26
Volné mastné kyseliny	27
Metody stanovení obsahu volných MK v syrovém kravském mléce	27
4. SHRUTÍ VÝSLEDKŮ DISERTAČNÍ PRÁCE.....	29
5. ZÁVĚR	32
6. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY.....	33
7. PŘÍLOHY	47
Publikace I.	47
Publikace II.	51
Publikace III.....	54

1. ÚVOD

Psychrotrofní mikroflóra (s teplotním rozpětím 3-7 °C) syrového kravského mléka je považována za doplňkový ukazatel hygieny výroby mléka (ČSN 57 0529). Je možné předpokládat, že farení chladové uskladnění mléka omezuje růst mezofilní mikroflóry (s teplotním optimumem 37 °C) na minimum, avšak nízké teploty umožňují růst psychrotrofní mikroflóry mléka (BURDOVÁ a kol., 2002). Psychrotrofní bakterie produkují termorezistentní extracelulární proteolytické a lipolytické enzymy, které představují riziko kvalitativních problémů při zpracování mléka a kažení finálních výrobků během uskladnění. Významnou kontaminaci syrového kravského mléka z hygienického a technologického hlediska představují bakterie rodů *Bacillus* a *Pseudomonas*. Vyskytují se běžně ve stájovém prostředí. Některé druhy rodu *Bacillus* se vyznačují vysokou lipolytickou a proteolytickou aktivitou. Po vyklíčení spor v mléce a mléčných výrobcích působí lipolytické enzymy (lipázy) produkované bakteriemi hydrolyzu tuku a produkci volných mastných kyselin. Lipázy jsou většinou produkovány mikroorganismy v pozdní lag fázi a časně stacionární fázi růstu, proto mezi počtem mikroorganismů a aktivitou enzymů není přímý proporcionální vztah. Působení lipáz napomáhají fyzikální jevy uplatňující se při zpracování mléka jako homogenizace, náhlé změny teplot, intenzivní míchání, či turbulence mléka v potrubí, které mohou poškozovat lipoproteinovou membránu tukových kuliček a tím zpřístupnit tuk vůči působení lipáz (JANŠTOVÁ a kol., 2004).

V důsledku lipolýzy se také zvyšuje obsah volných MK (mastných kyselin) v mléce. (BURDOVÁ a kol., 2002; VYLETĚLOVÁ a kol., 1999; CHEN a kol., 2003). Změny v koncentraci volných mastných kyselin v mléce mohou sloužit jako nepřímý ukazatel lipolytické aktivity (CHEN a kol., 2003). Obvyklý obsah volných MK v mléčném tuku je mezi 5 a 12 mmol·kg⁻¹ (PETERKOVÁ, 2002). Povolené maximum obsahu volných MK je 13,0 mmol·kg⁻¹ pro metodu stlukem, nebo 32,0 mmol·kg⁻¹ pro extrakčně titrační metodu (ČSN 57 0529). Jako hranici rizika lipolytických změn chuťových vlastností mléka uvádí KRATOCHVÍL (1992) obsah volných MK 49 mmol·kg⁻¹ při stanovení extrakčně-titrační metodou.

PETERKOVÁ (2002) uvádí, že pro mlékárenskou praxi jsou významné *tři typy lipolýzy*. Jako první uvádí *Spontánní lipolýzu*, která je vyvolaná nativními mléčnými lipázami a probíhá i v mléce s neporušenými tukovými kuličkami. Faktory, označované jako původní příčina vzniku spontánní lipolýzy, jsou pozdní stadium laktace, složení

krmné dávky, nízká mléčná užitkovost, hormonální léčba, mastitidy a zvýšený počet somatických buněk v mléce. *Indukovaná lipolýza* je vyvolána rovněž nativními lipázami a dochází k ní při vystavení mléka mechanickému působení a současnému působení zvyšující se teploty, které vedou k poškození membrán tukových kuliček, čímž se usnadní činnost lipáz a uvolňují se volné mastné kyseliny. Třetím typem je *mikrobiální lipolýza* vyvolaná mikrobiálními termorezistentními lipázami psychrotrofních bakterií, které se uplatňují po pasteraci.

Na rozdíl od nativních lipáz jsou bakteriální lipázy termorezistentní a zůstávají aktivní i po záhřevu včetně UHT ošetření mléka, kde způsobují rozvoj žluklé chuti a vůně a podílejí se tak na znehodnocení výrobku. Nežádoucí chuť mléka způsobují zejména volné mastné kyseliny s krátkým a středně dlouhým řetězcem, jejichž aroma je výrazné. Tyto volné MK mohou zapříčinit například žluklou, hořkou, či mýdlovou chuť (DEETH, 2006; CHAMPAGNE a kol., 1994).

2. CÍL PRÁCE

Cílem řešení bylo stanovení množství psychrotrofních bakterií v bazénových vzorcích syrového kravského mléka a jejich metabolické aktivity na základě obsahu volných mastných kyselin a určení faktorů, které mohou jejich množství ovlivňovat. Práce zahrnuje tyto dílčí cíle:

- zhodnocení výskytu psychrotrofních bakterií v syrovém kravském mléce u vybraných chovů z různých krajů,
- kvantitativní zastoupení jednotlivých druhů psychrotrofních bakterií a jejich dynamika,
- vyjádření závislosti mezi zastoupením psychrotrofních bakterií a jejich lipolytickou aktivitou na základě koncentrace volných mastných kyselin,
- stanovení koncentrace volných mastných kyselin (základní metodou- extrakčně titrační a infračervenou spektrofotometrií nebo plynovou chromatografií) při různém zastoupení psychrotrofních bakterií v souvislosti s aktivitou a dynamikou,
- určení souvislostí mezi teplotou uchování mléka a výskytem psychrotrofních bakterií.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

Mikrobiologie mléka

Hipokrates jako otec medicíny považoval mléko podle jeho nutriční hodnoty za „téměř dokonalou potravinu“. U novorozených mláďat savců jsou veškeré živinové požadavky kryty mlékem. Pokud je mléko nutričně nekompletní, přežívání mláďat savců je obtížné (ENSMINGER, 1993).

Mléko je sekret mléčné žlázy samic savců (přes 4000 druhů), a je často jediným zdrojem potravy pro mláďata savců. Funkce mléka je poskytovat živiny a imunologickou ochranu. Největší množství zpracovávaného mléka pro lidskou spotřebu tvoří u velké části světové populace mléko kravské. Mléko je komplexní biologická tekutina obsahující asi 100 000 různých sloučenin. Hlavní složky mléka byly důkladně prozkoumány a základní charakteristiky jednotlivých složek jsou dobře známé. Mléko ve svém přirozeném stavu je vysoce neúdržný materiál, protože je náchylné k rychlému kažení působením přirozeně se vyskytujících enzymů a kontaminujících mikroorganismů. Během posledního století bylo vyvinuto mnoho procesů k prodloužení trvanlivosti mléka na dlouhou dobu a ke zvýšení jeho využití a bezpečnosti. Mléko se zpracovává na širokou škálu mléčných výrobků pomocí řady pokročilých technologií. V mnoha zemích je mléko a mléčné výrobky nepostradatelnou součástí potravinového dodavatelského řetězce. Neméně důležitá je skutečnost, že mléko je výborným zdrojem živin pro člověka, avšak v jiné souvislosti tytéž živiny poskytují velmi vhodné médium pro růst mikroorganismů a jejich metabolismus. Mikrobiologie mléka a mléčných výrobků proto zůstává prioritním zájmem mlékárenského průmyslu (CHAMBERS, 2005).

Mikroorganismy syrového kravského mléka

V syrovém kravském mléce se mohou vyskytovat tyto rody bakterií: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus* a koliformní bakterie (COUSIN, 1982). Mezi bakterie vyskytující se v mléce, které mohou způsobit onemocnění, patří např. *Salmonella* (GREENWOOD a HOOPER, 1983; HALPIN-DOHNALCK a MARTH, 1989; D'AOUST, 1991), *Staphylococcus* a *Escherichia coli* (LECHEVALLIER a kol., 1996; SHINODA a kol., 1979; STARK, 2000). Ostatní psychrotrofní bakterie přítomné v chlazeném syrovém mléce patří k rodům *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Listeria*, *Arthrobacter* (DESMASURES, 1995).

Faktory přispívající ke kontaminaci mléka

Nedodržení hygienických zásad týkajících se veškeré manipulace s mlékem, zkrácení doby skladování, použití účinných chladicích teplot, dostupnost metody pro snížení patogenní mikroflóry a efektivní využití systémů Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) jsou hlavní problémy postihující úseky, které musí řešit mlékárenský průmysl (SØRHAUG A STEPANIAK, 1997).

Na kontaminaci mléka bakteriemi se podílejí tyto zdroje: okolní prostředí, běžná mikroflóra vemene a mikroorganismy účastníci se infekce vemene (VAN SCHAIKA a kol., 2005). Počet a typ mikroorganismů v mléce bezprostředně po nadojení (tj. počáteční mikroflóra) přímo odráží mikrobiální kontaminaci během výroby a zpracování. Po opuštění hospodářství je mikroflóra mléka významně ovlivněna skladovací teplotou a dobou, která uplynula od nadojení. Pokud je mléko uloženo při teplotách nižších než 4°C, dochází k omezení bakteriálního růstu. Pokud nejsou dojící zařízení nebo mléčné tanky udržovány v požadovaných hygienických podmínkách, mohou nízké teploty tento fakt maskovat (CHAMBERS, 2005). Zdravotní stav zvířat, druh krmiv (zelená píce, siláž atd.) a podmínky skladování syrového mléka jsou také důležité faktory, které určují složení mikroflóry mléka (THOMAS, 1973).

Riziko bakteriální kontaminace mléka začíná na úrovni zemědělského podniku a stoupá s počtem zpracovatelů mléka (OMORE a kol., 2004). Nedostatečná hygiena mléka jako jedna z hlavních příčin jeho špatné mikrobiologické kvality má za následek ztrátu příjmu pro zemědělského prvovýrobce (BONFOH a kol., 2003).

Zdroje mikroorganismů

U zdravých krav je mléko uvnitř mléčné žlázy sterilní a bakteriální kontaminace začíná až s dojením. Ke kritickým místům, kde může dojít ke kontaminaci mléka, patří prostory, kde se mléko po nadojení skladuje, svozové cisterny a v neposlední řadě také přímo mlékárenské závody (BONFOH a kol., 2003; GRAN a kol., 2002; SRAÏRI a kol., 2009). Zdroje kontaminace mléka jsou rozmanité, bakterie mohou pocházet například z vody, půdy, ovzduší, výkalů, vemene, dojícího zařízení a rukou pracovníků (ANDERSSON a kol., 1995). Voda používaná v procesu produkce mléka by měla být kvalitní, pitná. To znamená, že přívod vody musí být ze schváleného zdroje, bez patogenů a fekálního znečištění. V mnoha případech farmy získávají vodu z neupravených vodních zdrojů (vrty, studny, jezera, prameny a řeky), které mohou být kontaminovány mikroorganismy fekálního původu. Jedná se zejména o koliformní bakterie, fekální streptokoky a klostridie. Mohou být přítomny i další druhy pocházející z půdy nebo vegetace: *Pseudomonas sp.*, koliformní bakterie, spory rodu *Bacillus*, koryneformní bakterie a bakterie mléčného kvašení. Obsahy těchto mikroorganismů ve vodě se mohou značně lišit. Zásobování pitnou vodou v hospodářství je třeba řádně chránit před hlodavci, ptáky a hmyzem (CHAMBERS, 2005). Pokud zvířata konzumují krmivo kontaminované sporotvornými bakteriemi, může být velké množství spor přítomno v jejich výkalech, které mohou kontaminovat struky vemene (TE GIFFEL a kol., 2002). Siláž může být také zdrojem kontaminace syrového mléka. Nedostatečně vyčištěné dojící zařízení, potrubí a mléčné tanky jsou taktéž neméně důležitými zdroji kontaminace (GRIFFITHS A PHILLIPS, 1990).

Psychrotrofní mikroorganismy

Psychrotrofní bakterie jsou mikroorganismy, které mohou prospívat při nízkých teplotách (3-7 °C). Co do četnosti, rod *Pseudomonas sp.* představuje kolem 50 % zastoupení, převládá *Pseudomonas fluorescens* a ostatní druhy jako *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas aeruginosa* a dále druhy rodů *Flavobacterium*, *Acinetobacter-Moraxella*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Aeromonas* a *Klebsiella*. Většinu ze zbývajících psychrotrofních bakterií tvoří koliformní skupiny.

Některé z těchto psychrotrofních mikroorganismů rostoucích ve zchlazeném mléce produkují extracelulární, termostabilní lipázy, které přispívají k rozvoji žluklé chuti mléka, stejně jako proteinázy, které poškozují kasein. Gram-negativní psychrotrofní

bakterie jsou zničeny pasterací, ale jejich enzymy zůstávají aktivní. V důsledku toho tyto bakterie mají značný význam pro mléčné výrobky a jsou často spojované s postpasterační kontaminací mléka (COUSIN, 1982). *Arthrobacter* a další gram-pozitivní druhy (např. streptokoky), byly také pozorovány ve spojitosti se syrovým mlékem. Nedostatečné čištění a desinfekce dojícího zařízení zůstává i nadále hlavním důvodem výskytu psychrotrofních bakterií v syrovém mléce. V průměru tvoří psychrotrofní mikroflóra syrového bazénového mléka něco mezi 10 a 50 % z celkového počtu mikroorganismů (CHAMBERS, 2005).

Tyto bakterie nezpůsobují v souvislosti s kažením syrového mléka závažné problémy, většina z nich jsou termolabilní gram-negativní koky, které jsou inaktivovány pasterační teplotou, ale enzymy produkované těmito bakteriemi jsou termostabilní a mohou degradovat důležité složky mléka s vlivem na technologické a senzorické vlastnosti mléka, způsobují srážení mléka a jeho nečistou či hořkou chuť (COUSIN, 1976). Vedoucí úlohu hrají při kažení chlazeného mléka a mléčných výrobků. Jejich množství závisí na teplotě skladování a době uchování mléka. V dobrých hygienických podmínkách je jejich hodnota zastoupení 10 % z celkové mikroflóry, zatímco při nedodržení správných hygienických zásad se jejich podíl zvyšuje až na 75 % (COUSIN, 1982).

Ke znehodnocení mléka bez bakteriálního růstu dochází při akumulaci a činnosti extracelulárních lipolytických a proteolytických enzymů. Bakterie přežívající pasteraci jsou zastoupeny zejména rodem *Bacillus sp.*, dále se často vyskytují rody *Arthrobacter*, *Clostridium sp.*, které jsou zároveň sporotvorné a anaerobní (SØRHAUG A STEPANIAK, 1997).

Termostabilní a sporotvorné mikroorganismy

Rody přežívající laboratorní pasteraci (minimálně 71,7 °C po dobu alespoň 15 s) jsou uvedeny v tabulce 1. *Microbacterium lacticum* a bakteriální spory běžně vykazují 100% přežití. Některé druhy *Micrococcus sp.* jsou o něco méně tepelně odolné, u kmenů *Alcaligenes tolerans* může přežít pouze 1-10 %. Některé druhy streptokoků (např. *Enterobacter faecalis*), laktobacily, a některé korynebakterie jsou tepelně odolné, přežívají 60 °C přibližně po dobu 20 min, ale jen malé procento (<1 %) obvykle přežívá 63 °C po dobu 30 min. Výskyt většiny koliformních bakterií a *Escherichia coli*

nalezených v mléce po pasteraci lze obvykle přisuzovat postpasterační kontaminaci při skladování nebo ve výrobním řetězci (GOUDKOV A SHARPE, 1965).

Sporotvorné bakterie jsou buď striktně anaerobní (SPAN) - rod *Clostridium*, často *C. butyricum*, *C. sporogenes* a *C. botulinum*, které se vyskytují jen zřídka. Nebo jsou fakultativně anaerobní, což znamená, že jsou schopny růstu za aerobních i anaerobních podmínek, zejména rod *Bacillus*, nejčastěji *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* (LUKÁŠOVÁ a kol., 2001; PÁČOVÁ a kol., 1996). *Bacillus cereus* je nejčastější představitel psychrotolerantního druhu (SUTHERLAND A MURDOCH, 1994), zatímco *Geobacillus stearothermophilus* a termotolerantní *B. licheniformis* jsou primárně termofilní nebo termotolerantní druhy (PHILLIPS A GRIFFITHS, 1986).

Gram-pozitivní bakterie *Bacillus sp.* představují důležitou kontaminující složku syrového mléka, a to především z hygienického a technologického pohledu, některé z nich dokonce z hlediska lidského zdraví. Spory *Bacillus sp.* se objevují pravidelně a obyčejně představují sekundární kontaminaci mléka během procesu dojení (JANŠTOVÁ, 2004). *Bacillus cereus* je znám jako potravinový patogen, který způsobuje dva druhy potravinových intoxikací: emetický a průjemový typ. První z nich je způsoben přítomností termostabilního peptidu zvaného cereulid a druhý termolabilními enterotoxiny (GRAN, 2002). I z hlediska kvality výrobků představují *Bacillus sp.* v mlékárenském průmyslu komplikace kvůli schopnosti produkce extracelulárních enzymů jako jsou lipázy, proteázy a lecitinázy, které mohou způsobit kažení pasterovaného mléka (MEER a kol., 1991).

Spory rodu *Bacillus* v syrovém mléce zřídka překročí četnost $5000 \cdot \text{ml}^{-1}$ a vyskytují se ve vyšších hodnotách v zimním období. Důvodem je, že tyto bakterie dominující v mléce v zimě převážně pocházejí z povrchu struků, které byly v kontaktu s podestýlkou. *Bacillus licheniformis* je častý druh vyskytující se v cisternovém mléce. *Bacillus cereus* se nachází v cisternovém mléce jen sporadicky. Byly také popsány nově zjištěné druhy: psychrofilní: *B. weihenstephanensis*, jehož optimální teplota pro růst je 4-7 °C (PÁČOVÁ a kol., 2003) a ultra termostabilní *B. sporotermoturans*, které jsou schopny přežít i vysokoteplné ošetření mléka 147 °C po dobu 5 sekund (GUILLAUME-GENTIL a kol., 2002; HAMMER A WALTE, 1996). Všudypřítomný charakter fakultativně aerobních bakterií tvořících spory vede k mnoha možnostem jejich potenciálního vstupu do syrového mléka (MEER a kol., 1991). Znečištění vemene a struků je považováno za jeden z nejdůležitějších rizikových faktorů pro kontaminaci syrového mléka sporamai (WAES, 1976). Vysoké množství aerobních spor, v rozmezí od 10 do $10^5 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$, byla nalezena v travní

siláži (SLAGHUIS, 1997), obsahy 10^3 až 10^6 CFU·g⁻¹ byly zjištěny v koncentrovaných krmivech (VAEREWIJK a kol., 2001). Spory rodu *Micrococcus* a *Microbacterium sp.* pocházejí téměř výhradně z dojícího zařízení, které je někdy silně kontaminováno těmito bakteriemi (s největší pravděpodobností v důsledku přítomnosti biofilmu), počet termostabilních mikroorganismů v mléce často překračuje hodnoty 50 000·ml⁻¹.

Spory rodu *Clostridium sp.* vykazují tepelnou odolnost a obvykle jsou detekovány v pasterovaném mléce, kde došlo ke zničení bakterií ve vegetativním stavu. Izolace a detekce rodu *Clostridium sp.* vyžaduje použití vhodných médií a anaerobního kultivačního prostředí. Počet spor rodu *Clostridium* narůstá zejména v zimním období, jelikož mezi jejich zdroj patří hlavně siláž používaná ke krmení a stelivo. Při zvýšeném výskytu spor druhu *Clostridium tyrobutyricum*, který je spjatý s nekvalitními silážemi, není mléko vhodné pro výrobu tvrdých sýrů, např. ementálu, které jsou znehodnocovány tzv. duřením. (GOUDKOV A SHARPE, 1965).

Tabulka 1. Termostabilní a psychrotrofní rody bakterií v syrovém kravském mléce (CHAMBERS, 2005)

Termostabilní rody ^a	Psychrotrofní rody ^b
<i>Microbacterium</i>	<i>Acinetobacter- Moraxella</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Flavobacterium</i>
<i>Bacillus (spory)</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Clostridium (spory)</i>	<i>Alcaligenes</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Bacillus</i>
	<i>Arthrobacter</i>

^a Přežívají zahřátí 63 °C po dobu 30 minut.

^b Viditelný růst při 5-7 °C po 7-10 dnech

Koliformní mikroorganismy

Výskyt koliformních bakterií, které patří do rodu *Enterobacter* a *E. coli*, v syrovém mléce získal značnou pozornost. Tato pozornost je způsobena částečně kvůli jejich spojení s kontaminací fekálního původu a následným rizikem výskytu dalších přítomných patogenních mikroorganismů, které mohou růst při pokojových teplotách. Koliformní bakterie se mohou rychle množit ve vlhkém prostředí (mléčné zbytky - biofilm)

na dojicím zařízení a poté se stávají hlavním zdrojem kontaminace mléka. Nicméně, relativně nízké počty koliformních bakterií v mléce nemusí nutně znamenat efektivní čištění a dezinfekci dojícího zařízení. Sporadicky vysoký počet koliformních bakterií by mohl souviset s koliformními mastitidami u stáda dojnic. Některé druhy rodů tvořících koliformní skupiny bakterií jsou psychrotrofní a tvoří 10-30 % mikroflóry veškerého syrového mléka. Většina těchto koliformních bakterií jsou *Aerobacter sp.* (DRUCE A THOMAS 1972).

Patogenní mikroorganismy v mléce

Syrové mléko může obsahovat mikroorganismy, které jsou patogenní pro člověka a jejich zdroj může spočívat uvnitř nebo vně vemene. Historicky bylo nejvíce závažných lidských onemocnění šířeno spotřebou kontaminovaného syrového mléka, které obsahovalo původce tuberkulózy a brucelózy. U obou onemocnění mohou být vyvolávající bakterie vylučovány do mléka z infikovaných zvířat. Jedná se o tyto původce: *Mycobacterium bovis* nebo *M. tuberculosis* a *Brucella abortus*, *B. melitensis* nebo *B. suis*. Při infekci druhu rodu *Brucella* nejsou známky na vemeni či v mléce téměř patrné, mastitida není přítomna. V případě tuberkulózy však bývá sledována zjevná charakteristická změna mléčné žlázy a mléka. V mnoha částech světa byly tyto nemoci skotu vymýceny a již nepředstavují riziko pro lidské zdraví (WEIR A BARBOUR, 1950).

Patogenní bakterie mohou být rovněž přítomny v syrovém mléce přímo jako důsledek onemocnění vemene. Mezi bakterie běžně způsobující mastitidy se řadí *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*, která je známá jako patogenní i pro člověka. *Streptococcus agalactiae* může iniciovat řadu klinických stavů, z nichž nejzávažnější jsou bakteriémie a meningitida novorozenců, které jsou u infikovaných dětí potenciálně fatální. Stafylokokové mastitidy u dojnic představují přímou hrozbu, protože některé kmeny produkují enterotoxin (OLSEN, 1975). Konzumace potravin obsahujících enterotoxin vede k symptomatickému onemocnění trvajícímu přibližně 24 hodin, které se vyznačuje nevolností, průjmem a bolestmi břicha. Produkce enterotoxinu je obvykle spojena s rozmnožením stafylokoků za příznivých růstových podmínek při skladování mléka. Vzhledem k tomu, že enterotoxin je relativně tepelně stabilní, následná pasterace kontaminovaného mléka nezaručí bezpečnost potraviny ke konzumaci. Vysoké počty *E. coli* mohou být přítomny v mléce jako důsledek mastitidy, tato bakterie způsobuje u člověka několik onemocnění různé závažnosti.

Zatímco přímé spojení mezi *E. coli* infekcemi vemene a lidskými chorobami nebylo hlášeno, byla izolována široká škála *E. coli* sérotypů z kravského mléka, a je pravděpodobné, že některé z nich jsou patogenní pro člověka. Zajímavé je, že bakterie, které mají větší patogenitu pro člověka jen zřídka vyvolávají u skotu mastitidy a přesto mohou být přítomny v syrovém mléce. Patří mezi ně *Leptospira sp.*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Pasteurella multocida*, *Clostridium perfringens*, *Nocardia sp.*, *Cryptococcus neoformans*, a *Actinomyces sp.* Další onemocnění u lidí vyvolané *Coxiellou burnetii* způsobuje Q horečku. Do vemene se dostává pravděpodobně hematogenní cestou a lidé se při konzumaci infikovaného mléka mohou nakazit. Všechny tyto patogeny jsou zničeny pasterací, s výjimkou *Clostridium perfringens* a *Bacillus cereus*, které mohou přežít pasteraci, protože jsou schopny sporulace. Nicméně nákazy, které způsobuje *Bacillus cereus* nejsou často spojovány s pitím kontaminovaného pasterizovaného mléka, protože růst *B. cereus* vede k rozvoji nežádoucích příchutí a vzhledu mléka, což spotřebitele odrazuje od konzumace (DAVIES A WILKINSON, 1973).

Imunita mléčné žlázy

Dobrý zdravotní stav vemene má zásadní význam pro kvalitu mléčné produkce. Somatické buňky (SB) jsou nejčastějším kritériem pro hodnocení zdravotního stavu vemene a kvality mléka ve všech hlavních zemích produkujících mléko (RYŠÁNEK a kol., 2007).

V mléce je možné nalézt několik antimikrobiálních systémů. Fungují buď k ochraně mléčné žlázy před infekcí, nebo zajišťují obranyschopnost sajících telat. Vlastní obrana vemene před infekcí je zajišťována bariérami kůže, sliznice a strukového kanálku. Primární funkcí těchto protilátek je chránit novorozená telata pasivním přenosem imunity. Protilátky také mohou sloužit ke snížení závažnosti onemocnění vemene například tím, že neutralizují toxiny uvolněné během procesu infekce.

Kůže a sliznice vemene se zbavují bakteriální kolonizace olupováním epitelu a svou obnovou. Podstatnou obrannou funkci má i vyplavování bakterií sekretem mléčné žlázy při jeho získávání. Dalším faktorem je uzavíratelnost strukového kanálku. V jeho vnějším ústí je produkován keratin, který chrání mléčnou žlázu proti infekci nejen mechanicky, ale také svým chemismem. Vytváří mazovou zátku zvanou laktosebum. Zvýšený obsah některých mastných kyselin (kys. laurové a myristové) je znakem

rezistence mléčné žlázy vůči infekci. Laktoferin je glykoprotein aktivně vážící ionty železa. V přítomnosti bikarbonátu inhibuje bakterie, které jsou metabolicky náročné na ionty železa (*E. coli*). Laktoperoxidáza-thiokyanát-hydrogen peroxidový systém je významným obranným mechanismem zvláště v laktaci, inhibuje růst stafylokoků, streptokoků i koliformních bakterií. Myeloperoxidáza produkovaná neutrofilů katalyzuje obdobnou reakci jako laktoperoxidáza. Lysozym ničí bakterie lýzou peptidoglykanu jejich buněčné stěny. Pochází zejména z lyzovaných neutrofilů. Defenziny jsou baktericidním produktem neutrofilů a působí na všechny běžné původce mastitid. Komplement přechází do mléka z krevního séra, uplatňuje se jako opsonin a působí i bakteriolyticky (TOMAN a kol., 2000) Neutrofilů, makrofágů a cytotoxické NK (natural killer) buňky zajišťují nespecifickou buněčnou obranu mléčné žlázy (CHAMBERS, 2005).

Mastitidy a jejich původci

Mastitidy jsou považovány za hlavní onemocnění mléčného skotu vzhledem ke snížené produkci a kvalitě mléka, nákladů na léčení, veterinárních poplatků, a poklesu stavu počtu dojnic z důvodu předčasného úmrtí (SANTOS A FONSECA, 2007). Infekce vemene u krav bývají převážně způsobené bakteriemi a méně často viry a houbami (RIBEIRO, 2008).

I chovatelé zdravých krav se potýkají s problémem mastitid ve stádě. Mastitidy mohou být přítomny v klinické formě, ve které jsou makroskopické změny mléka nebo mléčné žlázy snadno zjistitelné v době dojení, ale častěji se vyskytují jako subklinická onemocnění, při kterých se mléko i mléčná žláza jeví jako normální. Subklinické mastitidy lze diagnostikovat pomocí zkušební vzorku mléka, jehož výsledky mohou ukazovat na přítomnost patogenních bakterií, zvýšený počet somatických buněk (PSB) a na celou řadu biochemických změn, které jsou znaky onemocnění vemene (WHEELOCK a kol., 1966; SCHALM a kol., 1971). Tyto změny ve složení mikroflóry do značné míry odrážejí zvýšení pohybu krevních složek do mateřského mléka v průběhu zánětu. Mléko z infikovaných čtvrtí obsahuje zvýšené koncentrace anti-trypsinu, albuminu, imunoglobulinu, sodíku a chloridových iontů, avšak snížené koncentrace laktózy a draslíku. Proces infekce začíná na koncích struků, kde dojde k penetraci obvykle během dojení, následuje mikrobiální osídlení tkáně struku. Mikroorganismy prostupují do vemene přes kanálek na hrotu struku. Délka strukového kanálku se pohybuje od 5 mm do 14 mm a jeho povrch je silně keratinizován. Tato zrohovatělá vrstva zadržuje zbytky mléka a vykazuje antibakteriální

účinnost. Konce struků poškozené následkem zranění ztrácejí funkci ochranné bariéry, kterou strukový kanálek poskytuje. Některé druhy bakterií, nejvíce *Staphylococcus aureus*, snadno kolonizují struk, zejména v oblasti strukového otvoru. Kolonizace strukových otvorů může trvat mnoho týdnů, aniž by bakterie pronikly do struku. Poté, co dojde k průniku, následuje růst a uvolňování toxinů. *Staphylococcus aureus* je nejčastějším původcem bovinních mastitid. I přes aplikaci preventivních opatření, jako jsou optimalizace dojcích technik, desinfekce struku po dojení a antibiotická terapie je prevalence subklinické a chronické mastitidy stále vysoká (ZECCONI a kol., 2003; VOLLING A KROMKER, 2008).

Infekce bakteriemi *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, nebo *Escherichia coli* způsobují největší ekonomické ztráty. Významným z hlediska infekce vemene byl prokázán *Streptococcus agalactiae*, který lze vymýtít ze stáda po jeho odstranění z infikovaných vemene. *Streptococcus agalactiae* a *Staphylococcus aureus* můhou být přenášeny i z lidí na skot. Mezi patogeny, jejichž šíření ve stádě je méně závislé na procesu dojení, se řadí například *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* a *Mycoplasma sp.* *Streptococcus uberis* byl izolován z dutiny ústní, struků, bachoru, břicha, vulvy a konečníku krávy (BRAMLEY a kol., 1979). Podestýlka a výkaly jsou primárními zdroji kontaminace *E. coli* (BRAMLEY A NEAVE, 1975). Správná hygiena a desinfekce struků před a po dojení přispívá ke snížení rizika infekce. Nové infekce vemene vznikají nejčastěji na začátku laktace a v období bezprostředně po zasušení. Určité patogeny, zejména *E. coli* a *Corynebacterium pyogenes*, vykazují výrazné sezónní trendy.

Mastitida způsobená bakterií *Pasteurella multocida* je považována za neobvyklou. Postižená zvířata mají závažné klinické mastitidy, perakutní nebo akutní, někdy přecházející do agalaktie ve všech čtvrtích vemene, fibrózy a atrofie mléčné žlázy. Občas zvířata vykazují systémové příznaky včetně horečky, tachykardie a respiračních potíží. Vemeno je oteklé a mléko z postižených čtvrtí má neobvyklé zbarvení, s přítomností hrudek, vloček a je vodnatého charakteru. Navíc u telat, která sají mléko kontaminované *P. multocida*, se může vyvinout zápal plic (RADOSTIS a kol., 2007). Hlavními cestami nákazy patogenem *P. multocida* u skotu je orofaryngeální mikroflóra telat infikující strukový kanálek vzestupně během sání telete, hematogenní šíření nebo kontaminovaným dojcím zařízením (RADOSTITS a kol., 2007, SALERNO a kol., 2008).

Přehled významných patogenů mléčné žlázy (WENDT a kol., 1998)

1) Grampozitivní KOKY- původci streptokokových a stafylokokových mastitid

Streptococcus – *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. thermophilus*

Staphylococcus – *S. aureus*, *S. epidermidis* – koaguláza negativní stafylokoky

Enterococcus – *E. faecalis*, *E. bovis*, *E. durans*, *E. faecium*

Micrococcus – *M. indolicus*

2) Gramnegativní TYČINKY- původci enterobakteriálních (Coli) mastitid, čeleď *Enterobacteriaceae*

Escherichia – *E. coli*

Citrobacter – *C. diversus*

Enterobacter – *E. cloacae*, *E. agglomerans*

Proteus – *P. vulgaris*

Serratia – *S. marcescens*

Klebsiella – *K. pneumoniae*

3) OSTATNÍ PATOGENY MLÉČNÉ ŽLÁZY– původci pyogenních mastitid

Arcanobacterium – *A. pyogenes*

Peptococcus – *P. indolicus*

Fusobacterium – *F. necroforum*

Bacteroides – *B. melanogenococcus*

4) DALŠÍ PATOGENY MLÉČNÉ ŽLÁZY

Bacillus – *B. cereus*

Pseudomonas – *P. aeruginosa*

Mycoplasma – *M. bovis*

Chlamidophilla – *Ch. abortus*

Nocardia – *N. aeroides*

Prototheca – *P. zopfii*

Požadavky na jakost syrového kravského mléka

V České republice byly požadavky na syrové kravské mléko harmonizovány s uvedenými předpisy EU: Směrnice 92/46/EHS vymezila základní jakostní znaky syrového kravského mléka. Hygienický balíček je výsledkem snahy Evropské komise (EK) po zjednodušení evropské legislativy. Navazuje na nařízení Evropského parlamentu a rady č. 178/2002 ze dne 28. ledna 2002, jímž se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva. Toto nařízení se označuje jako zlomové. Zavádí poprvé filosofii od farmy po stůl. Za nezávadnost potravin totiž činí odpovědným každý článek výrobního řetězce, na jehož konci stojí potraviny na stole spotřebitele.

Kritéria hodnocení jakosti mléka jsou obsažena i v nezávazné ČSN 57 0529 Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování: norma platí pro syrové kravské mléko určené k mlékárenskému ošetření a zpracování a stanovuje základní zdravotní a hygienické požadavky a znaky jakosti. Mléko je získáváno od dojnic, které:

- jsou z chovů prostých tuberkulózy a brucelózy,
- nevykazují zjevné příznaky onemocnění přenosných na lidi,
- nevykazují zjevné příznaky poruch celkového zdravotního stavu a zjevné příznaky zánětů a poranění mléčné žlázy a kůže mléčné žlázy,
- dojí nejméně dva litry denně a nebyla u nich měněna frekvence dojení pro zahájení procesu zaprahování,
- mléko musí být čerstvé, z jednoho nebo více nádojů, získané úplným vydojením, při svozu by mléko nemělo být starší než 20 hodin, při obdenním svozu by nemělo být mléko starší než 45 hodin,
- mléko nesmí být získáno od dojnic, kterým byla podána krmiva obsahující látky nepříznivě ovlivňující normální složení a jakost mléka, které měly přístup k cizorodým látkám nebo byly vystaveny silné expozici těchto látek, u kterých jsou stanovena ochranná a zdolávací opatření při výskytu nákazy nebo jiného hromadného onemocnění a dále od dojnic do 5 dní po otelení,
- z dodávek pro mlékárenské ošetření a zpracování musí být vyloučeno mléko s obsahem cizorodých látek (látky nebo rezidua s farmakologickými a hormonálními účinky, antibiotiky, čistící a dezinfekční prostředky apod. nebo látky, které způsobují

technologické a organoleptické vady mléka), které mohou ohrožovat zdraví lidí, a to ve vyšším množství, než připouští směrnice ministerstva zdravotnictví. Dále musí být vyloučeno mléko od dojnic léčených nebo ošetřovaných antibiotiky a dalšími přípravky a látkami, které se vylučují mlékem, a to po dobu léčby a stanovených ochranných lhůt pro jednotlivé přípravky.

Znaky jakosti:

Smyslové znaky – barva bílá, popř. lehce nažloutlá, konzistence a vzhled: stejnorodá tekutina bez usazenin, vloček a hrubých nečistot, chuť a vůně čistě mléčná bez jiných příchutí a pachů. Fyzikální a chemické znaky jakosti – obsah tuku nejméně $33,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, obsah bílkovin nejméně $28,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, bod mrznutí nejvýše $-0,515 \text{ }^\circ\text{C}$ včetně, kyselost mléka stanovená metodou Soxhlet-Henkela 6,2-7,8.

Teplota mléka – s chlazením mléka musí být započato od začátku dojení; jestliže mléko není svezeno do dvou hodin po nadojení, musí být zchlazeno na teplotu $4-8 \text{ }^\circ\text{C}$ a při těchto teplotách uchováno až do svozu k mlékařskému ošetření a zpracování.

Mikrobiologické znaky jakosti:

- Počet somatických buněk – hygienický limit do 400 tis. v 1 ml.
- Celkový počet mikroorganismů – hygienický limit do 100 tis. v 1 ml.
- Inhibiční látky (RIL) – stanovení látek inhibujících růst mlékárenských kultur musí být negativní.

Doplňkové znaky jakosti:

- Počet psychrotrofních mikroorganismů do 50 tis. v 1 ml.
- Počet termorezistentních mikroorganismů do 2 tis. v 1 ml.
- Počet koliformních bakterií nejvýše 1000 v 1 ml.
- Sporotvorné anaerobní bakterie v 0,1 ml – negativní.

Obsahové složky:

- látkový obsah volných mastných kyselin u mléčného tuku $13 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$, metodou stlukem a nebo $32,0 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ metodou extrakčně titrační,
- obsah nutričně významných složek – vápník $1,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, vitamín B1 $0,32 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, vitamín B2 $1,4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$,
- mechanické nečistoty max. II. stupeň dle ČSN 57 0530,
- kysací schopnost jogurtovou kulturou vyjádřená metodou Soxhlet-Henkela nejméně 25,
- obsah tukuprosté sušiny nejméně 8,5 % hmotnosti.

Lipolytické změny mléka

Organoleptické vlastnosti mléka a mléčných výrobků mohou být lipolýzou a uvolněním mastných kyselin nepříznivě ovlivněny. Chuť způsobená lipolýzou je obvykle popisována termíny jako žluklá nebo mýdlová. Jelikož je chuť a konzistence mléčných výrobků základním požadavkem spotřebitelů, lipolýza se tak stává pro zpracovatele mléka z hlediska finančního i praktického nežádoucí (DEETH A FITZGERALD, 1995).

K lipolýze dochází enzymatickou hydrolýzou mléčného tuku, což způsobuje hromadění volných mastných kyselin v mléce (WALSTRA a kol., 1999). Lipázy jsou enzymy, které katalyzují hydrolýzu triacylglycerolů- hlavní lipidové složky mléka. Tato hydrolýza je obvykle uváděna jako lipolýza. Produktem reakce jsou volné (neesterifikované) mastné kyseliny, parciální estery glycerolu (monoacylglyceroly, diacylglyceroly) a v některých případech až glycerol (DEETH, 2006). Výsledky současného výzkumu naznačují, že za téměř veškerou lipolytickou činnost v syrovém kravském mléce je odpovědný lipolytický enzym LPL (lipoproteinová lipáza) (OLIVECRONA a kol., 2003). Lipoproteinové lipázy se v mléce vyskytují v hojném počtu, ale většina z nich je v neaktivním stavu. Aktivátory lipáz se vyskytují přirozeně v krvi a do mléka vstupují ve vyšších koncentracích například při infekci vemene, v průběhu involuce mléčné žlázy na konci laktace a během období, kdy je dojnice vystavena stresu nebo špatné výživě (THOMSON, 2005). Pasterace mléka redukuje počáteční množství bakterií i aktivitu původní mléčné lipázy (LPL). Proto se stávají termostabilní lipolytické a proteolytické enzymy psychrotrofních bakterií limitujícím faktorem pro zachování

chuťové kvality tekutého mléka a mléčných výrobků (HANTIS-ZACHAROV A HALPERN, 2007).

Extracelulární lipázy produkované psychrotrofními bakteriemi mají značný potenciál pro vyvolání hydrolytického žluknutí mléka a mléčných výrobků. Mezi bakterie, které jsou odpovědné za produkci těchto lipáz patří zejména *Pseudomonas fluorescens*, *P. fragi*, z čeledi Enterobacteriaceae *Serratia* a *Acinetobacter sp.* Ostatními významnými producenty jsou *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* a *Moraxella* (STEWART a kol., 1975; MUIR a kol., 1979; SHELLEY a kol., 1987; ABDOU, 2003). Lipázy jsou produkovány psychrotrofními bakteriemi během pozdní a časně stacionární fáze růstu (STEAD, 1987; STEPANIAK a kol., 1987; GRIFFITHS, 1989; ROWE a kol., 1990). Minimum lipáz je produkováno než buňky dosáhnou počtu 10^6 - $10^7 \cdot \text{ml}^{-1}$. Tempo růstu nekoreluje s produkcí lipáz. Mnoho z těchto lipáz vykazují aktivitu i za nízkých teplot užívaných pro skladování (TE WHAITI A FRYER, 1978). Jednou z nejdůležitějších vlastností těchto enzymů je jejich tepelná stabilita (STEPANIAK a kol., 1995). Ta se liší podle druhu a kmene (FITZ-GERALD a kol., 1982). Mnohé z nich jsou natolik odolné, že jejich činnost je zachována i po pasteraci (LAW a kol., 1976; FITZ-GERALD a kol., 1982; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1984), a dokonce i po záhřevu UHT- teplota 135 °C po dobu 1s (KISHONTI, 1975; MOTTAR, 1981; CHRISTEN a kol., 1986).

Lipolytická aktivita v mléce se dá nepřímou vyjádřit jako změny v úrovni volných MK po jejich extrakci vhodným rozpouštědlem. Následuje stanovení buď titrací alkalickým roztokem (CASTBERG a kol., 1975; DEETH a kol., 1975) nebo plynovou chromatografií (DEETH a kol., 1983; DE JONG A BADINGSE, 1990). Celkově lze říci, že způsoby detekce aktivity lipáz v mléce a mléčných produktech jsou velmi rozmanité a těžko srovnatelné. Ideální testovací metoda, která by mohla být běžně používána v mlékárenském průmyslu pro odhad kvality výrobků je stále nedostupná (DEETH A TOUCH, 2000). Hlavním problémem všech metod je rušivé působení mléčných lipidů (STEAD, 1983; MCKELLAR A CHOLETTE, 1986; BLAKE a kol., 1996; DEETH A TOUCH, 2000).

Spontánní lipolýza

Může být definována jako množství volných mastných kyselin v syrovém chladově uskladněném mléce bez jiného zásahu (SLAGHUIS, 2005). Je vyvolána nativními mléčnými lipázami a probíhá i v mléce s neporušenými tukovými kuličkami. Jako původní příčina vzniku mohou být označeny tyto faktory: pozdní stádium laktace, složení krmné dávky, nízká dojivost, hormonální léčba, zvýšený počet somatických buněk v mléce a mastitida (PETERKOVÁ, 2002). Nižší lipolýza mléka byla zjištěna u krav krmných dietami na bázi jadrných krmiv nebo kukuřičné siláže, než u dojnic pasoucích se, krmných travní siláží anebo senem (CHILLIARD a kol., 2003).

Náchylnost mléka ke spontánní lipolýze je do značné míry dána těmito biochemickými faktory: mírou aktivity lipáz, celistvostí membrán kuliček mléčného tuku a vyvážeností inhibičních a aktivačních faktorů lipolýzy (CARTIER a kol., 1990). Mléko většiny krav s nízkou úrovní výživy má zvýšenou citlivost ke spontánní lipolýze (GHOLSON a kol., 1966; ASTRUP a kol., 1980), také krmení siláže může mít za následek vážné problémy se spontánní lipolýzou (JOHNSON A VON GUNTEN, 1961; CHAZAL a kol., 1987).

Mléko obsahuje lipoproteinové lipázy (LPL) a lipázy stimulované žlučovými solemi (BSSL), tento enzym je také přítomný v pankreatické šťávě. LPL je dobře charakterizována u skotu (OLIVECRONA a kol., 2003). Hlavními substráty pro LPL v krvi jsou triacylglyceroly s velmi nízkou hustotou lipoproteinů a chylomikronů. Hydrolýza fosfolipidů je méně závislá na aktivátorech než hydrolýza triacylglycerolů. Spontánní lipolýza chlazeného mléka vzniká v důsledku působení lipoproteinové lipázy, která může být stimulována mícháním, pěněním a především rychlou změnou teploty (CHILLIARD a kol., 2003).

Indukovaná lipolýza

Všechny faktory, které mohou ovlivňovat indukovanou lipolýzu jsou založeny na poškození membrány kuličky mléčného tuku (SLAGHUIS, 2005). K indukované lipolýze dochází nejčastěji při transportu a výrobě mléka. Mezi hlavní příčiny patří míchání, čerpání mléka zejména s příměsí vzduchu, zmrazování a rozmrazování mléka a homogenizace (DEETH A FITZ-GERALD, 1977). Na farmách bývá významnou příčinou této formy lipolýzy nadměrný přívod vzduchu do strukových násadců (EVERS A PALFREYMAN, 2001). Čím déle trvá mechanický stres mléka, tím většího

rozsahu je narušení membrány tukových kuliček a plocha vystavená účinku lipáz (DEETH, 2006). Membrány tukových kuliček v mléce obvykle chrání lipidy před aktivitou lipáz, jejich narušení rozvíjí lipolýzu (CARTIER A CHILLIARD, 1990). Rychlost a intenzita míchání mléka může ovlivnit mléčný tuk dvěma způsoby. Za relativně nízké intenzity a při nízké rychlosti kapénky tuku splývají (vyskytuje se při výrobě másla), naopak při silné intenzitě míchání jsou kapénky tuku rozptýleny a tvoří mnohem menší kuličky (procesy podobné homogenizaci). Zatímco rozsah poškození membrány tukové kuličky je podobný v obou případech, rozsah lipolýzy vyplývající z druhého typu míchání je mnohem výraznější, protože povrch vystavený působení lipáz je mnohem větší (DEETH A FITZ-GERALD, 1977). Vzhledem k tomu, že pastace následuje při průmyslové výrobě mléka bezprostředně po homogenizaci a inaktivuje lipázy, k lipolýze v homogenizovaném pasterizovaném mléce již nedochází (MULDER A WALSTRA, 1974).

Mikrobiální lipolýza

Je vyvolána mikrobiálními lipázami, které jsou produkovány psychrotrofními bakteriemi. Na rozdíl od lipáz nativních jsou termorezistentní při pasteračních a UHT teplotách (ANTONELLI a kol., 2002; CHEN a kol., 2003; 2004). Porovnání vlastností těchto dvou lipáz je patrné z Tabulky 2. Bakteriální lipázy jsou schopné hydrolyzovat neporušené tukové kuličky (FITZ-GERALD A DEETH, 1983; DEETH A FITZ-GERALD, 1995). Při dobré mikrobiologické kvalitě mléka a jeho řádném skladování se stávají bakteriální lipázy důležitým faktorem pro lipolýzu až po několika dnech skladování (WIKING, 2005). Mnoho mikroorganismů může produkovat více než jeden typ extracelulárních lipáz, které jsou schopny hydrolyzovat mastné kyseliny s různou délkou řetězce, zejména ty s krátkým řetězcem. (SHELLEY a kol., 1987). Produkce lipáz je ovlivněna některými podmínkami jako je teplota, pH, obsah dusíkatých látek a lipidů, koncentrace anorganických solí, dostupnost kyslíku a poměr extracelulárních lipáz k intracelulárním (SUGIURA, 1984; AIRES-BARROS, 1994).

Lipolytické aktivity bakterie druhu *Pseudomonas fluorescens* a *Pseudomonas fragi* probíhají za relativně termostabilních podmínek. Například surové lipázy produkové psychrotrofním druhem *Pseudomonas fluorescens* izolovaným ze syrového mléka si zachovávají svou aktivitu od 55 do 100 % po tepelném ošetření při 63 °C po dobu

30 minut (LAW a kol., 1976) a 75-100 % aktivity po tepelném zpracování při 100 °C po 30 sekund v odtučněném mléce (FITZ-GERALD a kol., 1982).

Tabulka 2. Porovnání některých vlastností lipoproteinových a bakteriálních lipáz (DEETH, 2006)

Mléčné lipázy	Lipázy psychrotrofních mikroorganismů
Ničeny krátkodobou pasterací při vysoké teplotě	Termostabilní - odolávají i UHT záhřevu
Aktivovány sérovými lipoproteiny	Většina není aktivována sérovými lipoproteiny
Působí často na čerstvé mléko a smetanu	Vliv často u skladovaných produktů
Během skladování ke změnám nedochází (máslo, sýry)	Nežádoucí efekt se u másla a sýrů projevuje pouze po skladování
Vysoké množství v syrovém mléce	V syrovém mléce jen stopová množství

Proteolytické změny mléka

Proteolytické enzymy v mléce lze rozdělit podle jejich původu na přirozené nebo mikrobiální (extracelulární, intracelulární nebo periplasmatické) (SHAMSUZZAMAN A MCKELLAR, 1987). Mléko obsahuje řadu původních proteináz, plazmin je nejvýznamnější. Optimální podmínky pro činnost plazminu jsou teplota 37 °C a pH 7,5; ale je schopen vyvolat proteolytické změny v průběhu skladování syrového mléka i při teplotě 4 °C (MA a kol., 2003). V mléce od mastitidních krav dochází ke zvýšení počtu somatických buněk, které obsahují mnoho aktivních proteináz (UPADHYAY, 2004).

Mezi hlavní bakteriální rody, které produkují proteolytické enzymy patří např. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Proteus*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Flavobacterium*, *Chryseobacterium*, atd., přičemž první dva rody se řadí mezi nejvýznamnější (CHEN a kol., 2004). Většina z extracelulárních proteináz se syntetizuje na konci exponenciální, stacionární fáze a při sporulaci. Proteolytické změny se manifestují zvýšením koncentrace nebílkovinného dusíku a para- κ -kaseinu, jsou doprovázeny destabilizací kaseinových micel a koagulací mléka (CHEN a kol., 2003). Kažení mléka způsobené proteázami má negativní vliv na trvanlivost a sensorickou kvalitu mléka. Sensorické vlastnosti pasterovaného mléka se zhoršují již při obsahu psychrotrofních bakterií od 10^5 do 10^6 CFU·ml⁻¹, může dojít ke snížení

trvanlivosti a zvýšené pěnivosti mléka (SØRHANG A STEPANIAK, 1997). Postpasterační kontaminaci nejčastěji způsobuje rod *Pseudomonas* (MCPHEE A GRIFFITHS, 2003). *Bacillus cereus* významně omezuje trvanlivost pasterizovaného mléka (TE GIFFEL a kol., 2000). Proteolytické enzymy přítomné v syrovém mléce mohou zčásti přežít tepelné zpracování a způsobit poruchy trvanlivého mléka, např. nežádoucí příchutě - hořkou, trpkou nebo zatuchlou (SANTOS a kol., 2003) a vady konzistence jako je zahušťování, koagulace nebo gelovatění (CELESTINO a kol., 1997). Tyto enzymy mohou přežít i při výrobě sušeného mléka. Přestože nízká aktivita vody jejich růst z velké části inhibuje, enzymatické aktivity přetrvávají a způsobují sensorické a funkční vady (CHEN a kol., 2004).

Lipidy mléka

Syntéza a složení lipidů

Hlavní složkou mléčného tuku jsou triacylglyceroly, které tvoří asi 98 % mléčného tuku. Další 2 % mléčného tuku se skládají z diacylglycerolů, monoacylglycerolů, cholesterolu, fosfolipidů, volných mastných kyselin, cerebrosidů a gangliosidů. Další součástí mléčných lipidů jsou steroly nebo jejich estery, z nichž nejrozšířenější je cholesterol (prekurzor vitamínu D3) a ergosterol (prekurzor vitamínu D2). Mléčný tuk má poměrně vysoký obsah nasycených mastných kyselin s krátkým řetězcem jako je máselná (C₄) a kaprinová (C₁₀). V mléce je skoro všechen tuk přítomen ve formě tukových kuliček o velikosti od 0,1 do 15 μm v průměru. Přibližně 90 % tuku je v kuličkách o průměru 1,0 - 6,0 μm. Mléko obsahuje také malé tukové kapénky (4,0 μm), ty ale tvoří jen 2-3 % z celkového množství tuku v mléce. Každá kulička je obklopena tenkou membránou o tloušťce 8-10 nm, která je obvykle nazývána membrána tukové kuličky (MFGM- milk fat globule membrane). Její složení a vlastnosti jsou zcela odlišné od membrán v mléčném tuku nebo v plazmě. MFGM je odvozena od apikální buněčné membrány Golgiho vakuol. Membrány působí jako přírodní emulgátor umožňující, aby tuk zůstal rozptýlen v celé vodné fázi mléka. Předcházejí tak do jisté míry srážení a koalescenci. Odhaduje se, že hmotnost membrány je 2-6 % z celkové hmotnosti tukové kapénky. Proteiny a fosfolipidy spolu tvoří přes 90 % sušiny membrány, ale relativní podíl tuků a bílkovin se může značně lišit. Lipidové složky MFGM tvoří přibližně 62 % triacylglycerolů s vysokými

teplotami tání, 22 % fosfolipidů, 9 % diacylglycerolů, 7 % volných mastných kyselin a malé množství nezmýdelnitelných lipidů a monoacylglycerolů (GAJDŮŠEK, 2003; CHAMBERS, 2005).

Membránové proteiny jsou velmi specifické a jejich složení a struktury nejsou dobře známy. Existuje nejméně 10 různých druhů bílkovin, jsou to převážně glykoproteiny jako je například sialoglykoprotein. Obecně platí, že membránové glykoproteiny mají, kromě vysoce glykosylované oblasti, silně hydrofobní oblasti, které jsou potřebné pro vazbu na lipidovou membránu. Butyrofilin je hlavní glykoprotein v MFGM, tvoří asi 40 % hmotnosti membránových proteinů. Xantinoxidáza tvoří dalších asi 20 % hmotnosti bílkovinné membrány. MFGM obsahuje nejméně 25 různých enzymů, více než polovina z nich se řadí mezi hydrolázy, další mezi oxidoreduktázy a transferázy. Nejhojnější jsou enzymy alkalická fosfatáza a xantinoxidáza (KEENAN A DYLEWSKI, 1995).

U přežvýkavců (na rozdíl od živočichů s jednokomorovým žaludkem) se na syntéze tuku podílejí hlavně těkavé mastné kyseliny původem z bacheru. Hlavními prekurzory mléčného tuku jsou především kyseliny octová a máselná. Ty mají rozhodující vliv na výsledné množství tuku v mléku (u zvířat s jednoduchým žaludkem mají těkavé mastné kyseliny z hlediska laktace podřadnou úlohu a jejich funkci přebírá glukóza). Z energetického hlediska je významné, že v bacheru se za den vyprodukuje až 6 kg těkavých mastných kyselin, což představuje až 80 % potřeby energie vysokoprodukční dojnice (CHURCH, 1974).

Mastné kyseliny

Mastné kyseliny z mléčného tuku mohou vznikat ze dvou zdrojů: syntézou v mléčné žláze „*de novo*“ z nízkomolekulárních prekurzorů mastných kyselin pomocí enzymů acetyl-CoA-karboxylázy (ACC) a syntetázy a plazmatických lipidů pocházejících z krmiv. *De novo* vzniká přibližně 45 % z celkového obsahu mastných kyselin v mléčném tuku, zatímco mastné kyseliny původem z potravy činí zbytek (MOORE A CHRISTIE, 1979). Lipidy pocházející z krmiva jsou převážně fosfolipidy, glykolipidy, triacylglyceroly. V bacheru jsou tyto lipidy hydrolyzovány na neesterifikované mastné kyseliny, které jsou pak podrobeny rozsáhlým biohydrogenacím bacherovými mikroorganismy (JENKINS, 1993).

Profil mastných kyselin se dá měnit v podstatě tím, že manipulujeme se stravou zvířat (GAYNOR a kol., 1994; KENNELLY A FENTON, 1982; KENNELLY A KHORASANI, 1992; KHORASANI a kol., 1991). KEYS a HEGSTED se již v roce 1965 zabývali obsahem mastných kyselin z hlediska vlivu na obsah cholesterolu. Mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem (MCFA – medium-chain fatty acids) kyselina laurová (12:0)*, kyselina myristová (14:0) a kyselina palmitová (16:0) jsou obecně považovány za hlavní faktory, které zvyšují množství celkového LDL cholesterolu v séru (KEYS a kol., 1965; HEGSTED a kol., 1965).

Nenasycené mastné kyseliny (UFA – unsaturated fatty acids), zejména *cis*-kyseliny olejová (18:1), linolová (18:2) a linolenová (18:3), se považují za cholesterol snižující mastné kyseliny. Mléčný tuk je kritizován kvůli jeho relativně vysokému obsahu MCFA a nízkému obsahu UFA a proto se výzkum zaměřuje na změnu profilu mastných kyselin v mléce (BERNER, 1993; JENSEN a kol., 1991). Lidé, kteří konzumovali mléko a mléčné výrobky s vyšším množstvím UFA a nižším obsahem nasycených MK, měli nižší plazmatické obsahy celkového cholesterolu ve srovnání s těmi, kteří konzumovali konvenční mléko (NOAKES a kol., 1996).

Zvýšení zastoupení kyselin olejové a linolové na úkor laurové, myristové a palmitové kyseliny je považováno za žádoucí z hlediska lidského zdraví a nabízí i další výhody, jako je například měkčí máslo. Výsledky studií také uvádějí, že zkrmování olejů obsahujících 80 % nebo více kyseliny olejové může mít vysoký potenciál pro zlepšení profilu mastných kyselin v kravském mléce s ohledem na prevenci hypercholesterolemie u lidí. Nejpříznivější výsledky s ohledem na zlepšení profilu mastných kyselin v mléčném tuku byly získány zkrmováním olivového a sezamového oleje (BANDARA, 1998).

* Základní údaje o struktuře mastných kyselin se uvádějí jako poměr X:Y, kde X je počet atomů uhlíku v řetězci a Y počet dvojných vazeb.

Struktura a názvosloví mastných kyselin

V přírodě a v potravinách se vyskytují v lipidech tyto skupiny jednosytných mastných kyselin (angl. fatty acids – FA):

- nasyčené mastné kyseliny (SFA, saturated fatty acids) máselná, kapronová, kaprylová, kaprinová, laurová, myristová, palmitová, stearová, arachová, behenová, lignocerová, cerotová, montanová, melissová, lakcerová,
- nenasyčené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou (monoenové; MUFA, monounsaturated fatty acids) olejová, eruková, palmitolejová, myristolejová, kaprolejová,
- nasyčené mastné kyseliny s několika dvojnými vazbami (polyenové; PUFA, polyunsaturated fatty acids) linolová, linolelaidová, linolenová, arachidonová, EPA (eikosapentaenová), DHA (dokosahexaenová),
- mastné kyseliny s trojnými vazbami a s různými substituenty - rozvětvené, cyklické, s kyslíkatými, sirnými nebo dusíkatými skupinami, které se vyskytují jen velmi omezeně.

Nasyčené mastné kyseliny

Nasyčené mastné kyseliny, které jsou přítomny v mléčném tuku, mají vesměs nerozvětvený přímý řetězec se sudým počtem atomů uhlíku. Obsahují 4 - 60 atomů uhlíku. V lipidech potravin jsou hlavními kyselinami většinou palmitová a stearová (VELÍŠEK, 2002).

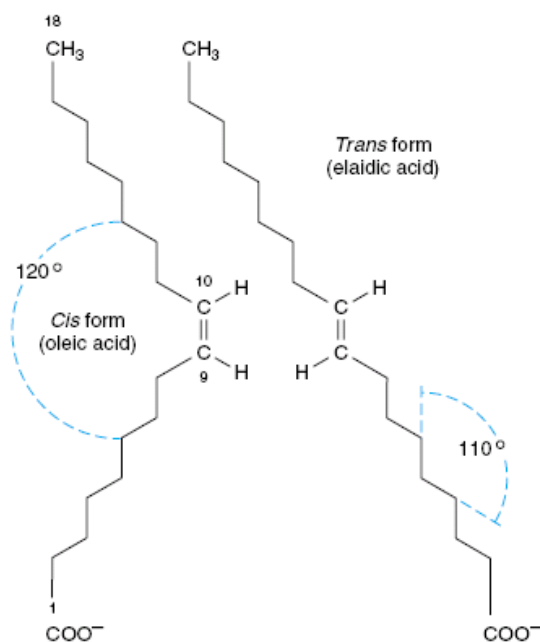
Tato skupina mastných kyselin představuje v mléčném tuku přibližně 70 až 75 % z celkového obsahu mastných kyselin. Nejdůležitější nasycenou mastnou kyselinou z kvantitativního hlediska je palmitová (16:0), představující asi 25 až 30 % z celkového množství, zatímco další dvě mastné kyseliny, myristová (14:0) a stearová (18:0) jsou v množství 10 až 13 %. Mastné kyseliny s krátkým a středně dlouhým řetězcem v mléčném tuku mají určité zajímavé vlastnosti, které mohou vysvětlit některé důvody jejich přítomnosti. Na rozdíl od MK s dlouhým řetězcem, jsou absorbovány jako neesterifikované mastné kyseliny do krevního řečiště a jsou v játrech rychle metabolizovány. Proto jsou schopny přímo a rychle přispívat k energetickému metabolismu novorozenečel telat (NOBLE, 1978).

Nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou

Stručněji se nazývají monoenoové, liší se navzájem podle počtu atomů uhlíku, polohy dvojných vazby a její prostorové konfigurace. Většina přirozeně se vyskytujících nenasycených mastných kyselin má na dvojných vazbách *cis*-uspořádání. U *cis* (či *Z*) konfigurace jsou obě části řetězce umístěny na stejné straně roviny proložené dvojnou vazbou. *Trans* (či *E*) konfigurace: obě části řetězce jsou lokalizovány na opačných stranách roviny proložené dvojnou vazbou - řetězec je napřímený. Přirozeně se vyskytující nenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem jsou téměř všechny konfigurace *cis* (tzv. *all-cis*), úhel v místě ohnutí je 120° (ohnutí řetězce do tvaru L) obrázek 1.

Kyselina olejová má tvar L, zatímco isomerní kyselina elaidová s *trans*-konfigurací zachovává rovné uspořádání. Zvýšení počtu *cis*-dvojných vazeb u mastných kyselin vede k řadě možných prostorových uspořádání molekuly. U přežvýkavců vznikají *trans*-isomery mastných kyselin transformací (biohydrogenací) nenasycených MK vlivem činnosti mikroorganismů v batoru (MURRAY a kol. 2003; VELÍŠEK, 2002).

Obr. 1 Geometrická izomerie mastných kyselin olejové (*cis*-18:1) a elaidové (*trans*-18:1)



Zdroj: MURRAY a kol., 2003

Nenasycené mastné kyseliny se dvěma a více dvojnými vazbami

Mastné kyseliny se dvěma dvojnými vazbami (dienové) jsou velmi důležité ve výživě člověka. Nejvýznamnější z nich je linolová kyselina.

Zvláštní význam mají mastné kyseliny s konjugovanými dvojnými vazbami (tj. oddělené jen jednou jednoduchou vazbou), které se svou reaktivitou podstatně liší od mastných kyselin s izolovanými dvojnými vazbami (oddělenými obvykle dvěma vazbami jednoduchými) a mají také odlišné fyziologické účinky (VELÍŠEK, 2002).

Termínem konjugovaná kyselina linolová (CLA, conjugated linoleic acid) se rozumí různé polohové a geometrické (tedy *cis-trans*) isomery kyseliny linolové s konjugovanou dvojnou vazbou. Mléčný tuk může obsahovat více než 20 různých isomerů CLA. CLA isomery jsou tvořeny jako přechodné meziprodukty v bachoru biohydrogenací nenasycených mastných kyselin přijatých krmivem. Kyselina *cis-9, trans-11-CLA* známá pod triviálním názvem bachorová kyselina (rumenic acid) je převládající isomer (až 90 % z celkového obsahu všech CLA), který vzniká především endogenní syntézou z vakcenové kyseliny (přesněji *trans*-vakcenové, což je kyselina s 18 atomy uhlíku a dvojnou vazbou mezi uhlíky 11 a 12). Druhým nejčastějším je isomer *trans-7, cis-9-CLA*, který představuje asi 10 % z celkové CLA.

Přítomnost CLA v mléce skotu je známa již více než 70 let. Biomedicínské studie na zvířecích modelech prokázaly, že bachorová kyselina stejně jako vakcenová mají antikarcinogenní a antiaterogenní vlastnosti. Antikarcinogenní účinky byly pozorovány pro širokou škálu typů rakoviny, ale nejvíce prokazatelné výsledky byly zjištěny u rakoviny prsu (KRAMER a kol. 1998; FOX A MCSWEENEY, 2006).

Volné mastné kyseliny

Jako volné MK se označuje malá část mastných kyselin, které nejsou esterifikovány v triglyceridech a jsou volně rozptýleny převážně v tukové a mírně ve vodné fázi mléka. Některé mastné kyseliny mají silné bakteriostatické vlastnosti, které jsou přirozeně využívány v obranném systému mléčné žlázy (protimastitidní imunita vemene je zajištěna keratinovou zátkou strukového kanálku s obsahem volných MK). Zvýšený obsah volných MK může poukazovat na špatný zdravotní stav dojníc nebo rozklad tuku v důsledku kontaminace mléka psychrotrofními bakteriemi při nedodržení vhodných podmínek skladování mléka nebo při jeho nadměrném mechanickém namáhání. Proto je v poslední době využíváno obsahu volných mastných kyselin jako ukazatele kvality mléka s vlivem na jeho zpeněžování. Zvýšení znamená negativní vlivy typu lipolýzy nebo tvorby nekompletních tukových kuliček, obvykle z důvodů metabolických problémů dojnice. Vede ke zhoršeným technologickým vlastnostem mléka (např. zhoršená šlehatelnost smetany) ale zejména ke zhoršení sensorických vlastností mléka, zejména změnu chuti a vůně, což se projevuje nahořklou pachutí, která může negativně ovlivnit kvalitu mléčných výrobků (HANUŠ a kol., 2004; ANTONELLI a kol., 2002). Koncentrace volných mastných kyselin v mléce je ukazatelem výživy dojnice, jeho bakteriální kontaminace a kvality skladování. Vysoká koncentrace volných MK způsobená lipolýzou zhoršuje technologické vlastnosti mléčných výrobků (HANUŠ a kol., 2008). Změny obsahu volných MK v mléce mohou být považovány za nepřímý ukazatel lipolytické aktivity (CHEN a kol., 2003).

Metody stanovení obsahu volných MK v syrovém kravském mléce

Z metodologického pohledu existují pro stanovení volných mastných kyselin v mléce tyto metody: titrační – vizuální, kolorimetrické a potenciometrické (ANTONELLI a kol., 2002), plynová chromatografie (GONZALEZ-CORDOVA a VALLEJO-CORDOBA, 2001) a elektroforéza (VALLEJO-CORDOBA a kol., 1998).

Metody stanovení obsahu volných MK (extrakčně titrační, BDI a stluková) jsou standardizované podle normy a relativně jednoduché, ale často mají omezenou spolehlivost (YUE a kol., 2008). Tyto metody se podstatně liší rozpouštěním a izolací mléčného tuku, ale u všech následuje titrace volných MK odměrným roztokem hydroxidu

draselného. Většina těchto metod nepokrývá plné spektrum volných MK, přesto jsou stále vhodné jako analytický nástroj k měření míry lipolýzy.

Metoda stlukem (ČSN 570533) je založena na izolaci tuku odstředěním a následným stlukem získané smetany na máselné zrno. Získaný čistý mléčný tuk se rozpustí ve směsi etanolu a dietyleru a titruje se odměrným roztokem hydroxidu draselného. Při titraci se stanoví volné mastné kyseliny, vzniklé počínající lipolýzou máselného tuku, které jsou nerozpustné ve vodě (PETERKOVÁ, 2002)

Metoda označovaná BDI (Bureau of Dairy Industries) stanoví jen asi 50 – 70 % volných MK přítomných v mléce (IDF, 1991). Tato metoda byla shledána vhodnou pro stanovení stupně lipolýzy v homogenizovaném mléce (SURENDRA a kol., 1994). Metoda je založena na izolaci mléčného tuku pomocí speciálního roztoku BDI za vyšší teploty. Získaný mléčný tuk se rozpustí ve směsi etanolu a dietyleru a titruje se odměrným roztokem hydroxidu draselného. Výsledky jsou nižší než u metody stlukem, jelikož určitá část volných mastných kyselin přechází do vodné fáze (PETERKOVÁ, 2002). V literatuře byly popsány různé verze této metody, existuje však standardizovaná verze (IDF, 1991).

NISHIMURA a kol. (2002) uvádí metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC, high performance liquid chromatography) s fluorescenční detekcí jako vysoce citlivou, jednoduchou a přesnou pro stanovení volných mastných kyselin v mléce a mléčných výrobcích. Byla prokázána také dobrá shoda s výsledky získanými konvenční titrační metodou.

Sériové stanovení volných MK umožňuje instrumentální technika infračervené spektrofotometrie za využití celého IR spektra s následným vyhodnocením signálu pomocí Fourierových transformací (IR-FT). Tuto metodu lze používat pro rutinní monitoring velkých sérií vzorků mléka. Vzorky mléka musí být zpracovány u referenčních metod do 24 hodin nebo u rutinních metod do 48 hodin při chladovém uskladnění do 5 °C (HANUŠ a kol., 2004). Krátká doba analýzy a přesnost rozboru jsou klíčovými parametry pro chovatele. Za poslední desetiletí se metoda FT-IR spektroskopie zařadila mezi nejrozšířenější metody používané pro analýzy složení mléka v mlékárenském průmyslu. Možnost měření složek nebo vlastností mléka a mléčných výrobků umožňuje v mlékárenském průmyslu zaplatit zemědělcům za dodávku mléka na spravedlivém základě a udržovat výrobu mléčných produktů ve stálé kvalitě (PEDERSEN, 2003).

4. SHRnutí VÝSLEDKŮ DISERTAČNÍ PRÁCE

Předložená disertační práce navazuje a rozšiřuje předchozí výzkum, který byl prováděn na katedře veterinárních disciplin a kvality produktů. Před rokem 2007 byla pozornost věnována psychrotrofním mikroorganismům v bazénových vzorcích syrového kravského mléka. Jednalo se především o stanovení těchto druhů bakterií: psychrotrofní, lipolytické a proteolytické. Mimo jiné byly v mléce stanovovány také základní obsahové složky. Mé doktorské studium začalo říjnu v roce 2007. Celkem bylo vyšetřeno 300 vzorků mléka. Tyto vzorky byly rozděleny na soubor č. 1 (n=150) a soubor č. 2 (n=150). Soubory se od sebe odlišovaly zejména metodou stanovení volných MK.

Vzorky souboru č. 1 pocházely z farem lokalizovaných v horských a podhorských oblastech jižních a západních Čech, byly odebírány z mléčných bazénů farem. U souboru č. 1 většina terénních prací probíhala formou sběru bazénových vzorků mléka na jednotlivých farmách. Chovy se lišily technologií ustájení a dojení (17 farem volné boxové stelivové ustájení s dojením v dojárně, 3 farmy volné roštové bezstelivové s dojením v dojárně, 3 farmy vazné stelivové s dojením na stání do potrubí). Vzorky mléka byly u odebírání sterilní naběračkou do sterilní vzorkovnice přímo z mléčných bazénů jednotlivých farem. Uloženy byly do termoboxů s chladicí vložkou a ihned po přepravě předány do laboratoře k dalšímu zpracování. V laboratořích Zemědělské fakulty probíhalo kultivační stanovení těchto parametrů: CPM- celkový počet mikroorganismů, PTM- počet psychrotrofních bakterií, PLM- psychrotrofní lipolytické bakterie, PPM- psychrotrofní proteolytické bakterie. K ředění vzorků byl použit sterilní fyziologický roztok s peptonem. 1 ml inokula příslušného ředění byl zalit médiem vytemperovaným na 45 °C. Vzorky byly očkovány vždy po třech po sobě jdoucích ředěních, ve dvou opakováních. Pro stanovení celkového počtu mezofilních (CPM) a psychrotrofních (PTM) mikroorganismů byl použit, Plate count skin milk agar (MERCK). Inkubace proběhla u CPM při 30 °C po dobu 72 hodin a u PTM při 6,5 °C po dobu deseti dnů. Odečítaly se plotny s počtem kolonií 10 až 300. Pro kultivaci psychrotrofních proteolytických bakterií (PPM) byl použit Milk agar (OXOID), pro kultivaci psychrotrofních lipolytických bakterií (PLM) Tributyrin agar (MERCK). Inkubace proběhla při 6,5 °C po dobu deseti dnů. Odečítaly se kolonie s jasnou lytickou zónou. Obsahové složky mléka byly stanoveny v centrální laboratoři Madeta, kam se vzorky svážely bezprostředně po jejich odběru na farmách. Stanovované složky mléka: PSB, tuk, bílkoviny, kasein, laktóza, močovina a sušina. Počet somatických buněk

(PSB) v bazénových vzorcích syrového mléka byl stanoven podle ČSN EN ISO 13366 – 3 (1997) Mléko – Stanovení počtu somatických buněk Část 3: Fluoro – opto – elektronická metoda, prostřednictvím přístroje Fossomatic 5000. Ostatní ukazatele byly stanoveny metodou FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) technologií na přístroji Miloscan FT 6000 podle ČSN 57 0536 (1999). U některých vzorků mléka (n=43) byly vybrány kolonie lipolytických mikroorganismů druhově zařazeny. Tyto kultivace a následné druhové zařazení byla provedena na SVÚ v Českých Budějovicích. Souběžně byl sledován u bazénových vzorků mléka i obsah volných MK v mléce. Stanovení látkového obsahu volných mastných kyselin bylo provedeno extrakčně titrační metodou podle ČSN 57 0533 jejíž předmětem je určení látkového obsahu volných mastných kyselin, obsažených ve stlučeném mléčném tuku. Látkový obsah volných MK= množství volných mastných kyselin stanovené za podmínek metody, vyjadřuje se v mmol/ kg tuku. Metoda je určena pro stanovení veškerých volných MK a používá se rovněž pro výběr syrového mléka nebo mlékárensky ošetřeného mléka s kyselostí zjištěnou metodou podle Soxhlet-Henkela (SH) do 9 (2,5 mmol·l⁻¹) a smetany určené pro výrobu másla. Tato metoda dává systematicky zvýšené výsledky, např. pro syrové mléko 32, 0 mmol·kg⁻¹ místo 13 mmol·kg⁻¹ tuku. Podstata zkoušky: Mléčný tuk se vyextrahuje ve směsi izopropylalkoholu (propanolu) a petroléru v kyselém prostředí. Při extrakci přecházejí do nevodné fáze volné mastné kyseliny, vzniklé lipolýzou máselného tuku a rovněž část přítomné kyseliny mléčné. V alikvotním podílu nevodné fáze se titrují odměrným roztokem hydroxidu veškeré přítomné kyseliny. Zkušební vzorek se důkladně promíchá a ohřeje na teplotu 30 °C. Z připraveného vzorku se odpipetují 3 ml mléka do zkumavky. Pipetou se přidá 10 ml směsného extrakčního činidla (izopropylalkohol, petroléter a kyselina sírová se smíchají v poměru objemů 40 + 10 + 1), 6 ml petroléru a 4 ml vody, uzavře se zátkou a obsah se intenzivně protřepává po dobu 15 až 30 s. Po deseti minutách stání - oddělení vodné a nevodné vrstvy, se z horní nevodné vrstvy odpipetuje 5 ml do malé titrační baňky, přidá se asi 6 kapek indikátoru a titruje se odměrným roztokem hydroxidu draselného do právě vzniklého růžového zbarvení stejného jako při slepém pokusu a za stejného osvětlení.

Druhý soubor pocházel ze 4 různých krajů České republiky: pardubický, jihomoravský, středočeský a Vysočina- tyto vzorky byly získávány přímo při svozu mléka a jejich rozbor byl proveden v LRM Buštěhrad. Všechny analýzy byly provedeny

metodou FTIR (Fourier Transform Infra Red) technologií na přístroji Milkoscan FT 6000 podle ČSN 57 0536 (1999).

První částí výzkumu (soubor č.1) bylo stanovení množství psychrotrofních (lipolytických, proteolytických) a mezofilních bakterií. V publikaci I. CEMPÍRKOVÁ R., MIKULOVÁ M. (2009) jsme analyzovali vzájemné vztahy mezi těmito skupinami bakterií, přičemž vysoká korelační závislost byla zjištěna mezi obsahem psychrotrofních a psychrotrofních lipolytických bakterií. Mezi další faktor, u kterého jsme předpokládali vliv na obsah těchto bakterií v mléce byl zařazen i vliv sezónní, kdy byly zjištěny statisticky významně vyšší hodnoty celkového počtu mikroorganismů v letních měsících. Dalším cílem výzkumu bylo experimentální sledování nárůstu obsahu volných mastných kyselin a psychrotrofních bakterií, kdy u třech různých vzorků mléka byl experimentálně sledován nárůst psychrotrofních mikroorganismů a obsah volných mastných kyselin, mléko se uchovávalo při třech teplotách: 4 °C; 6,5 °C a 10 °C. Na konci pokusu byly vyhodnoceny souvislosti obsahu psychrotrofních mikroorganismů a volných mastných kyselin s teplotou uchování mléka a dobou jeho skladování. Analýzy byly provedeny v den odběru a následovně po 24 hodinách až do 96 h. Teplota 4 °C byla vyhodnocena jako výrazně inhibiční pro nárůst mezofilních i psychrotrofních bakterií. Nárůst volných mastných kyselin byl při této teplotě také pozvolnější.

Významný vliv na obsah volných MK a psychrotrofních lipolytických bakterií v mléce měla také technologie ustájení a dojení Nejvyšší hodnoty psychrotrofních lipolytických bakterií a volných MK byly zjištěny u vazné stelivové technologie ustájení (Publikace II. CEMPÍRKOVÁ R., MIKULOVÁ M., TRÁVNÍČEK J. 2009). Naproti tomu volné boxové ustájení vykazovalo tyto hodnoty významně nižší. Obsah volných mastných kyselin u bazénových vzorků syrového kravského mléka byl ovlivněn především aktivitou nativních mléčných lipáz v procesu indukované lipolýzy, což dokumentují vysoké hodnoty volných MK, které byly zjištěny u systému dojení na stání do potrubí, kde lze předpokládat vyšší míru mechanického stresu mléka oproti dojení v dojárně.

Publikace III. Mikulová M. (2011) analyzuje množství volných mastných kyselin, obsah celkového počtu mikroorganismů, a psychrotrofních lipolytických bakterií v bazénových vzorcích syrového kravského mléka u chovů s odlišnou technologií dojení, kdy byl soubor vzorků oproti předchozím výzkumům navýšen také o chovy s automatickým způsobem dojení. Sledován byl i vztah obsahu psychrotrofních lipolytických bakterií a somatických buněk s hodnotami volných mastných kyselin.

Při vyhodnocení vzájemné souvislosti těchto ukazatelů mezi nimi nebyl prokázán těsnější vztah. U chovů s dojením na stání do potrubí byly prokázány statisticky významné nejvyšší průměrné hodnoty volných mastných kyselin a psychrotrofních lipolytických bakterií. V chovech se systémem automatického dojení byly zjištěny nejnižší obsahy VMK, střední hodnoty byly zjištěny u farem s dojírnou.

Konečnou fází výzkumu bylo stanovení množství volných MK metodou infračervené spektrofotometrie za využití celého IR spektra s následným vyhodnocením signálu pomocí Fourierových transformací (FT-MIR). Tato metoda stanovení volných MK se ukázala jako vhodnější analytický nástroj k měření lipolýzy oproti extrakčně-titrační metodě, která je standardizovaná podle normy a relativně jednoduchá, ale její použití se pro sériové stanovení jevílo jako méně vhodné zejména z těchto důvodů: časová náročnost, pracnost, spotřeba velkých množství rozpouštědel a používání ekologicky problematických činidel.

5. ZÁVĚR

Jelikož mléko a mléčné výrobky představují vhodné prostředí pro nárůst různých mikroorganismů a tím i potenciální nebezpečí pro vznik onemocnění způsobených potravinami, uvádím jako doporučení pro zajištění správné úrovně ochrany spotřebitele skladovací teplotu 4 °C. Tato teplota je nejméně riziková a vhodná pro uchování a skladování syrového kravského mléka. Z hlediska omezení nárůstu obsahu volných MK v kravském mléce a z důvodu možného zhoršení technologických vlastností mléka není vhodné proudění nadojeného mléka příliš dlouhým potrubím, kde dochází k mechanickému stresu mléka a tím k následnému zvýšení obsahu volných MK nad rizikovou hranici lipolytických změn a ke vzniku nežádoucích chťových vlastností mléka. Chovy s vaznou technologií ustájení a dojením na stání vyhodnocuji proto jako nejméně vhodné. Pro sériové stanovení obsahu volných mastných kyselin je z hlediska časové úspornosti a možnosti stanovit mnohem větší počet vzorků najednou, vhodná metoda infračervené spektrofotometrie. Z hlediska kontaminace syrového kravského mléka byly do současné doby vyšetřeny vzorky pocházející z 20 chovů. Pouze u 4,6 % analyzovaných vzorků byla kontaminace mléka celkovým počtem mikroorganismů velmi riziková a to převážně z chovu, který byl již zrušen. Závěrem mohu konstatovat, že sledované chovy jsou na takové úrovni, že je možno kontaminaci mléka předcházet.

6. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. Abdou A.M. (2003): Purification and partial characterization of psychrotrophic *Serratia marcescens* lipase. *Journal of Dairy Science*, 86, 127–132.
2. Aires-Barros M.R., Taipa M.A., Cabral J.M.S. (1994): Isolation and purification of lipases. In: Wooley P. a Petersen S., Editors, *Lipases: Their structure, biochemistry, and application*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 243–270.
3. Andersson A., Ronner U., Granum, P.E. (1995): What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*. *International Journal of Food Microbiology*, 28, 145–155.
4. Antonelli M.L., Curini R., Scricciolo D., Vinci G. (2002): Determination of free fatty acids and lipase activity in milk: quality and storage markers. *Talanta*, 58 (3), 561–568.
5. Astrup H.N., Baevre L., Vik-Mo L., Ekern A. (1980): Effect on milk lipolysis of restricted feeding with and without supplementation with protected rape seed oil. *Journal of Dairy Research*, 47, 287–294.
6. Bandara B.P.A. (1998): Modifying fatty acid composition of bovine milk by abomasal infusion or dietary supplementation of seed oils or fish oil. Dissertation thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, United States-Virginia, 129.
7. Berner L.A. (1993): Round table discussion on milk fat, dairy foods and coronary heart disease risk. *Journal of Nutrition*, 123, 1175.
8. Blake M.R., Koka R., Weimer B.C. (1996): A semiautomated reflectance colorimetric method for the determination of lipase activity in milk. *Journal of Dairy Science*, 79 (7), 1164–1171.
9. Bonfoh B., Wasem A., Traoré A.N., Fané A., Spillmann H., Simbé C.F. (2003): Microbiological quality of cows's milk taken at different intervals from the udder to the selling point in Bamako (Mali). *Food Control*, 14, 495–500.
10. Bramley A.J., Neave F.K. (1975): Studies on the control of coliform mastitis in dairy cows. *British Veterinary Journal*, 131, 160.

11. Bramley A.J., King J.S., Higgs T.M., (1979): The isolation of *Streptococcus uberis* from cows in two dairy herds. *British Veterinary Journal*, 135–262.
12. Burdová O., Baranová M., Lauková A., Róžańska H., Rola J.G. (2002): Hygiene of pasteurized milk depending on psychrotrophic microorganism. *The Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 46, 325–329.
13. Cartier P., Chilliard Y. (1990): Spontaneous lipolysis in bovine milk: Combined effects of nine characteristics in native milk. *Journal of Dairy Science*, 73, 1178–1186.
14. Cartier P., Chillard Y., Paquet D. (1990): Inhibiting and Activating Effects of Skim Milks and Proteose-Peptide Fractions on Spontaneous Lipolysis and Purified Lipoprotein Lipase Activity in Bovine Milk. *Journal of Dairy Science*, 73 (5), 1173–1177.
15. Castberg H.B., Solberg P., Egelrud T. (1975): Tributyrate as a substrate for the determination of lipase activity in milk. *Journal of Dairy Research*, 42 (5), 247–253.
16. Celestino E.L., Iyer M., Roginski H. (1997): Reconstituted UHT-treat milk: Effects of raw milk, powder quality and storage conditions of UHT milk on its physico-chemical attributes and flavour. *International Dairy Journal*, 7, 129–140.
17. Cousin M.A., Marth E.H. (1976): Psychrotrophic bacteria cause changes in stability of milk to coagulation by rennet or heat. *Journal of Dairy Science*, 60, 1042–1047
In: Hygiene of pasteurized milk depending on psychrotrophic microorganisms, *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 46 (2), 325–329.
18. Cousin M.A. (1982): Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. *Journal of Food Protection*, 45, 172–207.
19. ČSN 57 0529 (1993): Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování. Praha
20. ČSN 57 0530 (1998): Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků. Praha.
21. ČSN 57 0533 (1997): Mléko - Stanovení látkového obsahu volných mastných kyselin. Praha.

22. ČSN 57 0536 (1999): Stanovení složení mléka infračerveným absorpčním analyzátozem. Praha.
23. D'Aoust Y.L. (1991): Pathogenicity of food borne *Salmonella*. International Journal of Food Microbiology, 12, 17–40.
24. Davies F.L., Wilkinson G. (1973): In The Microbiological Safety of Foods, Hobbs B.C. Christian J.H.B., (Eds.), Academic Press, London.
25. De Jong C., Badings H.T. (1990): Determination of free fatty acids in milk and cheese: Procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis. Journal of High Resolution Chromatography, 13 (2), 94–98.
26. Deeth H.C., Fitz-Gerald C.H. (1977): Some factors involved in milk lipase activation by agitation. Journal of Dairy Research, 44, 569–583.
27. Deeth H.C., Touch V. (2000): Methods for detecting lipase activity in milk and milk products. Australian Journal of Dairy Technology, 55 (3), 153–168.
28. Deeth H.C., Fitz-Gerald C.H., Snow A.J. (1983): A gas chromatographic method for the quantitative determination of free fatty acids in milk and milk products. New Zealand, Journal of Dairy Science and Technology, 8, 13–20.
29. Deeth H.C., Fitz-Gerald C.H., Wood A.F. (1975): A convenient method for determining the extent of lipolysis in milk. Australian Journal of Dairy Technology, 30 (9), 109–111.
30. Deeth H.C., Fitz-Gerald C.H. (1995): Lipolytic enzymes in milk and milk products. In: Fox P.F. (Eds.), Advanced dairy chemistry, Vol. 2: Lipids, pp. 247–308.
31. Deeth H.C. (2006): Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. International Dairy Journal, 16 (6), 555–562.
32. Desmasures N. (1995): Etude de laits de haute qualité: caractérisation et aptitudes microbiologiques à la transformation en camembert au lait cru. Ph.D. thesis. Institute of Biochemistry and Applied Biology, University of Caen, Caen, France.
33. Druce R.G., Thomas S.B. (1972): Bacteriological Studies on Bulk Milk Collection: Pipeline Milking Plants and Bulk Milk Tanks as Sources of Bacterial Contamination of Milk-A Review. Journal of Applied Microbiology, 35, 253–270.

34. Ensminger M.E. (1993): Dairy Cattle Science (Animal Agriculture Series). Interstate Publishers, INC., Danville, Illinois.
35. Evers J.M., Palfreyman K.R. (2001): Free fatty acid levels in New Zealand raw milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, 56, 198–201.
36. Fitz-Gerald C.H., Deeth H.C. (1983): Factors influencing lipolysis by skim milk cultures of some psychrotrophic microorganisms. *Australian Journal of Dairy Technology*, 38, 97–103.
37. Fitz-Gerald C.H., Deeth H.C., Coghill D.M. (1982): Low temperature inactivation of lipases from psychrotrophic bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, 37, 51–54.
38. Fox P.F., McSweeney P. (2006): *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2 - Lipids* (3rd Edition): Springer – Verlag, 3–125.
39. Gajdůšek S. (2003): *Laktologie*. Brno: MZLU, 78 s.
40. Gaynor P.J., Erdman R.A., Teter B.B, Sampugna J., Capuco A.V., Waldo D.R., Hamosh M. (1994): Milk fat yield and composition during abomasal infusion of cis or trans octadecenoates in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 77, 157.
41. Gholson J.H., Schexnailder R.H., Ruso V.L.L. (1966): In: Xuence of a poor-quality, low-energy ration on lipolytic activity in milk. *Journal of Dairy Science*, 49, 1136–1139.
42. Gonzalez-Cordova A.F., Vallejo-Cordoba B. (2001): Quantitative determination of short-chain free fatty acids in milk using solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (10), 4603–4608.
43. Goudkov A.V., Sharpe M.E. (1965): Clostridia in Dairying. *Journal of Applied Microbiology*, 28, 63–73.
44. Gran H.M., Mutukumira A.N., Wetlesen A., Narvhus J.A. (2002): Smallholder dairy processing in Zimbabwe: Hygienic practices during milking and the microbiological quality of the milk at the farm and on delivery. *Food Control* 13, 41–47.
45. Greenwood M.H., Hooper W.L. (1983): Chocolate bars contaminated with *Salmonella napolii*: an infective study. *British Medical Journal*, 286, 1394.

46. Griffiths M.W., Phillips J.D. (1990): Strategies to control the outgrowth of spores of psychrotrophic *Bacillus sp.* In dairy products 2. Heat-Treatments, Milchwissenschaft-Milk Science International, 45 (11), 719–721.
47. Griffiths, M.W. (1989): Effect of temperature and milk fat on extracellular enzyme synthesis by psychrotrophic bacteria during growth in milk. Milchwissenschaft, 44, 539–543.
48. Guillaume-Gentil O., Scheldeman P., Marugg J., Herman L., Joosten H., Heyndrickx M. (2002): Genetic heterogeneity in *Bacillus sporothermodurans* as demonstrated by ribotyping and repetitive extragenic palindromic-PCR fingerprinting. Applied and Environmental Microbiology, 68, 4216–4224.
49. Hammer P., Walte H.G. (1996): *Bacillus sporothermodurans* – investigation of pathogenicity. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte - Berlin, 48, 151–161.
50. Halpin-Dohnalck M.I., Marth E.H. (1989): *Staphylococcus aureus* production of extracellular compounds and behavior in foods. Journal of Food Protection, 52, 267–82.
51. Hantis-Zacharov E., Halpern M. (2007): Culturable psychrotrophic bacteria communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. Applied and Environmental Mikrobiology, 73, 7162–7168.
52. Hanuš O., Janů L., Vyletělová M., Macek A., Zajíčková I., Kopecký J., Jedelská R., Nejeschlebová L. (2004): Vliv faktorů prvovýroby jako genotypu dojnice, krmení a bakteriální a mykotoxinové kontaminace mléka na jeho technologické ukazatele typu obsahu volných mastných kyselin, kysací schopnosti a syřitelnosti. Příloha: TEZ_2004_QF3025_A_5 VÚCHS Rapotín.
53. Hanuš O., Vegricht J., Frelich J., Macek A., Bielka M., Louda F., Janů L. (2008): Analysis of raw cow milk quality according to free fatty acid contents in the Czech Republic, Czech Journal of Animal Science, 53, 17–30.
54. Hegsted D.M., McGandy R.B., Myers S.M., Stare F.J. (1965): Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. The American Journal of Clinical Nutrition, 17, 281.

55. Chambers J.V. (2005): The Microbiology of raw milk. In: Robinson RK (Eds.): Dairy mikrobiology handbook: The microbiology of milk and milk products. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, USA, pp. 39–90.
56. Champagne C.P., Laing R.R., Roy D., Mafu A.A., Griffiths M.W. (1994): Psychrotrophs in dairy product: Their effects and their control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34, 1–30.
57. Chazal M.P., Chilliard Y., Coulon J.B. (1987): Effect of nature of forage on spontaneous lipolysis in milk from cows in late lactation. *Journal of Dairy Research*, 54, 13–18.
58. Chen L., Daniel R.M., Coolbear T. (2003): Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, 13, 255–275.
59. Chen L., Coolbear T., Daniel R.M. (2004): Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines. *International Dairy Journal*, 14, 495–504.
60. Chilliard Y., Ferlay A., Rouel J., Lamberett G. (2003): A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *Journal of Dairy Science*, 86, 175–1770.
61. Christen G.L., Wang W.C., Ren T.J. (1986): Comparison of the heat resistance of bacterial lipases and proteases and the effect on ultra-high temperature milk quality. *Journal of Dairy Science*, 69, 2769–2778.
62. Church D.C. (1974): Metabolic problems to ruminants. In: Slavík P., Illek J., Matějčíček M., Klouda Z. 2004. Obsah tuku v mléce jako ukazatel zdravotního stavu dojníc a úrovně výživy. *Veterinářství*, 54, 520–524.
63. IDF (1991): Determination of free fatty acids in milk and milk products. IDF Bulletin No. 265. Brussels: International Dairy Federation.
64. Janštová B., Lukášova J., Dračková M., Vorlová L. (2004): Influence of *Bacillus* spp. enzymes on ultra high temperature-treated milk proteins, *Acta Veterinaria Brno*, 73, (3) 393.
65. Jenkins T.C. (1993): Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 76, 3851–3863.

66. Jensen R.G., Ferris A.M., Lammi-Keefe C.J. (1991): Symposium: Milk fat composition, function and potential for change. The composition of milk fat. *Journal of Dairy Science*, 74, 3228.
67. Johnson P.E., Gunten R.L.V. (1961): Effect of feeding sorghum silage on the lipolytic activity of milk. *Journal of Dairy Science*, 44, 969.
68. Kalogridou-Vassiliadou D. (1984): Lipolytic activity and heat resistance of extracellular lipases of some Gram-negative bacteria. *Milchwissenschaft*, 39, 601–603.
69. Keenan T.W., Dylewski D.P. (1995): Intracellular origin of milk lipid globules and the nature and structure of the milk lipid globule membrane. In: *Advanced Dairy Chemistry. 2: Lipids*. 2nd edn (Fox P. F., ed.), Chapman and Hall, London, pp. 89–130.
70. Kennelly J.J., Fenton M. (1982): Influence of whole canola seed on the fatty acid composition of cows' milk. Page 58. In *61st Annual Feeder's Day Report*, Department of Animal Science, University of Alberta, Canada.
71. Kennelly J.J., Khorasani R.G., (1992): Influence of flaxseed feeding on the fatty acid composition of cow's milk. In: Carter J.F. (Editor), *Proceedings of the 54th Flax Institute Conference*. North Dakota State University, Fargo, ND, 99–105.
72. Keys A., Anderson J.T., Grande F. (1965): Serum cholesterol response to changes in the diet. IV. Particular saturated fatty acids in the diet. *Metabolism*, 14, 776.
73. Khorasani G.R., Robinson P., De Boer G., Kennelly J.J. (1991): Influence of canola fat on yield, fat percentage, fatty acid profile, and nitrogen fractions in Holstein milk. *Journal of Dairy Science*, 74, 1904.
74. Kishonti E. (1975): In: *Xuence of heat resistant lipases and proteases in psychrotrophic bacteria on product quality*. Document 86, International Dairy Federation, Brussels, pp. 121–124.
75. Kramer J.K.G., Sehat N., Dugan M.E.R., Mossoba M.M., Yurawecz M.P., Roach J.A.G., Eulitz K., Aalhus J.L., Schaefer A.L., Ku Y. (1998): Distributions of conjugated linoleic acid (CLA) isomers in tissue lipid classes of pigs fed a commercial CLA mixture determined by gas chromatography and silver ion high-performance liquid chromatography. *Lipids*, 33 (6), 549–558.

76. Kratochvíl L. (1992): Rozklad mléčného tuku v zemědělské výrobě. *Náš Chov*, 1, 22–23.
77. Law B.A., Sharpe M.E., Chapman H.R. (1976): The effect of lipolytic Gram-negative psychrotrophs in stored milk on the development of rancidity in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 43, 459–468.
78. LeChevallier M.W., Werch N.J., Smith D.B., (1996): Full-scale studies of factors related to Coliform regrowth in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 689–93.
79. Lukášová J., Vyhnálková J., Páčová Z. (2001): *Bacillus* species in raw milk and in the farm environment. *Milchwissenschaft*, 56, 609–611.
80. Ma Y., Barbano D.M., Santos M. (2003): Effect of CO₂ Addition to Raw Milk on Proteolysis and Lipolysis at 4 °C. *Journal of Dairy Science*, 86, 1616–1631.
81. Macrae A.R. (1983): Extracellular microbial lipases. In: *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Edited by Fogarty W.M. London: Applied Science Publishers, pp. 225-250.
82. McPhee J.D., Griffiths M.W. (2003): Psychrotrophic bacteria. *Pseudomonas* spp. In: Roginski H., Fuquay J.W., Fox P.F. *Encyclopedia of Dairy Science*. Academic Press, London, pp. 2340–2345.
83. McKellar R.C., Cholette H. (1986): Determination of the extracellular lipases of *Pseudomonas fluorescens* spp. in skim milk with the b-naphthyl caprylate assay. *Journal of Dairy Research*, 53 (2), 301–312.
84. Meer R.R., Baker J., Bodyfelt F.H., Griffiths M.W. (1991): Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. *Journal of Food Protection*, 54, 969–979.
85. Moore J.H., Christie W.W. (1979): Lipid metabolism in the mammary gland of ruminant animals. *Progress in Lipid Research*, 17, 347–395.
86. Mottar J. (1981): Heat resistant enzymes in UHT milk and their influence on sensoric changes during uncooled storage. *Milchwissenschaft*, 36, 87–91.
87. Muir D.D., Phillips J.D., Dalgleish D.G. (1979): The lipolytic and proteolytic activity of bacteria isolated from blended raw milk. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 32, 19–23.

88. Mulder H., Walstra, P. (1974): The milk fat globule. Farnham Royal, UK: Commonwealth Agricultural Bureaux.
89. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A.R.V.W. (2003): Harper's Illustrated biochemistry (26th Edition): McGraw-Hill, pp. 111–122.
90. Nishimura K., Suzuki T., Itabashi Y. (2002): Determination of free fatty acids in milk and dairy products by reversed-phase HPLC with fluorescence detection. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 43 (4), 230–233.
91. Noakes M., Nestel P.J., Clifton P.M. (1996): Modifying the fatty acid profile of dairy products through feedlot technology lowers plasma cholesterol of humans consuming the products. *American Journal of Clinical Nutrition*, 63, 42.
92. Noble R.C. (1978): Digestion, absorption and transport of lipids in ruminant animals. *Progress in Lipid Research*, 17, 55–91.
93. Olivecrona T., Vilaro S., Olivecrona G. (2003): Lipases in milk. In: Fox P.F., McSweeney P.L.H. (Eds.), *Advanced dairy chemistry, Vol. 1: Proteins*, 3rd ed., New York, USA: Kluwer Academic Publishers. Plenum Press, pp. 473–494.
94. Olsen S.J. (1975): In *Proceedings of the Seminar on Mastitis Control*, F. H. Dodd, T. K. Griffin, and R. G. Kingwill, (Eds.), Doc. 85, International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
95. Omore A., Stall S.J., Osafo E.L.K., Kurwijilla L., Barton D., Mdoe N., Nurah G., Aning G. (2004): Market Mechanisms, Efficiency, Processing and Public health risks in Peri Urban Dairy product markets: Synthesis of findings from Ghana and Tanzania. Final Technical Report for LPP Project R7321.
96. Páčová Z., Vyhnálková J., Lukášová J, Holec J. (1996): Identification of aerobic and facultatively anaerobic sporulating bacteria isolated from operations of milk primary production, *Veterinární Medicína – Czech*, 41, 19–23.
97. Páčová Z., Švec P., Stenfors L.P., Vyletělová M., Sedláček I. (2003): Isolation of the psychrotolerant species *Bacillus weihenstephanensis* from raw cow's milk, *Czech Journal of animal science*, 48, 93–96.
98. Pedersen D.K. (2003): Determination of casein and free fatty acids in milk by means of FT-IR techniques. In: *Proc. IDF Symposium on advancement in*

Analytical Techniques. Holstebro. Denmark. Bulletin 383, International Dairy Federation, Brussels, pp. 48 -51.

99. Peterková L. (2002): Free fatty acids ratio in milk, factors which affect their concentration and possibilities their determination. *Problematika prvovýroby mléka XXVI*, Medlov, 26–30.
100. Phillips J.D., Griffiths M.W. (1986): Factors contributing to the seasonal variation of *Bacillus* spp. in pasteurized dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*, 61, 275–285.
101. Radostis O.M., Gay C.C, Hinchclif K.W. (2007): *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*. 10.ed. Philadelphia: Saunders, pp.724–725.
102. Ribeiro M.G. (2008): Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: Andrade S.F. (Ed). *Manual de terapêutica veterinária*. 3.ed. Roca: São Paulo, pp. 759–771.
103. Rowe M.T., Johnston D.E., Kilpatrick D.J., Dunstall G., Murphy R.J. (1990): Growth and extracellular enzyme production by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at a low temperature. *Milchwissenschaft* 45, 495–499.
104. Ryšánek D., Babák V., Zouharová M. (2007): Bulk tank milk somatic cell count and sources of raw milk contamination with mastitis pathogens. *Veterinární Medicína*, 52 (6), 223–230.
105. Salerno T., Siquiria, A.K., Flaminio, A.P. (2008): Pasteurelose bovina e ovina: Revisão de Literatura. *The Revue de Médecine Vétérinaire*, 6–13.
106. Santos M.V., Ma Z., Caplan Z., Barbano D.M. (2003): Sensory threshold of off-flavours caused by proteolysis and lipolysis in milk. *Journal of Dairy Science*, 86, 1601–1607.
107. Santos, M.V., Fonseca, L.F.L. (2007): Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. São Paulo: Manole, 314.
108. Shamsuzzaman K., McKellar R.C. (1987): Peptidases from two strains of *Pseudomonas fluorescens*: partial purification, properties and action on milk. *Journal of Dairy Research*, 54, 238–293.

109. Shelley A.W., Deeth, H.C., MacRae I.C. (1987): A numerical taxonomic study of psychrotrophic bacteria associated with lipolytic spoilage of raw milk. *Journal of Applied Bacteriology*, 62, 197–207.
110. Shinoda S., Yamamoto S., Tomochika K., Miyoshi S. (1979): Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Japanese, Journal of Toxicology and Environmental Health*, 43, 1–14.
111. Schalm O.W., Carroll I.G., Jain E.C.(1971): *Bovine mastitis. Bovine Mastitis.* Philadelphia: Lea a Febiger, 139.
112. Slaghuis B.A., Te Giffel M.C., Beumer R.R., Andre G. (1997): Effect of pasturing on the incidence of *Bacillus cereus* spores in raw milk. *International Dairy Journal*, 7, 201–205.
113. Slaghuis B.A., Verstappen J.A.M., Ferwerda R.T., Bos C.H., Schuiling, H.J. (2005): Milk quality and automatic milking: effects of teat and system cleaning. In Hocquette, J.F. a Gigli S., *Indicators of Milk and Beef Quality*, Wageningen Academic Publishers, pp. 359–364.
114. Sørhang T., Stepaniak L. (1997): Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trend in Food Science and Technology*, 8, 35–41.
115. Sraïri M.T., Benhouda H., Kuper M., Le Gal P.Y. (2009): Effect of cattle management practices on raw milk quality on farms operating in two-stage dairy chain, *Tropical Animal Health and Production*, 41, 259–272.
116. Stark K.D., (2000): Food safety achieved through herd management. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 142, 673–678.
117. Stead D. (1983): A fluorimetric method for the determination of *Pseudomonas fluorescens* AR11 lipase in milk. *Journal of Dairy Research*, 50 (4), 491–502.
118. Stead D. (1987): Production of extracellular lipases and proteinases during prolonged growth of strains of psychrotrophic bacteria in whole milk. *Journal of Dairy Research*, 54, 535–43.
119. Stepaniak L., Birkeland S.E., Vagias G., Sørhaug T. (1987): Enzyme-linked immunosorbant assay ELISA for monitoring the production of heat stable proteinases and lipase from *Pseudomonas*. *Milchwissenschaft*, 42, 168–172.

120. Stepaniak L., Sorhaug T. (1995): Thermal denaturation of bacterial enzymes in milk. In: Heat Induced Changes in Milk (P. F. Fox, ed.), Special Issue 9501, International Dairy Federation, Brussels, pp. 349–364.
121. Stewart D.B., Murray J.G., Neill S.D. (1975): Lipolytic activity of organisms isolated from refrigerated bulk milk. Document 86, International Dairy Federation, Brussels, pp. 38–50.
122. Sugiura M. (1984): Bacterial lipases. In: Borgstrom B. a Brockman H.L., Editors, Lipases, Elsevier Science Publishers, New York, USA (1984), pp. 505–523.
123. Surendra Nath, B., Usha M.A., Unnikrishnan V. (1994): Estimation of free fatty acids in homogenised milk. 24th international dairy congress, Melbourne, Australia, September, 119, 18–22.
124. Sutherland A.D., Murdoch R. (1994): Seasonal occurrence of psychrotrophic *Bacillus* species in raw milk, and studies on the interactions with mesophilic *Bacillus* sp. *International Journal Food Microbiology*, 21, 279–292.
125. Te Giffel M., Beumet R., Christianson A., Griffiths M. (2000): *Bacillus cereus* in milk and milk products. Advances in detection, typing and epidemiology. *Bulletin IDF*, 357, 47–54.
126. Te Giffel, M.C.T., Wagendorp A., Herrewegh A., Driehuis F.(2002): Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie Leeuwenhoek*, 81, 625–630.
127. Te Whaiti I.E., Fryer T.F. (1978): Production and heat stability in milk of proteinases and lipases of psychrotrophic pseudomonads. *Proc. 20th International Dairy Congres (Paris) E*, 303–304.
128. Thomas S.B., Thomas B.F. (1973): Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk. *Dairy Industry*, 38, 61–70.
129. Thomson N.A., Woolford W.M., Copeman A.P.J. (2005): Milk harvesting and cow factors influencing seasonal variation in the levels of free fatty acids in milk from Waikato dairy herds. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 48, 11–21.
130. Toman M., Bárta O., Dostál J., Faldyna M., Holáň V., Hořín P. Hruban V., Knotek Z., Kopecký J., Koudela B., Krejčí J., Plachý J., Pospíšil R., Pospíšil Z, Rybníkář A., Ryšánek D., Smola J., Šíma P., Tlaskalová H., Toman M., Trebichavský I.,

- Veselský L. (2000): Veterinární imunologie. Grada publishing. Praha. ISBN 80-7169-727-3, 202–207.
131. Upadhyay V.K., McSweeney P.L.H., Magboul A.A.A., Fox P.F. (2004): Proteolysis in Cheese during Ripening. In: Fox P.F., Mc Sweeney P.L.H., Cogan T.M. Guinee T.P. (eds): Cheese – Chemistry, Physics and Microbiology. Academic Press, London, pp. 391–396.
132. Vaerewijck M.J.M., De Vos P., Lebbe L., Scheldeman P., Hoste B., a Heyndrickx M. (2001): Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1074–1084.
133. Vallejo-Cordoba B., Mazorra-Manzano M.A., Gonzalez-Cordova A.F. (1998): Determination of short-chain free fatty acids in lipolyzed milk fat by capillary electrophoresis. *Journal of Capillary Electrophoresis*, 5 (3-4), 111–114.
134. Van Schaika G., Green L.G., Guzman D., Esparza H., Tadich N. (2005): Risk factors for bulk milk somatic cell counts and total bacterial counts in small holder dairy farmers in the 10th region of Chile. *Preventive veterinary medicine*, 67, 1–17.
135. Velíšek J. (2002): *Chemie potravin*. Vyd. 2., upr. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-86659-03-8, 3 s.
136. Volling O., Kromker V., (2008): Udder health management practices in dairy enterprises to reduce the incidence of bovine mastitis. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 115, 410–420.
137. Vyletělová M., Hanuš O., Kopyňec P. (1999): Determination of total counts of psychrotrophic bacteria in pool milk samples and their relation to total counts of microorganism, *Czech Journal of Food Sciences*, 17, 216–222.
138. Waes G. (1976): Aerobic mesophilic spores in raw milk. *Milchwissenschaft*, 31, 521–525.
139. Walstra P., Geurts T.J., Noomen A., Jellema A., Boekel M.A.J.S., (1999): In *Dairy Technology, Principles of Milk Properties and Processes*. Marcel Dekker, Inc. New York Basel, 162.
140. Weir J., Barbour D. (1950): Tuberculosis of the udder and its differential diagnosis. *Veterinary Record*, 62, 239.

141. Wendt K., Lotthammer K.H., Fehlings K., Spohr M. (1998): Handbuch Mastitis. Kamlage Verlag, Osnabrück, Germany, pp. 300.
142. Wheelock J.V., Rook J.A.F., Neave F.K., Dodd F.H. (1966): The effect of bacterial infections of the udder on the yield and composition of cows' milk. *Journal Of Dairy Research*, 33, 199–215.
143. Wiking L. (2005): Milk fat globule stability. Lipolysis with special reference to automatic milking systems. Doctoral thesis. Swedish university of Agricultural Science, Uppsala, 39 s.
144. Yue L., García-González D.L., Xiuzhu Y., Frederik R., Van de Voort (2008): Determination of Free Fatty Acids in Edible Oils with the Use of a Variable Filter Array IR Spectrometer. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85 (7), 599–604.
145. Zecconi A., Piccinini R., Fox L.K. (2003): Epidemiologic study of intramammary infections with *Staphylococcus aureus* during a control program in nine commercial dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223, 684–688.

7. PŘÍLOHY

Publikace I.

Czech Journal of Animal Science- vydaná

Zhodnocení viz. kapitola: **Shrnutí výsledků disertační práce.**

Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk

R. CEMPÍRKOVÁ, M. MIKULOVÁ

Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, České
Budějovice, Czech Republic

Abstract: The contamination of bulk samples of cow's raw milk ($n=491$) by psychrotrophic lipolytic bacteria (PLiBC), total count of psychrotrophic bacteria (PBC) and mesophilic bacteria (TBC) was monitored for two years on eight dairy farms and the correlations among these groups of bacteria were analysed. An increase in TBC, PBC and PLiBC and in the values of free fatty acids (FFA) was tested experimentally in three milk samples in relation to time (analyses were done in 24-hour intervals until 96 hours) and storage temperature of milk samples (4; 6.5 and 10°C). Bacterial contamination of milk was determined by culture methods in accordance with IDF standards, the values of FFA were determined by an extraction-titration method. These mean values were determined in the set of samples ($n=491$): PLiBC 659 CFU·ml⁻¹, PBC 2 932 CFU·ml⁻¹ and TBC 18 932 CFU·ml⁻¹. A high correlation was proved between values of PBC and PLiBC ($r=0.87$; $P<0.001$) while the correlation between TBC and PBC ($r=0.65$; $P<0.001$) and between PLiBC and TBC ($r=0.59$; $P<0.001$) was on a medium level. The proportional index pi for PLiBC/PBC was 0.20, for PLiBC/TBC 0.03 and for PBC/TBC 0.16. In seasonal dynamics a statistically significant difference ($P<0.001$; $P<0.05$) between the increased values of TBC in the summer season was proved compared to the winter and spring season. The differences in the seasonal variation of PBC and PLiBC values were not significant. Experimental investigation of an increase in the values of tested parameters showed that at temperatures of milk sample storage 4 and 6.5°C TBC did not exceed the permissible hygienic value (100 000 CFU·ml⁻¹) even after 96 hours while at 10°C it amounted to 90 000 CFU·ml⁻¹ after 48 hours and the limit for TBC was exceeded several times after 96 hours. PBC, which is not inhibited by cold storage to such a large extent, did not exceed the hygienic limit value for PBC (50 000 CFU·ml⁻¹) even after 96 hours when milk samples were stored at 4°C,

but at 6.5°C after 72 hours and at 10°C already after 48 hours the values 6 and 20 times higher, respectively, than the hygienic limit were recorded. A similar trend was observed in PLiBC, which exceeded the hazardous limit (43 000 CFU·ml⁻¹) at 6.5°C after 96 hours and at 10°C already after 48 hours whereas at 4°C the limit value was not exceeded even after 96 hours. The content of FFA also increased in relation to the storage time and temperature of milk samples but in comparison with the increase in the tested groups of microorganisms the increase in FFA showed a higher correlation with storage time compared to storage temperature. A medium correlation was calculated between PLiBC and/or PBC and FFA content ($r=0.52$; $r=0.57$; $P<0.001$).

Keywords: cow; raw milk; psychrotrophic lipolytic bacteria; psychrotrophic bacteria; total bacteria count; free fatty acids; lipolysis

Abstrakt: Kontaminace bazénových vzorků syrového kravského mléka ($n=491$) psychrotrofními lipolytickými bakteriemi (PLM), celkovým počtem psychrotrofních (PTM) a mezofilních (CPM) bakterií byla sledována po dva roky u osmi farem dojníc a analyzovány byly vzájemné vztahy těchto skupin bakterií. Experimentálně byl na třech vzorcích mléka ověřen nárůst CPM, PTM, PLM a hodnot volných mastných kyselin (VMK) v závislosti na čase (analýzy prováděny ve 24 hod. intervalech do 96 hod.) a úchovné teplotě vzorků mléka (4; 6,5; 10 °C). Bakteriální kontaminace mléka byla stanovena kultivačními metodami dle norem IDF, hodnoty VMK byly stanoveny extrakčně-titrační metodou. U souboru vzorků ($n=491$) byly zjištěny průměrné hodnoty PLM 659 CFU·ml⁻¹, PTM 2932 CFU·ml⁻¹ a CPM 18932 CFU·ml⁻¹. Byla prokázána vysoká korelační závislost mezi zastoupením PTM a PLM ($r=0,87$; $P<0,001$) a střední korelační závislost mezi CPM a PTM ($r=0,65$; $P<0,001$) a PLM a CPM ($r=0,59$; $P<0,001$). Poměrný index p_i pro PLM/PTM byl 0,20, pro PLM/CPM 0,03 a pro PTM/CPM 0,16. U sezónní dynamiky byl prokázán statisticky významný rozdíl ($P<0,001$; $P<0,05$) mezi zvýšenými hodnotami CPM v letním období v porovnání se zimním a s jarním obdobím. Rozdíly v sezónním kolísání hodnot PTM a PLM nebyly signifikantní. Při experimentálním sledování nárůstu hodnot testovaných ukazatelů bylo zjištěno, že CPM při teplotě uchování vzorku mléka 4 a 6,5 °C nepřekročil povolený hygienický limit (100 tis. CFU·ml⁻¹) ani v 96 hodinách, zatímco při 10 °C už ve 48 hodinách dosahoval 90 tis. CFU·ml⁻¹ a v 96 hodinách byl limit pro CPM několikanásobně překročen. PTM, které nejsou

chladovým uskladněním tak omezovány, při uchování vzorků mléka ve 4 °C nepřekročily povolený hygienický limit pro PTM (50 tis. CFU·ml⁻¹) ani v 96 hodinách, avšak při 6,5 °C v 72 hodinách a při 10 °C již ve 48 hodinách byly zjištěny hodnoty 6 a 20 násobně vyšší nežli hygienický limit. Obdobný trend vykazovaly i PLM, které překročily rizikovou hranici (43 tis. CFU·ml⁻¹, Vyleťelová a kol., 2000) při 6,5 °C v 96 hodinách a při 10 °C již ve 48 hodinách, zatímco při 4 °C nedošlo ani v 96 hodinách k jejímu překročení. Látkový obsah VMK se rovněž zvyšoval v závislosti na čase a teplotě uchování vzorků mléka, avšak v porovnání s nárůstem testovaných skupin mikroorganismů nárůst VMK vykazoval vyšší závislost na čase, nežli na úchovné teplotě. Mezi PLM, respektive PTM a obsahem VMK byla zjištěna střední korelační závislost ($r=0,52$; $r=0,57$; $P<0,001$).

Klíčová slova: kráva, syrové mléko, psychrotrofní lipolytické bakterie, psychrotrofní bakterie, celkový počet mikroorganismů, volné mastné kyseliny, lipolýza

Publikace II.

Journal of Agrobiology- vydaná

Zhodnocení viz. kapitola: **Shrnutí výsledků disertační práce.**

Counts of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk samples from the aspect of technological quality

Růžena CEMPÍRKOVÁ, Magda MIKULOVÁ, Jan TRÁVNÍČEK

University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Agriculture,
Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Czech Republic, e-mail: cempir@zf.jcu.cz,
travnic@zf.jcu.cz, mikulm00@zf.jcu.cz

Abstract: The objective of the study was to analyze the relationship of psychrotrophic lipolytic bacteria in milk with the level of free fatty acids as an indicator of technological quality of milk on dairy farms with different management technology. The contamination of bulk samples of cow's raw milk (n=110) by psychrotrophic lipolytic bacteria (PLiBC) and total counts of psychrotrophic bacteria (PBC) and mesophilic bacteria (TBC) were determined by a culture method in accordance with IDF standards. The content of free fatty acids (FFA) was determined by an extraction-titration method and somatic cell count (SCC) was determined by flow cytometry with fluorescence detection. The study was conducted throughout 2008 on 11 farms with different management technology (5 farms with loose littered cubicle housing with milking in a milking parlour; 3 farms with loose litterless slatted-floor housing with milking in a milking parlour; 3 farms with stanchion littered housing with an in-stall milking pipeline system). The correlation of PLiBC with FFA content was low ($r=0.03$; NS) and the correlation of SCC with FFA was similar ($r=0.047$; NS). The average FFA value of $32 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ fat was on the limit of the permissible maximum content for FFA for the extraction-titration method. However, a statistically significant relationship of FFA content ($P<0.001$) with the technology of stanchion housing with the in-stall milking pipeline system was proved where the highest average values of FFA and PLiBC were determined ($42 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ fat and $1,935 \text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1} - \log 2.86$; respectively) compared to loose littered cubicles ($23 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ fat and $598 \text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1} - \log 2.58$; respectively) and loose litterless slatted-floor housing with milking in a milking parlour ($30 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$

fat and $1,339 \text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1} - \log 2.84$; respectively). The technology of milking in the in-stall milking pipeline system causes a higher mechanical stress of milk that results in physical damage of milk fat globule membranes and subsequent release of FFA from fat esters by lipases.

Keywords: cow; raw milk; psychrotrophic lipolytic bacteria count; free fatty acids; lipolysis; somatic cell count

Abstrakt: Cílem práce bylo analyzovat vztah psychrotrofních lipolytických bakterií v mléce s obsahem volných mastných kyselin, jako ukazatelem technologické jakosti mléka, u chovů dojnic s odlišnou technologií. Kontaminace bazénových vzorků syrového kravského mléka ($n=110$) psychrotrofními lipolytickými bakteriemi (PLM) a celkový počet psychrotrofních bakterií (PTM) a mezofilních bakterií (CPM) byl stanoven kultivační metodou podle norem IDF. Obsah volných mastných kyselin (VMK) byl určen extrakčně titrační metodou a počet somatických buněk (PSB) byl stanoven metodou průtokové cytometrie s fluorescenční detekcí. Sledování proběhlo v průběhu jednoho roku na 11 farmách dojnic s odlišnou technologií (5 farem volné boxové stelivové s dojením v dojárně; 3 farmy volné roštové bezstelivové s dojením v dojárně; 3 farmy vazné stelivové s dojením na stání do potrubí). Korelace PLM s látkovým obsahem VMK byla na nízké úrovni ($r=0,03$; NS) a obdobně tomu bylo u vztahu PSB a VMK ($r=0,047$; NS). Průměrná hodnota VMK $32 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ tuku se pohybovala na hranici povoleného maximálního obsahu pro VMK pro extrakčně titrační metodu. Byla však prokázána statisticky významná závislost obsahu VMK ($P<0,001$) a PLM ($P<0,05$) na technologii vazného ustájení s dojením na stání do potrubí, kde byly zjištěny nejvyšší průměrné hodnoty VMK a PLM ($42 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ tuku; $1\,935 \text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$) v porovnání s volným boxovým stelivovým ($23 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ tuku; $598 \text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$) a volným roštovým bezstelivovým ustájením ($30 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ tuku;

$1\,339 \text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$) s dojením v dojárně. Technologie dojení na stání do potrubí představuje vyšší mechanický stres mléka, který vede k fyzikálnímu poškození membrán tukových kuliček a následnému uvolňování VMK z tukových esterů lipázami.

Klíčová slova: kráva; syrové mléko; psychrotrofní lipolytické bakterie, volné mastné kyseliny, lipolýza, somatické buňky

Publikace III.

Journal of Agrobiology- vydaná

Zhodnocení viz. kapitola: **Shrnutí výsledků disertační práce.**

Content of free fatty acids, lipolytic bacteria and somatic cells in relation to milking technology

Magda MIKULOVÁ

University of South Bohemia, Faculty of Agriculture, České Budějovice, Czech Republic

Abstract: The contents of free fatty acids (FFA) and counts of total bacteria, psychrotrophic lipolytic bacteria (PLiBC) and somatic cells were determined in 150 samples of cow's bulk raw milk on 20 farms with three different milking technologies in South Bohemia during 2008–10. FFA were determined using an extraction-titration method. Within the compared technologies, the highest mean values of FFA ($3.88 \text{ mmol}\cdot 100\text{g}^{-1}$; $P < 0.001$) and PLiBC ($696 \text{ CFU}\cdot \text{ml}^{-1}$) were observed on farms with pipeline milking in stalls. The lowest mean FFA level ($1.54 \text{ mmol}\cdot 100\text{g}^{-1}$) was determined on farms with an automatic milking system. Medium values were determined on farms with parlour milking.

Key words: free fatty acids; psychrotrophic lipolytic bacteria; somatic cells; lipolysis; milking technology; mechanical stress of milk

Abstrakt: Cílem práce bylo analyzovat množství volných mastných kyselin, obsah celkového počtu mikroorganismů, psychrotrofních lipolytických bakterií a somatických buněk v bazénových vzorcích syrového kravského mléka u chovů s odlišnou technologií dojení. Sledování proběhlo v průběhu let 2008-2010 na dvaceti farmách pocházejících z různých krajů České republiky s odlišnou technologií dojení. Pro stanovení obsahu volných mastných kyselin byla použita metoda Extrakčně titrační. U chovů s dojením na stání do potrubí byly prokázány statisticky významné nejvyšší průměrné hodnoty volných mastných kyselin ($3,88 \text{ mmol}\cdot 100\text{g}^{-1}$; $P < 0.001$) a psychrotrofních lipolytických bakterií (PLM) ($696 \text{ CFU}\cdot \text{ml}^{-1}$). V chovech se systémem automatického dojení byly zjištěny nejnižší obsahy VMK ($1,54 \text{ mmol}\cdot 100\text{g}^{-1}$), střední hodnoty byly zjištěny u farem s dojárnou.

Klíčová slova: volné mastné kyseliny; psychrotrofní lipolytické bakterie; somatické buňky; lipolýza; technologie dojení; mechanický stres mléka