

ALINA ADAMIAK, ALINA GÓRSKA, BARBARA MRÓZ

BAKTERIE PSYCHROTROFOWE W MLEKU SUROWYM I JEGO PRZETWORACH

Streszczenie

W unijnych rozporządzeniach określono ogólne wymagania mikrobiologiczne dotyczące mleka surowego, nie sprecyzowano jednak, jaki ma być skład jakościowy mikroflory. Przy braku higieny doju mleko zostaje zanieczyszczone mikroflorą, która pomimo chłodniczego przechowywania namnaża się i produkuje równocześnie zewnątrzkomórkowe enzymy (głównie proteinazy i lipazy), przyczyniające się do obniżenia jakości mleka i produktów mlecznych. Ze względu na termooporność enzymy pochodzenia bakteryjnego stanowią poważny problem dla przemysłu mleczarskiego. W niniejszej pracy scharakteryzowano źródła zanieczyszczenia mleka surowego mikroflorą psychrotrofową, omówiono skład jakościowy drobnoustrojów psychrotrofowych i właściwości ich enzymów oraz skutki działania proteaz i lipaz podczas magazynowania mleka i jego produktów.

Słowa kluczowe: surowe mleko, bakterie psychrotrofowe, enzymy proteolityczne, enzymy lipolityczne

Wprowadzenie

Mleko, jako produkt zróżnicowany pod względem zawartości składników pokarmowych, stanowi dobrą pożywkę dla rozwoju bakterii. Ze względu na specyfikę jego pozyskiwania nie jest możliwe uniknięcie zanieczyszczenia mleka mikroorganizmami. Dlatego ogólna liczba drobnoustrojów jest ważnym wskaźnikiem przy określaniu jego jakości higienicznej [4, 38]. Zgodnie z rozporządzenia Komisji (WE) nr 1662/2006 z dnia 6 listopada 2006 r. [39] mleko surowe nie powinno zawierać więcej niż 100 tys. drobnoustrojów w 1 ml. Dobra jakość mleka surowego warunkuje jego przydatność technologiczną oraz odpowiednią jakość i trwałość przetworów mleczarskich. Zanieczyszczenie mikrobiologiczne surowego mleka zależy m.in. od takich czynników, jak:

*Mgr inż. A. Adamiak, Katedra Hodowli Bydła i Oceny Mleka, prof. dr hab. Alina Górską, dr Barbara Mróz, Katedra Dietetyki i Oceny Żywności, Wydz. Przyrodniczy, Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach, ul. Prusa 14, 08-110 Siedlce.
Kontakt: ala.witkowska@interia.pl*

stan zdrowotny krów, warunki higieniczne gospodarstwa, higiena doju oraz temperatura przechowywania mleka [27, 50]. Obowiązek niezwłocznego schładzania mleka bezpośrednio po udoju przyczynił się do znacznej poprawy jakości mleka surowego i przetworów mleczarskich. Równocześnie powstały dobre warunki do rozwoju bakterii zimnolubnych [39]. Dominującą mikroflorę schłodzonego mleka surowego stanowią bakterie psychrotrofowe, zdolne do wydzielania zewnątrzkomórkowych enzymów, szczególnie proteolitycznych i lipolitycznych, warunkujących psucie się gotowych wyrobów mleczarskich [8, 9, 22].

W niniejszej pracy przedstawiono charakterystykę bakterii psychrotrofowych występujących w mleku surowym i jego produktach oraz skutki ich działania.

Źródła zanieczyszczenia mikrobiologicznego mleka surowego

Bakterie psychrotrofowe są powszechne w przyrodzie, występują w wodzie, glebie, na roślinach i w powietrzu. Mogą gromadzić się w rurociągach, paszy (w tym w kiszonkach niskiej jakości), trawie, ściółce, kale, na powierzchni strzyków oraz sprzętu mleczarskiego. Nie są jednak naturalną mikroflorą znajdującą się w wymionach krów, dlatego ich obecność jest wyłącznie wynikiem zanieczyszczenia mleka surowego w trakcie doju lub po nim [3, 14, 20, 40].

Wśród źródeł zanieczyszczenia Gram-ujemnymi bakteriami psychrotrofowymi należy wymienić pozostałości wody w dojarkach i rurociągach podających mleko oraz w zbiornikach chłodzących, brudne wymiona i strzyki, nieodpowiednio czyszczone powierzchnie mające kontakt z mlekiem w trakcie jego transportu i dalszego magazynowania w mleczarni. Z kolei obecność przetrwalnikujących bakterii psychrotrofowych z rodzaju *Bacillus spp.* zwykle tłumaczona jest tzw. efektem sezonowości. Głównymi źródłami zanieczyszczenia mleka tymi bakteriami w okresie zimowym są siano i pył, a w lecie – zabrudzone ziemią wymiona i strzyki [40, 41]. Christiansson i wsp. [13] potwierdzili w badaniach, że liczba zarodników w mleku surowym jest skorelowana ze stopniem zanieczyszczenia strzyków glebą. Z kolei Lukaseva i wsp. [31] oraz Foltys i Kirchnerova [16] nie potwierdzili wpływu „efektu sezonowości” na obecność *Bacillus spp.* w mleku surowym. Lukaseva i wsp. [31] tłumaczyli duże zanieczyszczenie mleka bakteriami z rodzaju *Bacillus spp.* w sierpniu i październiku brakiem higieny podczas doju i przechowywania mleka. Berthold i Molska [3] stwierdziły

w 1 g gleby obecność $10^3 \div 10^7$ jtk komórek wegetatywnych *Bacillus cereus* i $10^2 \div 10^5$ jego przetrwalników, natomiast w 1 g kału pobranego z otoczenia krów było $10^2 \div 10^5$ jtk przetrwalników *Bacillus cereus*. Większość analizowanych pasz zawierała przetrwalniki *Bacillus cereus*, a ich liczba mieściła się w granicach $10 \div 10^4$ w 1 g. Kał i gleba, ze względu na łatwość zanieczyszczenia powierzchni strzyków krów, stanowią znaczne zagrożenie dla mleka. Zajac i Brzozowska [49] wykazały, że ocenione wzro-

kowo jako czyste strzyki krów utrzymywanych w pomieszczeniach zamkniętych były przyczyną wzrostu zanieczyszczenia mleka średnio o 10^4 jtk/ml. Udział komórek bakterii z powierzchni strzyków ocenionych wzrokowo jako brudne w ogólnym zanieczyszczeniu mleka był większy i osiągnął 10^5 jtk/ml, natomiast zanieczyszczenie mleka pozyskanego po umyciu i dezynfekcji strzyków było mniejsze niż 10^3 jtk/ml. Jak podaje Ziarno [50], w przypadku zdrowej krowy i czysto przeprowadzonego doju pozyskane mleko zanieczyszczone jest jedynie nieliczną mikroflorą saprofityczną na poziomie do kilku tysięcy komórek w 1 ml. Natomiast niehigieniczny dój i nieprawidłowe przechowywanie surowca skutkują zwiększeniem liczby komórek bakterii do poziomu od kilkuset tysięcy do kilkudziesięciu milionów w 1 ml.

Bakterie psychrotrofowe w mleku

Bakterie psychrotrofowe nie są jedną grupą taksonomiczną, określenie to charakteryzuje drobnoustroje różnego gatunku zdolne do wzrostu w temp. $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ lub niższej, niezależnie od ich optymalnej temperatury wzrostu [40], która wynosi $20 \div 30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zdolność bakterii psychrotrofowych do wzrostu i aktywności metabolicznej w niskiej temperaturze związana jest z budową błony komórkowej, która, wzbogacona w wielonienasycone kwasy tłuszczowe, chroni i zapewnia prawidłową przepuszczalność oraz aktywny transport metabolitów niezbędnych do wzrostu [40].

Kukula [27] stwierdziła większą liczbę bakterii psychrotrofowych w mleku w cieplejszych porach roku, co uzasadnia warunkami korzystnymi do namnażania mikroorganizmów w wyższej temperaturze. Wykazała ona, że przy ogólnej liczbie bakterii w mleku na poziomie 10^6 jtk/ml udział komórek bakterii psychrotrofowych pozostawał na poziomie niższym o 1 do 2 rzędów wielkości. Przy zwiększeniu ogólnego zanieczyszczenia mleka, zwiększała się również liczba komórek bakterii psychrotrofowych. Z kolei w badaniach prowadzonych od wielu lat w Zakładzie Biotechnologii Mleka SGGW wykazano, że w mleku pozyskanym z doju mechanicznego, przechowywanym w warunkach chłodniczych, udział bakterii psychrotrofowych w ogólnej liczbie drobnoustrojów wynosił $30 \div 60,7\%$, ale analizy przeprowadzone w warunkach przemysłowych wskazują, że udział ten może przewyższać 90% [50]. Cempirkova [6] potwierdziła wysoką korelację pomiędzy ogólną liczbą drobnoustrojów mleka surowego i liczbą komórek bakterii psychrotrofowych ($r = 0,69$, $p < 0,01$). Ponadto wykazała znaczący wpływ systemu utrzymania krów i techniki doju na ogólną liczbę drobnoustrojów i liczbę bakterii psychrotrofowych mleka. Ogólna liczba bakterii w mleku pochodzącym od krów utrzymywanych w oborach wolnostanowiskowych i dojonych w hali udojowej wyniosła $5 \times 10^3 \div 370 \times 10^3$ jtk/ml, w tym liczba bakterii psychrotrofowych $0,9 \times 10^3 \div 39,7 \times 10^3$ jtk/ml, a od krów utrzymywanych w systemie uwięzionym i dojonych dojarką przewodową odpowiednio $5 \times 10^3 \div 4\,239 \times 10^3$ jtk/ml i $1,4 \times 10^3 \div 64,8 \times 10^3$ jtk/ml.

Hantsis-Zacharov i wsp. [22] stwierdzili, że ok. 20 % bakterii wyizolowanych z mleka surowego stanowiły bakterie psychrotrofowe, które zaklasyfikowali do siedmiu klas: *Gammaproteobacteria*, *Bacilli*, *Acinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Flavobacteria* i *Sphingobacteria*. Trzy pierwsze klasy zawierały po 18 ÷ 21 gatunków bakterii i dominowały w zależności od pory roku. Klasa *Gammaproteobacteria* dominowała w sezonie jesiennym i zimowym, *Bacilli* – w sezonie letnim, a *Acinobacteria* – w jesiennym. Dominującym rodzajem w obrębie wyżej wymienionych klas były: *Pseudomonas* i *Acinetobacter* (*Gammaproteobacteria*), *Microbacterium* (*Acinobacteria*) oraz bakterie fermentacji mlekowej *Leuconostoc* i *Lactococcus* (*Bacilli*). Większość autorów zajmujących się badaniem jakościowym flory bakteryjnej mleka surowego podaje, że drobnoustroje psychrotrofowe zdolne do wzrostu w mleku surowym w temp. bliskiej 0 °C reprezentowane są przez Gram-ujemne bakterie, takie jak: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* i *Flavobacterium* oraz Gram-dodatnie bakterie z rodzajów: *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* i *Microbacterium* [6, 7, 27, 40, 44, 46].

Wśród psychrotrofowej mikroflory mleka największe zainteresowanie mikrobiologów i technologów mleczarstwa wzbudzają gatunki reprezentowane przez *Pseudomonas* ssp. oraz *Bacillus* ssp. [42, 43]. Bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, odporne w lekko alkalicznym środowisku, mogą rozmnażać się w urządzeniach mytych tylko środkami alkalicznymi, niestarannie wypłukanych i niezdezynfekowanych [1, 35]. Adams i wsp. [2] wykazali, że 70 ÷ 90 % bakterii psychrotrofowych wyizolowanych z surowego mleka przechowywanego przez tydzień w temp. 4 °C należało do *Pseudomonas* spp. Podobne wyniki uzyskali Craven i Macauley [15], którzy potwierdzili obecność wymienionych bakterii w 87 % próbek pasteryzowanego mleka przechowywanego w temperaturze 4 °C. Natomiast Moussa i wsp. [35] wykazali, że ponad 50 % ogólnej liczby bakterii psychrotrofowych w mleku należało do rodzaju *Pseudomonas*. Wyizolowali oni z próbek surowego mleka pięć dominujących gatunków, tj. *Pseudomonas fluorescens* (20 %), *Aeromonas hydrophila* (16 %), *Pseudomonas cepacia* (13 %), *Pseudomonas putida* (6 %) i *Chryseomonas luteola* (5 %). Większość tych bakterii (58 ÷ 91 %) produkuje zewnątrzkomórkowe enzymy: proteazy, lipazy i fosfolipazy. W porównaniu z innymi bakteriami psychrotrofowymi *Pseudomonas* ssp. charakteryzuje się krótkim czasem generacji (<4 h), co oznacza, że zanieczyszczenie jedną komórką wyżej wymienionej bakterii może prowadzić do zwiększenia ich liczby do wartości 10⁶ jtk/ml w mleku przechowywanym przez 8 dni w temp. 4 °C [40].

Wśród ciepłoodpornej, psychrotrofowej i przetrwalnikującej mikroflory mleka dominuje *Bacillus* spp. [45]. Phillips i Griffiths stwierdzili [37], że 86 % ciepłoodpornych bakterii psychrotrofowych wyizolowanych z mleka surowego stanowiły bakterie z tego rodzaju. *Bacillus* spp. są bardziej niejednorodną grupą aniżeli *Pseudomonas* spp., charakteryzującą się w obrębie grupy różnymi wymaganiami żywieniowymi,

zdolnością do wzrostu w szerokim przedziale temperatur i pH oraz wykazującą inną oporność na ciśnienie osmotyczne. Wśród bakterii należących do rodzaju *Bacillus* najczęściej izolowanymi gatunkami w mleku surowym i pasteryzowanym oraz w produktach mleczarskich są: *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. subtilis* i *B. circulans*. W stosunku do *Pseudomonas* spp. wegetatywne komórki *Bacillus* spp. mają większą zdolność do wydzielania zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych enzymów hydrolitycznych [10, 11, 19, 23, 40]. W 40 ÷ 84 % przypadków stwierdzono, że *Bacillus* spp., a w szczególności gatunek *B. cereus* wyizolowany z mleka, produkował enzymy lipolityczne i proteolityczne, a w ok. 80 % także fosfolipazę [33, 40]. Czas trwania jednej generacji (ok. 8,5 h) i okres fazy przygotowawczej (lag fazy) psychrotrofowych laseczek z rodzaju *Bacillus* w temp. 2 ÷ 7 °C są znacznie dłuższe niżeli *Pseudomonas* spp. Mimo tego zarodnikujące formy *Bacillus* spp. mogą stać się dominującym zanieczyszczeniem mleka przechowywanego w temp. 10 °C [45, 46]. Sorhoug i Stepaniak [46] podają, że ok. 25 % wszystkich problemów związanych z trwałością konwencjonalnie pasteryzowanego mleka i śmietanki w USA może być powiązana z ciepłoopornymi bakteriami psychrotrofowymi.

Enzymy bakterii psychrotrofowych oraz ich wpływ na jakość mleka i jego przetworów

Bakterie psychrotrofove mleka surowego powodują stopniowe niekorzystne i nieodwracalne zmiany jego składu chemicznego oraz cech sensorycznych, a natężenie tych zmian zależy od początkowej liczby i charakteru drobnoustroju. Prawidłowo przeprowadzony proces pasteryzacji mleka surowego zredukuje liczbę bakterii Gram-ujemnych, wegetatywne formy ciepłoopornych bakterii Gram-dodatnich, jednak ich przetrwalniki przetrwają. Także enzymy proteolityczne i lipolityczne oraz inne metabolity wydzielane do mleka przez bakterie psychrotrofove przetrzymują pasteryzację, a nawet sterylizację [6, 8, 9, 26].

Drobnoustroje z rodzaju *Pseudomonas* wydzielają do środowiska dwa lub trzy immunologicznie niepowiązane enzymy proteolityczne i jeden lipolityczny. Enzymy te wydzielane są do mleka pod koniec fazy intensywnego wzrostu komórek lub w fazie stacjonarnej [10, 11, 25]. Proteinaza wydzielana przez *Pseudomonas* spp. zachowuje 55 ÷ 60 % aktywności po obróbce termicznej w 77 °C przez 17 s i 20 ÷ 49 % aktywności po obróbce termicznej w 140 °C przez 10 s, a proteinazy produkowane przez dziesięć różnych gatunków z rodzaju *Pseudomonas* przetrwały obróbkę cieplną w 149 °C przez 10 s [2, 21, 34].

Większość enzymów proteolitycznych wytwarzanych przez *Pseudomonas* spp. zawiera jeden atom cynku i do ośmiu atomów wapnia w cząsteczce (metaloenzymy). Optimum ich działania znajduje się w zakresie pH 6,5 ÷ 8. Rozwój ten może nastąpić w mleku pozbawionym aktywności bakterii kwaszących, które zostaną zahamowane na

skutek schłodzenia mleka. Proteinyzy wydzielane są przez *Pseudomonas* spp. również w mleku rozcieńczonym do 5000 razy, tym samym mogą gromadzić się w źle wypłukanych i zdezynfekowanych zbiornikach i rurociągach [10, 46].

W porównaniu z *Pseudomonas* spp. gatunki z rodzaju *Bacillus* zdolne są do produkcji bardziej zróżnicowanych enzymów proteolitycznych, a wiele z nich może także produkować więcej niż jeden rodzaj proteinyzy. Chopra i Mathur [12] stwierdzili, że *Bacillus stearothermophilus* wyizolowany z surowego mleka produkuje dwie proteinyzy: metaloproteinazę RM-67 I o masie cząsteczkowej ok. $67,6 \cdot 10^3$ Da i proteinazę serynową RM-67 II o masie cząsteczkowej ok. $20 \cdot 10^3$ Da. Obie proteinyzy wykazują optimum działania przy pH 8. Wykazano także, że enzymy proteolityczne pochodzące od *Bacillus stearothermophilus* i *Bacillus licheniformis* nie tracą aktywności po obróbce cieplnej w temp. 70 °C przez 10 min [10, 12, 46].

Wśród Gram-ujemnych bakterii psychrotrofowych *Pseudomonas* ssp. jest przyczyną niekorzystnych zmian jakościowych mleka pasteryzowanego w 15 ÷ 33 %. Nawet bardzo niska początkowa liczba ich komórek podczas dłuższego przechowywania mleka pasteryzowanego może osiągnąć poziom $10^6 \div 10^7$ jtk/ml w ciągu 10 dni i powodować zmiany smaku, zapachu a tym samym skracać długość terminu przydatności do spożycia mleka pasteryzowanego [5, 28, 48].

Przy wysokich standardach higienicznych, jakie wdrożono w zakładach mleczarskich, to właśnie wzrost i aktywność *Pseudomonas* spp. i *Bacillus* spp., pochodzących z tzw. reinfekcji, jest jednym z najczęstszych szkodliwych czynników decydujących o jakości mleka pasteryzowanego (w temp. 72 °C przez 12 ÷ 15 s) przechowywanego w temp. 4 ÷ 7 °C. Zakładając, że poziom reinfekcji *Pseudomonas* spp. w pierwszych dniach przechowywania wynosi 1 jtk/ml, uwzględniając czas generacji 9,4 h w temp. 4 °C, w ciągu 10 dni liczba komórek bakterii wzrośnie do $3 \cdot 10^7$ jtk/ml [46]. Popasteryzacyjny wzrost komórek bakterii potwierdzają Śmietana i wsp. [48], którzy po pasteryzacji mleka surowego, o początkowej wartości ogólnej liczby drobnoustrojów $2,9 \cdot 10^5$ jtk/ml, uzyskali redukcję OLD do poziomu $8,2 \cdot 10^2$ jtk/ml. W czasie przechowywania zaobserwowano jednak zwiększenie wartości tego wskaźnika do $6,0 \cdot 10^5$ jtk/ml w ostatnim dniu przechowywania (9. dzień). Liczba komórek bakterii psychrotrofowych po obróbce termicznej była niższa niż 10 jtk/ml. Jednak już pierwszego dnia przechowywania wynosiła $1,0 \cdot 10^3$ jtk/ml i nieznacznie zmieniała się w trakcie przechowywania. Pasteryzacja zmniejszyła populację bakterii ciepłoopornych o dwa rzędy wielkości i nie zaobserwowano wzrostu komórek tych drobnoustrojów w trakcie przechowywania. Liczba komórek bakterii tlenowych przetrwalnikujących (*Bacillus*) została natomiast zredukowana z $4,0 \cdot 10^2$ do $3,0 \cdot 10^1$ jtk/ml. Jednak już po pierwszym dniu przechowywania stwierdzono jej zwiększenie o jeden rząd wielkości, zaś w ostatnim dniu przechowywania populacja tych bakterii była równa liczbie oznaczonej w mleku surowym.

W przypadku, gdy wyizolowany czysty szczep *Pseudomonas fluorescens* dodano do mleka UHT, kolejne etapy w ocenie smaku określono jako: świeży, nieświeży, nieco przestarzały, nieczysty lub o łagodnym posmaku, lekko gorzki i gorzki [45, 46]. Z kolei przechowywane mleko UHT w warunkach doświadczalnych (temp. 37 °C), zanieczyszczone szczepami *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis* po 30 dniach charakteryzowało się obcym smakiem i galaretowatą konsystencją [29, 36, 40].

Wzmożony wzrost i aktywność metaboliczna drobnoustrojów z rodzaju *Pseudomonas* i *Bacillus* w mleku przechowywanym w temp. 4 °C prowadzi do nagromadzenia enzymów proteolitycznych – proteinaz, które hydrolizują kazeinę do rozpuszczalnych peptydów. Rozłożone białko traci swoje właściwości i przydatność technologiczną, szczególnie w serowarstwie. Gorzyczka w mleku, galaretowacenie mleka UHT i zmniejszona produkcja miękkiego sera są efektem obecności proteinaz produkowanych przez bakterie psychrotrofowe. Większość proteinaz jest zdolna do rozkładu przede wszystkim kazeiny, a w tym jej frakcji β , a następnie α_s i κ . Białka serwatkowe są rozkładane na ogół wolniej i nie przez wszystkie bakterie [45, 46].

Sorhaug i wsp. [46] stwierdzili rozwój nieswoistego zapachu, a także smaku gorzkiego oraz problemy z teksturą sera, spowodowane psychrotroforowymi enzymami proteolitycznymi, gdy ogólna liczba bakterii psychrotroforowych w mleku wynosiła $2,0 \times 10^6 \div 5,0 \times 10^8$ jtk/ml. Enzymy proteolityczne bakterii psychrotroforowych stymulują uwalnianie plazminy i plazminogenu z miceli kazeinowych w mleku surowym. W praktyce oznacza to, że wysoka aktywność plazminy już w mleku przerabianym na sery powoduje zmniejszenie zdolności do tworzenia skrzepu serowarskiego i straty białek z serwatką na skutek wypłukiwania plazminy i plazminogenu z masy serowej do serwatki, a tym samym zmniejszenie wydajności produkcji. Zanieczyszczenie mleka surowego na poziomie 10^3 jtk/ml bakteriami psychrotroforowymi, przechowywanego przez 48 h, zmniejsza wydajność o ok. 4 % [10, 30, 40]. Ponadto pozostające w skrzepie serowym enzymy proteolityczne przy zmniejszonym stężeniu plazminy powodują nietypowy zapach podczas dojrzewania, szczególnie serów półtwardych, które długo dojrzewają [17, 18, 40].

Smak twarogu wyprodukowanego z mleka zawierającego 5 ng/ml proteinazy P1 z *P. fluorescens*, po upływie 3 tygodni przechowywania w temp. 7 °C, był znacząco niżej oceniany ze względu na smak gorzki [46].

Interesującą konsekwencją aktywności enzymów proteolitycznych jest stymulacja rozwoju w mleku komórek bakterii kwasu mlekowego. Dzieje się tak prawdopodobnie dlatego, że bakterie te mogą korzystać z peptydów, aminokwasów i amoniaku produkowanych przez psychrotrofy. Z drugiej strony, wolne kwasy tłuszczowe uwalniane przez *Pseudomonas* spp. mogą hamować wzrost bakterii kwasu mlekowego. Podobnie enzymy proteolityczne wytwarzane przez *P. fluorescens*, które przyczyniają się do

posmaku goryczy w mleku, były stosowane z dobrym skutkiem do przyspieszenia dojrzewania serów Cheddar [46].

Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* wykazują także silne właściwości lipolityczne, a wydzielane przez nie do środowiska lipazy wchodzą w kontakt z tłuszczem mlecznym. Lipazy wytwarzane przez *P. fluorescens* i *P. fragi* wykazują optimum działania odpowiednio przy pH 6,5 i 7,5, ale znaczną część aktywności zachowują jeszcze przy pH 5,0 ÷ 5,5. Większość bakterii psychrotrofowych produkuje lipazy w późnej fazie logarytmicznej oraz we wczesnej stacjonarnej fazie wzrostu. Bakterie wytwarzają także fosfolipazy uszkadzające otoczki kuleczek tłuszczu mlecznego, co znacznie ułatwia działanie lipazom [10, 46]. Produkcję lipaz stwierdzono zarówno w przypadku Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich bakterii psychrotrofowych. Jednak w przeciwieństwie do *Pseudomonas* spp., których enzymy lipolityczne zakwalifikowano do sześciu biochemicznych grup, enzymy lipolityczne wydzielane przez rodzaj *Bacillus* są ściśle związane z zewnątrzkomórkowymi i wewnątrzkomórkowymi lipazami, które należą tylko do dwóch grup [11]. Bakteryjne enzymy lipolityczne są zróżnicowane pod względem właściwości i specyfikacji podłoża. Na ogół mają masę cząsteczkową $30 \cdot 10^3$ ÷ $50 \cdot 10^3$ Da, a optimum działania w zakresie pH 7 ÷ 9. Większość z nich jest specyficzna w pozycji *sn-1* i *sn-3* triacylogliceroli, a niektóre hydrolizują diacyloglicerole i monoacyloglicerole, szybciej niż triacyloglicerole [35]. W przeciwieństwie do lipazy lipoproteinowej (LPL) mleka, lipazy bakteryjne są zdolne do hydrolizy nienaruszonych kuleczek tłuszczu mleka, ale tryb dostępu i mechanizm tego działania nie są jeszcze poznane [12, 32].

Podobnie jak proteiny, również lipazy wytwarzane przez *Pseudomonas* spp. i *Bacillus* spp. są względnie stabilne termicznie, np. wyizolowana z surowego mleka lipaza produkowana przez *Pseudomonas* spp. zachowała 55 ÷ 100 % aktywności podczas obróbki termicznej w temp. 63 °C przez 30 min. Natomiast większość lipaz produkowanych przez *Bacillus* spp. wykazywała najwyższą aktywność w temp. 60 ÷ 75 °C [11]. Lipazy są bardziej stabilne termicznie niż proteiny. Prawdopodobnie dlatego wykazują wyższą aktywność podczas przechowywania mleka w proszku [45, 46, 47].

Gorzki smak śmietanki i pływające grudki tłuszczu, występujące w produktach mleczarskich, związane są z obecnością komórek *Bacillus* spp. w liczbie ok. 10^6 jtk/ml lub większej i sugerują wyjątkową zdolność bakteryjnej fosfolipazy do uszkadzania błon kuleczek tłuszczowych [45, 46, 47]. Matta i Punji [33] wykazali, że 48 próbek surowego mleka było zanieczyszczone bakteriami psychrotrofowymi o właściwościach lipolitycznych, takimi jak: *Bacillus cereus*, *B. polymyxa*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. subtilis*, *B. laterosporus* i *B. coagulans*.

Janstova i wsp. [24] badali zmianę stężenia wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) w mleku sterylizowanym zanieczyszczonym *Bacillus* spp. Po trzech tygodniach prze-

chowywania mleka UHT w temp. 24 °C początkowe stężenia FFA – 41,97 mmol/kg zwiększyło się do 1617,22 mmol/kg. Największy wzrost stężenia FFA w mleku UHT zaobserwowano przy zanieczyszczeniu mleka jednocześnie dwoma gatunkami: *B. licheniformis* i *B. cereus*. Ze względu na intensywną lipolizę i proteolizę nastąpiło skrócenie terminu przydatności do spożycia mleka UHT o 25 %.

Jak podają Smarzija i wsp. [40], mikroflora psychrotrofowa w 25 % jest przyczyną skrócenia terminu przydatności do spożycia śmietany i masła produkowanych wyłącznie ze schłodzonego mleka surowego. Produkty te ze względu na dużą zawartość tłuszczu są bardziej podatne na zepsucie spowodowane lipolizą aniżeli proteolizą. Koka i wsp. [26] stwierdzili, że główne drobnoustroje psychrotrofowe związane z jęlczeniem masła i śmietany to *P. fragi* i *P. fluorescens*. Gatunki te namnażają się przy zwiększonej wilgotności masła i wówczas *P. fragi* uwalnia estry kwasu jabłkowego, w konsekwencji czego pojawia się jełki smak. Z kolei *P. putrefaciens* rośnie na powierzchni masła, uwalniając kwasy organiczne, a w szczególności kwas izowalerianowy, który jest rozpoznawalny po 7 ÷ 10 dniach jako zgniły zapach masła. Oba gatunki mogą wydzielać zielonkawy barwnik, który odpowiedzialny jest za nieprzyjemne przebarwienia masła. *P. mephitica* oraz *P. nigrifaciens* odpowiedzialne są za rzadziej opisywane wady masła, jak nieprzyjemny smak i czarne przebarwienia [26, 40].

W serach dojrzewających aktywność lipolityczna bakterii psychrotrofowych rozpoczyna się w końcowej fazie dojrzewania sera i odpowiedzialna jest za obcy smak spowodowany uwalnianiem przez lipazy FFA z kuleczek tłuszczowych. W przypadku zanieczyszczenia sera lipazą pochodzącą od *P. fluorescens* jęlczenie serów twardych rozpocznie się po ok. 2 miesiącach dojrzewania [40, 46].

Mleko fermentowane z powodu niskiego pH 4,2 ÷ 4,6 nie jest odpowiednim środowiskiem dla większości bakterii. Jednak użycie do jego produkcji mleka surowego, wysoko zanieczyszczonego mikrobiologicznie, stwarza problemy technologiczne. Mikroflora psychrotrofowa hydrolizująca białko i tłuszcz w mleku surowym powoduje niekorzystne zmiany tekstury i zapachu wyrobu gotowego. Na przykład zhydrolizowana κ-kazeina z mleka surowego w jogurcie ma żelową konsystencję, zwiększoną lepkość i ulega szybciej synerezie [40].

Inaktywacja zewnątrzkomórkowych, stabilnych w wysokich temperaturach hydrolaz, pochodzących od bakterii psychrotrofowych, wymagałaby takich zabiegów termicznych, które są niedopuszczalne w przemyśle mleczarskim. Mogłyby one doprowadzić choćby do zmiany barwy mleka na skutek reakcji Maillarda [46]. Pomimo badań nad termoopornością enzymów pochodzących od bakterii psychrotrofowych oraz ich wpływu na podstawowe składniki mleka, mechanizmy ich syntezy nie są jeszcze wyjaśnione. Potwierdza to z jednej strony ich złożoność i różnorodność, z drugiej – utrudnia ustalenie metod i celów ich kontroli [2, 10, 12, 17, 21, 25, 26, 32, 33, 35, 46].

Podsumowanie

Na jakość produktów mleczarskich mogą mieć wpływ enzymy termostabilne, które wydzielane są do mleka przez bakterie psychrotrofowe przed obróbką termiczną surowego mleka lub enzymy i inne metabolity, które są produkowane przez bakterie psychrotrofowe podczas chłodniczego magazynowania produktów mleczarskich. Usunięcie zarówno bakterii psychrotrofowych, jak i skutków ich działania jest trudne, dlatego na wszystkich etapach pozyskiwania i przetwarzania mleka należy stosować takie zabiegi, które w znacznym stopniu ograniczą udział tego typu mikroflory w mleku surowym. Największe znaczenie w tym względzie mają prawidłowe warunki higieniczne doju oraz szybkie schłodzenie pozyskanego mleka. Obniżenie jakości mleka i produktów mleczarskich powodowane przez bakterie psychrotrofowe i ich metabolity oraz potencjalna chorobotwórczość wymienionych bakterii wymagają dalszych badań. Szczególnie ważne są prace zmierzające do opracowania szybkich i skutecznych metod pomiaru aktywności enzymów mleka i jego produktów, bowiem dostępne testy są czasochłonne i skomplikowane technicznie.

Literatura

- [1] Aaku E.N., Collinson E.K., Gashe B.A., Mpuchane S.: Microbiological quality of milk from two processing plants in Gaborone Botswana. *Food Control*, 2004, **15**, 181-186.
- [2] Adams D.M., Barch J.T., Speck M.L.: Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *J. Dairy Sci.*, 1975, **58** (6), 828-834.
- [3] Berthold A., Molska I.: Występowanie *Bacillus cereus* w środowisku pozyskiwania mleka. *Med. Weter.* 2004, **60** (1), 42.
- [4] Bis H., Mędreła-Kuder E.: Czystość mikrobiologiczna mleka i jego przetworów dostarczanych przez indywidualnych producentów na plac targowy Stary Kleparz w Krakowie. *Hygeia Public Health* 2011, **46**, 57-63.
- [5] Burdova O., Baranova M., Andrea L., Róžańska H., Rola J.: Hygiene of pasteurized milk depending on psychrotrophic microorganisms. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 2002, **46**, 325-329.
- [6] Cempirkova R.: Psychrotrophic vs. total bacterial counts in bulk milk samples. *Vet. Med. Czech*, 2002, **47** (8), 227-233.
- [7] Cempirkova R.: Contamination of cow's raw milk by psychrotrophic and mesophilic microflora in relation to selected factors. *Czech J. Anim. Sci.*, 2007, **52** (11), 387-393.
- [8] Cempirkova R., Mikulova M.: Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. *Czech. J. Anim. Sci.*, 2009, **54**, 65-73.
- [9] Cempirkova R., Mikulova M., Travnicek J.: Counts of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk samples from the aspect of technological quality. *J. Agrobiol.*, 2009, **26** (2), 113-121.
- [10] Chen L., Daniel R.M., Coolbear T.: Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *Int. Dairy J.*, 2003, **13**, 255-275.
- [11] Chen L., Coolbear T., Daniel R.M.: Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus sp.* Isolated from milk powder production lines. *Int. Dairy J.*, 2004, **14**, 495-504.
- [12] Chopra A.K., Mathur D.K.: Purification and character-isolation of heat-stable proteases from *Bacillus stearothermophilus* RM-67. *J. Dairy Sci.*, 1985, **68**, 3202-3211.

- [13] Christiansson A., Bertilsson J., Sevansson B.: *Bacillus cereus* spores in raw milk: Factor affecting the contamination of milk during the grazing period. *J. Dairy Sci.*, 1999, **82**, 305-314.
- [14] Coorevits A., De Jonghe V., Vandroemme J., Reekmans R., Heyrman, J., Messens W., De Vos P., Heyndrickx M.: Comparative analysis of the diversity of aerobic-spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *System. Appl. Microbiol.*, 2008, **31**, 126-140.
- [15] Craven H.M., Macauley B.J.: Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage 1. Identification of types. *Austr. J. Dairy Technol.*, 1992, **47**, 38-45.
- [16] Foltys V., Kirchenerova K.: Mesophilic and psychrotrophic aerobic sporulating microorganisms in raw cow's milk. *CEJB*, 2006, **1 (4)**, 545-560.
- [17] Fox P.F., Stepniak L.: Isolation and some properties of extracellular heat-stable lipases from *Pseudomonas fluorescens* strain AFT36. *J. Dairy Res.*, 1983, **50**, 77-89.
- [18] Fox P.F., Guinee T.P., T.M., McSweeney, P.L.H.: *Microbiology of Cheese Ripening*. U knjizi *Fundamentals of Cheese Science*, An Aspen Publication. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland 2000, pp. 206-232.
- [19] Gargourin A., Hamed H., El Feki A.: Analysis of raw milk quality at reception and during cold storage: Combined effects of somatic cell counts and psychrotrophic bacteria on lipolysis. *J. Food Sci.*, 2013, **78, 9**, 405-411.
- [20] Godic Torkar K., Golc Teger S.: The microbiological quality of raw milk after introducing the two day's milk collecting system. *Acta Agriculturae Slov.*, 2008, **92**, 61-74.
- [21] Griffiths M.W., Philips J.D., Muir D.D.: Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. *J. Appl. Bacteriol.*, 1981, **50**, 289-303.
- [22] Hantsis-Zacharov E., Halpern M.: Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 7162-7168.
- [23] Izidoro T., Pereira J., Soares V., Pinto J.: Effect of psychrotrophic growth on the milk fat fraction at different temperatures of storage. *J. Food Sci.*, 2013, **78, 9**, 615-618.
- [24] Janstova B., Drackova M., Vorlova L.: Effect of *Bacillus cereus* enzymes on the milk quality following ultra high temperature processing. *Acta Veterinaria Brno*, 2006, **75**, 601-609.
- [25] Kohlmann, K.L., Nielsen S.S., Steenson L.R., Landisch M.R.: Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. *J. Dairy Sci.*, 1991, **74**, 3275-3283.
- [26] Koka R., Weimer B.C.: Influence of growth conditions on heat-stable phospholipase activity in *Pseudomonas*. *J. Dairy Res.*, 2001, **68**, 109-116.
- [27] Kukula E.: Mikroflora psychrotrofowa w mleku surowym przeznaczonym do skupu. *Zesz. Nauk. AR Kraków*, 2001, **83**, 37-44.
- [28] Kumaresan G., Annalvilli R., Sivakumar K.: Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of storage. *J. App. Sci. Res.*, 2007, **3 (11)**, 1383-1387.
- [29] Larsen H.D., Jorgensen K.: Growth of *Bacillus cereus* in pasteurized milk product. *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, **46**, 173-176.
- [30] Leitner G., Silanikove N., Jacobi S., Weisbilt L., Bernstein S., Merin U.: The influence of storage on the farm and in dairy silos on milk quality for cheese production. *Int. J. Dairy*, 2008, **18**, 109-113
- [31] Lukasova J., Vyhalkova J., Pacova Z.: *Bacillus species* in raw milk and in the farm environment. *Milchwissenschaft*, 2001, **56**, 609-611.
- [32] Macrae A.R.: Extracellular microbial lipases. In: W. M. Fogarty (Ed.). *Microbial enzymes and biotechnology*. Applied Science Publishers, New York 1983, pp. 225-249.
- [33] Matta H., Punj V.: Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic spore forming bacteria from raw milk. *Int. J. Dairy Technol.*, 1999, **52**, 59-62.
- [34] Marchand S., Coudijzer K., Heyndrickx M., Dewettinck K., Block De J.: Selective determination of the heat-resistant proteolytic activity of bacterial origin in raw milk. *Int. Dairy J.*, 2008, **18**, 514-519.

- [35] Moussa O.B., Mankai M., Barbana Ch., Hassouna M., Alvarenga N.B., Canada J.: Influence of culture conditions on esterase activity of five psychrotrophic Gram negative strains selected from raw Tunisian milk. *Ann. Microbiol.*, 2008, **58**, 53-59.
- [36] Murugan B., Villi R.A.: Lipolytic activity of *Bacillus species* isolated from milk and dairy products. *The Indian Vet. J.*, 2009, **86**, 80-81.
- [37] Phillips J., Griffiths M.W.: Pasteurized dairy products: the constraints imposed by environmental contamination. In: Nriagu J.O., Simmons M.S.: *Food Contamination from Environmental Sources*. Wiley, New York 1990, pp. 387-456.
- [38] Rogelj I.: Mleko. In: Bem Z., Adamic J., Zlender B., Smole Mozina S., Gasperlin L.: *Mikrobiologija Zivil Zivalskega Izvora Biotehniska fakulteta. Oddelek za zivilstvo Ljubljana 2003*, pp. 515-538.
- [39] Rozporządzenia Komisji (WE) nr 1662/2006 z dnia 6 listopada 2006 r., zmieniające Rozporządzenie (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego. *Dz. Urz. UE L 320 z 18.11.2006 r.* z późn. zm.
- [40] Samarzija D., Zamberlin S., Pogacić T.: Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. *Mljekarstvo*, 2012, **62 (2)**, 77-79.
- [41] Santana E.H.W., de Beloti, Muller E.E., Ferreira M.A.de Moraes L.B., Pereira M.S., Gusmao VV.: Milk contamination in different points of dairy process. Mesophilic, psychrotrophic and proteolytic microorganisms. *Semina: Ciencias Agrarias, Londrina 2004*, **25**, 349-358.
- [42] Sevansson B., Monthan A., Shaheen R., Andersson A.M., Salkinoja-Salonen M., Christiansson A.: Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in dairy production chain. *Int. Dairy J.*, 2005, **16**, 740-749.
- [43] Sevansson B., Ekelund K., Ogura H., Christiansson A.: Characterisation of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. *Int. Dairy J.*, 2004, **14**, 17-27.
- [44] Shah N.P.: Psychrotrophs in milk: a review. *Milchwissenschaft*, 1994, **49**, 432-437
- [45] Sorhaug T., Stepaniak L.: *Microbial Enzymes in the Spoilage of Milk and Dairy Products: Food Enzymology*. Vol. 1. Elsevier 1991, pp. 169-218.
- [46] Sorhaug T., Stepaniak L.: Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends Food Sci. Technol.*, 1997, **35-40**.
- [47] Stepaniak L.: Psychrotrophic bacteria, bacteria other than *Pseudomonas spp.*. *Encyclopedia of Dairy Sci.*, 2002, **4**, 2345-2351.
- [48] Śmietana Z., Krajewska-Kamińska E., Bohdziewicz K., Nalepa B.: Porównanie jakości mikrobiologicznej mleka pasteryzowanego mikrofiltrowanego i UHT. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **2 (51)**, 29-39.
- [49] Zając M., Brzozowska M.: Czynniki warunkujące jakość mikrobiologiczną mleka surowego. *Med. Weter.*, 1990, **7-8**, 34.
- [50] Ziarno M., Czapska M.: Skład jakościowy mikroflory mleka krowiego surowego i pasteryzowanego. *Przegl. Mlecz.*, 2008, **5**, 4-8.

PSYCHROTROPHIC BACTERIA IN RAW MILK AND DAIRY PRODUCTS

Summary

In the EU regulations, general microbiological requirements for raw milk are laid down; however, the qualitative composition of microflora is not defined. In the absence of hygiene during milking, milk becomes contaminated with microflora that, despite the cold storage, can multiply and, at the same time, produces extracellular enzymes (mainly proteases and lipases), which contribute to the quality deteriora-

tion of milk and dairy products. Owing to their heat resistance, the enzymes of bacterial origin are a serious problem for the dairy industry. In the paper, there are characterized the contamination sources of raw milk with psychrotrophic microflora and the qualitative composition of psychrotrophic microorganisms as are the properties of their enzymes and the effects of the activity of proteases and lipases while storing milk and its products.

Key words: raw milk, psychrotrophic bacteria, proteolytic enzymes, lipolytic enzymes ☒