

Vliv lipolytických enzymů *Pseudomonas fluorescens* na uvolňování mastných kyselin z mléčného tuku*

MARCELA VYLETĚLOVÁ¹, JAROSLAV FICNAR², OTO HANUŠ¹

¹Research Institute for Cattle Breeding, Rapotín; ²Service Labor, Postřelmov, Czech Republic

Abstract

VYLETĚLOVÁ M., FICNAR J., HANUŠ O. (2000): Effects of lipolytic enzymes *Pseudomonas fluorescens* on liberation of fatty acids from milk fat. Czech J. Food Sci., 18: 175–182.

Effects of thermostable lipolytic enzymes *Pseudomonas fluorescens* 66 ZB in pasteurized milk on concentration of free fatty acids (VMK) in milk were studied in selected milk samples. Identical bulk milk samples were analyzed by the method specified according to VYLETĚLOVÁ *et al.* (2000b). Reference milk samples (without bacterial strains) and the experimental ones (containing *Ps. fl.* 150 th. CFU/ml and 2800 th. CFU/ml, resp.) were stored at 6.5°C and 14°C and analyzed at regular time intervals (24 h) – Table 1. An extractive-titric method (KADLEC, PETERKOVÁ 1996; Table 5 and Fig. 4) was used for monitoring of fatty acid (MK) liberation. Precise analyses of MK and VMK were made by the chromatographic method (Figs. 1, 2 and 3, Table 2 and 3). Medium-chain fatty acids (C₁₂–C₁₆) are liberated first of all; short-chain acids (C₆–C₁₀) were found sporadically or in very small quantities (Table 2). Dissociation constant of the specific fatty acid liberated from milk fat affects principally relationships between pH and free fatty acid concentration. The predominating proportion of long-chain acids in liberated fatty acid formation is associated with lower reduction of pH as compared to the predomination of fatty acids with shorter chains associated with more substantial reduction of pH. In our study, a rapid decrease of pH was noted before 168 h (Table 4); this corresponds to low concentrations of short-chain free fatty acids. VYLETĚLOVÁ *et al.* (2000b) found significant relations between pH and contents of VMK (measured by the extractive-titric method); in some samples, correlation coefficients amounted to $r = -0.93^{***}$ ($P \leq 0.001$). The extractive-titric method analyzing VMK concentrations (mmol/kg milk fat) provides results characterized by a systematic rise (e.g., 32.0 mmol/kg instead of 13.0 mmol/kg in raw milk). According to KRATOCHVÍL (1992) 20 mmol VMK/kg milk fat signalized the starting point characterizing flavour degradation of milk caused by activities of fatty acids C₁₂–C₁₄ above all; the transformed value (respecting specifics of the extractive-titric method) amounts to 49 mmol/kg. Limits determining potential lipolytic modifications of milk flavour (RLZCHV) as related to specific samples and temperatures at VMK levels amounting to 49 mmol/kg or 20 mmol/kg are outlined in Fig. 4. Milk samples No. 5 and No. 6 stored at higher temperature surpassed this risk limit at 56 h and 64 h, respectively (Table 6, Fig. 4). On the contrary, milk samples stored temperatures corresponding to the standard storage temperature (storage of raw milk, transport, storage of pasteurized milk) surpass the mentioned risk level after 90 h and 140.5 h. Obtained results document the predominant role of storage temperature in the whole complex (production and processing of milk as a raw material or an intermediate product); evident differences in contamination rates (10^5 and 10^6) can be characterized as secondary effects in this case (Table 5). As related to practical conditions, the mentioned facts imply immediate processing of raw milk and pasteurized milk. This postulate must be respected namely by dairy plants producing delicate milk products. VYLETĚLOVÁ *et al.* (2000b) found a notable VMK increase/24 h (7–11 mmol/kg milk fat) under specific temperatures and microbial contamination.

Key words: milk; *Pseudomonas fluorescens*; lipolytic enzymes; free fatty acids; extractive-titric method; chromatographic method

Abstrakt

VYLETĚLOVÁ M., FICNAR J., HANUŠ O. (2000): Vliv lipolytických enzymů rodu *Pseudomonas fluorescens* na uvolňování mastných kyselin z mléčného tuku. Czech J. Food Sci., 18: 175–182.

Ve vybraných vzorcích mléka jsme sledovali vliv termostabilních lipolytických enzymů *Pseudomonas fluorescens* 66 ZB pasterovaného mléka na obsah volných mastných kyselin (VMK) mléčného tuku. Vzorky bazénového mléka byly analyzovány

*Práce byla dělána za finanční podpory Národní agentury pro zemědělský výzkum, grant č. EP 7154.

podle metodiky, kterou popsali VYLETĚLOVÁ *et al.* (2000b). Kontrolní vzorek mléka (bez přítomnosti bakteriálního kmene) a pokusné vzorky (s obsahem *Ps. fl.* 150 tis. a 2800 tis. CFU/ml) byly uchovávány při teplotě 6,5 a 14 °C a v pravidelném 24h intervalu odebírány pro analýzu. Na sledování průběhu uvolňování mastných kyselin (MK) byla použita extrakčně-titrační metoda (KADLEC, PETERKOVÁ 1996) a pro přesnou analýzu MK a VMK byla použita metoda plynové chromatografie. Z výsledků vyplynulo, že nejdříve dochází k uvolnění MK se středně dlouhým řetězcem (C_{12} – C_{16}), dále s dlouhým řetězcem (C_{18}), zatímco mastné kyseliny s krátkým řetězcem (C_6 – C_{10}) jsme zaznamenali pouze ojediněle nebo ve stopovém množství. Extrakčně-titrační metodou jsme určili hranici rizika lipolytických změn chuťových vlastností mléka (RLZCHV) při obsahu VMK 49 mmol/kg (KRATOCHVÍL 1992). Kritickou hranici překročily jako první pokusné vzorky uchovávané při teplotě 14 °C, přičemž vzorek s vyšším počtem *Ps. fluorescens* po 56 h a vzorek s nižším počtem po 64 h. U vzorků skladovaných při teplotě 6,5 °C byl průběh podobný. Rizikovou hranici překročily po 90 hodinách (vzorek s vyšší koncentrací enzymů *Ps. fluorescens*) a po 140,5 hodinách (vzorek s nižším počtem). Větší vliv na obsah VMK měla při experimentální degradaci pasterovaného mléka úchovná teplota než koncentrace psychrotrofní bakteriální kontaminace přispívající termostabilními lipasami.

Klíčová slova: mléko; *Pseudomonas fluorescens*; lipolytické enzymy; volné mastné kyseliny; extrakčně titrační metoda; chromatografická metoda

Mléčný tuk je nejsložitější ze všech přírodních tukových komplexů. Obsahuje většinou nasycené mastné kyseliny (66 %), dále kyseliny monosaturované (30 %) a nenasycené (4 %) (BAER 1991). Narušení tukové fáze je výsledkem působení mnoha enzymatických aktivit plazmatického, membránového nebo bakteriálního původu a projevuje se rozkladem triacylglycerolů a zvýšením obsahu VMK. Pokud je obsah vyšších mastných kyselin (VMK) vyšší než 20 mmol/kg mléčného tuku, má tuk nažluklou až mýdlovitou chuť, zapříčiněnou zejména VMK C_{12} a C_{14} (KRATOCHVÍL 1992). V technologické praxi mají největší vliv na kvalitu mléka psychrotrofní bakterie s kombinovanou tvorbou obou lytických enzymů. Převážnou většinu těchto kmenů tvoří *Pseudomonas fluorescens* (MUIR *et al.* 1979; SHELLEY *et al.* 1987; TERNSTRÖM *et al.* 1993; VYLETĚLOVÁ *et al.* 1998, 1999a, b, 2000a). Při nedodržování nízké teploty během skladování nebo transportu (VYLETĚLOVÁ *et al.* 1999a, b) mohou psychrotrofní bakterie tvořit až 100 % z celkového počtu mikroorganismů (CPM). Enzymy bakteriálního původu mají v porovnání s nativní lipasou vyšší tepelnou odolnost. Mléčné lipasy pravděpodobně zapříčiňují významnou lipolýzu v sýrech ze syrového mléka a způsobují i některé změny v sýrech vyrobených z pasterovaného mléka, zvláště když je mléko pro kompletní inaktivaci mléčných lipas tepelně ošetřeno jen pasterační teplotou (DRIESEN 1989; FOX 1993). Některé jsou vysoce selektivní pro mastné kyseliny na pozici 3, kde je umístěna většina kyseliny máselné, což pravděpodobně vysvětluje nepřiměřenou koncentraci kyseliny máselné v sýru.

Cílem výrobců sýru je produkovat výrobek s charakteristickou chutí, vůní a strukturou, bez defektů a v co nejkratším možném čase. Kvalitní syřidlo nemá lipasovou aktivitu. V kontrastu s tím siřidlo užívané v některých italských sýrech obsahuje účinný lipasový extrakt, který je v některých zemích přidáván do syrového mléka v částečně čištěné formě. Tento extrakt vykazuje vysokou specifitu pro krátké řetězce MK, esterifikované na 3. pozici a je odpovědný za charakteristickou pikantní chuť tvrdého italského sýru. Většina ostatních lipas je pro výrobu

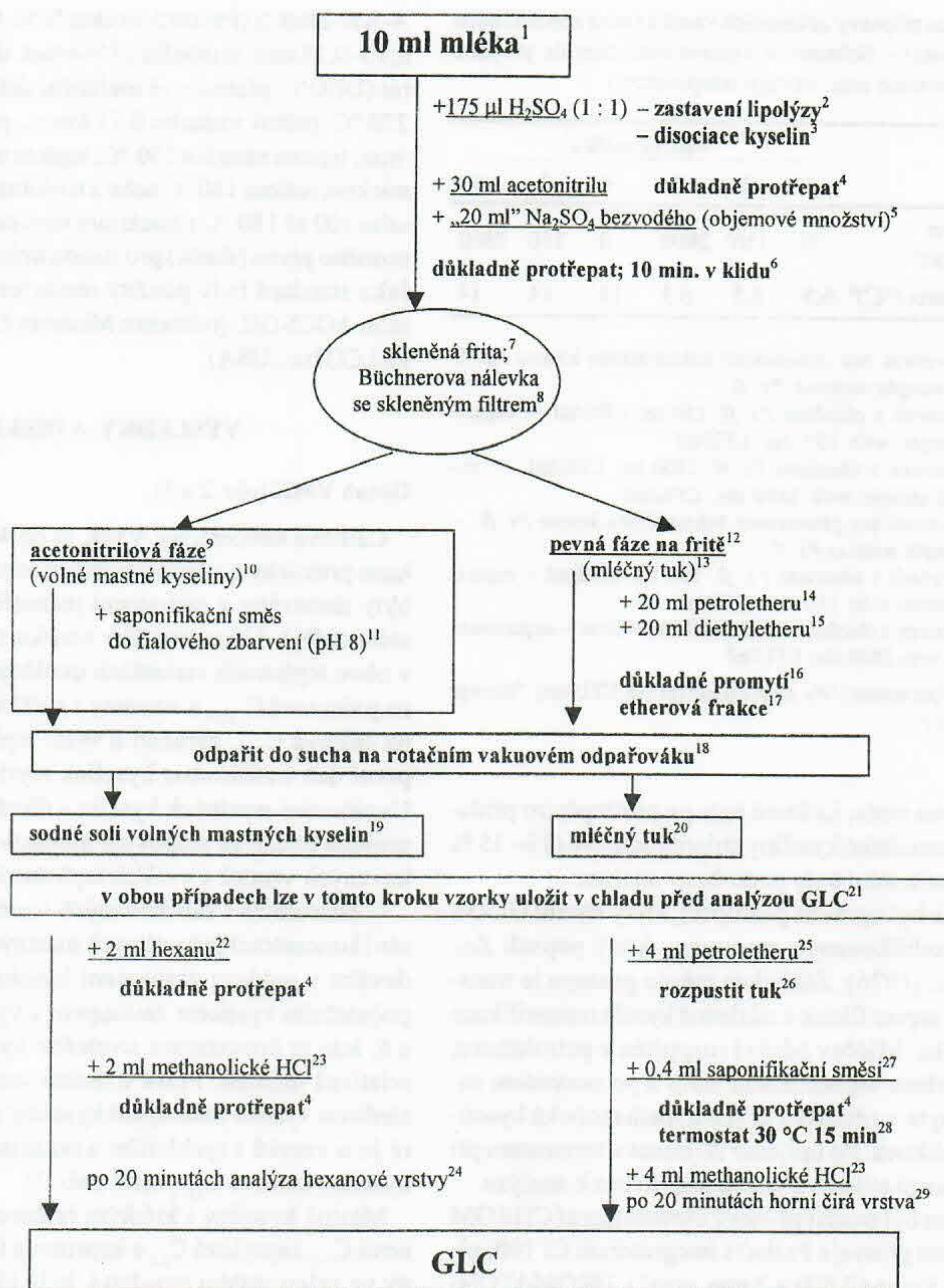
italských sýrů nevyhovující pro jejich nepřesnou specifitu. Rozvoj plynové chromatografie a spektroskopie v 60. a 70. letech ovlivnil výzkum sýrové chuti a aroma, neboť umožnil stanovit stovku složek ovlivňujících chuť a aroma. Většina z nich je přítomna ve velmi nízkých koncentracích, mnohé pod prahovými hodnotami, ale mohou ještě ovlivnit kvalitu sýru (FOX 1993).

MATERIÁL A METODY

Příprava vzorků. Analýze bylo podrobena bazénové pasterované mléko, které bylo zaočkováno psychrotrofním kmenem *Pseudomonas fluorescens* a uchovávalo při teplotách 6,5 a 14 °C (tab. 1) (VYLETĚLOVÁ *et al.* 2000b).

Stanovení obsahu VMK a měření pH. Celkový obsah volných mastných kyselin VMK (mmol/kg tuku) v bazénovém vzorku pasterovaného mléka byl stanoven podle metodiky uvedené v práci (VYLETĚLOVÁ *et al.* 2000b) a extrakčně-titrační metodou (DEETH *et al.* 1975; KADLEC, PETERKOVÁ 1996). Pro každý vzorek bylo měřeno pH (Radelkis OK-102/1, MLR) – podrobnější výsledky uvádíme v práci VYLETĚLOVÁ *et al.* (2000b).

Stanovení koncentrace VMK chromatografickou metodou (obr. 1). K vybraným vzorkům mléka o objemu 10 ml, které byly odebrány ve stanoveném časovém intervalu v průběhu sledování lipolýzy, bylo přidáno 175 µl zředěné kyseliny sírové (50 % obj. v destilované vodě). Acidifikací mléka na pH asi 1,0 dojde k zastavení lipolýzy a zároveň k disociaci volných mastných kyselin (dále jen VMK). Vlastní extrakce VMK byla provedena acetonitrilem (CH_3CN ; Fluka, Švýcarsko) o objemu 30 ml a po důkladném protřepání vzorku a extrakčního činidla bylo přidáno 20 ml bezvodého síranu sodného. Tímto postupem došlo jednak k odstranění vlhkosti z acetonitrilu, k vyizolování VMK do extrakčního činidla (KUZDZALSAVOIE 1980) a k zachycení mléčného tuku v pevné fázi reakční směsi. Jelikož se jedná o dělení v soustavě kapalina–pevná látka je zamezeno tvorbě emulzí a podstatně se zkrátí doba izolace tuku z mléka (KRÁL, KRATOCHVÍL 1976). Vzniklá polosypká směs byla několikanásobně pro-



¹milk; ²cessation of lipolysis; ³dissociation of acids; ⁴acetonitrile shake thoroughly; ⁵anhydrous Na₂SO₄ (volume quantity); ⁶shake thoroughly; 10 min-rest; ⁷fritted glass; ⁸Büchner funnel with glass filter; ⁹acetonitrile phase; ¹⁰free fatty acids; ¹¹saponifying mixture until violet colouring (pH 8); ¹²solid phase on the fritted glass; ¹³milk fat; ¹⁴petroleum ether; ¹⁵diethyl ether; ¹⁶careful washing out; ¹⁷ether fraction; ¹⁸evaporate to dryness on rotatory vacuum vaporizer; ¹⁹Na salts of free fatty acids; ²⁰milk fat; ²¹it is possible to keep samples cold before GLC analysis (in two cases); ²²hexane; ²³methanolic HCl; ²⁴analysis of hexane layer after 20 min; ²⁵petroleum ether; ²⁶dissolve fat; ²⁷0.4 ml saponifying mixture; ²⁸thermostat 30 °C 15 min; ²⁹upper clear layer after 20 min

1. Schéma analýzy mastných kyselin během lypolýzy mléka – Scheme of fatty acid analysis during milk lipolysis

míchána a po desetiminutovém stání převedena na skleněnou fritu o hustotě S1 a byla separována acetonitrilová fáze, která obsahuje VMK. K této fázi byl dále přidán benzen-methanolický roztok hydroxidu sodného až do dosažení pH > 8. Po zalkalizování byla acetonitrilová fáze na rotačním vakuovém odpařováku při teplotě 85 °C odpařena do sucha. Tento pracovní postup je modifikací postupu, který popsali SPANGELO *et al.* (1986). Vzorky s obsahem VMK byly uchovány při teplotě 5 °C do doby vlastní analýzy plynovou chromatografií.

Mléčný tuk zachycený po separaci acetonitrilové fáze na síranu sodném byl extrahován 20 ml petroletheru a následně 20 ml diethyletheru. Spojené extrakty byly na rotační vakuové odparce odpařeny dosucha. Vzorek s obsahem sodných solí VMK a vzorek mléčného tuku byly do analýzy plynovou chromatografií uchovány při teplotě 5 °C.

Pro analýzu mastných kyselin plynovou chromatografií byly připraveny jejich methylestery. Přidáním 2 ml hexanu (Fluka, Švýcarsko) do vzorku VMK, resp. sodných solí

Tab. 1. Schéma přípravy pokusných vzorků (míra kontaminace, úchovná teplota) – Scheme of experimental sample preparation (contamination rate, storage temperature)

Parametr ²	Vzorek mléka ¹					
	1	2	3	4	5	6
<i>Ps. fluorescens</i> (v tis. CFU/ml) ³	0	150	2800	0	150	2800
Úchovná teplota (°C) ⁴	6,5	6,5	6,5	14	14	14

1 = kontrolní vzorek bez přítomnosti bakteriálního kmene *Ps. fl.* – control sample without *Ps. fl.*

2 = pokusný vzorek s obsahem *Ps. fl.* 150 tis. CFU/ml – experimental sample with 150 ths. CFU/ml

3 = pokusný vzorek s obsahem *Ps. fl.* 2800 tis. CFU/ml – experimental sample with 2800 ths. CFU/ml

4 = kontrolní vzorek bez přítomnosti bakteriálního kmene *Ps. fl.* – control sample without *Ps. fl.*

5 = pokusný vzorek s obsahem *Ps. fl.* 150 tis. CFU/ml – experimental sample with 150 ths. CFU/ml

6 = pokusný vzorek s obsahem *Ps. fl.* 2800 tis CFU/ml – experimental sample with 2800 ths. CFU/ml

¹milk sample; ²parameter; ³*Ps. fluorescens* (in ths. CFU/ml); ⁴storage temperature (°C)

byla vytvořena směs, ke které byly po protřepání přidány 2 ml methanolické kyseliny chlorovodíkové (13–15 % obj.). Po 20 min stání byly podrobeny analýze.

Mléčný tuk byl upraven postupem, který navrhl GLASS (1971), a modifikovaným postupem, který popsali ZADRAŽIL *et al.* (1976). Základem tohoto postupu je transesterifikace, saponifikace a následná kyselá reesterifikace mléčného tuku. Mléčný tuk byl rozpuštěn v petroletheru, pak byla přidána saponifikační směs a po provedení saponifikace byla v přebytku přidána methanolická kyselina chlorovodíková. Po uplynutí 20 minut v termostatu při 30 °C byla horní etherová vrstva připravena k analýze.

K analýzám byl použit plynový chromatograf CHROM 5 (Laboratorní přístroje Praha) s integrátorem CI 100; plněná kovová kolona 2 500 × 3 mm, nosič CHROMATON-

A-AW-DMCS (Packard-Becker B.V., Nizozemsko), zrnění 0,90–0,18 mm, smáčedlo 13 % hmot. diethylenglykoljantarát (DEGS), plamenově ionizační detektor (FID), teplota 270 °C; průtok vzduchu 0,71 l/min., průtok vodíku 40 ml/min; teplota nástřiku 250 °C, teplota termostatu při izotermickém režimu 180 °C nebo s teplotním programem v rozsahu 100 až 180 °C s lineárním nárůstem 5 °C/min, průtok nosného plynu (dusík) pro danou kolonu pro tlak 215 kPa. Jako standard byly použity methylestery mastných kyselin AOCS OIL (reference Mixtures č. RM-5 výrobce SUPELCO Inc., USA).

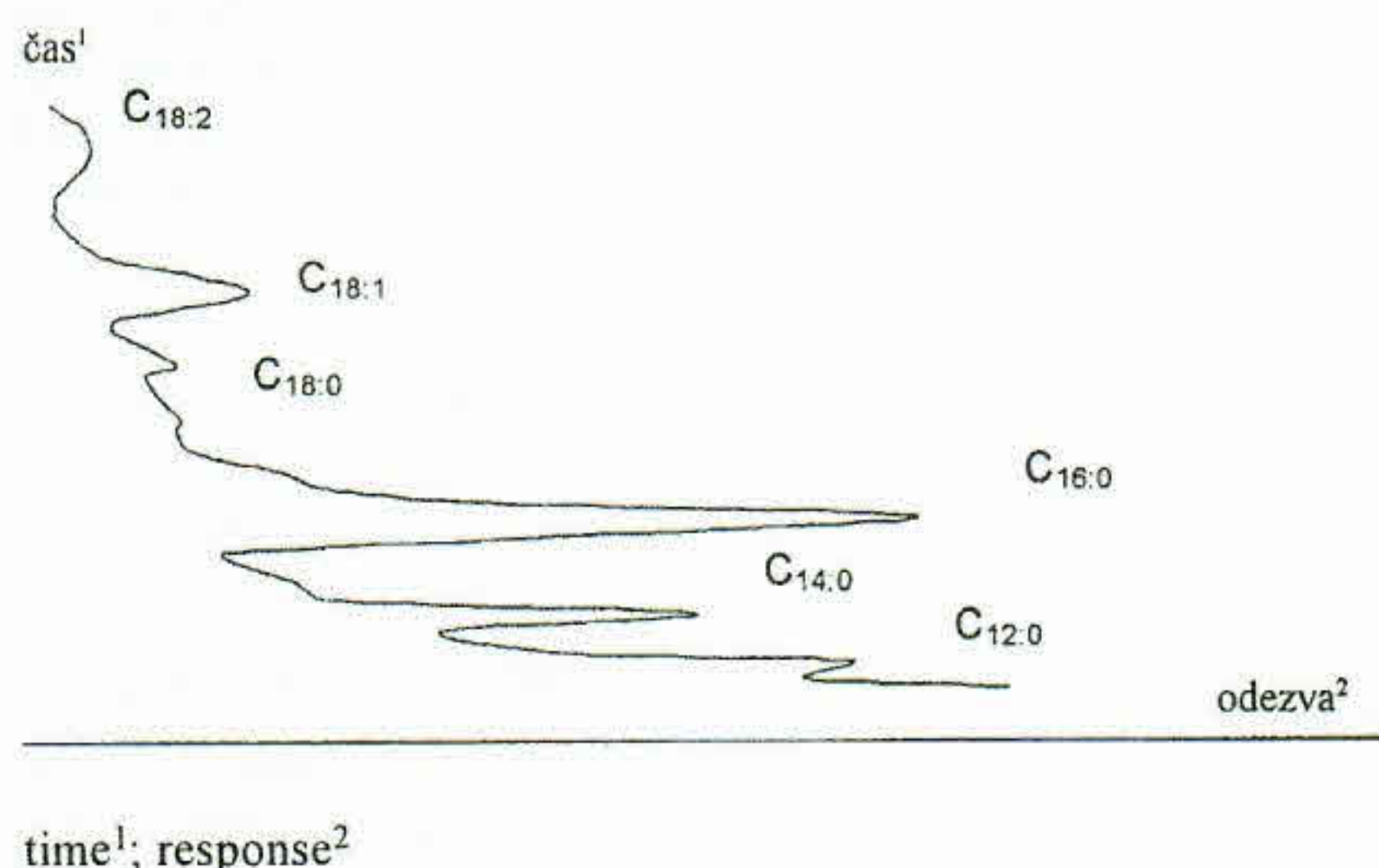
VÝSLEDKY A DISKUSE

Obsah VMK (obr. 2 a 3)

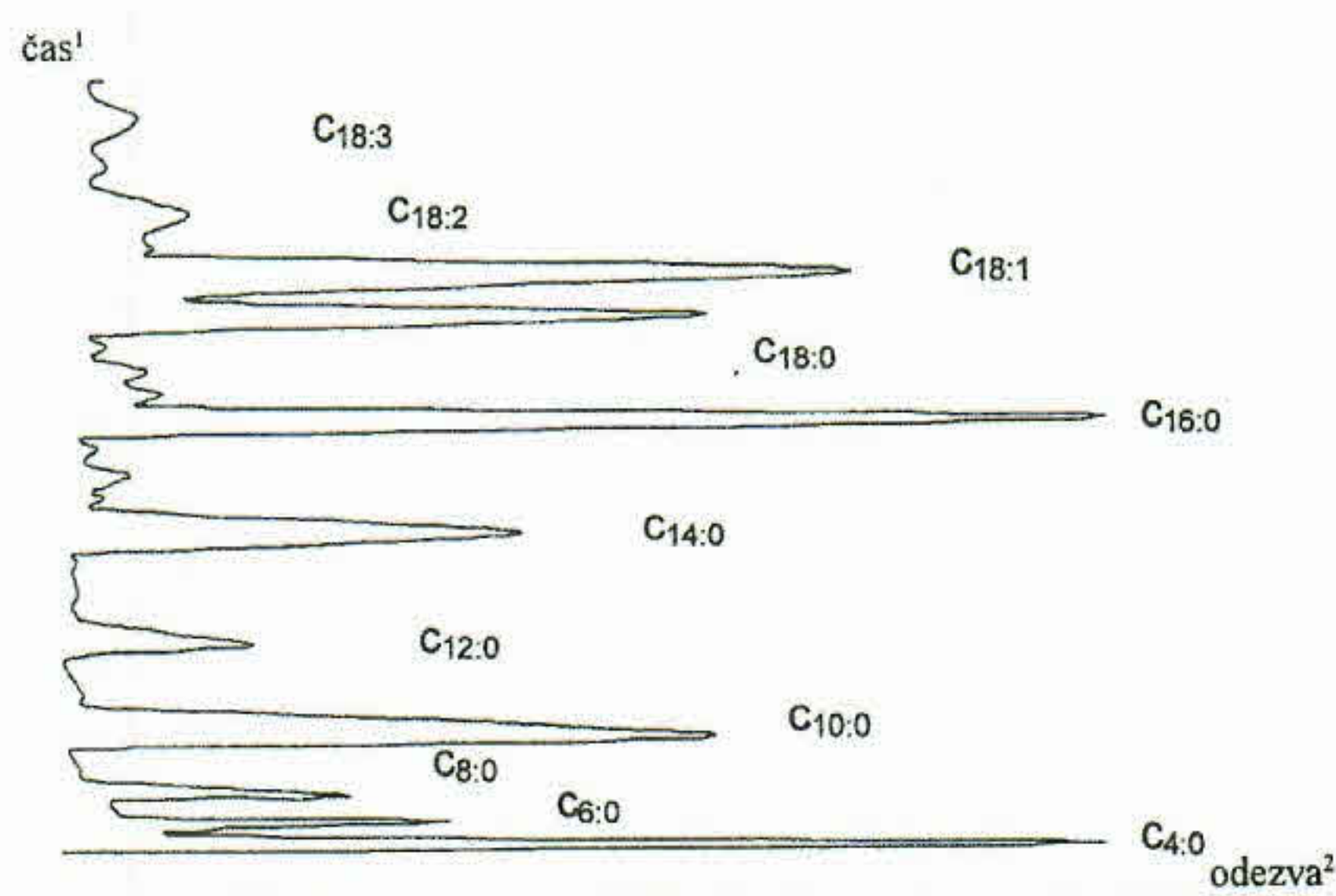
Celková koncentrace VMK je do 48 h od zahájení pokusu prakticky u všech vzorků shodná. Podstatné rozdíly byly sledovány v zastoupení jednotlivých mastných kyselin (MK). U kontrolního vzorku mléka (č. 1 a 4) se v obou teplotních variantách uvolňuje především kyselina palmitová $C_{16:0}$, u varianty s nižší teplotou dále kyselina laurová $C_{12:0}$, zatímco u vyšší teplotní varianty je již první den uvolňována kyselina myristová $C_{14:0}$ (tab. 2). Uvolňování mastných kyselin s dlouhým řetězcem (C_{18}) probíhá pouze ve stopovém množství, výrazněji u zaočkovovaných vzorků a vyšších teplotních variant (tab. 2).

U kontrolních i zaočkovovaných vzorků dochází ke kolísání koncentrací jednotlivých mastných kyselin, a to především v poklesu zastoupení kyseliny laurové $C_{12:0}$ po počátečním vysokém zastoupení s výjimkou vzorků č. 5 a 6, kde je koncentrace uvolněné kyseliny laurové $C_{12:0}$ relativně nejvyšší. Právě u těchto vzorků lze od počátku sledovat vysoké zastoupení kyseliny myristové $C_{14:0}$, které je u vzorků s rychlejším a razantnějším uvolňováním kyseliny laurové $C_{12:0}$ nižší (tab. 2).

Mastné kyseliny s krátkým řetězcem (kyselina kapronová $C_{6:0}$, kaprylová $C_{8:0}$ a kaprinová $C_{10:0}$) jsou uvolňovány ve velmi malém množství, byly identifikovány pouze



Obr. 2. Chromatogram volných mastných kyselin (vzorek č. 5, lipolýza 72 h) – Chromatogram of free fatty acids (sample No. 5, 72 h-lipolysis)



Obr. 3. Chromatogram mastných kyselin mléčného tuku (vzorek č. 5, lipolýza 144 h) – Chromatogram of fatty acids of milk fat (sample No. 5, 144 h-lipolysis)

Tab. 2. Relativní podíl (%) jednotlivých detekovaných VMK v okamžiku měření – Relative share (%) of individual FFA at the time of analysis

Čas [h] ¹	MK s krátkým řetězcem ²			MK se středním řetězcem ³			MK s dlouhým řetězcem ⁴		
	C _{6:0}	C _{8:0}	C _{10:0}	C _{12:0}	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2:3}
Kontrolní vzorek č. 1⁵									
24	–	–	–	47,6	stopy	52,3	–	–	–
48	–	–	–	22,4	23,1	54,4	–	–	–
72	–	–	–	15,4	29,6	54,4	–	–	–
96	–	–	–	10,3	32,5	46,2	1,7	9,4	stopy
120	stopy ¹¹	stopy	stopy	11,9	28,6	38	7,1	14,3	stopy
144	stopy	stopy	stopy	7,4	29,5	44,2	3,2	15,8	stopy
168	stopy	stopy	stopy	23,3	33,3	33,3	stopy	10	–
Vzorek č. 2⁶									
24	–	–	–	62,5	stopy	37,5	–	–	–
48	–	–	–	45,5	0,9	53,6	–	–	–
72	–	–	–	1,0	15,8	57,9	10,5	15,8	–
96	–	–	–	10,1	32,4	41,6	5,5	9,8	stopy
120	–	–	–	stopy	28,1	50,0	9,3	12,5	stopy
144	–	–	–	10,4	31,2	41,6	4,1	12,5	stopy
168	–	–	–	8,6	28,9	43,1	3,4	15,5	stopy
Vzorek č. 3⁷									
24	–	–	–	38,7	12,9	38,7	stopy	9,7	–
48	–	–	–	15,5	25,4	41,5	3,4	14,1	stopy
72	–	–	–	stopy	37,8	43,2	5,4	13,5	stopy
96	–	–	–	13,3	33,6	38,9	3,5	10,6	stopy
120	–	–	–	9,3	29,9	41,1	3,7	15,8	stopy
144	–	–	–	10,7	14,2	32,1	3,6	39,3	stopy
168	–	–	–	8,6	15,9	33,2	33,2	18,4	stopy
Kontrolní vzorek č. 4⁸									
24	–	–	–	18,2	31,8	50,0	stopy	stopy	–
48	–	–	–	62,1	4,5	33,3	stopy	stopy	–
72	–	–	–	11,0	38,0	37,0	3,0	11,0	stopy
96	–	–	–	9,8	37,5	39,2	2,8	10,7	stopy
120	–	–	–	9,3	29,9	41,1	3,7	15,8	stopy
144	–	–	–	14,4	30,1	38,5	3,6	13,3	stopy
168	–	–	–	6,2	30,9	39,2	3,5	20,2	stopy
Vzorek č. 5⁹									
24	–	–	–	6,8	37,9	44,8	1,7	8,6	–
48	–	–	–	7,5	32,0	43,3	1,9	16,6	stopy
72	–	–	–	9,0	38,0	39,9	3,0	10,0	stopy
96	–	–	–	8,8	37,3	39,2	2,9	11,8	stopy
120	–	–	–	11,5	30,2	39,5	3,8	14,8	stopy
144	–	–	–	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	stopy
Vzorek č. 6¹⁰									
24	stopy	stopy	stopy	12,7	32,6	38,3	4,7	11,6	–
48	stopy	stopy	stopy	6,5	28,3	43,5	6,5	15,2	stopy
72	–	–	–	5,2	32,0	44,3	4,1	14,4	stopy
96	–	–	–	10,6	31,9	38,3	4,3	14,9	stopy
120	–	–	–	9,9	29,2	39,6	4,2	15,1	1,8
144	–	–	–	15,8	28,7	38,1	3,6	11,5	0,7

¹time [h]; ²short-chain fatty acids; ³medium-chain fatty acids; ⁴long-chain fatty acids; ⁵control sample No. 1; ⁶sample No. 2; ⁷sample No. 3; ⁸control sample No. 4; ⁹sample No. 5; ¹⁰sample No. 6; ¹¹traces

Tab. 3. Složení mléčného tuku po ukončení pokusu (zastoupení MK v %) – Composition of milk fat (MK ratios in %) – post-experimental period

Kyselina ¹	1	2	3	4	5	6
Kapronová ² C _{6:0}	2,70	2,63	2,60	2,57	2,44	2,40
Kaprylová ³ C _{8:0}	3,17	3,14	3,00	3,14	3,08	2,60
Kaprinová ⁴ C _{10:0}	3,61	3,29	3,30	3,51	3,45	3,44
Laurová ⁵ C _{12:0}	4,67	4,38	4,30	4,60	4,52	4,39
Myristová ⁶ C _{14:0}	13,45	12,62	12,45	10,16	10,10	10,07
Tetradecenová ⁷ C _{14:1}	2,15	2,10	2,10	2,14	2,05	2,00
Pentadecylová ⁸ C _{15:0}	0,08	0,07	0,05	0,06	0,04	0,02
Palmitová ⁹ C _{16:0}	27,05	27,09	26,89	24,02	23,91	23,86
Hexadecenová ¹⁰ C _{16:1}	0,40	0,35	0,32	0,39	0,31	0,30
Stearová ¹¹ C _{18:0}	13,25	12,17	12,15	13,15	11,17	10,40
Olejová ¹² C _{18:1}	27,25	34,34	30,30	33,56	30,55	29,46
Linolová ¹³ C _{18:2}	2,18	1,06	1,70	2,00	1,98	1,56
Linolenová ¹⁴ C _{18:3}	0,77	0,76	0,70	0,70	0,75	0,70

¹acid; ²caproic acid; ³caprylic acid; ⁴capric acid; ⁵lauric acid; ⁶myristic acid; ⁷tetradecenic acid; ⁸pentadecylic acid; ⁹palmitic acid; ¹⁰hexadecenic acid; ¹¹stearic acid; ¹²oleic acid; ¹³linoleic acid; ¹⁴linolenic acid

u kontrolního vzorku č. 1 v pozdějším stadiu lipolýzy a u vzorku č. 6 (tab. 2). Mastné kyseliny s nižšími řetězci jsme v průběhu pokusu nedetekovali. Zřejmě by se uvolňovaly v pozdějším stadiu lipolýzy, což by vysvětlovalo technologické problémy při výrobě např. sýrů, kdy způsobují zhoršení chuťové a aromatické kvality mléka (např. kyselina máselná apod.).

Spektrum uvolněných mastných kyselin je odrazem zastoupení majoritních kyselin mléčného tuku (kyselina laurová C_{12:0}, myristová C_{14:0}, palmitová C_{16:0}, stearová C_{18:0} a olejová C_{18:1}). Kromě uvolňování těchto majoritních kyselin lze sledovat i uvolňování některých kyselin minoritních, hlavně kyseliny tetradecenové C_{14:1} a hexadecenové C_{16:1}, ovšem pouze ve zcela stopových množstvích. Dominantní zastoupení má ve všech případech v průběhu celého pokusu kyselina palmitová, které se z mléčného tuku uvolnilo nejvíce (tab. 2).

Obdobný trend jako při výskytu VMK lze pozorovat při srovnání zastoupení jednotlivých MK v mléčném tuku po ukončení lipolýzy (tab. 3). Největší rozdíly jsou právě u majoritních MK.

Kolísání v množství uvolněných mastných kyselin, zvláště u kyselin s krátkým a středním řetězcem, může být způsobeno dalšími chemickými reakcemi těchto kyselin. Tak byla např. zaznamenána produkce methylketonů z mastných kyselin při působení pankreatické lipasy (PANNEL, OLSON 1991a, b).

Závislost mezi hodnotou pH a koncentrací VMK je zásadním způsobem ovlivněna disociační konstantou mastné kyseliny uvolněné z tuku. V případech, kdy ve složení uvolněných mastných kyselin převládají kyseliny s delším řetězcem, bude pokles pH nižší než při uvolnění mastných kyselin s kratším řetězcem, které je provázáno vyšším poklesem pH do kyselé oblasti. V našem pokusu dochází

k prudkému poklesu pH až po 168 h (obr. 4), což by rovněž odpovídalo skutečnosti, že jsme nezachytili zvýšenou koncentraci VMK s krátkým řetězcem. VYLETĚLOVÁ *et al.* (2000b) zjistili, že vztah mezi hodnotou pH a obsahem VMK (měřený extrakčně-titrační metodou) je statisticky významný a korelační koeficient se u některých vzorků rovná $r = -0,93^{***}$ ($P < 0,001$).

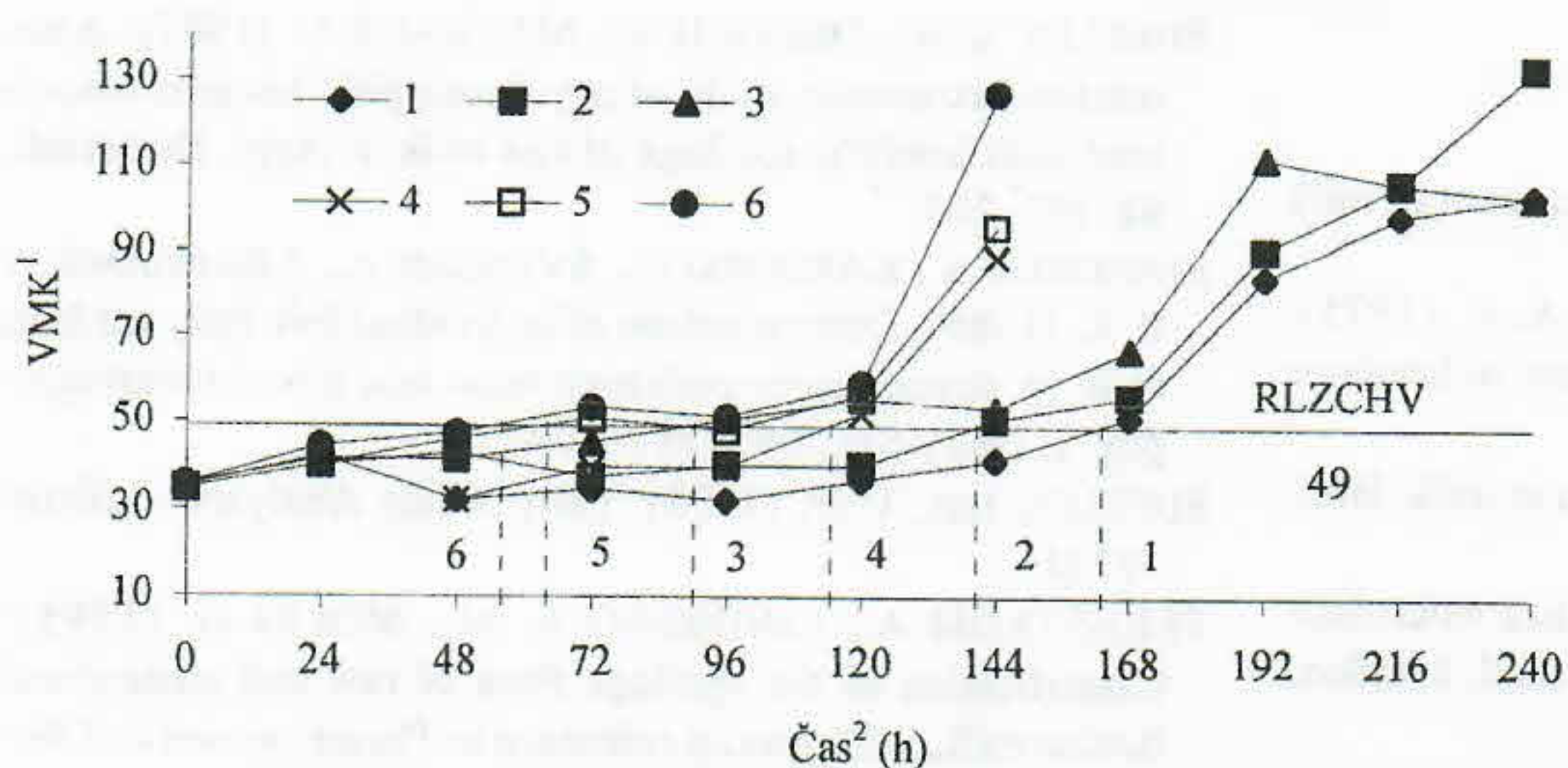
Obsah VMK a počátek technologických problémů

Extrakčně-titrační metodou pro stanovení obsahu VMK (mmol/kg tuku) byly zjištěny systematicky zvýšené výsledky (např. pro syrové mléko 32 místo 13,0 mmol/kg).

Tab. 4. Změna pH v průběhu lipolýzy v pasterovaném mléce podle stupně kontaminace *Ps. fluorescens* a způsobu uložení – pH variations characterizing lipolysis in pasteurized milk as related to *Ps. fluorescens* contamination and storage conditions

Čas [h] ¹	1	2	3	4	5	6
0	6,82	6,76	6,75	6,82	6,76	6,75
24	6,83	6,82	6,81	6,83	6,71	6,81
48	6,73	6,74	6,73	6,73	6,72	6,72
72	6,72	6,74	6,73	6,72	6,72	6,7
96	6,72	6,73	6,7	6,65	6,69	6,6
120	6,71	6,71	6,69	6,45	5,68	6,55
144	6,64	6,65	6,64	6,3	5,66	6,2
168	6,55	6,63	6,62			
192	6,1	6,58	6,1			
216	5,58	6,16	5,58			
240	5,01	5,55	6,16			

¹time [h]



RLZCHV – hranice rizika lipolytických změn chuťových vlastností mléka (49 mmol/kg tuku; podle KRATOCHVÍL 1992) – risk level characterizing lipolytic changes of taste characteristics (49 mmol/kg fat; according to KRATOCHVÍL 1992)

¹free fatty acids; ²time (hours)

Obr. 4. Průběh uvolňování mastných kyselin pro jednotlivé vzorky bazénového mléka v čase a při různé teplotě – Dynamics of fatty acid liberation in individual bulk milk samples as related to time and temperature

KRATOCHVÍL (1992) uvádí, že obsah 20 mmol VMK na kg mléčného tuku signalizuje počátek chuťové degradace mléka, zejména přítomností mastných kyselin C_{12} – C_{14} , což po přepočtu na extrakčně-titrační metodu představuje obsah 49 mmol VMK/kg. Výrazný zlom nastává u vyšší teploty po 144 h, zatímco u vzorků uchovávaných při nižší teplotě až po 192 h (tab. 5). Na obr. 4 je vyznačena hranice rizika lipolytické změny chuťových vlastností mléka (RLZCHV) pro jednotlivé vzorky a teploty při dosažení obsahu 49 mmol VMK/kg (resp. 20 mmol/kg) v odpovídajícím čase. Pomocí aproximace jsme stanovili čas 56 a 64 h, při kterém pokusné vzorky č. 5 a 6 s vyšší úchovnou teplotou překročily hranici RLZCHV (tab. 6, obr. 4). Naopak pokusné vzorky uchovávané při teplotě, která odpovídá

požadované skladovací teplotě v praxi (uchování syrového mléka, transport, uchování pasterovaného mléka) dosahují za daných podmínek rizikovou hranici až po 90 a 140,5 h (asi o 1–4 dny později). Výsledky ukazují na dominantní úlohu skladovací teploty v celém řetězci výroby a zpracování mléka jako suroviny nebo mezisuroviny, zatímco rozdíly v kontaminaci 10^5 a 10^6 měly až druhořadý význam (tab. 5). Pro mlékárenskou praxi, zvláště pro technologické provozy při výrobě náročnějšího mléčného produktu to znamená zpracování syrového a následně pasterovaného mléka v co nejkratším možném čase. VYLETĚLOVÁ *et al.* (2000b) uvádí nárůst VMK o 7 až 11 mmol na kg tuku každých 24 hodin za daných podmínek teploty a mikrobiální kontaminace.

Tab. 5. Časová dynamika vzrůstu obsahu volných mastných kyselin (VMK; mmol/kg tuku) v pasterovaném mléce podle stupně kontaminace *Ps. fluorescens* a způsobu uložení – Dynamics of free fatty acid increase (VMK, mmol/kg fat) in pasteurized milk as related to *Ps. fluorescens* contamination and storage conditions

Čas [h] ¹	1	2	3	4	5	6
0	35,12	34,674	35,552	35,107	34,674	35,552
24	42,054	40,003	41,373	42,055	40,003	44,328
48	32,16	42,676	41,373	32,16	45,954	47,283
72	34,633	37,342	45,385	39,581	50,671	53,193
96	32,16	40,009	50,375	39,736	48,004	51,238
120	36,75	40,009	55,319	51,95	56,456	59,103
144	41,5	50,678	53,193	89,057	96,007	127,073
168	51,363	56,013	67,193			
192	84,109	90,687	112,297			
216	98,95	106,691	106,387			
240	103,899	133,36	103,432			

¹time [h]

Tab. 6. Dosažení hranice rizika lipolytických změn chuťových vlastností (RLZCHV) pro jednotlivé vzorky mléka v čase určeném pomocí aproximace (podle obr. 4) – Time intervals specifying attainment of risk levels characterizing changes of taste characteristics (RLZCHV) in individual milk samples (time intervals were calculated by approximation) according to Fig 4

Číslo vzorku ¹	1	2	3	4	5	6
Překročení hranice 49 mmol/kg (h) ²	163	140,5	90	114,5	64	56

¹sample No.; ²exceeding the risk level 49 mmol/kg (h)

Literatura

- BAER J. R. (1991): Alteration of the fatty acid content of milk fat. *J. Food Protect.*, **54**: 383–386.
- DEETH H. C., FITZ-GERALD C. H., WOOD A. F. (1975): A convenient method for determining the extent of lipolysis in milk. *J. Dairy Technol.*: 109–111.
- DRIESEN F. M. (1989): In heat-induced changes in milk. *Bull.* 238. Int. D. Feder, Brussels.
- FOX P. E. (1993): *Cheese: Chemistry Physic and Microbiology. General Aspects. Vol. 1.* Chapman and Hall, London, UK.
- GLASS R. L. (1971): Alcoholysis saponification and the preparation of fatty acid methylesters. *Lipids*, **6**: 919–925.
- KADLEC I., PETERKOVÁ L. (1996): Metody zkoušení syrového kravského mléka. Doporučené metodické postupy zkoušení jakosti nakupovaného mléka a činnosti centrálních laboratoří. Praha, ÚVO Prardubice.
- KRÁL J., KRATOCHVÍL L. (1976): Rychlá metoda izolace mléčného tuku pro stanovení mastných kyselin plynovou chromatografií. *Mlék. Listy*, **2**: 6.
- KRATOCHVÍL L. (1992): Rozklad mléčného tuku v zemědělské výrobě. *Náš Chov*, č. 1: 22–23.
- KUZDZAL-SAVOIE S. (1980): Determination of free acids in milk and milk products. In: MOORE J. H. (Ed.): *Flavour impairment of milk and milk products due to lipolysis*. Int. Dairy Fed. Bull. Doc.: 118–153.
- MUIR D. D., PHILLIPS J. D., DALGLEISH D. G. (1979): The lipolytic and proteolytic activity of bacteria isolated from blended raw milk. *J. Dairy Technol.*, **32**: 19–23.
- PANNEL L. K., OLSON N. F. (1991a): Methyl ketone production in milk-fat-coated microcapsules. 1. Variation of lipase and spore concentrations. *J. Dairy Sci.*, **74**: 2048–2053.
- PANNEL L. K., OLSON N. F. (1991b): Methyl ketone production in milk-fat-coated microcapsules. 2. Methyl ketones from controlled concentrations of free fatty acids. *J. Dairy Sci.*, **74**: 2054–2059.
- SHELLEY A. W., DEETH H. C., MACRAE I. C. (1987): A numerical taxonomic study of psychrotrophic bacteria associated with lipolytic spoilage of raw milk. *J. Appl. Bacteriol.*, **62**: 197–207.
- SPANGELO A., KARIJORD Q., SVENSEN A., ABRAHAMSEN R. K. (1986): Determination of individual free fatty acids in milk by strong anion-exchange resin and gas chromatography. *J. Dairy Sci.*, **69**: 1787–1792.
- SUPELCO Inc., USA (1975): *Fatty Acids Analysis. Bulletin* 727 H.
- TERNSTRÖM A., LINDBERG A. M., MOLIN G. (1993): Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. *J. Appl. Bacteriol.*, **75**: 25–34.
- VYLETĚLOVÁ M., HANUŠ O., BENDA P., KOPUNECZ P. (1998): Psychrotrofní a celková mikrobiální kontaminace syrového kravského mléka. *Veterinářství*, **9**: 373–374.
- VYLETĚLOVÁ M., HANUŠ O., URBANOVÁ E. (1999a): Výskyt a identifikace proteolytických a lipolytických psychrotrofních bakterií v bazénových vzorcích kravského mléka. *Veterinářství*, **11**: 480–482.
- VYLETĚLOVÁ M., BENDA P., HANUŠ O., KOPUNECZ P. (1999b): Stanovení celkového počtu psychrotrofních bakterií v bazénových vzorcích mléka a jejich vztah k celkovému počtu mikroorganismů. *Czech J. Food Sci.*, **17**: 216–222.
- VYLETĚLOVÁ M., HANUŠ O., URBANOVÁ E., KOPUNECZ P. (2000a): Výskyt a identifikace proteolytických a lipolytických psychrotrofních bakterií v bazénových vzorcích mléka v podmínkách technologií prvovýrobního uskladnění. *Cz. J. Animal. Sci.*, **45**: 373–384.
- VYLETĚLOVÁ M., HANUŠ O. (2000b): Vliv kontaminace *Pseudomonas fluorescens* na hlavní složky a technologické vlastnosti pasterizovaného mléka během skladování. *Czech J. Food Sci.*, **18**: v tisku.
- ZADRAŽIL K., ŠMERDA J., BÍLEK J., BAŠE J. (1976): Složení mastných kyselin mléčného tuku dojníc plemen jersey a montafon. *Živoč. Vyr.*, **21**: 205–212.

Došlo 14. 3. 2000

Přijato k publikování 29. 5. 2000

Kontaktní adresa

RNDr. MARCELA VYLETĚLOVÁ, Výzkumný ústav pro chov skotu, s. r. o., Rapotín, 788 13 Vikýřovice, Česká republika, tel.: + 420 649 21 41 01, fax: + 420 649 21 57 02, e-mail: vuchs_rapotin@ova.pvtnet.cz