



Certifikovaná metodika č. QK1710156-CM1

ISBN 978-80-904348-2-0

Metodika stanovení Gram-negativních aerobních bakterií v syrovém mléce

Autoři:

Irena Němečková, Marcela Klimešová, Ludmila Nejeschlebová, Jana Smolová, Šárka Havlíková, Petr Roubal

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. QK1710156 s názvem „Nové přístupy a metody analýzy pro zajištění kvality, bezpečnosti a zdravotní nezávadnosti sýrů, optimalizace jejich výroby a zefektivnění procesů hygieny a sanitace při současném snížení zátěže životního prostředí odpadními vodami“ v programu ZEMĚ, který je řešen s finanční podporou Národní agentury pro zemědělský výzkum Ministerstva zemědělství České republiky.

Cíl metodiky

Cílem metodiky je zavést a využívat nový základní parametr pro hodnocení kvality syrového mléka. Jedná se o Gram-negativní aerobní bakterie, jakožto producenty proteolytických a lipolytických enzymů, které patří mezi nejčastější příčiny vzniku technologických problémů a senzorických vad mléčných výrobků.

Vlastní popis metodiky

Úvod

Koncentrace prvovýroby a zpracování mléka a s tím spojené nároky na jeho stabilitu v posledních desetiletích vyústily ve zlepšení technologií pro udržení chladírenského řetězce. Tyto změny se promítly i do legislativních předpisů týkajících se syrového mléka (Nařízení 853/2004, ve znění pozdějších předpisů), které jeho teplotu během úchovy a přepravy limitují. Přijetí těchto opatření nejenže zabránilo nežádoucímu kyselému srážení syrového mléka, ale zejména zabránilo pomnožování většiny patogenních mikroorganismů kontaminujících syrové mléko a tím významně přispělo ke zlepšení jeho mikrobiologické bezpečnosti. Na druhou stranu se však začaly objevovat mikrobiologické problémy jiného typu, se kterými se mlékárenský průmysl dosud nevyrovnal.

Konkrétně se jedná o působení vysoce termostabilních proteolytických a lipolytických enzymů produkovaných psychrotrofními mikroorganismy schopnými růst za podmínek přepravy a skladování syrového mléka. Přestože jsou tyto mikroorganismy následnou pasterací mléka účinně usmrceny, jejich enzymy určitou měrou procházejí všemi v mlékárenství používanými technologiemi, a mohou tak negativně ovlivňovat průběh výrobního procesu i kvalitu finálních mléčných výrobků (Sørhung a Stepaniak, 1997).

Mezi nejvýznamnější problémy způsobované těmito enzymy patří zhoršení termostability mléka a zvýšená tvorba usazenin v tepelných výměnících (Gaucher a kol. 2008), gelovatění, hořknutí, vznik žluklé chuti a dalších pachutí v pasterovaných (McKellar, 1981) a UHT záhřevem ošetřených mléčných výrobcích (Valero a kol., 2001, Zhang a kol., 2018, Alves a kol., 2016), zhoršené funkční a senzorké vlastnosti sušených mléčných výrobků (Chen a kol., 2003), žluknutí smetan a másla (Santos a kol., 2003, Singhal a Kulkarni, 1999), zpomalené prokysávání a hořká, nečistá nebo ovocná pachutí fermentovaných mléčných výrobků (McPhee a Griffiths, 2003) a sýrů, stejně jako snížení výtěžnosti při jejich výrobě (Johnson, 2001). Z uvedeného vyplývá, že se tyto problémy dotýkají prakticky všech typů mléčných výrobků. Nicméně podle našich zkušeností jsou v podmínkách ČR tyto problémy nejpálčivější právě pro výrobce sýrů, neboť nestandardní kvalita vstupní suroviny vede k nestandardnímu průběhu výroby těchto technologicky náročných produktů. Následující odstavce stručně shrnují cestu, kterou jsme se dostali – v rámci našeho výzkumu a ve snaze pomoci mlékárenské praxi s řízením uvedeného rizika – až k definici nového mikrobiologického kritéria pro syrové mléko – Gram-negativní aerobní bakterie.

Přestože termostabilní proteolytické a lipolytické enzymy v mléce představují významné riziko technologických problémů a kažení finálních výrobků, jejich stanovení, popř. stanovení projevů jejich aktivity v mléce je v současné době pro mlékárenskou praxi nedostupné. Metody stanovení těchto enzymů či projevů jejich aktivity sice existují, avšak fungují spolehlivě pouze na modelově připravených vzorcích s vyloučenou přirozenou variabilitou suroviny a s vysokou denzitou enzymy-produkujících mikroorganismů. Hlavní příčiny nevhodnosti těchto metod pro mlékárenskou praxi jsou zejména:

- vysoké nároky na přístrojové vybavení a laboratorní personál,
- relativně nízká koncentrace enzymů v mléce (které však v mléce a mléčných výrobcích mohou působit po relativně dlouhou dobu, a tak detekovatelné změny způsobit),
- variabilita stanovovaných enzymů (existuje více druhů rizikových mikroorganismů, z nichž každý může tvořit více rizikových enzymů – navíc výskyt těchto mikroorganismů v syrovém mléce je variabilní),
- přirozená variabilita složení syrového mléka (kolísání obsahu bílkovin a tuku je vyšší než jejich enzymaticky způsobené změny).

Jestliže jsou metody pro stanovení termostabilních proteolytických a lipolytických enzymů jako takových v syrovém mléce nedostupné, nabízí se stanovení jejich producentů. K dispozici jsou jednoduché kultivační metody pro stanovení proteolytických, lipolytických či psychrotrofních mikroorganismů. Významnou nevýhodou těchto metod je, že neumožňují rozlišit mezi skutečně hledanými psychrotrofními producenty termostabilních enzymů a mikroorganismy ze širěji definované skupiny daných vlastností. Patrné to je zejména na skupině psychrotrofních mikroorganismů. Nejen naše výzkumy (data nepublikována), ale např. i práce Munsch-Alatossavy a Alatossavy (2006) naznačují, že většina mikroorganismů (88 % izolátů) vyskytujících se v syrovém mléce má schopnost růstu za chladírenských teplot. Pravděpodobným důvodem toho je adaptace kontaminujících mikroorganismů na nízké teploty v podmínkách prvovýroby mléka.

Podrobnější vzhled na druhové zastoupení psychrotrofních mikroorganismů v syrovém mléce a na jejich rizikové enzymové aktivity přináší např. práce Vithanage a kol. (2016), Ribeira jr. a kol. (2018) či obsáhlá studie (2906 izolátů) von Neubecka a kol. (2015). Jako nejrizikovější se jeví rody *Pseudomonas* (kmeny proteolytické nebo proteolytické a lipolytické zároveň) a *Acinetobacter* (kmeny lipolytické).

Pro stanovení bakterií rodu *Pseudomonas* existuje několik kultivačních metod, včetně normovaného postupu podle ČSN P ISO/TS 11059 (2009). Za podmínek metody však rostou i další mikroorganismy (rod *Acinetobacter* a další Gram-negativní aerobní bakterie, někteří zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*, rodu *Bacillus*, kvasinek a jiných mikroorganismů). Pro jejich odlišení od pseudomonád je nutné provést confirmaci vykultivovaných kolonií, aby nebyly získány falešně pozitivní výsledky. Obnáší to však navazující kultivační kroky spojené s pomnožováním rizikových mikroorganismů, což je zejména pro provozní laboratoře mlékáren nevhodné.

A z opačného úhlu pohledu: Existují rovněž kultivační metody pro stanovení bakterií rodu *Acinetobacter*. Za podmínek metody však na nich rostou i další mikroorganismy syrového mléka, zejména rod *Pseudomonas* a další Gram-negativní aerobní bakterie, někteří zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*, rodu *Bacillus*, kvasinek a jiných mikroorganismů, tedy spektrum mikroorganismů rostoucích za podmínek metody je srovnatelné jako na půdách pro pseudomonády.

Proto jsme vybrané metody pro pseudomonády a acinetobaktery porovnali. Konkrétně se jednalo tyto metody:

- podle ČSN P ISO/TS 11059 (2009) – *Pseudomonas* selective agar base (Merck) s penicilinem G (100 000 IU/l) a pimarinem (0,01 g/l) (MILCOM a.s., závod Tábor), kultivace při 25 °C/48 h,
- podle ISO 13720 (2000) – *Pseudomonas* selective agar base (Merck) s glycerolem (10 ml/l) a CFC supplementem na finální koncentraci cetrimidu 10 mg/l, fucidinu 10 mg/l a cefalotinu 50 mg/l (Merck), kultivace při 25 °C/48 h,
- podle DIN/EN 12780 (2002) – *Pseudomonas* selective agar base (Merck) s glycerolem (10 ml/l) a CN supplementem, na finální koncentraci cetrimidu 200 mg/l a kyseliny nalidixové 15 mg/l, kultivace při 37 °C/48 h,
- GSP půda (MILCOM a.s., závod Tábor) s penicilinem G (100 000 IU/l) a pimarinem (0,01 g/l), kultivace při 25 °C/48 h,
- Sellers Differential HiVeg agar (HiMedia Laboratories), na povrch půdy rozetřít 0,2 ml 50% roztoku dextrosy, kultivace při 30 °C/24 h,
- Leeds *Acinetobacter* agar base (HiMedia Laboratories) bez přídavku supplementu, kultivace při 30 °C/24-48 h,
- Leeds *Acinetobacter* agar base s MDR (Multi-Drug-Resistance) supplementem, na finální koncentraci sodné soli ampicillinu 10 mg/l a ceftazidimu 10 mg/l (HiMedia Laboratories), kultivace při 30 °C/24-48 h.

Z porovnání vyšla nejlépe metoda s využitím Leeds *Acinetobacter* agaru bez přidavku supplementu, na které lze v jednom kultivačním kroku a bez nutnosti confirmace stanovit souhrnně Gram-negativní aerobní bakterie a odlišit je od ostatních výše jmenovaných mikroorganismů rostoucích za podmínek metody. V syrovém mléce mezi Gram-negativními aerobními bakteriemi jednoznačně převažují rody *Pseudomonas* a *Acinetobacter* (více než 89 % izolátů), a zbytek tvoří další rody z této skupiny mikroorganismů, např. *Chryseobacterium* či *Rhizobium*. Tato metodika popisuje, jak využít stanovení Gram-negativních aerobních bakterií při kontrole kvality syrového mléka.

Složení a postup přípravy živné půdy

Složení živné půdy Leeds *Acinetobacter* agar base je uvedeno v tab. I. Půdu je možné připravit navážení jednotlivých složek anebo z komerčně dostupné dehydratované směsi. Sypké složky se v množství 53,42 g rozptýlí v 1 litru demineralizované vody a kompletně rozpustí povařením. Hodnota pH se upraví na $7,0 \pm 0,2$ (při 25 °C). Půda se neautoklávuje. Po zchladnutí na 45-50 °C se půda rozlije po 12-15 ml na Petriho misky o průměru 90 mm.

Takto připravené plotny lze uchovat v chladničce při 4-8 °C po dobu 1 týdne. V tom případě je nutné před použitím povrch živné půdy předsušit v laminárním boxu nebo v termostatu nastaveném na 42-44 °C a odstranit tak zkondenzovanou vlhkost. Z hlediska zachování správné funkce acidobazického indikátoru je však šetrnější plotny spotřebovat přímo v den jejich přípravy a vyvarovat se tak tepelného namáhání při skladování a přesoušení.

Při nakládání s touto půdou je nutné postupovat co nejšetrněji, aby nedošlo k nežádoucím změnám acidobazického indikátoru. Zejména se jedná o tato opatření:

- Půdu rozvařovat pouze po dobu nezbytnou k úplnému rozpuštění všech složek.
- Při rozvařování půdy využít vodní lázeň.
- Dodržet správné pH připravované půdy.
- Půdu neautoklávuovat.
- Po vyndání ploten z chladničky či z termostatu je nechat přirozeně ohřát na laboratorní teplotu.

Tabulka I: Složení půdy Leeds *Acinetobacter* agar base

Složka	Množství
Kyselý hydrolyzát kaseinu	15 g
Sójový pepton	5 g
Chlorid sodný	5 g
Fruktóza	5 g
Sacharóza	5 g
Mannitol	5 g
Fenylalanin	1 g
Citrát železito-amonný	0,4 g
Fenolová červeň	0,02 g
Agar	12 g
Demineralizovaná voda	1 litr

Analytický postup a odečet výsledků

Na plotny s živnou půdou Leeds *Acinetobacter* agar base se vzorek očkuje roztěrem po 0,1 ml příslušných desetinasobných ředění vzorku. Pro aktuální stav v ČR lze doporučit inokulaci 1., 2. a 3. desetinasobného ředění syrového mléka.

Následně se plotny inkubují při 37 °C/24-48 h. Delší inkubace po dobu 48 h umožňuje vykultivovaným mikroorganismům intenzivněji projevit svou metabolickou aktivitu a tedy se hodí zejména v případech, kdy byly po 24 h získány dubiozní výsledky. Nicméně pokud je možné plotny po 24 h inkubace bez obtíží odečíst, jeví se prodloužení doby inkubace a opakovaný odečet druhý den jako zbytečný.

Jako Gram-negativní aerobní bakterie se počítají kolonie, které nemění barvu acidobazického indikátoru z růžové na žlutou, tedy kolonie, které nejsou bílé či žluté a zároveň nemají nažloutlou či žlutou zónu. Znamená to, že se počítají kolonie různých odstínů od bílé po růžovou a kolonie homogenně žlutě až oranžově pigmentované, které jsou všechny bez barevné zóny v okolním agaru.

Pigment-produkující mikroorganismy rostoucí za podmínek metody typicky náležejí k druhu *Chryseobacterium*, který se v syrovém mléce obvykle vyskytuje v nízké denzitě (odhadem 1 KTJ v 0,01 až >10 ml vzorku). Patří do skupiny Gram-negativních aerobních bakterií a typicky vykazuje silnou proteolytickou aktivitu, avšak obvykle není schopen růstu při chladírenských teplotách. Pro získání výsledků, které budou vhodným způsobem reflektovat kvalitu syrového mléka, tedy není interpretace těchto pigment-produkujících kolonií nikterak rozhodující.

Pro odečet výsledků se vybírají přednostně plotny, na kterých narostlo 15-150 kolonií. Výpočet denzity Gram-negativních aerobních bakterií probíhá standardními postupy. Pokud jsou z daného vzorku vykultivovány převážně kolonie tvořící žluté zóny, které zhoršují či znemožňují spolehlivé rozpoznání kolonií Gram-negativních aerobních bakterií, pro odečet se využije nejvyšší dostupné desítkové ředění, na kterém byly kolonie zachyceny. Tyto obtíže při vyhodnocení výsledků nemusejí, avšak – vzhledem k variabilitě mikroflóry syrového mléka – mohou nastat. Pokud se tak stane, indikuje to zhoršenou mikrobiologickou kvalitu syrového mléka z hlediska jiného parametru (koliformní bakterie, kvasinky, sporulující aerobní bakterie, aj.). Přitom je nutné vzít v úvahu, že vyhodnocení mikroorganismů jiných než Gram-negativní aerobní bakterie, které rostou za podmínek metody, nenahrazuje kvantitativní stanovení žádné jiné skupiny mikroorganismů.

Vyhodnocení výsledků této metody je srovnatelně náročné jako při použití jiných kultivačních metod na půdách s různými indikátory. Aby však byl popis metody kompletní, jsou výše popsány i speciální případy, které při analýze tak mikrobiologicky pestré matrice, jako je syrové mléko, mohou nastat. Interpretaci získaných výsledků se zabývá následující kapitola.

Interpretace získaných výsledků

Následující doporučení pro interpretaci získaných výsledků vycházejí z analýzy 134 cisternových vzorků syrového kravského mléka odebraných v ČR. Stanoveny v nich byly Gram-negativní aerobní bakterie podle této metodiky, psychrotrofní mikroorganismy podle ČSN ISO 6730 (2007) a celkový počet mikroorganismů (CPM) podle ČSN EN ISO 4833-1 (2014). Vyhodnoceny byly jak absolutní hodnoty těchto parametrů (KTJ/ml), tak procentuální zastoupení Gram-negativních aerobních bakterií vůči psychrotrofním mikroorganismům a CPM.

V testovaném souboru vzorků syrového mléka se denzita Gram-negativních aerobních bakterií pohybovala v rozpětí od <100 do $6,7 \times 10^5$ KTJ/ml, přičemž průměrná denzita byla $1,7 \times 10^3$ KTJ/ml. Gram-negativní aerobní bakterie tvořily v průměru 52 % z CPM, nicméně tato hodnota byla významně ovlivněna vzorky, ve kterých došlo k pomnožení Gram-negativních aerobních bakterií až na úroveň prakticky stejnou jako CPM. Gram-negativní aerobní bakterie tvořily nanejvýš 20 % z psychrotrofních mikroorganismů u 41 % vzorků a z CPM u 40 %

vzorků. Toto zjištění podporuje tvrzení, že stanovení psychrotrofních mikroorganismů v syrovém mléce dostatečně nereflexuje jeho mikrobiologickou kvalitu.

S využitím tohoto souboru dat byla navržena obecná kritéria pro Gram-negativní aerobní bakterie v syrovém mléce na 2×10^4 KTJ/ml a zároveň maximálně 20 % z CPM. Pokud jsou obě tato kritéria splněna, syrové mléko se jeví z pohledu rizik spojených s Gram-negativními aerobními bakteriemi jako kvalitní – viz tab. II. Tato kritéria mohou být dále zpřesněna dle potřeb konkrétních mlékárenských provozů na základě porovnání parametrů syrového mléka ve vztahu s jeho zpracovatelností a kvalitou finálních produktů.

Získané výsledky lze rovněž interpretovat kvalitativně, např. s využitím tab. III. Podle tohoto postupu se určí desetinásobné ředění vzorku, pro které byly na plotně inokulované 0,1 ml daného ředění zachyceny řádově jednotky kolonií. Poté se posoudí, zda mezi mikroorganismy zachycenými na všech odečitatelných ředěních vzorku převažují spíše Gram-negativní aerobní bakterie, anebo jiné mikroorganismy rostoucí za podmínek metody.

Tabulka II: Kvantitativní interpretace výsledků stanovení Gram-negativních aerobních bakterií v syrovém mléce

Výsledek stanovení Gram-negativních aerobních bakterií	≤ 20 % z CPM	> 20 % z CPM
$\leq 2 \times 10^4$ KTJ/ml	Přiměřená mikrobiologická kvalita	Zhoršená mikrobiologická kvalita
$> 2 \times 10^4$ KTJ/ml	Zhoršená mikrobiologická kvalita	Zvýšené riziko technologických problémů či vad finálních výrobků

Tabulka III: Kvalitativní interpretace výsledků stanovení Gram-negativních aerobních bakterií v syrovém mléce

		1	2	3
		Jednotky kolonií na 1. ředění	Jednotky kolonií na 2. ředění	Jednotky a více kolonií na 3. ředění
A	Kolonie barví agar převážně do žluta	Nejvyšší mikrobiologická kvalita	Standardní mikrobiologická kvalita	Jiný mikrobiologický problém
B	Kolonie barvíci agar do žluta a kolonie barvíci agar do růžova zastoupeny srovnatelně	Vynikající mikrobiologická kvalita	Standardní mikrobiologická kvalita	Zhoršená mikrobiologická kvalita
C	Kolonie barví agar převážně do růžova	Velmi dobrá mikrobiologická kvalita	Standardní mikrobiologická kvalita	Zvýšené riziko technologických problémů či vad finálních výrobků

Srovnání novosti postupů

Leeds *Acinetobacter* agar je již známou živnou půdou, která se používá především v klinické praxi a v souvislosti s detekcí a stanovením bakterií rodu *Acinetobacter*, jak popisují např. Jawad a kol. (1994). Tato metodika popisuje nový způsob využití uvedené živné půdy.

Při analýze syrového mléka lze na ní totiž kvantitativně stanovit sumu Gram-negativních aerobních bakterií. V kontextu analýzy syrového mléka tato skupina zahrnuje především rody *Acinetobacter* a *Pseudomonas* a dále i minoritně zastoupené rody.

Jak bylo podrobně popsáno v Úvodu, tato metodika představuje nový nástroj k řízení rizika vzniku technologických problémů či senzorických vad mléčných výrobků způsobených proteolytickými a lipolytickými enzymy Gram-negativních aerobních bakterií. Vzhledem k závažnosti tohoto problému i dosavadní absenci jiných, ve výrobní praxi využitelných nástrojů, se jedná o metodiku nejen novou, ale i svým způsobem průlomovou.

Popis uplatnění metodiky

Tato metodika je určena pro laboratoře provádějící mikrobiologickou analýzu syrového mléka, především pro účely mlékárenského zpracování a zpeněžování syrového mléka. Jsou to zejména příjmové a provozní laboratoře mlékáren, centrální laboratoře (CL) a laboratoře pro rozbor mléka (LRM). Metodika může být využita rovněž v laboratořích dozorových orgánů a státní správy, poradenských a výzkumných organizací.

Metodika se zabývá problematikou, která se týká prakticky všech zpracovatelů mléka. Proto je podložena Smlouvou o využití výsledků uzavřenou s Českomoravským svazem mlékárenským, z.s. Metodika je k dispozici zdarma všem zájemcům o její využití.

Ekonomické aspekty

Zavedení této metodiky do standardně vybavené laboratoře klasické kultivační mikrobiologie obnáší náklady na pořízení živné půdy, které se pohybují okolo 1,5 tis. Kč za jedno balení obsahující 500 g dehydratované půdy. Toto množství půdy vystačí na analýzu minimálně 100 vzorků.

Přínosy metodiky spočívají ve snížení rizika vzniku technologických problémů a senzorických vad finálních mléčných výrobků díky efektivnějšímu řízení výběru a nakládání se syrovým mlékem, jakožto s hlavní vstupní surovinou. Znamená to snížení výrobních nákladů i ztrát v důsledku nutnosti přepracovat či zlikvidovat neshodné šarže produktů. Použití syrového mléka nevyhovující kvality totiž přináší zpomalené prokysávání (prodloužení doby výroby), zvýšenou tvorbu usazenin v tepelných výměnících (vyšší náklady na sanitaci těchto zařízení), snížení výtěžnosti při výrobě sýrů (vyšší náklady na surovinu) a řadu dalších problémů popsaných v Úvodu. Využití této metodiky u jednotlivého zpracovatele mléka může odhadem přinést úspory v řádu stovek tisíc korun ročně.

Seznam použité související literatury

- Alves, M.P., Salgado, R.L., Eller, M.R., Vidigal, P.M.P., de Carvalho, A.F. (2016): Characterization of a heat-resistant extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* 07A shows that low temperature treatments are more effective in deactivating its proteolytic activity. *Journal of Dairy Science*, 99/10: 7842-7851.
- ČSN EN ISO 4833-1 (2014): Mikrobiologie potravin a krmiv: Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů – Část 1: Technika přelivem a počítáním kolonií vykultivovaných při 30 °C.
- ČSN ISO 6730 (2007): Mléko: Stanovení počtu jednotek tvořících kolonie psychrotrofních mikroorganismů: Technika počítání kolonií vykultivovaných při 6,5 °C.
- ČSN P ISO/TS 11059 (2009): Mléko a mléčné výrobky: Metoda stanovení počtu bakterií rodu *Pseudomonas*.

- DIN/EN 12780 (2002): Water quality – Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* by membrane filtration.
- Gaucher, I., Mollé, D., Garnaire, V., Gaucheron, F. (2008): Effects of storage temperature on physico-chemical characteristics of semi-skimmed UHT milk. *Food Hydrocolloids*, 22: 130-143.
- 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.
- ISO/WD 13720 (2000): Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of *Pseudomonas* spp.
- Jawad A., Hawkey P.M., Heritage J., Snelling A.M. (1994): Description of Leeds *Acinetobacter* medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *J. Clin. Microbiol.*, 32/10, s. 2353-2358.
- Johnson, M.E. (2001): Cheese products. V knize: Marth, E.H., Steel, J.L.(Edit.): *Applied Dairy Microbiology*, 2. vydání, str. 345-384. Marcel Dekker, Inc., New York, USA. ISBN 0-8247-02536-X.
- McKellar R.C. (1981): Development of off-flavours in ultra-high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. *Journal of Dairy Science*, 64: 2138-2145.
- McPhee a Griffiths 2003.
- Munsch-Alatossava, P., Alatossava, T. (2006): Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. *Microbiology Research*, 161/4: 334-346.
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví hygienické předpisy pro potraviny živočišného původu, ve znění pozdějších předpisů.
- Ribeiro jr., J.C., de Oliveira, A.M., de G. Silva, F., Tamanini, R., de Oliveira, A.L.M., Beloti, V. (2018): The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *Journal of Dairy Science*, 101: 75-83.
- Santos, M.V., Ma, Z., Caplan, Z., Barbano, D.M. (2003): Sensory threshold of off-flavors caused by proteolysis and lipolysis in milk. *Journal of Dairy Science*, 86: 1601-1607.
- Singhal, R.S., Kulkarni, P.R. (1999): Milk and milk products: Microbiology of cream and butter. V knize: Robinson R.K. (Edit.): *Encyclopedia of Food Microbiology*, str. 1445-1455. Academic Press, London, UK. ISBN 978-0-12-227070-3.
- Sørhung, T., Stepaniak, L. (1997): Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 8/2: 35-41.
- Valero, E., Villamiel, M., Miralles, B., Sanz, J., Martínez-Castro, I. (2001): Changes in volatile components during storage of whole and skimmed UHT milk. *Food Chemistry*, 72: 51-58.
- Vithanage, N.R., Dissanayake, M., Bolge, G., Palombo, E.A., Yeager, T.R., Datta, N. (2016): Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. *International Dairy Journal*, 57: 80-90.
- Von Neubeck, M., Baur, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Kranz, B., Stressler, T., Fischer, L., Hinrichs, J., Scherer, S., Wenning, M. (2015): Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *International Journal of Food Microbiology*, 211: 57-65.
- Zhang, Ch., Bijl, E., Hettinga, K. (2018): Destabilization of UHT milk by protease AprX from *Pseudomonas fluorescens* and plasmin. *Food Chemistry*, 263: 127-134.

Seznam publikací, které předcházely metodice

- Němečková, I., Pechačová, M., Roubal, P. (2009): Problems with detection of proteolytic Micro-organisms and their undesirable activities in milk. Czech J. Food Sci., 27: S2-82 – S2-89.
- Chramostová, J., Hanuš, O., Klimešová, M., Němečková, I., Roubal, P., Kopecký, J., Jedelská, R., Nejeschlebová, L. (2016): Proteolysis in raw milk in the relation to microbiological indicators. Czech J. Food Sci., 34/4: 306 – 312.
- Němečková, I., Červenková, L., Pechačová, M., Roubal, P. (2009): Plotnové metody stanovení proteolytických mikroorganismů a jejich enzymů v mléce. Mlékařské listy – zpravodaj, 113/114: 14 – 18.
- Němečková, I., Pešek, E., Hanušová, J., Roubal, P. (2012): Kultivační metody stanovení bakterií rodu *Pseudomonas* v mléce. Mlékařské listy – zpravodaj, 131: I - V.
- Němečková, I., Chramostová, J., Mühlhansová, A., Jebavá, I., Purkrťová, S. (2013): Gramovo barvení a další jednoduché testy pro rozlišení mikroorganismů. Mlékařské listy - zpravodaj 141: XIII - XVIII.
- Chramostová, J., Rubina, N., Šedivcová, V., Dragoun, M., Němečková, I., Roubal, P. (2014): Vliv chladírenských teplot na růst a proteolytickou činnost mikroorganismů syrového mléka. Mlékařské listy - zpravodaj 146: X - XIII.
- Vyletělová-Klimešová, M., Hanuš, O., Němečková, I., Karpíšková, R., Kalhotka, L., Nejeschlebová, H., Kopecký, J., Nejeschlebová, L., Jedelská, R. (2014): Hodnocení statistických výsledků kvalitativních ukazatelů syrového kravského mléka. Mlékařské listy - zpravodaj 146: XX - XXIV.
- Chramostová, J., Vrzáková, Z., Němečková, I., Čurda, L. (2014): Termostabilita mléka a faktory, které ji ovlivňují. Mlékařské listy - zpravodaj 146: XIV - XVII.
- Chramostová, J., Havlíková, Š., Purkrťová, S., Němečková, I., Roubal, P. (2014): Potenciál mikroorganismů při kažení mléka a mlékárenských produktů. Mlékařské listy - zpravodaj 147: XVII - XX.
- Šviráková, E., Mühlhansová, A., Němečková, I., Junková, P., Purkrťová, S., Jelínková, M., Felsberg, J. (2015): Identifikace technologicky rizikových bakterií rodu *Acinetobacter*. Mlékařské listy - zpravodaj 150: XIV - XX.
- Chramostová, J., Mühlhansová, A., Binder, M., Strmiska, V., Čurda, L., Hanuš, O., Kopeckým, J., Klimešová, M., Dragounová, H., Seydlová, R., Němečková, I. (2016): Termostabilita syrového ovčího a kozího mléka. Mlékařské listy – zpravodaj, 157, 27/4: 22 – 26.
- Hanuš, O., Němečková, I., Chramostová, J., Klimešová, M., Roubal, P., Jedelská, R., Kopecký, J., Nejeschlebová, L., Vondrušková, E. (2016): Vybrané metodické pohledy na některé možnosti popisu rozvoje proteolýzy bílkovin mléka. Mlékařské listy – zpravodaj, 159, 27/6: 20-25.
- Šviráková, E., Mühlhansová, A., Purkrťová, S., Němečková, I., Jelínková, M., Felsberg, J. (2016): Identifikace potravinářských průmyslových izolátů rodu *Acinetobacter* pomocí metody PCR s originálně navrženými, rodově-specifickými primery. Mlékařské listy – zpravodaj, 159, 27/6: 30-35.
- Šviráková, E., Purkrťová, S., Němečková, I., Karpíšková, R., Jelínková, M., Felsberg, J. (2017): Metody identifikace a charakterizace potravinářských průmyslových izolátů *Pseudomonas* spp. Mlékařské listy – zpravodaj 161, 28/2: 13-20.
- Němečková, I., Chramostová, J., Klimešová, M., Nejeschlebová, L., Smolová, J., Havlíková, Š., Roubal, P. (2018): Kultivační metoda pro stanovení Gram-negativních aerobních bakterií v syrovém mléce. Mlékařské listy – zpravodaj, 169, 29/4: 8-12.

Jména oponentů a názvy jejich organizací

Uživatel metodiky dle Smlouvy o využití výsledků: Českomoravský svaz mlékárenský, z.s.

Oponent z oboru: Ing. Vladimír Čejna, Ph.D., Savencia Fromage & Dairy CZ, a.s.

Oponent z odborného orgánu státní správy: MVDr. Jiří Hlaváček, Státní veterinární správa ČR

Dedikace

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. QK1710156 s názvem „Nové přístupy a metody analýzy pro zajištění kvality, bezpečnosti a zdravotní nezávadnosti sýrů, optimalizace jejich výroby a zefektivnění procesů hygieny a sanitace při současném snížení zátěže životního prostředí odpadními vodami“.