

Józef Szlachta, Tomasz Podawca  
Instytut Inżynierii Rolniczej  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

## ZMIANA AKTYWNOŚCI WODY W MLEKU W ZALEŻNOŚCI OD LICZBY KOMÓREK SOMATYCZNYCH I OGÓLNEJ LICZBY DROBNOUSTROJÓW

### Streszczenie

Analizowano aktywność wody w mleku surowym w zależności od zawartości komórek somatycznych i ogólnej liczby mikroorganizmów. Wykazano, że zawartość komórek somatycznych w mleku powoduje zmianę aktywności wody, ale tylko w przedziale między 100 000 a 300 000. Ogólna liczba drobnoustrojów nie ma wpływu na aktywność wodną mleka.

**Słowa kluczowe:** mleko, aktywność wody, komórki somatyczne, drobnoustroje

### Wstęp

Zawartość wody w żywności decyduje o możliwości rozwoju mikroflory niebezpiecznej dla zdrowia człowieka. Jednakże większość parametrów decydujących o trwałości i przydatności żywności nie jest powiązana z całkowitą zawartością wody, ale jej aktywnością. W licznych eksperymentach wykazano, że część wody nie wymarza w procesie zamrażania, ponieważ nie jest ona dostępna dla sieci krystalicznej. I tak ilość niezamarzającej wody wynosi w kolagenie 20%, w skrobi kukurydzianej 26%, w celulozie 14%, w białku jaja kurzego 35,5%. A więc 14-35,5% wody może być powiązane ze składnikami żywności. Właściwości tej wody różnią się od właściwości wody czystej, w której występuje tylko oddziaływanie woda-woda, zaś do opisanego liczbowego tego stanu stosuje się pojęcie potencjału chemicznego [Lewicki 1999].

Zmiana potencjału chemicznego wynikająca ze zmiany stanu powiązania cząsteczek wody ze składnikami żywności wyrażana jest za pomocą mierzalnej wartości zwanej aktywnością wody. W ten sposób wyrażono stan termodynamiczny wody w żywności za pomocą aktywności wodnej, co jest równoznaczne z pojęciem względną wilgotność równowagowa, którą opisuje równanie:

$$a_w = \left( \frac{p}{p_n} \right)_{P,T},$$

gdzie:

$a_w$  - aktywność wody,

$p$  – prężność pary,

$P_n$  – ciśnienie otoczenie w stanie nasycenia,

$P$  – ciśnienie otoczenia,

$T$  – temperatura.

W świetle powyższego woda czysta ma aktywność równą 1, zaś pozbawiona wody ma aktywność wody równą 0. Wprowadzenie pojęcia aktywności wody umożliwiło powiązanie stanu termodynamicznego wody w produktach spożywczych z ich właściwościami, jakością i trwałością, ponadto znajomość tych powiązań stała się podstawą przewidywania wielu procesów, a także projektowania właściwości gotowych produktów [Lewicki 2003].

Dla poznania wskaźników charakteryzujących trwałości żywności, przydatnym jest rozpoznanie stosunków wodnych panujących w badanych substancjach lub poznanie zachowania się cząsteczek wody w miarę wzrostu stężenia substancji rozpuszczonej. Woda od roztworu wodnego różni się m.in. większą prężnością pary wodnej, wyższym punktem zamarzania i niższym punktem wrzenia. Właściwości te świadczą, że siły międzycząsteczkowe, wiążące cząstki wody, wzrastają w roztworze. Zjawisku temu towarzyszy tworzenie się powłok wodnych dookoła cząsteczki i jonów rozpuszczonych w wodzie, co nosi nazwę hydratacji.

Względna prężność pary wodnej została przez Raoult'a nazwana aktywnością wody i opisana następującym równaniem:

$$\frac{p}{p_o} = \frac{n_2}{n_1} + n_2 = a_w ,$$

gdzie:

$p$  i  $p_o$  - odpowiednio prężność par roztworu i czystego rozpuszczalnika w danej temperaturze,

$n_1$  i  $n_2$  - stężenie molowe substancji rozpuszczonej i rozpuszczalnika,

$a_w$  - aktywność wody.

Liczbowo aktywność wodna równa się równoważnej wilgotności względnej podzielonej przez 100, stąd też aktywność wody przyjmuje wartość od 1 dla czystej wody do 0 dla środowiska o nieskończenie małej zawartości wody.

Woda jako swoisty rozpuszczalnik w sposób istotny wpływa na przebieg procesów biologicznych, a szczególnie na rozwój i podział drobnoustrojów. Ogólnie pleśnie są bardziej przystosowane do rozwoju w warunkach ograniczonej dostępności do wody niż drożdże, a drożdże lepiej znoszą obniżenie aktywności wody niż bakterie. Praktycznie biorąc, aktywność drobnoustrojów jest całkowicie zahamowana przy aktywności wody poniżej 0,6.

Najbardziej niepożądane grupy drobnoustrojów występujących w przemyśle rolno-spożywczym tracą zdolności do prawidłowego funkcjonowania przy następującej aktywności wody:

- większość pleśni nie rośnie przy  $a_w < 0,7$ ,
- większość drożdży nie rośnie przy  $a_w < 0,8$ ,
- większość bakterii nie rośnie przy  $a_w < 0,9$ .

Bakterie chorobotwórcze, które mogą występować w żywności tracą możliwości rozwoju przy aktywności wody poniżej 0,95 i tak np.:

- Salmonella, Escherichia i Vibrio nie rosną przy  $a_w < 0,95$ ,
- produkcja toksyn wytwarzanych przez Clostridium botulinum jest zahamowana przy  $a_w < 0,97$ ,
- produkcja toksyn wytwarzanych przez Clostridium perfringens jest zahamowana przy  $a_w < 0,95$ ,
- toksykotwórcza bakteria Staphylococcus aureus w warunkach beztlenowych nie rozwija się przy  $a_w < 0,91$ , ale w warunkach tlenowych może rosnąć przy  $a_w > 0,86$ .

Pewne rodzaje drobnoustrojów są dobrze przystosowane do rozwoju w środowisku suchym. Bakterie halofilne rozwijają się przy aktywności wody pow. 0,75, a osmofilne drożdże mogą rosnąć przy  $a_w > 0,6$  [Burbianka i in. 1983].

Podsumowując wpływ aktywności wody na stabilność żywności można stwierdzić, że:

- odpowiednia aktywność wody warunkuje procesy życiowe drobnoustrojów i przebieg reakcji enzymatycznych,
- wpływ aktywności wody na reakcje chemiczne zależy od natury reagentów; obecność wody hamuje przebieg reakcji, w których substrat jest nierozpuszczalny w wodzie; z kolei reakcje, w których substrat jest rozpuszczalny w wodzie są przyspieszane w obecności wody, chociaż efekt rozcieńczenia może wystąpić przy wysokich aktywnościach wody,
- woda spełnia rolę smaru i pozwala na poruszanie się jednych jednostek względem drugich; zwiększenie aktywności wodnej w produkcie powoduje zmianę jego właściwości reologicznych z ciała kruchego na ciało wykazujące sprężystość, plastyczność i lepkość [Świta 1996].

Ocena przydatności mleka jako surowca rolno-spożywczego zależy przede wszystkim od stopnia zanieczyszczenia mikrobiologicznego. Ze względu na długą drogę, jaką odbywa mleko od producenta do konsumenta, jest ono narażone na wiele form zakażenia mikrobiologicznego. Dzieje się tak dlatego, iż mleko jest bardzo dobrym substratem do wzrostu dla wielu gatunków czy nawet grup drobnoustrojów (bakterie, drożdże, pleśnie). Skład mleka najbardziej odpowiada potrzebom rozwojowym heterotrofów, czyli bakteriom kwasu mlekowego oraz większości saprofitycznych drobnoustrojów (w tym bakterii gnilnych), do odżywiania których podstawową rolę odgrywają białka, tłuszcze i proste węglowodany. W mleku bytują drobnoustroje choro-

botwórcze, choć nie zawsze jest to dla nich pożywka intensywnie pobudzająca ich rozwój, ale bardzo często staje się ich nośnikiem [Pijanowski 1984].

Kolejnym parametrem decydującym o klasie przydatności mleka jest zawartość komórek somatycznych, pochodzących z gruczołu mlekowego całych lub zniszczonych komórek nabłonka pęcherzyków, przewodów i zatok mlecznych oraz składniki morfotyczne krwi i limfy, głównie krwinki białe, czyli leukocyty. Mleko jako surowiec musi spełniać wszelkie wymagania stawiane mu przed dopuszczeniem do dalszej obróbki technologicznej, określone w Rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi: „*W sprawie szczególnych warunków weterynaryjnych wymaganych przy pozyskiwaniu, przetwórstwie, składowaniu i transporcie mleka oraz przetworów mlecznych*”.

Najczęściej obok wirowania, homogenizacji i standaryzacji mleko poddawane jest zabiegom obróbki termicznej, które najskuteczniej niszczą i hamują rozwój mikroflory. Według PN liczba bakterii saprofitycznych w 1 ml mleka spożywczego nie może przekraczać 50 000 i z roku na rok zmniejsza się, aby w najbliższym czasie osiągnąć 30 000. Znacznie większe ograniczenia występują odnośnie bakterii z grupy Coli, które nie powinny w ogóle występować w 1 ml mleka. Gęstość mleka o zawartości tłuszczu 2% nie może być mniejsze niż 1,029, a mleka o zawartości tłuszczu 3,2% 1,028, kwasowość powinna zawierać się w granicach 6–8° S.H.; smak i zapach właściwy dla mleka, brak zanieczyszczeń mechanicznych i zafałszowań.

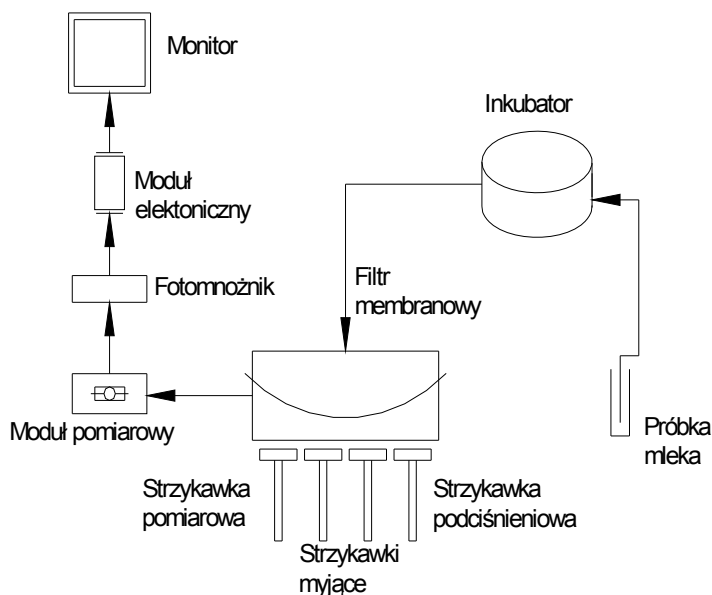
Nowe technologie uzdatniania mleka, do których niewątpliwie należy mikrofiltracja, pozwalają na osiągnięcie produktu końcowego o znacznie lepszych parametrach niż te wymagane przez PN. W przypadku mikrofiltracji nie stosuje się tak wysokich temperatur, jak ma to miejsce podczas procesu pasteryzacji i sterylizacji, co pozwala otrzymać produkt o znacznie lepszych walorach odżywczych i smakowych.

### **Metodyka badań**

W literaturze istnieje wiele informacji odnośnie aktywności wody materiałów biologicznych, jak: owoce, warzywa, soki, jaja, mięso, sery, miód, płatki zbożowe, owoce suszone, produkty częściowo odwodnione lub produkty z dodatkiem substancji mających zdolność trwałego wiązania wody. Brak jest natomiast informacji odnośnie aktywności wody w mleku surowym i w mleku spożywczym. Dlatego celem pracy było wykazanie, w jakim stopniu obróbka, wybrane formy obróbki technologicznej mleka, a także zawartość komórek somatycznych i ogólnej liczby drobnoustrojów, wpływają na zmianę aktywności wody. Dodatkowo celem pracy było wykazanie, w jakim stopniu aktywność wody w mleku spożywczym zależy od zawartości tłuszczu oraz czasu i temperatura przechowywania.

Badania wykonano w laboratorium Instytutu Inżynierii Rolniczej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Do pomiaru aktywności wody wykorzystano miernik KMAW-7. Badanie zawartości komórek somatycznych i ogólnej liczby drobnoustrojów wykonano w Laboratorium Oceny i Analizy Mleka Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu przy użyciu aparatu BACTOCOUNT 70 i aparatu SOMACOUNT 150.

Badania laboratoryjne zawartości komórek somatycznych i ogólnej liczby drobnoustrojów w świeżym mleku przeprowadzono w okresie od 11.10.2004 r. do 3.12.2004 r.

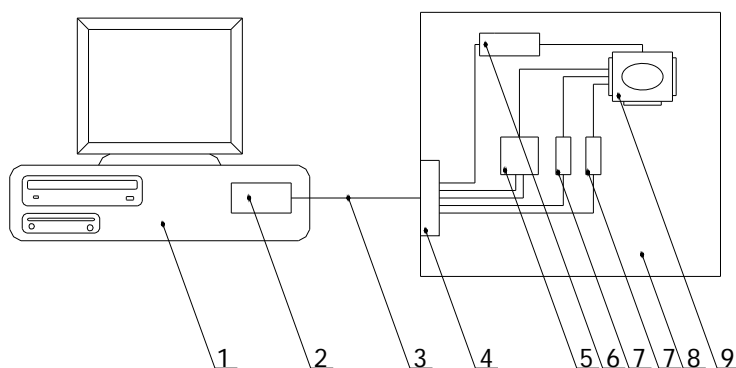


Rys. 1. Schemat budowy aparatu BACTOCOUNT 70  
Fig. 1. Scheme of the BACTOCOUNT 70 apparatus construction

Zawartość liczby komórek somatycznych określano w aparacie SOMACOUNT 150, wykorzystującym technologię cytometrii przepływowej, z wykorzystaniem roztworu buforowego i barwnika fluorescencyjnego, który barwi DNA komórek somatycznych. Próbkę analizowanego mleka są wstrzykiwane w strumień płynu nośnego, na który skierowany jest promień lasera, co powoduje fluorescencję zabarwionych komórek. Fotodetektor wykrywa zabarwione komórki, a następnie dane przekazuje do komputera, w którym są zliczane, a wynik przedstawiony na monitorze. Komputer steruje pracą poszczególnych podzespołów urządzenia, np. ruchem pomp strzykowych, systemem przepływu, pracą lasera, kontrolą napięcia zasilającego. Do pomiaru aktywności wody zastosowano aparat KMAW-7, składający się z dwóch podstawowych elementów, tj. panela głównego miernika aktywności oraz komputera do sterowania procesem pomiaru i archiwizacji wyników [Podawca 2005].

Miernik aktywności wody służy do oznaczania  $A_w$  próbek, sekwencyjnie w dwóch komorach próbkowych, stabilizowanych termicznie. Miernik stwarza możliwość szybkich i dokładnych oznaczeń  $A_w$  w próbkach materiałów biologicznych, jak również innych sorbentów wody. Ważniejsze parametry charakteryzujące pracę aparatu KMAW-7 przedstawiają się następująco:

- zakres pomiaru  $A_w$   $0 \div 0,990$ ,
- dokładność pomiaru  $A_w$  w temperaturze pokojowej  $\pm 0,015$ ,
- błąd powtarzalności pomiaru  $A_w$   $< 0,005$ ,
- zakres temperatury pomiaru  $+5 \div +60^\circ\text{C}$ ,
- dokładności pomiaru temperatury  $\pm 0,2^\circ\text{C}$ ,
- błąd stabilizacji temperatury  $< \pm 0,05^\circ\text{C}$ .



Rys. 2. Schemat budowy miernika aktywności wody KMAW-7: 1– komputer PC, 2– karta pomiarowa NI6023, 3– przewód łączący, 4– płytka łącząca podająca sygnały (pomiarowa), 5– zespolony przetwornik (Rotronic I-155C/CI) wilgotności i temperatury nad próbką, 6– układ wykonawczy regulacji temperatury i dynamizacji atmosfery z zasilaczami, 7– przetworniki temperatury korpusu oraz temperatury otoczenia, 8– panel główny miernika, 9– korpus komory pomiarowej z modułami grzewąco-chłodzącymi z sondą wilgotności

Fig. 2. Scheme of the water activity meter KMAW-7: 1– personal computer, 2– measuring card NI6023, 3– connecting conductor, 4– connecting (measuring) plate transferring the pulses, 5– complex converter (Rototronic I-155C/CI) of the moisture and temperature above the sample, 6– executive system of temperature and atmosphere control with the feeders, 7– converters of body and ambient temperature, 8– main measuring panel, 9– body of measuring chamber with the heating-cooling moduli and the moisture probe

Poszczególne partie analizowanego mleka dzielono na dwie części, jedna przechowywana była w warunkach chłodniczych w temperaturze  $5-8^\circ\text{C}$ , druga w temperaturze pokojowej ok.  $20^\circ\text{C}$ . Badanie było powtarzane w odstępach 24 godzinnych przez okres 12 dni w przypadku próbek przechowywanych w warunkach chłodniczych. W przypadku próbek przechowywanych w temperaturze pokojowej udało się przeprowadzić tylko 5 analiz, ponieważ mleko uległo skwaszeniu. Mleko do pomiarów umieszczono w naczynkach pomiarowych o pojemności ok. 15 ml i wprowadzano do komory miernika

KMAW-7, gdzie następowała stabilizacja próbek, po której następował pomiar zasadniczy. W przypadku mleka surowego, po oznaczeniu ogólnej liczby drobnoustrojów i ilości komórek somatycznych bezzwłocznie poddawane ono było dalszej analizie i oznaczano jego aktywność wodną.

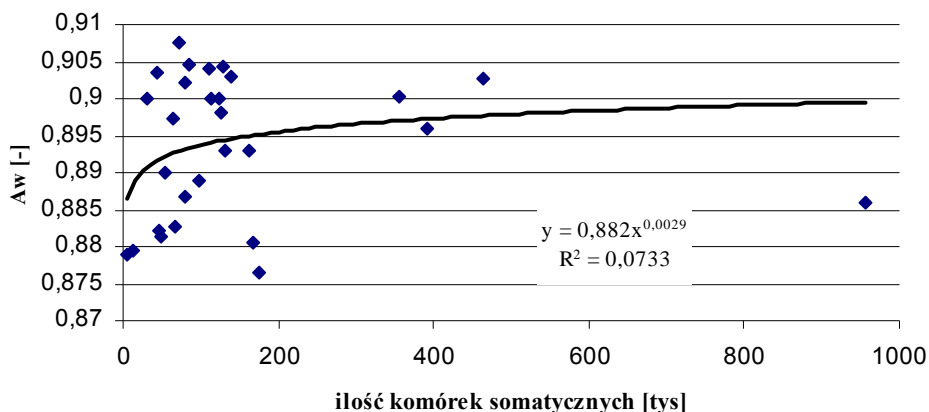
## Wyniki badań

### Wpływ ilości komórek somatycznych mleka surowego na aktywność wody

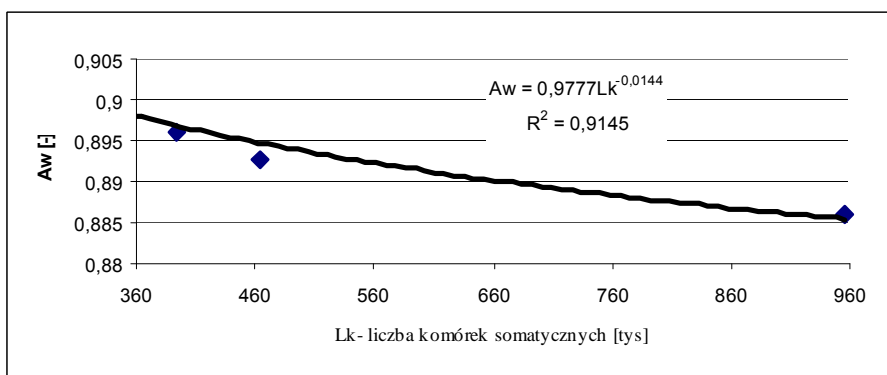
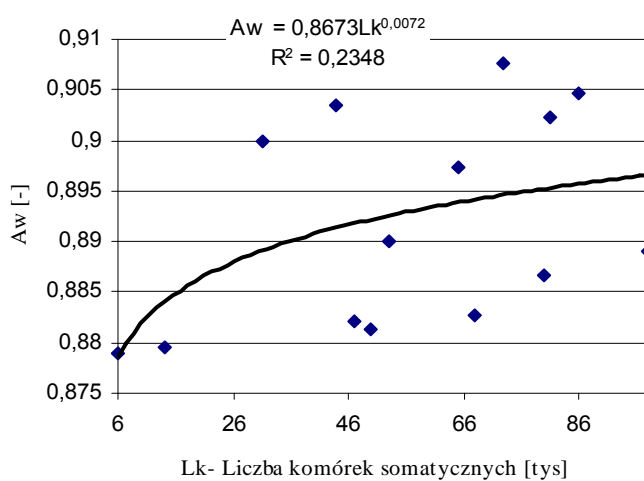
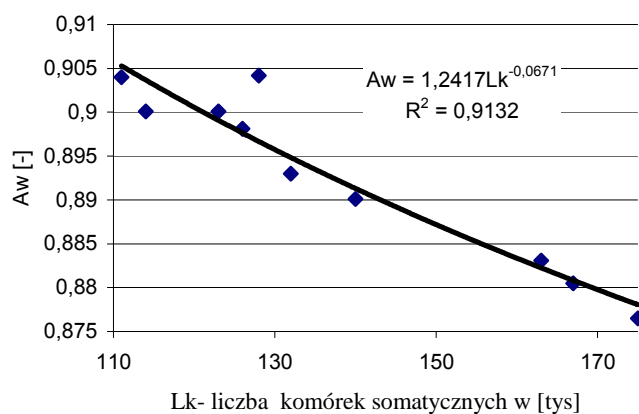
Pierwszy etap badań dotyczył wykazania zależności pomiędzy zawartością komórek somatycznych a aktywnością wody w mleku. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1 i na rysunku 3.

Tabela 1. Aktywność wody dla mleka o określonej ilości komórek somatycznych  
Table 1. Water activity in milk with definite number of somatic cells

Liczba komórek somatycznych w 1 ml mleka	Aktywność wody $A_w$	Liczba komórek somatycznych w 1 ml mleka	Aktywność wody $A_w$
6 000	0,879	111 000	0,904
14 000	0,8795	114 000	0,9001
31 000	0,8999	123 000	0,9001
44 000	0,9034	126 000	0,8981
47 000	0,8821	128 000	0,9042
50 000	0,8814	132 000	0,893
53 000	0,8901	140 000	0,8901
65 000	0,8973	163 000	0,8831
68 000	0,8828	167 000	0,8805
73 000	0,9077	175 000	0,8765
80 000	0,8867	356 000	0,9003
81 000	0,9022	393 000	0,896
86 000	0,9046	464 000	0,8928
98 000	0,889	956 000	0,886



Rys. 3. Zależność między ilością komórek somatycznych a aktywnością wody  
Fig. 3. Relationship between the number of somatic cells and water activity



Rys. 4. Zależność między ilością komórek somatycznych a aktywnością wody w dla wybranych przedziałów liczby komórek somatycznych

Fig. 4. Relationship between the number of somatic cells and water activity for selected ranges of somatic cell numbers



Graficzne przedstawienie uzyskanych wyników (rys. 3) wykazuje brak zależności pomiędzy liczbą komórek somatycznych a aktywnością wody. Należy jednak zauważyć, że zdecydowana większość próbek mleka dotyczy liczby komórek somatycznych mieszczącej się w przedziale 0-200 tys.

Ze względu na dużą rozpiętość wyników charakteryzujących liczbę komórek somatycznych zawierającą się między 6000 a 956000 w dalszej części analizy dokonano podziału wyników na trzy grupy zawierające się w przedziałach: 6000-100000 komórek somatycznych, 100000-200000 komórek somatycznych, 200000-956000 komórek somatycznych.

Dla każdego przedziału wykonano oddzielne wykresy, z których można odczytać równanie funkcji opisującej daną zależność i sprawdzić wartość współczynnika  $R^2$ .

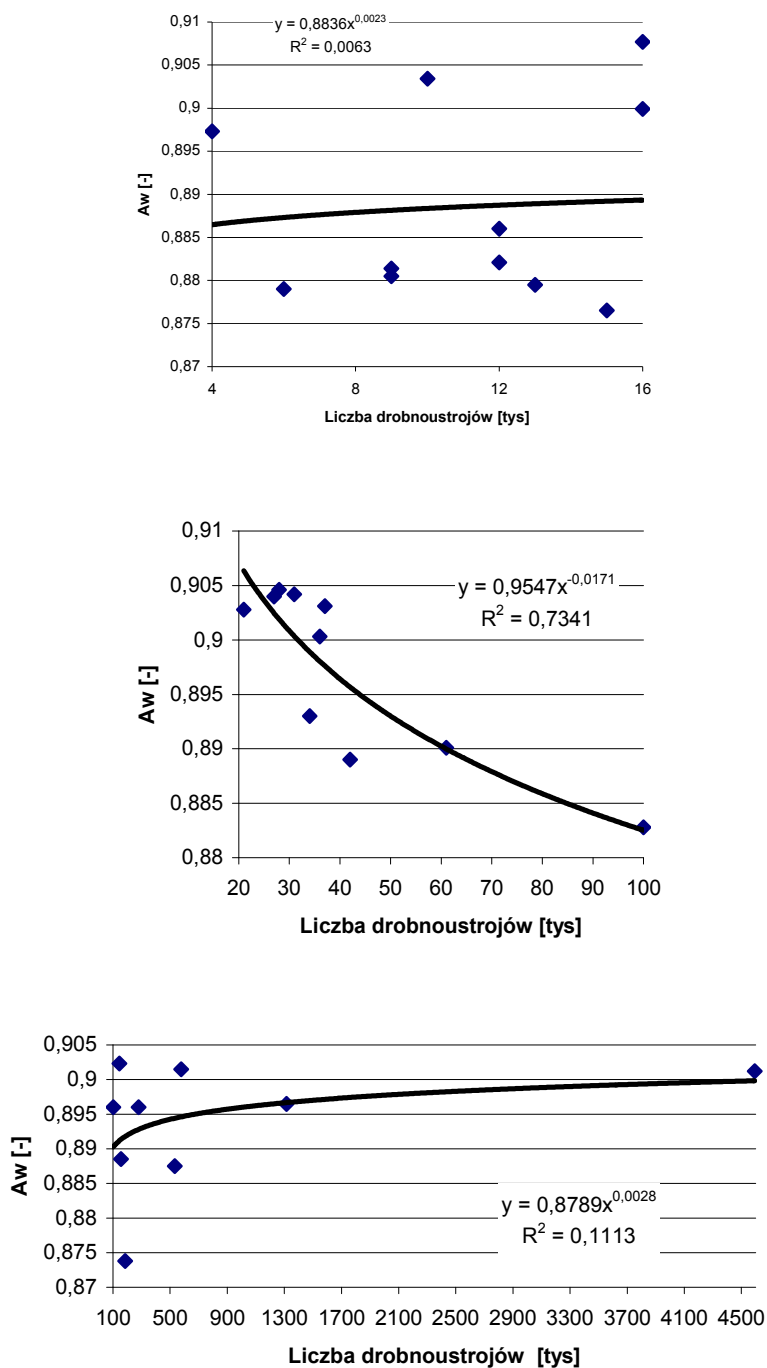
Analiza danych zamieszczonych na rysunku 4 pozwala zauważyć, że:

- dla próbek mleka surowego o zawartości komórek somatycznych z liczbą mieszczącą się w przedziale 6000-100000 nie wykazano wpływu na aktywność wody zawartej w mleku,
- dla próbek mleka surowego o zawartości komórek somatycznych z liczbą mieszczącą się w przedziale 100000-200000 wykazano spadek aktywności wody w mleku ze wzrostem ilości komórek somatycznych; co oznacza, im większa ilość komórek somatycznych tym gorsze warunki dla rozwoju drobnoustrojów,
- dla próbek mleka surowego o zawartości komórek somatycznych z liczbą mieszczącą się w przedziale od 300000 do 956000 wykazano także wpływ na aktywność wody w mleku, jednakże ze względu na małą ilość punktów pomiarowych w tym przedziale liczby komórek, wnioskowanie jest obciążone dużym błędem.

#### ***Wpływ ogólnej liczby drobnoustrojów mleka surowego na aktywność wody***

Kolejny etap badań obejmował analizę wpływu ogólnej liczby drobnoustrojów na aktywność wody. Ze względu na dużą rozpiętość liczby drobnoustrojów w mleku zawartą pomiędzy 4000 a 4593000, do wykazania wpływu na aktywność wody, zakres zawartości liczby drobnoustrojów podzielono na trzy podgrupy zawierające się w przedziałach: 4000 do 16000 drobnoustrojów, 16000 do 100000 drobnoustrojów i 100000 do 4593000 drobnoustrojów

Dla każdego przedziału wykonano oddzielne wykresy (rys. 5), pozwalające na wyznaczenie funkcji opisującej daną zależność oraz na ocenę wartości współczynnika determinacji  $R^2$ . W świetle uzyskanych wyników badań (rys. 5) można zauważyć, że ogólna liczba drobnoustrojów w mleku nie ma wpływu na jego aktywność wodną. W żadnym z przedstawionych przedziałów współczynnik determinacji  $R^2$  nie jest na tyle wysoki, aby można było mówić o relacji między tymi dwoma parametrami.



Rys. 5. Zmiana aktywności wody w mleku dla wybranych przedziałów liczby drobnoustrojów

Fig. 5. Changes of the water activity in milk for selected ranges of microorganisms' number

### **Podsumowanie i wnioski**

Przeprowadzone badania wykazały, że mleko wyróżnia się aktywnością wody zdecydowanie poniżej wartości 0,95, która dla większości produktów żywnościowych uważana jest za graniczną. Poniżej tej wartości bakterie chorobotwórcze tracą możliwość rozwoju, niestety łatwo mogą się rozwijać pozostałe grupy bakterii, drożdże i pleśnie, dla których optymalne warunki do życia stwarza środowisko o aktywności wodnej: 0,9 dla pozostałych grup bakterii, 0,8 dla drożdży, 0,7 dla pleśni.

W świetle uzyskanych wyników badań aktywność wody mleka surowego można sprecyzować następujące wnioski:

- ilość komórek somatycznych w mleku powoduje zmianę aktywności wody, ale tylko w przedziale między 100 000 a 300 000; mleko o takiej zawartości komórek somatycznych mieści się w klasie ekstra, jeśli chodzi o wymagania jakościowe mleka przeznaczonego do skupu; ogólna liczba drobnoustrojów nie ma wpływu na aktywność wodną mleka,
- zmiana aktywności wody we wszystkich analizowanych przypadkach jest nieznaczna, co nie powoduje znaczących zmian w środowisku dla rozwoju mikroorganizmów.

### **Bibliografia**

- Burbianka M., Pliszka H., Burzyńska H. 1983. Mikrobiologia żywności. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa
- Lewicki P. 1999. Właściwości wody w produktach spożywczych. Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej, nr 811
- Lewicki P. 2003. Woda jako składnik żywności. Przemysł Spożywczy, 5
- Pijanowski E. 1984. Zarys chemii i technologii mleczarstwa. Tom I. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa
- Podawca T. 2005. Aktywność wody w mleku w aspekcie technologii produkcji, ilości komórek somatycznych i ogólnej liczby drobnoustrojów. Praca magisterska. Maszynopis Wrocław
- Świata J. 1996. Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa