

PROBIOTICKÉ MIKROORGANISMY V MLÉKÁRENSKÉM PRŮMYSLU

Šárka Horáčková, Eva Šviráková

Ústav technologie mléka a tuků, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

Probiotic microorganisms in dairy industry

Abstrakt

Probiotické mikroorganismy jsou v posledních letech předmětem řady vědeckých studií. Příspěvek shrnuje požadavky, které by měl probiotický mikroorganismus splňovat z hlediska jeho původu, fyziologických vlastností a technologických požadavků. Podrobněji jsou shrnuta data o zdravotně-funkčních tvrzeních a uvedeny příklady nejčastěji používaných a studovaných kmenů probiotických mikroorganismů.

Abstract

Probiotic microorganisms have been studied by many scientists for many years. The article summarizes the requirements for the probiotics from the point of view of the origin, physiologic and technologic properties. In details the data on health and functional benefits are summarized. The most common probiotic strains are also listed.

Již před více než 100 lety vyslovil ruský imunolog Ilja Mečnikov teorii, že bakterie mléčného kvašení ovlivňují zdravotní stav člověka a přispívají k prodloužení délky života. Ale teprve asi před 20 lety začal intenzivní výzkum a cílené technologické využití probiotických kultur. Přidavek probiotických mikrobiálních kultur modifikuje potraviny na tzv. potraviny funkční, jak bylo uvedeno v předcházejícím příspěvku (Horáčková, 2008). Probiotické potraviny jsou definovány jako potraviny obsahující živé mikroorganismy, které pozitivně ovlivňují zdraví člověka změnou či udržováním určité rovnováhy střevní mikroflóry (Shah, 2007).

Vhodnost a zařazení mikroorganismů mezi probiotické, a tedy zdraví prospěšné, je předmětem celé řady studií a lze je posuzovat alespoň ze tří následujících pohledů.

1. Původ a vlastnosti samotného mikroorganismu

- Mikroorganismus by měl být izolován z gastrointestinálního traktu zdravého člověka, i když ve zprávě FAO/WHO z roku 2001 bylo též navrženo, aby byl tento požadavek přehodnocen z důvodu nesnadné identifikace původu některých mikroorganismů. Mikroorganismus by měl být přesně taxonomicky určen - moderní metody molekulární biologie umožňují vytváření velkých databází sekvencí 16S/23S rRNA, a tím usnadňují rychlou

a přesnou klasifikaci uvažovaných a nových probiotických kmenů (Vasiljevic a kol., 2008).

- Probiotický mikroorganismus nevykazuje žádnou patogenitu. Bakterie mléčného kvašení, které jsou dlouhodobě používány při fermentaci potravin, jsou považovány za zcela bezpečné. Pozornost je nutné věnovat novým kmenům zaváděným jako probiotika, neboť i přes nízkou pravděpodobnost byly zaznamenány některé případy infekcí spojených s kmeny rodu *Lactobacillus* (Havenaar, Spanhaak, 1994). Velkou pozornost je v tomto ohledu potřeba věnovat zástupcům rodu *Enterococcus*, neboť patří mezi nejčastější příčinu infekčních onemocnění u lidí. Enterokoky izolované z potravin nebyly zatím příčinou klinických infekcí (Giraffa, 2002).
- Měl by být tolerantní k žaludečním kyselinám a žlučovým solím. Tento požadavek ovšem není jednoznačný, neboť některé pokusy s laktobacily ukázaly značné rozdíly při *in vivo* a *in vitro* studiích. Zřejmě pouze kmeny extrémně citlivé ke kyselinám *in vitro* nejsou schopny přežít přechod přes trávicí trakt (Morelli, 2007). Doporučení IDF též nezařazuje tuto vlastnost u mikroorganismů, které mají být použity jako preparáty pro obnovení ústní či vaginální mikroflóry (Mercenier a kol., 2008).
- Měl by mít schopnost adheze ke střevní stěně a schopnost přežít v gastrointestinálním traktu člověka. Navázané bakterie jsou schopné déle setrvat v gastrointestinálním traktu a mají tudíž lepší možnost projevit imunomodulační účinek. Díky adhezi je umožněna interakce s povrchem sliznice a usnadněn kontakt s lymfoidní tkání, která zprostředkovává imunitní účinky (Saarela a kol., 2000).
- Neměl by být přenašečem genů zodpovědných za přenos antibiotické rezistence - u mnoha kmenů používaných laktobacilů, laktokoků i bifidobakterií byla zjištěna rezistence vůči některým antibiotikům (D' Aimmio a kol., 2007), ovšem existuje jen málo dat o schopnosti přenosu genů této rezistence na jiné mikroorganismy (Mathur, Singh, 2005). Zvláště laktobacily vykazují rezistenci vůči široké škále antibiotik, ale tato rezistence není kódována geny přenositelného typu. Pozornost by měla být věnována hlavně rezistenci kódované na plasmidech, i když není u laktobacilů běžná (Saarela a kol., 2000). Riziko přenosu genů antibiotické rezistence je vysoké i u potenciálně probiotických enterokoků, jedná se hlavně o rezistenci vůči vankomycinu, chloramfenikolu, tetracyklinům (Flint, 2002).
- Neměl by produkovat biogenní aminy jako jsou histamin a tyramin vzhledem k jejich toxikologickým účinkům (Ozogul, Ozogul, 2007; Kalač a kol., 2000).

2. Technologické vlastnosti mikroorganismu

Probiotické mikroorganismy musí v dostatečném množství (10^6 - 10^9 K TJ · g⁻¹ výrobku) přežít technologický i skladovací proces a přinášet výrobku vhodné senzorké vlastnosti. Nárůst buněk za použití 1 - 10% inokula během 24 h by měl dosahovat denzitu 10^8 - 10^9 K TJ · ml⁻¹ a kmeny

by měly být tolerantní vůči kyslíku pro kultivaci v mléce (Gomez, Malcata, 1999).

Z důvodu rostoucí koncentrace organických kyselin klesá během skladování pH výrobku a následkem toho se mohou snižovat počty bifidobakterií (Donkor a kol., 2006). Při porovnání výrobků balených do různých druhů obalů je vyšších počtů probiotických mikroorganismů dosahováno v obalech skleněných, které jsou lepší bariérou pro plyny (Dave, Shah, 1997).

Při výběru vhodné probiotické kultury je nezbytné zohlednit rozdílné požadavky na aktivitu vody, redox potenciál, teplotu, kyselost, možný antagonismus mezi jednotlivými kmeny. Životaschopnost probiotických kultur při skladování výrobků závisí na druhu potravin - dostupnosti živin, tvorbě inhibičních látek, teplotě skladování, koncentraci kyslíku a jeho prostupnosti přes obalový materiál apod.

3. Zdravotní - funkční vlastnosti mikroorganismu

Potvrzení zdravotních účinků jednotlivých mikroorganismů a jejich vlivu na lidský organismus je jednou z nejobtížnějších částí studia probiotických kmenů. Jako důkaz zdravotního tvrzení by měla být vždy předložena klinická studie - dvojitě zaslepená, placebem kontrolovaná a provedená nejlépe na dvou nezávislých pracovištích. Těmto studiím prováděným na lidech předchází vždy *in vitro* studie a studie prováděné na zvířatech, což znamená značné finanční nároky na výzkum a potvrzení zdravotních účinků těchto kmenů.

Pracovní skupina FAO/WHO vytvořila "průvodce pro hodnocení probiotik v potravinách" s následujícími požadavky (Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, 2002):

- identifikace mikrobiálního kmene fenotypovými i genotypovými metodami,
- *in vitro* testy nebo testy na zvířatech, případně studie na lidech pro určení bezpečnosti mikroorganismu,
- *in vitro* testy, testy na zvířatech pro charakterizaci funkčních vlastností,
- dvojitě zaslepená, náhodná, placebem kontrolovaná studie na lidech k potvrzení zdravotních účinků mikroorganismů,
- porovnání probiotik se standardní stravou,
- charakterizace výrobku - minimální množství živých buněk na konci skladovací doby, správné skladovací podmínky apod.

Podobná doporučení byla publikována již několikrát (Guarner, Schaafsma, 1998). Jedním z posledních je doporučení Mezinárodní mlékařské federace (Mercenier a kol., 2008), která vytvořila skupinu expertů, jejichž cílem je postihnout minimální kritéria pro probiotické mikroorganismy, jejich fyziologické a funkční vlastnosti a charakterizovat metody k ohodnocení těchto vlastností.

Pozitivními zdravotními účinky probiotických mikroorganismů se zabývají stovky vědeckých prací. Světová gastroenterologická organizace shrnuje účinky probiotik následujícím způsobem (Probiotics and Prebiotics, 2008):

• imunologický účinek:

- zvýšení přítomnosti antigenu k B lymfocytům a zvýšení produkce imunoglobulinu A,
- ovlivnění profilu cytosinů,
- ovlivnění reakce na potravinové alergeny,

• neimunologický účinek:

- kompetice o zdroje energie s patogenními mikroorganismy,
- změna lokálního pH vytvářející nepříznivé podmínky pro patogeny,
- produkce bakteriocinů,
- stimulace produkce mucinu,
- likvidace radikálů,
- zlepšení funkce intestinální bariéry,
- kompetice o adhezi ke střevní stěně s patogenními mikroorganismy,
- modifikace toxinů vytvořených patogeny.

Všechny výše zmíněné účinky prokazatelně ovlivňují nejruznější onemocnění. Mezi nejčastěji uváděné příznivé účinky probiotik patří antimikrobiální aktivita v souvislosti s nejruznějšími druhy gastrointestinálních infekcí (akutní průjemové onemocnění, průjemové onemocnění spojené s užíváním antibiotik, ozařováním, prevence tzv. cestovních průjmů), spolu s antibiotiky potlačení infekce *Helicobacter pylori*, dále pak zmírnění průběhu nespecifických střevních zánětů (ulcerózní kolitida, Crohnova choroba), prevence atopického ekzému, zlepšení trávení laktosy, redukce hladiny sérového cholesterolu, antikarcinogenní účinky, stimulace imunitního systému, léčení urovaginálních infekcí apod. (Marteau, Rambaud, 1993; Zubillaga a kol., 2001; Shah, 2007; Probiotics and Prebiotics, 2008).

Příklady kmenů probiotických mikroorganismů jsou uvedeny v tabulce 1 (Gibson, 1999; Collins, Gibson, 1999; Shah, 2007; Vasiljevic, Shah, 2008).

Tab. 1 Příklady probiotických mikroorganismů

Mikrobiální druh	kmen
<i>Bifidobacterium</i>	
<i>acidophilus</i>	
<i>longum</i>	B536, SBT-2928
<i>breve</i>	Yakult
<i>bifidus</i>	Bb-11
<i>lactis (animalis)</i>	Bb-01
<i>infantis</i>	Shirota
<i>Lactobacillus</i>	
<i>acidophilus</i>	LA1/LA5, NCFM
<i>delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	Lb 12
<i>paracasei</i>	CRL 431, F19
<i>casei</i>	Shirota, Immunitass
<i>rhamnosus</i>	GG1, GR-1
<i>plantarum</i>	299v
<i>salivarius</i>	UCC118
<i>lactis</i>	La1
<i>reuteri</i>	SD2112
<i>fermentum</i>	RC-14
<i>johnsonii</i>	La1
<i>helveticus</i>	B02
<i>Lactococcus lactis</i>	L1a

I když probiotické účinky byly potvrzeny i u jiných mikroorganismů (např. *Enterococcus faecium*, *E. coli* Nissle 1917, *Saccharomyces boulardii*), je z přehledu patrné, že tyto účinky jsou připisovány a zkoumány převážně u bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií. Tím se mlékárenské výrobky stávají hlavní potravinovou matricí k přenosu prospěšných mikroorganismů do organismu člověka, což dává velký potenciál výrobcům těchto produktů.

Kromě potravin s probiotickými mikroorganismy je v současné době na našem trhu registrováno přes 90 druhů probiotik jako doplňků stravy. Je třeba zdůraznit, že u těchto výrobků současná legislativa nepožaduje potvrzení klinických účinků, podléhají předpisům o potravinách a k uvedení na trh je potřebná pouze notifikace (oznámení na Ministerstvo zemědělství ČR a Ministerstvo zdravotnictví ČR týkající se zdravotních a výživových tvrzení), na rozdíl od probiotik, která se mají používat jako léčiva a která jsou schvalována Státním ústavem pro kontrolu léčiv (Michalová, 2007). Tato praxe by měla být změněna - v roce 2009 by na základě Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1924/2006 měl vzniknout schválený seznam zdravotních tvrzení, která budou moci používat všichni výrobci potravin. Zdravotní tvrzení týkající se snížení rizika onemocnění a tvrzení týkající se vývoje a zdraví dětí dle čl. 14 Nařízení č. 1924/2006 podléhají zvláštnímu schvalování Evropské komise na základě doporučení EFSA. K této žádosti je zapotřebí doložit pozitivní i negativní vědecké studie založené na již výše uvedených zásadách (klinické studie) (Winklerová, 2008).

Poděkování

Práce byla podpořena grantem MSM 6046137305.

Literatura

- Collins M.D., Gibson G.R.: American Journal of Clinical Nutrition 69, 1052-1057 (1999).
- D'Aimmo M.R., Modesto M., Biavati B.: International Journal of Food Microbiology 115, 35-42 (2007).
- Dave R.I., Shah N.P.: International Dairy Journal 7, 31 - 41 (1997).
- Donkor O. N., Henriksson A., Vasiljevic T., Shah N.P.: International Dairy Journal 16, 1181 - 1189 (2006).
- Flint S.: Encyclopedia of Dairy Sciences. 1st ed. London: Academic Press, 2002, s. 904 - 907. ISBN 0-12-227237-4.
- Gibson G.R.: Journal of Nutrition 129, 1438 - 1441 (1999).
- Giraffa G.: FEMS Microbiology Reviews 26, 163 - 171 (2002).
- Gomez A.M.P., Malcata F.X.: Trends in Food Science and Technology 10, 139 - 157 (1999).
- Guarner F., Schaafsma G.J.: International Journal of Food Microbiology 39, 237 - 238 (1998).
- Havenaar R., Spanhaak S.: Current Option in Biotechnology, 5, 320 - 325 (1994).
- Horáčková Š.: Mlékařské listy - Zpravodaj 111, 23 - 25 (2008).
- Kalač P., Špička J., Křížek M., Pelikánová T.: Food Chemistry 70, 355 - 359 (2000).
- Ozogul F., Ozogul Y.: European Food Research Technology, 225, 385 - 394 (2007).
- Marteau P., Rambaud J-C.: FEMS Microbiology Reviews 12, 207 - 220 (1993).
- Mathur S., Singh R.: International Journal of Food Microbiology 105, 281-295. (2005).
- Mercenier A., Lenoir-Wijnkoop I., Sanders M. E.: Bulletin of the International Dairy Federation 429, 1 - 6, 2008.
- Michalová I.: Průvodce spotřebitele - Doplňky stravy 12, 15 - 16 (2007). ISBN 978-80-903930-1-1.
- Morelli L.: International Dairy Journal 17, 1278 - 1283 (2007).

- Saarela M., Morgensen G., Fondén R., Matto J., Mattila-Sandholm T.: Journal of Biotechnology 84, 197 - 215 (2000).
- Shah P.N.: International Dairy Journal 17, 1262-1277 (2007).
- Vasiljevic T., Shah N.P.: International Dairy Journal 18, 714-728 (2008).
- Zubillaga M., Weill R., Postaire E., Goldman C., Caro R., Boccio J.: Nutrition Research 21, 569 - 579 (2001).
- Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food (2002): http://www.who.int/entity/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf, staženo 15. 1. 2009.
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1924/2006 ze dne 20.12.2006 o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin.
- Probiotics and Prebiotics (2008): <http://www.worldgastroenterology.org/probiotics-prebiotics.html>, staženo 15. 1. 2009.
- Winklerová D.: Přednáška na semináři Aktuální informace 2008 o vývoji potravinového práva EU a ČR a nových povinnostech provozovatelů potravinářských podniků, Institut profesní přípravy, Praha 4. 12. 2008.

Přijato do tisku 20. 1. 2009

Lektorováno 30. 1. 2009

PLOTNOVÉ METODY STANOVENÍ PROTEOLYTICKÝCH MIKROORGANISMŮ A JEJICH ENZYMŮ V MLÉCE

I. Němečková¹, L. Červenková¹, M. Pechačová², P. Roubal²

¹ - MILCOM a.s., Praha

² - Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

Plate methods for proteolytic microorganisms and their enzymes determination in milk

Souhrn

Testovány byly jednoduché, levné a v provozních podmínkách dostupné plotnové metody stanovení proteolytických mikroorganismů a jejich enzymů.

Porovnány byly půdy pro kultivační stanovení proteolytických mikroorganismů - Calcium Caseinate agar, Calcium Caseinate agar s přidaným mlékem a GTK agar s 10 % obj. sterilního mléka. Všechny tři poskytly kvantitativně srovnatelné výsledky, navíc počet všech mikroorganismů narostlých na GTK agaru s mlékem odpovídal celkovému počtu mikroorganismů podle ČSN EN ISO 4833 (2003).

Difuzní agarová metoda stanovení proteolytických enzymů je vhodná zejména ke studiu vlastností jednotlivých enzymů. Aplikace metody na mléko je limitována relativně nízkou koncentrací enzymů a rozdílnými podmínkami pro jejich aktivitu.

Summary

Simple, cheap and dairy plant laboratories available plate methods for proteolytic microorganisms and their enzymes determination were tested.