

RŮST SPORULUJÍCÍCH BAKTERIÍ V TAVENÝCH SÝRECH O RŮZNÉM OBSAHU TUKU A V PŘÍTOMNOSTI MONOACYLGLYCEROLU KYSELINY UNDEKANOVÉ

Iva Doležálková, Leona Buňková, Kristýna Janečková,
Jan Navrátil, David Gergela, Rahula Janiš

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky,

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

dolezalkova@ft.utb.cz; bunkova@ft.utb.cz

The growth of spore-forming bacteria in processed cheese with different fat content and in the presence of monoacylglycerol of undecanoic acid

Abstrakt

Sporulující bakterie rodu *Bacillus* a *Clostridium* patří mezi nejvýznamnější kontaminanty tavených sýrů. Cílem této studie bylo sledovat vliv některých faktorů na množení těchto mikroorganismů přímo v tavených sýrech. Byly vyrobeny modelové vzorky tavených sýrů o různém obsahu tuku v sušině, v další fázi experimentu byl sledován vliv přídavku látky s emulgačním a antibakteriálním účinkem – monoacylglycerolu kyseliny undekanové. Z výsledků vyplývá, že obsah tuku ovlivňuje růst a množení sporulujících bakterií v tavených sýrech a sýry s nižším obsahem tuku jsou pro bakterie méně příznivým prostředím. Monoacylglycerol kyseliny undekanové v koncentraci 0,15 % w/w zabránil růstu obou kmenů bacilů a mírně potlačil růst studovaných klostridií.

Klíčová slova: tavený sýr, *Bacillus*, *Clostridium*, obsah tuku, monoacylglycerol kyseliny undekanové

Abstract

Spore-forming bacteria of the genus *Bacillus* and *Clostridium* are the most important contaminants of processed cheese. The aim of this study was to examine the influence of some factors on the proliferation of these microorganisms in processed cheese. Model cheese samples with different fat content were prepared for the first part of the experiment, in the next phase emulsifying and antibacterial agent monoacylglycerol of undecanoic acid was added to cheese samples. The results showed that the fat content affects the growth and multiplication of spore-forming bacteria in processed cheese and cheese with lower fat content is less favorable environment for bacteria. Monoacylglycerol of undecanoic acid at a concentration of 0.15% w/w prevented the growth of both strains of bacilli and slightly suppressed the growth of clostridia studied.

Key words: processed cheese, *Bacillus*, *Clostridium*, fat, monoacylglycerol of undecanoic acid

Úvod

Mikrobiologická nezávadnost tavených sýrů je zajištěna fyzikálním procesem v podobě tepelného ošetření. Při diskontinuálním procesu výroby je na surovinovou směs působeno teplotou 75 až 90 °C, což vede k usmrcení vegetativních forem mikroorganismů, tyto teploty však nezajistí usmrcení bakterií se schopností tvorby endospor. Bakteriální spory takové teploty přežívají a teplotní záhřev navíc může podpořit proces jejich germinace¹. Sporulující bakterie tedy představují velmi významnou skupinu kontaminantů tavených sýrů a je proto nutné jim věnovat značnou pozornost.

Nejčastějšími rody izolovanými v souvislosti s tavenými sýry jsou grampozitivní rody *Clostridium* a *Bacillus*. Z tavených sýrů bylo izolováno několik zástupců rodu *Clostridium*, především *C. sporogenes*, *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum* a *C. cochlearium*^{2,3}. Typickým důsledkem množení těchto mikroorganismů v tavených sýrech je produkce plynů vedoucí k tzv. pozdnímu duření sýrů a produkce organických kyselin, zejména kyseliny máselné a octové, jejichž přítomnost má negativní vliv na organoleptické vlastnosti produktu^{2,3}. Organoleptické defekty, jako je například hořká, zatuchlá či trpká příchut, bývají často důsledkem produkce proteolytických a lipolytických enzymů některými kmeny bacilů. V souvislosti s mléčnými výrobky jde hlavně o druhy *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. sphaericus*, *B. mycoides* a *B. coagulans*. Z hlediska spotřebitele nelze zanedbat ani potenciální zdravotní rizika plynoucí z přítomnosti těchto mikroorganismů vzhledem k tomu, že některé druhy bacilů (*B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* nebo *B. pumilus*) mohou být původci potravinových otrav⁴.

Snaha potlačit či předejít množení nežádoucích mikroorganismů v potravinách je logickým důsledkem potřeby zvyšování údržnosti a bezpečnosti potravin a potravinových surovin. Za tímto účelem jsou hledány látky působící inhibičně na mikroorganismy, které by současně neměly negativní vliv na lidský organizmus ani na vlastnosti potravinového produktu, v ideálním případě by mohly některé jeho vlastnosti dokonce zlepšovat. Možnou ochranou před nežádoucí mikroflórou by mohla být aplikace látek acylglycerolového typu, které mají antimikrobiální účinek a navíc by se mohl uplatnit i jejich emulgační účinek při samotném technologickém zpracování.

Monoacylglyceroly (MAG) jsou parciální estery glycerolu s vyššími mastnými kyselinami mající povahu povrchově aktivních látek. Aplikaci monoacylglycerolů v potravinách umožňuje i dobrá snášenlivost těchto látek. V lidském organizmu MAG vznikají jako přirozený produkt lipázou katalyzované hydrolyzy tuků, běžně se vyskytují v živočišných produktech, např. v mléce, a jsou tedy obecně považovány za bezpečné, bez nežádoucích účinků a toxicity vůči sliznicím^{5,6}.

Antimikrobnímu působení těchto látek byla v poslední době věnována řada studií, které přisuzují monoacylglycerolům schopnost potlačit růst širokého spektra mikroorganismů. MAG působí inhibičně na vegetativní formy gram pozitivních i gram negativních bakterií^{7,8,9}, kvasinky^{6,9} i některé plísně^{9,10}. Některé MAG dokážou potlačit nebo alespoň zpomalit proces sporulace a germinace, nebo snížit odolnost bakteriálních endospor^{11,12}. Schopnost MAG ovlivnit růst mikroorganismů vychází z lipofilního charakteru těchto látek, díky čemuž dochází k interakcím s cytoplazmatickou membránou buněk^{13,14}.

Cílem této studie bylo sledovat dynamiku růstu sporulujících bakterií rodu *Bacillus* a *Clostridium* v modelových vzorcích tavených sýrů a ověřit použitelnost monoacylglycerolu kyseliny undekanové pro potlačení růstu těchto mikroorganismů. Vzhledem k tomu, že růst nežádoucí mikroflóry v potravinách je ovlivněn řadou faktorů, byl sledován i vliv obsahu tuku v tavených sýrech.

Materiál a metody

Mikroorganismy

Pro sledování růstu mikroorganismů v tavených sýrech s různým obsahem tuku v sušině a s přidavkem monoacylglycerolu kyseliny undekanové byly zvoleny následující kmeny bakterií: *Bacillus cereus* CCM 2010, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062, *Clostridium butyricum* CAPM 6342, *Clostridium sporogenes* CAPM 6329. Bakterie rodu *Clostridium* byly získány ze Sbírký zoopatogenních mikroorganismů při Výzkumném ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. v Brně.

Příprava suspenze bakterií

Inokulum bylo připraveno zaočkováním 20 ml kultivačního média bakteriemi rodu *Clostridium* a *Bacillus*. Buňky byly kultivovány při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Zaočkováním 10 ml kultivačního média připraveným inokulem o objemu 25 µl byla připravena bakteriální suspenze, která byla kultivována dalších 48 hodin.

Výroba tavených sýrů

Vzorky sýrů byly taveny na přístroji Vorwerk Thermomix TM 31-1 (Vorwerk & Co. Thermomix; GmbH, Wuppertal, Německo). Použita byla tavicí teplota 80 - 85 °C po dobu 1 minuty, 4000 otáček/min. Tavenina byla následně nalita do 100 g polystyrenových vaniček, uzavřena, zchlazena a skladována v lednici při teplotě 6 ± 2 °C. Pro výrobu modelových vzorků tavených sýrů byly použity následující suroviny: Eidamská cihla (Kromilk s.r.o., 30 % (w/w) tuku v sušině), čerstvé máslo, pitná voda, tavicí soli (difosforečnany Na₂H₂P₂O₇, (SAPP) a Na₄P₂O₇, (TSPP) a monofosforečnan Na₂HPO₄ (DSP); vše Fosfa Břeclav) v celkovém množství 2,7 % (w/w). Ihned po výrobě byly sýry zaočkovány suspenzí bakterií v objemu 5 ml. Poté byla tavenina rozlita do plastových kelímků, které byly ihned uzavřeny přivařitelným víčkem. Vyrobené vzorky byly zchlazeny a skladovány při teplotě 6 ± 2 °C.

Výroba byla rozdělena do několika fází. V první fázi byly vyrobeny vzorky tavených sýrů s obsahem tuku v sušině 30, 40 a 50% (w/w). Ve druhé fázi byly vyrobeny vzorky s přidavkem monoacylglycerolu kyseliny undekanové v koncentraci 0,01; 0,05 a 0,15 % (w/w) a s obsahem tuku v sušině 50 % (w/w). Každá tavba byla opakována dvakrát.

Mikrobiologická analýza

Modelové vzorky tavených sýrů byly skladovány po dobu pěti měsíců s odběry po 2., 7., 14., 29., 43., 64., 92., a 140. dnu skladování. Vzorek taveného sýru byl asepticky odebrán, následně byl k němu přidán fyziologický roztok v poměru 1:9 a vše bylo důkladně homogenizováno ve stomacheru po dobu 2 minut. Vyšetřováno bylo vždy 1000 µl vzorku příslušného ředění, který byl přelit sterilní kultivační půdou temperovanou na 50 °C. Kultivace probíhala při 37 °C po dobu 48 hodin, klostridia byla inkubována v termostatu s řízenou atmosférou (10 % CO₂). Pro kultivaci *B. cereus* CCM 2010 a *B. subtilis* CCM 4062 byla použita kultivační půda PCA (Plate Count Agar, HiMedia). Pro *C. butyricum* CAPM 6342 a *C. sporogenes* CAPM 6329 byla zvolena půda RCA (Reinforced Clostridial Agar, HiMedia). Po uplynutí 48 hodin kultivace byl proveden odečet počtu narostlých kolonií a vypočtena hodnota CFU (colony-forming units, kolonie tvořící jednotky) na gram výrobku.

Výsledky a diskuze

Mikrobiální jakost tavených sýrů je ovlivněna řadou faktorů mezi které lze řadit kvalitu použitých surovin, hodnotu vodní aktivity, pH, množství tuku ve výrobku a přítomnost přídatných látek¹⁵. Pro studium vlivu vybraných faktorů na rozvoj nežádoucí mikroflóry v tavených sýrech byly zvoleny 4 kmeny sporulujících bakterií rodu *Bacillus* a *Clostridium*, jejichž spory nejsou eliminovány teplotou používanou při výrobě tavených sýrů diskontinuálním způsobem. V první fázi experimentu byl sledován růst těchto mikroorganismů v tavených sýrech o různém obsahu tuku, dále byl sledován vliv přídatných látek, a to monoacylglycerolu kyseliny undekanové (MAG C11:0). Ve vzorcích sýrů byla také sledována hodnota vodní aktivity a pH v průběhu celého skladovacího pokusu, tedy po dobu pěti měsíců.

Růst bakterií v tavených sýrech s různým obsahem tuku v sušině

Pro sledování vlivu obsahu tuku na růst sporulujících mikroorganismů v tavených sýrech byly vyrobeny sýry s obsahem tuku v sušině 30, 40 a 50 % (w/w). Na obrázku 1 je znázorněn růst testovaných mikroorganismů v tavených sýrech vyjádřený jako log CFU/g v závislosti na délce skladování.

Obecně lze říci, že tavené sýry s obsahem tuku v sušině 30 % (w/w) jsou pro růst sporulujících bakterií méně vhodným prostředím ve srovnání se sýry o vyšší tučnosti. Vyšší obsah lipidů v prostředí pravděpodobně poskytuje bakteriím

ochranu vůči inhibičně působícím látkám rozpustným ve vodné fázi produktu¹⁶. Bylo prokázáno, že inhibiční efekt kyseliny sorbové, sorbanu draselného a polyfosforečnanů je negativně ovlivněn přítomností lipidů¹⁷. Snížený růst *C. botulinum* v prostředí s nižším obsahem tuku uvádí např. studie Ter Steega a kol.¹⁸. Nízký obsah tuku vede také ke zpoždění produkce botulotoxinu¹⁹. Obdobně i Mehta a Tatini²⁰ uvádějí, že méně tučné sýry jsou méně příznivým prostředím pro růst bakterií *Listeria monocytogenes* a *Salmonella* sp. Poněkud v rozporu s tímto tvrzením jsou výsledky získané pro *B. cereus* během prvních 40-ti dnů skladování, kdy byl pozorován nejvyšší nárůst počtu buněk právě v tavených sýrech s 30 % tuku v sušině. Vyšší obsah tuku zde zřejmě zapříčinil prodloužení lag-fáze. Po delší době skladování však již došlo k poklesu počtu těchto bakterií a po 140 dnech skladování byl právě u tohoto modelového vzorku počet testovaných bakterií nejnižší (obr. 1). U žádného z testovaných vzorků této etapy nebyly v průběhu skladování zaznamenány změny hodnot vodní aktivity a pH, které zůstávaly v rozmezí hodnot příznivých pro růst studovaných bakterií.

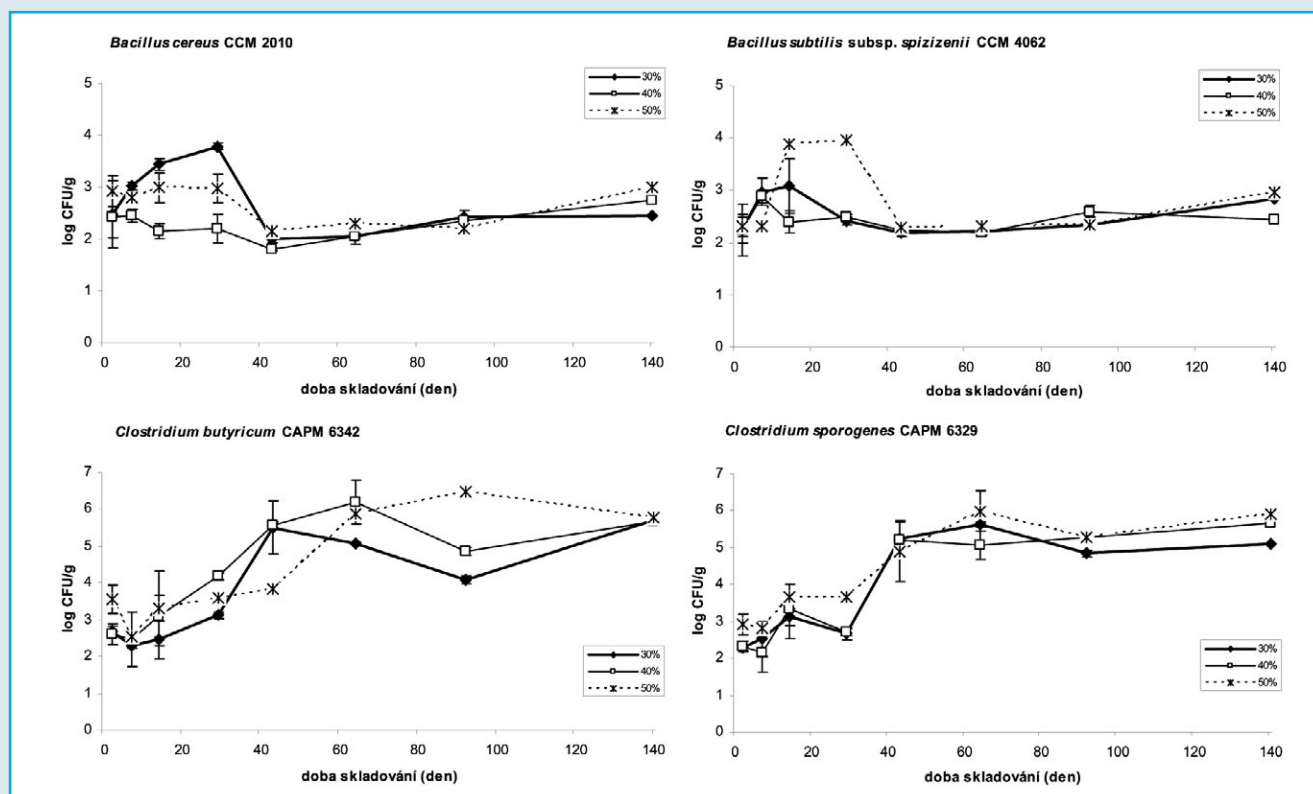
Růst bakterií v tavených sýrech s přidavkem monoacylglycerolu kyseliny undekanové

V posledních letech byly publikovány četné studie zaměřené na inhibiční účinky monoacylglycerolů. Antibakteriální aktivita těchto látek se liší v závislosti na charakteru mastné kyseliny vázané na glycerol, tedy na délce uhlíkového řetězce mastné kyseliny, počtu a poloze dvojných vazeb²¹. Většina studií je zaměřena na monoacyl-

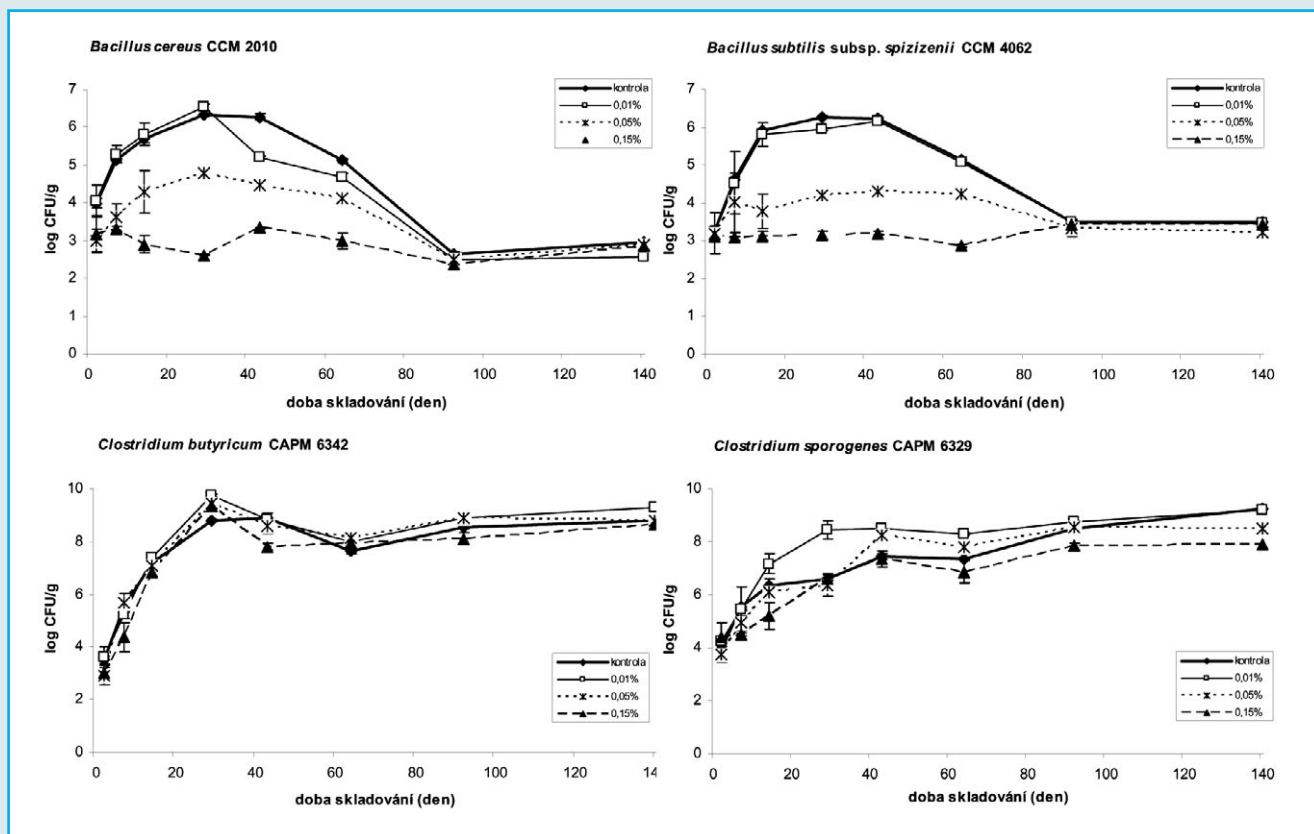
glyceroly kyselin se středně dlouhým řetězcem a sudým počtem uhlíků. Buňková a kol.⁸ ale prokázali značnou účinnost monoacylglycerolů s lichým počtem uhlíků v podmínkách *in vitro*, zejména monoacylglycerolu kyseliny undekanové (MAG C11:0). Pro sledování vlivu přidavku MAG C11:0 na růst studovaných mikroorganismů byly vyrobeny tavené sýry s obsahem tuku v sušině 50 % (w/w). Během tavení, společně s tavicími solemi byla přidána vypočtená navážka MAG, tak aby bylo dosaženo testovaných koncentrací 0,01, 0,05 a 0,15 % w/w. Dynamika růstu sporulujících bakterií v přítomnosti MAG C11:0 je znázorněna na obrázku 2.

V případě *B. cereus* a *B. subtilis* nebyly pozorovány významné rozdíly mezi růstem v kontrolních vzorcích tavených sýrů bez přidavku MAG C11:0 a vzorcích s monoacylglycerolem v nejnižší testované koncentraci 0,01 %. V těchto vzorcích se zvyšoval počet mikroorganismů během prvních 30-ti dnů skladování, poté počet buněk klesal až do 90. dne, kdy se ustálil na hodnotách nepřevyšujících 3,5 log CFU/g. U vzorků obsahujících MAG C11:0 v koncentraci 0,05 % lze hovořit o částečné inhibici růstu se snížením hodnot log CFU/g o jeden až dva logaritmické řády během prvních 80-ti dnů skladování. Ve vzorcích sýrů s přidavkem 0,15 % MAG C11:0 nedošlo k výraznějším změnám v počtu bakterií během celého skladovacího pokusu a hodnoty celkového počtu mikroorganismů kolísaly kolem počáteční hodnoty. Nejvyšší testovaná koncentrace 0,15 % w/w MAG C11:0 tedy zabránila růstu obou kmenů testovaných bacilů. Kompletní inhibici růstu *B. cereus* a *B. subtilis* uvádí ve své práci i Buňková a kol.⁸, kdy během 24 hodinové kultivace v živném médiu

Obr. 1 Vliv obsahu tuku na růst sporulujících bakterií v tavených sýrech



Obr. 2 Vliv přídavku MAG C11:0 na růst sporulujících bakterií v tavených sýrech



se 100 µg/ml MAG C11:0 nebyl zaznamenán růst žádné z testovaných bakterií rodu *Bacillus*. Účinek MAG C11:0 na růst klostridií byl odlišný, nejnižší testovaná koncentrace 0,01 % dokonce mírně stimulovala růst *C. sporogenes*, zejména v první polovině doby skladování. Podle Altieri a kol.⁷ může být zvýšený nárůst bakteriálních buněk v přítomnosti MAG důsledkem zvýšení permeability cytoplazmatické membrány a následné rychlejší výměny látek a živin mezi bakteriální buňkou s okolním prostředím. Průběh růstové křivky *C. sporogenes* v přítomnosti 0,05 % MAG C11:0 je téměř shodný s růstovou křivkou kontrolního vzorku a tato koncentrace nemá tedy téměř žádný vliv na dynamiku růstu klostridií v tavených sýrech. Nejvyšší testovaná koncentrace 0,15 % vykazovala částečnou inhibici růstu a na konci skladovacího pokusu byl rozdíl v počtu buněk mezi tímto vzorkem a vzorkem bez přídavku MAG C11:0 1,36 log CFU/g. U *C. butyricum* byla situace podobná, nižší koncentrace MAG C11:0 měly mírný stimulační účinek a ani při nejvyšší použité koncentraci nebyl zaznamenán výraznější pokles počtu buněk ve vzorcích tavených sýrů. Během 140-ti dní skladování nedošlo k výraznější změně pH a vodní aktivity vzorků, jejichž hodnoty odpovídaly přijatelnému rozmezí pro růst bakterií rodu *Bacillus* a *Clostridium*. Rovněž nebyla zpozorována žádná změna barvy, vůně či konzistence tavených sýrů.

Závěr

Z výsledků experimentů vyplývá, že obsah tuku ovlivňuje růst a množení sporulujících bakterií v tavených sýrech. Sýry s nižším obsahem tuku jsou pro bakterie méně příznivým prostředím ve srovnání se sýry o vyšší tučnosti. Přídavek monoacylglycerolu kyseliny undekanové v koncentraci 0,01 % w/w nemá inhibiční účinky na studované sporulující bakterie, vyšší koncentrace 0,05 % w/w vedla k částečné inhibici růstu *B. cereus* a *B. subtilis*. MAG C11:0 v koncentraci 0,15 % w/w zabránil růstu obou kmenů bacilů a mírně potlačil růst studovaných klostridií. Hodnoty pH a vodní aktivity modelových tavených sýrů nebyly ovlivněny přídavkem monoacylglycerolu a po celou dobu skladování zůstaly prakticky nezměněny.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory projektu MŠMT ČR MSM7088352101 a interního grantu UTB ve Zlíně č. IGA/20/FT/10/D financovaného z prostředků specifického vysokoškolského výzkumu.

Literatura je k dispozici u autorů.

Přijato do tisku 15. 8. 2011

Lektorováno 8. 9. 2011