

TESTOVÁNÍ BIFIDOBAKTERIÍ NA CITLIVOST VŮČI ANTIMIKROBIÁLNÍM LÁTKÁM

Gabriela Kunová^{1,2}, Adrien Vidaillac³, Šárka Ročková²,
Vojtěch Rada², Ivana Lisová¹

¹ - Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

² - Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky,
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů,
Česká zemědělská univerzita v Praze

³ - Oddělení kvality a zdravotní bezpečnosti potravin a výživy,
Univerzita Bordeaux Sciences Agro, Bordeaux, Francie

Susceptibility of bifidobacteria against antimicrobial substances

Abstrakt

Soubor izolátů bifidobakterií byl otestován na citlivost, resp. rezistenci k antimikrobiálnímu enzymu lysozymu (koncentrace 400 a 1000 µg/ml) a k deseti terapeuticky významným antibiotikům (ampicilin, vankomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erytromycin, klindamycin, quinupristin/dalfopristin, tetracyklin a chloramfenikol). Citlivost bifidobakterií k lysozymu se lišila. Druhy *Bifidobacterium bifidum* a *Bifidobacterium longum* izolované ze stolice kojenců a dětí se vyznačovaly větší odolností vůči antimikrobiálnímu působení lysozymu. Naopak, větší citlivost byla zaznamenána u bifidobakterií animálního původu. Všechny testované kmeny bifidobakterií byly citlivé na terapeuticky používaná antibiotika ampicilin, vankomycin, erytromycin, klindamycin, quinupristin (dalfopristin), tetracyklin a chloramfenikol. Vysoký stupeň rezistence bifidobakterií byl zaznamenán u streptomycinu, gentamicinu a kanamycinu. U této skupiny aminoglykosidových antibiotik se jedná o rezistenci přirozenou pro daný bakteriální rod a nepředstavuje nebezpečí.

Klíčová slova: bifidobakterie, lysozym, antibiotická rezistence, antimikrobiální látky, probiotika

Abstract

Strains of *Bifidobacterium* species have been tested for their sensitivity (resistance) to antimicrobial enzyme lysozyme (concentrations of 400 and 1000 µg/ml) and against 10 therapeutically important antibiotics (ampicillin, vankomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erytromycin, clindamycin, quinupristin/dalfopristin, tetracycline and chloramphenicol). Sensitivity of bifidobacteria to lysozyme differed. *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium bifidum* species isolated from faeces of infants and children had higher resistance to the antimicrobial effect of lysozyme. Conversely, higher sensitivity to

lysozyme was observed in bifidobacteria of animal origin. All of bifidobacterial strains tested were sensitive to therapeutically used antibiotics as ampicilin, vankomycin, erytromycin, clindamycin, quinupristin (dalfopristin), tetracycline and chloramphenicol. High degree of resistance among bifidobacteria was observed for streptomycin, gentamicin and kanamycin. For this group of aminoglycoside antibiotics the resistance of *Bifidobacterium* species is intrinsic and for this reason not worrying.

Key words: bifidobacteria, lysozyme, antibiotic resistance, antimicrobial compounds, probiotics

Úvod

Lysozym je antimikrobiální a lytický enzym objevený Flemingem (1922). Přirozeně se vyskytuje v sekretech a buňkách obratlovců, např. slinách, slzách, krvi a dalších tělesných tekutinách. Zvláště bohatým zdrojem lysozymu jsou mateřské mléko a vaječný bílek (Pakkanen a Aalto, 1997). Lysozym působí antimikrobiálně zejména na Gram-pozitivní bakterie a to tím, že narušuje buněčnou stěnu svým hydrolytickým působením na 1,4-β-D-glykosidové vazby N-acetylmuramové kyseliny a N-acetylglukosaminu v peptidoglykánové vrstvě bakteriálních buněčných stěn (Voet a kol., 1995). Lze ale předpokládat, že existují i jiné mechanismy jeho účinku, vzhledem k tomu, že částečně denaturovaný lysozym může mít rovněž antibakteriální účinky (Meyer, 2003).

V současnosti je za účelem komerční extrakce tohoto enzymu nejvíc využíván bílek ze slepičích vajec, kde je lysozym vedlejším produktem při výrobě vaječného albuminu (Meyer, 2003). Lysozym slepičího bílku (HEWL - hen egg white lysozyme) je současně enzym, u kterého je nejlépe prostudován mechanismus účinku. V rámci Evropské Unie má HEWL status potravinářské přídatné látky pod kódem E 1105 (Směrnice 95/2/ES). Praktické využití má lysozym v sýrařství, a to při prevenci germinace spor *Clostridium tyrobutyricum* (Šviráková a kol., 2006), nebo také při výrobě vína, kde přídatek lysozymu významně přispívá ke stabilizaci vín a umožňuje výrobu vín se sníženým obsahem oxidu siřičitého (Nařízení komise ES č. 423/2008).

EFSA (European Food Safety Authority) požaduje testování antibiotické rezistence vůči deseti antibiotikům, které se využívají v humánní a veterinární medicíně. Jedná se konkrétně o ampicilin, vankomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erytromycin, klindamycin, quinupristin/dalfopristin, tetracyklin a chloramfenikol (EFSA, 2008). V technických pokynech z 18. června 2008 jsou definovány minimální inhibiční koncentrace (MIC) vybraných bakteriálních rodů, příp. druhů. Důležité je pak také rozlišovat, zda se jedná o rezistenci získanou, nebo přirozenou (vlastní) pro daný rod příp. druh. O přirozené rezistenci mluvíme v případě, kdy rezistence vůči danému antimikrobiálnímu agens je typická pro všechny kmeny daného druhu. Naopak, když kmen typicky vnímavého druhu, je odolný vůči danému antibiotiku, je to považováno

VĚDA, VÝZKUM

Tab. 1 Citlivost kmenů bifidobakterií vůči lysozymu (400 a 1000 µg/ml)

Kmen	druh	původ	400 µg/ml			1000 µg/ml		
			citlivý	částečně citlivý	rezistentní	citlivý	částečně citlivý	rezistentní
CCDM219	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	faeces kojence	-	-	+	-	-	+
CCDM559	<i>B. bifidum</i>	faeces dítěte	-	-	+	-	-	+
CCDM223	<i>B. adolescentis</i>	originální kultura	-	-	+	+	-	-
JOV	<i>B. bifidum</i>	faeces kojence	-	-	+	-	-	+
AVNB3-P1	<i>B. bifidum</i>	GIT dítěte	-	-	+	+	-	-
CCDM562	<i>B. breve</i>	GIT dítěte	-	+	-	+	-	-
CCDM229	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	originální kultura	-	+	-	+	-	-

Tab. 2 Citlivost bifidobakterií vůči antibiotikům

kmen	AMP (10 µg)	VA (5 µg)	GN (10 µg)	K (30 µg)	S (25 µg)	E (15 µg)	DA (2 µg)	QD (15 µg)	TE (30 µg)	C (30 µg)
<i>B. bifidum</i> JOV	S	S	S/R	R	R	S	S	S	S	S
<i>B. bifidum</i> AVNB3-P1	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> CCDM 219	S	S	S/R	R	R	S	S	S	S	S
<i>B. adolescentis</i> CCDM 223	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> CCDM 229	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
<i>B. bifidum</i> CCDM 559	S	S	S/R	R	R	S	S	S	S	S
<i>B. bifidum</i> JKM	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
<i>B. breve</i> CCDM 562	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 94	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S

R - rezistentní (průměr inhibiční zóny < 12 mm), S - citlivé (průměr inhibiční zóny > 16 mm), R/S - částečně citlivé (průměr inhibiční zóny 12-16 mm)

AMP - ampicilin, VA - vankomycin, GN - gentamicin, K - kanamycin, S - streptomycin, E - erytromycin, DA - klindamycin, QD - quinupristin/dalfopristin, TE - tetracyklin, C - chloramfenikol

za získanou rezistencí (EFSA, 2008). K získávání rezistence dochází prostřednictvím mutací původních genů nebo horizontálním přenosem (Ammor a kol., 2008). Příkladem horizontálního přenosu je např. přenos genů kódujících rezistenci prostřednictvím plasmidů (extrachromozomální DNA) z jedné bakteriální buňky do druhé konjugací (Grohmann a kol., 2003). Rychlý vývoj bakteriální rezistence je odevzvo na rozsáhlé používání antibiotik a potraviny jsou obecně považovány za nejdůležitější vektor při šíření rezistence mezi člověkem a zvířaty (Molbak, 2004). V současnosti představuje nárůst antibiotické rezistence závažný problém. Podle dostupných literárních údajů, každoročně podlehne infekcím způsobených rezistentními kmeny bakterií v krajinách Evropské Unie kolem 25 000 pacientů (WHO, 2011).

Cílem práce bylo otestovat soubor kmenů bifidobakterií na citlivost, resp. rezistenci vůči antimikrobiálnímu enzymu lysozymu a deseti terapeuticky důležitým antibiotikům, jejichž testování požaduje EFSA.

Materiál a metodika

Použité kmeny

Na testování byly použity kmeny pocházející ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora® (CCDM - Culture Collection of Dairy Microorganisms) a kmeny z Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky, ČZU v Praze.

Testování citlivosti vůči lysozymu

Na testování tolerance kmenů bifidobakterií (tabulka 1) vůči lysozymu byl použit lysozym získaný z vaječného bílku (Sigma-Aldrich, ČR), koncentrace 400 a 1000 µg/ml.

Testování se provádělo v MRS bujónu o pH 6,2 s přidavkem 0,05% *L*-cystein hydrochloridu za použití metodiky podle Rada a kol. (2010). Bujón byl inokulován suspenzí příslušného kmene v exponenciální fázi růstu ve třech zkumavkách, které byly následně inkubovány při teplotě 37 °C v anaerostatech (Oxoid, UK). Po první hodině inkubace byl do jedné ze zkumavek přidán lysozym o koncentraci 400 µg/ml, do druhé zkumavky byl přidán lysozym o koncentraci 1000 µg/ml a třetí zkumavka sloužila jako kontrola (bez přidavku lysozymu). Růstové křivky byly stanovovány každou hodinou, densitometricky, přístrojem Densitometer DEN-1 (Dynex, ČR) za pomoci měření absorpance při vlnové délce 540 nm. Veškerá měření byla prováděna dvojmo a výsledky byly vyhodnoceny v programu MS Excel 2007 (Microsoft, USA).

Testování citlivosti vůči antibiotikům

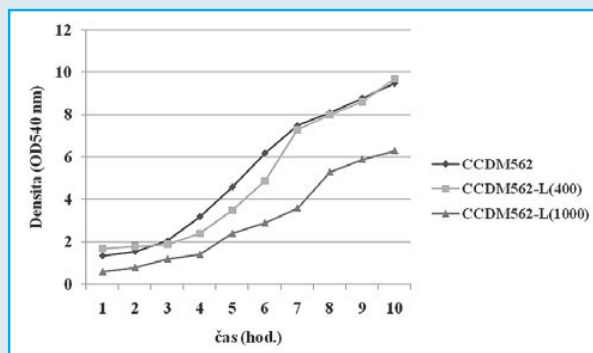
Citlivost devíti kmenů bifidobakterií (tabulka 2) na antibiotika byla testována plotnovou, diskovo-difúzní metodou, která využívá difúzní vlastnosti antibiotik z papírových disků. Bylo použito 10 antibiotik, které doporučuje k testování EFSA (EFSA, 2008) konkrétně, ampicilin (10 µg), vankomycin (5 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), streptomycin (25 µg), erytromycin (15 µg), klindamycin (2 µg), quinupristin/dalfopristin (15 µg), tetracycline (30 µg) a chloramfenikol (30 µg, všechna antibiotika Oxoid, UK). Na testování se použil MRS agar o pH 6,2 s přidavkem 0,05% *L*-cystein hydrochloridu. Půda byla rozlita na Petriho misky. Po zatuhnutí byla na povrch následně aplikována rozřem suspenze příslušného kmene (0,1 ml) v exponenciální růstové fázi. Následně byly naneseny pomocí sterilní pinzety

na povrch agaru papírové disky s příslušným antibiotikem. Misky byly kultivovány anaerobně při teplotě 37 °C po dobu 48 až 72 hod. Následně byla odečtena velikost inhibiční zóny v mm, na základě které byly kmeny klasifikovány jako rezistentní (průměr inhibiční zóny < 12 mm), částečně citlivé (průměr inhibiční zóny 12-16 mm) nebo citlivé (průměr zón > 16 mm) k příslušnému antibiotiku. Výsledky představují průměr ze tří uskutečněných stanovení.

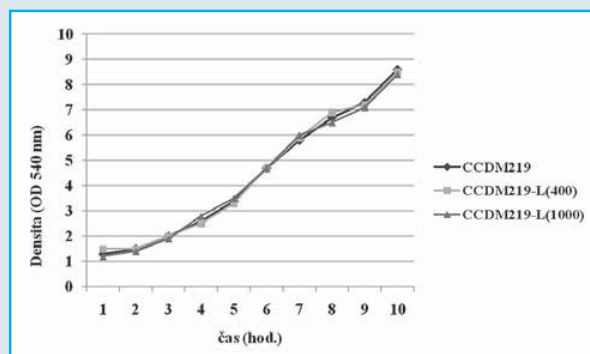
Výsledky a diskuse

Vliv přidavku lysozymu na růst testovaných kmenů bifidobakterií je shrnut v tabulce 1. Sledovány byly dvě koncentrace lysozymu, a to 400 a 1000 µg/ml. Inhibiční vliv lysozymu se projevil zpomalením bakteriálního růstu a byl porovnáván s kontrolou (bez přidavku lysozymu). Pět ze sedmi kmenů bylo rezistentních vůči použité koncentraci 400 µg/ml, tj. přidavek lysozymu neměl vliv na jejich růst ve srovnání s kontrolou. U dalších dvou kmenů bylo po přidavku lysozymu o koncentraci 400 µg/ml pozorováno mírné opoždění exponenciální růstové fáze a jejich růstové křivky byly ve srovnání s kontrolou mírně ovlivněny (graf 1). Při vyšší použité koncentraci (1000 µg/ml), byl pozorován podle očekávání i větší rozdíl v citlivosti bifidobakterií. Čtyři ze sedmi kmenů byly klasifikovány jako citlivé, a to na základě toho, že po přidavku lysozymu došlo okamžitě k výrazné inhibici bakteriálního růstu (graf 1). U dalších tří kmenů nedošlo k ovlivnění jejich růstových křivek a byly kategorizovány jako rezistentní.

Celkově pak lze shrnout, že 3 kmeny (*B. longum* subsp. *longum* a 2 kmeny *B. bifidum*) byly zcela rezistentní vůči lysozymu, 2 kmeny (*B. adolescentis* a *B. bifidum*) byly rezistentní vůči koncentraci 400 µg/ml, ale citlivé vůči koncentraci 1000 µg/ml. Kmeny *B. breve* a *B. animalis* subsp. *animalis* byly již částečně citlivé i vůči nižší testované koncentraci a úplně citlivé při vyšší použité koncentraci. Je možné konstatovat, že humánní kmeny *B. bifidum* a *B. longum*, izolované ze stolice kojenců a dětí, se vyznačovaly větší odolností vůči antimikrobiálnímu působení lysozymu. Naopak větší citlivost byla pozorována u bifidobakterií animálního původu.



Graf 1 Vliv lysozymu na růst kmene *B. breve* (částečně citlivý ke koncentraci 400 µg/ml a citlivý ke koncentraci 1000 µg/ml)



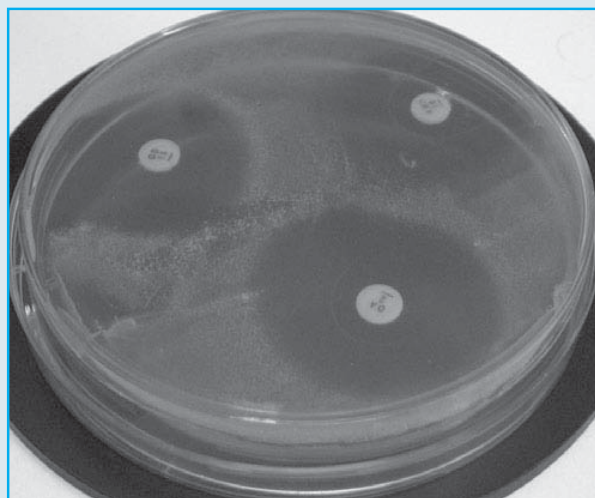
Graf 2 Vliv lysozymu na růst kmene *B. longum* subsp. *longum* (rezistentní vůči lysozymu)

Citlivost (resp. rezistence) bifidobakterií vůči působení lysozymu se liší a jejich citlivost se jeví jako kmenově i druhově specifická. Vliv na jejich citlivost mohou mít i různé vnější vlivy, jako např. teplota média, růstová fáze, spolupůsobení dalších enzymů apod. Známý je např. synergický antibakteriální účinek lysozymu a nisinu, který se vzájemně doplňuje. Nejdříve působí lysozym, který naruší buněčnou stěnu a následně do buňky projdou molekuly nisinu a dojde k buněčné lysi (Šviráková a kol., 2006). Neujahr a kol. (1973) testovali vliv lysozymu na kmen *Lbc. fermentum* v závislosti na růstové fázi a konstatovali, že buňky nacházející se v stacionární fázi byly odolné vůči lysozymu. Naopak, nejvyšší citlivost byla zaznamenána u buněk nacházejících se mezi střední exponenciální a časně stacionární fázi růstu.

U probiotických bakterií je rezistence vůči lysozymu žádoucí, někteří autoři dokonce doporučují testování citlivosti vůči lysozymu jako jedno z kritérií při výběru nových potenciálně probiotických kmenů (Cardarelli a kol., 2007; Rada a kol., 2010). Podobně u bakterií mléčného kysání (BMK), které se využívají v mlékařském průmyslu je jejich rezistence vůči lysozymu hodnocena pozitivně. Obecně lze říct, že testované bifidobakterie tolerovaly lysozym dobře. Jen dva kmeny byly kategorizovány jako částečně citlivé vůči koncentraci 400 µg/ml, což je nejvyšší koncentrace lysozymu zachycena v mateřském mléce (Clare a kol., 2003).

Antibiotický profil potenciálních probiotik je testován z hlediska bezpečnosti jejich použití, aby nedocházelo k přenosu rezistence prostřednictvím zejména extrachromozomální DNA. Všechny námi testované kmeny bifidobakterií byly citlivé na ampicilin, vankomycin, erytromycin, klindamycin, quinupristin (dalfopristin), tetracyklin a chloramfenikol. Inhibiční působení těchto antibiotik se projevilo vytvořením inhibičních zón kolem disků (obrázek 1). Je to pozitivní fakt z hlediska toho, že se tato antibiotika využívají jako terapeutická. Podle literárních údajů, některé BMK (zejména heterofermentativní laktobacily) mohou vykazovat přirozenou rezistenci na vankomycin (Hamilton-Miller a kol., 1998). Bifidobakterie, laktokoky a obligátně homofermentativní laktobacily jsou však ve většině případů na vankomycin citlivé

VĚDA, VÝZKUM



Obr. 1 Inhibiční zóny kolem antibiotických disků (quinupristin/dalfopristin, ampicilin a klindamycin) u kmene *B. bifidum* CCDM 559

(Ammor a kol., 2008; Delgado a kol., 2005), což se u námi testovaného souboru bifidobakterií potvrdilo. Poměrně častá je také přítomnost genu kódujícího rezistenci vůči tetracyklinu a to, jak u rodu *Bifidobacterium*, tak u ostatních BMK (Aires a kol., 2007; Flórez a kol., 2005). Rezistence vůči tetracyklinu u našeho souboru kmenů pozorována nebyla.

Vysoký stupeň rezistence bifidobakterií (100%) byl zaznamenán v případě aminoglykosidového antibiotika streptomycinu. Rezistence k tomuto antibiotiku je poměrně rozšířena a dá se předpokládat, že se jedná o rezistenci přirozenou a z tohoto důvodu není znepokojující. Zvláště vysoké minimální inhibiční koncentrace (MIC) byly zaznamenány u druhu *B. bifidum* (Ammor a kol., 2008). U dalších dvou testovaných antibiotik ze skupiny aminoglykosidů, tj. u kanamycinu a gentamicinu byl zaznamenán podobně, jako v případě streptomycinu, vysoký stupeň rezistence. U kanamycinu 100% a v případě gentamicinu byly dva kmeny *B. bifidum* a kmen *B. longum* subsp. *longum* částečně citlivé. Vyšší přípustné MIC (EFSA, 2008) u této skupiny antibiotik nasvědčují tomu, že je možné očekávat vyšší výskyt rezistence a s největší pravděpodobností se bude jednat o rezistenci přirozenou.

Bifidobakterie jsou přirozenou součástí gastrointestinálního traktu, jsou často používány jako probiotika a mají status GRAS (Generally Recognized As Safe). Vzhledem k jejich využívání v potravinářství, se kromě jiného vyžaduje, aby byly testovány na citlivost k antibiotikům a zabránilo se tím šíření determinantů odpovědných za antibiotickou rezistenci (Delgado a kol., 2005). Podle dostupných údajů (Ammor a kol., 2008), je zaznamenán zvýšený výskyt antibiotické rezistence i u této skupiny užitečných bakterií. Bakterie střevní mikroflóry člověka a zvířat mohou působit jako rezervoár genů rezistence, které by mohly být v konečném důsledku přeneseny i na patogeny (Salyers a kol., 2004).

Kvalitativní nebo semi-kvantitativní metody k určení MIC nepřímou (např. i difuzní metoda), jsou na testování obecně nepřijatelné. Nicméně, použití těchto metod pro sledování antibiotické rezistence EFSA připouští u rodu *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Propionibacterium* sp. a *Leuconostoc* sp. (EFSA, 2008). Jedním z důvodů je možná interference s růstovým médiem, což může testování komplikovat (Klare a kol., 2005; Huys a kol., 2008). Námi použitá plotnová metoda spolehlivě potvrdila citlivost testovaného souboru kmenů vůči požadovaným antibiotikům.

Závěr

Rezistence vůči lysozymu a citlivost k terapeuticky významným antibiotikům jsou důležité z hlediska možného použití kmenů jako potenciálních probiotik. Testované bifidobakterie tolerovaly lysozym dobře a byly citlivé na působení antibiotik, kromě aminoglykosidových antibiotik (streptomycinu, gentamicinu a kanamycinu). V tomto případě se však jedná o přirozenou vlastnost pro rod *Bifidobacterium*.

Poděkování

Tato práce byla uskutečněna s podporou projektu č. QJ1210093 Mze ČR, NAZV a grantu z Danone Institutu.

Literatura

- Aires, J., Doucet-Populaire, F., Butel, M.J. (2007): Tetracycline resistance mediated by *tet(W)*, *tet(M)* and *tet(O)* genes of *Bifidobacterium* species from human isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 2751-2754.
- Ammor, M.S., Florez, A.B., van Hoek, A.H.A.M., de los Reyes-Gavilán, C.G., Aarts, H.J.M., Margolles, A., Mayo, B. (2008): Molecular Characterization of Intrinsic and Acquired Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *J. Molecul. Microbiol. Biotechnol.*, 14: 6-15.
- Cardarelli, H.R., Saad, S.M., Gibson, G.R., Vulevic, J. (2007): Functional petit-suisse cheese: measure of the prebiotic effect. *Anaerobe*, 13: 200-207.
- Clare, D.A., Gatignani, G.L., Swaisgood, H.E (2003): Biodefense properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides. *Curr. Pharm. Des.*, 9: 1239-1255.
- Delgado, S., Florez, A.B., Mayo, B. (2005): Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. *Curr. Microbiol.*, 50: 202-207.
- Fleming, A. (1922): On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proceedings of Royal Society B.*, 93: 306-317.
- Flórez, A.B., Delgado, S., Mayo, B. (2005): Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Can. J. Microbiol.*, 51: 51-58.
- Grohmann, E., Muth, G., Espinosa, M. (2003): Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67: 277-301.
- Hamilton-Miller, J.M., Shah, S. (1998): Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli. *Lett. Appl. Microbiol.*, 26: 153-115.
- Huys, G., D'Haene, K., Danielsen, M., Mättö, J., Egervärn, M., Vandamme, P. (2008): Phenotypic and molecular assessment of antimicrobial resistance in *Lactobacillus paracasei* strains of food origin. *J. Food Protect.*, 71: 339-344.
- Klare, I., Konstabel, C., Muller-Bertling, S., Reissbrodt, R., Huys, G., Vancanneyt, M., Swings, J., Goossens, H., Witte, W. (2005): Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of lactobacilli, pediococci, lactococci and bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 8982-8986.
- Meyer, A.S. (2003): Antimicrobial enzymes. V: Zeuthen, P., Sorensen, L.B.: Food preservation techniques. Woodhead publishing, Cambridge: 49-70.

- Molbak, K. (2004): Spread of Resistant Bacteria and Resistance Genes from Animals to Humans - The Public Health Consequences. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*, 51: 364-369.
- Nařízení Komise ES č. 423/2008 ze dne 8. května 2008, kterým se stanoví některá prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 1493/1999 a kterým se zavádí kodex Společenství pro enologické postupy a ošetření.
- Neujahr, H.Y., Borstad, B., Logardt, I.M. (1973): Factors affecting the resistance of *Lactobacillus fermenti* to lysozyme. *J. Bacteriol.*, 116: 694-698.
- Pakkanen, R., Aalto, J. (1997): Review Paper: Growth Factors and Antimicrobial Factors of Bovine Colostrum. *Int. Dairy J.*, 7: 285-297.
- Rada, V., Šplíchal, I., Ročková, Š., Grmanová, M., Vlková, E. (2010): Susceptibility of bifidobacteria to lysozyme as a possible selection criterion for probiotic bifidobacterial strains. *Biotechnol. Lett.*, 32, 3: 451-455.
- Salys, A.A., Gupta, A., Wang, Y. (2004): Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol.*, 12: 412-416.
- Směrnice Evropského parlamentu a Rady 95/2/ES ze dne 20. února 1995 o potravinářských přídatných látkách jiných než barviva a náhradní sladidla. *Úřední věstník Evropské unie*, L 61.
- Šviráková, E., Ostapčuk, R., Tichovský, P., Ploková, M. (2006): Vliv kombinace lysozymu a laktokoků produkujících nisin na růst *Bacillus cereus* DMF 2001 v modelovém systému tvarohu. *ML listy-zpravodaj*, 99: 18-23.
- The EFSA Journal (2008): Technical Guidance, Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance, 732: 1-15.
- Voet, D., Voetova, G. (1995): Enzymová katalýza. V: Biochemie. Victoria publishing, Praha, 1995: 390-431.
- World Health Organization (2011): Introduction- Antibiotic resistance as a global threat. V: Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. WHO, Regional Office for Europe, ISBN 978 92 890 1421 2: 1-5.

Kontaktní informace:

MVDr. Gabriela Kunová, VÚM s.r.o., Ke Dvoru 12a,
160 00 Praha 6, HYPERLINK kunova@milcom-as.cz,
tel.: 235 354 551

Lektorováno dne 26. 10. 2012
Přijato k tisku dne 7. 12. 2012

VLIV PASTERACE A ZAMRAŽENÍ NA OBSAH LIPOFILNÍCH VITAMINŮ V MLÉČE

Michlová Tereza¹, Hejtmánková Alena¹, Pivec Vladimír¹,
Dragounová Hedvika², Hejtmánková Kateřina¹,
Elich Ondřej²

¹ Katedra chemie, Fakulta agrobiologie, potravinových
a přírodních zdrojů, ČZU

² Výzkumný ústav mlékařský s.r.o.

Effects of pasteurization and refrigeration on contents of lipophilic vitamins in milk

Abstrakt

Byl sledován vliv pasterace a následného krátkodobého skladování v mrazicím boxu při teplotě -20 °C na změnu obsahu vitamínu E a A v kozím a ovčím mléce. Vitaminy byly stanoveny metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. K detekci vitamínu E byl použit fluorescenční

detektor, ke stanovení vitamínu A detektor diodového pole. Průměrný obsah vitamínu A v kozím čerstvém mléce byl $112 \pm 38 \mu\text{g}/100 \text{ g}$, resp. $119 \pm 61 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ v čerstvém ovčím mléce. Vitamin E byl průměrně z $96,7 \pm 3,6 \%$ zastoupen α -tokoferolem. Průměrný obsah α -tokoferolu v kozím čerstvém mléce byl $183 \pm 12 \mu\text{g}/100 \text{ g}$, resp. $382 \pm 185 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ v čerstvém ovčím mléce. Úbytek sledovaných vitaminů v důsledku pasterace byl velmi rozdílný a pohyboval se v rozmezí 0 - 64,8 %. Po týdenním skladování v mrazicím boxu klesl obsah obou vitaminů v průměru o 22 % v mléce čerstvém, resp. o 29 % v mléce pasterovaném a i nadále klesal strměji v mléce pasterovaném. Po třítýdenním skladování dosáhl průměrný pokles vitaminů v pasterovaném mléce 41 %. Předběžné výsledky naznačují, že obsah obou vitaminů v čerstvém mléce i míra poklesu jejich obsahu během skladování v mrazicím boxu souvisí s tučností mléka a pokles obsahu vitaminů je na rozdíl od jejich celkového množství nižší v mléce s vyšším podílem tuku. K ověření dosažených výsledků bude této problematice věnována pozornost i v následujícím roce.

Klíčová slova: pasterace, zamražení, vitamin E, vitamin A, HPLC

Abstract

Effects of pasteurization and subsequent short-term storage in clima box at - 20 °C on changes of vitamins E and A in goat's and sheep's milk were observed. Both vitamins were determined using HPLC technique. Vitamin E was detected using fluorimetric detection and vitamin A using diode array detection respectively. The average content of vitamin A in fresh goat's milk was $112 \pm 38 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ and $119 \pm 61 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ in fresh sheep's milk. Vitamin E was formed by α -tocopherol from $96.7 \pm 3.6 \%$. The average content of α -tocopherol in fresh goat's milk was $183 \pm 12 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ and $382 \pm 185 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ in fresh sheep's milk. Vitamins decrease during pasteurization varied in broad range 0 - 64.8 %. Another 22 % of both vitamins in fresh milk and 29 % in pasteurized milk were lost during one-week storage in clima box at - 20 °C. Contents of both vitamins decreased steeper in pasteurized milk compared to fresh milk also in subsequent storage. The average decrease of vitamins in pasteurized milk after three weeks of storage was 41 %. Tentative results indicate that contents of both vitamins in fresh milk and also ratio of decrease during short-term storage are primarily influenced by milk fatness. Total amount of both vitamins is higher in fatter milk and their decrease during pasteurization and storage is higher in milk with lower fat content in contrast. Further attention for results confirmation will be devoted to this issue during next year.

Key words: pasteurization, refrigeration, vitamin E, vitamin A, HPLC

Úvod

Pro průmyslové zpracování a lidskou výživu se využívá především mléko kravské, celosvětově asi 85 %¹. Díky