

VĚDA, VÝZKUM

Lafti L-26 vyšší, a to o 1,1 řádu resp. 1,3 řádu. Tyto výsledky jsou shodné s výsledky Charalampopoula a Pandielly (2010), kteří zaznamenali pokles počtu buněk kmene *L. plantarum* NCIMB 8826 při skladování ve zfermentovaném 5 % hm. sladovém roztoku o 1,5 řádu.

Stabilita kmenů *L. acidophilus* CCDM 151 a *L. casei* CCDM 198 v mléce obohaceném mléčnou složkou (5 % hm. sušené syrovátky, 5 % hm. syrovátkového bílkovinného koncentrátu a 5 % hm. kaseinomakropeptidu), byla stejně, jako u kmene *L. casei* Lafti L-26, vysoká. Pokles počtu buněk (log KTJ/ml) se pohyboval v rozmezí 0,5 až 1,3 řádu. Výsledky jsou shodné s výsledky Dava a Shaha (1998), kteří uvádějí, že pokles životaschopných buněk kmene *L. acidophilus* kultivovaných v mléce s 2 hm. % sušené syrovátky či syrovátkového bílkovinného koncentrátu po 25 dnech skladování při 4 °C nebyl větší než 0,5 - 1 řád.

Nižší stabilita kmenů *L. acidophilus* CCDM 151 a *L. casei* CCDM 198 byla v průběhu skladování zjištěna v mléce s přídavkem Sladovitu i sladu. Během 28denního skladování byl zaznamenán pokles počtu životaschopných buněk kmene *L. acidophilus* CCDM 151 o 2,7 - 3,0 řády. Pokles počtu buněk *L. casei* CCDM 198 se při skladování ve zmíněných médiích pohyboval v rozmezí o 2,5 až 4,4 řádu. Ve zfermentovaném mléce byl zjištěn pokles buněk těchto kmenů o 1,7 a 1,2 řádu. Výsledky poklesu počtu buněk při skladování zfermentovaného mléka se shodují s výsledky dosaženými Guiemondem a kol. (2004). Helland a kol. (2004) ve své studii věnované růstu a metabolismu probiotických laktobacilů v cereálním pudinku s mléčným a vodným základem rovněž uvedl, že jako jediný z pěti testovaných kmenů laktobacilů, který byl schopný přežít skladovací proces (21 dní při 4-6 °C) v množství větším než 10⁸, byl kmen *L. rhamnosus* GG, u ostatní kmenů došlo k poklesu KTJ/ml až o 3,3 řádu.

Během skladování nebyly zaznamenány výrazné změny pH, v médiích tedy nedošlo k postacidifikačním změnám. Hodnota aktivní kyselosti se během skladování měnila jen maximálně o 2 desetiny jednotek. Naměřený pokles pH je nižší, než pokles zaznamenaný v práci Dava a Shaha (1998) při skladování mléka s přídavkem 2 % hm. syrovátkových bílkovin či kaseinomakropeptidu zfermentovaného jogurtovou kulturou. Na konci skladovacího procesu se hodnoty pH některých médií i mírně zvyšovaly.

Skladovací testy prokázaly stabilitu kmene *L. casei* Lafti L-26 v průběhu 28denního skladování. Počet buněk tohoto kmene ve všech typech médií klesl pouze o max. 1,3 řádu ve srovnání s hodnotami na počátku skladování. Bylo prokázáno, že v mléce s přídavkem sladu a Sladovitu docházelo k vyššímu úbytku živých buněk kmenů *L. acidophilus* CCDM 151 a *L. casei* CCDM 198 v porovnání s mlékem či mlékem s přídavkem mléčných složek. I když jsou laktobacily obecně tolerantní k nízkému pH prostředí, může být nižší hodnota pH mléka se Sladovitem nebo sladem příčinou nižší stability buněk.

Práce byla podpořena grantem Ministerstva zemědělství ČR č. QI101B090.

Literatura

- ANTUNES A. E., CAZETTO T. F., BOLINI H. M. A.: Viability of probiotic micro-organisms during storage, post acidification and sensory analysis of fat-free yoghurts with added whey protein concentrate. *International Journal of Dairy Technology* 58, 169-173 (2005).
- DAVE R. I., SHAH N. P.: Ingredients supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *Dairy Science* 81, 2804-2816 (1998).
- DEMIRBAS A.: β -glucan and mineral nutrient content of cereals grown in Turkey. *Food Chemistry* 90, 773 - 777 (2005).
- CHARALAMPOPOULOS D., PANDIELLA S. S.: Survival of human derived *Lactobacillus plantarum* in fermented cereal extracts during refrigerated storage. *LWT - Food Science and Technology* 43, 431 - 435 (2010).
- CHARALAMPOPOULOS D., PANDIELLA S. S., WEBB C.: Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extract on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic condition. *International Journal of Food Microbiology* 82, 133-141 (2003).
- GUEIMONDE M., DELGADO S., MAYO B., RUAS-MADIEDO P., MARGOLLES A., DE LOS REYES-GAVILAN C.G.: Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Research International Journal* 37, 839 - 850 (2004).
- HELLAND M. H., WICKLUND T., NARVHUS J.A.: Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk- and water-based cereal puddings. *International Dairy Journal* 14, 957-965 (2004).
- KRISSANSEN G. W.: Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. *Journal of the American College of Nutrition* 26, 713 - 723 (2007).
- LUCAS A., SODINI I., MONNET C., JOLIVET P., CORRIEU G.: Probiotic cell counts and acidification in fermented milk supplemented with milk protein hydrolysate. *International Dairy Journal* 14, 47 - 53 (2004).
- RIVERA-ESPINOZA Y., GALLARDO-NAVARRO Y.: Non - dairy probiotic product. *Food Microbiology* 27, 1 - 11 (2010).
- SULLIVAN S. T., KHAN S. A., EISSA A. S.: Whey proteins: Functionality and Foaming under Acidic Conditions. V knize: *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*, kap. 5, s. 99, Wiley-Blackwell and The Institute of Food Technology, Iowa (2008).

Lektorováno dne 2. 11. 2012

Přijato k tisku dne 7. 12. 2012

ANTIFUNGÁLNÍ VLASTNOSTI BAKTERIÍ PROPIONOVÉHO KVAŠENÍ

Vladimír Dráb, Eva Suchanová

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Soběslavská 841,
390 02 Tábor, Email: v.drab@vum-tabor.cz,
e.suchanova@vum-tabor.cz

Antifungal properties of propionic acid bacteria

Abstrakt

Tato práce popisuje testování antifungálních účinků 16 kmenů bakterií propionového kvašení vůči vláknitým houbám z rodu *Penicillium*. Výraznější antifungální účinky byly pozorovány při použití živých buněk, než při použití bezbuněčných supernatantů. Pozorován byl rovněž vliv použitého živného média na antifungální aktivitu. Nejcitlivější z testovaných kmenů vláknitých hub bylo *Penicillium nalgiovensis* CCDM 329, nejméně citlivý byl kmen *P. roqueforti* PA1. Nejširší spektrum účinnosti vyka-

zovaly kmeny *Propionibacterium freudenreichii* MAD-8AP a *Propionibacterium acidipropionici* CCM 1859.

Klíčová slova: antifungální aktivita, *Propionibacterium*, *Penicillium*

Abstract

This work deals with the antifungal activity of 16 strains of propionic acid bacteria against fungi from *Penicillium* genus. Higher antifungal effect was found out in the case of propionibacteria viable cells compared to cell-free extracts. Furthermore, the influence of growth medium on antifungal activity was observed. Out of the fungi strains tested, *Penicillium nalgiovensis* CCDM 329 was the most responsive to propionibacteria live cells. Only small sensitivity was detected in the case of *P. roqueforti* PA1. The most broad spektrum of activity showed live cell sof *Propionibacterium freudenreichii* MAD-8AP and *Propionibacterium acidipropionici* CCM 1859.

Úvod

Většina potravin a krmiv je citlivá na kontaminaci vláknitými houbami v různých etapách výroby, zpracování, přepravy a skladování. Klimatické podmínky a podmínky během výroby, přepravy a skladování mohou podpořit růst hub a syntézu mykotoxinů vedoucí ke kažení potraviny nebo její zdravotní závadnosti. Trendem posledních let při výrobě potravin vyvolaným požadavky spotřebitelů je snížení množství či úplná eliminace chemických sloučenin používaných pro konzervaci a ochranu potravin a krmiv a jejich nahrazení přírodními antimikrobiálními látkami. Jednou z možností ochrany potravin před kažením způsobeným vláknitými houbami je použití bakterií mléčného kvašení (BMK) produkujících antifungálně působící metabolity. Studium této tematiky je záležitostí zejména posledních dvou dekád^{1,2,3}. Nejčastěji byly antifungální vlastnosti pozorovány u různých druhů laktobacilů a pediokoků. Existuje pouze několik prací zaměřených na testování antifungálních vlastností bakterií propionového kvašení^{4,5,6}. Cílem této práce bylo zjištění případných antifungálních vlastností u souboru sbírkových kmenů bakterií propionového kvašení a kmenů izolovaných z mléka a mléčných výrobků.

Materiál a metody

Soubor kmenů

V práci byly použity kmeny bakterií propionového kvašení získané z České sbírky mikroorganismů (CCM 1859, 3323, 4902), Sbírký mlékárenských mikroorganismů Laktoflora (CCDM 57, 160, 163, 164, 167, 805, 1005, 1009) a kmeny izolované z mléka a mléčných výrobků (BIO1-P, ITV1''-BP, LE-A, MAD-8AP, MK5, PS1-BP) zejména sýrů švýcarského typu. Jako indikátorové kmeny byly použity tyto kultury: *Penicillium roqueforti* PA1 (Danisco A/S, Kodaň, Dánsko), *Penicillium nalgiovensis* CCDM 269, *Penicillium camemberti* CCDM 797+799.

Příprava extraktů

Kmeny bakterií propionového kvašení dlouhodobě uchovávané v zamraženém stavu byly obnoveny v YEL bujónu (yeast extrakt lactate) při 30 °C po dobu 48 hodin a následně očkovány (2 % inokula) do syrovátkového média (retentát kyselé syrovátky zahuštěný reverzní osmózou, výchozí pH 4,4-4,5, obsah kyseliny mléčné ~ 2%), jehož pH před sterilací (110 °C, 20 minut) bylo upraveno na 7,0. Pro udržení konstantního pH během fermentace bylo přidáno 5 % (m/v) sterilního CaCO₃ a 0,5 % trimagnesium fosfátu. Po kultivaci při 30 °C byla část fermetovaného média sterilně převedena do zkumavek a uchovávána při -20 °C do doby použití (komplet). Zbývající část byla odstředěna při 9000 g po dobu 10 minut a získaný supernatant membránově filtrován (0,2 μm) a rovněž uchováván při -20 °C (bb supernatant).

Příprava živných půd a suspenzí vláknitých hub

Používané kmeny vláknitých hub byly kultivovány na ječných kroupách při optimální teplotě a po sporulaci byly spóry extrahovány fyziologickým roztokem s přídavkem 0,05 % (m/v) Tween 80. Koncentrace spór v extraktu byla zjištěna pomocí plotnové metody na Malt agaru (HiMedia Laboratories, Mumbai, Indie). Spóry vláknitých hub byly vmíchány do rozvařených živných půd temperovaných na 50 °C na výslednou koncentraci 20-50 spór/ml média a rozlity na plotny. Pro testování byla použita tato živná média:

Malt agar M253 (HiMedia), 5,5 ± 0,2

Czapek Malt agar M732 (HiMedia), pH 6,8 ± 0,2

JM3 agar: smícháno 40 ml zahuštěné syrovátky RO pH 6,5 se 150 ml deionizované vody 10 g ječné mouky, směs rozvařena na homogenní směs, ochlazená na 25-28 °C, pH znovu upraveno 40 % (m/v) NaOH na 6,5, sterilace 110 °C, 20 minut, sterilní směs smíchána 1:1 s rozvařeným 3 % agarem).

Testování antifungálních vlastností

V případě testování účinnosti bb supernatantů byly spóry plísni v živných médiích nality na Petriho misky o průměru 18 cm a po zatuhnutí byly v agaru vykrojeny jamky o průměru 8 mm. Do jamek bylo pipetováno 200 μl příslušného bb supernatantu a po 4 hodinách skladování při 4-6 °C byly misky kultivovány při 25 °C po dobu 5 dní. V případě testování živých buněk (komplet) bylo na misku pipetováno nejprve 1,5 ml kompletu obsahujícího ~ 1x10⁹ KTJ/ml a zalito 15 ml suspenze spór v živné půdě. Kontrolní misky obsahovaly přídavek stejného objemu sterilní kyselé syrovátky pH 4,4-4,5 a neutralizované syrovátky s pH upraveným 40 % NaOH na 7,0. Vzhled misek byl hodnocen vizuálně po 5 dnech porovnáním růstu hub na plotnách s testovaným kmenem a kontrolních obsahujících kyselou nebo neutralizovanou syrovátku (1 úplná inhibice, 2 výrazná inhibice, 3 mírná inhibice, 4 bez inhibice) a zároveň byla pořizována fotografická dokumentace.

VĚDA, VÝZKUM

Tab. 1 Antifungální aktivita živých buněk různých kmenů propionibakterií vůči vláknitým houbám z rodu *Penicillium*

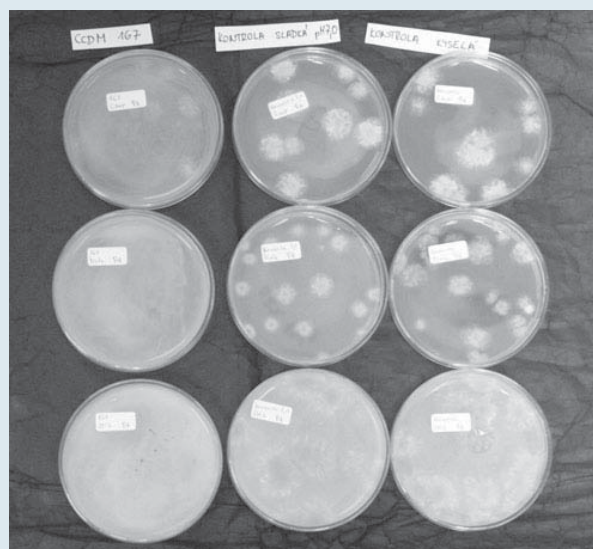
Indikátorové kultury Testované kmeny	<i>Penicillium roqueforti</i> PA 1			<i>Penicillium nalgiovensis</i> CCDM 329			<i>Penicillium camemberti</i> CCDM 797+799		
	Czapek Malt.	Malt	JM3	Czapek Malt.	Malt	JM3	Czapek Malt.	Malt	JM3
CCDM 57	3	4	4	3	3	4	3	3	4
CCDM 160	3	4	4	4	3	4	4	4	4
CCDM 163	4	4	4	2	4	4	4	4	4
CCDM 164	3	3	4	4	2	4	4	4	4
CCDM 167	4	2	4	2	4	4	3	3	4
CCDM 805	4	4	4	2	1	4	4	4	4
CCDM 1009	4	4	4	4	4	4	4	3	3
CCM 1859	4	3	4	2	3	2	3	3	3
CCM 3323	4	4	4	4	4	4	2	2	3
CCM 4902	4	3	4	4	4	4	3	3	4
PS1-BP	4	4	4	2	4	4	3	3	3
MK 5	4	4	4	4	4	4	3	3	4
LE-A	4	4	4	4	3	4	4	3	4
ITV1 -BP	4	4	4	4	4	4	4	4	4
BIO1-P	4	4	4	4	4	4	3	3	4
MAD-8AP	4	4	3	1	2	3	2	3	4

Legenda: 1 úplná inhibice, 2 výrazná inhibice, 3 mírná inhibice, 4 bez inhibice

Výsledky a diskuze

V případě bezbuněčných supernatantů byla pozorována jen mírná inhibice růstu *Penicillium nalgiovensis* CCDM 329 na Malt i Czapek Malt agaru kmenem MAD-8AP. Stejný kmen způsobil výraznou inhibici růstu testované kultury *Penicillium camemberti* na Malt agaru, zatímco na Czapek Malt agaru nebyla pozorována žádná inhibice. Naopak v případě *Pen. roqueforti* PA1 byla u tohoto kmene pozorována výrazná inhibice růstu na Czapek Malt agaru, zatímco na Malt agaru byl neúčinný. Opačný výsledek, mírná inhibice na Malt agaru a žádný účinek na Czapek Malt agaru, byl pozorován u kmenů CCDM 167 a ITV1'-BP. Ostatní testované kmeny nevykazovaly žádné inhibiční účinky vůči žádnému z testovaných kmenů vláknitých hub (výsledky neuvedeny).

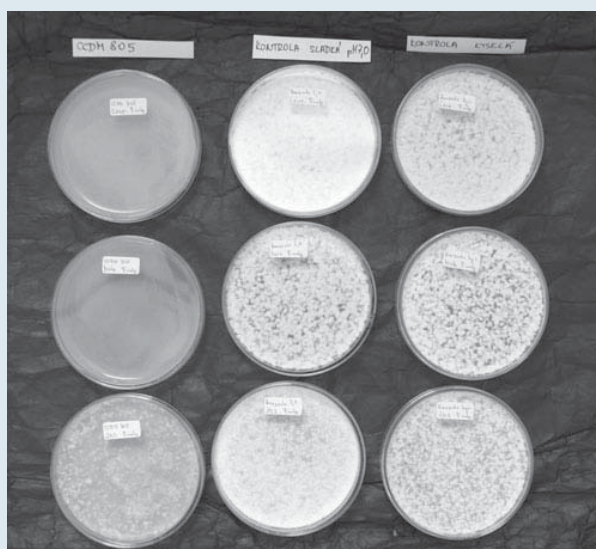
V případě přidavku živých buněk bakterií propionového kvašení jsou výsledky uvedeny v tabulce 1 a na obrázcích 1-3. Z 16 testovaných kmenů propionibakterií bylo různě výrazně zpomalení růstu vláknitých hub na některém živném médiu pozorováno u 15 z nich. Výjimkou byl kmen ITV1'-BP. Nejméně účinné byly živé buňky propionibakterií u *Penicillium roqueforti* PA1, kde byla pozorována mírná inhibice růstu na Czapek Malt agaru (3 kmeny), Malt agaru (3 kmeny) a JM3 (1 kmen). Výrazná inhibice byla pozorována pouze na Malt agaru pro kmen CCDM 167. Nejvýraznější inhibiční účinky vykazovaly testované kmeny na růst *Penicillium nalgiovensis* CCDM 329 na Czapek Malt agaru, kde v 1 případě došlo k úplné inhibici růstu a v 5 případech k výraznému zpomalení. Z výsledků je rovněž patrné, že použité živné médium mělo také výrazný vliv na inhibiční účinky. Obecně nejméně účinné byly testované kmeny propionibakterií na půdě JM3. Rozdíly v míře inhibičního působení lze pravděpodobně vysvětlit rozdílným složením antifungálně účinných metabolitů produkovaných jednotlivými kmeny a různě účinných v závislosti na pH prostředí (5,5 x 6,8 x 6,5).



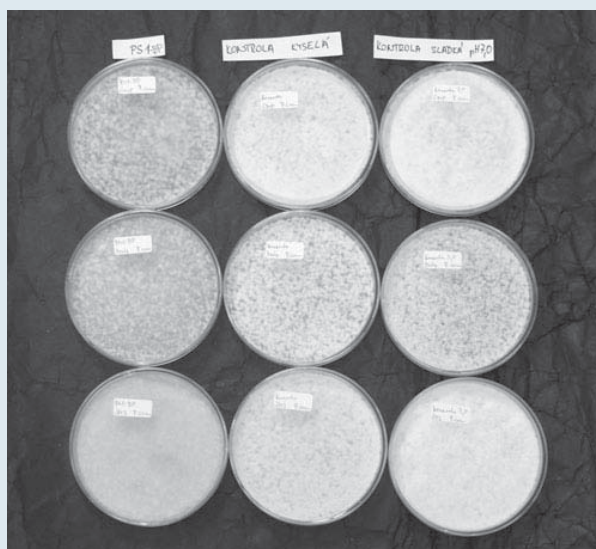
Obr. 1 Inhibice růstu *Pen. roqueforti* PA1 živými buňkami CCDM 167.

V případě antifungálně působících metabolitů se předpokládá synergické působení různých nízkomolekulárních sloučenin, jako jsou organické kyseliny, hydroxykyseliny, různé laktony, methylhydantoin, cyklické peptidy atd.⁷. Některé z těchto sloučenin jsou výrazně účinnější v kyselém prostředí - organické kyseliny, jiné pravděpodobně v neutrálním. Na vytvořené množství a zastoupení jednotlivých antifungálně působících látek má také vliv složení kultivačního média. Při aplikaci v různých potravinách lze také očekávat částečnou inaktivaci či neutralizaci antifungálně účinných látek sloučeninami obsaženými v potravine (viz výrazně nižší inhibice hub v médiu JM 3 obsahujícím ječnou mouku).

Výsledky jsou v souladu s výsledky pozorovanými pro houby z rodů *Fusarium* a *Alternaria*, kde byly živé buňky také účinnější než bezbuněčné supernatanty⁶.



Obr. 2 Inhibice růstu *Pen. nalgiovensis* CCDM 269 živými buňkami CCDM 805.



Obr. 3 Inhibice růstu kultury *Pen. camemberti* živými buňkami kmene PS1-BP.

Legenda: Pořadí živých půd zhora dolů je Czapek Malt agar, Malt agar a JM3 agar. Misky zleva doprava: testovaný kmen, kontrola-kyselá syrovátka, kontrola neutralizovaná syrovátka.

Závěr

Z dosažených výsledků je patrné, že použitím živých buněk propionibakterií je možné dosáhnout vyššího inhibičního působení vůči nárůstu vláknitých hub z rodu *Penicillium*, než při použití bezbuněčných supernatantů. Nejširší spektrum účinností vykazovaly kmeny MAD-8AP a CCM 1859. Nejcitlivější z testovaných kmenů vláknitých hub bylo *Penicillium nalgiovensis* CCDM 329, nejméně citlivý byl kmen *P. roqueforti* PA1.

Poděkování

Tato práce vznikla v rámci institucionální podpory VUM s.r.o., rozhodnutí RO 0511.

Literatura

- MAGNUSSON, J., STRÖM, K., ROOS, K., SJÖGREN, J., SCHNÜRER, J. (2003): Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 219, 129-135.
- GEREZ, C. L., TORINO, M. I., ROLLAN, G., DE VALDEZ, G. F. (2009): Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control* 20, 144-148.
- MIESCHER SCHWENNINGER, S., VON AH U, NIEDERER, B., TEUBER, M., MEILE, L. (2005): Detection of antifungal properties in *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* SM20, SM29, and SM63 and molecular typing of the strains. *J. Food Prot.* 68, 111-119.
- MIESCHER SCHWENNINGER, S., MEILE, L. (2004): A mixed culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 229-237.
- LIND, H., JONSSON H., SCHNÜRER, J. (2005): Antifungal compounds from cultures of dairy propionibacteria type strains. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 157-165.
- GWIAZDOWSKA, D., CZACZYK, K., FILIPIAK, M., GWIAZDOWSKI, R. (2008): Effects of *Propionibacterium* on the growth and mykotoxin production by some species *Fusarium* and *Alternaria*. *Pol. J. Microbiol.* 57, 205-212.
- MIESCHER SCHWENNINGER, S., LACROIX, C., TRUTTMANN, S., JANS, C., BOMMER, D. et al. (2008): Characterization of low-molecular weight antiyeast metabolites produced by a food-protective *Lactobacillus/Propionibacterium* co-culture. *J. Food Prot.* 71, 2481-2487.

Lektorováno dne 6. 11. 2012

Přijato k tisku dne 7. 12. 2012

TEPELNÁ STABILITA NÁPOJŮ NA BÁZI MLÉČNÝCH SLOŽEK V ZÁVISLOSTI NA KONCENTRACI SYROVÁTKOVÝCH BÍLKOVIN

Binder Michael¹, Drbohlav Jan¹, Pechačová Marta¹, Jarmar Jan²

¹ Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.,

² Bohušovická mlékárna a.s.

e-mail: binder@milcom-as.cz

Thermal stability of milk beverages depending on concentration of fortified whey proteins

Abstrakt

Byly stanoveny termostability diafiltrátu s různým obsahem syrovátkových bílkovin při záhřevu v olejové lázni a byl sledován vliv koncentrace stabilizačních solí. Na jejich základě byla navržena receptura a technologický postup sterilovaného mléčného nápoje se zvýšeným obsahem syrovátkových bílkovin.

Klíčová slova: termostabilita, syrovátkové bílkoviny, proteinový nápoj

Abstract

Thermal stabilities of the diafiltrate with various contents of whey proteins were tested during the heating in the oil bath and the influence of stabilization salts on them.