

TESTOVÁNÍ VLIVU BAKTERIÁLNÍHO IZOLÁTU POTLAČUJÍCÍHO RŮST PRODUCENTŮ BIOGENNÍCH AMINŮ PŘI POLOPROVOZNÍCH VÝROBÁCH SÝRŮ

Šárka Havlíková¹, Eva Kvasničková¹, František Buňka²

¹ Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

² Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Effect of bacterial isolate suppressing growth of biogenic amines producers in pilot plant cheese production

Abstrakt

Cílem práce bylo ověřit antimikrobiální účinek izolátu ze syrového mléka ML4DP na růst producentů biogenních aminů. Ověření bylo provedeno na přístroji RABIT v obnoveném mléce s kvasničným autolyzátem. Po zjištění, že v přítomnosti izolátu ML4DP identifikovaného jako *Lactobacillus paracasei/casei* došlo k potlačení růstu biogenní aminy tvořících laktobacilů až o šest řádů, byl stejný izolát aplikován v poloprovozních výrobcích sýrů eidamského typu, kde nebyl tento trend potvrzen v plné míře. V přítomnosti kmene ML4DP došlo po 90 denním zrání sýra ke snížení počtu KTJ/g dekarboxylázapozitivních laktobacilů pouze o jeden řád, přesto ale bylo zaznamenáno snížení celkového obsahu biogenních aminů v sýrech, u tyraminu až o polovinu.

Klíčová slova: antimikrobiální aktivita, biogenní aminy, laktobacily, sýry eidamského typu

Abstract

The aim of the study was to verify the antimicrobial effect of ML4DP isolate from raw milk on the growth biogenic amines producers. Verification was performed on the RABIT apparatus in reconstituted milk with yeast extract. In the presence of ML4DP isolate identified as *Lactobacillus paracasei/casei* the inhibition of growth of biogenic amines producing lactobacilli by up to six orders was found. The same isolate was applied in pilot production of Edam type cheese, where the inhibiting activity was not confirmed in full. In cheese in the presence of strain ML4DP the number of dekarboxylase positive lactobacilli was reduced after 90 days of cheese ripening by only one order. The total of biogenic amines in cheese was yet decreased, in the case of tyramine by half.

Key words: antimicrobial activity, biogenic amines, lactobacilli, Edam type cheese

Úvod

Metabolismus aminokyselin u laktobacilů přitahuje pozornost pro svůj vliv na kvalitu potravin jednak proto, že se podílí

na vzniku charakteristických senzorických vlastností sýrů a pozitivně působí na lidské zdraví (Fernandez, Zuniga, 2006), a jednak naopak tím, že aminokyseliny jsou prekursory biogenních aminů, které naopak zdraví konzumentů ohrožují a jsou tvořeny také některými laktobacily. Právě laktobacily ze skupiny obligátně i fakultativně heterofermentativních, které ve svém enzymovém vybavení mají dekarboxylázy, produkují za různých podmínek různé biogenní aminy ve vzájemně se lišícím množství. Někteří autoři (Marcobal a kol., 2006) uvádějí, že tvorba dekarboxylačních enzymů je indukována u mikroorganismů schopných je vytvářet v prostředí bohatém na prekursory biogenních aminů - aminokyseliny a jejich kofaktory jako je pyridoxal-5-fosfát. Takovým prostředím může být zrající sýr, kde probíhá štěpení bílkovin až na aminokyseliny. Dále je důležitá dostupnost aminokyselin ve vodné fázi sýra (Innocente a kol. 2009). Testováním různých skupin sýrů bylo zjištěno, že vyšších koncentrací biogenních aminů a zvláště tyraminu bylo dosaženo při počtu bakterií s dekarboxylační aktivitou vyšší než 10⁴ KTJ/g (Ladero a kol., 2010).

Cílem práce bylo ověřit na základě poznatků o antimikrobiální aktivitě živých buněk a bezbuněčných extraktů kmene *Lbc. paracasei/casei* ML4DP, vyizolovaného ze syrového mléka na MRS agaru, jeho antimikrobiální účinnost v obnoveném mléce s přidavkem kvasničného autolyzátu vůči vybraným 8 kmenům *Lbc. curvatus* s prokázanou schopností tvorby biogenních aminů v laboratorních podmínkách. K tomuto účelu byla použita vodivostní metoda pomocí přístroje RABIT a plotnová kultivační metoda. V dalším kroku pak následovalo ověření těchto poznatků i v poloprovozních podmínkách výroby sýrů eidamského typu.

Materiál a metody

Ověření inhibiční aktivity kmene *Lbc. paracasei/casei* ML4DP vůči dekarboxylázapozitivním laktobacilům (*Lbc. curvatus*)

Materiál

MRSB bujón, pH 5.7 (MERCK 1.10661, Darmstadt, D)
 MRS agar, pH 5.7 (MERCK 1.10660, Darmstadt, D)
 FHN (MILCOM a. s.) selektivní agar ke stanovení heterofermentativních laktobacilů
 MDA agar (MILCOM a. s.) selektivní agar ke stanovení dekarboxylázapozitivních laktobacilů
 RSMKA - obnovené odstředěné mléko 16 g / 100 ml s přidavkem kvasničného autolyzátu 0,5 g / 100 ml mléka
 lomefloxacin hydrochlorid (LOM) - 0,5 g / 100 ml zásobního roztoku (CHEMOS CZ) (přídavek k FHN agaru omezuje růst kmene ML4DP)
 kmen *Lbc. paracasei/casei* ML4DP
 8 dekarboxylázapozitivních kmenů *Lbc. curvatus*: L17(29/9), L17(18/10), 10127-4, 10127-9, 10147-5, 10167-5, CCM 4438 a CCM 7271

Přístroje a metody

Stanovení vodivosti: RABIT (DWS, Shipley, UK), Návod k obsluze pro RABIT, Bentley Czech & Don Whitley Czech, SMM/DWS/0119/02

Stanovení aktivní kyselosti: laboratorním pH metrem inoLab pH 720 (WTW, Weilheim, D)

Ověření inhibiční aktivity kmene *Lbc. paracasei/casei* ML4DP v poloprovozních podmínkách výroby sýrů

Materiál

dekarboxylázapozitivní kmeny *Lbc. curvatus* L17(29/9), L17(18/10), 10127-4, 10127-9, 10147-5, 10167-5, CCM 4438 a CCM 7271

kmen *Lbc. paracasei/casei* ML4DP
pasterované mléko (MADETA a.s.)
mezofilní smetanová kultura DCC 232 (Chr. Hansen´s)

Přístroje a metody

Stanovení aktivní kyselosti: laboratorním pH metrem inoLab pH 720 (WTW, Weilheim, D)

Stanovení titrační kyselosti (°SH): Gajdůšek a Klíčnick (1988)

Stanovení obsahu sušiny: ČSN ISO 570107-3

Stanovení aktivity vody: AwSprint, Novasina, CH, při konstantní teplotě 25 °C.

Stanovení nižších mastných kyselin: Izotachoforetický analyzátor EA 02 (VILLA Labeco SK), SOP č. 23 MILCOM a. s.

Stanovení biogenních aminů: Vzorky pro stanovení obsahu biogenních aminů byly nejprve lyofilizovány (přístroj Christ Alpha 1-4; Osterode am Harz, Německo) a následně do dalšího zpracování uchovávány při teplotě pod -70 °C. Trojnásobná extrakce aminů byla provedena roztokem 0.6 mol·l⁻¹ kyseliny chloristé. Obsah 8 aminů (histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, tryptaminu, putrescinu, kadaverinu, spermidinu a sperminu) byl stanoven metodou kapalinové chromatografie (přístroje LabAlliance [State College, USA] a Agilent Technologies [Agilent, Paolo Alto, USA]) po předchozí derivatizaci dansylchloridem (Dadáková a kol., 2009). Každý vzorek byl extrahován třikrát a každá derivatizovaná směs dvakrát nanášena na kolonu (n = 6). Výsledky byly přepočteny na hmotu sýra před lyofilizací.

Pracovní postup

Ověření inhibiční aktivity kmene *Lbc. paracasei/casei* ML4DP vůči dekarboxylázapozitivním laktobacilům (*Lbc. curvatus*)

Na souboru 8 indikátorových kmenů *Lbc. curvatus* uložených na pracovišti MILCOM a.s. v Táboře, u nichž byla prokázána schopnost tvorby biogenních aminů, byla otestována antimikrobiální aktivita živých buněk kmene *Lbc. paracasei/casei* ML4DP. Příslušný indikátorový kmen s testovaným kmenem byly vždy čerstvě přeočkovány a nakultivovány v MRSB 5.7 při 30°C.

Do předem připravených sterilních měřicích tub pro přímou metodu bylo pipetováno dvojmo 1 ml 1. ředění testovaného kmene a poté přidáno 9 ml 16 % RSMKA zaočkovaného příslušným indikátorovým kmenem třemi

různými dávkami (0,1 %, 0,01 % a 0,001 %). Pro kontrolu růstu indikátorového kmene byly připraveny stejným způsobem dvě tuby s 9 ml zaočkovaného mléka příslušnou očkovací dávkou s přidavkem 1 ml fyziologického roztoku. Pro kontrolu růstu testovaného kmene *Lbc. paracasei/casei* ML4DP byly připraveny dvojmo tuby s 1 ml 1. ředění daného kmene a přidáno 9 ml sterilního 16 % RSMKA. Stejným způsobem byly připraveny dvě tuby se slepým vzorkem (RSMKA bez inokula) pro kontrolu sterility živného média. Kultivace v RABITu probíhala při teplotě 30 °C.

Pokud se průběh dvojice vodivostních křivek nelišil, vzorky ke stanovení počtu KTJ plotnovou metodou byly odebrány po ukončení kultivace vždy z příslušné dvojice tub po smíchání jejich obsahu, změřeno pH a naměřené hodnoty vodivosti obou křivek zprůměrovány. Výsledné křivky jsou tedy průměrem ze dvou souběžných měření.

Ověření inhibiční aktivity kmene *Lbc. paracasei/casei* ML4DP v poloprovozních podmínkách výroby sýrů

Na základě laboratorních poznatků o antimikrobiální aktivitě živých buněk kmene vyizolovaného ze syrového mléka a vlastnostech vybraných kmenů *Lbc. curvatus*, získaných jejich studiem již v předcházejících letech, byla otestována jeho inhibiční aktivita v poloprovozně vyrobených sýrech eidamského typu.

Technologický postup byl zvolen tak, aby byl jednoduchý a opakovatelný a přitom zachovával principy klasické výroby. Po celou dobu výroby a zrání byly sýry sledovány tak, aby byly zachyceny všechny změny ve složení a v zastoupení jednotlivých skupin mikroorganismů (laktokoky, halotolerantní, termorezistentní aerobní, termorezistentní anaerobní, fakultativně heterofermentativní laktobacily). Byly u nich provedeny fyzikálně-chemické rozborů: pH, SH, sušina, a_w, obsah nižších mastných kyselin. Dále bylo provedeno stanovení obsahu histaminu, tyraminu, kadaverinu, putrescinu, fenyletylaminu, tryptaminu, spermidinu a sperminu. Pokusné výroby byly celkem provedeny s 8 indikátorovými kmeny *Lbc. curvatus*. V jedné sérii byla vždy jedna kontrolní výroba bez přidavku laktobacilů, jedna výroba s přidavkem kmene *Lbc. paracasei/casei*, jedna s přidavkem indikátorového kmene *Lbc. curvatus* společně s *Lbc. paracasei/casei* a jedna pouze s kmenem *Lbc. curvatus*. Vzorky byly odebrány 1., 30., 60. a 90. den po výrobě.

Postup výroby: Mléko 5 l bylo pasterováno šetrnou pasterací 30 min při 65°C, přidán 0,3 ml/l chloridu vápenatého a 1 % tekuté mezofilní smetanové kultury (DCC 232, Chr. Hansen's). Do prvních 3 pokusných sérií bylo přidáno 0,01 % jednotlivého kmene *Lbc. curvatus* o známé denzitě a do dalších 5 pokusných sérií byla dávka upravena na 0,001 %. Testovaný antimikrobiální kmen byl u prvních dvou sérií přidáván v dávce 1 % a u dalších 6 upraveno dávkování na 0,01 %. Při teplotě 32-33°C bylo mléko zasýřeno tekutým chymozinovým syřidlem o síle 1:15000. Doba od přidavku ČMK do odtažení syrovátky byla 80-90 minut. Po odtažení 1/3 syrovátky byl přidán stejný objem prací vody a dosoušení probíhalo při teplotě

37-38°C po dobu 40-50 minut. Pak byla směs zrna se syrovátkou vypuštěna do lisovacích forem a 1 hodinu byly sýry lisovány za postupně se zvyšujícího tlaku. Celková doba výroby sýrů do konce lisování byla 245 minut. Prokysané sýry byly soleny 3,5 hodiny v 20% solné lázni při teplotě 8°C, osušeny a pod nátěrem Plasticoat zrály při teplotě 15°C.

Výsledky a diskuse

Ověření inhibiční aktivity kmene *Lbc. paracasei/casei* ML4DP vůči dekarboxylázopozitivním laktobacilům (*Lbc. curvatus*)

Výše uvedeným postupem byla na dekarboxylázopozitivních kmenech *Lbc. curvatus* L17(29/9), L17(18/10), 10127-4, 10127-9, 10147-5, 10167-5, CCM 4438 a CCM 7271 ověřena účinnost antimikrobiálního kmene *Lbc. paracasei/casei* ML4DP.

Výchozí počet živých buněk antimikrobiálního kmene byl řádově 10^5 KTJ/ml. Počty příslušného indikátorového kmene byly ve třech různých očkovacích dávkách: 0,1 % - řádově 10^4 - 10^5 , 0,01 % odpovídalo řádově 10^3 - 10^4 a 0,001 % řádově 10^3 - 10^2 KTJ/ml. Výsledné grafy nevytvářely dostatečně o inhibičním účinku živých buněk kmene ML4DP, a proto po kultivaci v RABITU byly z vybraných tub zaočkovaných příslušnými kmeny či jejich kombinací stanoveny a porovnány počty KTJ/ml na FHN, FHN+lomefloxacin a MDA. Pro kultivační rozlišení směsi dekarboxylázopozitivních kmenů *Lbc. curvatus* a kmene s antimikrobiální aktivitou byl použit již dříve otestovaný přídatek lomefloxacinu k FHN agar. Lomefloxacin omezil růst kmene ML4DP a umožnil stanovení počtu KTJ kmenů *L. curvatus* ve směsi na počátku a na konci jejich společné kultivace. Inhibiční účinek kmene ML4DP byl zjištěn u všech testovaných kmenů. Příklad inhibičního účinku kmene ML4DP na čtyři vybrané kmeny *Lbc. curvatus* 10127-9, 10147-5, CCM 7271 a L17(18/10) je uveden

Tab. 1 Inhibiční účinek kmene *Lbc. paracasei/casei* ML4DP vůči vybraným dekarboxylázopozitivním kmenům v RABITU (log KTJ/ml)

Zaočkováno kmenem	FHN		FHN+LOM	MDA	
	Lbc.c.	ML4DP		Lbc.c.	ML4DP
CCM 7271	8,26	-	8,28	8,30	-
ML4DP	-	9,15	2,95	nest.	nest.
CCM 7271+ML4DP	*	9,11	2,70	*	9,04
10127-9	7,28	-	7,15	7,61	-
ML4DP	-	8,96	2,94	-	8,97
10127-9+ML4DP	*	9,08	2,79	*	9,04
10147-5	7,79	-	7,79	7,86	-
ML4DP	-	9,11	2,70	-	9,08
10147-5+ML4DP	*	9,00	2,48	*	9,00
L17(18/10)	7,75	-	7,78	7,90	-
ML4DP	-	9,37	2,30	nest.	nest.
L17(18/10)+ML4DP	*	9,16	2,88	*	9,04

* kolonie nelze odečíst

Tab. 2a Fyzikálně-chemické rozborů sýrů výroby č. 6 během zrání

Použité kultury	stáří dny	sušina (%)	°SH	pH strouh	a_w
DCC 232 (kontrola)	1	57,47	92	5,13	0,97
	30	74,67	101	5,42	0,91
	61	70,63	95	5,34	0,93
	90	77,97	96	5,48	0,89
DCC 232 + ML4DP	1	55,84	94	5,1	0,98
	30	72,73	105	5,31	0,91
	61	70,09	95	5,33	0,93
	90	76,34	98	5,45	0,90
DCC 232 + ML4DP + L17(18/10)	1	56,96	87	5,18	0,97
	30	73,55	102	5,46	0,90
	61	72,14	92	5,39	0,92
	90	78,63	98	5,5	0,88
DCC 232 + L17(18/10)	1	56,92	87	5,19	0,98
	30	72,83	98	5,41	0,89
	61	70,78	91	5,44	0,93
	90	77,76	93	5,59	0,88

Tab. 2b Obsah nižších mastných kyselin v sýrech výroby č. 6 během zrání

Použité kultury	stáří dny	mrav. mg/100 g	citr. mg/100 g	fosfát mg/100 g	mléčná mg/100 g	jantar. mg/100 g	aspar. mg/100 g	octová mg/100 g	glut. mg/100 g	prop. mg/100 g	másečná mg/100 g
DCC 232 (kontrola)	1	22	104	515	1115	0	7	52	23	0	0
	30	13	47	410	1483	14	19	93	62	0	0
	61	24	31	416	1549	0	20	108	55	0	0
	90	32	41	455	1819	0	24	131	62	0	0
DCC 232 + ML4DP	1	23	95	507	1187	0	12	57	26	0	0
	30	19	42	394	1784	12	17	104	35	0	0
	61	29	32	470	1583	0	22	127	50	0	0
	90	40	31	495	1706	0	27	168	73	0	0
DCC 232 + ML4DP + L17(18/10)	1	26	72	432	1008	0	14	71	33	0	0
	30	33	32	351	1288	0	15	113	50	0	0
	61	28	31	422	1396	0	20	125	68	0	0
	90	38	44	563	1567	0	26	156	89	0	0
DCC 232 + L17(18/10)	1	25	85	461	1103	0	14	54	34	0	0
	30	26	36	370	1397	0	16	101	55	0	0
	61	22	27	344	1278	0	20	111	63	0	0
	90	31	38	584	1446	0	28	142	92	0	0

Tab. 3a Mikrobiologické stanovení sledovaných skupin laktobacilů v sýrech výroby č.6 po 90 dnech zrání (log KTJ/g)

Použité kultury	laktobacily			<i>Lbc. curvatus</i>			<i>Lbc. curvatus</i>
	FHN (30°C/6/AN)			FHN+L (30°C/6/AN)			MDA
	ML4DP	L17(18/10)	celkem	ML4DP	L17(18/10)	celkem	(30°C/6/AN) L17(18/10)
DCC 232 (kontrola)	-	-	4,65	-	-	1,3	-
DCC 232 + ML4DP	8,06	-	8,06	-	-	2,26	-
DCC 232 + ML4DP+L17(18/10)	7,82	6,34	7,83	-	6,36	6,36	6,61
DCC 232 +L17(18/10)	-	7,39	7,39	-	7,34	7,34	7,45

Tab. 3b Mikrobiologické rozborů sýrů výroby č. 6 ve stáří 90 dnů (log KTJ/g)

Použité kultury	entero-koky 42°C/2/AE	halotol. 30°C/3/AE	termorez. aer. 30°C/3/AE	termorez. an. 37°C/5/AN	laktokoky 21°C/5/AE
DCC 232 (kontrola)	<1	2,34	2,36	2,53	8,23
DCC 232 + ML4DP	1,60	1,85	2,49	2,46	8,32
DCC 232 + ML4DP+L17(18/10)	<1	2,20	2,54	2,40	7,87
DCC 232 + L17(18/10)	<1	1,90	2,54	2,49	8,13

v Tab. 1. Z výsledků, které jsou v tabulce 1 tučně zvýrazněny, je zřejmé, že došlo ke snížení počtu KTJ/ml dekarboxylázapozitivních kmenů vlivem přidavku živých buněk kmene *Lbc. paracasei/casei* ML4DP až o 6 řádů.

Ověření inhibiční aktivity kmene *Lbc. paracasei/casei* ML4DP v poloprovozních podmínkách výroby sýrů

Inhibiční účinky tohoto kmene byly otestovány na souboru dekarboxylázapozitivních kmenů *Lbc. curvatus* L17(29/9), L17(18/10), 10127-4, 10127-9, 10147-5, 10167-5, CCM 4438 a CCM 7271 v poloprovozních podmínkách výroby sýrů eidamského typu. Vzorky na fyzikálně-chemické rozborů byly odebrány již během výroby sýrů a dále po 1, 30, 60 a 90 dnech zrání. Vzhledem

k velkému počtu výsledků jsou v Tab. 2a a 2b uvedeny jen výsledky pro pokusnou výrobu č. 6 s indikátorovým kmenem *Lbc. curvatus* L17(18/10). Při porovnání jednotlivých analytických parametrů v Tab. 2a a 2b série čtyř výrob, je zřejmé, že se od sebe lišily jen minimálně. Stejně závěry platí i po vzájemném porovnání všech 8 výrob.

Současně se vzorky na fyzikálně-chemické rozborů byly odebrány i vzorky na mikrobiologická stanovení. Z porovnání v Tab. 3a získaných počtů KTJ/g v sýrech pro již uváděnou pokusnou výrobu č. 6 na jednotlivých živných médiích obou kmenů sledovaných laktobacilů - *Lbc. paracasei/casei* ML4DP x *Lbc. curvatus* L17(18/10) - bylo možné usuzovat, že přidavek kmene *Lbc. paracasei/casei* ML4DP, u něhož byla v laboratorních podmínkách ověřena antimikrobiální účinnost, nevedl v poloprovozních podmínkách výroby sýrů k významnému snížení počtu buněk biogenní aminy tvořícího kmene *Lbc. curvatus* L17(18/10). Tučně zvýrazněné hodnoty v Tab. 3a dokazují snížení počtu KTJ/g tohoto kmene pouze o 1 řád. Na základě plotnové kultivační metody byl vysledován podobný trend i u ostatních 7 výrob.

Stanovení obsahu biogenních aminů v sýrech v průběhu jejich zrání (Tab. č. 4) prokázalo, že v sýrech vyrobených s přidavkem kmene produkujícího biogenní aminy L17(18/10) a kmene ML4DP, jehož antimikrobiální vliv byl prokázán v předcházejících testech, byl obsah tyraminu po 90 denním zrání 67,69 mg/kg, kdežto u sýrů vyrobených pouze s přidavkem kmene L17(18/10) byl obsah tyraminu

Tab. 4 Obsah nižších mastných kyselin v sýrech výroby č. 6 během zrání

Použité kultury	stáří dny	Hodnocení obsahu biogenních aminů a polyaminů (mg/kg)							
		tryptamin	fenylethylamin	putrescin	kadaverin	histamin	tyramin	spermidin	spermin
DCC 232 (kontrola)	1	ND	ND	0,52	ND	ND	5,19	ND	ND
	30	ND	ND	1,17	ND	ND	18,52	ND	ND
	61	ND	ND	2,01	ND	ND	24,77	ND	ND
	90	ND	ND	2,63	ND	ND	28,96	ND	ND
DCC 232 + ML4DP	1	ND	ND	2,39	ND	ND	1,24	ND	ND
	30	ND	ND	15,53	ND	ND	9,08	ND	ND
	61	ND	ND	18,18	ND	ND	13,48	ND	ND
	90	ND	ND	19,82	ND	ND	19,18	ND	ND
DCC 232 + ML4DP + L17(18/10)	1	ND	ND	1,22	ND	ND	4,97	ND	ND
	30	ND	ND	26,85	ND	ND	24,16	ND	ND
	61	ND	ND	38,83	ND	ND	48,49	ND	ND
	90	ND	ND	47,79	ND	ND	67,69	ND	ND
DCC 232 + L17(18/10)	1	ND	ND	1,74	ND	ND	4,32	ND	ND
	30	ND	ND	25,37	ND	ND	39,86	ND	ND
	61	ND	14,00	29,68	ND	ND	59,37	ND	ND
	90	ND	22,63	30,89	ND	ND	141,54	ND	ND

ND – nebylo detekováno

147,54 mg/kg. Podobný trend byl zjištěn i u fenyletylaminu, kde nebylo v prvním případě detekovatelné množství a ve druhém byl stanoven obsah 22,63 mg/kg. Pozitivní vliv přísad kmene ML4DP se nepotvrdil v případě putrescinu, kde byly zjištěny hodnoty jeho obsahu 47,79 a 30,89 mg/kg. Kmen L17(18/10) v předchozích testech (Černý a kol., 2012) produkoval jen velmi nízké množství putrescinu až na hranici detekce, proto se domníváme, že jeho mírně zvýšené množství mohlo být způsobeno přítomností jiné mikroflóry s dekarboxylační schopností pocházející z mléka. Celkově je ale nutné konstatovat, že celkový obsah biogenních aminů byl velmi nízký, což bylo pravděpodobně způsobeno velkým zvýšením sušiny během zrání pod nátěrem, čímž došlo k zhoršení podmínek pro růst testovaných laktobacilů a zároveň mohla být zhoršena přístupnost prekurzorů biogenních aminů, tj. aminokyselin ve vodné fázi sýra. Sušina sýrů se během zrání zvýšila přibližně o 20 % a aktivita vody klesla až na hodnoty mezi 0,90 a 0,88 (Tab. č. 2a).

Výsledky rozborů sýrů z pokusných výrob neodpovídají zcela výsledkům laboratorních testů (Tab. č. 1), v reálném prostředí byl účinek nižší, přesto ale došlo v přítomnosti kmene ML4DP ke snížení celkového obsahu biogenních aminů v sýrech.

Výsledky dalších pokusných výrob nebylo možné pro omezený rozsah článku uvádět a jsou k dispozici u autorů na pracovišti VÚM v Táboře.

Závěr

Na základě dosažených výsledků byla potvrzena antimikrobiální aktivita živých buněk testovaného kmene *Lbc. paracasei/casei* ML4DP vůči souboru indikátorových kmenů *Lbc. curvatus* jejich společnou kultivací v obnoveném mléce s přísadkou kvasničného autolyzátu v RABITU.

Přídavek kmene *Lbc. paracasei/casei* ML4DP vedl, na základě výsledků plotnové kultivační metody, v polo-provozních podmínkách výroby sýrů ke snížení počtů KTJ/ml biogenní aminy tvořících kmenů *Lbc. curvatus* přibližně o 1 řád, aniž by byly ovlivněny fyzikálně chemické vlastnosti vyrobených sýrů.

Stanovením obsahu vybrané skupiny biogenních aminů v pokusných sýrech byl potvrzen vliv přísadky kmene *Lbc. paracasei/casei* ML4DP. U sýrů vyrobených v polo-provozních podmínkách po době zrání 90 dnů došlo vlivem přísadky testovaného kmene ke snížení obsahu tyraminu přibližně o polovinu.

Tato práce vznikla v rámci institucionální podpory výzkumné organizace VÚM s.r.o., rozhodnutí RO 0511.

Literatura

- ČERNÝ V., HAVLÍKOVÁ Š., KVASNIČKOVÁ E. (2012): Tvorba biogenních aminů v sýrech eidamského typu. In Sborník *Celostátní přehlídka sýrů 2012*, Praha, VŠCHT, s. 197-202, ISBN 978-80-7080-838-2
- DADAČOVÁ E., KRÍŽEK P., PELIKÁNOVÁ T. (2009): Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*, 116, s. 365-370.

- FERNANDEZ M., ZÚNIGA M. (2006): Amino Acid Catabolic Pathways of Lactic Acid Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 32, s. 155-183
- GAJDŮŠEK S., KLÍČNÍK V. (1988): *Mlékařství*, MZLU v Brně, s. 128
- INNOCENTE N., MARINO M., MARCHESINI G., BIASUTTI M. (2009): Presence of biogenic amines in a traditional salted Italian cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 62, (2), s. 154-160
- LADERO V., MARTÍNEZ N., MARTÍN M. C., FERNÁNDEZ M., ALVAREZ M. A. (2010): qPCR for quantitative detection of tyramin producing bacteria in dairy products. *Food Research International*, 43, s. 289-295
- MARCOBAL A., DE LAS RIVAS B., MUNOZ R. (2006): Methods for the Detection of Bacteria Producing Biogenic Amines on Foods. A Survey. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 1, s. 187-196

Přijato do tisku 11. 3. 2013

Lektorováno 1. 4. 2013

VÝVOJ MLÉČNÝCH SYNBIO- TICKÝCH FERMENTOVANÝCH NÁPOJŮ A JOGURTŮ

Gabriela Kunová^{1,2}, Ivan Boháčenko³, Marta Pechačová¹, Jitka Pinkrová³, Jitka Peroutková¹

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 - Výzkumný ústav potravinářský Praha v.v.i.

Development of synbiotic milk-based fermented beverages and yogurts

Abstrakt

Cílem práce bylo na základě experimentálních znalostí o interakcích mezi probiotiky a prebiotiky navrhnout a laboratorně připravit nové synbiotické fermentované mléčné výrobky. Připraveny byly 2 synbiotické fermentované nápoje a 3 synbiotické jogurty s obsahem fruktanů (Orafti P95) a kombinací základních kultur s doplňkovými kulturami s probiotickými vlastnostmi (*Lbc. rhamnosus* CCDM 150, *Bifidobacterium* sp. CCDM 94, *Ent. durans* CCDM 922). Oba typy výrobků byly podrobeny 30-dennímu skladování, v průběhu kterého byl přibližně v sedmidenních intervalech sledován počet mikroorganismů, pH a obsah prebiotik. Obsah fruktooligosacharidů (Orafti P95) zůstal během skladování konstantní s minimálními rozdíly (v rámci nejistoty stanovení). V průběhu skladování nápojů a jogurtů došlo také k poklesu mikroorganismů, přičemž ve většině případů se jednalo o mírný pokles (0,2 - 0,3 log KTJ/g) mikrobiálních počtů doplňkových kultur. U jednoho vzorku, a to u jogurtu obsahujícího kombinaci kmenů CCDM 922 a CCDM 94 došlo však k výraznému poklesu počtů, a to zejména u kmene CCDM 922 (pokles o 4,1 log KTJ/g). Obsah živých buněk probiotických bakterií v tomto případě výrazně poklesl pod hranici jednoho milionu v 1g, resp. 1 ml výrobku stanovenou vyhláškou, kdy