

HODNOCENÍ PROBIOTICKÝCH VÝROBKŮ SPOLEČNOSTÍ PRO PROBIOTIKA A PREBIOTIKA

Radko Pechar¹, Vojtěch Rada¹, Šárka Musilová¹,
Věra Bunešová¹, Eva Vlková¹, Vladimír Kmetz², Jiří Killer^{1,3}

¹ Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky,
Česká zemědělská univerzita v Praze

² Ústav fyziologie hospodářských zvířat SAV, Košice

³ Ústav živočišné fyziologie a genetiky AVČR, Liběchov

Testing of probiotic products by Society for Probiotics and Prebiotics

Abstrakt

Společnost pro probiotika a prebiotika (SPP, www.probiotika-prebiotika.cz) zahájila testování probiotických potravin a potravních doplňků v roce 2009. Jsou testovány bifidobakterie a dále také laktobacily v mléčných kysaných výrobcích a lyofilizovaných práscích, přičemž je stanovován celkový počet živých buněk v průběhu expirační doby. Testování probíhá podle IDF (International Dairy Federation) standardů a s použitím dalších metod. Výrobky vesměs splňují normu (kysané mléčné výrobky), nebo množství deklarované na obalu (lyofilizované produkty). V některých lyofilizovaných preparátech však byly nalezeny počty živých buněk mírně nižší, než udávají hodnoty uvedené na obalu. Kromě počtu živých buněk SPP provádí také izolaci čistých kultur a jejich identifikaci pomocí fenotypových a genotypových testů až na úroveň druhu, poddruhu a případně i kmene pomocí fingerprintových metod.

V mléčných kysaných výrobcích je prakticky výhradně nalézán druh *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, zatímco v lyofilizovaných výrobcích bývají zastoupeny také druhy *B. longum*, *B. breve* a *B. bifidum*. Z laktobacilů bývají přítomny druhy *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus* a *L. casei*.

SPP testuje také metody, jak selektivně stanovit ostatní probiotické mikroorganismy, jako jsou kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae* a *S. boulardii*), enterokoky, *Escherichia coli* (v ČR jsou známy preparáty Mutaflor a Coliinfant), *Bacillus* spp. a další mikroorganismy.

Všichni výrobci a distributoři probiotik se mohou obrátit na SPP s žádostí o test svého produktu. Je třeba připomenout, že testy probíhají nad rámec standardních metod a průběžně se zařazují nové metody pro stanovení množství živých buněk (např. RT-PCR, FISH) a pro identifikaci druhů a kmenů (např. sekvence genů pro 16SrRNA a HSP60, MALDI-TOF MS). Případní zájemci také mohou kontaktovat přímo Laboratoř anaerobní mikrobiologie Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky (rada@af.czu.cz) na ČZU v Praze, kde se testování pro SPP provádí.

Klíčová slova: probiotika, kysané mléčné výrobky, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, selektivní stanovení probiotických mikroorganismů

Abstract

Society for Probiotics and Prebiotics (SPP, www.probiotika-prebiotika.cz) began testing of probiotic foods and dietary supplements in 2009. Bifidobacteria and lactobacilli are tested in a milk fermented products and lyophilized powders. The total number of viable cells are determined during the expiration date. Testing carried out by IDF (International Dairy Federation) standards and by using other methods. The products generally meet the standard (fermented milk products), or the amount declared on the label (lyophilized product). In some of lyophilized preparations, however, were found living cell counts slightly lower than values indicated on the packaging. Besides the number of living cells SPP also performs the isolation of pure cultures and their identification using phenotypic and genotypic tests to the species, subspecies and possibly strain levels using fingerprint methods.

In fermented dairy products is usually almost exclusively found *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, whereas in lyophilized products are also represented species *B. longum*, *B. breve* and *B. bifidum*. The lactobacilli are present by species *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* and *L. rhamnosus*.

SPP also tested methods to selectively determine other probiotic microorganisms such as yeast (*Saccharomyces cerevisiae* and *S. boulardii*), enterococci, *Escherichia coli* (in the Czech Republic are known medications Mutaflor and Coliinfant), *Bacillus* spp. and other microorganisms.

All manufacturers and distributors of probiotics may apply to the SPP with a request to test their product. It should be noted that the tests are performed in excess of the standard methods and is continuously inserted new method for determining the amount of living cells (such as RT-PCR, FISH) and for the identification of species and strains (such as a gene sequence for 16SrRNA and HSP60, MALDI-TOF MS). Potential applicants may also contact the Laboratory of Anaerobic Microbiology, Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics, Faculty of Agrobiological Sciences, Czech University of Life Sciences (rada@af.czu.cz), where testing for the SPP is realised.

Key words: probiotics, fermented milk products, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, selective enumeration of probiotic microorganisms

Úvod

S ohledem na trvale rostoucí zájem spotřebitelů o sortiment potravin a potravních doplňků, které obsahují tzv. probiotika, je velmi aktuální vypracování postupů pro selektivní stanovení těchto mikroorganismů. Podle Organizace pro výživu a zemědělství a Světové zdravotnické organizace (FAO/WHO, 2001) jsou probiotika živé mikroorganismy přidávané do potravin, které při podávání v adekvátním množství pozitivně působí na trávicí trakt konzumenta. Pro rutinní kontrolu probiotických potravin je pak ideální vyvinout jednoduché postupy, snadno pro-

veditelné v běžných laboratořích. V současné době se však zdá vytvoření takových postupů nereálné a ke kontrole je proto potřebné také využití náročných technologií. Různé technologické přístupy je navíc nezbytné kombinovat. Proto, aby mohly být určité mikroorganismy využité jako probiotika, musí splňovat kritéria spojená s bezpečnostními, funkčními a technologickými vlastnostmi (Saarela et al., 2000). Mezi nejdůležitější požadované funkční vlastnosti probiotik patří použití hostitelsky specifických kmenů, rezistence vůči kyselému prostředí gastrointestinálního traktu a žlučovým solím, schopnost (alespoň přechodně) kolonizovat intestinální trakt, schopnost adherence na střevní epitel, antagonistické působení na patogenní bakterie, vyloučení faktoru patogenity, genetická stabilita a klinicky prokázané pozitivní zdravotní účinky. Z technologických vlastností je kladen důraz zejména na schopnost zachování ověřitelné životaschopnosti těchto mikroorganismů během procesu výroby a expirační doby produktu (Klaenhamer a Kullen, 1999; Kaur et al., 2002). Mikroorganismy je nutné identifikovat na úroveň rodu, druhu a kmene, pomocí fenotypových a molekulárně genetických metod, kmen musí být uložen v mezinárodní sbírce kultur. Pro určení bezpečnosti a účinnosti kmene jsou nutné *in vitro* testy a/nebo testy na zvířatech a poté také dvojité zaslepené, randomizované, placebem kontrolované (DZPK) klinické studie. Výrobek obsahující probiotické mikroorganismy pak musí obsahovat označení rodu, druhu a kmene a dále údaj o minimální koncentraci mikroorganismů do konce jeho záruční doby. S ohledem na tyto požadavky jsou jako probiotika nejčastěji využívány různé druhy laktobacilů a bifidobakterií. Logicky proto vznikl také požadavek pro jejich kvantitativní kontrolu. Podle mezinárodních ISO/IDF norem však v současnosti existuje pouze postup pro selektivní stanovení druhu *Lactobacillus acidophilus*. Pro ostatní druhy laktobacilů sice existuje požadavek (10^6 v 1 g či 1 ml výrobku - tzv. terapeutické minimum) pro počet živých buněk obsažených v produktu do konce doby expirace, avšak neexistuje spolehlivá a závazná metoda jak požadovaný stav ověřit. Podobně u bifidobakterií existuje pouze ISO/IDF norma pro stanovení rodu *Bifidobacterium*, přičemž dosud nebylo možné rozlišit jednotlivé, v současné době používané, druhy.

Materiál a metody

Pro testování bakterií obsažených v probiotických výrobcích bylo v první řadě použito jejich stanovení pomocí dostupných selektivních médií. Dále byla provedena identifikace na úroveň rodu (F6PPK, PCR) a na úroveň druhu a kmene (API, PCR, MALDI-TOF MS, sekvenace genů - 16SrRNA, HSP60). DNA vzorků byla izolována podle protokolu PrepMan® (Applied Biosystems®). Pro identifikaci pomocí MALDI-TOF MS byly připraveny čerstvě narostlé kultury (Kmet a Drugdova, 2012). Stanovení bifidobakterií je upraveno normou ISO 29981:2010 (IDF 220). Stanovení bifidobakterií v mléčných produktech. Bylo použito médium TOS s mupirocinem (50 mg/l), při pH 7,4 probíhala kultivace

anaerobně 48 hodin při 37°C. Pro selektivní stanovení *Bifidobacterium bifidum* bylo využito jeho schopnosti užívat mucin. Bylo testováno médium sestávající z tryptonu (5,0 g/l), živného bujónu č. 2 (25,0 g/l), kvasničného autolyzátu (2,5 g/l), tweenu (0,5 ml/l), cysteinu (0,25 g/l), mucinu (20 g/l) a bromkresolové červeně (0,01 g/l). Byl vyvinut selektivní MM (mucin, mupirocin) agar pro stanovení druhu *B. bifidum*. Složení MM agaru: trypton (5,0 g/l), živný bujón (Nutrien) (5,0 g/l), kvasničný autolyzáta (Yest) (2,5 g/l), tween (0,5 ml/l), cystein (0,25 g/l), technický agar (10 g/l), mucin (20 g/l), mupirocin (100 mg/l). Pro selektivní stanovení *B. longum* a *B. breve* byla vyvinuta selektivní média s obdobným základním složením (MM bez mucinu), kde jako zdroj uhlíku byly použity: pro *B. longum* turanosa a pro *B. breve* sorbitol a mannitol. Stanovení *Lactobacillus acidophilus* bylo provedeno podle normy ISO 20128:2006 (IDF 192). Stanovení *Lactobacillus acidophilus* v mléčných produktech. Zde bylo použito médium MRS s klindamycinem (0,1 mg/l), médium však není dostatečně selektivní a nebylo možné jím odlišit řadu jiných druhů laktobacilů a rovněž kvasinky. Pro stanovení *L. casei* mezinárodní ISO/IDF norma neexistuje. Zde byl použit MRS agar (Oxoid) s přídavkem 1,5% žluči (Oxoid) a pH 5,4 (Vinderola a Reinheimer, 2000). Na Rogosa agaru při pH 5,4 probíhala kultivace anaerobně 14 dnů při 15 °C (Champagne et al., 1997).

Výsledky a diskuse

Perspektivní probiotický druh, typický pro trávicí trakt člověka, je *Bifidobacterium bifidum*. Často se vyskytuje u kojených novorozenců, dobře využívá oligosacharidy mateřského mléka a je schopen využívat mucin. Setkáme se s ním hlavně v lyofilizovaných probiotických produktech. Byl navržen MM agar (mucin, mupirocin agar), který se ukázal být vhodný ke kultivačnímu stanovení druhu *B. bifidum*. Byly stanoveny počty *B. bifidum* v testovaných výrobcích v řádech od 10^6 do 10^7 KTJ/g výrobku (Tab. 1).

Tab. 1 Počty kolonií *Bifidobacterium bifidum* na MM agaru

Výrobek	LogKTJ / 1 g výrobku
Lepicol	8,05
Biopron Junior	8,06
Laktobacilky Baby	7,9
Probioflora	7,18
AB Aktiv	7,16

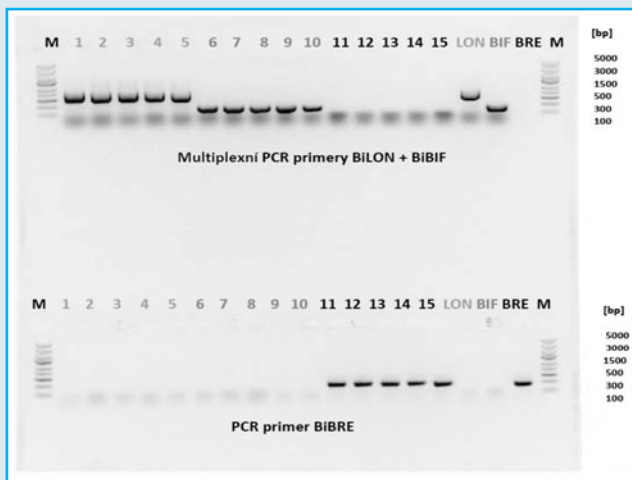
Dále byly stanoveny druhy *B. longum* a *B. breve*. Byla užita vyvinutá selektivní média, modifikované MM médium, s různými zdroji uhlíku: pro stanovení *B. longum* turanosa, pro *B. breve* sorbitol a mannitol.

Kultivační selektivní stanovení druhů *B. bifidum*, *B. longum* a *B. breve* bylo potvrzeno užitím druhově specifické PCR a dalších metod (Tab. 2, Obr. 1). Kmeny bifidobakterií byly identifikovány pomocí pozitivní F6PPK, rodové i druhové PCR, API 50 CHL, Rapid ID 32 A a MALDI-TOF MS.

Tab. 2 Identifikace bifidobakterií izolovaných z probiotických výrobků

Výrobek	F6PPK	PCR rodová	PCR druhová	API 50 CH	Rapid ID 32 A
Lepicol	+	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>
Pangamin Bifi	+/-	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. longum</i>
Probioflora	+	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>
Biopron Junior	+	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>
Candi Stop	+/-	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. breve</i>
Lactobene	+/-	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>
Laktobacilky Baby	+	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>
AB Aktiv	+	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>

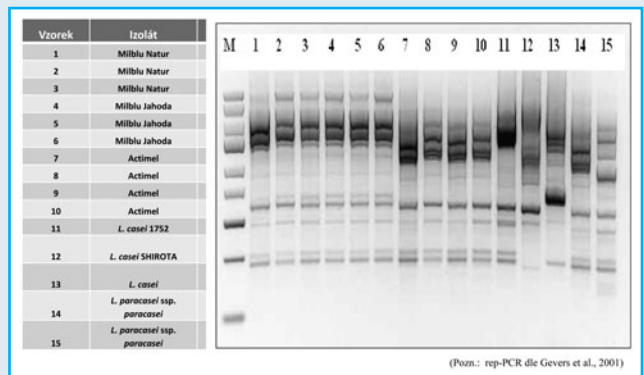
(Pozn.: PCR dle Matsuki et al., 2003; F6PPK: + pozitivní, +/- nejednoznačný výsledek)

Obr. 1 Selektivní stanovení a identifikace bifidobakterií *B. bifidum*, *B. longum* a *B. breve* pomocí druhové specifické PCR

Mléčné kysané výrobky obsahovaly *Lactobacillus casei* v řádech od 10^6 do 10^8 KTJ/g výrobku (Tab. 3). Byla také provedena identifikace *Lactobacillus casei* na úroveň kmene (Actimel, Milblu). Vyhodnocení biochemických testů API 50 CHL programem Apiweb u produktů: Milblu Natur: *L. paracasei* subsp. *paracasei* (99,7 %; 0,79 T), Milblu Jahoda: *L. paracasei* subsp. *paracasei* (99,8 %; 0,775 T), Actimel (Natur, Jahoda): *L. paracasei* subsp. *paracasei* (99,6 %; 0,83 T), korespondovalo s rep-PCR (Obr. 2). Pro potvrzení získaných výsledků byla provedena sekvenace genů 16S rRNA a HSP60 (Obr. 3). Kmeny z Danone a Milblu se u 16S rRNA nelišily, lišily se však ve dvou bázích u genu pro HSP60.

Tab. 3 Počty kolonií izolovaných laktobacilů (*Lactobacillus casei*)

Výrobek	LogKTJ / 1 g výrobku
Actimel Jahoda	8,93
Actimel Natur	8,92
Probiotický drink natural	8,31
Bifidus Natur	7,8
Vian Probiotic Drink	7,73
Vivacto Probiotic jogurt drink	7,72
Acti Plus Drink	7,71
Probiotic Drink Classic	6,78

Obr. 2 Charakterizace *Lactobacillus casei* a příbuzných druhů izolovaných z mléčných kysaných výrobků pomocí rep-PCR

(Pozn.: rep-PCR dle Gevers et al., 2001)

Obr. 3 Sekvenace genu pro HSP60 u dvou kmenů laktobacilů - šipky označují odlišné báze

Závěr

Stanovení většiny druhů bifidobakterií v potravinách je možné a spolehlivé. Médium s mucinem je vhodné pro selektivní stanovení *B. bifidum*, lze selektivně stanovit i ostatní aplikované druhy bifidobakterií.

Je nutné vypracovat spolehlivou normu pro stanovení *L. casei* a *L. acidophilus*. Metody fungující pro mléčné výrobky nemusí fungovat pro jiné potraviny (fermentované masné výrobky).

Stanovení kvasinek v probiotických výrobcích je snadné, jejich identifikace je však problematická.

Obr. 4 Výrobci, kterým SPP udělila právo používat logo společnosti

Logo SPP uděleno

- Firmě Danone a.s., Konopišská 905, 256 37 Benešov za výrobky
 - Activia nápoj *
 - Activia lehká & fit *
 - Actimel Natur
 - Actimel Jahoda
- Firmě ASP Czech s.r.o., K Teplínám 679, Slušovice za výrobek
 - Lepicol
- S&D Pharma Ltd., Westfield Lane, Harrow HA39ED, Velká Británie za výrobky
 - Probio-Fix *
 - Probio-Fix Imun *
- Valosun a.s., Kytnerova 403/5, 621 00, Brno za výrobek
 - Biopron Junior

* testované výrobky nezmiňované v článku

Většina výrobků, testovaných SPP v roce 2013, obsahovala deklarované mikroorganismy, počty živých bakterií byly však v některých případech nižší.

Na základě výsledků realizovaných testů uděluje SPP výrobcům právo používat logo společnosti (Obr. 4).

Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory NAZV v rámci grantu QJ1210093 - Nové metody pro výrobu, kontrolu kvality a účinků probiotických potravin.

Literatura

- ISO 29981:2010 (IDF 220: 2010). Milk products - Enumeration of presumptive bifidobacteria - Colony count technique at 37 degrees C.
- ISO 20128:2006 (IDF 192: 2006). Milk products - Enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a selective medium - Colony count technique at 37 degrees C.
- Champagne C.P., Roy D., Lafond A. (1997): Selective enumeration of *Lactobacillus casei* in yoghurt-type fermented milks based on a 15°C incubation temperature. *Biotechnology Techniques* 8, 567-569.
- Gevers D., Huys G., Swings J. (2001): Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 205, 31-36.
- Kaur I.P., Chopra K., Saini A. (2002): Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 15, 1-9.
- Klaenhammer T.R., Kullen M.J. (1999): Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 50, 45-57.
- Kmet V., Drugdova Z. (2012): Antimicrobial susceptibility of microflora from ovine cheese. *Folia Microbiologica*, 57, 291-293.
- Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R. (2003): Genus and species-specific PCR primers for the detection and identification of bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 4, 61-69.
- Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J., Mattila-Sandholm T. (2000): Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* 84, 197-215.
- Vinderola C.G., Reinheimer J.A. (2000): Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic acid starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal* 10, 271-275.

Pozn.: Další literatura je k dispozici u autorů.

Přijato do tisku: 6. 5. 2013

Lektorováno: 22. 6. 2013

STANOVENÍ LAKTOSY V MLÉČNÝCH MATERIÁLECH S UPRAVENÝM OBSAHEM MLÉČNÉ SUŠINY METODOU HPLC

Borková Markéta¹, Marková Marie¹, Mošnová Romana², Elich Ondřej¹

¹ Výzkumný ústav mlékařenský s.r.o., Praha

² MILCOM a.s., Praha

Determination of lactose in dairy materials with modified milk dry matter content by HPLC

Abstrakt

Laktosa byla v mléčných materiálech s upraveným obsahem mléčné sušiny stanovena technikou vysokoučinné

kapalinové chromatografie na koloně Phenomenex Luna NH₂ s refraktometrickou detekcí. Kvantifikace laktosy byla provedena metodou přidavku vnitřního standardu monohydrátu D(+)-melezitose.

Podrobněji byl sledován vliv navýšení obsahu mléčných bílkovin v mléčném vzorku přidávkem tekutých mléčných retentátů, sušeného nízkotučného a plnotučného mléka na obsah laktosy ve vzorku. V případě tekutých retentátů nebyl zaznamenán významný rozdíl v obsahu laktosy. Přídávkem sušeného mléka se obsah laktosy zvýšil z původních 4,65 g/100 g na 4,93 až 5,66 g/100 g. Výsledky stanovení laktosy technikou HPLC odpovídaly předpokládanému obsahu laktosy vypočtenému z hmotnostní bilance výchozí suroviny a jednotlivých přidavků. Získané výsledky potvrdily, že metoda HPLC je vhodná pro stanovení laktosy v mléčných matricích s upraveným obsahem mléčné sušiny.

Klíčová slova: laktosa, HPLC, bílkovinné koncentráty

Abstract

Lactose in milk material with modified milk dry matter content was determined using high pressure liquid chromatography on Phenomenex Luna NH₂ column with refractometric detection. Quantification of lactose was performed by addition of the monohydrate D(+)-melezitose internal standard.

The effect of increase of milk proteins content in milk sample by addition liquid milk retentates, dried skim and whole milk for lactose content of the sample was followed in great detail.

In the case of liquid retentate wasn't observed significant difference in the content of lactose. The content of lactose was increased by addition of dried milk from original 4.65 g/100 g to 4.93 up to 5.66 g/100 g. The results of determination of lactose by HPLC were similar as presumed content of lactose calculated from the mass balance of individual portions. The results verified that the method is suitable for HPLC determination of lactose in dairy materials with modified milk dry matter content.

Keywords: lactose, HPLC, protein concentrates

Úvod

V současné době je v mlékařenském průmyslu patrný trend vývoje nových výrobků, u kterých jsou uplatňovány zdokonalené a nové prvky technologie (např. ultrafiltrace), při kterých dochází ke změně složení obsahu složek mléčné sušiny vstupní suroviny. S tímto rozvíjejícím se trendem zavádění nových mléčných produktů obohacených o jednotlivé složky mléčné sušiny, je nutností zavést a optimalizovat vhodné metody pro stanovení jednotlivých složek mléčné sušiny, které nejsou rušeny změnou matrice vzorku.

V praxi se často používá navýšení obsahu mléčných bílkovin v mléčné matrici, a proto byla pozornost zaměřena zejména na vliv přidavku mléčné bílkoviny na obsah laktosy ve finálním produktu. Přídavek bílkovinné složky do vstupní suroviny na výrobu mléčných výrobků může být