

## Závěr

Sledování počtu *S. aureus* a přítomnosti stafylokokových enterotoxinů (SEs) je u čerstvých sýrů významným kritériem bezpečnosti těchto mléčných výrobků. Tvorba SEs byla v případě použití BHI média a potravinové matrice rozdílná. Nejrychlejší tvorba byla zaznamenána u enterotoxinu A. Porovnáním vytvořených růstových křivek s křivkami programu prediktivní mikrobiologie byla potvrzena vhodnost využívání programu jako součásti systému HACCP v procesu výroby čerstvých sýrů v rámci minimalizace potencionálního rizika onemocnění stafylokokovou enterotoxikózou.

## Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory Výzkumného záměru MSM 6215712402 Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin a IGA VFU Brno 16/2013/FVHE.

## Literatura

- AKINEDEN Ö., HASSAN A.A., SCHNEIDER E., USLEBER E. (2008): Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolates from goat's milk cheese. *Int J Food Microbiol.*, 124, s. 211-216.
- ARGUDÍN M.A., MENDOZA M.C., RODICIO M.R. (2010): Food Poisoning and *Staphylococcus aureus*. Enterotoxins. *Toxins*, 2, s. 1751-1773.
- ASAO T., KUMEDA Y., KAWAI T., SHIBATA T., ODA H., HARUKI K., NAKAZAWA H., KOZYKIS. (2003): An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol Infect.*, 130, s. 33-40.
- BHUNIA A.K. (2008): Foodborne microbial pathogens. Mechanisms and pathogenesis. 1<sup>st</sup> ed. New York, USA: Springer Science+Business Media, LLC. s. 276.
- BUCHANAN R.L., SMITH J.L., MCCOLGAN C., MARMER B.S., GOLDEN M.H., DELL B.J. (1993): Response surface models for the effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the aerobic and anaerobic growth of *Staphylococcus aureus* 196E. *J Food Safety*, 13, s. 159-175.
- ČSN EN ISO 6888-1 (1999): Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků (*Staphylococcus aureus* a další druhy) - Část 1: Technika s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera. 15 s.
- EC No. 2073/2005: Commission Regulation (EC) No. 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official J of the EU*, L 322/12.
- ERTAS N., GONULALAN Z., YILDIRIM Y., KUM E. (2010): Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in wheel cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. *Int J Food Microbiol.*, 142, s. 74-77.
- HUBÁČKOVÁ M., RYŠÁNEK D. (2007): Effects of freezing milk samples on the recovery of alimentary pathogens and indicator microorganisms. *Acta Vet Brno*, 76, s. 301-307.
- JABLONSKI L.M., BOHACH G. (2001): *Staphylococcus aureus*. V: DOYLE M.P., BEUCHAT L.R., MONTVILLE T.J. (Ed.): Food microbiology: Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Washington, s. 411-434.
- LOIR Y., BARON F., GAUTIER M. (2003): *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res.*, 2, s. 63-76.
- MORANDI S., BRASCA M., ANDRIGHETTO C., LOMBARDI A., LODI R. (2009): Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains from Italian dairy products. *Int J Microbiol.*, s. 1-8.
- NECIDOVÁ L., ŠTÁŠTKOVÁ Z., POSPÍŠILOVA M., JANŠTOVÁ B., STREJČEK J., DUŠKOVÁ M., KARPÍŠKOVÁ R. (2009): Influence of soft cheese technology on the growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. *Czech J Food Sci.*, 27, s. 127-133.
- RABELLO R.F., MOREIRA B.M., LOPES R.M., TEIXEIRA L.M., RILEY L.W., CASTRO A.C. (2007): Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. *J Med Microbiol.*, 56, s. 1505-1511.

- SATTAR S.A., SPRINGTHORPE S., MANI S., GALLANT M., NAIR R.C., SCOTT E., KAIN J. (2001): Transfer of bacteria from fabrics to hands and other fabrics: development and application of a quantitative method using *Staphylococcus aureus* as a model. *J Appl Microbiol.*, 90, s. 962-970.
- SCHEERER D., CORTI S., MUEHLHERR J.E., ZWEIFEL C., STEPHAN R. (2004): Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. *Vet Microbiol.*, 101, s. 101-107.
- SUTHERLAND J.P., BAYLISS A.J., ROBERTS T.A. (1994): Predictive modeling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *Int J Food Microbiol.*, 21, s. 217-236.
- United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service Department of Agriculture-Agricultural Research Service (USDA-ARS), Eastern Regional Research Center (ERRC) in Wyndmoor, Pennsylvania. Pathogen Modeling Program (PMP) Online. Staženo: 5.4.2012. Dostupné z: [www.pmp.arserrc.gov/PMPOnline.aspx?ModelID=4&Aerobic=True](http://www.pmp.arserrc.gov/PMPOnline.aspx?ModelID=4&Aerobic=True).
- VALERO A., PÉREZ-RODRIGUEZ F., CARRASCO E., FUENTES-ALVENTOSA J.M., GARCÍA-GIMENO R.M., ZURERA G. (2009): Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. *Int J Food Microbiol.*, 133, s. 186-194.
- WALLIN-CARLQUIST N., BORCH D.M.E., RÄDSTRÖM P. (2010): Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. *Int J Food Microbiol.*, 141, s. 69-74.
- ZURERA-COSANO G., CASTILLEJO-RODRIGUEZ A.M., GARCÍA-GIMENO R.M., RINCÓN-LEÓN F. (2004): Performance of response surface and Davey model prediction of *Staphylococcus aureus* growth parameters under different experimental conditions. *J Food Protect.*, 67, s. 1138-1145.

Přijato do tisku: 10. 6. 2013

Lektorováno: 29. 7. 2013

## POROVNÁNÍ PRODUKCE Kyseliny PROPIONOVÉ PŘI FERMENTACI ZAHUŠTĚNÉ SYROVÁTKY VYBRANÝMI KMENY PROPIONIBAKTERIÍ

Eva Kvasničková, Šárka Havlíková, Vladimír Dráb  
Výzkumný ústav mlékárenský s. r. o.

The comparison of propionic acid production  
by selected strains of propionic bacteria  
during the fermentation of concentrated whey

### Abstrakt

Práce byla zaměřena na prozkoumání schopnosti produkce kyseliny propionové vybranými kmeny propionových bakterií při fermentaci zahuštěné syrovátky. Fermentace probíhaly v laboratorním fermentoru INFORS 4 při pH 6 a teplotě 30 °C. Jednotlivé kmeny se lišily jak v množství vytvořené kyseliny propionové, tak i v produkci kyseliny octové a schopnosti fermentovat vedle laktátu také laktózu. Nejvyšší produkce kyseliny propionové bylo dosaženo u kmene MAD-8AP (3 400 mg/100 ml) a kmene CCM 3323 (1 200 mg/100 ml). Tyto dva kmeny byly vybrány k dalšímu testování.

**Klíčová slova:** syrovátka, *Propionibacterium*, fermentace, kyselina propionová, laktát

## Abstract

The work was focused on the determination of ability to produce propionic acid by selected strains of propionic bacteria during the fermentation of concentrated whey. Fermentation were held in a laboratory fermentor at pH 6 and temperature 30°C. Tested strains differed in the amount of propionic acid formed, in the production of acetic acid and in the ability to ferment lactose besides lactate as well. The highest production of propionic acid was found in strain MAD-8AP (3,4 g/100 g) and strain CCM (1,2 g/100 g). These two strains were selected for further testing.

**Key words:** whey, *Propionibacterium*, propionic acid, lactic acid, lactate

## Úvod

Bakterie rodu *Propionibacterium* jsou významnými producenty kyseliny propionové jako hlavního metabolitu, nejvíce zastoupeným vedlejším produktem fermentace je kyselina octová. Soli kyseliny propionové mají výrazné antimikrobiální účinky a jsou proto zajímavým biokonzervačním činidlem použitelným v potravinářské výrobě a především ve výrobě pečiva, protože omezují růst plísní (DRÁB a kol. 2012)

Podmínky pro růst propionových bakterií splňuje řada substrátů, jedním z nich je odpadní produkt z výroby sýrů - syrovátka. Obsahuje jak kyselinu mléčnou jako přednostně využitelný substrát pro tyto bakterie, tak i poměrně velké množství laktózy jako další substrát. Laktóza může být využita přímo propionovými bakteriemi po vyčerpání laktátu nebo může být jinými bakteriemi předem nebo současně zfermentována na laktát.

Produkcí kyseliny propionové ze syrovátky kontinuálním způsobem se zabývali např. GUPTA a kol. (2001). Ze syrovátky zahuštěné ultrafiltrací s přidavkem  $\text{CaCO}_3$  k neutralizaci vznikajících kyselin a kvasničného extraktu jako zdroje dusíku získali kyselinu propionovou JAIN a kol. (1999) s výtěžností 2,25 až 11,5 g/l.

V předkládané práci je uvedeno porovnání růstu různých kmenů rodu *Propionibacterium* ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora MILCOM a. s. v Táboře a České sbírky mikroorganismů v Brně v syrovátce zahuštěné reverzní osmózou s cílem vybrat kmeny s nejvyšší produkcí kyseliny propionové a vytvořit tak předpoklad pro hledání nových možností využití syrovátky.

## Materiál a metody

Pro fermentaci syrovátky byly použity kmeny *Propionibacterium* sp. CCM 3323 (Česká sbírka mikroorganismů, Brno), *Propionibacterium freudenreichii* CCDM 160, *Propionibacterium* sp. MAD-8AP, a IOTA2-DL1 P (Laktoflora, MILCOM a.s.). Kmeny byly uchovávány při -

70 °C v YEL bujónu s 15 % glycerolu. Po obnovení v YEL bujónu při 30 °C po dobu 48 hodin byly kmeny dále vedeny v zahuštěné syrovátce.

5 mol/l roztok  $\text{NH}_4\text{OH}$  (ALDRICH 318612) k úpravě pH ve fermentoru

GLIM agar (MILCOM a. s.) ke stanovení KTJ/ml propionibakterií plotnovou metodou. Složení na 1 litr: trypton 10 g, kvasničný autolyzát 5 g, laktát lithný 10 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,25 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,05 g, glycerol 6 g, bromkresol purpur 0,05 g, agar 15 g.

Sladká syrovátka zahuštěná reverzní osmózou, sterilovaná při 110°C 20 minut s obsahem laktátu od 1,88 do 2,24 g/100 ml a obsahem laktózy od 12,1 do 12,8 g/100 ml.

Laboratorní fermentor LABFORS 4 (INFORS AG, Bottmingen, Schweiz) s detektory plynů BlueSens (BlueSens gas sensor GmbH, Germany) pro  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2$ .

## Pracovní postup

### Fermentace

K fermentaci zahuštěné syrovátky byly použity tyto kmeny propionibakterií *Propionibacterium* sp. CCM 3323, *Propionibacterium* sp. MAD-8AP, *Propionibacterium freudenreichii* CCDM 160 a *Propionibacterium* sp. IOTA-DL1P. Po provedených fermentacích byla vyhodnocena produkce kyseliny propionové a změny dalších složek fermentační směsi. Fermentace probíhaly v laboratorním fermentoru s 900 ml sterilní zahuštěné syrovátky a 100 ml inokula kultivovaného v téže zahuštěné syrovátce. Protože propionové bakterie produkují kyselinu propionovou až po přechodu populace do stacionární fáze, bylo použito poměrně vysoké inokulum ve snaze zkrátit co nejvíce logaritmickou fázi jejich růstu. Kyselost fermentační směsi byla nastavena na hodnotu 6 a úprava byla prováděna automaticky přidavkem 5 mol/l  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Teplota byla udržována na 30°C a rychlost míchání 236 ot/min. V průběhu fermentací byly asepticky odebírány vzorky ke kontrole KTJ/ml propionibakterií plotnovou metodou, stanovení nižších mastných kyselin (NMK) kapilární izotachoforézou a obsahu laktózy, glukózy a galaktózy kapilární elektroforézou (CE).

### Stanovení obsahu cukrů CE

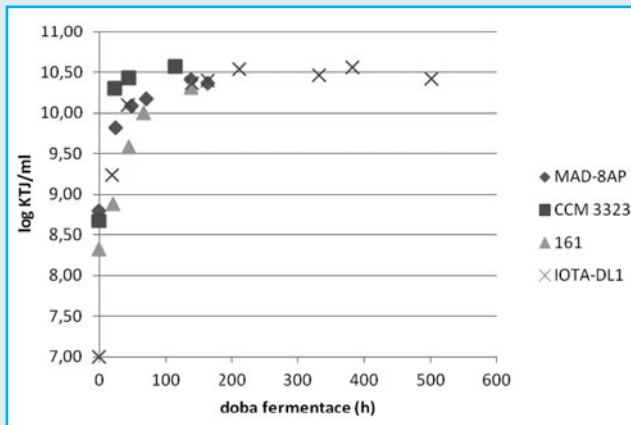
Pro stanovení sacharidů byl používán systém kapilární elektroforézy Agilent CE 3D G1600 (Agilent Technologies, USA) s UV detekcí. Separace jednotlivých sacharidů probíhala v nepotažené křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ , celkové délce 64,5 cm a efektivní délce 56 cm. Separční pufr pro toto stanovení se skládal ze 130 mM  $\text{NaOH}$  a 36 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  v deionizované vodě (pH 12,6). Kapilára a karusel byly v této metodě temperovány na 15 °C a vlastní separace probíhala při vloženém napětí 16 kV. K injektáži vzorků byl využíván hydrodynamický mód, kdy při tlaku 35 mbar byl nejprve po dobu 4 sekund injektován vzorek a následně po dobu 5 sekund pufr. Detekované píky sacharidů byly zaznamenávány při vlnové délce 270 nm se šířkou spektra 10 nm.

Před každou analýzou byla kapilára kondicionována 10%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (4 min) a puřrem (6 min).

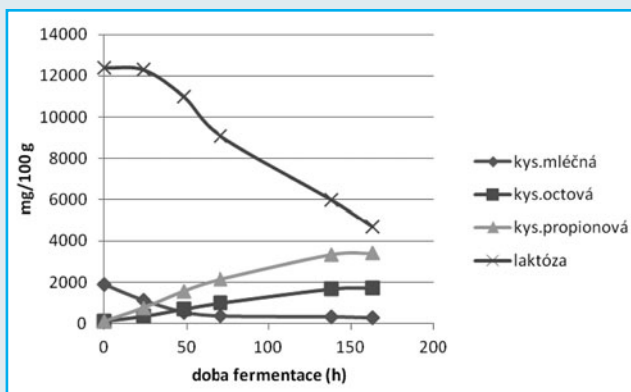
### Stanovení nižších mastných kyselin kapilární isotachoforézou

Niřší mastné kyseliny byly stanoveny na izotachoforetickém analyzátoru EA 02 (Villa Labeco, SR) podle SOP č. 23 (MILCOM a. s., Tábor).

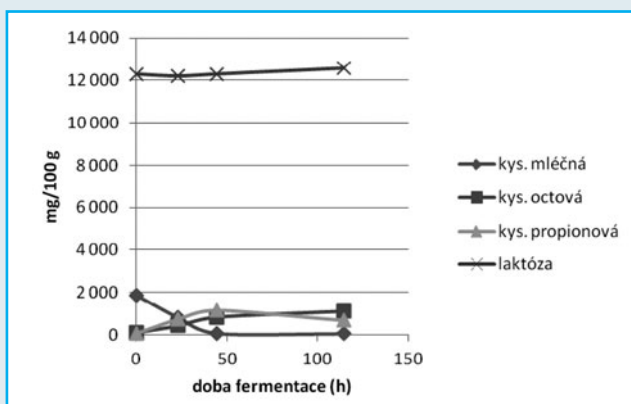
## Výsledky a diskuse



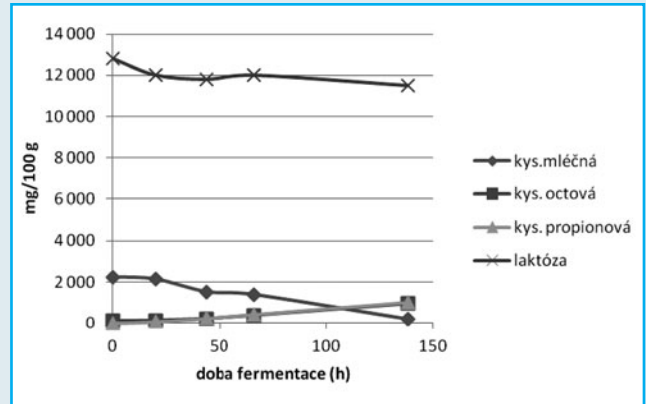
**Obr. 1** Růst jednotlivých kmenů v zahuřtěné syrovátce při 30 °C



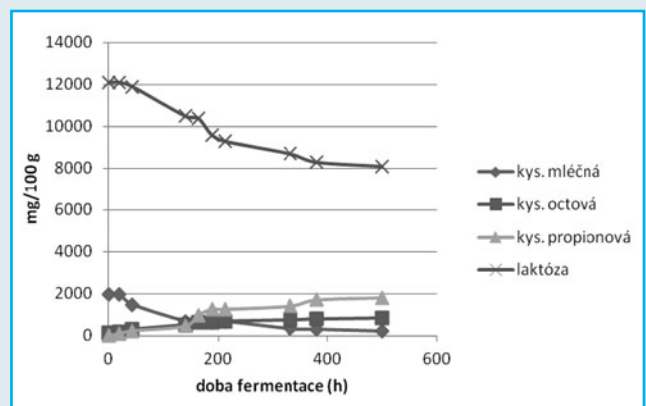
**Obr. 2** Změny obsahu vybraných organických kyselin a laktózy při fermentaci zahuřtěné syrovátky při 30 °C kmenem MAD-8AP



**Obr. 3** Změny obsahu vybraných organických kyselin a laktózy při fermentaci zahuřtěné syrovátky při 30 °C kmenem CCM 3323



**Obr. 4** Změny obsahu vybraných organických kyselin a laktózy při fermentaci zahuřtěné syrovátky při 30 °C kmenem CCDM 160



**Obr. 5** Změny obsahu vybraných organických kyselin a laktózy při fermentaci zahuřtěné syrovátky při 30 °C kmenem IOTA2-DL1P

Výchozí obsah laktátu byl na počátku testování čtyř vybraných kmenů v rozmezí 1 881 - 2 242 mg/100 ml. Obsah laktózy v syrovátce na počátku byl stanoven 12 000 mg/ml až 12 800 mg/100 ml. Počty KTJ/ml jednotlivých kmenů v průběhu fermentací stanovené plotnovou metodou na GLIM agaru jsou uvedeny v grafu na obr. č. 1. U kmene MAD-8AP (obr. č. 2) byl obsah laktátu spotřebován do 72 hodin. Rozklad laktózy začal ještě před úplným vyčerpáním laktátu. Dosažený obsah kyseliny propionové byl 3 400 mg/100 ml a obsah kyseliny octové na konci fermentace byl přibližně o polovinu nižší než obsah kyseliny propionové. Kmen CCM 3323 (obr. č. 1) v syrovátce rostl nejrychleji, do 23 hodin byl počet KTJ/ml vyšší než  $10^{10}$ . Laktát byl spotřebován do 50 hodin od začátku fermentace (obr. č. 3). Laktózu jako druhotný substrát neřtěpil vůbec a obsah vytvořené kyseliny propionové a kyseliny octové byl přibližně stejný a nepřesáhl 1 200 mg/100 ml. Při fermentaci zahuřtěné syrovátky kmenem CCDM 160 (obr. č. 4) se obsah laktátu snížil na 216 mg/100 ml až po 138 hodinách, laktóza byla řtěpena jen velmi slabě a obsah kyseliny propionové byl po této době fermentace pouze 1 001 mg/100 ml a byl téměř shodný s obsahem kyseliny octové. Kmen IOTA2-DLP (obr. č. 1) rostl v testovaném substrátu rychleji než kmen CCDM 160, ale rozklad laktátu byl pomalý, obsahu



kyseliny propionové 972 mg/100 ml bylo dosaženo až po 140 hodinách fermentace a dvojnásobného zvýšení této hodnoty až po 500 hodinách (obr. č. 5). Po této době byla spotřebována i 1/3 obsahu laktózy. Obsah kyseliny octové byl celou dobu fermentace nižší než kyseliny propionové. Ve vzorcích ze všech fermentací byla stanovena pouze laktóza, přítomnost glukózy ani galaktózy nebyla v syrovátce na počátku a během fermentací zjištěna.

Kmen MAD-8AP jako zdroj uhlíku využil laktát i laktózu a bylo u něho dosaženo při pokusné fermentaci nejvyššího obsahu kyseliny propionové - 3 400 mg/100 ml za 138 hodin. CORAL a kol. (2008) uvádí u *Propionibacterium acidipropionici* výsledný obsah kyseliny propionové při obdobné fermentaci pouze 3 000 mg/100 ml po 130 hodinách. Sbírkový kmen 3323 byl nejrychlejší v růstu, ale neštěpil laktózu a produkce kyseliny propionové u něj byla nižší - pouze 1 200 mg/100 ml. Další dva kmeny vykazovaly pomalejší a nižší produkci kyseliny propionové.

## Závěr

Pro další testování byly vybrány kmeny MAD-8AP a CCM 3323, které produkovaly za uvedených fermentačních podmínek největší množství kyseliny propionové.

## Poděkování

Tato práce vznikla za podpory Rozhodnutí č. RO0512 a projektu QI111B053 MZe ČR.

## Literatura

- CORAL, J.; KARP, S. G.; SOUZA VANDERBERGHE, L. P.; PARADA, J. L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. (2008) Batch fermentation model of propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151, s. 333-341
- DRÁB, V.; SUCHANOVÁ, E. (2012): Antifungální vlastnosti bakterií propionového kvašení. *Mlékařské listy* 23, 135, s. XII-XV
- GUPTA, A.; SRIVASTAVA, A. K. (2001) Continuous propionic acid production from cheese whey using in situ spin filter. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 6, s. 1-5
- JAIN, D. L.; TYAGI, R. D.; KLUEPFEL, D.; AGBEBAVI, T. J. (1991) Production of propionic acid from whey ultrafiltrate by immobilized cells of *Propionibacterium shermanii* in batch proces. *Process Biochemistry* 26 (4), s. 217-223

Přijato do tisku: 23. 7. 2013

Lektorováno: 10. 8. 2013

## Diagnostické soupravy a přístroje pro chemické a mikrobiologické analýzy mléka a mléčných výrobků a kontrolu kvality hygieny a sanitace



Mimo jiné nabízíme:

- luminometry **Uni-Lite, Uni-Lite NG** - rychlá kontrola hygieny
- sušené živné půdy **BIOKAR** - klasická mikrobiologie potravin
- **PETRIFILM** média - přímá mikrobiologická kontrola
- proužkové testy na tetracykliny, mykotoxiny, GMO aj.
- přesné analyzátoři mléka a mléčných produktů firem **Advanced Instruments a Delta Instruments**: kryoskopy - bod mrznutí, Fluorophos - alkalická fosfatáza, Somascope - počet somatických buněk, Lactoscope - obsahové složky, FTIR analyzátoři
- ELISA metody - detekce toxinů, antibiotik, alergenů, hormonů a patogenů (*Salmonely, Listerie, aj.*) v potravinách a krmivech
- enzymatické testy - chemické složení potravin

*Rádi Vám poskytneme informace o všech dodávaných testech a provedeme jejich prezentaci.*

**NOACK ČR spol. s r.o.**  
 Vídeňská 122, Brno 619 00  
 Tel. 533 439 722, Fax. 533 439 720  
 diagnostika@noack.cz

# NOACK