

HLEDÁNÍ VHODNÝCH KVASOVÝCH IZOLÁTŮ PRO PEKAŘSKÉ VYUŽITÍ

Markéta Lízalová, Vladimír Dráb

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Soběslavská 841, Tábor
Email: m.lizalova@vum-tabor.cz, v.drab@vum-tabor.cz

The finding of applicable sourdough isolates for use in bakery

Abstrakt

Cílem této studie bylo nalezení vhodných bakterií pro zařazení do kvasové kultury. Byly studovány jejich pozitivní vlastnosti, jako je přežití a růst v médiu simulujícím kvas. Další testovanou oblastí byla tvorba exopolysacharidů a inhibice běžných kvasových kultur izolovanými laktobacily.

Klíčová slova: kvas, laktobacily, exopolysacharidy, inhibice

Abstract

The aim of this research was finding of applicable bacterial strain for placement to sourdough culture. The positive properties were study as survival and grow in simulated sourdough medium. Production of exopolysaccharides and inhibition sour dough culture with isolated *Lactobacillus* genus was the next tested area.

Key words: Sourdough, *Lactobacillus*, Exopolysaccharides, Inhibition

Úvod

Pekařský kvas představuje komplexní biologický ekosystém, který ovlivňuje technologii, senzorku a funkční vlastnosti hotového výrobku. Tento systém vytvářejí kvasinky společně s bakteriemi mléčného kvašení (Minervini a kol., 2012). Složení mikroorganismů v kvasu se liší podle použité mouky. V žitné a pšeničné mouce se vyskytuje jako hlavní zdroj uhlíku maltosa fermentovaná kmeny *Lbc. sanfranciscensis*, *Lbc. fermentum* a *Lbc. reuteri*. Dalším zdrojem energie je škrob, který využívají amylolytické laktobacily např.: *Lbc. plantarum*, *Lbc. amylolyticus* a *Lbc. manihottivorans* (Gänzle, 2014). Výsledné složení kvasu neovlivňuje pouze druh mouky, ale také další technologické podmínky (Coda a kol., 2014).

Významnou látkou využívanou v pekařském průmyslu jsou exopolysacharidy (EPS). EPS jsou bakteriemi produkovány extracelulární polysacharidy uvolňované do růstového média. (Stingele a kol., 1995). Tyto látky zvyšují odolnost mikroorganismů vůči nepříznivým vnějším vlivům. Ochraňují bakterie před vysušením, nedostatkem živin, bakteriofágy a před špatným osmotickým tlakem. EPS usnadňují adhezi bakterií a tvorbu biofilmu (Patel

a kol., 2012). Vyskytují se jako homopolysacharidy (např.: dextran, alternan, reuteran, pullulan, levan a inulin) a heteropolysacharidy (gellan, xanthan a kefiran) (Patel a kol., 2012). Heteropolysacharidy jsou využívány v potravinářství pro své funkční vlastnosti. Používají se např. pro zvýšení viskozity, stabilizaci a emulgaci. (Vanangelgem a kol., 2004). Homopolysacharid reuteran je jeden z EPS, který je díky rozpustnosti ve vodě využíván pro pekárenské účely (produkovan *Lbc. reuterii*) (Patel a kol., 2012). Přídavek do chleba může umožnit vyrobit chléb bez glutenu se stejnými vlastnostmi, jaké má běžný chléb (objem, textura, skladovatelnost). Je důležité, aby bakteriemi produkován EPS, byly pro pekařské mikroorganismy nerozložitelné (Arendt a kol., 2011).

Materiál a metody

Pro měření byly vybrány izoláty z kvasů laboratorních a komerčních. Mikroorganismy použité jako indikátorové kmény pocházejí ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů Laktoflora. Mouky pro měření byly dodány firmou Zeelandia s.r.o.. Chemikálie pro stanovení byly použity v čistotě p.a. z běžně dostupných zdrojů.

Pro měření bylo použito 5 izolátů *Lbc. brevis* (CRL-M225-7A, BF-M17-6A, PHC-M17-6A, GUS-M638-6B, MAGE-M225-7A), 3 izoláty *Lbc. plantarum* (DRIII-M103-5B, AMBR-FHN-5B, JM-M638-6A), 1 izolát *Lbc. paracasei* (DRIII-57-5B), 2 izoláty *Lbc. mindensis* (DRIII-57-5C, AMBR-FHN-4B) a 9 laktobacilů zatím blíže neidentifikovaných (OT-M103-7A, PHC-APT-6B, GUS-M103-6A, GUS-APT-6A, MAGE-APT-7B, JM-APT-7A, 5-APT-5B, DNV-M103-7A, AMBR-57-7EP1). Testovanou oblastí bylo zjištění růstu v moučném médiu (MM), které simuluje prostředí kvasu. Během růstu byla zaznamenávána kontinuálně změna pH a byly měřeny obsahy kyselin, které vznikají během fermentace. Další měření se týkalo tvorby EPS a možné interakce mezi izoláty a běžně se vyskytujícími kvasovými bakteriemi a kvasinkami.

Moučné médium bylo po předchozím testování ponecháno na obsahu 20 % syrovátky o pH 6,5; 5 % mouky - z čehož 60 % bylo mouky pšeničné chlebové a 40 % mouky žitné chlebové. Tato směs byla doplněna na 100 % destilovanou vodou a rozvařena na vodní lázni. Po vychlazení se pH upravilo na hodnotu 6,5 po sterilaci. Počáteční počty byly sjednoceny pomocí měření absorbance (650 nm) na rozmezí 6-7 log KTJ/ml. Kontrola celkového počtu mikroorganismů proběhla vždy na počátku a na konci měření. Živná půda byla použita podle daného izolátu. Měření pH bylo zaznamenáváno každých 10 minut a probíhalo na komerčně dostupných elektrodách při 30 °C, 3 dny. Měření obsahu kyselin bylo stanovováno zavedenou izotachoforetickou metodou.

Pro stanovení tvorby EPS byla upravena metoda použitá v článku Mora a kol. (2002). Jako základ pro moučný agar s rutheniem (MR agar) bylo použito MM s přídavkem 1,2 % agaru a 3 % směsi cukrů - maltosa, fruktosa, glukosa (1:1:1). Pro některé izoláty bylo v půdě upraveno složení

cukrů podle jejich využití sacharidů. Celková koncentrace cukru byla vždy 3 %. Po sterilaci byla do MM přidána sterilní rutheniová červeně 250 µl/100 ml živné půdy. Roztok rutheniové červeně byl připraven z 0,08 g rutheniové červeně rozpuštěné v 10 ml deionizované vody a sterilován mikrofiltrací filtrem Millipore 0,2 µm.

Interakce mezi mikroorganismy přirozeně se vyskytujícími v kvasu a izoláty byla vyzkoušena pomocí jamkové metody inhibice. Pro indikaci byly použity sbírkové kmeny: *Lbc. sanfranciscensis* CCDM 451, *Lbc. fermentum* CCDM 830, *Lbc. reuteri* CCDM 777, *Lbc. plantarum* CCDM 188, *Lbc. brevis* CCDM 202, *Lbc. pontis* CCDM 835, *Lbc. helveticus* CCDM 466, *Pediococcus pentosaceus* CCDM 862, *Kluyveromyces marxianus* CCDM 269 a *Saccharomyces cerevisiae* CCDM 88. Živné půdy pro inhibice byly zvoleny podle indikátorového kmene. Inhibice byla testována pro živé buňky v bujonu, supernatant bujonu, živé buňky v MM a MM sterilované. Pro supernatant bujonu byl každý izolát po nakultivování v bujonu odstředěn, pH roztoku bylo upraveno na 6,5 a necháno při pokojové teplotě stát 30 minut. Po uplynutí době byla kultura sterilována přes mikrofiltr Millipore 0,2 µm. Moučné médium (MM) bylo před sterilací zaočkováno 1 % kultury a 3 dny kultivováno. Po kultivaci byla kultura 2x odstředěna a filtrována přes filtrační papír. Poté bylo pH filtrátu upraveno na 6,5 a necháno 30 minut stát. Sterilizace supernatantu MM probíhala ve vodní lázni při 85 °C po dobu 10 minut v uzavřených falconách.

Výsledky a diskuze

Růst v MM

Z tabulky 1 je vidět, že značného prokvašení a dosažení pH pod 4 po 3 dnech kultivace při 30 °C bylo zjištěno u pěti izolátů, čtyři izoláty dosáhly pH mezi 4 - 4,5, další dva pak pH mezi 4,5 - 5,0. Sedm vzorků se pohybovalo v rozmezí 5 - 5,5 a poslední dva byly pouze mezi 5,5 - 6,0 pH.

Tab. 1 Dosažené pH izolátů po 3 dnech kultivace při 30 °C v MM

pH 6,0-5,5	pH 5,5-5,0	pH 5,0-4,5	pH 4,5-4,0	pH 4,0-3,5
BF-M17-6A	AMBR-57-7EP1	DNV-M103-7A	DRIII-M103-5B	JM-M638-6A
GUS-M638-6B	MAGE-APT-7B	MAGE-M225-7A	OT-M103-7B	AMBR-FHN-5B
GUS-M103-6A		5-APT-5B	DRIII-57-5B	
GUS-APT-6A		DRIII-57-5C	AMBR-FHN-4B	
PHC-M17-6A			JM-APT-7A	
PHC-APT-6B				
CRL-M225-7A				

Tab. 2 Příklady největších a nejmenších změn rozdílů počtu mikroorganismů po 3 dnech kultivace při 30 °C v MM

vzorek	rozdíl mikroorganismů (log KTJ/ml)
AMBR-FHN-5B	2,8
DRIII-57-5B	3,2
DRIII-57-5C	3,4
DRIII-M103-5B	1,2
5-APT-5B	0,9

Tab. 3 Příklady naměřených hodnot obsahů kyselin po 3 dnech kultivace při 30 °C v MM

	kys. mléčná (mg/100 ml)	kys. octová (mg/100 ml)	kys. fosforečná (mg/100 ml)
DRIII-M103-5B	543,54	32,23	95,31
DRIII-57-5B	992,59	10,99	102,55
DRIII-57-5C	668,50	9,86	107,15
AMBR-FHN-4B	771,89	27,56	100,45
AMBR-FHN-5B	818,15	11,41	79,15
5-APT-5B	444,49	55,36	110,29
JM-M638-6A	728,54	29,94	90,91
JM-APT-7A	943,88	29,75	93,34

V tabulce 2 jsou uvedeny příklady největších a nejmenších rozdílů počtů mikroorganismů kultivovaných v MM. Počty mikroorganismů byly stanovovány v den založení pokusu a den ukončení pokusu (3. den). Většina izolátů se pohybovala v rozmezí mezi 1,5 - 2,5 log KTJ/ml. Poslední sledovanou oblastí byl vznik kyselin během fermentace MM. Významnější vznik kyselin během růstu v MM byl pozorován u 8 izolátů, které jsou zaznamenány v tabulce 3.

Z výsledků je patrné, že ne vždy znamenal nejvyšší nárůst celkového počtu také nejvyšší stupeň prokvašení. Vzorky s nejnižším růstem byly v dosaženém pH v rozmezí 4,0 - 4,5 pH. Izoláty s nejvyšší tvorbou kyselin během fermentace byly podle předpokladů vzorky, u kterých došlo k nejvyššímu poklesu pH.

Stanovení EPS

Tvorba EPS byla určována podle růstu růžově nebo bíle zabarvených kolonií na speciálně připraveném MR agaru. Mezi růžově zabarvené kolonie, tedy negativní výsledky, patří CRL-M225-7A, GUS-M638-6B, MAGE-M225-7A, PHC-APT-6B, GUS-M103-6A, GUS-APT-A a MAGE-APT-7B. Bílé až krémové kolonie, tedy pozitivní na tvorbu EPS byly DRIII-M103-5B, AMBR-FHN-4B, AMBR-FHN-5B, DRIII-57-5B, DRIII-57-5C, JM-APT-7A, 5-APT-5B, DNV-M103-7A a AMBR-57-7EP1. Ostatní kolonie izolátů byly bezbarvé.

Tab. 4 Příklad inhibice

izolát	použité médium	CCDM 188	CCDM 466	CCDM 862	CCDM 269
DRIII-M103-5B	bujon, živé	++	+++	++	P
	bujon, supernatant	0	+++	0	P
	MM, živé	++	++	++	0
	MM, supernatant	0	0	0	0
AMBR-FHN-4B	bujon, živé	++, P	+++	++	P
	bujon, supernatant	0	+	0	P
	MM, živé	++	++	++	0
	MM, supernatant	0	0	0	0
CRL-M225-7A	bujon, živé	0	++	P	P
	bujon, supernatant	0	0	0	P
	MM, živé	0	+, P	+, P	0
	MM, supernatant	0	0	0	0

0... bez změny růstu; +... slabá inhibice do 1,3 cm; ++... inhibice 1,3-1,5 cm; +++... čirá inhibice 1,5-2,5 cm; P... podpora růstu indikátorového kmene

Inhibice

V tabulce 4 je uveden příklad inhibicí pro indikátorové kmeny CCDM 188, CCDM 466, CCDM 862 a CCDM 269. Je zde vidět rozdíl mezi použitím buněk živých a supernatantu s upraveným pH a také mezi použitím bujony a MM. U živých buněk docházelo obecně k vyššímu stupni inhibice než u stejného, ale sterilního média. Během růstu bakterií docházelo k produkci organických kyselin, které u živých buněk zvyšují inhibici. U supernatantů (sterilních médií) byl tento efekt vyloučen pomocí úpravy pH. Izoláty identifikované jako *Lbc. brevis* a některé neidentifikované laktobacily vykazovaly u většiny použitých indikátorových kmenů jen mírnou, nebo žádnou inhibici. Ostatní laktobacily, *Lbc. paracasei*, *Lbc. plantarum* a *Lbc. mindensis* se lišily v míře inhibice s použitým indikátorovým kmenem.

Závěr

Bylo zjištěno, že některý z těchto izolátů by mohl být vhodný pro zařazení do kvasu. Izoláty AMBR-FHN-5B, AMBR-FHN-4B, DRIII-57-5B, JM-M638-6A a JM-APT-7A během 3 dnů kultivace snížily pH matrice pod hranici 4,0 a vzorky DRIII-M103-5B, OT-M103-7B, 5-APT-5B a DRIII-57-5C pod hranici 4,5. Tvorba EPS byla nalezena u DRIII-M103-5B, AMBR-FHN-4B, AMBR-FHN-5B, DRIII-57-5B, DRIII-57-5C, JM-M638-6A, JM-APT-7A, 5-APT-5B, DNV-M103-7A a AMBR-57-7EP1. Izoláty CRL-M225-7A, GUS-M638-6B, MAGE-M225-7A, BF-M17-6A, PHC-M17-6A nepotlačují růst u většiny testovaných mikroorganismů, které se v kvasu přirozeně vyskytují.

Vzhledem ke zjištěným vlastnostem izolovaných mikroorganismů, by bylo vhodné do nového kvasu zařadit některý z izolátů AMBR-FHN-5B, AMBR-FHN-4B, DRIII-57-5B, JM-M638-6A, JM-APT-7A, DRIII-M103-5B, 5-APT-5B a DRIII-57-5C, které snižují pH matrice a zároveň tvoří EPS. Pro zařazení některého z těchto laktobacilů (nebo směsi více bakterií) mezi kvasové kultury by bylo nutné prověřit dalšími pokusy jejich vzájemný účinek na přežití ostatních kvasových mikroorganismů a následně na vlastnosti pekárenského výrobku. Další testovanou oblastí musí být tvorba EPS, která může být ovlivněna ostatními kvasovými mikroorganismy a změnou pH matrice. Příznivou vlastností by také bylo potlačení nežádoucí mikroflóry, které způsobuje vady pekařských výrobků.

Poděkování

Tato práce byla uskutečněna za podpory MZe ČR, NAZV, projektu QJ1310256.

Literatura

- ARENDE E.K., MORONI A., ZANNINI E. (2011): Medical nutrition therapy: use of sourdough lactic acid bacteria as a cell factory for delivering functional biomolecules and food ingredients in gluten free bread. *Microbial Cell Factories*, 10.
- CODA R., DI CANGO R., GOBBETTI M., RIZZELLO C.G. (2014): Sourdough lactic acid bacteria: exploration of non-wheat cereal-based fermentation. *Food Microbiology*, 37, s. 51-58.

- GÄNZLE M.G. (2014): Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiology*, 37, s. 2-10.
- KITAHARA M., SAKATA S., BENNO Y. (2004): Biodiversity of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from five sourdoughs. *Letters in Applied Microbiology*, 40, s. 353-357.
- MINERVINI F., DI CANGO R., LATTANZI A., DE ANGELIS M., ANTONIELLI L., CARDINALI G., CAPPELLE S., GOBBETTI M. (2012): Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of 19 sourdoughs used for traditional/typical Italian breads: interactions between ingredients and microbial species diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, s. 1251-1264.
- MORA D., FORTINA M.G., PARINI C., RICCI G., GATTI G., GIRAFFA G., MANACHINI P.L. (2002): Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy product. *Journal of Applied Microbiology*, 93, s. 278-287.
- PATEL S., MAJUMDER A., GOYAL A. (2012): Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian Journal Microbiology*, 52, s. 3-12.
- STINGELE F., NEESER J-R., MOLLET B. (1996): Identification and characterization of the *eps* (exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Str6. *Journal of Bacteriology*, 178 (6), s. 1680-1690.
- VANINGELGEM F., ZAMFIR M., ADRIANY T., DE VUYST L. (2004): Fermentation condition affecting the bacterial growth exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST 111 in milk-based medium. *Journal of Applied Microbiology*, 97, s. 1257-1273.

Přijato do tisku: 4. 11. 2014

Lektorováno: 20. 11. 2014

LACTOBACILLUS CASEI A JEHO SELEKTIVNÍ STANOVENÍ VE SMĚSÍCH S OSTATNÍMI BAKTERIEMI MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Šárka Horáčková, Andrea Mühlhansová,
Kateřina Houšková, Milada Pločková

Ústav mléka, tuků a kosmetiky,

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

sarka.horackova@vscht.cz

**Lactobacillus casei and its selective
determination in mixtures with other lactic
acid bacteria**

Abstrakt

V práci jsou shrnuty základní údaje týkající se výskytu, morfologie a fenotypových vlastností mikroorganismů skupiny *L. casei* (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*). Dále práce teoreticky shrnuje kultivační média a kultivační podmínky, které byly dosud publikovány v odborné literatuře pro selektivní stanovení druhu *L. casei*. Nejčastěji doporučované kultivační půdy pro selektivní stanovení tohoto mikroorganismu ve směsích s jogurtovou kulturou, *L. acidophilus* nebo bifidobakteriemi jsou LC-agar s ribosou v kombinaci se snížením kultivační teploty na 15 °C po dobu 14 dní, MRS agar s přísadkou žluči, MRS agar s přísadkou vankomycinu či tzv. M-RTL agar.

Klíčová slova: skupina *L. casei*, selektivní stanovení