

ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY VYBRANÝCH BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Šalaková A., Pechačová M., Dráb V., Drbohlav J.,
Pešek E.

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Antimicrobial effects of selected lactic acid bacteria

Abstrakt

Studie se zabývá antimikrobiálním působením vybraných bakterií mléčného kvašení na technologicky nežádoucí mikroorganismy v mléce. BMK (laktobacily, laktokoky, enterokoky a propionové bakterie) byly vybrány ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora® v Táboře. Kontaminující mikroorganismy byly izolovány ze syrového a pasterovaného mléka. Antimikrobiální účinek byl stanovován difúzní plotnovou metodou. Z výsledků výzkumu vyplývá, že neexistuje kmen, který by byl schopen potlačovat veškeré nežádoucí mikroorganismy, které se vyskytují v syrovém mléce, nebo které přežívají pasteraci mléka. Pozitivním výsledkem však je, že u kmenů CCDM 821, 1079, 1080, 182, 731, 160 byl zjištěn inhibiční efekt vůči jednotlivým námi izolovaným kmenům technologicky nežádoucích mikroorganismů.

Klíčová slova: bakterie mléčného kvašení, antimikrobiální efekt

Abstract

The study is focused on the antimicrobial effect of selected lactic acid bacteria on technologically harmful microorganisms in milk. LAB (lactobacilli, lactococci, enterococci and propionic bacteria) were selected from the Collection of Dairy Microorganisms Laktoflora® in Tábor. Contaminating microorganisms were isolated from raw and pasteurized milk. The antimicrobial effect was determined by the diffusion plate method. The research results show that there is no strain which is capable of suppressing all the harmful microorganisms that are present in raw milk or which survive pasteurization of milk. The positive result is that inhibitory effect of strains CCDM 821, 1079, 1080, 182, 731, 160 was observed against individual of us isolated strains technologically undesirable microorganisms.

Key words: lactic acid bacteria, antimicrobial effect

Úvod

Naše studie je zaměřena na výběr a testování kmenů bakterií mléčného kvašení, které mají antimikrobiální efekt vůči technologicky nežádoucím mikroorganismům. Kmeny bakterií mléčného kvašení byly vybrány ze Sbírký

mlékařských mikroorganismů Laktoflora®. Kontaminující mikroorganismy byly vyizolovány z pasterovaných a syrových vzorků mléka odebraných v pravidelných intervalech během roku tak, aby bylo získáno široké spektrum kontaminujících mikrobů i v závislosti na ročním období. Tyto mikroorganismy byly vyizolovány a identifikovány metodou MALDI-TOF a nejčastěji se vyskytující kmeny byly použity pro účely této studie.

Literární rešerše

Bakterie mléčného kvašení a jejich antimikrobiální vlastnosti

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou definovány jako skupina mikroaerofilních gram-pozitivních mikroorganismů, které fermentují hexosy za produkce kyseliny mléčné. Tato skupina obsahuje mnoho rozmanitých technologicky významných rodů bakterií, jako např. *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* aj. Tyto bakterie jsou velice důležité pro výrobu mléčných kysaných výrobků, vína, kávy, kakaa a dalších potravinářských komodit, při jejichž výrobě se využívá fermentace (Makarova a kol., 2006). Někteří zástupci z této početné skupiny jsou schopny tvořit látky, které mají antimikrobiální účinky. Mezi tyto látky patří např. bakteriociny, organické kyseliny aj. Bakteriociny inhibují růst technologicky či hygienicky nežádoucích bakterií, např. *Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Campylobacter jejuni* aj. Obecně se jedná o nízkomolekulární proteiny, které jsou schopny interagovat s cílovými buňkami, pomocí vazby na receptory, které jsou na povrchu buňky. Jejich baktericidní mechanismy se mohou lišit a mohou zahrnovat tvorbu pórů, degradaci buněčné DNA, narušení specifické části 16S rRNA či inhibici syntézy peptidoglykanů (Todorov a kol., 2011).

Bakterie z rodu *Lactobacillus* jsou gram-pozitivní, nesporulující, anaerobní či mikroaerofilní nepohyblivé tyčinky či kokotyčinky. V rámci rodu je můžeme, na základě rozdílného metabolismu, rozdělit na tzv. homofermentativní a fakultativně či obligátně heterofermentativní laktobacily. Toto rozdělení závisí na tom, zda daný druh fermentuje laktosu pouze na kyselinu mléčnou (homofermentativní) či na kyselinu mléčnou nebo směs organických kyselin - kyselinu mléčnou, kyselinu octovou, ethanol a oxid uhličitý (heterofermentativní). Laktobacily se vyskytují v mléčných, obilných a masných produktech, ve víně, ovoci a ovocných džusech, kysaném zelí, nakládané zelenině či v gastrointestinálním traktu zvířat a lidí. Mezi technologicky významné laktobacily, které se používají k výrobě mléčných výrobků, patří např. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. casei* a další (Kandler, Weiss, 1986). *Lactobacillus acidophilus* (M46) tvoří bakteriocin acidocin B, který je schopen inhibovat růst *Listeria monocytogenes*, *Clostridium sporogenes*, *Brochothrix thermosphacta*. Jedná se o protein o velikosti 2,4 kDa, jehož syntéza je kódovaná pomocí plasmidu (Leer a kol., 1995).

Také *Lactobacillus plantarum* ST16Pa tvoří bakteriocin, o velikosti 6,5 kDa, který je schopen inhibovat růst nežádoucích bakterií. Tento bakteriocin ST16Pa je účinný proti bakteriím rodů *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* a *Staphylococcus* (Todorov a kol., 2011). I u bakterie *Lactobacillus fermentum* UN01 byl prokázán antibakteriální účinek. Bakteriocin, který produkuje tento kmen je schopen inhibovat růst *Escherichia coli*, *Staphylococcus typhi*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia* a *Pseudomonas aeruginosa* (Udhayashree a kol., 2012). *Lactobacillus acidophilus* 11088 (NCK88) produkuje bakteriocin lactacin F. Tento bakteriocin má schopnost inhibovat růst široké škály mikroorganismů, mezi jinými i jiné laktobacily či *Enterococcus faecalis* (Muriana, Kleanhammer, 1991). Různé bakteriociny jsou schopné tvořit i kmeny bakterií *L. acidipiscis*, *L. brevis*, *L. gasseri*, *L. rennini*, *L. sanfranscensis*, *L. delbrueckii*, *L. paracasei* aj. (Zoumpopoulou a kol., 2013).

Bakterie rodu *Leuconostoc* taktéž patří mezi bakterie mléčného kvašení. Jsou to gram-pozitivní, nepohyblivé, spóry netvořící koky (Schleifer, 1986). Některé druhy mají aerobní a některé anaerobní metabolismus a obvykle jsou všechny katalasa negativní (Lonvaud-Funel, 2000). *Leuconostoc mesenteroides* UL5 tvoří bakteriocin mesenterocin 5, který inhibuje růst *Listeria monocytogenes* (Daba a kol., 1991). Proti bakterii *Listeria monocytogenes* je účinný i bakteriocin mesentericin Y105, který je produkován *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* Y105, který byl izolován z kozího mléka. Velikost tohoto bakteriocinu byla, pomocí SDS-PAGE, stanovena na 2,5 - 3,0 kDa a jeho účinnost byla testována proti různým bakteriím (patogenním i nepatogenním). Bylo ale zjištěno, že na tento bakteriocin jsou citlivé pouze bakterie rodu *Listeria* (*Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*) (Hécharde a kol., 1992). Bakteriocin je schopen tvořit i *Leuconostoc lactis* (Zoumpopoulou a kol., 2013).

Mezi BMK patří též některé bakterie rodu *Streptococcus*. Tyto bakterie jsou gram-pozitivní, obvykle nepohyblivé a fakultativně anaerobní. Jedná se o chemoorganotrofy s fermentativním metabolismem, které rozkládají sacharidy hlavně na kyselinu mléčnou bez produkce plynu. Některé kmeny jsou schopné tvořit i jiné organické kyseliny, jako např. jablečnou, citronovou, propionovou, octovou aj. Velká část bakterií tohoto rodu je schopná tvořit různé bakteriociny, které inhibují nežádoucí bakterie (Schleifer, 1986). Bylo prokázáno, že bakteriociny jsou schopné tvořit kmeny bakterií *Streptococcus bovis*, *Streptococcus macedonicus* a *Streptococcus thermophilus*. Konkrétně u kmenu *S. macedonicus* ACA-DC 198 byla prokázána účinnost proti bakteriím podílejících se na rozvoji orálních nemocí (Zoumpopoulou a kol., 2013).

Dalšími představiteli BMK jsou bakterie rodu *Lactococcus*. Jsou to gram-pozitivní nepohyblivé koky, které tvoří spory a vyskytují se v páru či v krátkých

řetězcích. Jedná se o poměrně nový bakteriální rod, protože dříve byl součástí rodu *Streptococcus*. Rozdílnými charakteristikami se staly tolerance k pH, soli, ale i teploty pro jejich růst (Batt, 2000). Asi nejznámějším bakteriocinem, který produkují bakterie *Lactococcus lactis* je nisin. Jedná se o malý protein, který je účinný proti gram-pozitivním bakteriím, jako např. *Listeria*, *Clostridium*, *Bacillus* aj. Tento bakteriocin se běžně používá jako konzervační činidlo do různých potravin (Liu, Hansen, 1990; Dodd a kol., 1992). Bylo zjištěno, že *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R tvoří bakteriocin lactococin R, který potlačuje růst různých potravinářských patogenů. Jsou to např. bakterie rodu *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Bacillus* aj. Účinek tohoto bakteriocinu je však omezen pouze na gram-pozitivní rody, ale proti gram-negativním bakteriím účinný není. Jeho velikost byla stanovena na 2,5 kDa. což je velikost nisinu. Na rozdíl od nisinu (3,4 kDa) je však tento bakteriocin sensitivní k působení pepsinu a α -chymotripsinu (Yildirim, Johnson, 1998).

Bakterie mléčného kvašení však mohou působit antibakteriálně i díky jiným sloučeninám či mechanismům, než jen pomocí bakteriocinů. Mohou např. produkovat i peroxid vodíku, který je výsledkem působení flavoprotein oxidasy či NADH peroxidasy za přítomnosti kyslíku. Jeho antimikrobiální účinek vychází z oxidace sulfhydrylových skupin, které mohou způsobit denaturaci různých enzymů nebo peroxidaci membránových lipidů. Tímto dochází ke zvýšení membránové permeability. Jinými látkami, které jsou produkty BMK a mohou mít antimikrobiální účinky, jsou i organické kyseliny. Ty působí mechanismem, který za nízkého pH způsobuje okyselení buněčné cytoplasmy, přičemž nedisociovaná lipofilní kyselina může pasivně difundovat přes membránu a způsobit kolaps elektrochemického protonového gradientu. Může také pozměnit permeabilitu buněčné membrány a tím přerušit substrátový transportní systém (Ammor a kol., 2006).

Popsané antimikrobiální aktivity bakterií mléčného kvašení jsou přínosem pro potravinářský průmysl. Bakterie mléčného kvašení s antimikrobiální aktivitou jsou využívány k prodloužení trvanlivosti potravin, kdy slouží jako ochrana proti špatné manipulaci s potravinou. Přispívají také ke snížení ekonomických ztrát, způsobených kažením potravin, dále ke snížení rizika šíření patogenních mikroorganismů v potravinách a nemocí, které mohou tyto mikroorganismy způsobit. Mohou se použít také jako konzervační činidlo, čímž může dojít k nahrazení či omezení aplikace chemických konzervantů. Je patrné, že díky svým vlastnostem mohou mít BMK, které produkují antimikrobiální látky, či i bakteriociny samotné široké možnosti využití (Gálvez a kol., 2007).

Náš výzkum je orientován na zlepšování kvality vstupní suroviny - syrového mléka již v průběhu skladování, a to redukcí pomnožování technologicky nežádoucí mikroflóry využitím antimikrobiálních vlastností BMK a tak zlepšit kvalitu mléčných výrobků především sýrů, tvarohů a trvanlivých výrobků.

Materiál

Bakterie mléčného kvašení

Tab. 1 Výběr kmenů s potencionálním antimikrobiálním účinkem - laktobacily

pořadí	druh	označení
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 150
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 821
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 1081
4	<i>Lactobacillus casei</i>	CCDM 1079
5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 818
6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 1080
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 182
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 1078
9	<i>Lactobacillus helveticus</i>	CCDM 98
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCDM 151

Tab. 2 Výběr kmenů s antimikrobiálním účinkem - laktokoky, enterokoky a propionové bakterie

pořadí	druh	označení
11	Mezofilní kultura	CCDM 632
12	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 416
13	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 731
14	<i>Enterococcus faecium</i>	CCDM 941
15	<i>Enterococcus durans</i>	CCDM 922
16	<i>Propionibacterium fredenreichii</i> subsp. <i>shermani</i>	CCDM 160

Tab. 3 Technologicky nežádoucí izoláty ze syrových a pasterovaných mlék

pořadí a označení kmene	izolován při analýze	identifikace kmene
1/11	syrové mléko - CPM	<i>Stenotropomonas maltophilia</i>
2/12	syrové mléko - CPM	<i>Chryseobacterium indolgenes</i>
3/13	syrové mléko - CPM	<i>Serratia plymuthica/liquefaciens</i>
4/14	syrové mléko - PT	<i>Enterobacter cloacae</i> ssp. <i>cloacae</i>
5/15	syrové mléko - PT	<i>Chryseobacterium indolgenes</i>
6/16	syrové mléko - PT	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
7/17	syrové mléko - PT	<i>Pseudomonas putida</i>
8/18	syrové mléko - PT	<i>Pseudomonas</i> sp.
9/P2	syrové mléko - CPM	<i>Brochothrix thermosphaecta</i>
10/P8	syrové mléko - CPM	<i>Staphylococcus warneri</i>
11/J2	pasterované mléko - CPM	<i>Kocuria varians</i>
12/J6	pasterované mléko - TRM	<i>Serratia liquefaciens</i>
13/J8	syrové mléko - CPM	<i>Hafnia alvei</i>
14/J11	syrové mléko - PT	<i>Bacillus pumilos</i>
15/J15	syrové mléko - CPM	<i>Hafnia alvei</i>

Postup prací

Kmeny ze Sbírký mlékařských mikroorganismů byly obnoveny za optimálních kultivačních podmínek.

Kultivační podmínky vybraných mlékařských mikroorganismů jsou uvedeny v tabulce č.4 a č.5.

Kmeny bakterií mléčného kvašení byly obnoveny z lyofilizované kultury ze Sbírký Laktoflora® a dvakrát přeočkovány za optimálních kultivačních podmínek. Oživené kmeny byly rozplněny do zkumavek po 10 ml

Tab. 4 Kultivační podmínky laktobacilů

pořadí	druh	označení
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 150	37 °C anaerobně Médium B, 15, 64, 113
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 821	30 °C anaerobně Médium A, 15, 64, 113
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 1081	30 °C anaerobně Médium 15, 64, 113
4	<i>Lactobacillus casei</i> CCDM 1079	30 °C anaerobně Médium 15, 64, 113
5	<i>Lactobacillus paracasei</i> CCDM 818	37 °C anaerobně Médium B, 15, 64, 113
6	<i>Lactobacillus paracasei</i> CCDM 1080	37 °C anaerobně Médium 15, 64, 113
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 182	30 °C anaerobně Médium B, 15, 64, 113
8	<i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 1078	30 °C anaerobně Médium 15, 64, 113
9	<i>Lactobacillus helveticus</i> CCDM 98	37 °C anaerobně Médium A, 15, 64, 113
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCDM 151	37 °C anaerobně Médium A, 15, 64, 113

x) seznam médií: A= obnovené mléko, B= obnovené mléko s kvasničním extraktem, 15= živná půda MRS bujón, 64= živná půda MRSC bujón, 113= živná půda MRS57 agar

Tab. 5 Kultivační podmínky laktokoků, enterokoků a propionových bakterií

pořadí	druh	označení
1	Mezofilní kultura CCDM 632	30 °C aerobně Médium A, 68, 99
2	<i>Lactococcus lactis</i> CCDM 416	30 °C aerobně Médium A, 98, 99
3	<i>Lactococcus lactis</i> CCDM 731	30 °C aerobně Médium A, 98, 99
4	<i>Enterococcus faecium</i> CCDM 945	37 °C aerobně Médium A, 98, 99
5	<i>Enterococcus durans</i> CCDM 922	37 °C aerobně Médium A, 98, 99
6	<i>Propionibacterium fredenreichii</i> subsp. <i>shermani</i> CCDM 160	30 °C anaerobně Médium B, 30+L-cystein

xx) seznam médií: A= obnovené mléko, B= obnovené mléko s kvasničním extraktem, 68= živná půda GTKM-BP agar, 98= živná půda M17 agar podle Terzaghi, 99= živná půda M17 agar podle Terzaghi, 30= živná půda YEL-G agar

a zmrazeny při - 40 °C. Před vlastním použitím byly rozmrazeny a jednou přeočkovány.

Kmeny izolované ze syrového a pasterovaného mléka byly deponovány v mrazicím boxu při -40 °C a v pravidelných pololetních intervalech byly tyto kmeny přeočkovány a opětovně zamrazeny. Optimálním kultivačním médiem bylo médium BHI. Před testováním antimikrobiální aktivity byly deponované kmeny rozmrazeny, přeočkovány a k pokusu byla použita čerstvá suspenze.

Na Petriho misky byly zaočkovány suspenze z třetího ředění technologicky nežádoucího kmene zalitím živnou půdou BHI agar soft. Sterilním korkovrtem byly připraveny do ztuhlého agaru jamky o průměru 10 mm. Do jamek byly zaočkovány mlékařské kultury.

Poté byly misky uloženy do lednice po dobu 4 hodin. Po uplynutí této doby byly misky umístěny do termostatu 30 °C po dobu 48 hodin aerobně. Po kultivaci byly misky s nárůstem kontaminující mikroflóry prosvíceny a odečteny změřením vzniklé zóny.

Výsledky

Tab. 6 Antimikrobiální účinek vybraných mlékařských kultur na technologicky nežádoucí druh *Stenotropomonas maltophilia* 1/11

pořadí	druh	označení	inhibiční zóna (mm)
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 150	0
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 821	12
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 1081	0
4	<i>Lactobacillus casei</i>	CCDM 1079	0
5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 818	0
6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 1080	0
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 182	0
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 1078	0
9	<i>Lactobacillus helveticus</i>	CCDM 98	0
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCDM 151	0
11	Mezofilní kultura	CCDM 632	0
12	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 416	12
13	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 731	18
14	<i>Enterococcus faecium</i>	CCDM 945	0
15	<i>Enterococcus durans</i>	CCDM 922	0
16	<i>Propionibacterium fredenreichii</i> subsp. <i>shermani</i>	CCDM 160	0

Tab. 7 Antimikrobiální účinek vybraných mlékařských kultur na technologicky nežádoucí druh *Chryseobacterium indoligenes* 2/12

pořadí	druh	označení	inhibiční zóna (mm)
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 150	0
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 821	0
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 1081	11
4	<i>Lactobacillus casei</i>	CCDM 1079	11
5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 818	0
6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 1080	11
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 182	0
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 1078	0
9	<i>Lactobacillus helveticus</i>	CCDM 98	0
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCDM 151	13
11	Mezofilní kultura	CCDM 632	0
12	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 416	0
13	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 731	0
14	<i>Enterococcus faecium</i>	CCDM 945	0
15	<i>Enterococcus durans</i>	CCDM 922	0
16	<i>Propionibacterium fredenreichii</i> subsp. <i>shermani</i>	CCDM 160	0

Tab. 8 Antimikrobiální účinek vybraných mlékařských kultur na technologicky nežádoucí druh *Serratia plymuthica/liquefaciens* 3/13

pořadí	druh	označení	inhibiční zóna (mm)
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 150	0
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 821	0
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 1081	0
4	<i>Lactobacillus casei</i>	CCDM 1079	11
5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 818	0
6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 1080	11
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 182	0
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 1078	0

Tab. 8 Antimikrobiální účinek vybraných mlékařských kultur na technologicky nežádoucí druh *Serratia plymuthica/liquefaciens* 3/13

pořadí	druh	označení	inhibiční zóna (mm)
9	<i>Lactobacillus helveticus</i>	CCDM 98	0
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCDM 151	0
11	Mezofilní kultura	CCDM 632	0
12	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 416	0
13	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 731	0
14	<i>Enterococcus faecium</i>	CCDM 945	0
15	<i>Enterococcus durans</i>	CCDM 922	0
16	<i>Propionibacterium fredenreichii</i> subsp. <i>shermani</i>	CCDM 160	12

Tab. 9 Antimikrobiální účinek vybraných mlékařských kultur na technologicky nežádoucí druh *Enterobacter cloacae* ssp. *cloacae* 4/14

pořadí	druh	označení	inhibiční zóna (mm)
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 150	0
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 821	12
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 1081	14
4	<i>Lactobacillus casei</i>	CCDM 1079	12
5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 818	0
6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 1080	11
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 182	0
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 1078	0
9	<i>Lactobacillus helveticus</i>	CCDM 98	0
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCDM 151	0
11	Mezofilní kultura	CCDM 632	0
12	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 416	0
13	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 731	0
14	<i>Enterococcus faecium</i>	CCDM 945	0
15	<i>Enterococcus durans</i>	CCDM 922	0
16	<i>Propionibacterium fredenreichii</i> subsp. <i>shermani</i>	CCDM 160	13

Tab. 10 Antimikrobiální účinek vybraných mlékařských kultur na technologicky nežádoucí druh *Chryseobacterium indoligenes* 5/15

pořadí	druh	označení	inhibiční zóna (mm)
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 150	12
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 821	0
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 1081	0
4	<i>Lactobacillus casei</i>	CCDM 1079	0
5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 818	0
6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 1080	0
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 182	0
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 1078	0
9	<i>Lactobacillus helveticus</i>	CCDM 98	12
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCDM 151	0
11	Mezofilní kultura	CCDM 632	0
12	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 416	12
13	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 731	12
14	<i>Enterococcus faecium</i>	CCDM 945	0
15	<i>Enterococcus durans</i>	CCDM 922	12
16	<i>Propionibacterium fredenreichii</i> subsp. <i>shermani</i>	CCDM 160	0

Tab. 11 Antimikrobiální účinek vybraných mlékařských kultur na technologicky nežádoucí druh *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* 6/16

pořadí	druh	označení	inhibiční zóna (mm)
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 150	0
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 821	12
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 1081	12
4	<i>Lactobacillus casei</i>	CCDM 1079	13
5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 818	0
6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 1080	13
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 182	0
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 1078	13
9	<i>Lactobacillus helveticus</i>	CCDM 98	0
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCDM 151	0
11	Mezofilní kultura	CCDM 632	0
12	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 416	0
13	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 731	0
14	<i>Enterococcus faecium</i>	CCDM 945	0
15	<i>Enterococcus durans</i>	CCDM 922	0
16	<i>Propionibacterium fredenreichii</i> subsp. <i>shermani</i>	CCDM 160	12

Tab. 12 Antimikrobiální účinek vybraných mlékařských kultur na technologicky nežádoucí druh *Pseudomonas putida* 7/17

pořadí	druh	označení	inhibiční zóna (mm)
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 150	0
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 821	0
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 1081	12
4	<i>Lactobacillus casei</i>	CCDM 1079	11
5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 818	0
6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 1080	12
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 182	0
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 1078	0
9	<i>Lactobacillus helveticus</i>	CCDM 98	0
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCDM 151	0
11	Mezofilní kultura	CCDM 632	0
12	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 416	0
13	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 731	0
14	<i>Enterococcus faecium</i>	CCDM 945	0
15	<i>Enterococcus durans</i>	CCDM 922	0
16	<i>Propionibacterium fredenreichii</i> subsp. <i>shermani</i>	CCDM 160	12

Tab. 13 Antimikrobiální účinek vybraných mlékařských kultur na technologicky nežádoucí druh *Pseudomonas* sp. 8/18

pořadí	druh	označení	inhibiční zóna (mm)
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 150	0
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 821	0
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 1081	0
4	<i>Lactobacillus casei</i>	CCDM 1079	0
5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 818	0
6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 1080	11
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 182	12
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 1078	0

Tab. 13 Antimikrobiální účinek vybraných mlékařských kultur na technologicky nežádoucí druh *Pseudomonas* sp. 8/18

pořadí	druh	označení	inhibiční zóna (mm)
9	<i>Lactobacillus helveticus</i>	CCDM 98	0
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCDM 151	0
11	Mezofilní kultura	CCDM 632	0
12	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 416	0
13	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 731	0
14	<i>Enterococcus faecium</i>	CCDM 945	0
15	<i>Enterococcus durans</i>	CCDM 922	0
16	<i>Propionibacterium fredenreichii</i> subsp. <i>shermani</i>	CCDM 160	11

Tab. 14 Antimikrobiální účinek vybraných mlékařských kultur na technologicky nežádoucí druh *Brochothrix thermosphacta* 9/P2

pořadí	druh	označení	inhibiční zóna (mm)
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 150	0
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 821	11
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 1081	0
4	<i>Lactobacillus casei</i>	CCDM 1079	11
5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 818	0
6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 1080	0
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 182	11
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 1078	0
9	<i>Lactobacillus helveticus</i>	CCDM 98	0
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCDM 151	0
11	Mezofilní kultura	CCDM 632	0
12	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 416	0
13	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 731	11
14	<i>Enterococcus faecium</i>	CCDM 945	0
15	<i>Enterococcus durans</i>	CCDM 922	0
16	<i>Propionibacterium fredenreichii</i> subsp. <i>shermani</i>	CCDM 160	0

Tab. 15 Antimikrobiální účinek vybraných mlékařských kultur na technologicky nežádoucí druh *Staphylococcus warneri* 10/P8

pořadí	druh	označení	inhibiční zóna (mm)
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 150	0
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 821	11
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 1081	0
4	<i>Lactobacillus casei</i>	CCDM 1079	0
5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 818	0
6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 1080	0
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 182	11
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 1078	11
9	<i>Lactobacillus helveticus</i>	CCDM 98	0
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCDM 151	0
11	Mezofilní kultura	CCDM 632	11
12	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 416	0
13	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 731	0
14	<i>Enterococcus faecium</i>	CCDM 945	0
15	<i>Enterococcus durans</i>	CCDM 922	11
16	<i>Propionibacterium fredenreichii</i> subsp. <i>shermani</i>	CCDM 160	0

Tab. 16 Antimikrobiální účinek vybraných mlékařských kultur na technologicky nežádoucí druh *Kocuria varians* 11/J2

pořadí	druh	označení	inhibiční zóna (mm)
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 150	0
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 821	0
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 1081	0
4	<i>Lactobacillus casei</i>	CCDM 1079	0
5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 818	0
6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 1080	0
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 182	12
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 1078	18
9	<i>Lactobacillus helveticus</i>	CCDM 98	11
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCDM 151	0
11	Mezofilní kultura	CCDM 632	0
12	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 416	0
13	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 731	11
14	<i>Enterococcus faecium</i>	CCDM 945	0
15	<i>Enterococcus durans</i>	CCDM 922	0
16	<i>Propionibacterium fredenreichii</i> subsp. <i>shermani</i>	CCDM 160	0

Tab. 17 Antimikrobiální účinek vybraných mlékařských kultur na technologicky nežádoucí druh *Serratia liquefaciens* 12/J6

pořadí	druh	označení	inhibiční zóna (mm)
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 150	0
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 821	11
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 1081	0
4	<i>Lactobacillus casei</i>	CCDM 1079	0
5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 818	0
6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 1080	0
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 182	0
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 1078	0
9	<i>Lactobacillus helveticus</i>	CCDM 98	0
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCDM 151	0
11	Mezofilní kultura	CCDM 632	0
12	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 416	0
13	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 731	0
14	<i>Enterococcus faecium</i>	CCDM 945	0
15	<i>Enterococcus durans</i>	CCDM 922	0
16	<i>Propionibacterium fredenreichii</i> subsp. <i>shermani</i>	CCDM 160	0

Tab. 18 Antimikrobiální účinek vybraných mlékařských kultur na technologicky nežádoucí druh *Hafnia alvei* 13/J8

pořadí	druh	označení	inhibiční zóna (mm)
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 150	0
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 821	0
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 1081	0
4	<i>Lactobacillus casei</i>	CCDM 1079	0
5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 818	0
6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 1080	0
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 182	11
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 1078	0

Tab. 18 Antimikrobiální účinek vybraných mlékařských kultur na technologicky nežádoucí druh *Hafnia alvei* 13/J8

pořadí	druh	označení	inhibiční zóna (mm)
9	<i>Lactobacillus helveticus</i>	CCDM 98	0
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCDM 151	0
11	Mezofilní kultura	CCDM 632	0
12	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 416	0
13	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 731	0
14	<i>Enterococcus faecium</i>	CCDM 945	0
15	<i>Enterococcus durans</i>	CCDM 922	0
16	<i>Propionibacterium fredenreichii</i> subsp. <i>shermani</i>	CCDM 160	0

Tab. 19 Antimikrobiální účinek vybraných mlékařských kultur na technologicky nežádoucí druh *Bacillus pumilus* 14/J11

pořadí	druh	označení	inhibiční zóna (mm)
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 150	0
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 821	0
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 1081	0
4	<i>Lactobacillus casei</i>	CCDM 1079	0
5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 818	0
6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 1080	0
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 182	0
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 1078	11
9	<i>Lactobacillus helveticus</i>	CCDM 98	0
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCDM 151	0
11	Mezofilní kultura	CCDM 632	0
12	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 416	0
13	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 731	13
14	<i>Enterococcus faecium</i>	CCDM 945	0
15	<i>Enterococcus durans</i>	CCDM 922	0
16	<i>Propionibacterium fredenreichii</i> subsp. <i>shermani</i>	CCDM 160	0

Tab. 20 Antimikrobiální účinek vybraných mlékařských kultur na technologicky nežádoucí druh *Hafnia alvei* 15/J15

pořadí	druh	označení	inhibiční zóna (mm)
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 150	0
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 821	0
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCDM 1081	0
4	<i>Lactobacillus casei</i>	CCDM 1079	0
5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 818	0
6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCDM 1080	0
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 182	0
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCDM 1078	0
9	<i>Lactobacillus helveticus</i>	CCDM 98	0
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCDM 151	0
11	Mezofilní kultura	CCDM 632	0
12	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 416	0
13	<i>Lactococcus lactis</i>	CCDM 731	0
14	<i>Enterococcus faecium</i>	CCDM 945	0
15	<i>Enterococcus durans</i>	CCDM 922	0
16	<i>Propionibacterium fredenreichii</i> subsp. <i>shermani</i>	CCDM 160	0

Diskuze a závěr

Z uvedených výsledků výzkumu vyplývá, že neexistuje kmen, který by byl schopen potlačovat veškeré nežádoucí mikroorganismy, které se vyskytují v syrovém mléce nebo které přežívají pasteraci mléka. Pozitivním výsledkem však je, že převážná část námi izolovaných nežádoucích mikroorganismů má antagonistický druh, který je schopen alespoň minimálně omezovat jejich růst nebo metabolismus. Zjištěné, naměřené zóny do 15 mm ukazují na nízkou schopnost redukce vybraných technologicky nežádoucích mikroorganismů, zjištěné zóny nad 15 mm ukazují na prokazatelnou schopnost daného kmene k inhibici kmene testovaného. Schopnost inhibice širšího spektra kmenů, ač na velmi nízké úrovni, byla zjištěna u kmenů CCDM 821, 1079, 1080, 182,731, 160.

Většina námi testovaných technologicky nežádoucích kmenů byla inhibována 1-2 kmeny bakterií mléčného kvašení. Z toho vyplývá, že pro inhibici širšího spektra technologicky nežádoucích mikroorganismů bude nutno skládat kmeny do kultur na základě očekávaného nebo zjištěného složení syrového nebo pasterovaného mléka tak, aby došlo k co nejširšímu inhibičnímu účinku nežádoucí mikroflóry.

Literatura

- AMMOR S., TAVERON G., DIVOUR E., CHEVALIER I. (2006): Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small - scale facility. 1 - Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food control*, 17, s. 454 - 461.
- BATT C.A. (2000): *Lactococcus*. V knize Encyclopedia of Food Microbiology, Volumes 1-3 (Robinson E.K.), s. 1164-1165. Academic Press, London, U.K.
- DABA H., PANDIAN S., GOSSELIN J.F., SIMARD R.E., HUANG J., LACROIX C. (1991): Detection and activity of bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, s. 3450-3455.
- DODD H.M., HORN N., HAO Z., GASSON M.J. (1992): A lactococcal expression system for engineered nisins. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, s. 3683-3693.
- GÁLVEZ A., VALDIVIA E., ABRIQUEL H., CAMAFEITA E., MENDEZ E., MARTÍNEZ - BUENO M., MAQUEDA M. (1998): Isolation and characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Arch Microbiol.* 171, s. 59 - 65.
- HÉCHARD Y., DÉRIJARD B., LETELLIER F., CENATIEMPO Y. (1992): Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of General Microbiology*, 138, s. 2725-2731.
- KANDLER O., WEISS N. (1986): Regular, nonsporing gram-positive rods. V knize Bergey's manual of systematic bacteriology (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.), s. 1208-1260. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- LEER R.J., VAN DER VOSSEN J.B.M., VAN GIEZEN M., VAN NOORT J.M., POUWELS PH. (1995): Genetic of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology*, 141, s.1629-1635.
- LIU W., HANSEN J.N. (1990): Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, s.2551-2558.
- LONVAUD-FUNEL A. (2000): *Leuconostoc*. V knize Encyclopedia of Food Microbiology, Volumes 1-3 (Robinson E.K.), s. 1183-1194. Academic Press, London, U.K.
- MAKAROVA K., SLESAREVB A., WOLFA Y., SOROKINA A., MIRKINC B., KOONINA E., PAVLOVB A., PAVLOVAB N., KARAMYCHEVB V., POLOUCHINEB N., SHAKHOVAB V., GRIGORIEVB I., LOUE Y., ROHSARE D., LUCASE S., HUANGE K., GOODSTEINE D. M., HAWKINSE T., PLENGVIDHYAF V., WELKERI D., HUGHESI J., GOHJ Y., BENSONJ A.,

- BALDWIN K., LEEK J.-H., DÍAZ-MUNIZ I., DOSTIL B., SMEIANOV V., WECHTERF W., BARBOTEM R., LORCAF G., ALTERMANN E, BAR-RANGOUF R., GANESANN B., XIEF Y., RAWSTHORNEF H., TAMIRF D., PARKERF C., BREIDTG F., BROADBENTO J., HUTKINSJ R., O'SULLIVANK D., STEELEJ J., UNLUJ G., SAIERM M., KLAENHAMMERD T., RICHARDSONE P., KOZYAVKINB S., WEIMERD B., MILLSD D. (2006): Comparative genomic of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, s.15611-15616.
- MURIANA P.M., KLAENHAMMER T.R. (1991): Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, s.114-121.
- SCHLEIFER K.H. (1986): Gram-positive cocci. V knize Bergey's manual of systematic bacteriology (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.), s. 999-1102. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- TODOROV S.D., PRÉVOST H., LÉBOIS M., DOUSSET X., LÉBLANC J.G., FRANCO B.D.G.M. (2011): Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*) - From isolation to application: Characterization of bacteriocin. *Food Research International*, 44, s. 1351-1363.
- UDHAYASHREE N., SENBAGAM D., SENTHILKUMAR B., NITHYA K., GURUSAMY R. (2012): Production of bacteriocin and their application in food products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, S406-S410.
- YILIRIM Z., JOHNSON M.G. (1998): Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R isolated from radish. *Letters in Applied Microbiology*, 26, s.297-304.
- ZOUMPOPOULOU G., PEPELASSI E., PAPAIOANNOU W., GEORGALAKI M., MARAGKOUidakis P.A., TARANTILIS P.A., POLISSIOU M., TSAKALIDOU E., PAPADIMITRIOU K. (2013): Incidence of bacteriocins produced by food-related lactic acid bacteria active towards oral pathogens. *International Journal of Molecular Sciences* 14, s.4640-4654.

Práce vznikla za finanční podpory projektu QJ 1310256

Přijato do tisku: 10. 1. 2015

Lektorováno: 25. 1. 2015

MRAŽENÝ KRÉM TYPU GELATO - NOVÝ VÝROBEK PRO AUTOMATICKOU MINI-MLÉKÁRNU

Michael Binder¹, Jan Drbohlav², Petr Čihák³

¹ Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o.

² MILCOM a.s.

³ Fabric Constructions s.r.o.

Gelato type ice cream - the new product for the automatic mini-dairy

Abstrakt

Byla odzkoušena výroba mraženého krému typu gelato v kombinovaném výrobníku zmrzliny, který je součástí automatické mini-mlékárny. Výroba je vhodná k plnění do obalů pomocí čerpadla a lze jej dlouhodobě skladovat při nízkých teplotách. Na základě senzoricích zkoušek byly vybrány 3 směsi vyrobené z čerstvých mléčných surovin bez použití hotových sušených směsí. Je popsán výrobní postup.

Klíčová slova: Mražený krém, gelato, automatická mini-mlékárna, čerstvé suroviny