

TESTOVÁNÍ NOVÝCH PROBIOTICKÝCH DRUHŮ BIFIDOBAKTERIÍ A LAKTOBACILŮ LIDSKÉHO PŮVODU PRO VÝROBU NÍZKODOHŘÍVANÝCH SÝRŮ

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

Testování nových probiotických druhů bifidobakterií a laktobacilů lidského původu pro výrobu nízkodohříváných sýrů

Abstrakt

Cílem práce bylo ověřením vlivu technologického procesu výroby sýrů eidamského typu na probiotické bakterie v průběhu zrání sýrů po 30, 60 a 90 dnech. Sýry byly vyráběny za sterilních podmínek s přidavkem pěti probiotických kmenů laktobacilů a pěti probiotických kmenů bifidobakterií do mléka před výrobou spolu se smetanovým zákyssem. V kontrolních výrobách byl použit pouze smetanový zákys. Stanovený obsah laktobacilů se pohyboval po celou dobu zrání nad hranicí 10^6 CFU/g a sýry měly vyhovující sensorické vlastnosti. U bifidobakterií byl obsah bakterií nad hranicí 10^6 CFU/g jen první den po výrobě, pouze u jednoho kmene i po 30 dnech. Sensorické vlastnosti těchto sýrů byly hodnoceny jako horší. Fyzikálně chemické hodnoty se u jednotlivých výrob lišily jen málo. Pro využití ve výrobě eidamských sýrů byly proto navrženy kmeny laktobacilů.

Klíčová slova: laktobacily, bifidobakteria, nízkodohříváné sýry

Abstract

The aim of this work was to verify the technological process of Edam cheese on probiotic bacteria during ripening at 30, 60 and 90 days. Cheeses were manufactured under sterile conditions of five strains of probiotic *Lactobacillus* and five strains of probiotic *Bifidobacterium* together. In control production only cream starter was used. The established count of *Lactobacilli* ranged throughout the ripening was above limit of 10^6 CFU/g and cheese had satisfactory sensory characteristics. Using *Bifidobacteria* bacterial count reached above 10^6 CFU/g only the first day after production and only for one strain after 30 days. The sensory properties of the cheese were evaluated as worse. Physicochemical values varied only little. Therefore, for use in the manufactured Edam cheese, *Lactobacilli* strains were designed.

Key words: *Lactobacilli*, *Bifidobacterium*, Edam cheese

Úvod

Na pracovištích MILCOM a. s. a VÚM s. r. o. byla v předcházejících letech testována řada bakterií izolovaných z lidských zdrojů s probiotickými účinky (Cukrovská et al. 2009, Rittich et al. 2006). K testování pro výrobu sýrů byly vybrány ty bakteriální kmeny, které vykazovaly nejvyšší probiotické účinky a zároveň nejvyšší odolnost vůči fyzikálním a chemickým faktorům, jimž jsou vystaveny v průběhu výroby sýrů a jejich zrání.

Abychom získali co nejpřesnější informace o žádoucí přítomnosti těchto bakterií ve vyrobených sýrech a v průběhu jejich zrání a zároveň o jejich vlivu na průběh těchto procesů a výsledné vlastnosti sýrů, provedli jsme řadu modelových výrob s maximálním omezením možnosti kontaminace. Nebylo možno použít sterilní mléko, protože by došlo k ovlivnění technologických vlastností suroviny i výsledné kvality sýrů. Proto bylo použito syrové mléko z farmy, u něhož byla vyloučena fáze svozu, přejímky, míchání s jiným mlékem a skladování před pasterací, a mléko bylo pasterováno v laboratorních podmínkách. Požadavek praktické sterility byl určující jak pro velikost sýrů, tak pro nutnost nahradit technologický krok předlisování a lisování odstředováním v kyvetách. Výrobní postup byl modifikován pro eidamské sýry, jak uvádí Hynes et al. (2000) a Shakeel-ur-Rehman et al. (1998).

Materiál a metody

K výrobě minisýrů v laboratorních podmínkách bylo použito 5 kmenů laktobacilů: *Lactobacillus rhamnosus* RL3-P, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL4-P, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL10-P, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL19-P, *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* RL26-P a 5 kmenů bifidobakterií: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* RB1-MPP, *Bifidobacterium bifidum* RB9-MPP, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* RB22-6A, *Bifidobacterium breve* RB44-P, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* RB50-P ze Sbírký mlékařských mikroorganismů *Laktoflora*[®] (MILCOM a. s., CZ). Všechny kmeny byly před použitím čerstvě nakultivovány po dobu 24 h v M.R.S. Broth (LAB094, Lab M Limited, UK), laktobacily při 30 °C, bifidobakteria při 37 °C s přidavkem roztoku cystein hydrochloridu (Sigma-Aldrich, C6852) o koncentraci 0,5 g/l v dávce 1 ml/100 ml média.

Na základě provedených předběžných pokusů byl zvolen následující pracovní postup:

1. Ošetření mléka. Plnotučné nehomogenizované syrové mléko z automatu (Farma U Drhovských, Malšice) bylo pasterováno při 62 °C 30 minut, potom ochlazeno na 30-32 °C.
2. Srážení mléka. 300 ml mléka o teplotě 32 °C odměřených do sterilních nádob bylo upraveno přidavkem 1 ml nasyceného roztoku CaCl₂ a zakysáno 6 ml smetanového zákysu FD (Chr. Hansen's, DK). Současně bylo přidáno 0,15 ml prvního ředění testo-

vané kultury laktobacilů nebo bifidobaterií. Po 30 minutách, eventuálně dosažení pH alespoň hodnoty 6,3, bylo zasýřeno 1 ml naředěného syřidla: 3 ml syřidla CAGLIFICI CLERICI 1: 15 000 (MILCOM a. s., Tábor, CZ) do 50 ml odměrné baňky.

- Zpracování sýřeniny. Využitá sýřenina byla pokrájena sterilními harfíčkami a 20 minut míchána. Pak bylo sterilně odlito 120 ml syrovátky a nahrazeno sterilní vodou o teplotě 32 °C a mícháno 10 minut. Potom byla odlita syrovátka a zrno převedeno do sterilních odstředovacích kyvet tak, aby měly stejnou hmotnost pro odstředování.
- Formování a lisování. Probíhalo 10 minut při 320 g v odstředivce MPW-351 (Unimed Praha s.r.o., CZ) vyhřívané na 30°C, pak byla odlita syrovátka a sýry byly odstředovány při stejné teplotě 60 minut při 1 400 g. Po odlití syrovátky a obrácení sýra pokračovalo odstředování stejnou rychlostí ještě 30 minut.
- Dokysávání a solení. Kyvety se sýry byly přemístěny do vodní lázně 32 °C a ponechány dokysat na hodnotu pH 5,2 - 5,4. Poté bylo do každé kyvety přidáno 26 ml solné lázně (330 g NaCl/l, pH 5,4, sterilovaná 121°C 20 minut) o teplotě 12 °C a ponecháno 5 minut.
- Osychání a voskování. Sýry po vysolení osychaly na mřížce ve sterilním boxu při 12 °C do druhého dne, potom byly zváženy, byl odebrán vzorek na analýzy a sýry navoskovány ponořením do rozehřátého sýrařského vosku (OK servis, CZ). Jako nejvhodnější povrchové ošetření sýrů bylo zvoleno voskování, které minimalizovalo riziko vysychání a nežádoucí zvyšování sušiny takto malých sýrů během zrání.
- Zrání. Při 10-12 °C do stáří 90 dnů.

V průběhu jednotlivých výrob byly odebírány vzorky syrového mléka ke stanovení celkového počtu mikroorganismů na GTK-AB agaru (MILCOM a.s., CZ) a stanovení aktivní kyselosti pomocí přístroje inoLab pH 720 (WTW, Weilheim, D). Vzorky pasterovaného mléka byly odebírány ke kontrole mikrobiálního složení - celkový počet mikroorganismů, enterokoky na KEA agaru (CM0591, OXOID, UK), halotolerantní na MSA agaru (LAB007, Lab M Limited, UK) mezofilní koky na M17 agaru (LAB092, Lab M Limited, UK), heterofermentativní laktobacily na FHN agaru (MILCOM a. s., CZ) - pH a ke stanovení obsahu sušiny podle ČSN ISO 570107-3. Sýry před voskováním byly zváženy a z jednoho sýra odebrán vzorek ke stanovení zastoupení jednotlivých skupin mikroorganismů (enterokoky, laktokoky, halotolerantní, fakultativně heterofermentativní laktobacily, případně bifidobakteria na TOS Propionate Agar (YACULT, Pharmaceutical Industry Co.Ltd, JAPAN) 57 ml + 3 ml roztoku Mupirocinu 1g/l), na stanovení aktivity vody na AwSprint (Novasina, CH) metodou podle ČSN ISO 21807, na stanovení titrační kyselosti (°SH) a aktivní kyselosti podle ČSN 570530 a ČSN 570107, na stanovení nižších mastných kyselin izotachoforetickým analyzátozem EA 102 (VILLA Labeco, SK) SOP č. 23 MILCOM a.s. a na stanovení obsahu NaCl argentometrickou metodou podle Mohra, SOP č. 22,

Tab. 1 Průměrné mikrobiální hodnoty mléka

vzorek	parametr	živné médium a podmínky	log CFU/ml
syrové ml.	celkové mezofilní	GTK-AB (30°C, 3 dny, aerobně)	5,32
paster.ml.	celkové mezofilní	GTK-AB (30°C, 3 dny, aerobně)	2,76
	enterokoky	KEA (42°C, 2 dny, aerobně)	0,21
	halotolerantní	MSA (30°C, 3 dny, aerobně)	1,21
	mezofilní laktokoky	M17 (21°C, 5 dní, aerobně)	2,53
	heterofermentativní lbc.	FHN (30°C, 6 dní, anaerobně)	1,36

Tab. 2 Průměrné chemické hodnoty mléka

vzorek	pH	sušina %
syrové ml.	6,78	-
paster.ml.	6,66	12,91

MILCOM a.s. Další vzorek byl odebrán po 30, 60 a 90 dnech, pak byl sýr hodnocen i senzorky.

Výsledky a diskuse

Průměrné hodnoty vstupní suroviny jsou uvedeny v tabulce 1 a 2. Vliv mikrobiálního složení mléka nebylo možné zcela eliminovat, protože sterilní mléko by mělo natolik pozměněné vlastnosti bílkovin, že by nebylo možné zajistit standardní průběh tvorby gelu a zpracování sýřeniny, a konečně ani charakter výrobku by neodpovídal sýru zvoleného typu. Proto je nutné při hodnocení přítomnosti přidaných kultur přihlížet i k vlivu mikrobiálního složení mléka, zvláště u skupiny laktobacilů, kde nebylo možné kultivačním stanovením na FHN agaru odlišit původní a přidanou mikroflóru. Je sice známa odlišnost v citlivosti různých druhů laktobacilů na různé druhy antibiotik, (Danielsen et al. 2003, Zhou et al. 2005) ale nelze tímto způsobem předem neidentifikované divoké laktobacily selektivně stanovit v sýru, podobně jako PCR metodami (Settani et al. 2005). U sýrů s přidanými bifi-

Tab. 3 Sledované chemické parametry v sýrech s testovanými kmeny laktobacilů během zrání

testovaný kmen	parametr	doba zrání (dny)			
		1	30	60	90
RL3-P	sušina (%)	52,72	50,86	50,76	51,46
	NaCl (%)	1,38	1,05	1,23	1,11
	pH	5,10	4,90	4,91	4,96
RL4-P	sušina (%)	52,80	53,21	53,20	-
	NaCl (%)	1,15	1,03	1,29	-
	pH	5,15	5,14	5,30	5,47
RL10-P	sušina (%)	52,18	53,81	52,64	53,11
	NaCl (%)	0,96	1,00	1,05	1,19
	pH	5,07	5,21	5,18	5,27
RL19-P	sušina (%)	50,23	50,79	51,90	51,68
	NaCl (%)	1,23	0,95	1,12	0,96
	pH	5,09	4,87	4,75	4,82
RL26-P	sušina (%)	53,89	52,83	-	53,06
	NaCl (%)	1,61	1,40	-	1,18
	pH	5,15	4,99	-	5,02

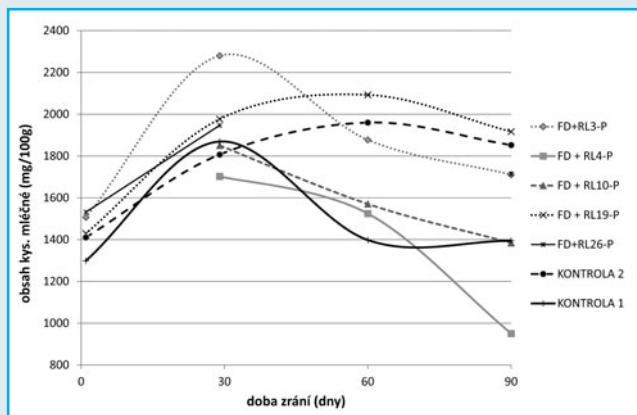
Tab. 4 Sledované chemické parametry v sýrech s testovanými kmeny bifidobakterií během zrání

testovaný kmen	parametr	doba zrání (dny)			
		1	30	60	90
RB1-MPP	sušina (%)	51,26	51,92	50,58	51,20
	NaCl (%)	1,39	1,22	1,19	1,23
	pH	5,11	5,00	4,93	5,03
RB9-MPP	sušina (%)	53,72	52,27	51,43	51,16
	NaCl (%)	1,37	1,03	1,10	1,07
	pH	5,11	5,00	4,99	5,00
RB22-6A	sušina (%)	49,95	50,18	49,76	49,65
	NaCl (%)	1,19	1,16	1,16	1,18
	pH	5,09	4,85	4,83	4,89
RB44-P	sušina (%)	51,60	50,81	52,46	50,72
	NaCl (%)	1,40	1,30	1,09	1,00
	pH	5,16	4,93	4,97	4,15
RB50-P	sušina (%)	51,46	50,98	50,44	50,48
	NaCl (%)	-	1,17	1,29	1,12
	pH	5,01	4,88	4,87	4,78

dobakteriemi je vyhodnocení počtu CFU jednoznačné, protože je lze kultivačně odlišit na diagnostickém agaru TOS Propionate Agar s mupirocinem.

Vyrobené sýry s přídavkem laktobacilů měly celkově nižší hmotnost a vyšší sušinu než sýry vyrobené s přídavkem bifidobakterií, ale rozdíly byly malé a hodnoty se lišily u jednotlivých testovaných kmenů. Hodnoty obsahu sušiny, obsahu NaCl a pH v průběhu zrání jsou uvedeny v tabulce 3 pro sýry s laktobacily a tabulce 4 pro sýry s bifidobakteriemi. Údaje o dvou kontrolních výrobcích pouze s kulturou FD jsou uvedeny v tabulce 5.

Z průběhu změn kyseliny mléčné stanovené izotachoforeticky pro sýry s přídavkem laktobacilů (graf. 1) bylo zřejmé, že se její obsah po výrobě lišil u pokusných i kontrolních sýrů jen málo, během prvních 30 dnů zrání se zvyšoval a teprve poté postupně klesal. Nejvyšší hodnoty 2 280 mg/100 g dosáhl sýr s přídavkem *Lactobacillus rhamnosus* RL3-P. U sýrů s přídavkem bifidobakterií (graf. 2) rovněž stoupal obsah kyseliny mléčné od 1. do 30. dne po výrobě, ale pokles obsahu kyseliny mléčné po další době zrání byl pozvolnější. Nejvyšší hodnoty 2 237 mg/100 g

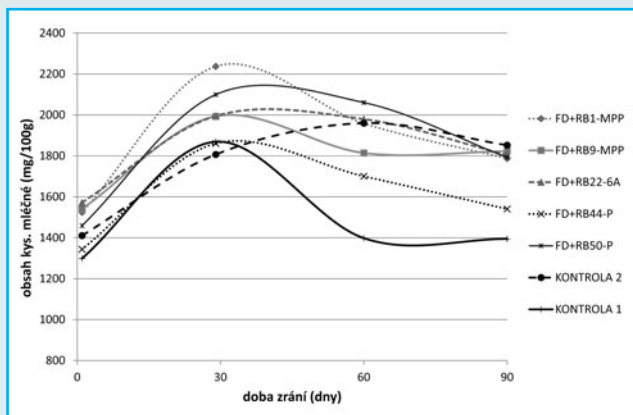
**Graf 1** Změna obsahu kys. mléčné v sýrech s testovanými kmeny laktobacilů během zrání**Tab. 5** Sledované chemické parametry v kontrolních sýrech během zrání

kontrolní výroba	parametr	doba zrání (dny)			
		1	30	60	90
1	sušina (%)	52,94	53,58	53,60	52,82
	NaCl (%)	1,40	1,01	1,16	1,20
	pH	5,20	5,19	5,31	5,27
2	sušina (%)	51,63	50,47	50,40	50,20
	NaCl (%)	1,25	1,26	1,18	1,13
	pH	5,06	4,90	4,88	4,91

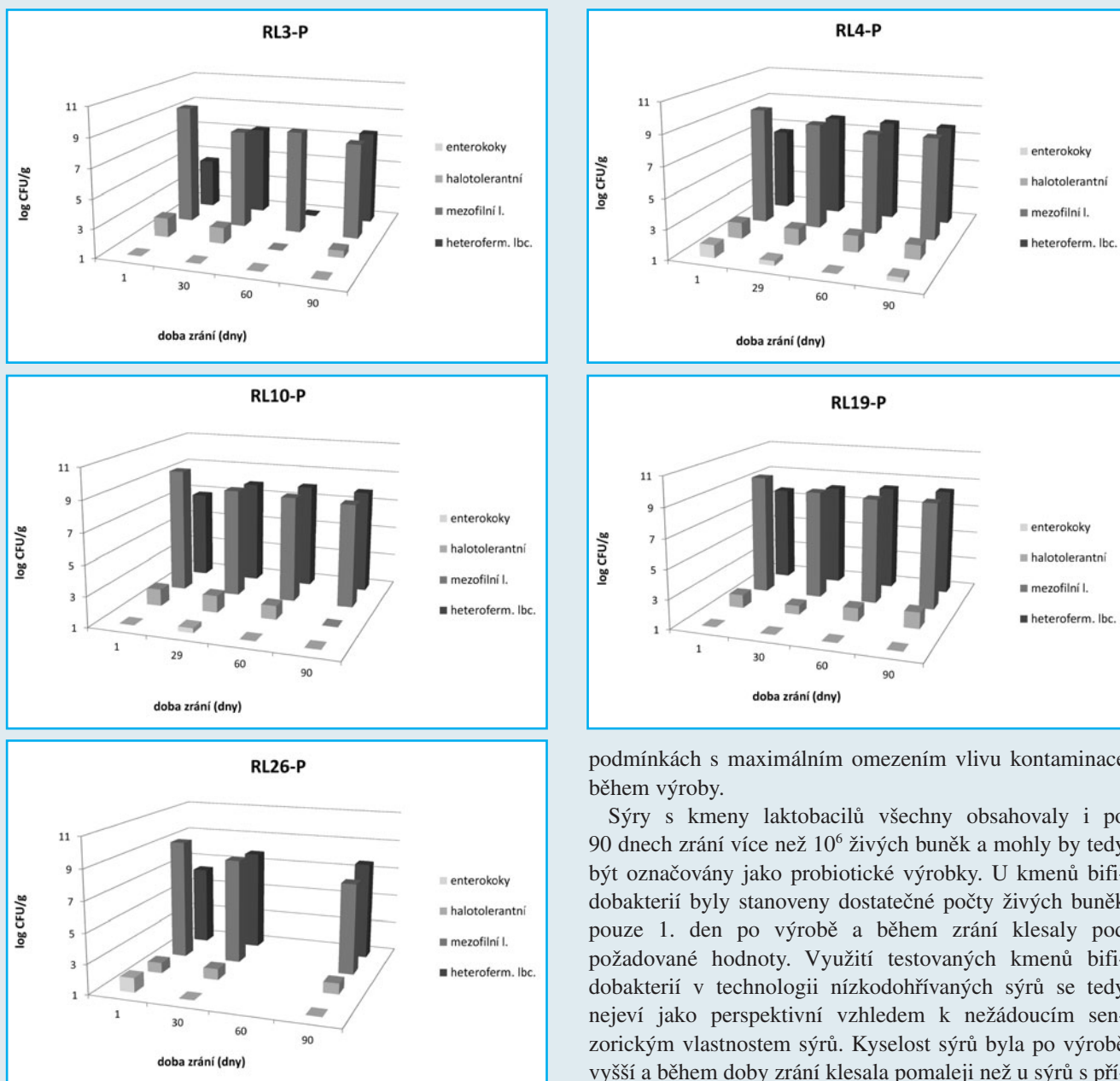
dosáhl sýr s přídáním *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* RB1-MPP a nejnižší 1 869 mg/100 g sýr s *Bifidobacterium breve* RB44-P, což byla hodnota srovnatelná s kontrolními výrobami pouze se smetanovou kulturou FD.

Za významný pro praktické využití ve výrobě sýrů považujeme obsah probiotických mikroorganismů. Podle FAO/WHO (2001) musí probiotický výrobek po celou dobu použitelnosti obsahovat minimálně 10^6 živých buněk probiotických bakterií. Toto kritérium splňovaly minisýry vyrobené s laktobacily prakticky po celou dobu 90 dní a to i po odečtení obsahu heterofermentativních laktobacilů v kontrolních sýrech v odpovídajícím stadiu zrání. Prosté odečtení je v tomto případě úkon pouze spekulativní, protože nelze s jistotou předpokládat nárůst stejného počtu původních heterofermentativních druhů v přítomnosti jiných námi přidaných laktobacilů. Celkový počet heterofermentativních laktobacilů dosáhl v jedné kontrolní výrobě maximálně 4×10^5 CFU/g po 90 dnech zrání, úroveň přítomnosti těchto laktobacilů byla v ostatních vzorcích odebíraných z kontrolních výrob maximálně řádově 10^3 CFU/g.

U sýrů s přídáním bifidobakterií byly nejvyšší počty CFU/g vždy 1. den po výrobě řádově 10^6 CFU/g, u kmene RB9-MPP ještě i po 30 dnech zrání. U kmene RB1-MPP se po 30 dnech pokles stabilizoval na hodnotách řádově 10^5 CFU/g až do stáří 90 dnů. U ostatních kmenů v celém průběhu zrání postupně počty CFU/g klesaly až na hodnoty řádově 10^3 až méně než 10^1 CFU/g. Prostředí ve zrajících sýrech zřejmě není pro růst těchto bakterií nejvhodnější a tyto se proto jeví jako vhodnější do čerstvých sýrů, kde

**Graf 2** Změna obsahu kys. mléčné v sýrech s testovanými kmeny bifidobakterií během zrání

Obr. 1 Počty CFU/g sledovaných skupin mikroorganismů v sýrech s testovanými kmeny laktobacilů během zrání



by bylo pravděpodobnější udržení počtu buněk potřebných pro probiotické účinky v organismu konzumenta.

Výsledky stanovení všech sledovaných skupin mikroorganismů v sýrech s laktobacily jsou na obr. 1, s bifidobakteriemi na obr. 2 a v kontrolních sýrech na obr. 3.

Při sensorickém hodnocení byly sýry s přidavkem laktobacilů hodnoceny jako více prozralé, měly jemnější konzistenci a nažloutlou barvu. Sýry vyrobené s přidavkem bifidobakterií měly kompaktní jemnou konzistenci, žádná oka, světlejší barvu a chuť vesměs kyselější a mírně nahořklou až hořkou.

Závěr

V této práci bylo testováno použití 5 probiotických kmenů laktobacilů a 5 probiotických kmenů bifidobakterií, již dříve izolovaných ve VÚM s. r. o. a MILCOM a. s., při výrobě sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou v laboratorních

podmínkách s maximálním omezením vlivu kontaminace během výroby.

Sýry s kmeny laktobacilů všechny obsahovaly i po 90 dnech zrání více než 10^6 živých buněk a mohly by tedy být označovány jako probiotické výrobky. U kmenů bifidobakterií byly stanoveny dostatečné počty živých buněk pouze 1. den po výrobě a během zrání klesaly pod požadované hodnoty. Využití testovaných kmenů bifidobakterií v technologii nízkodohřívaných sýrů se tedy nejeví jako perspektivní vzhledem k nežádoucím sensorickým vlastnostem sýrů. Kyselost sýrů byla po výrobě vyšší a během doby zrání klesala pomaleji než u sýrů s přidavkem probiotických laktobacilů. Pro výrobu probiotických sýrů s testovanými bifidobakteriemi by bylo možné použít např. enkapsulaci buněk.

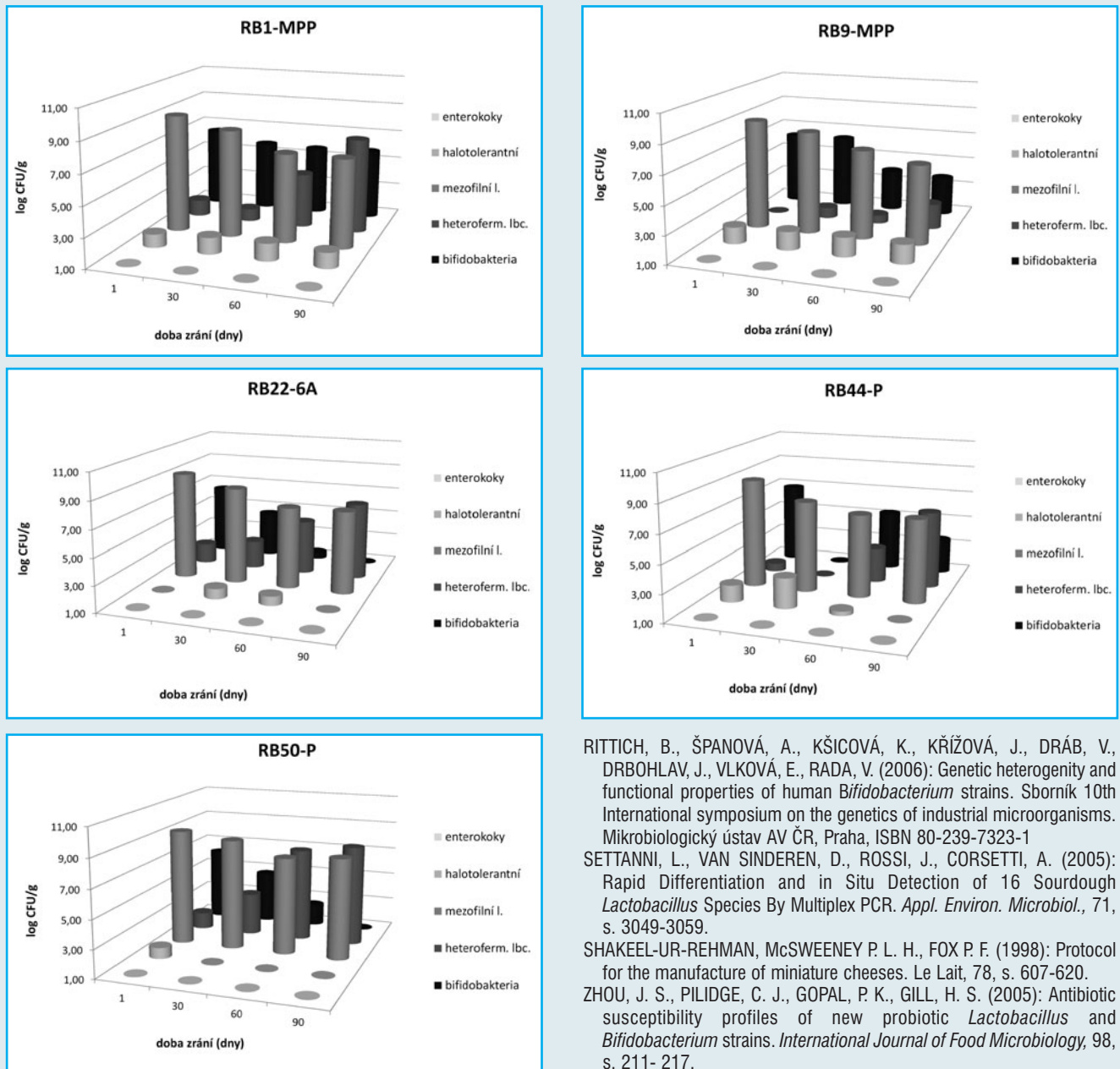
Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory MZe ČR, NAZV, projektu QJ1310256 v rámci programu KUS a v rámci institucionální podpory VÚM s.r.o., rozhodnutí č. RO1414.

Literatura:

- CUKROWSKA, B., MOTYL, I., KOZÁKOVÁ, H., SCHWARZER, M., GÓRECKI, R., KLEWICKA, E., SLIŽEVSKA., LIBUDZISZ, Z. (2009): Probiotic *Lactobacillus* strains: in vitro and in vivo studies. *Folia Microbiologica*, 54(6) ISSN 0015-5632
- DANIELSEN, M., WIND, A. (2003): Susceptibility of *Lactobacillus* ssp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82, s. 1-11.
- FAO/WHO (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Dostupné z: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf.

Obr. 2 Počty CFU/g sledovaných skupin mikroorganismů v sýrech s testovanými kmeny bifidobakterií během zrání



RITTICH, B., ŠPANOVÁ, A., KŠICOVÁ, K., KRÍŽOVÁ, J., DRÁB, V., DRBOHLAV, J., VLKOVÁ, E., RADA, V. (2006): Genetic heterogeneity and functional properties of human *Bifidobacterium* strains. Sborník 10th International symposium on the genetics of industrial microorganisms. Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha, ISBN 80-239-7323-1

SETTANNI, L., VAN SINDEREN, D., ROSSI, J., CORSETTI, A. (2005): Rapid Differentiation and in Situ Detection of 16 Sourdough *Lactobacillus* Species By Multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, s. 3049-3059.

SHAKEEL-UR-REHMAN, McSWEENEY P. L. H., FOX P. F. (1998): Protocol for the manufacture of miniature cheeses. *Le Lait*, 78, s. 607-620.

ZHOU, J. S., PILIDGE, C. J., GOPAL, P. K., GILL, H. S. (2005): Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 98, s. 211- 217.

HYNES E., OGIER J. C., DELACROIX-BUCHET A. (2000): Protocol for the manufacture of miniature washed-curd Cheeses under controlled microbiological conditions. *International Dairy Journal*, 10, s. 733-737.

Přijato do tisku: 14. 7. 2015
Lektorováno: 30. 7. 2015

Obr. 3 Počty CFU/g sledovaných skupin mikroorganismů v kontrolních sýrech během zrání

