

MIKROBIOLOGICKÁ DETEKCE PROBIOTICKÝCH MIKROORGANISMŮ VE FERMENTOVANÝCH MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH

R. Burdychová

Došlo: 3. ledna 2007

Abstract

BURDYCHOVÁ, R.: *Microbiological detection of probiotic microorganisms in fermented milk products*. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2007, LV, No. 2, pp. 15–20

A number of health benefits have been claimed for probiotic bacteria such as *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus rhamnosus*. Because of the potential health benefits, these organisms are increasingly incorporated into dairy foods. However, to reach health benefits, the concentration of probiotics have to be 10^6 CFU/g of a product. For assessing of required probiotic bacteria quantity, it is important to have a working method for selective enumeration of these probiotic bacteria.

Five bacteriological media were evaluated to assess their suitability to selectively enumerate *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Bacteriological media evaluated included *Streptococcus thermophilus* agar, pH modified MRS agar, MRS-vancomycine agar and BSM (*Bifidus* selective medium) agar under different culture conditions. Seven selected fermented milk products with probiotic culture were analyzed for their bacterial populations using the described selective bacteriological media and culture conditions. All milk products contained probiotic microorganisms claimed to be present in declared quantity (10^6 – 10^7 /g).

Streptococcus thermophilus, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., probiotic bacteria

Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy přítomné v potravě, které po požití v určitém množství příznivě ovlivňují složení a rovnováhu střevní mikroflóry, a tak i zdraví člověka. Probiotické bakterie jsou v potravině přítomny ve formě životaschopných buněk. Kultury těchto bakterií musí být humánního původu, musí být schopné přežít průchod trávicím traktem (odolat kyselému prostředí žaludku), musí se v místě působení (ve střevě) množit a nesmí být toxické či patogenní. Výběr vhodných probiotických kultur závisí i na jejich schopnosti vytvořit příznivé organoleptické vlastnosti (tj. chuť, vůni apod.) potraviny (TANNOCK, 2002; TANNOCK, 2005).

Koncepce probiotických výrobků se v rozsáhlé míře využívá v mlékárenském průmyslu, např. přidáním kultur rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* do

jogurtů a jogurtových nápojů, kefirového mléka či sýrů.

Je tzv. terapeutické minimum je spotřebitelům doporučována denní konzumace alespoň 100 g mléčného výrobku s minimálním obsahem 10 milionů (10^6) probiotických bakterií v 1 g nebo 1 ml (ROBINSON, 1987) výrobku. Pro jednotlivé skupiny fermentovaných mléčných výrobků je množství bakterií použité mikrobiální kultury stanoveno vyhláškou ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb., ve znění pozdějších předpisů. Jako příklad lze uvést „kysané mléčné výrobky s bifidokulturou“, které musí obsahovat 10^6 bifidobakterií.

Pro monitorování obsahu probiotických bakterií v souladu s vyhláškou je nutné vyvinout metody pro selektivní stanovení těchto kultur. V mléčných výro-

cích jsou totiž přítomny i jogurtové bakterie či bakterie mléčného kvašení (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*). Právě přítomnost těchto startovacích kultur znesnadňuje detekci probiotických mikroorganismů, pro selektivní stanovení je třeba zvolit kombinaci mikrobiologických a biochemických metod a jistou praktickou zkušenost (KNEIFER a PACHEL, 1993; LAROA a MARTIN, 1991). Vhodným doplněním je také využití molekulárně-biologických metod. Aplikace těchto metod však vyžaduje finančně nákladné vybavení laboratoře.

Následující práce představuje jednu z možností jak určit množství probiotických kultur ve fermentovaných mléčných výrobcích. Pro analýzu byly zvoleny výrobky vybrané mlékárny, které nesly na obalu značení „probiotická kultura“.

MATERIÁL A METODY

Bakteriální kmeny a jejich růstové podmínky

Kultury mikroorganismů *Streptococcus thermophilus* CCM 4757, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1828, *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833 a *Bifidobacterium lactis* DSM 10140 byly získány z České sbírky mikroorganismů v Brně a ze sbírky Výzkumného ústavu mlékárenského v Táboře (MILCOM, a.s.). Bakteriální buňky *S. thermophilus*, *L. rhamnosus* a *L. acidophilus* byly kultivovány aerobně na MRS agaru (Noack, Francie) při 30 °C, bakteriální buňky *B. lactis* na MRS agaru s cysteinem (0,05 %, Sigma-Aldrich, USA) za anaerobních podmínek při 37 °C. Kultury byly použity jako pozitivní kontroly pro růst na selektivních médiích.

Startovací kultury byly dodány výrobcem fermentovaných mléčných nápojů s probiotickou kulturou v zamraženém stavu, v době použitelnosti. Kultura YP-MIX™ 101 FRO 500 (Danisco, Dánsko) obsahovala bakteriální druhy *S. thermophilus*, *L. acidophilus* a *B. lactis*, v kultuře HOLDBAC™ LC FRO 750 (Danisco, Dánsko) byl přítomen bakteriální druh *L. rhamnosus*. Kultury byly použity jako pozitivní kontroly pro růst na selektivních médiích.

Příprava médií

Fyziologický roztok (Noack, Francie) byl připraven dle návodu výrobce.

Streptococcus thermophilus (ST) agar. Médium bylo připraveno smícháním následujících komponent: 10,0 g tryptonu, 1,0 g sacharosy, 5,0 g kvasničného extraktu a 2,0 g K_2HPO_4 . Komponenty byly rozpuštěny v 1 l destilované vody. pH média bylo upraveno na $6,8 \pm 0,1$, do média bylo přidáno 6 ml 0,5 % bromkresolové červeně a 12 g agaru.

MRS (deMan, Rogosa a Sharpe agar, Noack, Francie), MRS – vankomycin, MRS – clindamycin, MRS pH = $5,2 \pm 0,1$, MRS pH = $4,6 \pm 0,1$. MRS agar (Noack, Francie) byl připraven dle návodu výrobce (pH = 6,5). MRS – vankomycin agar byl připraven přidavkem vankomycinu (2 mg/l, Sigma-Aldrich, Německo) po autoklávování MRS média, MRS – clindamycin přidavkem 0,5 mg/l clindamycinu (Sigma-Aldrich, Německo), MRS s upraveným pH bylo připraveno úpravou pH MRS média 1 M HCl (Pliva-Lachema, Česká republika).

BSM (*Bifidus* selektivní agar, Fluka, USA) byl připraven dle návodu výrobce.

Mikrobiologický rozbor mléčných výrobků

Analyzován byl kompletní sortiment fermentovaných mléčných nápojů s probiotickou kulturou jedné šarže od jednoho výrobce, vždy po třech výrobcích stejného druhu. Výrobky byly analyzovány v den výroby, na přítomnost a počet kolonie tvořících jednotek na gram výrobku (KTJ/g). Mikrobiologický rozbor byl proveden dle ČSN EN ISO 8261 na příslušných selektivních půdách. Stupeň ředění byl volen tak, aby výsledný počet kolonií na jedné plotně byl 15 až 300. Petriho misky se vzorky byly kultivovány anaerobně a aerobně při 37 °C a 43 °C po dobu 24 a 72 h, dle stanovovaného bakteriálního druhu.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Bakteriální kmen *S. thermophilus* CCM dobře rostl na ST agaru a na MRS agaru. Tento bakteriální druh tvořil po 24 h aerobní kultivaci při 37 °C na ST agaru žluté kolonie. pH ST média je 6,8, což je dle SHANKARA a DAVISE (1977) prostředí, které potlačuje růst laktobacilů. Tento předpoklad byl v této práci potvrzen, *L. acidophilus* ani *L. rhamnosus* na ST médiu při uvedených podmínkách nerostly, ovšem delší inkubace (72 h) při stejných podmínkách vedla k růstu drobných žlutých kolonií bakteriálního druhu *L. acidophilus*. Bifidobakterie na ST médiu nerostly, neboť ke svému růstu vyžadují anaerobní podmínky. ST agar tedy může být použit pro selektivní stanovení bakterie *S. thermophilus* za aerobních podmínek při 37 °C 24 h a tak k odlišení tohoto bakteriálního druhu od probiotických kultur. Růst *S. thermophilus* na ostatních selektivních médiích použitých v této práci nebyl zaznamenán.

Na MRS médiu dobře rostly všechny sbírkové kmeny bakterií, kromě *B. lactis*. Při snížení pH MRS média na 5,2 a zvýšení teploty inkubace na 43 °C (DAVE a SHAH, 1996) na MRS médiu za anaerobních podmínek rostly pouze *L. rhamnosus* (2 mm velké bílé vypouklé kolonie) a *L. acidophilus* (0,1–0,5 mm drobné hnědé nepravidelné kolonie). Při dal-

ším snížení pH na 4,6 rostl na MRS médiu pouze *L. rhamnosus*. MRS s upraveným pH za anaerobních podmínek při 43 °C po dobu 72 h tedy může sloužit jako selektivní médium pro *L. rhamnosus* a *L. acidophilus*, jelikož i při pH = 5,2 jsou kolonie jednotlivých druhů od sebe dobře odlišitelné.

MRS médium s vankomycinem je selektivním médiem pro *L. rhamnosus* (SHAH, 2000), a to při anaerobní kultivaci při 43 °C po dobu 24 h. Bakterie za uvedených podmínek tvoří dobře vyvinuté 2 mm bílé vypouklé kolonie. Popsané podmínky inhibují růst sbírkových kmenů *S. thermophilus*, *L. acidophilus* i *B. lactis*.

MRS médium s clindamycinem bylo popsáno (BAILLON a kol., 2004) jako selektivní médium pro bakteriální druh *L. acidophilus* 5, při anaerobní kultivaci při 37 °C po dobu 72 h. Sbírkový kmen *L. acidophilus* rostl za uvedených podmínek na tomto médiu v drobných bílých nepravidelných koloniích. Na MRS médiu s clindamycinem nerostly žádné další testované sbírkové bakterie.

BSM agar byl použit pro selektivní kultivaci *B. lactis* za anaerobních podmínek při 37 °C po dobu 72 h. Žádný jiný testovaný bakteriální druh na tomto médiu za uvedených podmínek nerostl. Pro selektivní izolaci bifidobakterií bylo navrženo několik selektivních médií (SCARDOVI, 1986; TAMINE a kol., 1995; RADA a PETR, 2000), žádné z těchto médií však není pro rod *Bifidobacterium* zcela selektivní. Pro

selektivní izolaci je nezbytné použití antibiotik, která potlačí růst jiných bakteriálních rodů. BSM médium, které bylo v roce 2002 vyvinuto firmou Fluka, je vysoce selektivním médiem pro rod *Bifidobacterium*.

Kompletní přehled testovaných médií a selektivního růstu sbírkových bakteriálních druhů udává Tab. I.

V dalším kroku byly na selektivních médiích testovány komerční startovací kultury dodané výrobcem mléčných výrobků. Protože mohou různé kmeny probiotických bakterií vykazovat jiné vlastnosti než kmeny sbírkové, je nutné konkrétní startovací kultury použité pro výrobu nápojů s probiotickou kulturou před vlastním stanovením počtů KTJ na gram výrobku testovat na selektivní růst na testovaných kultivačních médiích. U startovacích kultur byly zjištěny stejné růstové vlastnosti jako u sbírkových kmenů, kromě růstu bakterie *L. acidophilus*, obsažené v kultuře YP-MIX™ 101 FRO 500. Růst tohoto bakteriálního druhu na MRS médiu s clindamycinem nebyl potvrzen, médium tedy nemohlo být použito pro selektivní stanovení *L. acidophilus* v analyzovaných mléčných výrobcích. Tento fakt jen potvrzuje hypotézu, že jednotlivé kmeny bakterií se od sebe svými růstovými charakteristikami liší a je nutné každý použitý kmen samostatně testovat. Všechna další výše popsaná selektivní média mohla být použita pro analýzu mléčných výrobků, protože se růstové vlastnosti sbírkových bakterií a startovacích bakteriálních druhů shodovaly.

I: Kultivační média testovaná pro selektivní izolaci *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* a *B. lactis*

| Kultivační médium | Bakteriální druh | Podmínky kultivace | Morfologie kolonií |
|--------------------|--|--|--|
| ST agar | <i>S. thermophilus</i> <i>L. acidophilus</i> | aerobně, 37 °C, 24 h aerobně, 37 °C, 72 h | 0,1–0,5 mm, žluté okrouhlé 0,5 mm, bílé, nepravidelné |
| MRS | <i>S. thermophilus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. rhamnosus</i> | aerobně, 37 °C, 24 h anaerobně, 37 °C, 72 h anaerobně, 37 °C, 72 h | 1–3 mm béžové, lesklé, vypouklé 0,5–1 mm hnědé, nepravidelné 2 mm okrouhlé, bílé, lesklé, s hladkými okraji |
| MRS – vankomycin | <i>L. rhamnosus</i> | anaerobně, 43 °C, 72 h | 2 mm okrouhlé, bílé, lesklé, s hladkými okraji |
| MRS – clindamycin | <i>L. acidophilus</i> | anaerobně, 37 °C, 72 h | 0,5–1 mm béžové, nepravidelné |
| MRS pH = 5.2 ± 0,1 | <i>L. rhamnosus</i> <i>L. acidophilus</i> | anaerobně, 43 °C, 72 h anaerobně, 43 °C, 72 h | 2 mm velké bílé vypouklé kolonie 0,1–0,5 mm drobné hnědé nepravidelné kolonie |
| MRS pH = 4.6 ± 0,1 | <i>L. rhamnosus</i> | anaerobně, 43 °C, 72 h | 2 mm velké bílé vypouklé kolonie |
| BSM agar | <i>B. lactis</i> | anaerobně, 37 °C, 72 h | 2 mm fialové vypouklé kolonie |

Kompletní sortiment fermentovaných mléčných nápojů s probiotickou kulturou z vybrané mlékárny byl analyzován na kvalitativní a kvantitativní zastoupení startovacích a probiotických mikroorganismů. V těchto mléčných výrobcích výrobce deklaruje

zastoupení probiotických mikroorganismů *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* a *B. lactis*. Počty *S. thermophilus* byly stanoveny použitím ST agaru a aerobní kultivace při 37 °C 24 hod. Počty *L. rhamnosus* byly stanoveny na MRS – vankomycin médiu a inkubací za anaerob-

ních podmínek při 43 °C po dobu 72 h. Na MRS pH = 5,2 při 43 °C po dobu 72 h za anaerobních podmínek byl stanoven počet *L. acidophilus*, počítány byly však jen drobné hnědé nepravidelné kolonie. Tab. II uvádí počty mikroorganismů v KTJ/g v jednotlivých fermentovaných mléčných nápojích, výsledky jsou statisticky zpracovány na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Všechny výsledky analýz jsou statisticky významné,

tzn. že počty probiotických bakterií jsou zastoupeny ve větším množství než je požadováno vyhláškou č. 77/2003 Sb. Vzhledem k tomu, že způsob uskladnění a doba trvanlivosti mohou mít na výsledné počty probiotických mikroorganismů nezanedbatelný vliv, bude předmětem dalšího studia zjistit variabilitu počtů probiotik ve fermentovaných nápojích v závislosti na těchto parametrech.

II: Kvantitativní mikrobiologická analýza fermentovaných mléčných výrobků s probiotickou kulturou

| Výrobek | Kvantitativní zastoupení presumptivních mikroorganismů (KTJ/g) | | | |
|---|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | <i>S. thermophilus</i> | <i>L. rhamnosus</i> | <i>L. acidophilus</i> | <i>B. lactis</i> |
| fermentovaný nápoj jablko-jahoda-malina | $(1,17 \pm 0,07) \times 10^8$ | $(1,76 \pm 0,04) \times 10^8$ | $(2,33 \pm 0,07) \times 10^8$ | $(4,10 \pm 0,11) \times 10^8$ |
| fermentovaný nápoj aloe vera | $(2,67 \pm 0,17) \times 10^8$ | $(3,03 \pm 0,07) \times 10^8$ | $(2,37 \pm 0,13) \times 10^6$ | $(1,10 \pm 0,11) \times 10^6$ |
| fermentovaný nápoj malina | $(6,20 \pm 0,23) \times 10^8$ | $(3,10 \pm 0,11) \times 10^8$ | $(1,76 \pm 0,04) \times 10^6$ | $(2,03 \pm 0,07) \times 10^8$ |
| fermentovaný nápoj meruňka | $(2,67 \pm 0,17) \times 10^8$ | $(5,00 \pm 0,11) \times 10^8$ | $(1,53 \pm 0,07) \times 10^6$ | $(2,37 \pm 0,07) \times 10^7$ |
| fermentovaný nápoj jahoda | $(5,10 \pm 0,11) \times 10^8$ | $(5,47 \pm 0,07) \times 10^8$ | $(1,57 \pm 0,07) \times 10^6$ | $(3,10 \pm 0,11) \times 10^7$ |
| fermentovaný nápoj jablko-banán-kiwi | $(1,63 \pm 0,07) \times 10^8$ | $(5,30 \pm 0,11) \times 10^8$ | $(1,63 \pm 0,07) \times 10^6$ | $(3,57 \pm 0,07) \times 10^8$ |
| fermentovaný nápoj jablko-broskev-meruňka | $(5,30 \pm 0,11) \times 10^8$ | $(1,76 \pm 0,04) \times 10^8$ | $(1,67 \pm 0,07) \times 10^8$ | $(2,10 \pm 0,11) \times 10^8$ |

SOUHRN

Probiotickým bakteriím je připisována řada příznivých účinků pro lidské zdraví. Díky těmto vlastnostem jsou probiotické bakterie přidávány do potravin. Probiotické druhy *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. a *Lactobacillus rhamnosus* patří mezi nejčastěji používaná probiotika v mléčných výrobcích. Pro dosažení příznivých účinků pro lidské zdraví je spotřebitelům doporučována denní konzumace alespoň 100 g mléčného výrobku s minimálním obsahem 10 milionů (10^6) těchto probiotických bakterií v 1 g nebo 1 ml výrobku. Pro monitorování obsahu probiotických bakterií v mléčných výrobcích je nutné vyvinout metody pro selektivní stanovení probiotik.

Výsledkem této práce je výběr pěti kultivačních médií pro selektivní stanovení *S. thermophilus* (ST agar), *L. rhamnosus* (MRS s vankomycinem), *L. acidophilus* (MRS s upraveným pH = $5,2 \pm 0,1$) a *Bifidobacterium* spp. (BSM agar).

V práci bylo analyzováno sedm fermentovaných mléčných výrobků s probiotickou kulturou. Pro selektivní stanovení probiotických mikroorganismů byla použita výše popsaná selektivní média. Všechny analyzované mléčné výrobky obsahovaly deklarované probiotické mikroorganismy v požadovaném množství (10^6 – 10^7 /g).

Streptococcus thermophilus, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., probiotické bakterie

LITERATURA

BAILLON, M. A. MARSHALL-JONES, Z. V., BUTTERWICK, R. V.: Effects of probiotic *Lactobacil-*

lus acidophilus strain DSM13241 in healthy adult dogs. *Am J Vet Res.* 2004, 65, 3: 338–343.

DAVE, R. I., SHAH, N. P.: Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermo-*

- philus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacteria*. *J Dairy Sci.* 1996, 79: 1529–1536.
- KNEIFEL, W., PACHER, B.: An X-Glu based agar medium for the selective enumeration of *L. acidophilus* in yoghurt related milk products. *Int. Dairy J.* 1993, 3: 277.
- LAROIA, S., MARTIN, J. H.: Methods for enumerating and propagating bifidobacteria. *Cult. Dairy Prod. J.* 1991, 26, 2: 32.
- RADA, V., PETR, J.: A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *J Microbiol Methods.* 2000, 43, 2: 127–32.
- ROBINSON, R. K.: Survival of *Lactobacillus acidophilus* in fermented products. *S. Afr. Tydskr. Suiwelkd.* 1987, 19: 25.
- SCARDOVI, V.: Genus *Bifidobacterium*. In: SNEATH, P. H. A., MAIR, N. S., SHARPE, M. E., HOLT, J. G.: *Bergey's Manual Alphaprint of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins, Alton, Hants. 1986, 2: 1418–1434.
- SHAH, N. P.: Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy Sci.* 2000, 83: 894–907.
- SHANKAR, P. A., DAVIES, F. L.: A note on the suppression of *Lactobacillus bulgaricus* in media containing 0- glycerophosphate and application of the media to selective isolation of *Streptococcus thermophilus* from yoghurt. *J. Soc. Dairy Technol.* 1977, 30,1: 28.
- TAMINE, A. Y., MARSHALL, M. E., ROBINSON, R. K.: Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *J. Dairy Res.* 1995, 62: 151.
- TANNOCK, G. W.: *Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects*. Norwich: Caister Academic Press. 2005, 230 p. ISBN 1-904455-01-8.
- TANNOCK, G. W.: *Probiotics and Prebiotics: Where are We Going?* Norwich: Caister Academic Press. 2002, 333 p. ISBN-10: 0-9542464-1-1.

Adresa

Ing. Radka Burdychová, Ph.D., Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

