

DETECTION AND MONITORING OF PROBIOTIC MICROORGANISMS IN FERMENTED MILK PRODUCTS

STANOVENÍ A SLEDOVÁNÍ POČTU PROBIOTICKÝCH MIKROORGANISMŮ VE FERMENTOVANÝCH MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH

Burešová K., Burdychová R.

Department of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemědělská 1, 613 00, Brno, Czech Republic

E-mail: xburesov@node.mendelu.cz, burdycho@node.mendelu.cz

ABSTRACT

Probiotics are defined as live microorganisms present at food which have a positive effect on structure of intestinal microflora and thus also for men's health. These days, we can see on market mainly fermented milk products with addition of these microorganisms, especially containing strains of the genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. For reaching positive effect on men's health, it is suggested to consume at least 100 grams of fermented milk products with minimal concentration of 10^6 CFU/g of probiotics daily. Five kinds of fermented milk products REVITAL ACTIVE with different flavour (natur, aloe vera, strawberry, raspberry – vanilla, apricot) were analyzed for quality and quantity level of probiotics at the day of production and during the whole expiration period (28 days). The producer of these products is guaranting presence of three probiotics strains: *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* and *Bifidobacterium sp.* The presence of those three species were proved at each of tested products during the whole expiration period in total amount greater than 10^6 CFU/g.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium sp.*, probiotic bacteria

ÚVOD

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. Kultury těchto bakterií musí být humánního původu, musí být schopné přežít průchod trávicím traktem (odolat kyselému prostředí žaludku), musí se v místě působení (v tlustém 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 (BURDYCHOVÁ, 2007).

V současné době se do popředí zájmu spotřebitelů dostávají probiotické potraviny, mezi nimiž dominují kysané mléčné výrobky s přidavkem probiotických bakterií. Jedná se především o bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, které mají celou řadu pozitivních účinků na lidský organismus (NECIDOVÁ a kol., 2002).

Potraviny s přidavkem probiotických kultur jsou zařazovány mezi tzv. funkční potraviny (ŠPELINA, 2006). Obecně se funkční potravina definuje jako každá potravina, která má kromě své nutriční hodnoty kladný vliv na zdraví, fyzickou výkonnost nebo duševní stav konzumenta. Jde tedy o potravinu, která má v porovnání s běžnými potravinami zvýšený fyziologický účinek (SHALABY a kol., 1996). V současné době patří v oblasti lidské výživy problematika funkčních potravin mezi nejsledovanější témata.

Pro dosažení příznivých účinků pro lidské zdraví 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 výrobku (BURDYCHOVÁ, 2008).

Cílem této práce bylo ověřit, zda se ve fermentovaných mléčných nápojích REVITAL ACTIVE s výrobcem deklarovanou probiotickou kulturou, vyskytuje probiotická kultura v požadovaném množství, tedy minimálně 10^6 v 1 ml výrobku.

MATERIÁL A METODIKA

Bakteriální kmeny a jejich růstové podmínky

Startovací kultury byly dodány výrobcem fermentovaných mléčných nápojů s probiotickou kulturou v lyofilizovaném stavu. Kultura YP-MIXTM 101 FRO 500 (Danisco, Dánsko) obsahovala bakteriální druhy *S. thermophilus*, *L. acidophilus* a *Bifidobacterium sp.*, v kultuře HOLDBACTM 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. 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). BSM (Bifidus selektivní agar, Fluka, USA) byl připraven dle návodu výrobce.

Mikrobiologický rozbor mléčných výrobků

V experimentu bylo použito pět druhů zakysaných mléčných nápojů REVITAL ACTIVE s různou příchutí. Označení vzorků je uvedeno v Tab. 1. Analyzovány byly vždy tři stejné výrobky jedné šarže u každé příchuti. Analýza probíhala po celou dobu trvanlivosti (28 dní), po sedmi dnech, a to na přítomnost a počet kolonie tvořících jednotek na gram výrobku (KTJ/ml). Mikrobiologický rozbor byl proveden dle ČSN EN ISO 8261. Stupeň ředění byl volen tak, aby výsledný počet kolonií na jedné plotně byl 15 až 300. Stanovení počtu mezofilních bakterií mléčného kvašení bylo provedeno dle ČSN ISO 15214. Selektivní stanovení *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* a *Bifidobacterium sp.* bylo provedeno dle Burdychové (2007). Petriho misky se vzorky byly kultivovány při 30°C a 37 °C po dobu 72 hodin, dle stanovovaného bakteriálního druhu.

Tab. 1 Označení vzorků

Název výrobku	Označení vzorku
Revital active, natur bílý	Vzorek č.1
Revital active, aloe vera	Vzorek č.2
Revital active, jahoda	Vzorek č.3
Revital active, malina-vanilka	Vzorek č.4
Revital active, meruňka	Vzorek č.5

VÝSLEDKY A DISKUZE

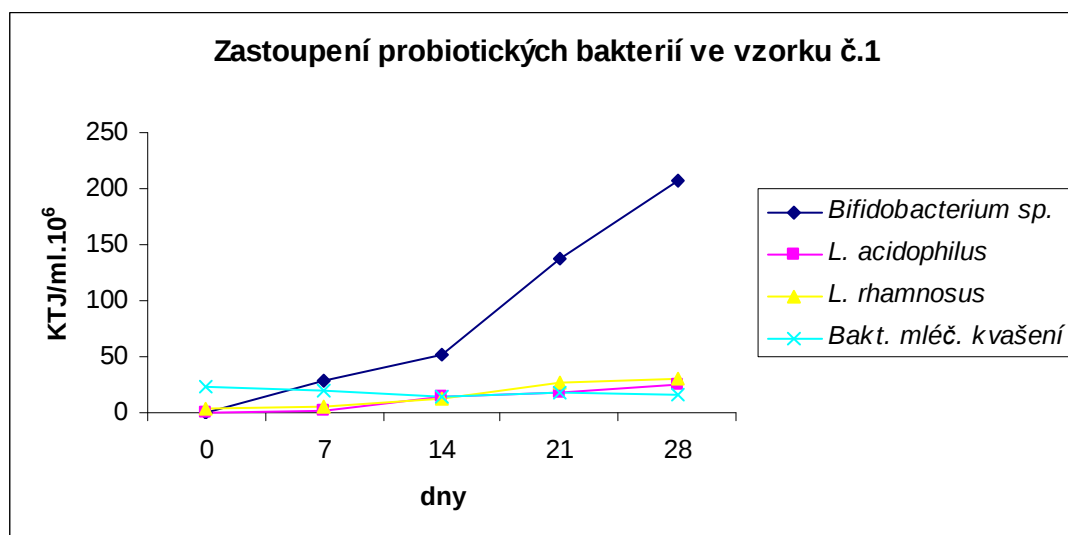
V prvním kroku byly na selektivních médiích testovány komerční startovací a probiotické kultury dodané výrobcem mléčných výrobků. Na MRS médiu v mikroaerofilních podmínkách dobře rostly všechny komerční startovací a probiotické kultury bakterií kromě *Bifidobacterium sp.* MRS médium s vankomycinem je selektivním médiem pro *L. rhamnosus* (SHAH, 2000), a to při anaerobní kultivaci při 43°C po dobu 24 hodin. Bakterie tvořily bílé vypouklé kolonie o velikosti 2 mm. Popsané podmínky inhibovaly růst kmenů *S. thermophilus*, *L. acidophilus* i *Bifidobacterium sp.* MRS médium s clindamycinem bylo popsáno jako selektivní médium pro bakteriální druh *L. acidophilus* při anaerobní kultivaci při 37°C po dobu 72 hodin (BAILLON a kol., 2004). *L. acidophilus* tvořil na tomto médiu drobné bílé nepravidelné kolonie. Na MRS médiu s clindamycinem nerostly kromě *L. acidophilus* žádné jiné startovací ani probiotické bakterie. Pro selektivní kultivaci *Bifidobacterium sp.* byl použit BSM agar. Počítány byly fialově zbarvené kolonie.

Ve druhém kroku bylo analyzováno pět druhů zakysaných mléčných výrobků REVITAL ACTIVE na kvalitativní a kvantitativní zastoupení probiotických mikroorganismů. Výrobce na obalu těchto produktů deklaruje přítomnost tří probiotických druhů, a to *Bifidobacterium sp.*, *L. acidophilus* a *L. rhamnosus*. Počty *Bifidobacterium sp.* byly stanoveny na médiu BSM při anaerobní kultivaci při 37°C 72 hodin. Počty *L. acidophilus* byly stanoveny na médiu MRS – clindamycin při anaerobní kultivaci při 37°C 72 hodin. Na

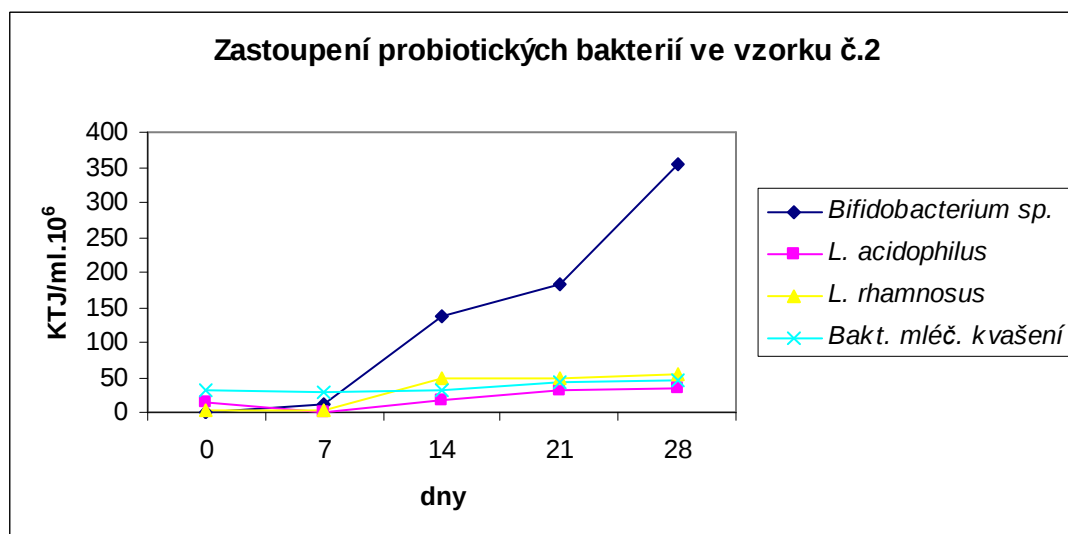
médiu MRS – vankomycin byly při anaerobní kultivaci při 37°C 72 hodin stanoveny počty *L. rhamnosus*. Celkový počet bakterií mléčného kvašení byl stanoven na médiu MRS.

Celkové počty bakterií mléčného kvašení byly měřeny v průběhu celé doby trvanlivosti. V žádném měření neklesly pod minimální hodnotu požadovanou vyhláškou č.77/2003 Sb. Počet všech probiotických mikroorganismů na konci analýzy vzrostl oproti počátečnímu počtu. Největší kvantitativní nárůst (o tři řády) byl zaznamenán u *Bifidobacterium sp.* V případě probiotických bakterií *L. acidophilus* a *L. rhamnosus* docházelo ve většině případů k mírnému poklesu počtů těchto bakterií po prvním týdnu. Jednalo se pravděpodobně o adaptaci těchto mikroorganismů na vnější podmínky. V dalších dnech jejich počet stoupal. Výrobky ochucené ovocnou složkou nevykazovaly vyšší počty probiotických mikroorganismů než výrobky neochucené.

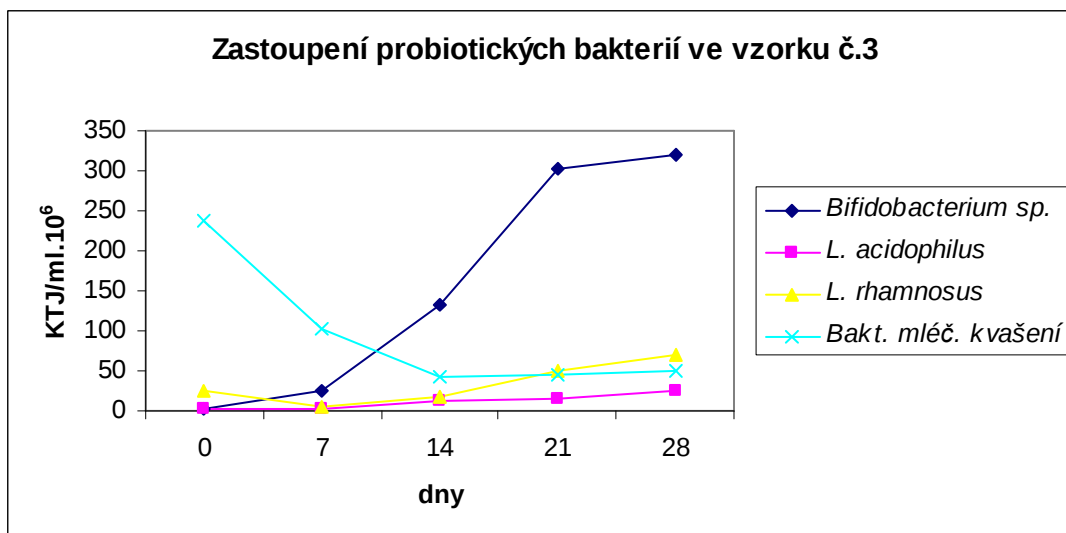
Zastoupení probiotických mikroorganismů ve vzorcích uvádí Graf č.1 – Graf č.5



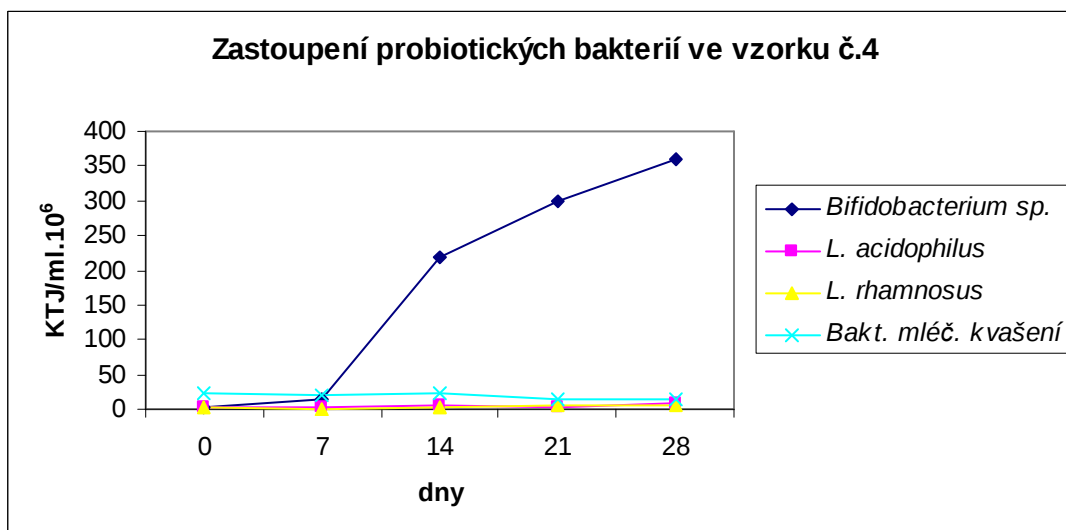
Graf č.1 Zastoupení probiotických bakterií ve vzorku č.1



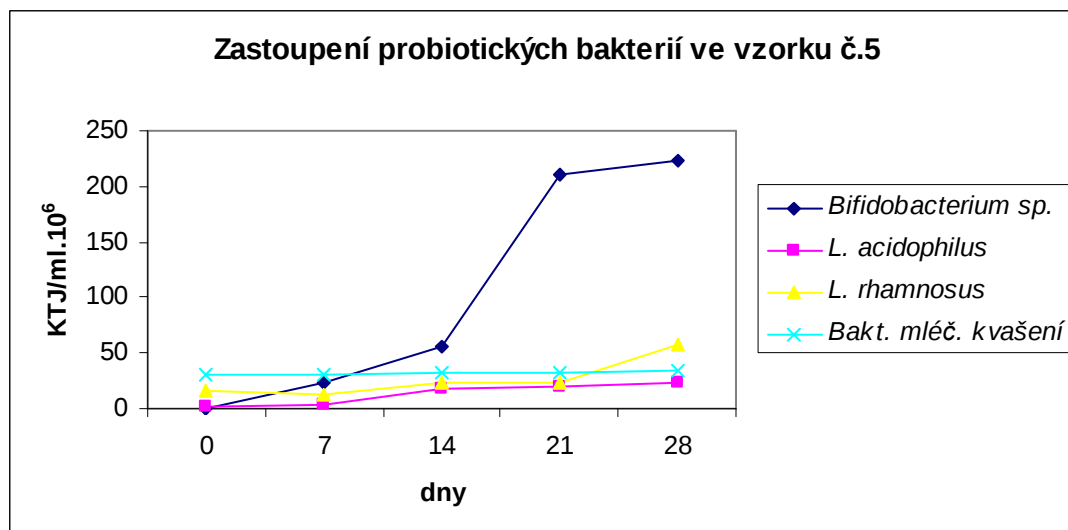
Graf č.2 Zastoupení probiotických bakterií ve vzorku č.2



Graf č.3 Zastoupení probiotických bakterií ve vzorku č.3



Graf č.4 Zastoupení probiotických bakterií ve vzorku č.4



Graf č.5 Zastoupení probiotických bakterií ve vzorku č.5

ZÁVĚR

V experimentu bylo potvrzeno, že údaje deklarované výrobcem jsou pravdivé. Počty všech probiotických bakterií byly zastoupeny ve větším množství, než je stanoveno vyhláškou č. 77/2003 Sb. Výrobek byl příznivým prostředím pro množení probiotických mikroorganismů, po dobu analýzy docházelo ke zvýšení jejich počtu. Tyto výrobky mohou být doporučeny spotřebitelům pro pravidelnou konzumaci, a to v množství alespoň 100 ml výrobku denně.

LITERATURA

BAILLON, M. A. MARSHALL-JONES, Z. V., BUTTERWICK, R. V. (2004): Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* strain DSM13241 in healthy adult dogs. *Am J Vet Res.* 2004, 65, 3: 338–343.

BURDYCHOVÁ, R. (2007): Microbiological detection of probiotic microorganisms in fermented milk products. *Acta univ. Agric. Et silvic. Mendel. Brun.*, 2007, LV, No. 2, pp. 15-20.

BURDYCHOVÁ, R. (2008): Sledování počtu probiotických mikroorganismů ve fermentovaných mléčných výrobcích. In *Sborník přednášek semináře Mléko a sýry, Praha 2008*. 1. vyd. VŠCHT Praha: VŠCHT Praha, 2008, s. 15--18.

NECIDOVÁ, L., CUPÁKOVÁ, Š., JANŠTOVÁ B., NAVRÁTILOVÁ, P. (2002): Úloha probiotik v kysaných mléčných výrobcích. *Veterinářství* 2002;52:66-68

SHAH, N. P. (2000): Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy Sci.* 2000, 83: 894–907.

SHALABY, A. R. (1996): Significance of biogenetic amines in food safety and human health. *Food res. Int.* 1996, 29, 675-690

ŠPELINA, V. (2006): *Vědecký výbor pro potraviny* [online]. 2003 , 28.12.2006 [cit. 2008-10-15]. Dostupný z WWW: <http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/informace/Info_2006_16_deklas_Probio_SK.pdf>.