

DETECTION OF PROBIOTIC MICROORGANISMS IN FERMENTED DAIRY PRODUCTS

Olga Cwiková, Gabriela Zorníková, Soňa Dvořáčková

ABSTRACT

Probiotics are living microorganisms, which have health benefits on human health. To provide health benefits is suggested the daily intake 100 g of product with concentration of living probiotics 10^6 CFU.ml⁻¹ of a product. Most often the probiotics are added to the fermented milk products.

Fermented dairy products containing probiotic culture were selected. The samples on presence and number of probiotic bacteria were analysed. Probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium* sp. contained in selected fermented milk products were detected on selective media and culture conditions evaluated in this study. The selected products were analysed from their production to the end of expiration period. In both products were proved the presence of lactic acid bacteria *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus* during the whole expiration period in amount higher than 10^6 CFU.ml⁻¹. Amount of *Bifidobacterium* sp. was insufficient in both products.

Keywords: probiotics, fermented milk products, lactic acid bacteria, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium* sp.

ÚVOD

V současné době je kladen velký důraz na zdravý životní styl, se kterým neoddělitelně souvisí i zdravé stravování. Proto se stále častěji setkáváme s produkty ekologického zemědělství a tzv. funkčními potravinami. Funkční potravina musí obsahovat významně vyšší množství látek, které mají prokazatelný a prokázaný příznivý efekt na zdraví (Kalač, 2003). Mezi nejrozšířenější funkční potraviny patří kysané mléčné výrobky s přidavkem probiotických mikroorganismů, které příznivě ovlivňují složení mikroflóry zažívacího traktu.

Aby mohl být určitý mikrobiální kmen označen jako probiotický, musí splňovat následující podmínky: zdravotní nezávadnost, pozitivní vliv na zdraví člověka, humánní původ, odolnost vůči prostředí žaludku a střeva (nízké pH, přítomnost kyseliny chlorovodíkové a proteolytických enzymů, odolnost vůči působení žluči, střevní peristaltika), produkce antimikrobiálních látek, působení proti patogenním mikroorganismům (produkci antimikrobiálních látek nebo tím, že patogenním mikroorganismům konkurují), odolnost vůči podmínkám technologického zpracování a skladování výrobků, bez negativního vlivu na senzorické vlastnosti výrobku (změna chuti, vůně, barvy, konzistence v porovnání s výrobkem bez probiotických mikroorganismů) (Holm, 2001), přítomnost v aktivní formě v dostatečném množství ve výrobku v době konzumace (alespoň 10^6 KTJ v 1 g nebo 1 ml výrobku) (Robinson, 1987).

Prokázaný je pozitivní vliv na střevní mikrobiologickou rovnováhu, zlepšení frekvence stolice, schopnost osídlit střevní sliznici, antagonismus vůči patogenním mikroorganismům (Zbořil a kol., 2005) a rozličné nutričně fyziologické efekty. Konzumace kysaného mléka obsahujícího *Lactobacillus acidophilus*

Částečně dokázaná je stimulace imunitního systému a snížení hladiny cholesterolu (Görner a Valík, 2004). Otázkou je pak použití probiotik jako prevence vzniku rakoviny tlustého střeva a konečníku (Mac Farlane a Cummings, 1999). V současné době však není znám přesný mechanismus, kterým by probiotika mohla inhibovat vznik např. kolorektálního karcinomu (Hronek et al., 2009).

Görner a Valík (2004) uvádějí tyto známé a komerčně dostupné bakteriální kmeny označované jako probiotika: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium* sp., *Bifidobacterium longum*.

Cílem práce bylo ověřit, zda vybrané probiotické výrobky splňují podmínky, dané legislativou, tzn. po celou dobu minimální trvanlivosti obsahují alespoň 10^6 KTJ *Bifidobacterium* sp. v 1 ml výrobku a 10^7 KTJ.ml⁻¹ bakterií mléčného kvašení a zároveň porovnat, zda se liší obsah těchto probiotických mikroorganismů ve dvou vybraných výrobcích: výrobku známé moravské mlékárny a výrobku vyráběném pod privátní značkou.

MATERIÁL A METODY

Pro analýzu byly použity dva druhy jogurtových nápojů. Vzorek č. 1 je vyráběn jako značkový výrobek moravské mlékárny, vzorek č. 2 je vyráběn pod privátní značkou velkého obchodního řetězce. Od obou vzorků bylo v běžné tržní síti zakoupeno pět lahví stejné šarže. Doba minimální trvanlivosti končila v den posledního odběru, tedy 28. den po výrobě.

Odběry vzorků byly provedeny každých sedm dní po celou dobu minimální trvanlivosti, první odběr byl proveden v den nákupu (7 dní po výrobě). Vzorky byly skladovány v chladničce při teplotě 7 °C.

Vzorek č.1: probiotický kysaný nápoj moravské mlékárny, obsahující probiotické kultury (*Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*).

prokazatelně snižuje počty hnilobných bakterií ve stolici (Hronek et al., 2009).

Vzorek č. 2: probiotický kysaný nápoj obsahující probiotickou kulturu (*Bifidobacterium* sp.).

Z mikrobiologických ukazatelů byl sledován celkový počet bakterií mléčného kvašení (BMK), počet *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* a počet bakterií rodu *Bifidobacterium* sp.

Stanovení počtu bakterií mléčného kvašení (BMK)

Stanovení počtu BMK bylo provedeno dle ČSN ISO 15214, plotnovou metodou. Objem vzorku (1 ml) nebo jeho ředění byl zalit MRS agarem (Noack, Francie). Od každého ředění byly paralelně inokulovány dvě misky. Načkované misky byly po zatuhnutí zality druhou vrstvou MRS agarů. Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 72 hodin.

Stanovení počtu *Lactobacillus acidophilus*

Ke stanovení počtu *Lactobacillus acidophilus* ve vzorcích bylo použito kultivační médium MRS agar (Noack, Francie) s upravenou hodnotou pH 5,2. Kultivace inokulovaných misek probíhala za anaerobních podmínek v anaerostatech (Oxoid, Velká Británie) při teplotě 43 °C po dobu 72 hodin.

Stanovení počtu *Lactobacillus rhamnosus*

Ke stanovení počtu *Lactobacillus rhamnosus* byl použit MRS agar (Noack, Francie) s přidavkem antibiotika vankomycinu (2 mg.l⁻¹), vůči kterému je *L. rhamnosus* rezistentní. Kultivace proběhla za anaerobních podmínek v anaerostatech (Oxoid, Velká Británie) při teplotě 43 °C po dobu 72 hodin.

Stanovení počtu *Bifidobacterium* sp.

Ke stanovení počtu *Bifidobacterium* sp. ve vzorcích byla použita selektivní tuhá živná půda BSM agar (Fluka, Švýcarsko) s přidavkem BSM suplementu (Fluka, Švýcarsko). Vzorky byly kultivovány v anaerobním prostředí v anaerostatech (Oxoid, Velká Británie) při teplotě 37 °C po dobu 72 hodin.

Pokus byl proveden v mikrobiologické laboratoři Ústavu technologie potravin Mendelovy univerzity v Brně, a to od listopadu do prosince 2009.

Statistické metody

Pro statistické vyhodnocení výsledků byly použity následující metody: výpočet základních statistických charakteristik (průměr, směrodatná odchylka, směrodatná chyba průměru). Statistické porovnání zjištěných hodnot mikroorganismů u výrobku 1 a 2 bylo provedeno v programu Statistica Cz, verze 9, t-testem dle nezávislých proměnných.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem práce bylo ověřit, zda oba výrobky, označené za probiotické, splňují podmínky dané vyhláškou MZe č. 77/2003 Sb., tzn. po celou dobu trvanlivosti obsahují alespoň 10⁶ KJT bakterií *Bifidobacterium* sp. v 1 ml výrobku a 10⁷ KJT bakterií mléčného kvašení (BMK) v 1 ml výrobku. Dalším úkolem bylo porovnat obsah probiotických mikroorganismů ve dvou výrobcích, výrobku známé moravské mlékárny a výrobku vyráběném pod privátní značkou.

Bakterie mléčného kvašení

Celkový počet bakterií mléčného kvašení (KJT.ml⁻¹) ve vzorku č. 1, resp. 2 během doby minimální trvanlivosti (28 dní) je uveden v Tab. 1.

Tab.1 Počet BMK (KJT.ml⁻¹) ve vzorku č. 1, resp. ve vzorku č. 2 v průběhu skladování, odběr č. 1 proveden 7 dnů po výrobě, odběr č. 2, 3, 4 proveden 14, 21, 28 dní po výrobě

	Počet BMK (KJT.ml ⁻¹)			
	Odběr č. 1	Odběr č. 2	Odběr č. 3	Odběr č. 4
Vzorek č. 1	2,1.10 ⁷	1,3.10 ⁷	1,2.10 ⁷	1,6.10 ⁷
Vzorek č. 2	1,0.10 ⁷	1,3.10 ⁷	8,0.10 ⁶	1,0.10 ⁷

Námi zjištěné počty BMK ve vzorku č. 1 byly nižší, než uvádí ve své práci Burešová (2009), která analyzovala stejný výrobek téže mlékárny. V jejím případě se na počátku skladování pohyboval počet BMK v rozmezí 4,4.10⁷ až 7,9.10⁷ KJT.ml⁻¹, na konci doby minimální trvanlivosti v rozmezí 5,2.10⁷ až 1,6.10⁸ KJT.ml⁻¹.

Po celou dobu skladování počet BMK ve výrobcích vyhovoval požadavku vyhlášky MZe č. 77/2003 Sb. Pouze ve vzorku č. 2, vyráběném pod privátní značkou klesl po 14 dnech skladování (odběr č. 3) počet bakterií mléčného kvašení pod hodnotu požadovanou legislativou (10⁷ KJT.ml⁻¹).

Lactobacillus acidophilus

Počet bakterií *L. acidophilus* ve vzorku č. 1, resp. 2 během doby minimální trvanlivosti je uveden v Tab. 2. Zatímco u vzorku č. 1 byly počty *L. acidophilus* po celou dobu sledování řádově 10⁷ KJT.ml⁻¹, v případě vzorku č. 2 došlo k vzestupu z původní hodnoty 6,5.10⁶ na 1,2.10⁷ KJT.ml⁻¹. Ve vzorcích analyzovaných Burešovou (2009) se obsah *L. acidophilus* během doby minimální trvanlivosti zvyšoval, nejvyšší hodnoty byly zaznamenány na konci doby minimální trvanlivosti po 28 dnech (3,5.10⁷ KJT.ml⁻¹). K jiným závěrům dospěla Zorníková (2007), která ve stejném výrobku zjistila v průběhu skladování pokles počtu *L. acidophilus* z 6.10⁷ na 2,3.10⁶ KJT.ml⁻¹.

Tab.2 Počet bakterií *L. acidophilus* (KJT.ml⁻¹) ve vzorku č. 1, resp. ve vzorku č. 2 v průběhu skladování, odběr č. 1 proveden 7 dnů po výrobě, odběr č. 2, 3, 4 proveden 14, 21, 28 dní po výrobě

	Počet bakterií <i>L. acidophilus</i> (KJT.ml ⁻¹)			
	Odběr č. 1	Odběr č. 2	Odběr č. 3	Odběr č. 4
Vzorek č. 1	1,7.10 ⁷	1,2.10 ⁷	1,5.10 ⁷	1,4.10 ⁷
Vzorek č. 2	6,5.10 ⁶	8,8.10 ⁶	8,2.10 ⁶	1,2.10 ⁷

Lactobacillus rhamnosus

Počet bakterií *L. rhamnosus* ve vzorku č. 1, resp. 2 je uveden v Tab. 3. Námi zjištěné počty *L. rhamnosus* korespondují s výsledky Zorníkové (2007), která v pokusu se stejným výrobkem zjistila po 21 dnech od výroby (odpovídá odběru č. 3 při našem pokusu) 1,7.10⁷ KJT.ml⁻¹. Celkově zaznamenala v průběhu skladování pokles počtu *L. rhamnosus*, což je v souladu s našimi výsledky.

Tab.3 Počet bakterií *L. rhamnosus* (KTJ.ml⁻¹) ve vzorku č. 1, resp. ve vzorku č. 2 v průběhu skladování, odběr č. 1 proveden 7 dnů po výrobě, odběr č. 2, 3, 4 proveden 14, 21, 28 dní po výrobě

	Počet bakterií <i>L. rhamnosus</i> (KTJ.ml ⁻¹)			
	Odběr č. 1	Odběr č. 2	Odběr č. 3	Odběr č. 4
Vzorek č. 1	2,2.10 ⁷	1,1.10 ⁷	1,4.10 ⁷	8,6.10 ⁶
Vzorek č. 2	8,0.10 ⁶	1,1.10 ⁷	9,4.10 ⁶	1,0.10 ⁶

Bifidobacterium sp.

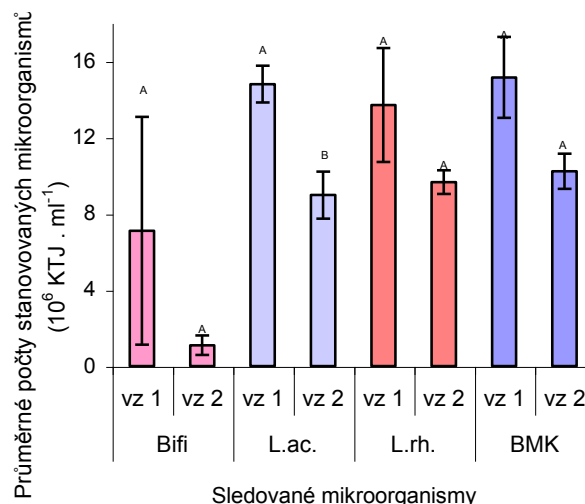
Počet bakterií *Bifidobacterium* sp. ve vzorku č. 1, resp. 2 je uveden v Tab. 4. Obdobné počty bifidobakterií zaznamenala **Zorníková (2007)**, která ve výrobku po 7 dnech skladování zjistila 2,4.10⁷ KTJ.ml⁻¹. Na konci doby minimální trvanlivosti došlo ve zmiňovaném pokusu k poklesu bifidobakterií až na 8,5.10⁵ KTJ.ml⁻¹. Také v našem pokusu došlo po 28 dnech od výroby k poklesu počtu bakterií *Bifidobacterium* sp.

Tab.4 Počet bakterií *Bifidobacterium* sp. (KTJ.ml⁻¹) ve vzorku č. 1, resp. ve vzorku č. 2 v průběhu skladování, odběr č. 1 proveden 7 dnů po výrobě, odběr č. 2, 3, 4 proveden 14, 21, 28 dní po výrobě

	Počet bakterií <i>Bifidobacterium</i> sp. (KTJ.ml ⁻¹)			
	Odběr č. 1	Odběr č. 2	Odběr č. 3	Odběr č. 4
Vzorek č. 1	2,5.10 ⁷	1,0.10 ⁶	1,0.10 ⁶	2,1.10 ⁶
Vzorek č. 2	1,5.10 ⁶	2,4.10 ⁶	3,5.10 ⁵	1,8.10 ⁵

Rozhodujícím faktorem pro přežívání probiotických bakterií je hodnota pH na konci fermentačního procesu. **Dave a Shah (1997)** v pokusu pozorovali, že snížení hodnoty pH pod 4,4 způsobí výrazné snížení počtu probiotických bakterií. Při našem pokusu bylo pH změřeno po 14 dnech skladování a zjištěná hodnota pH u vzorku č. 1 byla 4,2, resp. 4,3 u vzorku č. 2.

Průměrné hodnoty sledovaných mikroorganismů po celou dobu skladování jsou uvedeny na Obr. 1.



Obr. 1 Porovnání průměrných hodnot počtu bakterií *Bifidobacterium* sp. (Bifi), *Lactobacillus acidophilus* (L.ac.), *Lactobacillus rhamnosus* (L.rh.) a mléčného kvašení (BMK) v KTJ.ml⁻¹ ve vzorku č. 1 a vzorku č. 2 po celou dobu sledování (21 dní). Průměry označené různými písmeny se ve sledovaném znaku statisticky liší (P<0,01), n = 4

ZÁVĚR

Počty bakterií *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus rhamnosus* byly po celou dobu minimální trvanlivosti u obou vzorků vyšší než 1.10⁶ KTJ.ml⁻¹. Obsah *Bifidobacterium* sp. byl nižší než požaduje legislativa u vzorku č. 2 při třetím a čtvrtém odběru.

Počet bakterií *L. acidophilus* byl ve vzorku č. 1 vyšší (P<0,01) než ve vzorku č. 2. Co se týká ostatních sledovaných mikroorganismů, statistický rozdíl v jejich počtech ve vzorku č. 1 a 2 zjištěn nebyl (P>0,05).

Na základě výsledků našich analýz lze jako nejvhodnější doporučit spotřebitelům konzumaci probiotických výrobků co nejdříve od data výroby, kdy jsou probiotické mikroorganismy ve výrobku obsaženy v dostatečném množství.

LITERATURA

- BUREŠOVÁ, K., 2009. Stanovení probiotických mikroorganismů ve vybraných mléčných výrobcích. Diplomová práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 88 s.
- DAVE, RI., SHAH, NP., 1997. Effect of level of starter culture on viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts. *Food Australia*, Vol. 49, p. 164 – 168.
- GÖRNER, F., VALÍK, L., 2004. Aplikovaná mikrobiologie požívatin. 1.vydání. Bratislava: Malé centrum, 528 s.
- HOLM, F. 2001. Gut health. ISBN 2-7380-1008-3. Dostupné z <http://www.functionalfoodnet.eu/images/site/assets/a-Gut-health.pdf>.
- HRONEK, M., KUDLÁČKOVÁ, Z., NEKVINDOVÁ, J., 2009. Probiotika a prebiotika v profylaxi a terapii poruch GIT a v prevenci karcinogeneze. *Medicina pro praxi*, ročník 6., číslo 2, s. 66 – 68.

KALACH, P., 2000. Funkční potraviny-kroky ke zdraví. *Dona*, České Budějovice, 130 s., ISBN 80-7322-029-6.

MAC FARLANE, GT., CUMMINGS, JH., 1999. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *Br Med J*, Vol. 318, p. 999 – 1003.

ROBINSON, RK., 1987. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in fermented products. *S. Afr. J Dairy Sci*, Vol. 19, p. 25 – 27.

VYHLÁŠKA MZE č. 77/2003 Sb. o požadavcích na mléko, mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje.

ZBOŘIL, V., PROKOPOVÁ, L., HERTLOVÁ, M., 2005. Mikroflóra trávicího traktu, klinické souvislosti. *Grada Publishing*, Praha, 156 s., ISBN 80-247-0584-2.

ZORNÍKOVÁ, G., 2007. Probiotické mikroorganismy. Diplomová práce, *Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně*, 76 s.

Kontaktní adresa:

MVDr. Olga Cwíková Ph.D., Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, e-mail: cwikova@node.mendelu.cz

Ing. Gabriela Zorníková, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, e-mail: g.zornikova@email.cz

Soňa Dvořáčková, Gymnázium Brno, e-mail: sdvorackova2@seznam.cz