

HODNOTENIE VYBRANÝCH VLASTNOSTÍ NEŠARTOVACÍCH BAKTÉRIÍ MLIEČNEHO KYSNUTIA EVALUATION OF SELECTED PROPERTIES NON-STARTER LACTIC ACID BACTERIA

Jana Bezeková, Monika Lavová, Margita Čanigová, Miroslav Kročko, Konrad Domig

Abstract: The aim of this study was to determinate acidifying activity, proteolytic activity and ability of growth in an environment with NaCl of two strains of lactobacilli isolated from raw cow milk. Isolates were identified with commercial biochemical test API 50 CHL and PCR method, as *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*. Strain no. 80 showed in an environment with pH 5.9 higher proteolytic activity than strain no. 83. Proteolytic activity of the strain no. 80 was higher with longer time cultivation (5 - 10 days). The strain no. 83 grew in the environment with NaCl from 0 to 6 % without significant decline amount.

Keywords: NSLAB, *Lactobacillus*, proteolytic activity, acidifying activity, ability to NaCl

ÚVOD

NSLAB (nešartovacie baktérie mliečneho kysnutia) sa vyskytujú prirodzene v mlieku a v prostredí, sú izolované z podlahy, kanalizácie a z povrchov zariadení používaných v mliekarenskom prostredí (Fox et al., 2004; Tůma, Plocková, 2007). Prispievajú predovšetkým k rozvoju chuti syrov (Thage et al., 2005). NSLAB ako doplnkové kultúry v syrárstve musia spĺňať dva základné predpoklady. Použitý kmeň alebo zmes kmeňov nesmú negatívne ovplyvňovať proces zrenia a reakcie súvisiace s proteolýzou bielkovín. Po druhé, doplnková kultúra by mala inhibovať rast a účinky ostatných NSLAB a po celú dobu zrenia by mala zostať dominantnou kultúrou v syre (Burns et al., 2012). NSLAB by sa mali tiež podieľať počas výroby syrov na fermentácii laktózy, pričom by mali rýchlo dosiahnuť počty cca 10^7 KTJ.g⁻¹ na začiatku zrenia. Tento počet by sa nemal počas zrenia meniť (Tůma, Plocková, 2007). NSLAB majú jedinečnú schopnosť rásť v náročných podmienkach aké sú v zrejmých syroch (pH 4,9 – 5,3; teplota 13 – 15 °C, obsah soli je 0 – 6 %, minimum kyslíka). Tieto podmienky zrenia vytvárajú neprijateľné prostredie pre väčšinu mikroorganizmov a sú vhodné pre NSLAB (Wouters et al., 2002). K tejto skupine baktérií najčastejšie patria druhy rodu *Lactobacillus*. Napr. Bertier et al. (2001) z celkového počtu 488 izolátov mezofilných laktobacilov zo vzoriek mlieka potvrdili prevládajúce druhy *Lactobacillus paracasei* a *Lactobacillus rhamnosus*.

Cieľom práce bolo izolovať z mlieka baktérie mliečneho kysnutia, identifikovať ich a preštudovať ich vybrané vlastnosti v rôznych rastových podmienkach typických pre výrobu syrov.

MATERIÁL A METÓDY

Izolácia laktobacilov z mlieka

Prítomnosť NSLAB sa zisťovala v cisternových vzorkách surového kravského mlieka a vo vzorkách mlieka z mliečného automatu. V odobratých vzorkách mlieka sa stanovil počet laktobacilov kultiváciou na MRS agare (*HiMedia Laboratories*, India) pri teplote 37 ± 1 °C po dobu 72 hodín za anaeróbných podmienok. Počítateľné počty laktobacilov sa pohybujú v rozmedzí $15 - 150$ KTJ.ml⁻¹ (STN ISO 27205, 2010).

Rodová identifikácia laktobacilov

Baktérie rodu *Lactobacillus* vytvárajú na MRS médiu charakteristické kolónie, t.j. biele, šošovkovité až hviezdicovité kolónie o priemere 1 až 3 mm.

Vybrané kolónie laktobacilov vyrastené na živnom médiu MRS sa preočkovali čiarovaním na platne MRS agaru. Po kultivácii sa mikroskopicky zistila ich morfológia a príslušnosť podľa Grama. Laktobacily sú grampozitívne paličky samostatné resp. vytvárajúce retiazky a sú katalázanegatívne.

Druhovú identifikáciu laktobacilov

Druhovú identifikáciu izolátov sa vykonala pomocou komerčnej biochemickej súpravy API 50 CHL (*BioMérieux*, France). K identifikácii sa použila 24 hodinová kultúra, z ktorej sa pripravila suspenzia s turbiditou rovnajúcou sa 2. stupňu McFarlandovej zákalovej stupnice na prístroji Densilameter (*Lachema*, Česká republika). Inkubácia, identifikácia a vyjadrenie výsledkov sa uskutočnilo podľa návodu testu. Izoláty druhovo určené komerčným biochemickým testom sa potvrdili PCR metódou podľa **Song et al. (2000)**.

Izolácia bakteriálnej DNA (24 hodinová kultúra v MRS bujóne) sa uskutočnila pomocou komerčného kitu peqGOLD Bacterial DNA Kit (*Peqlab*, Germany). Čistota a koncentrácia získanej DNA sa zmerala na prístroji NanoDrop 2000c spektrofotometer (*Thermo Scientific*, Germany).

K 22 µl reakčného mixu, ktorý obsahoval: 100 µl 10 x PCR buffru (*Finnzymes*, Finland), 20 µl 10 mM deoxynukleozid trifosfát mixu (*Carl Roth*, Austria), 10 µl 2 U/µl DynaZyme II (DNA polymeráza) (*Finnzymes*, Finland) a 750 µl sterilnej vody sa pridal 1 µl každého 10 pmol primeru (*Fermentas*, Germany) a 1 µl testovanej DNA. Sekvencia špecifických primerov pre *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (312 bp): For CTAGCGGGTGCGACTTTGTT, Rev GGCCAGCTATGTATTCACTGA. Amplifikácia sa uskutočnila na prístroji Thermal cycler C1000 (*Biorad*, USA). Preinkubácia sa uskutočnila pri teplote 94 °C počas 2 min. V 30 cykloch sa opakovala denaturácia pri 94 °C 30 sekúnd, annealing pri 56 °C 40 sekúnd a elongácia pri 72 °C 1 min. Záverečný predĺžovací krok sa uskutočnil pri teplote 72 °C počas 5 min. PCR fragmenty sa získali na 2 % agarózovom géle pri 80 V a 2000 mA po dobu 50 minút, farbili sa pomocou etidium bromidu a vizualizovali pod UV svetlom (**Song et al., 2000**).

Hodnotenie kysacej, proteolytickej aktivity a schopnosti rastu laktobacilov v prostredí NaCl

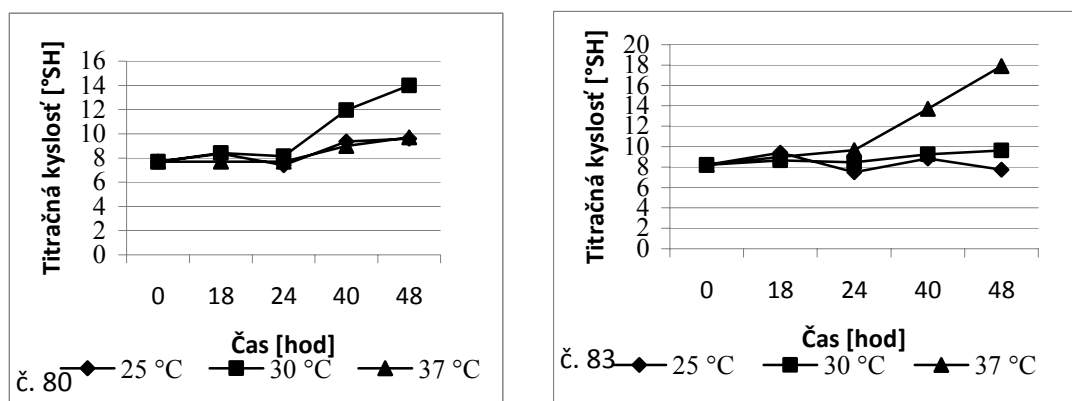
K hodnoteniu aktivít sa použila 24 hodinová kultúra izolátu s hustotou 0,5 stupňa McFarlandovej zákalovej stupnice, čo zodpovedalo 10^6 KTJ.ml⁻¹. Kysacia aktivita izolátov laktobacilov sa sledovala cez zmenu titračnej kyslosti naočkovaného UHT mlieka počas 48 hodinovej kultivácie pri teplote 25 °C, 30 °C a 37 °C v pravidelných časových intervaloch. Proteolytická aktivita sa zistila difúznou metódou na mäsopeptónovom agare (*HiMedia Laboratories*, India) s 10 %-tným prídavkom obnoveného sterilného odstredeného mlieka (pH média 5,9). Kultivácia prebehla pri teplote 7 °C, 25 °C, 30 °C a 37 ± 1 °C po dobu 10 dní. Schopnosť rastu laktobacilov v prostredí NaCl sa zistila na MRS médiu (pH = 5,9)

s prídavkom rôznych koncentrácií NaCl (0, 2, 4, 6 %) pri teplote 7, 25, 30 a 37 ± 1 °C po dobu 72 hodín za anaeróbných podmienok (IDF, 2010).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Počty laktobacilov vo vyšetrovaných vzorkách mlieka kolísali od $5,45 \cdot 10^2$ KTJ.ml⁻¹ do $1,89 \cdot 10^6$ KTJ.ml⁻¹. Z celkového počtu 181 izolátov mliečnych baktérií sa na základe príslušnosti podľa Grama a hodnotenia morfológického charakteru zistilo 91 kmeňov laktobacilov. U 2 náhodne vybraných izolátov č. 80 a 83 sa hodnotila kysacia a proteolytická aktivita a rast v prostredí NaCl. Podľa výsledkov biochemického testu API 50 CHL bol izolát č. 80 identifikovaný ako *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 1 a izolát č. 83 ako *Lb. rhamnosus*. Oba tieto druhy laktobacilov sú zaradené do skupiny *Lb. casei* group, preto vykazujú vysokú druhovú podobnosť, ktorá sa ťažko rozlišuje biochemickým testom. Pre spoľahlivú identifikáciu sa použila metóda PCR, na základe ktorej sa oba testované izoláty identifikovali ako *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*.

Nieto-Arribas et al. (2009) sa venovali štúdiu technologických vlastností tohto druhu a dokázali, že 90 % z 20 testovaných izolátov kmeňa *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* vykazovalo nízku kysaciu aktivitu. Na obrázku 1 sú znázornené zmeny titračnej kyslosti mlieka naočkovaného kmeňmi laktobacilov č. 80 a č. 83 v závislosti od času a teploty.



Obrázok 1 Priebeh zmeny titračnej kyslosti mlieka v °SH pôsobením kmeňa číslo 80 a 83 v závislosti od času a teploty

Ako vyplýva z obrázka 1 kmeň č. 80 po 48 hodinách kultivácie dosiahol najvyššiu kysaciu aktivitu pri teplote 30 °C, kmeň č. 83 pri 37 °C. Dosiadnutá zmena kyslosti poukazuje na slabšiu kysaciu aktivitu izolovaných kmeňov. Za zákvasové sa považujú tie baktérie mliečného kysnutia, ktoré majú schopnosť produkovať v mlieku pri 30 až 37 °C za 6 hodín toľko kyseliny mliečnej, ktorá zníži kyslosť mlieka z pôvodného pH asi 6,8 na hodnotu pH < 5,3 (Görner, Valík, 2004).

Vyššiu schopnosť proteolýzy vykazoval izolát č. 80 v porovnaní s izolátom č. 83 - tabuľka 1. S predlžujúcou dobou kultivácie sa zisťovala vyššia proteolytická aktivita kmeňa č. 80, čo z hľadiska zrenia syrov je zaujímavé zistenie. Sledovaním proteolytickej a lipolytickej aktivity kmeňov *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* sa zaoberali vo svojej štúdií Hoorde et al. (2010). Sánchez et al. (2005) zistili vyššiu proteolytickú aktivitu kmeňov *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (QC28 a QC35) v porovnaní s *Lb. plantarum*.

Tabuľka 1 Proteolytická aktivita (veľkosť zón v mm) izolátu č. 80 a 83 v závislosti od času a teploty pri pH 5,9

Proteolytická aktivita izolátu č. 80				Proteolytická aktivita izolátu č. 83				
Teplota	pH = 5,9							
	5 dní kultivácie		10 dní kultivácie		5 dní kultivácie		10 dní kultivácie	
	0 h*	48 h*	0 h	48 h	0 h	48 h	0 h	48 h
7 °C	0	0	0	0	0	0	0	0
25 °C	24	30	32	50	0	0	0	0
30 °C	27	31	32	49	0	0	0	0
37 °C	26	32	32	39	0	23	0	39

*0h – izolát naočkovaný v UHT mlieku bez predkultivácie

48 h – izolát naočkovaný v UHT mlieku po 48 hod. predkultivácie

Z tabuľky 2 vyplýva, že kmeň *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* č. 80 je schopný prežívať aj v prostredí s koncentráciou 6 % NaCl pri teplotách 25 až 37 °C. Kmeň č. 83 bol citlivejší na rastúcu koncentráciu NaCl, čo sa prejavilo poklesom počtov tohto kmeňa.

Tabuľka 2 Rast izolátov laktobacilov (č. 80, 83) v MRS médiu s rôznou koncentráciou NaCl v závislosti od teploty

Číslo izolátu	Teplota	Koncentrácia NaCl v %			
		0	2	4	6
		Počty laktobacilov (KTJ.ml ⁻¹)			
80	7 °C	0	0	0	0
	25 °C	5,45.10 ⁶	1,82.10 ⁶	6,90.10 ⁶	3,46.10 ⁶
	30 °C	7,27.10 ⁶	5,45.10 ⁶	5,82.10 ⁶	3,36.10 ⁶
	37 °C	3,64.10 ⁶	3,64.10 ⁶	5,18.10 ⁶	3,27.10 ⁶
83	7 °C	0	0	0	0
	25 °C	1,09.10 ⁷	1,55.10 ⁷	9,00.10 ⁶	0
	30 °C	1,55.10 ⁷	1,46.10 ⁷	5,82.10 ⁶	1,09.10 ⁵
	37 °C	1,27.10 ⁷	1,72.10 ⁷	1,07.10 ⁷	0,90.10 ⁴

Kask et al. (2003) vo svojej štúdií zaznamenali dokonca nulový rast *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* v prostredí so 6,5 % prídavkom NaCl pri 30 °C. V našich pokusoch kmeň *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* č. 83 v prostredí so 6 % NaCl nerástol už pri teplote 25 °C.

ZÁVER

Mlieko je jedným zo substrátov, v ktorom sa bežne vyskytujú baktérie mliečneho kysnutia. V posledných rokoch sa záujem mliekarenských odborníkov sústreďuje na izoláciu a charakteristiku vlastností nových kmeňov týchto baktérií, okrem iného aj z rodu *Lactobacillus*, s cieľom ich využitia ako doplnkových kultúr pri výrobe zrejúcich syrov. Aj naše výsledky potvrdili, že vhodnejšou metódou pre druhovú identifikáciu laktobacilov je PCR metóda v porovnaní s komerčným biochemickým API testom. Identifikované kmene vykazovali slabú kysiacu aktivitu. Jeden kmeň vykazoval proteolytickú aktivitu a schopnosť rastu v prostredí s NaCl aj pri teplote 25 °C. Tento kmeň je vhodný na ďalšie testovanie a v prípade potvrdenia zdraviu neškodných vlastností aj na testovanie vo výrobe zrejúcich syrov.

LITERATÚRA

- BERTHIER, F., BEUVIER, E., DASEN, A., GRAPPIN, R. 2001. Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comte cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. In *International Dairy Journal*, roč. 11, 2001, 293 – 305.
- BURNS, P., CUFFIA, F., MILESI, M., VINDEROLA, G., MEINARDI, C., SABBAG, N., HYNES, E. 2012. Technological and probiotic role of adjunct cultures of non-starter lactobacilli in soft cheeses. In *Food Microbiology*, roč. 30, 2012, s. 45 – 50.
- HOORDE, K. V., LEUVEN, I. V., DIRINCK, P., HEYNDRIKX, M., COUDIJZER, K., VANDAMME, P., HUYS, G. 2010. Selection, application and monitoring of *Lactobacillus paracasei* strains as adjunct cultures in the production of Gouda-type cheeses. In *International Journal of Food Microbiology*, roč. 144, 2010, s. 226 – 235.
- FOX, P. F., McSWEENEY, P. L. H., COGAN, T. M., GUINNE, T. P. 2004. Cheese – Chemistry, Physic and Microbiology. 3rd Edition. Vol. 1. Elsevier, 2004, 617 s., ISBN 0 – 1226 – 3652 – X.
- GÖRNER, F., VALÍK, L. 2004. *Aplikovaná mikrobiológia požívateľn.* 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s., ISBN 80 – 967064 – 9 – 7.
- KASK, S., ADAMBERG, K., ORLOWSKI, A., VOGENSEN, F. K., MOLLER, P., ARDÖ, Y., PAALME, T. 2003. Physiological properties of *Lactobacillus paracasei*, *L. danicus* and *L. curvatus* strains isolated from Estonian semi-hard cheese. In *Food Research International*, roč. 36, 2003, s. 1037 – 1046.
- NIETO-ARRIBAS, P., POVEDA, J. M., SESENA, S., PALOP, L., CABEZAS, L. 2009. Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. In *Food Control*, roč. 20, 2009, s. 1092 – 1098.
- SÁNCHEZ, I., SESENA, S., POVEDA, J. M., CABEZAS, L., PALOP, L. 2005. Phenotypic and genotypic characterization of lactobacilli isolated from Spanish goat cheeses. In *International Journal of Food Microbiology*, roč. 102, 2005, s. 355 – 362.
- SONG, Y., KATO, N., LIU, CH., MATSUMIYA, Y., KATO, H., WATANABE, K. 2000. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. In *FEMS Microbiology Letters*, roč. 187, 2000, s. 167 – 173.
- STN ISO 27205. 2010. Fermented milk products bacterial starter cultures – standard of identity. Bratislava: SÚTN, 2010.
- THAGE, B. V., BROE, M. L., PETERSEN, M. H., PETERSEN, M. A., BENNEDSEN, M., ARDÖ, Y. 2005. Aroma development in semi-hard reduced-fat cheese inoculated with *Lactobacillus paracasei* strains with different aminotransferase profiles. In *International Dairy Journal*, roč. 15, 2005, s. 795 – 805.
- TŮMA, Š., PLOCKOVÁ, M. 2007. Protektivní kultury pro výrobu polotvrdých sýrů. In *Mléko a sýry 2007* (sborník přednášek semináře), Praha, 2007, s. 31 – 36, ISBN 978 – 80 – 7080 – 661 – 6.
- WOUTERS, J. T. M., AYAD, E. H. E., HUGENHOLTZ, J., SMIT, G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. In *International Dairy Journal*, roč. 12, 2002, s. 91 – 109.

Pod'akovanie: Práca sa riešila za finančnej podpory grantovej výskumnej úlohy VEGA projektu č. 1/0679/13.

Kontaktná adresa:

Ing. Jana Bezeková, Katedra hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra, Slovensko, e-mail: j.bezekova@gmail.com

Ing. Monika Lavová, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: monika.lavova@gmail.com

doc. Ing. Margita Čanigová, CSc., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: margita.canigova@uniag.sk

Ing. Miroslav Kročko, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: miro.krocko@yahoo.com

Dipl.-Ing. Dr.nat.techn. Konrad Domig, University of Natural Resources and Life Sciences Vienna, Institute of Food Science, Muthgasse 18, 1190 Vienna, Austria, E-mail: konrad.domig@boku.ac.at