

Výber kmeňov *Lactobacillus species* na mliečnu fermentáciu zeleniny

MILAN DRDÁK - JOLANA KAROVIČOVÁ - GABRIEL GREIF - ALICA RAJNIAKOVÁ

Súhrn. 16 kmeňov z rodu *Lactobacillus* bolo testovaných na upravených vzorkách z bielej hlávkovej kapusty a sterilizovanej zmesi kapustovej a mrkvovej šťavy. Po ukončení fermentácie pri teplote 27 °C, resp. 30 °C po 7 dňoch boli vo vzorkách sledované redukujúce sacharidy, celková titračná kyslosť, pH hodnota, kyselina mliečna, citrónová a octová, amoniak, biogénne amíny, dusičnany a dusitany. Na základe týchto kritérií a senzorickej prijateľnosti boli vybrané 3 kmene, ktoré v požadovanej miere znižujú koncentráciu dusičnanov pôvodných vzoriek.

Mliečna fermentácia zeleniny ako konzervačná metóda na výrobu finálnych produktov a polotovarov sa opätovne začína radíť k rozširujúcim sa technológiám vzhľadom na rastúce množstvo surovín takto spracovaných v potravinárskom priemysle. Za základne dôvody možno považovať nutrično-fyziologické hľadisko a odpovedajúcu osvetu, hygienické hľadisko a náklady na produkciu. Tieto aspekty sú podčiarkované najmä pri posudzovaní nárastu objemu vyrábaných mliečne fermentovaných zeleninových štiav [3, 4].

Dosiahnutie výrobkov so žiadanými vlastnosťami vyžaduje výber vhodných kmeňov na mliečnu fermentáciu pre jednotlivé suroviny, pričom ako kritérium vhodnosti sa môže použiť rýchlosť a celková produkcia kyselín, zmena pH, úbytok výživovo dôležitých látok, znížo-

Doc.Ing. Milan Drdák, DrSc., Ing. Jolana Karovičová, CSc., Ing. Gabriel Greif, Ing. Alica Rajniaková, CSc., Katedra sacharidov a konzervácie potravín, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

vanie koncentrácie dusičnanov, produkcia biogénnych amínov a pod. [1, 2, 7]. Uvedené faktory sú stále predmetom diskusií vzhľadom na špecifiká rodu *Lactobacillus* a podmienenosť ich rastu prísunom živín (substrátu), prístupom (neprístupom) vzduchu (kyslíka), chemickým a fyzikálnym prostredím, vhodnou teplotou, rastovými faktormi [10-12]. Osobitú skupinu predstavuje používanie čistých kultúr, vhodné podmienky ich aplikácie a následne ovplyvnenie celkovej prijateľnosti takýchto výrobkov spotrebiteľom.

V predloženej práci sa zaoberáme výberom vhodných kmeňov z rodu *Lactobacillus* na základe sledovania vybraných ukazovateľov pri fermentácii vzoriek pripravených z hlávkovej kapusty a sterilizovaného kultivačného média pripraveného z kapustovej a mrkvovej šťavy čistými kultúrami.

Materiál a metódy

Príprava vzoriek kapusty a ich fermentácia

Biela hlávková kapusta po odstránení povrchových listov a prídavku 1,5 % NaCl bola rozdrvená na kutri. 300 g homogenizovanej kapusty bolo dávkaných do 500 ml baniek so zábrusom po predchádzajúcom dôkladnom premiešaní so 100 ml inokula, ktoré obsahovalo cca 10 mikróorganizmov v 1 ml. Následne boli banky uzatvorené zábrusovým uzáverom s vákuovým kohútom, cez ktorý bol odsatý vzduch pomocou výevy. Takto pripravené vzorky boli kultivované v termostate pri 27 °C 7 dní.

Príprava vzoriek kapustovej a mrkvovej šťavy a ich fermentácia

Očistená biela hlávková kapusta bola homogenizovaná na kutri s prídavkom 1 % NaCl. Lisovaním drviny sa získala šťava. Očistená a nakrájaná mrkva sa varila v tlakovom hrnci (cca 110 °C s vodou v pomere 1:1 10 minút, potom sa oddelila šťava od mrkvovej drene. Kapustová a mrkvová šťava sa zmiešali v pomere 2:1, pridali sa 3 % D-glukózy a koncentrácia soli bola upravená na 1,5 %. Šťava sa dávkovala do baniek, následne sterilizovala v autokláve 10 min pri 121 °C. Po ochladení šťavy sa do baniek pridala kyselina L-askorbová (15 až 25 mg na 100 g) a tiamíndichlorid (0,01 mg na 100 g), naočkovala sa čistými kultúrami mliečnych baktérií, objem šťavy v banke sa doplnil na 300 ml a banky

boli uzatvorené sterilnými gumovými zátkami. Vzorky boli kultivované pri teplote 30 °C 7 dní.

Kultivácia čistých kultúr

Všetky čisté kultúry boli kultivované na kvapalnej ATP pôde pre laktobacily. Pomnoženie bolo urobené pri teplote 30 °C za 5 dní. Pri pokusoch boli použité nasledujúce kmene: *Lactobacillus plantarum* (178/86), *L. plantarum* (186/86), *L. plantarum* (189/86), *L. casei* 598, *L. lactis* 447, *L. helveticus* CCM 3826, *L. plantarum* BIL, *L. pentosus*, *L. acidophilus* CCM 2913, *L. plantarum* (190/86), *L. plantarum* (195/86), *L. delbrueckii* (237/86), *L. delbrueckii* (238/86), *L. plantarum* (181/86), *L. plantarum* (187/86), *L. plantarum* (192/86), *L. plantarum* (976/86), *L. plantarum* CCM 551.

Chemické analýzy

Stanovenie redukujúcich cukrov podľa Schoorla [5]

Po vyredukovaní Cu₂O redukujúcimi cukrami z Fehlingových roztokov I a II sa stanoví nezredukovaná dvojmocná meď. Jodid draselný sa síranom meďnatým oxiduje na jód, ktorý sa stanoví titráciou tiosíranom sodným.

Stanovenie titrovateľných kyselín [5]

Odmerným roztokom NaOH sa na indikátor fenolftaleín stanoví obsah celkových kyselín a vyjadrí sa ako kyselina mliečna.

Stanovenie pH

Meranie na prístroji Pracistronic MV 88.

Stanovenie kyseliny L-askorbovej titračne [5]

Vzorka sa homogenizuje v prostredí kyseliny monohydrogénfosforečnej a v extrakte sa stanoví titračne s 2,6-dichlórfenolindofenolom.

Stanovenie kyselín kapilárnou izotachoforézou [9]

Vzorka sa homogenizuje a prefiltruje pred izotachoforetickou analýzou. Meranie bolo realizované na CS ZKI 01 izotachoforetickom analyzátore vybavenom vodivostným detektorom. Na identifikáciu

a stanovenie bol aplikovaný elektrolytický systém nasledujúceho zloženia: vodiaci elektrolyt $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ HCl}$; protiión 6-aminokaprónová, pH 4,5; aditívum 0,1 % metylhydroxyetylcelulóza; zakončujúci elektrolyt $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyselina kaprónová; $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ histidín, pH 4 - 5. Vzorky boli analyzované s prúdom 200 μA v preparačnej kolóne a 50 μA v analytickej kolóne. Kvantitatívna analýza bola realizovaná pomocou metódy kalibračnej krivky.

Stanovenie amoniaku mikrodifúziou podľa Conwaya [5]

Amoniak sa z extraktu vzorky vytlačí uhličitanom draselným v Conwayovej nádobke a absorbuje kyselinou boritou. Zo spotreby odmerného roztoku kyseliny sírovej sa vypočíta obsah amoniaku.

Stanovenie dusičnanov a dusitanov prietokovou injekčnou analýzou [11]

Na stanovenie bol použitý PIA 01 analyzátor fa LABECO so spektrofotometrickým detektorom. Metóda sa zakladá na diazotácii a následnej kopulačnej reakcii s aromatickými amínmi za vzniku stabilných azofarbív. Ich koncentrácia je priamo úmerná koncentrácii dusitanov. Koncentrácia dusičnanov bola stanovená nepriamo po ich redukcii na Cd-kolóne na dusitany.

Stanovenie biogénnych amínov [6]

Sledovali sa biogénne amíny (histamín, putrescín a kadaverín, pričom na izoláciu sa použil izokratický systém HPLC a predkolónová derivatizácia amínov s dansyl chloridom. Na kvalitatívne a kvantitatívne vyhodnotenie boli použité štandardy príslušných amínov. Použil sa izokratický systém HPLC kolóna SEPARON SGX C-18 (30 x 0,32 cm), 7 mm, teplota kolóny 40 °C, mobilná fáza metanol/voda 75:25, prietok mobilnej fázy 0,4 ml/min, dávkovač LCI 30, 20 ml, detektor UV-VIS 254 nm.

Výsledky a diskusia

V prvej časti práce sme sledovali vybrané ukazovatele, ktoré sme považovali za dôležité pre voľbu vhodného kmeňa. Zamerali sme sa na sledovanie priebehu mliečnej fermentácie vo vzorkách kapusty s podpriemerným celkovým počtom mikroorganizmov v 1 g suroviny.

Inokuláciu jednotlivými mikroorganizmami sme volili v rozpätí 10^4 až 10^6 živých mikroorganizmov na 1 g suroviny. Po predbežnom otestovaní celého súboru mikroorganizmov sme spravidla robili ďalšie pokusy pri troch koncentráciách v uvedenom rozpätí, pričom základným kritériom pre výber mikroorganizmov za nevyhnutného predpokladu dostatočnej a rýchlej produkcie kyseliny mliečnej bolo znižovanie koncentrácie dusičnanov. Základné údaje o priemerných výsledkoch z jednej sady pokusov sú zhrnuté v tabuľke 1. Z tabuľky je vidno rozdielnú produkciu kyselín a jej odraz na znížení pH hodnoty a pomernom zastúpení jednotlivých sledovaných organických kyselín pomocou izotachofórey. Za takto zvolených podmienok pokusu sa dá uvažovať o heterofermentatívnom priebehu mliečnej fermentácie ako aj o produkcii sprievodných látok ako dôsledku prítomnosti vlastnej mikrofóry suroviny. V každom prípade sa však prejavil rozdielny pokles dusičnanov. Z hľadiska priebehu mliečnej fermentácie, ale aj senzorických znakov, je zaujímavý, i keď vzhľadom na použitú metódu stanovenia len orientačný, nárast koncentrácie amoniaku. Tento sme pozorovali prakticky vo všetkých prípadoch.

V tejto časti práce sme sa zaoberali taktiež sledovaním biogénnych amínov. V prvej etape sme analyzovali vzorky kyslej kapusty z obchodnej siete. Zamerali sme sa na stanovenie putrescínu, kadaverínu a histamínu. Ich koncentrácia sa pohybovala pre kadaverín v rozpätí 12 - 45,5 mg/kg, pre histamín 56 - 90 mg/kg a putrescín 157 - 169 mg/kg. Vo vzorke spontánne fermentovanej v laboratórnych podmienkach (porovnávacia vzorka pre riadenú fermentáciu) bola napr. koncentrácia putrescínu 145 mg/kg. Vo vzorkách fermentovaných štartovacími kultúrami sa pohybovala koncentrácia putrescínu od 100 po 120 mg/kg, čo je v súlade s publikovanými údajmi. Hodnoty histamínu sa pohybovali od 10 do 25 mg/kg a kadaverínu od 35 do 50 mg/kg. Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že použitím vhodnej štartovacej kultúry je možné podstatne znížiť koncentráciu putrescínu rýchlym znížením pH hodnoty (produkcia kyseliny mliečnej). Pozitívnu úlohu hrá zvýšenie počiatočnej koncentrácie mikroorganizmov. Účinné zvládnutie tvorby histamínu je možné uskutočniť ukončením fermentácie v období, keď celková kyslosť prepočítaná na kyselinu mliečnu je 1,2 %.

Ďalšie pokusy sme realizovali pre naše potreby na prakticky sterilnej pôde, ktorej zloženie sa ukázalo ako vhodné na kultiváciu laktobacilov. Pre zabezpečenie porovnateľnosti pokusov sme fortifikovali sterilizova-

Tabuľka 1. Parametre stanovené v čerstvej kapuste a po 7 dňoch fermentácie rôznymi kmeňmi z rodu *Lactobacillus*.
 Table 1. Determination parameters in fresh cabbage and after 7-day fermentation by various strains of *Lactobacillus* gene.

VZORKA ¹	mliečne baktérie ³	cukry ⁴	kyseliny ⁵	pH ⁶	amoniak ⁷	dusičnany ⁸	kyseliny [g/kg]		
	[CFU/g]	[g/kg]	[g/kg]		[mg/kg]	[mg/kg]	mliečna ⁹	citrónová ¹⁰	octová ¹¹
čerstvá kapusta ²		47,2	3,1	6,2	56	339,2	0,4	4,8	0,1
<i>L. casei</i> 598	1,2 . 10 ⁶	21,4	18,9	3,6	201	172,0	14,8	1,9	0,7
<i>L. lactis</i> 447	1,5 . 10 ⁶	27,9	14,3	3,7	262	195,8	11,0	2,0	1,4
<i>L. helveticus</i> CCM 3826	2,3 . 10 ⁶	27,3	17,9	3,6	264	188,5	14,2	2,4	0,6
čerstvá kapusta ²		41,0	2,4	6,3	60	314,1	0,1	4,9	0,2
<i>L. plantarum</i> BIL	4,8 . 10 ⁶	27,3	15,6	3,8	205	258,0	13,5	2,0	0,7
<i>L. pentosum</i>	1,7 . 10 ⁶	21,7	18,6	3,8	192	237,0	14,7	0,9	1,1
<i>L. acidophilus</i> CCM 2913	3,5 . 10 ⁵	23,6	17,2	3,6	162	245,6	14,8	1,0	0,9
čerstvá kapusta ²		43,8	2,1	6,3	40	363,7	0,2	4,7	0,1
<i>L. plantarum</i> 190	1,2 . 10 ⁶	16,1	13,6	3,8	250	24,4	10,2	2,5	4,6
<i>L. plantarum</i> 195	3,2 . 10 ⁵	17,9	15,9	3,6	272	25,5	13,3	1,8	3,1

<i>L. delbrueckii</i> 238	$2,5 \cdot 10^4$	14,4	15,6	3,7	245	104,4	13,4	2,2	1,6
čerstvá kapusta ²		38,8	2,4	6,0	45	259,5	0,6	4,0	0,0
<i>L. plantarum</i> 181	$3,0 \cdot 10^5$	11,4	13,8	3,4	198	83,5	15,4	2,4	0,5
<i>L. plantarum</i> 187	$1,6 \cdot 10^6$	11,5	13,0	3,4	213	86,5	16,5	1,9	0,5
<i>L. plantarum</i> 192	$1,9 \cdot 10^6$	12,4	12,5	3,7	277	24,5	11,2	2,0	5,2
<i>L. plantarum</i> 976	$4,0 \cdot 10^5$	9,4	16,6	3,3	153	81,0	16,6	2,7	0,4
<i>L. plantarum</i> CCM 551	$2,6 \cdot 10^5$	8,9	17,1	3,3	186	86,0	16,0	0,7	0,6

1 - sample, 2 - fresh cabbage, 3 - lactic bacteria, 4 - saccharides, 5 - acids, 6 - pH, 7 - ammonia, 8 - nitrates, 9 - lactic acid, 10 - citric acid, 11 - acetic acid.

Tabuľka 2. Stanovené parametre v zmesi kapustovej a mrkvovej šťavy (2:1) a po 7 dňoch fermentácie rôznymi kmeňmi z rodu *Lactobacillus*.
Table 2. Determined parameters in mixture of cabbage and carrot juice (2:1) and after 7-day fermentation by various strains of *Lactobacillus* gene.

VZORKA ¹	mliečne baktérie ³	cukry ⁴	kyseliny ⁵	pH ⁶	dusičnany ⁷	kyseliny [g/kg]			k. askorbová ¹¹
	[CFU/g]	[g/kg]	[g/kg]		[mg/kg]	mliečna ⁸	citrónová ⁹	octová ¹⁰	[mg/kg]
čerstvá vzorka ²		47,1	1,8	6,0	162,0	1,1	4,5	0,1	30,8
<i>L. plantarum</i> 178	$1,1 \cdot 10^4$	33,7	12,5	3,8	142,4	18,0	2,5	0,4	20,0
<i>L. plantarum</i> 186	$2,4 \cdot 10^4$	33,3	14,1	3,7	161,0	19,0	1,9	0,4	17,8
<i>L. plantarum</i> 189	$2,1 \cdot 10^4$	34,0	12,6	3,8	63,5	16,1	2,1	0,4	16,6
čerstvá vzorka ²		61,6	2,6	6,0	415,0	0,4	6,0	0,2	24,1
<i>L. casei</i> 598	$9,7 \cdot 10^5$	44,2	15,2	3,5	216,5	18,3	1,8	0,3	17,1
<i>L. lactis</i> 447	$1,3 \cdot 10^6$	46,5	15,0	4,1	367,3	16,1	1,6	0,5	11,3
<i>L. helveticus</i> CCM 3826	$1,9 \cdot 10^6$	45,1	15,8	3,7	413,3	16,9	1,6	0,3	17,5
čerstvá vzorka ²		64,5	1,7	5,5	230,0	0,3	5,7	0,2	24,5
<i>L. plantarum</i> BIL	$2,5 \cdot 10^6$	51,3	12,7	4,0	77,9	19,0	2,6	0,5	18,3
<i>L. pentosus</i>	$9,0 \cdot 10^5$	39,9	13,1	3,9	77,1	19,8	1,3	0,6	16,7
<i>L. acidophilus</i> CCM 2913	$1,8 \cdot 10^5$	49,9	14,3	3,9	90,2	18,9	2,5	0,5	17,9
čerstvá vzorka ²		52,2	1,9	5,4	299,2	0,3	4,8	0,2	22,8
<i>L. plantarum</i> 190	$6,3 \cdot 10^5$	32,1	10,8	3,6	19,7	10,0	1,8	2,3	7,4
<i>L. delbrueckii</i> 237	$1,0 \cdot 10^4$	34,3	11,1	3,6	9,2	9,9	1,2	2,3	9,7

nú šťavu zo zmesi kapustovej a mrkvovej šťavy tiamíndichloridom, prakticky na úroveň ATP pôdy a súčasne upravili koncentráciu kyseliny askorbovej na priemernú hodnotu jej obsahu v hlávkovej bielej kapuste. Inokulum jednotlivých mikroorganizmov sme pridávali v porovnateľných množstvách s pokusmi s kapustou. Opätovne pre vhodnú skupinu mikroorganizmov, hlavne pre tie, s ktorými sme dosiahli pri mliečnej fermentácii kapusty najlepšie výsledky, sme volili viacero rozdielných prídavkov mikroorganizmov. Príklad dosiahnutých výsledkov sledovania fermentácie vzoriek pripravených z kapustovej a mrkvovej šťavy je uvedený v tabuľke 2. Na základe oboch pokusov a porovnania dosiahnutých výsledkov bola vybraná skupina mikroorganizmov s požadovanými vlastnosťami. Následne sme fermentované vzorky hodnotili senzoricky a potom vybrali tri kmene *L. plántarum* 189 a 190 a *L. delbrückii* 237. Ukázalo sa, že sa s nimi dosahujú dlhodobejšie porovnateľné výsledky, pričom získané produkty sú senzoricky prijateľné, vhodné na priamu konzumáciu, prípadne predstavujú vhodné východisko pre sortiment mliečne fermentovaných nápojov. Zaujímavý je poznatok, že sa dosahuje rôzna rýchlosť poklesu dusičnanov sprevádzaná rozdielnym prírastkom dusitanov v analyzovaných vzorkách počas fermentácie. Dynamika tohoto procesu je predmetom nášho pozorovania [8]. Najneskoršie po 10 dňoch fermentácie je však prítomnosť dusitanov na úrovni pôvodnej suroviny, t.j. na hranici stanoviteľnosti danou metódou.

Ukázalo sa, že koncipovanie práce na základe opakovania pokusov s jednotlivými sledovanými kmeňmi zo zbierok a vlastnými kmeňmi a následného rámcového výberu vhodných kmeňov na mliečnu fermentáciu vybraných druhov zeleniny je schodnou cestou. Dá sa očakávať, že pri dostatku živín a rastových faktorov bude možné kmene využívať pre riadenú fermentáciu s vopred kladenými nárokmi na konečný produkt.

Literatúra

1. ANDERSON, R.E.: Nitrate reduction during fermentation by Gram-negative bacterial activity in carrots. Int. J. Food Microbiol. 2, 1985, s. 219-225.
2. ANDERSON, R.E. - ERIKSOON, C.E. - SALOMONSON, B.A-Ch. - THEANDER, O.: Lactic acid fermentation of Fresh and stored carrot: Chemical, Microbial and sensory

- evaluation of products. *Lebensm.- Wiss. u.- Technol.* 23, 1990, s. 34-40.
3. BUCKENHÜSKES, H. - GIERSCHNER, K.: Charakterisierung von laktofermentierten Gemüsesäften aus dem Handel. *Flüssiges Obst* 54, 1990, s. 73-81.
 4. BUCKENHÜSKES, H. - GESSLER, A. - GIERSCHER, K.: Abhängigkeit der Sauerkrautqualität von der Güte des Dosenmaterials. *Ind. Obst. u.- Gemüseverw.* 73, 1988, s. 360-365.
 5. DAVÍDEK, J. - HRDLÍČKA, J. - KARVÁNEK, M. - POKORNÝ, J. - SEIFERT, J. - VELÍŠEK, J.: Laboratorní příručka analýzy potravin. 1 vyd., SNTL, Praha 1977, s. 240-241, 392-393, 335-338, 184-185.
 6. ETTER, R. - DIETRICH, S. - BATTAGLIA, R.: Bestimmung von biogenen Aminen in Lebensmitteln. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 81, 1990, s. 106-119.
 7. GIERSCHNER, K. - HAMMES, W.P.: Mikrobiologische Nitratentfernung aus Gemüsesäften, bzw. Gemüseflüssigprodukten. *Flüssiges Obst* 58, 1991, s. 236-239.
 8. HYBENOVÁ, E. - DRDÁK, M.: Assortment of appropriate pure strains for lactic acid fermentation of vegetables. *Z. Lebensm.- Wiss. u.- Technol.* (in press).
 9. KAROVIČOVÁ, J. - POLONSKÝ, J. - DRDÁK, M. - ŠIMKO, P. - VOLLEK, V.: Capillary isotachophoresis of organic acids produced by selected microorganisms during lactic acid fermentation. *J. Chromatogr.* 638, 1993, s. 241-246.
 10. LIEPE, H.U. - JUNKER, M.: Startenkulturen - Verwendung bei Gemüsesäften. *Ind. Obst. u. Gemüseverw.* 68, 1983, s. 319-321.
 11. LIEPE, H.U. - JUNKER, M.: Herstellung von milchsauren Gemüsesäften mit Bakterien-Reinkulturen. *Lebensmittel- Technol.* 17, 1984, s. 2-6.
 12. LIEPE, H.U.: Milchsaure Gemüsesäfte mit Starten- kulturen. *Flüssiges Obst* 54, 1987, s. 380 - 381.
 13. RAJNIAKOVÁ, A. - DRDÁK, M.: Flow injection determination of nitrate and nitrite in plant material. In.: 9th Int. Symp. Adv. and Appl. Chrom. in Industry, Bratislava 1993, s. 67-68.

Do redakcie došlo 24.6.1994.

Selection of *Lactobacillus* sp. strains for lactic fermentation of vegetables

Summary

16 strains of *Lactobacillus* were tested on white cabbage samples and on the sterilized cabbage and carrot juice mixture. After the end of fermentation at 27 °C or 30 °C, reducing sugars, global titration acidity, pH value, lactic acid, citric and acetic acid, ammonia, biogenic amines, nitrates and nitrites were determined. On the basis of these criteria and sensory suitability, 3 strains that reduced concentration of nitrates in samples to the required level were selected.