

Izolácia a charakterizácia kmeňov baktérií pre mliečne kvasenie zeleniny

TOMÁŠ KUČHTA - LUDOVÍT POLÍVKA

Súhrn. Z prirodzene kvasenej zeleniny (kapusta, uhorky) sa izoloval väčší počet kmeňov baktérií mliečného kvasenia, z ktorých sa 6 bližšie charakterizoval. Ide o 3 rôzne kmene *Lactobacillus plantarum*, a o kmene *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pentosus* a *Pediococcus parvulus*. Kmene rastú dynamicky na zeleninovom substráte a v komplexnej pôde MRS, pričom produkujú zmes izomérov kyseliny mliečnej. Jeden z kmeňov *L. plantarum* produkuje diacetyl. Žiaden z kmeňov neredukuje dusičnany na dusitany. Kmene sa úspešne použili na prípravu mliečne kvasených zeleninových šalátov.

Konzervovanie zeleniny mliečnym kvasením je účinná konzervačná metóda, ktorej produktom sú kvasené potraviny s výbornými organoleptickými vlastnosťami, pozitívnym vplyvom na zdravie konzumenta, dobrou údržnosťou a nízkou cenou. Pre mliečne kvasené zeleninové výrobky je charakteristický obsah kyseliny mliečnej so súčasne zníženým obsahom sacharidov, a tiež obsah živých baktérií mliečného kvasenia. Priaznivé zdravotné účinky má jednak kyselina L-mliečna, a tiež baktérie mliečného kvasenia, ktoré sú schopné kolonizovať tráviaci trakt konzumenta a eliminovať prípadnú nežiadúcu mikroflóru [1].

Okrem kvasenej kapusty a uhoriek, ktorých konzervovanie mliečnym kvasením má u nás tradíciu, rozšírilo sa v poslednom čase spektrum druhov zeleniny experimentálne konzervovaných týmto spôsobom [2-5]. Ide pre-

RNDr. Tomáš Kuchta, CSc., Výskumný ústav potravinársky, pracovisko Modra, Štefánikova 45, 900 01 Modra., Doc.Ing. Ludovít Polívka, CSc., GFP s.r.o., Výskumné a analytické laboratóriá, Na Pántoch 20, 835 21 Bratislava.

dovšetkým o prípravu mliečne kvasených zeleninových šalátov na báze červenej repy, zeleru, karfiolu, cibule, strukovín a pod. Uvedené substráty sú kvasené s použitím špeciálnych štartovacích kultúr baktérií mliečného kvasenia, ktoré zabezpečujú požadovanú kvalitu produktu. Najčastejšie sa používajú kmene z rodov *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Leuconostoc*.

Vzhľadom na vzrastajúci záujem o konzervovanie zeleniny mliečnym kvasením, sa izolovali nové kmene baktérií mliečného kvasenia, ktoré by mohli byť použité ako štartovacie kultúry pri príprave kvasených zeleninových šalátov. Práca sa sústreďuje na izoláciu kmeňov baktérií mliečného kvasenia z prirodzene kvasenej zeleniny a na ich charakterizáciu. Preukázala sa tiež ich praktická použiteľnosť na prípravu kvasených zeleninových šalátov.

Materiál a metódy

Kultúry sa izolovali zo spontánne kvasenej zeleniny (kapusta, uhorky) na pôdach MRS [6] a podľa Rogosu [7].

Identifikáciu vybraných kultúr vykonalí pracovníci Zbierky mikroorganizmov Masarykovej Univerzity v Brne.

Izolované kmene sme očkovali na hustotu 10^6 buniek.ml⁻¹ a kultivovali v pôde MRS pri teplote 30°C za miešania na rotačnej trepačke (frekvencia miešania 2 Hz). Z kultúr sa v hodinových intervaloch odoberali vzorky na meranie absorbancie a pH. Rastové rýchlosti sa vypočítali zo závislosti $\log_2 A_{560} = f(t)$ lineárnou regresiou pomocou programu GraphPad (ISI, USA). Korelačné koeficienty boli väčšie ako 0,995.

Vzorky pre stanovenie organických kyselín sa odoberali z kultúr v stacionárnej fáze po 24-hodinovej kultivácii. Biomasa sa odstredila a supernatant sa zahrial vo vodnom kúpeli na 80°C 15 min. Analýza produkovaných organických kyselín sa vykonala izotachforeticky na prístroji ZKI 001 s vodivostným detektorom (ÚRVJT, Spišská Nová Ves), v predseparačnej kolóne pri prúde 45 μ A, s nasledujúcim elektrolytickým systémom: vodiaci elektrolyt 10 mM HCl, protiión 5 mM kyselina 6-aminokaprónová, aditívum 0,1 % metylhydroxyetylcelulóza, zakončujúci elektrolyt 5 mM kyselina kaprónová, 5 mM histidín, pH 4,5. Pomer L- a D-izomérov kyseliny mliečnej sa stanovil reakciami špecificky katalyzovanými L-laktátdehydrogenázou a D-laktátdehydrogenázou pomocou súpravy na stanovenie kyse-

liny L-mliečnej a D-mliečnej v potravinách (Boehringer, Mannheim, Nemecko). Súčty hodnôt stanovených pre oba izoméry enzýmovo boli spravidla o 5 až 10 % nižšie ako hodnoty, stanovené izotachoforeticky.

Vzorky pre zistenie prítomnosti diacetylu sa odoberali z kultúr v neskorej exponenciálnej fáze a prítomnosť diacetylu sa kvalitatívne určili kreatínovou metódou podľa Kruiera [8].

Pre zistenie redukcie dusičnanov sme kultúry kmeňov kultivovali do stacionárnej fázy (24 h) za miešania (2 Hz) pri 30°C v dusičnanevej pôde, ktorá obsahovala (g.l⁻¹): glukóza 20, baktepeptón (Sevac) 10, kvasničný extrakt (Serva) 5, Tween 80 (Serva) 2, KNO₃ 1,5, KH₂PO₄ 1, MgSO₄·7 H₂O 0,2. Biomasa sa odstredila a v supernatante sa prítomnosť dusitanov kvalitatívne určila pomocou Gries-Ilosvayovho činidla [9].

Pre prípravu kvasených zeleninových šalátov sa použila čerstvá zelenina, a to biela a červená kapusta, tekvica, patizóny, zeler a mrkva. Ďalej sa použila červená repa varená 2 h. Zelenina, najemno nastrúhaná (kapusta) alebo nakrájaná na kocky približne 1 x 1 x 1 cm (ostatná zelenina), sa naplnila do zaváracích pohárov a zaliala suspenziami (pribl. 2 x 10⁷ buniek.ml⁻¹) jednotlivých kmeňov v 2 % NaCl. Šaláty sa inkubovali 4 až 10 dní pri 30°C.

Výsledky a diskusia

Zo spontánne kvasenej zeleniny sa izolovalo 47, väčšinou zmesných kultúr. Z nich sa zriedľovacou metódou izolovali jednotlivé kmene. Spomedzi izolovaných kmeňov sa vybralo 6 reprezentatívnych kmeňov.

Kmeň *Lactobacillus plantarum* uhl_{1m} bol izolovaný z nálevu kvasených uhoriek. Sú to grampozitívne paličky, vyskytujúce sa v palisádach. Na MRS tvorí guľaté, hladké, mliečne biele, pololesklé, vypuklé kolónie o veľkosti 1 až 2 mm v priemere, so súvislým okrajom. Rastie pri 15°C, nerastie pri 45°C. Je homofermentatívny. Fermentačný profil kmeňa, spolu s ďalšími, uvádza tab.1.

Kmeň *Lactobacillus brevis* uhl_{1w} bol izolovaný z nálevu kvasených uhoriek. Sú to grampozitívne paličky, vyskytujúce sa v palisádach, jednotlivé alebo v nepravidelných zhlukoch. Na MRS tvorí guľaté, hladké, jasno-biele, lesklé, vypuklé kolónie o veľkosti okolo 1 mm v priemere, so súvislým okrajom. Rastie pri 15°C, nerastie pri 45°C. Je heterofermentatívny.

Tabuľka 1. Fermentačné vlastnosti kmeňov *L.plantarum* uh1m, *L.brevis* uh1w, *L.plantarum* uh1y, *L.plantarum* uhs16i, *L.pentosus* ka19w a *P.parvulus* kap3i.
 Table 1. Fermentation profiles of strains *L.plantarum* uh1m, *L.brevis* uh1w, *L.plantarum* uh1y, *L.plantarum* uhs16i, *L.pentosus* ka19w and *P.parvulus* kap3i.

	uh1m	uh1w	uh1y	uhs16i	ka19w	kap3i
D-glukóza	+	+	+	+	+	+
glukonát	+	+	+	+	+	-
D-fruktóza	+	+	+	+	N	+
L-sorbóza	-	-	-	-	N	-
D-fukóza	-	-	-	-	N	-
L-fukóza	-	-	-	-	N	-
D-tagatóza	-	-	-	-	N	-
ribóza	+	+	+	+	+	-
galaktóza	+	+	+	+	+	+
D-manóza	+	-	+	+	+	+
D-xylóza	-	+	-	-	+	-
L-xylóza	-	-	-	-	N	-
D-arabinóza	-	-	-	-	N	-
L-arabinóza	+	+	-	-	-	-
D-lyxóza	-	-	-	-	N	-
ramnóza	-	-	-	-	N	-
maltóza	+	+	+	+	+	+
laktóza	+	+	+	+	+	-
sacharóza	+	-	+	+	+	-
trehalóza	+	-	+	+	+	+
melibióza	-	+	+	+	N	-
melezitóza	+	-	+	+	+	-
D-turanóza	+	-	-	-	N	-
celobióza	+	-	+	+	+	+
β-gentobióza	+	-	+	+	N	+
D-rafinóza	-	-	-	+	+	-
glycerol	-	-	-	-	-	-
manitol	+	-	+	+	+	-
sorbitol	+	-	+	-	N	-
erytritol	-	-	-	-	N	-
adonitol	-	-	-	-	N	-
dulcitol	-	-	-	-	N	-

Tabuľka 1. - pokračovanie
Table 1. - continued

	uhl1m	uhl1w	uhl1y	uhs16i	kal9w	kap3i
inozitol	-	-	-	-	N	-
xylitol	-	-	-	-	N	-
D-arabitol	-	-	-	-	N	-
L-arabitol	-	-	-	-	N	-
N-acetylglukózamín	+	-	+	+	N	+
α -metyl-D-glukozid	-	-	-	-	N	-
α -metyl-D-manozid	-	-	-	-	N	-
β -metylxylozid	-	-	-	-	N	-
inulín	-	-	-	-	N	-
glykogén	-	-	-	-	N	-
amygdalín	+	-	+	+	N	+
arbutín	+	-	+	+	N	-
salicín	+	-	+	+	N	+
2-ketoglukonát	-	-	-	-	N	-
5-ketoglukonát	-	+	-	-	N	-

+ tvorba kyseliny z daného substrátu,

- kmeň kyselinu z daného substrátu netvorí,

N nestanovené.

+ acid formation from the given substrate,

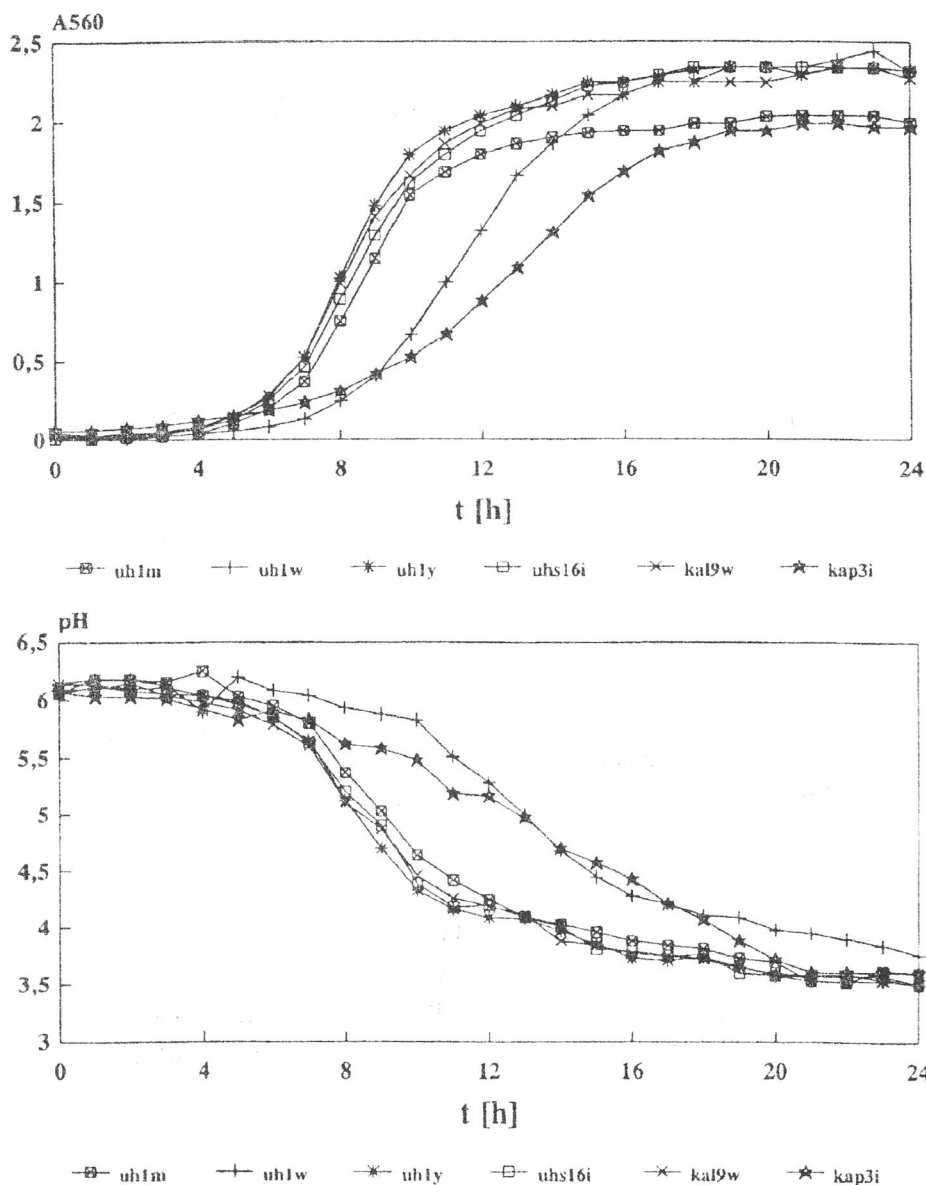
- acid is not formed from the given substrate,

N not determined.

Kmeň *Lactobacillus plantarum* uhl1y bol izolovaný z nálevu kvasených uhoriek. Sú to grampozitívne paličky, vyskytujúce sa vo dvojiciach alebo palisádach. Na MRS tvorí guľaté, hladké, mliečne biele, lesklé, vypuklé kolónie o veľkosti 1 až 2 mm v priemere, so súvislým okrajom. Rastie pri 15°C, nerastie pri 45°C. Je homofermentatívny.

Kmeň *Lactobacillus plantarum* uhs16i bol izolovaný z nálevu kvasených uhoriek s vyššou koncentráciou NaCl. Sú to grampozitívne paličky, vyskytujúce sa vo dvojiciach alebo palisádach. Na MRS tvorí guľaté, hladké, mliečne biele, lesklé, vypuklé kolónie veľkosti 1 až 2 mm v priemere, so súvislým okrajom. Rastie pri 15°C, nerastie pri 45°C. Je homofermentatívny.

Kmeň *Lactobacillus pentosus* kal9w bol izolovaný z kvasenej kapusty. Sú to grampozitívne paličky, vyskytujúce sa vo dvojiciach, zhľukoch a krátkych palisádach. Na MRS tvorí guľaté, hladké, jasnobiele, lesklé, mierne



Obr.1. Rast kultúr kmeňov *L.plantarum* uhl_m, *L.brevis* uhl_w, *L.plantarum* uhl_y, *L.plantarum* uhs16_i, *L.pentosus* kal9_w a *P.parvulus* kap3_i (a) a zodpovedajúci pokles pH (b) v médiu MRS pri 30°C.

Fig.1. Culture growth of strains *L.plantarum* uhl_m, *L.brevis* uhl_w, *L.plantarum* uhl_y, *L.plantarum* uhs16_i, *L.pentosus* kal9_w and *P.parvulus* kap3_i (a) and corresponding fall in pH (b) in MRS medium at 30°C.

vypuklé, mukózne kolónie o veľkosti okolo 2 mm v priemere, so súvislým okrajom. Rastie pri 15°C, nerastie pri 45°C. Je homofermentatívny.

Kmeň *Pediococcus parvulus* kap3i bol izolovaný z kvasenej kapusty. Sú to grampozitívne koky, vyskytujúce sa po dvoch alebo po štyroch. Na MRS tvorí guľaté, hladké, jasnobiele, lesklé, mierne vypuklé kolónie o veľkosti 0,5 mm v priemere, so súvislým okrajom. Rastie pri 15°C a 35°C, nerastie pri 37°C a 45°C. Rastie na MRS so 4 % a 6,5 % NaCl. Je homofermentatívny.

Kultúry izolovaných kmeňov z rodu *Lactobacillus* rástli dynamicky v médiu MRS za miešania pri 30°C a rýchlo okysľovali médium (obr.1). Najaktívnejšie sa javia *L.plantarum* uhlý, uhs16i a uhlm, a tiež *L.pentosus* ka19w. Zdanlivo nižšia konečná hustota kultúry *L.plantarum* uhlm v stacionárnej fáze súvisí s typickou vločkovitou konzistenciou biomasy tohoto kmeňa. Kultúry *L.brevis* uhlw rástli o niečo pomalšie a mali tiež dlhšiu lag-fázu. Pomerne pomaly rástli v pôde MRS kultúry *P.parvulus* kap3i. Tento fakt však zrejme súvisí s nevhodnosťou pôdy MRS pre kultiváciu tohoto kmeňa, nakoľko v kapustnej šťave sterilizovanej mikrofiltráciou rástli kultúry *P.parvulus* kap3i veľmi dynamicky ($\mu > 1 \text{ h}^{-1}$).

Optimálna kultivačná teplota pre všetky kmene bola 30°C. Vychádzajúc z predpokladu, že z ekonomických dôvodov budú kmene v praxi používané na kvasenie zeleniny pri nižších teplotách, porovnala sa dynamika rastu kultúr pri optimálnej teplote miestnosti (tab.2). Dynamika rastu kultúr je i pri teplote miestnosti veľmi dobrá.

Pre praktické použitie kmeňov je dôležitá aj ich tolerancia voči NaCl v koncentráciách, používaných pri kvasení zeleniny. Prídavok 2 % NaCl do pôdy MRS nemal negatívny vplyv na dynamiku rastu žiadneho zo študovaných kmeňov.

Pri kultivácii v pôde MRS sa sledovala produkcia organických kyselín. Študované kmene produkovali kyselinu mliečnu, a heterofermentatívny kmeň *L.brevis* uhlw tiež kyselinu octovú. L-Izomér kyseliny mliečnej produkoval kmene v množstve 3,9 až 5,7 g.l⁻¹ (tab.3). Z hľadiska podielu L-izoméru na produkovanej kyseline mliečnej sú najvýhodnejšie kmene *L.brevis* uhlw a *P.parvulus* kap3i.

Niektoré kmene baktérií mliečneho kvasenia sú známe produkciou vonnej látky diacetylu, ktorej prítomnosť pri kvasení zeleniny je však problematická. Kvalitatívny test na produkciu diacetylu ukázal, že túto látku v pôde MRS produkuje kmeň *L.plantarum* uhs16i, kým ostatné študované kmene diacetyl neprodukujú.

Tabuľka 2. Dynamika rastu kultúr kmeňov *L.plantarum* uh1m, *L.brevis* uh1w, *L.plantarum* uh1y, *L.plantarum* uhs16i, *L.pentosus* ka19w a *P.parvulus* kap3i v médiu MRS pri optimálnej teplote a teplote miestnosti.

Table 2. Culture growth of strains *L.plantarum* uh1m, *L.brevis* uh1w, *L.plantarum* uh1y, *L.plantarum* uhs16i, *L.pentosus* ka19w and *P.parvulus* kap3i in MRS medium at optimal and room temperatures, respectively.

Kmeň ¹	μ [h ⁻¹]	
	30°C	23°C
uh1m	0,97	0,53
uh1w	0,78	0,49
uh1y	0,93	0,54
uhs16i	0,96	0,56
ka19w	0,92	0,52
kap3i	0,37	0,32

1 - Strain.

Tabuľka 3. Organické kyseliny tvorené v kultivačnom médiu MRS kmeňmi *L.plantarum* uh1m, *L.brevis* uh1w, *L.plantarum* uh1y, *L.plantarum* uhs16i, *L.pentosus* ka19w a *P.parvulus* kap3i.

Table 3. Organic acids formed in MRS medium by strains *L.plantarum* uh1m, *L.brevis* uh1w, *L.plantarum* uh1y, *L.plantarum* uhs16i, *L.pentosus* ka19w and *P.parvulus* kap3i.

Kmeň ¹	DL-HLac ² [g.l ⁻¹]	% L / % D ³	HAc ⁴ [g.l ⁻¹]
uh1m	15,1	38/62	stopy ⁵
uh1w	11,8	56/44	5,5
uh1y	17,2	29/71	stopy
uhs16i	17,1	30/70	stopy
ka19w	15,9	31/69	stopy
kap3i	12,8	45/55	stopy

2 - Kyselina mliečna, stanovená izotachoforeticky, 3 - pomer L- a D-izomérov kyseliny mliečnej, stanovený enzýmovo, 4 - kyselina octová, stanovená izotachoforeticky.

1 - Strain, 2 - Lactic acid as determined by isotachopheresis, 3 - L-Lactic acid : D-lactic acid ratio, as determined enzymatically, 4 - acetic acid as determined by isotachopheresis, 5 - traces.

Zelenina, použitá ako substrát pre kvasenie, môže obsahovať určité množstvá dusičnanov. Preto je dôležité, aby kmene, určené na jej kvasenie, neredukovali dusičnany na hygienicky neprípustné dusitany. Kvalitatívny test v komplexnom médiu obsahujúcom dusičnan ukázal, že žiadny zo študovaných kmeňov neredukuje dusičnany na dusitany.

Uvedené kmene sa úspešne použili na kvasenie zeleniny. Najlepšie organoleptické vlastnosti pripravených mliečne kvasených zeleninových šalátov sa dosiahli použitím kmeňov *P.parvulus* kap3i, *L.pentosus* kal9w a *L.plantarum* uh1y. Ako najlepší substrát sa ukázali tekvica a patizón. Pripravené šaláty preukázali trvanlivosť 6 mesiacov pri teplote miestnosti.

PodĎakovanie

Autori ďakujú pracovníkom VÚP Ing. B.Glončákovej, Ing. J.Koreňovej a RNDr. Z.Samekovi za konzultácie, L.Peškovej za izotachoforetické stanovenie organických kyselín a A.Belicovej, A.Jančovičovej a J.Lopašovskej za technickú pomoc.

Literatúra

1. GILLILAND, S.E.: FEMS Microbiol. Rev., 87, 1990, s.175.
2. BUCKENHÜSKES, H. - SCHMIDT, E. - GIER SCHNER, K.: Ind. Obst Gemüseverwert, 69, 1984, s.367.
3. BUCKENHÜSKES, H. - GIER SCHNER, K.: Ind. Obst Gemüseverwert, 72, 1987, s.455.
4. BUCKENHÜSKES, H.: Food Biotechnol., 4, 1990, s.475-476.
5. KAROVICHOVÁ, J. - DRDÁK, M. - POLONSKÝ, J. - ČANIGOVÁ, M.: Bulletin PV, 3/1, 1992, s.269.
6. DE MAN, J.D. - ROGOSA, M. - SHARPE, M.E.: J. Appl. Bacteriol., 23, 1960, s.130.
7. ROGOSA, M. - MITCHELL, J.A. - WISEMAN, R.F.: J. Bacteriol., 62, 1951, s.132.
8. TEPLÝ, M. - ČERMÍNOVÁ, N. - DĚDEK, M. - HYL MAR, B. - PETERKOVÁ, L. - POKORNÁ, L. - URNEROVÁ, M.: Čisté mlékařské kultury. Výroba, kontrola, použití. SNTL, Praha, 1984, s.175.
9. ANONYM: Microbiology Manual, Merck, Darmstadt, 1992, s.291.

Do redakcie došlo 28.7.1993.

Isolation and characterization of bacterial strains for lactic fermentation of vegetables

Summary

Several strains of lactic acid bacteria have been isolated from spontaneously fermented vegetables (sauerkraut, cucumbers). 6 strains have been characterized: 3 different strains of *Lactobacillus plantarum*, and per one of *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pentosus* and *Pediococcus parvulus*. The strains grow well on vegetable substrates and in a complex medium MRS. They produce a mixture of lactic acid isomers. One strain of *L. plantarum* produces diacetyl. None of the strains reduces nitrates to nitrites. The strains have been successfully used for lactic acid fermentation of vegetables to produce fermented salads.