



VETERINÁRNÍ UNIVERZITA BRNO

# Má využití ochranných kultur ve výrobě potravin živočišného původu význam?

Josef Kameník, Marta Dušková, Pavlína Navrátilová

# K historii záměrného používání mikrobiálních kultur při zpracování masa

## USA

- **30. a 40. léta 20. století** Jensen a Paddock: laktobacily
- 50. a 60. léta 20. století: *Pediococcus acidilactici* (Deibel): American summer sausages (>30 °C)

## Evropa

- 50. a 60. léta 20. století: *Micrococcaceae* (Niinivaara)
- **2. polovina 60. let: bakterie mléčného kvašení (BMK)**

## ČR

- v polovině 80. let salám Herkules (startovací kultura Lactil)

# Ochranné kultury (*Protective cultures*)

= **živé mikroorganismy záměrně přidávané do potravin s cílem kontroly jejich mikrobiologického stavu** (Zarzecka et al., 2022)

- **doplňkový faktor** z hlediska bezpečnosti potravin
- jejich použití by mělo podpořit správnou výrobní/hygienickou praxi
  - snížení rizika růstu nebo přežívání patogenních agens
  - snížení růstu původců kažení dané potraviny

# Ochranné vs. startovací kultury

- **startovací kultury:**
  - technologicky důležitá jejich **metabolická aktivita** (např. produkce kyselin),
  - antimikrobiální aktivity mohou představovat sekundární efekt
- pro **ochranné kultury** je to naopak

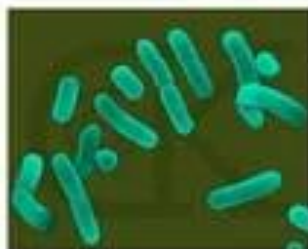
# „Ideální“ vlastnosti ochranných kultur

(Holzapfel et al., 1995)

## 1. Nulové zdravotní riziko

- bez produkce toxinů
- bez produkce biogenních aminů nebo jiných metabolitů s negativním vlivem na zdraví
- nepatogenní

### Protective cultures - are safe



#### • Lactic acid bacteria

*Lactobacillus sp.*  
*Lactococcus sp.*  
*Pediococcus sp.*  
*Carnobacterium sp.*  
*Enterococcus sp.*  
*Leuconostoc sp.*  
*Weissella sp.*  
*Vagococcus sp.*

• *Propionibacteria*

Protective cultures are:

- ✓ generally recognised as safe (GRAS)
- ✓ there is no indication of a health risk of this bacterial group
- ✓ the use of lactic acid bacteria in biological preservation might even contribute to the health benefits of a product <sup>(1)</sup>

© Holzapfel et al., 1995, Int. J. Food Microbiol. 78: 119-131

# „Ideální“ vlastnosti ochranných kultur

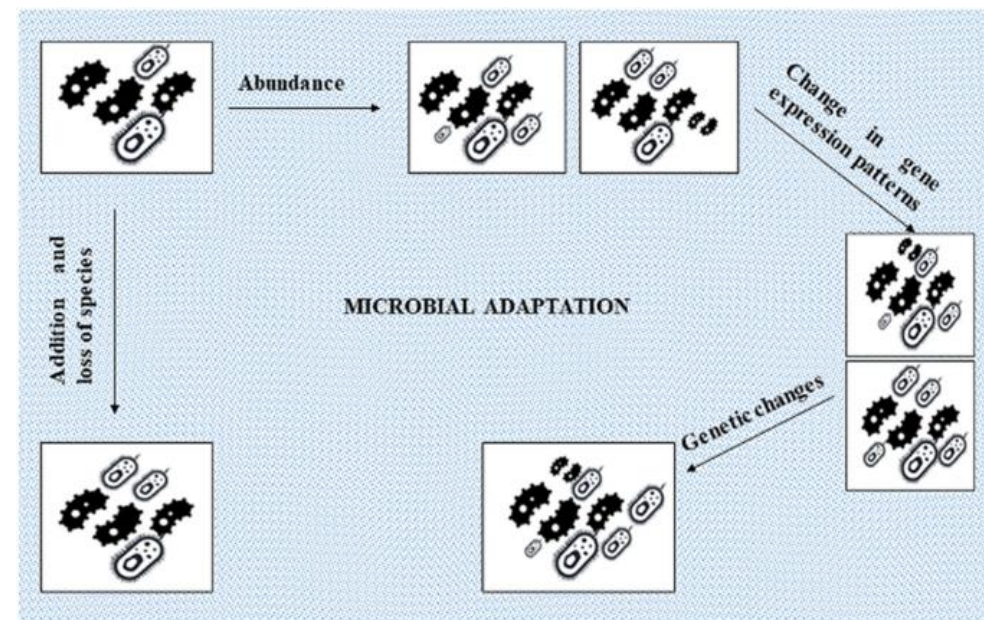
(Holzapfel et al., 1995)

## 1. Nulové zdravotní riziko

- bez produkce toxinů
- bez produkce biogenních aminů nebo jiných metabolitů s negativním vlivem na zdraví
- nepatogenní

## 2. Příznivé účinky na produkt

- adaptace na produkt/substrát



# „Ideální“ vlastnosti ochranných kultur

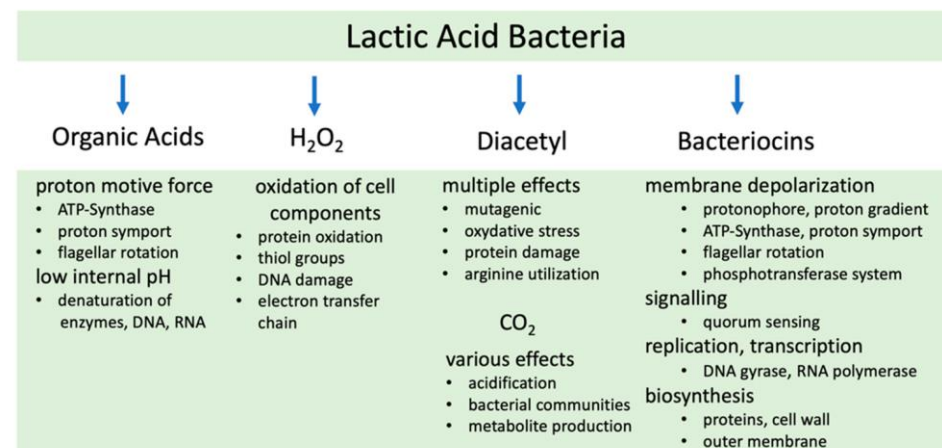
(Holzapfel et al., 1995)

## 1. Nulové zdravotní riziko

- bez produkce toxinů
- bez produkce biogenních aminů nebo jiných metabolitů s negativním vlivem na zdraví
- nepatogenní

## 2. Příznivé účinky na produkt

- adaptace na produkt/substrát
- **spolehlivost v důsledné ochranné aktivitě**



# „Ideální“ vlastnosti ochranných kultur

(Holzapfel et al., 1995)

## 1. Nulové zdravotní riziko

- bez produkce toxinů
- bez produkce biogenních aminů nebo jiných metabolitů s negativním vlivem na zdraví
- nepatogenní

## 2. Příznivé účinky na produkt

- adaptace na produkt/substrát
- spolehlivost v důsledné ochranné aktivitě
- **předvídatelná metabolická aktivita** za daných podmínek (např. produkce kyseliny mléčné /žádná tvorba plynu)



# „Ideální“ vlastnosti ochranných kultur

(Holzapfel et al., 1995)

## 1. Nulové zdravotní riziko

- bez produkce toxinů
- bez produkce biogenních aminů nebo jiných metabolitů s negativním vlivem na zdraví
- nepatogenní

## 2. Příznivé účinky na produkt

- adaptace na produkt/substrát
- spolehlivost v důsledné ochranné aktivitě
- předvídatelná metabolická aktivita za daných podmínek (např. produkce kyseliny mléčné /žádná tvorba plynu)
- **konkurenceschopnost proti autochtonní mikrobiotě**
- specifické enzymatické aktivity, např. pro maso nitrát reduktáza, kataláza

# „Ideální“ vlastnosti ochranných kultur

(Holzapfel et al., 1995)

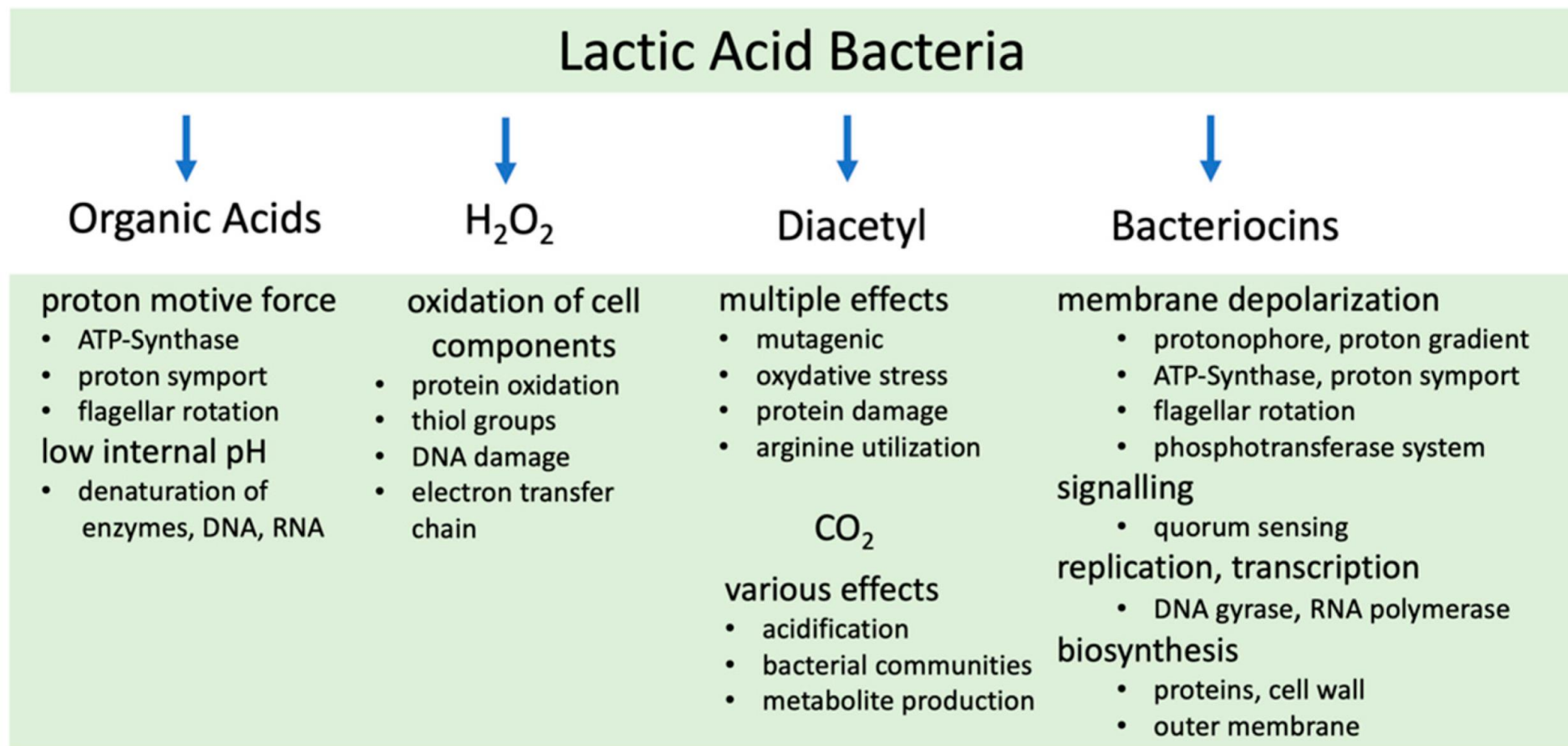
- 3. Žádný negativní (senzorický) účinek na produkt za dodržení zásad správné výrobní praxe (např. bez produkce organických kyselin, plynu, slizu ad. v závislosti na typu produktu)**

# „Ideální“ vlastnosti ochranných kultur

(Holzapfel et al., 1995)

3. Žádný negativní (senzorický) účinek na produkt za dodržení zásad správné výrobní praxe (např. bez produkce organických kyselin, plynu, slizu ad. v závislosti na typu produktu)
4. Funkce jako „indikátor“ při nedodržení doporučených podmínek

# BMK jako ochranné kultury



# Ochranné kultury k prodloužení údržnosti jehněčího masa (Xu et al., 2021)

- **6 komerčních ochranných kultur** (rozdílná kombinace *Lactobacillus sakei*, *P. pentosaceus*, *Staphylococcus carnosus*, *S. xylosus*)
- jehněčí *longissimus lumborum* (300 g/15 cm) ošetřené máčením (30 s) do suspenze  $10^7$  KTJ/ml
  - **MAP: 80 % O<sub>2</sub>/20 % CO<sub>2</sub>**; skladování 7 dnů v  $4 \pm 1$  °C
  - **VAP (99 %)**; skladování 15 dnů v  $4 \pm 1$  °C

Microbiological counts ( $\log_{10}$  CFU/cm<sup>2</sup>) of lamb backstraps with and without added protective cultures C1 to C6 before and after storage at  $4 \pm 1$  °C under different packaging systems

Sample	TVC	LAB	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Enterobacteriaceae</i>
Before storage					
Untreated	3.5 ± 0.4	3.1 ± 0.6	2.7 ± 0.2	3.1 ± 0.4	1.6 ± 0.1
Water	3.7 ± 0.3	3.6 ± 0.7	3.2 ± 0.3	3.6 ± 0.2	1.7 ± 0.2
C1	6.5 ± 0.2*	6.5 ± 0.1*	2.8 ± 0.1	3.3 ± 0.2	1.5 ± 0.1
C2	6.5 ± 0.1*	6.3 ± 0.0*	2.8 ± 0.2	3.6 ± 0.3	1.7 ± 0.1
C3	5.8 ± 0.0*	5.4 ± 0.1*	2.9 ± 0.3	3.2 ± 0.3	1.5 ± 0.0
C4	6.1 ± 0.2*	5.9 ± 0.1*	2.7 ± 0.1	3.2 ± 0.2	1.6 ± 0.0
C5	6.4 ± 0.2*	6.4 ± 0.1*	2.9 ± 0.4	3.2 ± 0.2	1.5 ± 0.0
C6	6.6 ± 0.1*	6.3 ± 0.1*	2.8 ± 0.2	3.3 ± 0.2	1.7 ± 0.1

## Ochranné kultury k prodloužení údržnosti jehněčího masa

(Xu et al., 2021)

# Ochranné kultury k prodloužení údržnosti jehněčího masa

(Xu et al., 2021)

**Table 1**

Microbiological counts ( $\log_{10}$  CFU/cm<sup>2</sup>) of lamb backstraps with and without added protective cultures C1 to C6 before and after storage at  $4 \pm 1$  °C under different packaging systems

Sample	TVC	LAB	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
After 7-day storage in MAP					
Untreated	5.3 ± 0.3	6.4 ± 1.1	5.1 ± 0.2	4.4 ± 0.6	1.9 ± 0.3
Water	5.6 ± 1.0	5.9 ± 1.4	5.3 ± 0.9	4.5 ± 0.8	2.9 ± 1.0
C1	7.2 ± 0.1*	7.4 ± 0.1	4.4 ± 0.2	3.9 ± 0.2	1.5 ± 0.0
C2	6.2 ± 0.1	6.9 ± 1.0	4.8 ± 0.2	4.2 ± 0.5	2.1 ± 0.4
C3	8.7 ± 0.1*	8.6 ± 0.1*	5.7 ± 0.5	4.6 ± 0.5	2.8 ± 0.7
C4	8.4 ± 0.1*	8.4 ± 0.2*	4.8 ± 0.4	4.3 ± 0.5	2.1 ± 0.5
C5	6.3 ± 0.2*	7.1 ± 0.8	4.5 ± 0.1	4.1 ± 0.5	1.9 ± 0.4
C6	6.4 ± 0.2*	6.9 ± 0.9	4.5 ± 0.2	3.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1

# Ochranné kultury k prodloužení údržnosti jehněčího masa

(Xu et al., 2021)

**Table 1**

Microbiological counts ( $\log_{10}$  CFU/cm<sup>2</sup>) of lamb backstraps with and without added protective cultures C1 to C6 before and after storage at  $4 \pm 1$  °C under different packaging systems

Sample	TVC	LAB	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
After 15-day storage in VP					
Untreated	6.2 ± 0.3	7.9 ± 0.5	4.0 ± 0.2	4.8 ± 0.1	4.2 ± 0.5
Water	6.2 ± 0.7	7.6 ± 0.8	4.0 ± 0.2	4.7 ± 0.3	4.1 ± 0.4
C1	7.5 ± 0.3*	7.6 ± 0.4	3.3 ± 0.5	4.3 ± 0.6	3.4 ± 0.8
C2	6.4 ± 0.1	7.9 ± 0.6	3.4 ± 0.3	4.6 ± 0.3	3.7 ± 0.5
C3	8.6 ± 0.3*	8.6 ± 0.2	3.0 ± 0.3*	3.9 ± 0.3*	3.4 ± 0.3
C4	8.0 ± 0.1*	8.2 ± 0.1	2.7 ± 0.2*	3.6 ± 0.6*	2.8 ± 0.8*
C5	6.5 ± 0.2	8.3 ± 0.7	3.3 ± 0.4	4.8 ± 0.2	3.7 ± 0.4
C6	6.6 ± 0.3	7.9 ± 0.6	4.4 ± 0.2	4.9 ± 0.5	4.3 ± 0.4



# Ochranné kultury k prodloužení údržnosti jehněčího masa

(Xu et al., 2021)

pH of lamb backstraps with and without added protective cultures C1 to C6 before and after storage at  $4 \pm 1$  °C under different packaging systems

Sample	Before storage	After 7-day storage in MAP	After 15-day storage in VP
Untreated	5.6 ± 0.1	5.6 ± 0.0	5.6 ± 0.1
Water	5.7 ± 0.1	5.6 ± 0.1	5.5 ± 0.1
C1	5.6 ± 0.0	5.5 ± 0.0	5.5 ± 0.1
C2	5.6 ± 0.1	5.5 ± 0.0	5.5 ± 0.1
C3	5.5 ± 0.0	5.6 ± 0.0	5.4 ± 0.0
C4	5.5 ± 0.1	5.5 ± 0.0	5.4 ± 0.0
C5	5.5 ± 0.1	5.5 ± 0.0	5.5 ± 0.1
C6	5.4 ± 0.0	5.6 ± 0.0	5.5 ± 0.0

*Note.* Values are expressed as mean ± standard error of the mean of three replicates. There were no statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) among samples on the same day. MAP = modified atmosphere packaging; VP = vacuum packaging; C1 to C6 are samples treated with protective cultures C1 (*Lactobacillus sakei*), C2 (*Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosus*), C3 (*L. sakei*, *Staphylococcus carnosus*, and *S. xylosus*), C4 (*S. carnosus* and *L. sakei*), C5 (*S. carnosus* and *P. pentosaceus*), and C6 (*P. pentosaceus* and *S. xylosus*).

# *Carnobacterium maltaromaticum* jako ochranná kultura? (Cavalari et al., 2020)

- V tekutém médiu (BHI bujón) dokázaly jednotlivé kmeny CM **potlačit růst *Listeria monocytogenes*** při teplotách -1 °C nebo 4 °C až o 5 log KTJ/ml,
- v 25 °C byla inhibice slabší.
- **žádný inhibiční efekt** nebyl prokázán **proti STEC O157:H7**, ani proti ***Salmonella* Typhimurium**
- potlačení růstu *L. m.* **nezpůsobily bakteriociny**, ale patrně organické kyseliny, příp. další metabolity nebo soutěžení o živiny v médiu.

# *Carnobacterium maltaromaticum* jako ochranná kultura? (Cavalari et al., 2024)

- testování ochranného vlivu stejných kmenů CM proti původcům kažení masa:
  - *Brochothrix thermosphacta* (BT)
  - *Pseudomonas fluorescens* (PF)
- Inokulace mletého hovězího masa s CM byla provedena na hladinu okolo 2,0 ( $10^2$ ) KTJ/g.
- Umělá kontaminace BT nebo PF činila přibližně 4,0 log KTJ/g.

# *Carnobacterium maltaromaticum* jako ochranná kultura? (Cavalari et al., 2020; 2024)

- zformovány burgery o váze 80 g (průměr 12 cm); modifikovaná atmosféra:
  - **66 % O<sub>2</sub>, 4 % N<sub>2</sub> a 30 % CO<sub>2</sub>**
- skladování 7 dnů (3 dny při 4 °C; 4 dny při 8 °C)
- analýzy se uskutečnily v nultý, 3. a 7. den

# *Carnobacterium maltaromaticum* jako ochranná kultura? (Cavalari et al., 2020; 2024)

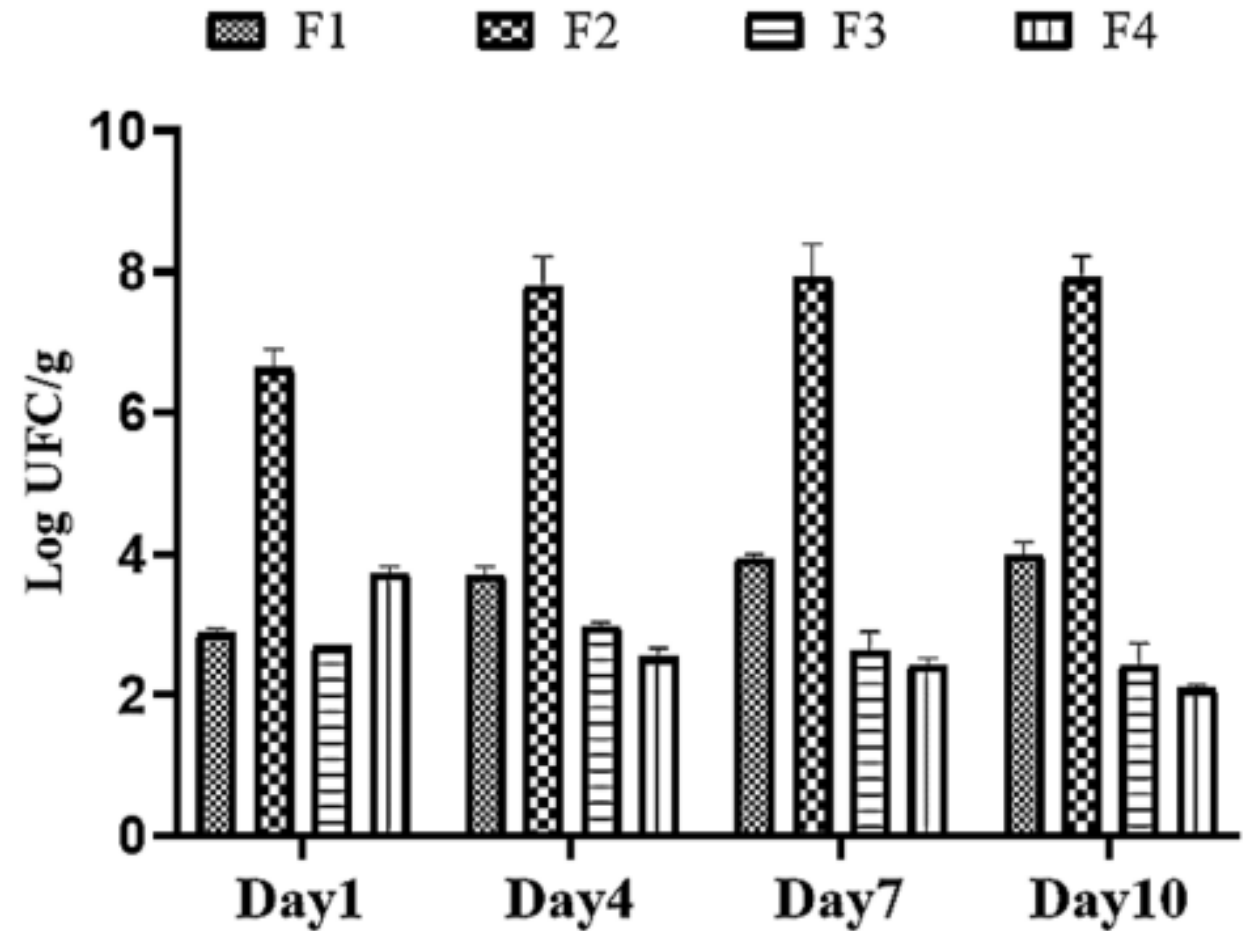
- Přítomnost CM snížila **7. den počet bakterií čeledě *Enterobacteriaceae*** oproti negativní neinokulované kontrole.
- ve vzorcích mletého masa s inokulací BT nastal nárůst během týdenního skladování **z 4 log KTJ/g na 7,2 log KTJ/g**, v případě směsi CM a BT se populace BT zvýšila **jen na 4,9 KTJ/g**.
- Při inokulaci PF nastalo zvýšení **populace PF** během skladování **o 1,4 log KTJ/g**, při směsné kultuře CM a PF **jen o 0,7 KTJ/g**.

# *Carnobacterium maltaromaticum* jako ochranná kultura? (Cavalari et al., 2020; 2024)

- ošetření bakteriemi mělo vliv na hodnoty pH
- vzorky s CM, CM+BT, CM+PF: snížení hodnot pH oproti vzorkům s jiným ošetřením ( $P < 0,05$ )
- rozdíly v hodnotách byly menší než  $< 0,3$ .
  - **neošetřené vzorky:** hodnoty pH po 7 dnech  **$5,85 \pm 0,01$**
  - vzorky s **CM:**  **$5,68 \pm 0,01$** ,
  - s BT:  $5,81 \pm 0,00$ ,
  - s **CM+BT:**  **$5,67 \pm 0,02$** ,
  - s PF:  $5,79 \pm 0,02$
  - s **CM+PF:**  **$5,56 \pm 0,05$**

# *Lactiplantibacillus plantarum* jako ochranná kultura?

(Abouloifa et al., 2023)



**Fig. 1** Survival of *Escherichia coli* in treated ground beef meat during storage at 4 °C for 10 days [Legend: (F1) ground meat without inoculation, (F2) ground meat inoculated with 5 Log CFU/g of *E. coli*, (F3) ground meat inoculated with 7 Log CFU/g of *L. plantarum* S61, (F4) ground meat inoculated with 5 Log CFU/g of *E. coli* and 7 Log CFU/g of *L. plantarum* S61]

# *Lactiplantibacillus plantarum* jako ochranná kultura?

(Di Gioia et al., 2016)

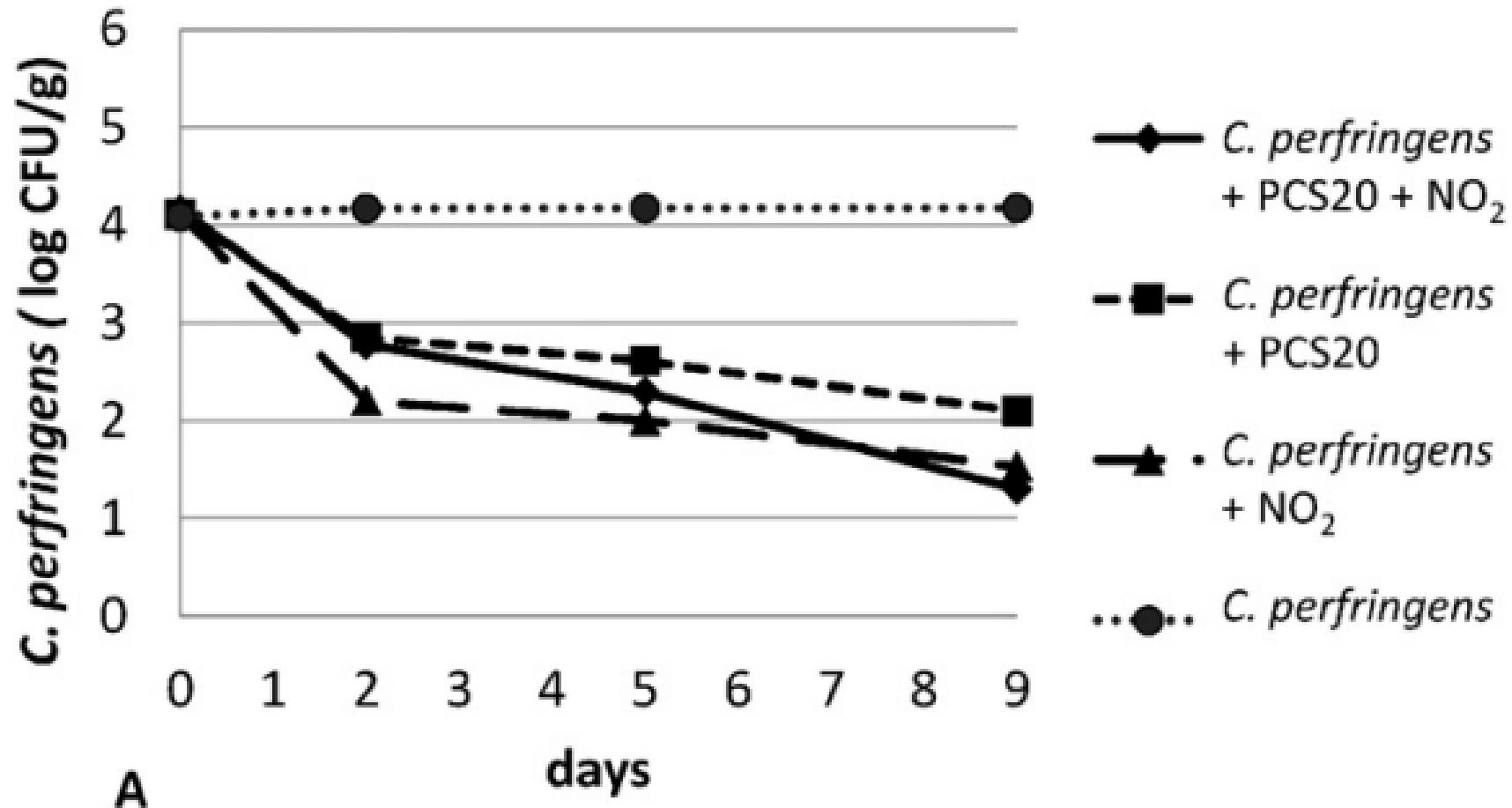


**Fig. 1.** Spot agar test showing growth inhibition of *C. perfringens* DSM 756 by *L. delbrueckii* DSM 20074 (left) and *L. plantarum* PCS20 (right) strains.



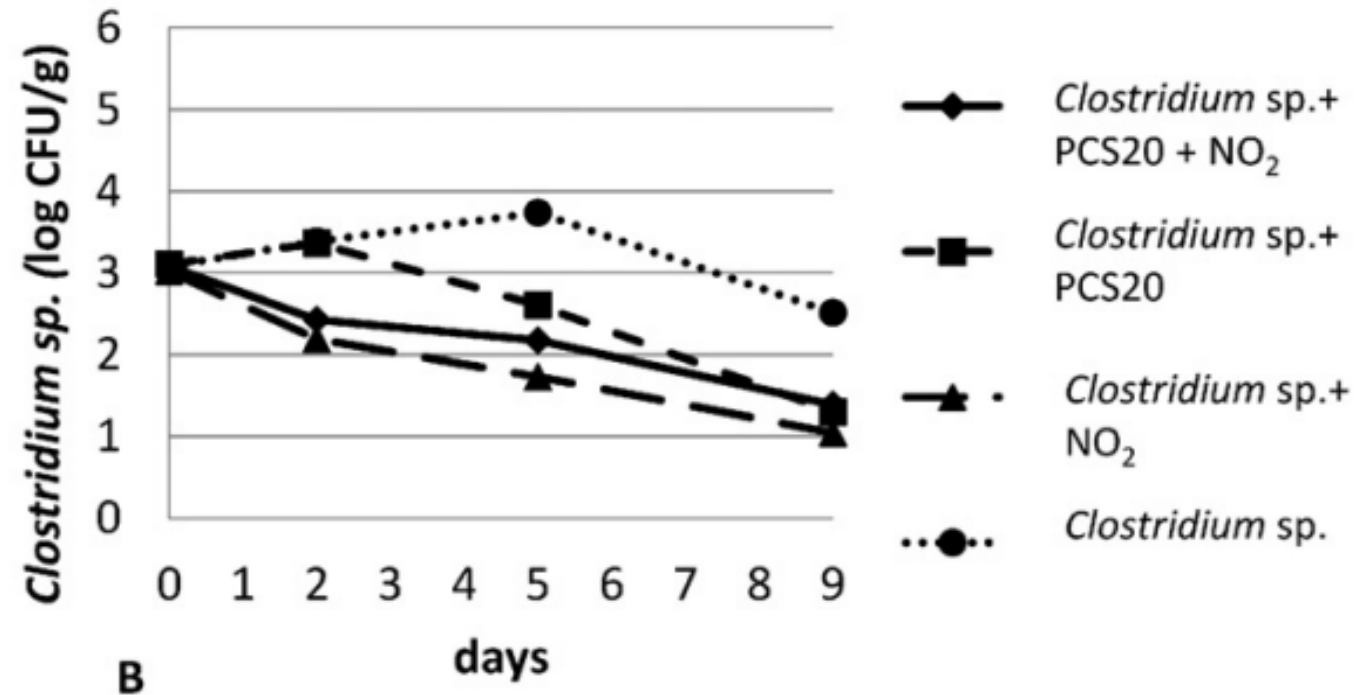
# *Lactiplantibacillus plantarum* jako ochranná kultura?

(Di Gioia et al., 2016)



# *Lactiplantibacillus plantarum* jako ochranná kultura?

(Di Gioia et al., 2016)



**Fig. 5.** *Clostridium* counts of pork ground meat challenged with *C. perfringens* DSM 756 (Fig. 5A) and with *Clostridium* sp. DSM 1985 (Fig. 5B) in the presence and absence of *L. plantarum* PCS20 and 150 mg/kg nitrite.

# Závěr

- ochranné kultury jsou nabízené jako **prostředek ke zvýšení bezpečnosti/údržnosti potravin**

# Závěr

- ochranné kultury jsou nabízené jako prostředek ke zvýšení bezpečnosti/údržnosti potravin
- jejich aplikace **nemůže kompenzovat nedostatky** v oblasti hygieny/technologie během celého výrobního a distribučního procesu

# Závěr

- ochranné kultury jsou nabízené jako prostředek ke zvýšení bezpečnosti/údržnosti potravin
- jejich aplikace nemůže kompenzovat nedostatky v oblasti hygieny/technologie během celého výrobního a distribučního procesu
- důležitá je absence/minimální aktivita enzymatických reakcí, které by mohly **ovlivnit senzorické vlastnosti finálních produktů**