

Vliv jogurtových kultur na obsah kyseliny benzoové v jogurtech*

ALENA HEJTMÁNKOVÁ, VLADIMÍR HORÁK, JANA DOLEJŠKOVÁ, FRANTIŠEK LOUDA,
HEDVIKA DRAGOUNOVÁ

Czech University of Agriculture – Faculty of Agronomy, Prague-Suchbát, Czech Republic

Abstract

HEJTMÁNKOVÁ A., HORÁK V., DOLEJŠKOVÁ J., LOUDA F., DRAGOUNOVÁ H. (2000): **Influence of yoghurt cultures on benzoic acid content in yoghurt.** Czech J. Food Sci., 18: 52–54.

Benzoic acid is not the natural metabolite in ruminants, therefore it is blocked in their gastrointestinal system in the form of benzoylglycine (hippuric acid). Change of hippuric acid into benzoic acid is realized by yoghurt cultures during yoghurt preparation. The influence of yoghurt cultures most frequented species J22, WV2, JK, T767 + T, J2, RX, JOB, WV3 and two strains MILCOM a. s. Laktoflora (used for preparation of yoghurt cultures) on benzoic acid level was tested on model yoghurts, produced from cow milk. One model of yoghurt was produced from goat milk, inoculated with yoghurt culture WV2. The levels of benzoic acid were determined by HPLC with SOP (standard operation procedure) used by the Czech Agricultural and Food Inspection. All experimental samples were prepared by the same technology and the same starting raw material and inoculated by the above 8 most frequently used yoghurt cultures. Differences between the used yoghurt cultures were found and statistically confirmed.

Key words: benzoic acid; yoghurt; yoghurt culture; strains; cow milk; goat milk; HPLC; hygienic limit

Souhrn

HEJTMÁNKOVÁ A., HORÁK V., DOLEJŠKOVÁ J., LOUDA F., DRAGOUNOVÁ H. (2000): **Vliv jogurtových kultur na obsah kyseliny benzoové v jogurtech.** Czech J. Food Sci., 18: 52–54.

Kyselina benzoová, přicházející do zažívacího traktu přežvýkavců rostlinnou potravou, není jejich přirozeným metabolitem. Musí být proto blokována mj. vazbou s glycinem za tvorby kyseliny hippurové (benzoylglycinu). Část takto vzniklé kyseliny hippurové se dostává do mléka, výchozí suroviny k přípravě kysaných mléčných produktů. Mikroorganismy (např. laktobacily, některé streptokoky aj.) v procesu fermentace mléka štěpí kyselinu hippurovou zpět v kyselinu benzoovou a glycin. Kyselina benzoová se tak stává přirozenou součástí jogurtů či jiných mléčných výrobků, připravovaných fermentací mléka vhodnými mléčnými kulturami. Byla sledována hladina kyseliny benzoové v modelových jogurtech z kravského mléka zaočkovaných směsnými mléčnými kulturami J22, WV2, JK, T767 + T, J2, RX, JOB, a WV3 a dvěma kmeny mikroorganismů MILCOM a. s. Laktoflora (*Lbc. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*) používanými k přípravě jogurtových kultur. Jeden modelový jogurt byl připraven z kozího mléka zaočkováním kulturou WV2. Na základě statistického vyhodnocení výsledků byl hodnocen vliv použitých kultur na obsah kyseliny benzoové ve finálním mléčném výrobku. Kyselina benzoová byla stanovována metodou HPLC na koloně s reverzní fází C18 za použití PDA detektoru při vlnové délce 235 nm (mobilní fáze methanol–0,02M acetátový pufr, pH = 4,5, 80 : 20 [v : v]). Byly nalezeny statisticky významné rozdíly v hladinách kyseliny benzoové v jogurtech vyrobených stejným postupem ze stejné výchozí suroviny, ale zaočkované různými mléčnými kulturami. Stanovené hladiny kyseliny benzoové u žádného modelového vzorku nepřekročily hygienický limit 30 mg/kg (platný od roku 1997).

Klíčová slova: kyselina benzoová; jogurt; jogurtová kultura; kmen mikroorganismů; kravské mléko; kozí mléko; HPLC; hygienický limit

Benzoová kyselina je přirozenou složkou rostlin, ovoce a zeleniny, různých druhů koření a ořechů (OBEN-TRAUT 1982). Jako součást pícnin se dostává do zažívacího traktu přežvýkavců, kde podléhá biochemickým

změnám, přičemž vzniká i nepřirozený metabolit, který musí být v organismu blokován tvorbou benzoylglycinu – kyseliny hippurové (KARLSON *et al.* 1987; HORÁK *et al.* 1996).

*Práce byla vypracována v rámci řešení grantového projektu NAZV EP 0960006367 a za finanční podpory interního grantového úkolu AF ČZU v Praze.

RENTERGHEM (1982) a stejně i SCHMIDT-HEBBEL (1983), popsali přeměnu kyseliny hippurové na kyselinu benzoovou při výrobě jogurtu. Bylo prokázáno, že štěpení kyseliny hippurové na kyselinu benzoovou a glycin je způsobeno přítomností laktobacilů, streptokoků a některých druhů rodu *Leuconostoc* (NISHIMOTO *et al.* 1969).

Štěpení kyseliny hippurové bakteriemi mléčného kysání používanými při výrobě jogurtů prokázali RENTERGHEM (1982) a BERTLING (1985).

Kyselina benzoová může v jogurtech vznikat i při degradaci fenylalaninu a autooxidaci benzaldehydu (MOORE *et al.* 1968; BLANC *et al.* 1983; SIEBER *et al.* 1985).

Testovali jsme vliv jogurtových kultur na hladinu kyseliny benzoové v jogurtech. Všechny modelové jogurty byly připraveny stejnou technologií a ze stejného výchozího materiálu (kravského mléka) a byly zaočkovány osmi nejfrekventovanějšími jogurtovými kulturami MILCOM a. s. Laktoflora. Jeden modelový jogurt byl připraven z kozího mléka za použití jogurtové kultury WV2. Byl stanoven obsah kyseliny benzoové i v kmenech mikroorganismů MILCOM a. s. Laktoflora, z kterých se připravují uvedené jogurtové kultury. Statistické vyhodnocení experimentů ukázalo v některých případech signifikantní rozdíly v hladinách kyseliny benzoové ve vztahu k použitým jogurtovým kulturám.

MATERIÁL A METODA

K výrobě modelových jogurtů bylo použito mléko dojnic holštýnského plemene tepelně ošetřené záhřevem na 84–85 °C. Takto tepelně upravené mléko bylo zahuštěno sušeným mlékem (přídavkem 0,5 % sušiny) a zaočkováno do 24 hodin po výrobě 1 % čisté mlékařské jogurtové kultury MILCOM a. s. Laktoflora (označení J22, WV2, JK, T767 + T, J2, RX, JOB, a WV3). Kultivace probíhala 3,5 hodiny při teplotě 43 °C.

Stejným postupem byl připraven modelový jogurt z mléka plemene koz bílá krátkosrstá zaočkovaný jogurtovou kulturou WV2 MILCOM a. s. Laktoflora.

Vzorek o hmotnosti cca 20 g byl v souladu se standardní metodikou IDF (Provisional IDF Standard 139, 1987) mírně zahřát a promícháním zhomogenizován. Tuky a proteiny byly vysráženy ze slabě alkalického vodného roztoku za použití hexakynoželesnatanu draselného (Carrezovo činidlo I) a octanu zinečnatého (Carrezovo činidlo II). Přídavkem methanolu byla extrahována kyselina

benzoová a po membránové filtraci byl supernatant použit ke stanovení metodou HPLC v isokratickém režimu na koloně s reversní fází (SGX C18, 250 × 4 mm, 7 μm), při vlnové délce 235 nm a s mobilní fází ethanol–0,02M acetátový pufr, pH 4,5 (80 : 20 [v : v]). Průtok mobilní fáze byl 1,2 ml/min. Hladiny kyseliny benzoové byly vyhodnoceny z výšky píku na chromatogramech získaných na přístroji Waters.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Každý modelový jogurt byl ve třech paralelních opakováních připraven k analýze, kyselina benzoová byla stanovena ze dvou nástříků. Výsledky stanovení kyseliny benzoové v kmenech mikroorganismů MILCOM a. s. Laktoflora a v modelových jogurtech jsou přehledně uvedeny v tab. 1–3.

Statistické zhodnocení hladin kyseliny benzoové v jogurtech zaočkovaných rozdílnými jogurtovými kulturami bylo realizováno metodou ANOVA – jednofaktorovou analýzou rozptylu s opakováním, technikou vícenásobného porovnávání na hladině významnosti 0,05.

Získané výsledky vedou k následujícím závěrům:

- Hladiny kyseliny benzoové v kmenech mikroorganismů se statisticky významně liší.

Obsah kyseliny benzoové v modelových jogurtech vyrobených z kozího mléka, zaočkovaných jogurtovou kulturou WV2, je statisticky významně vyšší v porovnání se všemi ostatními testovanými modelovými jogurty.

- Podle obsahu kyseliny benzoové v modelových jogurtech zaočkovaných nejfrekventovanějšími mléčnými kulturami lze rozdělit sledované kultury do tří skupin:

1. skupina: J22, RX, WV3 – průměrný obsah kyseliny benzoové 23,31 mg/kg;
2. skupina: WV2, JK – průměrný obsah kyseliny benzoové 18,52 mg/kg;
3. skupina: T767 + T, J2, JOB – průměrný obsah kyseliny benzoové 13,49 mg/kg.

Jogurtové kultury první skupiny produkují největší množství kyseliny benzoové, zatímco kultury třetí skupiny nejméně. Toto tvrzení dokládá i statisticky prokázaný významný rozdíl vztažený na produkci kyseliny benzoové.

Kultury v jednotlivých skupinách se od sebe vzájemně významně neliší. Statisticky významně se liší kultury skupiny 1 od kultur skupiny 3. Rozdíly mezi skupinou 2 a skupinami 1 a 3 nejsou ve všech případech statisticky významné.

Tab. 1. Obsah kyseliny benzoové [mg/kg] v kmenech mikroorganismů MILCOM a. s. Laktoflora – Benzoic acid content [mg/kg] in the strains of MILCOM a. s. Laktoflora microorganisms

Kmen mikroorganismů ¹	Titrační kyselost ² [°SH]	Stanovení ³			Průměr ⁴	σ*	S _R **
		1.	2.	3.			
<i>Lbc. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	51,6	9,80	9,45	9,77	9,47	0,286	3,02
<i>Str. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	41,9	1,21	0,98	1,13	1,11	0,117	10,52

*směrodatná odchylka – standard deviation [mg/kg]; **relativní směrodatná odchylka – relative standard deviation[%]

¹microorganism strain; ²titratable acidity (°SH); ³determination; ⁴mean

Tab. 2: Obsah kyseliny benzoové [mg/kg] v modelových jogurtech vyrobených z kravského mléka a zaočkovaných rozdílnými jogurtovými kulturami MILCOM a. s. Laktoflora – Benzoic acid content [mg/kg] in model yoghurts produced from cow milk and inoculated with different yogurt cultures of MILCOM a. s. Laktoflora

Kultura ¹	J22	WV2	JK	T767+T	J2	RX	JOB	WV3
Titrační kyselost*** ²	42	45	33,6	42,1	45	43	42	45
1.	22,33	17,26	18,00	13,02	13,22	23,05	14,02	22,60
2.	24,84	17,60	20,80	13,45	13,22	22,25	14,47	23,32
3.	25,13	18,30	19,17	12,87	13,87	23,42	13,27	22,82
Průměr ³	24,10	17,72	19,32	13,11	13,44	22,91	13,92	22,91
σ^*	1,540	0,530	1,406	0,301	0,375	0,598	0,606	0,369
S_R^{**}	6,39	2,99	7,28	2,30	2,79	2,61	4,36	1,61

*směrodatná odchylka – standard deviation [mg/kg]; **relativní směrodatná odchylka – relative standard deviation [%]; ***hodnoty titrační kyselosti jsou uvedeny ve °SH – values of titratable acidity are given in °SH

¹culture; ²titratable acidity; ³mean

Tab. 3: Obsah kyseliny benzoové [mg/kg] v modelovém jogurtu vyrobeném z kozího mléka a zaočkovaném jogurtovou kulturou WV2 MILCOM a. s. Laktoflora*** – Benzoic acid content [mg/kg] in model yoghurts produced from goat milk and inoculated with yogurt culture WV2 MILCOM a. s. Laktoflora

1.	2.	3.	Průměr ¹	σ^*	S_R^{**}
34,80	33,67	34,25	34,24	0,565	1,65

*směrodatná odchylka – standard deviation [mg/kg]

**relativní směrodatná odchylka – relative standard deviation [%]

***titrační kyselost jogurtové kultury WV2 MILCOM a. s. Laktoflora byla 42,8 °SH – titratable acidity of yoghurt culture WV2 MILCOM a. s. Laktoflora was 42.8 °SH

¹mean

Závěr

Na základě statistického hodnocení jednofaktorovou analýzou rozptylu s opakováním byl prokázán vliv jednotlivých jogurtových kultur na obsah kyseliny benzoové v jogurtech. Současně byla prokázána statisticky významná odlišnost v obsahu kyseliny benzoové ve sledovaných kmenech mikroorganismů. Přestože se obsahy kyseliny benzoové v modelových jogurtech vlivem použité kultury mění, jsou všechny stanovené hodnoty pod platným hygienickým limitem (30 mg/kg – platný od listopadu 1997).

Jogurt z kozího mléka se statisticky významně liší v obsahu kyseliny benzoové od všech modelových jogurtů vyrobených z kravského mléka. Orientační pokus s modelovým jogurtem, připraveným z kozího mléka, ukazuje na vyšší obsahy kyseliny benzoové (průměrná hodnota 34,24 mg/kg) přesahující hygienický limit. Problematice hladin kyseliny benzoové v kozím mléce a ve výrobcích z něj se budeme věnovat v další práci.

Literatura

- BERTLING L. K. (1985): Free of preservatives but still positive for benzoic acid? Ohne Konservierungsstoffe – aber Benzoessäure positiv? Dtsch. Milchwirtsch. Forsch., **36**: 135–136.
- BLANC B., BOSSET J. O., MARTIN B., JIMENO J. (1983): Echanges gazeux à la surface du fromage de gruyers en cours de maturation. Schweiz. Milchwirtsch. Forsch., **12**: 359–362.
- HORÁK V., CUHRA P., DOLEJŠKOVÁ J., LOUDA F., DRAGOUNOVÁ H., NEUHYBEL P. (1996): Kyselina hippurová a benzoová v mléce a mléčných výrobcích. Živočiš. Vyr., **41**: 277–279.
- KARLSON P., GEROK W., GROSS W. (1987): Pathobiochemie. Academia, Praha.
- MOORE K., SUBBA RAO P. V., TOWERS G. H. N. (1968): Degradation of phenylalanine and tyrosine by *Sporobolomyces roseus*. Biochem. J., **106**: 507–514.
- NISHIMOTO T., UYETA M., TAUE S. (1969): Precursor of benzoic acid in fermented milk. J. Food Hyg. Soc. Jap., **10**: 410–413.
- OBENTRAUT S. (1982): Der natürliche benzoessäuregehalt in österreichischen sauremilchprodukten. Milchwiss. Ber., **72**: 187–189.
- RENTERGHEM R. van (1982): Het natuurlijke benzoëzuurgehalte van yoghurt. Belg. Arch. Soc. geneesk. Gyg. Arbeids-gen. Ger. Geneesk., **40**: 530–583.
- SCHMIDT-HEBBEL H. (1983): Natural benzoic acid formation in milk products. Alimentos., **42**: 35–42.
- SIEBER S., BUTIKOFER U., BOSSET J. O. (1985): Benzoic acid as a natural compound in cultured dairy products and cheese. Int. Dairy J., **5**: 227–246.

Došlo 18. 2. 1999

Přijato k publikování 24. 6. 1999

Kontaktní adresa:

Ing. ALENA HEJTMÁNKOVÁ, Česká zemědělská univerzita v Praze, Agronomická fakulta, 165 21 Praha 6-Suchbát, Česká republika, tel.: + 420 2 24 38 27 15, fax: + 420 2 24 38 27 15, e-mail: hejtmank@af.czu.cz