

## VLIV ELEKTRODIALÝZY NA TERMOSTABILITU SYROVÁTKOVÉHO PROTEINOVÉHO KONCENTRÁTU (WPC)

Matej Vavro<sup>1</sup>, Hana Fárová<sup>1</sup>, Michal Jirdásek<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MemBrain s.r.o., Pod Vinicí 87, 471 27 Stráž pod Ralskem, Czech Republic. [www.membrain.cz](http://www.membrain.cz)

<sup>2</sup> MEGA a.s., Pod Vinicí 87, 471 27 Stráž pod Ralskem, Czech Republic. [www.mega.cz/dairy](http://www.mega.cz/dairy)

### Influence of electrodialysis on WPC thermostability

#### Abstrakt

Syrovátkové proteiny jsou široce využívány v potravinářském průmyslu, kde je jejich tepelná (před)úprava často nezbytná. Jelikož termostabilita syrovátkových proteinů je poměrně nízká, bylo vyvinuto několik metod na zvýšení termostability. Naše metoda se zaměřuje na snížení obsahu vápníku bez přímého přidávání chemikálií. Speciální uspořádání elektrodialyzačního modulu umožnilo výměnu kationtů mezi roztokem syrovátkového proteinového koncentrátu (WPC) a roztokem NaCl a KCl, sloužícím jako zdroj kationtů (dále označovaný jen jako zdroj monovalentů). Během laboratorních testů byl roztok WPC, obsahující 11,4 % sušiny a 9,1 % hrubého proteinu, zpracován speciální elektrodialýzou pro záměnu kationtů. Molární poměr NaCl a KCl v monovalentním zdroji byl 1:1, a absolutní koncentrace solí 10 g·L<sup>-1</sup>. Zdroj monovalentů byl demineralizován na různé úrovně, v rozmezí od 40 % do 80 % redukce počáteční vodivosti, a byl studován vliv na minerální profil a termostabilitu WPC. Koncentrace vápníku klesla z počáteční hodnoty 25,1 meq·L<sup>-1</sup> na 12,5 a 8,8 meq·L<sup>-1</sup> při redukcí vodivosti zdroje monovalentů 40 % a 50 %, v tomto pořadí. Koncentrace vápníku se významně nezměnila pro hodnoty redukce vodivosti zdroje monovalentů mezi 50 a 80 %. Bivalentní ionty ve WPC byly nahrazeny monovalentními

mi ionty, a poměr mezi monovalentními a bivalentními ionty se ve WPC zvýšil, což přispělo k vyšší termostabilitě syrovátkových proteinů. Všechny vzorky modifikovaného WPC byly termostabilní, přičemž 40 % redukce vodivosti monovalentního zdroje postačilo k dosažení termostabilního WPC.

**Klíčová slova:** syrovátkové proteiny, WPC, termostabilita, elektrodialýza

#### Abstract

Whey proteins are widely used in the food industry, where their heat (pre)treatment is often necessary. Since the thermostability of whey proteins is relatively low, several methods have been developed to increase the thermostability. Our method focuses on reducing calcium content without directly adding chemicals. The special arrangement of the electrodialysis module enabled the exchange of cations between the whey protein concentrate (WPC) and the NaCl and KCl solution, serving as a source of cations (hereafter referred to only as a source of monovalents). During the laboratory tests, the WPC solution, containing 11.4 % dry matter and 9.1 % crude protein, was processed by a special electrodialysis for cation exchange. The molar ratio of NaCl and KCl in the monovalent source was 1:1, and the absolute salt concentration was 10 g·L<sup>-1</sup>. The monovalent source was demineralized to various levels, ranging from 40 to 80 % reduction of initial conductivity, and the effect on the mineral profile and thermostability of WPC was studied. The calcium concentration dropped from an initial value of 25.1 meq·L<sup>-1</sup> to 12.5 and 8.8 meq·L<sup>-1</sup> with a reduction in monovalent source conductivity of 40 % and 50 %, respectively. Calcium concentration did not change significantly for monovalent source conductivity reduction values between 50 % and 80 %. Bivalent ions in WPC were replaced by monovalent ions, and the ratio between monovalent and bivalent ions increased in WPC, which contributed to higher thermostability of whey proteins. All samples of the modified WPC were thermostable, with a 40 % reduction in monovalent source conductivity being sufficient to achieve thermostable WPC.

**Key words:** whey proteins, WPC, thermostability, electrodialysis

## Úvod

Syrovátkové proteinové koncentráty (WPC), využívané v potravinářském průmyslu jsou často tepelně upravovány. Při vyšších teplotách jsou WPC náchylné k denaturaci, což může vést k agregaci či gelování, které je nežádoucí. Termostabilita WPC především závisí na termostabilitě nejvíc zastoupených syrovátkových proteinů  $\beta$ -laktoglobulinu a  $\alpha$ -laktalbuminu. Běžnou průmyslovou metodou pro zlepšení termostability syrovátkových proteinů je přidávání solí vázících se na volný vápník (např. citrátů a fosforečnanů), což zvyšuje termostabilitu. Jelikož je termostabilita  $\beta$ -laktoglobulinu závislá na obsahu vápníku, přičemž vysoká koncentrace vápníku termostabilitu snižuje, je naše metoda zaměřena na snížení obsahu vápníku, bez přímého přidávání chemikálií.

Cílem práce bylo zvýšení termostability syrovátkového proteinového koncentrátu (WPC) prostřednictvím změny minerálního profilu využitím speciálního uspořádání elektrodialýzy.

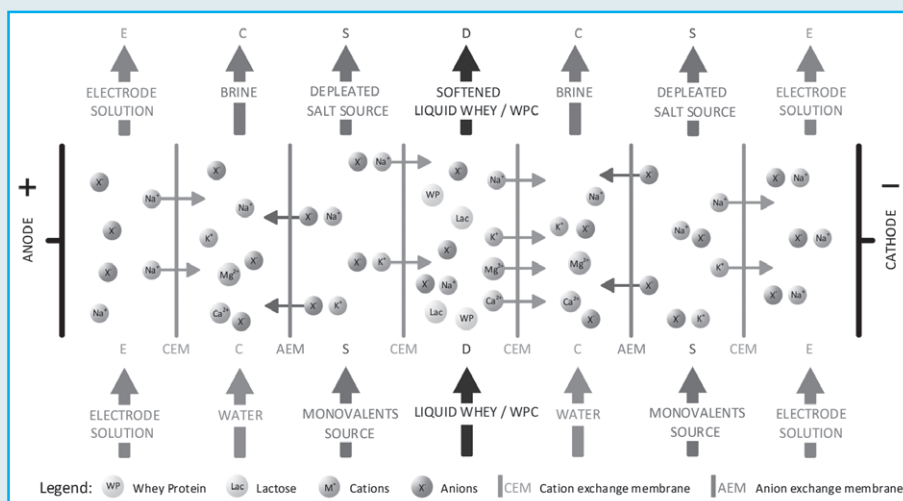
## Materiály a metody

### Elektrodialýza

Přestože využitím konvenční elektrodialýzy (ED) dochází k zlepšení termostability syrovátkových proteinů, jednoduché snížení obsahu vápníku využitím ED nezajišťuje termostabilní produkt v případě WPC. Pro zajištění termostabilních WPC je tedy potřebné využít jiný způsob redukce vápníku. Jednou z možností je využití elektrodialýzy s parciální výměnou kationtů. Tento typ elektrodialýzy se speciálním uspořádáním elektrodialyzačního modulu (EDM) umožňuje snížení obsahu vápníku za současného udržení iontové síly roztoku WPC, což vede ke vzniku termostabilního produktu. Jako zdroj monovalentních kationtů pro náhradu vápenatých iontů  $\text{Ca}^{2+}$  sloužily roztoky chloridu sodného (NaCl), chloridu draselného (KCl) nebo jejich směsi. Princip elektrodialýzy s parciální záměnou kationtů je znázorněn na Obr. 1.

### Elektrodialyzační jednotka

Testy elektrodialýzy EDM byly provedeny na laboratorní elektrodialyzační jednotce P EDR-Z/4x1. Pro tento typ elektrodialýzy byl použit 3okruhový modul elektrodialýzy EDR-Z/3x10-0,8 v konfiguraci CM – AM – CM, který byl složen



Obr. 1 Princip EDM pro parciální záměnu kationtů

z 21 ks standardních CM(H) PES a 10 ks AM(H) PES membrán RALEX® vyrobených ve firmě MEGA a.s. V diluátových a koncentrátových komorách byly vloženy PE rozdělovače o tloušťce 0,8 mm. Tloušťka elektrodových rozdělovačů byla 1,0 mm. Redukovaná plocha membránových tripletů byla 0,064 m<sup>2</sup>.

### Surovina

Surovinou byl kapalný WPC 80 dodán výzkumným partnerem z Německa, který byl před testy zředěn RO filtrátem\*) v hmotnostním poměru 1:1. Složení WPC 80 před naředěním a po naředění je uvedeno v Tab. 1.

### Testy elektrodialýzy EDM

Vstupní surovinou pro testy elektrodialýzy byl 1 kg tekutého WPC80, s obsahem sušiny 11,4 % a obsahem hrubých bílkovin 9,1 %. Surovina na elektrodialýzu byla připravena zředěním tekutého WPC80 z průmyslové/industriální jednotky ultrafiltrace (UF), obsahujícího 22,8 % sušiny, za použití RO filtrátu\*). Složení vstupní suroviny na elektrodialýzu je uvedeno v Tab. 1.

Zdrojem monovalentních iontů bylo 2,25 kg směsi NaCl a KCl v molárním poměru 1:1 o celkové koncentraci

Tab. 1 Průměrné složení suroviny před naředěním a po naředění RO filtrátem\*) v poměru 1:1

Surovina	$\kappa_{25^\circ\text{C}}$ [mS·cm <sup>-1</sup> ]	pH [-]	Sušina [%]	Popel [%]	Popel v sušině [%]	Hustota [kg·m <sup>-3</sup> ]	RS [°Bx]
WPC80	N/A	N/A	22,88	0,666	2,91	N/A	N/A
WPC80 1:1	2,11	6,35	11,44	0,330	2,91	1031,5	9,2
Surovina	Na <sup>+</sup> [mg·kg <sup>-1</sup> ]	K <sup>+</sup> [mg·kg <sup>-1</sup> ]	Mg <sup>2+</sup> [mg·kg <sup>-1</sup> ]	Ca <sup>2+</sup> [mg·kg <sup>-1</sup> ]	Hrubé proteiny [%]	Čisté proteiny [%]	NPN [%]
WPC80	346	1386	138	974	18,2	15,3	0,46
WPC80 1:1	173	684	69	487	9,1	7,63	0,23
Surovina	Laktosa [%]	Laktát [mg·kg <sup>-1</sup> ]	Citrát [mg·kg <sup>-1</sup> ]	Cl <sup>-</sup> [mg·kg <sup>-1</sup> ]	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> [mg·kg <sup>-1</sup> ]	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> [mg·kg <sup>-1</sup> ]	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [mg·kg <sup>-1</sup> ]
WPC80	3,66	<100	582	<200	<200	<200	<200
WPC80 1:1	1,83	<50	291	<100	<100	<100	<100

$\kappa_{25^\circ\text{C}}$  – vodivost měřená při referenční teplotě 25 °C, RS – refraktometrická sušina, NPN – nebilkovinný dusík

traci  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Koncentrace  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  v zdroji monovalentních solí byly přibližně  $1\,700 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $2\,900 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Jako vstup do koncentrátového okruhu bylo použito  $0,5 \text{ kg}$  RO filtrátu<sup>\*)</sup>. Bylo použito vždy stejné počáteční množství zdrojové soli, která byla postupně odsolena přibližně o 40, 50, 60, 70 a 80 %. Vodivost ani pH koncentráty nebyly upravovány, neboť nehrozí srážení fosforečnanu vápenatého v koncentráty jako při demineralizaci syrovátky pomocí ED.

### Testy termostability

Surovinou pro testy termostability byly kapalné roztoky WPC – produkty z elektrodialýzy, které byly naředěny RO filtrátem<sup>\*)</sup>, tak, aby měly 10 % sušiny.

Termostabilita se zkoušela po úpravě většího množství vzorku na hodnotu pH 6,8–7,3 použitím 50% roztoku NaOH. Zahuštěné vzorky po neutralizaci se zředily demineralizovanou vodou tak, aby výsledná sušina vzorku byla cca 10 %. Sušina kapalných vzorků byla orientačně kontrolována pomocí měření refraktometrické sušiny. Kádinkové testy termostability byly prováděny tak, že kádinka se 100 ml roztoku byla postavena na rozehřátou plotýnku o teplotě  $230 \text{ }^\circ\text{C}$  a za stálého míchání byl roztok zahříván. Doba ohřevu se počítala od dosažení teploty  $90 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po záhřevu byly roztoky vylity na Petriho misku a bylo sledováno, zda nedošlo k vzniku sraženiny, změně zbarvení, viskozity či vzniku gelu. Celkové trvání testu bylo 16 min, přičemž samotný ohřev roztoku v kádince probíhal po dobu 10 min a během následujících 6 minut byla teplota udržována na  $90 \text{ }^\circ\text{C}$ . Před testem a po testu byl kvůli odpařování kontrolován obsah sušiny sušením na sušících váhách.

### Analytické metody

Během jednotlivých experimentů elektrodialýzy bylo měřeno: vodivost, teplota a pH pomocí WTW Multi 3240, hustota digitálním hustoměrem Mettler-Toledo Densito 30PX.

V laboratoři Membránového Inovačního Centra společnosti MemBrain s.r.o. bylo dále měřeno:

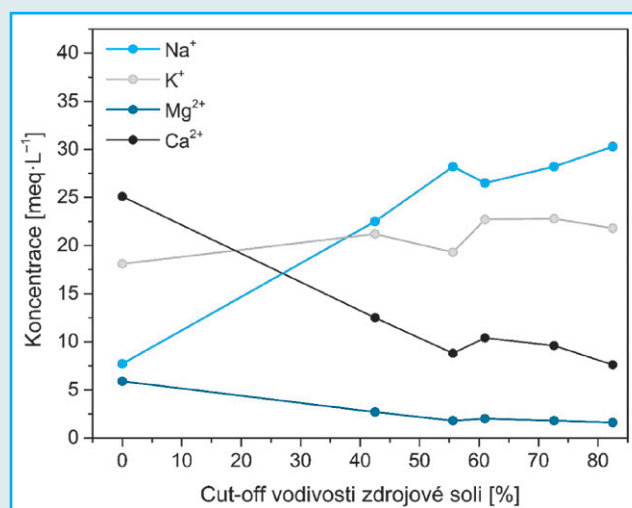
- sušina na sušících váhách VWR MB 160 při  $102 \text{ }^\circ\text{C}$
  - popel vážkově spalováním v peci při  $525 \text{ }^\circ\text{C}$
  - kationty  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{P}_{\text{celk.}}$ , S na iCAP 7000s (optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ICP-OES)
  - anionty  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  na přístroji Dionex™ ICS-5000+ DC (iontová chromatografie)
  - laktosa polarimetricky na přístroji P1000-LED A.KRÜSS OPTRONIC
  - organické kyseliny pomocí kapilární izotachografie Ionosep 2017
  - bílkovinný (organický) dusík a obsah hrubých bílkovin Dumasovou metodou pomocí analyzátoru MAX N exceed (Elementar Rapid)
- Obsah NPN<sup>\*\*\*)</sup> byl stanoven výpočtem.

## Výsledky a diskuse

Celkem bylo provedeno 5 testů EDM, které byly ukončeny, když vodivost zdrojové soli klesla o 40, 50, 60, 70 a 80 %, přičemž označení testů bylo EDM-40 až EDM-80. Průtok v diluátovém, koncentrátovém okruhu a okruhu zdrojové soli byl  $60 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$  (lineární rychlost  $5,21 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ) a průtok v elektrodovém okruhu byl  $50 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$  (lineární rychlost  $20,83 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Napětí na svazku bylo nastaveno na 17 V, resp. 1,7 V/triplet.

Díky záměně kationtů rostla během pokusů vodivost WPC 80, avšak jeho pH se významně neměnilo. Vodivost zdrojové soli v čase lineárně klesala, zcela překvapivě klesalo i pH soli. Pokles pH soli byl doprovázen nárůstem pH koncentráty.

Vliv redukce vodivosti zdrojové soli na minerální profil WPC 80 je znázorněn na Obr. 2.



Obr. 2 Obsah kationtů ve WPC 80 v závislosti na cut-off zdrojové soli

Základní složení a termostabilita vstupní suroviny a produktů jsou uvedeny v Tab. 2.

S vyšším množstvím zdrojové soli (zdroje monovalentních iontů), resp. vyšší redukcí/cut off zdrojové soli nedocházelo k výraznému rozdílu ve snížení koncentrace vápníku. Při redukcí vodivosti zdrojové soli o 40 % (cut-off 40 %) došlo k poklesu obsahu vápníku na  $15,2 \text{ meq}\cdot\text{L}^{-1}$ . Při redukcí 50 % a výše se koncentrace vápníku pohybovala v rozmezí 7,6 až  $10,4 \text{ meq}\cdot\text{L}^{-1}$ . Lze předpokládat, že rozdíly v koncentracích vápníku od

Tab. 2 Závislost minerálního profilu produktů na množství použité zdrojové soli

Vzorek WPC 80	Cut-off S [%]	pH [-]	$\text{K}_{25^\circ\text{C}}$ [ $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ ]	Sušina [%]	Popel [%]	Hrubé bílkoviny [%]	Čisté bílkoviny [%]	Termostabilita
F <sup>***)</sup>	0,0	6,35	2,11	11,44	0,33	9,10	7,63	NE
EDM-40	42,5	6,50	2,47	10,68	0,34	8,44	7,19	ANO
EDM-50	55,6	6,48	2,59	10,61	0,34	8,42	7,29	ANO
EDM-60	61,0	6,48	2,68	10,71	0,36	8,48	7,35	ANO
EDM-70	72,6	6,48	2,78	10,83	0,38	8,53	7,35	ANO
EDM-80	82,5	6,49	2,86	10,77	0,37	8,52	7,16	ANO

redukce 50 % výše nejsou způsobeny vyšší redukcí vodivosti zdrojové soli, ale nejistotami analytického měření. Všechny získané produkty z testů EDM-40 až EDM-80 byly termostabilní, co naznačuje, že redukce vápníku na 15 meq·L<sup>-1</sup> při celkové koncentraci kationtů zhruba 60 meq·L<sup>-1</sup> a poměru jednomocných iontů ku dvojmocným 2,9 je dostačující pro získání termostabilního produktu.

Koncentrace hořčičku v závislosti na redukcí vodivosti zdrojové soli měla podobný trend jako v případě vápníku a od cut-off 50 % výše se měnila jen málo. Naopak koncentrace sodíku s rostoucím cut-off rostla, s výjimkou pouze při cut-off 50 %, kterou přisuzujeme nejistotám v analytickém měření. Koncentrace draslíku nejdříve rostla a od cut-off 50-60 % se již neměnila.

Ukázalo se, že část vápníku je pevně vázána s bílkovinami a fosforečnany ve WPC a bez změn pH ji není možné odstranit z WPC. Zároveň při EDM hraje roli i různá pohyblivost jednotlivých iontů. Draselné ionty mají nejvyšší pohyblivost ve srovnání se sodnými, hořečnatými a vápenatými ionty, tedy jsou nejsnadněji převáděny z WPC do koncentrátu a jsou nahrazovány draselnými a sodnými ionty ze zdrojové soli. Proto se koncentrace draslíku během pokusů měnila jen málo.

## Závěr

Použitím elektrodialýzy pro parciální záměnu iontů EDM došlo k úpravě minerálního profilu WPC, čímž došlo k získání termostabilního koncentrátu syrovátkových proteinů (WPC). Použitá technologie umožnila redukcí vápníku maximálně 65 %, přičemž už redukce vápníku na úrovni 50 % při zachování stejné iontové síly je dostatečná k získání termostabilního produktu.

## Použité zkratky

\*) RO-filtrát = filtrační voda prostupující membránou reverzní osmózy a vystupující ze zařízení reverzní osmózy

\*\*) NPN = (Non protein nitrogen) = nebílkovinný dusík

\*\*\*) F = (Feed) = vstupní surovina

## Poděkování

Tato práce vznikla v rámci projektu CZ.01.1.02/0.0/0.0/17\_107/0012377 „Dairy Ingredients“ za podpory Ministerstva průmyslu a obchodu prostřednictvím Agentury pro podnikání a inovace. Projekt je spolufinancován Evropskou unií.

## Poznámka

Tento článek je českou verzí **posterového sdělení** prezentovaného v posterové sekci na **IDF World Dairy Summit 2023** v Chicagu, USA v říjnu 2023, v sekci „Dairy Technology: Research“.

## Literatura

Literární zdroje/reference k článku jsou k dispozici u autorů.

## Korespondující autor:

Matej Vavro

MemBrain s.r.o.,

Pod Vinicí 87, 471 27 Stráž pod Ralskem,

e-mail: matej.vavro@membrain.cz, www.membrain.cz

Přijato do tisku: 23. 1. 2024

Lektorováno: 7. 2. 2024

# IZOLACE, IDENTIFIKACE A CHARAKTERIZACE MIKROORGANISMŮ Z NEPÁLSKÝCH SÝRŮ

O. Bazalová<sup>1</sup>, J. Cihlář<sup>1</sup>, V. Dráb<sup>1</sup>, A. Rossová<sup>1</sup>,  
M. Kavková<sup>1</sup>, J. Kavka<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

<sup>2</sup> Zdravotně sociální fakulta, Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích

## ISOLATION, IDENTIFICATION AND CHARACTERISATION OF MICROORGANISMS FROM NEPALI CHEESES

### Abstrakt

Ze souboru sýrů získaných v oblasti národního parku Lang Tang (Nepál) bylo získáno celkem 200 různých izolátů, z toho cca polovina byla na základě homologie sekvence 16S rDNA přiřazena k příslušnému druhu a prozatím 11 izolátů bylo vybráno k dalším testům. Největší potenciál negativně ovlivnit růst nežádoucích bakterií vykazovaly nově získané izoláty *Lactiplantibacillus plantarum* a *Lentilactobacillus parabuchneri*, růst nežádoucí plísně *Penicillium commune* pak nejvíce ovlivnil *Streptococcus macedonicus* a některé izoláty *Lactocaseibacillus casei* a *L. plantarum*. Prokázat probiotický potenciál některého izolátu se nám zatím nepodařilo, ale ukázali jsme, že izolované *L. casei* a *L. paracasei* dokázaly růst i v mediu obsahujícím 1 % žlučových solí. Vzhledem k tomu, že bakterie mléčného kvašení (BMK) mohou také sloužit jako rezervoár genů antibiotické rezistence a přenášet je na bakterie stejného nebo odlišného druhu či rodu a tím šířit rezistenci případně i na patogenní mikroorganismy, zaměřili jsme se i na otestování senzitivity vůči některých antibiotikům, kdy všechny testované izoláty byly senzitivní k medicínsky významným antibiotikům.

**Klíčová slova:** bakterie mléčného kvašení, Nepál, sýr, funkční vlastnosti, antibiotická rezistence

### Abstract

A total of approximately 200 different isolates were gathered from a set of cheeses obtained in the area of the

Lang Tang National Park (Nepal). Based on the homology of the 16S rDNA sequence approximately half of the isolates were assigned to the respective species. 11 isolates were selected for further tests. The newly isolated *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lentilactobacillus parabuchneri* showed the greatest potential to negatively influence the growth of spoilage bacteria. *Streptococcus macedonicus* and some isolates of *Lactocaseibacillus casei* and *L. plantarum* had a significant impact on the growth of the fungus *Penicillium commune*. Although the full probiotic potential of any isolate was not proved, isolates of *L. casei* and *L. paracasei* survived and grown even in a medium containing 1 % bile salts. Furthermore, sensitivity to certain antibiotics was assessed because Lactic acid bacteria (LAB) can also serve as a reservoir of antibiotic-resistance genes. All tested isolates were sensitive to medically important antibiotics.

**Key words:** lactic acid bacteria, Nepal, cheese, functional properties, antibiotic resistance

## Úvod

Mléčné výrobky, a především pak sýry, představují heterogenní a živné prostředí pro řadu mikroorganismů. Druhové zastoupení mikroorganismů kolonizujících tyto výrobky je ovlivněno mnoha faktory, kdy původ a kvalita mléka jsou jedněmi z nejdůležitějších. Pro inovace v oblasti potravinářství a mikrobiologie je stěžejní, aby docházelo k izolaci nových mikroorganismů, především pak bakterií mléčného kvašení (BMK), z produktů získaných z různých geografických prostředí a k testování jejich prospěšných vlastností.

Bakterie, druh od druhu a izolát od izolátu, disponují širokým spektrem funkčních vlastností, které mohou mít významný přínos pro vývoj potravin nové generace cílených na specifické skupiny konzumentů s ohledem na jejich zdraví a nutriční požadavky. Mezi velmi žádanými vlastnostmi BMK patří antimikrobiální účinky proti jiným mikroorganismům (Leyva Salas a kol., 2017), technologicky významné by pak mohly být především jejich antifungální či antimikrobiální vlastnosti proti kontaminantům různých výrobků. V povědomí jsou BMK známé také jako probiotika (Yan a Polk, 2011). Probiotické vlastnosti zahrnují mimo jiné také schopnost perzistence v gastrointestinálním prostředí a tolerance vůči žlučovým solím (Sedláčková a kol., 2015). V neposlední řadě BMK mohou také sloužit jako rezervoár genů antibiotické rezistence a přenášet je na bakterie stejného, nebo odlišného druhu či rodu a tím šířit rezistenci případně i na patogenní mikroorganismy. Je proto velmi důležité zaměřit se u nově izolovaných kmenů na bezpečnostní aspekty, které zahrnují stanovení senzitivity vůči jednotlivým antibiotikům.

Naší laboratoří se podařilo získat několik vzorků polotvrdých sýrů z oblasti národního parku Lang Tang v Nepálu ze dvou druhů mléka, kravského a jačího. Naším dlouhodobým cílem je za pomoci funkčních testů

odhalit nově získané izoláty s vhodnými vlastnostmi a ty pak použít v doplňkových kulturách využitelných v potravinářství. V této práci jsme se proto zaměřili na získání nových izolátů především bakteriální mikrobioty pro obohacení genofondu mlékařsky využitelných BMK v ČR a otestování některých jejich základních vlastností.

## Materiál a metody

### Sýry

Získány byly celkem čtyři vzorky sýru nedefinovaného stáří, zakoupené od lokálních výrobců. Dva sýry byly zhotovené z mléka kravského, přičemž jeden sýr zrál pod mazem, a další dva sýry byly zhotovené z mléka jačího. Vzhledem k velmi malému množství vzorku nebyly u žádného sýru stanoveny základní chemické parametry, byly pouze postoupeny mikrobiologickému rozboru.

### Izolace bakterií

Dva gramy sýru byly zpracovány dle následujícího protokolu: do sterilní váženky byl navážen vzorek a dále ve sterilní třecí misce homogenizován v 18 ml roztoku citronanu sodného (2 % w/vol). Po homogenizaci a přípravě ředící řady vzorku byla provedena izolace a stanovení počtu mikroorganismů (KTJ/g) na vybraných živných půdách vhodných pro bakterie, či kvasinky (Tab. 1). Tři až deset kolonií z každého druhu živné půdy bylo vybráno na základě morfologických vlastností. Jednotlivé kolonie byly pomocí sterilní kličky přeneseny do příslušného kultivačního media a inkubovány do nárůstu kultury (nejčastěji 24–48 h).

### Identifikace bakterií

Z narostlé suspenze byla část odebrána a zamrzena v glycerolu (2 x 200 µl) a zbytek kultury byl centrifugován 4000 rpm, 2 min. a vzniklá peleta použita pro izolaci DNA. Po izolaci a přečištění byly získané izoláty klasifikovány na základě homologie získaných sekvencí 16S ribozomální RNA a sekvencí uložených v databázi NCBI pomocí porovnávacího nástroje BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). DNA z bakteriálních kultur byla extrahována pomocí DNeasy® UltraClean® Microbial Kit (Qiagen, Hilden, Německo) podle Quick-Start protokolu dodaného výrobcem. Gen 16S rDNA byl amplifikován pomocí primerů fD1 (5' - AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG - 3') a rP2 (5' - ACGGCTACCT-TGTTACGACTT - 3'). Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla provedena v reakčním objemu 25 µl (0,5 µl obou primerů (10 µM), 1 µl templátu DNA, 12,5 µl 2x PPP Taq MasterMix (TopBio, Vestec, ČR) a 10,5 µl ddH<sub>2</sub>O). Podmínky amplifikace byly následující: předehřívání na 95 °C (2 min.), 35 cyklů: denaturace při 95 °C (30 s), nasedání primerů při 55 °C (30 s), prodlužování při 72 °C (5 min.) a následná konečná extenze při 72 °C (8 min.). Všechny produkty PCR byly ošetřeny 2 µl ExoSAP-ITTM dle referenční příručky výrobce (ThermoFisher Scientific, Baltic UAB, Vilnius) a sekvenovány

Tab. 1 Používané mikrobiologické agary

SKUPINA MIKROORGANISMŮ	MEDIUM	MEDIUM-ZDROJ/ PŘÍPRAVA	SUPLEMENTY	KULTIVACE
Laktobacily	MRS pH5.4 (deMan Rugosa Sharp medium)	Proteose pepton (Oxoid) 10 g, Lab lemco (Oxoid) 8 g, Kvasn. autolyzát 2 g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2g, MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 0,2 g, MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O 0,05 g, Tween 80 1 ml, glukóza 20 g, citrát amonný 2 g, acetátový pufr (pH 5,4) 200 ml (1M CH <sub>3</sub> COOH 29 ml + 1M CH <sub>3</sub> COONa 171 ml), agar 15 g, destil. voda 990 ml		2–5 dní, anaerobní, 30–45 °C
	MRS pH5.7	MERCK KGaA, Německo		3–5 dní, anaerobní, 30 °C
	FHN	Proteose pepton (Oxoid) 10 g, Lab lemco (Oxoid) 10 g, Kvasn. autolyzát 1 g, manitol 20 g, MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 0,1 g, MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O 0,1 g, Tween 80 1 ml, 1M acetátový pufr (pH 5,4) 200 ml (1M CH <sub>3</sub> COOH 29 ml + 1M CH <sub>3</sub> COONa 171 ml), agar 15 g, destil. voda 990 ml	Vankomycin (50 mg.L <sup>-1</sup> ) Nalidixová kyselina (40 mg.L <sup>-1</sup> )	5 dní, aerobní, 30 °C
Bakterie mléčného kvašení	HHD (Lactic Bacteria Differential Broth)	Hi-media, Indie		5 dní, anaerobní, 30 °C
Laktokoky, Streptokoky	M17	Oxoid, UK		3–5 dní, aerobní, 25 °C – 42 °C
Enterokoky	KAA (Kanamycin Aesculin Azide)	Lab M Limited, UK		2 dny, aerobní, 42 °C
<i>Propionibacterium</i>	GLIM (Lithium Lactate Glycerol)	MILCOM a.s., ČR	Fosfomicin (512 mg.L <sup>-1</sup> ) Gentamicin (320 mg.L <sup>-1</sup> ) Nalidixová kyselina (320 mg.L <sup>-1</sup> v 1 % NaCl)	6 dní, anaerobní, 30 °C
<i>Brevibacterium, Corynebacterium</i>	PITON	MILCOM a.s., ČR		2 dny ve tmě/3 dny na světle, 25 °C
<i>Micrococcus, Staphylococcus</i>	MSA (Mannitol Salt Agar)	Hi-media, ČR		3 dny, aerobní, 30 °C
	SK	Milcom, a.s., ČR	Azid sodný (0,45 % wt/vol)	3–5 dní, aerobní, 30 °C
Enterobakterie	VČŽG	Milcom, a.s., ČR		24 h–72 h, aerobní, 37 °C
Kvasinky a plísňe	MALT agar	Himedia, Indie		5 dní, aerobní, 25 °C
	DG18	BDH, Prolabo, Německo		5–10 dní, aerobní, 25 °C

společností Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg, Německo) s použitím fD1 jako sekvenčního primeru. Získané sekvence byly porovnány s databází pomocí služby BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### Antimikrobiální a antifungální aktivita

Pro stanovení antimikrobiální aktivity byly studované izoláty kultivovány ve 30 °C v růstovém mediu po dobu 24 hodin. Antimikrobiální aktivita byla testována vůči kmenům a izolátům patřícím především do kontaminující mikrobioty mléčných výrobků. Kmeny CCDBC jsou součástí sbírky CCDBC a izoláty jsou uloženy v pracovních sbírkách projektů VÚM (Tab. 2). Ke stanovení antimikrobiální aktivity byla použita agarová difuzní metoda, kdy 0,1 % indikátorového bakteriálního kmene bylo zalito příslušným agarem na Petriho misce. Miska byla na 4 h odložena do lednice, poté do ní byly pomocí sterilní skleněné trubičky vyhotoveny jamky o průměru 1 cm, do kterých bylo

následně napipetováno 200 µl jednotlivého supernatantu. Míra inhibice růstu indikátorových kmenů byla vyhodnocena po 18 h růstu dle Moran a kol. (2016) stupnicí 1–5. 5 značí, že k inhibici nedošlo a růst indikátorového kmene je naopak podpořen, 4 značí, že růst kmene není ovlivněn a nedojde ani k potlačení, ani podpoření jeho růstu. 3 značí, že k inhibici růstu dojde, ale inhibiční zó-

Tab. 2 Indikátorové kmeny

AKRONYM	MO (16S rRNA)	ZDROJ	KULTIVACE	
			MEDIUM	PODMÍNKY
1)	<i>Buttiauxella izardii</i>	sýr s hnětenou sýřeninou	BHI	37 °C, A
2)	<i>Pantoea agglomerans</i>	sýr s hnětenou sýřeninou	BHI	37 °C, A
3)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	sýr s hnětenou sýřeninou	TSBK	30 °C, A
4)	<i>Pseudomonas mandelii</i>	čerstvý sýr	TSBK	30 °C, A
5)	<i>Staphylococcus kloosii</i>	sbíрка CCDBC	AJDT	30 °C, A
6)	<i>Staphylococcus sciuri</i>	sbíрка CCDBC	AJDT	30 °C, A
8)	<i>Pseudomonas putida</i>	čerstvý sýr	BHI	30 °C, A
9)	<i>Klebsiella oxytoca</i>	sýr s hnětenou sýřeninou	BHI	37 °C, A
10)	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	sýr s hnětenou sýřeninou	BHI	37 °C, A
11)	<i>Morganella morganii</i>	sýr zrající pod mazem	TSBK	30 °C, A
12)	<i>Lysinibacillus macroides</i>	sýr zrající pod mazem	GTK	30 °C, A
13)	<i>Staphylococcus succinus</i>	čerstvý sýr	AJDT	30 °C, A
14)	<i>Staphylococcus capitis</i>	sýr zrající pod mazem	AJDT	30 °C, A
15)	<i>Penicillium commune</i>	jogurt	MEA	25 °C, A

na není čirá, je přítomno větší množství kolonií, 2 k inhibici dochází, v zóně je přítomno velmi malé množství kolonií a 1 k inhibici růstu příslušného indikátorového kmene dochází, zóna je kompletně čirá, bez kolonií. Ze všech výsledků bylo ustanoveno inhibiční skóre, což je průměr vykázané inhibiční aktivity. Statistické zhodnocení pokusu nebylo stanoveno, jelikož byl zatím test proveden pouze jednou.

Před stanovením antifungální aktivity byly studované izoláty kultivovány ve 30 °C v růstovém mediu po dobu 24 hodin. Následně byly 2x centrifugovány (6 000 rpm, 10 minut), přefiltrovány za pomoci 0,45 µm sterilního filtru a získané supernatanty byly použity v pokusu. Antifungální aktivita byla testována difúzní metodou dle Kavkové a kol., 2022 proti plísni *Penicillium commune*, která patří mezi nejvýznamnější kontaminanty mléčných výrobků. 1 % bakteriálního supernatantu bylo zalito MEA agarem, na který bylo po zatuhnutí naneseno 5 µl kultury *P. commune* naředěné ve fyziologickém roztoku na koncentraci  $1 \times 10^6$  spor/ml. Jako kontrola byly použity agarové misky bez přidání supernatantů. Po 5 dnech inkubace ve 25 °C byla měřena velikost narostlé kolonie a byla pozorována míra sporulace plísně. Test byl zatím pouze jednou zopakován.

### Schopnost perzistence v gastrointestinálním prostředí

Schopnost přežití v gastrointestinálním prostředí byla u vybraných BMK testována pomocí dvou typů gastrických medií: a) žaludeční a b) dvanácterníkové (složení viz Tab. 3) a dále byla sledována také jejich schopnost tolerovat až 1% koncentraci žlučových solí. Růst kultur byl paralelně sledován také v běžném kultivačním mediu (MRS pH 5,7, či M17 dle kmene). Zkumavky s 5 ml růstového, žaludečního či dvanácterníkového media byly zaočkovány 1 % bakteriální kultury a kultivovány v 37 °C. V čase 0 h, 0,5 h, 1 h a 2 h byl 1 ml media odebrán pro stanovení počtu bakterií plotnovou metodou (log KTJ/ml). Petriho misky byly kultivovány při 30 °C v anaerobních, či aerobních podmínkách po dobu 3–5 dní.

Pro stanovení tolerance ke žlučovým solím byly zkumavky obsahující 5 ml růstového media s různou koncentrací (0 %; 0,3 %; 0,5 % a 1 %) žlučových solí w/v (Oxoid) temperovány na 37 °C v termostatu. Jednotlivé kmeny byly naočkovány do 4 ks zkumavek od každého

Tab. 3 Složení gastrických medií

Žaludeční medium		Dvanácterníkové medium	
NaCl	4,8 g	NaCl	5,0 g
NaHCO <sub>3</sub>	4,56 g	KCl	0,6 g
KCl	2,2 g	CaCl <sub>2</sub>	0,02 g
CaCl <sub>2</sub>	0,22 g	žlučové soli	17 g
destilovaná voda	1 l	1 mol/l NaHCO <sub>3</sub>	1 l
pH úprava na 2,4 ± 0,2		pH úprava na 7,0 ± 0,2	
sterilizace 121 °C, 15 minut			
po sterilaci přidány 2 mg pepsinu		po sterilaci přidány 2 mg pankreatinu	

media (inokulum 1 %) a následně byly kmeny kultivovány při 37 °C. Pro stanovení počtu bakterií plotnovou metodou byl 1 ml kultury odebrán ihned po inokulaci kmene do media (označení 0. den) a následně každý den po dobu 3 dní (označení 1., 2. a 3. den). Jako kontrola testu sloužily kmeny zapůjčené ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů – Laktoflora®: *Lactobacillus acidophilus* (CCDM 406, přežívá) a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (CCDM 235, nepřežívá).

### Senzitivita k vybraným antibiotikům

Citlivost k 21 vybraným antibiotikům byla testována pomocí diskové difúzní metody. Senzitivita byla testována na antibiotika používaná buď v humánní, či veterinární medicíně, případně v molekulární biologii a mikrobiologii jako selektivní agens. Většina antibiotik použitých v pilotních pokusech byla vybrána tak, aby koncentrace v disku odpovídala buď EUCAST, či CLSI směrnícím. Na Petriho miskách bylo 20 µl narostlé kultury zalito příslušným růstovým agarem, po zatuhnutí byly na agar aplikovány antibiotické disky. Po 18–24 hodinách anaerobní či aerobní kultivace (dle mikroba) při 30 °C byl změřen průměr jednotlivých zón v milimetrech. Pro vyhodnocení byla použita metodika podle Yerlikaya a kol. 2021, dle které značí velikost zón kmeny rezistentní (< 6 mm; 0), slabě senzitivní (7–10 mm; 1), senzitivní (11–17 mm; 2) a velmi senzitivní (> 17 mm; 3). Přesné hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) zatím stanoveny nebyly.

### Výsledky a diskuze

V této práci jsme se nezaměřovali na studium přesného mikrobiálního složení nepálských sýrů, ale snahou bylo především rozšířit mlékařský genofond ČR o bakteriální kmeny použitelné v sekundárních mlékařských kulturách. Vzhledem k tomu, že získány byly jen drobné vzorky sýrů, všechny vzorky byly postoupeny pouze mikrobiologickému rozboru. Základní mikrobiologický

Tab. 4 Výsledky mikrobiologického rozboru

sýr	kráva, mazový	kráva	jak 1	jak 2
půda	log KTJ/g	log KTJ/g	log KTJ/g	log KTJ/g
KAA	*	> 6	7,55	< 1
M17	8,89	8,08	7,32	< 3
FHN	8,18	7,94	7,55	7,04
MRS 5.7	8,14	8,06	7,35	1,98
MRS 5.4	8,01	7,91	7,45	4,34
HHD	8,07	8,17	7,60	*
GLIM	5,30	8,07	4,60	*
MSA	> 6	> 6	6,86	3,56
SK	8,29	7,60	< 6	1,41
VČŽG	1,30	3,45	< 1	< 1
MALT	8,40	8,10	7,48	*
DG18	5,30	> 4	4,04	*
PITON	8,47	*	*	*

\* – nestanoveno

rozbor ukázal na relativně vysoké počty enterokoků ve dvou sýrech (ozn. kráva a jak 1), kdy počty přesahovaly  $1 \times 10^6$  KTJ/g sýru (Tab. 4). To odpovídá výskytu těchto mikroorganismů v řemeslných sýrech vyráběných především z nepasterovaného mléka, případně v sýrech vyráběných v oblastech jižní Evropy, kde jsou enterokoky součástí startovací kultury a sýrům dodávají specifickou chuť a barvu a díky produkci některých bakteriocinů také slouží jako ochranná mikrobiota proti některým kontaminantům (Foulquie' Moreno a kol., 2006, Franz a kol., 2003, Qiao a kol., 2019, Elkenany a kol., 2018).

Tab. 5 Izolované bakterie

ŘÁD	ČELEĎ	ROD	DRUH	VÝSKYT (mléko)
Actinomycetales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	<i>C. casei</i>	kráva
Bacillales	Staphylococcaceae	Staphylococcus	<i>S. equorum</i>	jak / kráva
			<i>S. carnosus</i>	jak
			<i>S. lugdunensis</i>	jak
			<i>S. saprophyticus</i>	kráva
Enterobacterales	Enterobacteriaceae	Escherichia	<i>E. coli</i>	kráva
	Morganellaceae	Morganella	<i>M. morgani</i>	kráva
Lactobacillales	Enterococcaceae	Bavariococcus	<i>B. seileri</i>	kráva
		Enterococcus	<i>E. faecalis</i>	kráva
			<i>E. faecium/durans</i>	jak
			<i>E. pseudoavium</i>	kráva
	Lactobacillaceae	Lactocaseibacillus	<i>L. paracasei</i>	jak / kráva
			<i>L. casei</i>	jak / kráva
			<i>L. rhamnosus</i>	kráva
			<i>L. rhamnosus/zeae</i>	kráva
		Lactiplantibacillus	<i>L. plantarum</i>	jak / kráva
		Lactobacillus	<i>L. delbruecki</i>	jak
	Lentilactobacillus	<i>L. parabuchneri</i>	kráva	
<i>L. parafarraginis</i>		kráva		
Streptococcaceae	Streptococcus	<i>S. macedonicus</i>	kráva	
Micrococcales	Brevibacteriaceae	Brevibacterium	<i>B. antiquum</i>	kráva
			<i>B. aurantiacum</i>	kráva
	Dermabacteraceae	Brachybacterium	<i>B. tyrofermentans</i>	kráva
Micrococcaceae	Rothia	<i>R. kristinae</i>	kráva	
Propionibacteriales	Propionibacteriaceae	Acidipropionibacterium	<i>A. acidipropionici</i>	kráva
		Propionibacterium	<i>P. freudenreichii</i>	kráva

Tab. 6 Studované izoláty

AKRONYM	MO (16S rRNA)	PŮVOD (mléko)	KULTIVACE		PROVEDENÉ TESTY			
			MEDIUM	PODMÍNKY	anti-mikrobiální interakce	anti-fungální interakce	GIT přežití	ATB rezistence
2023-4	<i>Streptococcus macedonicus</i>	kráva	M17	30 °C, A	x	x	*	*
2023-7	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> (ssp. <i>paracasei</i> )	jak	MRS	30 °C, AN	x	x	x	x
2023-8	<i>Enterococcus faecium/durans</i>	jak	M17	30 °C, A	x	x	*	x
2023-9	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> (ssp. <i>tolerans</i> )	jak	MRS	30 °C, AN	x	x	x	x
2023-10	<i>Enterococcus faecalis</i>	kráva	M17	30 °C, A	x	x	*	x
2023-13	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> (ssp. <i>neurčen</i> )	kráva	MRS	30 °C, AN	x	x	x	x
2023-15	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> (ssp. <i>neurčen</i> )	jak	MRS	30 °C, AN	x	x	x	x
2023-16	<i>Lactocaseibacillus casei</i>	jak	MRS	30 °C, AN	x	x	x	x
2023-26	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>	kráva	MRS	30 °C, AN	x	x	x	*
2023-69	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	jak	MRS	30 °C, AN	x	x	x	x
2023-70	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	kráva	MRS	30 °C, AN	x	x	x	x

\* – dosud nestanovené

Naproti tomu v druhém sýru z jačího mléka nebyl výskyt enterokoků pozorován a tento sýr odpovídal typově sýru střední až severní Evropy, kde enterokoky nejsou součástí startovací kultury a jejich výskyt je spíše považován za nežádoucí. Ve třech sýrech byl pozorován vysoký počet laktokoků (M17 agar), jelikož laktokoky bývají součástí startovacích kultur. Ve všech sýrech byl pozorován vysoký výskyt divokých laktobacilů, kdy na půdě FHN, ale i MRS a HHD byl nárůst kolonií i více jak  $1 \times 10^7$  KTJ/g sýru, což odpovídá již dříve pozorovaným výsledkům u sýrů z podobných oblastí (Neupaney a kol., 1997, Prashant a kol., 2009) a také bakterií *Propionibacterium*

(GLIM agar). Dále byl ve třech sýrech pozorován vysoký počet mikokoků a stafylokoků (MSA a SK agar) a v jednom sýru i vysoký výskyt bakterií z čeledi *Enetobacteriaceae* (VČŽG agar). Stejně jako dříve pozorovali Panda a kolegové (2016), i výskyt kvasinek byl relativně vysoký ve všech sýrech, i u těch, které nezrály pod mazem. Vzhledem k tomu, že nemohlo být zajištěno naprosto aseptické prostředí během odběru sýrů, ke kontaminaci těmito organismy však mohlo dojít i sekundárně.

Z ploten s různými agary bylo celkem získáno cca 200 různých izolátů, z toho cca polovina byla na základě homologie sekvence 16S rDNA přiřazena k příslušnému druhu. Souhrn izolovaných druhů a popis, zda byl mikrob zaznamenán v sýru z mléka kravského, nebo z mléka jačího, je uveden v Tab. 5. Laktokoky v tabulce zaznamenány nejsou, ač se v sýrech vyskytovaly. Nejdominantnější izolovanou skupinou byly BMK, především laktobacily *Lactocaseibacil-*



Tab. 7 Výsledky antimikrobiální aktivity

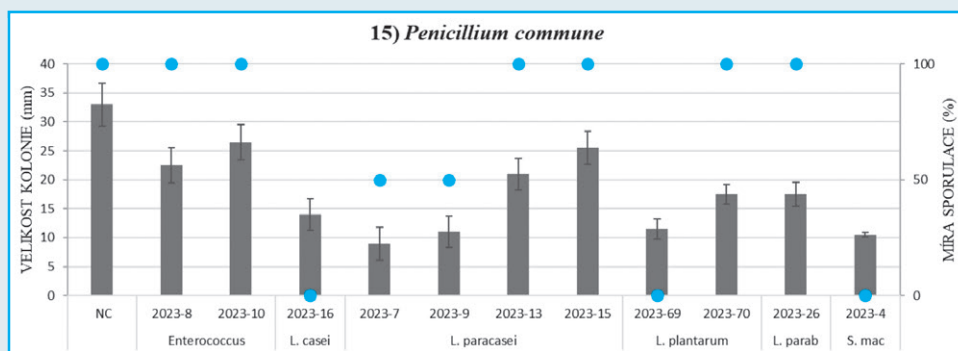
MO	AKRONYM		1)	2)	3)	4)	5)	6)	8)	9)	10)	11)	12)	13)	14)	SKÓRE	
<i>Enterococcus</i>	2023-8	inhibice	4	4	4	4	1	2	4	4	4	4	1	4	4	3,38	
		zona v mm					4	3					7				
	2023-10	inhibice	4	4	3	3	4	4	4	4	4	4	4	1	4	4	3,62
		zona v mm			2	2								7			
<i>L. casei</i>	2023-16	inhibice	4	2	3	3	2	1	1	4	2	3	1	3	2	2,38	
		zona v mm		3	4	4	3	3	2		3	5	9	4	3		
<i>L. paracasei</i>	2023-7	inhibice	3	3	3	3	1	1	1	4	2	3	1	3	3	2,38	
		zona v mm	1	1	4	5	3	2	3		3	4	9	3	3		
	2023-9	inhibice	3	3	3	3	2	1	4	4	2	4	1	3	4	2,85	
		zona v mm	1	1	3	3	3	3			1		8	3			
	2023-13	inhibice	4	4	3	3	1	1	4	4	2	4	1	3	4	2,92	
		zona v mm			5	5	3	3			2		7	3			
	2023-15	inhibice	4	4	3	3	1	1	4	4	4	4	3	1	3	4	3,00
		zona v mm			4	4	3	3					3	6	4		
<i>L. plantarum</i>	2023-69	inhibice	2	2	3	3	*	2	2	2	1	*	1	2	3	2,09	
		zona v mm	3	3	3	3		3	4	7	4		10	4	4		
	2023-70	inhibice	2	3	3	3	*	3	1	3	2	*	1	2	3	2,36	
		zona v mm	3	3	3	2		4	2	3	3		10	3	3		
<i>L. parab</i>	2023-26	inhibice	*	*	2	2	2	*	*	1	*	1	2	*	*	1,67	
		zona v mm			3	4	2			2		2	7				
<i>S. mac</i>	2023-4	inhibice	4	4	3	3	2	3	4	4	4	4	1	4	4	3,38	
		zona v mm			3	3	3	3					4				

Legenda: 1 – inhibice, zona čirá bez kolonií, 2 – inhibice, zona čirá s menším množstvím kolonií, 3 – inhibice, zona s větším množstvím kolonií, 4 – bez inhibice, růst není ovlivněn, \* – dosud nestanovené

*l. paracasei*, kdy dva izoláty byly na základě homologie sekvence 16S rDNA určeny i do poddruhu (Tab. 6), dále *L. casei*, *L. rhamnosus*, přičemž u jednoho izolátu nelze na základě získané sekvence z 16S rDNA určit, zda se jedná o *L. rhamnosus*, či *L. zaeae*. Dále byly izolovány bakterie *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lentilactobacillus parabuchneri* a *L. parafarraginis*. Z dalších

BMK to byly *Bavariicoccus seileri*, enterokoky *Enterococcus faecalis*, *E. pseudoavium* a izolát označený jako *E. faecium/durans*, jelikož se nám doposud nepodařilo na základě sekvenovaného úseku 16S rDNA určit přesný druh tohoto enterokoka. V neposlední řadě byl izolován *Streptococcus macedonicus*, který byl dříve izolován i z řeckého sýra (De Vuyst a kol., 2008). Jedenáct izolátů bylo vybráno k dalším testům (Tab. 6).

Bylo sledováno, zda dojde k potlačení růstu 13 různých kontaminantů mléčných výrobků a plísně *P. commune*. Největší inhibiční potenciál vykázal izolát *L. parabuchneri*, jehož průměrné inhibiční skóre bylo nejnižší (Tab. 7), ovšem dosud nebyly testovány interakce tohoto mikroorganismu se všemi indikátorovými kmeny. Dále vykázaly relativně vysoký potenciál oba testované izoláty *L. plantarum*, izolát *L. paracasei* 2023-7 a *L. casei* 2023-16. Bylo



Obr. 1 Antifungální aktivita studovaných izolátů. Ovlivnění růstu a sporulace *P. commune* po aplikaci bezbuněčných supernatantů do růstového agaru. NC – negativní kontrola (bez přidaného supernatantu do agaru); tmavě modré sloupčky – velikost kolonie *P. commune*; světle modré tečky – míra sporulace *P. commune*.

také sledováno ovlivnění růstu a sporulace plísně. Nejvíce byl růst plísně ovlivněn aplikací bezbuněčného supernatantu *L. paracasei*, izoláty 2023-7 a 2023-9, ovšem míra sporulace plísně byla ovlivněna jen z části (Obr. 1). Menší měrou byl ovlivněn růst plísně izoláty *L. paracasei* 2023-13 a 2023-15, kdy se ovšem míra sporulace plísně nelišila od kontrolní misky. Nejvíce byl růst plísně, a i její sporulace, ovlivněn *S. macedonicus* (izolát 2023-4), což koresponduje s již publikovanými výsledky, kdy u *S. macedonicus* izolovaného z řeckého sýra byla prokázána produkce bakteriocinu (De Vuyst a kol., 2008). Dále růst a sporulaci plísně značně ovlivnil *L. casei* (izolát 2023-16) a také *L. plantarum* 2023-69. Naproti tomu izolát *L. plantarum* 2023-70 ovlivnil pouze růst plísně, ne však míru sporulace, což koresponduje s dříve publikovanými výsledky, kdy izoláty *L. plantarum* získané z různých

**Tab. 8** Výsledky testu schopnosti přežití v žaludečním a duodenálním mediu

MO	AKRONYM	Růstové médium (LOG KTJ/ml)				Žaludeční médium (LOG KTJ/ml)				Duodenální médium (LOG KTJ/ml)			
		t (h)	0	0,5	1	2	0	0,5	1	2	0	0,5	1
<i>L. casei</i>	2023-16	6,44	6,47	6,47	6,58	6,44	<3	0	0	5,16	0	0	0
<i>L. paracasei</i>	2023-7	6,31	6,42	6,38	6,54	6,34	1,84	0	0	6,35	<1	0	0
	2023-9	6,45	6,56	6,55	6,61	6,50	<3	0	0	5,46	0	0	0
	2023-13	6,48	6,53	6,59	6,78	6,28	<3	0	0	*	*	*	*
	2023-15	5,87	6,02	6,02	6,06	5,05	<3	0	0	*	*	*	*
<i>L. plantarum</i>	2023-69	6,57	6,60	6,64	6,84	6,18	<4	0	0	7,01	7,06	7,08	6,71
	2023-70	7,14	7,13	7,08	7,28	7,11	<4	2,56	1,30	6,39	5,95	5,71	2,51
<i>L. parabuchneri</i>	2023-26	6,38	6,30	6,43	6,68	6,37	4,91	0	0	7,01	6,83	6,41	5,99

\* dosud nestanoveno

**Tab. 9** Výsledky přežití v prostředí se žlučovými solemi

MO	AKRONYM	0.den (LOG KTJ/ml)				1.den (LOG KTJ/ml)				2.den (LOG KTJ/ml)				3.den (LOG KTJ/ml)			
		0 %	0,3%	0,5%	1 %	0 %	0,3%	0,5%	1 %	0 %	0,3%	0,5%	1 %	0 %	0,3%	0,5%	1 %
<i>L. casei</i>	2023-16	7,05	6,97	6,62	5,27	9,15	8,65	7,98	5,85	8,52	8,06	8,06	7,59	8,11	7,30	7,15	6,33
<i>L. paracasei</i>	2023-7	6,35	6,18	5,34	4,41	8,07	7,44	6,73	5,26	7,98	6,75	6,00	4,85	7,67	6,11	5,88	5,61
	2023-9	6,65	6,29	5,68	5,06	8,64	7,81	7,92	7,84	8,33	7,02	6,19	5,61	8,11	5,88	4,26	4,13
	2023-13	6,32	6,31	6,09	5,02	7,65	6,82	6,28	4,55	7,40	6,21	6,66	6,16	7,31	5,86	6,13	5,39
	2023-15	6,35	5,81	4,90	3,85	8,90	8,29	8,29	7,99	8,68	5,13	5,64	7,17	8,13	3,34	3,15	5,00
<i>L. plantarum</i>	2023-69	6,67	6,35	6,35	6,40	8,17	5,95	5,43	5,49	7,96	3,58	3,35	3,59	7,54	2,78	2,63	2,51
	2023-70	7,24	7,06	7,08	7,18	8,55	6,95	5,74	5,74	8,39	2,23	2,60	1,30	8,35	2,85	2,00	<2
<i>L. parabuchneri</i>	2023-26	6,82	6,92	6,48	6,43	9,30	8,67	8,34	6,41	8,90	8,27	8,14	7,90	8,10	7,26	6,90	6,35
	235 (-)	5,78	5,69	5,21	4,90	7,00	4,81	4,17	2,71	7,05	4,11	4,04	2,71	7,30	3,36	3,93	1,43
	406 (+)	5,55	5,50	5,44	5,38	7,35	7,13	7,37	7,52	6,82	6,33	6,15	6,27	6,83	6,27	6,12	6,21

**Tab. 10** Výsledky testování senzitivity k vybraným antibiotikům

ATB	Enterococcus		<i>L. casei</i>	<i>L. paracasei</i>				<i>L. plantarum</i>	
	2023-8	2023-10	2023-16	2023-7	2023-9	2023-13	2023-15	2023-69	2023-70
AMI	1	1	0	0	0	0	0	0	0
AMP	1	1	1	2	2	2	1	1	2
CEF	2	1	1	2	1	2	1	1	2
CIP	2	1	1	1	1	2	1	0	0
CLI	2	1	1	2	2	3	1	1	1
ERY	2	1	2	3	2	3	2	1	2
GEN	1	1	1	1	1	1	0	1	1
CHL	2	1	2	2	2	3	2	2	2
KAN	1	1	0	0	0	0	0	0	0
LEV	2	1	3	1	1	2	1	1	1
MET	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MUP	2	2	2	2	2	3	2	2	2
NA	1	1	0	0	0	0	0	0	0
NEO	1	1	0	0	0	0	0	0	0
NOV	2	1	1	1	2	2	1	1	1
OXC	0	0	0	1	1	0	1	1	1
PEN	2	1	1	2	2	3	2	1	2
STR	1	1	1	1	1	2	1	1	1
TET	2	1	1	1	2	3	1	1	1
VAN	1	1	0	0	0	0	0	0	0
AMX	2	2	2	3	2	3	2	2	2

AMI – Amikacin, AMP – Ampicilin, CEF – Cefadroxil, CIP – Ciprofloxacín, CLI – Clindamycin, ERY – Erythromycin, GEN – Gentamycin, CHL – Chloramphenicol, KAN – Kanamycin, LEV – Levofloxacin, MET – Matronidazole, MUP – Mupirocin, NA – Nalidixová kyselina, NEO – Neomycin, NOV – Novobicoín, OXC – Oxacillin, PEN – Penicillin G, STR – Streptomycin, TET – Tetracyclin, VAN – Vankomycin, AMX – Amoxicillin, 0 – rezistentní, 1 – slabě senzitivní, 2 – senzitivní, 3 – velmi senzitivní

zdrojů ovlivnily růst plísni nestejnou měrou (Kavková a kol., 2022). Enterokoky nevykazovaly velký potenciál v potlačení růstu většiny indikátorových kmenů.

Dále byla testována schopnost přežití v gastrointestinálním prostředí. Z vybraných BMK ani jeden izolát nebyl schopen přežít více jak hodinu v žaludečním mediu, kdy počet životaschopných buněk u většiny již po půl hodině inkubace v mediu klesl pod  $1 \times 10^4$  buněk na 1 ml vzorku vyjma *L. parabuchnerii* izolátu 2023-26 (shrnutí Tab. 8). Naproti tomu v duodenálním mediu byly některé izoláty schopny přežít. Počet životaschopných buněk u *L. plantarum* izolátu 2023-70 byl vyšší než  $1 \times 10^5$  i po hodině inkubace v mediu, u izolátů 2023-69 (*L. plantarum*) a 2023-26 (*L. parabuchnerii*) byl jejich počet dokonce i po 2 hodinách inkubace v mediu cca  $1 \times 10^6$  KTJ/ml. Výsledky z testu tolerance vůči žlučovým solím ukazují, že většina z testovaných izolátů byla schopna přežít v prostředí se žlučovými solemi v koncentraci až 1 % žlučových solí w/v po dobu 3 dnů (souhrn výsledků v Tab. 9) a dva izoláty *L. paracasei* (2023-9 a 2023-15) byly dokonce i schopny růstu. U kmene sen-

zitivního na žlučové soli (CCDM 235), a sloužícího jako negativní kontrola, došlo k poklesu životaschopných buněk již po jednom dni růstu v prostředí se solemi. Naproti tomu kmen tolerantní ke žlučovým solím (CCDM 406), a sloužící jako pozitivní kontrola, byl dokonce i schopen růstu, když během prvního dne počet jeho životaschopných buněk vzrostl o dva řády. Z našich výsledků vyplývá, že *L. parabuchnerii* 2023-26 zatím ukázal největší probiotický potenciál z dosud testovaných izolátů, jelikož dokázal přežít nejdelší čas v mediích simulující GIT prostředí a v prostředí se žlučovými solemi.

Jako poslední byla testována citlivost k zvoleným antibiotikům. Pomocí difuzní metody jsme ukázali, že námi studované izoláty jsou citlivé k většině vybraných antibiotik, výjimku tvoří pouze metronidazol, ke kterému jsou všechny izoláty rezistentní (tab. 10). Celkově nejvíce rezistencí nesou *L. plantarum*, *L. paracasei* a *L. casei*, které jsou rezistentní vůči amikacinu, kanamycinu, nalidixové kyselině a vankomycinu, což odpovídá již známým faktům (Shao a kol., 2015) a dále neomycinu. Na druhou stranu ani u jednoho izolátu *L. plantarum* nebyla pozorována dříve popsána rezistence vůči streptomycinu (Klarin a kol., 2018). Izoláty *L. plantarum* jsou navíc rezistentní vůči ciprofloxacinu. Nejméně rezistencí pak dle našich výsledků nesly enterokoky, což ne zcela odpovídá závěrům některých studií, které uvádějí enterokoky izolované z potravin jako nositele genů ATB rezistence (Câmara a kol., 2020).

## Závěr

Ze vzorků nepálských sýrů bylo izolováno několik desítek izolátů. Vybrané izoláty byly na základně homologie sekvence 16S rDNA přiřazeny ke konkrétnímu druhu bakterie. K dalším pokusům bylo vybráno 11 izolátů BMK, u nichž byl předpoklad výskytu některých prospěšných funkčních vlastností. Dále u nich byla stanovena bezpečnost v rámci možného přenosu ATB rezistence. Na základě dosud provedených testů se ze zkoumaných izolátů jako nejperspektivnější ukazují *L. paracasei* 2023-7, *L. parabuchnerii* 2023-26, *L. plantarum* 2023-69 a 2023-70 a *S. macedonicus* 2023-4. Na druhou stranu vzhledem k možné produkci histaminu je však například použití *L. parabuchnerii* v mléčných produktech diskutabilní a bude potřeba dalších funkčních testů k ověření jeho možné aplikace do produktů.

## Poděkování

Tato práce mohla být uskutečněna díky finanční podpoře Národní agentury pro zemědělský výzkum MZe ČR (NAZV), s využitím institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace na základě rozhodnutí MZE-RO1424.

## Literatura

CÂMARA, S.P.A., DAPKEVICIUS, A., SILVA, C.C.G., MALCATA, F.X., DAPKEVICIUS, M.L.E. (2020): Artisanal Pico cheese as reservoir of *Enterococcus* species possessing virulence and antibiotic resistance properties: Implications for food safety. *Food Biotechnol.* 2020, 34, s. 25–41.

CLSI VET07 Performance standards for Antimicrobial Discs and Dislution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 6th edition, 2023, s. 164.

DE VUYST L., TSAKALIDOU E. (2008): *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations, *International Dairy Journal*, Volume 18, Issue 5, 2008, s. 476–485, ISSN 0958-6946

ELKENANY, R.M., ELSAYED, M.M., ELTAYSH, R.A., ZAKARIA, A.I., EL-BAZ, A.H. (2018): In vitro probiotic characteristics of *Enterococcus* species isolated from raw cow milk. *Int. J. Probiotics Prebiotics* 2018, 13, s. 117–126.

EUCAST <https://www.eucast.org>.

FOULQUIE' MORENO M.R., SARANTINOPOULOS P., TSAKALIDOU, E., DE VUYST, L. (2006): The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 2006, s. 106, 1–24.

FRANZ, C.M.A.P., STILES, M.E., SCHLEIFER, K.H., HOLZAPFEL, W.H. (2003): *Enterococci* in foods—a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 88, s. 105–122.

GIRAFFA, G. (2002): *Enterococci* from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* 2002, 26, s. 163–171.

KAVKOVÁ M., CIHLÁŘ J., DRÁB V., BAZALOVÁ O., DLOUHÁ Z. (2022): The Interactions among Isolates of *Lactiplantibacillus plantarum* and Dairy Yeast Contaminants: Towards Biocontrol Applications. *Fermentation* 2022, s. 8–14.

KLARIN B., LARSSON A., MOLIN G., JEPSSON B. (2018): Susceptibility to antibiotics in isolates of *Lactobacillus plantarum* RAPD-type Lp299v, harvested from antibiotic treated, critically ill patients after administration of probiotics. *Microbiology Open.* 2019;8:e642

LEYVA SALAS, M., MOUNIER, J., VALENCE, F., COTON, M., THIERRY, A., COTON, E. (2017): Antifungal microbial agents for food biopreservation – a review. *Microorganisms*, 2020;5, s. 1–35.

MORAN, J. C., CRANK, E. L., GHABBAN, H. A., & HORSBURGH, M. J. (2016): Deferred growth inhibition assay to quantify the effect of bacteria-derived antimicrobials on competition. *Journal of Visualized Experiments*, 115, s. 1–5. DOI: 10.3791/54437

NEUPANEY D., KIM J., ISHIOROSHI M. A SAMEJIMA K. (1997): "Study on Composition of Nepalese Cheeses, Yak Milk, and Yak Cheese Whey," *Milk Science*, Vol. 46, No. 2, 1997, pp. 95–102.

PANDA A., GHOSH K., RAY M., NANDI S.K., PARUA S. (MONDAL), BERA D., NATH SINGH S., DWIVEDI S.K., MONDAL K.C. (2016): Ethnic preparation and quality assessment of Chhurpi, a home-made cheese of Ladakh, India, *Journal of Ethnic Foods*, Volume 3, Issue 4, 2016, pp. 257–262, ISSN 2352-6181

PRASHANT, TOMAR, S.K., SINGH, R. *et al.* (2009): Phenotypic and genotypic characterization of lactobacilli from Churpi cheese. *Dairy Sci. Technol.*, 2009, s. 89, 531–540.

QIAO, X., DU, R., WANG, Y., HAN, Y., ZHOU, Z (2019): Isolation, characterisation and fermentation optimisation of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium*. *Waste Biomass Valorization* 2019, 11, s. 3173–3181.

SEDLÁČKOVÁ, P., HORÁČKOVÁ, Š., SHI, T., KOSOVÁ, M., PLOCKOVÁ, M., (2015): Two different methods for screening of bile salt hydrolase activity in *Lactobacillus* strains. *Czech J. Food Sci.* 2015,33, s. 13–18.

SHAO Y., ZHANG W., GUO H., PAN L., ZHANG H., SUN T. (2015): Comparative studies on antibiotic resistance in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*, *Food Control*, Volume 50, 2015, pp.250–258, ISSN 0956-7135.

YAN, F., POLK, D.B., (2011): Probiotics and immune health. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 2011, 27, s. 496–501.

YERLIKAYA, O., SAYGILI, D., AKPINAR, A. (2021): Evaluation of antimicrobial activity and antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from commercial yoghurt starter cultures. *Food Sci. Technol.* 2021, 41, s. 418–425. <https://doi.org/10.1590/fst.03920>

**Korespondující autor:** Ing. Miloslava Kavková, Ph.D.  
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a,  
160 00 Praha 6, e-mail: m.kavkova@vum-tabor.cz

Přijato do tisku: 23. 1. 2024

Lektorováno: 5. 2. 2024

## “GO JE ZAJÍMAVÉHO VE VĚDECKÉ LITERATUŘE”

Mléko a mléčné výrobky jsou neustále centrem pozornosti výzkumu. Výběr z vědecké literatury pro toto číslo zahrnuje následující publikace:

### Fermentace koncentráту syrovátkových bílkovin kmeny *Streptococcus thermophilus* uvolňuje peptidy s biologickými aktivitami

Solieri, L., Valentini, M., Cattivelli, A., Sola, L., Helal, A., Martini, S., Tagliacucchi, D. (2022): Fermentation of whey protein concentrate by *Streptococcus thermophilus* strains releases peptides with biological activities. *Process Biochemistry*, 121, s. 390–600.

Syrovátka je hlavním vedlejším produktem výroby sýrů a je vnímána jako látka znečišťující životní prostředí. K přeměně syrovátky na produkty s přidanou hodnotou, včetně koncentrátu syrovátkových bílkovin (WPC), se používají různé technologické postupy. Tato studie hodnotila schopnost dvou kmenů *Lactobacillus helveticus* a pěti kmenů *Streptococcus thermophilus*, izolovaných ze zákysu z přírodní syrovátky z výroby sýra Parmigiano Reggiano, fermentovat WPC a uvolňovat bioaktivní peptidy. WPC fermentovaný kmenem *S. thermophilus* RBC06 vykázal nejvyšší antioxidační aktivitu, stejně jako aktivitu enzymu konvertujícího angiotenzin (ACE) a aktivity inhibitorů dipeptyl-peptidázy 4 (DPP-4), které přinesla fermentace WPC kmeny *S. thermophilus* RBC 20 a RBN16. Peptidy uvolněné po fermentaci WPC byly profilovány necíleným peptidomickým přístupem. Bylo identifikováno několik bioaktivních peptidů, hlavně inhibitory enzymu konvertujícího angiotenzin a byly kvantifikovány antihypertenzní laktotripeptidy valine-proline-proline (VPP) a isoleucine-proline-proline ((IPP). Nejvíce VPP ( $12,8 \pm 0,5$  mg/L) produkoval *S. thermophilus* RBC06 a největší množství IPP ( $0,56 \pm 0,02$  mg/L) produkoval *S. thermophilus* RBN16. Tato studie ukázala možnost dalšího využívání *S. thermophilus* RBC06 jako nového producenta bioaktivních peptidů a pro vývoj syrovátkových nápojů se zlepšenými zdravými prospěšnými vlastnostmi.

### Fyziokemické a nutriční vlastnosti jogurtové emulze s lykopenem při skladování v chladu

Jie Chen, Chen-Hai-Yue Yuan, Wei-Chao-Li, Lei-Zhao, Yan-Bo Huang, Hai-Hang Li, Guang Liu, He Ni, Raiok, V. (2022): Physicochemical and nutritional properties of yogurt emulsion with lycopene during chilled storage. *Journal of Food Science and Technology*, 59, (10), s. 4037–404.

Lykopen je vysoce účinný antioxidant, který převládá mezi dietními karotenoidy. Jeho využití v potravinářství je však omezené kvůli jeho špatné rozpustnosti ve vodě a náchylnosti k oxidaci. Cílem tohoto výzkumu bylo enkapsulovat lykopen v jogurtu s použitím emulzní technologie ke zlepšení jeho stability během zpracování a skladování za účelem obohacení široce konzumovaného potravinářského produktu a zvýšení jeho nutriční hodnoty. Data z konfokální laserové mikroskopie ukázala, že začlenění olejových kapiček s emulgací nemělo negativní vliv na tvorbu a mikrostrukturu jogurtu. Synereze jogurtových vzorků fortifikovaných lykopenem byla zhruba dvojnásobná v porovnání s běžným jogurtem 7. den skladování; schopnost zadržovat vodu byla výrazně zvýšena během doby skladování u všech emulgovaných vzorků. Skladování navíc snížilo Turbiscan Stability Indices (TSI) u všech jogurtových vzorků, což naznačuje, že se fyzická stabilita při 4° C zlepšila. Emulgace vedla ke zvýšené oxidaci v důsledku zvýšeného obsahu oleje. Tento vliv však účinně omezila enkapsulace lykopenem, která účinně chránila olej od oxidace a zabránila (jeho) degradaci. Tato studie naznačuje, že emulgování je slibnou metodou enkapsulace lykopenem a může být využito pro vývoj jogurtů s požadovanými nutričními vlastnostmi.

### Potenciální role mléčných bioaktivních peptidů na serotonergní systém a osu střevo-mozek

Buey, Y., Layunta, E., Latorre, E., Mesonero, J.E. (2023): Potential role of milk bioactive peptides on the serotonergic system and the gut-brain axis. *International Dairy Journal*, 137, s. 105534.

Bioaktivní složky získané z mléka mají zdraví prospěšné účinky díky velkému počtu jejich biologických vlastností. Ačkoli fyziologickému významu některých z těchto látek dosud plně nerozumíme, panuje přesvědčení, že jak bílkoviny, tak bioaktivní peptidy jsou složkami, které zlepšují zdraví. Serotonin je klíčovým signálním neurotransmiterem v ose střevo-mozek, který kontroluje širokou škálu fyziologických funkcí a má tak velký význam pro regulaci neurobiologické a intestinální fyziologie. Tato práce se zabývá úlohami a způsoby, kterými by tyto bioaktivní peptidy získané z mléka mohly modulovat serotonergní funkce, protože jsou nově vznikajícím potenciálním terapeutickým adjuvans pro dietní modulaci poruch na ose střevo-mozek a tuto modulaci by mohl zprostředkovávat právě serotonin.