

STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH VLASTNOSTÍ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ LIDSKÉHO PŮVODU

Vladimír Dráb^{1*}, Laura Dymáčková², Eva Lavická², Nina Růžičková¹, Lenka Samcová², Miroslava Vilímková²

¹ Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke dvoru 12, 16000 Praha 6

² MILCOM a.s., Ke dvoru 12, 16000 Praha 6

* v.drab@vum-tabor.cz

Determination of antimicrobial activity of lactic acid bacteria of human origin

Abstrakt

Pomocí Rogosa agaru bylo ze stolice kojenců a dospělých jedinců izolováno 31 kmenů bakterií mléčného kvašení (30 zástupců rodu *Lactobacillus* a jeden zástupce rodu *Enterococcus*). Mezi izolovanými kmeny převažovaly laktobacily komplexu "*Lbc. casei*", "*Lbc. acidophilus*" a obligátně heterofermentativní laktobacily. U 13 kmenů byla prokázána přítomnost antimikrobiálně působících látek vůči indikátorovým kmenům z rodů *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Streptococcus*. Spektrum účinnosti bylo u většiny kmenů omezeno na blízké příbuzné druhy. Širší antimikrobiální spektrum bylo prokázáno u kmene RL22-P a *Enterococcus faecalis* RL27-VGA-7A2. U obou kmenů byl za antimikrobiální účinek odpovědný protein s molekulovou hmotností vyšší než 50 kDa.

Abstract

Thirty one strains of lactic acid bacteria (30 representatives of genus *Lactobacillus* and one representative of genus *Enterococcus*) were isolated from stool of suckling and adult persons using Rogosa agar. Lactobacilli of the complex "*Lbc. casei*", "*Lbc. acidophilus*" and obligatory heterofermentative lactobacilli predominate between isolated strains. Presence of antimicrobially active substances effective against indicator strains from genus *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Streptococcus* were observed in 13 strains. Spectrum of activity generally limited on nearly related species. Wider antimicrobial spectrum was observed in strain RL22-P and *Enterococcus faecalis* RL27-VGA-7A2. The protein with molecular weight higher than 50 kDa was responsible for antimicrobial effect of the both strains.

1. Úvod

Lze předpokládat, že v nadcházející éře funkčních, za zdravou výživu orientovaných potravin, budou probiotické mikrobiální kmeny jejich důležitou složkou. Nevyvážená

strava, antibiotická terapie a stres jsou faktory, které negativně ovlivňují přirozenou střevní mikroflóru. K jejímu obnovení přispívají zástupci probiotických mikroorganismů¹. Svému nositeli pomáhají rovněž dalšími užitečnými vlastnostmi např. pozitivním způsobem mohou ovlivňovat klinické projevy některých onemocnění², produkují vitaminy, mají antialergické účinky a ovlivňují imunitní systém¹. Rovněž metabolizují různé endogenní a exogenní sloučeniny, včetně prekancerogenních, či zabraňují kolonizaci střev patogenními mikroorganismy^{3,4}. Při hledání potenciálních probiotických kmenů se testuje především schopnost kmenů přežít průchod žaludkem a tenkým střevem, kolonizovat gastrointestinální trakt adhesí a růstem

Tab. 1 Výsledky identifikace získaných izolátů bakterií mléčného kvašení lidského původu pomocí biochemické identifikace (API 50CH) a PCR

Označení izolátu	Výsledek biochemické identifikace (API 50 CH)	PCR-rod	PCR-druh
RL1-P	<i>Lbc. rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc.rhamnosus</i>
RL2-P	<i>Lbc. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. gasseri</i>
RL3-P	<i>Lbc. rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. rhamnosus</i>
RL4-P	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. paracasei</i> / <i>Lbc. casei</i>
RL5-P	<i>Lbc. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. gasseri</i>
RL6-P	ND	<i>Lactobacillus</i>	ND
RL7-P	<i>Lbc. fermentum</i>	<i>Lactobacillus</i>	ND
RL8-P	<i>Lbc. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. gasseri</i>
RL9-P	<i>Lbc. rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc.rhamnosus</i>
RL10-P	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. paracasei</i> / <i>Lbc. casei</i>
RL11-P	<i>Lbc. rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. rhamnosus</i>
RL12-PA	<i>Lbc. fermentum</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. fermentum</i>
RL13-P	<i>Lbc. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. gasseri</i>
RL14-P	<i>Lbc. rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. rhamnosus</i>
RL15-P	<i>Lbc. salivarius</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. salivarius</i>
RL16-P	<i>Lbc. fermentum</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. fermentum</i>
RL17-P	<i>Lbc. rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. rhamnosus</i>
RL18-P	<i>Lbc. rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. rhamnosus</i>
RL19-P	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. paracasei</i> / <i>Lbc. casei</i>
RL20-P	<i>Lbc. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> / <i>Lbc. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. helveticus</i>
RL21-P	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. paracasei</i> / <i>Lbc. casei</i>
RL22-P	<i>Lbc. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. gasseri</i> / <i>Lbc. johnsonii</i>
RL23-P	<i>Lbc. fermentum</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. fermentum</i>
RL24-P	<i>Carnobacterium divergens</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. gasseri</i> / <i>Lbc. johnsonii</i>
RL25-P	<i>Lbc. fermentum</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. fermentum</i>
RL26-P	<i>Lbc. plantarum</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. plantarum</i>
RL27-P	<i>Lbc. fermentum</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. reuteri</i> / <i>Lbc. oris</i>
RL27-VGA-7A2	<i>Lbc. rhamnosus</i> (diplokoky!)	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
RL28-P	<i>Lbc. buchneri</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. reuteri</i> / <i>Lbc. oris</i>
RL29-P	<i>Lbc. rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. rhamnosus</i>
RL30-P	<i>Lbc. rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. rhamnosus</i>

Legenda: ND neurčeno

Tab. 2 Seznam použitých primerů pro rodově a druhově specifickou PCR a délka amplifikovaných PCR produktů

Rod, druh	Primery	Délka PCR produktu (bp)	Literatura
<i>Enterococcus</i>	E1, E2	733	8
<i>Ent. faecalis</i>	FL1, FL2	360	9
<i>Lactobacillus</i>	R16-1, LbLMA1-rev	cca 250	10
<i>Lbc. fermentum</i>	LfermF, LactoR	317	11
<i>Lbc. gasseri</i>	GasI, GasII	200-250	12
<i>Lbc. helveticus</i>	PeC _f , PeC _r , PeN _f , PeN _r , Tri _f , Tri _r (Fortina a kol., 2001)	524, 726, 918	13
<i>Lbc. johnsonii</i>	Joh16S1, Joh16S2	cca 780	12
<i>Lbc. paracasei</i> / <i>Lbc. casei</i>	IDL03R, IDL11F	727	14
<i>Lbc. plantarum</i>	Lb1, Lb2, LbPI1, LbPI2	cca 200, 253	15
<i>Lbc. reuteri</i>	IDL03R, IDL52F	1105	14
<i>Lbc. rhamnosus</i>	LU-5, Rhall	113	16
<i>Lbc. salivarius</i>	Lsal-1, Lsal-4	411	16

na sliznicích, či produkce antimikrobiálně působících látek. Cílem této práce bylo získat různé probiotické kmeny bakterií mléčného kvašení lidského původu a zjistit jejich případnou produkci antimikrobiálně působících látek.

2. Materiál a metody

2.1 Izolace kmenů

Pomocí Rogosa agaru (Oxoid CM 627, OXOID, Basingstoke, Velká Británie) byly izolovány bakterie mléčného kvašení ze stolice kojenců a dospělých lidí. Inkubace probíhala při 37 °C za mikroaerofilních podmínek. Jako laktobacily byly předběžně identifikovány grampozitivní, kataláza-negativní nesporeující pravidelné tyčinky. Získané izoláty byly dlouhodobě uchovávány při -70 °C v MRSC bujónu s 15 % glycerolu. Před použitím byly dvakrát za sebou zaočkovány do MRSC bujónu (MRS bujón Merck 1.10661 + 2g /l NaHCO₃) s 0,05 % L-cystein hydrochloridu a kultivovány při 37 °C do začátku stacionární fáze. Seznam získaných kmenů je uveden v tabulce 1.

2.2 Biochemická identifikace kmenů

Biochemická identifikace byla prováděna pomocí soupravy API 50 CH (bioMérieux, Francie) podle instrukcí

výrobce a dosažené výsledky byly vyhodnoceny pomocí software apiweb (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francie).

2.3 Identifikace pomocí rodově a druhově specifické PCR

Pro identifikaci kmenů pomocí rodově a druhově specifické PCR byla použita chromozomální DNA kmenů izolovaná pomocí komerčního kitu QIAamp Dneasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Německo). Intaktnost izolované DNA byla ověřena pomocí agarózy gelové elektroforézy a spektrofotometricky byla stanovena její koncentrace a čistota⁵. Velikost získaných ampliconů a použité primery jsou uvedeny v tabulce 2. Podmínky amplifikace a detekce PCR produktů jsou popsány ve výzkumné zprávě Drbohlava a kol.^{6,7}

2.4 Stanovení antimikrobiální aktivity izolovaných kmenů vůči bakteriím mléčného kvašení

Vliv jednotlivých kmenů na růst různých druhů bakterií mléčného kvašení byl testován agarovou difuzní metodou. Vybrané kmeny byly kultivovány v 16 % obnoveném odstředěném mléce s přísadkou 0,5 % kvasničného extraktu při 37 °C do začátku stacionární fáze. Poté byly bujón nebo sražené mléko odstředěny po dobu 15 minut při 9 000 g a 4 °C. Získaný supernatant byl upraven roztokem 20 % NaOH na pH 6,5, znovu odstředěn za stejných podmínek, supernatant sterilizován mikrofiltrací (0,22 μm) a skladován do doby použití při -70 °C. Jako indikátorové kmeny byly použity kmeny z rodů *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Streptococcus*. Příslušná živná půda (150 ml GTK-M nebo M17 agaru (Merck 1.15108) pro *Enterococcus*, *Lactococcus* a *Streptococcus*; MRS agar (Merck 1.10160) pro *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Pediococcus*) byla zaočkována 0,1 % indikátorového kmene a rozlita na Petriho misky o průměru 180 mm. V agaru byly po ztuhnutí vykrojeny otvory, do kterých bylo pipetováno 200 l supernatantu a plotny byly následně skladovány při teplotě 4-8 °C po dobu 3-4 hodin. Poté byly plotny kultivovány při optimální teplotě indikátorových kmenů do druhého dne za aerobních podmínek pro rody *Enterococcus*, *Lactococcus* a *Streptococcus* a za anaerobních podmínek pro ostatní rody. Velikost inhibiční zóny byla vypočtena podle vzorce: (průměr inhibiční zóny - 8 mm)/2.

Tab. 3 Počet inhibovaných z celkového počtu testovaných kmenů pro různé rody bakterií mléčného kvašení a bifidobakterie

Testované rody	RL2-P	RL14-P	RL15-P	RL17-P	RL20-P	RL22-P	RL23-P	RL24-P	RL25-P	RL26-P	RL27-P	RL27-VGA-7A2	RL30-P
<i>Bifidobacterium</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	0/1	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0	0/1	0/1
<i>Carnobacterium</i>	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
<i>Enterococcus</i>	0/2	1/4	0/2	0/5	1/5	1/5	0/5	1/4	0/5	0/5	0/4	2/4	0/3
<i>Lactobacillus</i>	2/104	4/137	4/135	3/127	9/162	47/175	1/136	8/170	1/142	8/136	2/124	40/132	2/135
<i>Lactococcus</i>	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/3	0/2	0/2	0/2	0/1	0/1	0/3	0/2
<i>Leuconostoc</i>	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/3	0/3	0/3	0/3	0/1	0/0	1/3	0/2
<i>Pediococcus</i>	0/4	0/4	0/4	0/5	0/5	0/5	0/4	0/5	0/4	0/4	0/4	1/5	0/4
<i>Streptococcus thermophilus</i>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	3/4	0/4	3/4	0/2	0/1	0/4	0/3

Legenda: počet inhibovaných / celkový počet testovaných kmenů

2.5 Stanovení povahy antimikrobiálně působících látek

Průkaz proteinové povahy antimikrobiálně působících látek byl testován pomocí několika různých testů. Nejdříve byl vyloučen možný inhibiční vliv peroxidu vodíku přidáním 2,4 mg katalázy (C9322, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) /ml neutralizovaného supernatantu a po 4 h kultivace při 37 °C byly porovnány inhibiční vlastnosti s kontrolním supernatantem vůči citlivému indikátorovému kmeni. Dále byl sledován vliv tepelného ošetření supernatantu (110 °C, 10 minut) a trypsinu (0,625 mg/ml supernatantu, 30 °C, 4 hodiny) na antimikrobiální aktivitu. Ultrafiltrační membrány Centricon (Millipore, Billerica, USA) s různou velikostí pórů (3000, 5000, 50000 Da) byly použity pro získání různých frakcí supernatantu a pomocí citlivého indikátorového kmene *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCM 7190^T byla následně testována přítomnost antimikrobiálně působících látek v jednotlivých frakcích.

3. Výsledky a diskuse

3.1. Izolace a identifikace kmenů

Mezi izolovanými kmeny převažovaly laktobacily komplexu "*Lbc. casei*", "*Lbc. acidophilus*" a obligátně heterofermentativní laktobacily - *Lbc. fermentum* a *Lbc. reuteri*/*Lbc. oris* (tabulka 1). Zastoupené druhy byly z gastrointestinálního traktu (GIT) izolovány také dalšími autory¹⁷.

3.2. Stanovení produkce antimikrobiálně působících látek u nově izolovaných probiotických kmenů laktobacilů.

V tabulce 3 jsou uvedeny výsledky testů antimikrobiálního působení kmenů bakterií mléčného kvašení izolovaných z lidské stolice vůči různým indikátorovým kmenům z různých rodů gram pozitivních bakterií. Kmeny RL2-P, RL15-P, RL17-P a RL27-P inhibovaly pouze několik kmenů laktobacilů především *Lbc. delbrueckii*, *Lbc. helveticus* či *Lbc. brevis*. Kmen *Lbc. rhamnosus* RL14-P inhiboval růst čtyř kmenů *Lbc. delbrueckii* a 1 kmene *Enterococcus durans*, zatímco u kmene RL30-P byla pozorována inhibice dvou kmenů *Lbc. delbrueckii*. Kmeny *Lbc. fermentum* RL23-P a RL25-P inhibovaly růst 3 kmenů *Streptococcus thermophilus* a kmene *Lbc. jensenii* LMG 6414^T. Růst 8 kmenů laktobacilů (*Lbc. delbrueckii*, *Lbc. helveticus*, *Lbc. reuteri*) byl inhibován supernatantem kmene *Lbc. plantarum* RL26-P. Jeden kmen z rodu *Enterococcus* a devět kmenů laktobacilů bylo inhibováno supernatantem *Lbc. helveticus* RL20-P. Pouze druh *Lbc. delbrueckii* (8 kmenů) a *Enterococcus faecalis* CCM 7000^T byl inhibován kmenem RL24-P. Supernatant kmene RL22-P inhiboval růst celkem 52 kmenů především z rodu *Lactobacillus* (druhy *Lbc. acidipiscis*, *Lbc. coryniformis*, *Lbc. delbrueckii*, *Lbc. helveticus*, *Lbc. jensenii*, *Lbc. johnsonii*, *Lbc. oris*, *Lbc. ruminis*) ale také některé kmeny z rodu *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* a *Streptococcus*. Celkem 40 kmenů laktobacilů (*Lbc. acidipiscis*, *Lbc. amylovorus*, *Lbc. delbrueckii*, *Lbc. hel-*

Tab. 4 Inhibiční vlastnosti neutralizovaných supernatantů po frakcionaci pomocí ultrafiltračních membrán vůči *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCM 7190^T

Kmen	Velikost inhibiční zóny (mm)			
	frakce >5000Da	frakce <5000Da	frakce <50000 Da	frakce >50000 Da
RL22-P	4,5	0	0	2**
RL27-VGA-7A2	5,5	0	0	4,5

veticus, *Lbc. ruminis*, *Lbc. sakei*), jakož i dva kmeny z rodu *Enterococcus* a po jednom z rodu *Lactococcus* a *Pedio-coccus* bylo inhibováno supernatantem kmene *Enterococcus faecalis* RL27-VGA-7A2.

Antimikrobiální aktivita kmenů RL22-P a RL27-VGA-7A2 nebyla ovlivněna působením katalázy. Ke ztrátě antimikrobiální aktivity došlo po 10 minutovém tepelném ošetření supernatantu při 110 °C a po přidavku trypsinu. Pomocí ultrafiltračních membrán s různou velikostí pórů bylo zjištěno, že antimikrobiální aktivita se u obou kmenů vyskytuje v proteinové frakci s velikostí nad 50 kDa (tabulka 4). U enterokoků byla antimikrobiální aktivita popsána u řady kmenů *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*. Většina charakterizovaných bakteriocinů patří do třídy II a je účinná vůči *Listeria monocytogenes*¹⁸. Molekulová hmotnost popsanych bakteriocinů u rodu *Enterococcus* ale nepřesahuje 10 kDa¹⁸, takže kmen *Enterococcus faecalis* RL27-VGA-7A2 zřejmě produkuje dosud nepopsaný bakteriocin.

Závěr

Z dosažených výsledků je patrné, že lidský gastrointestinální trakt je vhodným zdrojem bakterií mléčného kvašení s antimikrobiálními vlastnostmi. Z 31 kmenů izolovaných pomocí Rogosa agaru ze stolice jich 13 vykazovalo antimikrobiální vlastnosti vůči použitým indikátorovým kmenům. U většiny kmenů bylo spektrum účinnosti omezeno na blízké příbuzné druhy. Širší antimikrobiální spektrum bylo prokázáno u kmene RL22-P a *Enterococcus faecalis* RL27-VGA-7A2. U obou kmenů byl za antimikrobiální účinek odpovědný protein s molekulovou hmotností vyšší než 50 kDa.

Poděkování

Tato práce vznikla díky finanční podpoře projektu MŠMT MSM 2672286101 a MZe 1G58097. Autoři rovněž děkují pracovníkům Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky ČZU v Praze (Prof. Rada, Ing. Tománková) za poskytnutí kmenů izolovaných ze stolice kojenců a dospělých lidí.

Literatura

- Vaughan E. E., Mollet B. (1999): Probiotics in the new millenium, *Nahrung* **43**: 148-153.
- Rogelj I., Matijašič B. B., Majhenič A. Č., Stojković S. (2002): The survival and persistence of *Lactobacillus acidophilus* LF221 in different ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* **76**: 83-91.

3. Fuller R. (1989): Probiotics in man and animals. *J.Appl.Bacteriol.* **66**:365-378
4. Gibson G. R., Beatty E.R., Wang X., Cummings J.H. (1995): Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterol.* **108**: 975-982.
5. Sinden R. R. (1994): DNA Structure and Function, Academic Press, San Diego 1994, s. 34.
6. Drbohlav J., Elich O., Snášelová J., Roubal P., Černý V., Dráb V., Šalaková A. (2008): Výroční zpráva Výzkumného záměru MSM 2672286101 Mléko - významná součást zdravé a bezpečné výživy, Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha 2008
7. Drbohlav J., Elich O., Snášelová J., Roubal P., Černý V., Dráb V., Šalaková A. (2009): Výroční zpráva Výzkumného záměru MSM 2672286101 Mléko - významná součást zdravé a bezpečné výživy, Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha 2009
8. Deasy B.M., Rea M.C., Fitzgerald F., Cogan T.M., Beresford T.P. (2000): A Rapid PCR Method to Distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *System.Appl.Microbiol.* **23**: 510-522.
9. Jackson Ch.R., Fedorka-Cray P.J., Barrett J.B. (2004): Use of a Genus- and Species-Specific Multiplex PCR for Identification of Enterococci. *J.Clin.Microbiol.*, **42**:3558-3565.
10. Dubernet S., Desmasures N, Guéguen M. (2002): A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol Lett.* **214**: 271-275.
11. Byun R., Nadkarni M. A., Chmour K.-L., Martin F.E., Jacques N.A., Hunter N. (2004): Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 3128-3136.
12. Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K., Alatosava T. (2000): Detection and Identification of Gastrointestinal *Lactobacillus* Species by Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Species-Specific PCR Primers. *Appl. Environ.Microbiol.* **66**: 297-303.
13. Fortina M. G., Ricci G., Mora D., Parini C., Manachini P. L. (2001): Specific identification of *Lactobacillus helveticus* by PCR with *pepC*, *pepN* and *htrA* targeted primers. *FEMS Microbiol.Lett.* **198**: 85-89.
14. Kwon H. - S., Yang E. -H., Yeon S. -W., Kang B.-H., Kim T.-Y. (2004): Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiology Lett.* **239**:267-75.
15. Quere F., Deschamps A., Undaci M. C. (1997): DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* **82**: 783-790.
16. Song Y.-L., Kato N., Liu Ch.-X., Matsumiya Y., Kato H., Watanabe K. (2000): Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA innergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiol Lett.* **187** : 167-173.
17. Walter J. (2008): Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract:Implications for Fundamental and Biomedical Research. *Appl.Environ. Microbiol.* **74**:4985-4996.
18. Nes I.F., Diep D.B., Holo H. (2007): Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* **189**: 1189-1198.

Přijato do tisku 5.5.2009

Lektorováno 20.5.2009

VYUŽITÍ KYSELINY MLÉČNÉ ZE SYROVÁTKY PRO PŘÍPRAVU POLYLAKTÁTU A TVORBU BIODEGRADOVATELNÝCH PLASTŮ

Drbohlav J.¹, Šalaková A.¹, Sedlářík V.³, Nehyba A.², Cícvárek J.¹

¹ Milcom a.s. Praha

² VÚM s.r.o. Praha

³ Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Utilization of lactic acid bacteria from whey for preparing of polylactete and production of biodegraded plastics

Abstrakt

Při výrobě sýrů a tvarohů vzniká jako odpadní produkt syrovátka. Syrovátka je významná surovina obsahující celou řadu nutričních látek, které lze dále průmyslově využít. Jednou z možností využití je fermentace sladké syrovátky kmeny bakterií mléčného kvašení. Vznikající kyselina mléčná může být dále využita pro tvorbu gelů a fólií polymerací na polylaktát. V naší práci jsme se zaměřili na vytypování nejvhodnějších kmenů ze Sbírký mlékařských mikroorganismů pro fermentaci sladké syrovátky s požadavkem na tvorbu co nejvyššího množství kyseliny mléčné. Současně bylo provedeno porovnání s fermentací s mléčným substrátem. Byly zjištěny rozdíly mezi fermentacemi v různých substrátech a v rychlosti a hloubce prokysávání médií. Z širokého souboru kmenů byl vybrán kmen *Lactobacillus helveticus* CCDM 108 s nejvyšší produkcí kyseliny mléčné. Dobrou schopnost prokysávat sladkou syrovátku prokázaly i kmeny *Lbc. helveticus* CCDM 92, 98, 121, 122, 447.

Abstract

Whey as waste product occurs by cheese and quark production. The whey is a significant raw material containing a range of nutritional matters, which is possible industrial utilize. The fermentation of sweet way by the strains of

INFORMACE

CAMPINA - NEJVĚTŠÍ NĚMECKÝ VÝROBCE ŠKOLNÍHO MLÉKA

Campina vyrábí školní mléko pod značkou "Landliebe". Je to čerstvé mléko s prodlouženou trvanlivostí. 1 litr odtučněného mléka stojí ve škole v současné době 30 centů, mléčný smíšený nápoj (čokoládové s podílem 50 % trhu, vanilkové, jahodové a nově karamelové) se nabízí za 35 centů. EU subvencuje v současné době kg školního mléka nezávisle na obsahu tuku 18 centy. Do základních škol se mléko dodává denně, do školek a družin dva až třikrát týdně. Školky a družiny objednávají převážně 1 litrové lahve (zálohované) s čerstvým plnotučným mlékem nebo také mléko v kartonech nebo 10 litrové nádoby k čerpání nebo také H-mléko. Převažující obal pro základní školy je 0,25 l skleněná láhev, další školy mají v oblibě kartónové obaly nebo automaty. Týdně závod v Kolíně vyrábí ca 300 000 litrů školního mléka, což odpovídá asi 1 milionů obalových jednotek.

Dtsche Milchwirtschaft, 60, 2009, č.4 (ben)