

Příspěvek byl podporován prostředky projektů MŠMT INGO LA 09030, MSM 2678846201 a CZ.1.07/2.3.00/09.0081 a Národní referenční laboratoří pro syrové mléko Rapotín.

Literatura je k dispozici u autorů.

Přijato do tisku 28. 9. 2010

Lektorováno 8. 10. 2010

APLIKACE KMENŮ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ S TVORBOU EXOPOLYSACHARIDŮ DO MLÉKA RŮZNÝCH DRUHŮ A JEJICH VÝZNAM

Snášelová Jana, Zikán Vladimír, Srkalová Simona

Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o.

Application of lactic acid bacteria producing exopolysaccharides into different milk types and their importance

Abstrakt

Předložená práce obsahuje vybrané aspekty použití bakterií mléčného kvašení (LAB) s tvorbou exopolysacharidů (EPS) v lidské výživě a jejich význam. Jde především o výrobu fermentovaných výrobků z kravského, kozího i ovčího mléka, která je v posledních letech často spojována s použitím těchto mikrobiálních kmenů. Jejich přítomnost může příznivě ovlivnit reologické vlastnosti a texturu výrobku a v případě použití probiotických bakterií zvyšuje i nutriční hodnotu výrobku. Nyní jsou studovány i nové možnosti využití těchto kmenů v humánní medicíně.

Abstract

The literature retrieval includes select aspects of using of lactic acid bacteria (LAB) producing exopolysaccharides (EPS) in human nutrition and their importance. First of all it is production of fermented products from cow, goat and sheep milk, which is frequently connected with application of these microbiological strains. Their presence can positively influence rheological characters and texture of product and in case of probiotic bacteria also nutrition value is increased. At present new possibilities about application of these strains in human medicine are under study.

Základní charakteristika polysacharidů

Způsob tvorby a charakteristiku polysacharidů uvádí např. Turková, K. (2007). Polysacharidy (PS) jsou vysoce rozmanitou skupinou polymerů, lišící se molekulární hmot-

ností, typem vazeb, stupněm větvení a chemickou stavbou. Výsledkem je velký počet různých druhů biomolekul. Tato diverzita nabízí množství aplikací polysacharidových polymerů v potravinářském průmyslu a jako zdraví prospěšné látky. Všeobecně se PS dělí na strukturní a nestrukturní. Strukturní PS jsou součástí strukturních a stavebních materiálů u rostlin, hmyzu nebo bakterií (např. celulóza, pektin, chitin, murein). Nestrukturní PS (škrob, glykogen a inulin) většinou slouží jako zásobárny energie. Mnohé PS jsou využívány v potravinářském průmyslu jako zahušťovadla, stabilizátory, tvarovací a želatinační činidla. Jsou běžně získávány z rostlin (škrob, pektin) a mořských řas (alginát). PS mohou být syntetizovány nejen rostlinami a řasami, ale také mnoha druhy mikroorganismů, včetně kvasinek a bakterií. Schopnost produkovat PS je mezi bakteriemi značně rozšířená. Mohou jednak syntetizovat zásobní PS, jako glykogen, který se nachází v cytoplasmě, a jednak strukturní PS buněčné stěny. Jedná se o peptidoglykan a lipoteichoové kyseliny u grampozitivních bakterií a lipopolysacharidy (LPS) vnější membrány u gramnegativních bakterií.

Přehledné poznatky o biochemii, genetice a použití *Streptococcus thermophilus* s tvorbou exopolysacharidů (dále EPS) uvádí Broadbent, J.R. et al. (2003). Z jeho review vyplývá, že mnoho kmenů *Streptococcus thermophilus* syntetizuje extracelulární polysacharidy. Tyto molekuly mohou být produkovány jako slizovitý obal lehce připojený k buňce, nebo mohou být volně v médiu jako volný sliz (tzv. táhlovité polysacharidy). Přítomnost exopolysacharidů neprokázala žádnou prokazatelnou výhodu pro vlastní životaschopnost *Str. thermophilus* v mléce, ačkoli produkce EPS přináší typicky žádanou táhlovitou nebo viskózní texturu fermentovaného mléčného výrobku. Poslední práce také ukazují, že *Str. thermophilus* produkující exopolysacharidy může zvýšit funkční vlastnosti sýra Mozzarella, ale nemá vliv na fagorezistenci. Podle současných znalostí genetiky, fyziologie a funkčnosti bakteriálních EPS kmenů pokračuje jejich zkoumání a následně další nové aplikace EPS kmenů do mléčných výrobků, což souvisí s potřebami zpracovatelů mléka a požadavky spotřebitelů.

Složení tří druhů mlék

Složení mléka, zejména druhově odlišného, výrazně ovlivňuje vlastnosti fermentovaných výrobků, připravovaných za použití LAB s tvorbou EPS. Proto je dále uvedeno zastoupení majoritních složek kravského, kozího a ovčího mléka (viz tabulka 1, 2 a 3).

Sledováním vybraných parametrů mléka bílých krátkosrstých koz ze dvou farem v České republice se zabývala Přidalová, H. et al., (2009). U vzorků mléka

Tab. 1 Složení kravského mléka

Autor	Sušina %	Tuk %	Bílkoviny %	Laktóza %
Strmiska et al., 1983	12,5	3,75	3,27	4,70
Drbohlav, Vodičková, 2002	12,85	4,06	3,29	4,77
Kvapilík et al., 2008	-	3,90	3,33	4,84

Tab. 2 Složení kozího mléka

Autor	Sušina %	Tuk %	Bílkoviny %	Laktóza %
Strmiska et al., 1983	14,1	4,52	3,71	5,2
Drbohlav, Vodičková, 2002	12,97	4,14	3,56	4,45
Marková et al., 2008	11,60	3,54	2,94	-
Bucek a kol., 2007	-	3,33	3,05	4,57

Tab. 3 Složení ovčího mléka

Autor	Sušina %	Tuk %	Bílkoviny %	Laktóza %
Strmiska et al., 1983	19,0	7,31	5,97	4,9
Drbohlav, Vodičková, 2002	19,30	7,00	5,98	5,36
Bucek et al., 2009	-	6,11	5,82	4,8

pocházejících z kozí farmy "A" a domácího malochovu "B" byly zjištěny následující průměrné hodnoty (A/B): obsah bílkovin 27,80/31,60 g.l⁻¹, obsah tuku 30,60/37,20 g.l⁻¹, obsah laktózy 45,20/47,80 g.l⁻¹, obsah tukuprosté sušiny 78,40/85,10 g.l⁻¹, titrační kyselost 5,5/6,8 SH, syřitelnost 93/56 s, bod mrznutí (-0,550)/(-0,560) °C.

Z výsledků studie Dragounové, H. et al. (2005), která porovnávala ovčí mléko s mlékem kravským, vyplývá, že průměrný obsah tuku v ovčím mléce je cca o 58 % vyšší, obsah bílkovin o cca 44 % vyšší a laktózy cca o 10 % vyšší než v mléce kravském.

Jsou také prezentovány možné pozitivní vlivy výrobků z ovčího mléka na lidské zdraví. Kajaba et al. (2008) zdůrazňují význam vyššího obsahu syrovátkových bílkovin s vyrovnaným spektrem aminokyselin a bohatým podílem rozvětvených aminokyselin u ovčího mléka v porovnání s mlékem kravským. Z minerálních látek je pozitivně hodnocen vysoký obsah vápníku v ovčím mléce (cca 2,5 krát vyšší než u kravského mléka) a také správný poměr vápníku a fosforu.

Tabulky 4 a 5 uvádějí srovnání vybraných složek tří druhů mléka podle Domagala (2008) a Kajaby, I. et al. (1983).

Důležitým fyzikálním ukazatelem kvality mléka je bod mrznutí. Tomu věnovali pozornost autoři Genčurová et al. (2008), kteří po dobu tří let v letní a zimní sezoně sledovali vztah mezi bodem mrznutí, složením a vlastnostmi kozího a kravského mléka. Z výsledků je zjevné, že zjištěný průměrný bod mrznutí kozího mléka (-0,5544) °C je nižší než hodnota (-0,5221) °C pro kravské mléko. Významné vztahy hodnocené např. korelačními koeficienty byly pozorovány mezi bodem mrznutí kozího mléka a tukem, sušinou, kaseinem, močovinou a vápníkem.

Macek et al. (2008) sledovali na vzorcích z prvních dvou třetin laktace zimní a letní sezony vztah mezi bodem mrznutí, složením a vlastnostmi ovčího a kravského mléka. Ovčí mléko vykázalo nižší hodnotu bodu mrznutí (-0,6048) °C než mléko kravské (-0,5221) °C. Byly pozorovány vý-

znamné vztahy hodnocené korelačním koeficientem mezi bodem mrznutí ovčího mléka a laktózou (což je podle autorů poněkud neobvyklé) a sušinou tukuprostou i dalších parametřů. U bodu mrznutí ovčího mléka bylo nalezeno více významných korelací než u kravského mléka.

Fermentace kravského, kozího a ovčího mléka LAB s tvorbou EPS

Ruas-Madiedo, P. et al., 2002 studovali funkčnost produkce EPS bakteriemi *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ve vztahu k viskozitě kysaného mléka. Kmeny bakterií mléčného kvašení, které produkují EPS, jsou využívány při výrobě fermentovaných výrobků, aby zlepšily jejich texturu a viskozitu. Dá se předpokládat, že molekulární vlastnosti, tj optická aktivita a molární hmotnost těchto polymerů hrají částečnou roli. Cílem studie bylo objasnit, zda viskozitní vlastnosti EPS ve vodném roztoku jsou v relaci s viskozitou kysaných mléčných výrobků. Proto byla pozornost zaměřena na vztah mezi molekulárními vlastnostmi EPS produkovanými několika kmeny *L. lactis* subsp. *cremoris* v mléce při třech inkubačních teplotách 20 °C, 25 °C a 30 °C na viskozitu kysaných produktů. Dalším sledováním závislosti koncentrace EPS na hodnotě viskozity fermentovaného mléka měřené metodou dle Posthumuse bylo zjištěno, že nejsou jasné vztahy mezi koncentrací EPS a viskozitou fermentovaného mléka. Jenom u kmene B35, který měl vyšší výtěžnost koncentrace EPS při nižší inkubační teplotě, se objevila přímá závislost s vyšší viskozitou fermentovaného mléka. Pro danou koncentraci EPS ve fermentovaném mléce byly nalezeny určité korelace mezi EPS viskozitními parametry (vnitřní viskozita, délka segmentu polymeru podle Kuhna a účinností zahušťování) a viskozitou získanou metodou podle Posthumuse.

Při studii byly použity čtyři EPS mezofilní kmeny *L. lactis* subsp. *cremoris* (B35, B39, B40 a B 891) ze sbírky NIZO. Viskozita fermentovaných mlék byla měřena při 5 °C kelímkovou metodou (tzv. Posthumus metoda).

Výzkumem reologických vlastností jogurtů z kravského mléka, vyrobených s kulturami lišícími se tvorbou EPS se ve své práci zabývali Kánský, J. et al. (2006). Tři jogurtové kultury (MY 092, J2 - slizovitá, RX-neslizovitá) byly použity ke studiu vlivu kultivačních podmínek: teplota 30 °C a 45 °C, finální pH 4,7; 4,5 a 4,3, obsah bílkovin 3,2 % na produkci EPS a reologické vlastnosti jogurtu (pevnost gelu, viskozita a tixotropie). Produkce EPS byla srovnatelná pro všechny tři kultury (okolo 40 mg/kg v substrátu obsahujícím 3,2 % bílkovin, 45 °C). U kultury J2 (slizovitá) byla produkce EPS nezávislá na podmínkách

Tab. 4 Složení kozího, kravského a ovčího syrového mléka

Druh	Celková sušina %	Celkové bílkoviny %	Kasein %	Syrovátkové bílkoviny %	Nebílkovinný dusík %	Tuk %	Laktóza %	popel %	Hustota g/cm ³	Viskozita mPas	Titrační kyselost SH	pH
Kozí	10,98	2,90	2,26	0,31	0,33	2,9	4,49	0,72	1,0270	1,77	6,7	6,66
Kravské	12,32	3,16	2,38	0,49	0,29	4,0	4,53	0,66	1,0290	2,36	7,1	6,69
Ovčí	15,61	5,20	4,25	0,84	0,11	4,7	4,87	0,96	1,0353	2,55	8,5	6,63

Tab. 5 Složení kravského, kozího a ovčího mléka

Složka ve 100 g	Jednotka	Mléko kravské	Mléko ovčí	Mléko kozí
Energie	kcal/kJ	64/268	95/398	61/255
Bílkoviny	g	3,3	5,4	3,5
Tuky	g	3,5	6,2	3,8
Sacharidy	g	4,7	4,5	3,3
Vápník	mg	121	180-220	150

Tab. 6 Reologické vlastnosti fermentovaného mléka

Fermentované mléko	Viskozita	Tuhost	Synereze
A	2325±388	11,7±0,68	570±83
B	1786±284	6,15±1,48	635±44
C	3012±300	25,2±0,98	508±76
D	4545±487	34,7±6,43	430±57

kultivace, zatímco u kultur RX a MY byla pro výnos EPS lepší delší kultivace při 30 °C. Z porovnání hodnot zdánlivé viskozity a míry tixotropie je patrná výrazně vyšší hodnota jak viskozity, tak tixotropie kultury J2, zatímco mezi kulturami RX a MY nebyl nalezen významný rozdíl.

Turková, K. (2007) uvádí, že množství EPS není tak důležité pro reologické vlastnosti jogurtu jako typ EPS a vzájemné interakce s mléčnými proteiny. Dokonce u některých jogurtů byla koncentrace EPS nízká a viskozita dosahovala nejvyšších hodnot u měřených vzorků jogurtů. Byla tak potvrzena hypotéza, že interakce EPS s mléčnými proteiny více ovlivňuje vlastnosti potraviny, než samotná koncentrace EPS.

Charakter kozího mléka je odlišný od kravského a proto výroba fermentovaných výrobků z kozího mléka je problematická z hlediska vyšší prokysávací schopnosti způsobené nižší pufrovací schopností kozího mléka. Kozí mléko obsahuje méně kaseinu než kravské a má velmi nízký nebo žádný obsah s1-kaseinu a vyšší množství dispergovaných kaseinových micel (Remeuf, F., & Lenoir, J. 1986).

Všechny tyto faktory mají vliv na reologické vlastnosti koagulátu kozího mléka, který je řídký než koagulát kravského mléka. Podle Martín-Diana, A.B. et al. (2003) je vhodné používat pro produkci fermentovaných výrobků z kozího mléka syrovátkové proteinové koncentráty a mikrobiální kmeny mléčných bakterií, které tvoří exopolysacharidy. Použití bílkovinných koncentrátů nebo EPS kmenů zvyšuje viskozitu a snižuje synerezi koagulátu kozího mléka.

Autoři Martín-Diana, A.B. et al. (2003) uvádějí výsledky v tabulce 6.

Rheologické vlastnosti (průměr a±SD): viskozita (cP), tuhost (g) a stupeň synerese (g kg⁻¹) fermentovaných vzorků mléka vyrobených z kravského mléka (A), kozího mléka (B) a kozího mléka s přidavkem 3 % koncentráty syrovátkových bílkovin (WPC), označeno C a 5 % WPC (D) po fermentačním procesu a 21 dnech skladování při 4 °C.

Z porovnání v této studii (Martín-Diana, A.B. et al. 2003) je zřejmé, že fermentované výrobky z kozího mléka vykazovaly vždy nejnižší hodnoty viskozity. Tito autoři porovnávali reologické vlastnosti a viskozity kravského a kozího mléka při současném použití koncentrátů syrovátkových

bílkovin a EPS kmenů. Zjištěné výsledky ukazují, že viskozita fermentovaných vzorků vyrobených z kozího mléka je podstatně nižší než pro kravské mléko. Reologické vlastnosti a synereze u produktů z kozího mléka se zlepšuje přidavkem syrovátkových bílkovin. Z toho lze usuzovat, že použití EPS kmenů, které kvalitativně zlepšují vzhled výrobku (vytvářejí dojem vyšší sušiny), má při přípravě fermentovaných výrobků a čerstvých sýrů z kozího mléka ještě větší význam než u mléka kravského.

Marková, M. et al., (2008) se zabývali vlivem vybraných kultur na technologii výroby a sensorické vlastnosti mléčného fermentovaného nápoje keřirového typu z kozího mléka dvou genetických variant α_{S1} -kaseinu FA a α_{S1} -kaseinu FF. Individuální vzorky mléka byly smíchány podle genetických variant α_{S1} -kaseinu a inokulovány. V průběhu fermentace byly stanoveny kysací křivky jednotlivých variant α_{S1} -kaseinu. U hotových výrobků bylo provedeno sensorické hodnocení chuti a konzistence. Výrobky byly skladovány 21 dní. Na konci doby skladování byly stanoveny počty bakterií mléčného kvašení a kvasinek a počty probiotického kmene *Enterococcus faecium*. Při sensorickém hodnocení chuti byla nejčastěji nejlépe hodnocena varianta α_{S1} -kaseinu FA. Použitím kultur s tvorbou exopolysacharidů bylo dosaženo velmi dobré konzistence u většiny vzorků.

U jogurtů připravených ve střední části laktační periody z ovčího mléka, a to v čerstvě připravených a také skladovaných 14 dní v chladu, byla instrumentální technikou prováděna měření pevnosti, lepivosti, extruze, synereze a mikrostruktury (Domagala, J. 2009). Produkt z kozího mléka byl charakteristický nižší pevností, lepivostí, a extruzí, ale vyšší synerezí než jogurt z kravského a ovčího mléka. Mikrostruktura jogurtu z kozího mléka byla jemnější, než u jogurtů z kravského a ovčího mléka. Z provedené studie vyplývá, že u jogurtu z kozího mléka je nutno modifikovat podmínky výroby, aby byl získán jogurt o správné konzistenci a redukovala se také synereze u finálního produktu.

Fyzikálně chemické a sensorické charakteristiky keříru z ovčího mléka v průběhu skladování sledovali Cais-Sokolinska, D., Dankow, R., Pikul, J. (2008). Ovčí mléko bylo inokulováno vybranými mléčnými kulturami, inkubováno při 23 °C (kultura DA) a 26 °C (kultura DC) po dobu 16-18 hodin dokud pH nedosáhlo 4,6. Počáteční titrační kyselost keříru vyrobeného s kulturou DA bylo o 14 % vyšší než u keříru vyrobeného s DC kulturou. Vyrobené keříry byly skladovány 21 dní v lednici. Po tomto skladování se objevily výrazné rozdíly titrační kyselosti a obsahu volných mastných kyselin, acetaldehydu a diacetylu. Keřír vyrobený s DC kulturou byl chutnější než s CA kulturou. Nejlepší sensorické hodnocení keřírů, bez ohledu na použítou kulturu, bylo po 7 dnech skladování.

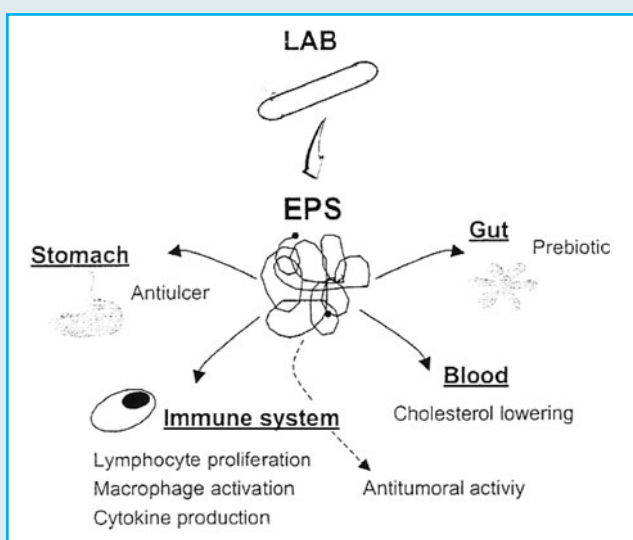
Zdravotní a nutriční aspekty fermentovaných produktů s EPS

V současnosti je zájem výzkumu EPS zaměřen spíše na zjištění struktury EPS, tvorbu jejich vzniku a technologické

využití zejména při výrobě fermentovaných mléčných produktů a čerstvých sýrů z kravského, kozího a ovčího mléka, ale stále více je také věnována pozornost zdravotnímu a nutričnímu benefitu kultur tvořících EPS. Mezi pozitivní zdravotní účinky kmenů mléčných bakterií produkujících EPS je řazen např. prebiotický efekt, imunostimulační a protinádorová aktivita, vytvářená některými kmeny rodu *Lactobacillus* a *Streptococcus*.

Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, P. (2002) studovali kromě funkčních vlastností i některé zdravotní benefity EPS kmenů, zejména protirakovinné a imunomodulační aktivity. Byly zjištěny i prebiotické účinky.

Uvedení autoři uvádějí následující schematické znázornění možných pozitivních podpůrných zdravotních vlivů EPS, produkovaných některými kmeny LAB:



Legenda: Stomach (antiulcer) - žaludek (podpůrný protivředový vliv)
 Gut (prebiotic) - střevo (podpůrný prebiotický vliv)
 Immune system - imunitní systém (podpůrný vliv na složky imunitního systému)
 Antitumoral aktivita - protinádorová aktivita
 Blood (Cholesterol lowering) - krev - snižování cholesterolu

Imunomodulační efekt *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 s tvorbou EPS studoval (Makino, S. et al, 2006). Extracelulární polysacharidy produkované bakteriemi mléčného kysání jsou spojovány s reologií, texturou a chutí fermentovaných mléčných výrobků včetně jogurtu. Tato studie zkoumá imunomodulační efekt EPS přečištěného ze supernatantu kultury *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. Supernatant kultury *L. bulgaricus* OLL1073R-1 s původním EPS byl upraven standardními chromatografickými metodami a pak byl frakcionován na neutrální EPS a EPS s kyselým charakterem (APS). EPS s kyselým charakterem (APS) byl následně rozdělen na vysokomolekulární frakci APS (H-APS) a nízkomolekulární frakci (L-APS). Vysokomolekulární frakce APS jsou polysacharidy obsahující D-glukozu, D-galaktozu, and fosfor. Stimulace myšičích splenocytů vysokomolekulární frakcí APS (H-APS) významně zvýšila produkci gama-interferonu a navíc orální podání H-APS rozšiřuje působení NK buněk (natural killer cells tzv. "přirození zabíječi").

Orální podávání jogurtu fermentovaného *L. bulgaricus* OLL1073R-1 a *Str. thermophilus* OLS3059 myším ukázal podobnou úroveň imunomodulace jako H-APS. Avšak tento efekt nebyl zjištěn u jogurtu fermentovaného kulturami *L. bulgaricus* OLL1256 a *Str. thermophilus* OLS3295. Z těchto experimentálních šetření byl učiněn závěr, že jogurt fermentovaný kmenem *L. bulgaricus* OLL1073R-1, obsahující imunostimulační EPS, by mohl mít imunomodulační efekt na lidské tělo.

Autoři Drbohlav et al. (2009) se zaměřili na vliv probiotických vlastností kyselinotvorných kultur, zejména na kmen *Enterococcus faecium* CCDM 922 (MILCOM a.s., Laktoflora®, 2003). V podmínkách in vivo formou metabolického testu, v návaznosti na klinickou studii konanou Státním zdravotním ústavem v Praze, byla provedena 3 měsíční šetření na kohortě zdravých lidí. Výsledky metabolického testu potvrdily, že konzumace pokusného mléčného výrobku s obsahem testovaného kmene *Enterococcus faecium* CCDM 922 o koncentraci 10^7 a příjmu 100 ml denně po dobu 3 měsíců má pozitivní vliv na krevní parametry a to na zvýšení hladiny HDL cholesterolu v krvi konzumenta, na snížení rizikovitosti onemocnění kardiovaskulárními onemocněními snížením poměru celkového a HDL cholesterolu a na snížení krevního tlaku konzumenta.

Tvorba EPS dalšími rody bakterií mléčného kvašení a následný vliv na konzistenci, nutriční hodnotu a zdravotní benefity je v současné literatuře rovněž zmiňována. Jako příklad lze uvést autory Yanping-Wang et al., (2008), kteří sledovali fyzikálně chemické vlastnosti EPS, v tomto případě identifikovaný jako glukogalaktan, produkovaný kmenem *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3, izolovaným z tibetských kefirových zrn.

Výše uvedené skutečnosti vypovídají o možných pozitivních podpůrných vlivech potravinových výrobků připravených za použití LAB s tvorbou EPS.

Zcela nový směr pak představuje výzkum přímých zdravotních účinků LAB s tvorbou EPS, který zahájili Deutsch, S.M., et al., (2008) na kmeni *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *germanii* TL 34 (CIP 103027), který tvoří EPS se slizovitým obalem lehce připojeným k buňce. PCR amplifikacemi byly zjišťovány možnosti navázání tohoto EPS na kmen *Streptococcus pneumoniae* typ 37 s cílem tvorby specifického antiséra pro humánní medicínu. Jak uvádějí samotní autoři, tento výzkum je teprve na počátku.

Možnosti využití bakterií mléčného kvašení s tvorbou exopolysacharidů pro zlepšení hodnoty potravin mléčného i nemléčného původu jsou stále rozšiřovány, stejně jako přímá aplikace těchto kmenů v humánní medicíně.

Poděkování

Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (výzkumný záměr MSM2672286101).

Literatura je k dispozici u autorů.

Přijato do tisku 10. 8. 2010

Lektorováno 6. 9. 2010