

Závěr

Při analýzách byla změřena spektra bílých i ochucených jogurtů. Posuzován byl vliv teploty, síly sáčku určeného k měření vzorků a také vliv příchutí. Pomocí metody diskriminační analýzy byl potvrzen vliv teploty i síly měřicího materiálu na přesnost měření vzorků jogurtů při NIR spektrometrické analýze. Kalibrační modely je nutno měřit při jedné stálé teplotě nebo vytvořit kalibrační modely pro dané teploty, při kterých chce analytik sledovat jakost jogurtů, stejně jako držet standard v použitých transparentních materiálech, na kterých je vzorek měřen. Diskriminační analýza bezpečně rozdělila také spektra ochucených jogurtů. Je proto vhodné používat samostatné kalibrace pro homogenizované jogurty s jednotlivými příchutěmi.

Poděkování

Příspěvek byl zpracován s podporou projektu NAZV KUS QJ1210302 "Technologické postupy a složení mléčných výrobků umožňující prodloužení údržnosti, zvýšení bezpečnosti nebo zvýšení nutričních a zdravotních benefitů prostřednictvím bioaktivních látek přirozeně se vyskytujících v potravinách".

Korespondenční adresa: prof. Ing. Květoslava Šustová, Ph.D. Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav technologie potravin, Zemědělská 1, 613 00 Brno, e-mail: sustova@mendelu.cz

Literatura:

- CENTER, V. (1999): Near infrared spectroscopy (NIR) and his technology application. *CHEMAGAZIN*, 9, vol.1, p. 22-23.
- ČURDA, L., KUKAČKOVÁ, O., NOVOTNÁ, M. (2002): NIR spektroskopie a jeho využití při analýze mléka a mléčných výrobků. *Chem. Listy*, 96, p. 305 - 310.
- Firma Nicodrom, (1997): *TQ Analyst - vývoj kalibračního modelu pro kvantitativní stanovení pomocí algoritmu PLS*. Firemní literatura, 13 s.
- JINDŘICH, J.: *Možnosti uplatnění NIR analyzátorů v mlékařenské laboratorní kontrole* - diplomová práce, VŠCHT Praha, 1997, 89 s.
- MELOUN, M., FREISLEBEN, J. (2008): *Klasifikace podzemních vod diskriminační analýzou*. Databáze online (cit 2010-5-6). Dostupné na: <http://meloun.upce.cz/docs/publication/197-manus.pdf>.
- MELOUN, M., MILITKÝ, J. (1991): *Chemometrie - zpracování experimentálních dat na IBM-PC*. Praha, 384 s. typové číslo L16-EI-IV-85/62 256.
- RODRIGUEZ-OTERO, J.L., HERMIDA, M. (1996): Analysis of Fermented Milk Products by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *J. of AOAC Internat.*, 79, 3, p. 817-821.
- RODRIGUEZ-OTERO, J., L., HERMIDA, M., CENTENO, J. (1997): Analysis of Dairy Products by Near-Infrared Spectroscopy: A Review. *J. Agric. Food Chem.*, 5(8), p. 2815-2818.
- ŠIKOLA, J. (2002): NIR spektroskopie - perspektivní metoda pro kvalitativní a kvantitativní analýzu v potravinách. *Kvalita potravin*, 2 (4), 18-19.

Přijato do tisku: 9. 3. 2015

Lektorováno: 29. 3. 2015

RŮST A ANTIMIKROBIÁLNÍ VLASTNOSTI BIFIDOBACTERIÍ A LAKTOBACILŮ LIDSKÉHO PŮVODU

Eva Suchanová,

Výzkumný ústav mlékařenský s.r.o., Soběslavská 841, 390 02 Tábor, E-mail: e.suchanova@vum-tabor.cz

Growth and antimicrobial properties *Bifidobacterium* sp. and *Lactobacillus* sp. of human body

Abstrakt

Laktobacily a bifidobakteria jsou přirozenou součástí lidského gastrointestinálního traktu. Jejich antimikrobiální vlastnosti pomáhají udržovat rovnováhu v těle. Interakce mezi čtrnácti druhy rodu *Lactobacillus* sp., dvaceti sedmi druhy rodu *Bifidobacterium* sp. izolovaných z lidského gastrointestinálního traktu a indikátorovými kmeny byly sledovány pomocí jamkové difúzní metody. Cílem experimentu bylo porovnat vliv rodového a druhového spektra testovaných mikroorganismů a také vyhodnotit vhodnou formu jejich aplikace. Významné antimikrobiální účinky vykazovaly živé buňky laktobacilů. Velmi slabý efekt na vznik difúzní zóny měly supernatanty z mléka sraženého bifidobakteriemi.

Růst bakterií mléčného kvašení byl testován v sýrovém extraktu z Moravského bloku (45 %). Bylo testováno všech 14 druhů rodu *Lactobacillus* sp. a 9 druhů rodu *Bifidobacterium* sp. *Bifidobakteria* a laktobacily v sýrovém extraktu rostou pouze s přidávkem 10 % roztoku galaktózy, laktózy, nebo ribózy.

Klíčová slova: laktobacily, bifidobakteria, antimikrobiální vlastnosti, sýrový extrakt

Abstract

The genera *Lactobacillus* sp. and *Bifidobacterium* sp. are well known natural microbiota of gastrointestinal tract of human and animals.

The health impact of *Lactobacillus* sp. and *Bifidobacterium* sp. is well documented in humans. Well-diffusion simultaneous antagonism method was used to test an antibiotic effect among fourteen species of *Lactobacillus* sp. and twenty seven species of *Bifidobacterium* sp. from human gastrointestinal tract.

The effect of application of bacterial suspensions, genera of bacteria and species of *Lactobacillus* sp. and *Bifidobacterium* sp. on indicator bacterial strains was evaluated. The most effective form of application showed to be suspension of life cells compare to supernatans from broth and skim milk medium. Particularly suspension of life cells belong to *Lactobacillus* sp. performed effective inhibitions against indicator bacterial strains.

The suitability of cheese extract "Moravský blok" (45%) for growth of fourteen species of *Lactobacillus* sp. and nine species of *Bifidobacterium* sp. was tested.

Their properties were observed and compared for individual strains. Properties of suspension of live cells, supernatants from broth and from recombinant skim milk were tested. *Bifidobacterium* sp. and *Lactobacillus* sp. were growing only when 10% solution of sugars galactose, lactose or ribose was added.

Key words: *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., antimicrobial properties, cheese extract

Úvod

Mezi mikroorganismy obecně dochází k mnohačetným interakcím, jako je například kompetice (Hibbing et al. 2010), antibióza nebo exploatace (Barefoot F., Nettles G. 1993). Tyto vztahy jsou předurčeny genetickou výbavou jednotlivých zástupců a potažmo jejich biochemickými produkty v kombinaci s vlivy prostředí. V kontextu s bakteriemi mléčného kvašení (LAB) je známa řada studií, které potvrzují jejich mikrobiální aktivitu vůči patogenním a jiným nežádoucím skupinám mikroorganismů, které například vyvolávají kazivost potravin (Perin et al. 2013; Dal Belo et al. 2010).

Bakterie mléčného kvašení reprezentují širokou skupinu grampozitivních, kataláza-negativních, spory netvořících tyčinek a koků. Obvykle jsou nepohyblivé a sacharidy fermentují. Konečným produktem jejich metabolismu je kyselina mléčná. S určitými výjimkami jsou aerotolerantní. Několik druhů je dobře známých pro jejich schopnost působit jako konzervační činidlo v potravinářských produktech jako je kyselé zelí, fermentované obilné kaše a luštěniny (Onilude et al. 2005). K ochraně potravin slouží buď jako přírodní mikroflora, nebo jako startovací kultury přidávané za kontrolovaných podmínek do výrobků. Konzervační účinek je způsoben produkcí organických kyselin (např. kyselina mléčná), které snižují pH. LAB produkují také antimikrobiální sloučeniny, jako jsou peroxid vodíku, oxid uhličitý, diacetyl, acetaldehyd, D-isomer aminokyselin, reuterin a bakteriociny (Yang et al. 2012).

Bakteriociny jsou krátkořetězcové peptidy jejichž variabilitu a antimikrobiální účinek ovlivňuje složení aminokyselin (Ortolani et al. 2010). Podle zastoupení aminokyselin pak například nisin může tvořit různě účinné varianty (Perin 2014; Nagao 2009). Bakteriociny jsou ribozomálně syntetizované antimikrobiální peptidy, které jsou aktivní vůči jiným bakteriím, buď stejného druhu (úzce spektrální), nebo různého druhu (široko spektrální). Mohou být produkovány grampozitivními i gramnegativními bakteriemi. V posledních letech mají důležitý význam bakteriociny produkované bakteriemi mléčného kvašení (Yang et al. 2012).

Bylo také zjištěno, že kromě bakterií mléčného kvašení, mají antagonistický charakter i kvasinky, plísně, probiotika a bakteriofágy (Erginkaya et al. 2011).

K hodnocení interakcí mezi mikroorganismy se používají "in vitro" biotesty (Grimoud et al. 2010), proteomické

a molekulární metody (Sheffield, Gavinski 2003). Jednou z "in vitro" metod je jamková difúzní metoda (Finn 1959), která umožňuje sledovat vizuálně primární interakce mezi mikroorganismy. Mikrobiální testy jsou kvalitativní, nebo semi-kvantitativní metody, které jsou založeny na specifické reakci mezi mikroorganismy (obvykle bakterie, aktinomyceety, kvasinky a plísně) a antibiotiky přítomnými ve vzorku (Cháfer-Pericás et al. 2010). Jamková difúzní metoda je založena na sledování vztahu mezi množstvím antibiotik vyskytujících se v místě pevného media (agaru) a průměru růstu inhibiční zóny (Awerbuch T. E., Stark A. A., 1979).

Hlavním cílem této studie bylo zjistit, zda se od sebe liší rod *Bifidobacterium* sp. a *Lactobacillus* sp. v rámci tvorby difúzních zón během "in vitro" testů s indikátorovými kmeny a zda tuto formu antibiózy ovlivňuje také příslušnost k jednotlivým druhům uvedených rodů. Rovněž bylo cílem prověřit, jaká forma aplikace je v rámci difúzního testu nejefektivnější v kombinaci s antimikrobiálními schopnostmi rodu a druhu těchto mikroorganismů. Dalším úkolem bylo experimentálně vyzkoušet, zda sýrový bujon má stejné, nebo alespoň podobné vlastnosti jako klasické živné médium.

Materiál a metodika

Použité kmeny

V Tab. 1 je uveden přehled použitých izolátů kmenů *Lactobacillus* sp. a *Bifidobacterium* sp. a indikátorových kmenů pro agarovou difúzní metodu. Uvedené izoláty pocházejí ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů Laktoflora®.

Příprava bezbuněčných supernatantů

Supernatanty z bujonů (supernatant 1)

Uvedené experimentální kmeny byly obnoveny z hlubokomraženého stavu (-70 °C) do 9 ml bujonu MRSC (MRS bujon + 2 g NaHCO₃/l) a kultivovány v termostatu 24 hodin na 37 °C. V případě bifidobakterií bylo do bujonu přidáno 1 % L-cystein (zásobní roztok 5 %). Kultury byly přeočkovány 1 % do 40 ml stejného bujonu, po inkubaci 24 hodin 37 °C byly odstředěny 6', 5000 g, 20 °C. Získané supernatanty byly slity do kádinek, pH bylo upraveno 15 % NaOH na hodnotu 6,5. Po úpravě byly všechny ponechány 30 minut při pokojové teplotě. Hotové supernatanty byly sterilovány mikrofiltrací přes filtr o velikosti pórů 0,20 μm do sterilních zkumavek. Vzorky byly uchovány v mrazicím boxu při -20 °C.

Supernatanty z obnoveného odstředěného mléka (supernatant 2)

Obnovené přeočkované kultury byly z bujonu přeočkovány 1 % do 40 ml 16 % RSMKA (obnovené odstředěné mléko s přísadkou 0,5 % kvasničného extraktu). Kultury byly kultivovány při 37 °C 24-48 hodin do nárůstu (sražení).

Sražená mléka byla odstředěna 10', 9000 g, 4 °C. Supernatant byl přelit do čisté falkony, znova odstředěn a filtrován přes filtrační papír. Pokud nebylo pH pod hodnotu

Tab. 1 Přehled použitých testovaných druhů rodů *Lactobacillus* sp. a *Bifidobacterium* sp. a indikátorových kmenů

Experimentální kmen	Izolát	Indikátorový kmen	Izolát
<i>Lactobacillus gasseri</i>	RL2-P, RL5-P, RL8-P, RL13-P, RL22-P, RL24-P	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	CCDM 235
<i>Lactobacillus helveticus</i>	RL20-P	<i>Lactobacillus helveticus</i>	CCDM 34
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	RL4-P, RL10-P, RL19-P	<i>Streptococcus thermophilus</i>	CCDM 45
<i>Lactobacillus plantarum</i>	RL26-P	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	CCDM 611
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	RL3-P, RL30-P	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	CCDM 613
<i>Lactobacillus salivarius</i>	RL15-P	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	CCDM 48
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	RB29-P, RB41-P, RB48-P, RB54-P	<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 4516
<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	RB1-MPP, RB26-P	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	CCDM 847
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	RB9-MPP, RB24-P, RB31-P, RB58-P, RB60-P, RB61-P, RB70-P	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	CCDM 269
<i>Bifidobacterium breve</i>	RB44-P, RB56-P	<i>Bacillus subtilis</i>	CCDM 665
<i>Bifidobacterium longum</i>	RB39-AP, RB53-P	<i>Micrococcus luteus</i>	CCDM 231
<i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>infantis</i>	RP25-P, RB38-BP	<i>Kocuria rosea</i>	CCDM 204
<i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>longum</i>	RB27-P, RB45-P, RB47-P, RB50-P, RB65-6A	<i>Brevibacterium linens</i>	CCDM 980
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	RB22-6A		
<i>Bifidobacterium</i> sp.	RB40-P, RB59-P		

Tab. 2 Indikátorové kmeny a podmínky jejich kultivace

Indikátorový kmen	Živná půda	Podmínky kultivace
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> (CCDM 235)	MRS 57	37 °C, AN
<i>Lactobacillus helveticus</i> (CCDM 34)	MRS 57	37 °C, AN
<i>Streptococcus thermophilus</i> (CCDM 45)	M17	37 °C, aer.
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> (CCDM 611)	MRS 57	30 °C, aer.
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> (CCDM 613)	M17	30 °C, aer.
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (CCDM 48)	M17	30 °C, aer.
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 4516)	M17	37 °C, aer.
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> (CCDM 547)	MRS 57	30 °C, aer.
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (CCDM 269)	Malt agar	25 °C, aer.
<i>Bacillus subtilis</i> (CCDM 665)	MPA	37 °C, aer. - šikmý agar
<i>Micrococcus luteus</i> (CCDM 231)	MPA	30 °C, aer. - šikmý agar
<i>Kocuria rosea</i> (CCDM 204)	MPA	30 °C, aer. - šikmý agar
<i>Brevibacterium linens</i> (CCDM 980)	ž. p. pro <i>B. linens</i>	25 °C, aer. - šikmý agar

5,0 bylo sníženo 80% kyselinou mléčnou a ponecháno 30 minut při pokojové teplotě. Následně bylo pH upraveno 15 % NaOH na 6,5 a vzorky ponechány 30 minut při pokojové teplotě. Celý postup se zvýšením pH 15 % NaOH na 6,5 byl opakován (bez tohoto procesu by vzorek nešlo sterilovat přes filtr o velikosti pórů 0,20 µm). Po uplynutí 30 minut byly supernatanty znovu odstředovány při stejných podmínkách a poté filtrovány přes filtrační papír. Další kroky byly stejné jako u supernatantu z bujonu.

Příprava indikátorových kultur

Indikátorové kmeny *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (CCDM 235) - *Kluyveromyces marxianus* (CCDM 269) uvedené v Tab. 2 byly součástí Sbírký mlékárenských mikroorganismů Laktoflora®. Po druhém přeočkování 1 % do 9 ml bujonu byly použity jako indikátorové kultury.

Kmeny *Bacillus subtilis* (CCDM 665) - *Brevibacterium linens* (CCDM 980) byly přeočovány na šikmý agar. Po

Tab. 3 Demonstrativní schéma rozdělení do skupin a jejich označení

Experimentální kmen (Izolát)	10 % galaktóza	10 % laktóza	10 % ribóza	Vzorek bez cukru
RL2-P	RL2-P + Gal.	RL2-P + Lakt.	RL2-P + Rib.	RL2-P
Kontrola	Kontr. + Gal.	Kontr. + Lakt.	Kontr. + Rib.	Kontr.

nárůstu byl proveden splach fyziologickým roztokem, který byl následně přidán do živné půdy.

Testování tvorby antimikrobiálních látek - jamková difuzní metoda

Na velkou Petriho misku bylo nalito 150 ml živné půdy s přidáním indikátorovým kmenem o množství 250 µl/100 ml živné půdy. Po zatuhnutí byly do půdy vykrájeny jamky o průměru 8 mm, do kterých bylo napipetováno 200 µl živé kultury nebo supernatantu z bujonu nebo z mléka. Poté byla miska uložena na 4 hodiny

do lednice. Po uplynutí této doby byla umístěna do inkubátoru o nastavené teplotě typické pro indikátorový kmen.

Výsledky byly odečítány po 24 hodinách. Míra inhibice byla označena stupnicí 1-5 (1 - bez inhibice, 2 - podpora růstu, 3 - slabě čirá zóna, 4 - čirá zóna s přechodem v okrajích, 5 - plná inhibice).

Příprava sýrového extraktu - PRLA bujon

Sýr Moravský blok 45 % (Madeta a. s.) o stáří 15 dnů a hmotnosti 1 kg byl rozemlet v mixeru Vorwerk a smíchán s deionizovanou vodou v poměru 1:3. Směs byla homogenizována v mixeru Ultra Turrax a poté byla 30' extrahována při 30 °C. Po uplynutí tohoto času byla tuková vrstva oddělena odstředěním v kyvetách 4000 g, 10' a 4 °C. Filtrace vodní fáze byla provedena nejprve přes hrubý filtr (filtr pro Fatran box na filtraci vzduchu) pro odstranění tuku. Poté byla provedena její sterilace 10' 80-85 °C ve vodní lázni a znovu filtrace přes hrubý filtr a dále přes filtr 6F/C. Následně byla provedena úprava obsahu laktátu a citrátu na jejich obsah v sýrech. Hodnota pH byla upravena 15 % NaOH na 5,45 a hotový bujon byl sterilován mikrofiltrací a poté rozplněn po 10 ml do sterilních zkumavek

Tab. 4 Metabolická produkce kyseliny mléčné a hodnoty absorbance naměřené při růstu vybraných testovaných druhů rodů *Lactobacillus* sp. v sýrovém bujonu

	Experimentální kmen (Izolát)		
	RL15-P+Gal.	RL19-P+Gal.	RL20-P+Gal.
Kys. mléčná (mg/100 g)	1666,318	2051,440	1098,845
Absorbance (nm)	1,3	1,7	0,8
	RL15-P+Lakt.	RL19-P+Lakt.	RL20-P+Lakt.
Kys. mléčná (mg/100 g)	1426,495	1933,785	2172,202
Absorbance (nm)	1,0	1,4	1,3
	RL15-P+Rib.	RL19-P+Rib.	RL20-P+Rib.
Kys. mléčná (mg/100 g)	1202,903	1693,326	245,308
Absorbance (nm)	0,5	1,4	0,03

Tab. 5 Vliv testovaných faktorů na tvorbu difúzní zóny. Faktory označené indexem* statisticky významně ovlivňovaly tvorbu difúzních zón. ANOVA hlavních komponent, Statistica software, verze 8.0, $p \leq 0,05$

faktor	df	F	p
Rod bakterie	1	5,87	0,03*
Forma aplikace	2	28,11	0,001*
druh	13	0,75	0,7

a uložen do lednice. Příprava sýrového bujonu byla provedena podle návodu (Program MZe QE 1382, odpovědný řešitel Ing. Vladimír Dráb, 2002).

Do sýrového bujonu byly zaočkovány 1 % všechny laktobacily a vybrané kmeny bifidobakterií (RB24-P, RB25-P, RB26-P, RB27-P, RB29-P, RB38-P, RB41-P, RB44-P, RB45-P). U bifidobakterií bylo do bujonu přidáno také 1 % L-cystein (5% zásobní roztok), aby bylo prostředí stejné jako u běžně používaného bujonu. Do zaočkovaných zkumavek byl přidán 1 ml 10% roztoku cukru: galaktóza, laktóza, maltóza a jedna skupina zůstala bez přidaného cukru. Ta sloužila pro porovnání výsledků. U každé skupiny s přidaným cukrem byl jeden vzorek nezaočkovaný, sloužící jako slepý vzorek (vysvětlení rozdělení do skupin uvedeno v Tabulce 3). Vzorky byly kultivovány při teplotě 37 °C a odebrány v časových intervalech (0., 3., 6., 10., 14., 21., 28. den). Růst mikroorganismů byl zjišťován pomocí spektrofotometru, kdy byla absorbance měřena při optické denzitě 650 nm. Pomocí kapilární izotachofórey (ITP) bylo zjišťováno množství kyseliny citronové, glutamové, mléčné a octové. Jejich koncentrace byla uvedena v mg/100 g. Tato metoda byla provedena pomocí postupů zavedených na pracovišti. Vybrané hodnoty množství kyseliny mléčné a naměřené absorbance jsou uvedeny v tabulce 4.

Zpracování dat

Získané údaje byly zpracovány statistickou metodou ANOVA (analýza variance) verzí pro mnohonásobná porovnávání a analýzou hlavních komponent (Paquet J. et al. 2000). Vyhodnocení statisticky odlišných variant bylo provedeno pomocí Post Hoc Tukey testu. Ke zpracování dat a grafickému vyhodnocení byl použit program Statistica

Tab. 6 Vliv testovaných faktorů pro rod *Lactobacillus* sp. a jejich kombinace na tvorbu difúzní zóny. Faktory označené indexem* statisticky významně ovlivňovaly tvorbu difúzních zón. ANOVA mnohonásobná porovnávání, Statistica software, Verze 8.0, $p \leq 0,05$

faktor	df	F	p
Forma aplikace	2	68,75	0,001*
druh	5	0,27	0,926
Aplikace vs. druh	10	1,27	0,300

Tab. 7 Vliv testovaných faktorů pro rod *Bifidobacterium* sp. a jejich kombinace na tvorbu difúzní zóny. Faktory označené indexem* statisticky významně ovlivňovaly tvorbu difúzních zón. ANOVA mnohonásobná porovnávání, Statistica software, Verze 8.0, $p \leq 0,05$

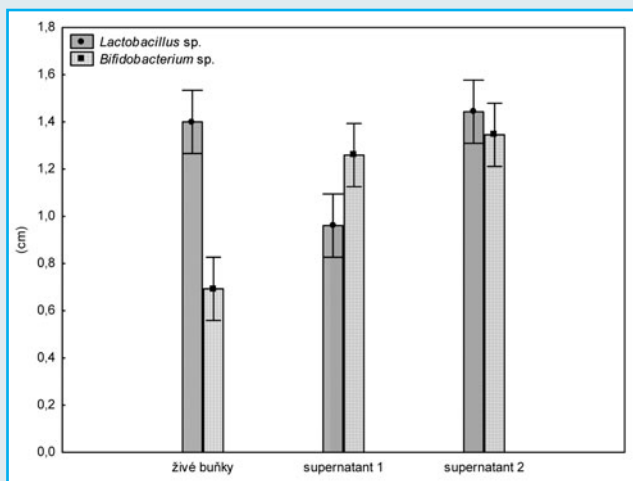
faktor	df	F	p
Forma aplikace	2	112,19	0,001*
druh	8	0,800	0,605
Aplikace vs. druh	16	3,213	0,001*

Software verze 8.0. Data byla testována při hladině významnosti $\alpha=0,05$.

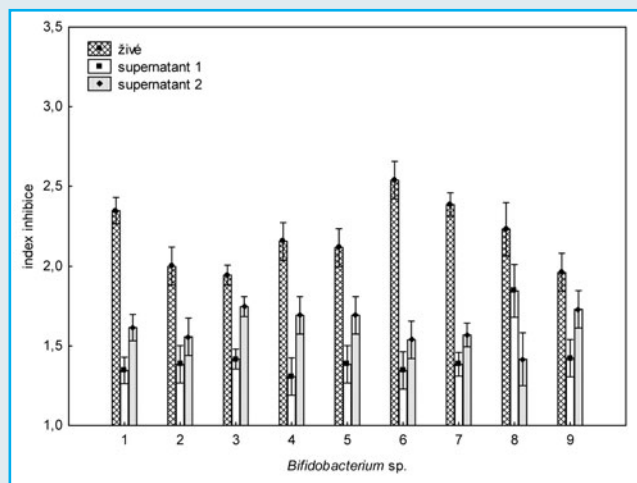
Výsledky a diskuze

Jamkové difúzní metoda

Při sledování antimikrobiálních účinků u rodu *Lactobacillus* sp. byl prokázán významně vyšší antimikrobiální účinek u živých buněk než u supernatantů z bujonu a mléka (Tabulka 6). Nejsilnější účinek byl zaznamenán u indikátorových kmenů *Lactobacillus helveticus* (CCDM 34), *Streptococcus thermophilus* (CCDM 45)



Obr. 1 Vyhodnocení vlivu druhů u rodů *Lactobacillus* sp. a *Bifidobacterium* sp. na tvorbu difúzní zóny (cm). Hodnota ve sloupci představuje průměr z měřených souborů ($N=42$) při třech opakování (Vícecestná ANOVA, Statistica software, Verze 8.0) ($F_{(2, 10,8)}=7,16$, $p \leq 0,01$); **živé buňky** = suspenze živých buněk v bujonu MRSC, **supernatant 1** = supernatant z bujonu MRSC, **supernatant 2** = supernatant z 16% obnoveného odstředěného mléka



Obr. 2 Vliv druhů rodu *Bifidobacterium* sp. na tvorbu difúzních zón s ohledem na formu aplikace ($F_{(16, 1,4)}=3,12, p \leq 0,001$); **živé buňky** = suspenze živých buněk v bujonu, **supernatant 1** = supernatant z bujonu MRSC, **supernatant 2** = supernatant z 16% obnoveného odstředěného mléka, index inhibice = velikost inhibiční zóny podle stanovené stupnice

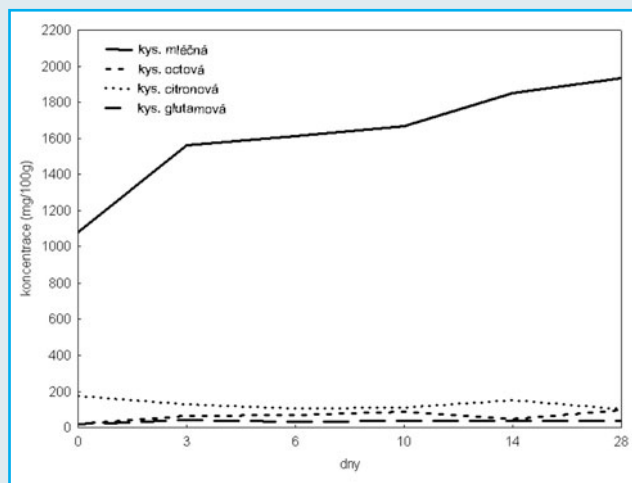
a *Kocuria rosea* (CCDM 204), u kterých byla inhibice zaznamenána ve všech případech. Z těchto výsledků je dobře patrné, že živé laktobacily produkují látky s antimikrobiálními účinky, které narušují buněčnou stěnu indikátorových kmenů, a tím dojde k jejich rozpadu a následně ke vzniku inhibiční zóny (Stoyanova a kol. 2011).

U bifidobakterií byl výsledek podobný jako u laktobacilů (Tabulka 7). Nejsilnější inhibiční efekt byl u živých buněk, kdy indikátory *Kocuria rosea* (CCDM 204) a *Micrococcus luteus* (CCDM 231) byly inhibovány všemi kulturami. Na rozdíl od laktobacilů u bifidobakterií je antimikrobiální efekt ovlivněn nejen rodovým, ale i druhovým zastoupením v kombinaci s formou aplikace tj. živé buňky a supernatanty.

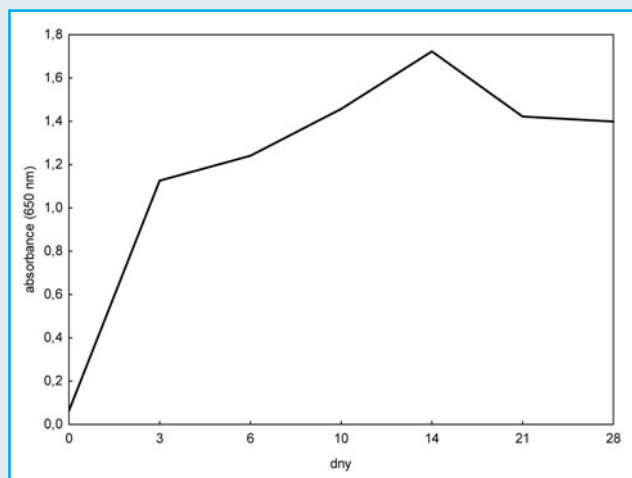
Porovnání vlivu rodu *Lactobacillus* sp. a *Bifidobacterium* sp. na tvorbu distančních zón v kombinaci s formou aplikace je graficky znázorněno na obrázku 1.

Silnější inhibiční efekt byl zaznamenán u laktobacilů ve formě suspenzí živých buněk v porovnání se supernatanty z 16 % RSMKA, kde byla tvorba distančních zón statisticky významně nižší. Naopak suspenze živých buněk bifidobakterií mají nejnižší inhibiční účinek ze všech testovaných variant. Z grafu na obrázku 1 je patrné, že rod *Bifidobacterium* sp. produkuje lépe antimikrobiální látky a ovlivňuje tím distanční zóny, když je aplikován v suspenzi 16 % RSMKA. U obou rodů testovaných mikroorganismů nebyl prokázán vliv druhového zastoupení na tvorbu distanční zóny, ale forma aplikace a druh jako takový měl na tvorbu distanční zóny prokazatelný vliv (Touré a kol. 2003).

Přímý vliv druhu na tvorbu distančních zón nebyl prokázán jako významný faktor u rodu *Lactobacillus* sp. (tabulka 6), ale u rodu *Bifidobacterium* sp. druhové zastoupení, jako faktor v kombinaci s formou aplikace, význam-



Obr. 3 Metabolická produkce kyselin z *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* v sýrovém bujonu s přidavkem 10 % laktózy



Obr. 4 Růst *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* v sýrovém bujonu s přidavkem 10 % laktózy

ně ovlivnilo produkci antimikrobiálních látek a následně i tvorbu distančních zón. Tuto informaci doplňuje graf na obrázku 2, kde je porovnáno 9 druhů bifidobakterií, které byly aplikovány v rámci experimentu třemi různými způsoby.

Nejsilnější inhibice byla zaznamenána u suspenzí živých buněk, konkrétně u druhů *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* a *Bifidobacterium longum* ssp. *longum*, které byly vybrány jako tři druhy s nejsilnější schopností inhibice. Míra inhibice byla hodnocena podle Indexu inhibice, jehož nejvyšší hodnota byla 2,5, což je na rozmezí stupňů Podpora růstu a Velmi slabá inhibice. Prokazatelné rozdíly byly pozorovány ve všech případech, test je tedy průkazný při hladině významnosti $\alpha=0,05$.

Z dosažených výsledků vyplývá, že živé buňky mají větší inhibiční efekt než pouze jejich supernatanty. Organické kyseliny jsou hlavními produkty bakterií mléčného kvašení. Tyto bakterie produkují hlavně kyselinu mléčnou a octovou. Vyšší inhibiční efekt živých buněk vyplývá z toho, že organické kyseliny prochází membránou

cílového organismu v hydrofobní nedisociované formě, snižují cytoplazmatické pH a zastavují metabolickou aktivitu a tím zvyšují účinek bakteriocinů (Muhialdin a kol., 2011).

Růst v sýrovém bujonu

Laktobacily zaočkované v sýrovém bujonu, rostly lépe tam, kde byly přidány 10 % roztoky cukrů. Podle rozboru množství obsažených kyselin na kapilární izotachofórze bylo zjištěno, že na konci růstu je nejvyšší koncentrace kyseliny mléčné, ostatní kyseliny octová, glutamová a citronová mají stejnou setrvalou koncentraci. Vzorek měl koncovou hodnotu absorbance 1,399 při vlnové délce 650 nm ve 28. dni růstu. Koncentrace kys. mléčné byla 1933,8 mg/100 g, kys. citronové 102,3 mg/100 g, kys. glutamové 35,3 mg/100 g a kys. octové 95,2 mg/100 g. Koncentrace kyseliny mléčné byla nejvyšší, což odpovídá tomu, že je hlavním koncovým produktem metabolismu glukózy u bakterií mléčného kvašení. Tyto výsledky jsou uvedeny v Obr. 3, ve kterém je uveden vzorek CCDM 213 (RL19-P) *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* s přidaným 1 ml 10 % laktózy. Na obrázku 4 je uveden graf závislosti růstu absorbance na čase. Počáteční hodnota absorbance v den založení (0. den) byla 0,063, během třech dnů růstu došlo k jejímu velkému zvýšení na 1,126 (3. den) a do 10. dne rostla jen pozvolna na hodnotu 1,457 a ve 14. den byla hodnota maximální 1,723. Poté došlo k jejímu mírnému poklesu na 1,422 a na této hodnotě se držela až do konce měření. Ke snížení absorbance došlo pravděpodobně z důvodu vyčerpání živin.

Tam kde byl pouze samotný sýrový bujon, nebyl zaznamenán znatelný nárůst kultury. Hodnota absorbance se zvyšovala do té doby, dokud měly kultury z čeho žít. Po vyčerpání veškerého množství živin se začala snižovat, spolu s absorbancí se výrazně neměnila ani koncentrace měřených kyselin.

Bifidobakteria nerostla ani v sýrovém bujonu s přidanými cukry.

Závěr

Při zjišťování antimikrobiálních vlastností laktobacilů a bifidobakterií z lidského gastrointestinálního traktu bylo zjištěno, že celkově větší inhibiční schopnost mají laktobacily, konkrétně suspenze jejich živých kultur.

Samotný sýrový bujon se nijak neosvědčil jako živné médium pro bakterie mléčného kvašení. Bakterie potřebují pro svůj metabolismus zdroj energie v podobě sacharidu, který v něm samotném chybí.

Poděkování

Tato práce vznikla v rámci programu MZe ČR, NAZV, projektu QJ1310256.

Literatura

- AWERBUCH T. E., STARK A. A. (1979): Plate diffusion assay as a rapid method for dosimetry of mutagens. *Applied and environmental microbiology*, 38 (6), s. 1127-1131.
- BAREFOOT F. S., NETTLES G. C. (1993): Antibiosis revisited: Bacteriocins produced by dairy starter cultures. *Journal of dairy science*, 76 (8), s. 2366-2379.
- DAL BELLO B., RANTSIOU K., BELLIO A., ZEPPA G., AMBROSOLI R., CIVERA T., COCOLINI I. (2010): Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of autochthonous population. *Food science and technology*, 43, s. 1151-1159.
- DRÁB V. (2002): Využití probiotik v mléčných výrobcích pro zvýšení jejich kvality, nutriční hodnoty a zdravotní bezpečnosti. Redakčně upravená periodická zpráva za rok 2002. Odpovědný řešitel: Ing. Vladimír Dráb, řešitelé: RNDr. Dittmar Chmelař, Ing. Petr Marek, RNDr. Ivo Sedláček, CSc, Ing. Jan Tykvart. Program III-D-01
- ERGIN KAYA Z., UNAL E., KALKAN S. (2011): Importance of microbial antagonisms about food attribution. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, A. Méndez-Vilas (Ed.) 1342-1348.
- FINN R. K. (1959): Theory of agar diffusion methods for bioassay. *School of chemical and metallurgical engineering*. 31 (6): 975-977.
- GRIMOUD J., DURAND H., COURTIN C., MONSAN P., THEODOROU V., ROQUES C. (2010): In-vitro screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. *Anaerobe*. 16 (5), s. 493-500.
- HIBBING M. E., FUQUA C., PARSEK M. R., PETERSON S. B. (2010): Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Macmillan Publisher Limited*, 8 (1), s. 15-25.
- CHÁFER-PERICÁS C., MAQUIEIRA Á., PUCHADES R. (2010): Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends in analytical chemistry*, 29 (9), s. 1038-1049.
- MUHALDIN B. J., HASSAN Z., SADON S. K. (2011): Biopreservation of food by lactic acid bacteria against spoilage fungi. *Annals. Food science and technology*, 12 (1), s. 45-57.
- NAGAO J. (2009): Properties and applications of lantibiotics, a class of bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Journal of oral biosciences*, 51 (3), s. 158-164.
- ONILUDE A. A., FAGADE O.E., BELLO M. M., FADAHUNSI I.F. (2005): Inhibition of aflatoxin-producing aspergilli by lactic acid bacteria isolates from indigenously fermented cereal gruels. *African journal of biotechnology*, 4 (12), s. 1404-1408.
- ORTOLANI M. B. T., MORAES P. M., PERIN L. M., VICOSA G. N., CARVALHO K. G., SILVA J. R., NERO L. A. (2010): Molecular identification of naturally occurring bacteriocinogenic and bacteriocinogenic-like lactic acid bacteria in raw milk and soft cheese. *Journal of dairy science*, 93, s. 2880-2886.
- PAQUET J., LACROIX CH., AUDET P., THIBAUT J. (2000): Electrical conductivity as a tool for analysing fermentation processes for production of cheese starters. *International dairy journal*, 10, s. 391-399.
- PERIN L. M., NERO L. A. (2014): Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. *Perin and nero BMC Microbiology*, s. 14:36.
- SHEFFIELD L. G., GAVINSKI J. J. (2003): Proteomics methods for probing molecular mechanisms in signal transduction. *Journal of Animal science*, 81, s. 48-57.
- STOYANOVA L. G., USTYUGOVA E. A., NETRUSOV A. I. (2012): Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria. Their diversity and properties. *Applied biochemistry and microbiology*. 48 (3), s. 229-243.
- TOURÉ R., KHEADR E., LACROIX C., MORONI O., FLISS I. (2003): Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of applied microbiology*, 95, s. 1058-1069.
- YANG E., FAN L., JIANG Y., DOUCETTE C., FILLMORE S. (2012): Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *Applied microbiology and biotechnology Express*, 2, s. 48.

Přijato do tisku: 9. 3. 2015

Lektorováno: 20. 3. 2015