

- Frank, J. F., Hassan, A. N. (2003): Microorganisms associated with milk. V knize Encyclopedia of dairy science (Roginski, H., Fuquay, J. W., Fox, P. F., eds.), str. 1786 - 1796. Academic Press, London, U. K. ISBN 0-12-227235-8.
- Hayes, M. C., Boor, K. (2001): Raw milk and fluid milk products. V knize Applied Dairy Microbiology, 2nd edition (Marth, E. H., Steel, J. L., eds.), str. 59 - 76. Marcel Dekker, Inc., New York, USA. ISBN 0-8247-02536-X.
- Lechner, S., Mayer, R., Francis, K.P., Prús, M., Kaplan, T., Wiessner-Gunkel, E., Steward, G.S.A.B., Scherer, S. (1998): *Bacillus weihenstephanensis* spp. no. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 1373 - 1382.
- Lin, S., Scharft, H., Odumera, J.A., Griffiths, M.W. (1998): Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. Int. J. Food Microbiol. 43: 159 - 171.
- Matta, H., Punj, V. (1998): Isolation and partial characterization of a thermostable extracellular protease of *Bacillus polymyxa* B-17. Int. J. Food Microbiol. 42: 139 - 145.
- Mossel, D.A.A., Koopmann, M.J., Jongerius, E. (1967): Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. Appl. Microbiol. 15: 650 - 653.
- Němečková, I., Roubal, P., Pechačová, M., Vyletěllová, M., Nejšlechbová, L. (2006): Výskyt *Bacillus cereus* a *Bacillus licheniformis* ve vybraných mlékařských technologiích. Mlékařské listy 99: 23 - 27.
- Ouwehand, A.C., Vesterlund, S. (2004): V knize Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects, str. 375 - 391. Marcel Dekker, New York, 2004.
- Scheldeman, P., Pijl, A., Herman, L., De Vos, P., Heyndrickx, M. (2005): Incidence and diversity of potentially high heat-resistant spores isolated at dairy farms. Appl. Environ. Microbiol. 71 (3): 1480 - 1494.
- Stepaniak, L. (2003): Psychrotrophic bacteria. Bacteria other than *Pseudomonas* spp. V knize Encyclopedia of Dairy Science (Roginski, H., Fuquay, J.W., Fox, P.E., eds.), str. 2344 - 2351. Academic Press, London, UK. ISBN 0-12-227235-8.
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (1986): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, str. 1122 - 1123. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, ISBN 0-683-07893-3.
- Sutherland, A.D., Murdoch, R. (1994): Seasonal occurrence of psychrotrophic *Bacillus* species in raw milk and studies on the interaction with mesophilic *Bacillus* sp. Int. J. Food Microbiol., 21: 279 - 292.
- Te Giffel, M., Beumet, R., Christianson, A., Griffiths, M. (2000): *Bacillus cereus* in milk and milk products. Advances in detection, typing and epidemiology. Bull. IDF 357: 47 - 54.
- Villar, A., García, J. A., Iglesias, L., García, M. L., Otero, A. (1996): Application of principal component analysis to the study of microbial populations in refrigerated raw milk from farms. Int. Dairy J. 6: 937 - 945.
- Vyletěllová, M., Hanuš, O. (2005): Výskyt vybraných potravních patogenů při výrobě UHT mléka, jogurtu a sýru a jejich vztah k některým skupinám mikroorganismů. Veterinářství 9: 567 - 572. ISSN 050-68-231.
- White, R.H. (2001): Testing of milk and milk products. V knize Applied Dairy Microbiology, 2nd edition (Marth, E.H., Steel, J.L., eds.), str. 645 - 680. Marcel Dekker, Inc., New York, USA. ISBN 0-8247-02536-X.
- ČSN EN ISO 4833 Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C, Český normalizační institut, Praha, 2003.
- ČSN ISO 7889 Jogurt - Stanovení počtu charakteristických mikroorganismů - Technika stanovení počtu kolonií při 37 °C. ČNI, Praha, 2004.
- ČSN ISO 7932 Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení počtu *Bacillus cereus*. Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. Český normalizační institut, Praha, 2005.
- ČSN ISO 8261 Mléko a mléčné výrobky - Příprava analytických vzorků a ředění pro mikrobiologické zkoušení. ČNI, Praha, 1996.
- ČSN 56 0100 Mikrobiologické zkoušení poživatin, předmětů běžného užívání a prostředí potravinářských provozoven, Český normalizační institut, Praha, 1994.

Práce byla přijata do tisku 7. 4. 08

Recenzována 5. 5. 08

Odlíšení kmenů druhu *Lactobacillus helveticus* od fylogeneticky příbuzných druhů *Lactobacillus delbrueckii* a *Lactobacillus acidophilus* pomocí biochemických testů a molekulárně genetických metod.

The differentiation of the *Lactobacillus helveticus* strains from phylogenetically related species *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus acidophilus* by means of biochemical tests and genotyping

Dráb Vladimír¹, Klečacká Jana¹, Sedláček Ivo², Švec Pavel², Vilímková Miroslava¹

¹ Výzkumný ústav mlékařský, s.r.o., Soběslavská 841, Tábor

² MILCOM a.s., Soběslavská 841, Tábor

³ Masarykova univerzita v Brně, Česká sbírka mikroorganismů, Tvrdého 14, Brno

Abstrakt

Celkem 41 kmenů termofilních laktobacilů uložených ve Sbírce mlékařských mikroorganismů Laktoflora (CCDM) a využívaných v mlékařském průmyslu převážně pro výrobu sýrů a jogurtů bylo identifikováno pomocí kombinace biochemických (API 50 CH) a genotypových metod (druhově specifická PCR pro *L. helveticus*, ribotypizace). Biochemická identifikace pomocí komerční soupravy API 50 CH neumožnila spolehlivé rozlišení *L. helveticus* od *L. delbrueckii* a komplexu *L. acidophilus*. Druhově specifická PCR pro *L. helveticus* byla pozitivní pro 30 analyzovaných kmenů. Vzhledem k detekci specifických PCR produktů také u kmene *L. galinarum* CCM 4383^T (fylogeneticky blízké příbuzný druh), bylo zařazení kmenů do druhu *L. helveticus* ověřeno ribotypizací s restriktivním enzymem *EcoRI*. Ribotypizací bylo potvrzeno zařazení kmenů do druhu *L. helveticus*. Další 4 kmeny byly zařazené do druhu *L. delbrueckii*. Celkem 7 kmenů nebylo možné pomocí použitých metod taxonomicky zařadit.

Abstract

Total 41 strains of thermophilic lactobacilli, stored in the Collection of Dairy Microorganisms Laktoflora (CCDM) and employed in dairy industry mainly for

Tabulka 1 Typové a referenční kmeny použité v této studii a výsledky multiplexové PCR pro *L. helveticus*

Druh	Označení kmene	PCR produkt/gene/bp		
		<i>htrA</i>	<i>pepN</i>	<i>pepC</i>
		918bp	726bp	524bp
<i>Bifidobacterium infantis</i>	CCM 4990 ^T	-	-	-
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	ATCC 15707 ^T	-	-	-
<i>Enterococcus durans</i>	CCM 5612 ^T	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	CCM 7167 ^T	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	CCM 7000 ^T	-	-	-
<i>Enterococcus italicus</i>	CCM 7297 ^T	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	LMG 6897 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus acidifarinae</i>	CCM 7240 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCM 4833 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	CCM 4380 ^T	-	+	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	CCM 3805 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	CCM 7088 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	CCM 7089	-	-	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	CCM 7010 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus cypricasei</i>	CCM 7008 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CCM 7190 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	CCM 7191 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>indicus</i>	LMG 22083 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	LMG 7942 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CCM 7192 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus gallinarum</i>	CCM 4383 ^T	+	+	+
<i>Lactobacillus gasserii</i>	CCM 7009 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus helveticus</i>	CCM 7193 ^T	+	+	+
<i>Lactobacillus jensenii</i>	LMG 6414 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	CCM 4384 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	LMG 19149 ^T	(+)	-	-
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i>	LMG 15132 ^T	(+)	-	-
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	CCM 1753 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	CCM 7090	-	-	-
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	CCM 7092 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	CCM 4613 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus pentosus</i>	CCM 4619 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCM 7039 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCM 1825 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCM 7091	-	-	-
<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	LMG 9477 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus zeae</i>	CCM 7069 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus zymae</i>	CCM 7241 ^T	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	CCM 1803 ^T	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	CCM 2078 ^T	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	CCM 2086 ^T	-	-	-
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	CCM 2083 ^T	-	-	-
<i>Leuconostoc lactis</i>	CCM 4545 ^T	-	-	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	LMG 6896 ^T	-	-	-

Legenda: ATCC, American Type Culture Collection; CCM Česká sbírka mikroorganismů;
LMG, Bacteria Collection, Ghent University
+ PCR produkt detekován
- PCR produkt nedetekován

cheese and yogurt production, were identified by means of the combination biochemical (API 50 CH) and genotypic methods (species specific PCR for *L. helveticus*), ribotyping. Biochemical identification using commercial set API 50 CH did not allow reliably differentiation of *L. helveticus* from *L. delbrueckii* and of complex *L. acidophilus*. Species specific PCR for *L. helveticus* was positive for 30 strains. Because specific PCR products were also detected for phylogenetically related species *L. gallinarum* CCM 4383^T, the correct taxonomic classification was confirmed by means of ribotyping with restriction endonuclease *EcoRI*. The other 4 strains were classified as *L. delbrueckii*. Used typing techniques didn't allow classify 7 strains.

Úvod

Lactobacillus helveticus je důležitý druh bakterií mléčného kvašení (BMK) využívaný v mlékařském

průmyslu pro výrobu polotvrdých a tvrdých sýrů jako jsou např. Parmezán a Ementál [1]. Kmeny *L. helveticus* byly také izolovány z tradičních fermentovaných výrobků typu kefiru či kumysu [2] a v poslední době se také používají v kombinaci s kvasinkami pro výrobu funkčních potravin snižujících krevní tlak (např. Calpis). Identifikace průmyslově významných druhů laktobacilů je důležitá pro potravinářskou výrobu vzhledem k požadavkům legislativy na správnou deklaraci druhového zastoupení BMK ve výrobku [3]. Spolehlivá identifikace druhu *L. helveticus* v rámci rodu *Lactobacillus* je někdy obtížná vzhledem k vysoké vnitrodruhové variabilitě charakteristické pro tento druh [4-8]. Tato heterogenita má za následek velmi obtížné biochemické odlišení druhu *L. helveticus* od fylogeneticky příbuzných druhů jako jsou druhy z komplexu *L. acidophilus* a *L. delbrueckii* [9]. Velké rozdíly mezi kmeny ve schopnosti fermentace sacharidů, tvorby kyseliny mléčné a štěpení bílkovin vysvětlují obtíž

spojené s identifikací na základě biochemických testů. Rovněž genotypově vykazují kmeny *L. helveticus* značnou diverzitu, a proto některé metody běžně používané pro identifikaci jednotlivých druhů BMK založené na typizaci DNA mohou být v tomto případě využity pouze pro odlišení kmenů [10]. Kromě časově náročného stanovení DNA/DNA podobnosti je možné využít druhově specifické PCR založené na druhově specifických sekvencích v genomu BMK [10, 11].

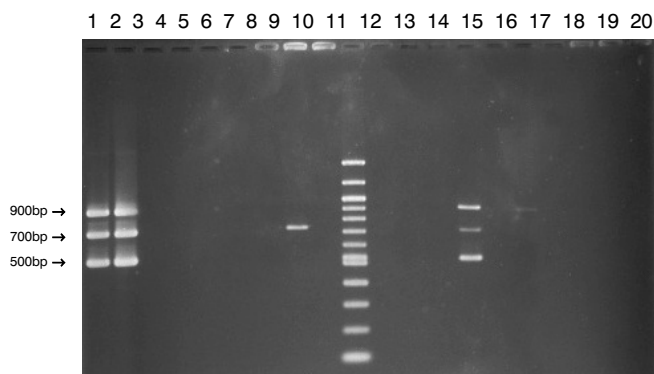
Cílem této práce bylo využít biochemických testů a molekulárně genetických metod pro identifikaci termofilních laktobacilů, zejména druhu *Lactobacillus helveticus* a fylogeneticky příbuzných druhů *Lactobacillus delbrueckii* a *Lactobacillus acidophilus* ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora.

Postup práce

Kmeny a podmínky kultivace

Kmeny použité v této práci zahrnují 44 typových a referenčních kmenů bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií, jejichž seznam je uveden v tabulce 1 a 41 kmenů ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora zařazené jako *L. helveticus*, *L. delbrueckii* a *L. acidophilus* (tabulka 2). Použité kmeny byly před testováním minimálně dvakrát přeočkovány v MRSC bujónu (MRS bujón Merck 1.10661 + 2g/l NaHCO₃) při optimální teplotě.

Obr. 1 Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů amplifikovaných v multiplexní PCR s primery **PeC_f**, **PeC_r**, **PeN_f**, **PeN_r**, **Tri_f** a **Tri_r** specifickými pro druh *L. helveticus* [10]. Ověření specifity primerů.



Bakt. kmen (5 ng DNA): 1 - CCM 7193^T - *L. helveticus*, 2 - CCDM 121 - *L. helveticus*, 3 - LMG 6897^T - *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, 4 - LMG 6896^T - *Str. thermophilus*, 5 - CCM 1803^T - *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, 6 - CCM 7167^T - *Ent. faecium*, 7 - ATCC 15707^T - *Bif. longum* ssp. *longum*, 8 - CCM 4380^T - *L. amylovorus*, 9 - CCM 7191^T - *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, 10 - DNA standard (100bp Ladder), 11 - CCM 7088 - *L. casei*, 12 - CCM 7069^T - *L. zeae*, 13 - CCM 1753^T - *L. paracasei*, 14 - CCM 4383^T - *L. gallinarum*, 15 - CCM 7010^T - *L. crispatus*, 16 - LMG 15132^T - *L. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, 17 - LMG 6414^T - *L. jensenii*, 18 - CCM 4619^T - *L. pentosus*, 19 - CCM 4613^T - *L. paraplantarum*, 20 - negativní kontrola bez DNA.

Izolace DNA a příprava hrubých lyzátů buněk

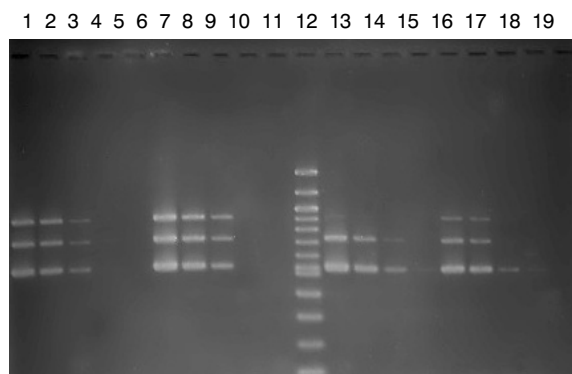
Pro optimalizaci druhově specifické PCR byla použita chromozomální DNA kmenů izolovaná pomocí fenolové extrakce [12] nebo komerčního kitu QIAamp Dneasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Německo). Intaktnost izolované DNA byla ověřena pomocí agarózové gelové elektroforézy a spektrofotometricky byla stanovena její koncentrace a čistota [13]. U metod optimalizovaných pomocí čisté DNA byla následně z praktických důvodů odzkoušena možnost amplifikace DNA z hrubých lyzátů bakteriálních buněk.

Hrubé lyzáty byly připraveny z kultur na začátku stacionární fáze růstu. Po odstředění 1 ml kultury při 15 000 g po dobu 4 minut a 4 °C byl sediment promyt 1 ml sterilní vody (18 MΩ) a opět odstředěn za stejných podmínek. Poté byl sediment resuspendován ve 100 μl alkalického lyzačního roztoku (0,05M NaOH + 0,25% SDS) [14], inkubován 30 minut při 94 °C a rychle zchlazen. Nakonec byl vzorek naředěn 400krát vodou (PCR kvalita) a uložen při -20 °C. Těsně před pipetováním do PCR směsi byly vzorky opět 5 min při 94°C zahřívány (denaturace DNA).

Biochemická identifikace

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' Etoile, Francie).

Obr. 2 Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů amplifikovaných v multiplexní PCR s primery **PeC_f**, **PeC_r**, **PeN_f**, **PeN_r**, **Tri_f** a **Tri_r** specifickými pro druh *L. helveticus* [10]. Amplifikováno bylo různé množství purifikované DNA a hrubých lyzátů buněk různých kmenů.



Stanovení citlivosti PCR-reakce:

Vzorky 1-5 - *L. helveticus* CCM 7193^T: 1 - 2ng DNA, 2 - 20pg, 3 - 20 pg, 4 - 2pg, 5 - 200fg; vzorky 6-10 - *L. helveticus* CCDM 121: 6 - 2ng, 7 - 200pg, 8 - 20pg, 9 - 2pg, 10 - 200fg; vzorek 11 - DNA standard (100bp Ladder); vzorky 12-15 - *L. helveticus* CCDM 423: 12 - HL400x, 13 - 2000x, 14 - 10000x, 15 - 50000x, běhy 16-19 - *L. helveticus* CCDM 121: 16 - HL400x, 17 - HL2000x, 18 - HL10000x, 19 - HL - 50000x), běh 20 - negativní kontrola bez DNA.

Pozn.: HL = hrubý lyzát, ředěný 400x až 50000x

Druhově specifická PCR pro *L. helveticus*

Při zavádění této metody jsme vycházeli z práce publikované Fortinou a kol. [10]. Metodu jsme optimalizovali úpravou koncentrací primerů, dNTP, hořčíku a Taq polymerázy, změnou teploty a doby připojení primerů, použitím různých polymeráz a změnou počtu cyklů. Jako nejvhodnější se ukázala PCR reakce, kdy každých 25 µl směsi obsahovalo 200 µM dATP, dCTP, dGTP a dTTP, 10 mM Tris-HCl pH 8,8, 50 mM KCl, 0,1 % Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, 3 pmol primerů PeC_f, PeC_r, PeN_f, PeN_r a 6 pmol primerů Tri_f, Tri_r, 1 U Taq-Purple polymerázy (Top-Bio, Praha, ČR) a 5 ng purifikované DNA nebo 5 µl 400x ředěného hrubého lyzátu. K amplifikaci byl použit Biometra TProfessional Cykler (Biometra, Göttingen, Německo). Amplifikační reakce zahrnovala 5 minut trvající počáteční denaturaci při 95 °C (horký start), následovalo 28 cyklů (94 °C, 45 s denaturace; 58 °C, 45 s nasedání primerů; 72 °C, 60 s elongace DNA řetězce), v posledním 29 cyklu byla elongace při 72 °C prodloužena na 7 minut. Specifita reakce byla testována s využitím chromozomální DNA izolované z typových kmenů, jejichž seznam je uveden v Tab. 1. Ke každé PCR reakci byla vždy přiřazena negativní kontrola (vzorek bez DNA) z důvodu kontroly možné kontaminace komponent pro PCR a pozitivní kontrola (5 ng purifikované DNA typového kmene *L. helveticus* CCM 7193^T) pro kontrolu průběhu amplifikace.

PCR produkty o velikosti 918 bp, 726 bp a 524 bp byly detekovány gelovou elektroforézou na 1,5 % agarózovém gelu v 0,5 x TBE pufru (45 mM kyselina boritá, 45 mM Tris-báze, 1 mM EDTA, pH 8,0) při 60 V po dobu 150 minut.

K vizualizaci PCR produktů bylo použito barvení ethidium bromidem (0,5 µg/ml) a následnou UV-transiluminaci pomocí dokumentačního zařízení Gene Genius 12 (Syngene, Cambridge, Velká Británie). Velikost PCR produktů byla určena pomocí 100 bp DNA standardu obsahujícího fragmenty 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 bp (Malamité, Moravské Prusy, ČR).

Ribotypizace s restrikčním enzymem *EcoRI*

K ribotypizaci byly použity *EcoRI* restrikční fragmenty genomové DNA, které byly hybridizovány se sondou komplementární ke genům pro 16S a 23S rRNA. Metodika modifikovaná pro bakterie mléčného kvašení vycházela z práce Švece a kol. [15].

Výsledky a diskuze

Biochemická identifikace pomocí komerční soupravy API 50 CH nepotvrdila u některých kmenů jejich původní druhové zařazení. Většina kmenů byla identifikována do druhu *L. helveticus*, další do druhu *L. del-*

brueckii a komplexu *L. acidophilus* (tabulka 2). Proto byly pro identifikaci kmenů použity další metody.

Druhově specifická multiplexová PCR popsaná Fortinou a kol. [10] je založena na unikátnosti části sekvencí kódujících dvě aminopeptidázy (*pepC*, *pepN*) a jednu proteázu (*htrA*) druhu *L. helveticus*. Velikost získaných fragmentů je 524 párů bazí (bp) pro *pepC*, 726 bp pro *pepN* a 918 bp pro *htrA*. PCR produkty této velikosti byly detekovány po amplifikaci DNA typového kmene *L. helveticus* CCM 7193^T (obr. 1). Detekce specifických PCR produktů pro druh *Lactobacillus helveticus* u typového kmene a u 30 bakteriálních kmenů ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů Laktoflóra je uvedena na Obr.1, v Tab. 1 a v Tab. 2. Použitá metoda je značně citlivá, což dokazuje detekci PCR produktů při různé koncentraci DNA a různém ředění hrubých lyzátů. PCR produkty byly detekovatelné po amplifikaci 200 fg purifikované genomové DNA v PCR směsi (obr. 2). Nahrazení purifikované genomové DNA hrubými lyzáty nemělo vliv na dosažené výsledky amplifikace (obr. 2) a proto byla druhově specifická PCR kmenů ze sbírký CCDM prováděna z hrubých lyzátů.

Při aplikaci multiplexní PCR pro druh *L. helveticus* bylo prokázáno, že primery jsou specifické pro tento druh až na jednu výjimku. Všechny tři PCR produkty byly detekovány kromě *L. helveticus* také u typového kmene *L. gallinarum* CCM 4383^T (zkřížená reakce). Dále byl detekován jeden PCR produkt (726 bp) po amplifikaci DNA kmene *L. amylovorus* CCM 4380^T a jeden PCR produkt (918 bp) po amplifikaci DNA kmenů *L. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* LMG 15132^T a *L. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* LMG 19149^T (tabulka 1, obr. 1). V práci Fortiny a kol. [8] bylo kromě *L. helveticus* testováno pouze 9 dalších druhů laktobacilů a kmen *L. gallinarum* testován nebyl, zatímco v naší studii bylo testováno dalších 28 druhů laktobacilů a navíc 13 druhů BMK z 5 dalších rodů běžně se vyskytujících v mléčných výrobcích. Specifitu primerů tak lze považovat za dostatečnou, s výše uvedenými výjimkami, které bude třeba ověřit s využitím většího počtu kmenů daného druhu.

K odlišení testovaných kmenů druhů *L. helveticus* a *L. gallinarum* byla použita metoda ribotypizace s restrikčním enzymem *EcoRI*. Byly detekovány odlišné fingerpriny typových kmenů (obr. 3), což potvrdilo zkřížené reakce v použité metodě PCR. Ze 30 kmenů CCDM identifikovaných multiplexní PCR jako *L. helveticus* vytvářelo 27 kmenů společnou skupinu s typovým kmenem *L. helveticus* CCM 7193^T, čímž bylo potvrzeno jejich zařazení do druhu. U tří kmenů vytvářejících další společný shluk (tab. 2) nebylo možné pomocí shlukové analýzy rozhodnout o zařazení do druhu *L. helveticus* nebo *L. delbrueckii*. Jelikož multiplexní PCR pro *L. helveticus* byla pro tyto kmény po-

Tabulka 2 Porovnání výsledků identifikace sbírkových kmenů laktobaciliů pomocí biochemických (API50CH) a mol.genetických metod (ribotypizace, multiplexová PCR)

Původní rodové a druhové zařazení kmenů ve sbírce CCDM	Označení kmene	API 50CH	ribotypizace EcoRI	PCR produkt/gen/bp			Současná druhová identifikace
				h1A 918bp	pepN 726bp	pepC 524bp	
<i>L. helveticus</i>	CCDM 34	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CCDM 40	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	CCDM 68	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. plantarum</i>	CCDM 92	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. acidophilus</i>	CCDM 98	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CCDM 108	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CCDM 112	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. acidophilus</i>	CCDM 115	<i>L. helveticus</i>	neidentifikováno ¹	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. helveticus</i>	CCDM 121	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. helveticus</i>	CCDM 122	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	CCDM 125	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. acidophilus</i>	CCDM 132	<i>L. acidophilus</i> atyp.	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	-	-	-	neidentifikováno
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	CCDM 136	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	CCDM 138	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	CCDM 139	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	CCDM 140	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	CCDM 142	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. acidophilus</i>	CCDM 153A	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. acidophilus</i>	CCDM 155	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. acidophilus</i>	CCDM 159	<i>L. acidophilus</i>	neidentifikováno ⁴	-	-	-	neidentifikováno
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CCDM 364	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	-	-	-	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
<i>L. helveticus</i>	CCDM 380	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. acidophilus</i>	CCDM 382	<i>L. acidophilus</i>	neidentifikováno ³	-	-	-	neidentifikováno
<i>L. acidophilus</i>	CCDM 405	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	-	-	-	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	CCDM 447	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	CCDM 450	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. helveticus</i>	CCDM 466	<i>L. helveticus</i>	neidentifikováno ¹	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. acidophilus</i>	CCDM 468	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. acidophilus</i>	CCDM 476	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	<i>L. acidophilus</i>	-	-	-	neidentifikováno
<i>L. helveticus</i>	CCDM 560	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CCDM 664	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	-	-	-	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
<i>Lactobacillus</i> sp.	CCDM 707	<i>L. acidophilus</i>	neidentifikováno ²	+	+	+	neidentifikováno
<i>Lactobacillus</i> sp.	CCDM 714	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	-	-	-	<i>L. helveticus</i>
<i>Lactobacillus</i> sp.	CCDM 740	<i>L. acidophilus</i>	neidentifikováno ²	-	-	-	neidentifikováno
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CCDM 807	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CCDM 820	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	CCDM 846	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	neidentifikováno ²	-	-	-	neidentifikováno
<i>L. kefir</i>	CCDM 850	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. helveticus</i>	CCDM 961	<i>L. helveticus</i>	neidentifikováno ¹	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. acidophilus</i>	CCDM 982	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	+	+	+	<i>L. helveticus</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CCDM 988	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	-	-	-	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>

Legenda:
CCDM Sběrka mlékařských mikroorganismů
Laktiflora®
(MILCOM a.s., Tábor, ČR)

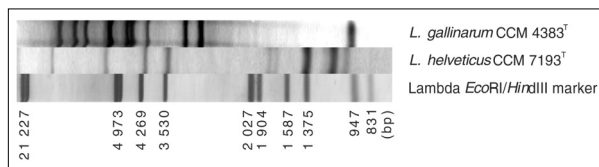
¹ shluk příbuzných kmenů
80 % vzájemná podobnost
(60 % s *L. delbrueckii*,
40 % s *L. helveticus*)

² téměř identické ribotypy
(45 % podobnost
s *L. delbrueckii*,
40 % s *L. helveticus*)

^{3,4} samostatné shluky,
minimální podobnost
s typovými kmeny
v databázi

+ PCR produkt detekován
- PCR produkt nedetekován

Obr. 3 Porovnání ribotypů typových kmenů *L. helveticus* a *L. gallinarum*



zitivní, byly rovněž zařazeny do druhu *L. helveticus*. Metoda ribotypizace umožnila zařazení 4 kmenů do druhu *L. delbrueckii*. Jeden z testovaných kmenů byl pomocí metody ribotypizace zařazen do druhu *L. acidophilus*. Vzhledem k rozdílným výsledkům použitých metod je u tohoto kmene nutné potvrzení druhového zařazení dalšími metodami.

Porovnání výsledků dosažených pomocí druhově specifické PCR, ribotypizace a biotypizace pomocí API 50 CH soupravy pro 41 testovaných kmenů laktobacilů je uvedeno v tabulce 2. Původní zařazení kmenů prováděné pomocí jednoduchých biochemických testů v 60-90. letech minulého století se shodovalo s výsledky API 50 CH pouze v 18 případech. Výsledky identifikace pomocí API 50 CH se s výsledky ribotypizace a PCR shodovaly u 29 kmenů, u 7 kmenů se lišily. Sedm kmenů ze studovaného souboru zůstalo nezařazených a bude dále testováno druhově specifickou PCR pro *L. delbrueckii* a jednotlivé druhy z komplexu *L. acidophilus* s cílem zjistit jejich odpovídající taxonomické postavení.

Závěr

Nejnovější metodické postupy byly využity pro analýzu termofilních laktobacilů uložených ve Sbírce mlékařských mikroorganismů Laktoflora (CCDM). Kombinace druhově specifické PCR pro *L. helveticus* a ribotypizace s restriktivním enzymem *EcoRI* umožnila zařazení 30 kmenů do druhu *L. helveticus* a dalších 4 kmenů do druhu *L. delbrueckii*. Potvrdil se přínos využití více molekulárně genetických metod (polyfázní přístup) při identifikaci nových bakteriálních kmenů.

Literatura

- [1] Torriani, S., Vescovo, M. and Scolari, G. (1994) An overview on *Lactobacillus helveticus*. *Ann. Microbiol.* 44, 163-191.
- [2] Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, Ts., Frengova, G. and Spasov, Z. (2002) Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1-6.
- [3] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 ze dne 20. prosince 2006 o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin. Úřední věstník Evropské unie L 404/9
- [4] Reinheimer, J.A., Morelli, L., Bottazzi, V. and Suarez, V. (1995) Phenotypic variability among cells of *Lactobacillus helveticus* ATCC15807. *Int. Dairy J.* 5, 97-103.
- [5] Fortina, M.G., Nicastro, G., Carminati, D., Neviani, E. and Manachini, P.L. (1998) *Lactobacillus helveticus* heterogeneity in natural cheese starters: the diversity in phenotypic characteristics. *J. Appl. Microbiol.* 84, 72-80.
- [6] Giraffa, G., De Vecchi, P., Rossi, P., Nicastro, G. and Fortina, M.G. (1998) Genotypic heterogeneity among *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural cheese starters. *J. Appl. Microbiol.* 85, 411-416.
- [7] Quiberoni, A., Tailliez, P., Quénéé, P., Suarez, V. and Reinheimer, J. (1998) Genetic (RAPD-PCR) and technological diversities among wild *Lactobacillus helveticus* strains. *J. Appl. Microbiol.* 85, 591-596.
- [8] Giraffa, G. and Neviani, E. (1999) Different *Lactobacillus helveticus* strain populations dominate during Grana Padano cheesemaking. *Food Microbiol.* 16, 205-210.
- [9] Kandler, O. and Weiss, N. (1986) Regular nonsporing Gram-positive rods. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, pp. 1208-1260. William and Wilkins, Baltimore, MD.
- [10] 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 Microbiology Letters* 198, 85-89.
- [11] Ventura, M., Callegari, M.L. and Morelli, L. (2000) S-layer gene as a molecular marker for identification of *Lactobacillus helveticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 189, 275-279.
- [12] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual* ed. Ford N., Nolan C. and Ferguson M. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- [13] Sinden R. R. DNA Structure and Function, Academic Press, San Diego 1994, s. 34.
- [14] Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd edn*, Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press
- [15] Švec, P., Sedláček, I., Pantůček, R., Devriese, L. A., Doškař, J. (2001) Evaluation of ribotyping for characterization and identification of *Enterococcus haemoperoxidus* and *Enterococcus moraviensis* strains. *FEMS Microbiol Lett* 203, 23 - 27.

Tato práce byla finančně podpořena MŠMT v rámci výzkumných záměrů MSM 2672286101 a 0021622416 a MZe v rámci projektu 1G46045.

Práce byla přijata do tisku 30. 4. 08

Recenzována 15. 5. 08

Výběr vhodných hydrokoloidů pro stabilizaci jakosti termizovaných smetanových sýrů

The choice of suitable hydrocolloids for quality stabilization of thermized cream cheese

Ing. Dagmar Tykvartová, Ing. Josef Mrázek,
Ing. Mgr. Michal Pospíšil, VOŠ potravinářská
a SPŠ mlékařská v Kroměříži

doc. ing. Jan Hrabě, PhD. Univerzita Tomáše Bati, Zlín

Souhrn

Konzistence a textura jsou velmi důležité organoleptické vlastnosti termizovaných sýrů, kvůli očeká-