

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/  
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

jún 2015

## INFORMAČNÝ LIST ÚSPEŠNE ZREALIZOVANÉHO PROJEKTU

<b>Názov projektu</b>		Izolácia, identifikácia a charakterizácia kyslomliečnych baktérií pre ich aplikáciu v mliekarenskom priemysle
<b>Kód ITMS</b>		26220220065
<b>Prijímateľ</b>	<b>Názov</b>	Výskumný ústav mliekarenský, a.s.
	<b>Sídlo</b>	Dlhá 95, 010 01 Žilina
<b>Operačný program</b>		Výskum a vývoj
<b>Prioritná os</b>		2 Podpora výskumu a vývoja
<b>Opatrenie</b>		2.2 Prenos poznatkov a technológií získaných výskumom a vývojom do praxe
<b>Partner</b>		ÚFHZ SAV Košice

### 1. Miesto realizácie projektu

Okres	Obec	Ulica	Číslo
Žilina	Žilina	Dlhá	95
Košice	Košice	Šoltésovej	4-6
Košice	Košice	Pri hati	10

### 2. Finančný a časový rámec realizácie projektu

<b>Časový rámec realizácie projektu (MM/RRRR)</b>	Začiatok realizácie aktivít projektu		Ukončenie realizácie aktivít projektu
	06/2010		05/2014
<b>Výdavky projektu v EUR</b>	Celkové oprávnené výdavky		517 613,29
	Z toho	NFP	464 413,29
		Vlastné zdroje	53 200,00
<b>Čerpané výdavky projektu v EUR po schválení záverečnej ŽoP</b>	Čerpané celkové oprávnené výdavky		411 134,16
	Z toho	Čerpané NFP	370 640,31
		Čerpané vlastné zdroje	40 493,85

### 3. Cieľ a dosiahnuté výsledky projektu

<b>Cieľ projektu</b>	<b>Cieľ projektu</b> Vytvorenie zbierky originálnych kyslomliečnych kultúr s požadovanými vlastnosťami pre ich praktickú aplikáciu pri spracovaní ovčieho a kravského mlieka
----------------------	---

	<p><b>Špecifický cieľ projektu 1</b> Charakterizácia vlastností kmeňov kyslomliečnych baktérií, molekulárna a genetická typizácia bakteriofágov</p> <p><b>Špecifický cieľ projektu 2</b> Izolácia a identifikácia kmeňov kyslomliečnych baktérií a bakteriofágov</p> <p><b>Špecifický cieľ projektu 3</b> Molekulárno-biologická charakterizácia mechanizmov prirodzenej a získanej rezistencie na antibiotiká vo vybraných kmeňoch BMK , modifikácia vybraných kmeňov BMK</p> <p><b>Špecifický cieľ projektu 4</b> Overenie kmeňov kyslomliečnych baktérií vo výrobe mliečnych výrobkov, sformovanie zbierky mliekarenských kultúr</p>
<p><b>Dosiahnuté výsledky merateľných ukazovateľov</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li><b>1. Počet publikácií v nekarentovaných časopisoch</b> 9/10,33 (114,78%)</li> <li><b>2. Počet zorganizovaných konferencií</b> 1/1 (100,00%)</li> <li><b>3. Študenti doktorandského štúdia vlastnej organizácie a partnerov v projekte, ktorí využívajú poskytnutú podporu – muži</b> 1/1(100,00%)</li> <li><b>4. Študenti doktorandského štúdia vlastnej organizácie a partnerov v projekte, ktorí využívajú poskytnutú podporu – ženy</b> 2/4 (200,00%)</li> <li><b>5. Výskumníci nad 35 rokov vlastnej organizácie a partnerov, ktorí využívajú poskytnutú podporu – muži</b> 2/4 (200,00%)</li> <li><b>6. Výskumníci nad 35 rokov vlastnej organizácie a partnerov, ktorí využívajú poskytnutú podporu – ženy</b> 3/4 (133,3%)</li> </ol>
<p><b>Dosiahnuté výsledky projektu v rámci aktivity</b></p>	<p><b>Aktivita 1.1 Izolácia kmeňov kyslomliečnych baktérií a ich identifikácia</b></p> <p><i>Cieľ aktivity:</i> Cieľom realizácie tejto aktivity je vyizolovať zo surového ovčieho a kravského mlieka, z výrobkov z nich vyrobených kmene kyslomliečnych baktérií a taxonomicky ich identifikovať.</p>

*Výstup aktivity:*

Výstupmi tejto aktivity budú vyizolované a identifikované kmene kyslomliečnych baktérií. Hlavným medzníkom indikujúcim správnu a efektívnu realizáciu činností v rámci tejto aktivity bude identifikácia vhodných kmeňov kyslomliečnych baktérií, s ktorými sa bude ďalej pracovať v rámci nadväzujúcich aktivít.

*Naplnenie výstupu:*

Z fariem a bryndziarní z rôznych regiónov Slovenska boli odobraté vzorky ovčích hrudkových syrov vyrobených zo surového mlieka, vzorky žinčice, surového ovčieho a kozieho mlieka, u ktorých prebiehala izolácia kyslomliečnych baktérií (laktobacily, laktokoky, enterokoky). Identifikácia jednotlivých druhov izolátov sa vykonala klasickými kultivačnými metódami, pomocou Maldi -Tof identifikačného systému, ako aj s využitím PCR. Takto izolované a identifikované bakteriálne kmene boli postúpené na ďalšiu charakterizáciu v iných aktivitách projektu.

Zároveň prebiehal proces úchovy vyizolovaných bakteriálnych kmeňov (preočkovávanie, mikroskopická kontrola izolátov). Dlhodobejšia úschova izolátov bola riešená aj ich zmrazovaním pri teplote -20 °C na afinitných guľôčkach. Pri posúdení ďalších vlastností sa tieto izoláty vyseletovali na in situ analýzu.

V rámci tejto aktivity boli počas riešenia projektu publikované, resp. akceptované na uverejnenie tieto publikácie:

*„Izolácia, identifikácia a charakterizácia kyslomliečnych baktérií pre ich aplikáciu v mliekarenskom priemysle. Isolation, identifikation and characterization of lactic acid bacteria for their aplikation in dairy industry“* (Zborník prác z VIII. medzinár. vedeckej konferencie Bezpečnosť a kontrola potravín, Nitra, 30.-31. marec 2011, s. 150-153. SPU Nitra, ISBN 978-80-552-0559-5).

*„Izolácia, identifikácia a charakterizácia kyslomliečnych baktérií pre ich aplikáciu v mliekarenskom priemysle. Isolation, identifikation and characterization of lactic acid bacteria for their aplikation in dairy industry“* (Mliekarstvo, roč. 40, november 2011, č. 2, príloha Veda a výskum, s. IV-VI. ISSN 1210-3144).

*„Tradičné slovenské mliečne špeciality, ako zdroj technologicky atraktívnych mliekarenských kultúr“* (Mliekarstvo, roč. 41, december 2012, č. 2, príloha Veda a výskum, s. XVII-XX. ISSN 1210-3144).

*„Bioaktívne kmene Enterococcus durans izolované z ovčieho hrudkového syra“* (SLOVENSKÝ VETERINÁRSKY ČASOPIS, roč. XXXVII, 2012, č. 5, s. 277-278. ISSN 1335-0099).

*„Izolácia laktobacilov, laktokokov a enterokokov*

z tradičných slovenských špecialít“ (Zborník prednášok z konferencie Mléko a sýry, Praha leden 2012, s. 63-68. Vysoká škola chemicko-technologická v Prahe ISBN 978-80-7080-832-2.).

„Strains of *Enterococcus durans* isolated from sheep lump cheese and their bacteriocin-like activity. Kmene *Enterococcus durans* izolované z ovčieho hrudkového syra a ich bacteriocin-like aktivita“. (Zborník prednášok a posterov z medzinár. vedeckej konferencie Hygiene Alimentorum XXXIV, Bezpečnosť a kvalita mlieka a mliečnych produktov; In Proceedings of lectures and posters, Hygiene Alimentorum XXXIV, Safety and quality of milk and milk products, Štrbské Pleso, Slovakia, 8.5.-10.5. 2013, p. 117-121. ŠVPS SR, ISBN 978-80-8077-334-2, EAN 9788080773342.

*Percentuálny podiel partnera na rozpočte aktivity:*

VÚM, a.s.: 71,07%

ÚFHZ SAV: 28,93%

### **Aktivita 1.2 Izolácia bakteriofágov a ich základná identifikácia**

*Cieľ aktivity:*

Za účelom izolácie bakteriofágov a ich základnej identifikácie a charakterizácie budú z rôznych regiónov Slovenska odoberané z prostredia výroby a spracovania ovčieho a kravského mlieka (salaše, bryndziarne, syrárne) vzorky surového mlieka a výrobkov z nich vyrobených (syry, bryndza, žinčica a pod.), ktoré budú analyzované na prítomnosť bakteriofágov. Ako hosťiteľské kmene budú použité bakteriálne izoláty získané v rámci aktivity 1.1, ako aj v súčasnej dobe používané produkčné kmene. Okrem prirodzene sa vyskytujúcich sa kmeňov lýtických bakteriofágov budú v paralelných experimentoch izoláty získané v rámci aktivity 1.1 testované na indukciu temperovaných bakteriofágov.

Získané nové bakteriofágy, ako aj už známe bakteriofágy budú následne predbežne identifikované a klasifikované tak, aby sa pripravila reprezentatívna zbierka bakteriofágov z prostredia slovenských chovov a producentov mlieka.

*Výstup aktivity:*

Výstupom tejto aktivity budú jednak informácie o výskyte bakteriofágov, ako aj reprezentatívna zbierka bakteriofágov z prostredia slovenských chovov a producentov mlieka. Vybrané bakteriofágy budú následne použité v rámci aktivity 2.2.

*Naplnenie výstupu:*

Počas riešenia bola vykonaná charakterizácia vybraných enterokokových bakteriofágov izolovaných z mlieka. Vyselektovali sa bakteriofágy s najvyššou

lytickou aktivitou a pomocou Maldi - Tof sa porovnali proteínové profily bakteriofágov infikujúcich *E. faecalis*.

V experimentálnych prácach bola vykonaná izolácia a základná charakterizácia bakteriofágov infikujúcich štartovacie kultúry používané VÚM, ako aj typové kmene *Lactobacillus plantarum* a *Lactococcus lactis*.

Metódami molekulárnej analýzy sa charakterizoval bakteriofág MSF1. Zo vzoriek mlieka sa izoloval bakteriofág označený ako M4. Stanovilo sa spektrum jeho aktivity voči dostupným kmeňom *E. faecalis*, boli vykonané experimenty na jeho charakterizáciu na molekulovej úrovni.

V opakovaných experimentoch sa nepodarilo identifikovať žiadne nové bakteriofágy *E. faecalis*, preto sa na záverečnú analýzu genómu bakteriofágov pomocou *next generation sequencing* prístupu zvolil bakteriofág MSF1. Porovnanie genomickej sekvencie bakteriofága MSF1 s genómom profágov *E. faecalis* prinesie informácie o mechanizme integrácie bakteriofágov.

V rámci tejto aktivity boli počas riešenia projektu publikované, resp. akceptované na uverejnenie tieto publikácie:

„*Mechanizmy fágovej rezistencie u baktérií mliečného kvasenia*“ (akceptované na publikovanie v Slovenskom veterinárskom časopise, č. 3-4, august 2014).

*Percentuálny podiel partnera na rozpočte aktivity:*

VÚM, a.s.: 0%

ÚFHZ SAV: 100%

## **Aktivita 2.1 Charakterizácia vlastností kmeňov kyslomliečnych baktérií**

*Cieľ aktivity:*

Cieľom realizácie tejto aktivity je charakterizácia vyizolovaných a identifikovaných kmeňov kyslomliečnych baktérií z hľadiska ich antimikrobiálnych účinkov voči nežiaducim mikroorganizmom, kvantifikácia metabolitov kyslomliečnych baktérií s antimikrobiálnym účinkom, budú sa skúmať probiotické vlastnosti daných kmeňov kyslomliečnych baktérií, ako aj charakterizovať ich technologické vlastnosti.

*Výstup aktivity:*

Výstupmi tejto aktivity budú viaceré kmene kyslomliečnych baktérií charakterizované z hľadiska antimikrobiálnych účinkov, probiotických a technologických vlastností. Hlavným medzníkom indikujúcim správnu a efektívnu realizáciu činností v rámci tejto aktivity bude reálna prítomnosť kmeňov kyslomliečnych baktérií s požadovanými vlastnosťami, ktoré umožnia ich praktické overenie v rámci ďalšej

nadväzujúcej aktivity (poloprevádzkové pokusné výroby mliečnych výrobkov).

*Naplnenie výstupu:*

U vyizolovaných laktobacilov, laktokokov a enterokokov sa sledovali základné technologické vlastnosti - fermentačná schopnosť (rast v mlieku pri teplote 30, 37 °C) a tvorba zrazeniny. Hodnotili sa senzorické vlastnosti koagulátov: vzhľad, chuť, vôňa. V pravidelných časových intervaloch sa hodnotilo pH fermentačného média.

U vybraných kmeňov izolátov sa sledovala tolerancia k rôznym koncentráciám NaCl (2- 6 % NaCl v živnom médiu).

Sledoval sa vplyv teploty na špecifickú rastovú rýchlosť a produkciu organických kyselín – meraním optickej hustoty a pH (kmene boli kultivované v syntetických médiách pri teplotách 15, 30, 37, 45 °C).

U vybraných kmeňov izolátov sa testovala ich proteolytická aktivita (meraním vyčírených zón na médiu M17 s prídavkom sušeného odstredeného mlieka), produkcia acetaldehydu, peroxidu vodíka.

Izoláty kyslomliečnych baktérií boli testované na produkciu kysličníka uhličitého pomocou rastu v syntetických médiách v mikrobiologických skúmavkách s ponorenými Durhamovými skúmavkami.

U vybraných kmeňov sa testovala produkcia organických kyselín (k. mliečna a k. octová) pri raste na sterilnom polotučnom mlieku.

Vybraté izoláty z identifikovaných lactobacilov (druhy *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*) boli testované na produkciu kyseliny mliečnej a testované na prítomnosť reštrikčných enzýmov, ako aj na testovanie ich dekarboxylázovej aktivity.

U vybraných kmeňov izolátov sa dvojvrstvou difúznou metódou testovala ich antibakteriálna a antifungálna aktivita voči vybraným indikátorovým kmeňom (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus flavus*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium nivale*, *Mucor racemosus*, *Penicillium funiculosum*, *Rhizopus oryzae*, *Alternaria alternata*, *Mucor rouxii*, *Penicillium chrysogenum*).

Kmeň *Lactobacillus plantarum* 17L/1(7) neprodukoval biogénne amíny ani CO<sub>2</sub>, preto bol testovaný na inhibičnú aktivitu proti indikátorovým kmeňom *S. aureus* SABok1, Sedl4, ktoré boli izolované zo syrov a kmene *L. monocytogenes* CCM 4699 a *L. innocua* LMG 13568. Inhibovaný bol rast listérií pri minimálnej veľkosti inhibičných zón 6 mm kvalitatívnou metódou. Tento kmeň bol precipitovaný kvôli získaniu koncentrovanejšej inhibičnej substancie, avšak

nepreukázal inhibičnú aktivitu. Rovnako aj kmeň *Lactococcus lactis* 21S1. Kmeň *L. plantarum* 17L/1 neprodukuje enzýmy, ktoré sú detekovateľné pri ochoreniach tráviaceho systému a pri testovaní jeho translokácie v experimente na myškách Balb/c dobre prežíva, translokuje a je nepatogénny, čo sú tiež kritériá zahrnuté v rámci EFSA.

Na antilisteriálnu aktivitu boli tiež otestované modifikované supernatanty kmeňov laktokokov, laktobacilov, enterokokov kultivovaných v syntetických médiách (modifikácia spočívala v neutralizácii pH nakultivovaných médií pomocou NaOH, resp. ich saturácii síranom amónnym, čím sa testoval antimikrobiálny účinok látok iných, akými sú organické kyseliny).

Všetky izoláty laktobacilov, laktokokov a enterokokov boli testované na produkciu biogénnych amínov (putrescín, kadaverín, tyramín, histamín) metódou HPLC pri raste v syntetických selektívnych médiách s prídavkom prekursorov 2- fenylalanínu, histidínu a tyrozínu. Na základe výsledkov boli vyselektované kmene s najnižšou produkciou biogénnych amínov.

Súbor 60 enterokokov v zastúpení druhov *Enterococcus faecium* (23), *E. faecalis* (27), *E. durans* (9), *E. hirae* (1) bolo testovaných na prítomnosť génov pre produkciu známych enterocínov. Tieto kmene boli predtým otestované ako technologicky vhodné izoláty; avšak podľa QPS evaluácie teda zdravotnej bezpečnosti, *E. hirae* sa nebrala do úvahy z hľadiska možného použitia, ale len z hľadiska základného výskumu.

Následne sa testovala bakteriocínová aktivita daných izolátov na indikátorové kmene *Enterococcus avium* EA5, *Staphylococcus aureus* SA5, *Listéria monocytogenes* CCM 4699, *Listeria innocua* LMG13568 kvalitatívnou metodikou. Na základe dosiahnutých výsledkov bol vybraný kmeň *E. durans* 26E/7 na purifikáciu bakteriocínovej substancie.

Výsledky inhibičnej aktivity tohto kmeňa voči testovaným indikátorovým kmeňom a zároveň tiež preukázanie, že daný produkčný kmeň má nulové hodnoty súvisiace s enzýmami diagnostikovanými pri niektorých ochoreniach (ako je napr. alfa chymotrypsín, beta glukuronidáza alebo beta-glukozidáza), by mohli predstavovať spolu s probiotickými ukazovateľmi a vhodnými technologickými vlastnosťami jeho reálnu aplikáciu pre výrobu syrov.

V rámci probiotických vlastností boli u kmeňov testované nasledovné charakteristiky: vplyv lysozýmu, prežívanie v prostredí gastrointestinálneho traktu (GIT), nízke pH, tráviace enzýmy a adhézia na hydrofóbne prostredie (simulácia väzby na bunky čreva). Kmene vykazovali rôznu odolnosť voči pôsobeniu lysozýmu a pasážovaniu v prostredí GIT. Ani jeden kmeň

nevykazoval výraznejšiu schopnosť adhézie.

V rámci tejto aktivity boli počas riešenia projektu publikované, resp. akceptované na uverejnenie tieto publikácie:

„*Bacteriocin-like active strain Lactobacillus plantarum 17L/1, isolate from stored sheep cheese. Bakteriocín-like aktívny kmeň Lactobacillus plantarum 17L/1, izolát z ovčieho sudovaného syra*“. In: Zborník prednášok a posterov z medzinárodnej vedeckej konferencie Hygiena Alimentorum XXXIV, Bezpečnosť a kvalita mlieka a mliečnych produktov; In Proceedings of lectures and posters, Hygiena Alimentorum XXXIV, Safety and quality of milk and milk products, Štrbské Pleso, Slovakia, 8.5.-10.5. 2013, p. 122-125. ed. Baranová, Dudříková, ŠVPS SR, ISBN 978-80-8077-334-2, EAN 9788080773342.

„*Characterisation of certain dairy starters isolated from traditional slovak milk specialities. Charakterizácia vybraných mliekarenských kultúr získaných z tradičných slovenských mliečnych špecialít*“. In: Zborník prednášok a posterov – Hygiena Alimentorum XXXIV, medzinárodná konferencia Bezpečnosť a kvalita mlieka a mliečnych produktov; In Proceedings of lectures and posters, Hygiena Alimentorum XXXIV, Safety and quality of milk and milk products, Štrbské Pleso, Slovakia, 8.5.-10.5. 2013, p. 103-106. ed. Baranová, Dudříková, ŠVPS SR, ISBN 978-80-8077-334-2, EAN 9788080773342.

„*Characterisation of lactobacilli from ewe's and goat's milk for their further processing re-utilisation*“. (Potravinarstvo, vedecký časopis pre potravinarstvo, roč. 8, č. 1/2014, s. 130-134. ISSN 1337-0960 (online).

*Genome Sequence of Lactobacillus plantarum 19L3, a Strain Proposed as Starter Culture for Slovenská Bryndza Ovine Cheese* (Genome Announcements, Vol. 2, Issue 2, march/apríl 2014, e00292-14).

*Production of technologically desirable metabolites by lactobacilli isolated from goat's milk*. In: Zborník príspevkov z XVI. Konferencie mladých vedeckých pracovníkov s mezinárodnou účasťou, Brno, 28.5.2014, s. 31– 33. ed Vorlová a kol., Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno, ISBN 978-80-7305-670-4.

*Druhové zastúpenie laktobacilov v ovčom mlieku a v ovčom hrudkovom syre z regiónu stredného Slovenska. Species of lactobacilli detected in ewes milk and lump cheese from region of central Slovakia* (akceptované na uverejnenie v časopise MLÉKAŘSKÉ LISTY, roč. 25, 2014, č. 144, VĚDA, VÝZKUM s. XII-XVI).

*Percentuálny podiel partnera na rozpočte aktivity:*

VÚM, a.s.: 65,63%

ÚFHZ SAV: 34,37%



## **Aktivita 2.2 Štúdium kyslomliečnych baktérií z hľadiska ich rezistencie voči vybraným bakteriofágom, molekulárna a genetická typizácia bakteriofágov**

### *Cieľ aktivity:*

Cieľom aktivity je charakterizácia vlastností vybraných produkčných kmeňov kyslomliečnych baktérií z hľadiska ich rezistencie voči vybraným bakteriofágom a molekulárna a genetická typizácia bakteriofágov.

### *Výstup aktivity:*

Výstupom tejto aktivity budú kmene kyslomliečnych baktérií so zvýšenou rezistenciou voči fágovým infekciám *in vitro*, ako aj informácie o genetických determinantoch zodpovedných za pozorovanú rezistenciu a informácie o genetickej organizácii bakteriofágov infikujúcich kyslomliečne baktérie. Výsledky získané v rámci tejto aktivity budú základom pre aktivitu 3.2..

### *Naplnenie výstupu:*

Boli vykonané analýzy enterokokov vyizolovaných z mlieka v rámci aktivity 1.1. Prevažná časť izolátov bola rezistentná voči testovaným bakteriofágom izolovaným taktiež z mlieka, ale hlavným mechanizmom rezistencie nie je prítomnosť restriktčno-modifikačných systémov. Identifikovali sa viaceré restriktčno-modifikačné systémy, ktoré sú izoschizomérmi HaeIII a HhaI. Analýzou štartovacích kultúr používaných VÚM sa nepodarilo identifikovať žiadne restriktčno-modifikačné systémy potenciálne chrániace tieto kmene pred fágovými infekciami. Bola vykonaná analýza plazmidov v jednotlivých izolátoch štartovacích kultúr.

Analýza bakteriofága MSF2 metódami rekombinantných DNA ukázala, že je prakticky identický ako bakteriofág phiFL1A už izolovaný z *E. faecalis* (Yasmin et al., Comparative genomics and transduction potential of *Enterococcus faecalis* temperate bacteriophages. J. Bacteriol. 192 (4), 1122-1130 (2010) GenBank Accession number GQ478081).

Testovala sa rezistencia štartovacích kultúr a ďalších izolátov *L. lactis* a *Lactobacillus spp.* voči zbierkovým bakteriofágom. U oboch skupín organizmov sa rezistencia na bakteriofágy vyskytovala len obmedzene a restriktčno modifikačný systém sa detekoval len v jednom kmeni. Rozšírilo sa spektrum kmeňov *E. faecalis* analyzovaných na fágovú rezistenciu a výskyt reštrikčných endonukleáz o ďalších 20 kmeňov. Celkovo sa analyzovalo viac než 90 kmeňov a reštrikčné endonukleázy sa identifikovali v 7 z nich. Identifikované reštrikčné endonukleázy sú izoschizomérmi už známych reštrikčných endonukleáz

HaeIII (GGCC), SduI (GDGCHC) a NciI (CCSGG). Izochizoméry HaeIII a SduI sa detegovali 3 krát, NciI izoschizomér sa detegoval len raz. Bola vykonaná charakterizácia reštrikčných endonukleáz v kmeňoch *L. lactis*.

Pomocou bioinformatických metód sa študoval vplyv prítomnosti reštrikčno modifikačných systémov na genóm bakteriofágov *E. faecalis*. Korelácia medzi výskytom reštrikčno modifikačných systémov a zložením genómu sa pozorovala pre GGCC špecifické systémy (izoschizoméry HaeIII), ktoré sú najčastejšie detegované u *E. faecalis*, ale nie pre GATC špecifické systémy.

Ukončili sa experimentálne práce na identifikácii génov abortívnej infekcie (abi) v študovanej kolekcii kmeňov laktobacilov, laktokokov a enterokokov. Spektrum študovaných génov sa rozšírilo na všetkých 23 abi systémov známych z laktokokov. U kmeňov *L. lactis* sa identifikoval výlučne AbiB systém. U kmeňov rodu *Lactobacillus* sa nedetegoval žiadny abi systém. Najväčšia variabilita i frekvencia abi systémov sa detegovala u enterokokov. Nepozorovala sa jednoznačná korelácia medzi prítomnosťou abi systémov a rezistenciou voči fágovým infekciám. Získala sa nukleotidová sekvencia bakteriofágu MSF1.

V rámci tejto aktivity boli počas riešenia projektu publikované, resp. akceptované na uverejnenie tieto publikácie:

„*INTERPLAY BETWEEN BACTERIOPHAGES AND RESTRICTION-MODIFICATION SYSTEMS IN ENTEROCOCCI*“ (akceptované na publikovanie v časopise *Nova Biotechnologica et Chimica*, vol.1., Issue 13, 2014).

*Percentuálny podiel partnera na rozpočte aktivity:*

VÚM, a.s.: 0%

ÚFHZ SAV: 100%

### **3.1 Charakterizácia mechanizmov rezistencie na antibiotiká v kyslomliečnych baktériách**

*Cieľ aktivity:*

Cieľom realizácie aktivity bude selekcia baktérií bez získanej rezistencie na antibiotiká.

*Výstup aktivity:*

Výstupom budú overené kmene kyslomliečnych baktérií obsahujúce len prirodzene sa vyskytujúcu rezistenciu na antibiotiká.

*Naplnenie výstupu:*

Počas riešenia bolo na prístroji Maldi-Tof diagnostikovaných 200 LAB izolátov z VÚM, ako aj vlastných izolátov. Izoláty bolo možné zaradiť do

druhov *Lactobacillus fermentum*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. helveticus*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *E. faecium*.

Izoláty boli testované na tzv. ECOFF (epidemiologický cut-off) hodnoty podľa novej ISO normy 10932 (1. vydanie 15. Júna 2010), ktorá vyžaduje molekulárnu typizáciu NELAB (ne-enterokokové LAB), pretože každý druh baktérie má iné hodnoty ECOFF. U dvoch laktobacilov a jedného laktokokoka boli vyššie hodnoty ECOFF v prípade streptomycínu, gentamicínu a klindamycínu. Pomocou PCR však gény rezistencie na tieto tri antibiotiká neboli detekované.

V rámci medzinárodnej spolupráce s Dr. D'Auria z FISABIO, Španielsko (Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana) sa vo väzbe na riešenie aktivity 4.1. metódou NGS získal draft genómovej sekvencie kmeňa *L.plantarum*19L3. Boli vyhodnotené základné fyziologické (väzba na extracelulárnu matrix, adherencia na manózové receptory, bakteriocíny), ale aj potenciálne nebezpečné (rezistencia na antibiotiká a virulencia) vlastnosti kmeňa podľa získaných DNA sekvencií. NGS sekvencia kmeňa bola uložená do génovej banky pod číslom SAMN02353165.

V rámci tejto aktivity boli počas riešenia projektu publikované, resp. akceptované na uverejnenie tieto publikácie:

„Citlivosť na antibiotiká u potravinových laktobacilov - ISO norma 10932“ (SLOVENSKÝ VETERINÁRSKY ČASOPIS, roč. XXXVI, 2011, č. 2, s. 88-89. ISSN 1335-0099).

*Percentuálny podiel partnera na rozpočte aktivity:*

VÚM, a.s.: 0%

ÚFHZ SAV: 100%

### **3.2 Modifikácia vybraných kmeňov kyslomliečnych baktérií za účelom zvýšenia rezistencie voči fágovým infekciám**

*Cieľ aktivity:*

Cieľom aktivity je modifikácia vybraných kmeňov kyslomliečnych baktérií za účelom zvýšenia rezistencie voči fágovým infekciám

*Výstup aktivity:*

Výstupom tejto aktivity budú produkčné kmene kyslomliečnych baktérií so zvýšenou rezistenciou voči fágovým infekciám v podmienkach *in vitro*. Tieto kmene budú ďalej použité v rámci aktivity 4.1.

*Naplnenie výstupu:*

Boli vykonané kokultivačné experimenty s vybranými

bakteriálnymi kmeňmi, ktoré splňali technologické parametre použitia a vybranými bakteriofágmi, s cieľom pripraviť spontánne rezistentné mutanty.

Analyzoval sa výskyt a bola vykonaná charakterizácia plazmidov u vybraných izolátov laktokokov a laktobacilov. Analýza výsledkov kokultivačných experimentov ukázala, že spontánne fágo rezistentné mutanty študovaných kmeňov vznikajú z relatívne vysokou frekvenciou. Analýzy ukázali, že mechanizmom rezistencie nie je prítomnosť reštrikčno modifikačných systémov.

Charakterizovala sa populácia plazmidov v kmeni *Lactococcus lactis* LM-25. V tomto kmeni sa vyskytujú viaceré plazmidy vykazujúcu najvyššiu podobnosť k už známym plazmidom pSK11, pL1, pVF18 (Fallico, V., McAuliffe, O., Fitzgerald, G.F. and Ross, R.P. Plasmids of raw milk cheese isolate *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis DPC3901 suggest a plant-based origin for the strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (18), 6451-6462 (2011) izolovaným z laktokov. Tieto plazmidy nesú viaceré gény potencióálne zvyšujúce odolnosť hostiteľského kmeňa voči fágovým infekciám (reštrikčno modifikačné systémy, abi systémy).

V nadväznosti na aktivitu 2.2. sa vykonali experimenty zamerané na možný prenos génov kódujúcich mechanizmus abortívnej infekcie (abi) do vyselektovaných kmeňov. S cieľom lepšieho poznania mechanizmov rezistencie voči fágovým infekciám sa z vybraných bakteriálnych kmeňov pripravili vzorky DNA na analýzu genómu pomocou *next generation sequencing*. Týmto postupom sa charakterizovali aj plazmidy prítomné v týchto kmeňoch. Metódami NGS sa získali drafty genómových sekvencií vybraných kmeňov. Analýzy potvrdili relatívne široký výskyt abi systémov ako jedného z mechanizmov fágovej rezistencie. Ako vedľajší výsledok sa získala kompletná nukleotidová sekvencia plazmidu z kmeňa *Enterococcus faecalis*.

V rámci tejto aktivity boli počas riešenia projektu publikované, resp. akceptované na uverejnenie tieto publikácie:

„*THE PARTIAL CHARACTERIZATION OF ENTEROCOCCUS FAECALIS MSF1 BACTERIOPHAGE FROM RAW MILK*“ (akceptované na publikovanie v časopise *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, vol. 3, Issue 6, june- July 2014).

*Percentuálny podiel partnera na rozpočte aktivity:*

VÚM, a.s.: 0%

ÚFHZ SAV: 100%

**4.1 Poloprevádzková výroba mliečnych výrobkov, sformovanie zbierky mliekarenských kultúr**

*Cieľ aktivity:*

Cieľom realizácie tejto aktivity je odskúšanie vybraných kmeňov kyslomliečnych baktérií s vhodnými vlastnosťami v poloprevádzkových pokusných výrobách syrov a kyslomliečnych výrobkov. Na základe vyhodnotenia týchto výrob bude z príslušných vyhovujúcich kmeňov kyslomliečnych baktérií sformovaná zbierka mliekarenských kultúr (štartovacie, doplnkové), ktoré budú ponúknuté spracovateľom mlieka do praxe.

*Výstup aktivity:*

Výstupmi tejto aktivity budú výsledky z praktickej aplikácie kyslomliečnych baktérií s charakterizovanými vlastnosťami v pokusných poloprevádzkových výrobách syrov, resp. kyslomliečnych výrobkov. Na základe vyhodnotenia výsledkov týchto výrob bude sformovaná zbierka mliekarenských kultúr (štartovacie, doplnkové) v lyofilizovanej forme z príslušných vyhovujúcich kmeňov kyslomliečnych baktérií.

*Naplnenie výstupu:*

Cieľom realizácie tejto aktivity bolo na základe výsledkov dosiahnutých pri riešení predchádzajúcich aktivít otestovanie vybraných kmeňov kyslomliečnych baktérií v poloprevádzkových výrobách mliečnych výrobkov a na základe vyhodnotenia týchto výrob sformovanie zbierky mliekarenských kultúr.

V prvej fáze riešenia sa u vybraných kmeňov kyslomliečnych baktérií (laktokoky, laktobacily, enterokokoky) začalo s vypracovávaním ich kysacej aktivity (zmena aktívnej a titračnej kyslosti vo zvolenom časovom rozpätí) v kravskom mlieku (obnovené odtučnené sušené mlieko, sterilizované plnotučné mlieko) pri teplotách vhodných z hľadiska ich aplikácie v konkrétnych technologických postupoch výroby. Súčasne sa sledoval rast, resp. koncentrácia testovaných kmeňov vo zvolených časových intervaloch. Vo vypracovávaní kysacej aktivity u vybraných laktokokov, laktobacilov a enterokokov sa pokračovalo potom tiež v nebovinných mliekach, keď ako testovacie média boli použité plnotučné pasterizované ovčie a kozie mlieko.

Na základe výsledkov kysacej aktivity u testovaných kmeňov kyslomliečnych baktérií boli v ďalšej fáze vykonané pokusné výroby čerstvých syrov (hrudka) a polotvrdých syrov eidamského typu z pasterizovaného kravského, kozieho a ovčieho mlieka za použitia kultúr pozostávajúcich z rôznych kombinácií kmeňov laktokokov, laktobacilov a enterokokov. U vyrábaných syrov sa v jednotlivých fázach výroby, zrenia, sledoval vplyv použitých kultúr na senzorické vlastnosti syrov, stupeň kysnutia,

	<p>sledoval sa rast (koncentrácia) použitých kmeňov kyslomliečnych baktérií.</p> <p>Boli taktiež vykonané pokusné výroby kyslomliečnych nápojov na báze pasterizovaného kravského a kozieho mlieka za použitia kultúr z vybraných kmeňov laktokokov a laktobacilov. U vyrábaných kyslomliečnych nápojov sa sledoval vplyv použitých kultúr na ich senzorické vlastnosti (konzistencia, chuť, vôňa), kyslosť, sledoval sa rast (koncentrácia) použitých kmeňov kyslomliečnych baktérií.</p> <p>Na základe vyhodnotenia pokusných výrob syrov a kyslomliečnych nápojov boli vybrané kmene kyslomliečnych baktérií, ktoré budú tvoriť zbierku mliekarenských kultúr pre ich aplikáciu pri výrobe syrov a kyslomliečnych výrobkov.</p> <p>Na základe získaných výsledkov boli počas riešenia projektu publikované, resp. akceptované na uverejnenie tieto publikácie:</p> <p><i>Laktobacily z kozieho mlieka, ako potenciálne štartovacie kultúry. Lactobacilli from goat's milk, as possible starters</i> (akceptované na uverejnenie v časopise MLÉKAŘSKÉ LISTY, roč. 25, 2014, č. 144, VĚDA, VÝZKUM s. I-IV)</p> <p>V rámci riešenia tejto aktivity bola dňa 30.5.2014 zorganizovaná konferencia „<i>Možnosti aplikácie originálnych kyslomliečnych baktérií v mliekarenskom priemysle</i>“.</p> <p><i>Percentuálny podiel partnera na rozpočte aktivity:</i>  VÚM, a.s.: 100%  ÚFHZ SAV: 0%</p>												
<p><b>Výdavky projektu rozdelené na prijímateľa a partnera</b></p>	<p><b>Výdavky projektu rozdelené na prijímateľa a partnera</b></p> <p><i>Výdavky projektu v EUR za prijímateľa VÚM, s.r.o.:</i></p> <table data-bbox="614 1429 1236 1534"> <tr> <td>celkové oprávnené výdavky:</td> <td>266 000,00</td> </tr> <tr> <td>NFP:</td> <td>212 800,00</td> </tr> <tr> <td>vlastné zdroje:</td> <td>53 200,00</td> </tr> </table> <p><i>Výdavky projektu v EUR za partnera UFHZ SAV:</i></p> <table data-bbox="614 1630 1236 1729"> <tr> <td>celkové oprávnené výdavky:</td> <td>251 613,29</td> </tr> <tr> <td>NFP:</td> <td>251 613,29</td> </tr> <tr> <td>vlastné zdroje:</td> <td>0,00</td> </tr> </table>	celkové oprávnené výdavky:	266 000,00	NFP:	212 800,00	vlastné zdroje:	53 200,00	celkové oprávnené výdavky:	251 613,29	NFP:	251 613,29	vlastné zdroje:	0,00
celkové oprávnené výdavky:	266 000,00												
NFP:	212 800,00												
vlastné zdroje:	53 200,00												
celkové oprávnené výdavky:	251 613,29												
NFP:	251 613,29												
vlastné zdroje:	0,00												

## FOTOGRAFIE Z MIESTA REALIZÁCIE PROJEKTU

Fotodokumentácia po ukončení realizácie aktivít projektu:



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3