

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Podíl kyseliny 3-hydroxypropionové na antimikrobiální  
aktivitě bakterií produkujících reuterin  
Bakalářská práce**

**Autor práce: Denisa Körberová**

**Obor studia: Výživa a potraviny**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Věra Neužil Bunešová, Ph.D.**

© 2021 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Podíl kyseliny 3-hydroxypropionové na antimikrobiální aktivitě bakterií produkujících reuterin" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 3. 5. 2020

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Věře Neužil Bunešové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady při zpracování mé bakalářské práce a čas, který mi věnovala. Dále bych ráda poděkoval Ass. Prof. Clarisse Schwab, Ph.D. za pomoc s praktickou částí v laboratoři.

# Podíl kyseliny 3-hydroxypropionové na antimikrobiální aktivitě bakterií produkujících reuterin

## Souhrn

Laktobacily zahrnují mnoho kmenů, které se využívají jako probiotické kultury. Patří mezi ně mimo jiné i *Limosilactobacillus reuteri* (syn. *Lactobacillus reuteri*). Laktobacily produkují antibakteriální metabolity, které přispívají ke konzervaci potravin, čehož se v potravinářství využívá zejména při výrobě kysaných mléčných výrobků. Těmito antibakteriálními látkami je mléčná kyselina, octová kyselina a reuterin. *L. reuteri* metabolizuje glycerol za vzniku reuterinu. Reuterin je dále metabolizován na 1,3-propandiol a 3-hydroxypropionovou kyselinu (3-HP). Pouze málo studií zkoumalo antimikrobiální aktivitu 3-hydroxypropionové kyseliny, proto bylo cílem této práce ji otestovat proti vybraným gram-negativním a gram-pozitivním bakteriím při nízkém pH. Byl proveden test minimální inhibiční koncentrace metodou ředění 3-HP (nejvyšší koncentrace 33 mM) při hodnotách pH 6,5; 5,5 a 4,8. Test minimální inhibice byl proveden celkem u 10 kmenů vybraných bakterií. Byl porovnán s propionovou kyselinou (60 mM obdobně). Samotný producent reuterinu *L. reuteri* nebyl inhibován při žádné z koncentrací. Předpokládaný trend se potvrdil u gram-negativních kmenů *Escherichia coli* a u bifidobakterií byly zaznamenány kmenové odlišnosti. Potřebná minimální inhibiční koncentrace k potlačení růstu klesala s hodnotou pH. Nicméně, je třeba zmínit, že počet kmenů byl omezený a použitý postup vyžaduje optimalizaci. V druhé části této práce byl sledován růst sedmi kmenů (reuterin-pozitivních a reuterin-negativních) v přítomnosti glycerolu o koncentraci 55 mM nebo 110 mM a bez glycerolu. Byla sledována optická denzita každou hodinu po dobu sedmi hodin a následně po dvaceti čtyř hodinách. Bylo zjištěno, že přítomnost glycerolu neovlivnila růstový profil bakterií, rychlost růstu jednotlivých kmenů se však lišila. Následné analýzy poukázaly na produkci 3-HP u reuterin-pozitivních kmenů. Ukazuje se, že 3-HP je jednou z dalších antibakteriálních sloučenin produkovaných bakteriemi.

**Klíčová slova:** reuterin; antimikrobiální látka; 3-hydroxypropionová kyselina; glycerol; *Limosilactobacillus reuteri*

# Contribution of 3-hydroxypropionic acid to antimicrobial activity of reuterin-producing bacteria

## Summary

Lactobacilli include many strains that are used as probiotic cultures. One of them is *Limosilactobacillus reuteri* (syn. *Lactobacillus reuteri*). Lactobacilli produce antibacterial metabolites that contribute to food preservation, which is used in the food industry mainly in the production of fermented milk products. These antibacterial agents are lactic acid, acetic acid and reuterin. *L. reuteri* metabolizes glycerol to reuterin. Reuterin is further metabolised to 1,3-propanediol and 3-hydroxypropionic acid (3-HP). Only a few studies have examined the antimicrobial activity of 3-hydroxypropionic acid, so the aim of this work was to test it against selected gram-negative and gram-positive bacteria at low pH. A minimum inhibitory concentration assay was performed by the 3-HP dilution method (maximum concentration 33 mM) at pH 6,5; 5,5 and 4,8. The minimal inhibitory test was performed on 10 strains of selected bacteria. It was compared with propionic acid (60 mM, similarly). The reuterin producer *L. reuteri* was not inhibited at any of the concentrations. The predicted trend was confirmed for gram-negative *Escherichia coli* strains and bifidobacteria showed strain differences. The required minimum inhibitory concentration to inhibit growth decreased with pH. However, it is important to say that the number of strains was limited and the used procedure should be optimized. In the second part of this work, the growth of seven strains (reuterin-positive and reuterin-negative) was monitored in the presence of glycerol, at a concentration of 55 mM or 110 mM, and without glycerol. Optical density was monitored every hour for seven hours and after twenty-four hours. It was found that the presence of glycerol did not affect the growth profile of bacteria, but the growth rate of individual strains were varied. Subsequent analyzes indicated the production of 3-HP in reuterin-positive strains. 3-HP has been shown to be one of the other antibacterial compounds produced by bacteria.

**Keywords:** reuterin; antibacterial agent; 3-hydroxypropionic acid; glycerol; *Limosilactobacillus reuteri*

# Obsah

1 Úvod.....	7
2 Cíl práce.....	8
3 Literární rešerše.....	9
3.1 <i>Lactobacillus</i> spp.....	9
3.2 <i>Limosilactobacillus reuteri</i> obecná charakterizace.....	9
3.2.1 Výskyt a rozšíření <i>L. reuteri</i> .....	9
3.2.2 <i>L. reuteri</i> jako probiotikum .....	10
3.2.3 Metabolismus <i>L. reuteri</i> .....	13
3.2.4 3- hydroxypropionová kyselina .....	15
3.2.5 Reuterin .....	16
3.3 Antimikrobiální aktivita .....	17
3.3.1 Metody stanovení antimikrobiální aktivity.....	18
3.3.1.1 Disková difúzní metoda .....	18
3.3.1.2 Minimální inhibiční koncentrace .....	19
3.3.1.3 Metoda bodu zlomu (breakpoint) .....	20
3.3.1.4 Faktory ovlivňující antimikrobiální testování.....	20
4 Metodika.....	21
4.1 Charakteristika použitých kmenů .....	21
4.2 Příprava kultivačních medií .....	22
4.3 Příprava roztoku 3-HP a propionové kyseliny.....	22
4.4 Příprava pracovních kultur .....	22
4.5 Test minimální inhibiční koncentrace (MIC).....	23
4.6 Tvorba 3-HP během růstu laktobacilů.....	23
5 Výsledky .....	24
5.1 Výsledky minimální koncentrace inhibice .....	24
5.1.1 Výsledky tvorby 3-HP během růstu laktobacilu .....	25
6 Diskuze.....	27
6.1 Minimální inhibiční koncentrace 3-HP .....	27
6.2 Tvorba 3-HP během růstu laktobacilů.....	28
7 Závěr .....	29
8 Literatura.....	30
9 Samostatné přílohy.....	I

# 1 Úvod

Bakterie mléčného kvašení jsou pro potravinářství důležité především pro svou sacharolytickou schopnost, čehož se využívá během procesu kvašení neboli fermentace. Kvašení je velmi důležité v potravinářství. Bakterie mléčného kvašení produkují organické kyseliny (mléčná kyselina, octová kyselina, propionová kyselina), čímž snižují pH prostředí, a přispívají tím ke konzervaci potravin. Mezi tyto bakterie patří laktobacily, a tedy i *Limosilactobacillus reuteri* syn. *Laktobacillus reuteri*. *L. reuteri* metabolizuje glycerol pomocí operonu pdu-cob-hem. Glycerol je nejprve dehydratován na 3-hydroxypropanaldehyd (3-HPA) v jediné reakci katalyzované enzymem glycerol/diol dehydratáza PduCDE. 3-HPA může být buď sekretován za vzniku reuterinu, čtyřčtetného vícesložkového systému sestávajícího z 3-HPA, 3-HPA hydrátu, 3-HPA dimeru a akroleinu, nebo může být dále metabolizován na 1,3-propandiol (1,3-PDO) a 3-hydroxypropionát (3-HP) enzymy kódovanými operonem využívajícím diol/propandiol. 3-HP je organická kyselina, která může být antimikrobiálně aktivní. Pouze málo studií zkoumalo antimikrobiální aktivitu 3-HP, proto je cílem této práce. *L. reuteri* patří mezi bakterie označované jako probiotika. Probiotika jsou prospěšné mikroorganismy, které působí příznivě na lidský mikrobiom a s tím související pozitivní dopad na lidské zdraví. Díky těmto vlastnostem se probiotika řadí mezi takzvané funkční potraviny a v současné době se jim dostává čím dál tím více pozornosti.

## **2 Cíl práce**

Předpokládáme, že 3-HP (3-hydroxypropionát) je antimikrobiálně aktivní proti gram-pozitivním a gram-negativním indikátorovým kmenům při nízkém pH. Pouze málo studií zkoumalo antimikrobiální aktivitu 3-HP, proto je cílem této práce testovat 3-HP jako antimikrobiální proti vybraným gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím.



## 3 Literární rešerše

### 3.1 *Lactobacillus* spp.

Rod *Lactobacillus* zahrnoval 261 druhů ještě v březnu 2020. Jednalo se o druhy velmi rozmanité na úrovni fenotypové, genotypové i ekologické. Po zhodnocení fylogeneze jádra genomu, průměrné nukleotidové identity (ANI; average nucleotide identity), projevu genů skupiny organismů, o nichž se předpokládá, že se vyvinuly ze společného předka, podle zásad kladistiky, fyziologického kritéria a ekologie organismu byl rod *Lactobacillus* rekválifikován do 23 nových rodů s názvy: *Holzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* a *Lentilactobacillus*. Rodový výraz „laktobacily“ zůstává pro označení všech organismů, které byly do roku 2020 klasifikovány jako *Lactobacillaceae*. Tato rekválifikace odráží fylogenetickou pozici mikroorganismů a výrazné klady skupinového sdílení ekologických a metabolických vlastností (Zheng et al. 2020).

### 3.2 *Limosilactobacillus reuteri* obecná charakterizace

*Lactobacillus reuteri* nově nese označení *Limosilactobacillus reuteri*. *Limosus* znamená slizký, což odkazuje na vlastnosti většiny kmenů z rodu *Limosilactobacillus*, využívané k výrobě exopolysacharidů ze sacharózy. *Limosilaktobacily* jsou gram-pozitivní, heterofermentativní anaerobní nebo aerotolerantní tyčinky. Růst je pozorován při 37 °C u většiny druhů (Zheng et al. 2020). *L. reuteri* je anaerobní probiotikum sídlící v lidském gastrointestinálním traktu. Fermentací glycerolu produkuje antimikrobiální sloučeninu reuterin, která inhibuje růst některých gram-pozitivních a gram-negativních bakterií (Spinler et al. 2008).

#### 3.2.1 Výskyt a rozšíření *L. reuteri*

*L. reuteri* se nachází v mikrobiotě obratlovců, ale také ve fermentovaných potravinách (Zheng et al. 2015). Byl izolován z mnoha potravin. Především z mléčných produktů (Dellaglio et al. 1981). Vyskytuje se také při fermentaci obilí, a tudíž se nachází v pekařském kvasu (Gänzle 2020). *L. reuteri* je navrhován jako vhodný pro konzervaci fermentovaných mléčných produktů, který zároveň nemění konzistenci výsledného produktu (Ortiz-Rivra et al. 2017).

*Limosilactobacillus* spp., zejména *L. reuteri*, se komerčně vyrábějí pro použití jako startovací kultura a také jako probiotická kultura (Zheng et al. 2020). Jeho hojnost se u různých jedinců liší. U lidí se vyskytuje v různých částech těla, včetně gastrointestinálního traktu, močových cest, kůže a mateřského mléka (Mu et al. 2018). Poprvé byl izolován *L. reuteri* DMS 20016 v roce 1962 ze střeva dospělého člověka (Kandler et al. 1980).

*L. reuteri* je schopný se adaptovat na potravní a střevní stanoviště, což naznačuje, že tato dvě stanoviště vyvíjejí odlišný selektivní tlak související s rychlostí růstu a energetickým (sacharidovým) metabolismem (Zheng et al. 2015). Střevní mikroby obratlovců se diverzifikací přizpůsobují hostiteli, což vychází z experimentu, který odhaluje genetickou heterogenitu v populaci *L. reuteri* u různých obratlovců (Oh et al. 2010). Kmeny *L. reuteri* a *Lactobacillus johnsonii* jsou autochtonní pro hlodavce a střeva prasat, protože byly zjištěny v několika studiích téměř u všech zvířat (Salzman et al. 2002; Leser et al. 2002; Brooks et al. 2003).

### 3.2.2 *L. reuteri* jako probiotikum

Probiotika jsou obvykle definována jako doplňky stravy obsahující živé mikroorganismy s prospěšnými účinky, a to buď na úrovni specifikované pro kmen, nebo skupinu v závislosti na povaze přínosu. Všechna probiotika musí být bezpečná pro jejich zamýšlené použití (Hill et al. 2014). Většina z nich je zahrnuta do skupiny organismů, které známe jako bakterie mléčného kvašení. Obvykle jsou konzumovány ve formě fermentovaných mléčných produktů. K jejich výhodám patří například zlepšení zdraví trávicího traktu, posílení imunitního systému, syntetizace a zlepšení biologické dostupnosti živin, snížení příznaků intolerance laktózy (Parvez et al. 2006).

Laktobacily zahrnují nejvíce charakterizovaných probiotik, jak můžeme vidět v tabulce č. 1, k čemuž přispívá to, že jejich zástupci dokážou využít velké množství sacharidů. Tato skutečnost jim zajišťuje zvládnutí vysoce konkurenčních prostředí jako je gastrointestinální trakt zvířat. Schopnost některých kmenů využít složené sacharidy (př. mléčné oligosacharidy a jejich monosacharidové prekurzory), jim dává konkurenční výhodu. To je důvodem, proč je mnoho z těchto sacharidů považováno za prebiotika (Zúñiga et al. 2021). Mnohé z probiotických mikroorganismů (jako např. *L. reuteri*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* (syn. *Lactobacillus rhamnosus*), bifidobakterie, některé kmeny *Lacticaseibacillus casei* (syn. *Lactobacillus casei*) se používají v probiotických potravinách, zejména fermentovaných mléčných produktech (De Vrese & Schrezenmeir 2008). Mimoto *L. reuteri* společně s *Limosilactobacillus fermentum* (syn. *Lactobacillus fermentum*), *Lactobacillus helveticus*

a *L. rhamnosus* prokázal zvýšení oxidační stability chlazeného jogurtu. Lze tedy říct, že použití vybraných kmenů laktobacilů je cesta biokonzervace (Hashemi et al. 2020).

Tabulka č. 1. Nejčastější druhy probiotik (Parvez et al. 2006; Śliżewska et al. 2021).

<b>Laktobacily</b>	<b>Bifidobacterium sp.</b>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>
<i>Lactocaseibacillus casei</i> syn. <i>Lactobacillus casei</i>	<i>B. adolescentis</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>Bulgaricus</i>	<i>B. animalis</i>
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	<i>B. infantis</i>
<i>Latilactobacillus curvatus</i> syn. <i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>B. thermophilum</i>
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> syn. <i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>B. longum</i>
<i>Lactobacillus lactic</i>	<i>B. lactis</i>
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> syn. <i>Lactobacillus plantarum</i>	
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> syn. <i>Lactobacillus reuteri</i>	
<i>Levilactobacillus brevis</i> syn. <i>Lactobacillus brevis</i>	
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> syn. <i>lactobacillus pentosus</i>	
<i>Lentilactobacillus kefir</i> syn. <i>lactobacillus kefir</i>	
<b>Enterococcus sp.</b>	<b>Streptococcus sp.</b>
<i>Ent. faecalis</i>	<i>S. cremoris</i>
<i>Ent. faecium</i>	<i>S. salivarius</i>
	<i>S. diacetylactis</i>
	<i>S. intermedius</i>

Střeva jsou osídlena přibližně 100 biliony bakterií, ale také houbami a viry. V lidském střevě převládají kmeny *Firmicutes* a *Bacteroidetes*. Složení těchto mikroorganismů ovlivňuje mnoho faktorů, jako je strava, léky, nemoci, prostředí. Tyto faktory způsobují střevní dysbiózu a mění skladbu mikroorganismů, což vede k nemocem. Dysbióza byla spojena se zvýšenou propustností střev, obezitou, diabetem a průnikem patogenů. Pokusem na myších bylo dokázáno, že mikrobiota po léčbě antibiotiky (po dobu 2 týdnů) neovlivňuje zdraví kostí, ale následná dysbióza snižuje hustotu kostí. Předpokládá se, že úbytku kostní hmoty vyvolanému dysbiózou, lze předcházet užíváním *L. reuteri*, který posílí funkci střevní bariéry (Schepper et al. 2019).

Chronické onemocnění dásní parodontóza, které může vést až ke ztrátě zubů, je velmi rozšířené u dospělé populace. Hlavními mikroorganismy spojenými s parodontózou jsou

*Fusobacterium nucleatum* a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *L. reuteri* díky antimikrobiálnímu účinku snižuje růst *A. actinomycetemcomitans in vitro* (Santos et al. 2020).

Děti trpící akutní gastroenteritidou, kterým byl podán doplněk ve formě probiotik (*L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. casei*), se snížila doba průjmu. Jogurtové kultury zlepšují trávení laktózy a snižují příznaky nesnášenlivosti laktózy. Tuto výhodu způsobuje enzym laktáza obsažený ve fermentovaných mléčných výrobcích (Guarner & Malagelada 2003).

Bylo prokázáno, že probiotika a prebiotika zabraňují rakovině tlustého střeva u některých zvířat, ale u lidí snižování rizika rakoviny tlustého střeva nebylo zjištěno. Prokázáno ovšem bylo, že probiotika snižují aktivitu enzymů, které produkují sloučeniny působící jako iniciátory vzniku nádoru (Guarner & Malagelada 2003). Karcinogeny mohou být přijímány, nebo vytvářeny metabolickou aktivitou mikrobů v gastrointestinálním traktu. Předpokládá se, že probiotické kultury můžou snížit jejich působení detoxikací a změnou prostředí střeva, tím sníží populace a metabolické aktivity bakterií vytvářejících karcinogenních sloučenin, nebo produkci metabolitů (např. butyrát), které danou buňku zabijí (Parvez et al. 2006).

Probiotika mohou pozitivně ovlivnit obezitu a další metabolická onemocnění působením na metabolismus lipidů. Nový kmen *L. reuteri* HI120 může transformovat linolovou kyselinu na konjugovanou linolovou kyselinu. Jeho účinek na metabolismus lipidů byl studován u obézních myších. Výsledky neodhalily významné změny ve stravě, tělesné hmotnosti a hladině triglyceridů v séru myši. Snížily však výrazně hladinu cholesterolu. Lze tedy uvažovat o *L. reuteri* HI120 jako o potenciálním probiotiku, které přispěje k prevenci a léčbě obezity a hyperlipidémie (Sun et al. 2020).

Onemocnění jater způsobené alkoholem patří mezi nejčastější onemocnění jater. Alkohol může inhibovat  $\beta$  – oxidaci a zvýšit syntézu mastných kyselin. Hromadění mastných kyselin v játrech narušuje rovnováhu metabolismu lipidů. V pokusu na myších narušení metabolismu mastných kyselin ethanolem dokázalo zvrátit přidání probiotika *L. reuteri* do jejich diety (Zheng et al. 2020).

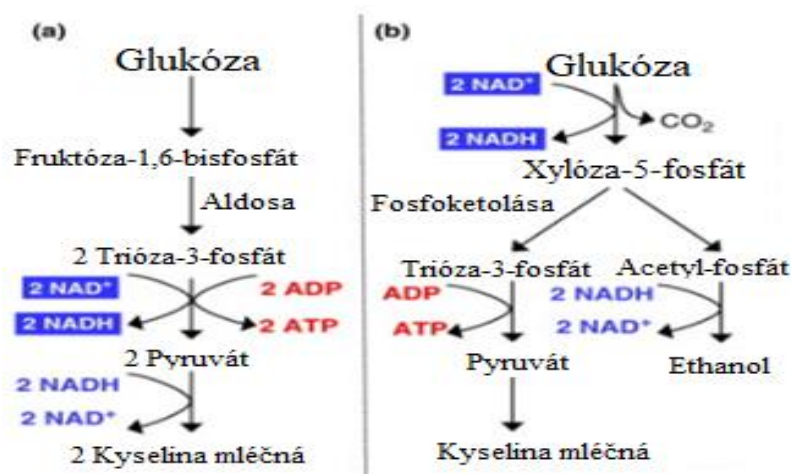
Rezistence vůči antibiotikům je jedním z největších světových problémů týkajících se veřejného zdraví. Současná medicína používá antibiotika nejen pro léčbu bakteriálních infekcí, ale také jako prevenci při rutinních zákrocích, zubních zákrocích nebo také při porodu. *Clostridium difficile* je sporotvorná gram-pozitivní bakterie, která infikuje zejména tlusté střevo a způsobuje průjem s těžkým průběhem. Hlavním faktorem infekce *C. difficile* je narušení zdravého střevního mikrobiomu širokospektrálními antibiotiky. Také je spojena se snížením rozmanitosti mikrobiálního osídlení střeva, což vede k vyššímu množství žlučových kyselin, které podpoří vyklíčení spor *C. difficile*. I přes to se tato infekce léčí antibiotiky, dochází tedy

k mnohočetnému opakování. To je důvodem hledání jiné terapie infekce. Studie ukazuje, že reuterin inhibuje *C. difficile*, ale neinhibuje její spory a klíčení. Dále ukazuje, že reuterin chrání epitelové buňky před toxicitou *C. difficile*. *L. reuteri* se jeví jako relevantní probiotikum k léčení infekce *C. difficile* (Engevik et al. 2020).

### 3.2.3 Metabolismus *L. reuteri*

Mikroorganismy v tenkém a tlustém střevě dokončují proces trávení. Jejich metabolity jsou organické kyseliny (mléčná kyselina a octová kyselina), které mají tendenci snižovat střevní pH a tím zhoršují podmínky pro škodlivé bakterie. Mohou také ovlivnit ochranné funkce střevní sliznice včetně syntézy a sekrece antibakteriálních peptidů a mucinů (Parvez et al. 2006). Biliony mikroorganismů sídlících v gastrointestinálním traktu tvoří řadu nezbytných ochranných a metabolických funkcí přispívajících ke zdraví hostitele, které zahrnují zpracování potravin, trávení nestravitelných polysacharidů, ničení patogenů a syntéza vitaminů. Metabolismus sacharidů vede k produkci krátkých řetězců mastných kyselin, jako je butyrát a propionát, které poskytují důležitý zdroj živin (Clarke et al. 2014).

Laktobacily se rozdělují na homofermentativní, fakultativně heterofermentativní a heterofermentativní druhy (Gänzle & Follador 2012). Homofermentativní druhy metabolizují sacharidy cestou Emden-Meyerhoffa. Zde z glukózy vzniknou 2 moly mléčné kyseliny. Klíčovým je pyruvát, jehož osud závisí na přístupu kyslíku. Kyselina mléčná je hlavním produktem při dostatku fermentovaných sacharidů. Heterofermentativní druhy rozkládají sacharidy cestou fosfoketolázy viz obrázek č. 1. Výsledkem tohoto kvašení je mléčná kyselina, ethanol a oxid uhličitý (Gänzle 2015).

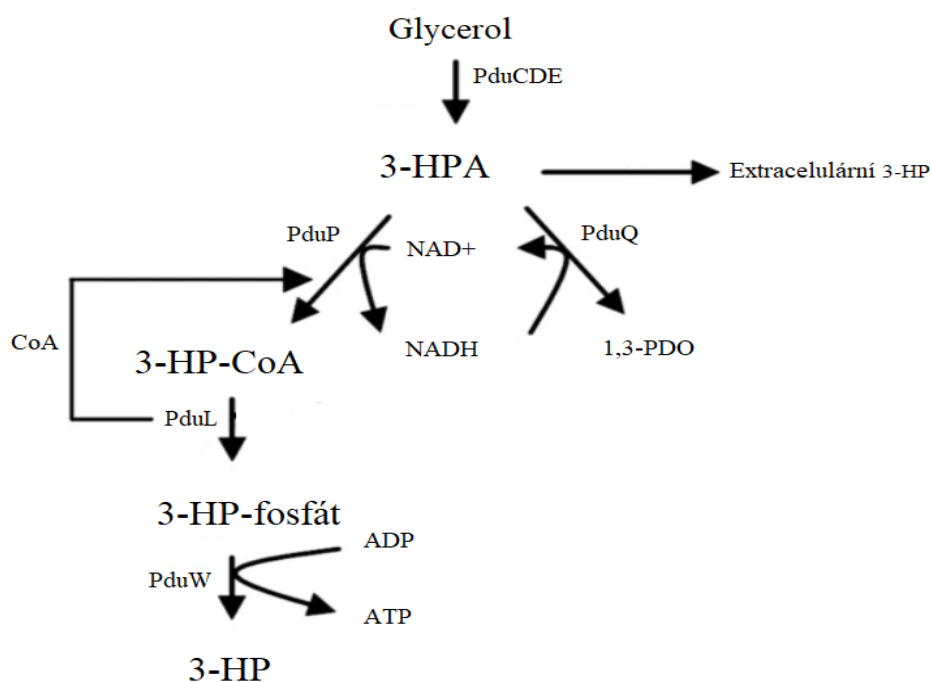


Obrázek č. 1. Schéma homofermentace (a) a heterofermentace glukózy (b) (upraveno podle Gänzle 2015).

Hlavní zásobní polysacharid rostlin je škrob. Skládá se z lineární amylosy a větveného amylolektinu. Amylosa obsahuje 1,4- $\alpha$ -glykosidově vázané glukózy. Amylopektin je složen z řetězců rozvětvených zhruba na každé desáté glukózové jednotce 1,6- $\alpha$ -glykosidovou vazbou. Na degradaci škrobu se podílí  $\alpha$ -amylasa a  $\beta$ -amylasa ve spojitosti se vznikem maltodextrinu, maltózy a glukózy. Lineární nebo rozvětvené glukany tvoří štěpením bakterie a houby. Příkladem je polysacharid reuteran produkovaný *L. reuteri*. Většina heterofermentativních laktobacilů, kam patří i *L. reuteri*, má jediný aktivní enzym na maltózu a tím je maltosofosforylása. Glukansacharása a fruktosacharása jsou jediné extracelulární enzymy schopné hydrolýzy sacharózy. Exopolysacharidy tvořené těmito enzymy přispívají k tvorbě biofilmu ve střevě, který přispívá k odolnosti laktobacilů vůči chemikáliím a fyzickému stresu. Fosforylása projevuje vysokou specifickou pro sacharózu jako substrát. Fosfolýza sacharózy je z energetického hlediska příznivější, protože glukóza je fosforylována anorganickým fosfátem, a nikoli za spotřeby adenosintrifosfátu (ATP). Tato fosfatása je jediným intracelulárním enzymem v *L. reuteri* schopným přeměnit sacharózu a významně přispívá k metabolismu sacharózy u tohoto druhu. Různé disacharidové hydrolázy nebo disacharidfosfohydrolázy se nacházejí v *L. casei*, *L. reuteri*, *Lactiplantibacillus plantarum* syn. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus johnsonii*, *L. delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*. Spektrum fermentace oligosacharidů zastupují ve střevech *L. reuteri* a *L. acidophilus* (Gänzle & Follador 2012).

Glycerol (propan-1,2,3-triol) běžně najdeme ve střevě. Je k dispozici jako produkt mikrobiální fermentace (trávení tuků, hlenu, buněk epitelu). Zástupci rodů *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus* a *Eubacterium halii* jsou schopni redukčně metabolizovat glycerol na 3-hydroxypropionaldehyd (3-HPA) a následně ihned redukovat na 1,3-propandiol (1,3-PDO), což způsobí 1,3-propandioldehydrogenáza během růstu (Engels et al. 2016). Meziprodukt 3-HPA využívá enzymy kódované v jeho propandiol operonu (*pdu*) (Dishisha et al. 2014). Přeměna glycerolu na 1,3-PDO a 3-hydroxypropionovou kyselinu (3-HP) je vyvolána dehydratací glycerolu na 3-HPA. Tato reakce je katalyzována enzymem B12-glyceroldehydratásou (PduCDE). Následující přeměna 3-HPA na 1,3-PDO je katalyzována 1,3-propandioloxidoreduktásou (PduQ) a alkoholdehydrogenásou. Tato reakce je spojena s regenerací jednoho molu nikotinamidadeninukleotid (NAD<sup>+</sup>) a produkovaného molu 1,3-PDO, což umožňuje, aby glycerol byl nepřetržitě využíván rostoucími buňkami jako elektronový příjemce pro konverzi nikotinamidadeninukleotid (NADH) generované během metabolismu cukru a růstu buněk. Naproti tomu buňky v klidovém režimu budou v této reakci pokračovat pouze do doby, než budou spotřebovány všechny molekuly NADH dostupné

v buňce. Velmi důležitá je role oxidační dráhy, jejímž prostřednictvím je 3-HPA oxidována ve třech stupních. 3-HPA je enzymy propionaldehyddehydrogenásou (PduP), fosfotransferásou (PduL) a propionátkinásou (PduW). Tudíž 3-HP s 3-HP-CoA a s 3-HP-fosfát jako meziproducty využívají  $\text{NAD}^+$  k získání  $\text{NADH}$ , což vede k rovnováze redoxních ekvivalentů. Celkově snižování rovnováhy ekvivalentů vede ke kompenzaci produkce hydroxykyselin a diolů. Kromě toho koenzym A (CoA), který je potřebný pro syntézu 3-HP-CoA v PduP katalyzačním kroku, je později uvolněný v PduL katalyzované reakci umožňující kontinuální regeneraci těchto dvou kofaktorů. V poslední fázi přeměny 3-HPA na 3-HP je získán jeden mol ATP na jeden mol vzniklé 3-HP. Tento zisk ATP činí tuto reakci termodynamicky příznivou. Získané ATP v tomto kroku je využito pro uvedení do aktivního stavu (reaktivaci) inaktivované glyceroldehydratázy v procesu, který vyžaduje ATP, kation hořečnatý a adenosinkobalamin (Dishisha et al. 2014).



Obrázek č. 2. Schéma metabolismu glycerolu v *L. reuteri* (upraveno podle Dishisha et al. 2014).

### 3.2.4 3- hydroxypropionová kyselina

Z chemického hlediska je 3-HP tříuhlíkatá, opticky neaktivní, organická sloučenina. 3-HP je strukturální izomer mléčné kyseliny (2- hydroxypropionové kyseliny) (Datta 1995).

Organické kyseliny mají obecnou strukturu  $\text{R-COOH}$ . Organické kyseliny s krátkým řetězcem (C1 – C7) jsou spojovány s antimikrobiální aktivitou. Patří mezi ně kyseliny s jednou karboxylovou skupinou (mravenčí kyselina, octová kyselina, propionová kyselina, máselná

kyselina) nebo karboxylové kyseliny nesoucí navíc další karboxylovou skupinu (nejčastěji na alfa uhlíku), jako je mléčná kyselina, jablečná kyselina, vinná kyselina a citrónová kyselina. Organické kyseliny jsou slabé kyseliny a jsou pouze částečně disociované (Dibner & Buttin 2002). Hlavně nedisociovaná forma organických kyselin vstupuje do buňky a okyseluje cytoplazmu mikroorganismů. Pokles pH cytoplazmy mění aktivitu enzymů a poškozuje strukturní proteiny a nukleové kyseliny (Mani-López et al. 2012). Stejně jako jiné kyseliny, je 3-HP toxická pro růst buněk a jejich produkci (Ashok et al. 2013).

Zástupci *Lentilactobacillus* spp. produkují propionovou kyselinu *in situ* při obilných fermentacích (Zhang et al. 2010). Kyselina propionová a její soli se používají jako inhibitory plísní v pekárenských výrobcích a patří tedy mezi povolené konzervační látky (Moresi & Parente 2014). Naproti tomu pouze málo studií zkoumalo konzervační potenciál 3-HP (Chun et al. 2014; Sankaranarayanan et al. 2014).

Mnoho mikroorganismů může produkovat 3-HP, buď jako meziproduct, nebo jako konečný produkt metabolismu. 3-HP lze tedy biologicky vyrobit z glukózy nebo glycerolu (Kumar et al. 2013). Existuje i několik chemických metod pro výrobu 3-HP z prekurzorů, jako je akrylová kyselina, lakton kyseliny 3-hydroxypropanové, 3-hydroxypropannitril, 2-propenol, 1-acetoxyethylen a 1,3-dihydroxypropan. Avšak tyto chemické procesy jsou nebezpečné pro životní prostředí, jsou časově náročné a nákladné, proto si získává zájem biologická cesta (Tingirikari et al. 2016).

3-HP se používá při syntéze řady průmyslových látek, jako je akrylová kyselina, 1,3-propandiol, methylakrylát, propionlakton, malonová kyselina a akryl amid. Tyto sloučeniny se používají pro výrobu lepidel, polymerů, vláken, plastových obalů, pryskyřic a čistících prostředků (Datta 1995; Huang et al. 2013; Tingirikari et al. 2016).

### 3.2.5 Reuterin

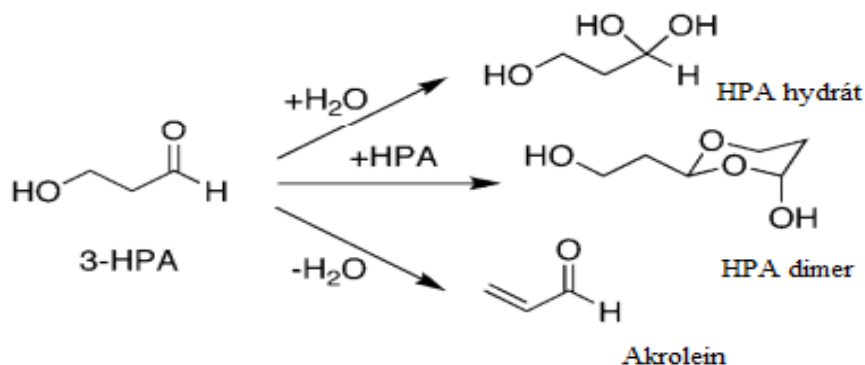
Reuterin je antimikrobiální látka účinná proti mnoha patogenům, včetně mikroorganismům způsobujícím kažení. Jeho vysoká rozpustnost ve vodě, odolnost vůči teple, proteolytická a lipolytická aktivita a stabilita v široké škále hodnot pH, činí z reuterinu ideální přírodní ochranu pro potraviny. Reuterin z *L. reuteri* DPC16 prokázal významné snížení bakteriální populace proti gram-pozitivním (př. *Staphylococcus aureus*) a gram-negativním (př. *Escherichia coli*) bakteriím (Gyawali & Ibrahim 2014). Reuterin udává konkurenční výhody místu působení, například gastrointestinálnímu traktu (Stevens et al. 2011). Hlavní mechanismus antimikrobiální aktivity reuterinu je předpokládána nerovnováha buněčného



redoxního stavu vyplývajícího z reakce 3-HPA s volnými thiolovými skupinami, což způsobuje vyčerpání glutathionu a změnu proteinů, včetně funkce enzymů (Engels et al. 2016).

Produkce reuterinu byla zpočátku pozorována pouze u druhů *L. reuteri*, které můžeme najít jako součást mikrobioty u lidí a zvířat. Nicméně bylo prokázáno, že druhy *L. brevis*, *Lentibactobacillus buchneri* (syn. *Lactobacillus buchneri*) a *Loigolactobacillus coryniformis* (syn. *Lactobacillus coryniformis*) jsou také schopné reuterin produkovat (Bianchini & Bullerman 2010). Dále ho můžou syntetizovat zástupci *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter* a *Klebsiella*. Ovšem reuterin jako meziprodukt těchto bakterií degraduje na 1,3-propandiol, vodu a oxid uhličitý. Pouze v *L. reuteri* je aktivita oxidoreduktázy, která degraduje reuterin, dostatečně nízká, aby se za anaerobních podmínek nahromadilo dostatečné množství, které je toxické pro jiné bakterie (Begunova et al. 2020).

Na obrázku č. 3 je vidět, že reuterin může tvořit dimery HPA, nebo být hydratován na HPA hydrát. Reuterin může být také dehydratován do toxické sloučeniny akroleinu (Vollenweider & Lacroix 2004). Akrolein byl identifikován jako hlavní složka zodpovědná za antimikrobiální aktivitu reuterinu. Kromě prospěšné antimikrobiální funkce je reuterin spojen s procesem konjugace heterocyklických aminů, které jsou potenciální pro biologickou dostupnost toxických látek v lidském střevě (Engels et al. 2016).



Obrázek č. 3. Reuterin (upraveno podle Schaefer et al. 2010).

### 3.3 Antimikrobiální aktivita

Bakterie, zejména bakterie mléčného kvašení, produkují širokou škálu chemických látek s antimikrobiální aktivitou (Gyawali & Ibrahim 2014). Tato aktivita by mohla být alternativou chemických konzervantů (jako je např. benzoová kyselina, sorbová kyselina, dusitany, siřičitany). Bakterie mléčného kvašení produkují několik antimikrobiálních látek, včetně organických kyseliny (mléčná kyselina, octová kyselina, mravenčí kyselina, kapronová

kyselina), oxidu uhličitého, peroxidu vodíku, diacetylu, ethanolu, bakteriocinů a reuterinu (Leroy & De Vuyst 2004). Sloučeniny, vznikající během fermentace, slouží jako překážky pro patogeny a kažení (Ross et al. 2002).

### 3.3.1 Metody stanovení antimikrobiální aktivity

Hlavním důvodem testování citlivosti antimikrobiální aktivity je vhodný výběr léků. Antimikrobiální aktivita může být vyhodnocena kvalitativně s označením výsledku citlivý, což značí, že standardní dávka je vhodná pro léčbu pacienta, nebo jako rezistentní, což naopak značí, že infekce nebude reagovat na antimikrobiální činidlo, a poslední možností je označení jako meziproduct, kde jsou testované kmeny na hranici mezi mírně rezistentní a středně citlivé. Meziproduct značí, že kmen může být inhibován většími dávkami, nebo může být potlačen v místech větší koncentrace činidla (Collins et al. 2004).

Jeden z důležitých problémů je bakteriální rezistence vůči lékům. Označujeme ji jako stav, při kterém není nebo je snížena citlivost na antibakteriální látky. Experimentální stanovení antibakteriální aktivity je založeno na testování postupně rostoucích koncentrací chemické sloučeniny proti zkoumaným mikroorganismům za účelem zjištění koncentrace, při které je růst inhibován (Babu et al. 2009). Tři hlavní metody, které se používají pro stanovení antimikrobiální aktivity jsou difúzní metoda, minimální inhibiční koncentrace (minimum inhibitory concentration; MIC) a metoda bodu zlomu (breakpoints) (Collins et al. 2004).

#### 3.3.1.1 Disková difúzní metoda

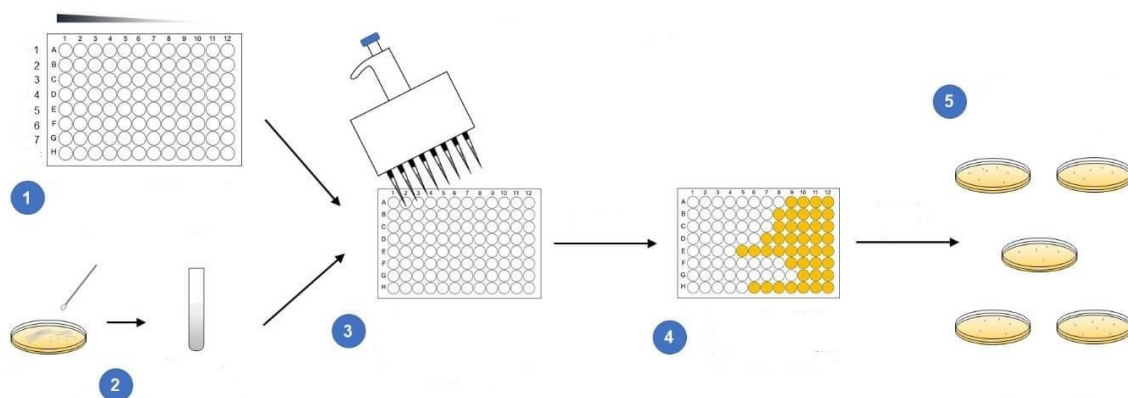
Již mnoho let je disková difúzní metoda Kirby-Bauer nejcitlivější. Kirby-Bauerova metoda používá inhibiční zóny, kde nerostou bakterie, aby byla zjištěna úroveň rezistence vůči antibiotikům (Tan 2006). Test s činidly na papírových discích patří mezi nejpoužívanější metody v klinických laboratořích. Postup je jednoduchý a spolehlivý. Papírové disky o známém množství antibiotik se aplikují na desky naočkované testovacím/kontrolním organismem. Po inkubaci se používá průměr inhibice růstu k rozhodnutí, zda je kmen náchylný ke zkoušenému činidlu. Metody kontroly variací se rozdělují do dvou skupin: srovnávací metody a standardizované metody (Collins et al. 2004).

Ve srovnávacích metodách se velikost zóny zkušebního kmene porovnává s kontrolním kmenem. Předpokládá se, že změny při zkoušce ovlivňují zkušební a kontrolní kmeny, a tím je ruší. Nestandardizace a obtížnost výběru vhodných ovládacích prvků dělá tuto metody méně spolehlivé než standardizované metody (Collins et al. 2004).

Ve standardizovaných metodách jsou všechny podrobnosti doporučeny v mezinárodní studii testování citlivosti. Průměry zón pochází z tabulky velikosti bodu zlomu. Velikosti zón jsou definované z analýzy velikosti zóny MIC s minimalizací chyb a studiem distribuce citlivosti různých druhů. Tyto rozdílné metody mohou být kombinovány (Collins et al. 2004).

### 3.3.1.2 Minimální inhibiční koncentrace

MIC je definováno jako nejnižší koncentrace činidla, která inhibuje viditelný růst. V minimálních inhibičních koncentračních metodách se stanovuje citlivost organismů na sériové dvojí ředění činidel v agaru, nebo vývaru viz obrázek č. 6. V klinických laboratořích se metody MIC používají k testování organismů, u kterých není jednoznačný výsledek v difúzní zkoušce, nebo diskový test může být nespolehlivý. Minimální baktericidní koncentrace (MBC) je nejnižší koncentrace, která brání růstu (Collins et al. 2004) a sníží o 99,9 % počáteční mikrobiální hustotu (Andrews 2001). MBC je komplementární k MIC. V MIC je nejnižší úroveň antimikrobiální látky, která inhibuje růst bakterií, zatímco MBC stanovuje nejnižší úroveň látky, která způsobuje mikrobiální smrt (French 2006).



Obrázek č. 4. Schéma postupu stanovení MIC.

Pro stanovení testu MIC/MBC se nejprve připraví dvojnásobné sériové ředění zkušebních sloučenin a jedno antibiotikum pro kontrolu kvality. V dalším kroku (2) se vytvoří inokulum odebráním několika kolonií z agarové destičky. Připraví se McFarlandův standard a následuje ředění tohoto standardu do média. Inokulum přeneseme do mikroředicí destičky, kde je připravena sériově naředěná zkušební sloučenina (3). Takto připravená destička se inkubuje. Po inkubaci se zjistí hodnota MIC (4). V dalším kroku (5) se zjišťuje MBC přenesením na vhodné agarové médium. Následuje inkubace a kontrola kolonií pro stanovení MBC.

zdroj: emerypharma.com

Jinou kvantitativní formu testování představuje E-test. Testování probíhá na komerčně dostupných plastových prouzcích 50 mm x 5 mm se sušeným exponenciálním antimikrobiálním gradientem na jedné straně a stupnicí MIC na druhé straně (Collins et al. 2004).

### 3.3.1.3 Metoda bodu zlomu (breakpoint)

Tato metoda je podobná MIC. Rozdíl je v tom, že se zkouší pouze jedna, nebo dvě koncentrace. Koncentrace vybrané pro testování jsou hraniční hodnoty oddělující různé kategorie citlivosti. Koncentrace s jedním bodem zlomu růstu označujeme jako rezistentní a s žádným růstem jako citlivý. Tato metoda bývá v posledních letech oblíbenější než disková difúzní metoda. Testy bodu zlomu jsou vhodné pro automatizované zaočkování a čtení testů (Collins et al. 2004).

### 3.3.1.4 Faktory ovlivňující antimikrobiální testování

Prvním z faktorů ovlivňujících antimikrobiální testování je médium. Médium by mělo podporovat přirozený růst organismů a zároveň by nemělo obsahovat antagonisty antimikrobiální aktivity nebo látky, které mohou inaktivovat mikrobiální činidla. U difúzních testů se mění velikost zóny s hloubkou média (agar by měl být rovnoměrně rozprostřen do hloubky  $4 \pm 0,5$  mm). Hodnota pH ovlivňuje rychlost růstu mikroorganismů, čímž nepřímo ovlivňuje jejich citlivost. Při inkubaci může oxid uhličitý snižovat pH, které může ovlivnit aktivitu některých látek. Svou roli hraje také velikost inokula. Platí, že větší inokulum snižuje náchylnost k látkám jak v difúzních, tak v ředících testech. Je nezbytná standardizace inokula. Plno problémů může působit nesprávné zacházení s komerčně vyráběnými disky, na které tímto vlivem následně působí vlhkost. Disky by se měly uchovávat ve tmě a nádoby na uchování by měly obsahovat vysoušedlo. Ideální teplota uchování disků je méně než 8 °C. Před otevřením by měly být zahřáty na pokojovou teplotu, aby se předcházelo kondenzaci vody na discích. Výsledek ovlivňuje způsob čtení výsledků. Pokud nečte výsledek automatizovaný systém, může výsledek být subjektivně zkreslen (Collins et al. 2004).

## 4 Metodika

Cílem této práce bylo testovat antimikrobiální aktivitu 3-HP proti gram-pozitivním a gram-negativním kmenům při nízkém pH. Praktická část bakalářské práce se skládá ze dvou částí. První část je věnována testování minimální inhibiční koncentrace 3-HP, která je stanovena pomocí metody ředění za použití 96-ti jamkové destičky. MIC bylo srovnáváno s MIC propionové kyseliny při pH 6,5; 5,5 a 4,8, protože propionová kyselina a 3-HP jsou strukturně podobné a mají podobné disociační konstanty (pK). Kyselina propionová má pK 4,88 a 3-HP má pK 4,5. Druhá část je zaměřena na zkoumání růstu vybraných kmenů v přítomnosti glycerolu. Tento růst a využití glycerolu je zároveň předpokladem pro tvorbu 3-HP. Měření produkce 3-HP není součástí této práce a mnou naměřená data budou v části diskuse porovnána s výsledky naměřenými na katedře (Liang et al. 2021).

### 4.1 Charakteristika použitých kmenů

K testování byly použity bakteriální kmeny ze sbírky Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky, ČZU v Praze, dále z laboratoře potravinářské mikrobiologie na Albertské univerzitě (FUA, Kanada), z Německé sbírky pro mikroorganismy a buněčné kultury (DSMZ), z Americké sbírky typové kultury (ATCC) a z České sbírky mikroorganismů (CCM, Masarykova univerzita Brno). Jednalo se o 7 kmenů *Limosilactobacillus reuteri* syn. *Lactobacillus reuteri*, kmen *Levilactobacillus brevis* syn. *Lactobacillus brevis*, kmen *Furfrilactobacillus rossiea* syn. *Lactobacillus rossiae*, 4 kmeny *Escherichia coli* a 4 kmeny *Bifidobacterium*. Sbírkové označení a původ kmenů je uveden v tabulce č. 2.

Tabulka 1. Použité bakteriální kmeny.

Druh	kmen	původ	Druh	kmen	původ
<i>L. reuteri</i>	DSM 20016	člověk	<i>E. coli</i>	Nissle	-
<i>L. reuteri</i>	CCM 3625	-	<i>E. coli</i>	ATCC 25922	člověk
<i>L. reuteri</i>	J3	-	<i>E. coli</i>	1	člověk
<i>L. reuteri</i>	FUA 3400	kvásek	<i>E. coli</i>	2	člověk
<i>L. reuteri</i>	FUA 3400 $\Delta$ pduCDE	-	<i>B. animalis</i>	Danone	-
<i>L. reuteri</i>	1	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	INFNUT	střevo kojence
<i>L. reuteri</i>	2	-	<i>B. bifidum</i>	B10	člověk
<i>L. brevis</i>	CCM 3805	lidské výkaly	<i>B. bifidum</i>	B29	člověk
<i>F. rossiae</i>	DSM 15814	kvásek			

## 4.2 Příprava kultivačních medií

Kultivační média byla připravena dle pokynů dodavatele (Oxoid, Česká republika), popřípadě byla obohacena o další ingredience, které jsou zde uvedeny. Média byla připravována buď ve formě agaru nebo tekutého média (broth). Bylo připraveno médium MRS, kde bylo v destilované vodě rozpuštěno 52 g/l v případě brothu a 62 g/l v případě agaru. Pro přípravu média Nutried Broth Nr. 2 bylo v destilované vodě rozpuštěno 25 g/l v případě agaru a 28 g/l v případě brothu. Médium Wilkins Chalgren (33 g/l v případě brothu, 43 g/l v případě agaru) bylo obohaceno sójovým peptonem v koncentraci 5 g/l, dále byl přidán cystein (0,5 g/l) a tween 1 ml/l. Druhá sada médií byla upravena na pH 4,8 a 5,5 za použití HCl. Všechna média byla sterilována v autoklávu.

## 4.3 Příprava roztoku 3-HP a propionové kyseliny

Molární hmotnost 3-HP je 90 g/mol. 3-HP byla k dispozici ve formě 30% roztoku. To znamená 300 g/l. Pracovní roztok: 33,3 mM (ředěno 1 : 100) = 25  $\mu$ l v 2,5 ml.

Molární hmotnost propionové kyseliny je 74 g/mol. Její hustota je 0,993 g/ml = 993 g/l. Pracovní roztok: 60 mM (ředěno 1 : 223) = 44  $\mu$ l v 10 ml.

## 4.4 Příprava pracovních kultur

Zmrazené bakteriální kultury byly vyjmuty z mrazáku, kde byly uchovávány při teplotě  $-80$  °C. Vzorky byly inokulovány na Petriho misku s agarem. Misky byly inkubovány při teplotě 30 °C nebo 37 °C po dobu 24 hodin v závislosti na druh (viz tabulka č. 3). Následovala příprava kultury v tekutém médiu. Byla vybrána jedna kolonie z agarové plotny. Opět přišla na řadu inkubace v 30 °C nebo 37 °C po dobu 24-48 hodin (viz tabulka č. 3). Anaerobní kultivace probíhala ve speciálních nádobách s vyvíječi anaerobního prostředí (AnaeroGen, Oxoid). Po uplynulé době byl přenesen 1 ml vzorku do zkumavky Eppendorf. Vzorky byly odstředěny při centrifugačním zrychlení 5000 po dobu 5 min. Tekutina nad sedimentem (supernatant) byla odstraněna a nahrazena jedním mililitrem čerstvého média. Po promíchání vznikla pracovní kultura.

Tabulka 2. Podmínky růstu testovaných bakterií.

Druh	Médium	Teplota růstu (°C)	Aerobní/anaerobní
<i>Escherichia coli</i>	Nutrient broth/agar	37	Aerobní
Laktobacily	MRS broth/agar	30 nebo 37	Anaerobní
<i>Bifidobacterium</i>	Wilkens-Chalgren se sójovým peptonem broth/agar	37	Anaerobní

#### 4.5 Test minimální inhibiční koncentrace (MIC)

K testu minimální inhibiční koncentrace 3-HP byly použity 96-ti jamkové sterilní PCR destičky a metoda ředění. Jako indikátorové kmeny byly použity vybrané gram-pozitivní (*L. reuteri* 1, *L. reuteri* 2, *B. longum* subsp. *infantis* INFNUT, *B. animalis* – Danone, *B. bifidum* B10, *B. bifidum* B29) a gram-negativní bakterie (*E. coli* Nissle, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 1, *E. coli* 2). Destičky byly naplněny následujícím způsobem:

1. Vícekanálovou pipetou bylo přeneseno do každé jamky 120 µl sterilního média.
2. Bylo přidáno 120 µl média, které mělo upravené pH na hodnoty 6,5; 5,5 a 4,8.
3. Poté bylo napipetováno do první poloviny destičky 120 µl 3-HP (33,3 mM) a do druhé 120 µl propionové kyseliny (60 mM). Kromě prvního, který byl ponechán jako negativní kontrola, zde bylo tedy pouze médium.
4. Následovalo ředění od druhého řádku po sedmý. Osmý byl ponechán jako pozitivní kontrola, kde bylo pouze médium a pracovní kultura.
5. Do testovacích sloupců od druhého po osmý bylo přidáno 50 µl pracovní kultury.

Následně byla destička inkubována. Pomocí čtečky byla stanovena optická denzita při 600 nm.

#### 4.6 Tvorba 3-HP během růstu laktobacilů

Pro zjištění tvorby 3-HP během růstu v přítomnosti glycerolu byly použity vybrané reuterin-pozitivní (*L. reuteri* DMS 20016, *L. reuteri* FUA 3400, *F. rossiae* DMS 15814) a reuterin-negativní laktobacily (*L. reuteri* FUA 3400  $\Delta$ *pduCDE*, *L. reuteri* J3, *L. reuteri* CCM 3625, *L. brevis* CCM 3805), u kterých byla sledována optická denzita.

250 µl pracovní kultury bylo převedeno do zkumavek typu Hungate, kde bylo 10 ml čistého MRS média a do stejných zkumavek s 10 ml MRS média obohaceného o glycerol o koncentraci 110 mM nebo 55 mM. Vzorek byl inkubován a každou hodinu byla

sledována jeho optická denzita měřena v denzitometru McFarladn DEN1-B (Biosan, Lotyšsko) po dobu 7 hodin a následně po 24 hodinách. Pokus byl opakován třikrát. Obdobně byl tento pokus realizován pracovníky katedry, kdy byly supernatanty zpracovány a metabolity včetně 3-HP detekovány a kvantifikovány, detailně popsáno v Liang et al. (2021)

## 5 Výsledky

### 5.1 Výsledky minimální koncentrace inhibice

Celkem bylo testováno 10 kmenů, z toho 4 gram-negativní kmeny (*E. coli* 1, *E. coli* 2, *E. coli* Nissle, *E. coli* ATCC 25922) a 6 gram-pozitivních kmenů (*L. reuteri* 1, *L. reuteri* 2, *B. animalis* – Danone, *B. longum* subsp. *infantis* INFNUT, *B. bifidum* B10, *B. bifidum* B29).

Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) 3-HP a propionové kyseliny bylo provedeno metodou ředění a následně byla ze spektrofotometricky naměřených dat zjištěna minimální inhibiční koncentrace, která je potřebná k potlačení růstu o 50 % (MIC50). Měření probíhalo bohužel jen v jedné kopii a z naměřených dat je patrné, že je zde celá řada nepřesností, která mohla vzniknout chybou v pipetování, kontaminací a vlivem dalších faktorů během procesu kultivace vzorků. Všechna naměřená data jsou uvedena v přílohách práce (tabulka č. 5.). Některé kmeny nebo varianty kmenů v rámci testování nenarostly. Výsledky, kde byla patrná chyba v experimentu, byly z hodnocení vyřazeny.

Z výsledků je patrné, že samotný producent 3-HP *L. reuteri* není inhibován v růstu přítomností 3-HP a MIC50 byla naměřena u 3-HP >33,3 mM, u propionové kyseliny >60 mM.

V případě dalších testovaných gram-pozitivních bakterií jsou výsledky dost variabilní (viz tabulka č. 4.). MIC50 se u bifidobakterií mírně lišila v závislosti na hodnotě pH, bohužel zde nebyl zaznamenán jednotný trend, a druhové a kmenové rozdíly však byly významnější. Nejvíce se odlišoval kmen *Bifidobacterium animalis* – Danone, což může být způsobeno chybou experimentu, anebo tím, že tento kmen se obecně velmi liší od ostatních bifidobakterií kultivačními nároky (dobrý růst, růst i v přítomnosti menšího množství kyslíku) a je tedy hojně využíván v potravinářství. Naproti tomu ostatní testované bifidobakterie byly lidské izoláty, které vyžadují striktně anaerobní podmínky a jsou citlivé na celou řadu faktorů.

V případě gram-negativních *E. coli* byly testovány 4 kmeny, a i přes to, že některé kopie nenarostly, tak výsledky mají celkem jednotný trend, kdy potřebná MIC50 klesá s hodnotou pH, což byl předpoklad testování. Tento trend je společný jak pro propionovou kyselinu,



tak pro 3-HP, jen kmen *E. coli* Nissle vykazoval stejnou hodnotu MIC50 bez ohledu na pH. Detekovaný účinek propionové kyseliny a 3-HP byl obdobný.

Tabulka č. 3. Minimální inhibiční koncentrace inhibující 50 % růstu (MIC50).

Testovaný kmen	Propionová kyselina			3-HP			
	Gram (-)	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8
<i>Escherichia coli</i> 1		7,5-15	1,88-3,75	< 1,88	NG	NG	NG
<i>Escherichia coli</i> 2		15-30	3,75-7,5	NG	NG	NG	NG
<i>Escherichia coli</i> Nissle		7,5-15			8,33-16,65		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		X	X	7,5-15	16,65-33,3	8,33-16,65	
Testovaný kmen	Propionová kyselina			3-HP			
	Gram (+)	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8
<i>L. reuteri</i> (1)		> 60			> 33,3		
<i>L. reuteri</i> (2)		> 60			> 33,3		
<i>Bifidobacterium animalis</i> - Danone		30-60			> 33,3		
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infant</i>		X	3,75-7,5	7,5-15	X	8,33-16,65	2,08-4,17
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (B10)		X	3,75-7,5	NG	8,33-16,65	4,17-8,33	NG
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (B29)		X	7,5-15	> 60	X	4,17-8,33	> 60

Vysvětlivky:

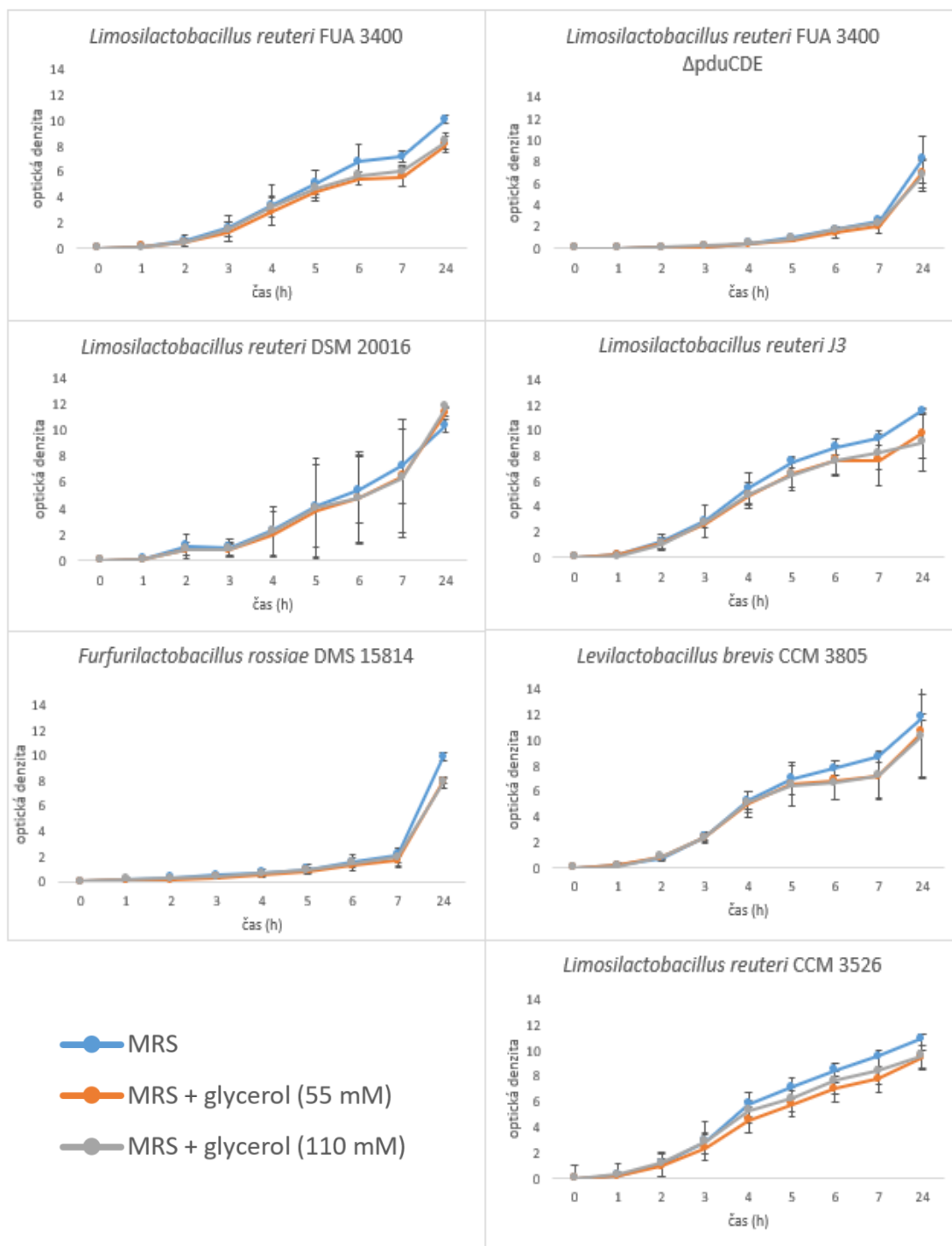
NG – kultura nenarostla

X – nepoužitelný výsledek

Červeně značené = nestandardní výsledek

### 5.1.1 Výsledky tvorby 3-HP během růstu laktobacilu

Byly testovány druhy reuterin-pozitivní (*L. reuteri* FUA 3400, *L. reuteri* DMS 20016, *F. rossiae* DSM 15814) a reuterin-negativní (*L. reuteri* FUA 3400  $\Delta$ pduCDE, *L. reuteri* J3, *L. reuteri* CCM 3526, *L. brevis* CCM 3805). Byl pozorován jejich růst v médiu za přítomnosti různé koncentrace glycerolu po dobu 24 hodin. V pravidelném časovém odstupu proběhlo měření optické denzity. Bylo zjištěno, že přítomnost glycerolu růst pozorovaných laktobacilů neovlivnila. Možná nepatrně nižší optická denzita byla zaznamenána v přítomnosti glycerolu u *L. reuteri* FAU 3400, J3, a CCM 3526, dále pak u *L. brevis* CCM 3805. Na obrázku č. 7 je grafické znázornění průběhu změny optické denzity. Nicméně rychlost růstu jednotlivých kmenů se lišila. Z grafů je patrné, že mezi kmeny byly rozdíly v rychlosti růstu. Kdy u kmene *L. reuteri* FUA 3400  $\Delta$ pduCDE a *F. rossiae* DSM 15814 došlo k zaznamenání nárůstu optické denzity, a tedy růstu až po 5 hodinách od počáteční inokulace a měření denzity. V případě ostatních kmenů to bylo zhruba po 2-3 hodinách.



Obrázek č. 5. Růst reuterin-pozitivních a reuterin-negativních laktobacilů v průběhu 24 hodin inkubovaných při teplotě 37 °C.

## 6 Diskuze

Kmeny *Limosilactobacillus reuteri* se používají jako startovací a bioprotektivní kultury. Přispívají ke konzervaci potravin produkcí fermentačních metabolitů mléčné kyseliny, octové kyseliny a reuterinu. Reuterin se skládá z akroleinu a 3-hydroxypropionaldehydu (3-HPA), které lze dále metabolizovat na 1,3-propandiol a 3-hydroxypropionovou kyselinu (3-HP). Zatímco reuterin byl předmětem mnoha výzkumů, příspěvek 3-HP k antimikrobiální aktivitě reuterinu souvisejících s potravinami není příliš znám (Laing et al. 2021).

### 6.1 Minimální inhibiční koncentrace 3-HP

V průběhu řízené fermentace potravin bakteriemi mléčného kvašení klesá pH z téměř neutrálního na pH <5 a předpokládá se, že to zvyšuje antimikrobiální aktivitu organických kyselin. Organické kyseliny a jejich soli jsou považovány za slabé kyseliny, což znamená, že se plně nerozkládají (nedisociují) ve vodě, ale v závislosti na pH prostředí. Snížení pH vede k vyšší koncentraci protonů, snížení polaritý molekuly a zvýšení difúze kyseliny přes membránu do cytoplazmy. Nedisociovaná forma organické kyseliny difunduje mikrobiální membránou a kyselé prostředí poškozuje enzymy buňky. Již dříve bylo prokázáno u mléčné kyseliny, octové kyseliny a propionové kyseliny, že antimikrobiální aktivita organických kyselin se zvyšuje s klesajícím pH. Tento účinek je připisován disociaci slabých kyselin v závislosti na pH (Gerez et al. 2009; Mani-López et al. 2012). Proto jsme testovali aktivitu 3-HP a propionové kyseliny v závislosti na pH pomocí testu dvojnásobného ředění v médiu upraveném na pH 6,5; 5,5 a 4,8. Tento trend se potvrdil u gram-negativní *E. coli*. U bifidobakterií se mírně lišila MIC<sub>50</sub> v závislosti na pH. Odlišoval se kmen *Bifidobacterium animalis* – Danone, kde bylo naměřeno MIC<sub>50</sub> pro propionovou kyselinu v rozmezí 30-60 mM a 3-HP >33 mM, z čehož vyplývá jeho výhoda pro využití v potravinářství. Bifidobakterie se často používají jako probiotikum do fermentovaných mléčných výrobků. Musí překonat kyselé pH žaludku během cesty gastrointestinálním traktem. Byly studovány mechanismy, které jsou základem adaptace *B. longum*. Ukázalo se, že přizpůsobení na nízké pH, zahrnuje změny v glykolytickém toku a ve schopnosti regulovat vnitřní pH (Sánchez et al. 2007).

Disociační konstanta 3-HP je 4,51 a propionové kyseliny je 4,87. 3-HP je tedy silnější kyselina než propionová kyselina a dříve bylo pozorováno, že růst *E. coli* byl inhibován organickými kyselinami při neutrálním pH v závislosti na disociační konstantě (Chun et al. 2014). Očekávali jsme tedy vyšší MIC 3-HP se srovnáním s propionovou kyselinou při stejném pH. Avšak MIC propionové kyseliny a 3-HP proti testovaným bakteriím byl obdobný, což

naznačuje, že mechanismy, které ovlivnily inhibici bakterií, jsou jiné než membránová propustnost nedisociovaných organických kyselin. Bakterie mléčného kvašení se setkávají s kyselým prostředím, proto si musely vyvinout různé mechanismy ke zlepšení odolnosti vůči kyselinám (Wang et al. 2018). Tato skutečnost je činí ideálními startovacími kulturami. *L. reuteri* nebyl inhibován přítomností více jak 60 mM propionové kyseliny a 33 mM 3-HP bez rozdílu hodnoty pH. Také studie Liang et al. (2021) testovala antimikrobiální aktivitu 3-HP, kde se ukázalo, že 3-HP působí antibakteriálně v závislosti na pH s podobnou aktivitou jako propionová kyselina. Avšak 3-HP neinhibovala kvasinky a houby způsobující kažení. Také v této studii bylo zjištěno, že antimikrobiální aktivita 3-HP a akrolein působí synergicky a pravděpodobně se tvoří současně při pěstování laktobacilů metabolizujících glycerol.

## 6.2 Tvorba 3-HP během růstu laktobacilů

Vliv glukózy na metabolismus glycerolu, zejména na 3-HPA a jeho akumulaci klidovými buňkami *L. reuteri*, byl zkoumán. Zvýšený metabolismus pozitivně koreloval s koncentracemi glukózy (Lüthi-Peng et al. 2002). Abychom zjistili, zda se současně tvoří 3-HP, porovnali jsme růst za přítomnosti glycerolu reuterin-pozitivních a reuterin-negativních bakterií. Z našich výsledků vyplývá, že přítomnost glycerolu neovlivnila růstový profil testovaných bakterií. Na druhou stranu byly detekovány rozdíly ve složení supernatantu. Pracovníky katedry byly detekovány metabolity v supernatantech. Ukázalo se, že přítomnost 110 mM glycerolu významně zvýšila tvorbu acetátu *L. reuteri* FUA 3400, zatímco *L. reuteri* DMS 20016 vytvořil vyšší hladiny acetátu s oběma koncentracemi glycerolu (55 i 110 mM). Tvorba 1,3-PD byla reuterin-pozitivních kmenů 1,3 – 2,6krát vyšší v přítomnosti 110 mM glycerolu se srovnání s 55 mM glycerolu. 3-HP byla detekována u kmenů reuterin-pozitivních, které byly kultivovány v přítomnosti 110 mM glycerolu (Liang et al. 2021), což potvrzuje potenciál uvolnění 3-HP během růstu reuterin-pozitivních bakterií za přítomnosti glycerolu.

## 7 Závěr

- Pouze málo studií zkoumalo antimikrobiální aktivitu 3-HP, proto bylo cílem této práce její testování.
- Celkem u 10 kmenů byla stanovena minimální inhibiční koncentrace potřebná k potlačení 50 % růstu gram-pozitivních a gram-negativních bakterií. Předpokládali jsme, že 3-HP je antimikrobiálně aktivní proti gram-pozitivním a gram-negativním indikátorovým kmenům při nízkém pH. Tato vývojová tendence byla potvrzena u gram-negativních kmenů *E. coli*. U bifidobakterií se minimální inhibiční koncentrace lišila v závislosti na hodnotě pH pouze mírně, ale bohužel zde nebyl zaznamenán jednotný trend. Bylo zjištěno, že samotný producent 3-HP *L. reuteri* není inhibován v růstu v neutrálním prostředí ani v prostředí se sníženou hodnotou pH. Bohužel je nutné podotknout, že tento experiment probíhal pouze v jedné kopii a byla zaznamenána celá řada nepřesností, které mohly být způsobené kontaminací, chybou v pipetování a dalšími faktory během procesu kultivace vzorů.
- Dále bylo sledováno, zda se tvoří 3-HP během růstu bakterií v přítomnosti glycerolu. Ukázalo se, že růstový profil to nikterak neovlivní, ale složení metabolitů v supernatantu ano. U reuterin-pozitivních kmenů za přidání 110 mM glycerolu vzniká 3-HP.
- Ukazuje se, že 3-HP produkovaná reuterin-pozitivními laktobacily, by mohla být další z antimikrobiálních látek využívaných v potravinářství.

## 8 Literatura

- Andrews J M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **48**:5-16.
- Ashok S, Mohan Raj S, Ko Y, Sankaranarayanan M, Zhou S, Kumar V, Park S. 2013. Effect of puuC overexpression and nitrate addition on glycerol metabolism and anaerobic 3-hydroxypropionic acid production in recombinant *Klebsiella pneumoniae*  $\Delta$ glpK $\Delta$ dhaT. *Metabolic Engineering* **15** (1):10-24.
- Babu PA, Kumar PS, Padmaja P, Rao TK, Chitti S. 2009. MIC database: A collection of antimicrobial compounds from literature. *Bioinformatics* **4** (2):75-77
- Begunova AV, Rozhkova IV, Shirshova TI, Glazunova OA, Fedorova TV. 2020. Optimization of Cultivation Conditions for the *Lactobacillus reuteri* LR1 Strain to Improve the Biosynthesis of Bacteriocin-Like Substances. *Applied Biochemistry and Microbiology* **56** (9):920-929.
- Bianchini A, Bullerman LB. 2010. Biological Control of Molds and Mycotoxins in Foods. Mycotoxin Prevention and Control in Agriculture. American Chemical Society. Washington DC.
- Brooks SPJ, McAllister M, Sandoz M, Kalmokoff ML. 2003. Culture-independent phylogenetic analysis of the faecal flora of the rat. *Canadian Journal of Microbiology* **49** (10):589-601.
- Clarke, G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. 2014. Minireview: Gut Microbiota. *Molecular Endocrinology* **28** (8):1221-1238.
- Collins CH, Lyne PM, Range JM, Falkinham, JO. 2004. Collins and Lyne's Microbiological Methods. 8. Arnold. London.
- Datta R. 1995. Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiology Reviews* **16** (2-3):221-231.
- de Vrese M, Schrezenmeir J. 2008. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. *Food Biotechnology* **111**:1-66.
- Dellaglio F, Arrizza S, Ledda A. 1981. Classification of Citrate Fermenting Lactobacilli Isolated from Lamb Stomach, Sheep Milk and Pecorino Romano Cheese. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie* **2** (4):349-356.

- Dibner JJ, Buttin P. 2002. Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism. *Journal of Applied Poultry Research* **11** (4):453-463.
- Dishisha T, Pereyra LP, Pyo SH, Britton RA, Hatti-Kaul R. 2014. Flux analysis of the *Lactobacillus reuteri* propanediol-utilization pathway for production of 3-hydroxypropionaldehyde, 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol. *Microbial Cell Factories* **13** (e76) DOI: 10.1186/1475-2859-13-76.
- Engels C, Schwab C, Zhang J, Stevens MJA, Bieri C, Ebert MO, McNeill K, Sturla SJ, Lacroix C. 2016. Acrolein contributes strongly to antimicrobial and heterocyclic amine transformation activities of reuterin. *Scientific Reports* **6** (e36246) DOI: 10.1038/srep36246.
- Engevik MA, Danhof HA, Shrestha R, Chang-Graham AL, Hyser JM, Haag AM, Mohammad MA, Britton RA, Versalovic J, Sorg JA, Spinler JK. 2020. Reuterin disrupts *Clostridioides difficile* metabolism and pathogenicity through reactive oxygen species generation. *Gut Microbes* **12** (e1788898) DOI: 10.1080/19490976.2020.1795388.
- French GL. 2006. Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections--the potential role of daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **58** (6):1107-1117.
- Gänzle MG, Follador R. 2012. Metabolism of Oligosaccharides and Starch in *Lactobacilli*: A Review. *Frontiers in Microbiology* **3** (e340) DOI: 10.3389/fmicb.2012.00340.
- Gänzle MG. 2015. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science* **2**:106-117.
- Gänzle MG. 2020. Food fermentations for improved digestibility of plant foods – an essential ex situ digestion step in agricultural societies? *Current Opinion in Food Science* **32**:124-132.
- Gerez CL, Torino MI, Rollán G, Font de Valdez G. 2009. Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control* **20** (2):144-148.
- Guarner F, Malagelada JR. 2003. Gut flora in health and disease. *The Lancet* **361** (9356):512-519.
- Gyawali R, Ibrahim SA. 2014. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control* **46**:412-429.
- Hashemi SMB, Gholamhosseinpour A, Abedi E. 2020. Biopreservative potential of *Lactobacillus* strains in yoghurt dessert. *Journal of Food Measurement and Characterization* **15**:1634-1643.

- Hill C, et al. 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **11**:506–514.
- Huang Z, Li Z, Shimizu K, Ye Q. 2013. Co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* expressing aldH under microaerobic conditions. *Bioresource Technology* **128**:505-512.
- Chun AY, Yunxiao L, Ashok S, Seol E, Park S. 2014. Elucidation of toxicity of organic acids inhibiting growth of *Escherichia coli* W. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **19** (5):858-865.
- Kandler O, Stetter KO, Köhl R. 1980. *Lactobacillus reuteri* sp. nov., a New Species of Heterofermentative Lactobacilli. *Zentralblatt für Bakteriologie: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie* **1** (3):264-269.
- Kumar V, Ashok S, Park S. 2013. Recent advances in biological production of 3-hydroxypropionic acid. *Biotechnology Advances* **31** (6):945-961.
- Leroy F, De Vuyst L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* **15** (2):67-78.
- Leser TD, Amenuvor JZ, Jensen TK, Lindcroma RH, Boye M, Moller K. 2002. Culture-Independent Analysis of Gut Bacteria: the Pig Gastrointestinal Tract Microbiota Revisited. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (2):673-690.
- Liang N, Neužil-Bunešová V, Tejnecký V, Gänzle M, Schwab C. 2021. 3-Hydroxypropionic acid contributes to the antibacterial activity of glycerol metabolism by the food microbe *Limosilactobacillus reuteri*. *Food Microbiology* **98** (e103720) DOI: 10.1016/j.fm.2020.103720.
- Lüthi-Peng Q, Dileme F, Puhan Z. 2002. Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **59** (2-3):289-296.
- Mani-López E, García HS, López-Malo A. 2012. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International* **45** (2):713-721.
- Moresi M, Parente E. 2014. FERMENTATION (INDUSTRIAL) | Production of Some Organic Acids (Citric, Gluconic, Lactic, and Propionic). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier **1**:804-815.
- Mu Q, Tavella VJ, Luo XM. 2018. Role of *Lactobacillus reuteri* in Human Health and Diseases. *Frontiers in Microbiology* **9** (e757) DOI: 10.3389/fmicb.2018.00757.



- Oh PL, Benson AK, Peterson DA, Patil PB, Moriyama EN, Roos S, Walter J. 2010. Diversification of the gut symbiont *Lactobacillus reuteri* as a result of host-driven evolution. *The ISME Journal* **4** (3):377-387.
- Ortiz-Rivera Y, Sánchez-Vega R., Gutiérrez-Méndez N, León-Félix J, Acosta-Muñiz C, Sepulveda DR. 2017. Production of reuterin in a fermented milk product by *Lactobacillus reuteri*: Inhibition of pathogens, spoilage microorganisms, and lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* **100** (6):4258-4268.
- Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology* **100** (6):1171-1185.
- Ross PR, Morgan S, Hill C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* **79** (1-2):3-16.
- Salzman NH, de Jong H, Paterson Y, Harmsen HJM, Welling GW, Bos NA. 2002. Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria. The GenBank accession numbers for the clone sequences reported in this paper can be found in Table 1 T1; the accession number for isolate MIB-CB3 is AJ418059. *Microbiology* **148** (11):3651-3660.
- Sánchez B, Champomier-Vergès MC, Collado MC, Anglade P, Baraige F, Sanz Y, de los Reyes-Gavilán, CG, Margolles A, Zagorec M. 2007. Low-pH Adaptation and the Acid Tolerance Response of *Bifidobacterium longum* Biotype longum. *Applied and Environmental Microbiology* **73** (20):6450-6459.
- Sankaranarayanan M, Ashok S, Sunghoon P. 2014. Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by acid tolerant *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **41** (7):1039-1050.
- Santos TA, Scorzoni L, Correia R, Junqueira JC, Anbinder AL. 2020. Interaction between *Lactobacillus reuteri* and periodontopathogenic bacteria using in vitro and in vivo (*G. mellonella*) approaches. *Pathogens and Disease*. 78 (e8) DOI: 10.1093/femspd/ftaa044.
- Schaefer L, Auchtung TA, Hermans KE, Whitehead D, Borhan B, Britton RA. 2010. The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology* **156** (6):1589-1599.
- Schaefer, L., Auchtung, T. A., Hermans, K. E., Whitehead, D., Borhan, B., Britton, R. A. 2010. The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology*. **156** (6):1589-1599.

- Schepper JD, Collins FL, Rios-Arce ND, Raetz S, Schaefer L, Gardinier JD, Britton RA, Parameswaran N, McCabe LR. 2019. Probiotic *Lactobacillus reuteri* Prevents Postantibiotic Bone Loss by Reducing Intestinal Dysbiosis and Preventing Barrier Disruption. *Journal of Bone and Mineral Research* **34** (4): 681-698.
- Śliżewska K, Markowiak-Kopeć P, Śliżewska W. 2021. The Role of Probiotics in Cancer Prevention. *Cancers* 13 (e20) DOI: 10.3390/cancers13010020.
- Spinler JK, Taweechoatipatr M, Rognerud CL, Ou CN, Tumwasorn S, Versalovic J. 2008. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe* **14** (3):166-171.
- Stevens MJA, Vollenweider S, Meile L, Lacroix C. 2011. 1,3-Propanediol dehydrogenases in *Lactobacillus reuteri*: impact on central metabolism and 3-hydroxypropionaldehyde production. *Microbial Cell Factories* 10 (e115) DOI: 10.1186/1475-2859-10-61.
- Sun Y, Tang Y, Hou X, Wang H, Huang L, Wen, J, Niu H, Zeng W, Bai Y. 2020. Novel *Lactobacillus reuteri* HI120 Affects Lipid Metabolism in C57BL/6 Obese Mice. *Frontiers in Veterinary Science* (e560241) DOI: 10.3389/fvets.2020.560241
- Tan TY. 2006. Comparison of three standardized disc susceptibility testing methods for colistin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **58** (4):864-867.
- Tingirikari JMR, Ahmed S, Yata VK. 2016. 3-Hydroxy-propionic Acid. Pages 101-117 in Brar SK, Sarma SJ, Pakshirajan K, editors. *Platform Chemical Biorefinery*, Elsevier. Amsterdam.
- Vollenweider S, Lacroix C. 2004. 3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **64** (1):16-27.
- Wang C, Cui Y, Qu X. 2018. Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. *Archives of Microbiology* **200** (2):195-201.
- Zhang C, Brandt MJ, Schwab C, Gänzle MG. 2010. Propionic acid production by cofermentation of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus diolivorans* in sourdough. *Food Microbiology* **27** (3):390-395.
- Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, O'Toole P W, Pot B, Vandamme P, Walter J, Watanabe K, Wuyts S, Felis GE, Gänzle MG, Lebeer S. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **70** (4):2782-2858.

- Zheng J, Zhao X, Lin X.B, Gänzle M. 2015. Comparative genomics *Lactobacillus reuteri* from sourdough reveals adaptation of an intestinal symbiont to food fermentations. *Scientific Reports* 5 (e18234) DOI: 10.1038/srep18234.
- Zheng T, Pu S, Tan P, Du Y, Qian B, Chen H, Fu W, Huang M. 2020. Liver Metabolomics Reveals the Effect of *Lactobacillus reuteri* on Alcoholic Liver Disease. *Frontiers in Physiology*. 11 (e595382) DOI: 10.3389/fphys.2020.595382.
- Zúñiga M, Yebra MJ, Monedero V. 2021. Complex Oligosaccharide Utilization Pathways in *Lactobacillus*. *Current Issues in Molecular Biology*. **40**:49-80.



## 9 Samostatné přílohy

Tabulka č. 5. Úplná naměřená data minimální inhibiční koncentrace inhibující 50 % růstu (MIC50) propionové kyseliny (PA) a 3-hydroxypropionové kyseliny (3-HP).

<i>Escherichia coli 1</i>							
PA	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8	3-HP	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8
-	0,0465	0,0498	0,0488	-	0,0491	0,0483	0,0454
1,88 mM	0,4238	0,3714	0,1611	1,04 mM	0,0474	0,0473	0,0474
3,75 mM	0,4393	0,1746	0,1286	2,08 mM	0,0453	0,0471	0,0457
7,5 mM	0,4715	0,0909	0,0782	4,17 mM	0,0453	0,0459	0,0469
15 mM	0,2056	0,0576	0,0558	8,33 mM	0,0457	0,0452	0,0453
30 mM	0,0627	0,0582	0,0586	16,65 mM	0,0466	0,0455	0,0458
60 mM	0,0522	0,0559	0,0546	33,3 mM	0,0448	0,0444	0,0415
+	0,5301	0,4717	0,3664	+	0,0446	0,0417	0,0432
50%	0,2651	0,2359	0,1832				
MIC50 (mM)	7,5-15	1,88-3,75	< 1,88	MIC50 (mM)	NG	NG	NG
<i>Escherichia coli 2</i>							
PA	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8	3-HP	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8
-	0,0457	0,0499	0,0492	-	0,0485	0,0481	0,0477
1,88 mM	0,425	0,451	0,3081	1,04 mM	0,0477	0,0509	0,0494
3,75 mM	0,4075	0,3082	0,2364	2,08 mM	0,0463	0,046	0,0385
7,5 mM	0,4373	0,1236	0,1163	4,17 mM	0,0465	0,0457	0,0435
15 mM	0,3024	0,0564	0,0607	8,33 mM	0,0458	0,0463	0,0462
30 mM	0,0702	0,0591	0,0597	16,65 mM	0,0459	0,0451	0,0481
60 mM	0,0548	0,0555	0,0468	33,3 mM	0,0461	0,0474	0,0482
+	0,494	0,4731	0,0444	+	0,0464	0,0453	0,0449
50%	0,247	0,237					
MIC50 (mM)	15-30	3,75-7,5	NG	MIC50 (mM)	NG	NG	NG
<i>Bifidobacterium animalis - Danone</i>							
PA	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8	3-HP	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8
-	0,3248	0,0751	0,0653	-	0,3859	0,0743	0,0645
1,88 mM	0,5987	0,5915	0,5077	1,04 mM	0,5562	0,5633	0,489
3,75 mM	0,478	0,4833	0,4562	2,08 mM	0,4768	0,4868	0,4692
7,5 mM	0,3214	0,3648	0,3783	4,17 mM	0,4721	0,3448	0,3331
15 mM	0,5702	0,535	0,5224	8,33 mM	0,5016	0,4727	0,4611
30 mM	0,4828	0,5239	0,5729	16,65 mM	0,4176	0,4257	0,4817
60 mM	0,1209	0,1172	0,103	33,3 mM	0,453	0,4504	0,2564
+	0,619	0,6231	0,5404	+	0,5848	0,6487	0,5418
50%	0,3095	0,31155	0,2702	50%	0,2924	0,32435	0,2709
MIC50 (mM)	30-60			MIC50 (mM)	> 33,3		

Vysvětlivky:

NG – kultura nenarostla

X – nepoužitelný výsledek pro další interpretaci

Červeně značené = nestandartní výsledek

Tabulka č. 5. Úplná naměřená data minimální inhibiční koncentrace inhibující 50 % růstu (MIC50) propionové kyseliny (PA) a 3-hydroxypropionové kyseliny (3-HP).

<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> INFNUT							
PA	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8	3-HP	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8
-	0,3412	0,0738	0,0672	-	0,3789	0,0747	0,0652
1,88 mM	0,4662	0,5229	0,3339	1,04 mM	0,4658	0,501	0,241
3,75 mM	0,2384	0,3412	0,2062	2,08 mM	0,243	0,3584	0,2151
7,5 mM	0,2362	0,2426	0,1577	4,17 mM	0,247	0,3742	0,1512
15 mM	0,3936	0,2157	0,1391	8,33 mM	0,4956	0,3621	0,1402
30 mM	0,2323	0,1264	0,1055	16,65 mM	0,3325	0,2069	0,1099
60 mM	0,1054	0,108	0,1044	33,3 mM	0,1227	0,1095	0,0979
+	0,4413	0,4959	0,2935	+	0,3788	0,4896	0,3245
50%	0,22065	0,24795	0,14675	50%	0,1894	0,2448	0,16225
MIC50 (mM)	X	3,75-7,5	7,5-15	MIC50 (mM)	X	8,33-16,65	2,08-4,17
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (B10)							
PA	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8	3-HP	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8
-	0,3507	0,0768	0,0722	-	0,3499	0,085	0,0676
1,88 mM	0,1804	0,2815	0,0882	1,04 mM	0,2517	0,2271	0,0979
3,75 mM	0,2143	0,1736	0,0919	2,08 mM	0,2654	0,1887	0,0848
7,5 mM	0,188	0,1112	0,0832	4,17 mM	0,2449	0,1435	0,0798
15 mM	0,0968	0,0799	0,073	8,33 mM	0,1875	0,0999	0,0809
30 mM	0,072	0,0785	0,0742	16,65 mM	0,0945	0,0835	0,0806
60 mM	0,068	0,0795	0,075	33,3 mM	0,0751	0,1057	0,0875
+	0,2653	0,2228	0,0788	+	0,2485	0,2276	0,0837
50%	0,13265	0,1114		50%	0,12425	0,1138	
MIC50 (mM)	X	3,75-7,5	NG	MIC50 (mM)	8,33-16,65	4,17-8,33	NG
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (B29)							
PA	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8	3-HP	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8
-	0,3356	0,0747	0,0712	-	0,4159	0,0776	0,0699
1,88 mM	0,3068	0,2752	0,1523	1,04 mM	0,3427	0,2569	0,1025
3,75 mM	0,2851	0,2238	0,1141	2,08 mM	0,3035	0,2625	0,1161
7,5 mM	0,2215	0,1551	0,1005	4,17 mM	0,2977	0,2095	0,0914
15 mM	0,1385	0,1026	0,0826	8,33 mM	0,2259	0,1285	0,0849
30 mM	0,1017	0,0857	0,0812	16,65 mM	0,1278	0,1094	0,0792
60 mM	0,0769	0,0825	0,0746	33,3 mM	0,0971	0,0866	0,0836
+	0,3234	0,2228	0,1181	+	0,3723	0,2803	0,1182
50%		0,1114	0,05905	50%		0,14015	0,0591
MIC50 (mM)	X	7,5-15	> 60		X	4,17-8,33	> 60

Vysvětlivky:

NG – kultura nenarostla

X – nepoužitelný výsledek pro další interpretaci

Červeně značené = nestandardní výsledek

Tabulka č. 5. Úplná naměřená data minimální inhibiční koncentrace inhibující 50 % růstu (MIC50) propionové kyseliny (PA) a 3-hydroxypropionové kyseliny (3-HP).

<i>Escherichia coli</i> Nissle							
PA	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8	3-HP	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8
-	0,0452	0,2932	0,0469	-	0,0446	0,2601	0,7449
1,88 mM	0,8079	0,7767	0,812	1,04 mM	0,6092	0,6435	0,6621
3,75 mM	0,703	0,8604	0,7697	2,08 mM	0,591	0,7272	0,7126
7,5 mM	0,8547	0,841	0,5464	4,17 mM	0,6725	0,6473	0,7756
15 mM	0,1698	0,2158	0,0949	8,33 mM	0,7195	0,7856	0,4825
30 mM	0,0872	0,1084	0,0768	16,65 mM	0,3485	0,2914	0,1086
60 mM	0,0966	0,101	0,0956	33,3 mM	0,2163	0,0764	0,0932
+	0,8352	0,92	0,9449	+	0,83	0,8228	0,9054
50%	0,4176	0,46	0,47245	50%	0,415	0,4114	0,4527
MIC50 (mM)	7,5-15			MIC50 (mM)	8,33-16,65		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922							
PA	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8	3-HP	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8
-	0,0454	0,186	0,0474	-	0,5618	0,2802	0,0483
1,88 mM	0,8993	0,8074	0,7984	1,04 mM	0,7318	0,7366	0,9666
3,75 mM	0,9422	0,8559	0,8009	2,08 mM	0,7496	0,7743	0,8939
7,5 mM	0,9851	0,7967	0,6703	4,17 mM	0,7691	0,8077	0,8679
15 mM	0,1979	0,0644	0,2059	8,33 mM	0,7758	0,8017	0,6809
30 mM	0,1184	0,1153	0,1268	16,65 mM	0,5777	0,4084	0,232
60 mM	0,1255	0,1328	0,1257	33,3 mM	0,0814	0,1153	0,1486
+	0,1535	0,1404	0,9476	+	0,9099	0,9192	0,9621
50%			0,4738	50%	0,45495	0,4596	0,48105
MIC50 (mM)	X	X	7,5-15	MIC50 (mM)	16,65-33,3	8,33-16,65	
<i>L. reuteri</i> (1)							
PA	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8	3-HP	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8
-	0,099	0,0892	0,0873	-	0,0962	0,0928	0,0874
1,88 mM	1,0663	1,0715	0,9434	1,04 mM	1,1202	1,108	0,9286
3,75 mM	0,9772	0,9709	0,9078	2,08 mM	1,1015	1,1647	0,2872
7,5 mM	0,9017	1,0243	0,8152	4,17 mM	1,0749	0,7976	0,9355
15 mM	0,9924	0,951	0,7242	8,33 mM	1,0657	1,1348	1,171
30 mM	0,8104	0,5338	0,4475	16,65 mM	0,9746	0,8996	0,1831
60 mM	0,7515	0,4402	0,4325	33,3 mM	0,7461	0,8139	0,6537
+	1,0717	1,0459	0,9335	+	1,0897	0,9325	0,9793
50%	0,53585	0,52295	0,46675	50%	0,54485	0,46625	0,48965
MIC50 (mM)	> 60			MIC50 (mM)	>33,3		

Vysvětlivky:

NG – kultura nenarostla

X – nepoužitelný výsledek pro další interpretaci

Červeně značené = nestandardní výsledek

Tabulka č. 5. Úplná naměřená data minimální inhibiční koncentrace inhibující 50 % růstu (MIC50) propionové kyseliny (PA) a 3-hydroxypropionové kyseliny (3-HP).

<i>L. reuteri</i> (2)							
PA	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8	3-HP	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,8
-	0,0953	0,0907	0,0892	-	0,095	0,0912	0,0859
<b>1,88 mM</b>	<b>0,8197</b>	1,1618	0,9567	<b>1,04 mM</b>	<b>0,5176</b>	1,2517	1,1164
<b>3,75 mM</b>	<b>0,3997</b>	1,0008	0,883	<b>2,08 mM</b>	0,7354	1,1908	0,6947
<b>7,5 mM</b>	<b>0,5598</b>	1,0739	0,7763	<b>4,17 mM</b>	0,7372	0,8556	0,9171
<b>15 mM</b>	<b>1,0077</b>	0,8316	0,6139	<b>8,33 mM</b>	1,1678	1,1268	1,1815
<b>30 mM</b>	0,5989	0,5483	0,4215	<b>16,65 mM</b>	1,0258	0,8269	0,6271
<b>60 mM</b>	<b>0,4349</b>	<b>0,3346</b>	<b>0,3059</b>	<b>33,3 mM</b>	<b>0,7887</b>	<b>0,7524</b>	<b>0,7104</b>
+	0,6572	1,0951	1,0501	+	<b>0,3438</b>	1,1365	1,1449
50%	0,3286	0,54755	0,52505	50%	0,1719	0,56825	0,57245
MIC50 (mM)	> 60			MIC50 (mM)	> 33,3		

Vysvětlivky:

NG – kultura nenarostla

X – nepoužitelný výsledek pro další interpretaci

Červeně značené = nestandardní výsledek