VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PRODUKCE A MOŽNOSTI APLIKACE ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK PRODUKOVANÝCH PROBIOTICKÝMI BAKTERIEMI

PRODUCTION AND APPLICATION OF ANTIMICROBIAL SUBSTANCES PRODUCED BY LACTIC ACID BACTERIA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE — Kristýna Utíkalová

AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

SUPERVISOR

BRNO 2023

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání bakalářské práce

Číslo práce:	FCH-BAK1827/2022	Akademický rok: 2022/23
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Studentka:	**Kristýna Utíkalová**	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin	
Studijní obor:	Chemie a analýza přírodních látek	
Vedoucí práce:	**prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**	

Název bakalářské práce:

Produkce a možnosti aplikace antimikrobiálních látek produkovaných probiotickými bakteriemi

Zadání bakalářské práce:

1) Literární rešerše zaměřená na problematiku produkce antimikrobiálních látek (zejména lanthibiotik) pomocí bakterií mléčného kvašení
2) kultivace vybraných druhů LAB s předpokládanou produkcí bakteriocinů, možnosti detekce lanthibiotik a kyseliny mléčné
3) testování antimikrobiálních účinků izolátů z LAB na G+ i G– bakteriích

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Kristýna Utíkalová studentka	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. vedoucí ústavu

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

V Brně dne 1.2.2023

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá produkcí antimikrobiálních látek vybraných bakterií mléčného kvašení rodu *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Bifidobacterium*, u kterých byla na základě provedené rešerše předpokládána produkce bakteriocinů. Bakteriociny jsou antimikrobiální látky peptidové povahy s potenciálem být hojně využívané především jako biokonzervanty v potravinářství.

Teoretická část bakalářské práce se věnuje především antimikrobiálním látkám produkovaným probiotickými bakteriemi se zaměřením na bakteriociny produkované vybranými bakteriálními druhy a jejich dosavadní výzkum a aplikace v průmyslu. V experimentální části byla testována antimikrobiální aktivita připravených izolátů z probiotických bakterií na vybraných gramnegativních a grampozitivních bakteriích. Konkrétně se jednalo o agarovou difúzní metodu, bujónovou diluční metodu a test viability buněk pomocí resazurinu. Bylo také stanoveno množství kyseliny mléčné a octové v jednotlivých izolátech pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází, což umožnilo dále pojednávat o jejich vlivu na antimikrobiální aktivitu izolátů.

U všech izolátů byla zjištěna silná antimikrobiální aktivita proti indikátorovým bakteriím. U některých izolátů byla dokonce vyšší než antimikrobiální aktivita samotné kyseliny mléčné v koncentraci, ve které se v izolátu dle měření vyskytuje, což je významným podnětem pro další zkoumání těchto probiotických izolátů především pak izolátu *L. acidophilus* a *L. plantarum*.

Bylo například zjištěno, že testovaný izolát z *L. acidophilus* vykazoval při koncentraci 20,47 mg/ml inhibiční aktivitu proti *S. epidermidis* 90,76 % a proti *E. coli* 81,62 %. S izolátem z bakterie *L. acidophilus* byla následně provedena aplikace na polymerní obalový materiál s potenciálem být používány v potravinářství a byla pozorována antimikrobiální aktivita tohoto izolátu proti kontaminujícím mikroorganismům.

KLÍČOVÁ SLOVA

bakterie mléčného kvašení, bakteriociny, antimikrobiální látky, kyselina mléčná, antimikrobiální testy, rod *Lactobacillus*, rod *Pediococcus*, rod *Bifidobacterium*

ABSTRACT

The bachelor's thesis deals with the production of antimicrobial substances by selected lactic acid bacteria of the genera *Lactobacillus, Pediococcus* and *Bifidobacterium*, in which the production of bacteriocins was assumed based on the conducted research. Bacteriocins are peptide-based antimicrobial substances with the potential to be widely used primarily as biopreservatives in the food industry.

The theoretical part of the bachelor's thesis focuses on antimicrobial substances produced by probiotic bacteria with a further concentration on bacteriocins produced by selected bacterial species and their current research and application in the industry. In the experimental part, the antimicrobial activity of prepared isolates from probiotic bacteria was tested on selected gram-negative and gram-positive bacteria. Specifically, this was done by the agar diffusion method, the broth dilution method and the cell viability test using resazurin. The amount of lactic acid and acetic acid in the individual isolates was determined using high performance reverse-phase liquid chromatography, which made it possible to further discuss their influence on the antimicrobial activity of the isolates.

Strong antimicrobial activity against indicator bacteria was found in all isolates. For some isolates, it was higher than the antimicrobial activity of lactic acid itself together with its concentration which is found in the isolate according to the measurements. That is a significant stimulus for further research of these probiotic isolates, especially the *L. acidophilus* and *L. plantarum* isolates.

For example, it was found that the tested isolate from *L. acidophilus* showed an inhibitory activity against *S. epidermidis* of 90,76 % and 81,62 % against *E. coli* at a concentration of 20,47 mg/ml. The isolate from *L. acidophilus* was subsequently applied to plant packaging with the potential of usage in the food industry, and the inhibitory activity of this isolate against contaminating microorganisms was observed.

KEY WORDS

lactic acid bacteria, bacteriocins, antimicrobial agents, lactic acid, antimicrobial tests, genus *Lactobacillus*, genus *Pediococcus,* genus *Bifidobacterium*

UTÍKALOVÁ, Kristýna. *Produkce a možnosti aplikace antimikrobiálních látek produkovaných probiotickými bakteriemi*. Brno, 2023. Dostupné také z: https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149203. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

……..

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za možnost pracovat v jejím týmu a za její vstřícný přístup a ochotu. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Ing. Paulíně Strečanské za cenné rady, velkou ochotu, věnovaný čas, trpělivost, a především odborný dohled při zpracovávání mé bakalářské práce.

OBSAH

1 **ÚVOD** 9

2 **TEORETICKÁ ČÁST** 10

2.1 Bakterie mléčného kvašení 10

2.1.1 Rod *Lactobacillus* 10

2.1.2 Rod *Pediococcus* 11

2.1.3 Rod *Bifidibacterium* 11

2.2 Antimikrobiální látky produkované probiotiky 11

2.2.1 Organické kyseliny 11

2.2.2 Peroxid vodíku 12

2.2.3 Oxid uhličitý 12

2.2.4 Bakteriociny 12

2.3 Rozdělení bakteriocinů LAB 13

2.3.1 Třída I.: Lantibiotika 13

2.3.1.1 Nisin 14

2.3.1.2 Další lantibiotika 14

2.3.2 Třída II.: Nelantibiotika 15

2.3.2.1 Pediociny 15

2.3.2.2 Bakteriociny produkované rodem Bifidobacterium 16

2.3.3 Třída III. 17

2.4 Biosyntéza bakteriocinů LAB 19

2.4.1 Regulace biosyntézy bakteriocinů 19

2.5 Mechanismus působení bakteriocinů 19

2.6 Aplikace bakteriocinů LAB 20

2.6.1 Využití bakteriocinů jako přírodních konzervantů 20

2.6.2 Bioaktivní obaly 21

2.6.3 Lékařské aplikace bakteriocinů 21

2.7 Stanovení antimikrobiální aktivity 22

2.7.1 Vybrané indikátorové bakterie pro antimikrobiální testy 22

2.7.1.1 *Escherichia coli* 23

2.7.1.2 *Serratia marcescens* 23

2.7.1.3 *Micrococcus luteus* 23

2.7.1.4 *Staphylococcus epidermidis* 23

2.7.2 Difúzní metody 24
2.7.3 Diluční metody 24
2.8 Stanovení buněčné viability pomocí resazurinu 25
2.9 Hartree-Lowryho metoda stanovení proteinů 25
3 **CÍL PRÁCE** 26
4 **EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST** 27
4.1 Použité bakteriální kultury 27
4.2 Chemikálie použité pro kultivace bakterií 27
4.3 Chemikálie použité pro analýzy 27
4.4 Přístroje a pomůcky 27
4.5 Kultivace bakterií 28
4.6 Růstové křivky probiotických bakterií 29
4.7 Příprava agarových misek 29
4.8 Příprava izolátů 29
4.9 Stanovení celkových proteinů Hartree-Lowryho metodou 30
4.10 Stanovení obsahu organických kyselin pomocí kapalinové chromatografie 31
4.11 Stanovení antimikrobiální aktivity izolátů 31
4.11.1 Difúzní disková metoda 31
4.11.2 Diluční bujónová metoda 32
4.12 Stanovení antimikrobiální aktivity kyseliny L-mléčné 32
4.13 Stanovení viability buněk pomocí resazurinu 32
4.14 Stanovení antimikrobiální aktivity na obalovém materiálu potravin 32
4.15 Pozorování mikroorganismů pod světelným mikroskopem 33
5 **VÝSLEDKY A DISKUZE** 34
5.1 Charakterizace růstu vybraných probiotických bakterií 34
5.2 Produkce antimikrobiálních látek 35
5.2.1 Spektrofotometrické měření zákalu (turbidimetrie) 35
5.2.2 Stanovení celkových proteinů Hartree-Lowryho metodou 36
5.2.3 Stanovení koncentrace organických kyselin v izolátu 37
5.3 Stanovení antimikrobiální aktivity izolátů z probiotických bakterií 39
5.3.1 Agarový difúzní test 39
5.3.2 Bujónová diluční metoda 40
5.3.2.1 Antimikrobiální aktivita izolátů proti gramnegativním bakteriím 40

5.3.2.2 Antimikrobiální aktivita izolátů proti grampozitivním bakteriím 41
5.3.2.3 Vliv kyseliny mléčné na antimikrobiální aktivitu izolátů 41
5.4 Resazurinový test 45
5.5 Stanovení mikrobiální kontaminace na obalovém materiálu potravin 47
6 **ZÁVĚR** 49
7 **SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY** 51
8 **PŘÍLOHY** 59

1 ÚVOD

Bakterie mléčného kvašení jsou pro svou produkci řady antimikrobiálních látek známé a hojně využívané ke konzervaci potravin již po staletí. Mezi antimikrobiální látky produkované těmito bakteriemi patří organické kyseliny, peroxid vodíku, oxid uhličitý a bakteriociny. Tyto látky působí v synergii inhibičně proti řadě patogenních a kontaminujících bakterií.

Bakteriociny jsou látky peptidové povahy s vysokým inhibičním účinkem proti patogenním bakteriím. Možná vznikající bakteriální rezistence je při použití bakteriocinů na rozdíl od antibiotik zanedbatelná. To činí bakteriociny možným kandidátem na hledání alternativ za antibiotika, která naopak kvůli vznikající bakteriální rezistenci ztrácejí inhibiční schopnosti. Tím si bakteriociny získaly pozornost a byly pro ně nalezeny možnosti využití jak v potravinářském, tak ve farmaceutickém průmyslu. Dnes je však jediným téměř celosvětově schváleným bakteriocinem v potravinářství nisin produkovaný bakterií *L. lactis*. Potenciál bakteriocinů jako antimikrobiálních látek tak není zcela využit a pro jejich plné využití je potřeba uskutečnit další studie.

Tato práce je zaměřena na produkci a aplikaci antimikrobiálních látek produkovaných probiotiky, především bakteriociny a organické kyseliny. Za účelem produkce těchto antimikrobiálních látek byly kultivovány vybrané bakterie rodů *Lactobacillus, Pediococcus* a *Bifidobacterium.* Byla zkoumána antimikrobiální aktivita jejich izolátů proti modelovým mikroorganismům z řad gramnegativních a grampozitivních bakterií a na základě výsledků byl sledován vliv ošetření vybraným izolátem na růst mikroorganismů kontaminujících polymerní obalový materiál určen k potravinářskému použití.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (LAB z anglického „lactic acid bacteria“) jsou heterogenní skupina grampozitivních koků nebo tyčinek, které nevytvářejí spory a mají vysokou tolerancí k nízkému pH. Bakterie mléčného kvašení jsou obvykle nepohyblivé [1]. Jsou děleny do skupin podle charakteristiky fermentace glukózy, buněčné morfologie, využívání cukrů a optimálního rozhraní teplot pro zdárný růst bakterií. Podle toho jsou děleny do pěti základních skupin: *Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc*, *Streptococcus* a *Bifidobacterium* [2]. LAB jsou řazeny mezi nejdůležitější mikroby, které se používají při fermentaci potravin, zlepšování chuti a textury fermentovaných potravinářských produktů. Jsou charakterizovány produkcí mléčné kyseliny, jako hlavního produktu metabolismu glukózy, a produkcí látek inhibující růst jako jsou bakteriociny, peroxid vodíku, diacyly atd., které zabraňují množení bakterií a dalších patogenů způsobujících kažení potravin. LAB fermentují sacharidy, aby získaly energii, přičemž jako konečný akceptor elektronů místo kyslíku používají endogenní zdroje uhlíku. Jsou aerotolerantní a jsou chráněny proti vedlejším produktům kyslíku, jako je peroxid vodíku, pomocí peroxidáz [1]. Na základě produktů fermentovaných sacharidů se dělí LAB na homofermentativní a heterofermentativní. Homofermentativní LAB produkují z cukrů kyselinu mléčnou, zatímco heterofermentativní LAB produkují kromě kyseliny mléčné taky kyselinu octovou, nebo ethanol a oxid uhličitý [3].

2.1.1 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* je největším rodem ve skupině mléčných bakterií. Jedná se o rod tyčinkových, grampozitivních, nesporotvorných a fakultativně anaerobních bakterií kmene *Firmicutes* [4]. Bakterie rodu *Lactobacillus* je možno rozdělit do tří skupin na základě jejich metabolismu. Do obligátně homofermentativní skupiny, která fermentuje sacharidy za vzniku kyseliny mléčné, jako hlavního vedlejšího produktu jsou řazeny například *L. acidophilus* a *L. helveticus*. Fakultativně heterotrofní skupina za určitých podmínek se specifickými substráty fermentuje sacharidy za vzniku kyseliny mléčné, kyseliny octové a oxidu uhličitého jako svých vedlejších produktů. Do této skupiny jsou například řazeny *L. plantarum* a *L. casei*. Poslední skupina obligátně heterofermentativní, do které patří *L. fermentum* a *L. reuteri*, fermentuje sacharidy vždy za vzniku kyseliny mléčné, kyseliny octové a oxidu uhličitého jako vedlejších produktů [4]. Bakterie rodu *Lactobacillus* se vyskytují převážně v gastrointestinálním traktu, ústní dutině a různých fermentovaných potravinách [5]. Mezi bakteriociny produkované *L. acidophilus* patří lactacin, acidophilucin a acidocin [6]. Většina těchto bakteriocinů je tepelně stabilní s malou molekulovou hmotností a jsou řazeny do druhé třídy bakteriocinů (nelantibiotik) [7]. Bakteriociny produkované bakterií *L. plantarum* jsou převážně malé stabilní kationtové peptidy (třída I. a II.) například plantaricin [8]. *L. casei* produkuje bakteriociny caseicin a lactocin [9, 10].

2.1.2 Rod *Pediococcus*

Pediokoky jsou grampozitivní kulovité koky tvořící páry a tetrády. Jsou řazeny mezi fakultativně anaerobní bakterie nevytvářející spory. Bylo prokázáno, že produkují bakteriociny působící proti blízce příbuzným bakteriím a některým grampozitivním patogenům [11]. Bakteriociny rodu *Pediococcus* jsou nazývány pediociny a jsou produkovány třemi druhy, které hrají velmi důležitou roli v biokonzervaci fermentovaných potravin a to *P. acidilactici, P. cerevisiae* a *P. pentosaceus.* [12]. Těmito potravinami jsou především mléčné výrobky, fermentovaná zelenina a maso. V mléčných výrobcích se pediokoky objevují často jako náhodná kultura, která se využívá pro fermentaci mléka a sýrů. Pediociny vykazují širokou antimikrobiální aktivitu proti bakteriím způsobujícím kažení potravin. *P. acidilactici* produkuje pediocin AcH a pediocin PA-1. Pediocin A byl získán z bakterie *P.pentosaceus* [11, 12].

2.1.3 Rod *Bifidibacterium*

Ostatní bakterie mléčného kvašení jsou seskupeny do větve *Clostridium* grampozitivních bakterií, která je příbuzná bacilům, zatímco bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou řazeny do větve *Actinomycetes* [1]. Jsou to grampozitivní anaeroby tvaru tyčinky dominující v gastrointestinálním traktu člověka, kde mají početnou převahu nad jinými bakteriemi mléčného kvašení [13, 14]. Způsob účinku bifidobakterií, jako probiotik, je připisován schopnosti vyvíjet inhibiční účinek proti škodlivým, nebo dokonce patogenním mikroorganismům. Kombinují větší počet mechanismů včetně produkce organických kyselin a produkcí specifických antimikrobiálních látek, jako jsou právě bakteriociny [15]. Mezi zástupce bakteriocinů produkovanými rodem *Bifidobacterium* patří například bifidocin B, bifidin I a bifidoadocin. Tyto bakteriociny jsou produkovány bakteriemi *B. bifidum, B. infantis a B. adolescentis* [12, 16, 17].

2.2 Antimikrobiální látky produkované probiotiky

Schopnost bakterií mléčného kvašení produkovat antimikrobiální látky je využívána pro uchovávání potravin již od starověku v podobě fermentovaných produktů. Samotná fermentace snižuje množství dostupných uhlovodíků a vzniká během ní velké množství organických molekul malé molární hmotnosti, jako například kyselina mléčná, octová nebo propionová. Mezi další antimikrobiální látky produkované bakteriemi mléčného kvašení patří peroxid vodíku, oxid uhličitý a bakteriociny [18].

2.2.1 Organické kyseliny

Jak bylo již zmíněno výše, při homofermentaci hexos je hlavní produkovanou složkou kyselina mléčná. Jedná-li se o heterofermentaci, tak je bakteriemi mimo kyselinu mléčnou produkováno také ekvimolární množství kyseliny octové, propionové a oxidu uhličitého. Organické kyseliny obecně vytvářejí nevhodné prostředí pro růst patogenních a kontaminujících bakterií. Jejich mechanismem účinku je snižování pH prostředí, ovlivnění protonového gradientu a transportu přes cytoplazmatickou membránu. Kyselé prostředí nejen že zamezuje růstu kontaminujících bakterií, ale i podporuje působení ostatních

antimikrobiálních látek [18, 19]. Obecně působí slabé kyseliny mnohem více antimikrobiálně při nízkém pH než při pH neutrálním. Kyselina octová a propionová mají disociační konstantu (pK_a) 4,756 a 4,784, což je činní slabšími kyselinami než je kyselina mléčná, která má pK_a 3,862 [20]. Kyselina octová a propionová disponují větší antimikrobiální aktivitou než kyselina mléčná právě proto, že jsou v roztoku méně disociovány. Například při pH 4, pouze 11 % kyseliny mléčné není disociováno, zatímco kyselina octová není disociována z 85 % a propionová z 92 %. Právě ve směsi těchto kyselin působí tedy kyselina mléčná, která je taky produkována bakteriemi mléčného kvašení v největším množství, především k redukci pH a málo disociovaná kyselina octová a propionová působí jako antimikrobiální látky. Právě i díky snížení pH je potlačen růst nežádoucích mikroorganismů vlivem permeabilizace vnější membrány [18, 21].

2.2.2 Peroxid vodíku

Za přítomnosti vzduchu jsou bakterie mléčného kvašení schopny produkovat peroxid vodíku, a to díky působení oxidáz obsahující flavoprotein, NADH oxidáz a superoxiddismutáz. Samotný baktericidní účinek peroxidu vodíku je přisuzován jeho silnému oxidačnímu účinku na bakteriální buňku, například oxidací thiolových skupin buněčných proteinů a membránových lipidů. Peroxid vodíku může taky reakcí s volnými buněčnými komponentami tvořit další antimikrobiální látky. Některé z reakcí produkující peroxid vodíku také zachycují kyslík, čímž vytvářejí aerobní prostředí, které je pro bakterie mléčného kvašení nepříznivé [18, 19].

2.2.3 Oxid uhličitý

Oxid uhličitý má dvojí antimikrobiální účinek. Jeho produkcí je vytvářeno anaerobní prostředí a samotný disponuje antimikrobiální aktivitou. Oxid uhličitý je hlavním produktem štěpení hexóz u heterofermentativních bakterií mléčného kvašení. Mechanismus antimikrobiálního účinku oxidu uhličitého proti některým aerobním mikroorganismům spočívá v znemožnění schopnosti buněčné membrány redukovat a vyrovnávat pH vnitřního a vnější prostředí buňky [18, 19]. Předpokládá se, že oxid uhličitý inhibuje enzymatické dekarboxylační reakce. Vlivem naakumulovaného oxidu uhličitého v lipidové dvojvrstvě je poté zapříčiněna následná dysfunkce membránové permeability [18]. V nízkých koncentracích však může být oxid uhličitý některými bakteriálními druhy tolerován a dokonce na ně mít stimulační efekt [18, 19]. Díky své antimikrobiální aktivitě je dnes oxid uhličitý běžně používán v potravinářství při balení potravin, jako hlavní složka ochranných atmosfér potravin [18, 22].

2.2.4 Bakteriociny

Velké množství grampozitivních a gramnegativních bakterií, včetně bakterií mléčného kvašení, produkují během svého růstu látky proteinové povahy (polypeptidové) disponující antimikrobiální aktivitou, nazývané bakteriociny [23]. Tato rozmanitá skupina antimikrobních peptidů složených z 20 - 60 aminokyselin je syntetizována ribozomy. Několik genů se podílí na modifikaci aminokyselin, exportu a regulaci bakteriocinů a proteinů vlastní imunity. Geny kódující bakteriociny jsou organizovány do operonů umístěných v chromozomech,

plazmidech, nebo jiných mobilních genetických prvcích. Bakteriociny jsou extracelulárně uvolňovány a mohou mít baktericidní, nebo bakteriostatický efekt za cílem zničit, nebo potlačit vývoj podobných či příbuzných druhů, rodů, nebo dokonce kmenů jiných mikroorganismů, jako způsob soutěže a boje o přežití v mikrobiální komunitě [2, 24]. Bakteriociny mají obvykle nízkou molekulovou hmotnost, podléhají posttranslační modifikaci a mohou být snadno degradovány proteolytickými enzymy, zejména proteázami gastrointestinálního traktu savců, což je činí bezpečnými pro lidskou spotřebu [23].

Přestože by mohly být bakteriociny kategorizovány mezi antibiotika, tak nejsou. Největší rozdíl mezi bakteriociny a antibiotiky spočívá v odlišnosti jejich účinku. Zatímco bakteriociny omezují svou aktivitu na kmeny příbuzných a zejména stejných druhů, antibiotika mají širší spektrum účinnosti. Kromě toho jsou bakteriociny ribozomálně syntetizovány a produkovány během primární fáze růstu, antibiotika jsou však obvykle sekundárními metabolity [23]. Bakteriociny produkované jednotlivými bakteriálními druhy se od sebe výrazně liší a to způsobem účinku, inhibičním spektrem, molekulovou hmotností, biochemickými vlastnostmi a genetickým původem [2, 24].

2.3 Rozdělení bakteriocinů LAB

Klaenhammer, mezinárodní expert na bakterie mléčného kvašení, klasifikoval bakteriociny LAB do čtyř odlišných tříd s dalšími podtřídami podle jejich strukturálních rozdílů [2]. Tyto skupiny jsou bakteriociny I. třídy (lantibiotika), II. třídy (nelantibiotika), III. třídy a IV. třídy. Mezi autory později došlo k revizi množství skupin a uvádějí se nejčastěji pouze tři skupiny [1]. V Tabulce 1 je přehled jednotlivých tříd bakteriocinů se zástupci, producenty těchto bakteriocinů a citlivými bakteriemi, na které bakteriociny působí inhibičně.

2.3.1 Třída I.: Lantibiotika

Třída I. lantibiotika, jsou třídou peptidových látek, které jsou značně posttranslačně modifikovány, což vede k tvorbě neobvyklých aminokyseliny jako je lanthionin, nebo methyllanthionin. Jedná se o polycyklické thioetetherové aminokyseliny. Bakteriociny první třídy jsou malé (<5kDa) tepelně odolné peptidy [1, 23]. Dále jsou rozděleny do dvou typů na základě strukturních podobností.

Typ Ia (lineární) se skládá z relativně protáhlých šroubovitých, kladně nabitých, amfipatických, flexibilních molekul. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje mezi 2 až 4 kDa a obecně působí prostřednictvím membránové depolarizace cytoplazmatické membrány citlivých cílových druhů spojené s tvorbou pórů. Hlavními zástupci této skupiny jsou nisin a lakticin 3147 [23, 24].

Typ Ib (globulární) je tvořen globulárními a nepružnými bakteriociny, které jsou záporně nabité, nebo nemají žádný náboj. Tyto peptidy mohou inhibovat katalytické enzymy nezbytné pro přežití citlivých bakterií. Třída Ic (multikomponentní) jsou peptidy obsahující síru vázanou na alfa uhlíku [24].

2.3.1.1 Nisin

Nisin je bakteriocin produkovaný skupinou grampozitivních bakterií především pak bakterií *L. lactis*. Je nejvíce studovaným lantibiotikem a patří do třídy Ia [25, 26]. Nisin patří mezi vůbec první identifikované a charakterizované bakteriociny. Tento bakteriocin byl objeven ve dvacátých letech minulého století, ale až v roce 1971 byla určena jeho struktura. V roce 1988 bylo úspěšně dosaženo chemické syntézy nisinu, což potvrdilo jeho již dříve navrženou strukturu [18, 26]. Ve stejném roce se taky podařilo docílit jeho biosyntézy. Během následujících let se nisinu a dalším bakteriocinům dostalo velké pozornosti díky odhalení způsobu jejich působení a jejich možnému využití jako konzervačních látek [18].

Během několika posledních desetiletí je nisin (E 234) široce používán jako netoxický, bezpečný a stabilní potravinový přírodní konzervační prostředek. Od té doby bylo pro jeho jedinečné antimikrobiální vlastnosti identifikováno a studováno mnoho přírodních a geneticky modifikovaných variant nisinu [25]. Nisin je v současné době povolenou potravinářskou přídatnou látkou schválenou v EU úřadem EFSA (European Food Safety Authority) a v USA schválenou FDA (U. S Food and Drug Administration) a je tedy obecně považován za bezpečný peptid s potenciálem pro klinické použití [25, 27]. Jako přírodní konzervant je používán díky své antimikrobiální aktivitě proti různým alimentárním patogenům, které jsou zodpovědné za většinu kažení potravin, bez podstatného rozvoje bakteriální rezistence. Působí inhibičně proti tepelně odolným bakteriím (*B. cereus, B. stearothermophilus, C. botulinum, L. monocytogenes* a *S. aureus*) z mléčných výrobků, vajec, masa (vakuově balené uzeniny), mořské plody, nápoje a salátové dressingy. Dále přispívá k trvanlivosti kuřecího masa, rajčatové šťávy a pomerančového džusu [26, 28].

2.3.1.2 Další lantibiotika

Lakticin 3147 je dvousložkové širokospektrální lantibiotikum produkované bakterií *L. lactis*. Koncentrované přípravky lakticinu 3147 inhibují růst grampozitivních patogenních bakterií včetně *S. mutans* a *C. difficile*. Orálně podávaný lakticin 3147 je však v gastrointestinálním traktu savců okamžitě rozložen pepsiny. Řešením by mohlo být orální podání producenta tohoto bakteriocinu, tedy bakterie *L. lactis* [29]. Účinnost kultur produkujících lakticin 3147 byla prokázána jako inhibiční proti patogenům *L. monocytogenes* a *C. perfringens* v sýrech a masných výrobcích [30]. *L. lactis* produkující lakticin 3147 se také osvědčil ve startovacích kulturách při výrobě sýru typu čedar. Hladina produkovaného lakticinu 3147 zůstala konstantní po dobu 6 měsíců zrání sýru a významným podílem zabraňovala růstu nežádoucí mikroflóry [31].

Dalším lantibiotikem je plantaricin C produkovaný bakterií *L. plantarum*, který byl izolován ze zrajícího sýru [32]. Plantaricin C vykazuje širokospektrální inhibiční aktivitu nejen proti bakteriím mléčného kvašení, ale taky proti jiným grampozitivním bakteriím rodu *Lactobacillus, Leuconostoc, Streptococcus.* Proti testovaným gramnegativním bakteriím nebyla zaznamenána žádná inhibiční aktivita [33].

2.3.2 Třída II.: Nelantibiotika

Bakteriociny druhé třídy jsou malé (<10kDa), flexibilní, obsahují membránově aktivní peptidy a mají amfifilní helikální strukturu. Tyto peptidy neobsahují modifikované aminokyselinové zbytky a jsou odolné vůči pH a teplu. Bakteriociny druhé třídy jsou rozděleny do čtyř podtříd na základě jejich struktury a modifikací [23, 24].

Bakteriociny třídy IIa (podobné pediocinu) zahrnují peptidy o 35 až 50 aminokyselinách, které obsahují stálý motiv aminokyselinové sekvence tzv: „pediocinový box" (Tyr-Gly-Asn-Gly-Val), který se nachází na N-terminálním konci a v některých případech může mít drobné odchylky [34, 35]. Tyto bakteriociny mají silnou aktivitu proti bakteriím rodu *Listeria* [24, 35]. Mezi zástupce této podskupiny řadíme pediocin PA-1, bifidocin B, leukocin A a sakacin A [23, 35]. Více jak 50 druhů bakteriocinů podtřídy IIa bylo izolováno z fermentovaného masa, zeleniny, mléčných výrobků, uzeného lososa a z lidského gastrointestinálního traktu [1].

Třída IIb (dvoupeptidové nemodifikované bakteriociny) se skládá ze dvou různých komplementárních peptidů. Optimální antimikrobiální aktivita vyžaduje oba peptidy, které jsou členy této skupiny, v přibližně stejných množstvích. Do této podtřídy řadíme laktacin F a laktokokcin G [23].

Třída IIc (kruhové bakteriociny) obsahuje 35 až 70 aminokyselin. Tyto bakteriociny jsou spojeny s vedoucí peptidovou sekvencí a ve své struktuře zahrnují jeden až dva cysteinové zbytky. Tyto peptidy jsou odolné vůči mnohým proteolytickým enzymům. Poslední podtřída IId je tvořena lineárními, pediocinu podobnými, jednopeptidovými bakteriociny [24].

Nelantibiotika jsou obecně uznávané jako bezpečné (GRAS), biologicky aktivní a stabilní. Tím získávají pozornost jako potenciální kandidáti pro použití v potravinářském průmyslu jako biokonzervanty [35]. Za cílem získání širšího a specifičtějšího antimikrobiálního spektra nelantibiotik přišli v roce 2011 Acuna a jeho tým na postup pro navrhování nových hybridních bakteriocinů [36]. Nový rekombinantní hybridní peptid Ent35-MccV kombinuje pomocí fúze bakteriocin enterocid CRL35 a mikrocin V. Tento hybridní peptid vykazoval antimikrobiální aktivitu proti *E. coli* a *L. monocytogenes* a časem může najít využití v aplikacích v potravinářském a farmaceutickém průmyslu [35, 36].

2.3.2.1 Pediociny

Pediociny jsou bílkovinné antimikrobiální látky produkované pediokoky s vysoce specifickou inhibiční aktivitou proti *L. monocytogenes* [37]. Většinu pediocinů řadíme do třídy IIa, kde je molekulová hmotnost bakteriocinů obecně menší než 5 kDa [12]. Mechanismus účinku pediocinu vůči grampozitivním bakteriím je zaměřen především na buněčnou membránu a je více baktericidní než bakteriostatický [37]. Pediociny jsou obecně stabilní ve vodných roztocích, širokém rozmezí pH a teplot, což je činí vhodnými konzervanty potravinových produktů. Možnosti aplikace pediocinů při konzervaci mléčných výrobků jsou zkoumány právě na základě těchto vyhovujících vlastností. Několik studií potvrzuje, že pediocin PA-1 produkovaný *P. acidilactici* PAC snižuje množství *L. monocytogenes* v tvarohu, smetaně a sýrové omáčce [12]. Obecně mají pediociny široké spektrum

antimikrobiálního účinku proti grampozitivním bakteriím, ale podobně jako nisin mají nízkou aktivitu proti gramnegativním bakteriím, kvasinkám a plísním [37]. Pediociny jsou svým účinkem proti určitým patogenním bakteriím dokonce efektivnější než nisin. Z grampozitivních bakterií jsou to například *L. monocytogenes* a *S. aureus* a z gramnegativních zástupci rodu *Pseudomonas* a *E. coli* [12].

Pediocin A byl získán z *P. pentosaceus* a byl potvrzen jeho inhibiční účinek proti zástupcům rodu *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Staphylococcus, Listeria* a *Clostridium*. Nový bakteriocin byl získán z *P. pentosaceus* ACCEL s molekulovou hmotností 17,5 kDa a stabilitou při pH 2-6. Tento bakteriocin působil inhibičně proti grampozitivním bakteriím [12].

V roce 2006 Speelmans a jeho tým izolovali z lidských výkalů bakteriální kmen *P. acidilactici* LMG P-21927 produkující pediocin [38]. Tento pediokok je schopný přežít v gastointestinálním traktu člověka a bylo zjištěno, že jeho bakteriocin je účinným inhibitorem některých grampozitivních bakteriálních patogenů jako je *Enterococcus spp.* a *L. monocytogenes*. Tento pediocin také projevil silnou inhibiční aktivitu proti žaludeční adhezi oportunních patogenů, jako jsou rody *Klebsiella, Pseudomonas* a *Shigella*. Bylo tak prokázáno, že pediokoky jsou pro své blahodárné účinky na zdraví vhodné k využití v gastrointestinálním traktu člověka, zejména proti infekci multirezistentními bakteriemi [38]. Existuje již komerčně vyráběný pediocin-ALTA 2341® společností Quest International Sarasota Florida z *P. acidilactici.* Tento bakteriocin se dnes používá jako složka média pro fermentační procesy. Díky svým silným inhibiční účinkům proti *L. monocytogenes* požádal však jeho výrobce pro jeho využití k potravinářským účelům o schválení FDA [32].

Díky své antimikrobiální aktivitě nalézá pediocin uplatnění především při konzervaci potravin, v poslední době se také používá jako součást jejich obalů. Nisin a pediocin jsou nejdostupnější čisté bakteriociny inhibující mikrobiální kažení nefermentovaných potravin. V mase však působí pediocin efektivněji než nisin [28].

2.3.2.2 Bakteriociny produkované rodem Bifidobacterium

Kvůli náročné purifikaci bakteriocinů produkovaných rodem *Bifidobacterium* jich není mnoho detailně charakterizováno [39]. Třikrokovou metodou byl například purifikován a poté charakterizován bifidocin B produkovaný *B. bifidum* NCFB 1454 [40]. Bifidocin B inhibuje růst vybraných druhů rodů *Listeria, Bacillus, Enterococcus, Lactobacillus, Leuconostoc a Pediococcu*s, je citlivý na proteolytické enzymy a odolný vůči pH v rozmezí 2-10, teplu a organickým rozpouštědlům [16]. Aminokyselinová sekvence bifidocinu B byla již stanovena, ale stále obsahuje nejasnosti. Nedávno objevený bifidin I produkovaný bakterií *B. infantis BCRC 14602* vykazuje značnou podobnost s bifidocinem B, nebyly však u něj doposud stanoveny celé aminokyselinové sekvence [35]. Bifidin I prokázal široké spektrum antimikrobiálního účinku proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Toto spektrum zahrnovalo také bakterie kazící potraviny, jako například *S. aureus, B. subtilis, B. cereus* [13, 17, 18].

Purifikovaný bifidocin A produkovaný *B .animals* vykazuje rozsáhlou antimikrobiální aktivitu proti velkému množství patogenních bakterií například *E. coli, L. monocytogenes* a *S. aureus*, což je v souladu s inhibiční aktivitou bifidocinu B [12, 16].

Mezi další bakteriociny produkované rodem *Bifidobacterium* patří bifilakt z *B.lactis*, termofilicin z *B.thermophilium*, bifilong a bisin z *B.longum*. Tyto bakteriociny jsou stabilní v poměrně širokém rozmezí pH (3-10), jsou termostabilní a odolné vůči působení organických rozpouštědel [41].

Pouze málo charakterizujících informací lze zjistit z izolace a purifikace bakteriocinu bakterie *B. breve* a vyhodnotit tak jeho inhibiční účinek na patogenní bakterie. V roce 1994 byly Gibsonem a Wangem pro zjištění antimikrobiální aktivity bakteriocinů z *B. breve* provedeny diskové difúzní testy s *E. coli*, jejichž výsledek byl pozitivní [14]. V roce 2017 byl Mahdim zkoumán izolát bifidobakterií z prsního kolostra íráckých žen, obsahující převážně bakterii *B.breve,* na pravděpodobnou produkci bakteriocinu bifidobrevicin LHM. Produkce byla potvrzena a bakteriocin izolován. Bifidobrevicin-LHM je termostabilní a vykazuje silnou antimikrobiální aktivitu proti *S. agalactiae* [42]. Bifidoadocin, bakteriocin produkovaný *B. adolescentis*, je aktivní v širokém rozmezí pH (3-8), termostabilní a inhiboval růst některých patogenních bakterií [12, 43].

V současné době neexistují žádné údaje o toxicitě bakteriocinů z bifidobakterií a žádné tak nejsou využívány jako konzervační látky [39]. Podrobnější pochopení mechanismu působení těchto bakteriocinů by je učinilo schopnými pro použití jako konzervanty v potravinářství, ve zdravotnictví a farmaceutickém průmyslu [41]. Jejich dlouhodobé zkoumání silně naznačuje, že tyto bakteriociny mohou být jednou v těchto odvětvích bezpečně používány [44].

2.3.3 Třída III.

Tato třída je tvořena tepelně nestabilními proteiny, které mají obecně velkou molekulovou hmotnost (>30kDa). Bakteriociny představující tuto skupinu jsou helveticin a enterolysin produkovaný *E. faecium* [23]. Dále do této skupiny patří bakteriocin caseicin 80, který je syntetizován bakterií *L. casei* B 80. Caseicin 80 projevil specifickou baktericidní aktivitu proti příbuznému kmeni *L. casei* B 109, je termolabilní a jeho molekulová hmotnost je přibližně 42 kDa [9, 45].

Tabulka 1: Přehled bakteriocinů produkovaných LAB, jejich producentů a k nim citlivým mikroorganismů [2, 33, 35, 41, 42, 46–51]

skupina bakteriocinů	**bakteriocin**	**producent bakteriocinu**	**účinek bakteriocinu proti citlivým bakteriím**
I.třída: lantibiotika	nisin A, nisin Z	*Lactococcus lactis spp.lactis*	*L.monocytogenes, B.cereus, B.stearothermophilus, C.botulinum, S.aureus*
	lakticin 3147	*Lactococcus lactis subsp. lactis*	*L.lactis, L.monocytogenes , B.subtilis*
	lactocin S	*Lactobacillus sake*	*Clostridium, L.monocytogenes, Enterococcus*
	mutacin II.	*Streptococcus mutans T8*	*S. pyogenes, Streptococci*
	plantaricin C	*Lactobacillus plantarum*	rody *Lactobacillus, Leuconostoc, Streptococcus*
II.třída: nelantibiotika	acidocin B	*Lactobacillus acidophilus*	*L.monocytogenes, C.sporogenes, B.thermosphacata,*
	pediocin PA-1	*Pediococcus acidilactici*	*L. monocytogenes*
	pediocin A	*Pediococcus pentosaceus*	rody *Leuconostoc, Staphylococcus, Listeria a Clostridium*
	bifidocin B	*Bifidobacterium bifidum*	*rody Listeria, Bacillus, Enterococcus, Leuconostoc a*
	bifidin I	*Bifidobacterium infantis*	*S.aureus, B.subtilis,B.cereus*
	bifidobrevicin-LHM	*Bifidobacterium breve*	*S.agalactiea*
	plantaricin MG	*Lactobacillus plantarum*	*L.monocytogenes, S.aureus, S. typhimurium a Escherichia coli*
	lactacin F	*Lactobacillus johnsonii*	*L.delbrueckii, L.helveticus, E. faecalis*
	lactococcin A, lactococcin G	*Lactococcus lactis*	*L.sakei, L.lactis subsp. lactis a cremoris*
	enterolysin A	*Enterococcus faecalis*	*enterokoky, pediokoky, laktokoky, laktobacily*
III. třída	helveticin J	*Lactobacillus helveticus 481*	*L. helveticus, L. bulgaricus*
	lactococcin 972	*Lactococcus lactis IPLA 972*	*L.sakei, L.lactis subsp. lactis a cremoris*
	caseicin 80	*Lactobacillus casei B 80*	*L.casei B 109*

2.4 Biosyntéza bakteriocinů LAB

Mechanismus syntézy bakteriocinů může být u některých kmenů bakterií mléčného kvašení často indukován stresovými podmínkami, jako jsou nedostatek živin a nárůst cizí kolonie soupeřící o stejné podmínky. Z tohoto důvodu bývají často antimikrobiální účinky produkovaných bakteriocinů zaměřeny na příbuzné kmeny bakteriálních buněk. Syntéza bakteriocinů probíhá během nebo na konci exponenciální fáze růstu bakterií [52].

Bakteriociny jsou ribozomálně syntetizované peptidy, které jsou zpočátku biologicky neaktivní (pre-peptidy). Pre-peptidy obsahují zpravidla N-terminální vedoucí konec, kde je peptid zakončen NH_2 skupinou a C-terminální konec, kde je peptid zakončen karboxylovou skupinou COOH. Tyto prekursory bakteriocinů jsou později modifikované tak, aby dosáhly aktivního stavu. Dochází ke štěpení tzv. „vedoucí sekvence peptidu“, která je u každého bakteriocinu jiná, proteolytickými enzymy, které jsou přítomné v cytoplazmě. Například pro většinu nelantibiotik je tento vedoucí peptid tzv.“ double glycinového“ typu [1, 53].

Sekrece bakteriocinů je tedy řízena touto vedoucí sekvencí, která je odštěpena během nebo po exportu bakteriocinu [53]. Tento aktivní bakteriocin je poté uvolněný mimo produkující buňku. Extracelulární transport nelantibiotik je prostředkován transportními ABC (ATP Binding Cassette) proteiny, které přenášejí aktivní bakteriociny přes cytoplazmatickou membránu za spotřeby ATP. Obecně jsou geny kódující produkci bakteriocinu a imunitu organizovány v operonových shlucích. Mohou být umístěny na mobilních genetických elementech, jako je chromozom ve spojení s transpozony nebo plazmidy [1, 52].

2.4.1 Regulace biosyntézy bakteriocinů

Biosyntéza lantibiotik a nelantibiotik je obvykle regulována prostřednictvím dvousložkových regulačních systémů. Tyto regulační systémy se skládají ze dvou signálů produkujících proteiny, membránově vázaný histidinový proteinkináza (HPK) a regulátor cytoplazmatické odezvy (RR) [54]. V exponenciální fázi růstu buňky dosahují prahové koncentrace autoindukčních peptidů. Tyto peptidy se následně vážou na receptor transmembránového enzymu histidinkinasy, který je součástí regulačního systému buňky. Výsledkem autofosforylace histidinového zbytku je málo stabilní sloučenina a fosfátová skupina je tak přenesena na regulátor. Fosforylací regulátoru dojde k aktivaci exprese genů pro syntézu bakteriocinů [52, 54].

2.5 Mechanismus působení bakteriocinů

Mechanismus účinku bakteriocinů závisí na jejich primární struktuře. Některé mohou působit na cytoplazmatickou membránu a uvolňovat sloučeniny ohrožující život náchylných bakterií (lýze buňky), jiné mohou vstoupit do cytoplazmy a ovlivnit genovou expresi a syntézu proteinů a některé mohou působit bakteriostaticky [55]. Například u nisinu, který je bakteriocinem třídy I, a některých bakteriocinů třídy II se jedná o membránově aktivní peptidy, které ničí integritu cytoplazmatické membrány prostřednictvím tvorby membránových

kanálků. Ty působí na propustnost membrány a způsobují prosakování nízkomolekulárních metabolitů, čímž inhibují produkci energie a biosyntézu proteinů či nukleových kyselin. Většina bakteriocinů produkovaných bakteriemi mléčného kvašení má baktericidní účinek na citlivé buňky, takže jejich působení vede k lýze buněk. Jiné bakteriociny, jako například laktocin 27, leukocin A a leuconocin působí bakteriostaticky [54]. Citlivost grampozitivních bakterií a gramnegativních bakterií je založena na chemickém složení buněčné stěny[52].

2.6 Aplikace bakteriocinů LAB

Bakterie mléčného kvašení produkující bakteriociny jsou součástí naší stravy již od dob, kdy existují potraviny fermentované bakteriemi mléčného kvašení. Většina mléčných bakterií a bakteriocinů je izolována právě z jídla. Bylo zjištěno, že taky střevní mikroflóra obsahuje bakterie schopné produkovat bakteriociny, což bylo potvrzeno nálezy v trávicím traktu a ve vzorcích stolice lidí i zvířat.

Bakteriociny mohou být přidány do potravin za cílem prodloužit a zlepšit jejich skladovatelnost mnoha možnými způsoby. Bakteriociny produkující bakterie mléčného kvašení mohou být použity jako kultura ve fermentovaném produktu, anebo může být přidána do čerstvých potravin, jako ochranná kultura. Bakteriociny jsou používány jako přírodní konzervanty pouze omezeně, nisin je však výjimkou [18]. Používání nisinu jako přírodního konzervantu v nejrůznějších potravinách je schválen ve více než 50 zemích světa. Některé další bakteriociny byly také schváleny a dostaly se na potravinový trh za cílem zlepšení bezpečnosti potravin, avšak ne v takové míře jako nisin. Další využití bakteriociny nacházejí v lékařství. Bylo například zjištěno, že nisin a lakticin 3147 jsou účinné při ochraně proti bakteriální mastitidě a při její léčbě [28]. V potravinářství se bakteriociny využívají při přímé aplikaci do potravin jako konzervanty, dále při aplikaci kmenů schopných produkovat bakteriociny a také při výrobě bioaktivních potravinových obalů [18]. Bakteriociny lze také využít ke zlepšení kvality jídla a senzorických vlastností, například zvýšení rychlosti proteolýzy, nebo v prevenci tvorby přebytečného plynu u časného duření sýrů [23].

2.6.1 Využití bakteriocinů jako přírodních konzervantů

Mezi bakteriociny LAB se prokázal jako vysoce účinný nisin A a jeho přírodní varianta nisin Z proti mikrobiálním činitelům způsobující kažení potravin. Bakteriociny lze do potravin aplikovat v purifikované (velmi nákladná), nebo surové formě. Další možností je přidání bakteriocinů do potravin prostřednictvím produktu, který byl již fermentován kmenem bakterií produkující bakteriocin (startovací kultura). Začlenění bakteriálního kmene produkující bakteriocin má nevýhodu v nedostatečné kompatibilitě mezi kulturou produkující bakteriocin a kulturami vyžadovanými pro fermentaci. Bylo však prokázáno, že samotný bakteriocin nezajistí úplnou bezpečnost potravin, zejména v případě gramnegativních bakterií. Proto jsou bakteriociny kombinovány s jinými antimikrobiálními sloučeninami, jako je octan sodný, nebo laktát sodný což vede ke zvýšené inaktivaci cílových bakterií [23].

Nisin se využívá při zvýšení trvanlivosti a úbytku hmotnosti sýru Riccota pomocí jedlých povlaků z galaktomannanů, získaných z nekonvekčních zdrojů obsahujících nisin, proti *L. monocytogenes*. Dále se využívá při kontrole vývoje bakterie *L. monocytogenes*

s pomocí filmů z kaseinátu sodného se začleněným nisinem v mini červeném sýru Babybel. Nisin také inhibuje *L. monocytogenes* na za studena uzených lososech. Využití nisin nalézá také v kombinaci s organickými kyselinami a solemi ke kontrole *L. monocytogenes* na krájeném vepřovém mase skladovaném ve 4 °C ve vakuových obalech. A v poslední řadě působí nisin při inhibici *E. coli* a *L. monocytogenes* ve vakuově baleném hovězím mase [28].

2.6.2 Bioaktivní obaly

Další aplikací bakteriocinů je využití v bioaktivních obalech, které chrání potraviny před vnějšími kontaminanty. Většinou dochází k začátku kažení chlazených potravin mikrobiálním růstem na povrchu potravin. Tento fakt posiluje snahu využít právě bakteriociny ve spojení s obaly potravin k zabránění právě tohoto povrchového mikrobiálního růstu, čímž se zajistí delší trvanlivost potravin. Bioaktivní obaly lze připravit přímou imobilizací bakteriocinu na obal potravin, nebo přidáním sáčku obsahující bakteriocin do zabalených potravin, který se bude postupně uvolňovat během skladování potravin. Postupné uvolňování bakteriocinů z obalových fólií na povrchu potravin může mít výhodu oproti máčení a postřikování potravin bakteriociny. Antimikrobiální aktivita bakteriocinů může být totiž ztracena nebo snížena inaktivací bakteriocinů složkami potravin, nebo ředěním pod aktivní koncentraci v důsledku migrace do potravin [2, 23, 56].

Existuje několik metod přípravy balících fólií (obalů) s bakteriociny. Jednou z metod je začlenění bakteriocinu přímo do polymerů, například začlenění nisinu do biologicky odbouratelných proteinových filmů. Další metodou je potažení a adsorpce bakteriocinů na polymerní povrchy například nisin-methyl celulózové povlaky pro polyethylenové fólie pro použití na drůbeží maso. Známé jsou také metody adsorpce nisinu na polyethylen, ethylen, vinylacetát, polypropylen, polyamid, polyester akryláty a polyvinyl chlorid [23, 30].

2.6.3 Lékařské aplikace bakteriocinů

Přestože je dnes využití bakteriocinů záležitostí především potravinářskou, další významné aplikace bakteriocinů nalézáme taky v lékařství. Bakterie mléčného kvašení jako probiotika jsou nepatogenní, živé mikroorganismy schopné působit hostiteli blahodárně, jsou-li konzumované v příznivém množství. Bakteriociny produkované těmito bakteriemi (LAB) jsou zkoumány pro své klinické aplikace v prevenci i léčbě infekcí např. gastroenteritidy [2]. Většina bakteriocinů má relativně úzké spektrum antimikrobiální aktivity. Některé bakteriociny však vykazují mnohem širší spektrum antimikrobiální aktivity a působí antimikrobiálně taky na prvoky, kvasinky houby a viry [57]. Bakteriociny bakterií mléčného kvašení díky poměrně úzkému spektru působení získaly pozornost při řešení nedostatků antibiotik. Jelikož mají bakteriociny LAB úzké a specifické spektrum zabíjení cizích patogenů, neohrožují okolní mikroflóru [2]. S příchodem rezistentních bakterií se stal prioritou vývoj alternativních léčebných postupů proti výše zmíněným patogenům. Vzhledem k tomu, že princip účinku bakteriocinů se od klasických antibiotik znatelně liší můžeme tedy mluvit o novém způsobu kontroly těchto patogenů [2, 23]. Například nisin má úzké spektrum působení a inhibuje především grampozitivní bakterie. Spektrum působení nisinu lze však rozšířit i na gramnegativní bakterie, pokud je použit v kombinaci s jinými antimikrobiálními činidly

[2, 25]. Nisin vykazuje antimikrobiální aktivitu proti bakteriím způsobujícím plak a záněty dásní a je tak často součástí ústních vod [57]. Nisin a lakticin 3147 se prokázaly jako účinné při léčbě mastitidy skotu a lakticin 3147 prokázal proti mastitickým stafylokokům a streptokokům [28, 57].

Lakticin 3147, dvoupeptidové lantibiotikum, inhibuje růst kmenů *S. aureus* (MRSA), a vankomycin-rezistentní *E. faecalis*. *S. aureus* a methilicin-rezistentní *S. aureus* (MRSA) jsou nejčastější mikroorganismy vyskytující se při kožních infekcí. Mnoho používaných antibiotik pro léčbu těchto onemocnění působí jen velmi omezeně. Jako poslední možnost se v léčbě těchto kožních infekcí používá vankomycin, také však s nevelkým úspěchem. Mersacidin, lantibiotikum produkované *Bacillus sp*. kmen HIL-Y 85,54728, inhibuje růst kmenů MRSA in vivo u myší a lze je považovat za možnou alternativní léčbu [6, 32]. Při léčbě kožních infekcí se také osvědčily bakteriociny epidermin a gallidermin produkované bakteriemi *S. gallinarum* a *S. epidermidis* [57].

2.7 Stanovení antimikrobiální aktivity

Jelikož je mikrobiální diverzita velmi široká přirozeně je potřeba se také zaobírat velmi širokým spektrem bakteriocinů. Díky tomu, že bakteriociny mohou být používány jako přírodní konzervační látky potravin, jejich vyhledávání a analýza se staly v posledním desetiletí velmi populární. Bakteriociny produkované LAB byly izolovány z různých potravinových i nepotravinových matric. Nejvíce studií se zabývá izolací z mléčných a fermentovaných výrobků. Diverzita mikroflóry těchto výrobků je ovlivněna podmínkami prostředí, specifiky fermentace, původem potravin, interakcemi s jinými mikroorganismy atd. Cenné bakteriociny LAB však byly nalezeny také na neočekávaných místech, jako jsou střeva včel a půda [46].

Prvním krokem v analýze bakteriocinů je hodnocení jejich antimikrobiální aktivity [46]. Existují různé faktory, které ovlivňují antimikrobiální aktivitu bakteriocinů, mezi ně patří molekulová hmotnost, iontový náboj, koncentrace nebo gelová kompozice bakteriocinů [58]. Nejběžnější tradiční metody testování antimikrobiální aktivity bakteriocinů jsou testy difúzní a diluční. Všechny metody vycházejí z reakce indikátorového kmene se supernatantem obsahující organické kyseliny, bakteriociny a další antimikrobiální látky. Nejčastěji používanými indikátorovými kmeny jsou *E. coli* a *S. aureus*, ale používají se i *L. monocytogenes*, M. *luteus*, *S. epidermidis* a *S. marcescens* Tyto tradiční metody jsou poměrně pracné, časově náročné, poskytují malé výtěžky a vyžadují mnoho kroků v následném čištění bakteriocinů. Tyto potíže vedly vědce k vyvinutí nových molekulárních metod screeningu, jako je například PCR [46, 59].

2.7.1 Vybrané indikátorové bakterie pro antimikrobiální testy

Pro testování antimikrobiální aktivity byly pro naši práci vybrány dvě indikátorové gramnegativní bakterie, a to *E. coli* a *S. marcescens*. Jako zástupci pro skupinu grampozitivních bakterií byly vybrány indikátorové bakterie *M. luteus* a *S. epidermidis*. Všechny výše zmíněné testované bakterie jsou běžně používané jako indikátorové bakterie pro testování inhibiční aktivity antimikrobiálních látek.

2.7.1.1 Escherichia coli

E. coli je řazena do čeledi *Enterobacteriaceae*, což jsou gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky. Mohou být buď pohyblivé, nebo nepohyblivé a dokáží přežít i v aerobním prostředí [60, 61]. Některé kmeny *E. coli* způsobují infekci produkcí tzv. shiga toxinů. Velmi nízká infekční dávka této bakterie a fakt, že je obtížné ji usmrtit ji činí poměrně nebezpečnou. Bakterie *E. coli* mohou způsobit infekce ran, močových cest, žlučníku a břišní dutiny. Dále jsou možnou příčinou septikémii, neonatální meningitidy, infantilní gastroentitidy, turistického a hemoragického průjmu. Nepřítomnost, nebo přítomnost *E. coli* je jedním ze standardních testů kontroly kvality u potravin a vody [61].

2.7.1.2 Serratia marcescens

S. marcescens je gramnegativní bakterie charakterizována produkcí červeného pigmentu prodigiosinu zejména na půdách s přídavkem sacharidů, za pokojové teploty a přístupu denního světla [62, 63]. *Serratia* stejně jako ostatní *Enterobacterieceae* (k nimž je řazena), roste dobře na běžných médiích za anaerobních i aerobních podmínek. Ve vodě nerozpustný červený pigment prodigiosin disponuje antimikrobiální aktivitou [64, 65]. Tento gramnegativní bacil se nejčastěji vyskytuje ve vodě a půdě a je spojován s infekcemi dýchacích a močových cest, endokarditidou, osteomyelitidou, septikémií, infekcemi ran, očními infekcemi a meningitidou. K přenosu bakterie dochází přímým kontaktem [62].

2.7.1.3 Micrococcus luteus

Mikrokoky jsou grampozitivní, nesporolující a nepohyblivé bakterie, které mají kulovitý tvar. Často bývají spojeny do kruhových tetrády a na živném agaru tvoří žluté kolonie [66]. Rod *Micrococcus* zahrnuje mnoho druhů, které jsou řazeny mezi striktní aeroby, avšak *M. luteus* je obligátně aerobním druhem [67, 68]. *M. luteus* můžeme nalézt v půdě, prachu, vodě a na pokožce člověka, kde způsobuje zápach při odbourávání složek potu. Byla taky izolována z potravin, jako je mléko a kozí sýr. Tato bakterie je považována za oportunní patogen, který může být zodpovědný za nozokomiální infekce. Může způsobit kožní infekce a u imunokompromitovaných osob dokonce septický šok [66].

2.7.1.4 Staphylococcus epidermidis

Fakultativně anaerobní grampozitivní stafylokoky jsou běžnými bakteriálními kolonizátory kůže a sliznice člověka. *S. epidermidis* je nejčastěji izolovaným druhem z lidského epitelu a kolonizuje převážně kůži v podpaží, na hlavě a dutinu nosní [69, 70]. Tvorba biofilmu, exopolymery a další mechanismy chrání bakterii před antibiotiky a obranou hostitele. Touto obranou hostitele může být právě vylučování antimikrobiálních peptidů (bakteriocinů), se kterou se *S. epidermidis* setkává ve svém přirozeném prostředí. *S. epidermidis* neprodukuje žádné toxiny a jeho imunitní obrané faktory mají pravděpodobně původní funkci v komenzálnímu životním stylu tohoto druhu [69]. Stafylokoky jsou poměrně nenáročné na kultivaci, rostou dobře na obyčejném agaru, nebo na agaru se srdcovou a mozkovou infuzí. Na pevné agarové půdě vyrůstají do 24 hodin inkubace při kultivační teplotě 37 ^{0}C

v okrouhlých, hladkých, lehce konvexních mazlavých koloniích o průměru 1-3 mm. *S. epidermidis* roste i na půdách s vysokým obsahem NaCl a v bujónu roste v zákalu s prstenčitou blankou na povrchu [63].

2.7.2 Difúzní metody

Difúzní metody jsou založeny na měření velikosti zóny inhibovaného růstu bakterií kolem aplikované antimikrobiální látky, která vzniká pronikáním antimikrobiální látky ze zdroje do okolí. Jedná se o metodu kvalitativní. Na základě velikosti inhibičních zón jsme schopni posoudit, zda se jedná o bakterie citlivé, nebo rezistentní. Tato metoda není schopna rozlišit baktericidní a bakteriostatické účinky látek, jelikož inhibice růstu neznamená nutnou smrt bakterie Tato metoda není vhodná pro určování minimální inhibiční koncentrace antimikrobiálních látek (MIC). Nejsme totiž schopni kvantifikovat množství antimikrobiální látky difundované do agaru. Hodnota MIC představuje nejnižší koncentraci z testované škály, která zastavuje pouhým okem viditelný růst testované bakterie [59, 63, 71]. Vyjadřuje se v μg/ml nebo mg/l a využívá se především u dilučních metod. Časté používání difúzních metod je spojeno především s jednoduchostí provedení a nízkou cenou.

Mezi difúzní metody jsou řazeny agarová disková difúzní metoda, agarová jamková difúzní metoda a tzv. metoda „spot on lawn“. Při diskové difúzní metodě se agarové plotny v Petriho miskách naočkují standardizovaným inokulem testovaného mikroorganismu, poté se na povrch agaru umístí disk filtračního papíru (o poloměru přibližně 6 mm), který je impregnován testovanou sloučeninu o požadované koncentraci. Petriho misky s kulturou se nechají inkubovat za vhodných podmínek. Antimikrobiální činidlo difunduje z filtračního papíru do agaru a inhibuje růst testovaného mikroorganismu. Poté jsou měřeny průměry inhibičních růstových zón [59, 71]. Průměr inhibované zóny je tím větší, čím je testovaný kmen citlivější na testovanou látku [63].

2.7.3 Diluční metody

Jedná se o metody kvantitativní, které se používají ke zjištění MIC. Spočívají v inhibici růstu bakterií danou koncentrací antimikrobiální látky. Mezi diluční metody řadíme bujónovou diluční metodu na mikrotitračních destičkách a agarovou diluční metodu [71]. Diluční bujónové testy jsou jedny z nejpoužívanějších testů ke kvantitativnímu hodnocení citlivosti bakterií na antimikrobiální látku. Umožňují vedle hodnoty MIC stanovit taky hodnotu letální koncentrace LC 100 a LC 50. Letální koncentrace je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky potřebná k usmrcení mikroorganismu. Hodnota LC 50 je koncentrace antimikrobiální látky, při které dojde k usmrcení 50 % bakterií.

Praktické provedení bujónových dilučních testů spočívá v naředění (obvykle geometrickou řadou) testované antimikrobiální látky ve vhodném tekutém médiu a pomocí vícekanálové pipety je rozplněna do jamek polystyrenové mikrotitrační destičky [63]. Vyhodnocení je prováděno po inkubaci přibližně 24 hodin, kdy je na mikrotitrační destičce měřen zákal roztoku indikátorového kmene bakterií. Hledá se minimální inhibiční koncentrace látky (MIC), tedy vzorek, kde nevznikl zákal nebo sediment, který ukazuje růst mikroorganismů. Je to tedy koncentrace antimikrobiální látky v první jamce, ve které nebyl pozorován viditelný růst

bakterie. Porovnávání se provádí spektrofotometricky měřením absorbance při vlnové délce 630 nm, turbidimetricky, nebo vizuálně [59, 63, 71].

2.8 Stanovení buněčné viability pomocí resazurinu

Metabolická aktivita buněk může být sledována pomocí oxidačně-redukčního indikátorového barviva resazurinu. Princip fungování tohoto testu je založen na sledování enzymatické redukce resazurinu životaschopnými buňkami. Jedná se o netoxickou, pro buňky propustnou sloučeninu indigové barvy, která nevykazuje prakticky žádnou fluorescenci.

Resazurin je životaschopnými buňkami redukován na červenou fluorescenční látku resorufin. Množství vyredukovaného resorufinu je poté kvantifikováno spektrofotometricky na základě měření absorbance při vlnové délce 570 nm. Tato metoda je rychlá, citlivá, bezpečná, netoxická pro buňky a levná. Komerčně dostupným produktem využívajícím tento mechanismus je například Alamar Blue Assay. Díky této metodě jsme schopni kvantitativně analyzovat buněčnou životaschopnost a proliferaci [72, 73]. Resazurin je také možné použít, jako indikátor pH v rozmezí pH 3,8 (oranžovočervená barva) - 6,5 (modrofialová barva), kdy však postrádá své fluorescenční schopnosti. Resazurin a resofurin jsou fluorescenční pouze ve své aniontové formě, v které jsou pouze při pH 7 a vyšším [74, 75].

2.9 Hartree-Lowryho metoda stanovení proteinů

Původní Lowryho metoda stanovení proteinů z roku 1951 je kolometrické stanovení založené na dvou činidlech biuretovém a Folin-Ciocalteauovým. Biuretové činidlo se používá také při biuretové metodě stanovení proteinů, která je založena na chelataci Cu^{2+} iontů imidovými polypeptidy ionizovanými v silně alkalickém prostředí za vzniku červeného komplexu. Folin-Ciocalteauovo činidlo pro fenoly obsahuje fosfolmolybdenové a fosfowolframové kyseliny, které se redukují tyrosinovými zbytky proteinů za vzniku modrého barviva, které je poté spektrofotometricky měřeno při vlnové délce 630 nm. Hartreeho modifikace Lowryho metody z roku 1972 využívá tři činidla (první dvě jsou pro biuretové stanovení) namísto původních pěti. Třetí činidlo je Folin-Ciocaleuovo činidlo. Hartreeho modifikace metody přinesla intenzivnější zbarvení (zvýšená citlivost metody), zjednodušení (použití tří činidel namísto pěti) a rozšíření lineárního rozsahu reakce. Hartree-Lowryho metoda stanovení proteinů patří mezi citlivé metody, je možné ji použít ke stanovení proteinů v rozsahu 0,1-0,6 g/l [76, 77].

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je studium produkce a možnosti aplikace antimikrobiálních látek produkovaných probiotickými bakteriemi. Součástí práce je řešení následujících dílčích úloh:

- Literární rešerše zaměřená na problematiku produkce antimikrobiálních látek (zejména lanthibiotik) pomocí bakterií mléčného kvašení
- kultivace vybraných druhů LAB s předpokládanou produkcí bakteriocinů, možnosti detekce lanthibiotik a kyseliny mléčné
- testování antimikrobiálních účinků izolátů z LAB na G+ i G- bakteriích

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité bakteriální kultury

Pro zkoumání antimikrobiálních vlastností bakterií mléčného kvašení bylo použito pět kmenů bakterií. Pro testování jejich antimikrobiálních vlastností byly využity čtyři bakteriální kmeny. Všechny bakterie pocházejí z České sbírky mikroorganismů Brno, ČR (Czech Collection of Microorganisms,CCM):

- *Lactobacillus acidophilus* (CCM 4833)
- *Lactobacillus plantarum* (CCM 7039)
- *Lactobacillus casei* (CCM 4798)
- *Bifidobacterium breve* (CCM 7825)
- *Pediococcus acidilactici* (CCM 4577)
- *Escherichia coli* (CCM 3954)
- *Staphylococcus epidermidis* (CCM 4418)
- *Serratia marcescens* (CCM 8587)
- *Micrococcus luteus* (CCM 1569)

4.2 Chemikálie použité pro kultivace bakterií

- Destilovaná voda, FCH VUT Brno, (Česká republika)
- Ethanol, Lach-ner (Česká republika)
- Lactobacillus MRS Broth, Himedia (Indie)
- Nutrient Broth w/1 % Peptone (NB), Himedia (Indie)
- LB Broth (Lennox) médium, Sigma-Aldrich (Německo)
- Brain Heart Infusion Broth (BHI) médium, Himedia (Indie)
- Agar Powder, Himedia (Indie)

4.3 Chemikálie použité pro analýzy

- Folin-Ciocalteauovo činidlo, VWR Chemicals (Francie)
- Pentahydrát síranu měďnatého, Lach-ner (Česká republika)
- Hydroxid sodný perly čisté, Lech-ner (Česká republika)
- Vínan sodno-draselný tetrahydrát, Lachema (Česká republika)
- Uhličitan sodný bezvodý p.a, Penta (Česká republika)
- Sodná sůl resazurinu, Sigma-Aldrich (Německo)
- L-(+)-Kyselina mléčná (98%), Sigma-Aldrich (Německo)
- Kyselina mléčná, Hi-AR^{TM}/ACS, Himedia (Indie)
- Kyselina sírová 96 % P.A., Lach-ner (Česká republika)

4.4 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy, Boeco (Německo)
- Předvážky Ohaus ScoutPro (USA)
- Fixed Speed Vortex Mixer, Ohaus (Čína)

- Automatické pipety v různém rozsahu objemu, Discovery (Německo), Biohit (Německo)
- Acura ® manual 855 multikanálová pipeta, Socorex (Švýcarsko)
- Laminární box Aura mini, BioAir Instruments (USA)
- Syringe filter 0,22 μm, Techno Plastic Products (Švýcarsko)
- Filtry pro HPLC, PRE-CUT, (Alltech; Velká Británie)
- Fluorescenční mikroskop pro biotechnologii (Labomed; USA)
- Trojdílná jednorázová injekční stříkačka Omnifix® Solo 10 ml, B.Braun (Německo)
- Microjet Microwave Autoclave, Rodwell (UK)
- Denzitometr McFarland typ DEN-1, Grant-bio (Česká republika)
- Centrifuga vysokorychlostní chlazená Z36HK, Hermle (Německo)
- Třepačka Heidolph Promax 1020, Heidolph Inkubator 1000, Labicom (Česká republika)
- Spektrofotometr UV/Vis UV-1600PC, VWR (Čína)
- Synergy HTX multimode reader (ELISA-reader), BioTek (Česká republika)
- INCU-Line inkubátor, VWR (Čína)
- Lyofilizátor Freeze Dry System/FreeZone 4,5 l, Labconco (USA)
- HPLC sestava Ultimate 3000 s UV/VIS a RI detektorem –Thermo Fisher (USA)
- Rezex ROA-Organic Acid H+ (8 %), New Column 250x 4,6 mm, Phenomenex (USA)
- běžné laboratorní sklo a vybavení

4.5 Kultivace bakterií

Komplexní médium vhodné pro konkrétní druh bakterie (viz. Tabulka 2) bylo v Erlenmayerových baňkách rozpuštěno v destilované vodě. Po zazátkování buničitou vatou bylo médium sterilizováno pomocí Microjet Microwave Autoclave.

Bakterie mléčného kvašení byly zaočkovány z kryozkumavek do 15 ml sterilního MRS média. Bakterie byly poté anaerobně inkubovány 14 hodin při teplotě 37 ºC a následně přeočkovány do 50 ml MRS média (inokulum 10 %). Poté byly bakterie opět dány inkubovat za stejných podmínek jako v předchozí kultivaci. Doba kultivace 14 hodin byla zvolena z praktických důvodů, aby mohla být kultivace ukončena pro všechny bakterie současně. V tomto čase dosahuje vrcholu exponenciální fáze většina testovaných bakterií a byla tak v kulturách bakterií očekávána vysoká koncentrace primárních metabolitů.

Pro kultivace vybraných indikátorových bakterií byla zvolena vhodná komplexní média (Tabulka 2). Indikátorové bakterie byly zaočkovány tak, aby inokulum tvořilo vždy 10 % z celkového kultivovaného objemu. Kultivace probíhala po dobu 24 hodin aerobně v inkubačním boxu se třepáním udržujícím teplotu 37 ºC. V případě anaerobní kultivace byl využit inkubační box s teplotou 37 ºC bez třepání.

Tabulka 2: Použitá komplexní média pro vybrané mikroorganismy

Mikroorganismus	Použité médium	Navážka média na 100 ml destilované vody [g]
Bakterie mléčného kvašení	MRS medium	5,515
Escherichia coli	LB medium	2,0
Serratia marcescens	NB medium	2,5
Micrococcus luteus	NB medium	2,5
Staphylococcus epidermidis	BHI medium	3,7

4.6 Růstové křivky probiotických bakterií

Je-li bakterie vnesena do tekutého homogenního prostředí obsahující v neomezené míře všechny pro ni potřebné živiny roste a dělí se. V důsledku toho pak s časem vzrůstá počet buněk v objemové jednotce. Vyneseme-li tuto měnící se koncentraci buněk (optickou hustotu) v závislosti na čase, získáme funkční závislost nazývanou růstová křivka bakterií [63]. Bakterie mléčného kvašení byly kultivovány (viz. 4.5) a poté ředěny na hodnotu 0,5 McFarland pomocí McFarlandových standardů. Poté byla kultura naředěna médiem tak aby obsahovala $1 \cdot 10^6$ CFU/ml.

Následně bylo na 96-jamkovou mikrotitrační destičku napipetováno 100 μl média a 100 μl naředěné kultury bakterií mléčného kvašení. Takto připravená mikrotitrační destička byla inkubovaná po dobu 24 hodin v 37 °C vytemperovaném ELISA-readeru, kde byla v 30minutových časových intervalech měřena absorbance vzorků při vlnové délce 630 nm. Závislost koncentrace biomasy na čase byla poté vynesena do grafu.

4.7 Příprava agarových misek

Agarové misky byly připraveny pro agarové difúzní testy. Agar Powder (20 g/l) byl v Erlenmayerových baňkách smíchán s konkrétním komplexním médiem pro kultivaci daného druhu indikátorové bakterie a rozpuštěn v destilované vodě (viz Tabulka 2). Erlenmayerova baňka byla poté opatřena zátkou z buničité vaty a médium sterilizováno pomocí přístroje Microjet Microwave Autoclave. Po sterilizaci bylo médium v laminárím boxu rozlito na plastové Petriho misky. Po ztuhnutí agaru byly misky uzavřeny parafilmem a skladovány v lednici.

4.8 Příprava izolátů

Z inkubované kultury bakterie mléčného kvašení byl odebrán 1 ml pro následné spektrofotometrické měření zákalu. Zbytek kultury bakterie mléčného kvašení byl odstředěn pomocí vysokorychlostní centrifugy Z 36 HK (Hermle) po dobu 15 minut při 9000 rpm a teplotě 4 °C. Pro stanovení proteinů Hartree-Lowryho metodou bylo odebráno 10 ml bezbuněčného supernatantu. Zbylý bezbuněčný supernatant byl následně po dobu 24 hodin

uchován při teplotě -80 ºC a podroben lyofilizaci. Izoláty byly připraveny rozsuspendováním vzniklých lyofilizátů v destilované vodě a následnou filtrací přes Syringe filtr s velikostí pórů 0, 22 μm.

4.9 Stanovení celkových proteinů Hartree-Lowryho metodou

Byl připraven zásobní roztok proteinu albuminu o koncentraci 150 μg/ml, z něhož byla připravena série kalibračních standardů o koncentraci 30 μg/ml - 150 μg/ml. Kalibrační standardy byly ředěny destilovanou vodou, tak aby měl každý standard objem 1 ml. Následně bylo do každé zkumavky přidáno 0,9 ml připraveného roztoku A. Zkumavky s kalibračními standardy byly na 10 minut umístěny do 50 ºC vodní lázně a po vyjmutí byly ochlazeny na laboratorní teplotu (21-25 ºC) a bylo do každé přidáno 0,1 ml roztoku B. Roztoky byly poté ponechány 10 minut při laboratorní teplotě. Poté byly rychle přidány 3 ml roztoku C. Bylo třeba zajistit okamžité promíchání roztoku C se vzorkem, aby se promíchání uskutečnilo hned v prvních sekundách po přidání roztoku C. Zkumavky byly opět inkubovány v 50 ºC vodí lázni po dobu 10 minut a následně ochlazeny na pokojovou teplotu. Absorbance byla poté měřena v 1 cm kyvetách při vlnové délce 650 nm proti slepému vzorku, který byl pro měření kalibračních standardů destilovaná voda.

Vzorky supernatantů a slepý vzorek, který byl MRS médium, byly připravovány stejným způsobem, jako kalibrační vzorky. Na začátku stanovení byly 100x ředěny destilovanou vodou na objem 1 ml, aby mohly být detekovány spektrofotometrem. Detekční limit Hartree-Lowryho metody je 0,1-0,6 g/l. [76, 77].

Na přípravu **100 ml činidla A** bylo potřeba následující množství chemikálií [76]:

- 0,2 g vínanu sodno-draselného (tetrahydrát)
- 10 g uhličitanu sodného
- 50 ml hydroxidu sodného o koncentraci 1 $mol \cdot dm^{-3}$

Po rozpuštění vínanu sodno-draselného (tetrahydrát) a uhličitanu sodného v hydroxidu sodném byl roztok doplněn destilovanou vodou na 100 ml [76].

Na přípravu **100 ml činidla B** bylo potřeba následující množství chemikálií [76]:

- 2 g vínanu sodno-draselného
- 1 g pentahydrátu síranu měďnatého
- 10 ml hydroxidu sodného o koncentraci 1 $mol \cdot dm^{-3}$
- 90 ml destilované vody

Po rozpuštění vínanu sodno-draselného (tetrahydrát) a uhličitanu sodného ve vodě je do roztoku přidán hydroxid sodný do objemu 100 ml [76].

Na přípravu **činidla C** je jeden objem Folin-Ciocalteauova činidla ředěn patnácti objemy destilované vody. Činidlo C připravujeme denně v 16 ml anebo v jeho násobcích. pH dále neupravujeme [76, 77].

4.10 Stanovení obsahu organických kyselin pomocí kapalinové chromatografie

Pro stanovení L-kyseliny mléčné, která je nejčastěji produkovaným izomerem probiotických bakterií, a kyseliny octové v izolátech probiotických bakterií byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC). Měření probíhalo na přístroji Ultimate 3000. Pro kvantitativní stanovení kyselin ve vzorcích izolátů byly sestrojeny kalibrační křivky pomocí standardů kyseliny mléčné a octové, které byly připraveny v koncentračním rozsahu 0,2-5 mg/ml.

Vzorky standardů byly naneseny na kolonu pomocí stříkačky a dávkovací smyčky v objemu 20 µl. Směs byla dělena na koloně Rezex^{TM} ROA-Organic Acid H+ (8 %), New Column 250x 4,6 mm při 30 ºC. Jako mobilní fáze byla použita 5 mmol kyselina sírová a zvolený průtok byl po optimalizaci 0,4 ml/min. Doba měření jednoho vzorku byla 12 minut a pro detekci organických kyselin byl použit RI detektor. Ze získaných chromatogramů byly pomocí programu Chromeleon vypočteny plochy jednotlivých píků, ze kterých byly v závislosti na obsažené koncentraci organické kyseliny sestrojeny kalibrační křivky. Vzorky izolátů se analyzovaly stejným způsobem, jako kalibrační standardy a obsah kyselin ve vzorcích byl vypočítán pomocí získaných kalibračních rovnic.

4.11 Stanovení antimikrobiální aktivity izolátů

Byla stanovena antimikrobiální aktivita připravených izolátů vůči čtyřem vybraným bakteriálním kmenům, dvěma gramnegativním (*E. coli, S. marcescens*) a dvěma grampozitivním (*M. luteus, S. epidermidis*). Testování bylo provedeno pomocí diskové difúzní metody na agarových plotnách, bujónové diluční metody na 96 - jamkových mikrotitračních destičkách a pomocí stanovení viability buněk resazurinem.

4.11.1 Difúzní disková metoda

Indikátorové bakteriální inokulum odebrané v exponenciální fázi růstu bylo ředěno médiem na hodnotu 0,5 McFarland, která odpovídá hodnotě $1{,}5 \cdot 10^8$ CFU/ml (jednotek tvořící kolonie) [78]. Pro získání této hodnoty byl využit stolní denzitometr McFarland DEN-1, který byl kalibrován McFarlandovými standardy. Poté byla kultura naředěna na $1{,}0 \cdot 10^6$ CFU/ml a v množství 100 µl napipetována na agarovou plotnu.

Napipetované inokulum bylo rozetřeno po povrchu agarové plotny očkovací hokejkou a ponecháno zaschnout. Poté byly na agarovou plotnu pinzetou pokládány disky ze sterilního filtračního papíru (o průměru přibližně 0,6 cm), na které bylo automatickou pipetou napipetováno 10 µl izolátu. Na každou Petriho misku byly umístěny čtyři disky s izoláty o různé koncentraci. Na pátý disk filtračního papíru bylo napipetováno 10 µl 70 % ethanol, který sloužil jako kontrola pro porovnání antimikrobiální aktivity. Celá práce probíhala za sterilních podmínek v laminárním boxu. Připravené Petriho misky s naočkovanou bakterií a umístěnými disky byly dány kultivovat po dobu 24 hodin při teplotě 37 ºC. Poté byly pravítkem proti kontrastnímu pozadí změřeny průměry inhibičních zón okolo disků [63].

4.11.2 Diluční bujónová metoda

Před samotným zahájením testu byla v laminárním boxu naředěna kultura indikátorového bakteriálního kmene médiem (Tabulka 2) na vhodnou koncentraci ($1{,}0 \cdot 10^6$ CFU/ml) pomocí McFarlandových standardů. Pro testovaní antimikrobiální aktivity izolátů byly použity 96-jamkové mikrotitrační destičky, do kterých bylo v laminárním boxu napipetováno pomocí vícekanálové pipety vždy 100 μl komplexního média a 100 μl izolátu v devíti různých koncentracích. Na závěr bylo do každé jamky přidáno 100 μl ředěné indikátorové bakteriální kultury. Na destičce byly pro porovnání a kontrolu připraveny také jamky obsahující buněčnou kontrolu (neobsahující antimikrobiální látku), jamky s čistým médiem a jamky, kde byl jako antimikrobiální látka přidán 70 % ethanol. Výsledný objem v každé jamce činil 200 μl.

Následně byla pomocí přístroje ELISA-reader změřena absorbance při vlnové délce 630 nm v čase t=0. Poté byly mikrotitrační destičky ponechány 24 hodin v inkubačním boxu o teplotě 37 ºC a v čase t=24 byla opět změřena absorbance vzorků při výše zmíněné vlnové délce. Ze získaných dat byla stanovena antimikrobiální aktivita izolátů.

4.12 Stanovení antimikrobiální aktivity kyseliny L-mléčné

Stanovení antimikrobiální aktivity kyseliny L-mléčné bylo provedeno bujónovou diluční metodou na 96-jamkové destičce. Před začátkem samotného testu byla naředěna kultura indikátorového kmene médiem na koncentraci $1{,}0 \cdot 10^6$ CFU/ml pomocí McFarlandových standardů. Dále se postupovalo stejně jako při postupu v bodě 4.11.2. Místo izolátu byla však jako antimikrobiální látka použita kyselina L-mléčná o koncentraci 150 mg/ml, která byla testována pro svou antimikrobiální aktivitu v devíti koncentracích proti všem testovaným indikátorovým bakteriím.

4.13 Stanovení viability buněk pomocí resazurinu

Sodná sůl resazurinu byla rozpuštěna ve fosfátovém pufru (PBS-Phosphate Buffer Saline), tak aby byla koncentrace připraveného roztoku 0,15 mg/ml. Poté bylo do každé jamky mikrotitrační destičky, kde byla předtím provedena diluční bujónová metoda antimikrobiálního testu, přidáno 20 μl připraveného roztoku resazurinu. Destička byla inkubována po dobu 30 minut v inkubačním boxu o teplotě 37 ºC a poté byla změřena absorbance na přístroji ELISA-reader při vlnové délce 570 nm.

4.14 Stanovení antimikrobiální aktivity na obalovém materiálu potravin

Byla provedena aplikace izolátu na polymerní obal za účelem testování jeho antimikrobiální aktivity při aplikaci na obalový materiál potravin. Bylo testováno 8 vzorků polymerních obalů na uzeniny od průmyslového partnera.

Polymerní obal byl nastříhán na čtverečky o velikosti přibližně 1x1cm. Vzorky byly hodinu inkubovány v roztoku izolátu z *L. acidophilus* o koncentraci 327,5 mg/ml. Obalový materiál s aplikovanou antimikrobiální látkou byl poté sterilní pinzetou v laminárním boxu umístěn do středu agarové misky s komplexním širokospektrálním LB médiem. Miska byla uzavřena parafilmem a ponechána kultivovat při teplotě 37 ºC po dobu 48 hodin v inkubačním boxu.

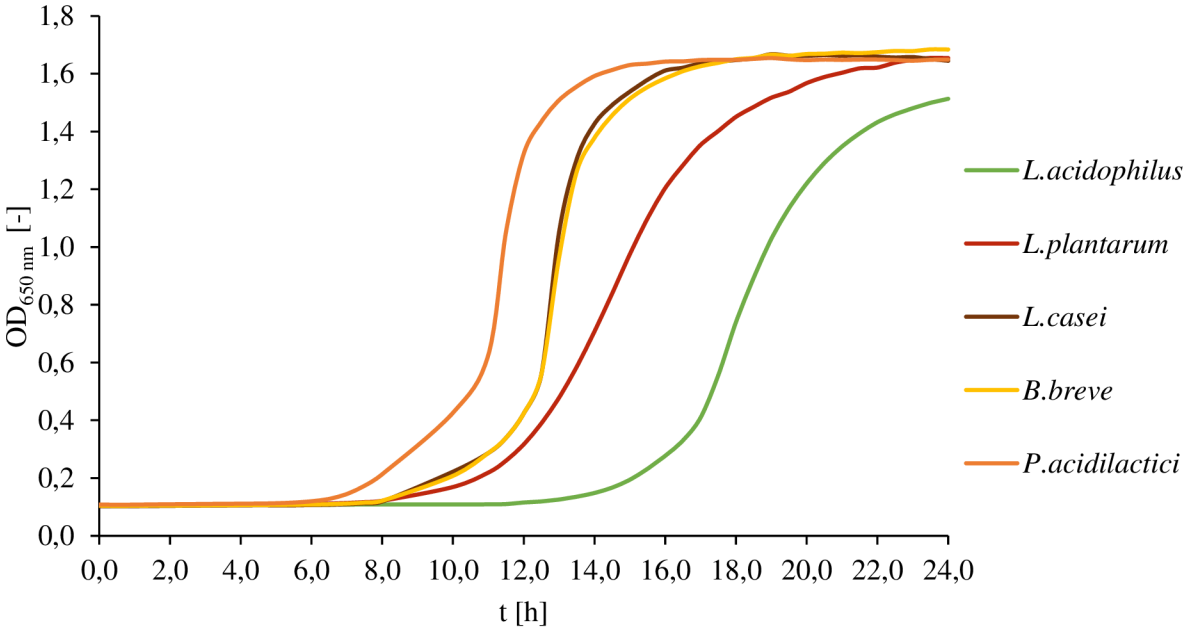
V intervalu 24 hodin a 48 hodin byly pořízeny fotografické snímky misek obsahující viditelný nárůst kontaminujících mikroorganismů. Tyto mikroorganismy byly následně pozorovány pomocí světelného mikroskopu (4.15). Paralelně byl test proveden s aplikací 96 % ethanolu na obalový materiál. Následně byl vizuálně pozorován vliv obou testovaných antimikrobiálních látek na nárůst kontaminujících mikroorganismů na agarových miskách.

4.15 Pozorování mikroorganismů pod světelným mikroskopem

Pro přípravu nativního preparátu byla na sterilní podložní sklo nanesena kapka vody. Vyžíhanou kličkou bylo do kapky vody přeneseno malé množství kultury. Suspenze byla kličkou důkladně rozmíchána a překryta krycím sklem, tak aby nevznikly bublinky. Připravený preparát byl ihned pozorován pod světelným mikroskopem imerzním objektivem (zvětšeno 100x) s použitím imerzního oleje, který byl aplikován v malém množství na krycí sklo [79].

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Charakterizace růstu vybraných probiotických bakterií



Obrázek 1: Graf závislosti optické hustoty (OD) měřené při 650 nm na čase [t]: Růstové křivky vybraných testovaných probiotických bakterií

Pro sledování životního cyklu vybraných probiotických bakterií byly změřeny jejich růstové křivky, které znázorňují změnu optické hustoty v čase (Obrázek 1). Byl tak nalezen čas, kdy dochází k exponenciální fázi růstu bakterií. Měření bylo provedeno podle postupu v bodě 4.6. Bakterie *L. acidophilus* dosahovala vrcholu exponenciální fáze ve 20 hodině od počátku doby kultivace, bakterie *L. plantarum* v 18 hodině, bakterie *L. casei* a *B. breve* ve 14 hodině a bakterie *P. acidilactici* ve 12 hodině. Důvodem větších rozdílu v čase růstu bakterií může být jejich odlišný metabolismus, jelikož se jedná o bakterie jiného druhu.

Touto metodou byly nalezeny časy, kdy dochází k exponenciální fázi růstu každého bakteriálního kmene. Ve fázi exponenciálního růstu byla předpokládána největší produkce primárních metabolitů bakterií, mezi které patří také bakteriociny.

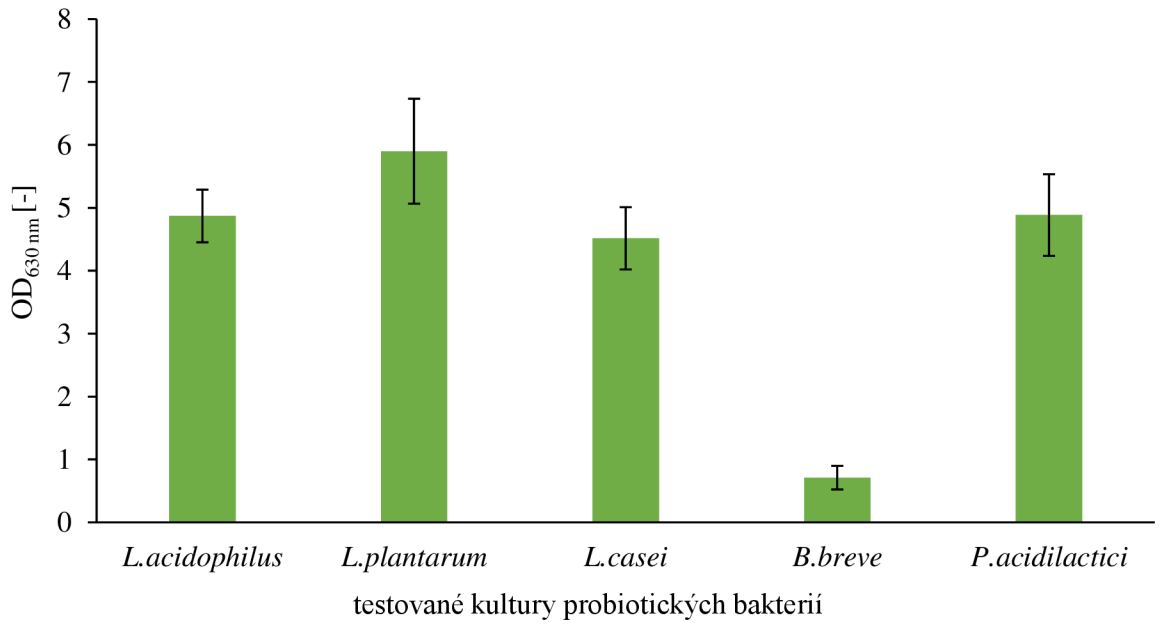
5.2 Produkce antimikrobiálních látek

5.2.1 Spektrofotometrické měření zákalu (turbidimetrie)

Po ukončení 14hodinové kultivace probiotických bakterií bylo odebráno malé množství každé kultury pro změření optické hustoty na Spektrofotometru UV/Vis UV-1600PC. Jako slepý vzorek bylo použito čisté MRS medium, ve kterém byly všechny probiotické bakterie kultivovány. Výsledné hodnoty optické hustoty každé kultury probiotických bakterií po 14hodinové kultivaci jsou znázorněny v grafu na Obrázku 2.

Na Obrázku 2 můžeme vidět, že absorbance u kultury *L. acidophilus* a *L. plantarum* je ve 14 hodině kultivace vyšší, než bylo očekáváno na základě změřené růstové křivky těchto bakterií. Podobných výsledků taky docílila při měření růstové křivky bakterie *L. acidophilus* ve své práci Ing. Vašků [80]. Na druhou stranu, bakterie *B. breve* měla po 14 hodinách od počátku kultivace mnohem nižší optickou hustotu, než bylo na základě růstové křivky předpokládáno.

Tento rozdíl mohl být způsoben tím, že při měření růstové křivky nebyly bakterie v tak dobré kondici, jako při měření optické hustoty těchto bakterií. Bakterie *B. breve* je navíc striktně anaerobním druhem je tedy možné, že byl při kultivaci pro měření optické hustoty její růst inhibován kyslíkem obsaženým ve vzduchu. Pro lepší výsledky by bylo potřeba bakterii *B. breve* kultivovat v anaerostatu. Dalším důvodem nedostatečného nárůstu *B. breve* může být použití MRS média pro jeho kultivaci. MRS médium je většinou používáno pro kultivaci bakterií rodu *Lactobacillus* a je tedy možné, že neobsahovalo složky potřebné pro optimální růst *B. breve*. V dalších studiích je potřeba optimalizovat složení kultivačního média pro *B. breve* přidáním chybějících složek do MRS média, nebo použitím jiného vhodnějšího média a kultivovat bakterii *B. breve* v anaerostatu.



Obrázek 2: Graf znázorňující hodnoty optické hustoty (OD) [-], které byly měřeny při 630 nm pro každou kulturu probiotických bakterií po 14 hodinách kultivace

5.2.2 Stanovení celkových proteinů Hartree-Lowryho metodou

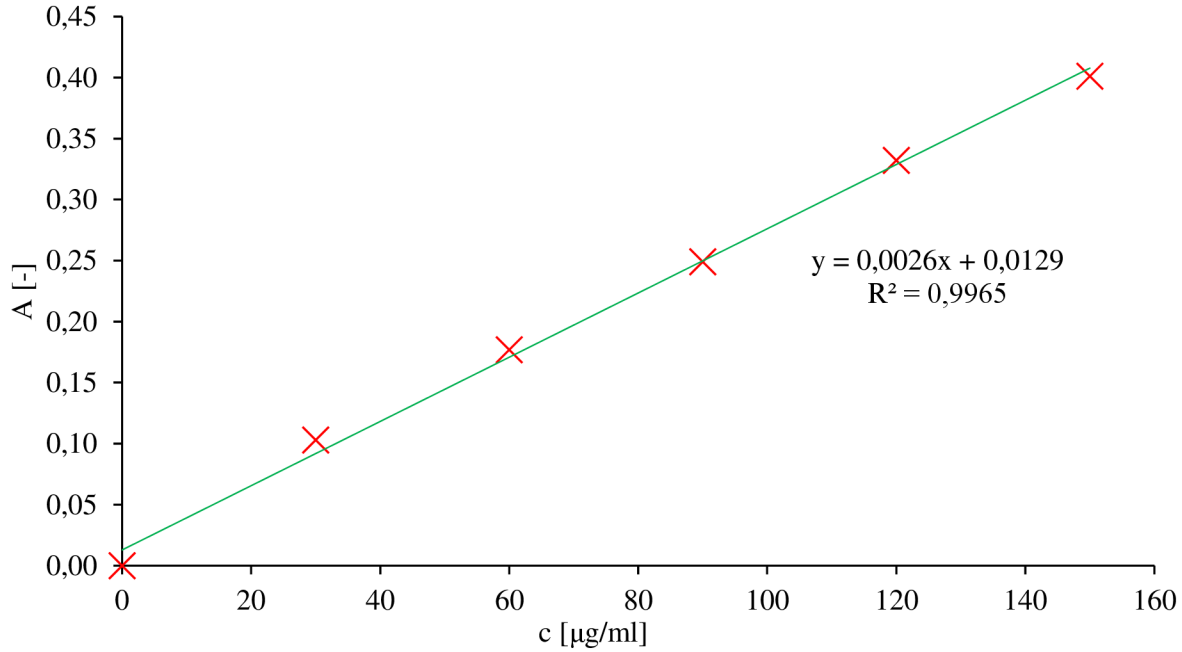
Supernatanty jednotlivých bakteriálních kultur byly testovány na přítomnost proteinů Hartree-Lowryho metodou podle postupu v bodě 4.9 princip metody je uveden v bodě 2.9. Pro stanovení proteinů Hartree-Lowryho metodou byla naměřena kalibrační závislost standardního roztoku albuminu (Obrázek 3). Stanovení proteinů bylo prováděno za předpokladu, že supernatant obsahuje bakteriociny, které jsou peptidové povahy a lze je tedy pomocí Hartree-Lowryho metody stanovit. Z našeho předpokladu tedy vyplývalo, že supernatant bude obsahovat více bílkovin než čisté MRS médium, kde byla probiotika kultivována. Vyšší koncentrace bílkovin v supernatantu by mohla prokázat produkci bakteriocinů v měřitelné koncentraci.

Naše hypotéza o stanovení koncentrace bakteriocinů pomocí Hartree-Lowryho metody však nebyla našim experimentem potvrzena, jelikož samotné MRS médium obsahuje velké množství proteinů (peptony, hovězí extrakt), které probiotika spotřebovávala během svého růstu. Bakteriociny jsou přitom produkované v malém množství a rozdíl malého nárůstu tak nebyl detekovatelný. Nebylo tedy možné probiotiky produkované bakteriociny pomocí Hartree-Lowryho metody stanovit. V Tabulce 3 jsou vypočítané hodnoty koncentrací proteinu v jednotlivých supernatantech a hodnoty optické hustotou kultur, z nichž byl supernatant odebrán. Na základě výše zmíněných faktů nebylo možné najít bližší souvislosti mezi těmito daty.

Stanovení proteinů touto metodou by bylo možné při použití jiného kultivačního média, kde by byl dusík, který je potřebný pro růst bakterií, přítomen v jiné formě než peptidové (v anorganické formě např. ve formě amonných soli). To může být podnětem k dalšímu zkoumání. Další možností stanovení přítomných bakteriocinů by bylo zvolení jiné metody. Metody purifikace, separace a následné identifikace bakteriocinů z kultivačního média jsou však velmi pracné a obsahují mnoho kroků. Možný způsob separace bakteriocinů je například purifikace síranem amonným následovaná iontoměničovou chromatografií, a nakonec vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s reverzní fází [81].

Tabulka 3: Přehled spektrofotometricky změřené optické hustoty (OD) supernatantů a média při 630 nm a vypočítané koncentrací proteinu [mg/ml] zjištěné Hartree-Lowryho metodou v jednotlivých testovaných vzorcích

testované médium a supernatanty	$OD_{630\ nm}$ [-]	koncentrace proteinu [mg/ml]
MRS medium	0,0	11,59
L. acidophilus	4,87	11,16
L. plantarum	5,90	9,79
L. casei	4,52	11,58
B. breve	0,71	11,15
P. acidilactici	4,86	11,79



Obrázek 3: Graf kalibrační závislosti absorbance [-] na koncentraci albuminu [µg/ml]

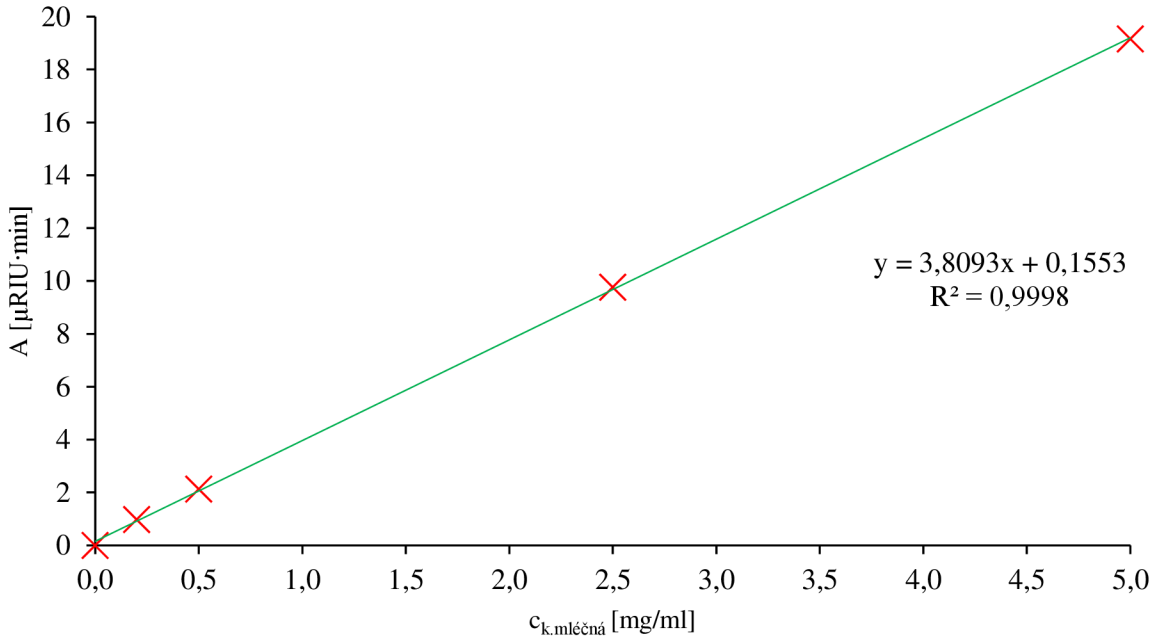
5.2.3 Stanovení koncentrace organických kyselin v izolátu

Za využití analytické metody reverzní kapalinové chromatografie na přístroji HPLC sestava Ultimate 3000 s UV/VIS s RI detektorem byla stanovena koncentrace přítomné kyseliny mléčné v jednotlivých izolátech probiotických bakterií podle postupu v bodě 4.10. Výpočet koncentrace kyseliny mléčné byl proveden na základě naměřené kalibrační závislosti, kterou můžeme vidět na Obrázku 4. Retenční čas pro kyselinu L-mléčnou byl 6 minut. Koncentrace kyseliny L-mléčné se v izolátech jednotlivých probiotických bakterií lišily. Ve sloupcovém grafu je zaznamenáno, kolik gramů kyseliny L-mléčné připadá na gram izolátu určitých testovaných probiotických bakterií (Obrázek 5).

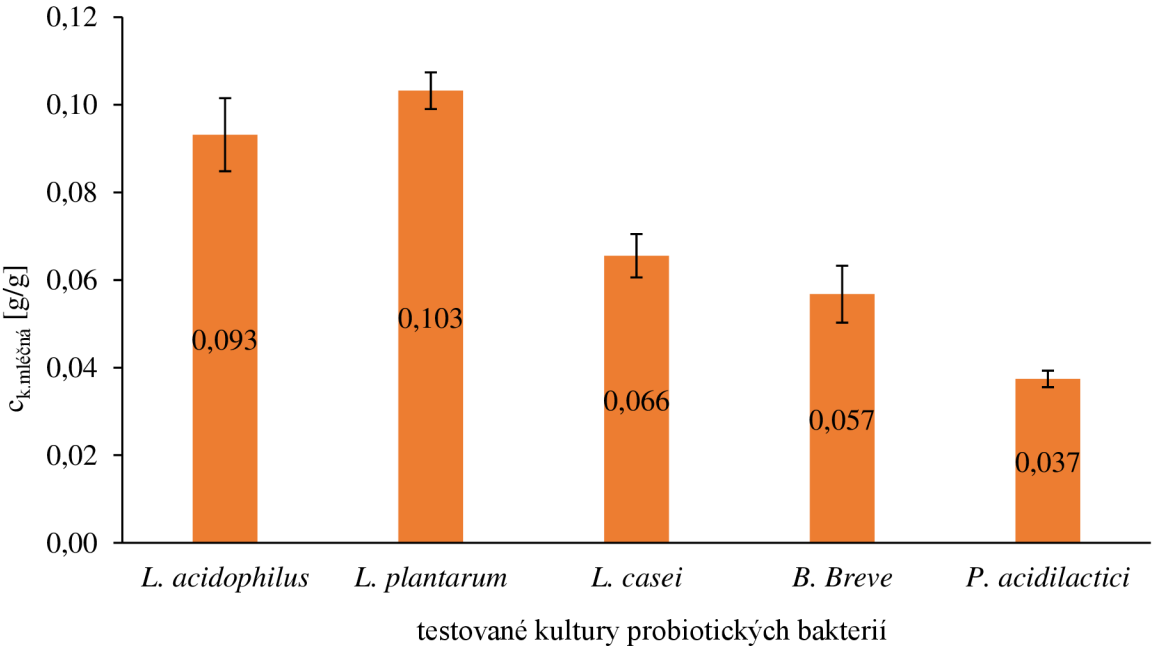
Nejvyšší koncentrace kyseliny mléčné byla změřena v izolátu *L. plantarum,* a to 0,103 g/g. Nejnižší koncentrace kyseliny mléčné byla naopak zjištěna v izolátu bakterie *P. acidilactici,* a to 0,037 g/g. Rozdílná koncentrace produkované kyseliny mléčné mohla být ovlivněna množstvím přítomných probiotických bakterií v kultuře (Obrázek 2). Odlišné hodnoty koncentrace u jednotlivých bakteriích mohly být také způsobeny rozdíly v jejich metabolismu a morfologii.

Dále byla provedena analýza koncentrace kyseliny octové v izolátu za použití stejné metody i techniky. Bylo zjištěno, že žádný izolát neobsahuje kyselinu octovou. Předpoklad produkce této organické kyseliny probiotickými bakteriemi se nepotvrdil nejspíš z důvodů jejich metabolismu. Acetát je produkován během metabolismu glukózy pomocí pyruvátformiátlyázy za limitace substrátem (nedostatek fermentovatelných sacharidů), kdy dochází k redukci stejného podílu pyruvátu na ethanol a na acetát za účelem regenerace kofaktorů a syntézy ATP. Jelikož nebyla v izolátu z bakterií detekována kyselina octová, předpokládáme,

že metabolismus bakterií mléčného kvašení probíhal za dostatku fermentovatelných sacharidů, kdy je pyruvát metabolizovaný laktátdehydrogenázou na laktát, který je zároveň hlavním produktem metabolismu [82].



Obrázek 4: Graf kalibrační závislost plochy píků (A) [µRIU·min] chromatogramu na koncentraci standardu kyseliny L-mléčné [mg/ml]



Obrázek 5: Graf znázorňující množství kyseliny mléčné [g/g] v jednotlivých izolátech testovaných probiotických bakterií

5.3 Stanovení antimikrobiální aktivity izolátů z probiotických bakterií

5.3.1 Agarový difúzní test

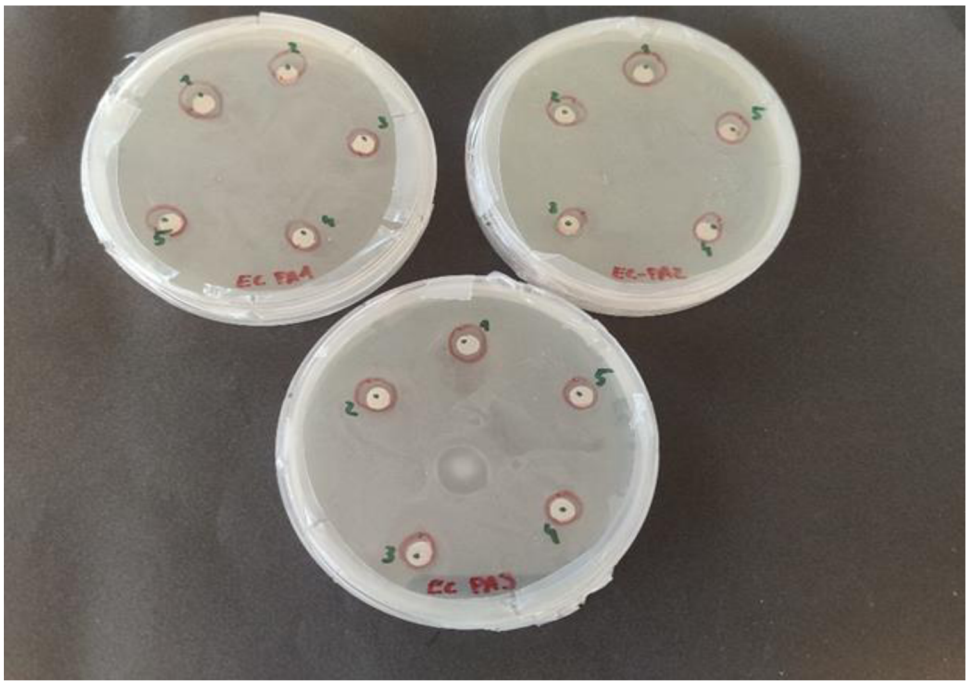
Byly provedeny antimikrobiální testy za využití agarové difúzní metody, jejíž postup je popsán v bodě 4.11.1. Všechna měření byla provedena v triplikátech a výsledné hodnoty průměrů inhibičních zón zprůměrovány. V Tabulce 4 jsou zaznamenány antimikrobiální aktivity nejkoncentrovanějších testovaných izolátů. Při prvním testování byla zvolena koncentrace 800 mg/ml pro zástupce gramnegativních i grampozitivních bakterií. U dalších testů byla použita vyšší koncentrace izolátů a to 1300 mg/ml, za cílem získání lepších výsledků. Výsledky všech testovaných koncentrací všech izolátů proti indikátorovým bakteriím jsou uvedeny v Příloze 1. Nejvyšší antimikrobiální aktivitu vykazoval u agarových difúzních testů izolát z *L. acidophilus*, který působil antimikrobiálně proti všem testovaným indikátorovým bakteriím.

Metoda agarových difúzních testů je nejtradičnější způsob validace pro identifikaci kmenů produkující bakteriociny. Avšak kvůli malému množství produkovaných bakteriocinů a vlivu dalších antimikrobiálních složek izolátů není tento test tolik vypovídající. Přesnost a reprodukovatelnost této metody je poměrně špatná a sloužila tedy při práci jako orientační zjištění antimikrobiální aktivity izolátů, která byla poté přesněji vyhodnocena pomocí bujónové diluční metody. Na Obrázku 6 můžeme vidět zakroužkované inhibiční zóny, které byly měřeny.

Tabulka 4: Vyhodnocení agarové difúzní metody, kdy byly vybrány a vzájemně porovnány koncentrace izolátů s největší naměřenou inhibiční zónou (cm)

	inhibiční aktivita antimikrobiální látky					
antimikrobiální látka	**c [mg/ml]**	***S. epidermidis***	***E.coli***	**c [mg/ml]**	***S.marcescens***	***M.luteus***
L.acidophilus	800,0	+++	+++	1300,0	++	++
L.plantarum	800,0	++	+++	1300,0	-	-
L.casei	800,0	+++	+++	1300,0	++	+
B.breve	800,0	+++	+++	1300,0	-	++
P.acidilactici	800,0	++	++	1300,0	-	-
ethanol	70 %	+	+	70 %	-	+

(Měření inhibičních zón: 0,0-0,6 cm: -; 0,6-0,8 cm: +; 0,8-1,0 cm: ++; 1,0-1,2 cm: +++)



Obrázek 6: Agarový difúzní test (červeně zakroužkované jsou inhibiční zóny)

5.3.2 Bujónová diluční metoda

Byly provedeny antimikrobiální testy za využití bujónové diluční metody, jejíž postup je popsán v bodě 4.11.2. Pomocí této metody, byla zjištěna antimikrobiální aktivita všech připravených izolátu proti všem vybraným testovaným bakteriím v různých koncentracích (Obrázek 7). Z naměřených hodnot pro každý izolát v účinku proti každé testované indikátorové bakterii byly vyhodnoceny minimální inhibiční koncentrace (MIC). Jako minimální inhibiční koncentrace byla zvolena nejnižší měřená koncentrace, kde byly indikátorové bakterie inhibovány v rozmezí 80-100 %. Přehled všech nalezených hodnot MIC je v Tabulce 5.

V Tabulce 6 byly pomocí rovnic lineární regrese vypočítány předpokládané hodnoty letální koncentrace (LC 100) a koncentrace, při níž je usmrceno 50 % všech bakterií (LC 50). Při spektrofotometrickém měření optické hustoty, která se používá při vyhodnocení tohoto typu testu, není možné určit, zda jsou bakteriální buňky mrtvé nebo pouze inhibované. Proto můžeme o hodnotách LC 100 a LC 50 mluvit pouze jako o pravděpodobných hodnotách, které nejsou zcela vypovídající. Tyto hodnoty koncentrací však mohou být využity pro ověření životaschopnosti bakterií jinými metodami.

5.3.2.1 Antimikrobiální aktivita izolátů proti gramnegativním bakteriím

Na Obrázku 7 u bakterie *E. coli* můžeme pozorovat velmi podobnou antimikrobiální aktivitu u izolátu *L. acidophilus a L. plantarum.* MIC těchto izolátů jsou 10,23 mg/ml a 9,51 mg/ml při nich dosahují antimikrobiální aktivity hodnot 81,62 % a 89,05 %. Izoláty z *L. casei* a *P. acidilactici* dosahují své MIC při 19,88 mg/ml a 23,17 mg/ml a jejich antimikrobiální aktivita je 84,33 % a 82,1 %. Po dosažení MIC u izolátů zůstává antimikrobiální aktivita

se zvyšující se koncentrací izolátů konstantní. Tak tomu není pouze u izolátu z *B. breve*, který vykazoval zvýšenou antimikrobiální aktivitu až při vysokých koncentracích. MIC tohoto izolátu byla taky nejvyšší a to 213,44 mg/ml, kdy inhibovala růst 94,15 % bakterií *E. coli*.

U bakterie *S. marcescens* byla pozorována nejnižší MIC u izolátu z *L. casei* a to 9,94 mg/ml, kdy inhibovala růst 97,73 % bakterií. Nejvyšší MIC 185,38 mg/ml byla pozorována u izolátu z *P. acidilactici* a inhibovala 81,99 % bakterií. Izolát z *B. breve* vykazoval proti *S. marcescens* nejvyšší antimikrobiální aktivitu a to 87,73 % při nejnižší MIC (79,63 mg/ml) ze všech testovaných indikátorových bakterií.

5.3.2.2 Antimikrobiální aktivita izolátů proti grampozitivním bakteriím

Nejvyšší antimikrobiální aktivitu proti bakterii *M. luteus* měly izoláty z *L. acidophilus* a *L. casei*, které již při koncentraci 10 mg/ml inhibovaly 85,1 % a 82,61 % bakterií. Naproti tomu k 86,18 % inhibici *M. luteus* izolátem *L. plantarum* byla potřebná koncentrace 304 mg/ml.

Proti bakterii *S. epidermidis* působil nejvíc antimikrobiálně izolát z *L.acidophilus,* který při koncentraci 20,47 mg/ml inhiboval 90,76 % bakterií. Nejvyšší MIC při inhibici *S. epidermidis* měl izolát z *B. breve* a to 318, 5 mg/ml, při které inhiboval 90,58 % bakterií.

5.3.2.3 Vliv kyseliny mléčné na antimikrobiální aktivitu izolátů

U některých izolátů bylo pozorováno, že izolát vykazuje vyšší antimikrobiální aktivitu než množství kyseliny mléčné v něm obsažené. To znamená, že se v izolátech kromě kyseliny mléčné vyskytují další antimikrobiální látky, které výslednou antimikrobiální aktivitu izolátu zvyšují. Mohlo by se jednat například o bakteriociny. Další možné vysvětlení je, že jednotlivé antimikrobiální látky obsažené v izolátu působí víc antimikrobiálně v synergii než jednotlivě.

Na Obrázku 7 u bakterie *E. coli* pozorujeme, že izolát z *L. plantarum* o koncentraci 9,51 mg/ml inhibuje větší procento bakterií (89,05 %), než kyselina mléčná o koncentraci 9,41 mg/ml, která inhibuje růst 83,1 % bakterií. U bakterie *S. marcescens* byla vyšší antimikrobiální aktivita, než u kyseliny mléčné pozorována u izolátu z *L. casei* při koncentraci 9,93 mg/ml, kdy izolát inhiboval 97,74 % bakterií a kyselina mléčná 92,65 % bakterií.

U bakterie *M. luteus* byla pozorována vyšší antimikrobiální aktivita u kyseliny mléčné než u izolátů. Kyselina mléčná o koncentraci 2,34 mg/ml inhibovala 88,5 % bakterií *M. luteus*. U bakterie *S. epidermidis* byla pozorována vysoká antimikrobiální aktivita izolátu *L. acidophilus*.

Na Obrázku 8 pozorujeme antimikrobiální vliv izolátu *L. acidophilus* vztažený na obsah kyseliny mléčné v izolátu v porovnání s antimikrobiálním účinkem kyseliny mléčné. Izolát z *L. acidophilus* při koncentraci 20,47 mg/ml inhiboval 90,76 % bakterií. Antimikrobiální aktivita tohoto izolátu přesáhla antimikrobiální aktivitu kyseliny mléčné obsažené v izolátu, inhibovala při stejné koncentraci 80,76 % bakterií.

U jednotlivých antimikrobiálních testů na indikátorových bakteriích byl sledován vliv pH na antimikrobiální aktivitu a hodnota pH byla zanesena do grafu (Obrázek 8). Sledujeme, že nejvyšší antimikrobiální aktivita izolátu je při nízkém pH (5-6). To souvisí s obsahem

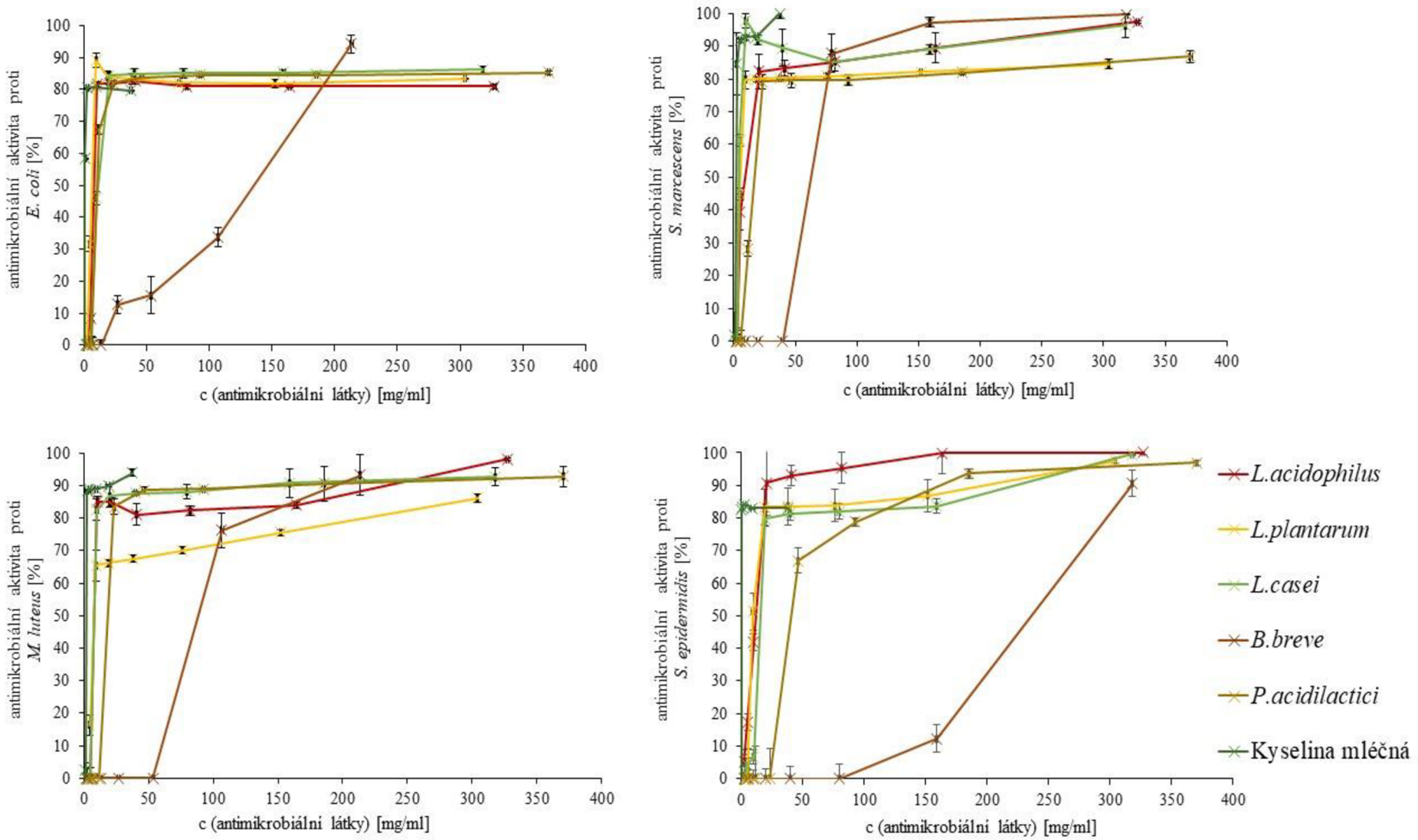
přítomné kyseliny mléčné jejíž koncentrace se zvyšuje se zvyšující se koncentrací izolátu, ve kterém je obsažená.

Tabulka 5: Přehled hodnot minimálních inhibičních koncentrací (MIC) testovaných izolátů na indikátorové bakterie

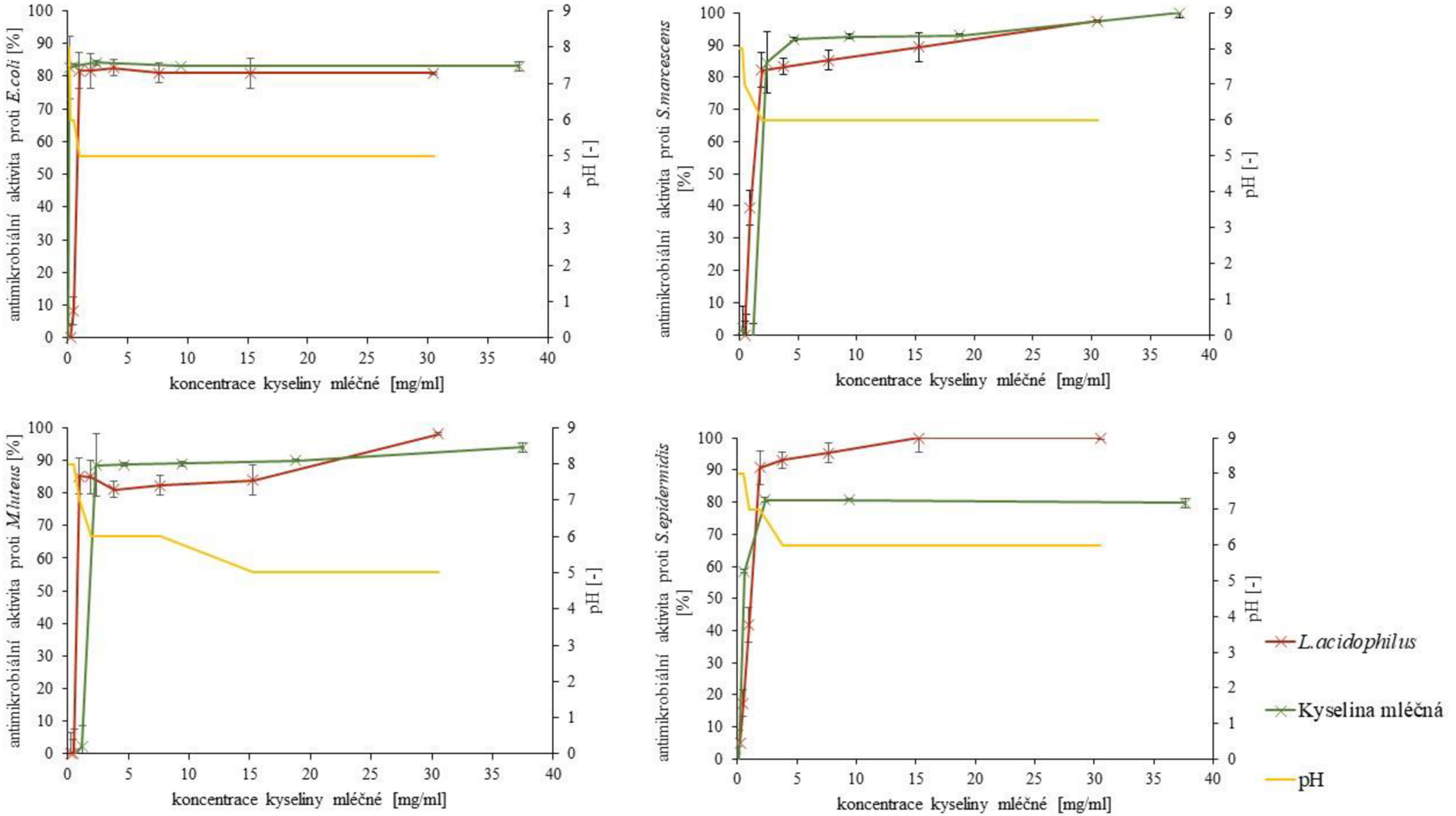
testované izoláty	minimální inhibiční koncentrace (MIC) izolátu [mg/ml] pro testované indikátorové bakterie			
	E. coli	*S. marcescens*	*M. luteus*	*S. epidermidis*
L .acidophilus	10,23	20,47	10,23	20,47
L. plantarum	9,51	38,02	304,18	19,01
L. casei	19,88	9,94	9,94	39,75
B. breve	213,44	79,63	213,44	318,50
P. acidilactici	23,17	185,38	23,17	185,38

Tabulka 6: Přehled vypočítaných hodnot letální koncentrace LC 50 a LC 100 [mg/ml] testovaných izolátů na indikátorové bakterie (-: značí, že nebylo možné dopočítat letální koncentraci)

testované izoláty	pravděpodobné letální koncentrace (LC) 50 a 100 (mg/ml) pro testované indikátorové bakterie							
	E. coli		*S. marcescens*		*M. luteus*		*S. epidermidis*	
	LC 50	**LC 100**	**LC 50**	**LC 100**	**LC 50**	**LC 100**	**LC 50**	**LC 100**
L. acidophilus	7,99	-	12,50	379,39	8,40	379,51	11,94	164,85
L. plantarum	6,66	-	8,93	1280,78	8,93	1280,78	13,55	301,77
L. casei	13,14	476,15	5,55	397,32	5,55	397,32	15,21	354,95
B. breve	124,27	235,03	61,76	298,31	61,76	298,31	235,26	336,35
P. acidilactici	14,15	869,85	17,19	971,44	17,19	971,44	12,12	360,91



Obrázek 7: Grafy porovnávající závislosti antimikrobiální aktivity všech izolátu a kyseliny mléčné na jejich koncentraci [mg/ml] u všech testovaných indikátorových bakterií



Obrázek 8: Grafy znázorňující srovnání antimikrobiální aktivity izolátu z *L.acidophilus* a kyseliny mléčné v závislosti na obsahu kyseliny mléčné v izolátu [mg/ml] se závislostí pH pro všechny testované indikátorové bakterie

5.4 Resazurinový test

Princip fungování tohoto testu je založen na sledování enzymatické redukce resazurinu životaschopnými buňkami na červenou fluorescenční látku resorufin (2.8). Resazurinový test viability je možné použít pouze při pH 7 a vyšším [74, 75]. Při tomto pH se nachází resazurin i resorufin ve své aniontové formě, kde vykazují fluorescenční schopnosti, které jsou podstatou celého resazurinového testu.

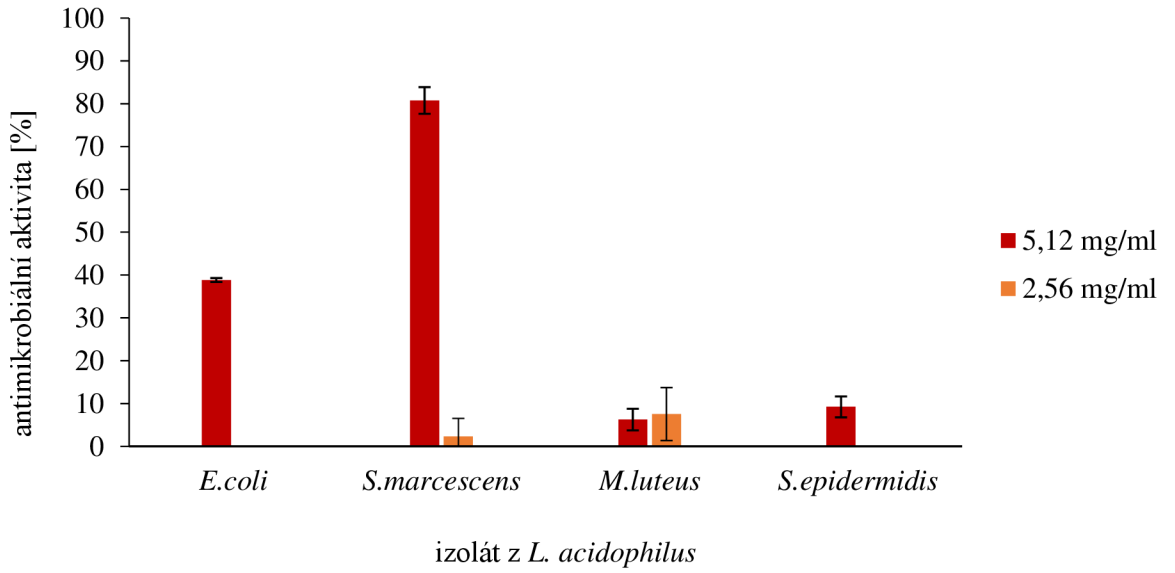
Metodou RP-HPLC bylo zjištěno, že bakterie mléčného kvašení obsahují určité množství kyseliny mléčné, které snižuje pH celého izolátu. Nízké pH znemožnilo provedení resazurinového testu, protože resazurin a resorufin neměli potřebné fluorescenční vlastnosti. Resazurin je však možné při pH 3,8 (oranžovočervená barva) - 6,5 (modrofialová barva) použít jako pH indikátor [74, 75].

Na Obrázku 10 je mikrotitrační destička s již provedenou bujónovou diluční metodou a přidaným resazurinem. Fotografie byla pořízena po 30 minutách od přidání resazurinu, takže již proběhla redukce barviva na resorufin živými buňkami (růžové jamky). Jamky, kde nebyly živé buňky, které by mohly zredukovat resazurin, zůstaly modrofialové. Oranžovočervené jamky, které jsou na destičce v největším počtu byly ty, kde bylo pH <7 (vysoká koncentrace organických kyselin). Při těchto vysokých koncentracích izolátu nebylo možné provést resazurinový test. Můžeme však pozorovat, že ředěním izolátu se zvyšuje hodnota pH a je tedy možné, tam kde je pH vyšší než 7 resazurinový test vyhodnotit. Na viabilitu buněk byly tedy testovány takové koncentrace izolátu, kde pH přesáhlo hodnotu 7. pH bylo v jamkách vyhodnoceno jak vizuálně (indikátor resazurin), tak pomocí lakmusových pH papírků (Obrázek 10).

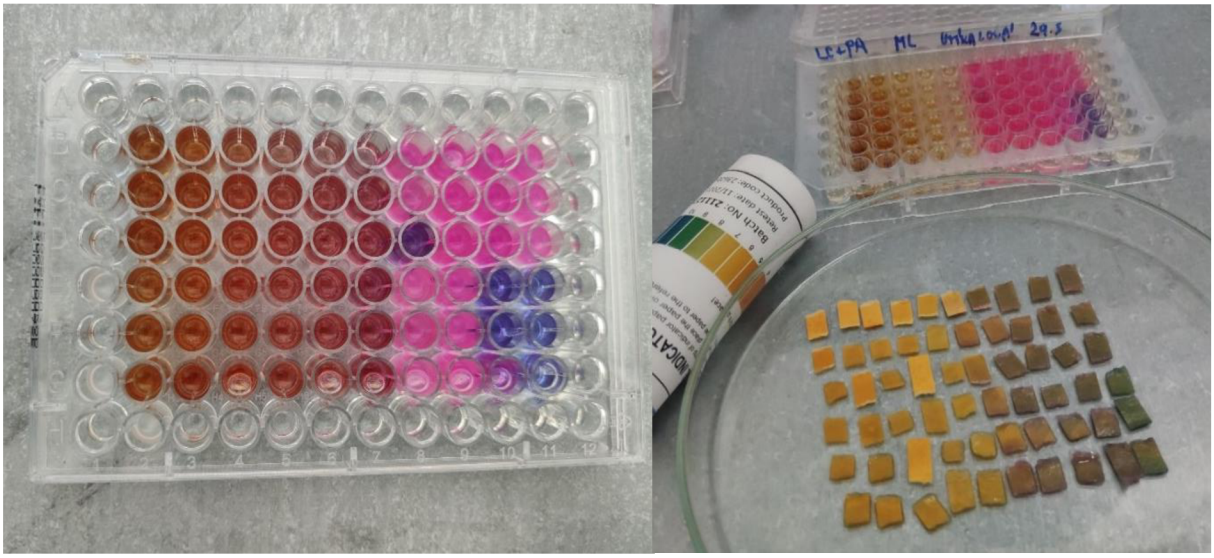
Našim cílem bylo komplexní zjištění inhibiční aktivity izolátu se všemi antimikrobiálními látkami a jejich vlivem taky sníženém pH (organické kyseliny). Avšak možným řešením problému nízkého pH pro měření resazurinového testu by mohla být neutralizace a zvýšení pH v jednotlivých jamkách.

Na Obrázku 9 je znázorněna antimikrobiální aktivita izolátu *L. acidophilus* při dvou testovaných koncentraci 2,56 mg/ml a 5,12 mg/ml proti indikátorovým bakteriím, která byla zjištěna pomocí resazurinového testu. U izolátu z *L. acidophilus,* jako jediného ze všech testovaných izolátů, bylo možné změřit pomocí resazurinového testu antimikrobiální aktivitu u všech testovaných bakterií.

Například u bakterie *S. marcescens* byla u resazurinového testu pozorována vyšší antimikrobiální aktivita izolátu z *L. acidophilus* při koncentraci 5,12 mg/ml a to 80,77 %, než u výsledku antimikrobiální aktivity získané vyhodnocením dilučních antimikrobiálních testů, kde činila při dané koncentraci pouze 39,42 %. Tato skutečnost byla pozorována také u dalších testovaných bakterií a izolátů. Je tedy možné, že zjištěné antimikrobiální aktivity izolátů z dilučních testů mohou být ve skutečnosti ještě vyšší. Pro potvrzení této skutečnosti by však bylo potřeba provést další testy viability buněk při všech testovaných koncentracích izolátu.



Obrázek 9: Graf znázorňující rozdílné antimikrobiální aktivity při působení dvou testovaných koncentrací izolátu z *L. acidophilus* na indikátorové bakterie



Obrázek 10: Mikrotitrační destička s resazurinovým testem (měření pH indikátorem resazurinem a lakmusovými pH papírky)

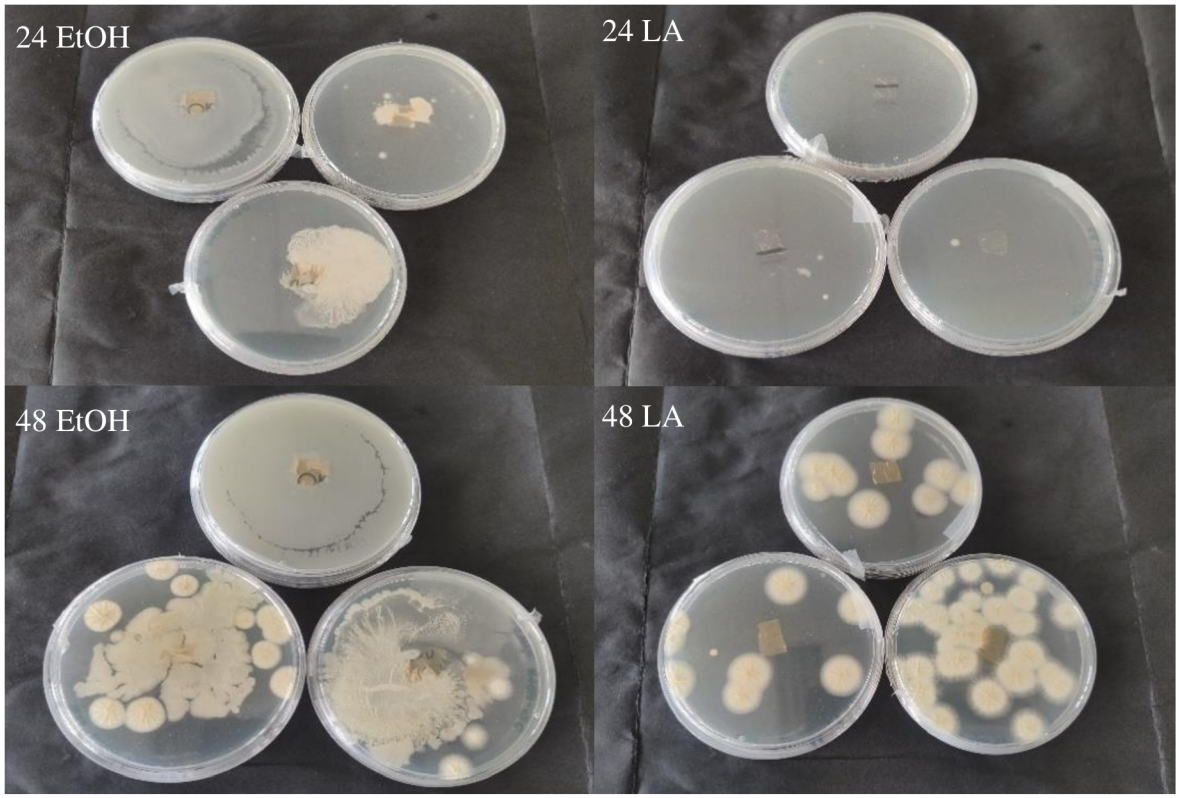
5.5 Stanovení mikrobiální kontaminace na obalovém materiálu potravin

Pro prvotní vyzkoušení aplikace připravených izolátů byl vizuálně pozorován vliv ošetření obalového materiálu na nárůst kontaminujících mikroorganismů. Jednalo se o polymerní obalový materiál na uzeniny od průmyslového partnera. Jako aplikovaná antimikrobiální látka byl vybrán izolát z *L. acidophilus*. který v dilučních a difúzních antimikrobiálních testech vykazoval nejvyšší antimikrobiální aktivitu ze všech zkoumaných izolátů a byl proto vybrán pro aplikované testování potravinářského produktu. Použitá koncentrace izolátu byla 327,5 mg/ml. Tato koncentrace byla zvolena na základě provedených dilučních testů, kdy byla u této koncentrace zaznamenána nejvyšší antimikrobiální aktivita u bakterie *E. coli* a to 80,88 %, *S. marcescens* 97,44 %, *S epidermidis* 100,0 % a u bakterie *M. luteus* 98,14 %.

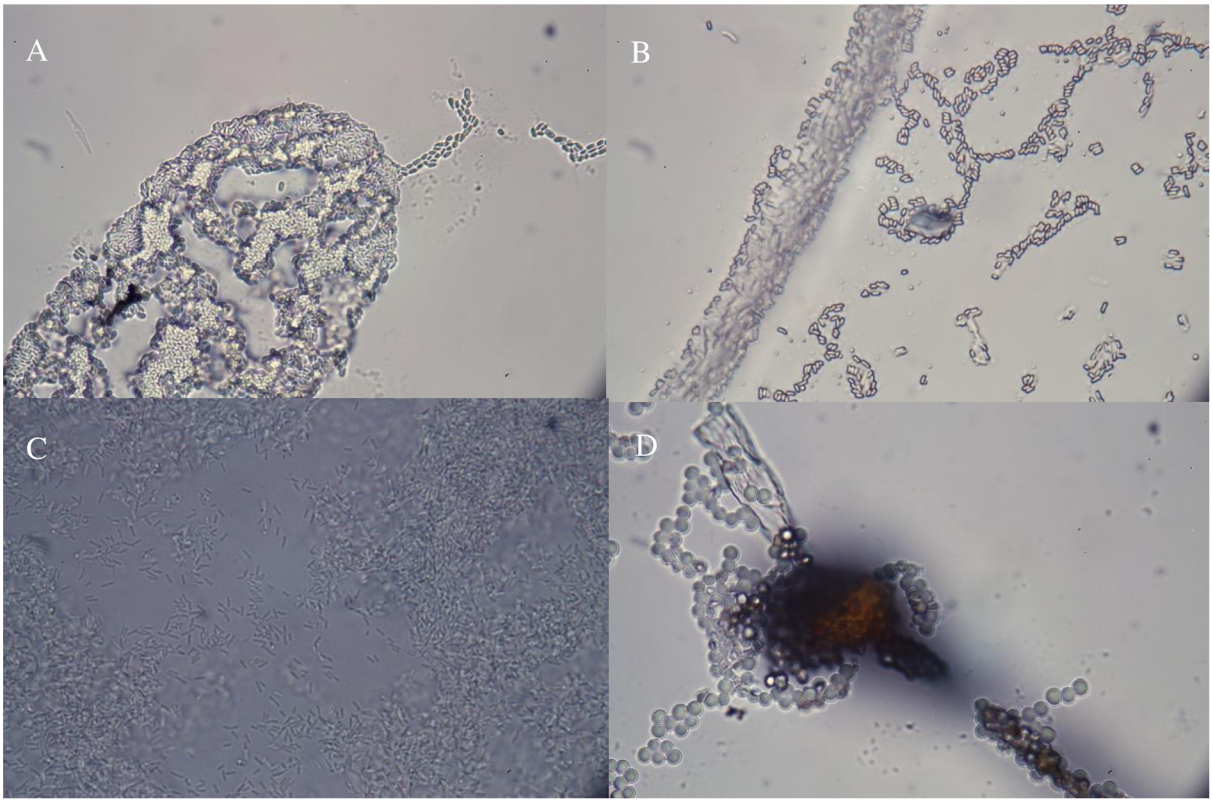
Na Obrázku 11 je pozorován nárůst kontaminujících mikroorganismů na vzorku č. 12 po 24 a 48 hodinách s použitím ethanolu a izolátu z *L. acidophilus*, jako antimikrobiálních látek. Bylo pozorováno, že použití izolátu z *L. acidophilus* zapříčinilo viditelně menší nárůst kontaminujících mikroorganismů, než použití 96 % ethanolu ve většině testovaných vzorků. Izolát z *L. acidophilus* a ethanol byl aplikován celkem na 8 vzorků potravinových obalů. Veškeré fotografické výsledky nárůstu kontaminujících bakterií na testovaných vzorcích jsou v Příloze 2.

Kontaminující mikroorganismy byly následně pozorovány pod světelným mikroskopem za použití imerzního objektivu při zvětšení 100x (Obrázek 12). Jednalo se především o plísně a tyčinkové bakterie. Pro lepší charakterizaci kontaminujících mikroorganismů by mohla být pro kultivaci použita selektivní média, ale pro bližší identifikaci kontaminujících mikroorganismů by bylo potřeba použít jiné metody například metodu PCR.

Délka inkubace vzorku obalu v roztoku antimikrobiální látky ovlivňuje výslednou antimikrobiální aktivitu. Pro získání lepších výsledků antimikrobiální aktivity by bylo tedy možné prodloužit čas inkubace vzorku v roztoku. Další možnou úpravou provedení tohoto testu by mohla být kultivace mikroorganismů přítomných na obalovém materiálu po ošetření v tekutém médiu a následné ředění a zaočkování kultury na agarovou plotnu. Díky vhodnému naředění by bylo možné na agarové plotně počítat jednotlivé kolonie bakterií a jiných mikroorganismů (CFU) a tak lépe vyhodnotit inhibiční aktivitu antimikrobiální látky.



Obrázek 11: Nárůst kontaminujících mikroorganismů na agarových miskách se vzorkem č.12 (po 24hodinové a 48hodinové kultivaci, EtOH-ethanol, LA-izolát z *L.acidophilus*)



Obrázek 12: Kontaminující mikroorganismy pozorované pod světelným mikroskopem (imerzní objektiv - 100x zvětšeno) A-C:tyčinkové bakterie, D: plíseň-konidiofor s konidiemi

6 ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na studium produkce a možnosti aplikace antimikrobiálních látek produkovaných probiotickými bakteriemi. V teoretické části práce byla zpracována rešerše na téma produkce antimikrobiálních látek pomocí bakterií mléčného kvašení, která byla zaměřena především na produkci kyseliny mléčné a bakteriocinů. Byla popsána charakteristika, dělení, biosyntéza a aplikace bakteriocinů. Na základě provedené rešerše bylo pro testování antimikrobiální aktivity vybráno pět probiotických bakterií tří různých rodů a to *L. acidophilus*, *L. planatarum, L. casei, P. acidilactici* a *B. breve*, u kterých byla prokázána produkce bakteriocinů. Zjištěné informace z teoretické části práce byly využity v experimentální části a při vyhodnocování výsledků.

V experimentální části práce byly kultivovány vybrané druhy bakterií mléčného kvašení s předpokládanou produkcí bakteriocinů. Byla provedena charakterizace jejich růstu sestrojením růstových křivek. Následně byly z kultur probiotických bakterií připraveny izoláty. Centrifugací byl získán bezbuněčný supernatant, který byl následně lyofilizován a rozsuspendován v destilované vodě.

Bezbuněčné supernatanty jednotlivých probiotik byly testovány pomocí Hartree-Lowryho metody na celkový obsah proteinů, za cílem přímou metodou prokázat přítomnost bakteriocinů. Použití této metody však nebylo úspěšné z důvodu nízké produkce bakteriocinů probiotiky, kterou nebylo možné detekovat. Připravené izoláty byly testovány na obsah kyseliny L-mléčné a kyseliny octové pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází. Byly zjištěny koncentrace kyseliny mléčné obsažené v jednotlivých izolátech. Kyselina octová v izolátech probiotických bakterií nebyla prokázána, nejspíš z důvodu dostatku fermentovatelných sacharidů v substrátu, díky kterým byla hlavním metabolitem probiotik kyselina mléčná.

Připravené izoláty a kyselina mléčná byly podrobeny stanovení antimikrobiální aktivity proti čtyřem vybraným bakteriím *E. coli, S. marcescens, M. luteus* a *S. epidermidis*. Pro zjištění antimikrobiální aktivity izolátů byly použity agarová difúzní a bujónová diluční metoda. Díky agarové difúzní metodě byly získány orientační výsledky antimikrobiální aktivity izolátů, které byly poté potvrzeny a upřesněny bujónovou diluční metodou. Antimikrobiální aktivita byla zjištěna u všech testovaných izolátů. Byly nalezeny minimální inhibiční koncentrace a z pozorování závislosti antimikrobiální aktivity na koncentraci byly vypočteny odhadované letální koncentrace LC 50 a LC 100 všech testovaných izolátů na všechny testované indikátorové bakterie.

Pro ověření viability testovaných indikátorových bakterií byl použit resazurinový test. Bylo zjištěno, že použití resazurinového testu je možné pouze při nízkých koncentracích izolátu, kdy je obsah kyseliny mléčné natolik nízký, že je pH vyšší než 7.

Díky zjištěnému obsahu kyseliny L-mléčné v jednotlivých izolátech a její antimikrobiální aktivity proti testovaným indikátorovým bakteriím, tak mohl být určen antimikrobiální vliv kyseliny L-mléčné u každého izolátu.

Nejvyšší antimikrobiální aktivita byla pozorována u izolátů *L.acidophilus a L.plantarum.* Díky antimikrobiálním testům byl nepřímou metodou stanoven možný antimikrobiální vliv

bakteriocinů na grampozitivní a gramnegativní bakterie. Izolát z *L.acidophilus* u bakterie *S.epidermidis* vykazoval vyšší antimikrobiální aktivitu než kyselina mléčná obsažená v izolátu. Při koncentraci izolátu 20,47 mg/ml bylo inhibováno 90,76 % bakterií a kyselina mléčná obsažená v izolátu inhibovala pouze 80,76 %. Izolát pravděpodobně působil vyšší antimikrobiální aktivitou z důvodu přítomnosti produkovaných bakteriocinů, případně synergie antimikrobiálních látek. *L. acidophilus* se dle literatury vyznačuje produkcí lactacinu, acidophilicinu, nebo acidocoinu [6]. Možný vliv přítomných bakteriocinů na zvýšenou antimikrobiální aktivitu byl také pozorován u bakterie *E. coli* u izolátů z *L. plantarum,* který inhiboval 89,05 % bakterií, *L. casei* a *P. acidilactici*, jednalo by se pak o plantariciny, caseicin a pediociny [8, 9, 12].

Izolát z *L. acidophilus* byl pro své vyhovující antimikrobiální vlastnosti vybrán pro aplikaci na polymerní obalový materiál na uzeniny, kde byla sledována inhibice mikrobiální kontaminace a srovnávána s působením ethanolu. U vzorků obalů, které byly ošetřeny izolátem, byl pozorován viditelně menší nárůst kontaminujících mikroorganismů než u vzorků ošetřených ethanolem.

Všechny probiotické izoláty projevily antimikrobiální aktivitu proti testovaným indikátorovým bakteriím a některé s velmi pozitivními výsledky, které přesáhly antimikrobiální vliv samotné kyseliny mléčné obsažené v izolátu. Tato zvýšená antimikrobiální aktivita může poukazovat právě na přítomnost bakteriocinů. Pro plné využití potenciálu těchto izolátů jako konzervačních látek by však bylo potřeba provést další vědecké studie.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] MOKOENA, Mduduzi Paul. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules* [online]. 2017, **22**(8), 1255 [vid. 2022-04-05]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules22081255

[2] YAP, Pei Gee, Zee Wei LAI a Joo Shun TAN. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification strategies and applications in food and medical industries: a review. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* [online]. 2022, **11**(1), 51 [vid. 2022-04-18]. ISSN 2314-8543. Dostupné z: doi:10.1186/s43088-022-00227-x

[3] ZÚÑIGA, M., I. PARDO a S. FERRER. An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1993, **18**(1), 37–42. ISSN 0168-1605. Dostupné z: doi:10.1016/0168-1605(93)90005-2

[4] DEMPSEY, Elaine a Sinéad C. CORR. Lactobacillus spp. for Gastrointestinal Health: Current and Future Perspectives. *Frontiers in Immunology* [online]. 2022, **13** [vid. 2022-12-20]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.840245

[5] HUANG, Zheng, Xingya ZHOU, Catherine STANTON, Reynolds Paul ROSS, Jianxin ZHAO, Hao ZHANG, Bo YANG a Wei CHEN. Comparative Genomics and Specific Functional Characteristics Analysis of Lactobacillus acidophilus. *Microorganisms* [online]. 2021, **9**(9), 1992 [vid. 2022-12-20]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9091992

[6] AHMED, Z., Y. WANG, Q. CHENG a M. IMRAN. Lactobacillus acidophilus bacteriocin, from production to their application: An overview. *African Journal of Biotechnology* [online]. 2010, **9**(20) [vid. 2022-12-20]. ISSN 1684-5315. Dostupné z: doi:10.4314/ajb.v9i20

[7] ANJUM, Nazia, Shabana MAQSOOD, Tariq MASUD, Asif AHMAD, Asma SOHAIL a Abdul MOMIN. Lactobacillus acidophilus: Characterization of the Species and Application in Food Production. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2014, **54**(9), 1241–1251 [vid. 2022-12-20]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2011.621169

[8] TODOROV, Svetoslav D. Bacteriocins from Lactobacillus plantarum – production, genetic organization and mode of action. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. 2009, **40**(2), 209–221 [vid. 2022-12-20]. ISSN 1517-8382. Dostupné z: doi:10.1590/S1517-83822009000200001

[9] MÜLLER, E. a F. RADLER. Caseicin, a bacteriocin from Lactobacillus casei. *Folia Microbiologica* [online]. 1993, **38**(6), 441–446. ISSN 0015-5632. Dostupné z: doi:10.1007/BF02814392

[10] CASTELLANO, Patricia, Raul RAYA a Graciela VIGNOLO. Mode of action of lactocin 705, a two-component bacteriocin from Lactobacillus casei CRL705. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2003, **85**(1–2), 35–43. ISSN 0168-1605. Dostupné z: doi:10.1016/s0168-1605(02)00479-8

[11] HOLLAND, R., V. CROW a B. CURRY. Lactic Acid Bacteria | Pediococcus spp. In: John W. FUQUAY, ed. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)* [online]. San Diego: Academic Press, 2011 [vid. 2022-12-20], s. 149–152. ISBN 978-0-12-374407-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374407-4.00269-7

[12] DARBANDI, Atieh, Arezoo ASADI, Marzieh MAHDIZADE ARI, Elnaz OHADI, Malihe TALEBI, Masoume HALAJ ZADEH, Amir DARB EMAMIE, Roya GHANAVATI a Maryam KAKANJ. Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* [online]. 2021, **36**(1), e24093 [vid. 2023-03-24]. ISSN 0887-8013. Dostupné z: doi:10.1002/jcla.24093

[13] DARVISHI, Nasrin, Najaf Allahyari FARD a Maryam SADRNIA. Genomic and proteomic comparisons of bacteriocins in probiotic species Lactobacillus and Bifidobacterium and inhibitory ability of Escherichia coli MG 1655. *Biotechnology Reports* [online]. 2021, **31**, e00654 [vid. 2022-12-20]. ISSN 2215-017X. Dostupné z: doi:10.1016/j.btre.2021.e00654

[14] GIBSON, G.R. a X. WANG. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* [online]. 1994, **77**(4), 412–420 [vid. 2023-03-23]. ISSN 0021-8847. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.1994.tb03443.x

[15] MOGNA, Luca, Mario DEL PIANO a Giovanni MOGNA. Capability of the Two Microorganisms Bifidobacterium breve B632 and Bifidobacterium breve BR03 to Colonize the Intestinal Microbiota of Children. *Journal of Clinical Gastroenterology* [online]. 2014, **48**, S37 [vid. 2022-12-22]. ISSN 0192-0790. Dostupné z: doi:10.1097/MCG.0000000000000234

[16] YILDIRIM, Zeliha a Michael JOHNSON. Characterization and Antimicrobial Spectrum of Bifidocin B, a Bacteriocin Produced by Bifidobacterium bifidum NCFB 1454. *Journal of food protection* [online]. 1998, **61**, 47–51. Dostupné z: doi:10.4315/0362-028X-61.1.47

[17] VENTURA, Marco, Francesca TURRONI, Mary O'Connell MOTHERWAY, John MACSHARRY a Douwe VAN SINDEREN. Host–microbe interactions that facilitate gut colonization by commensal bifidobacteria. *Trends in Microbiology* [online]. 2012, **20**(10), 467–476 [vid. 2023-03-23]. ISSN 0966-842X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tim.2012.07.002

[18] LAHTINEN, Sampo, Arthur C. OUWEHAND, Seppo SALMINEN a Atte von WRIGHT. *Lactic Acid Bacteria | Microbiological and Functional Aspects, Fourth* [online]. 4. vyd. Boca Raton: CRC Press, 2012 [vid. 2022-05-02]. ISBN 978-0-429-15145-3. Dostupné z: https://www.taylorfrancis.com/books/edit/10.1201/b11503/lactic-acid-bacteria-sampo-lahtinen-arthur-ouwehand-seppo-salminen-atte-von-wright

[19] KAZATELOVÁ, Marie. Produkty metabolismu bakterií mléčného kvašení a antimikrobiální aktivitou. *Bulletin potravinárskeho výskumu (Bulletin of Food Research)* [online]. 2003, **42**(1–2), 67–73. Dostupné z: https://www.vup.sk/en/index.php?mainID=2&navID=34&version=1&volume=42&article=684

[20] *Učebnice - tabulky* [online]. [vid. 2023-04-22]. Dostupné z: https://ach.upol.cz/ucebnice/tab8.htm

[21] IBRAHIM, Salam A., Hong YANG a Chung W. SEO. Antimicrobial activity of lactic acid and copper on growth of Salmonella and Escherichia coli O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. *Food Chemistry* [online]. 2008, **109**(1), 137–143. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2007.12.035

[22] NILSSON, L., H. H. HUSS a L. GRAM. Inhibition of Listeria monocytogenes on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1997, **38**(2–3), 217–227. ISSN 0168-1605. Dostupné z: doi:10.1016/s0168-1605(97)00111-6

[23] ZACHAROF, M. P. a R. W. LOVITT. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia* [online]. 2012, **2**, 3rd International Conference on Biotechnology and Food Science (ICBFS 2012), April 7-8, 2012, 50–56 [vid. 2022-04-18]. ISSN 2212-6708. Dostupné z: doi:10.1016/j.apcbee.2012.06.010

[24] HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, Juan Carlos, Abigail MARTÍNEZ-TAPIA, Gebim LAZCANO-HERNÁNDEZ, Blanca Estela GARCÍA-PÉREZ a Nayeli Shantal CASTREJÓN-JIMÉNEZ. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. A Powerful Alternative as Antimicrobials, Probiotics, and Immunomodulators in Veterinary Medicine. *Animals: an open access journal from MDPI* [online]. 2021, **11**(4), 979. ISSN 2076-2615. Dostupné z: doi:10.3390/ani11040979

[25] SHIN, J.m., J.w. GWAK, P. KAMARAJAN, J.c. FENNO, A.h. RICKARD a Y.l. KAPILA. Biomedical applications of nisin. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2016, **120**(6), 1449–1465 [vid. 2022-05-02]. ISSN 1365-2672. Dostupné z: doi:10.1111/jam.13033

[26] COOPER, Lisa E., Bo LI a Wilfred A. van der DONK. 5.08 - Biosynthesis and Mode of Action of Lantibiotics. In: Hung-Wen (Ben) LIU a Lew MANDER, ed. *Comprehensive Natural Products II* [online]. Oxford: Elsevier, 2010 [vid. 2023-04-01], s. 217–256. ISBN 978-0-08-045382-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-008045382-8.00116-7

[27] *Safety of nisin (E 234) as a food additive in the light of new toxicological data and the proposed extension of use | EFSA* [online]. [vid. 2022-06-23]. Dostupné z: https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5063

[28] MOGOŞANU, George Dan, Alexandru Mihai GRUMEZESCU, Cornelia BEJENARU a Ludovic Everard BEJENARU. 11 - Natural products used for food preservation. In: Alexandru Mihai GRUMEZESCU, ed. *Food Preservation* [online]. B.m.: Academic Press, 2017 [vid. 2022-06-13], Nanotechnology in the Agri-Food Industry, s. 365–411. ISBN 978-0-12-804303-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-804303-5.00011-0

[29] DOBSON, Alleson, Fiona CRISPIE, Mary C. REA, Orla O'SULLIVAN, Pat G. CASEY, Peadar G. LAWLOR, Paul D. COTTER, Paul ROSS, Gillian E. GARDINER a Colin HILL. Fate and efficacy of lacticin 3147-producing Lactococcus lactis in the mammalian gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. 2011, **76**(3), 602–614 [vid. 2023-04-12]. ISSN 0168-6496. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01069.x

[30] DEEGAN, L. H., P. D. COTTER, C. HILL a P. ROSS. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International dairy journal* [online]. 2006 [vid. 2022-06-13]. ISSN 0958-6946. Dostupné z: http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.026

[31] RYAN, M P, M C REA, C HILL a R P ROSS. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of Lactococcus lactis producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1996, **62**(2), 612–619 [vid. 2023-04-07]. Dostupné z: doi:10.1128/aem.62.2.612-619.1996

[32] DA SILVA SABO, Sabrina, Michele VITOLO, José Manuel Domínguez GONZÁLEZ a Ricardo Pinheiro de Souza OLIVEIRA. Overview of Lactobacillus plantarum as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International* [online]. 2014, **64**, 527–536 [vid. 2023-04-04]. ISSN 0963-9969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2014.07.041

[33] GONZÁLEZ, B, P ARCA, B MAYO a J E SUÁREZ. Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a Lactobacillus plantarum strain of dairy origin. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1994, **60**(6), 2158–2163 [vid. 2023-04-05]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC201617/

[34] RODRÍGUEZ, Juan M., María I. MARTÍNEZ a Jan KOK. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2002, **42**(2), 91–121. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408690290825475

[35] CUI, Yanhua, Chao ZHANG, Yunfeng WANG, John SHI, Lanwei ZHANG, Zhongqing DING, Xiaojun QU a Hongyu CUI. Class IIa Bacteriocins: Diversity and New Developments. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2012, **13**(12), 16668–16707 [vid. 2023-03-31]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms131216668

[36] ACUÑA, Leonardo, Roberto MORERO a Augusto BELLOMIO. Development of Wide-Spectrum Hybrid Bacteriocins for Food Biopreservation. *Food and Bioprocess Technology* [online]. 2011, **4**, 1029–1049. Dostupné z: doi:10.1007/s11947-010-0465-7

[37] ESPITIA, P. J. P., C. G. OTONI a N. F. F. SOARES. Chapter 36 - Pediocin Applications in Antimicrobial Food Packaging Systems. In: Jorge BARROS-VELÁZQUEZ, ed. *Antimicrobial Food Packaging* [online]. San Diego: Academic Press, 2016 [vid. 2022-06-13], s. 445–454. ISBN 978-0-12-800723-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800723-5.00036-X

[38] SPEELMANS, Gea, Adrianus VRIESEMA a Simone OOLHORST. Pediocin-producing pediococci [online]. US20060165661A1. 27. červenec 2006. [vid. 2023-03-28]. Dostupné z: https://patents.google.com/patent/US20060165661A1/en

[39] CHEIKHYOUSSEF, Ahmad, Natascha POGORI, Wei CHEN a Hao ZHANG. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: From production to their application. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2008, **125**(3), 215–222 [vid. 2023-03-23]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.012

[40] YILDIRIM, Z., D. K. WINTERS a M. G. JOHNSON. Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B produced by Bifidobacterium bifidum NCFB 1454. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 1999, **86**(1), 45–54. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00629.x

[41] SARKAR, Amrita a Santanu MANDA. *Bifidobacteria—Insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action | Elsevier Enhanced Reader* [online]. 23. únor 2016 [vid. 2023-03-23]. Dostupné z: doi:10.1016/j.micres.2016.07.001

[42] MAHDI, L. H. IMMUNOMODULATORY OF Bifidobacterium breve AND INHIBITORY EFFECT OF BIFIDOBREVICIN -LHM ON Streptococcus agalactiae AND ITS β-HEMOLYSIN. *IRAQI JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES* [online]. 2017, **48**(Special) [vid. 2023-03-24]. ISSN 2410-0862. Dostupné z: doi:10.36103/ijas.v48iSpecial.257

[43] MAHDI, Likaa, Ibtesam AUDA, Istabreq MUHAMMED ALI SALMAN, Luma AL-SAADI a Luma ZWAIN. Antibacterial activity of a novel characterized and purified bacteriocin extracted from Bifidobacterium adolescentis. *Reviews in Medical Microbiology* [online]. 2018, **29**. Dostupné z: doi:10.1097/MRM.0000000000000128

[44] CLEVELAND, J., T.J. MONTVILLE a Michael CHIKINDAS. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, **7**, 11–20.

[45] RAMMELSBERG, M., E. MÜLLER a F. RADLER. Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from Lactobacillus casei. *Archives of Microbiology* [online]. 1990, **154**(3), 249–252 [vid. 2023-04-05]. ISSN 1432-072X. Dostupné z: doi:10.1007/BF00248963

[46] KAŠKONIENĖ, Vilma, Mantas STANKEVIČIUS, Kristina BIMBIRAITĖ-SURVILIENĖ, Gintarė NAUJOKAITYTĖ, Loreta ŠERNIENĖ, Kristina MULKYTĖ, Mindaugas MALAKAUSKAS a Audrius MARUŠKA. Current state of purification, isolation and analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2017, **101**(4), 1323–1335. ISSN 1432-0614. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-017-8088-9

[47] CHIKINDAS, M. L., J. NOVÁK, A. J. DRIESSEN, W. N. KONINGS, K. M. SCHILLING a P. W. CAUFIELD. Mutacin II, a bactericidal antibiotic from Streptococcus mutans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 1995, **39**(12), 2656–2660. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.39.12.2656

[48] LEER, R. J., J. M. VAN DER VOSSEN, M. VAN GIEZEN, J. M. VAN NOORT a P. H. POUWELS. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus. *Microbiology (Reading, England)* [online]. 1995, **141 (Pt 7)**, 1629–1635. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/13500872-141-7-1629

[49] NISSEN-MEYER, J., P. ROGNE, C. OPPEGARD, H. S. HAUGEN a P. E. KRISTIANSEN. *Structure-Function Relationships of the Non-Lanthionine-Containing Peptide (class II) Bacteriocins Produced by Gram-Positive Bacteria* [online]. 2009 [vid. 2022-06-25]. Dostupné z: doi:10.2174/138920109787048661

[50] JOERGER, M. C. a T. R. KLAENHAMMER. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by Lactobacillus helveticus 481. *Journal of Bacteriology* [online]. 1986, **167**(2), 439–446. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/jb.167.2.439-446.1986

[51] ABEE, T, T R KLAENHAMMER a L LETELLIER. Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by Lactobacillus johnsonii that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1994, **60**(3), 1006–1013 [vid. 2022-06-25]. Dostupné z: doi:10.1128/aem.60.3.1006-1013.1994

[52] DA COSTA, Roger J., Flávia L. S. VOLOSKI, Rafael G. MONDADORI, Eduarda H. DUVAL a Ângela M. FIORENTINI. Preservation of Meat Products with Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. *Journal of Food Quality* [online]. 2019, **2019**, e4726510 [vid. 2022-05-02]. ISSN 0146-9428. Dostupné z: doi:10.1155/2019/4726510

[53] BRURBERG, M. B., I. F. NES a V. G. EIJSINK. Pheromone-induced production of antimicrobial peptides in Lactobacillus. *Molecular Microbiology* [online]. 1997, **26**(2), 347–360. ISSN 0950-382X. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2958.1997.5821951.x

[54] Biosynthesis and Potential Applications of Bacteriocins. *Journal of Pure and Applied Microbiology* [online]. 26. leden 2021 [vid. 2022-05-03]. Dostupné z: https://microbiologyjournal.org/biosynthesis-and-potential-applications-of-bacteriocins/

[55] COTTER, Paul D., R. Paul ROSS a Colin HILL. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews. Microbiology* [online]. 2013, **11**(2), 95–105. ISSN 1740-1534. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro2937

[56] ROSS, R. Paul, S. MORGAN a C. HILL. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2002, **79**(1–2), 3–16. ISSN 0168-1605. Dostupné z: doi:10.1016/s0168-1605(02)00174-5

[57] DICKS, L. M. T., T. D. J. HEUNIS, D. A. VAN STADEN, A. BRAND, K. Sutyak NOLL a M. L. CHIKINDAS. Medical and Personal Care Applications of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. In: Djamel DRIDER a Sylvie REBUFFAT, ed. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications* [online]. New York, NY: Springer, 2011 [vid. 2022-06-27], s. 391–421. ISBN 978-1-4419-7692-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4419-7692-5_19

[58] FERNANDES, Abigail a Renitta JOBBY. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their potential clinical applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. 2022 [vid. 2022-06-14]. ISSN 1559-0291. Dostupné z: doi:10.1007/s12010-022-03870-3

[59] ZOU, Jiong, Han JIANG, Hui CHENG, Jiehong FANG a Guangrong HUANG. Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, **117**, 781–789 [vid. 2022-06-08]. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.05.233

[60] DESMARCHELIER, P. a N. FEGAN. ESCHERICHIA COLI. In: Hubert ROGINSKI, ed. *Encyclopedia of Dairy Sciences* [online]. Oxford: Elsevier, 2002 [vid. 2022-12-21], s. 948–954. ISBN 978-0-12-227235-6. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-227235-8/00158-9

[61] *Escherichia coli | Wickham Micro* [online]. [vid. 2022-12-22]. Dostupné z: https://wickhammicro.co.uk/knowledge-and-education/escherichia-coli

[62] BUCKLE, Jane. Chapter 7 - Infection. In: Jane BUCKLE, ed. *Clinical Aromatherapy (Third Edition)* [online]. St. Louis: Churchill Livingstone, 2015 [vid. 2022-12-22], s. 130–167. ISBN 978-0-7020-5440-2. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-7020-5440-2.00007-3

[63] JÍLEK, Petr, Vladimír BUCHTA, Petra KUBANOVÁ a Miroslav FÖRSTL. *Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví* [online]. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2002 [vid. 2023-04-06]. ISBN 80-246-0459-0. Dostupné z: https://ipac.svkkl.cz/arl-kl/cs/detail-kl_us_cat-c287663-uvod-do-mikrobiologickych-vysetrovacich-metod-ve-zdravotnictvi/

[64] VENIL, Chidambaram Kulandaisamy. An Insightful Overview on Microbial Pigment, Prodigiosin. 2009, **5**.

[65] GARGALLO-VIOLA, D. Enzyme polymorphism, prodigiosin production, and plasmid fingerprints in clinical and naturally occurring isolates of Serratia marcescens. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 1989, **27**(5), 860–868 [vid. 2022-12-21]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC267444/

[66] *Micrococcus luteus | Wickham Micro* [online]. [vid. 2022-12-22]. Dostupné z: https://wickhammicro.co.uk/knowledge-and-education/micrococcus-luteus

[67] BENJAMIN, Prof. Sailas, Y SUREKHA, Sarath MOOLAKKARIYIL a Pradeep S. Micrococcus luteus Strain BAA2, A Novel Isolate Produces Carotenoid Pigment. *Electronic Journal of Biology*. 2016, **12**, 83–89.

[68] NETZER, Roman, Marit H. STAFSNES, Trygve ANDREASSEN, Audun GOKSØYR, Per BRUHEIM a Trygve BRAUTASET. Biosynthetic Pathway for γ-Cyclic Sarcinaxanthin in Micrococcus luteus: Heterologous Expression and Evidence for Diverse and Multiple Catalytic Functions of C50 Carotenoid Cyclases. *Journal of Bacteriology* [online]. 2010, **192**(21), 5688–5699 [vid. 2022-12-21]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.00724-10

[69] OTTO, Michael. Staphylococcus epidermidis — the „accidental" pathogen. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2009, **7**(8), 555–567 [vid. 2022-12-21]. ISSN 1740-1534. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro2182

[70] ZIEBUHR, Wilma, Susanne HENNIG, Martin ECKART, Hennes KRÄNZLER, Christoph BATZILLA a Svetlana KOZITSKAYA. Nosocomial infections by Staphylococcus epidermidis: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 2006, **28**, Proceedings of the 9th International Symposium on Urinary Tract Infection held during the 24th International Congress of Chemotherapy 4-6 June 2005 in Manila, The Philippines, 14–20 [vid. 2022-12-22]. ISSN 0924-8579. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.05.012

[71] BALOUIRI, Mounyr, Moulay SADIKI a Saad Koraichi IBNSOUDA. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 2016, **6**(2), 71–79 [vid. 2022-06-08]. ISSN 2095-1779. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005

[72] CZEKANSKA, Ewa M. Assessment of Cell Proliferation with Resazurin-Based Fluorescent Dye. In: Martin J. STODDART, ed. *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2011 [vid. 2023-04-15], Methods in Molecular Biology, s. 27–32. ISBN 978-1-61779-108-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-108-6_5

[73] AlamarBlue™ Cell Viability Reagent. *Thermo Fisher Scientific* [online]. [vid. 2023-04-15]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/DAL1025

[74] ZARE, Mohammadreza, Mehdi Mohammad AMIN a Mahnaz NIKAEEN. Resazurin reduction assay, a useful tool for assessment of heavy metal toxicity in acidic conditions [online]. 2015. Dostupné z: doi:10.1007/s10661-015-4392-y

[75] Resazurin sodium salt. *Thermo Fisher Scientific* [online]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/B21187.06

[76] HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry* [online]. 1972, **48**(2), 422–427 [vid. 2023-03-23]. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(72)90094-2

[77] MÁROVÁ, Ivana a Dana VRÁNOVÁ. *Praktikum z biochemie - Pracovní sešit*. B.m.: Fakulta chemická VUT v Brně. inovace 2016

[78] BUBONJA-ŠONJE, Marina, Samira KNEŽEVIĆ a Maja ABRAM. Challenges to Antimicrobial Susceptibility Testing of Plant-derived Polyphenolic Compounds. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* [online]. 2020, **71**(4), 300–311 [vid. 2023-04-05]. ISSN 0004-1254. Dostupné z: doi:10.2478/aiht-2020-71-3396

[79] *Praktikum z mikrobiologie - Pracovní sešit*, Fakulta chemická VUT v Brně

[80] VAŠKŮ, Barbora. *Testování faktorů ovlivňujících stabilitu a spotřebitelskou přijatelnost nálevu z kysaného zelí* [online]. Brno, 2022. Dostupné z: https:/www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139332. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová

[81] ZHANG, Jianming, Yanyan YANG, Hui YANG, Yushan BU, Huaxi YI, Lanwei ZHANG, Xue HAN a Lianzhong AI. Purification and Partial Characterization of Bacteriocin Lac-B23, a Novel Bacteriocin Production by Lactobacillus plantarum J23, Isolated From Chinese Traditional Fermented Milk. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2018, **9**, 2165 [vid. 2023-04-01]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2018.02165

[82] GÄNZLE, Michael G. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science* [online]. 2015, **2**, Food Microbiology • Functional Foods and Nutrition, 106–117 [vid. 2023-05-08]. ISSN 2214-7993. Dostupné z: doi:10.1016/j.cofs.2015.03.001

8 PŘÍLOHY

Příloha 1: Agarové difúzní testy

Tabulka 7: Přehled antimikrobiální aktivity izolátu z *L.acidophilus* proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím při zvolených koncentracích (měření inhibičních zón v cm)

	antimikrobiální aktivita izolátu z *L.acidophilus*			**antimikrobiální aktivita izolátu z *L.acidophilus***	
c [mg/ml]	***S.epidermidis***	***E.coli***	**c [mg/ml]**	***S.marcescens***	***M.luteus***
800,0	+++	+++	1300,0	++	++
400,0	+	+++	650,0	++	+
200,0	+	++	325,0	+	+
100,0	+	++	162,5	+	+
ethanol (70 %)	-	++	ethanol (70 %)	+	+

(Měření inhibičních zón: 0,0-0,6 cm: -; 0,6-0,8 cm: +; 0,8-1,0 cm: ++; 1,0-1,2 cm: +++)

Tabulka 8: Přehled antimikrobiální aktivita izolátu z *L.planatarum* proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím při zvolených koncentracích (měření inhibičních zón v cm)

	antimikrobiální aktivita izolátu z *L.plantarum*			**antimikrobiální aktivita izolátu z *L.plantarum***	
c [mg/ml]	***S. epidermidis***	***E.coli***	**c [mg/ml]**	***S.marcescens***	***M.luteus***
800,0	++	+++	1300,0	-	-
400,0	+	++	650,0	-	-
200,0	+	+	325,0	-	-
100,0	+	+	162,5	-	-
ethanol (70 %)	-	++	ethanol (70 %)	-	-

(Měření inhibičních zón: 0,0-0,6 cm: -; 0,6-0,8 cm: +; 0,8-1,0 cm: ++; 1,0-1,2 cm: +++)

Tabulka 9: Přehled antimikrobiální aktivity izolátu z *L.casei* proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím při zvolených koncentracích (měření inhibičních zón v cm)

	antimikrobiální aktivita izolátu z *L.casei*			**antimikrobiální aktivita izolátu z *L.casei***	
c [mg/ml]	**S. epidermidis**	**E.coli**	**c [mg/ml]**	***S.marcescens***	***M.luteus***
800,0	+++	+++	1300,0	++	+
400,0	++	++	650,0	++	+
200,0	++	+	325,0	+	-
100,0	++	+	162,5	+	-
ethanol (70 %)	+	+	ethanol (70 %)	+	-

(Měření inhibičních zón: 0,0-0,6 cm: -; 0,6-0,8 cm: +; 0,8-1,0 cm: ++; 1,0-1,2 cm: +++)

Tabulka 10: Přehled antimikrobiální aktivity izolátu z *B.breve* proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím při zvolených koncentracích (měření inhibičních zón v cm)

	antimikrobiální aktivita izolátu z *B.breve*			**antimikrobiální aktivita izolátu z *B.breve***	
c [mg/ml]	***S. epidermidis***	***E.coli***	**c [mg/ml]**	***S.marcescens***	***M.luteus***
800,0	+++	+++	1300,0	-	++
400,0	++	++	650,0	-	+
200,0	++	+	325,0	-	+
100,0	++	+	162,5	-	+
ethanol (70 %)	+	+	ethanol (70 %)	-	+

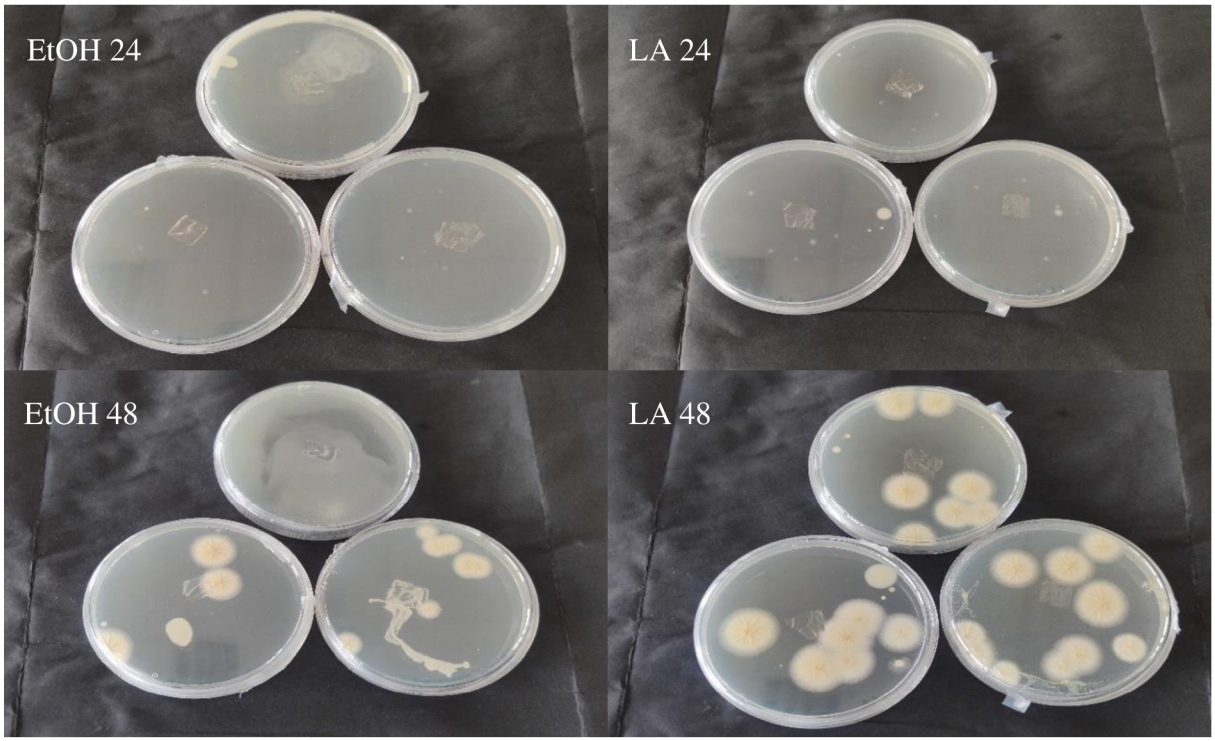
(Měření inhibičních zón: 0,0-0,6 cm: -; 0,6-0,8 cm: +; 0,8-1,0 cm: ++; 1,0-1,2 cm: +++)

Tabulka 11: Přehled inhibiční aktivity izolátu z *P. acidilactici* proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím při zvolených koncentracích (měření inhibičních zón v cm)

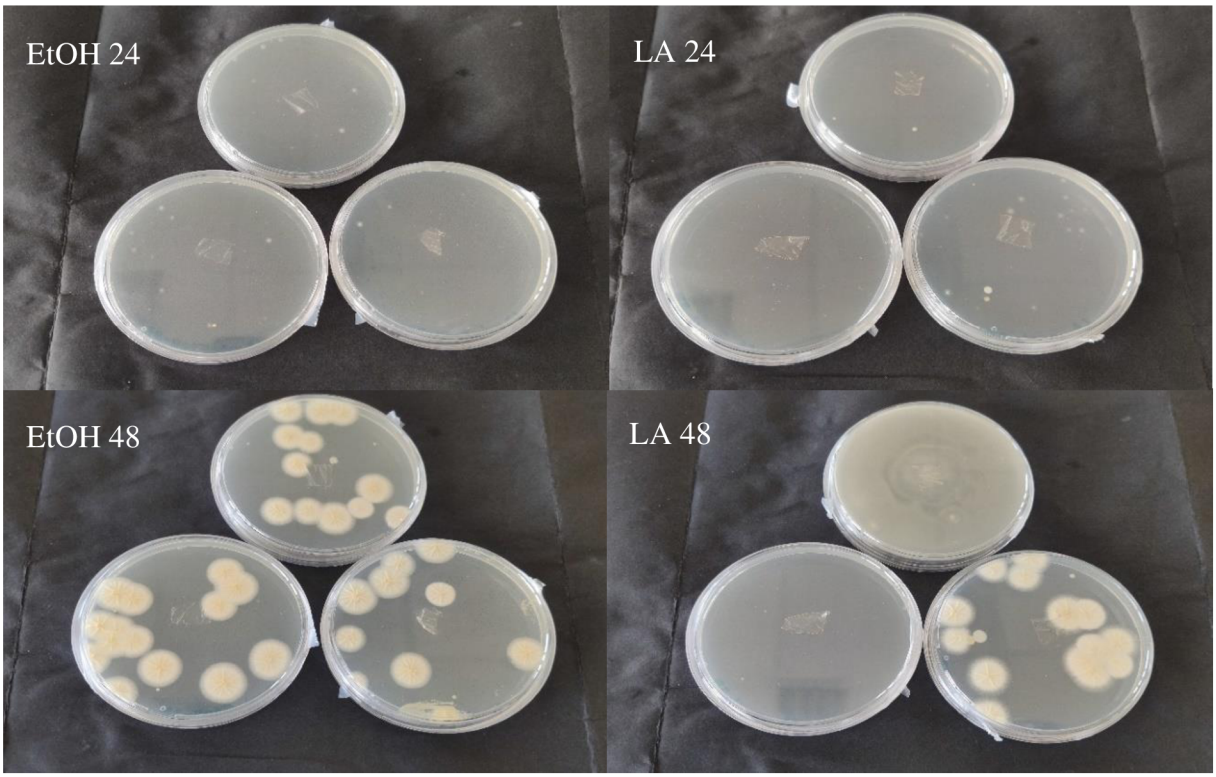
	inhibiční aktivita izolátu z *P.acidilactici*			**inhibiční aktivita izolátu z *P.acidilactici***	
c [mg/ml]	***S. epidermidis***	***E.coli***	**c [mg/ml]**	***S.marcescens***	***M.luteus***
800,0	++	++	1300,0	-	-
400,0	+	++	650,0	++	-
200,0	+	+	325,0	-	-
100,0	+	+	162,5	-	-
ethanol (70 %)	+	+	ethanol (70 %)	-	-

(Měření inhibičních zón: 0,0-0,6 cm: -; 0,6-0,8 cm: +; 0,8-1,0 cm: ++; 1,0-1,2 cm: +++)

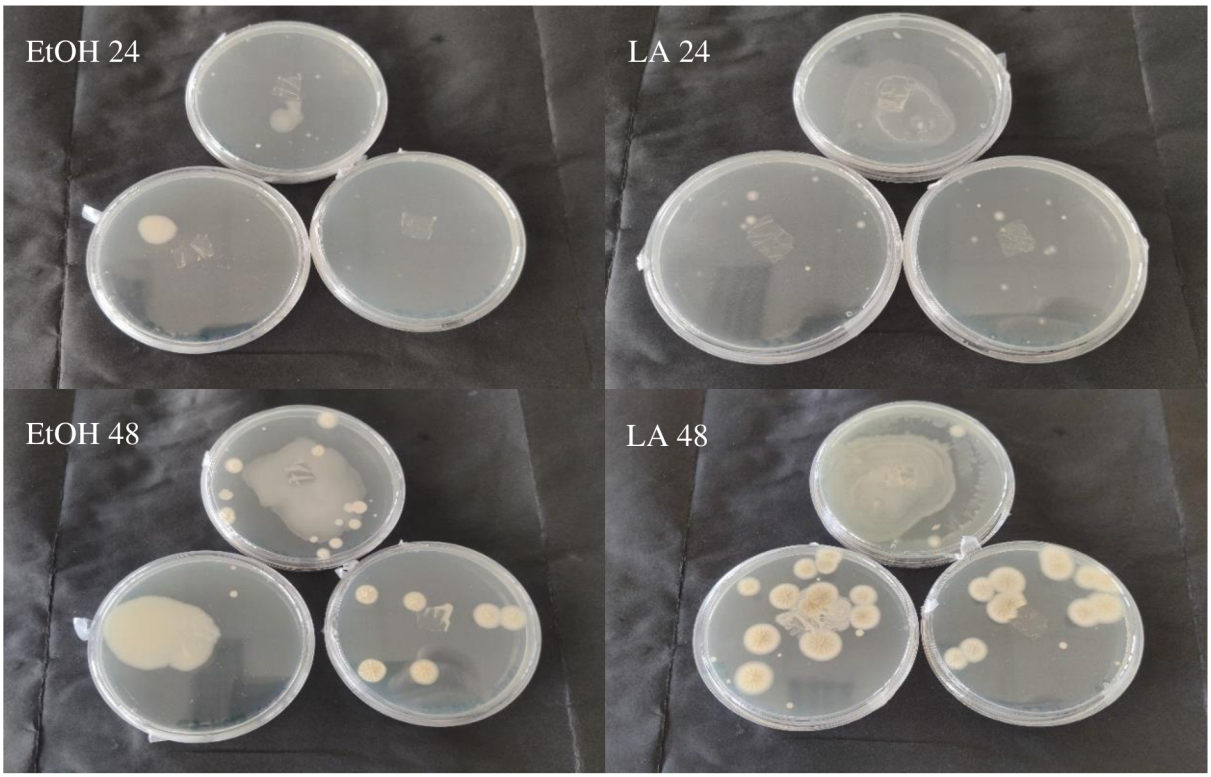
Příloha 2: Stanovení mikrobiální kontaminace



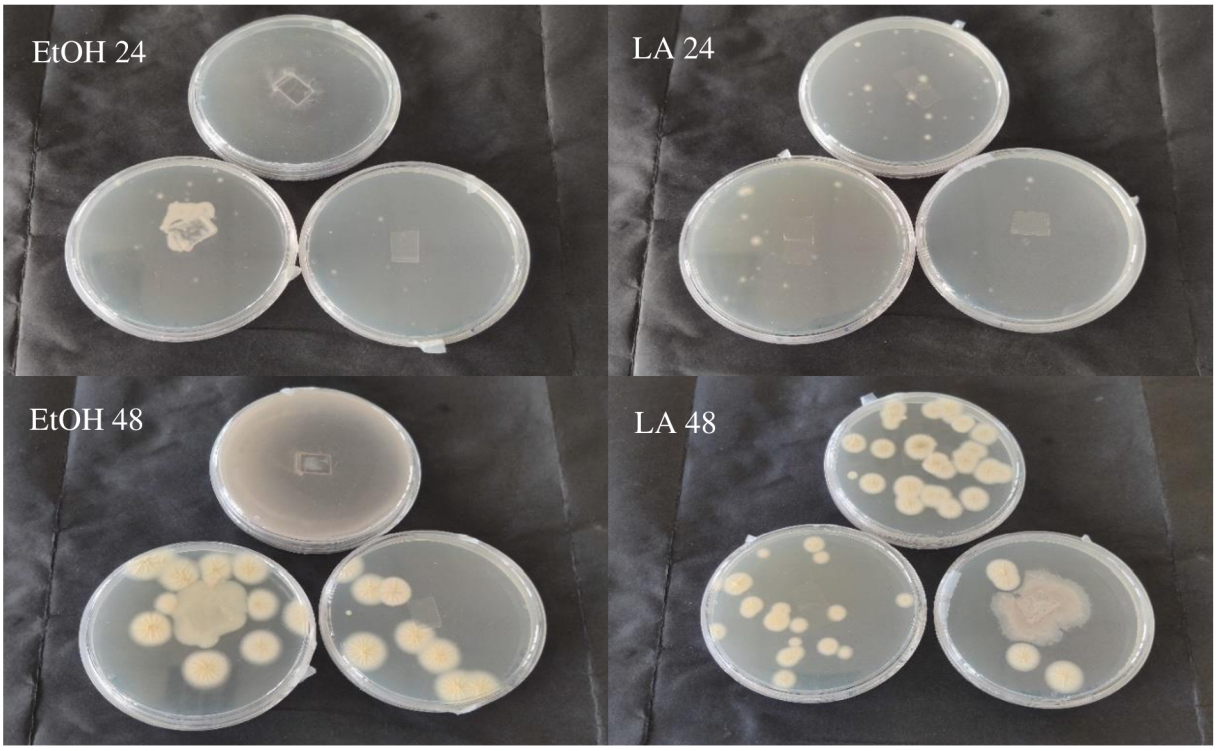
Obrázek 13: Nárůst kontaminujících mikroorganismů na agarových miskách se vzorkem č.2 (po 24hodinové a 48hodinové kultivaci, EtOH-ethanol, LA-izolát z *L. acidophilus*)



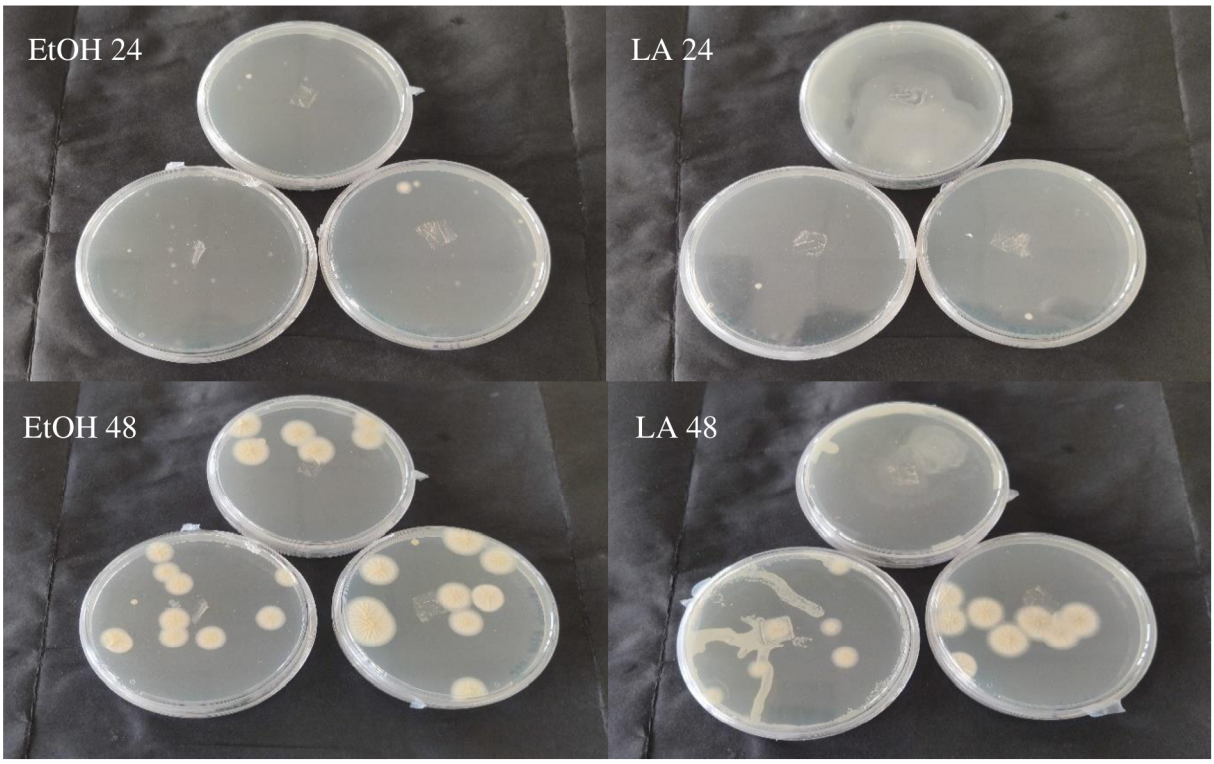
Obrázek 14: Nárůst kontaminujících mikroorganismů na agarových miskách se vzorkem č.3 (po 24hodinové a 48hodinové kultivaci, EtOH-ethanol, LA-izolát z *L. acidophilus*)



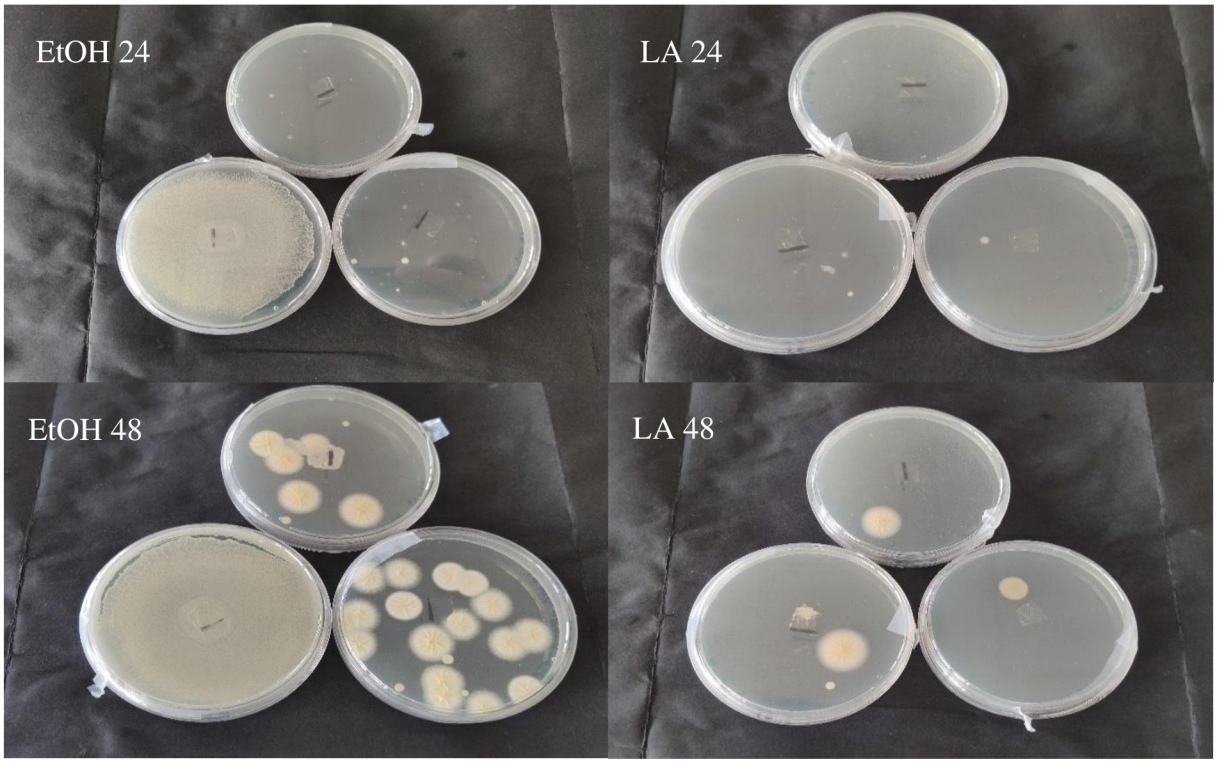
Obrázek 15: Nárůst kontaminujících mikroorganismů na agarových miskách se vzorkem č.6 (po 24hodinové a 48hodinové kultivaci, EtOH-ethanol, LA-izolát z *L. acidophilus*)



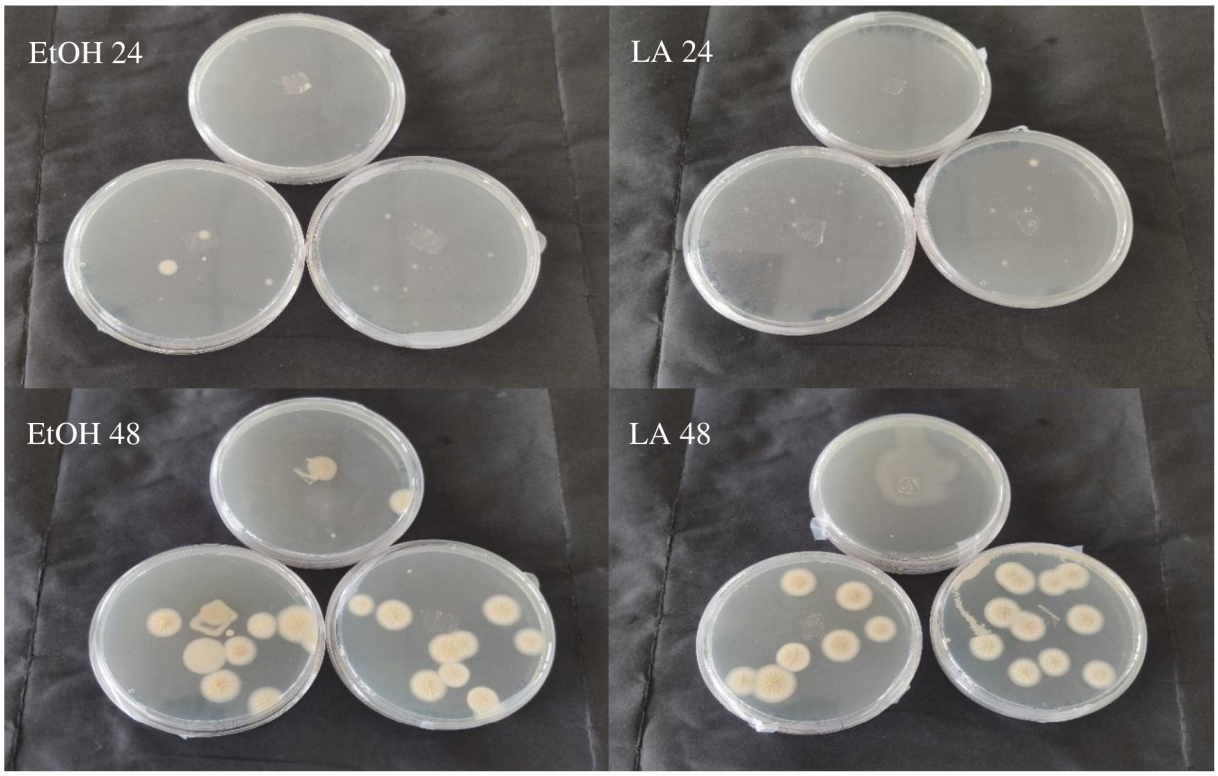
Obrázek 16: Nárůst kontaminujících mikroorganismů na agarových miskách se vzorkem č.10 (po 24hodinové a 48hodinové kultivaci, EtOH-ethanol, LA-izolát z *L. acidophilus*)



Obrázek 17: Nárůst kontaminujících mikroorganismů na agarových miskách se vzorkem č.11 (po 24hodinové a 48hodinové kultivaci, EtOH-ethanol, LA-izolát z *L. acidophilus*)



Obrázek 18: Nárůst kontaminujících mikroorganismů na agarových miskách se vzorkem č.13 (po 24hodinové a 48hodinové kultivaci, EtOH-ethanol, LA-izolát z *L. acidophilus*)



Obrázek 19: Nárůst kontaminujících mikroorganismů na agarových miskách se vzorkem č.14 (po 24hodinové a 48hodinové kultivaci, EtOH-ethanol, LA-izolát z *L. acidophilus*)