

Produkce bakteriocinů izolovanými bakteriemi mléčného kvašení

Bc. Jana Vančuříková

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana VANČUŘÍKOVÁ**
Osobní číslo: **T08825**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Produkce bakteriocinů izolovanými bakteriemi mléčného kvašení**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika bakterií mléčného kvašení.
2. Bakteriociny bakterií mléčného kvašení.
3. Metody stanovení produkce bakteriocinů bakteriemi mléčného kvašení.

II. Praktická část

1. Izolace a identifikace bakterií mléčného kvašení.
2. Stanovení produkce bakteriocinů bakteriemi mléčného kvašení metodou PCR



Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] SALMINEN, S., VON WRIGHT, A., OUWEHAND, A. Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects. 3. ed, New York, U.S.A. 2004. 633 s. ISBN 0-8247-5332-1.

[2] RILEY, M.A., GILLOR, O. Bacteriocins, Current Research and Applications. Norfolk, U.K.: Horizon Bioscience, 2007. 218 s. ISBN-10 1-904933-23-8.

[3] RODRÍGUEZ, J.M., MARTÍNEZ, M.I., HORN, N., DODD, H.M. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology 80, 2003. s. 101-116.

[4] CLEVELAND, J., MONTVILLE, T.J., NES, I.F., CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology 71, 2001. s. 1-20.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Zuzana Vaňátková

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

4. ledna 2010

Termín odevzdání diplomové práce:

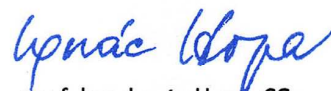
19. května 2010

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.

děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.

ředitel ústavu

Příjmení a jméno: VANČUŘÍKOVÁ JANA

Obor: CHTP/THÉVP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Cílem této práce byla izolace a identifikace bakterií mléčného kvašení ze zakysané smetany, biojogurtů a klobás. Dále se tato práce zaměřila na charakteristiku bakteriocinů a následné stanovení produkce bakteriocinů izolovanými bakteriemi. Identifikace izolovaných bakterií mléčného kvašení byla provedena z morfologického, fyziologického a biochemického hlediska a správnost byla následně ověřena sekvenací. Stanovení produkce bakteriocinů bylo provedeno metodou PCR a měřením optické hustoty.

Klíčová slova: bakterie mléčného kvašení, bakteriociny, polymerázová řetězová reakce (PCR), pediocin PA-1, thermophilin.

ABSTRACT

The aim of this thesis was isolation and identification of lactic acid bacteria from sour cream, bioyogurts and sausages. Further, this work was focused on characteristics of bacteriocins and subsequent determination of bacteriocins production by isolated bacteria. Identification of isolated lactic acid bacteria was performed on the basis of morphological, physiological and biochemical aspects and then the accuracy was verified by sequencing. Determination of bacteriocin production was performed by PCR and by measuring optical density.

Keywords: lactic acid bacteria, bacteriocins, polymerase chain reaction (PCR), pediocin PA-1, thermophilin.

„90 % projektu spotřebuje 90 % času,
zbývajících 10 % projektu spotřebuje dalších 90 % času“

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Zuzaně Vaňátkové za odborné vedení, poskytnuté rady a čas, který mi věnovala při jejím vypracování. Rovněž chci poděkovat Hance Miklíkové a Olze Haukové za jejich ochotu a vstřícný postoj při práci v laboratoři. Nemalý dík bych věnovala své rodině a přátelům za jejich podporu.

Ráda bych také vyjádřila dík laboratoři molekulárních metod Státního veterinárního ústavu v Praze, která určila přesnou identifikaci mikroorganismů sekvenací.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	8
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 CHARAKTERISTIKA BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	10
1.1 TAXONOMIE BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	10
1.1.1 Probiotika	11
1.2 DĚLENÍ BMK	11
1.3 MLÉČNÉ KVAŠENÍ.....	11
1.4 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH RODŮ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	13
1.4.1 Rod <i>Streptococcus</i>	13
1.4.2 Rod <i>Pediococcus</i>	15
1.4.3 Rod <i>Lactobacillus</i>	16
1.4.4 Rod <i>Enterococcus</i>	17
1.4.5 Rod <i>Lactococcus</i>	18
2 BAKTERIOCINY BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	20
2.1 BAKTERIOCINY VS. ANTIBIOTIKA	20
2.2 KLASIFIKACE BAKTERIOCINŮ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	21
2.2.1 Třída I - Lantibiotika	21
2.2.2 Třída II.....	22
2.2.3 Třída III	22
2.2.4 Třída IV	22
2.3 MECHANIZMUS PŮSOBENÍ	23
2.4 BAKTERIOCINY <i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i>	23
2.4.1 Thermophilin 13.....	24
2.5 BAKTERIOCINY PEDIOKOKŮ.....	24
2.6 BAKTERIOCINY ENTEROKOKŮ.....	25
2.7 BAKTERIOCIN <i>LACTOBACILLUS RHAMNOSUS</i>	26
2.8 BAKTERIOCIN <i>LACTOBACILLUS CASEI</i>	26
2.9 NIZIN.....	26
2.9.1 Varianty nizinu	27
2.9.2 Faktory ovlivňující produkci nizinu	27
2.9.3 Mechanismus antimikrobiálního působení nizinu	27
2.10 METODY STANOVENÍ PRODUKCE BAKTERIOCINŮ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	27

3	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE.....	29
3.1	DŮLEŽITÁ ZÁKLADNÍ FAKTA PCR	30
3.2	VARIANTY A MODIFIKACE PCR	33
3.3	FRAKCIONACE DNA POMOCÍ AGARÓZOVÉ GELOVÉ ELEKTROFORÉZY	34
3.3.1	Etidiumbromid	34
3.3.2	Postup při agarózové gelové elektroforéze	35
4	CÍL PRÁCE	36
II	PRAKTICKÁ ČÁST	37
5	IZOLACE A IDENTIFIKACE BMK, STANOVENÍ PRODUKCE BAKTERIOCINŮ	38
5.1	MATERIÁL	38
5.1.1	Sbírkové mikroorganismy	38
5.1.2	Vyizolované mikroorganismy	38
5.1.3	Kultivační média a roztoky	40
5.1.4	Činidla pro zjištění redukce dusičnanů	43
5.1.5	Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu	43
5.1.6	Chemikálie a biochemické testy.....	44
5.1.7	Komponenty pro PCR	45
5.1.8	Přístroje a pomůcky.....	45
5.2	METODIKA PRÁCE	47
5.2.1	Izolace bakterií mléčného kvašení	47
5.2.2	Identifikace BMK z morfoloického, fyzioloického a biochemického hlediska	47
5.2.3	Identifikace BMK sekvenací.....	50
5.2.4	Izolace DNA fenol-chloroformovou extrakcí	51
5.2.5	Důkaz produkce bakteriocinů izolovanými BMK metodou PCR.....	52
5.2.6	Stanovení produkce bakteriocinů izolovanými BMK měřením optické denzity	54
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	55
6.1	IZOLACE A IDENTIFIKACE BMK.....	55
6.1.1	Charakteristika izolátů z morfoloického, fyzioloického a biochemického hlediska	55
6.2	IDENTIFIKACE BMK SEKVENACÍ.....	65
6.3	IZOLACE DNA FENOL – CHLOROFORMOVOU EXTRAKCÍ.....	67
6.4	DETEKCE GENŮ PRO BAKTERIOCINY U IZOLOVANÝCH BMK METODOU PCR.....	69
6.4.1	Detekce genu pro thermophilin 13 u kmenů <i>Streptococcus thermophilus</i>	69
6.4.2	Detekce genu pro bakteriocin PA-1 u kmenů <i>Pediococcus pentosaceus</i>	70
6.5	STANOVENÍ PRODUKCE BAKTERIOCINŮ IZOLOVANÝMI BMK MĚŘENÍM OPTICKÉ DENZITY	71

ZÁVĚR	74
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	76
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	85
SEZNAM OBRÁZKŮ	87
SEZNAM TABULEK.....	88

ÚVOD

Bakterie mléčného kvašení jsou skupinou příbuzných bakterií, které během fermentace cukrů produkují jako hlavní metabolický produkt kyselinu mléčnou. Vyskytují se jako přirozená mikroflóra v syrovém mléce a využívají se ke kvašení potravin nejméně 4000 let. Jedná se o heterotrofní organizmy vyžadující zpravidla soubor živin (aminokyseliny a vitaminy), neboť postrádají mnoho biosyntetických schopností. Díky tomu jsou bakterie mléčného kvašení obvykle početné jen ve společenstvích, kde tyto nároky mohou být splněny.

Bakterie mléčného kvašení se využívají v potravinářském průmyslu z několika důvodů. Jejich růst snižuje v potravinách jak obsah sacharidů, které zkvašují, tak i pH díky produkci kyseliny mléčné. Tento proces okyselení je jeden z nejvíce žádaných účinků jejich růstu. Hodnota pH může klesnout až na 4,0. Toto pH je dostatečně nízké k inhibici růstu většiny dalších mikroorganismů, včetně nejčastějších lidských patogenů, což umožňuje prodloužit dobu trvanlivosti potravin.

Bakteriociny produkované bakteriemi mléčného kvašení jsou heterogenní skupina antibakteriálních proteinů s různým spektrem účinku, mechanismu působení, molekulární hmotností, genetickým původem a biochemickými vlastnostmi. Produkce antimikrobiálních peptidů, nalezená u různých kmenů, je v první řadě obranná, ale je také součástí přirozené imunity. Někdy bakteriociny účinkují proti specifické skupině konkurenčních mikroorganismů, jindy má jejich obranný mechanismus široké spektrum účinku. Bakteriociny jsou často zaměňovány s antibiotiky, hlavní rozdíl mezi nimi je, že antibiotika nejsou ribozomálně syntetizována. Dále se bakteriociny od antibiotik liší na základě mechanismu působení, antimikrobiálního spektra, toxicity a mechanismu odolnosti.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Bakterie mléčného kvašení zahrnují skupinu bakterií s podobnými morfologickými, metabolickými a fyziologickými vlastnostmi. Obecně jsou bakterie mléčného kvašení definovány jako grampozitivní, katalázanegativní, nesporeující, fakultativně anaerobní, nepohyblivé tyčinky nebo koky, které obsahují v DNA méně než 55 % mol G+C. Hlavním konečným produktem fermentace sacharidů je kyselina mléčná [1, 2, 3, 4, 9, 10, 60, 72].

Bakterie mléčného kvašení jsou používány při výrobě fermentovaných potravin po staletí. Jsou považovány za GRAS (všeobecně uznávané za bezpečné) organizmy a patří mezi nejlépe prostudované. Detailní znalost řady fyziologických vlastností otevřela nové možnosti využití těchto mikroorganismů v potravinářském průmyslu a v posledních letech se staly předmětem zájmu bakteriociny produkované těmito bakteriemi [3, 12].

Oproti mikrobům schopným respirace rostou bakterie mléčného kvašení pomaleji a produkují menší kolonie 2-3 mm díky nízkým energetickým výnosům. Jedná se obecně o mezofilní mikroorganismy, avšak mohou růst v rozmezí teplot od 5 do 45 °C. Bakterie mléčného kvašení jsou tolerantní ke kyselým podmínkám, většina kmenů je schopná růst při pH 4,4. Ovšem růstové optimum těchto bakterií je při pH 5,5 – 6,5. Bakterie mléčného kvašení vyžadují komplex živin jako aminokyseliny, peptidy, nukleotidové báze, vitaminy, sacharidy, minerální látky a mastné kyseliny [4, 5, 60, 72].

1.1 Taxonomie bakterií mléčného kvašení

Použití molekulárně genetických metod k určení příbuznosti bakterií mléčného kvašení souvisejících s potravinami mělo za následek významné změny v jejich taxonomickém zařazení. Během osmdesátých let 20. století byl rod *Streptococcus* rozdělen do tří rodů, a to *Enterococcus*, *Lactococcus* a *Streptococcus*. V současné době skupina bakterií mléčného kvašení zahrnuje následující rody: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc* a *Weissella* [2, 9, 10, 11].

Fylogeneticky jsou grampozitivní bakterie rozděleny do dvou hlavních větví. Všechny výše uvedené rody patří do kmene s nízkým obsahem G+C (< 50 %). Bifidobakterie nepatří mezi bakterie mléčného kvašení, pouze s nimi sdílí podobné fyziologické a biochemické vlastnosti a určitou společnou ekologickou niku, jako např. GIT (gastro-intestinální trakt).

Druhové představitele daných rodů můžeme nalézt v GIT lidí a zvířat a také ve fermentovaných potravinách [9].

1.1.1 Probiotika

Kmeny používané jako probiotika obvykle patří do rodů *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* a *Bifidobacterium*. Předmětem zájmu u probiotických bakterií jsou jejich fyziologické charakteristiky, např. předpoklad přežití v GIT. Zmíněný předpoklad je založen na odolnosti těchto bakterií k nízkému pH a žluči a na jejich teplotním růstovém rozsahu. Tyto schopnosti jsou však z taxonomického hlediska méně důležité [9].

Důležité fyziologické vlastnosti pro taxonomické zařazení jsou typ fermentace sacharidů, odolnost k různým koncentracím NaCl, růst na různých nutričních médiích, růst za definovaných teplot a odolnost vůči antibiotikům. Taxonomie laktobacilů byla po desetiletí založena na těchto fenotypových vlastnostech [9].

Rod *Lactobacillus* je rozmanitý s více než 60 druhy (obsah G+C v rozmezí 33 – 55 % mol) z nichž je asi 1/3 striktně heterofermentativní [11].

1.2 Dělení BMK

Na základě metabolismu sacharidů se bakterie mléčného kvašení dělí na homofermentativní (hlavní a konečný produkt fermentace je kyselina mléčná) a heterofermentativní (kromě kyseliny mléčné vznikají i jiné sloučeniny, např. kyselina octová, CO₂, etanol, aromatické sloučeniny...) [4, 5, 7, 8].

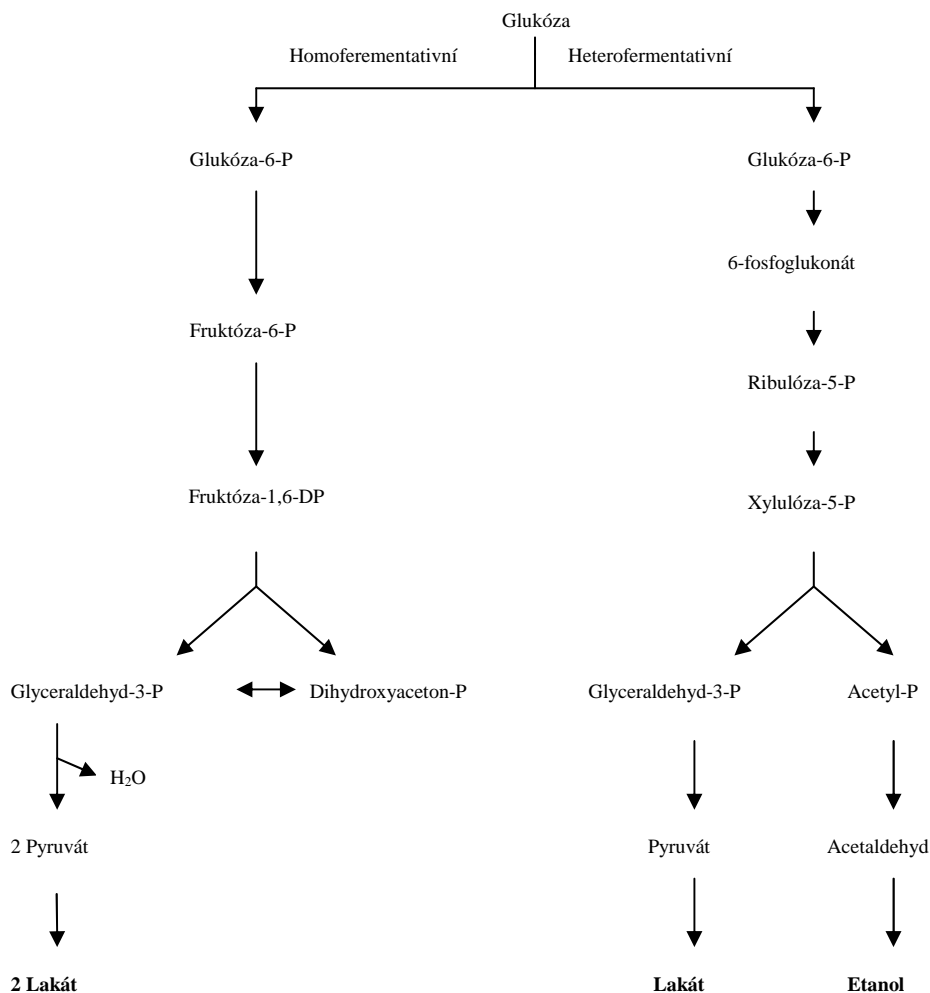
Podle optimální růstové teploty lze bakterie mléčného kvašení rozdělit na mezofilní a termofilní. Mezofilní mají teplotní růstové optimum mezi 20 až 30 °C a termofilní mezi 30 až 45 °C. Není tedy překvapením, že tradiční fermentované výrobky ze subtropických zemí obsahují termofilní bakterie mléčného kvašení, zatímco produkty s mezofilními druhy pochází ze západních a severních zemí Evropy [26].

1.3 Mléčné kvašení

Ochrana potravin fermentací je velmi využívaná prastará výrobní technika. Fermentace nezajišťuje pouze zvýšenou trvanlivost a mikrobiální bezpečnost potravin, ale také činí

některé potraviny lépe stravitelnými, např. v případě manioku jedlého fermentace redukuje toxicitu substrátu [5].

Všechny bakterie mléčného kvašení produkují kyselinu mléčnou z hexóz. Produkovaná kyselina mléčná může být L(+), nebo méně často D(-) izomer, popřípadě směs obou izomerů. Fermentace hexóz probíhá drahami, které jsou rozděleny do dvou skupin na homofermentativní a heterofermentativní fermentaci. Obecné schéma fermentace glukózy bakteriemi mléčného kvašení je znázorněno na Obr. 1 [5, 60]. Kyselina mléčná je hlavní konečný produkt mléčného kvašení, což přispívá ke kyselé chuti, ale ne vůni daného výrobku. Za vůni a chuť fermentovaných mléčných výrobků je zodpovědná kyselina octová, acetaldehyd a diacetyl [8, 72].



Obr. 1. Obecné schéma fermentace glukózy bakteriemi mléčného kvašení [5].

Homofermentativní bakterie mléčného kvašení produkují více než 85 % kyseliny mléčné z glukózy. Fermentují 1 mol glukózy na 2 moly kyseliny mléčné pomocí Embden - Meyerhof - Parnasovy dráhy a tvoří čistý výnos 2 mol ATP na molekulu metabolizované glukózy. Kyselina mléčná je hlavní produkt této fermentace [4, 5, 7, 8].

Hlavní rody homofermentativního kvašení jsou: *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* a některé druhy rodu *Lactobacillus* [5, 7, 8].

Heterofermentativní bakterie mléčného kvašení produkují pouze 50 % kyseliny mléčné z glukózy. Fermentují ekvimolární množství kyseliny mléčné, etanolu a CO₂ pomocí hexóza monofosfátové nebo pentózové dráhy. Jeden mol ATP je vytvořen z 1 molu glukózy, to má za následek horší růst. Na 1 mol metabolizované glukózy totiž tvoří pouze polovinu energie oproti homofermentativním druhům [4, 5, 7, 8].

Mezi zástupce heterofermentativního kvašení patří rody: *Leuconostoc*, *Weissella* a některé druhy rodu *Lactobacillus* [5, 7].

Některé druhy rodu *Lactobacillus* jsou homofermentativní, jiné heterofermentativní a některé jsou schopny využívat oba druhy kvašení [7, 8].

1.4 Charakteristika vybraných rodů bakterií mléčného kvašení

1.4.1 Rod *Streptococcus*

Rod *Streptococcus* byl původně popsán na základě morfologických, fyziologických, sérologických a biochemických charakteristik. To zahrnovalo široký rozsah organismů, včetně vysoce patogenních bakterií *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* a *Streptococcus agalactiae*, dále střevní skupinu D streptokoků *Streptococcus faecalis* a *Streptococcus faecium* a ekonomicky důležitou skupinu N startovacích bakterií *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis* a *Streptococcus thermophilus* [2, 11].

Od poloviny osmdesátých let 20. století bylo provedeno několik hlavních taxonomických změn v tomto rodu. Některé z těchto změn byly zvláště významné pro potravinářské mikrobiology. Během posledních 50 let byly streptokoky rozděleny do 4 hlavních skupin: pyogenní, střevní, viridující a mléčné. Tyto skupiny byly založeny dle tzv. Shermanova schématu, které obecně sloužilo jako základní nástroj pro organizaci druhů streptokoků. V následujících letech byly navrženy a přijaty dvě změny [2, 11].

Nejdříve skupina střevních streptokoků, která zahrnovala *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium* a *Streptococcus durans*, byla přesunuta do nového rodu *Enterococcus*. Poté byly další dva druhy, *Streptococcus lactis* a *Streptococcus cremoris*, uváděné jako „mléčné streptokoky“ přeřazeny do nového rodu *Lactococcus*. *Streptococcus thermophilus* je tedy nyní jediný člen rodu *Streptococcus* využívaný jako startovací mikroorganismus při fermentaci potravin, hlavně v jogurtech a sýrech [2, 11, 14, 17].

Obecně jsou streptokoky grampozitivní, fakultativně anaerobní, nepohyblivé, katalázanegativní mikroorganismy s obligátně homofermentativním metabolismem. Rostou jako lineární řetízky elipsovitých buněk a nejsou schopné růstu při 10 °C, pH 9,6 a 6,5% NaCl. Streptokoky vyžadují komplex nutričních požadavků a daří se jim v prostředí s dobrou zásobou sacharidů a proteinů zahrnujících tkáň a střevní trakt zvířat, mléko, mléčné produkty, zeleninu a další potraviny [2, 11, 30].

Streptococcus thermophilus

Identifikace *Str. thermophilus* je založena na hydrolyze argininu a eskulinu, kyselé fermentaci amygdalinu, celobiózy, inulinu, maltózy, manitolu, rafinózy a N-acetylglukóزامinu a schopnosti růstu při 45 °C [30].

Podobně jako laktokoky je *Str. thermophilus* vysoce adaptabilní v mléčném prostředí, kde rychle fermentuje laktózu a produkuje kyselinu mléčnou homofermentativním kvašením. *Str. thermophilus* má větší optimální růstovou teplotu 40 – 45 °C, větší teplotní maximum (52 °C) i teplotní toleranci nad 60 °C než laktokoky a pod 15 °C tento mikroorganismus neroste. V požadavcích na výživu je *Str. thermophilus* náročnější než laktokoky. *Str. thermophilus* je totiž slabě proteolytický, a proto potřebuje ve svém prostředí i volné aminokyseliny. Aminokyselinové požadavky *Str. thermophilus* jsou splněny výkonností jeho biosyntetické kapacity a spoluprací s dalšími bakteriálními kmeny rostoucími v mléčném prostředí jako je *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Str. thermophilus* je právě s *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve vzájemné symbióze. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* rozkládá kasein na příslušné peptidy a aminokyseliny, které pak ke svému růstu využívá *Str. thermophilus*. *Str. thermophilus* zase tvoří kyselinu mléčnou a mravenčí. Kyselina mléčná sníží pH prostředí na optimum pro růst bakterie *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a kyselina mravenčí její růst stimuluje [6, 73, 74].

Charakteristickými vlastnostmi *Str. thermophilus* jsou také tolerance k NaCl, citlivost ke žluči a omezená metabolická diverzita. Dále na rozdíl od laktokoků obsahuje *Str. thermophilus* málo plazmidů a pokud jsou plazmidy nalezeny, jsou malé a kryptické (tj., mají neznámou funkci) [2, 29].

1.4.2 Rod *Pediococcus*

Pediokoky patřily mezi první bakterie studované Louise Pasteurem díky asociaci s bakteriemi kazícími pivo. Jedná se o grampozitivní, fakultativně anaerobní, katalázanegativní koky uspořádané do dvojic, tetrad a shluků. Tetradové formace a sférický tvar sloužily jako klíčové charakteristiky k jejich brzkému rozpoznání. Pediokoky jsou homofermentativní a z glukózy produkují DL-laktát. Rod *Pediococcus* zahrnuje pět druhů: *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus dextranicus*, *Pediococcus parvulus* a *Pediococcus pentosaceus* [11, 28].

Pediokoky se často nachází v nízkých počtech společně s laktobacily a leukonostoky na rostlinných materiálech, na potravinách a také jako škodlivá agens v alkoholických nápojích jako je pivo [11].

Pediokoky jsou důležité startovací bakterie využívané při výrobě fermentovaných uzenin v některých regionech. Některé široce využívané startovací kmeny, např. *Ped. acidilactici* a *Ped. pentosaceus* produkují bakteriociny. I když jsou pediokoky považovány za ekonomicky důležité startovací kultury, ne všechny jejich fermentační dráhy jsou čisté. Pediokoky pro svůj růst vyžadují zkvasitelné cukry. Špatně rostou tyto bakterie v mléku, protože laktóza pro ně není pohotově využitelná. Glukózu za optimálních podmínek fermentují po Embden - Meyerhof - Parnasově dráze na laktát jako hlavní konečný produkt. Pyruvát může být přeměněn na další konečné produkty jako jsou diacetyl a acetoin, který je často produkován *Ped. damnosus*, zatímco *Ped. pentosaceus* produkuje ekvimolární množství laktátu a acetátu z pentóz [11].

Některé kmeny pediokoků vykazují extrémní odolnost k teplotě, pH a NaCl. *Ped. acidilactici* roste při 50 °C a je tepelně odolný. *Ped. damnosus* a *Ped. parvulus* jsou odolné ke kyselým podmínkám a rostou při nízkých teplotách, obecně však vyžadují více anaerobní růstové podmínky než ostatní kmeny. *Ped. pentosaceus* a *Ped. acidilactici* jsou blízce příbuzné kmeny, které nemusí být jasně rozlišitelné fenotypickými charakteristikami, avšak lze je rozlišit DNA-DNA homologií [11].

Ped. halophilus roste v přítomnosti 18 % NaCl. Tento druh byl přemístěn do nového rodu *Tetragenococcus*, který je více příbuzný enterokokům a karnobakteriím než pediokokům a laktobacilům [11].

1.4.3 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* tvoří grampozitivní, nesporulující, fakultativně anaerobní, katalázanegativní tyčinky. Jedná se o heterogenní skupinu (doložení na základě obsahu G+C s odlišnými druhy DNA, které kolísají mezi 33 a 55 %) obsahující asi 135 druhů a 27 poddruhů, přičemž se jejich klasifikace neustále upravuje díky moderním genetickým metodám. Kompletní genomová sekvence je vydána pro šest kmenů rodu *Lactobacillus*, kam patří druhy: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius* a *Lactobacillus plantarum*. Laktobacily hrají velmi důležitou roli při výrobě fermentovaných potravin zejména zeleniny, masa a zvláště fermentovaných mléčných výrobků [11, 13].

Laktobacily můžeme nalézt na místech s vysokým obsahem sacharidů, dále na místech jako jsou slizniční membrány lidí a zvířat (dutina ústní, střevo), na rostlinách a materiálech rostlinného původu, v organických hnojivech a syntetických stanovištích jako jsou kanalizační splašky a fermentované nebo kazící se potraviny. Laktobacily jsou všudypřítomné v potravě a jsou nalézány v GIT dětí brzy po narození. U zdravých lidí jsou laktobacily běžně přítomné v dutině ústní, v kyčelníku, tlustém střevě a jsou dominantními mikroorganismy ve vagíně [13].

Klasické rozdělení laktobacilů vhodné pro potravinářské mikrobiology je založeno na jejich fermentačních charakteristikách, jedná se o obligátně homofermentativní, fakultativně heterofermentativní a obligátně heterofermentativní laktobacily. Určité obligátně homofermentativní, fakultativně heterofermentativní a obligátně heterofermentativní laktobacily (např. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus*) se využívají při výrobě fermentovaných potravin. Oproti tomu některé obligátně heterofermentativní laktobacily (např. *Lb. brevis*, *Lb. fructivorans*) běžně doprovázejí kažení potravin. Obligátně heterofermentativní laktobacily fermentují hexózy na kyselinu mléčnou, octovou a CO₂. Charakteristickým znakem obligátně heterofermentativních bakterií je produkce plynu z glukózy [11].

Skupina *Lb. casei* zahrnuje *Lb. zaeae*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* a *Lb. rhamnosus*. Poslední tři jsou používány jako probiotika u lidí i zvířat. Avšak historicky zahrnovala skupina *Lb. casei* pouze jeden druh, který byl rozdělen do 5 poddruhů: *Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. casei* subsp. *alactosus*, *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum*, *Lb. casei* subsp. *tolerans* a *Lb. casei* subsp. *rhamnosus*. Collins a kol. pak navrhl reklasifikaci skupiny *Lb. casei* a popsal dva nové druhy: *Lb. paracasei* a *Lb. rhamnosus*. Buněčná stěna *Lb. rhamnosus* obsahuje rhamnózu a je to jeden z mála kmenů, který je schopen rhamnózu fermentovat [9, 11].

1.4.4 Rod *Enterococcus*

Enterokoky jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní, nesporulující, kataláza a oxidáza negativní koky vyskytující se jednotlivě, v párech nebo řetězcích. Optimální růstová teplota enterokoků je 35 °C, avšak většina druhů tohoto rodu roste v teplotním rozmezí 10 – 45 °C. Tyto bakterie dokáží růst také v přítomnosti 6,5 % NaCl, pH 9,6 a přežívají záhřev 60 °C po dobu 30 minut. Většina enterokoků hydrolyzuje eskulin v přítomnosti 40% žlučových solí [16, 18].

Kmeny enterokoků jsou používány především ve výživě zvířat. Avšak existují také farmaceutické produkty obsahující enterokoky jako probiotické kultury pro lidskou klinickou léčbu [9].

Na rozdíl od ostatních bakterií mléčného kvašení nejsou enterokoky považovány za GRAS a jejich detekce ve vodě je považována za indikátor fekálního znečištění [18].

Enterococcus faecium a *Enterococcus faecalis*

Rod *Enterococcus* zahrnuje mnoho různých druhů, ale pouze dva z nich jsou důležité jako probiotika: *Enterococcus faecium* používaný jako probiotikum hlavně u zvířat, ale také u lidí, a *Enterococcus faecalis* primárně používané probiotikum u lidí. Tyto dva druhy jsou od sebe snadno rozlišitelné fermentační reakcí (arabinóza, sorbitol) a různou teplotou růstu (např. 50 °C). Kmeny těchto dvou druhů jsou často izolovány z klinického materiálu. Mohou však také způsobovat nemocniční infekce u hospitalizovaných pacientů ohrožených poklesem imunity [9].

Ent. faecium a *Ent. faecalis* jsou přirozenou mikroflórou zažívacího traktu lidí. Enterokoky jsou také běžně izolovány z potravin, rostlin, vody a půdy, zřejmě následkem rozšíření z fekálních zdrojů a jejich přirozenou odolností k nepříznivým podmínkám. *Ent. faecium* a *Ent. faecalis* jsou běžně nalézány v mléku a sýrových produktech [18].

V některých případech jsou tyto enterokoky odolné proti antibiotikům například k ampicinu a mohou získat dodatečnou rezistenci. Oba druhy mohou způsobit přenosnou rezistenci ke glykopeptidovým antibiotikům používaným při léčbě multirezistentních enterokoků např. vankomycin a teicoplanin. Jestliže se tyto kmeny stanou odolné vůči glykopeptidovým antibiotikům, infekce je neléčitelná. Glykopeptidově odolné enterokoky by neměly být rozšiřovány potravním řetězcem v nemocničních kuchyních a dostat se tak k pacientům s ohroženou imunitou [9, 15, 16, 17].

1.4.5 Rod *Lactococcus*

Laktokoky jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní, nepohyblivé koky. Jsou homofermentativní a z glukózy produkují výhradně L(+) kyselinu mléčnou. Rostou při 10 °C, ale ne při 45 °C. Používání laktokoků jako startovacích kultur je rozšířené a má v mlékařském průmyslu dlouhou tradici, díky jejich spolehlivosti a stabilitě. Genetické studie laktokoků byly zaměřeny na mléčnou fermentaci, štěpení kaseinu, produkci diacetylu z citrátu a odolnost k bakteriofágovým útokům. Laktokoky získávají esenciální aminokyseliny pro růst hydrolýzou kaseinu, hlavního proteinu v mléku [2, 11, 19, 20].

Rod *Lactococcus* zahrnuje 5 druhů: *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus lactis*. *Lactococcus lactis* je dále rozdělen na poddruhy: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* [2, 19, 20].

Rod *Lactococcus* taktéž obsahuje několik málo obvyklých druhů: *Lactococcus garvieae* izolovaný z mastitid krav, *Lactococcus piscium* z lososovitých ryb, *Lactococcus plantarum* ze zmraženého hrášku a *Lactococcus raffinolactis* ze syrového mléka [11, 72].

Lactococcus lactis

Poddruhy *Lc. lactis* jsou nejvýznamnější komerčně využívané bakterie mléčného kvašení. Tyto bakterie jsou značně prostudované z hlediska jejich biochemických a fyziologických vlastností a jejich vlivu na potraviny. Tyto laktokoky jsou běžně izolovány z rostlinného materiálu, většinou se však vyskytují v mléčných výrobcích. Kmeny, které jsou schopné využít citrát s produkcí diacetylu, byly původně klasifikovány jako *Streptococcus diacetylactis* a následně jako *Lc. lactis* subsp. *diacetylactis*. Kmeny *Lc. lactis* produkují řadu bakteriocinů, nejdůležitější z nich je lantibiotikum nizin. Nizin je relativně širokospektrý bakteriocin účinný proti grampozitivním bakteriím zahrnujícím např. *Clostridium botulinum* a jejich spory. Je povoleno přidávat nizin do potravin ve více než 45 zemích [2, 11].

Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris

Lc. lactis subsp. *lactis* a *Lc. lactis* subsp. *cremoris* jsou široce využívány při výrobě fermentovaných mléčných produktů. Oba kmeny rostou rychle v mléku a produkcí kyseliny mléčné snižují pH pod 4,5. *Lc. lactis* subsp. *lactis* je schopný růst při maximální teplotě 40 °C, snáší 4 % NaCl a pH 9,2. Roste v mléku s 0,1 % metylenové modří a hydrolyzuje arginin na amoniak. *Lc. lactis* subsp. *cremoris* neroste nad 38 °C a netoleruje 4% NaCl [2, 11].

2 BAKTERIOCINY BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Bakteriociny jsou ribozomálně syntetizované antimikrobiální látky proteinové povahy, které jsou produkovány některými bakteriemi jako inhibitory jiných bakterií buď v rámci stejných druhů (úzké spektrum účinku) nebo různých druhů (středně široké spektrum účinku). Mnoho bakterií mléčného kvašení používaných v potravinářském průmyslu produkuje bakteriociny a jsou tedy bohatým zdrojem těchto přírodních inhibitorů. Bakteriociny bakterií mléčného kvašení mají rozsáhlý potenciál použití k udržení a zlepšování bezpečnosti a kvality potravin [12, 21, 22, 23, 39].

Bakteriociny mohou být tedy považovány za přirozený ochranný systém, který může být zabudován do potravních systémů k jejich sebeochraně proti kontaminaci a nebo následné nežádoucí mikroflóře [21].

2.1 Bakteriociny vs. antibiotika

Bakteriociny jsou často v literatuře mylně označovány jako antibiotika. To by mohlo z právního hlediska omezit jejich použití v potravinách. V některých zemích je to rozhodující kritérium mezi bakteriociny a antibiotiky. Bakteriociny, které jsou jasně odlišitelné od klinických antibiotik, mohou být bezpečně a účinně používané ke kontrole růstu cílových patogenů v potravinách [23].

Tab. 1. Bakteriociny vs. antibiotika [23, 25].

Charakteristika	Bakteriociny	Antibiotika
Aplikace	potraviny	medicína
Syntéza	ribozomální	sekundární metabolity
Aktivita	úzké spektrum	široké spektrum
Imunita hostitelské buňky	ano	ne
Mechanismus cílové buňky	obvykle adaptace ovlivňující buňku	obvykle geneticky přenosný
Odolnost nebo tolerance	membránové složení	rozhodující činitel ovlivňující různé stránky závisující na mechanismu působení
Interakční požadavky	někdy pokrytí molekulami	specifický cíl
Mechanismus působení	většinou pórová formace, ale v několika případech možná biosynéza buněčné stěny	buněčná membrána nebo intracelulární cíle
Toxicita/vedlejší účinky	nejsou známy	ano

2.2 Klasifikace bakteriocinů bakterií mléčného kvašení

Klasifikace bakteriocinů bakterií mléčného kvašení byla provedena dle jejich různorodosti do skupin na základě struktury a mechanismu působení. Zatímco většina klasifikačních systémů souhlasí se dvěma hlavními třídami, a to třída I (lantibiotika) a třída II (nemodifikované peptidy), některé dělení navrhují až pět tříd [21, 24].

2.2.1 Třída I - Lantibiotika

Bakteriociny třídy I jsou malé (< 5 kDa) tepelně stabilní peptidy obvykle označované jako lantibiotika, díky přítomnosti neobvyklých aminokyselin obsahujících lanthionin (Lan) a β -methyl-lanthionin (MeLan). Tyto neobvyklé sloučeniny jsou tvořeny v dvoustupňovém procesu. V prvním kroku dochází k enzymatické dehydrataci serinových nebo threoninových zbytků za vzniku α,β -nenasycených aminokyselin 2,3 - didehydroalaninu (Dha) nebo 2,3 - didehydrobutyriu (Dhb). Ve druhém kroku se následkem rozštěpení dvojně vazby v Dha nebo Dhb thiolovými skupinami z nedalekých cysteinových zbytků tvoří Lan nebo MeLan [21, 22, 23, 39].

Lantibiotika jsou dále rozdělena do dvou podtříd založených na strukturálních podobnostech. Podtřída Ia se skládá z kationaktivních, prodloužených, hydrofobních peptidů. Tyto peptidy tvoří póry v cílových membránách bakteriálních buněk a mají flexibilní strukturu ve srovnání s podtřídou Ib. Typickým členem skupiny Ia je lantibiotikum nizin, dále pep5 a epidermin [21, 23].

Podtřída Ib zahrnuje menší, kompaktnější, globulární peptidy buď s negativním nebo žádným nábojem. Aktivita těchto peptidů je spojena s inhibicí specifických enzymů. Do podtřídy Ib patří například mersacidin, actagardin a cinnamycin aj. [21, 23].

Vhodnost tohoto klasifikačního systému byla zpochybňována v důsledku zjištění, že nizin netvoří pouze póry, ale také inhibuje syntézu peptidoglykanu vázáním prekurzorů lipidů II do peptidoglykanu. Tudíž má společné rysy s oběma podtřídami Ia i Ib peptidů [21, 23]. Odrazem značné různorodosti mezi lantibiotiky bylo navržení nového klasifikačního schématu utvářejícího 11 podskupin. Vytvořené podskupiny jsou založeny na uspořádání aminokyselinové sekvence nemodifikovaných strukturálních peptidů. Tyto podtřídy v každém případě odráží originální pojmenování lantibiotik, tj. nizin, epidermin, streptin, pep5, lacticin 481, mersacidin, LtnA2, cytolysin, lacrocin S, cinnamycin a sublancin [21].

2.2.2 Třída II

Bakteriociny třídy II jsou nízkomolekulární (< 10 kDa) peptidy nelanthioninové povahy, jsou tepelně stabilní a nepodstupují rozsáhlou post - translační modifikaci. Patří zde například pediocin PA-1, sakaciny A a P, leukocin A, enterocin A [21, 22, 23, 27, 39].

Snaha subklasifikovat třídu II bakteriocinů byla komplikována různorodostí jejich chemických a genetických vlastností. Byl přijat návrh Cottera a jeho kolegů na 4 podtřídy (IIa-d) [21].

Podtřída IIa, peptidy podobné pediocinům či antilisteriální peptidy, je nejprozkoumanější skupinou. Rozsah délky u bakteriocinů podtřídy IIa se pohybuje v rozmezí od 37 do 48 aminokyselinových zbytků. Tyto bakteriociny jsou kationaktivní v neutrálním pH a jsou zvláště silnými inhibitory rodů *Listeria*. Podtřída IIa je charakterizována zachovanou N-koncovou sekvencí Tyr-Gly-Asn-Gly-Val (YGNGVxCxxxxCxV) a dvěma cysteiny tvořícími disulfidový můstek v polovině N-koncové oblasti. Bakteriociny podtřídy IIb jsou obvykle složeny ze dvou různých peptidů. Aby byly tyto dvoupeptidové bakteriociny plně účinné, potřebují přítomnost obou peptidů. Primární aminokyselinové sekvence peptidů jsou odlišné. Přesto je každý z nich kódován vlastními sousedními geny a je potřebný pouze jeden imunitní gen. Podtřída IIc (dříve třída V) se skládá z cyklických nemodifikovaných peptidů a podtřída II d je tvořena z nepediocinových lineárních peptidů [21, 23, 27, 39].

2.2.3 Třída III

Třídu III tvoří vysokomolekulární (> 30 kDa) a tepelně nestabilní skupina bakteriocinů. Z rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* jich bylo popsáno jen velmi málo. Jsou stále málo charakterizovány a zahrnují např. helveticin J produkovaný *Lactobacillus helveticus* 481, helveticin V produkovaný *Lactobacillus acidophilus* N2. Všechny sdílí úzké inhibiční spektrum a jsou antagonistické pouze k blízkce příbuzným druhům [23, 27, 39].

2.2.4 Třída IV

Třída IV obsahuje bakteriociny tvořící velké komplexy s dalšími makromolekulami jako jsou lipidy či sacharidy. Doposud však žádné takové bakteriociny nebyly purifikovány. Kationaktivní a hydrofóbní vlastnosti bakteriocinů umožňují tvorbu komplexů s jinými

makromolekulami, což je hlavní důvod vzniku bakteriocinů IV. třídy. Tento jev byl prokázán v případě plantaricinu S. Nejprve byla potvrzena velká komplexní molekula, která byla později purifikována jako malý peptid, avšak bylo pozorováno, že aktivita byla zachována i po rozložení komplexu [23, 39].

2.3 Mechanismus působení

Biologický účinek bakteriocinů nastává přes specifické receptory umístěné na povrchu cílové mikrobiální buňky. Bakteriociny jsou silné toxiny, často velmi specifické a obvykle produkované během vystavení některých bakteriálních rodů stresovým podmínkám. Po uvolnění do prostředí způsobují rychlou eliminaci neimunních nebo neodolných sousedních mikrobiálních buněk. Usmrcení mikrobiální buňky vlivem bakteriocinů může nastat v důsledku nevyvážené funkce cytoplazmatické membrány (ovlivnění syntézy energie a permeability), inhibicí syntézy nukleových kyselin, zásahem do syntézy proteinů a změnou mechanismu buněčného přenosu. Nicméně existují bakteriální rody, které mohou snést buněčnou lyzi díky vývoji specifické imunity zprostředkované proteinem. Bakteriociny jsou obvykle účinné proti grampozitivním bakteriím úzce příbuzným a také patřícím do různých rodů [25].

2.4 Bakteriociny *Streptococcus thermophilus*

Bakteriociny kmenů *Streptococcus thermophilus*, nazývané thermophiliny, jsou termostabilní a účinné skrz široký rozsah hodnot pH, na rozdíl od nizinu, který se nepoužívá v kyselých potravinách. Díky statusu GRAS pro *Str. thermophilus* jsou bezpečné i thermophiliny. Přestože bylo publikováno několik bakteriocin produkujících kmenů *Str. thermophilus*, bylo charakterizováno pouze pět bakteriocinů: thermophilin 347 (jogurtové kmeny), thermophilin A, thermophilin T (produkované kmeny v sýru „feta“), thermophilin 13 (*Str. thermophilus* Sfi13) a nový thermophilin Adria (*Str. thermophilus* Adria 91L 580). Thermophilin 13 má široké inhibiční spektrum. Thermophilin Adria inhibuje *Clostridium tyrobutyricum* izolované z tvrdého sýru [29, 30, 39].

2.4.1 Thermophilin 13

Thermophilin 13, dvousložkový bakteriocin, byl poprvé izolován ze *Streptococcus thermophilus* Sfi13. Thermophilin 13 má široký rozsah působení. Bylo zjištěno, že tento bakteriocin tvoří póry v lipozómech cytochromu *c* obsahujících oxidázu. Tato aktivita byla pozorována pouze u lantibiotik. To ukazuje, že thermophilin 13 nepotřebuje pro aktivitu receptor bílkovinné nebo lipidové povahy. Thermophilin 13 se skládá ze dvou složek označovaných ThmA a ThmB viz. Tab. 2. Obě zmíněné složky jsou původně produkované leadrem s dvojnásobným obsahem glycinu a hotové peptidy obsahují 62 (ThmA) a 43 (ThmB) AMK zbytků. Samotná složka ThmA působí vůči *Str. thermophilus*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* a *Bacillus cereus*. Avšak účinek první složky je 40x vyšší v případě přítomnosti ekvivalentního množství složky ThmB [38, 39].

Tab. 2. Thermophilin 13 [39].

Bakteriocin	Genetická sekvence peptidů	Produkční kmen	Molekulová hmotnost (Da)	Počet aminokyselin
Thermophilin 13	ThmA: YSGKDCLKDMGGYALAGAGSGALWGAPAGGVG ALPGAFVGAHVGAIAAGGFACMGGMIGNKFN	<i>Str. thermophilus</i> Sfi13	5776	62
	ThmB: QINWGSVVGHCIGGAIIGGAFSGGAAA GVGCLVGSBKAIINGL		3910	43

2.5 Bakteriociny pediokoků

Většina bakteriocinů produkovaných pediokoky, pediociny či podobné pediocinům, mají antilisteriální účinek. Zmíněné bakteriociny jsou termostabilní a spadají do velikostního rozsahu od 2867 do 4685 Da. Pediocin AcH, produkovaný *Pediococcus acidilactici*, je identický k pediocinu PA-1 produkovanému kmenem *Ped. acidilactici* PAC-1. Pediocin PA-1 je jeden z nejlépe prostudovaných bakteriocinů a je považován za dobrou přírodní ochrannou látku [24]. Různé kmeny *Ped. acidilactici* mohou dále tvořit bakteriociny Bac HA-6111-2, Bac HA-5692-3, JD a SM-1 a pediocin MM33, pediocin 5 a pediocin SA-1. *Pediococcus pentosaceus* produkuje pediocin ST18 a pediocin A, pediocin N5P [12, 24, 32].

Při porovnání pediocinů s nizinem, který je značně aplikován v konzervaci potravin, avšak jeho rozpustnost a stabilita významně klesá v neutrálním a zásaditém prostředí výrobků z masa, by mohly pediociny tento nedostatek nizinu nahradit, protože jsou stabilní v širokém rozmezí hodnot pH 2 – 10 [12].

Pediocin A

Pediocin A byl poprvé rozpoznán Flemingem a kol. jako inhibiční faktor zodpovědný za inhibici *Lactobacillus plantarum* ve směsných kulturách. Následně byly identifikovány tři kmeny *Ped. pentosaceus* (FBB63, FBB-61, L-7230), které produkovaly podobné bílkovinné inhibitory. Pediocin A byl stabilní po zahřátí na 100 °C po dobu 60 min a vystavení expanzivnímu baktericidnímu rozsahu, který zahrnoval většinu grampozitivních bakterií mléčného kvašení a patogenům přenášeným potravinami. Snahy o purifikaci a charakterizaci pediocinu A byly neúspěšné. Jeho široký rozsah účinku je srovnatelný pouze s nizinem a je navrženo, že pediocin A může být členem třídy lantibiotik [32].

Pediocin PA-1

Pediocin PA-1 (také nazýván pediocin AcH) je 44 aminokyselinový bakteriocin třídy II produkovaný především kmeny rodu *Pediococcus*. Má široké spektrum účinku a je zvláště účinný proti patogenním mikroorganismům v potravinách jako je *Listeria monocytogenes*, čehož se využívá hlavně v mlékařském průmyslu a *Clostridium botulinum*, které způsobí každý rok po celém světě mnoho úmrtí. Pediociny PA-1 jsou, jak již bylo řečeno, produkovány pediokoky. Tyto mikroorganismy jsou obvykle spojovány se zeleninovými a masovými produkty, avšak pro růst v mléku a mléčných produktech jsou málo přizpůsobivé. Proto je produkce pediocinu PA-1 kmeny mléčného původu velmi žádoucí [22, 56].

Pediocin PA-1 (AcH) může být produkován kmeny *Ped. acidilactici* H, E, F, M, PAC, 1.0, HA-6111-2 a HA-5692-3. [12, 24, 32]. Biosyntéza pediocinu PA-1 obsahuje DNA fragment přibližně 3,5 kb a zahrnuje čtyři geny *pedA*, *pedB*, *pedC* a *pedD* [24, 59].

2.6 Bakteriociny enterokoků

Mnoho kmenů enterokoků, především *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*, může produkovat různé bakteriociny účinné proti patogenům přenášeným potravinami jako je *Bacillus cereus*, *Clostridium* sp., *Listeria monocytogenes* nebo *Staphylococcus aureus*. Z tohoto důvodu dostalo využití enterocinů či enterocin produkujejících startovacích kultur

při fermentaci potravin speciální význam jako ochranná metoda ke kontrole patogenních bakterií. Příklady enterocinů: enterocin A, B, P, enterocin AS-48, enterocin 31, enterocin L50A a L50B, enterocin 1071A a 1071B [33].

2.7 Bakteriocin *Lactobacillus rhamnosus*

Na základě strukturních vlastností (molekulární hmotnost, pI, N – koncová sekvence) by mohl být rhamnosin A považován za bakteriocin třídy II [31]. Jedná se o tepelně stabilní bakteriocin, který je stravitelný proteolytickými enzymy přítomnými v gastrointestinálním traktu. Ačkoli většina bakteriocinů jsou přirozeně baktericidní nebo bakteriolytické, rhamnosin A v použité koncentraci 0,1 mg.ml⁻¹ měl bakteriostatický účinek. Faktory, které mohou ovlivnit mechanismus působení, zahrnují dávku a stupeň purifikace bakteriocinu, růstovou fázi indikátorových buněk a celkové experimentální podmínky [31].

2.8 Bakteriocin *Lactobacillus casei*

Lactocin 705 produkovaný startovacími kulturami *Lb. casei* CRL 705 používanými v mase je účinný proti několika grampozitivním bakteriím, včetně patogenů přenášeným potravinami. Proto je lactocin 705 dobrým kandidátem k použití jako přirozené ochranné látky při fermentaci masa. Jedná se o malý základní protein, který obsahuje vysoký podíl glycinových zbytků a neobsahuje lanthioninové nebo β-metyllanthioninové zbytky [37]. Lactocin 705 je složen ze dvou peptidů (705α a 705β), přičemž každý z nich má 33 aminokyselinových zbytků [39].

2.9 Nizin

Bakteriocin nizin (skupina N inhibičních látek) byl objeven v Anglii Rogersem a Whittierem v roce 1928. Nizin je produkován kmeny *Lc. lactis* subsp. *lactis*. Biosyntéza tohoto bakteriocinu nastává během exponenciální růstové fáze a zcela končí dosažením stacionární fáze. Strukturálně se jedná o polypeptid složený ze 34 aminokyselin ($M_r = 3500$ Da), který představuje kationaktivní a hydrofobní vlastnosti. Nizin patří do rodiny lantibiotik obsahující lanthioninové a methyllanthioninové skupiny. Navíc mohou být neobvyklé aminokyseliny odpovědné za důležité funkční vlastnosti nizinu, např. odolnost ke kyselinám, termostabilita při nízkém pH a specifický baktericidní mechanismus působení [40, 41, 42].

2.9.1 Varianty nizinu

Nizin existuje ve dvou variantách (A, Z), které se liší v jediné aminokyselině v pozici 27. U nizinu A se v dané pozici nachází histidin a u nizinu Z je to asparagin. Strukturální modifikace nizinu Z nemá účinek na jeho antimikrobiální aktivitu, naopak mu poskytuje větší rozpustnost a difuzní vlastnosti ve srovnání s nizinem A. To jsou vlastnosti důležité pro aplikace v potravinářství [40].

2.9.2 Faktory ovlivňující produkci nizinu

Produkce nizinu je ovlivněna několika kultivačními faktory jako je produkční kmen, nutriční složení média, pH, teplota, agitace a aerace. Dalšími faktory pak jsou např. substrát a inhibice produktu, adsorpce nizinu na produkční buňky a enzymatická degradace [40].

2.9.3 Mechanismus antimikrobiálního působení nizinu

Nizin je účinný baktericidní činitel působící vůči grampozitivním bakteriím zahrnujícím rody *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria* a *Mycobacterium*. Grampozitivní spory *Bacillus* sp. a *Clostridium* sp. jsou k nizinu zvláště citlivé. Na druhou stranu, mnoho grampozitivních bakterií vykazuje odolnost k nizinu díky jejich schopnosti syntetizovat enzym nizinázu, který může nizin inaktivovat. Nizin není účinný proti gramnegativním bakteriím, houbám a virům. Gramnegativní buňky jsou odolné díky obsahu lipopolysacharidů (LPS) v buněčné stěně, jejich vnější vrstva tak působí jako bariéra proti činnosti nizinu na cytoplazmatickou membránu [40, 42].

2.10 Metody stanovení produkce bakteriocinů bakterií mléčného kvašení

V současné době jsou metody na určení aktivity bakteriocinů založeny na enzymatických a neenzymatických postupech. Enzymatické metody spočívají na přímém měření intracelulárních enzymů, které se uvolňují po lyzi buňky, která byla vystavena účinku bakteriocinu. Přestože enzymatické metody poskytují rychlé výsledky, jejich přesnost může být oslabena kvalitou preparátů bakteriocinů kontaminovaných enzymy použitými při analýze, které mohou dávat falešně pozitivní výsledky [70].

Neenzymatické metody neboli tradiční techniky jsou „well-diffusion“ (jamková difuzní) nebo „disc diffusion“ (disková difuzní) metoda. Bakteriociny jsou přidávány do jamek pevného kultivačního média předem naočkovaného indikátorovým kmenem nebo na sterilní papírové disky umístěné na povrch předem naočkované agarové plotny indikátorovým kmenem. Ve „spot - on lawn“ nebo „spot“ (vpichové) metodě, jsou bakteriocinogenní bakterie zalaty nebo kultivovány na kultivačním agaru obsahujícím indikátorový kmen [70].

Dále byla publikována „deferred“ plotnová metoda. Bakteriocinogenní bakterie jsou inokulovány v podobě rovné čáry na agar. Poté se indikátorový kmen očkuje po celé ploše agaru předem překlopeného na víčko Petriho misky. Po kultivaci jsou sledovány zóny inhibice [70, 78].

Těmito metodami lze získat výsledky za 2 – 3 dny a přesnost těchto postupů může být ovlivněna subjektivním měřením inhibičních zón nebo v určení ředění, které tvoří pozorovatelné zóny kolem jamek nebo disků. Navíc časová náročnost těchto postupů a nedůslednost může chyby ve výsledcích ještě zvýšit [70].

Neenzymatické metody používající tekutá média a spektrofotometry nebo počítání kolonií indikátorových kmenů, taktéž představují určitá omezení, která mohou významně ovlivnit přesnost výsledků např. sedimentace buněk, interference barvy vzorků a vztah mezi koncentrací bakteriocinu a jeho inhibiční schopností. Tyto metody jsou však cenově efektivnější a odstraňují problémy spojené s agarovými difuzními metodami [70].

Například v práci dle Todorova a Dickse a práci Huanga a kol. byla určena tvorba bakteriocinů měřením optické denzity při 600 nm s použitím indikátorového kmene *Listeria monocytogenes* 54002. Supernatant zbavený buněk a upravený na pH 6 byl přidán k indikátorové kultuře v tekutém médiu, v blízké exponenciální fázi a následně inkubován. U vzorků byla každou hodinu zaznamenávána optická denzita při 600 nm po dobu 24 hodin a byly určeny životaschopné buňky na plotnách. Kontrola byla provedena s inaktivovaným bakteriocinem (20 minut při 121 °C) [12, 24].

3 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla koncipována a vyvinuta na počátku osmdesátých let 20. století Kary Mullisem, kterému díky tomu byla udělena v roce 1993 Nobelova cena za chemii. PCR je metoda pro amplifikaci DNA sekvencí *in vitro* zahrnující automatizované cykly denaturace, annealingu a exprese pomocí termocykleru. Technika dovoluje citlivou detekci a analýzu velmi malého množství nukleových kyselin [35]. PCR se tak stala jednou z nejefektivnějších technik molekulární biologie a nalezla využití v mnoha aspektech tohoto oboru [34].

Jedná se o velice citlivou metodu, která se využívá pro detekci a identifikaci mikroorganismů. Princip PCR je znázorněn na Obr. 2. Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymatické zmnožení určitého úseku nebo více úseků DNA ve směru $5' \rightarrow 3'$ za využití DNA – polymerázy. Cílová sekvence je vymezena připojením dvou oligonukleotidů (primerů). Primery jsou chemicky syntetizovány jako sekvence, které jsou komplementární ke specifickým místům na obou řetězcích molekuly DNA. Po přidání DNA – polymerázy a nukleotidů probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně. K syntéze DNA se používají termostabilní polymerázy, ty musí být stabilní z toho důvodu, že na počátku cyklu dochází k denaturaci DNA. DNA – polymerázy jsou izolovány z termofilních bakterií, které žijí v extrémních podmínkách, např. *Taq* DNA – polymeráza, která je nazvaná podle bakterie *Thermus aquaticus*, odolává teplotám, při nichž DNA denaturuje. To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně formou cyklů. Každý cyklus se skládá ze tří kroků, během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu [35, 36, 47, 49].

V prvním kroku dojde k denaturaci dvouřetězcových molekul DNA, toho je dosaženo zvýšením teploty na $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, zpravidla po dobu 1 – 5 minut. Zde je důležité, aby došlo k denaturaci celé molekuly DNA. Kdyby se tak nestalo, mohlo by dojít k velmi rychlé renaturaci celé molekuly, což by pak bránilo v interakci s primery [35, 36, 47, 49].

Ve druhém kroku dochází k připojení primerů (tzv. annealing primerů) k odděleným řetězcům DNA ($30 - 65\text{ }^{\circ}\text{C}$). Jedná se v podstatě o renaturaci, při které je směs ochlazená na teplotu, která vyhovuje nasedání primeru na vlákna DNA. Teplota, která je vhodná pro tuto reakci závisí na délce primeru a na zastoupení jednotlivých párů bazí [35, 36, 47, 49].

Ve třetím kroku dochází k syntéze nových řetězců DNA prostřednictvím DNA - polymerázy (65 – 75 °C), čili k tzv. extenzi řetězce DNA - polymerázou a tedy prodlužování nasadlých primerů. Teoreticky dojde v každém kroku k dvojnásobnému zmnožení přítomné matricové DNA a celkově k exponenciálnímu nárůstu množství DNA. Optimální počet cyklů je závislý na výchozí koncentraci templátové DNA a zpravidla se pohybuje v rozmezí 20 - 35 cyklů, což je pro většinu aplikací dostatečný počet. Reakce probíhají v zařízení nazývaném termocykler, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech. Výsledným produktem PCR jsou amplikony neboli úseky DNA definované délky o velikosti obvykle desítky až tisíce bp, analogické restričními fragmentům, jejichž přítomnost se v reakční směsi prokazuje stanovením jejich velikosti elektroforézou v agarózovém gelu [35, 36, 47, 49].

3.1 Důležitá základní fakta PCR

Kromě molekuly DNA, která je kopírována, musí být v reakční směsi přítomny ještě další složky nezbytné pro průběh reakce [35, 47, 49].

Základní složení

Vzorek DNA:

Extrahovaná DNA podléhající PCR amplifikaci. PCR může být uskutečněna s purifikovanými nebo surovými vzorky. V případě surových vzorků však může být účinnost PCR oslabena buněčnými zbytky nebo kontaminována extrakčními činidly [35].

Pufr:

Pufr zajišťuje optimální podmínky pro činnost DNA - polymerázy. Hodnota pH 8,3 je za standardních podmínek udržována použitím Tris - HCl pufru. Při vyšších teplotách pH klesá na 6,8, což příznivě ovlivňuje spolehlivost *Taq* DNA polymerázy. Dalšími složkami mohou být KCl a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Stabilitu *Taq* DNA polymerázy mohou podporovat neionogenní detergenty a hovězí sérum albumin (BSA) [35, 47, 49].

Hořečnaté kationty:

Hořečnaté kationty (Mg^{2+}) jsou základní složkou, stabilizující interakce mezi primerem, templátovou DNA a *Taq* DNA polymerázou. Mg^{2+} jsou nutným kofaktorem *Taq* DNA polymerázy, tedy čím více hořečnatých iontů v reakci, tím je výkon polymerázy větší,

avšak zároveň je negativně ovlivněna specifita nasedání primerů. Tudíž musí být zvolen vhodný kompromis [35, 47, 49].

Deoxyribonukleosid trifosfáty (dNTPs):

Deoxyribonukleosid trifosfáty jsou směsí 2'-deoxyadenosin 5'-trifosfát (dATP), 2'-deoxycytidin 5'-trifosfát (dCTP), 2'-deoxyguanosin 5'-trifosfát (dGTP) a thymidin 5'-trifosfát (TTP, ale uváděný jako dTTP). Tato směs slouží jako základní stavební jednotky pro syntézu nového řetězce DNA [35, 49].

Primery:

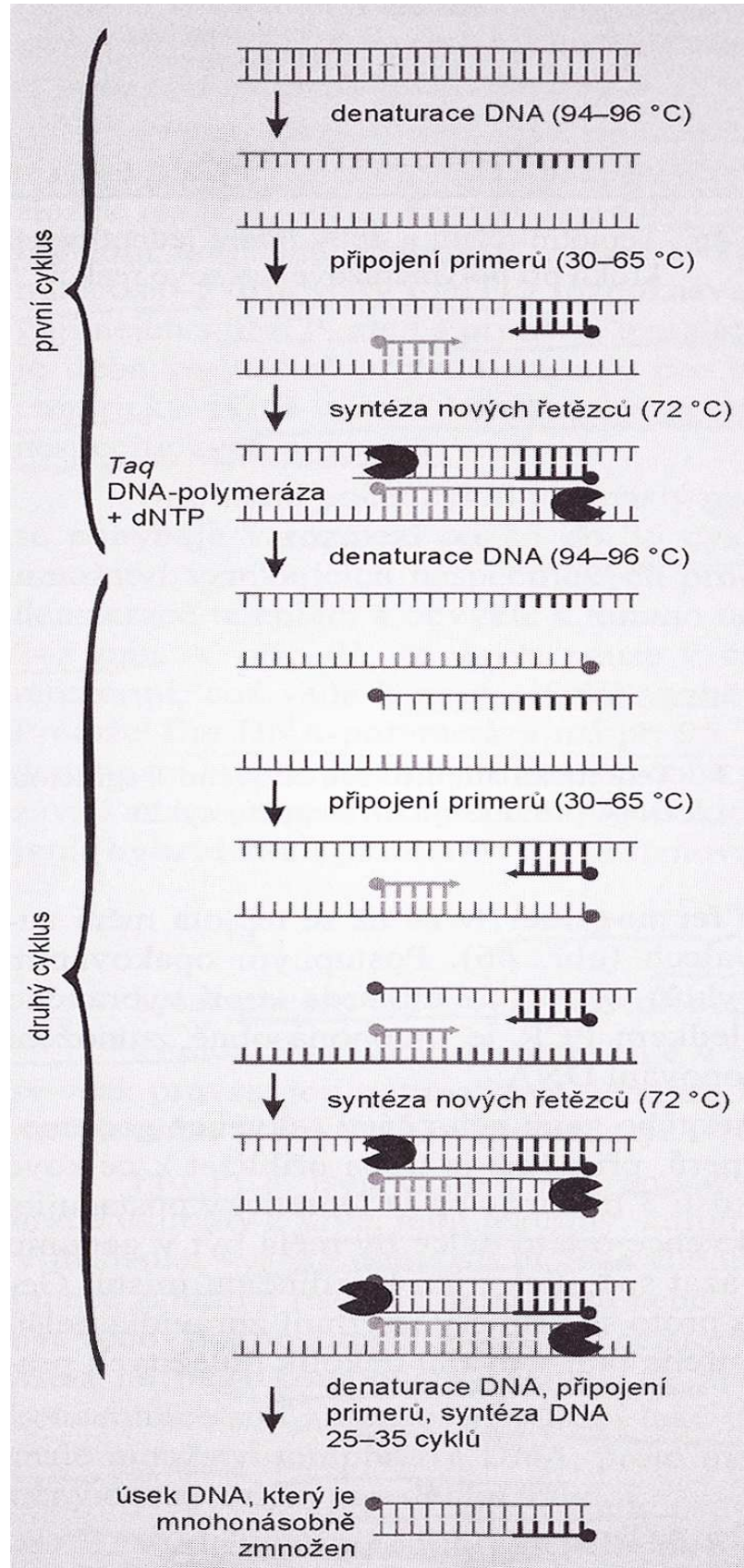
Primery vymezují oblast kopírování templátové DNA a označují se forward (směrem tam) a reverse (směrem zpět) podle toho, jaký určují směr syntézy nového vlákna. Jsou typické v rozsahu délky 18 - 25 bazí a koncentrace od 0,1 - 1 μM . Primery mohou být označeny fluorescenčními barvivy, které dovolují detekci PCR amplikonů fluorescenčních bazí [35, 47, 49].

Termostabilní DNA polymeráza:

Pro syntézu DNA je požadován, jak již bylo řečeno, tepelně stabilní enzym jako je *Taq* DNA polymeráza extrahovaná z bakterie *Thermus aquaticus* [35, 47, 49].

Dnase/Rnase- volná čistá voda:

Finální PCR reakční objemy se mění od 10 do 50 μl a jsou upraveny na tento objem přidáním objemu sterilní destilované vody [35].



Obr. 2. Princip PCR [35, 47].

3.2 Varianty a modifikace PCR

PCR je používána v rozsáhlé škále variant, které jsou upraveny podle toho, zda je potřeba amplifikovat templáty s nízkým počtem kopií, provádět molekulární identifikaci nebo typizaci organismů, detekovat sekvenční polymorfizmy nebo modifikovat sekvence nukleových kyselin. Tyto varianty se navzájem odlišují použitím dalších enzymatických reakcí kromě amplifikace *Taq* – polymerázou, použitím specifických sekvencí primerů, podmínkami pro amplifikaci a způsoby detekce PCR produktů [47].

- **Stanovení polymorfizmu délky restrikčních fragmentů u produktů PCR (PCR - RFLP)**
- **Mnohonásobná („multiplex“) PCR**
- **Odstupňovaná PCR neboli PCR využívající vnějších a vnitřních primerů (angl. Nested PCR)**
- **PCR kolonií**
- **Obrácená neboli inverzní PCR (IPCR)**
- **Modifikace konců DNA prostřednictvím 5'- konců primerů**
- **Alelově specifická PCR (AS – PCR)**
- **Zpětná PCR (RT – PCR)**
- **Rychlá amplifikace konců cDNA (RACE)**
- **Asymetrická PCR**
- **Dideoxy – fingerprinting (ddF)**
- **PCR s degenerovanými oligonukleotidovými primery (DOP – PCR)**
- **Degenerovaná PCR (D – PCR)**
- ***In situ* PCR**
- **Amplifikace vnitřních přepisovaných mezerníků (ITS – PCR)**
- **Polymorfizmus délky jednoduchých repetitivních sekvencí (SSLP – PCR)**
- **Náhodná PCR (AP – PCR) neboli náhodná amplifikace polymorfnní DNA (RAPD)**

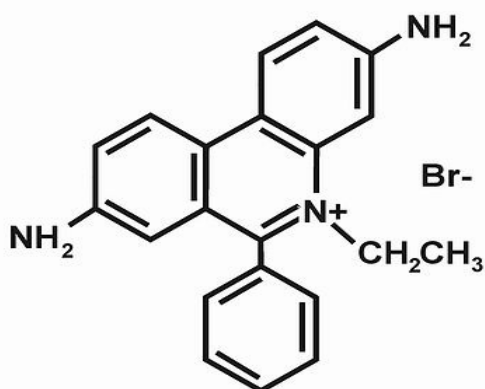
- **Interrepetitivní PCR (REP – PCR)**
- **Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP)**

3.3 Frakcionace DNA pomocí agarózové gelové elektroforézy

Pohyb molekul nukleových kyselin je zajištěn pomocí elektroforézy. Gel je umístěn v elektrickém poli mezi dvěma elektrodami, a to kladně nabitou a záporně nabitou. Elektroforetická frakcionace DNA přes gel je principiálně založena na tom, že DNA v téměř neutrálním roztoku je negativně nabitá. Proto bude DNA v elektrickém poli migrovat ke kladné elektrodě (anoda). Rychlost migrace je nepřímoúměrná logaritmu velikosti fragmentu. Menší fragmenty putují gelem mnohem rychleji než větší. Použité elektrické napětí je obvykle rovnoměrné, pulzní pole jsou používána pro speciální účely. Elektroforéza DNA na agarózovém gelu je velmi výkonný postup pro frakcionaci DNA fragmentů. Hlavní výhody jsou jednoduchost a opakovatelnost. Je možné výborné rozlišení směsi různých DNA fragmentových velikostí až k hranici blízké 40 kb, což je určeno koncentrací gelu a gradientem elektrického napětí. Frakcionovaná DNA může být v gelu vizuálně detekována použitím barviva, které se váže na DNA (např. etidiumbromid) [43, 49].

3.3.1 Etidiumbromid

Etidiumbromid (EtBr) je fluorescenční barvivo, které se velmi intenzivě a specificky váže na mitochondriální a chromozomální DNA. Chemická struktura EtBr je znázorněna na Obr. 3. EtBr svou plochou molekulou interkaluje mezi ploché páry bazí v molekule DNA. Ploché páry bazí jsou v dvoušroubovici DNA uspořádány nad sebou jako sloupec mincí a interkalace molekul může být představena jako vsouvání další ploché mince do stávajícího sloupce. Kromě barvení molekuly DNA může EtBr tímto vsouváním ovlivnit „čtení“ genetické informace při replikaci DNA a vyvolat tak nebezpečné posunové mutace v genetické informaci, proto je nutné dodržovat základní bezpečnostní pravidla [44, 45].



Obr. 3. Etidiumbromid - chemická struktura [44, 45].

3.3.2 Postup při agarózové gelové elektroforéze

Agarózový gel se připravuje nalitím roztoku agarózy do formy vhodné velikosti. Dokud je gel tekutý je umístěn hřebínek blízko jednoho konce formy. Hřebínek se po utužení gelu vyjme a vytvoří se tak jamky na aplikaci vzorků. Gel je následně umístěn do horizontální elektroforetické vany a je zalit pufrem. Vzorky DNA se aplikují do jamek a následuje připojení elektroforetické vany ke zdroji napětí a začne probíhat gelová elektroforéza [43, 49].

4 CÍL PRÁCE

Podstatou teoretické části byla obecná charakteristika bakterií mléčného kvašení se zaměřením na jednotlivé studované kmeny a jejich bakteriociny. Pozornost byla věnována také rozdělení bakteriocinů, mechanismu působení a jejich detekci plotnovými metodami a molekulární metodou PCR.

Cílem praktické části byla izolace bakterií mléčného kvašení a jejich následná identifikace z morfologického, fyziologického a biochemického hlediska. Dále se práce zaměřila na praktické stanovení bakteriocinů izolovaných bakterií mléčného kvašení metodou PCR a metodou měření optické hustoty.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 IZOLACE A IDENTIFIKACE BMK, STANOVENÍ PRODUKCE BAKTERIOCINŮ

5.1 Materiál

5.1.1 Sbírkové mikroorganismy

Kmeny získané z České sbírky mlékařských mikroorganismů (Czech Collection of Dairy Microorganisms CCDM), VÚM, Tábor:

- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 414
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 885
- *Streptococcus thermophilus* CCDM 7
- *Streptococcus thermophilus* CCDM 69
- *Lactobacillus bulgaricus* CCDM 66
- *Pediococcus* sp. CCDM 396
- *Pediococcus acidilactici* CCDM 561
- *Pediococcus acidilactici* CCDM 567

Kmeny získané ze sbírky Ústavu technologie a mikrobiologie potravin, FT, UTB ve Zlíně:

- *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*

Kmeny získané z České sbírky mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms CCM), Brno:

- *Listeria innocua* CCM 4030

5.1.2 Vyizolované mikroorganismy

Mikroorganismy vyizolované ze zakysané smetany:

- *Pediococcus pentosaceus* 1
- *Streptococcus thermophilus* 2
- *Enterococcus faecalis* 3

Mikroorganismy izolované z klobás:

- *Pediococcus pentosaceus* 4
- *Pediococcus pentosaceus* 5
- *Pediococcus pentosaceus* 6
- *Pediococcus pentosaceus* 7
- *Pediococcus pentosaceus* 8
- *Enterococcus faecium* 9
- *Pediococcus pentosaceus* 10
- *Pediococcus pentosaceus* 11
- *Pediococcus pentosaceus* 12
- *Pediococcus pentosaceus* 13
- *Pediococcus pentosaceus* 14
- *Pediococcus pentosaceus* 15
- *Pediococcus pentosaceus* 16

Mikroorganismy izolované z biojogurtů:

- *Lactobacillus rhamnosus* 17
- *Lactobacillus rhamnosus* 18
- *Lactobacillus rhamnosus* 19
- *Lactobacillus rhamnosus* 20
- *Lactobacillus rhamnosus* 21
- *Lactobacillus rhamnosus* 22
- *Lactobacillus rhamnosus* 23
- *Lactobacillus casei* 24
- *Lactobacillus casei* 25
- *Streptococcus thermophilus* 26

- *Streptococcus thermophilus* 27
- *Enterococcus faecalis* 28
- *Enterococcus faecalis* 29

5.1.3 Kultivační média a roztoky

Kultivační média

Jednotlivé složky použité v kultivačních médiích jsou přepočteny na 1 litr destilované vody. Média byla připravena rozpuštěním daných složek v destilované vodě a následně sterilována při 121 °C po dobu 20 minut.

- **M17 agar**

39,21 g	M17 broth (Oxoid Ltd., Anglie)
15 g	agar (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
100 ml	10% glukózy (Lachema a.s., Brno, CZ)
52 ml	10% laktózy (Lachema a.s., Brno, CZ)

- **M17 bujón**

39,21 g	M17 broth (Oxoid Ltd., Anglie)
100 ml	10% glukózy (Lachema a.s., Brno, CZ)
52 ml	10% laktózy (Lachema a.s., Brno, CZ)

- **MRS agar**

67,15 g	MRS broth (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
15 g	agar (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Indie)

- **MRS bujón**

67,15 g	MRS broth (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
---------	--

- **M17 agar + 2 % NaCl (4 %, 6,5 %)**

39,21 g	M17 broth (Oxoid Ltd., Anglie)
15 g	agar (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
20 g (40 g, 65 g)	NaCl (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, CZ)
52 ml	10% laktózy (Lachema a.s., Brno, CZ)

- **Listeria Oxford Medium Base**

55,5 g	Listeria Oxford Medium Base (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
--------	--

- **OF-médium M-23 pro fermentaci cukrů***

3 g	masový výtažek (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
10 g	pepton (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
5 g	NaCl (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, CZ)
1 g	bromkresolová červeň (Spolek pro chemickou a hutní výrobu, CZ)
1 g	bromtymolová modř (Chemapol Ltd., Praha, CZ)
3 g	agar (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
1 ml	barvy na OF test
1-2 g	D-glukóza (Lachema a.s., Brno, CZ)

*pH OF-média M-23 pro fermentaci cukrů bylo upraveno na 7,2

- **Médium pro fermentaci cukrů***

3 g	masový výtažek (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
10 g	pepton (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
5 g	NaCl (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, CZ)
1 ml	barvy na OF test

*pH média na zkvašování cukrů bylo upraveno na 7,2.

1-2 g cukr: D-glukóza (Lachema a.s., Brno, CZ), sacharóza (Lachema a.s., Brno, CZ), trehalóza (Lachema a.s., Brno, CZ), rafinóza (Merk s.r.o., Německo), D-sorbitol (Merk s.r.o., Německo).

Roztoky

- **Fyziologický roztok**

8,5 g NaCl (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, CZ)

Barvicí roztoky

- **Krystalová violet^{*}**

10 g krystalová violet^{*} (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Indie)

100 ml 96% etanol (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, CZ)

^{*}Dané složky byly doplněny 0,1% roztokem šťavelanu amonného (Lachema a.s., Brno, CZ) do objemu 0,5 l a směs byla zfiltrována.

- **Lugolův roztok**

1 g I₂ (Lachema a.s., Brno, CZ)

2 g KI (Lachema a.s., Brno, CZ)

100 ml destilovaná voda

- **Karbofuchsin^{*}**

0,1 g fuchsin bazický (Lachema a.s., Brno, CZ)

100 ml fenol (5% vodný roztok, Reactivul, Rumunsko)

10 ml 96% etanol (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, CZ)

^{*}Před použitím byl roztok zfiltrován.

- **Barva na OF test^{*}**

1 g bromtymolová modř (Chemapol Ltd., Praha, CZ)

25 ml 0,1 M NaOH (ONEX s.r.o., Rožnov pod Radhoštěm, CZ)

475 ml destilovaná voda

^{*}Směs byla uchovávána při 37 °C 1-2 dny v termostatu a několikrát denně promíchána. Po rozpuštění byla zfiltrována.

5.1.4 Činidla pro zjištění redukce dusičnanů

- **Griessovo činidlo I**

1 g kyseliny sulfanilové (Lachema a.s., Brno, CZ) byl rozpuštěn v 75 ml destilované vody a 25 ml ledové kyseliny octové (Lachema a.s., Brno, CZ).

- **Griessovo činidlo II**

0,3 g 1-naftylaminu (Lach-Ner, Neratovice, CZ) bylo povařeno v 70 ml destilované vody, zfiltrováno a k filtrátu bylo přidáno 30 ml ledové kyseliny octové (Lachema a.s., Brno, CZ).

5.1.5 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu

- **TAE pufr (Tris - acetátový pufr)***

242 g	TRISMA - base (Sigma, USA)
100 ml	0,5 M EDTA (pH 8, Lach-Ner, Neratovice, CZ)
57,1 ml	ledová kyselina octová (Lachema a.s., Brno, CZ)

*Jednotlivé složky byly doplněny destilovanou vodou do 1 l a roztok byl vysterilizován při 121 °C 20 minut.

- **Marker**

180 µl	sterilní destilovaná voda
50 µl	nanášecí pufr
20 µl	DNA LADDER (100 bp, 1kb) (BioLabs, Anglie)

- **Nanášení pufr***

10 mg	bromfenolová modř (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)
1,2 ml	glycerol (PENTA, Ing. Petr Švec, Chrudim, CZ)
1,2 ml	0,5M EDTA (LachNer, Neratovice, CZ)
600 µl	10% SDS (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)

*Vše bylo doplněno do 10 ml destilovanou vodou.

- **1,5% agarózový gel**

0,75 g agaróza pro elektroforézu DNA (SeaKem, USA)

50 ml 1x koncentrovaný TAE pufr

- **Etidiumbromid** (10 mg/ml, SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)

5.1.6 Chemikálie a biochemické testy

- Benzín (Ing. Jaromír Bacílek, CSc. – Dorapis, Brno, CZ)
- Etanol (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, CZ)
- Chloroform (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, CZ)
- Imerzní olej (PENTA, Ing. Petr Švec, Praha, CZ)
- Parafinový olej (Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Brno, CZ)
- Peroxid vodíku (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, CZ)
- Zinek práškový (Lachema a.s., Brno, CZ)
- VP test (Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Brno, CZ)
- STREPTOtest (Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Brno, CZ)
- Činidlo pro HIP (Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Brno, CZ)
- Činidlo pro PHS (Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Brno, CZ)
- Činidlo pro VPT I (Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Brno, CZ)
- Činidlo pro VPT II (Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Brno, CZ)

5.1.7 Komponenty pro PCR

dNTP směs	10 mM, PCR dNTP mix (Top-Bio s.r.o., Praha, CZ)
Taq DNA polymeráza	5000 U/ml (BioLabs, Anglie)
Reakční pufr	10x koncentrovaný (Thermopol Buffer B9004S, BioLabs, Anglie)
MgCl ₂	10 mM (Top-Bio s.r.o., Praha, CZ)
100 bp DNA Marker	(BioLabs, Anglie)
1 kb DNA Marker	(BioLabs, Anglie)
DNA primery	(Invitrogen, USA)

Tab. 3. Oligonukleotidy primerů použitých k určení přítomnosti genu pro pediocin PA-1

Primery	Koncentrace	Sekvence nukleotidů (5'-3')	Reference
<i>Pedpro</i>	100 μM	CAAGATCGTTAACCAGTTT	[59, 24]
<i>Ped1041</i>	100 μM	CCGTTGTTCCCATAGTCTAA	[59, 24]

Tab. 4. Oligonukleotidy primerů použitých k určení přítomnosti genu pro thermophilin

Primery	Koncentrace	Sekvence nukleotidů (5'-3')	Reference
<i>thmAf</i>	0,24 μM	TTCGACAGTTGAGGGTGGAT	databáze NCBI [79]
<i>thmAr</i>	0,19 μM	CCATACATGCAAAGCCTCCT	

5.1.8 Přístroje a pomůcky

- Autokláv 135 S, H+P VARIOKLAV- H+P Labortechnik AG, Německo
- Biohazard box EUROFLOW EF/S, Clean AIR, Holandsko
- Termoblok Bio TDB-100, Biotech, Praha, CZ
- Centrifuga laboratorní – chlazená Z 300 K, HERMLE, Labortechnik, Německo
- Vortex Heidolph REAX top, Německo
- Denzitometr DENZI-LA-METER, EMO Brno, CZ

- Fotoaparát PowerShot G6 Canon, Japonsko
- Mikrovlnná trouba Electrolux EMM 2005, Švédsko
- Inkubátor mikrobiologický Memmert, Německo
- Mikroskop laboratorní Motic BA200, Wedgwood AV Ltd., Anglie
- Mikropipety: Nichipet (Japonsko), Hirschmann Laborgerate (Německo), BioHit (Fisher Scientific, Anglie), Eppendorf Reseach (Fisher Scientific, Anglie)
- Termocycler DNA Engine, Biotech, Praha, CZ
- Předvážky KERN 440-47N (Max 2000 g, d = 0,1 g), Německo
- Termostat BT 120, Praha, CZ
- Transiluminátor Biotech (dokumentační systém pro elektroforézu), Praha, CZ
- Zařízení pro elektroforézu model B1A, OWL Separation Systems, Inc., USA
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Major Science MP-300N, Taiwan
- Třepačka LT2, Kavalier a.s., Votice, CZ
- Chladnička Elektrolux ERC 2521 (Elektrolux s.r.o., Praha, CZ)
- Stomacher, Seward, Anglie
- Spektrofotometr Libra S4, Fisher Scientific, spol. s.r.o., CZ
- Běžné laboratorní a mikrobiologické vybavení

5.2 Metodika práce

5.2.1 Izolace bakterií mléčného kvašení

Z jednotlivých mléčných výrobků zakysaných smetan a biojogurtů byl odebrán 1 ml vzorku a ten byl převeden do 9 ml sterilního fyziologického roztoku. V případě klobás bylo naváženo 5 g vzorku, ke kterým bylo přidáno 45 ml sterilního fyziologického roztoku. Následně byly získané směsi homogenizovány pomocí přístroje Stomacher. Byla provedena ředění 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} a z každého ředění bylo inokulováno 0,1 ml na živná média M17 a MRS.

Takto naočkované misky byly kultivovány dle typu výrobku v termostatu při 30 °C a při 37 °C po dobu 48 hodin. Poté byly náhodně vybrány kolonie a izolovány křížovým roztěrem na příslušné půdy pro získání čistých kultur.

5.2.2 Identifikace BMK z morfologického, fyziologického a biochemického hlediska

Gramovo barvení

Kultura byla přenesena na podložní sklo a po zaschnutí byl preparát fixován trojím protažením plamenem. Fixovaný preparát byl překryt 1 minutu roztokem krystalové violeti. Barvivo bylo smyto destilovanou vodou a preparát byl převrstven 1 minutu Lugolovým roztokem, ten byl slit a opláchnut destilovanou vodou. Následovalo odbarvení etanolem, opláchnutí destilovanou vodou a dobarvení 30 - 60 sekund karbolfuchsinem a 1 sekundu opláchnutí destilovanou vodou. Na usušený nátěr byl kápnut imerzní olej a byl mikroskopován za použití imerzního objektivu při zvětšení 16x100 [48, 49].

Dle Gramova barvení se rozlišují čtyři skupiny organizmů. Grampozitivní organizmy, u nichž se krystalová violet' udrží v buněčné stěně, gramnegativní organizmy, které neudrží krystalovou violet' v buněčné stěně, gramlabilní organizmy, jejichž buněčná stěna barvivo neudrží nebo jen velmi špatně a gramvariabilní organizmy, které barví nerovnoměrně. Grampozitivní mikroorganizmy jsou sledovány pod mikroskopem jako tmavě modré a gramnegativní mikroorganizmy jako růžové nebo červené [48].

KOH test

Na podložní sklíčko byla kápnuta kapka 3% KOH a sterilní kličkou v ní rozmíchána čerstvá kultura a bylo pozorováno zda dochází k táhlé reakci. Když se daná kultura táhne, jedná se o gramnegativní mikroorganismus a když se netáhne jedná se o grampozitivní mikroorganismus.

Důkaz produkce katalázy

Hlavní význam enzymu kataláza spočívá v rozkladu peroxidu vodíku, který je pro bakterie toxický. Kataláza rozkládá H_2O_2 na vodu a kyslík [50, 51].

Na podložní sklíčko byl kápnut 3% peroxid vodíku a v něm byla sterilní kličkou rozetřena čerstvá kultura. V pozitivním případě kultura rozkládá peroxid vodíku a uvolňují se bublinky kyslíku, jedná se o katalázapozitivní kmeny, v opačném případě se jedná o katalázanegativní kmeny [50].

Redukce dusičnanů na dusitany

Bakterie mohou redukovat dusičnany na dusitany enzymem nitrátreduktázou [50].

Do vysterilizovaných zkumavek s 5 ml peptonové vody byl přidán 1 ml sterilního 0,1% roztoku KNO_3 a 1 ml tekutého média se zaočkovanou kulturou. Zkumavky byly kultivovány v termostatu při 37 °C 2 dny a následně do nich bylo přidáno v poměru 1:1 Griessovo činidlo I a Griessovo činidlo II v uvedeném pořadí. Následně byl pozorován průběh barevné reakce [52].

Pozitivní reakce, čili redukce dusičnanů na dusitany, se projeví vznikem červeného zbarvení média po přidání Griessových činidel. V případě negativní reakce (bez barevné změny), se provede ověření této reakce, a to přidáním zinku v práškové podobě. Práškový zinek přítomné dusičnany zredukuje na dusitany, což se projeví barevnou změnou do červena [50, 61].

OF test

Dvě zkumavky s OF médiem byly naočkovány vpichem čerstvými kulturami a následně jedna z těchto dvou zkumavek byla převrstvena parafinem. Zkumavky byly kultivovány v termostatu při 37 °C 24 hodin.

OF testem se stanovuje oxidačně fermentační aktivita, tedy zda je kultura schopna využít daný cukr kvašením nebo jen za přítomnosti vzduchu. Pozitivní reakce se projeví změnou barvy média ze zelené na žlutou, popřípadě vznikem vzduchových bublin a trhlin v médiu. Není-li cukr rokládán, médium zůstane beze změny či zmodrá, což ukazuje na alkalizaci půdy. Bakterie rozkládající glukózu aerobně způsobí zežloutnutí živné půdy od hladiny ke dnu zkumavky. Ve zkumavce s parafinem půda barvu nezmění. Bakterie, které zkvašují glukózu způsobí zežloutnutí půdy v obou zkumavkách najednou. Bakterie, které nerozkládají glukózu v žádné zkumavce půdu nezmění nebo ji alkalizují [53].

Kvasná zkouška

Do média na fermentaci cukrů s přísadkou glukózy byla umístěna Durmanova plynovka tak, aby se v ní nevytvořila vzduchová bublina a následně byly tyto zkumavky vysterilovány při teplotě 121 °C 20 minut. Po vychladnutí byly zkumavky naočkovány čerstvými kulturami a kultivovány v termostatu při 30 °C a 37 °C 24 hodin. Po kultivaci byly zaznamenány barevné změny média a tvorba plynu [54].

STREPTOtest 16 (Souprava MIKRO-LA-TEST® STREPTOtest 16 Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Brno, CZ)

Z čerstvé 24 hodinové kultury ve fyziologickém roztoku byla připravena suspenze, jejíž zákal odpovídal 3. stupni McFarlandovy zákalové stupnice. Dále se postupovalo dle návodu přiloženého k soupravě STREPTOtestu 16. Vyhodnocení bylo rovněž provedeno dle přiložených instrukcí.

Voges-Proskauerův test – VP test (Souprava MIKRO-LA-TEST® STREPTOtest 16 Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Brno, CZ)

VP test je určen pro rychlou detekci produkce acetoinu pro účely mikrobiologické diagnostiky. Do zkumavky s 1 ml suspenze o zákalu odpovídajícímu 3. stupni McFarlandovy zákalové stupnice ze STREPTOtestu 16 byl vložen proužek VP testu. Následně byla zkumavka 2 hodiny inkubována v termostatu při 37 °C po dobu 2 hodin. Po této době byla odečtena reakce ve zkumavce a byly přidány 3 kapky činidla pro VPT I a činidla VPT II v tomto pořadí. Obsah zkumavky byl protřepán a inkubován dále 30 minut při 37 °C a po uplynutí této doby byla zhodnocena reakce. V případě pozitivní reakce, čili tvorby acetoinu, vzniká červené zbarvení, negativní reakce je bezbarvá či mírně narůžovělá.

PYRA test (MIKRO-LA-TEST[®] Pyratest 16 Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Brno, CZ)

Na navlhčenou zónu proužku PYRA testu byla nanesena sterilní kličkou 24 hodinová kultura. Proužek byl inkubován 10 minut při teplotě laboratoře a následně byl zakápnut činidlem pro PYRA test. Po 1 - 2 minutách byla odečtena barevná reakce. V pozitivním případě červené zbarvení nebo červenooranžové a v negativním případě žluté zbarvení.

Tolerance k NaCl

Na jednotlivé plotny s médiem M17 s přidavkem 2 %, 4 % a 6,5 % NaCl byly naočkovány jednotlivé kultury mikroorganismů. Po naočkování byly plotny kultivovány v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin a po této době byl zhodnocen nárůst kultur na plotnách.

5.2.3 Identifikace BMK sekvenací

Sekvence byla provedena Státním veterinárním ústavem v Praze, laboratoří molekulárních metod.

Enzymová metoda sekvenování DNA

Tato metoda je založena na použití dideoxyribonukleosid trifosfátů, tedy derivátů normálních deoxyribonukleosidtrifosfátů postrádajících 3'-hydroxylovou skupinu. DNA, která má být sekvenována, je syntetizována *in vitro* ve směsi, která obsahuje jednořetězcové molekuly DNA, enzym DNA – polymerázu, dále směs obsahuje krátký primer DNA, ten umožňuje DNA – polymeráze začít replikaci a čtyři deoxyribonukleosidtrifosfáty (dATP, dCTP, sGTP, sTTP). Je-li do této reakce přidán dideoxyribonukleosidový analog jednoho z nukleotidů, je tento analog začleněn do rostoucího řetězce DNA. V takovém případě, však v řetězci chybí 3'-hydroxylová skupina, což brání připojení dalšího nukleotidu a syntéza tohoto vlákna je ukončena. Při přidání do reakce malého množství dideoxyATP (ddATP), pak ddATP soutěží s nadbytkem normálního deoxyATP a je příležitostně začleňován do rostoucího řetězce DNA. Produktem reakční směsi bude sada různě dlouhých DNA, které budou komplementární k templátové DNA a jejich posledním nukleotidem bude vždy adenin [55].

U dvouvláknové DNA ke stanovení kompletní nukleotidové sekvence je nejdříve nutné od sebe oddělit oba řetězce a jeden z nich použít pro sekvenování jako templát. Ve čtyřech sekvenačních reakcích, které jsou oddělené, se stejným jednořetězcovým DNA – templátem, jsou použity čtyři různé dideoxyribonukleosidtrifosfáty, a to ddATP, ddCTP, ddGTP

a ddTTP. Výsledkem každé reakce je sada molekul DNA, které končí na různých místech původní sekvence a produkty všech čtyř sekvenačních reakcí jsou paralelně vedle sebe elektroforeticky rozděleny v polyakrylamidovém gelu. Nově nasyntetizované fragmenty bývají detekovány fluorescenčně nebo radioaktivně, přičemž označen může být buď primer nebo jeden z deoxyribonukleosidtrifosfátů. V každém sloupci představují proužky fragmenty DNA, které končí vždy stejným druhem nukleotidu, ale v různých pozicích původní DNA. Směrem zdola nahoru pak lze po porovnání všech sloupců odečíst sekvenci nově nasyntetizované DNA a tato sekvence je stejná jako 5' → 3' řetězec původní dvouvláknové DNA [55].

5.2.4 Izolace DNA fenol-chloroformovou extrakcí

Při této reakci dojde nejprve k rozrušení buněčných stěn kombinovaným působením enzymu lysozymu a detergentu SDS (dodecyl sulfát sodný). Získaný lyzát je promíchán se směsí fenolu a chloroformu. Chloroform denaturuje proteiny, rozpouští tuky a napomáhá lepšímu oddělení fází. Fenol sráží bílkoviny. Centrifugací dojde k oddělení fáze s rozpuštěnou DNA a mezifáze s denaturovanými proteiny. Vyizolovaná DNA je následně vysrážena etanolem za nízké teploty a v přítomnosti solí. Shromážděný precipitát nukleových kyselin je rozpuštěn ve vhodném roztoku a nežádoucí typ nukleové kyseliny se odstraní působením příslušné nukleázy [47, 49, 57].

Čerstvá hustě narostená kultura byla centrifugována (10 000 ot./min., 15 minut, 20 °C), následně bylo provedeno promytí 2x destilovanou vodou. Po promytí byl přidán lyzační roztok se sacharózou a čerstvě připravený lysozym o koncentraci 50 mg/ml. Následovala inkubace přes noc při 37 °C. Po inkubaci byl přidán 20% SDS a mikrozkušavky byly znovu inkubovány 30 minut při 55 °C. Následně byla přidána proteináza K a znovu proběhla inkubace 1 hodinu při 55 °C. Následovalo 2x srážení fenolchloroformem a CIZEM (směs chloroformu : izoamylalkoholu), při kterém došlo k oddělení fází. Poté k horní fázi s DNA byl přidán etanol a octan sodný a srážení probíhalo 1,5 hodiny v mrazáku při -30 °C. Po inkubaci následovala centrifugace při 10 000 otáčkách, 30 minut při 4 °C, odstranění supernatantu, vysušení a rozpuštění v TE pufru [49, 57]. Tímto způsobem byla získána DNA studovaných mikroorganismů, se kterou se dále pracovalo.

5.2.5 Důkaz produkce bakteriocinů izolovanými BMK metodou PCR

Detekce genu pro pediocin PA-1

Na základě dostupné literatury bylo testováno, zda vyizolované kmeny *Ped. pentosaceus* obsahují gen pro pediocin PA-1 (AcH) [24, 58].

Byla očekávána velikost DNA fragmentu totožného s pediocinem PA-1, a to 1044 bp [59].

PCR reakční směs k určení genu pro pediocin PA-1 u izolovaných kmenů *Ped. pentosaceus* (celkový objem 25 μ l):

Sterilní destilovaná voda	17,5 μ l
dNTP mix (10mM)	1 μ l (0,4mM)
Primery (Pedpro+Ped1041) (100 μ M)	0,2 μ l + 0,2 μ l (0,8 μ M + 0,8 μ M)
MgCl ₂ (10mM)	1,5 μ l (0,6mM)
Reakční pufr (10x koncentrovaný)	2,5 μ l
<i>Taq</i> – polymeráza	1 U
DNA	2 μ l

PCR program [59]:

- 1.) 1 cyklus 94 °C, 1 min
- 2.) 35 cyklů: 94 °C, 1 min
50 °C, 30 s
72 °C, 1 min
- 3.) 1 cyklus 72 °C, 5 min

Optimalizace metody

Z důvodu negativních výsledků byla metoda optimalizována naředěním DNA (10x, 30x, 50x, 100x) či přidáním různých koncentrací MgCl₂ (0,4 mM; 0,6 mM; 0,8 mM; 1 mM a 1,2 mM).

PCR produkty byly standardně detekovány agarózovou gelovou elektroforézou v 1,5% (w/v) gelu obarvením etidumbromidem [75]. Gely byly dokumentovány digitálním fotoaparátem PowerShot G6 (Canon, Japonsko).

Detekce genu pro thermophilin 13 u izolovaných kmenů *Str. thermophilus*

Přítomnost genu pro thermophilin 13 byla u kmenů *Str. thermophilus* potvrzena využitím komerčně syntetizovaných primerů (Invitrogen, USA) *thmAf/thmAr* (Tab. 4). Primery byly navrženy pomocí programu Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) na základě sekvence genu *thmA* pro *Str. thermophilus* thermophilin 13 (GenBank: U93029.1, NCBI). Velikost PCR produktu (179 bp) byla stanovena dle genu *thmA* (*Streptococcus thermophilus* thermophilin 13 operon) (NCBI databáze).

PCR reakční směs ke stanovení přítomnosti thermophilinu (celkový objem 25 µl):

Sterilní destilovaná voda	17,5 µl
dNTP mix (10mM)	1 µl (0,4 mM)
Primery (thmA F + thmA R) (100 µM)	0,2 µl + 0,2 µl (0,8 µM + 0,8 µM)
MgCl ₂ (10mM)	1,5 µl (0,6 mM)
Reakční pufr (10x koncentrovaný)	2,5 µl
<i>Taq</i> – polymeráza	0,1 U
DNA	2 µl

PCR program:

- 1.) 1 cyklus 95 °C, 5 min
- 2.) 30 cyklů: 95 °C, 30 s
58 °C, 30 s
72 °C, 30 s
- 3.) 1 cyklus 72 °C, 5 min

PCR produkty byly standardně detekovány agarózovou gelovou elektroforézou v 1,5% (w/v) gelu obarvením etidumbromidem [75]. Gely byly dokumentovány digitálním fotoaparátem PowerShot G6 (Canon, Japonsko).

5.2.6 Stanovení produkce bakteriocinů izolovanými BMK měřením optické denzity

Z čerstvě narostlých kultur kmenů *Ped. pentosaceus* bylo odstředěno 10 ml supernatantu při 3000 otáčkách, 20 minut a 4 °C. Supernatant zbavený buněk byl upraven 1 M NaOH na pH 6. Supernatant byl přidán k 50 ml kultury indikátorového kmene *Listeria innocua* CCM 4030 v blízké exponenciální fázi (cca 3 hodiny) a následně takto připravené vzorky byly inkubovány při 37 °C a každé dvě hodiny po dobu 24 hodin byla zaznamenávána optická denzita při 600 nm. Životoschopné buňky byly určeny na agarových plotnách s *Listeria* Oxford Medium Base. Bylo zvoleno ředění 10^{-4} a 10^{-5} . Kontrola byla provedena s kulturou indikátorového kmene bez přídavku supernatantu [12, 24].

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Izolace a identifikace BMK

Celkem bylo izolováno 29 náhodně vybraných kolonií získaných z výrobků zakysaná smetana, klobása a biojogurt. Izolované kolonie bakterií mléčného kvašení měly bílou či mléčnou barvu s mléčně nakyslou vůní, byly malé a vypouklé s hladkým okrajem a lesklým povrchem. Pro ověření kontroly byly aplikované metody prováděny současně se sbírkovými kmeny.

6.1.1 Charakteristika izolátů z morfoloického, fyzioloického a biochemického hlediska

Tvar buněk, Gramovo barvení, KOH test a důkaz produkce katalázy

Z morfoloického hlediska se u 29 izolátů jednalo o koky a tyčinky, které byly pomocí Gramova barvení určeny jako grampozitivní. Buňky měly pod mikroskopem tmavě modré zbarvení a byly nepohyblivé. Modré zbarvení bylo důkazem, že z buněčné stěny nebyla etalonem vyplavována krystalová violet' a vznikl komplex barvivo – jód – složky buněčné stěny. Grampozitivita byla potvrzena KOH testem, který byl vyhodnocen jako negativní. BMK postrádají enzym katalázu, který by rozkládal peroxid vodíku na vodu a kyslík, jsou proto označovány za katalázanegativní mikroorganizmy [1, 2, 3, 4, 9, 10, 48, 60, 72]. Také u všech izolátů bylo zjištěno, že neobsahují zmíněný enzym. Proto bylo z dosažených výsledků usuzováno, že izolované mikroorganizmy jsou bakterie mléčného kvašení. Výsledky testů jsou uvedeny v Tab. 5 a 6.

Z celkového počtu vyizolovaných kmenů byly vyloučeny ty, které dávaly pozitivní reakci na katalázu, z důvodu, že se nejednalo o bakterie mléčného kvašení, ale pravděpodobně se mohlo jednat o příslušníky rodu *Micrococcus*, které jsou katalázapozitivní [71].

Vzhledem k tomu, že obvyklými složkami jogurtové kultury jsou *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, bylo předpokládáno, že podle tvaru buněk by se mohlo jednat o uvedené mikroorganizmy. Ze zakysané smetany byl předpokládán výskyt mikroorganizmů základní (smetanové) kultury: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*

a *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. V případě klobás přicházel v úvahu i rod *Pediococcus* [76, 77].

Tab. 5. Výsledky testů aplikovaných k identifikaci izolátů*

Izoláty	Test			
	Tvar buněk	Gramovo barvení	KOH test	Kataláza
1 - 16	koky	+	-	-
17 - 25	tyčinky	+	-	-
26 - 29	koky	+	-	-

*+ pozitivní reakce ; - negativní reakce

Tab. 6. Výsledky testů provedených s kontrolními sbírkovými kmeny*

Sbírkové kmeny	Test			
	Tvar buněk	Gramovo barvení	KOH test	Kataláza
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 414	koky	+	-	-
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 885	koky	+	-	-
<i>Str. thermophilus</i> CCDM 7	koky	+	-	-
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	koky	+	-	-
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CCDM 66	tyčinky	+	-	-

*+ pozitivní reakce ; - negativní reakce

Redukce dusičnanů na dusitany

Při zjišťování schopnosti mikroorganismů redukovat dusičnany na dusitany se pozitivní reakce projeví změnou zbarvení média na červenou barvu po přidání Griessových činidel. Dále se provádí ověření negativní reakce, a to přidáním zinku v práškové podobě. Práškový zinek přítomné dusičnany zredukuje na dusitany, což se projeví barevnou změnou do červená [61]. Je obecně známo, že bakterie mléčného kvašení nemají schopnost redukovat dusičnany na dusitany [60]. Studované izoláty neredukovaly dusičnany na dusitany (viz Tab. 7), čímž byla potvrzena předchozí úvaha, že vyizolované mikroorganismy jsou bakterie mléčného kvašení.

Tab. 7. Výsledky zkoušky redukce dusičnanů na dusitany

Izoláty a sbírkové kmeny	Barevná reakce pro přidání Griessových činidel	Barevná změna po přidání Zn
1 - 16	Beze změny	Červená
17 - 25	Beze změny	Červená
26 - 29	Beze změny	Červená
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 414	Beze změny	Červená
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 885	Beze změny	Červená
<i>Streptococcus thermophilus</i> CCDM 7	Beze změny	Červená
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	Beze změny	Červená
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> CCDM 66	Beze změny	Červená

Kvasná zkouška a OF test

K důkazu fermentace glukózy a produkce plynu byla provedena kvasná zkouška. Všechny izolované mikroorganismy glukózu fermentovaly, avšak plyn netvořily, viz Tab. 8. Produkce plynu byla zaznamenána pouze u sbírkového kmene *L. mesenteroides* subsp. *mesen-*

teroides, což je typický projev tohoto mikroorganismu [62]. To vyloučilo domněnku, že by některý z izolovaných koků mohl být příslušníkem rodu *Leuconostoc*.

OF testem lze zjistit, zda se jedná o aerobní, fakultativně anaerobní či anaerobní mikroorganismus. U všech zkoumaných izolátů došlo k utilizaci cukru za vzniku kyseliny, původní zelená barva média se změnila na žlutou, jak ve zkumavce bez parafinu, tak i ve zkumavce s parafinem. Tím bylo prokázáno, že izolované kultury jsou fakultativně anaerobní mikroorganismy, protože dokáží využít cukr jak aerobně tak anaerobně [53].

Tab. 8. Výsledky získané provedením kvasné zkoušky u izolátů a sbírkových kmenů

Izoláty a sbírkové kmeny	Změna barvy média	Produkce plynu
1	Médium celé zežloutlo	-
2	Médium celé zežloutlo, v Durmanově plynovce beze změny barvy média	-
3 - 16	Médium celé zežloutlo	-
17 - 25	Médium celé zežloutlo	-
26	Médium celé zežloutlo, v Durmanově plynovce beze změny barvy média	-
27	Médium celé zežloutlo, v Durmanově plynovce beze změny barvy média	-
28	Médium celé zežloutlo	-
29	Médium celé zežloutlo	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 414	Médium celé zežloutlo	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 885	Médium celé zežloutlo	-
<i>Streptococcus thermophilus</i> CCDM 7	Médium celé zežloutlo, v Durmanově plynovce beze změny barvy média	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	Médium celé zežloutlo	+
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> CCDM 66	Médium celé zežloutlo	-

Test na zkvašování cukrů

Zmíněným testem byla zjišťována schopnost izolátů fermentovat sacharózu, trehalózu, rafinózu a sorbitol, viz Tab. 9. Tyto cukry byly zvoleny na základě studie Guessase a Kihala [78].

Z porovnání různých publikací, které se ve vyhodnocení zkvašování cukrů liší, vyplývá, že zkvašování cukrů je závislé na daném kmenu [28, 63, 65, 66].

Izoláty 1, 4 – 8 a 10 - 16 byly díky jejich zkvašování glukózy, trehalózy, sacharózy, i když některé zdroje uvádí negativní zkvašování sacharózy, předem určeny jako pediokoky [28, 63]. Později bylo toto stanovení dokázáno sekvenací, pomocí níž byly dané izoláty určeny jako *Pediococcus pentosaceus* [28, 63, 64].

Izoláty 17 - 25 z předchozích charakteristik byly považovány za představitele rodu *Lactobacillus*. Zkvašovaly glukózu, rafinózu, sorbitol pozitivně a trehalózu negativně, lišily se ve fermentaci sacharózy [65]. Později byly sekvenací izoláty 17 - 23 identifikovány jako *Lactobacillus rhamnosus* a izoláty 24 a 25 jako *Lactobacillus casei*.

Izoláty 2, 26 a 27 zkvašovaly glukózu a sacharózu pozitivně a negativně trehalózu, rafinózu a sorbitol [66]. Tyto izoláty poskytovaly stejné výsledky jako sbírkový *Str. thermophilus* CCDM 7, tak byly předem určeny jako *Str. thermophilus*, což bylo později potvrzeno sekvenací.

Izoláty 3, 9, 28 a 29 zkvašovaly glukózu, sacharózu, trehalózu, sorbitol pozitivně a rafinózu negativně [28, 66, 67]. Tyto izoláty dávaly jiné reakce než sbírkové kmeny laktokoků, což vyvrátilo domněnku, že se může jednat o *Lc. lactis* subsp. *lactis* nebo *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, proto musely být provedeny další testy k bližší identifikaci.

Výsledky mohly být zkresleny z důvodu mírné změny tmavě zelené barvy fermentačního média na světlejší odstín po vyautoklávování.

Tab. 9. Vyhodnocení zkvašování cukrů*

Izoláty a sbírkové kmeny	glukóza	sacharóza	trehalóza	rafinóza	sorbitol
1	+	+	+	-	-
2	+	+	-	-	-
3	+	+	+	-	+
4 – 8	+	+	+	-	-
9	+	+	+	-	+
10 - 16	+	+	+	-	-
17 - 23	+	-	-	+	+
24	+	+	-	+	+
25	+	+	-	+	+
26	+	+	-	-	-
27	+	+	-	-	-
28	+	+	+	-	+
29	+	+	+	-	+
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 414	+	+	+	+	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 885	+	-	+	-	-
<i>Streptococcus thermophilus</i> CCDM 7	+	+	-	-	-
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> CCDM 66	+	-	+	-	-

*+ pozitivní reakce ; - negativní reakce

STREPTOtest 16 a PYRA test

Souprava STREPTOtest 16 je určena pro rutinní identifikaci streptokoků. Tento test byl použit k ověření předpokládaných streptokoků a jako doplňkový test pro zbývající izoláty. Součástí STREPTOtestu 16 byl i VP test, který je určen na rychlou detekci produkce acetoinu [61]. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 10.

Identifikace vybraných izolátů byla provedena pomocí diagnostického seznamu pro soupravu STREPTOtest 16 a zároveň pomocí identifikačního programu TNW. Zmíněným počítačovým programem byly izoláty 2, 26 a 27 vyhodnoceny jako *Streptococcus acidominimus*. Tím byla prokázána předchozí úvaha, že se jedná o rod *Streptococcus*. Ostatní druhy mikroorganismů daný počítačový program hodnotil jako neidentifikovatelné či nepříliš typické, tak z daného testu byly hodnoceny výsledky jen některých testů např. reakce LAP testu (test na leucin aminopeptidázu), dále kontrola reakce cukrů, které byly použity při testu na zkvašování cukrů a VP test. Z VP testu na produkci acetoinu, u izolátů 3, 9, 28 a 29 by se dalo usuzovat, že se jedná o enterokoky, protože dávaly pozitivní reakci, zatímco kmeny laktokoků jsou na acetoin negativní, což by potvrdilo i předchozí určení z testu na zkvašování cukrů, že se nejedná o laktokoky [65]. Izoláty 1, 4 – 8 a 10 - 16 byly také negativní na produkci acetoinu, což ukazovalo na předchozí domněnku, že se může jednat o rod *Pediococcus* [65].

Tab. 10. Vyhodnocení STREPTOtestu 16 provedeného u vybraných izolátů*

Izoláty	VPT	HIP	PHS	LAP	GRL	aGA	ESL	ARG	URE	MAN	SOR	TRE	LAC	RAF	INU	MLB	RIB
1	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
2	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
3	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
4-8	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
9	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
10-16	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
26	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
27	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
28	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
29	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+

*+ pozitivní reakce ; - negativní reakce

Izolované mikroorganismy byly blíže identifikovány dle návodu přiloženého ke STREPTOtestu 16 a PYRAtestu (Tab. 11). Červené zbarvení značí pozitivní reakci PYRAtestu a žluté zbarvení naopak reakci negativní. Červené zbarvení bylo pozorováno u izolátů 3, 9, 28 a 29 a sbírkových laktokoků. U zbývajících izolovaných kmenů došlo k negativnímu žlutému zbarvení. Rod *Lactobacillus* je dle přiloženého návodu ke STREPTOtestu 16 pouze PYR negativní. Rody *Streptococcus* a *Pediococcus* jsou PYR negativní a LAP pozitivní. Zatímco rod *Enterococcus* a *Lactococcus* je PYR i LAP pozitivní [28]. Tento test potvrdil předchozí identifikaci streptokoků. I když PYRAtest blíže nerozlišil laktokoky a enterokoky, ale vzhledem k dřívějšímu vyloučení laktokoků, ukazovala pozitivní reakce spíše na enterokoky.

Tab. 11. Vyhodnocení PYRA testu*

Izoláty a sbírkové kmeny	Barevná změna PYRA testu
1	-
2	-
3	+
4 - 8	-
9	+
10 – 16	-
17 - 25	-
26	-
27	-
28	+
29	+
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 414	+
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 885	+
<i>Streptococcus thermophilus</i> CCDM 7	-
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> CCDM 66	-

*+ pozitivní reakce ; - negativní reakce

Tolerance k NaCl

Výsledky testu tolerance k NaCl jsou uvedeny v Tab. 12 a 13. Streptokoky jsou citlivé na přítomnost již 2 % NaCl, což potvrzuje správnost identifikace v případě izolátů 2, 26 a 27 jako právě streptokoků [65, 66]. *Lc. lactis* subsp. *lactis* snáší 4 % NaCl, zatímco *Lc. lactis* subsp. *cremoris* snáší nejvíce 2 % NaCl [2, 11, 65, 66, 68]. Avšak enterokoky a pediokoky dokáží růst v přítomnosti i 6,5 % NaCl [16, 18, 66, 68, 69]. Dle získaných výsledků, byla tedy vyvrácena domněnka, že by se v případě izolátů 3, 9, 28 a 29 mohlo jednat o laktokoky. Nejednalo se ani o pediokoky, neboť dané izoláty se lišily ve fermentaci sorbitolu a ve výsledcích PYRAtestu.

Izoláty 17 – 25 rostly pouze v přítomnosti 2 % NaCl, z čehož vyplývá, že by se mohlo jednat o laktobacily, nejen díky tvaru buněk, ale i předchozí fermentaci cukrů [65, 68]. Avšak i v případě tolerance k NaCl se publikace liší v závislosti na daném kmenu [65, 68].

Tab. 12. Výsledky testu tolerance k NaCl*

Obsah NaCl v médiu	Izoláty										
	1	2	3	4 - 8	9	10 - 16	17 - 25	26	27	28	29
2 % NaCl	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
4 % NaCl	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
6,5 % NaCl	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+

*+ růst kmene při dané koncentraci NaCl; - inhibice růstu kmene danou koncentrací NaCl

Tab. 13. Výsledky testu tolerance k NaCl*

Obsah NaCl v médiu	Sbírkové kmeny			
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 414	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 885	<i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i> CCDM 7	<i>Lactobacillus bulga-</i> <i>ricus</i> CCDM 66
2 % NaCl	+	+	-	+
4 % NaCl	+	-	-	-
6,5 % NaCl	-	-	-	-

*+ růst kmene při dané koncentraci NaCl; - inhibice růstu kmene danou koncentrací NaCl

6.2 Identifikace BMK sekvenací

Sekvence byla realizována Státním veterinárním ústavem v Praze, laboratoří molekulárních metod z poskytnuté izolované DNA jednotlivých mikroorganismů. Výsledky sekvenace jsou uvedeny v Tab. 15. a 16. Byla provedena identifikace všech 29 izolovaných bakterií mléčného kvašení na základě primerů pro 16S rRNA. Sumarizace výsledků je uvedena v Tab 14.

Tab. 14. Souhrn identifikace mikroorganismů sekvenací

Počet izolátů	identifikace
13	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
3	<i>Streptococcus thermophilus</i>
3	<i>Enterococcus faecalis</i>
2	<i>Lactobacillus casei</i>
1	<i>Enterococcus faecium</i>

Tab. 15. Výsledky sekvenace (1)

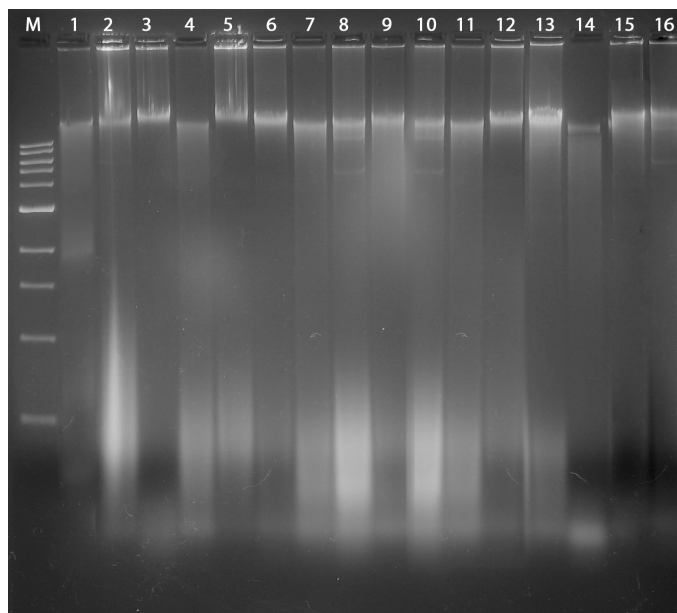
Č.	Výsledek	Seq	B L A S T						
			Genbank acc. no.	Total score	Query coverage	E value	Identities	Gaps	Average seq coverage
1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	556	AB481102.1	1022	100%	0.0	556/557 (100%)	1/557	2
2	<i>Streptococcus thermophilus</i>	510	DQ911624.1	942	100%	0.0	510/510 (100%)	0/510	2
3	<i>Enterococcus faecalis</i>	539	AB507170.1	992	100%	0.0	538/539 (99%)	0/539	2
4	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	555	AB481102.1	1022	99%	0.0	553/553 (100%)	0/553	2
5	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	554	AB481102.1	1022	99%	0.0	553/553 (100%)	0/553	2
6	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	551	AB481102.1	1018	100%	0.0	551/551 (100%)	0/551	2
7	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	556	AB481102.1	1022	100%	0.0	556/557 (99%)	1/551	2
8	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	555	AB481102.1	1022	99%	0.0	553/553 (100%)	0/553	2
9	<i>Enterococcus faecium</i>	536	EU722747.1	990	100%	0.0	536/536 (100%)	0/536	2

Tab. 16. Výsledky sekvenace (2)

Č.	Výsledek	Seq	B L A S T						
			Genbank acc. no.	Total score	Query coverage	E value	Identities	Gaps	Average seq cover- age
10	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	554	AB481102.1	1022	99%	0.0	553/553 (100%)	0/553	2
11	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	556	AB481102.1	1022	100%	0.0	556/557 (100%)	1/557	2
12	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	556	AB481102.1	1022	100%	0.0	556/557 (100%)	1/557	2
13	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	552	AB481102.1	1018	99%	0.0	551/551 (100%)	0/551	2
14	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	554	AB481102.1	1022	99%	0.0	553/553 (100%)	0/553	2
15	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	556	AB481102.1	1022	100%	0.0	556/557 (100%)	1/557	2
16	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	555	AB481102.1	1022	99%	0.0	553/553 (100%)	0/553	2
17	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	546	AP011548.1	1009	100%	0.0	546/546 (100%)	0/546	2
18	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	541	AP011548.1	1000	100%	0.0	541/541 (100%)	0/541	2
19	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	546	AP011548.1	1005	100%	0.0	545/546 (99%)	0/546	2
20	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	543	AP011548.1	1003	100%	0.0	543/543 (99%)	0/543	2
21	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	546	AP011548.1	1009	100%	0.0	546/546 (100%)	0/546	2
22	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	465	AP011548.1	852	100%	0.0	463/465 (99%)	0/465	2
23	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	438	FM179323.1	809	100%	0.0	438/438 (100%)	0/438	2
24	<i>Lactobacillus casei</i>	193	GU299083.1	357	100%	E-95	193/193 (100%)	0/193	1
25	<i>Lactobacillus casei</i>	320	GU299083.1	588	100%	7E-165	319/320 (99%)	0/320	1
26	<i>Streptococcus thermophilus</i>	528	DQ911624.1	976	100%	0.0	528/528 (100%)	0/528	2
27	<i>Streptococcus thermophilus</i>	527	DQ911624.1	974	100%	0.0	527/527 (100%)	0/527	2
28	<i>Enterococcus faecalis</i>	536	AB507170.1	979	100%	0.0	533/536 (99%)	0/536	2
29	<i>Enterococcus faecalis</i>	539	AB507170.1	992	100%	0.0	538/539 (99%)	0/539	2

6.3 Izolace DNA fenol – chloroformovou extrakcí

Fenol-chloroformovou extrakcí byla získána DNA z izolovaných a sbírkových mikroorganismů, která byla dále použita k detekci genů pro bakteriociny metodou PCR. Přítomnost DNA byla ověřena elektroforézou, která prokázala pozitivní výsledky viz Obr. 4 a 5.

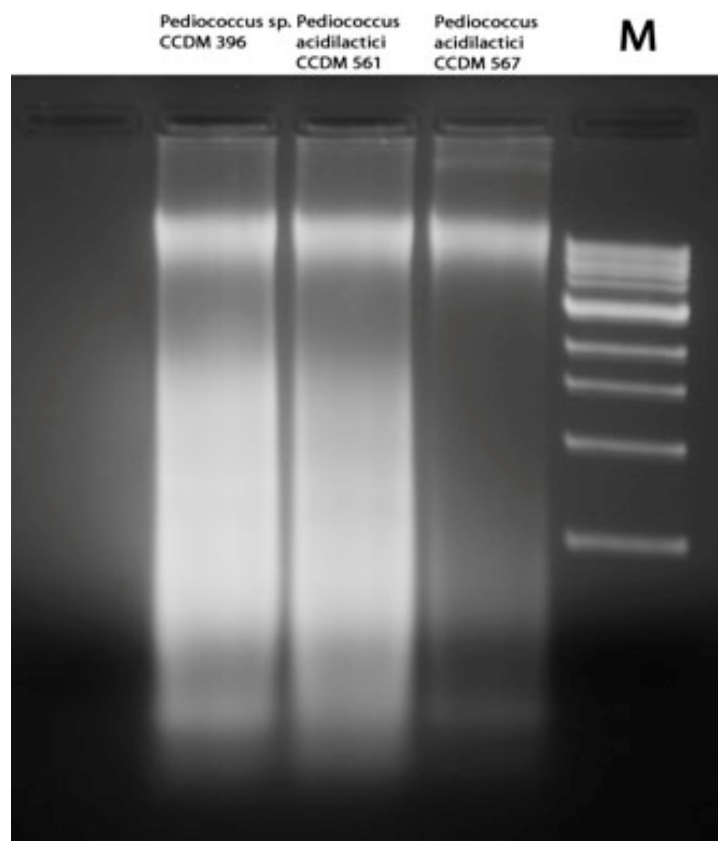


Obr. 4. Izolace DNA fenol-chloroformovou extrakcí

M.....1 kb DNA Marker

1.....	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1
2.....	<i>Streptococcus thermophilus</i>	2
3.....	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	4
4.....	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	5
5.....	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	6
6.....	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	7
7.....	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	8
8.....	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	10
9.....	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	11
10.....	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	12

11..... <i>Pediococcus pentosaceus</i>	13
12..... <i>Pediococcus pentosaceus</i>	14
13..... <i>Pediococcus pentosaceus</i>	15
14..... <i>Pediococcus pentosaceus</i>	16
15..... <i>Streptococcus thermophilus</i>	26
16..... <i>Streptococcus thermophilus</i>	27



Obr. 5. Izolace DNA fenol-chloroformovou extrakcí

Pediococcus sp. CCDM 369.....sbírkový kmen

Pediococcus acidilactici CCDM 561..... sbírkový kmen

Pediococcus acidilactici CCDM 567..... sbírkový kmen

M.....1 kb DNA Marker

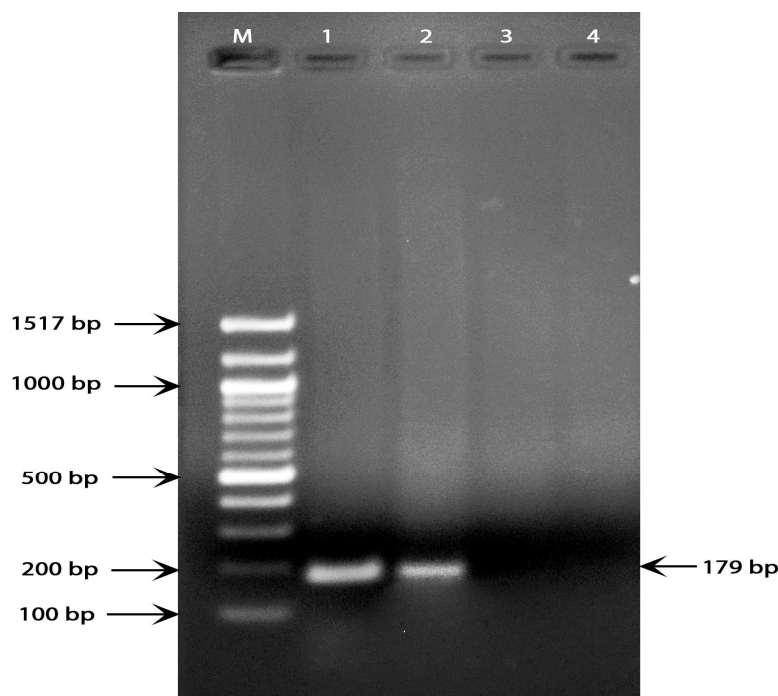
6.4 Detekce genů pro bakteriociny u izolovaných BMK metodou PCR

K detekci genů pro specifické bakteriociny metodou PCR byly vybrány kmeny *Streptococcus thermophilus* a *Pediococcus pentosaceus*.

6.4.1 Detekce genu pro thermophilin 13 u kmenů *Streptococcus thermophilus*

K ověření přítomnosti genu pro thermophilin 13 byly použity izolované kmeny *Str. thermophilus* 2, *Str. thermophilus* 26 a *Str. thermophilus* 27. Jako kontrola sloužil sbírkový kmen *Str. thermophilus* CCDM 69, u kterého byl již dříve detekován gen pro thermophilin 13.

PCR produkty o předpokládané velikosti 179 bp byly zaznamenány u jednoho z izolovaných kmenů, a to *Str. thermophilus* 26. U dalších dvou izolátů *Str. thermophilus* (2; 27) nebyla zjištěna přítomnost genu pro thermophilin 13. U zmíněných izolátů by bylo zajímavé studovat případnou přítomnost genů pro jiné typy thermophilinu, jako například thermophilin 347, thermophilin A, thermophilin T nebo thermophilin Adria [29].



Obr. 6. Amplifikace sekvence genu pro thermophilin 13

M.....100 bp DNA Marker

1..... *Streptococcus thermophilus* CCDM 69

2..... *Streptococcus thermophilus* 26

3..... *Streptococcus thermophilus* 2

4..... *Streptococcus thermophilus* 27

6.4.2 Detekce genu pro bakteriocin PA-1 u kmenů *Pediococcus pentosaceus*

V práci Swetwiwathana a kol. [58] byl z tradičního thajského fermentovaného hovězího masa (tzv. mum) izolován kmen M13 patřící mezi bakterie mléčného kvašení, který byl určen jako bakteriocin produkující kmen. Tento kmen byl dále studován z hlediska identifikace kmenů využitím 16S rDNA sekvence, a také využitím mikrotestu API 50 CH. Dále byla studována identifikace bakteriocinů produkovaných daným kmenem, a to pomocí aminokyselinové sekvence a PCR amplifikace DNA se specifickými primery pro geny kódující dané bakteriociny. Na základě mikroskopie byly určeny grampozitivní koky, shlukující se do tetrad a pomocí rychlého mikrotestu API 50 CH byly identifikovány jako *Pediococcus pentosaceus* se 100% pravděpodobností. Tato identifikace byla také potvrzena i kompletní DNA sekvenční analýzou, která byla také 100% totožná.

Molekulární hmotnost purifikovaných bakteriocinů byla kolem 4 627 Da, tato hmotnost je identická k pediocinu AcH nebo PA-1, které jsou produkovány různými kmeny *Pediococcus acidilactici*. Potvrzení bylo provedeno sekvenováním PCR amplikonu genu kódujícího tyto bakteriociny s pediocinem PA-1. Genově specifické primery ukazovaly 100% totožnost sekvencí k pediocinu PA-1 [58].

Tedy na základě dostupné literatury bylo zkoumáno, zda sbírkové kmeny *Pediococcus* sp. CCDM 396, *Pediococcus acidilactici* CCDM 561, *Pediococcus acidilactici* CCDM 567 a izolované kmeny *Pediococcus pentosaceus* 1, *Pediococcus pentosaceus* 4 – 8 a *Pediococcus pentosaceus* 10 - 16 obsahují gen pro bakteriocin PA-1 [24, 58]. Byly použity specifické primery pro pediocin PA-1 Pedpro a Ped 1041 a byly předpokládány amplikony totožné k pediocinu PA-1 o velikosti 1 044 bp [59].

Ani u jednoho ze sbírkových kmenů *Pediococcus* sp. 396, *Pediococcus acidilactici* CCDM 561, *Pediococcus acidilactici* CCDM 567 a izolovaných kmenů *Pediococcus pentosaceus* nebyl zaznamenán očekávaný amplikon o velikosti 1 044 bp. Proto byla provedena optimalizace metody přidavkem různých koncentrací $MgCl_2$ do PCR reakční směsi. Tato optimalizace opět ukázala negativní výsledek. Následně byla provedena optimalizace různých množství DNA, protože vysoká koncentrace DNA se může podílet na negativním výsledku [47]. Ani tento způsob řešení nevedl k pozitivnímu výsledku. Bylo tedy usouzeno, že námi testované kmeny nemají gen pro bakteriocin PA-1. V budoucnu by tedy bylo zajímavé zabývat se detekcí genů pro jiné pediociny (např. pediocin ST 18, pediocin A či pediocin N5P) u studovaných izolátů *Pediococcus pentosaceus* [12, 24, 32].

Ve studii Todorova a Dickse byl zaznamenán amplikon podobný genu pro pediocin PA-1 v případě provedení metody PCR s genomovou DNA izolovanou z *Ped. pentosaceus* ST44AM a s primery navrženými dle genu pro pediocin PA-1 (Pedpro a Ped 1041). Sekvenování PCR produktu prokázalo vysokou homologii s genem pro pediocin PA-1. Dále byla provedena metoda PCR s upravenou DNA (zbavenou plazmidu) izolovanou z téhož kmene *Ped. pentosaceus* ST44AM s primery uvedenými výše. V tomto případě nebyl získán žádný PCR produkt, stejně jako v této diplomové práci. Práce Todorova a Dickse tedy poukázala na to, že gen pro pediocin se zřejmě nachází na plazmidu [24]. Z toho vyplývá, že izolované kmeny pediokoků nejspíše neobsahovaly plazmidy kódující gen pro pediocin PA-1.

Pro zjištění, zda by mohly izolované kmeny *Ped. pentosaceus* produkovat jiné bakteriociny než PA-1, byla provedena metoda stanovení produkce bakteriocinů měřením optické denzity, viz kapitola 6.5.

6.5 Stanovení produkce bakteriocinů izolovanými BMK měřením optické denzity

Metoda byla provedena s izolovanými kmeny *Ped. pentosaceus* k určení, zda jsou dané kmeny schopny produkovat pediociny. Jako indikátorový kmen byla použita *Listeria innocua* CCM 4030, protože pediociny mají antilisteriální účinek, který je charakteristický pro bakteriociny třídy II [24]. V použité metodě byla sledována optická denzita při 600 nm a počty *L. innocua* po dobu 24 h.

Optická denzita klesla již po přidání upraveného supernatantu bakteriocinu ke kultuře indikátorového kmene *Listeria innocua* CCM 4030 (Tab. 16). Následně optická denzita vzorků s přídatkem bakteriocinu klesala každé dvě hodiny až po dobu 8 hodin. Zatímco optická denzita samotného indikátorového kmene, tedy kontrolního vzorku, rostla. Měření bylo z časových důvodů po 8 hodinách přerušeno a vzorky byly inkubovány přes noc při 37 °C. Další měření bylo provedeno po 20, 22 a 24 hodinách, kdy bylo naopak pozorováno zvýšení optické denzity u vzorků s přídatkem bakteriocinu. To mohlo být pravděpodobně způsobeno oslabením či úplným zastavením inhibiční schopnosti bakteriocinu.

Výrazný úbytek životaschopných buněk (z $1,9 \cdot 10^8$ CFU/ml na $9,5 \cdot 10^6$ CFU/ml viz Tab. 17) ve vzorcích s přidáním bakteriocinem nastal po čtyřech hodinách inkubace, kdy účinek působení bakteriocinu byl největší. Poté v následujících dvouhodinových časových intervalech inkubace došlo k opětovnému vzrůstu životaschopných buněk na miskách, což ukazuje, že účinek bakteriocinu byl pouze bakteriostatický. Oproti studii Todorova a Dickse, kteří uvedli, že po 15 hodinách v přítomnosti bakteriocinu ST44AM, produkovaného kmenem *Ped. pentosaceus* ST44AM, nebyly pozorovány žádné životaschopné buňky indikátorového kmene *Listeria innocua* 2030C. Z čehož plyne, že účinek bakteriocinu ST44AM byl bakteriocidní [24].

Optická denzita a počty získané pro indikátorový kmen kontrolního vzorku se během 24 hodin kultivace významně nelišily.

Tab. 17. Výsledky měření optické denzity a CFU/ml

BMK 13 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Čas 0 přídavek superna- tantu		Čas 1 Po 2 hodinách inkubace při 37 °C		Čas 2 Po 4 hodinách inkubace při 37 °C		Čas 3 Po 6 hodinách inkubace při 37 °C		Čas 4 Po 8 hodinách inkubace při 37 °C		Čas 5 Po 20 hodinách inkubace při 37 °C		Čas 6 Po 22 hodinách inkubace při 37 °C		Čas 7 Po 24 hodinách inkubace při 37 °C	
	OD ₆₀₀	CFU/ml	OD ₆₀₀	CFU/ml	OD ₆₀₀	CFU/ml	OD ₆₀₀	CFU/ml	OD ₆₀₀	CFU/ml	OD ₆₀₀	CFU/ml	OD ₆₀₀	CFU/ml	OD ₆₀₀	CFU/ml
1	0,804	1,3 · 10 ⁸	0,708	1,1 · 10 ⁸	0,423	9,9 · 10 ⁶	0,375	1,5 · 10 ⁷	0,305	4,3 · 10 ⁷	1,146	2,6 · 10 ⁸	1,049	1,3 · 10 ⁸	0,963	9,4 · 10 ⁷
4	0,987	2,6 · 10 ⁸	0,851	1,3 · 10 ⁸	0,517	1,3 · 10 ⁷	0,403	1,9 · 10 ⁷	0,361	5,6 · 10 ⁷	1,021	2,0 · 10 ⁸	0,989	9,8 · 10 ⁷	0,971	9,3 · 10 ⁷
5	1,013	3,0 · 10 ⁸	0,893	1,5 · 10 ⁸	0,488	1,5 · 10 ⁷	0,385	2,0 · 10 ⁷	0,294	4,8 · 10 ⁷	0,997	1,9 · 10 ⁸	0,984	9,1 · 10 ⁷	0,937	7,6 · 10 ⁷
6	1,069	3,1 · 10 ⁸	0,975	1,7 · 10 ⁸	0,605	1,2 · 10 ⁷	0,507	2,0 · 10 ⁷	0,456	6,3 · 10 ⁷	0,924	1,5 · 10 ⁸	0,836	8,7 · 10 ⁷	0,837	6,2 · 10 ⁷
7	0,932	1,8 · 10 ⁸	0,874	1,4 · 10 ⁸	0,449	1,0 · 10 ⁷	0,384	1,7 · 10 ⁷	0,333	4,6 · 10 ⁷	0,982	1,7 · 10 ⁸	0,974	8,3 · 10 ⁷	0,874	5,3 · 10 ⁷
8	0,743	1,1 · 10 ⁸	0,639	1,0 · 10 ⁸	0,524	9,8 · 10 ⁶	0,462	1,3 · 10 ⁷	0,412	5,8 · 10 ⁷	0,755	1,2 · 10 ⁸	0,698	7,9 · 10 ⁷	0,609	6,9 · 10 ⁷
10	0,918	1,6 · 10 ⁸	0,861	1,2 · 10 ⁸	0,426	9,5 · 10 ⁶	0,337	1,0 · 10 ⁷	0,296	4,5 · 10 ⁷	0,823	1,5 · 10 ⁸	0,819	8,8 · 10 ⁷	0,792	6,1 · 10 ⁷
11	0,951	1,9 · 10 ⁸	0,806	1,3 · 10 ⁸	0,431	1,1 · 10 ⁷	0,365	1,4 · 10 ⁷	0,249	4,4 · 10 ⁷	0,838	1,5 · 10 ⁸	0,824	8,6 · 10 ⁷	0,813	5,9 · 10 ⁷
12	0,923	1,7 · 10 ⁸	0,885	1,5 · 10 ⁸	0,476	1,0 · 10 ⁷	0,368	1,4 · 10 ⁷	0,335	4,7 · 10 ⁷	0,907	1,8 · 10 ⁸	0,911	9,3 · 10 ⁷	0,869	8,7 · 10 ⁷
13	0,977	2,0 · 10 ⁸	0,816	9,0 · 10 ⁷	0,546	1,8 · 10 ⁷	0,439	2,3 · 10 ⁷	0,393	5,9 · 10 ⁷	0,898	1,5 · 10 ⁸	0,885	9,1 · 10 ⁷	0,873	8,1 · 10 ⁷
14	1,103	3,2 · 10 ⁸	0,913	1,2 · 10 ⁸	0,515	1,1 · 10 ⁷	0,476	1,5 · 10 ⁷	0,357	5,5 · 10 ⁷	1,113	3,3 · 10 ⁸	1,057	1,1 · 10 ⁸	0,983	8,9 · 10 ⁷
15	1,138	3,3 · 10 ⁸	0,905	1,1 · 10 ⁸	0,461	1,0 · 10 ⁷	0,357	1,2 · 10 ⁷	0,321	4,6 · 10 ⁷	0,845	1,5 · 10 ⁸	0,821	8,9 · 10 ⁷	0,810	7,2 · 10 ⁷
16	1,002	3,0 · 10 ⁸	0,742	2,5 · 10 ⁸	0,508	1,2 · 10 ⁷	0,417	2,1 · 10 ⁷	0,351	5,3 · 10 ⁷	0,984	1,6 · 10 ⁸	0,976	9,4 · 10 ⁷	0,895	8,9 · 10 ⁷
Průměr:	-	1,9 · 10 ⁸	-	1,1 · 10 ⁸	-	9,5 · 10 ⁶	-	1,3 · 10 ⁷	-	4,1 · 10 ⁷	-	1,5 · 10 ⁸	-	7,6 · 10 ⁷	-	6,1 · 10 ⁷
Kontrola, bez přídavku supernatantu	0,164	0,8 · 10 ⁸	0,714	1,2 · 10 ⁸	1,021	1,6 · 10 ⁸	1,207	1,9 · 10 ⁸	1,357	2,3 · 10 ⁸	1,232	1,7 · 10 ⁸	0,908	1,4 · 10 ⁸	0,884	1,2 · 10 ⁷

ZÁVĚR

Cílem této práce byla izolace a identifikace bakterií mléčného kvašení a následné stanovení bakteriocinů metodou PCR a měřením optické denzity.

Bylo izolováno celkem 29 kmenů bakterií mléčného kvašení ze zakysané smetany, biojogurtů a klobás.

Izolované kmeny byly podrobeny řadě morfologických, fyziologických a biochemických testů. Tyto testy vedly k bližšímu určení daných mikroorganismů. Ze získaných výsledků byly předběžně určeny rody *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Enterococcus* a druh *Streptococcus thermophilus*. Přesná identifikace mikroorganismů byla provedena sekvenací, kterou provedla laboratoř molekulárních metod Státního veterinárního ústavu v Praze. Stanoveno bylo 29 kmenů, z nichž 13 bylo *Pediococcus pentosaceus*, 7 *Lactobacillus rhamnosus*, 2 *Lactobacillus casei*, 3 kmeny byly *Streptococcus thermophilus*, 3 *Enterococcus faecalis* a 1 kmen *Enterococcus faecium*.

Přítomnost genu pro thermophilin 13 byla ověřena metodou PCR u izolovaných kmenů *Streptococcus thermophilus*. Ze tří izolovaných kmenů *Str. thermophilus* obsahoval gen pro thermophilin 13 pouze kmen *Str. thermophilus* 26.

Výsledky detekce genů pro pediocin PA-1 u kmenů pediokoků metodou PCR byly negativní i po provedených optimalizacích. Proto bylo provedeno stanovení produkce bakteriocinů měřením optické denzity. Izolované kmeny *Pediococcus pentosaceus* při měření optické denzity projevovaly inhibiční účinek vůči *Listeria innocua* CCM 4030 po dobu 8 hodin.

Tato diplomová práce demonstrovala využití různých fenotypových, ale i genotypových metod při identifikaci bakterií mléčného kvašení a jejich bakteriocinů.

Bakterie mléčného kvašení jsou náročné na růstové podmínky a jejich identifikace a diferenciace je poměrně obtížná. Fenotypové metody jsou náročné na čas, jejich výsledky jsou někdy nejednoznačné a musí být provedena řada testů k bližší identifikaci. Naproti tomu jsou sice genotypové metody finančně náročnější, avšak jsou rychlejší a výsledky jsou srozumitelnější.

Porovnáním využití metody PCR a metody měření optické denzity na stanovení produkce bakteriocinů lze konstatovat, že výhoda metody PCR spočívá ve vysoké specifičnosti, citli-

vosti, možnosti standardizovaného přístrojového vybavení s minimálním množstvím původního vzorku DNA.

Ačkoliv je princip PCR velmi jednoduchý, praxe má k jednoduchosti často daleko vzhledem k mnoha vzájemně spolupůsobícím faktorům ovlivňujícím finální výsledek. Zpravidla je nutno konkrétní hodnoty jednotlivých parametrů např. koncentrace iontů, teplotní režim atd. empiricky vyzkoušet. Měření optické denzity je cenově efektivnější, ale náročnější na práci a přesnost výsledků může být významně ovlivněna sedimentací buněk, interferencí barvy vzorku a vztahem mezi koncentrací bakteriocinu a jeho inhibiční schopností. Proto k získání spolehlivých výsledků je vhodné kombinovat zmíněné metody.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SALMINEN, S., VON WRIGHT, A., OUWEHAND, A. Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects. 3. ed, New York, U.S.A. 2004. 633 s. ISBN 0-8247-5332-1.
- [2] HUTKINS, R.W. Microbiology and Technology of Fermented Foods. 1. ed, IFT Press, Blackwell Publishing. 2006. 473 s. ISBN-13:978-0-8138-0018-9.
- [3] KONINGS, W.N., KOK, J., KUIPERS, O.P., POOLMAN, B. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Elsevier Science*, 2000, vol. 276, s. 276-282.
- [4] REDDY, G., ALTAF, M., NAVEENA, B.J., VENKATESHWAR, E., KUMAR, E.V. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation – A review. *Biotechnology Advances*, 2008, vol. 26, s. 22-34.
- [5] CAPLICE, E., FITZGERALD, G.F. Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, vol. 50, s. 131-149.
- [6] GÖRNER, F., VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiológia potravín*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004. s. 528. ISBN 80-967064-9-7.
- [7] ROSS, R., MORGAN, S., HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, vol. 79, s. 3-16.
- [8] MOTVILLE, T.J. Food microbiology an introduction. 2. vyd. New Jersey: ASM Press, 2005. 367 s. ISBN 1-55581-308-9.
- [9] KLEIN, G., PACK, A., BONAPARTE, Ch., REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, vol. 41, s. 103-125.
- [10] GONZÁLEZ, C.J., ENCINAS, J.P., GARCÍA-LOPEZ, M.L., OTERO, A. Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. *Food Microbiology*, 2000, vol. 17, s. 383-391.
- [11] STILES, M.E., HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria in foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 1997, vol. 36, s. 1-29.

- [12] HUANG, Y., YUNBO, L., ZHAI, Z., ZHANG, H., YANG, Ch., TIAN, H., LI, Z., FENG, J., LIU, H., HAO, Y. Characterization and application of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* 05-10 isolated from Sichuan Pickle, a traditionally fermented vegetable product from China. *Food Control*, 2009, vol. 20, s. 1030-1035.
- [13] BERNARDEAU, M., VERNOUX, J.P., HENRI-DUBERNET, S., GUÉGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, vol. 126, s. 278-285.
- [14] KÖHLER, W. The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2007, vol. 297, s. 133-150.
- [15] AMYES, S.G.B. Enterococci and streptococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2007, vol. 29, s. 43-52.
- [16] MORENO, M.R.F., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU, E., DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, vol. 106, s. 1-24.
- [17] GIRAFFA, G. Enterococci from food. *FEMS Microbiology Reviews*, 2002, vol. 26, s. 163-171.
- [18] OGIER, J.C., SERROR, P. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, vol. 126, s. 291-301.
- [19] CASALTA, E., MONTEL, M.Ch. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, vol. 126, s. 271-273.
- [20] HOLLER, B.J., STEELE, J.L. Characterization of Lactococci Other than *Lactococcus lactis* for Possible Use as Starter Cultures. *International Dairy Journal*, 1995, vol. 5, s. 275-289.
- [21] RILEY, M.A., GILLOR, O. Bacteriocins, Current Research and Applications. Norfolk, U.K.: Horizon Bioscience, 2007. 218 s. ISBN-10 1-904933-23-8.

- [22] RODRÍGUEZ, J.M., MARTÍNEZ, M.I, HORN, N., DODD, H.M. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, vol. 80, s. 101-116.
- [23] CLEVELAND, J., MONTVILLE, T.J, NES, I.F, CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, vol. 71, s. 1-20.
- [24] TODOROV, S.D., DICKS, L.M.T. Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*). *International Journal of Food Microbiology*, 2009, vol. 132, s. 117-126.
- [25] SOUZA, E.L., SILVA, C.A., SOUSA, C.P. Bacteriocins: Molecules of Fundamental Impact on the Microbial Ecology and Potential Food Biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2005. s. 559-566.
- [26] WOUTERS, J.T.M., AYAD, E.H.E., HUGENHOLTZ, J., SMITH G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 2002, vol. 12, s. 91-109.
- [27] TAMIME, A.Y. Probiotic, Dairy products., Society of dairy technology, Blackwell Publishing. 2005. 216 s. ISBN-10:1-4051-2124-6.
- [28] FACKLAM, R., ELLIOTT, J.A. Identification, Classification, and Clinical Relevance of Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci, Excluding the Streptococci and Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 1995. s. 479-495.
- [29] IYER, R., TOMAR, S.K., MAHESWARI, T.U., SINGH R. *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 2010, vol. 20, s. 133-141.
- [30] DELORME, Ch. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, vol. 126, s. 274-277.

- [31] DIMITRIJEVIĆ, R., STOJANOVIĆ, M., ŽIVKOVIĆ, I., PETERSEN, A., JANKOV, R.M., DIMITRIJEVIĆ, L., GAVROVIĆ-JANKULOVIĆ, M. The identification of a low molecular mass bacteriocin, rhamnosin A, produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain 68. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, vol. 107, s. 2108-2115.
- [32] WOOD, B.J.B., WARNER, P.J. Genetics of Lactic Acid Bacteria. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. 2003. 394 s. ISBN 0-306-47290-2.
- [33] VALENZUELA, A.S., BEN OMAR, N., ABRIOUEL, H., LÓPEZ, R.L., VELJOVIC, K., CAÑAMERO, M.M., TOPISIROVIC, M.K.L., GÁLVEZ, A. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control*, 2009, vol. 20, s. 381-385.
- [34] RASHTCHIAN, A. Novel method for cloning and engineering genes using the polymerase chain reaction. *Current Opinion in Biotechnology*, 1995. s. 30-36.
- [35] EVANS, M.F. The polymerase chain reaction and pathology practice. REVIEW, Elsevier, *DIAGNOSTIC HISTOPATHOLOGY* 15:7, 2009.
- [36] GRISHAM G. Biochemistry. Thomson Learning. 3. edition, 2005. 1248 s. ISBN 0-534-49031-4.
- [37] CUOZZO, S.A., SESMA, F., PALACIOS, J.M., DE RUÍZ HOLGADO, A.P., RAYA, R.R. Identification and nucleotide sequence of genes involved in the synthesis of lactocin 705, a two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL 705. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, vol. 185, s. 157-161.
- [38] McAULIFFE, O., ROSS, R.P., HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 2001, vol. 25, s. 285-308.
- [39] GARNEAU, S., MARTIN, N.I., VEDERAS, J.C. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 2002, vol. 84, s. 577-592.
- [40] ARAUZ, L.J., JOZALA, A.F., MAZZOLA, P.G., PENNA, T.Ch.V. Nizin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 2009, vol. 20, s. 146-154.

- [41] JASTIMI, R.E., LAFLEUR, M. Structural characterization of free and membrane-bound nisin by infrared spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, vol. 1324, s. 151-158.
- [42] CHAN, W.C., BYCROFT, B.W., LIAN, L.Y., ROBERTS, G.C.K. Isolation and characterisation of two degradation products derived from the peptide antibiotic nisin. *Elsevier Science Publishers*, 1989. s. 29-36.
- [43] ROBERTSON, J., ROSS, A.M., BURGOYNE, L.A. DNA in forensic science: theory, techniques and application. Ellis Horwood Limited, 1990. 197 s. ISBN 0-13-217506-1.
- [44] TETTEY, J.N.A., SKELLERN, G.G., MIDGLEY, J.M., GRANT, M.H., PITT, A.R. The effect of inducing agents on the metabolism of ethidium bromide by isolated rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 123. 1999. s. 105-115.
- [45] Etidiumbromid [online]. [cit. 2010-05-2]. Dostupný z WWW: <<http://biologie.upol.cz/metody/Slovník/EtBr.htm>>
- [46] RABINOW, P. *Maing PCR: A Story of Biotechnology*. 2. ed. The University of Chicago, 1996. 190 s. ISBN 0-226-70146.
- [47] ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. 2008. 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [48] BLACK, J.G. *Microbiology: principles and applications*. 3. vyd. New Jersey: Prentice-Hall, 1996. 790 s. ISBN 0-13-190745-X.
- [49] ŘÍHOVÁ-AMBROŽOVÁ, J. *Mikrobiologie v technologii vod*. 2. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2008. 244 s. ISBN 97-8-80-7080-676-0.
- [50] Identifikace bakterií [online]. [cit. 2010-05-2]. Dostupný z WWW: <http://fv1.vfu.cz/sekce_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie_pro_farmaceuty/praktikum04/index.html>
- [51] EISENTHAL, R., DANSON, M.J. *Enzyme Assays*. 2. ed. Oxford University Press. 2002. 282 s. ISBN 0-19-963821-7.

- [52] VYTRÁSOVÁ, J., BÍLKOVÁ, Z. Laboratorní cvičení z obecné mikrobiologie. 2. vyd. Pardubice: Univerzita Pardubice. 2003. 140 s. ISBN 80-7194-610-9.
- [53] TEPLÝ, M., GOTTWALD, K., ČERMÍNOVÁ, N., DĚDEK, M., HYL MAR, B., PETERKOVÁ, L., POKORNÁ, L., URNEROVÁ, M. Čisté mlékařské kultury: Výroba, kontrola, použití. 1.vyd. Praha: SNTL. 1984. 295 s. Typové číslo L18-B3-IV-31/82299.
- [54] JANDOVÁ, B., KOTOUČKOVÁ, L. Praktikum z mikrobiologie. 1.vyd. Brno: Vydavatelství MU, 1996. 67 s. ISBN 80-210-1374-5.
- [55] ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky. Espero publishing, Ústí nad Labem. 1998. 630 s. ISBN: 80-902906-0-4.
- [56] MILLER, K.W., RAY, P., STEINMETZ, T., HANEKAMP, T., RAY, B. Gene organization and sequences of pediocin AcH/PA-1 production operons in *Pediococcus* and *Lactobacillus* plasmids. *Letters in Applied Microbiology*, 2005, vol. 40, s. 56-62.
- [57] CARRACEDO, A. Forensic DNA: Typing Protocols. Humana Press, USA. 2005. 280s. ISBN 1-58829-264-9.
- [58] SWETWIWATHANA, A., SURAPANTAPISIT, Y., ZENDO, T., NAKAYAMA, J., SONONOTO, K. Identification and partial characterization of pediocin PA-1 producing *Pediococcus pentosaceus* associated in traditional Thai fermented beef (mum). *Journal of Biotechnology*, 2008, vol. 136S, s. S743-7S50.
- [59] ALBANO, H., TODOROV, S.D., REENEN, C.A., HOGG, T., DICKS, L.M.T., TEIXEIRA, P. Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from „Alheira“, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, vol. 116, s. 239-247.
- [60] TAYLOR, S. Advances in Food and Nutrition Research. Elsevier Academic Press. 2005. 320 s. ISBN-13: 978-0-12-016450-9.

- [61] WINN, W., ALLEN, S., JANDA, W., KONEMAN, E., PROCOP, G., SCHRECKENBARGER, P., WOODS, G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6. ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2006. 1565 s. ISBN 13: 978-0-7817-3014-3.
- [62] HEMME, D., SCHEUNEMANN-FOUCAUD, C. Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, 2004, vol. 14, s. 467-494.
- [63] TANASUPAWAT, S., OKADA, S., KOZAKI, M., KOMAGATA, K. Characterization of *Pediococcus pentosaceus* and *Pediococcus acidilactici* Strains and Replacement of the Type Strain of *P. acidilactici* with the Proposed Neotype DSM 20284. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1993. 860-863.
- [64] PHALAKORNKULE, CH., TANASUPAWAT, S. Characterization of lactic acid bacteria from traditional Thai fermented sausages. *Journal of Culture Collections*, 2006, vol. 5, s. 46-57.
- [65] BADIS, A., GUETARNI, D., MOUSSA-BOUDJEMÂA, B., HENNI, D.E., TORNADIJO, M.E., KIHAL, M. Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiology*, 2004, vol. 21, s. 343-349.
- [66] CHERIGUENE, A., CHOUGRANI, F., BENSOLTANE, A. Identification and Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Goat's Milk. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2006, vol. 9, s. 1242-1249.
- [67] MARTINIS, E.C.P., FREITAS, F.Z. Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. *Food Control*, 2003, vol. 14, s. 197-200.
- [68] BADIS, A., GUETARNI, D., MOUSSA-BOUDJEMA, B., HENNI, D.E., KIHAL, M. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 2004, vol. 21, s. 579-588.
- [69] ABDI, R., SHEIKH-ZEINODDIN, M., SOLEIMANIAN-ZAD, S. Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Iranian Lighvan Cheese. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2006, vol. 9, s. 99-103.

- [70] FUENTE-SALCIDO, N., SALCEDO-HERNÁNDEZ, R., ALANÍS-GUZMÁN, M.A., BIDESHI, D.K., BARBOZA-CORONA, J.E. A new rapid fluorogenic method for measuring bacteriocin activity. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, vol. 70, s. 196-199.
- [71] BARROW, G.I., FELTHAM, R.K.A. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3. ed. Cambridge University Press. 2004. 331 s. ISBN 0-521-54328-2
- [72] AGUIRRE, M., COLLINS, M.D. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Bacteriology*, 1993, vol. 75, s. 95-107.
- [73] HOLS, P., HANCY, F., FONTAINE, L., GROSSIORD, B., PROZZI, D., LEBLOND-BOURGET, N., DECARIS, B., BOLOTIN, A., DELORME, Ch., EHRLICH, S.D., GUÉDON, E., MONNET, V., RENAULT, P., KLEEREBEZEM, M. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005, vol. 29, s. 435-463.
- [74] HUTKINS, R., HALAMBECK, S. M., MORRIS, H. A. Use of galactose-fermenting *Streptococcus thermophilus* in the manufacture of Swiss, Mozzarella and short-method Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 1985, vol. 69, s. 1-8.
- [75] SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual. Volume 2.* 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. ISBN 0-87969-576-5.
- [76] TEPLÝ, M. a kol. Čisté mlékařské kultury, výroba, kontrola, použití. Praha: SNTL, 1984. ISBN 04-806-84.
- [77] International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities. 2. ed. New York: Kluwer Academic & Plenum Publishers, 2005. 736 s. ISBN 978-0-306-4875-3.
- [78] GUESSAS, B., KIHAL, M. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goat's milk. *African Journal of Biotechnology*, 2004, vol. 3, s. 339-342.

- [78] BAREFOOT, S.F., KLAENHAMMER, T.R. Detection and Activity of Lactacin B, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, vol. 45, s. 1808-1815.
- [79] Databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information) [online]. [cit. 2010-05-2]. Dostupný z WWW:
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/2695623?reportgenbank&log\\$=seqview](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/2695623?reportgenbank&log$=seqview)>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BMK	Bakterie mléčného kvašení
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerázová řetězová reakce)
GIT	Gastro-intestinální trakt
Lan	Lanthionin
MeLan	β -methyllanthionin
Dha	2,3-didehydroalanin
Dhb	2,3-didehydrobutyryl
PCR	Polymerázová řetězová reakce
dNTP	deoxyribonukleosid trifosfát
BSA	Hovězí sérum albumin
LPS	Lipopolysacharidy
ATP	Adenozintrifosfát
OD ₆₀₀	Optická denzita při 600 nm
GRAS	„Generally Recognized As Safe“ (Všeobecně považované za bezpečné)
VP test	Voges – Proskauerův test
OF test	Oxidačně - fermentační test
LAP	Leucin aminopeptidáza
EtBr	Etidiumbromid
CCDM	Czech Collection of Dairy Microorganisms
CCM	Czech Collection of Microorganisms
FT	Fakulta technologická
UTB	Univerzita Tomáše Bati
TAE	Tris – acetátový pufr
SDS	Dodecyl sulfát sodný

HIP	Hippurát
PHS	Fosfatáza
GLR	β - Glukuronidáza
ESL	Eskulin
ARG	Arginin
URE	Ureáza
MAN	Manitol
SOR	Sorbitol
TRE	Trehalóza
LAC	Laktóza
RAF	Raffinóza
INU	Inulin
MLB	Melibióza
RIB	Ribóza

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Obecné schéma fermentace glukózy bakteriemi mléčného kvašení [5].</i>	12
<i>Obr. 2. Princip PCR [35, 47].</i>	32
<i>Obr. 3. Etidiumbromid - chemická struktura [44, 45].</i>	35
<i>Obr. 4. Izolace DNA fenol-chloroformovou extrakcí.</i>	67
<i>Obr. 5. Izolace DNA fenol-chloroformovou extrakcí.</i>	68
<i>Obr. 6. Amplifikace sekvence genu pro thermophilin 13.</i>	69

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Bakteriociny vs. antibiotika [23, 25].</i>	20
<i>Tab. 2. Thermophilin 13 [39].</i>	24
<i>Tab. 3. Oligonukleotidy primerů použitých k určení přítomnosti genu pro pediocin PA-1</i>	45
<i>Tab. 4. Oligonukleotidy primerů použitých k určení přítomnosti genu pro thermophilin</i>	45
<i>Tab. 5. Výsledky testů aplikovaných k identifikaci izolátů*</i>	56
<i>Tab. 6. Výsledky testů provedených s kontrolními sbírkovými kmeny*</i>	56
<i>Tab. 7. Výsledky zkoušky redukce dusičnanů na dusitany</i>	57
<i>Tab. 8. Výsledky získané provedením kvasné zkoušky u izolátů a sbírkových kmenů.</i>	58
<i>Tab. 9. Vyhodnocení zkvašování cukrů*</i>	60
<i>Tab. 10. Vyhodnocení STREPTOtestu 16 provedeného u vybraných izolátů*</i>	62
<i>Tab. 11. Vyhodnocení PYRA testu*</i>	63
<i>Tab. 12. Výsledky testu tolerance k NaCl*</i>	64
<i>Tab. 13. Výsledky testu tolerance k NaCl*</i>	64
<i>Tab. 14. Souhrn identifikace mikroorganismů sekvenací</i>	65
<i>Tab. 15. Výsledky sekvenace (1)</i>	65
<i>Tab. 16. Výsledky sekvenace (2)</i>	66
<i>Tab. 17. Výsledky měření optické hustoty a CFU/ml</i>	73