

# Inhibiční účinky kmenů *Streptococcus thermophilus*

Bc. Radka Nedopilová

---

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. Radka NEDOPILOVÁ**  
Osobní číslo: **T08875**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Inhibiční účinky kmenů *Streptococcus thermophilus***

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

- Charakteristika bakterií mléčného kvašení.
- *Streptococcus thermophilus* a jeho vlastnosti.
- Patogenní mikroorganizmy.

### II. Praktická část

- Stanovení inhibičních účinků *Streptococcus thermophilus* v modelovém systému UHT mléka.
- Stanovení inhibičních účinků *Streptococcus thermophilus* na BCP agaru.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] GÖRNER, F., VALÍK, L'. Aplikovaná mikrobiologie poživatin, 1. vydání, Malé Centrum, Bratislava 2004.

[2] TEPLÝ, M. a kol. ČMK – Výroba, kontrola použití, 1.vydání, SNTL, Praha 1984.

[3] WOOD, B. J. B. Microbiology of fermented foods, second edition, Blackie Academic and Professional, London 1998.

[4] SEDLÁČEK I. Taxonomie prokaryot, 1. vydání, Masarykova univerzita, Brno 2007.

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Zuzana Vaňátková**

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

**4. ledna 2010**

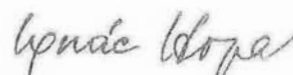
Termín odevzdání diplomové práce:

**19. května 2010**

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
*děkan*



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
*ředitel ústavu*

## ABSTRAKT

V této diplomové práci byly zjišťovány inhibiční účinky kmenů *Streptococcus thermophilus* vůči kmenům *Bacillus subtilis* a *Listeria innocua*. V teoretické části je pojednáno o bakteriích mléčného kvašení, dále o kmenu *Streptococcus thermophilus* a o jeho vlastnostech a produktech metabolismu. Následující text je věnován patogením bakteriím a to zejména kmenům *Bacillus subtilis* a *Listeria innocua*. Praktická část obsahuje dvě metody. První metodou je stanovení inhibičních účinků *Streptococcus thermophilus* v modelovém systému UHT mléka. Druhou metodou je stanovení inhibičních účinků *Streptococcus thermophilus* na BCP agaru. Zdařilo se prokázat inhibiční účinek kmenů streptokoků pomocí obou metod.

Klíčová slova:

Bakterie mléčného kvašení, bakteriociny, kyselina mléčná

## ABSTRACT

In this diploma thesis were investigated the inhibitory effects of *Streptococcus thermophilus* strains against of *Bacillus subtilis* and *Listeria innocua* strains. In the theoretical part is dealing with the lactic acid bacteria, the strains of *Streptococcus thermophilus* and its properties and metabolic products. The following text is devoted to pathogenic bacteria, especially strains of *Bacillus subtilis* and *Listeria innocua*. Practical part contains two methods. The first method is to determine the inhibitory effects of *Streptococcus thermophilus* in a model system of UHT milk. The second method is to determine inhibitory effects of *Streptococcus thermophilus* on BCP agar. Succeeded to demonstrate the inhibitory effect of streptococci strains by using both methods.

Keywords:

Lactic acid bacteria, bacteriocins, lactic acid

Chtěla bych poděkovat Ing. Zuzaně Vaňátkové za odborné vedení diplomové práce, dále laborantkám Hance Miklíkové a Olze Haukové a samozřejmě bych chtěla poděkovat také rodičům za podporu při studiu.

Příjmení a jméno: Nedopilová Radka

Obor: THEVP

## 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 <sup>1)</sup>;
- 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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> 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 <sup>3)</sup> 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 14. 5. 2010

Nedopilová R.

<sup>1)</sup> 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 nevydělčně 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.

<sup>2)</sup> 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 vzdělávacího zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> 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 výtěžku 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 přihledne k výši výtěžku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

**OBSAH**

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 CHARAKTERISTIKA BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ</b> .....	<b>12</b>
1.1 VÝZNAM BMK.....	13
1.1.1 Zdravotní význam BMK .....	13
1.1.2 Technologický význam BMK .....	14
1.1.3 Ekonomický význam BMK.....	15
1.2 VLASTNOSTI BMK.....	15
1.2.1 Kysací.....	16
1.2.2 Zrání .....	16
1.2.3 Dieteticko-léčebné.....	17
<b>2 STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</b> .....	<b>20</b>
2.1 TAXONOMIE .....	20
2.2 VLASTNOSTI.....	20
2.3 PRODUKCE INHIBIČNĚ PŮSOBÍCÍCH LÁTEK.....	21
2.3.1 Kyselina mléčná.....	23
2.3.2 Kyselina octová.....	23
2.3.3 Kyselina mravenčí.....	24
2.3.4 Diacetyl .....	24
2.3.5 Bakteriociny .....	24
<b>3 PATOGENNÍ MIKROORGANISMY</b> .....	<b>28</b>
3.1 <i>BACILLUS SUBTILIS</i> .....	30
3.1.1 Morfologické a fyziologické vlastnosti.....	30
3.1.2 Kultivační vlastnosti .....	31
3.1.3 Výskyt a uplatnění.....	31
3.2 <i>LISTERIA INNOCUA</i> .....	32
3.2.1 Morfologické a fyziologické vlastnosti.....	32
3.2.2 Kultivační vlastnosti .....	32
3.2.3 Výskyt a uplatnění.....	32
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>34</b>
<b>4 MATERIÁL</b> .....	<b>35</b>
4.1 PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY .....	35
4.2 POUŽITÉ MIKROORGANISMY .....	36
4.3 KULTIVAČNÍ PŮDY .....	37
<b>5 METODY</b> .....	<b>39</b>



5.1	STANOVENÍ INHIBIČNÍCH ÚČINKŮ <i>STR. THERMOPHILUS</i> V MODELOVÉM SYSTÉMU UHT MLÉKA .....	39
5.2	STANOVENÍ INHIBIČNÍCH ÚČINKŮ <i>STR. THERMOPHILUS</i> NA BCP AGARU .....	39
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>41</b>
6.1	HODNOCENÍ METODY INHIBIČNÍCH ÚČINKŮ KMENŮ <i>STR. THERMOPHILUS</i> V SYSTÉMU UHT MLÉKA .....	41
6.2	HODNOCENÍ METODY INHIBIČNÍCH ÚČINKŮ KMENŮ <i>STR. THERMOPHILUS</i> NA BCP AGARU .....	48
	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>52</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>53</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>57</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>58</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>59</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>60</b>

## ÚVOD

Bakterie mléčného kvašení jsou využívány především v potravinářském průmyslu. Jejich přínos v první řadě spočívá v tvorbě kyseliny mléčné z dostupných zdrojů uhlíku a v následné rychlé acidifikaci surových potravin, což je základní parametr při uchování potravin. Kromě tvorby mléčné kyseliny, přispívají bakterie mléčného kvašení také k některým charakteristickým rysům fermentovaných potravin, a to především ke struktuře či vůni.

Bakterie mléčného kvašení jsou převážně heterotrofní, žijí z organických látek a využívají je (odbourávají, fermentují, oxidují) na stavbu buňky a získání energie různými metabolickými drahami. Produkty metabolismu mohou být pro člověka užitečné (kyselina mléčná, etanol, aromatické látky aj.), ale i škodlivé (biogenní aminy, toxiny bakterií).

U bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií je dlouhou dobu známa schopnost inhibovat jiné mikroorganismy, které způsobují řadu onemocnění nebo kažení potravin. K antimikrobiální aktivitě přispívá produkce celé řady látek, a to především bakteriocinů, a organických kyselin.

Mezi významné antimikrobiální látky používané v potravinářském průmyslu patří bakteriociny. Bakteriociny jsou látky bílkovinné povahy působící inhibičně na druhově příbuzné bakterie a i na bakterie jiného druhu. Důležitý je zejména inhibiční efekt vůči patogenním mikroorganismům například *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*. Z tohoto důvodu je žádoucí používat bakteriociny v potravinářství. Nejpoužívanějšími bakteriociny jsou nisin a pediocin.

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat literární rešerši na téma inhibiční účinky kmenů *Streptococcus thermophilus*. V praktické části byly prováděny dvě metody. První metodou bylo stanovení inhibičních účinků *Streptococcus thermophilus* v modelovém

systému UHT mléka. Druhou metodou bylo stanovení inhibičních účinků *Streptococcus thermophilus* na BCP agaru. Obě metody byly aplikovány vůči dvěma patogenním kmenům a to *Bacillus subtilis* a *Listeria innocua*. Výsledkem je zjistit inhibiční účinky *Streptococcus thermophilus* na tyto dva patogenní kmeny.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 CHARAKTERISTIKA BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Pojem mikroorganismy vzbuzuje u neodborné veřejnosti zpravidla nepříjemné pocity pro jejich souvislost s onemocněními. Při hlubším zamyšlení si však uvědomují, že jsou například bakterie mléčného kvašení (BMK) užitečné při výrobě potravin a nepostradatelné při udržování biologické rovnováhy v přírodě [1].

Mikroorganismy mají v potravinářství mimořádný význam. Tepelným ošetřením syrového mléka jako základní suroviny se mléko nejdříve zbaví všech patogenních mikroorganismů i všech ostatních technologicky škodlivých mikroorganismů. Po této operaci, směřující k potlačení činnosti nežádoucích mikroorganismů, nastupuje operace druhá, při níž se v hlavních oborech mlékárenské výroby do tepelně ošetřeného mléka vědomě zavádějí ušlechtilé mikroorganismy, tedy bakterie mléčného kvašení. Jde o výrobu fermentovaných mléčných výrobků, másla ze zakysané a polozakysané smetany a všech druhů přírodních sýrů [2].

Mikroorganismy obsažené v syrovém mléce, i včetně divokých kmenů BMK, způsobovaly přirozené, tj. samovolné kysání mléka nebo smetany. Avšak výrobky tímto způsobem získané měly nízkou trvanlivost a značně kolísavou jakost. Hlavními příčinami bylo velmi odlišné složení přírodní mikroflóry syrového mléka (vlivem podmínek jeho výroby, získání, ošetření a uskladnění) a obsah nežádoucích sporotvorných a hnilobných bakterií. Tyto podmínky měly vliv také na rozmnožení původní mikroflóry syrového mléka v době od získání mléka až po jeho použití k přípravě mléčných výrobků. Je proto pochopitelné, že v tomto období primitivní mlékařské výroby se nejlepší druhy národních mléčných výrobků vyráběly v oblasti s dobrou krmivovou základnou, kde se dojnice volně pásly a pohybovaly na zdravém vzduchu, což ovlivnilo příznivě

i přírodní mikroflóru syrového mléka. Mléčné výrobky z těchto oblastí, většinou horských, měly vždy vynikající pověst, šlo zejména o národní typy zakysaných mlék, domácí selské máslo a sýry (švýcarský ementál, francouzský rokfór aj.) [2, 3, 4].

Bakterie mléčného kvašení se vyskytují na více přírodních stanovištích, nejen v mléce a mléčných výrobcích. Nachází se také na rostlinách, v zažívacím traktu člověka i zvířat aj. [4, 5].

V klasické monografii Dána Orla-Jensena (1919) pojednávající o bakteriích mléčného kvašení se říká: „Pravé bakterie mléčného kvašení tvoří velkou přirozenou skupinu

nepohyblivých, nesporulujících, gram pozitivních ( $G^+$ ) koků a paliček, které fermentují sacharidy za fakultativně anaerobních (mikroaerofilních) podmínek a tvoří při tom hlavně kyselinu mléčnou". Tato koncepce bakterií mléčného kvašení je platná v podstatě dodnes [1].

Pod pojmem bakterie mléčného kvašení se zpravidla rozumí bakterie zahrnující některé druhy rodu *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Pediococcus* [1, 6].

Bakterie mléčného kvašení vytvářejí prostřednictvím fermentace nepříznivé podmínky pro nežádoucí bakterie. Proto fermentace působí také jako konzervace tj. prodlužuje trvanlivost potravin rostlinného i živočišného původu [1]. Nežádoucí bakterie v kysaných mléčných výrobcích, které inhibuje proces fermentace, jsou např. *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter aerogenes* a *Escherichia coli* [7].

Hlavním produktem při fermentaci pomocí bakterií mléčného kvašení je kyselina mléčná. Za anaerobních podmínek dále vzniká kyselina octová, kyselina mravenčí, acetoin, acetaldehyd, kyselina hypurová, z níž může vzniknout i kyselina benzoová (např. v jogurtu může vzniknout 16 – 56 mg kyseliny benzoové v 1 l jogurtu), dále peroxid vodíku (vzniká jako meziprodukt) [1, 8].

Bakterie mléčného kvašení jsou aerotolerantní, mikroaerofilní nebo fakultativně anaerobní. Pro většinu BMK není vzdušný kyslík toxický. BMK nemají výrazné proteolytické a lipolytické vlastnosti. Z bílkovin tvoří štěpné produkty, peptidy a aminokyseliny, sloužící jako zdroj dusíku pro tyto bakterie. Zvláštností některých BMK je způsob genetické fixace jejich metabolických aktivit (např. fermentace laktosy, proteinasová aktivita), které jsou uloženy nejen v chromozomech, ale i v plazmidech. Plazmidy jsou malé na chromozomech nezávislé genetické částice determinující např. rezistenci vůči některým antibiotikům, bakteriofágům, produkci určitých metabolitů [1].

## 1.1 Význam BMK

### 1.1.1 Zdravotní význam BMK

Bakterie mléčného kvašení umožňují výrobu fermentovaných mléčných potravin z pasterovaného mléka. Je prokázáno, že BMK přispívají k dieteticko - léčebným

účinkům mlékárenských výrobků. Jde především o zvýšení výživné hodnoty mléčných výrobků, u nichž dochází k přeměně bílkovin mléka na jednodušší formy, které jsou lépe stravitelné. Některé bakterie mléčného kvašení produkují vitaminy, jimiž obohacují prostředí. BMK tvoří mléčnou kyselinu, která tlumí rozvoj škodlivé hnilobné mikroflóry. V tomto ohledu jsou zvláště významné BMK, které mají schopnost implantace v lidském střevním traktu. Bakterie mléčného kvašení ve střevním traktu mají účinek podobný antibiotikům [9].

### 1.1.2 Technologický význam BMK

Bakterie mléčného kvašení nám umožňují vyrábět široký sortiment mléčných výrobků. Kromě toho jsou používány jako součást bariérového konzervačního efektu např. u fermentovaných masných výrobků nebo při konzervaci zeleniny a ryb [2].

Bez BMK nevyrobíme žádné standardní výrobky. Pasterací se zničí nejen patogenní zárodky, ale také mikroby technologicky významné (BMK). Technologicky užitečné bakterie se nahrazují zaočkováním vybraných druhů BMK do pasterovaného mléka, tím se zajistí žádané biochemické procesy, nutné k dosažení specifických vlastností jednotlivých výrobků. S těmito biochemickými procesy souvisejí [2, 9]:

- a) **Fyzikálně chemické změny a rozklad bílkovin.** Projevují se především koagulací mléčné bílkoviny působením mléčné kyseliny, která vzniká činností BMK.
- b) **Tvorba ochranných látek.** Tato vlastnost se projevuje u jednotlivých kultur různě. Ochranný účinek má především mléčná kyselina inhibující škodlivou alkaligenní mikroflóru. Dále to jsou látky redukující povahy, které zamezují autooxidaci mléčného tuku, a některá antibiotika, potlačující rozvoj nežádoucí mikroflóry.
- c) **Vlastní zrání mlékárenských výrobků.** Jde o řadu chemických změn složek mléka, laktosy, bílkovin a tuku. Vzniká tak charakteristická konzistence, chuť a vůně výrobků.

Vlastnosti BMK se prolínají, kombinují, doplňují, a tak vzniká komplex činností typických pro každý druh mléčných výrobků [2, 5].

### 1.1.3 Ekonomický význam BMK

Používání BMK dává předpoklad k dosažení dobré, standardní jakosti výrobků. Snižuje se zmetkovitost ve výrobě a zvyšuje se hospodárnost výroby. BMK umožňují rozšiřování sortimentu a tím i uspokojení poptávky po fermentovaných mléčných výrobcích [9].

Z důležitosti významu a vlastností BMK vyplývá také náročnost na techniku práce s nimi, tj. na jejich vysoce odborné používání při výrobě. V zásadě lze právem tvrdit, že dokonalé ovládnutí techniky práce s BMK patří k mistrovství každého mlékařského technika a je základním předpokladem úspěchu v mlékařské výrobě. Vysoké odborné a technické nároky na práci s BMK vyžadují, aby pracovníci, kteří s nimi pracují v mlékárnách, nejen teoreticky ovládali základy mikrobiologie a výroby čistých mléčných kultur, ale měli i potřebnou praxi pokud jde o volbu vhodných kultur a metod jejich pěstování, správné ošetřování, rozmnožování a používání těchto kultur. Dále je nutno, aby mlékárny byly pro účely rozmnožování a používání čistých mléčných kultur na matečné a provozní zákysy vybaveny také řádným technickým zařízením. Nepracuje-li se s kulturami s náležitou péčí a nedodrží-li se při přípravě matečných a provozních zákysů i při výrobě jednotlivých druhů mléčných výrobků správná technika práce, vyrábějí se mléčné výrobky méně jakostní, nebo dokonce výrobky zmetkové. Proto je třeba, aby problému výroby a zejména používání čistých mléčných kultur v mlékárnách byla

i z tohoto hlediska věnována co největší péče [2].

V současnosti je na trhu mnoho druhů kultur a to jak ve formě tekuté, hluboce zmrazené nebo lyofilizované. Lyofilizované formy kultur jsou vhodné pro výrobu provozních zákysů, matečných zákysů i pro přímé zaočkování do mléka. Pokud se očkuje lyofilizovaná kultura přímo do mléka, nemusí být kladen velký důraz na odbornost při práci s nimi.

Výhodou kultur ve formě koncentrátů je vyšší a standardní aktivita, zaručená hygienická jakost, rovnováha jednotlivých druhů i kmenů s deklarovanou biochemickou a technologickou aktivitou [6].

## 1.2 Vlastnosti BMK

### 1. Kysací

2. Zrání
3. Dieteticko-léčebné

### 1.2.1 Kysací

Kysací funkce spočívá v tvorbě mléčné kyseliny, čímž vzniká kyselé prostředí. Od pradávna byla známa schopnost mléka zkysnout, a tak prodloužit jeho trvanlivost. Kysané mléčné výrobky mají značně nízké pH (mezi 3,0 až 4,5), vodní aktivita se pohybuje kolem 0,98 a obsah živin tvoří tuk, laktosa a peptidické látky vzniklé štěpením bílkovin. Laktosa je zkvašena na organické kyseliny, hlavně mléčnou (v případě homofermentativního kvašení) nebo směs kyselin obvykle mléčná, octová, mravenčí, propionová, máselná, isovalerová, kaprylová (heterofermentativní kvašení); někdy dochází i k vývinu plynů, zejména CO<sub>2</sub> ve formě bublinek. Obsah kyseliny mléčné se pohybuje kolem 1 % v zakysaných mléčných výrobcích. Při výrobě mléčných výrobků je významná přítomnost vysokých počtů kulturní mikroflóry, ve které dominují laktobacily a skupina mléčných streptokoků (rod *Lactococcus* a *Streptococcus thermophilus*). Fermentované výrobky dodávají konzumentům mléčné bílkoviny v natrávené, snadněji vstřebatelné formě, a příznivě ovlivňují střevní mikroflóru a to tím, že BMK mají schopnost usazovat se v zažívacím traktu konzumenta a eliminovat tak toxiny a patogenní mikroorganismy [4, 6, 7].

Z toho vyplývá, jak důležitý je kvalifikovaný výběr kultur, což se týká na prvním místě základních kultur s prokysávací funkcí. Rozhodující není jen počet mikroorganismů v kultuře, ale také schopnost kultury produkovat v pasterovaném mléce v určitém časovém úseku mléčnou kyselinu (kysací mohutnost). Kultura má nejvyšší kysací mohutnost hned po koagulaci, udržuje se ještě asi dvě hodiny a poté klesá [9].

### 1.2.2 Zrání

Při fermentativním pochodu zrání se mění většinou základní složky mléka, tj. mléčný cukr, tuk i bílkoviny. V této funkci se při zrání sýrů prakticky uplatňují BMK, které produkovanými enzymy rozkládají bílkovinu v první fázi na albumosy a peptony, a ty pak v druhé fázi na polypeptidy a aminokyseliny, popřípadě ještě dál až na nežádoucí amoniak [2].



Základní biochemické procesy, které probíhají při zrání sýrů obsažených v sýrařských kulturách, je možno rozdělit takto [10]:

- **První fáze** – dochází především k rozkladu laktosy vlivem enzymů produkovaných přítomnou mikroflórou. Současně dochází ke změnám kaseinu – zrno se spojuje a vzniká celistvá struktura výrobku.
- **Druhá fáze** – dochází ke snížení kyselosti jednak vazbou kyseliny mléčné na kasein, ale také její mikrobiální přeměnou na jiné produkty - podle typu sýra. Vznikají např. kyselina propionová, CO<sub>2</sub>, který se zásadním způsobem projeví při tvorbě pravých ok u sýrů ementálského typu.
- **Třetí fáze** – vlivem proteolýzy dochází k různě intenzivnímu rozkladu bílkovin. Podle typu sýra a použité proteolytické mikroflóry může rozklad probíhat anaerobně v celé hmotě (typické pro tvrdé sýry) nebo aerobně od povrchu (sýry s mazem).

### 1.2.3 Dieteticko-léčebné

Ve srovnání se sladkým mlékem se fermentované mléčné výrobky vyznačují významnými dieteticko-léčebnými účinky, které lze charakterizovat takto Lukáš (1976):

- a. Proteolytickým účinkem bakterií mléčného kvašení dochází k natrávení bílkovin. Mléčná bílkovina (kasein) jemně vyvločkuje, a tím získá lepší stravitelnost a resorpci. Na trávení bílkovin působí příznivě i snížení kyselosti žaludečních šťáv a na trávení vůbec pak zvýšené vyměšování trávicích sekretů (slin, žluče, žaludečních šťáv a střevního sekretu).
- b. Lipolýzou mléčných výrobků a uvolněním mastných kyselin ovlivňují BMK příznivě stravitelnost a absorpci mléčného tuku.
- c. Odstraňují alergické reakce vyvolané nativními bílkovinami nebo laktosou, jejichž obsah se účinkem BMK podstatně snižuje.
- d. Proti mléku sladkému dochází u zakysaných mlék ke zvýšené retenci důležitých prvků, např. fosforu, vápníku, železa v lidském těle. Biosyntézou probíhající při procesu zrání zakysaných mlék se zvyšuje obsah některých vitamínů skupiny B, stabilizovaných díky nižšímu pH zakysaných mlék.

- e. Poslední výzkumy potvrdily výrazný tlumivý až ničivý účinek BMK vůči patogenům a v některých případech i vlastnosti antivirové Dědek, Lukáš, Teplý (1979).
- f. Po léčbě antibiotiky pomáhá mikroflóra zakysaných mléčných výrobků, zejména acidofilní a bifidogenní tyčinky, k obnově přirozeného prostředí trávicího traktu a usnadňuje tím správnou funkci trávicí soustavy [2].

Na základě nových poznatků získaných u nás i v zahraničí lze tedy připustit ničivé účinky BMK v kysaných mléčných výrobcích vůči patogenním mikroorganismům. Tyto patogenní bakterie ztrácejí v kysaných výrobcích svou životnost v krátké době, zatímco ve sladkém mléce přežívají týdny, často i měsíce. Tento inhibiční účinek není způsoben pouze vlivem vytvořené kyseliny mléčné. V první řadě se jedná o účinek antibiotických a jiných produktů látkové výměny čistých mlékařských kultur. K podpoře tohoto tvrzení lze uvést řadu konkrétních případů Höckel (1955). Např. *Brucella abortus* vydrží ve sladkém mléce i několik měsíců, ale v kysaných mléčných výrobcích hyne do jednoho dne, takže se prakticky ve zralých kysaných mléčných výrobcích nevyskytuje. Také virus slintavky hyne v kyselém prostředí (již do pH 5,8), a proto se zakysané mléčné výrobky nemohou stát ani při epidemii slintavky a kulhavky nositelem infekce. Dále salmonely, zárodky tyfu, úplavice aj. vydrží v acidofilním mléce, kefíru a jogurtu velmi krátkou dobu, avšak naproti tomu dlouhou dobu ve sladkém mléce zbaveném zahřátím kyselinotvorné mikroflóry. To platí v zásadě i o tuberkulózní tyčince *Mycobacterium tuberculosis*, kterou intenzivně potlačují druhy *Propionibacterium* a speciální kvasinky. Prokázána je dále inhibice některých druhů salmonel (*Salmonella gallinarum*) a stafylokoků (*Staphylococcus aureus*) bakteriemi mléčného kvašení. Tato inhibice není rovněž jen důsledkem snížení hodnoty pH činností BMK, kdy se snižuje i obsah laktosy a oxidoredukční potenciál. Rozhodující je tvorba speciálních inhibičních látek antibiotické povahy, tzv. bakteriocinů (nisin, acidofilin, lactocidin, acidin, lactolin aj.). Tyto látky vykazují antimikrobiální aktivitu i proti enteropatogenním bakteriím, sporotvorným mikrobům a virům. Kromě těchto látek působí jako inhibitory i peroxid vodíku a další látky (např. D-leucin), které jsou produkty čistých mlékařských kultur [2, 11].

Pravidelná konzumace kysaných mléčných výrobků je tedy vysoce žádoucí. Kromě toho však napomáhá i k udržení funkce trávicí soustavy, což je zvlášť důležité nejen pro

nemocné, ale i pro starší populaci, neboť s přibývajícím věkem trávicí funkce ochabuje [4].

Souhrnem lze říci, že BMK tvorbou různých antibiotik, ale i dalších látek s inhibičním účinkem (mléčná kyselina, octová kyselina, peroxid vodíku, D-leucin aj.) vykazují antimikrobiální aktivitu zejména vůči enteropatogenním bakteriím, sporotvorným mikroorganismům, ale i virům [2].

Prokázaná antimikrobiální činnost BMK nesporně otevírá cestu novým a nadějným perspektivám léčebného využití mléčných výrobků zakysaných ušlechtilými bakteriemi mléčného kvašení [2, 4].

## 2 *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

*Streptococcus thermophilus* patří mezi potravinářsky nejvýznamnější bakterie mléčného kvašení. V mlékárenství je považován za nejdůležitější startovací kulturu hned po *Lactococcus lactis* a je hojně využíván k výrobě mléčných produktů [2, 12].

### 2.1 Taxonomie

Doména Bacteria, kmen *Firmicutes*, třída *Bacilli*, řád *Lactobacillales*, čeleď *Streptococcaceae*, rod *Streptococcus*, druh *Streptococcus thermophilus* [13]

V taxonomii streptokoků se používají dva klasifikační systémy. Ve starším pojetí se dělí klasifikace rodu *Streptococcus* na šest skupin: pyogenní streptokoky, orální streptokoky, jiné streptokoky, anaerobní streptokoky, enterokoky a mléčné streptokoky. V novějším klasifikačním systému rodu *Streptococcus* Schilfer a Killpper-Bälz (1984,1985,1987) jsou výše uvedené skupiny streptokoků ponechané s výjimkou anaerobních streptokoků. Výše uvedení autoři také navrhli skupinu enterokoků a mléčných streptokoků povýšit na samostatné rody *Enterococcus* a *Lactococcus*, dále navrhli i nové taxony. *Streptococcus thermophilus* se systematicky řadí mezi jiné streptokoky [1].

### 2.2 Vlastnosti

*Streptococcus thermophilus* (Obr. 1) je součástí mikroflóry směsných jogurtových kultur. Buňky mají velikost 0,7 – 0,9  $\mu\text{m}$  a bývají ve dvojicích nebo tvoří řetízky. Optimální teplota pro růst *Str. thermophilus* je 40 až 45 °C, roste i při 37 °C, neroste při 10 °C. *Str. thermophilus* zkvašuje sacharidy homofermentativně na mléčnou kyselinu, a to v množství asi 0,5 %, netvoří CO<sub>2</sub>. Bakterie tohoto druhu jsou G<sup>+</sup>, nepohyblivé, fakultativně anaerobní, nesporulující, kataláza negativní, [1, 13].

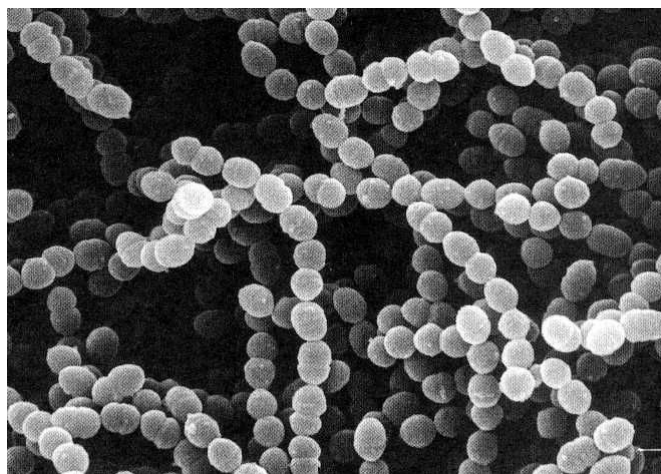
K růstu vyžaduje *Str. thermophilus* nutričně bohatá média. Pro optimální růst v uměle připravených médiích se přidává glukosa nebo jiný fermentovatelný sacharid. Nejvhodnějším prostředím pro kultivaci je mléko [1].

*Str. thermophilus* je schopen produkovat extracelulární polysacharidy, významné zejména pro mlékárenský průmysl díky zlepšení textury kysaných mléčných výrobků.

Navíc některé kmeny *Str. thermophilus* mají schopnost v zakysaných mléčných výrobcích syntetizovat kyselinu listovou [8].

*Str. thermophilus* má pouze mírné proteolytické vlastnosti. Proteolytické systémy BMK mají za úkol enzymaticky přeměnit bílkoviny na jednodušší a snadněji využitelné štěpy. Bílkoviny mléka mají tak velké molekuly, že neprojdou přes buněčnou stěnu BMK. Z tohoto důvodu vytvářejí BMK štěpy bílkovin tj. peptidy a aminokyseliny, které jsou buňkami využitelné. Tato vlastnost prodlužuje trvanlivost výrobků a také ovlivňuje jejich reologické a organoleptické vlastnosti [1].

*Str. thermophilus* patří ke skupině termofilních mléčných bakterií a je tradičně využívaný v kombinaci s *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* nebo *Lactobacillus helveticus* k výrobě jogurtů a sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou (např. Ementál) [14]. Mikroorganismy jogurtové kultury žijí v symbiose. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* uvolňuje aminokyseliny, které využívá *Str. thermophilus*. *Str. thermophilus* vytváří kyselinu mléčnou, která snižuje pH média na optimum pro růst bakterie *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, a kyselinu mravenčí, která stimuluje její růst [15].



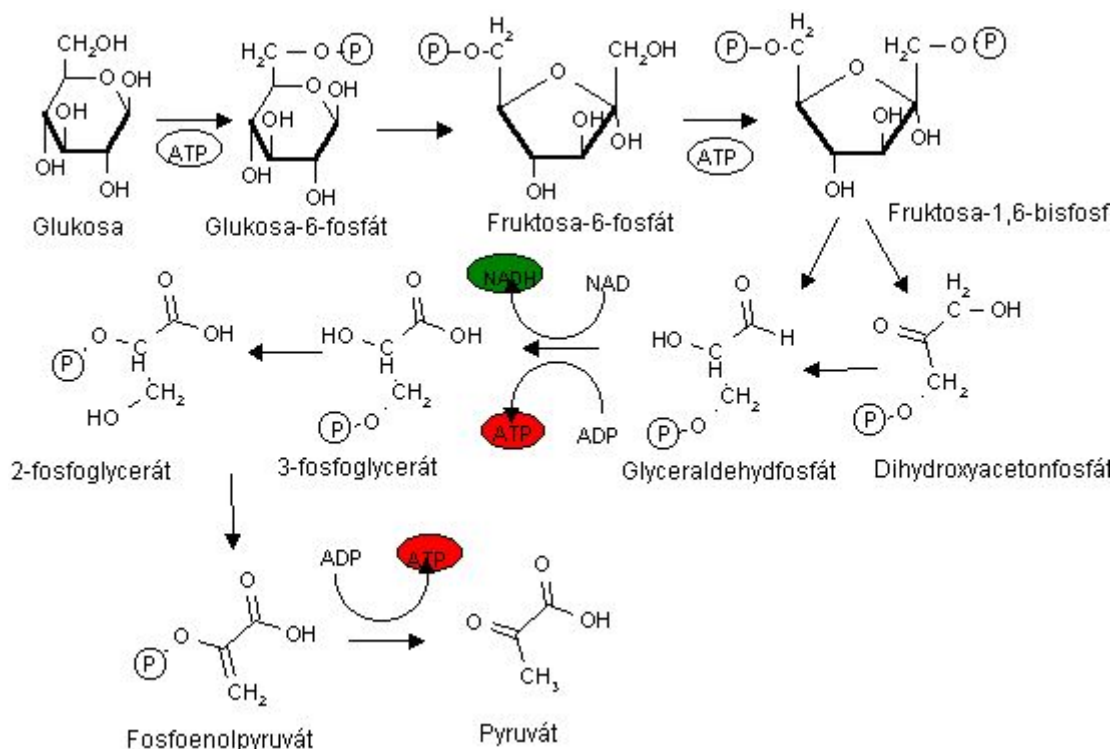
Obr. 1 – *Streptococcus thermophilus* [16]

### 2.3 Produkce inhibičně působících látek

*Streptococcus thermophilus* zkvašuje sacharidy (glukosu, laktosu, manosu, i fruktosu) homofermentativním způsobem tj. produkuje více než 90 % L(+) kyseliny mléčné a méně než 10 % ostatních produktů. Pouze malou část sacharidů mění na kyselinu

mravenčí a octovou. *Str. thermophilus* tvoří diacetyl, který tvoří charakteristickou vůni zakysaných mléčných výrobků. Mléčný cukr laktosu nejprve *Str. thermophilus* štěpí enzymem  $\beta$ -galaktosidasou na glukosu a galaktosu. Glukosa se podrobuje tzv. glykolýze. Galaktosa se hromadí, pokud není fermentovaná jinými BMK přítomnými ve výrobku [1, 13].

Mechanismus glykolýzy (Obr. 2) se dá popsat následovně: molekula glukosy se fosforyluje a izomeruje za vzniku fruktosa-1,6-bisfosfát, působením enzymu aldolasy vzniká glyceraldehyd-3-fosfát a dihydroxyaceton fosfát. Glyceraldehyd-3-fosfát se oxiduje a fosforyluje pomocí dehydrogenasy na 1,3-bisfosfoglycerát. Sledem dalších reakcí fosforylace, isomerace a enolizace vzniká pyruvát (kyselina pyrohroznová). Pyruvát je redukován za anaerobních podmínek na laktát tj. anion kyseliny mléčné [17]. *Str. thermophilus* produkuje inhibičně působící látky bakteriociny. [2]



Obr. 2 – Schéma průběhu glykolýzy [18]

### 2.3.1 Kyselina mléčná

Kyselina mléčná (2-hydroxypropanová) je přírodní organická látka kyselé chuti, lehce rozpustná ve vodě. Má jeden asymetrický uhlík, tudíž se vyskytuje ve dvou enantiomerních formách L(+) a D(-). D a L označuje strukturální konfiguraci kyseliny mléčné vzhledem ke struktuře glycerinaldehydu, neznamena optickou otáčivost v polarizovaném světle. Označení (+) znamená pravotočivá a (-) levotočivá. Označení D(-) znamená, že je konfigurace podobná D-glycerinaldehydu a je levotočivá. L(+) kyselina mléčná je analogicky pravotočivá. DL mléčná kyselina je racemická a její konfigurace je neznámá.

L(+) kyselina mléčná je lehce odbouratelná [1].

Kyselina mléčná má hydratační, antibakteriální a protizánětlivé účinky. Zvýrazňuje chuť, zesiluje účinnost antioxidantů, ovlivňuje pH a tím i kyselost sýrů, má antimikrobiální vlastnosti [19].

Kyselina mléčná má také inhibiční účinky na střevní bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*.

Je antimikrobiální látka používaná k odstranění patogenů a snížení počtu mikroorganismů na povrchu masa. Výhodou použití kyseliny mléčné je to, že nevyžaduje použití vysokých tlaků postřiků pro odstranění patogenů z masa jatečně upravených těl. Mimo to zůstává na mase jatečně upravených těl a účinkuje jako antimikrobiální látka. Studií byla prokázána inhibice *E. coli* kyselinou mléčnou. Kyselina mléčná inhibuje *E. coli* efektivněji než kyselina octová [20].

### 2.3.2 Kyselina octová

Kyselina octová (etanová) je jedna z nejjednodušších karboxylových kyselin. Vyznačuje se

se kyselou chutí a štiplavým zápachem. Kyselina octová je za normálních podmínek bezbarvá kapalina dokonale mísitelná s vodou, s etanolem i dimetyleterem. Je hygroskopická, takže pohlcuje vzdušnou vlhkost. Její vodný roztok o koncentraci přibližně od 5 do 8 % se nazývá ocet [21, 22].

Kyselina octová se v potravinářství uplatňuje také díky svým konzervačním účinkům [22]. Smrtící účinek kyseliny octové na většinu mikroorganismů je při koncentraci 6 %. Chuťově přijatelná je koncentrace 1 – 3 %, která významně prodlužuje skladovatelnost

potravin. V konzervárenství se zvyšuje účinek kyseliny octové v kombinaci s kuchyňskou solí. Pořadí účinnosti kyselin potlačující acidofilní mikroflóru je octová, mléčná, citronová, vinná a jablečná [23].

Kyselina octová se používá ke snížení počtu nebo k zastavení růstu aerobních bakterií a kvasinek v potravinách a potravinářských výrobcích. Je obecně považovaná za bezpečnou a zdravotně nezávadnou. Inhibuje například *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Yersinia enterocolytica*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Streptococcus faecalis* [20].

### 2.3.3 Kyselina mravenčí

Kyselina mravenčí (metanová) je bezbarvá kapalina kyselé chuti. Jedná se o nejjednodušší organickou kyselinu. Kyselina mravenčí má baktericidní a konzervační účinky, proto se používá k dezinfekci a v konzervárenství. Používá se ke srážení latexu, při odvápnování kůží, při vybarvování vlny (mořidla) [24]. V drůbežářském průmyslu, se někdy přidává ke krmení pro eliminaci salmonel. Někteří včelaři používají kyselinu mravenčí proti roztoči *Varroa* [25].

### 2.3.4 Diacetyl

Diacetyl (2,3-butandion) byl identifikovaný jako základní součást aroma a chuti v másle. V roce 1927 byla popsána jeho antimikrobiální aktivita vůči *Bacillus* ssp. Diacetyl produkují rody *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Streptococcus*. Při metabolismu hexosy může být tvorba diacetylu potlačena. Nicméně může dojít také k nadprodukcí diacetylu při metabolismu citrátu. Citrát přechází přes pyruvát na diacetyl. Byl pozorován větší efekt a účinek diacetylu při  $\text{pH} < 7$ , snížený účinek diacetylu v přítomnosti glukosy a acetátu. Diacetyl působí nejvíce na gramnegativní ( $G^-$ ) bakterie dále na kvasinky a plísně, méně na  $G^+$  bakterie. Nejméně citlivé na přítomnost diacetylu jsou bakterie mléčného kvašení. Diacetyl reaguje s aminokyselinou arginin u  $G^-$  bakterií a tím jim zabraňuje využít tuto aminokyselinu [26].

### 2.3.5 Bakteriociny

Mezi významné antimikrobiální látky používané v potravinářském průmyslu patří bakteriociny. Bakteriociny jsou bakteriemi produkované peptidy (obvykle obsahují 30 až 60



aminokyselinových zbytků), které usmrcují citlivé kmeny bakterií. Některé působí na cytoplasmatickou membránu bakteriální buňky, jiné nepříznivě ovlivňují funkci ribosomů. Každá bakterie, která produkuje bakteriocin, má určitý způsob imunity proti vlastnímu bakteriocinu [27, 28, 29].

Produkce bakteriocinů může být významně ovlivněna vnějšími podmínkami jako je teplota, redox potenciál, pH, ale také složením kultivačního média, např. obsahem peptidů, ionty kovů (např. manganu), koncentrací cukrů, atd. [27, 30]

Peptidy s antimikrobiální aktivitou, tedy bakteriociny, jsou účinné hlavně proti  $G^+$  bakteriím. Často je aktivita bakteriocinů zaměřena zejména proti druhům, které jsou úzce příbuzné s producentem bakteriocinu i proti dalším variantám (typům) téhož druhu [27].

Mechanismus působení bakteriocinů je založen na jejich reakcích s aniontovými lipidy (v cytoplasmě  $G^+$  bakterií) a tvorbě pórů, které vyčerpávají transmembránový potenciál nebo gradient pH. Membrána se stává propustnou, následně dochází ke ztrátě hybné síly protonu, úniku iontů ATP a dalších životně důležitých molekul s následkem smrti [27, 28].

Gramnegativní bakterie nejsou tak citlivé na bakteriociny, pokud není narušena ochranná funkce buněčné membrány. Rozdíl v citlivosti  $G^+$  a  $G^-$  bakterií na bakteriocin je způsoben rozdílnou strukturou buněčné membrány [5, 28, 31].

Bakteriociny jsou obvykle tříděny do 3 nebo 4 skupin, které jsou rozděleny na základě podobných či rozdílných vlastností a také podle složení peptidů i některých aminokyselin [31, 32, 33, 34].

- **Třída I:** zahrnuje tzv. lantibiotika typu A a B, modifikované druhy, jsou to malé molekuly velikosti 2 až 3 kDa, (obsahují výjimečné aminokyseliny např. lantionin,  $\beta$ -metyllantionin) patří k nim nisin, subtilin, galidermin, epidermin.
- **Třída II:** obsahuje malé (do 10 kDa), tepelně stabilní, nemodifikované druhy, tepelně odolné bakteriociny produkované kmeny rodů *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* a *Enterococcus*.
  - IIa** - zahrnuje pediocinové bakteriociny se silným antilisteriálním účinkem například pediocin PA-1, sakaciny A a P, lactococcin MFII, thermophilin 13.

**IIb** - zahrnuje dvoupeptidové bakteriociny například lactococciny A, B, G, F, M, lactacin F, plantaricin NC8.

**IIc** - zahrnuje sekundárně vylučované bakteriociny např. acidocin B.

- **Třída III:** zahrnuje velké (30 kDa i větší) tepelně labilní bakteriociny. Řadí se sem například helvecin J a V-1829, lactaciny A a B.
- **Třída IV:** obsahuje komplexní bakteriociny obsahující lipidy, sacharidy a proteiny.

Bakteriocinům produkovaným BMK se věnuje v potravinářství více pozornosti z důvodu jejich působení na patogenní bakterie a bakterie způsobující kažení potravin. Bakteriociny inhibují například kmeny *Listeria*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* a další [28, 30, 32].

Mezi bakteriociny, které byly doposud schváleny ke konzervaci potravin, patří především nisin. Nisin je produkován řadou kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, a je považovaný za prototyp bakteriocinů bakterií mléčného kvašení. Nisin byl objeven téměř o padesát let dříve (první zmínka o účincích nisinu v roce 1953) než mnoho dalších bakteriocinů a je první sloučeninou tohoto typu, která byla využita v potravinářském průmyslu na komerční úrovni. V roce 1969 byl nisin akceptován jako antimikrobiální látka a v roce 1988 bylo odsouhlaseno jeho využití jako biologické konzervační látky v mnoha zpracovávaných potravinách. V dnešní době je používán v potravinářském průmyslu ve více než čtyřiceti zemích po celém světě. V potravinářské technologii se často používá směsných preparátů bakteriocinů, jejichž přesné složení, tj. zastoupení jednotlivých kmenů, není běžně uváděno. Svou podstatou jsou bakteriociny antibiotiky, toto označení se však z obavy před záměnou s antibiotiky používanými

v medicíně dnes již prakticky nepoužívá [28, 30, 31].

Rod *Streptococcus* běžně produkuje bakteriociny obvykle malé (6 kDa), postranlačně modifikované peptidy zařazené do I. třídy. V posledních letech byla prokázána produkce

i velkých (10 kDa) tepelně stabilních, nemodifikovaných bakteriocinů zařazených do II. třídy. Jedná se např. o bakteriociny streptococcin M-57, dysgalacticin [35].

*Streptococcus thermophilus* SFI 13 tvoří bakteriocin thermofilin 13 skládající se ze dvou tepelně stabilních částí a inhibující následující kmeny: *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus faecium*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* [29, 31].

*Streptococcus thermophilus* 81 produkuje bakteriocin thermophilin 81, který je tepelně labilní, má antilisteriální aktivitu a široké inhibiční spektrum. Skládá se z 32 aminokyseliny a působí při pH 3 – 10. Antimikrobiální účinky byly prokázány i proti G<sup>-</sup> bakteriím [36].

Pro své vlastnosti se mohou bakteriociny používat v konzervárenství, kde chrání potraviny zejména před patogenními MO a napomáhají zvýšení údržnosti potravin. Příklady a použití baktericinů viz příloha I. [30, 31, 32].

### 3 PATOGENNÍ MIKROORGANISMY

V potravinářském průmyslu je věnována velká pozornost mikroorganismům, které vyvolávají alimentární onemocnění lidí. Výskyt potenciálně patogenních mikroorganismů v prostředí a jejich schopnost přežít v nepříznivých podmínkách, představuje vážné potenciální nebezpečí. Řada patogenních mikroorganismů se vyskytuje v zažívacím traktu zvířat a lidí, odkud jsou nepravdělně vylučovány do prostředí. Patogeny přežívají také na rostlinách, v prachu a také v povrchové a říční vodě. Z tohoto je zřejmé, jak obtížné je zabránit proniknutí patogenních mikroorganismů do potravin. Nejčastějšími potravinami spojenými s onemocněními jsou drůbež, vejce, maso, masné výrobky a jen ve velmi malém procentu mléko a mléčné výrobky. V mléce mohou být nalezeny salmonely, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, vzácně pak *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*. V úvahu je nutno brát také *Mycobacterium bovis* a především *Mycobacterium paratuberculosis* [37].

Patogenní bakterie vyvolávají choroby. Vniknutí choroboplodných bakterií do těla se nazývá infekce. Průběh nemoci závisí na virulenci a životaschopnosti bakterie. K infekci dochází [38]:

- přímým stykem s nemocným, předměty atd.,
- potravou („pitná“ voda, zelenina, nečisté ovoce aj.)
- vdechováním (vznášející se kapénky – kapénková infekce)
- poraněnou kůží (infekce ran, tetanus)
- bodnutí hmyzem (mouchy – tyfus, úplavice; vši – tyfus, úplavice; komáři rodu *Anopheles* – malárie)

Příznaky choroby se většinou projeví za několik hodin až tři týdny (inkubační doba) po infekci. Výskyt a prudké rozšíření infekční nemoci ve stejném čase na určitém místě propukne v epidemii. Rychlé množení a další vhodné podmínky (nedostatečná hygiena atd.) mohou vyvolat pandemii, které se dnes objevují jen ojediněle (rozvojové státy). Epidemie šířící se potravou se objevují i ve vyspělých státech (infekční žloutenka). Některé patogenní mikroorganismy tvoří toxiny [38].

Výskyt alimentárních infekcí a enterotoxikózy v průmyslově vyspělých státech má vzrůstající tendenci i přes trvale se zlepšující hygienické podmínky v potravinářském průmyslu i v zemědělství. Ukazuje se, že mikrobiologická vyšetření finálních výrobků

na přítomnost patogenů nezaručuje zdravotní nezávadnost těchto produktů. Potravinářští mikrobiologové jsou si již řadu let vědomi této skutečnosti i zásadních důvodů, proč tímto způsobem nelze nepřítomnost patogenů v potravinách zabezpečit. Hlavní účelem cílených mikrobiologických kontrol by měla být prevence – monitorování patogenní kontaminace v surovinách, během výroby, ve výrobcích a v prostředí. Využití poznatků o přežívání a pomnožování patogenů v potravinách by mělo sloužit k vypracování souboru opatření, která by zabraňovala kontaminaci, případně dalšímu pomnožení patogenů v potravině nebo z ní vyrobených pokrmech [39].

Viry se v potravinách vyskytují, ale nerozmnožují, avšak mohou způsobit závažná onemocnění. Většina virů je citlivá k vysokým teplotám a běžné technologické procesy jako jsou pastace a sterilizace je ničí. Některé viry jsou však schopny přežít vysoké teploty (např. virus infekční hepatitidy A), fermentační procesy aj. Proces mražení působí na viry jako konzervace. Viry v potravinách jsou nejčastěji příčinou infekční hepatitidy, vzácně klíšťové encefalitidy nebo dětské obrny, příp. jiných onemocnění [37].

Mykologie studuje interakce mezi potravinami, plísněmi a kvasinkami. Plísně jsou ubikvitárně rozšířeny v životním a pracovním prostředí člověka. Nalézáme je v ovzduší, půdě, vodě, na rostlinách, v krmivu, na pracovních plochách a stěnách v potravinářském průmyslu, na nesprávně skladovaných obalech, v surovinách a potravinách. Potraviny jsou pro plísně vhodným živným substrátem. Po kontaminaci potravin sporami dochází k růstu mycelia a aktivaci enzymového aparátu. Toxinogenní vláknité mikromycety (plísně) jsou mikroorganismy, které mají schopnost produkovat mykotoxiny. V současné době je známo více než 300 mykotoxinů. Mykotoxiny jsou sekundární toxické metabolity nebičkovinné povahy. Nejznámějšími mykotoxiny jsou aflatoxiny a ochratoxiny. Plísně patří k významným faktorům, které mohou v negativním smyslu ovlivnit zdraví člověka. Plesnivé potraviny obsahující toxinogenní mikromycety a mykotoxiny představují významné nebezpečí pro zdraví populace v ČR, zejména z hlediska tzv. pozdních toxických účinků, které mohou být karcinogenní [37, 40].

Zdroje kontaminace surovin a potravin obvykle jsou [37]:

- a. nevhodné umístění potravinářského závodu (v blízkosti zemědělské výroby, průmyslové výroby nebo zástavby obytných domů),
- b. klimatizace, zvláště při nedostatečném zabezpečení vhodnými filtry,
- c. nedostatečná hygiena a sanitace,
- d. plesnivé suroviny a potraviny.

Plísně však mají i pozitivní význam při výrobě potravin např. při výrobě sýrů [37, 40].

Systém komplexních preventivních opatření byl formulován pod názvem HACCP (Hazard Analysis of Critical Control Points). Hazard je definován takto: nepřijatelná kontaminace, růst nebo přežití mikrobů, které mohou způsobit znehodnocení nebo zdravotní nezávadnost potravin, nebo tvorbu a přetrvávání jejich toxických metabolických produktů v potravině. CCP (kritické kontrolní body) zahrnují místo, výrobní postup nebo technologický postup, který může být ovlivněn takovým způsobem, aby se vyloučil nebo alespoň minimalizoval výskyt rizik [39].

### 3.1 *Bacillus subtilis*

Doména Bacteria, kmen *Firmicutes*, třída *Bacilli*, řád *Bacillales*, čeleď *Bacillaceae*, rod *Bacillus*, druh *B. subtilis*.

Čeleď *Bacillaceae* byla popsána již v roce 1895 a v současnosti obsahuje velké množství rodů a druhů. Většinou osidlují prostředí, některé druhy mohou být patogenní pro člověka, zvířata či bezobratlé [13].

#### 3.1.1 Morfologické a fyziologické vlastnosti:

*Bacillus subtilis* je  $G^+$ , sporulující a pohyblivá bakterie. Buňky jsou tvaru tyčinek se zaoblenými konci velikosti 0,7 x 2 až 3  $\mu\text{m}$ . Tyčinky jsou uspořádány do řetízků. Bakterie jsou peritrichálně obrveny. Metabolismus je aerobní, chemoorganotrofní, obvykle kataláza pozitivní. Optimální teplota růstu je 30 °C, teplotní rozmezí růstu je 10 – 60 °C. Buňky se rozmnožují dělením. Spory jsou umístěny excentricky, mají velikost 0,8 až 1  $\mu\text{m}$  x 1 až 1,5  $\mu\text{m}$ , jsou oválného tvaru, nezduřují buňku. Spory snášejí teplotu

až 150 °C po dobu 6 hodin. *B. subtilis* ztekucuje želatinu, hydrolyzuje škrob a z dextri-  
nu tvoří kyselinu [41].

### 3.1.2 Kultivační vlastnosti:

Na agarových půdách tvoří *B. subtilis* okrouhlé matné kolonie krémově bělavé barvy, někdy slabě nahnědlé a vláknitě rozbíhavé. Mléko pomalu peptonizuje a alkalizuje. Kasein na mléčném agaru hydrolyzuje. Bujón kalí za vzniku šedavé sedliny. Dobře roste na bramborách [41].

### 3.1.3 Výskyt a uplatnění:

*Bacillus subtilis* je v přírodě velmi rozšířen, vyskytuje se zejména v seně, půdě, prachu a ve vodě. Je obávanou kontaminací v pekařském průmyslu, kde způsobuje nitkovitost pečiva a chleba, a také v mlékárenském průmyslu, kde je škůdcem pasterovaného i kondenzovaného mléka. Jako kontaminant se dále vyskytuje v konzervářenském, masném a kvasném průmyslu. Používá se také jako indikátor pro detekci přítomnosti  $\beta$ -laktamových antibiotik např. penicilinu [41, 42].



Obr. 3 – *Bacillus subtilis* [43]

### 3.2 *Listeria innocua*

Doména Bacteria, kmen *Firmicutes*, třída *Bacilli*, řád *Bacillales*, čeleď *Listeriaceae*, rod *Listeria*, druh *Listeria innocua* [13].

Čeleď *Listeriaceae* je nově navržená. V současnosti tato čeleď obsahuje pouze dva rody,

a to *Listeria* a *Brochotrix*. Zmíněné rody jsou významné z hlediska klinické i potravinářské mikrobiologie [13].

*Listeria innocua* byla objevena vědci Seeliger a Schoofs v roce 1979. Její druhové jméno znamená v latině nevinný (nebo neškodný), jelikož nezpůsobuje listeriózu (na rozdíl od *Listeria monocytogenes* a *ivanovii*) [44].

#### 3.2.1 Morfologické a fyziologické vlastnosti:

*Listeria innocua* tvoří pravidelné krátké tyčinky se zakulacenými konci, občas i kokovitěho tvaru, vyskytují se jednotlivě nebo v krátkých řetězcích, někdy tvoří „V“ formy. Starší kultura tvoří dlouhá vlákna. *Listeria innocua* je G<sup>+</sup>, nesporulující, netvoří pouzdra, snáší vysoké i nízké teploty a široké rozmezí pH (4,4 – 9,8). Při kultivaci s teplotami 20 – 25 °C jsou pohyblivé s několika peritrichálními bičíky. Optimální teplota růstu je 30 – 37 °C. *Listeria innocua* je fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní s fermentačním metabolismem. Hlavním produktem fermentace glukosy je L(+) laktát. Tato bakterie fermentuje řadu cukrů, ale bez tvorby plynu. *Listeria innocua* je kataláza pozitivní, oxidasa negativní, acetoin pozitivní. Hydrolyzuje eskulin, ale ne ureu, želatinu ani kasein, [13, 45].

#### 3.2.2 Kultivační vlastnosti:

*Listeria innocua* tvoří na agarových půdách malé, kulaté kolonie s pravidelným okrajem [45].

#### 3.2.3 Výskyt a uplatnění:

Listerie jsou velmi rozšířené v prostředí, některé druhy jsou patogenní pro člověka a zvířata. *Listeria innocua* je izolována z půdy, rostlin, stolice člověka i zvířat, je nepatogenní. *Listeria innocua* je důležitá pro výzkum, protože je velmi podobná alimentární patogenní *Listeria monocytogenes* způsobující onemocnění [13, 45].



Výzkumy bylo zjištěno, že izoláty rodu *Listeria* produkují inhibiční látky proti *Listeria monocytogenes*. Byl studován izolát *Listeria innocua* 743, který tvoří bakteriociny a proteiny proti jiným bakteriocinům [45].



Obr. 4 – *Listeria innocua*

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 MATERIÁL

### 4.1 Přístroje, zařízení a pomůcky

**Mikropipety** – BioHit (Fisher Scientific, Anglie)

**Parní sterilizátor** – VARIOKLAV 75S, 135S, H+P Labortechnik, Německo

**Očkovací box** – Clan air Technick B. V, Schoeller, Holandsko

**Váhy** – KERN 440.47N (max. 2000g), Německo

**Vortex** – Heidolph REAX top, Německo

**pH metr** – Gryf 208L, Havlíčkův Brod, ČR

**denzitometr** – DENZI-LA-METTER, EMO Brno

## 4.2 Použité mikroorganismy

V této práci bylo použito 7 kmenů *Streptococcus thermophilus* získaných ze sbírky Ústavu technologie a mikrobiologie potravin UTB ve Zlíně:

*Streptococcus thermophilus* 1

*Streptococcus thermophilus* 2

*Streptococcus thermophilus* 3

*Streptococcus thermophilus* 4

*Streptococcus thermophilus* 5

*Streptococcus thermophilus* 6

*Streptococcus thermophilus* 7

Jako indikátorové mikroorganismy inhibičních účinků streptokoků byly použity kmeny získané jak z České sbírky mlékárenských mikroorganismů (CCDM), tak z České sbírky mikroorganismů (CCM):

*Bacillus subtilis* CCDM 795

*Listeria innocua* CCM 4030

### 4.3 Kultivační půdy

#### Živné médium M17:

M 17	37,25 g	(Oxoid, United Kingdom)
10 % roztok glukosy	95 ml	(Lach-Ner, ČR)
10% roztok laktosy	49,4 ml	(Lach-Ner, ČR)
Voda	950 ml	

#### Živné médium MPB (MPB):

masový výtažek	3 g	(Himedia, India)
pepton	5 g	(Himedia, India)
NaCl	3 g	(Sigma-Aldrich, USA)
(agar	15g)	(Himedia, India)
voda	1000 ml	

#### Živné médium BHI (Brain Heart Infusion Broth (agar))

BHI	37 g	(Himedia, India)
(agar	15g)	(Himedia, India)
Voda	1000 ml	

#### Živné médium BCP:

##### **Použití:**

Půda pro zjištění inhibičních účinků kmenů *Streptococcus thermophilus* vůči *Bacillus subtilis* a *Listeria innocua*.

agar	15g	(Himedia, India)
bromkresolpurpurový indikátor	0,1 g	(Sigma-Aldrich, USA)
UHT odstředěné mléko	250 ml	(0,5 % hm. Tuku, Olma, a.s., ČR)

voda

735 ml

## 5 METODY

### 5.1 Stanovení inhibičních účinků *Str. thermophilus* v modelovém systému UHT mléka

#### Postup:

Inhibiční účinky zkoumaných kmenů *Streptococcus thermophilus* vůči listeriím a bacilům byly prověřeny v modelovém systému mléka UHT (0,5 % hm. ml. tuku, Populár, Olma, a.s., ČR) dle Švirákové a kol. (2009). Jednalo se o společnou kultivaci streptokoků s *Listeria innocua* a *Bacillus subtilis* v mléce při 37 °C po dobu 3 dní. Během kultivace byly sledovány hodnoty pH a počty listerií či bacilů vždy nultý, první a třetí den. Počty listerií byly prováděny na půdě BHI agar a počty bacilů na půdě MPA. První modelový systém: streptokoky (denzita  $10^8$  CFU.ml<sup>-1</sup>) byly do mléka inokulovány s listeriem nebo bacily (denzita  $10^3$  CFU.ml<sup>-1</sup>) současně. Druhý modelový systém: mléko bylo nejdříve fermentováno streptokoky (denzita  $10^8$  CFU.ml<sup>-1</sup>) a poté bylo zaočkováno listeriem nebo bacily (denzita  $10^3$  CFU.ml<sup>-1</sup>). Dále bylo provedeno i kontrolní stanovení, to znamená, že do mléka byl zaočkován pouze indikátorový mikroorganismus (denzita  $10^3$  CFU.ml<sup>-1</sup>) bez bakterií mléčného kvašení. Tato metoda byla prováděna pro každou kulturu mléčných bakterií a indikátorový mikroorganismus dvakrát.

### 5.2 Stanovení inhibičních účinků *Str. thermophilus* na BCP agaru

#### Postup:

Stanovení inhibičních účinků studovaných kmenů streptokoků na BCP agaru vycházelo z modifikované metody dle Plockové a kol. (2001). Jako indikátorové kmeny byly opět použity *Listeria innocua* CCM 4030 a *Bacillus subtilis* CCDM 795. Na Petriho misky bylo očkováno 20 µl kultury bakterií mléčného kvašení *Streptococcus thermophilus*, které byly přelity připraveným a vychlazeným (45 °C) BCP agarem. Po zatuhnutí byly Petriho misky kultivovány při 37 °C po dobu 48 hodin. Po této době byly Petriho misky předsušeny 10 min, 40 °C v sušárně. Dále byly indikátorové mikroorganismy (*Bacillus subtilis*, *Listeria innocua*) naočkovány vpichem (5 µl suspenze). Byly provedeny dva vpichy vedle sebe. Po vsáknutí byly Petriho misky uloženy do termostatu a kultivovány

po dobu 7 dní. Během této doby byl pozorován růst a zbarvení okolo vpichů. Každý den se měřil průměr každého vpichu zvlášť. Pro každou kulturu mléčných bakterií a indikátorový mikroorganismus byla provedena dvě stanovení. Dále bylo provedeno i kontrolní stanovení, to znamená, že na Petriho misku byly zaočkovány pouze indikátorové mikroorganismy bez bakterií mléčného kvašení.

**Výpočet:**

Průměr růstových zón vypočtený pro dané kontrolní stanovení má hodnotu 100 % ve srovnání s hodnotami vypočtenými pro jednotlivé kultury mléčných bakterií.

**Vzorec pro výpočet procenta inhibice:**

$$\%_{inhib.} = 100 - \frac{100 \cdot \bar{x}}{\bar{X}}$$

$\%_{inhib.}$  ..procento inhibice určitého indikátorového mikroorganismu danou kulturou

$\bar{x}$  .....průměr růstové zóny pro danou kulturu mléčných bakterií a indikátorový mikroorganismus

$\bar{X}$  .....průměr růstové zóny pro odpovídající kontrolní stanovení a indikátorový mikroorganismus



## 6 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 6.1 Hodnocení metody inhibičních účinků kmenů *Str. thermophilus* v systému UHT mléka

Pro diplomovou práci byly vybrány indikátorové MO *Bacillus subtilis* a *Listeria innocua*, na které působí mikrobicidně a mikrobistaticky bakteriocin thermophilin 13, který produkují vybrané kmeny streptokoků [29].

Byla provedena studie bakteriocinu termophilinu 13, který je aktivní vůči kmenům *Bacillus*, *Clostridium tyrobutyricum*, *L. monocytogenes* a *L. innocua*. Také byl prokázán vliv pH na bakteriociny [29]. Bakteriociny jsou velmi žádané v potravinářství z důvodu zajištění kvality a bezpečnosti potravin. Jejich použití v kombinaci s jinými antibakteriálními látkami otevírá nové možnosti širšího využití bakteriocinů v potravinářství, které však nejsou ještě dostatečně prostudovány [46]. Je potřeba více objasnit strukturně funkční vztahy, výrobu, odolnost a způsob účinku bakteriocinů [31]. *Str. thermophilus* produkuje kromě bakteriocinů i exopolysacharidy a vitaminy (B<sub>12</sub> a kyselinu listovou), také má potenciální probiotické účinky [47].

V současnosti vzhledem k zdravotní nezávadnosti výrobků jsou středem pozornosti bakterie rodu *Listeria*. V modelovém systému mléka UHT byl pozorován Šviráková, Tichovský a kol. (2009) vliv laktokoků na růst listerií. Výsledkem bylo, že laktokoky používané pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků ve formě mezofilních kyselých kultur lze použít pro kontrolu výskytu a růstu listerií díky jejich bohatým biochemickým činnostem. Především díky produkci kyseliny mléčné a různých bakteriocinů včetně nisinu. V modelovém systému UHT mléka bylo zjištěno, že pokud dojde ke kontaminaci mléka listeriemi ještě před fermentací laktokoků, dojde k adaptaci přítomných listerií na kyselé prostředí (pH 4,0 – 4,5) a jejich denzita se následně nezvyší ani nesníží. Jestliže listerie kontaminují již zfermentovaného mléka, skoková změna pH způsobí redukci počtu listerií [48].

Pozorování prováděné nultý, první a třetí den po aplikaci streptokoků a patogenních mikroorganismů do mléka pro oba indikátorové mikroorganismy a oba modelové systémy vycházejí z Tab. 1, 2, 3 a 4.

V Tab. 1 jsou uvedeny hodnoty pH a počty bacilů v UHT mléce zaočkovaném danými kmeny *Str. thermophilus* a *B. subtilis* současně. Během tří dnů pokusu se pH postupně snižovalo vlivem tvorby kyseliny mléčné, která má inhibiční účinky na patogenní mikroorganismy. V prvním a třetí dnu pokusu byly počty *B. subtilis* řádově shodné, z čehož lze usoudit, že kmeny streptokoků pozastavily růst *B. subtilis*. Avšak počty bacilů v daných vzorcích mléka s kontrolním stanovením byly nultý den nižší o dva řády, první den o jeden řád a třetí den opět o dva řády. Nejvíce inhibujícím kmenem byl *Str. thermophilus* 1. Mléko nejvíce okyseloval kmen *Str. thermophilus* 7, proto lze tvrdit, že na inhibici zřejmě nemá jednoznačný vliv pH. Nejmenší inhibici vůči kmenu *B. subtilis* měl *Str. thermophilus* 4.

V Tab. 2 jsou uvedeny naměřené hodnoty pH a počty *B. subtilis* nultý, první a třetí den v UHT mléce předem zaočkovaném studovanými kmeny *Str. thermophilus* a posléze bacily. Počty indikátorového MO v mléce se *Str. thermophilus* byly nultý, první a třetí den řádově stejné z čehož plyne, že *Str. thermophilus* pouze pozastavoval růst *B. subtilis*. Avšak v porovnání daných vzorků mléka s kontrolou byl počet bacilů nultý den rozdílný o jeden řád, první den o dva řády a třetí den o tři řády. Dalo by se říci, že pH zřejmě příliš neovlivňuje inhibiční účinky streptokoků. Jelikož kmen *Str. thermophilus* 7, u kterého bylo naměřeno nejnižší pH, nedosahoval nejvyšší inhibiční aktivity. Jako nejúčinnější kmen v tomto modelovém systému byl určen *Str. thermophilus* 3. Nejméně efektivní vůči kmenu *B. subtilis* byl kmen *Str. thermophilus* 4.

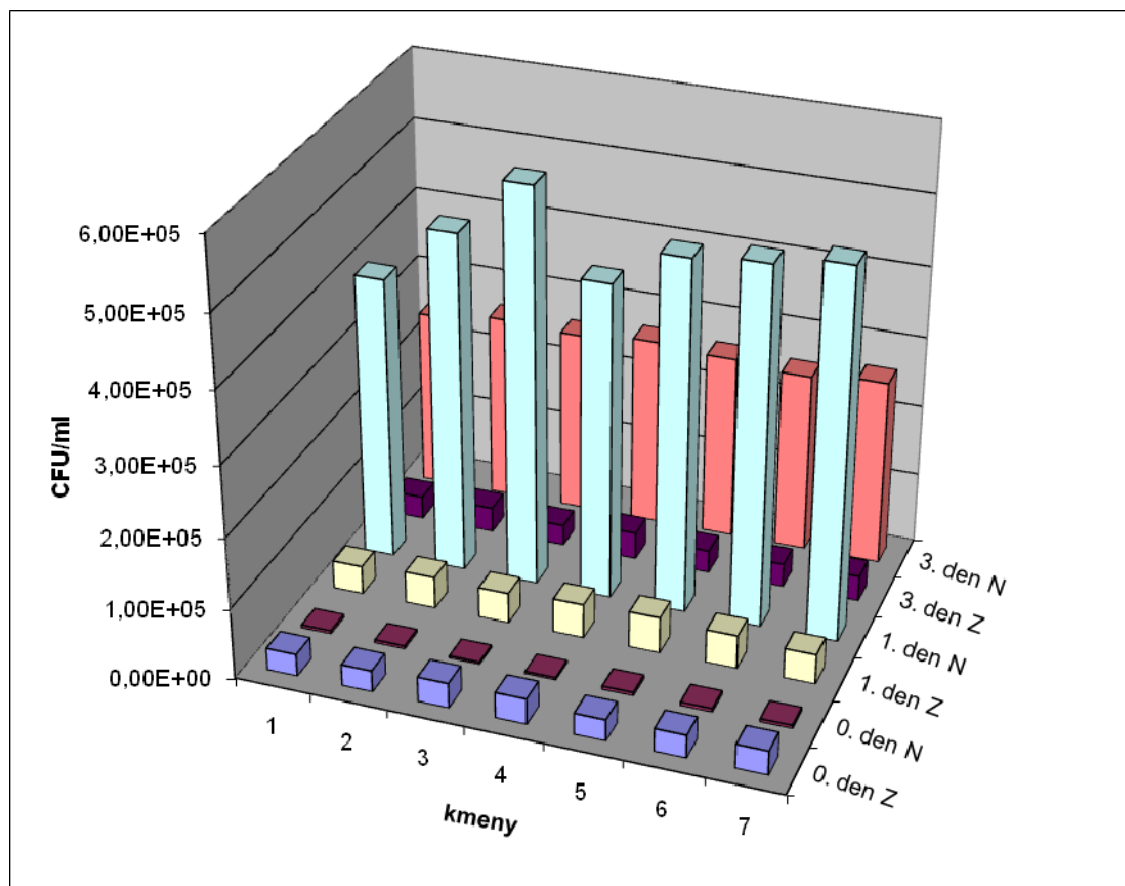
Indikátorový MO *B. subtilis* je inhibován nejvíce v druhém modelovém systému mléka tedy v mléce předem zaočkovaném kmeny *Str. thermophilus* (Obr. 5) zřejmě díky tvorbě bakteriocinu thermophilinu 13, taktéž produkcí kyseliny mléčné či jiných inhibičně působících látek. Nejvyšší inhibici z obou systémů mléka vykazoval kmen *Str. thermophilus* 1, nejnižší pak *Str. thermophilus* 4.

*Tab. 1 – Hodnoty pH a počty bacilů nultý, první a třetí den kultivace v mléce UHT zaočkovaném danými kmeny Str. thermophilus a B. subtilis současně.*

1. modelový systém						
Kmen č.	0. den		1. den		3. den	
	pH	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	CFU/ml
1	6,69	$4,20 \cdot 10^3$	5,20	$4,00 \cdot 10^5$	4,55	$2,51 \cdot 10^5$
2	6,71	$4,10 \cdot 10^3$	5,16	$4,80 \cdot 10^5$	4,54	$2,63 \cdot 10^5$
3	6,70	$3,00 \cdot 10^3$	5,20	$5,60 \cdot 10^5$	4,55	$2,58 \cdot 10^5$
4	6,71	$3,10 \cdot 10^3$	5,28	$4,45 \cdot 10^5$	4,57	$2,67 \cdot 10^5$
5	6,69	$4,60 \cdot 10^3$	5,31	$4,96 \cdot 10^5$	4,58	$2,61 \cdot 10^5$
6	6,70	$4,80 \cdot 10^3$	5,44	$5,05 \cdot 10^5$	4,59	$2,54 \cdot 10^5$
7	6,71	$4,30 \cdot 10^3$	5,24	$5,20 \cdot 10^5$	4,48	$2,63 \cdot 10^5$
<i>B. subtilis</i>	6,73	$3,30 \cdot 10^5$	6,65	$3,50 \cdot 10^6$	6,87	$1,51 \cdot 10^7$

Tab. 2 – Hodnoty pH a počty *Bacillus subtilis* nultý, první a třetí den kultivace v mléce UHT předem zaočkovaném studovanými kmeny *Str. thermophilus*.

2. modelový systém						
Kmen č.	0. den		1. den		3. den	
	pH	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	CFU/ml
1	5,15	$3,10 \cdot 10^4$	4,65	$4,00 \cdot 10^4$	4,55	$3,20 \cdot 10^4$
2	5,15	$3,00 \cdot 10^4$	4,62	$4,50 \cdot 10^4$	4,50	$3,50 \cdot 10^4$
3	5,20	$3,50 \cdot 10^4$	4,65	$4,30 \cdot 10^4$	4,49	$2,90 \cdot 10^4$
4	5,29	$3,60 \cdot 10^4$	4,66	$4,80 \cdot 10^4$	4,54	$3,80 \cdot 10^4$
5	5,34	$3,00 \cdot 10^4$	4,70	$5,10 \cdot 10^4$	4,55	$3,20 \cdot 10^4$
6	5,45	$3,20 \cdot 10^4$	4,83	$4,70 \cdot 10^4$	4,61	$3,30 \cdot 10^4$
7	5,15	$3,40 \cdot 10^4$	4,55	$4,20 \cdot 10^4$	4,47	$3,60 \cdot 10^4$
<i>B. subtilis</i>	6,73	$3,30 \cdot 10^5$	6,65	$3,50 \cdot 10^6$	6,87	$1,51 \cdot 10^7$



Obr. 5 – Znárodnění počtu *Bacillus subtilis* v obou modelových systémech UHT mléka multý, první a třetí den.

Legenda:

- 0. den Z .... 0. den pro zakysané mléko tj. 2. modelový systém
- 0. den N .... 0. den pro nezakysané mléko tj. 1. modelový systém
- 1. den Z .... 1. den pro zakysané mléko, 2. modelový systém
- 1. den N .... 1. den pro nezakysané mléko, 1. modelový systém
- 3. den Z .... 3. den pro zakysané mléko, 2. modelový systém
- 3. den N .... 3. den pro nezakysané mléko, 1. modelový systém

V Tab. 3 jsou uvedeny hodnoty pH a počty listerií nultý, první a třetí den kultivace v mléce UHT zaočkovaném danými kmeny *Str. thermophilus* a *L. innocua* současně. Počty *L. innocua* byly v každém dnu měření řádově rozdílné, tedy studované kmeny *Str. thermophilus* snižují počet bakterií *L. innocua*. Avšak porovnáním počtu listerií v daných vzorcích mlék s kontrolou byl nultý den sledován pokles o tři řády, první den a třetí den o jeden řád. Nejvíce inhibujícím kmenem byl *Str. thermophilus* 4, který zároveň nejvíce okyselil mléko. Z tohoto důvodu se projevil i vliv pH na inhibiční efekt. Nejmenší účinnost byla prokázána u kmene *Str. thermophilus* 1.

V Tab. 4 jsou zadány hodnoty pH a počty *L. innocua* v UHT mléce předem zaočkovaném kmeny *Str. thermophilus* a posléze listeriemí. Počty listerií byly nultý, první a třetí den řádově rozdílné z čehož plyne, že *Str. thermophilus* snižuje počet bakterií *L. innocua*. Avšak porovnání počtu listerií v daných vzorcích mlék s kontrolním stanovením byly nultý den nižší o dva řády, první a třetí den o jeden řád. Největší aktivitu vykazoval kmen *Str. thermophilus* 2, i když u něj nebylo dosaženo nejnižší hodnoty pH. Nejnižší aktivitu vykazoval kmen *Str. thermophilus* 7.

Ze získaných výsledků lze konstatovat, že kmeny *Str. thermophilus* snižují počet *L. innocua*.

Vyšší aktivita kmenů streptokoků byla pozorována ve druhém modelovém systému tj. v mléce UHT předem zaočkovaném danými kmeny *Str. thermophilus* a *L. innocua* (Obr. 6). V případě nezakysaných mlék byl prokázán vliv pH, proto lze říci, že inhibiční aktivita byla způsobena nejen bakteriociny, ale také tvorbou kyseliny mléčné. Nejúčinnějším kmenem vůči bakterii *L. innocua* byl *Str. thermophilus* 2. Nejméně účinný pak byl kmen *Str. thermophilus* 1.

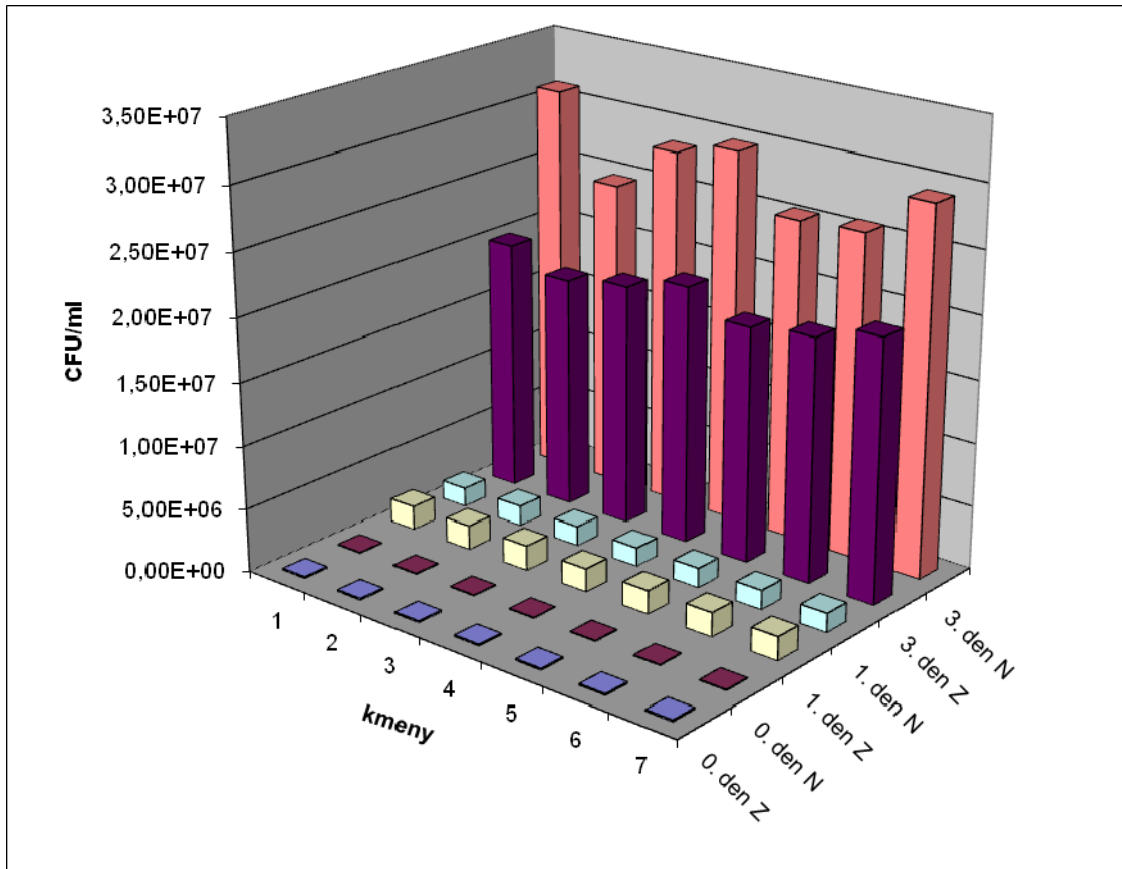
U všech studovaných kmenů *Streptococcus thermophilus* byla sledována vyšší inhibiční aktivita vůči daným indikátorovým mikroorganismům v zakysaném mléku. To mohlo být způsobeno nepříznivými podmínkami pro množení a růst těchto mikroorganismů jako je kyselé prostředí mléka či zvýšená koncentrace thermophilinu<sup>13</sup>.

Tab. 3 – Hodnoty pH a počty listerií nultý, první a třetí den kultivace v mléce UHT zaočkovaném danými kmeny *Str. thermophilus* a *L. innocua* současně.

1. modelový systém						
Kmen č.	0. den		1. den		3. den	
	pH	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	CFU/ml
1	6,76	$6,84 \cdot 10^4$	5,19	$1,50 \cdot 10^6$	4,63	$3,11 \cdot 10^7$
2	6,78	$7,16 \cdot 10^4$	5,24	$1,61 \cdot 10^6$	4,66	$2,46 \cdot 10^7$
3	6,78	$7,05 \cdot 10^4$	5,27	$1,55 \cdot 10^6$	4,74	$2,84 \cdot 10^7$
4	6,81	$6,96 \cdot 10^4$	5,16	$1,49 \cdot 10^6$	4,61	$2,96 \cdot 10^7$
5	6,79	$7,10 \cdot 10^4$	5,41	$1,56 \cdot 10^6$	4,73	$2,54 \cdot 10^7$
6	6,79	$6,89 \cdot 10^4$	5,33	$1,54 \cdot 10^6$	4,79	$2,57 \cdot 10^7$
7	6,78	$6,93 \cdot 10^4$	5,28	$1,51 \cdot 10^6$	4,62	$2,91 \cdot 10^7$
<i>L. innocua</i>	6,78	$3,32 \cdot 10^7$	5,63	$9,52 \cdot 10^7$	5,32	$5,56 \cdot 10^8$

Tab. 4 – Hodnoty pH a počty *Listeria innocua* nultý, první a třetí den v UHT mléce předem zaočkovaném studovanými kmeny *Str. thermophilus*.

2. modelový systém						
Kmen č.	0. den		1. den		3. den	
	pH	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	CFU/ml
1	5,17	$1,31 \cdot 10^5$	4,71	$1,89 \cdot 10^6$	4,52	$2,00 \cdot 10^7$
2	5,30	$1,36 \cdot 10^5$	4,87	$1,93 \cdot 10^6$	4,66	$1,84 \cdot 10^7$
3	5,26	$1,34 \cdot 10^5$	4,84	$1,97 \cdot 10^6$	4,61	$1,92 \cdot 10^7$
4	5,19	$1,29 \cdot 10^5$	4,75	$1,84 \cdot 10^6$	4,60	$2,05 \cdot 10^7$
5	5,16	$1,30 \cdot 10^5$	4,95	$1,86 \cdot 10^6$	4,67	$1,87 \cdot 10^7$
6	5,40	$1,27 \cdot 10^5$	4,92	$1,91 \cdot 10^6$	4,63	$1,93 \cdot 10^7$
7	5,36	$1,33 \cdot 10^5$	4,84	$1,87 \cdot 10^6$	4,58	$2,07 \cdot 10^7$
<i>L. innocua</i>	6,78	$3,32 \cdot 10^7$	5,63	$9,52 \cdot 10^7$	5,32	$5,56 \cdot 10^8$



Obr. 6 – Znázornění počtu *Listeria innocua* v obou modelových systémech UHT mléka multý, první a třetí den.

Legenda:

- 0. den Z .... 0. den pro zakysané mléko tj. 2. modelový systém
- 0. den N .... 0. den pro nezakysané mléko tj. 1. modelový systém
- 1. den Z .... 1. den pro zakysané mléko, 2. modelový systém
- 1. den N .... 1. den pro nezakysané mléko, 1. modelový systém
- 3. den Z .... 3. den pro zakysané mléko, 2. modelový systém
- 3. den N .... 3. den pro nezakysané mléko, 1. modelový systém

## 6.2 Hodnocení metody inhibičních účinků kmenů *Str. thermophilus* na BCP agaru

V Tab. 5 jsou uvedeny průměry růstových zón (cm) měřené během sedmi dnů kultivace studovaných kmenů *Str. thermophilus* spolu s *B. subtilis* na BCP agaru. V následující Tab. 6 jsou uvedené výsledky procent inhibice jednotlivých kmenů streptokoků vůči bakterii *B. subtilis*.

Pokusem byla prokázána inhibice *B. subtilis* kmeny streptokoků. Největší inhibici vykazoval *Str. thermophilus* 3 (66,7 %). Kmeny *Str. thermophilus* 2 a *Streptococcus thermophilus* 6 inhibovaly *B. subtilis* nejméně, oba kmeny z 30 %. Toto pořadí je názorně zobrazeno v Obr. 7.

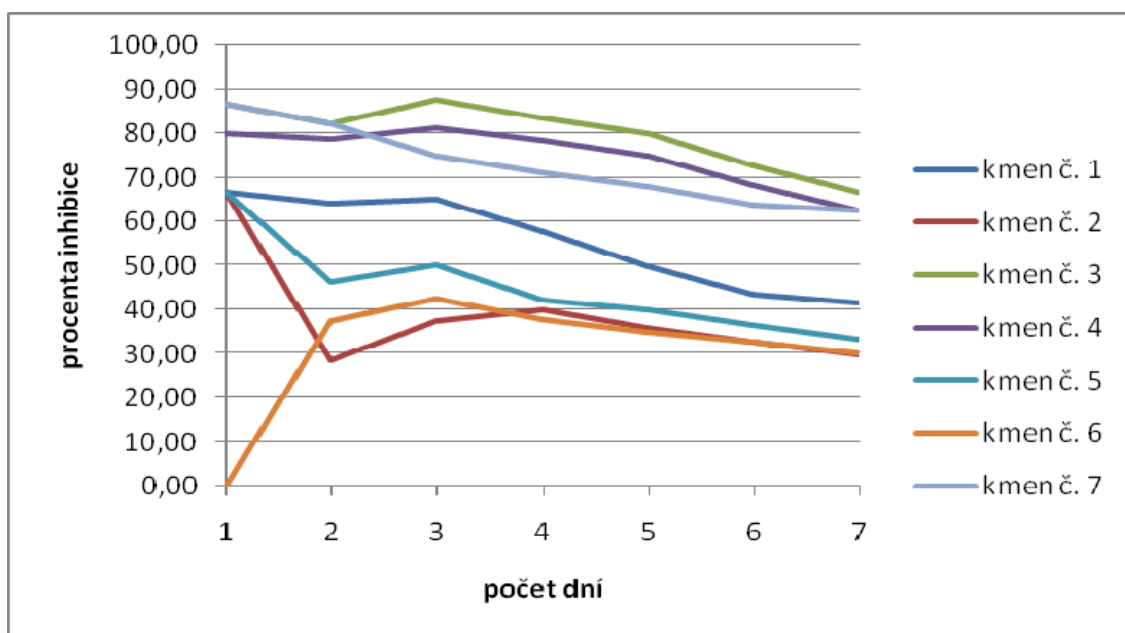
Tab. 5 – Průměr růstových zón (cm) *Bacillus subtilis* během 7 dnů kultivace na BCP agaru se studovanými kmeny *Str. thermophilus*.

Kmen	Průměr růstové zóny (cm)						
	1. den	2. den	3. den	4. den	5. den	6. den	7. den
1	0,50	1,00	1,40	1,90	2,50	3,10	3,50
2	1,51	2,00	2,50	2,70	3,20	3,70	4,20
3	0,20	0,50	0,50	0,75	1,00	1,50	2,00
4	0,31	0,60	0,75	0,97	1,25	1,75	2,25
5	0,50	1,50	2,00	2,60	3,00	3,50	4,00
6	1,51	1,75	2,30	2,80	3,25	3,70	4,20
7	0,21	0,50	1,00	1,30	1,60	2,00	2,25
<i>B. subtilis</i>	1,50	2,80	4,00	4,50	5,00	5,50	6,00



Tab. 6 – Míra inhibičního účinku studovaných kmenů *Str. thermophilus* s indikátorovým mikroorganismem *Bacillus subtilis* v časovém intervalu 7 dní.

Kmen	Inhibiční účinek [%]						
	1. den	2. den	3. den	4. den	5. den	6. den	7. den
1	66,67	64,29	65,00	57,78	50,00	43,64	41,67
2	66,67	28,57	37,50	40,00	36,00	32,73	30,00
3	86,67	82,14	87,50	83,33	80,00	72,73	66,67
4	80,00	78,57	81,25	78,44	75,00	68,18	62,50
5	66,67	46,43	50,00	42,22	40,00	36,36	33,33
6	0,00	37,50	42,50	37,78	35,00	32,73	30,00
7	86,67	82,14	75,00	71,11	68,00	63,64	62,50



Obr. 7 – Přehled procent inhibice pro kmeny streptokoků s indikátorovým mikroorganismem *Bacillus subtilis* v časovém intervalu 7 dní.

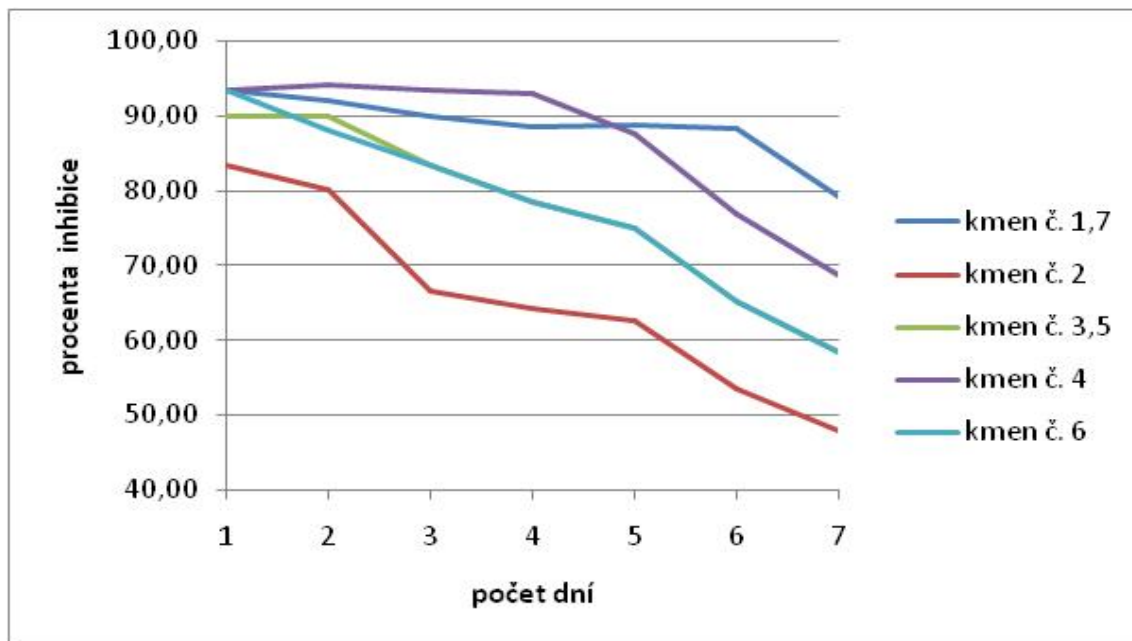
V Tab. 7 jsou uvedeny naměřené průměry růstových zón (cm) pro indikátorový mikroorganismus *L. innocua* kultivovaný spolu s jednotlivými kmeny streptokoků na BCP agaru. Následuje Tab. 8 s procenty inhibice pro kmeny streptokoků s *L. innocua*. Největší inhibiční aktivitu vykazoval kmen *Str. thermophilus* 1 a *Str. thermophilus* 7 a to ze 79,17 %. Kmen *Str. thermophilus* 2 inhiboval *L. innocua* nejméně, a to ze 47,92 %. Toto pořadí je znázorněno v Obr. 8.

Tab. 7 – Průměr růstových zón (cm) *Listeria innocua* během 7 dnů kultivace na BCP agaru se studovanými kmeny *Str. thermophilus*.

Kmen	Průměr růstové zóny (cm)						
	1. den	2. den	3. den	4. den	5. den	6. den	7. den
1	0,10	0,20	0,30	0,40	0,45	0,50	1,00
2	0,25	0,50	1,00	1,25	1,50	2,00	2,50
3	0,15	0,25	0,50	0,75	1,00	1,50	2,00
4	0,10	0,15	0,20	0,25	0,50	1,00	1,50
5	0,10	0,25	0,50	0,75	1,00	1,50	2,00
6	0,10	0,30	0,50	0,75	1,00	1,50	2,00
7	0,10	0,20	0,30	0,40	0,45	0,50	1,00
<i>L. innocua</i>	1,50	2,50	3,00	3,50	4,00	4,30	4,80

Tab. 8 – Míra inhibičního účinku studovaných kmenů *Str. thermophilus* s indikátorovým mikroorganismem *Listeria innocua* v časovém intervalu 7 dní.

Kmen	Inhibiční účinek [%]						
	1. den	2. den	3. den	4. den	5. den	6. den	7. den
1	93,33	92,00	90,00	88,57	88,75	88,37	79,17
2	83,33	80,00	66,67	64,29	62,50	53,49	47,92
3	90,00	90,00	83,33	78,57	75,00	65,12	58,33
4	93,33	94,00	93,33	92,86	87,50	76,74	68,75
5	93,33	90,00	83,33	78,57	75,00	65,12	58,33
6	93,33	88,00	83,33	78,57	75,00	65,12	58,33
7	93,33	92,00	90,00	88,57	88,75	88,37	79,17



Obr. 8 – Přehled procent inhibice pro kmeny streptokoků s indikátorovým mikroorganizmem *Listeria innocua* v časovém intervalu 7 dní.

V případě modelových systémů mléka UHT byl kmen *Str. thermophilus* 1 určen jako nejúčinnější vůči *B. subtilis*. Naopak nejméně účinným vůči bacilům byl kmen *Str. thermophilus* 4. Vzhledem k indikátorovému mikroorganismu *L. innocua* byl nejúčinnějším kmenem *Str. thermophilus* 2 a nejméně účinným *Str. thermophilus* 1.

V metodě s BCP agarem byl nejúčinnější kmen *Str. thermophilus* 3 a nejméně pak *Str. thermophilus* 2 a *Str. thermophilus* 6 vůči *B. subtilis*. Nejeftektivnějším kmenem vůči *L. innocua* byl kmen *Str. thermophilus* 1 a *Str. thermophilus* 7, nejméně inhibující *Str. thermophilus* 2.

Srovnáním první a druhé metody stanovení inhibičních účinků kmenů *Str. thermophilus* se zdál být jako nejúčinnější kmen *Str. thermophilus* 1 (79,17 %), který se ve svém inhibičním účinku vůči *B. subtilis* shodoval v metodě s UHT mlékem a vůči *L. innocua* v metodě s BCP agarem. Celkově byl nejméně aktivním určen kmen *Str. thermophilus* 2, který inhiboval nejméně (39 %) *B. subtilis* i *L. innocua* u metody s BCP agarem.

## ZÁVĚR

Po tisíciletí bylo mléko konzervováno fermentací bakteriemi mléčného kvašení, jejichž primární role je v tvorbě kyseliny mléčné a následném snížení pH. Kromě toho mnoho z používaných kultur může během fermentace produkovat řadu dalších metabolitů, které mají vliv nejen na kvalitu, bezpečnost, chuť a strukturu fermentované potraviny, ale také na její výživný a zdraví ovlivňující charakter.

V praktické části byly prováděny dvě metody studující inhibiční účinky kmenů *Str. thermophilus* vůči kmenům *Bacillus subtilis* a *Listeria innocua*.

První metodou bylo stanovení inhibičních účinků *Str. thermophilus* v modelovém systému mléka UHT. Vyšší inhibiční aktivita studovaných kmenů streptokoků byla prokázána ve druhém modelovém systému, tedy v mléce zaočkovaném nejdříve danými kmeny *Str. thermophilus* a poté kmeny *B. subtilis* či *L. innocua*. Zakysané mléčné výrobky jsou tedy pravděpodobně více chráněné vůči *B. subtilis* a *L. innocua* z důvodu kyselého prostředí a zřejmě většího rozvoje thermophilinu 13. Navíc vliv pH nebyl zcela prokázán, z toho lze usoudit, že inhibiční aktivita byla způsobena z větší části díky tvorbě thermophilinu 13.

Nejvyšší aktivitu vykazoval kmen *Str. thermophilus* 2 vůči indikátorovému mikroorganismu *L. innocua*. *B. subtilis* inhiboval nejvíce kmen *Str. thermophilus* 1. Naopak nejnižší aktivitu vůči *L. innocua* vykazoval kmen *Str. thermophilus* 1 vůči *B. subtilis* kmen *Str. thermophilus* 4.

Druhou metodou stanovení inhibičních účinků na BCP agaru bylo zjištěno, že *Bacillus subtilis* nejvíce inhiboval kmen *Str. thermophilus* 3 (79,17 %) a nejméně *Str. thermophilus* 2 (30 %) a *Str. thermophilus* 6 (30 %). Kmen *L. innocua* nejvíce inhibovaly (79,17 %) kmeny *Str. thermophilus* 7 a *Str. thermophilus* 1, nejméně *Str. thermophilus* 2 (47,92 %).

Inhibiční účinky kmenů *Str. thermophilus* vůči *Bacillus subtilis* a *Listeria innocua* jsou odlišné. Porovnáním první a druhé metody stanovení inhibičních účinků kmenů *Str. thermophilus* v UHT mléce a na BCP agaru vychází jako nejúčinnější kmen *Str. thermophilus* 1 (79,17 %). Celkově nejméně účinným byl určen kmen *Str. thermophilus* 2.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] GÖRNER, F., VALÍK, L'. *Aplikovaná mikrobiologie poživatin*. 1. vyd. Bratislava. 2004. 300s. ISBN 80-967064-9-7.
- [2] TEPLÝ, M. a kol. *ČMK - Výroba, kontrola, použití*. 1. vyd. Praha: SNTL. 1984. 250s.
- [3] KLAENHAMMER, T. R. et al. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, vol. 29, p. 393-409.
- [4] PAVELKA, A. *Mléčné výrobky pro vaše zdraví*. 1.vyd. Brno: Littera 1996. 105s. ISBN 80-85763-09-5.
- [5] ŠILHÁNKOVÁ, L., *Mikrobiologie pro potravináře*, Praha: Academia, 2002. Třetí opravené a doplněné vydání. ISBN 80-200-1024-6.
- [6] FORMAN, L. a kol. *Mlékárenská technologie II*. 1.vyd. Praha: VŠCHT, 1996. 150s. ISBN 80-7080-250-2.
- [7] ANONYM, *Potravinářská mikrobiologie III*. [online]. [cit. 2010-2-13, 11:44]. Dostupné z www: <http://utb.cepac.cz/Screens/Default.aspx>.
- [8] IYER, R., TOMAR, S. K., MAHESWARI, T. U., SINGH, R. *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 2010, vol. 20, issue 3, p. 133-141.
- [9] ŽIŽKA, B., MARTINKOVÁ, Z. *Mikrobiologie pro čtvrtý ročník SPŠ mlékárenské*. 1. vyd. Praha: SNTL. 1980. 150s.
- [10] ANONYM, *Mlékárenská technologie II*. [online]. [cit. 2010-2-13, 12:19]. Dostupné z www: <http://utb.cepac.cz/Screens/Default.aspx>.
- [11] OBERMAN, H., LIBUDZISZ, Z. *Microbiology of fermented foods*. Second edition, Edited by Brian J.B.Wood. London: Published by Blackie Academic and Professional, Thomson Science. 1998. 1000s. ISBN 0-7514-0216-8.
- [12] ZIMÁK, E. *Technologie pro 4.ročník SPŠ studijního oboru zpracování mléka*. Praha: SNTL. 1988. 300s.
- [13] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd., Vydala Masarykova univerzita. 2007. 270s. ISBN 80-210-4207-9.

- [14] HOLS, P., HANCY, F., FONTAINE, L. at. al., News insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics, *FEMS Microbiol. Rev.* 2005, vol. 5, p. 435-463.
- [15] ČURDA, L., HOLUBOVÁ, J., RUDOLFOVÁ, J., NĚMEČKOVÁ, I., *Stabilita galaktooligosacharidů ve fermentovaných mléčných výrobcích a jejich vliv na probiotické kultury*, [online]. [cit. 2010-03-31, 10:00]. Dostupný z www: <http://www.institut-danone.cz/data/studie/pridelene-granty/2004-04.pdf>.
- [16] ANONYM, *Fermenti lattici*. [online]. [cit. 2010-2-15, 12:03]. Dostupné z www: <http://www2.unibas.it/parente/Starter/gruppi.html>.
- [17] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ, P. *Potravinářská biochemie III*. 1. vyd. UTB ve Zlíně. 2006. 123s. ISBN 80-7318-396-x.
- [18] DUCHOVA, I. *Sacharidy ve výživě člověka*. [online]. [cit. 2010-2-15, 17:54]. Dostupné z www: <http://www.viviente.cz/sacharidy>.
- [19] ARNDT, T., *Kyselina mléčná*. [online]. [cit. 2010-3-17, 18:30]. Dostupné z www: <http://www.celostnimediceina.cz/kyselina-mlecna.htm>.
- [20] JASASS, B., M., F., Effectiveness of trisodium phosphate, lactic acid, and acetic acid in reduction of *E.coli* and microbial load on chicken surface es, *African journal of Microbiology Research*. 2008, vol. 2, p. 50-55.
- [21] BROWN, H., W., *Acetic acid*. [online]. [cit. 2010-3-31, 12:14]. Dostupné z www: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/3235/acetic-acid>.
- [22] JANEČKOVÁ, A., KLOUDA, P. *Organická chemie*. Ostrava: Pavel Klouda, 1998. ISBN: 80-902155-6-4/ 9802.
- [23] ANONYM, *Konzervace a balení potravin*. [online]. [cit. 2010-4-12, 17:56]. Dostupné z www: <http://utb.cepac.cz/Screens/Default.aspx>.
- [24] ANONYM, *Karboxylové kyseliny*. [online]. [cit. 2010-4-12, 18:32]. Dostupné z www: <http://www.gvi.cz/files/chemie/kk.pdf>.
- [25] ANONYM, *Formic acid*. [online]. [cit. 2010-4-12, 18:46]. Dostupné z www: <http://kyselina-mravenci.navajo.cz/>.

- [26] ARTHUR, C., OUWEHAND and SATU VESTERLUND, *Lactic acid bacteria, Microbiological and Functional Aspects*. Third edition, Edited by: Seppo Salminen, Atte von Wright, Arthur Ouwehand, New York, Basel: Published by Marcel Dekker, Inc. 2004. 631s. ISBN 0-8247-5332-1.
- [27] MOHAMED, A., FREDRICK, R. Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron*. 1996, vol. 27, Issue 6, p. 467-479.
- [28] HÉCHARD, Y. SAH, H. G. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria, *Biochimie*. 2002, vol. 84, Issues 5-6, p. 545-557.
- [29] GARNEAU, S., MARTIN, N. I., VEDERAS, J. C. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*. 2002, vol. 84, p. 577-592.
- [30] 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, Issue 1, p. 1-20.
- [31] DEEGAN, L. H., COTTER, P. D. HILL, C., ROSS, P., Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension, *International Dairy Journal*, 2006. Vol. 16, Issue 9, p. 1058-1071.
- [32] 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, Issue 2, p. 101-116.
- [33] ANONYM, *Antimikrobní látky*. [online]. [cit. 2010-2-19, 19:52]. Dostupné z www: [http://biomikro.vscht.cz/documents/biochemie\\_mikroorganismu/Antimikrob\\_latky.pdf](http://biomikro.vscht.cz/documents/biochemie_mikroorganismu/Antimikrob_latky.pdf).
- [34] ANONYM, *Význam a použití bakteriocinů*. [online]. [cit. 2010-2-19, 20:04]. Dostupné z www: [www.gate2biotech.cz/vyznam-a-pouziti-bakteriocinu/](http://www.gate2biotech.cz/vyznam-a-pouziti-bakteriocinu/).
- [35] HENG, N. C. K. et. al. The large antimicrobial proteins (bacteriocins) of streptococci, *International Congress Series*. 2006, vol. 1289, p. 351-354.
- [36] IVANOVA, I. et. al. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81, *International Journal of Food Microbiology*. 1998, vol. 42, p. 147-158.

- [37] LUKÁŠOVÁ, J. *Význam mikrobiologie pro zajištění zdravotní nezávadnosti a jakosti potravin*. [online]. [cit. 2010-2-22, 19:14]. Dostupné z [www: ≤http://www.vetweb.cz/projekt/clanek.asp?pid=2&cid=3482 ≥](http://www.vetweb.cz/projekt/clanek.asp?pid=2&cid=3482).
- [38] ANONYM, *Potravinářská mikrobiologie*. [online]. [cit. 2010-2-25, 21:13]. Dostupné z [www: ≤http://utb.cepac.cz/Screens/Default.aspx ≥](http://utb.cepac.cz/Screens/Default.aspx).
- [39] JIČÍNSKÁ, E., HAVLOVÁ, J. *Patogenní mikroorganismy v mléce a mlékárenských výrobcích*. 1. vyd. Praha: ÚZPI, 1995. 115s. ISBN 80-85120-47-X.
- [40] ANONYM, *Mikroorganismy způsobující kažení potravin, plísňe a kvasinky*. [online]. [cit. 2010-2-25, 8:15]. Dostupné z [www: ≤http://www.gybu.webzdarma.cz/biologie/verous/12b-viry\\_bakterie.doc ≥](http://www.gybu.webzdarma.cz/biologie/verous/12b-viry_bakterie.doc).
- [41] TVRDOŇ, M. *Školní atlas mikroorganismů pro 1. až 4. ročník SPŠ potravinářských*. 1978. 180s. Praha: SNTL.
- [42] CHUNCHALOVÁ, J., *Bakterie*. [online]. [cit. 2010-2-27, 18:20]. Dostupné z [www: ≤http://www.vscht.cz/kch/galerie/mleko.htm ≥](http://www.vscht.cz/kch/galerie/mleko.htm).
- [43] ANONYM, *Bacteria*. [online]. [cit. 2010-2-28, 21:26]. Dostupné z [www: ≤http://www.sciencebuddies.org/mentoring/project\\_ideas/Microbio\\_img\\_004.jpg ≥](http://www.sciencebuddies.org/mentoring/project_ideas/Microbio_img_004.jpg).
- [44] TICHOVSKÝ, P. *Původ názvu listerií*. [online]. [cit. 2010-4-12, 17:01]. Dostupné z [www: ≤http://tichovsky.ic.cz/html/mikro/listerie\\_nazvy.php ≥](http://tichovsky.ic.cz/html/mikro/listerie_nazvy.php).
- [45] STUDENTS, *Listeria innocua*. [online]. [cit. 2010-2-29, 22:21]. Dostupné z [www: ≤http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Listeria\\_innocua ≥](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Listeria_innocua).
- [46] SOBRINO-LOPEZ, A., MARTÍN-BELLOSO, O. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products, *International Dairy Journal*. 2008, vol. 18, p. 329-343.
- [47] IYER, R., TOMAR, S. K., at. al. *Streptococcus thermophilus* strains: Multi functional lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*. 2010, vol. 20, p. 133-141.



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

BMK Bakterie mléčného kvašení.

G<sup>+</sup> Gramovo barvení – pozitivní.

G<sup>-</sup> Gramovo barvení – negativní.

kDa Kilodaltony – Jednotka vyjadřující hmotnost přibližně 1000 atomů vodíku tj.  
 $1,66 \cdot 10^{-21}$  g

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obr. 1 – Streptococcus thermophilus</i> .....	21
<i>Obr. 2 – Schéma průběhu glykolýz</i> .....	22
<i>Obr. 3 – Bacillus subtilis</i> .....	31
<i>Obr. 4 – Listeria innocua</i> .....	33
<i>Obr. 5 – Znáznění počtu Bacillus subtilis v obou modelových systémech UHT mléka nultý, první a třetí den.</i> .....	44
<i>Obr. 6 – Znáznění počtu Listeria innocua v obou modelových systémech UHT mléka nultý, první a třetí den.</i> .....	47
<i>Obr. 7 – Přehled procent inhibice pro kmeny streptokoků s indikátorovým mikroorganismem Bacillus subtilis v časovém intervalu 7 dní.</i> .....	49
<i>Obr. 8 – Přehled procent inhibice pro kmeny streptokoků s indikátorovým mikroorganismem Listeria innocua v časovém intervalu 7 dní.</i> .....	51

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1 – Hodnoty pH a počty bacilů nultý, první a třetí den kultivace v mléce UHT zaočkovaném danými kmeny Str. thermophilus a B. subtilis současně. ....</i>	<i>42</i>
<i>Tab. 2 – Hodnoty pH a počty Bacillus subtilis nultý, první a třetí den kultivace v mléce UHT předem zaočkovaném studovanými kmeny Str. thermophilus. ....</i>	<i>43</i>
<i>Tab. 3 – Hodnoty pH a počty listerií nultý, první a třetí den kultivace v mléce UHT zaočkovaném danými kmeny Str. thermophilus a L. innocua současně. ....</i>	<i>46</i>
<i>Tab. 4 – Hodnoty pH a počty Listeria innocua nultý, první a třetí den v UHT mléce předem zaočkovaném studovanými kmeny Str. thermophilus. ....</i>	<i>46</i>
<i>Tab. 5 – Průměr růstových zón (cm) Bacillus subtilis během 7 dnů kultivace na BCP agaru se studovanými kmeny Str. thermophilus. ....</i>	<i>48</i>
<i>Tab. 6 – Míra inhibičního účinku studovaných kmenů Str. thermophilus s indikátorovým mikroorganismem Bacillus subtilis v časovém intervalu 7 dní. ....</i>	<i>49</i>
<i>Tab. 7 – Průměr růstových zón (cm) Listeria innocua během 7 dnů kultivace na BCP agaru se studovanými kmeny Str. thermophilus. ....</i>	<i>50</i>
<i>Tab. 8 – Míra inhibičního účinku studovaných kmenů Str. thermophilus s indikátorovým mikroorganismem Listeria innocua v časovém intervalu 7 dní. ....</i>	<i>50</i>

## SEZNAM PŘÍLOH

- PI** Bakteriociny jako potravinářské konzervační prostředky: příklady navrhovaných aplikací

## PŘÍLOHA P I:

P I - Bakteriociny jako potravinářské konzervační prostředky: příklady navrhovaných aplikací, převzato z [29]:

Bakteriocin	Použití	Závěry	Odkazy
<b>Nisin A</b>	Spojení nisinu s masitým pojivovým systémem (spojka v masných výrobcích)	Přídavek nisinu může redukovat nežádoucí bakterie v mletých masných produktech	Cutter and Siragusa, 1998.
<b>Pediocin AcH</b>	Použití pediocinu AcH produkovaného <i>Lactobacillus plantarum</i> WHE 92 pro postřikání povrchu sýru Münster na začátku doby zrání	Postřik zabraňuje růstu <i>L. monocytogenes</i> a může být použitý jako ošetření proti listeriím	Ennahar et al., 1996
<b>Enterocin 4</b>	Použití producenta enterocinu <i>Ent. Faecalis</i> INIA4 jako startovací kultury při výrobě sýra Manchego (španělský tvrdý sýr)	Použití startovací <i>Ent. faecalis</i> inhibuje <i>L. monocytogenes</i>	Nunez et al., 1997
<b>Linocin M-18</b>	Aplikace <i>Brevibacterium lines</i> jako startovací kultury pro výrobu červeného roztíratelného sýra	Způsobí snížení počtu o 2 log řády u <i>L. ivanovi</i> a <i>L. monocytogenes</i>	Eppert et al., 1997
<b>Nisin A</b>	Použití nisinu pro kontrolu <i>L. monocytogenes</i> v sýru Rikota	Nisin účinně inhibuje <i>L. monocytogenes</i> po 8 týdnů	Davies et al., 1997
<b>Piscicolin 126</b>	Aplikace piscicolinu 126 pro potlačení <i>L. monocytogenes</i> v dábělské šunkové pastě	Efektivnější než komerčně používané bakteriociny	Jack et al., 1996
<b>Leucocin A</b>	Použití leucocine produkovaného <i>Leu. gelidum</i> UAL 187 pro potlačení kažení masa	Naočkování vakuově baleného hovězího masa producentem bakteriocinu oddálí kažení způsobené <i>Lactobac. sake</i> až o 8 týdnů	Leisner et al., 1996
<b>Lactocin 705</b>	Použití lactocinu 705 pro snížení růstu <i>L. monocytogenes</i>	Lactocin inhibuje růst <i>L. monocytogenes</i> v hovězím sekaném mase	Vignolo et al., 1996

<b>Bakteriocin</b>	<b>Použití</b>	<b>Závěry</b>	<b>Odkazy</b>
<b>Pediocin AcH</b>	Použití pediocinu produkovaného <i>P. acidilactici</i> pro inhibici <i>L. monocytogenes</i>	Startovací kultura <i>P. acidilactici</i> přispívá k efektivnímu snížení <i>L. monocytogenes</i> během výroby suchých drůbežích nevařených párků	Baccus-Taylor et al., 1993
<b>Pediocin</b>	Exprese operonu pediocinu u <i>Sac. cerevisiae</i>	potenciální aplikace v konzervaci vína a pečených výrobků	Schoeman et al., 1999
<b>Pediocin AcH</b>	Přidávání pediocinu k syrové drůbeži	Regulace růstu <i>L. monocytogenes</i> při 5°C po 28 dnů	Goff et. al., 1996
<b>Pediocin PA-1</b>	Použití kmenů <i>P. acidilactici</i> jako startovacích kultur pro fermentaci salámů	Pediocin efektivně přispívá k inhibici <i>L. monocytogenes</i>	Foegeding et. al., 1992
<b>Enterocin</b>	Přidání enterocinu pro inokulaci šunky, vepřového masa, kuřecích prsou, paštik, salámů	Regulace růstu <i>L. monocytogenes</i> podle různých podmínek	Aymerich et. al., 2000 a, b