

Genotypizace bakteriocinů u potravinářsky významných bakterií

Monika Boháčková

Bakalářská práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Monika Boháčková
Osobní číslo: T22869
Studijní program: B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin
Specializace: Potravinářské biotechnologie a aplikovaná mikrobiologie
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Genotypizace bakteriocinů u potravinářsky významných bakterií

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

Charakterizace a dělení bakteriocinů.

Metody stanovení produkce bakteriocinů pomocí kvalitativní PCR.

Aplikace bakteriocinů v potravinářství.

II. Praktická část

Mikrobiologický rozbor a izolace bakterií z potravin.

Skríning produkce bakteriocinů pomocí PCR se specifickými primery.

Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce.

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

Seznam doporučené literatury:

- ARBULU, Sara, Juan J. JIMÉNEZ, Loreto GÚTIEZ, Cristina CAMPANERO, Rosa DEL CAMPO, Luis M. CINTAS, Carmen HERRANZ a Pablo E. HERNÁNDEZ. Evaluation of bacteriocinogenic activity, safety traits and biotechnological potential of fecal lactic acid bacteria (LAB), isolated from Griffon Vultures (*Gyps fulvus* subsp. *fulvus*). *BMC Microbiology*. 2016, 16(1). ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi:10.1186/s12866-016-0840-2
- PERALES-ADÁN, Jesús, Susana RUBIÑO, Manuel MARTÍNEZ-BUENO, Eva VALDIVIA, Manuel MONTALBÁN-LÓPEZ, Rubén CEBRIÁN a Mercedes MAQUEDA. LAB Bacteriocins Controlling the Food Isolated (Drug-Resistant) Staphylococci. *Frontiers in Microbiology*. 2018, 9. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2018.01143
- RAHMDEL, Samane, Seyed Shahram SHEKARFOROUSH, Saeid HOSSEINZADEH, Sandra TORRIANI a Veronica GATTO. Antimicrobial spectrum activity of bacteriocinogenic Staphylococcus strains isolated from goat and sheep milk. *Journal of Dairy Science*. 2019, 102(4), 2928-2940. ISSN 00220302. Dostupné z: doi:10.3168/jds.2018-15414

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Pavel Pleva, Ph.D.
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: 2. ledna 2024
Termín odevzdání bakalářské práce: 17. května 2024

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Jaroslav Filip, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 6. února 2024

PROHLÁŠENÍ AUTORKY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – 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);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem 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.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky:

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Bakteriociny jsou peptidy s antimikrobiální aktivitou syntetizované některými bakteriemi prostřednictvím ribozomů. Bakteriociny dokážou svou schopností ovlivňovat kvalitu a bezpečnost potravin, proto mají vynikající potenciál pro použití jako přírodní konzervační látky v potravinářském průmyslu. Cílem bakalářské práce byla genová typizace bakteriocinů u potravinářsky významných druhů bakterií, konkrétně bakterií mléčného kvašení. V teoretické části je popsána charakteristika, dělení a mechanismus účinku bakteriocinů. Dále je zde zmíněna aplikace bakteriocinů v potravinářství. V práci byly popsány i metody, kterými lze sledovat antimikrobiální aktivita bakteriocinů.

V experimentální části byly ověřeny antimikrobiální účinky vybraných sbírkových kmenů (CCDM) bakterií mléčného kvašení pomocí kultivačních metod. U bakteriálních druhů, které prokázaly schopnost inhibice růstu testovaných bakterií, byla provedena izolace a purifikace DNA a genotypizace bakteriocinů metodou PCR. Geny byly vizualizovány prostřednictvím elektroforézy. Za pozitivní producenty bakteriocinů identifikované v této práci lze považovat zástupce rodů *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lactilactobacillus* a *Lacticaseibacillus*.

Klíčová slova: bakteriociny, genotypizace, bakterie, potravinářství, antimikrobiální aktivita

ABSTRACT

Bacteriocins are peptides with antimicrobial activity synthesized by some bacteria via ribosomes. Bacteriocins have the ability to influence the quality and safety of food and therefore have excellent potential for use as natural preservatives in the food industry. The aim of the bachelor thesis was the gene typing of bacteriocins in food important bacterial species, specifically lactic acid bacteria. In the theoretical part, the characteristics, division and mechanism of action of bacteriocins are described. Furthermore, the application of bacteriocins to the food industry is mentioned. Methods by which the antimicrobial activity of bacteriocins can be monitored, have also been described in the thesis.

In the experimental part, the antimicrobial effects of selected collection strains (CCDM) of lactic acid bacteria were verified by culture methods. The bacterial species that showed the ability to inhibit the growth of the tested bacteria were subjected to DNA isolation and purification and genotyping of bacteriocins by PCR. Genes were visualized by electrophoresis. The positive producers of bacteriocins identified in this work can be considered representatives of the genera *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lactilactobacillus* a *Lacticaseibacillus*.

Keywords: bacteriocins, genotyping, bacteria, food industry, antimicrobial activity

Ráda bych touto cestou poděkovala zejména panu Ing. Pavlu Plevovi, Ph.D. za kvalitní vedení mé bakalářské práce, vstřícný přístup, cenné rady a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat paním laborantkám Ing. Veronice Kučabové a Mgr. Markétě Havlištové, které mi byly vždy nápomocné při práci v laboratoři a ochotně poskytovaly veškeré rady týkající se experimentální části této práce. Děkuji také Výzkumnému ústavu mlékárenskému a České sbírce mikroorganismů (CCM) Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity za poskytnutí sbírkových kmenů. Poděkování patří také mé rodině a blízkým za morální podporu během celé doby studia.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 CHARAKTERISTIKA BAKTERIOCINŮ	12
1.1 DEFINICE	12
1.2 ZDROJE BAKTERIOCIN PRODUKUJÍCÍCH BAKTERIÍ	13
1.2.1 Nekonvenční zdroje	13
1.3 BIOSYNTÉZA BAKTERIOCINŮ	13
2 DĚLENÍ BAKTERIOCINŮ	15
2.1 BAKTERIOCINY PRODUKOVANÉ GRAMPOZITIVNÍMI BAKTERIEMI.....	15
2.2 BAKTERIOCINY PRODUKOVANÉ GRAMNEGATIVNÍMI BAKTERIEMI.....	16
3 MECHANISMUS ÚČINKU BAKTERIOCINŮ	18
3.1 POŠKOZENÍ BUNĚČNÉ MEMBRÁNY	18
3.2 INTRACELULÁRNÍ PŮSOBNÍ.....	18
4 APLIKACE BAKTERIOCINŮ	19
4.1 APLIKACE V POTRAVINÁŘSTVÍ	19
4.1.1 Mléčné výrobky	20
4.1.2 Zelenina	21
4.1.3 Ovoce	21
4.1.4 Maso	22
4.1.5 Plody moře	22
5 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	23
5.1 SOUČASNÁ TAXONOMIE BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	23
5.2 METABOLISMUS BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	23
6 METODY PRO SLEDOVÁNÍ ÚČINKU BAKTERIOCINŮ	24
6.1 GENOTYPIZACE	24
6.2 DALŠÍ MOŽNOSTI SLEDOVÁNÍ AKTIVITY BAKTERIOCINŮ	24
II PRAKTICKÁ ČÁST	26
7 MATERIÁL	27
7.1 POUŽITÉ POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	27
7.2 CHEMICKÉ PŘÍPRAVKY A LÁTKY	28
7.3 KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	29
7.4 POUŽITÉ BAKTERIÁLNÍ KMENY	31
8 METODIKA PRÁCE	34
8.1 POPIS EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI	34

8.2	EXPERIMENT I	34
8.2.1	Barvení podle Grama	34
8.2.2	Detekce bakteriocinogenie pomocí vpichového testu.....	34
8.3	EXPERIMENT II.....	35
8.3.1	Izolace a purifikace bakteriální DNA	35
8.3.2	Genotypizace bakteriocinů metodou PCR	37
8.3.3	Elektroforéza	38
9	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	39
9.1	EXPERIMENT I	39
9.1.1	Barvení podle Grama	39
9.1.2	Detekce bakteriocinogenie pomocí vpichového testu.....	39
9.2	EXPERIMENT II.....	43
9.2.1	Genotypizace bakteriocinů metodou PCR	43
ZÁVĚR	48
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	49
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	54
SEZNAM OBRÁZKŮ	55
SEZNAM TABULEK.....	56

ÚVOD

Bakteriálních kmenů rezistentních vůči antibiotikům neustále přibývá, což představuje velký problém nejen v současné době, ale i v budoucnu. Dosavadním možným řešením tohoto globálního problému se stalo aktivní vyhledávání alternativních antimikrobiálních látek, které by pomohly účinek antibiotik zdokonalit, nebo v lepším případě plně nahradit. (Daba, Elkhateeb, 2024) Ukázalo se, že takovými látkami jsou například bakteriociny, které si získaly pozornost hned z několika důvodů. (Shahrir et al., 2024) Mají přínos v oblasti potravinářského průmyslu jako bio konzervační látky a slibný potenciál v lékařské oblasti pro zlepšení zdraví lidí a zvířat. (Daba, Elkhateeb, 2024)

Bakteriociny jsou ribozomálně syntetizované peptidy, které mohou být degradovány proteolytickými enzymy. Díky této skutečnosti se zamezí jejich setrvávání v prostředí a vzniku následné rezistence. (Daba, Elkhateeb, 2024) Kritickou úlohou bakteriocinů je inhibice růstu bakterií, hub, parazitů, či virů. Svou antimikrobiální činností jsou schopny snížit také aktivitu bakteriálního biofilmu. (Hernández-González et al., 2021)

Důležitou skupinu bakterií představují bakterie mléčného kvašení (LAB), které schopností produkce bakteriocinů přímo vynikají. (Hernández-González et al., 2021). Bakteriociny produkované LAB jsou většinou aktivní vůči geneticky blízce příbuzným organismům, čímž se jejich aplikace zužuje. (Todorov et al., 2011) Přesto však patří mezi nejvýznamnější producenty. Důkazem je status „Generally Recognized as Safe“ (GRAS) udělený americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a „kvalifikovaný předpoklad bezpečnosti“ (QPS) udělený Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA). (Shahrir et al., 2024)

Tato práce je zaměřena na genotypizaci bakteriocinů u potravinářsky významných bakterií rodů *Lactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus* a *Latilactobacillus*. V práci je pojednáno i o dalších metodách, kterými je možné sledovat antimikrobiální aktivitu, nicméně pro svou přesnost se stala za poslední roky oblíbenou a preferovanou volbou právě molekulární diagnostika.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA BAKTERIOCINŮ

Vzhledem k požadavkům spotřebitele, které kladou čím dál větší důraz na kvalitu potravin a jejich minimální zpracování, jsou zkoumány bio konzervační látky. Jedná se o látky, které by mohly přispět k eliminaci značného množství potravinářských aditiv chemické povahy, jako jsou kyselina benzoová, kyselina sorbová, kyselina octová a dusitan. (Shahrir et al., 2024) Bio konzervační látky zahrnují biologický systém, jehož cílem je inhibovat růst mikroorganismů. (Lücke, 2024) Zdrojem těchto látek mohou být zvířata (lysozym), rostliny (éterické oleje) nebo také mikroorganismy (bakteriociny). Bakteriociny se staly oblíbenými konzervačními látkami jednak díky své tepelné stabilitě, ale také kvůli možné aplikaci v širokém rozmezí pH. Další výhodou bakteriocinů je absence negativního účinku na zdraví spotřebitele (alergie, karcinogenní onemocnění). Jejich použitím zároveň nedochází ke změnám organoleptických vlastností výrobku. (Shahrir et al., 2024) Aplikace bakteriocinů jako konzervantů prozatím čelí několika omezením, zejména nákladné výrobě. Nutno je také pochopit jejich antimikrobiální mechanismus, jelikož právě ten je pro použití bakteriocinů zásadní. (Guo et al., 2024) Evropská unie spolu se Světovou zdravotnickou organizací a Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv doposud schválila jako potravinářskou přídatnou látku pouze bakteriocin nisin, který najdeme pod registrovaným číslem E 234. (Simons et al., 2020)

1.1 Definice

Bakteriociny se označují jako kationtové antimikrobiální peptidy syntetizované prostřednictvím ribozomů. (Guo et al., 2024) Jejich identifikace proběhla již téměř před 100 lety. Předpokládá se, že produkce minimálně jednoho bakteriocinu je schopna většina bakteriálních druhů, nicméně většina z nich není známa. Účinek bakteriocinů spočívá v tvorbě porů a porušení celistvosti membrány cílové buňky, které končí její apoptózou. Další možný mechanismus působení představuje inhibice syntézy buněčné stěny nebo narušení metabolických drah. (Darbandi et al., 2022) Bakteriociny působí na kmeny bakterií blízkce příbuzné nebo nepříbuzné bakteriím, které je produkují. Producenti těchto antimikrobiálních látek jsou před sebepoškozením chráněny pomocí imunitních proteinů, které si syntetizují. Tyto proteiny se snaží zabránit poškození vylučováním bakteriocinů nebo antagonistickou soutěží o bakteriocinový receptor (Verma et al., 2022).

1.2 Zdroje bakteriocin produkujících bakterií

Bakteriální producenty je možné získat z různých zdrojů, jako jsou voda, půda, zvířecí střeva nebo potravinářské produkty. Takové zdroje jsou označovány jako nekonvenční. Příkladem konvenčního zdroje je lidský gastrointestinální trakt. Pozornost vědců však patří více zdrojům nekonvenčním. (Darbandi et al., 2022)

1.2.1 Nekonvenční zdroje

Příkladem často užívaného nekonvenčního zdroje jsou mléčné výrobky různého druhu. (Darbandi et al., 2022) Většina používaných a známých bakteriocinů jsou produkty sekundárního metabolismu bakterií mléčného kvašení. (Zimina et al., 2020) Mezi ty nejznámější patří bakterie rodu *Lactococcus*, *Lactobacillus* a *Streptococcus*. Mezi proslulé producenty lze zařadit například kmeny *Lactiplantibacillus plantarum*, které často nacházíme v sýrech, dále *Levilactobacillus brevis*, se kterými se můžeme setkat v mléce a *Lactobacillus acidophilus*, které bývají nejčastěji přítomny v jogurtech. Další možný zdroj představují fermentované produkty ze syrového masa, ve kterých najdeme kmeny jako *Latilactobacillus curvatus*, *Pediococcus pentosaceus* a *Limosilactobacillus fermentum*. Řadu bakteriálních producentů získáme také z mořských plodů například kmeny *Enterococcus faecium*. Dalším dostupným zdrojem může být i ovoce a zelenina, pro které jsou typické kmeny *Lactiplantibacillus pentosus*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Weissella* či *Pediococcus*. (Darbandi et al., 2022)

1.3 BIOSYNTÉZA BAKTERIOCINŮ

Bakteriociny jsou produkty primárního metabolismu bakterií, což hraje roli při jejich manipulaci na úrovni genomu. Cílený zásah, jehož podstatou je ovlivnit vlastnosti daného bakteriocinu, je tedy jednodušší nežli u metabolitů sekundárních. (Daba, Elkhateeb, 2024) Bakteriociny jsou syntetizovány pomocí ribozomů. Geny produkce se nachází uvnitř bakteriocinových operonů. (Perez et al., 2014) Za schopnost tvorby bakteriocinů zodpovídají čtyři různé strukturní geny: geny kódující prekurzor bakteriocinu, geny chránící samotného producenta bakteriocinů - tzv. imunitní geny, geny sloužící k externalizaci bakteriocinů a přídatný protein, jehož funkce zůstává prozatím neobjasněna. Předpokládá se, že napomáhá při externalizaci bakteriocinů. (Daba, Elkhateeb, 2024)

Bakteriocin je obvykle syntetizován jako biologicky neaktivní N-koncový propeptid, který je spojen s biologicky aktivním C—koncovým propeptidem. (Gu, 2023) První krok

biosyntézy zahajuje odstranění vedoucí sekvence z propeptidu a tvorba zralého peptidu. K odštěpení dochází v průběhu zrání bakteriocinu. (Lahiri et al., 2022) Hlavní úlohou vedoucího peptidu je inaktivace bakteriocinu v produkční buňce, tím je bakterie chráněna před vlastní antimikrobiální aktivitou a hrozící záhoubou. (Daba, Elkhateeb, 2024) Za štěpení neaktivního propeptidu zodpovídá vyhrazený transportér kazety vázající ATP (ABC transportní protein) spolu s doplňkovým proteinem, jejichž účinkem dojde zároveň k transportu zralého peptidu přes bakteriální membránu (externalizaci). (Lahiri et al., 2022)

2 DĚLENÍ BAKTERIOCINŮ

Příliš velký počet dosud objevených bakteriocinů prakticky znemožňuje jejich rozdělení do jednotlivých skupin. Jedním z kritérií pro rozdělení bakteriocinů je struktura buněčné stěny bakterií (gramnegativní/grampozitivní). Došlo také ke klasifikaci několika bakteriocinů produkovaných zástupci domény *Archaea*. (Simons et al., 2020)

2.1 Bakteriociny produkované grampozitivními bakteriemi

V rámci grampozitivních bakterií jsme schopni rozlišit čtyři třídy klasifikace bakteriocinů. Charakteristickým rysem třídy I, známé také pod názvem lantibiotika, je obsah netypických aminokyselin. Ty se tvoří v důsledku posttranslačních modifikací, ke kterým dochází na základě dehydratace a cyklizace vybraných zbytků aminokyselin. Finální kruhová struktura zodpovídá za odolnost vůči teplu, hrozcím výkyvům pH a proteolýze. Takovou aminokyselinou je například lanthionin a 3—methyl lanthionin. Tato třída potlačuje růst grampozitivních bakterií a patogenů pocházejících z potravin. Molekulová hmotnost bakteriocinů je <5 kDa. (Simons et al., 2020)

Lantibiotika jsou dále rozdělena do dvou podtříd – Ia a Ib. Mechanismus účinku podtřídy Ia spočívá v porušení celistvosti membrány prostřednictvím utvořených pórů, naproti tomu podtřída Ib se zaměřuje na inaktivaci specifických enzymů. Třída II již atypické aminokyseliny neobsahuje, nicméně vyniká podobnými vlastnostmi jako třída I. Bakteriociny spadající do třídy II jsou tepelně stabilní a mají velikost <10 kDa. Mechanismem účinku se od třídy I nijak zvlášť neliší. Také třída II je rozdělena do jednotlivých podtříd, konkrétně do čtyř. Podtřída IIa získala pozornost díky své schopnosti potlačit růst bakteriálního rodu *Listera*. Podtřída IIb se vyznačuje rozdílnou dvoupeptidovou strukturou, zbytky cysteinu jsou typické pro podtřidu IIc a v podtřídě IIId prakticky najdeme všechny ostatní bakteriociny, které nebyly zařazeny do podskupin IIa – IIc. Bakteriociny třídy III se od předchozích tříd výrazně liší. Jsou charakterizovány jako tepelně labilní peptidy s molekulovou hmotností >30 kDa. Mechanismus účinku se zaměřuje na inaktivaci enzymů, což vede k destrukci bakteriální stěny. Součástí struktury bakteriocinů, které zapadají do třídy IV, jsou lipidové a sacharidové složky, které jsou značně citlivé vůči lipolytickým a glykolytickým enzymům. Jejich důležitou úlohou je porušení celistvosti buněčné membrány. (Simons et al., 2020)

Tabulka 1: Klasifikace bakteriocinů produkovaných grampozitivními bakteriemi (Simons et al., 2020, upraveno)

Třída	Podtřída	Příklady
I – Lantibiotika	Ia – lineární	Nisin Epidermin Gallidermin
	Ib – globulární	Lakticin 481 Cytolysin Salivaricin
II – Nelantibiotika	IIa – lineární	Leukocin A Acidocin A Pediocin PA-1
	IIb – lineární	Laktokokcin G Laktokokcin Q Plantaricin NC8
	IIc – lineární	Laktokokcin A Divergicin A Acidocin B
	IId – lineární	ostatní
III – Velké peptidy	žádná	Zoocin A Lysotaphin Helveticin J Helveticin V
IV – Obsahující lipidové a sacharidové složky	žádná	Plantaricin S Leukonocin S

2.2 Bakteriociny produkované gramnegativními bakteriemi

Gramnegativními producenty bakteriocinů jsou především kmeny *Escherichia coli*, avšak antimikrobiální aktivita byla zaznamenána i u bakterií rodu *Pseudomonas* či *Klebsiella*. Bakteriociny gramnegativních bakterií jsou organizovány do čtyř tříd. První z nich představují koliciny tvořené *Escherichia coli*. Tyto peptidy dosahují velikosti vyšší než 10 kDa a jejich antimikrobiální činnost spočívá v tvorbě pórů a rozkladu součástí nukleové kyseliny. Bakteriociny třídy II jsou charakterizovány jako peptidy, které se svými vlastnostmi podobají kolicinu. Jejich producenty jsou bakterie rodu *Pseudomonas* nebo *Klebsiella*. Třetí třídou jsou mikrociny o velikosti <10 kDa. Tato třída je rozdělena do dvou podtříd. Podtřída I (modifikované) s molekulovou hmotností <5 kDa a podtřída II (nemodifikované), jejichž velikost se pohybuje v rozmezí 5 až 10 kDa. Mechanismus

účinku je zaměřen zejména na enzymatický aparát – ATP syntázu, RNA polymerázu a DNA gyrázu. Čtvrtá skupina bakteriocinů vyniká schopností zasahovat do buněčných membrán. Jedná se o peptidy s velkou molekulovou hmotností. Strukturálně připomínají ocas fága, proto jsou též přezdívané jako bakteriociny podobné fágu. (Simons et al., 2020)

Tabulka 2: Klasifikace bakteriocinů produkovaných gramnegativními bakteriemi (Simons et al., 2020, upraveno)

Třída	Příklady
I – Koliciny	Koliciny A, B, E2, E3
II – Bakteriociny podobné kolicinu	S-piociny Klebiciny
III – Mikrocin	Microcin C7 Microcin C17 Colicin V
IV – Bakteriociny podobné fágovému ocasu	R-piciny F-piociny

3 MECHANISMUS ÚČINKU BAKTERIOCINŮ

Lze uvést dva způsoby antimikrobiálního mechanismu bakteriocinů. Jeden z nich představuje poškození buněčné membrány a druhý se odehrává uvnitř buňky, přičemž mechanismus, který zahrnuje perforaci buněčné membrány, je bakteriociny preferován. (Gu, 2023) Poté co se bakteriociny dostanou do kontaktu s buněčnou membránou citlivých bakteriálních buněk a vytvoří v ní póry, dojde k rychlému odtoku intracelulárních složek. V důsledku toho je protonová hybná síla rozptýlena a buňky odumírají. (Daba, Elkhateeb, 2024). Bakteriociny, které uplatňují své antimikrobiální mechanismy intracelulárně, narušují normální metabolismus buňky. Princip spočívá v cíleném zásahu na klíčové bio molekuly, jako jsou nukleové kyseliny a proteiny. Mechanismus účinku bakterií je poměrně komplikovaný, uvádí se, že jediný typ bakteriocinu může využívat více druhů mechanismů, aby uplatnil své antimikrobiální účinky. (Gu, 2023)

3.1 Poškození buněčné membrány

Integrita buněčné membrány je stěžejní pro správné fungování buněk. Mechanismus, který je uzpůsobený k poškození buněčné membrány, zahrnuje narušení membránové integrity a permeability, což vede k vyplavení důležitých buněčných součástí, jako jsou aminokyseliny, ionty a ATP a ke smrti cílové buňky. (Huang, 2000, Daba, Elkhateeb, 2024) Uvádí se, že za baktericidním účinkem bakteriocinů stojí zejména tvorba pórů. Tyto póry mohou vyvolat nevratné změny energie, které vedou ke změnám iontové vodivosti v lipidové dvojvrstvě. (Huang, 2000)

3.2 Intracelulární působení

Bakteriociny jsou schopny procházet buněčnou membránou, hromadit se uvnitř buňky a zasahovat do jejího metabolismu. Tento intracelulární mechanismus představuje poměrně složitý proces. Neomezuje se pouze na inhibici syntézy buněčné stěny, ale je též zaměřen na syntézu nukleových kyselin, proteinů a na změnu aktivity enzymů. Inhibice syntézy buněčné stěny spočívá v zamezení tvorby nového peptidoglykanu, což má za následek destabilizaci buněčné struktury a buněčnou smrt. Stejně tak buňka zaniká, pokud bakteriociny brání tvorbě nukleových kyselin a proteinů, které plní klíčovou funkci pro buněčný růst a replikaci. Bakteriociny, které ovlivňují aktivitu enzymů, principiálně zasahují do životně důležitých metabolických drah. Následkem je akumulace vedlejších toxických produktů, které buňky usmrtí. (Brogden, 2005)

4 APLIKACE BAKTERIOCINŮ

Praktické uplatnění bakteriocinů je různorodé. Jejich antibakteriální schopnosti lze využít v různých odvětvích především v potravinářském průmyslu, nicméně setkáme se s nimi i v průmyslu farmaceutickém či v zemědělství. (Negash et al., 2020)

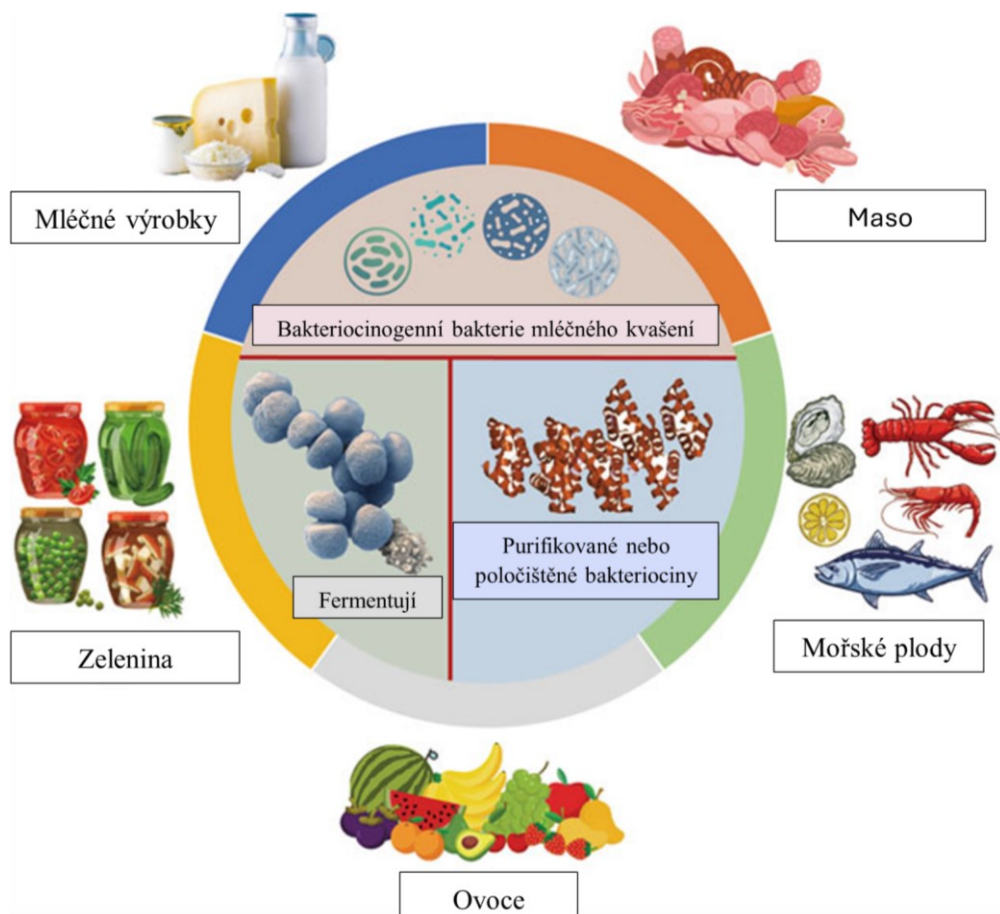
4.1 Aplikace v potravinářství

Za poslední století došlo v oblasti potravinářství k významným změnám. Světová populace neustále narůstá a klade vyšší nároky na kvalitu potravin, to znamená minimálně zpracované s nízkým obsahem potravinářských aditiv. Takový požadavek představuje výzvu pro velkoobchodní sítě, které distribuují potraviny ve velkém měřítku. Zároveň je třeba vzít v potaz, že nejzákladnějším atributem celého potravinového řetězce je potravinová bezpečnost. Uvést čerstvou potravinu na trh ve výše jmenovaných podmínkách je tedy poměrně složitější. S tradičními metodami konzervace potravin se setkáváme běžně i v domácím prostředí, známe je již od pradávna a jsou pro nás nepostradatelnou součástí (skladování v chladu, sušení, solení, nakládání, pasterace). Podmínkou těchto metod je zpracování spojené se změnami organoleptických vlastností výrobku. S ohledem na zdravý životní styl došlo k zpřísnění norem týkajících se přídavku soli a konzervačních látek, jako jsou kyselina benzoová a kyselina sorbová. Tyto konzervanty vzbuzovaly u některých spotřebitelů alergie a údajně by mohly přispívat ke vzniku karcinogenních onemocnění. Alternativní řešení mohou představovat bio konzervační metody spočívající v aplikaci nepatogenních mikroorganismů či jejich metabolitů za účelem inhibice patogenních mikroorganismů přenášených potravinami. Jinými slovy mohou představovat přirozenější cestu, jak předejít alimentárním nákazám. Aplikace bakteriocinů v potravinách je možná, jestliže splňují jisté požadavky. Musí být bezpečné pro lidskou spotřebu, odolné vůči působení enzymů a vyšších teplot. Dále by měly být schopny působit v širokém rozmezí pH a měly by odolávat vyšším koncentracím solí. (Lahiri et al., 2022) Bezpečnost je na prvním místě, proto je třeba provést ochranná opatření, která zahrnují fyziologické a biochemické testy citlivosti na antibiotika, hemolytickou aktivitu a potenciální produkci biogenních aminů. (Todorov et al., 2022)

V bio konzervaci potravin hrají významnou roli LAB. Setkáváme se s nimi ve velké řadě potravinářských produktů. LAB získaly status GRAS (všeobecně uznávaný jako bezpečný) pro svou souvislost s fermentací potravin a dále pro svou dlouholetou tradici využití jako bezpečných bakterií v potravinách. Také produkty metabolismu LAB, jako diacetyl, volné

mastné kyseliny, organické kyseliny, bakteriociny a peroxid vodíku prokázaly chvályhodné antimikrobiální vlastnosti. Antimikrobiální schopnosti LAB se dají uplatnit zejména pro bio konzervaci mléka, ovoce, zeleniny, nápojů, mořských plodů a masa. (Verma et al., 2022)

Existují tři varianty, kterými lze bakteriociny do potravin zakomponovat. První možností je přímá aplikace purifikovaného nebo poločištěného bakterioinu. Dále je možné naočkovat potravinu bakteriemi mléčného kvašení, které produkují bakteriociny. Třetí možností je přidat produkt s obsahem bakteriocinogenních kmenů, které byly přidány jako přísady při zpracování. (Gu, 2023)



Obrázek 1: Aplikace bakteriocinů v potravinářském průmyslu (Gu, 2023, upraveno)

4.1.1 Mléčné výrobky

Pro své vynikající fyziologické vlastnosti byly bakteriociny hojně rozšířeny v mlékárenském průmyslu. Kvalitní syrové mléko je pro mlékárenství základ. Na kvalitu mléka mohou mít vliv nemoci mléčných krav (mastitida), pro jejichž léčbu jsou užívána antibiotika. Pokud není dodržena ochranná lhůta, mohou být v konečném důsledku v mléce obsaženy jejich

rezidua, které budou bránit správné fermentaci LAB. Nadměrné užívání antibiotik může vést ke vzniku rezistence, proto je snaha tato léčiva nahradit bakteriociny. Malá množství dusičnanů/dusitanů se přidávají do krmiv, aby pomáhala řešit problém produkce methanu, který nastává v době trávení v bachoru krav. Nahromadění dusíkatých látek má nepříznivý účinek na zdraví krav, ale stejně tak na spotřebitele, který mléčný přípravek následně konzumuje. Studie uvádí, že nisin aplikovaný v krmivech pomohl snížit koncentraci dusitanů v plazmě i v bachoru, kde navíc inhiboval růst metanogenních bakterií a pozitivně tak ovlivnil konečný produkt. (Sar et al., 2004) Bakteriociny se též využívají k prevenci mastitidy, jejichž původcem je bakterie *Staphylococcus aureus* a k zabránění růstu patogenních bakterií v mléčných výrobcích, jako je mléko, jogurt a sýr. Bylo prokázáno, že nisin dokázal inhibovat růst bakterií *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus* v odstředěném mléce. (Gu, 2023, Tang et al., 2009)

4.1.2 Zelenina

Pro vysoký obsah vody, dostupnost živin a úzký kontakt s půdou zelenina poskytuje optimální podmínky k růstu patogenních bakterií. Současná společnost navíc požaduje minimálně zpracovanou zeleninu s původním obsahem živin, což riziko kontaminace podstatně zvyšuje. Tento problém by mohla vyřešit konkurenční mikroflóra, především bakterie mléčného kvašení a jejich bakteriociny. Studie uvádí, že kmen *Lactiplantibacillus plantarum*, který byl izolován z kysaného zelí, produkuje širokospektrální bakteriocin Plantaricin JLA-9, který účinně inhibuje růst nežádoucích bakterií, zejména růst *Bacillus* spp.. Bio konzervace čerstvé zeleniny za použití bakteriocinů produkovaných LAB je považována za jednu z nejnadějnějších metod biologické kontroly pro zlepšení trvanlivosti. (Gu, 2023)

4.1.3 Ovoce

Ke kontaminace ovoce může dojít v kterékoliv fázi zpracování včetně růstu, sklizně, přepravy a skladování. Bakteriociny jsou schopny účinně inhibovat růst patogenních mikroorganismů a snižovat tepelnou odolnost endospor v ovocných produktech, aniž by ovlivnili jejich sensorické a nutriční vlastnosti. Bakteriociny produkované probiotickými kulturami jsou do ovocných výrobků zaváděny přímo nebo jsou obsaženy v obalových materiálech. Pro konzervaci ovocných produktů, ale i syrového ovoce se osvědčil bakteriocin nisin, který inhibuje růst bakterie *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Jeho aplikace

nijak neovlivnila organoleptické vlastnosti ani obsah vitamínu C. (Mostafidi et al., 2020, Gu, 2023)

4.1.4 Maso

Maso je vzhledem k svému bohatému obsahu živin ideálním růstovým médiem pro širokou škálu mikroorganismů, jako jsou například patogenní druhy *Listeria* spp., *Bacillus* spp., *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Clostridium* spp. a *Pseudomonas* spp. Rizikovou fází výroby je zejména porážka, nicméně k jeho kontaminaci může dojít v kterékoli fázi výroby. Maso, které bylo napadeno, podléhá zkáze, což s sebou nese nepříznivé změny organoleptických vlastností. Kromě toho může dojít k tvorbě toxických sloučenin, jako jsou tryptamin a histamin, které mohou ohrozit lidské zdraví. Sušení, mrazení, konzervování a tepelné ošetření jsou dlouhodobě užívané známé metody, které se při zpracování masných výrobků běžně využívají. Dále se provádí chemické ošetření zahrnující aplikaci dusitanů a dusičnanů, které mají za úkol inhibovat růst nežádoucích mikroorganismů a zároveň zachovat barvu masného produktu. Jejich aplikace je však omezená kvůli možným ztrátám kvality chutě a vzniku karcinogenních látek, a proto si získaly oblibu bio konzervační metody. Nisin je v masném průmyslu nejrozšířenějším testovaným bakteriocinem. Studie prokázaly, že dokáže spolehlivě inhibovat růst bakterie *Listeria monocytogenes*, přičemž silnější inhibiční účinek vykazuje ve vařených vzorcích masa. (Bhattacharya et al., 2022, Gu, 2023)

4.1.5 Plody moře

Mořské plody, mezi které řadíme i ryby, korýše, ostnokožce a měkkýše, jsou bohatými zdroji bílkovin, tuků, vitamínů a minerálních látek. Mimo to obsahují vyšší množství vody a právě díky těmto zmíněným faktorům jsou ideální živnou půdou mnohých mikroorganismů. Patogenní bakterie, které mohou kontaminovat mořské plody, jsou seskupeny do tří hlavních kategorií: střevní bakterie, které jsou indikátory fekálního znečištění, jako jsou druhy *Salmonella* spp., *Shigella* spp., nativní bakterie, které jsou součástí přirozené mikroflóry ryb a jejich představiteli jsou například *Clostridium botulinum* nebo *Vibrio* spp. a bakterie, které kontaminují mořské plody během zpracování a skladování, jako je *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* či *Staphylococcus aureus*. Také u mořských plodů byla sledována antimikrobiální aktivita nisinu, Studie uvedly, že nisin inhiboval růst bakterie *Listeria monocytogenes* u čerstvého chlazeného lososa. (Gu, 2023)

5 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Bakterie mléčného kvašení (LAB) jsou definovány jako grampozitivní, kataláza negativní, nesporulující bakterie ve tvaru koků či tyčinek, rostoucí za mikroaerofilních až striktně anaerobních podmínek, sdílející společný rys produkce kyseliny mléčné. (Klein et al., 1998) Fermentace není zdaleka jediná schopnost, kterou LAB disponují, plní také funkci probiotik, degradují makromolekulární látky v potravinách (nestravitelné polysacharidy) a vytváří specifické produkty (mastné kyseliny s krátkým řetězcem, aminy, vitamíny, exopolysacharidy nebo bakteriociny). Na základě zmíněných metabolických charakteristik jsou LAB uplatňovány v řadě aplikací v potravinářském průmyslu. (Wang et al., 2021).

5.1 Současná taxonomie bakterií mléčného kvašení

V roce 2020 proběhla reklasifikace LAB u více než 300 druhů v 7 rodech a 2 čeledích do jedné čeledi *Lactobacillaceae*, která v současnosti zahrnuje 31 rodů, z nichž 23 rodů je nových a zahrnují organismy dříve klasifikované jako druhy *Lactobacillus* (Qiao et al., 2022). Vznik nové taxonomie se připisuje pokrokům v sekvenaci genomu. Právě na základě sekvenace bylo možné porovnat klíčové proteinové sekvence a následně i genetické, fyziologické a ekologické vlastnosti, od kterých se taxonomické vztahy mezi jednotlivými druhy odvíjely. Reklasifikace má přispět k lepší identifikaci mikroorganismů a lepšímu dorozumívání mezi vědci, průmyslovými odvětvími, regulačními orgány a veřejností. Potenciálním přínosem má být zejména pro průmysl potravinářský, kde by měla identifikace pomoci stanovit aplikaci, pro kterou se daný mikroorganismus hodí, tím se rozumí výběr ideálního prostředí, ve kterém bude ochotně tvořit žádaný produkt a zároveň inhibovat růst nežádoucích mikroorganismů. (Oberg et al., 2022)

5.2 Metabolismus bakterií mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (LAB) jsou členěny do dvou rozdílných skupin. Toto rozdělení závisí na druhu metabolismu, který LAB uplatňují. Homofermentativní LAB přeměňují molekulu glukózy na kyselinou mléčnou a adenosintrifosfát (ATP), reakci katalyzuje enzym aldoláza. Naproti tomu heterofermentativní LAB využívají k přeměně šestiuhlíkových cukrů (hexóz) na pětiuhlíkové cukry (pentózy) pentózamonofosfátovou dráhu. Reakci katalyzuje enzym fosfoketoláza a produktem je jedna molekula kyseliny mléčné a jedna molekula ethanolu nebo kyseliny octové. (Tang et al., 2023).

6 METODY PRO SLEDOVÁNÍ ÚČINKU BAKTERIOCINŮ

Objev nového bakteriocinu doprovází několik kroků. Prvním z nich bývá screening antimikrobiální aktivity bakteriocinů, v dalším kroku se provádí izolace a purifikace k získání podezřelých bakteriocinů a na závěr probíhá identifikace jejich struktury a genetických determinantů. (Gu, 2023)

6.1 Genotypizace

Při genotypizaci jsou sledovány genetické variace na úrovni DNA. Ke zkoumání se využívají molekulární markery. (Yang et al., 2013) Součástí bakteriocinových biosyntetických genových klastrů bývají geny kódující bakteriociny, enzymy, proteiny, imunitní geny a někdy také regulátory produkce bakteriocinu. V praxi se genotypizace provádí přímým vyhledáváním sekvencí pomocí známých referenčních sekvencí. (Gu, 2023) Pro odhalení relevantních bakteriocinových genů bývá prováděn screening, který zahrnuje izolaci bakteriální DNA, PCR reakci pro detekci genů zodpovědných za produkci bakteriocinů a elektroforézu. (Todorov et al., 2013)

6.2 Další možnosti sledování aktivity bakteriocinů

Agarová difúzní metoda

Pomocí agarové difúzní metody stanovujeme antimikrobiální aktivitu bakteriocinů. Fleming tuto metodu navrhl a poprvé aplikoval již v roce 1924. V současnosti je metoda využívána zejména pro stanovení biologických zdrojů aktivních antimikrobiálních látek a zahrnuje dva způsoby provedení: jamkovou difúzi a diskovou difúzi. Jejich základní princip však zůstává stejný. Účinná látka rovnoměrně působí kolem kultivačního média s bodem difúze ve středu. Průhledný kruh značí oblast, kam antimikrobiální látka proniká a kde bakterie nemohou růst. Velikost průhledného kruhu odráží antimikrobiální schopnost účinné látky a je ovlivňována různými faktory, jako je rychlost difúze účinné látky na plotně nebo množství agaru přidaného na difúzní plotnu. Aby mohly antimikrobiální látky difundovat do agaru, musí být rozpustné ve vodě. Indikátorové bakterie musí růst rychle a rovnoměrně v aerobním prostředí. Metoda je obecně považována za kvalitativní, nicméně pokud jsou striktně dodržovány podmínky provedení, antimikrobiální aktivita se může na průměru prstence odrazit i kvantitativně. (Gu, 2023)

Metoda dilučního gradientu

Metoda dilučního gradientu slouží ke kvantitativnímu stanovení antimikrobiální aktivity. Test je založen na sériovém ředění vzorků s obsahem účinné antimikrobiální látky a jejich společné kultivaci s indikátorovou bakterií. Výsledky jsou vyjádřeny jako minimální inhibiční koncentrace (MIC), tedy minimální koncentrace antimikrobiální látky, která dokáže viditelně inhibovat růst testovaného mikroorganismu. (Cintas et al., 1995)

Turbidimetrie

Turbidimetrie představuje další metodu, kterou je možné stanovit antimikrobiální aktivitu bakteriocinů. Principem se metoda podobá metodě dilučního gradientu. Turbidimetrie se od metody dilučního ředění liší intervaly ředění, které jsou zde bližší a přesnost je tak vyšší. Účinek značí zákal způsobený růstem bakterií. Metoda neukazuje pouze růst bakterií či nedostatek jejich růstu, ale umožňuje vypočítat i určitý poměr mezi standardní koncentrací a zákalem způsobeným růstem bakterií. Proto je možné ze zákalu bakteriálního růstu posoudit účinnost testovaného vzorku. Metoda není vhodná pro stanovení barevných a zakalených vzorků a je citlivá vůči nečistotám, které mohou ovlivnit výsledek. (Niku-Paavola et al., 1999)

II. PRAKTICKÁ ČÁST

7 MATERIÁL

7.1 Použité pomůcky a přístroje

K testování byly použity tyto pomůcky a přístroje:

- Váhy 440-47 N d=0,01 g (KERN, Německo)
- Termostat (Clean Air, Česká republika)
- Flow Box (Clean Air, Česká republika)
- Denzitometr (Erba Lachema, Česká republika)
- Centrifuga minispin plus (Eppendorf, Německo)
- Binokulární mikroskop se čtyřmi objektivy (Intraco Micro, Česká republika)
- Vortex V-1 plus (Biosan, USA)
- Vortex-Genie® 2 Vortex vč. vortexového adaptéru (Mo Bio Laboratories, USA)
- Spektrofotometr Infinite 200 PRO (Tecan, Švýcarsko)
- Osobní počítač ESPRIMO (Fujitsu-Siemens, Japonsko, Německo)
- Mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO, Japonsko)
- Mikropipety (Biohit, Finsko)
- Spektrofotometr Infinite 200 PRO (Tecan, Švýcarsko)
- PCR box AURA PCRTM (BIOAIR, Itálie)
- Termostat blokový Bio TDB-100 (Biosan, USA)
- Termocykler Aeris™ (ESCO, Singapur)
- Elektroforetická vana vč. příslušenství MultiSUB Mini (Consort, Belgie)
- Elektroforetická vana vč. příslušenství HU10 Mini-Plus Horizontal (SCIE-PLAS, Anglie)
- Elektrický zdroj pro elektroforézu EV243 (Consort, Belgie)
- UV-Transiluminátor InGeniusLHR (SYNGENE, Velká Británie)
- Osobní počítač ESPRIMO (Fujitsu-Siemens, Japonsko, Německo)
- Mikropipety (Eppendorf, Německo)

- Mikrovlnná trouba (Electrolux, Švédsko)
- Chladnička s mrazicím boxem CSA34020 (BEKO, Turecko)
- Laboratorní sklo – reagenční láhve, odměrný válec, Petriho misky (Simax, Česká republika)
- Ostatní – sterilní špičky, sterilní špičky pro PCR s filtrem, nitrilové rukavice, bakteriologické kličky, stojánek na zkumavky, plynový kahan, sterilní mikrozkušavky pro PCR, zápalky

7.2 Chemické přípravky a látky

- Krystalová violet' (PENTA, Česká republika)
- Lugolův roztok (LACHEMA, Česká republika)
- Aceton (PENTA, Česká republika)
- Safranin (HIMEDIA, Indie)
- Imerzní olej (Merck, USA)
- Ethanol (PENTA, Česká republika)
- Eluční pufr (QIAGEN, Německo)
- Chloroform (Sigma, St. Louis, USA)
- Destilovaná voda
- Sodnofosfátový pufr 0,5M (PENTA, Česká republika)
- L – cystein (Merck, USA)
- Sterilní fyziologický roztok
- Redestilovaná voda pro molekulární biologii
- NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Německo)
- VWR Red Taq DNA Polymerase Master Mix (Avantor, Dánsko)
- Tris-acetátový pufr (TAE pufr) – 20 mM Tris-base, 10 mM acetát sodný, 0,5 mM EDTA, pH 7,4 (Merck, USA)
- Vymývací pufr (QIAGEN, Německo)
- Agaróza SeaKem (Lonza, Švýcarsko)

- Etidiumbromid 1:30 H₂O (Merck, USA)
- 100 bp DNA Ladder N3231L (Biolabs. Inc., New England)
- DNA Gel Loading Dye (6x) (Thermo Scientific, USA)
- Primery (metabion international AG, Německo)

7.3 Kultivační média

K přípravě médií sloužily komerčně vyráběné dehydratované směsi.

De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) agar (HiMedia Laboratories, Indie)

- | | |
|------------------------------------|----------|
| - Proteosový pepton | 10 g/l |
| - Hovězí extrakt | 10 g/l |
| - Kvasničný extrakt | 5 g/l |
| - Dextrosa (glukóza) | 20 g/l |
| - Polysorbát 80 (tween 80) | 1 g/l |
| - Citran amonný | 2 g/l |
| - Octan sodný | 5 g/l |
| - Síran hořečnatý | 0,10 g/l |
| - Síran manganatý | 0,05 g/l |
| - Hydrogenfosforečnan (di)draselný | 2 g/l |
| - Agar | 1,5 % |

MRS agar sloužil pro kultivaci bakterií mléčného kvašení. Bylo naváženo přibližně 22,06 g přípravku, ke kterému bylo přidáno 6 g agaru. Obsah byl rozpuštěn ve 400 ml destilované vody. Následně proběhla sterilizace v autoklávu po dobu 20 minut při 121 °C. Po dostatečném ochlazení média byl přidán 0,05 % L-cystein a půda byla asepticky vylita do Petriho misek.

De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) soft agar (HiMedia Laboratories, Indie)

- | | |
|---------------------|--------|
| - Proteosový pepton | 10 g/l |
| - Hovězí extrakt | 10 g/l |
| - Kvasničný extrakt | 5 g/l |

- Dextrosa (glukóza)	20 g/l
- Polysorbát 80 (tween 80)	1 g/l
- Citran amonný	2 g/l
- Octan sodný	5 g/l
- Síran hořečnatý	0,10 g/l
- Síran manganatý	0,05 g/l
- Hydrogenfosforečnan (di)draselný	2 g/l
- Agar	1,05 %

MRS soft agar byl použit pro kultivační vpichový test. Pro přípravu MRS soft agaru bylo odváženo přibližně 11,03 g přípravku, ke kterému bylo přidáno 2,1 g agaru. Obsah byl rozpuštěn v 200 ml destilované vody. Následně proběhla sterilizace v autoklávu po dobu 20 minut při 121 °C.

De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) bujon (HiMedia Laboratories, Indie)

- Proteosový pepton	10 g/l
- Hovězí extrakt	10 g/l
- Kvasničný extrakt	5 g/l
- Dextrosa (glukóza)	20 g/l
- Polysorbát 80 (tween 80)	1 g/l
- Citran amonný	2 g/l
- Octan sodný	5 g/l
- Síran hořečnatý	0,10 g/l
- Síran manganatý	0,05 g/l
- Hydrogenfosforečnan (di)draselný	2 g/l

MRS bujon sloužil k pomnožení bakterií mléčného kvašení a k jejich krátkodobému uchování. Na přípravu MRS bujonu bylo naváženo požadované množství přípravku, který byl rozpuštěn v potřebném množství destilované vody. Následně proběhla sterilizace v autoklávu po dobu 20 minut při 121 °C. Po dostatečném ochladnutí média byl přidán 0,05

% L-cystein a médium bylo dávkováno do předem připravených sterilních skleněných zkumavek.

Brain Heart Infusion (BHI) soft agar (HiMedia Laboratories, Indie)

- Výtažek z telecího mozku	7,5 g/l
- Výtažek z hovězího srdce	10,0 g/l
- Pepton	10,0 g/l
- Glukóza	2,0 g/l
- NaCl	5,0 g/l
- Na ₂ HPO ₄	42,5 g/l

BHI soft agar sloužil pro kultivační vpichový test. Pro přípravu BHI soft agaru bylo odváženo přibližně 7,4 g přípravku, ke kterému bylo přidáno 1,05 g agaru. Obsah byl rozpuštěn v 200 ml fosfátového pufru. Následně proběhla sterilizace v autoklávu po dobu 20 minut při 121 °C.

7.4 Použité bakteriální kmeny

V experimentální části práce byly použity sbírkové bakteriální kmeny (CCDM) a (CCM), které byly obdrženy od České sbírky mikroorganismů (CCM) Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity (tabulka 3) a od Výzkumného ústavu mlékárenského se sídlem v Praze (tabulka 4). Kmeny bakterií (CCDM) byly izolovány z různých druhů mléčných výrobků. K jejich dlouhodobému uchování sloužil hlubokomrazicí box. Bakteriální kmeny zde byly umístěny ve zkumavkách obsahujících kultivační médium s glycerolem při teplotě -80 °C.

Tabulka 3: Seznam a charakteristika použitých sbírkových kmenů CCM

použité sbírkové kmeny	CCM	původ
<i>Escherichia coli</i>	3954	klinický izolát
<i>Staphylococcus aureus</i>	3953	klinický izolát
<i>Bacillus cereus</i>	2010	neznámý

Tabulka 4: Seznam a charakteristika použitých sbírkových kmenů CCDM

použité sbírkové kmeny	CCDM	původ
<i>Lacticaseibacillus casei</i> sub. <i>casei</i>	145	mléčný výrobek
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	148	tvaroh, ČR
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> sub. <i>bulgaricus</i>	154	mléčný výrobek, Německo
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	157	mléčná kultura, ČR
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	178	mlékařská kultura, Dánsko
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	181	siláž, ČR
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	183	kysaný mléčný výrobek, Německo
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	184	siláž, ČR
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	186	siláž, ČR
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	187	siláž, ČR
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	188	nakládané zelí, Dánsko
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	191	siláž, ČR
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	193	mlékařská kultura, Itálie
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	194	mlékařská kultura, Velká Británie
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	195	mlékařská kultura, Velká Británie
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	197	mlékařská kultura, Itálie
<i>Lacticaseibacillus casei</i> sub. <i>casei</i>	198	sýr eidam, ČR
<i>Lacticaseibacillus casei</i> sub. <i>casei</i>	199	sýr ementál, Švýcarsko
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	217	mlékařská kultura, Itálie
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	289	stolice
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	336	sýr, Švýcarsko
<i>Latilactobacillus sakei</i> sub. <i>sakei</i>	339	kultura pro výrobu sake
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> sub. <i>bulgaricus</i>	364	jogurt, ČR
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	375	neznámý
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	381	syrové kravské mléko, ČR
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	383	syrové kravské mléko, ČR
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	384	syrové kravské mléko, ČR
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	385	kozí sýr, Francie
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	387	syrové kravské mléko, ČR
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	388	kozí sýr, Francie
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	391	syrové kravské mléko, ČR
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> sub. <i>paracasei</i>	393	mlékařská kultura, ČR
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> sub. <i>paracasei</i>	394	neznámý, ČR
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	406	sušený mléčný výrobek
<i>Lacticaseibacillus casei</i>	422	sýr ementál
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	476	mlékařská kultura, Itálie
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	535	sýr, Francie
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	579	sýr, Švýcarsko

Tabulka 4: Seznam a charakteristika použitých sbírkových kmenů CCDM (pokračování)

použité sbírkové kmeny	CCDM	původ
<i>Lacticaseibacillus casei</i>	650	fermentovaný mléčný výrobek
<i>Lactilactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	717	neznámý
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> sub. <i>paracasei</i>	741	zákys, Německo
<i>Latilactobacillus sakei</i> sub. <i>carneus</i>	776	salám, Německo
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> sub. <i>paracasei</i>	792	neznámý
<i>Lactobacillus helveticus</i>	807	jogurtová kultura, Polsko
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	821	ovčí sýr, Slovensko
<i>Lentilactobacillus hilgardii</i>	828	víno
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> sub. <i>tolerans</i>	832	pasterované mléko
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	834	mléko
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	888	lidská tkáň tenkého střeva, ČR
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	963 A	sýr, ČR
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	963 B	sýr, ČR
<i>Lactobacillus helveticus</i>	982	izolát z CCDM 98

8 METODIKA PRÁCE

8.1 Popis experimentální části

Experimentální část byla zaměřena na sledování antimikrobiální aktivity bakteriocinů prostřednictvím kultivačních a molekulárních metod. Cíle práce byly plněny ve dvou experimentech. Prvním dílčím experimentem byla detekce bakteriocinogenie pomocí vpichového testu. Záměrem druhého stěžejního experimentu byla genotypizace bakteriocinů metodou PCR.

8.2 Experiment I

Před samotným screeningem byla ověřena čistota sbírkových kmenů (CCDM) barvením podle Grama. Lyofilizované kmeny byly rozmrazeny a zaočkovány do tekutého MRS média, kde proběhlo jejich pomnožení. Následně byly vyočkovány na MRS agar. Jejich kultivace probíhala při teplotě 37 °C anaerobně.

8.2.1 Barvení podle Grama

Základním principem tohoto barvení je schopnost buněčné stěny bakterií zadržet barvivo krystalové violeti během působení rozpouštědla. Tato schopnost se odráží od složení buněčné stěny. Grampozitivní bakterie mají ve své stěně vyšší obsah peptidoglykanů, zatímco ve stěně gramnegativních bakterií je vyšší obsah lipidů. Prvním krokem Gramova barvení je použití barviva krystalové violeti, které zpočátku všechny bakterie přijímají. Druhým krokem je fixace barviva prostřednictvím jodu. Následuje odbarvení pomocí rozpouštědla acetonu. V této fázi dojde k rozpuštění lipidové vrstvy gramnegativních bakterií a k uvolnění primárního barviva. U grampozitivních bakterií naopak dehydratace přispěje k uzavření pórů a zabrání tak vyplavení fialovo-jodového komplexu, bakterie tak zůstávají zabarvené. Posledním krokem je dobarvení pomocí fuchsinového barviva či safraninu. Sklíčko je vyšetřováno mikroskopem pod olejovou imerzí pomocí objektivu X100. (Tripathi a Sapra, 2024)

8.2.2 Detekce bakteriocinogenie pomocí vpichového testu

Nejdříve byly zjišťovány antimikrobiální účinky bakteriocinů vůči geneticky příbuzným bakteriím. V dalším kroku byly sledovány antimikrobiální účinky bakteriocinů vůči některým patogenním/podmíněně patogenním bakteriím.

Detekce bakteriocinogenie s citlivými kmeny

Půdy s MRS agarem byly naočkovány vpichem testovanými produkčními kmeny bakterií mléčného kvašení a byly kultivovány 48 hodin při teplotě 37 °C za anaerobních podmínek. Následně byly bakterie usmrceny parami chloroformu. Na víčko Petriho misky byl pipetován 1 ml chloroformu a po uplynutí 30 minut byly misky otevřeny, aby došlo k unikání přebytečných par chloroformu. Následovalo přelití misek 3 ml MRS soft agaru s obsahem 0,3 ml bakteriální suspenze citlivého kmene o hustotě 0,5 McF. Pro detekci bakteriocinogenie v rámci tohoto experimentu byly použity citlivé kmeny CCDM 717 a CCDM 832. Bakteriální suspenze byla připravena standardně ve zkumavce smícháním malého množství bakterie a fyziologického roztoku a její hustota byla měřena na densilometru. Po 24 h anaerobní kultivaci při teplotě 37 °C byly vyhodnocovány a měřeny inhibiční zóny, které byly utvořeny kolem nárůstu produkčního kmene.

Detekce bakteriocinogenie s patogeny

Produkční kmeny bakterií mléčného kvašení byly vpichem očkované do misek s MRS agarem. Po 24 h kultivaci při teplotě 37 °C za anaerobních podmínek byly bakterie usmrceny parami chloroformu. Po usmrcení byly misky přelity 3 ml BHI soft agaru s 0,3 ml bakteriální suspenze indikátorového mikroorganismu o hustotě 1 McF. Při přípravě BHI agaru byl namísto vody použit sodnofosfátový pufr, aby došlo k eliminaci dalších antimikrobiálních produktů LAB, jako je například kyselina mléčná, které by mohly vykazovat falešně pozitivní výsledek produkce bakteriocinů. Pro sledování aktivity bakteriocinů v rámci tohoto testu byly použity kmeny *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Bacillus cereus*. Inkubace proběhla podle podmínek indikátorového mikroorganismu, pro *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 37 °C aerobně, pro *Bacillus cereus* 30 °C aerobně. Po kultivaci byly opět zjišťovány a měřeny inhibiční zóny tvořené okolo nárůstu produkčního kmene.

8.3 Experiment II

8.3.1 Izolace a purifikace bakteriální DNA

Sbírkové kmeny mléčných bakterií byly přeočkovány z pevných půd do MRS bujónu a byly kultivovány 48 h při 37 °C anaerobně. Poté co došlo k pomnožení bakterií byla bakteriální suspenze použita k izolaci DNA pomocí komerční soupravy NucleoSpin® Tissue.

Postup:

- 2 ml bakteriální suspenze bylo odměřeno do mikrozkušavky. Obsah zkumavky byl centrifugován 5 minut při 8000x g.
- Po odstranění supernatantu bylo přidáno 360 μ l Bufferu T1, ve kterém byla peleta bakteriálních buněk resuspendována a bylo přidáno 40 μ l lysozymu. Obsah zkumavky byl promíchán a inkubován 15 minut při teplotě 37 °C.
- Po inkubaci bylo ke směsi přidáno 50 μ l proteinázy K. Směs byla smíchána a inkubována při 56 °C přes noc.
- Po inkubaci byla směs rozmíchána a bylo k ní přidáno 200 μ l Bufferu B3. Směs byla opět promíchána a inkubována při 70 °C po dobu 10 minut.
- Po inkubaci byla směs centrifugována při 11 000x g po dobu 5 minut a vzniklý supernatant byl přemístěn do kolonek.
- K supernatantu bylo přidáno 210 μ l 96 % ethanolu. Směs byla dobře promíchána a následně centrifugována při 14 000x g po dobu 1 minuty. V tomto kroku došlo k navázání DNA na membránu kolonky.
- Kolonka byla přemístěna do nové zkumavky. Do kolonky bylo přidáno 500 μ l promývacího Bufferu BW a obsah byl centrifugován při 11 000x g po dobu 1 minuty.
- Následoval další promývací krok pomocí 600 μ l Bufferu B5. Obsah byl centrifugován při 11 000x g po dobu 1 minuty. Přefiltrovaná kapalina byla vylita a centrifugace byla zopakována ještě jednou.
- Kolonka byla přenesena do čisté zkumavky. Do kolonky bylo napipetováno 50 μ l Bufferu BE, který byl předem zahřát na 70 °C. Směs se ponechala inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě.
- Po inkubaci byla směs centrifugována při 11 000x g po dobu 5 minut, aby došlo k uvolnění DNA z membrány kolonky do pufru.

Čistota a koncentrace izolované DNA byla měřena pomocí spektrofotometru Infinite 200 PRO (Tecan) při vlnové délce 260 nm. Čistá DNA měla mít hodnotu v rozmezí 1,8 – 2,0. Koncentrace byla změřena v ng/ μ l.

- Do 12 jamek destičky Nano Quant, která je součástí soupravy, byly pipetovány 2 μ l blanku (Buffer BE) a byla změřena absorbance.

- Destička byla očištěna pomocí ethanolu a následně bylo pipetováno po 2 μ l vzorku DNA a byla změřena absorbance.

8.3.2 Genotypizace bakteriocinů metodou PCR

PCR metoda sloužila pro amplifikaci hledaného úseku DNA. Pro genotypizaci bakteriocinů byly použity dva druhy primerů S1 a S2 navržené podle Darbandi et al., (2021) a Macwana a Muriana, (2012), jejichž sekvence jsou uvedeny v tabulce 5. Výsledný PCR produkt měl délku okolo 100 bp. PCR reakce probíhala v reakčním objemu 25 μ l. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 6. VWR Red Taq DNA Polymerase Master Mix obsahoval chlorid hořečnatý, Taq polymerázu, deoxynukleotidy (dNTP), inertní červené barvivo a stabilizátor. Příprava PCR směsi probíhala v PCR boxu, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku cizorodou DNA. PCR reakce probíhala v termocykleru Aeris™. Podmínky jednotlivých reakčních fází PCR reakce jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 5: Sekvence a charakteristika primerů

	Sekvence 5' - 3'	Bakteriocin	Publikace
S1	TGCGGTTATCAGTATGTCAAAG	Plantaricin G	Darbandi et al., 2021
S2	CTAGAAAAGATCTCTGGCGGTG	Plantaricin A	Macwana a Muriana, 2012

Tabulka 6: Složení reakční směsi pro PCR

Složky	Objem [μ l]	koncentrace
VWR Red Taq DNA Polymerase	12,5	1x koncentrovaný
Forward primer	0,5	10x zředěný
Reverse primer	0,5	10x zředěný
Templátová DNA	1	-
Sterilní voda pro PCR	10,5	-
Celkem	25	-

Tabulka 7: Podmínky jednotlivých reakčních fází PCR

Fáze PCR	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas [min]
Počáteční denaturace	95	2:00
Denaturace	95	0:30
Annealing	58	0:30
Elongace	72	1:00
Opakování cyklu 35x		
Konečná elongace	72	5:00

8.3.3 Elektroforéza

Elektroforéza v agarózovém gelu sloužila k vyhodnocení PCR produktů.

Postup:

- Pro přípravu 1,5 % gelu bylo smícháno 200 ml TAE pufru (50 x TAE: 2 M Tris, 0,05 M EDTA Na₂, 1 M kyselina octová, Sigma-Aldrich) a 3 g agarózy.
- Směs byla přivedena k varu zahříváním v mikrovlnné troubě.
- Po krátkém ochladnutí gelu byl přidán ethidium-bromid (látka umožňující vizualizaci DNA při elektroforéze).
- Takto připravený gel byl vylit do elektroforetické vany s hřebínky a nechal se ztuhnout.
- Po zatuhnutí gelu byly hřebínky vyjmuty a gel byl přemístěn do prostředí 1x koncentrovaného TAE pufru.
- Do jamek v gelu byly nanášeny 4 ul produktu PCR reakce a 4 ul standardu (100bp DNA marker).
- Elektroforetická separace probíhala při napětí 90 V, 90 minut.
- Po ukončení elektroforézy byl gel přemístěn do transluminátoru pod UV světlo.
- PCR produkty byly vyhodnoceny prostřednictvím fotodokumentačního systému GeneSnap.

9 VÝSLEDKY A DISKUZE

9.1 Experiment I

9.1.1 Barvení podle Grama

Sbírkové kmeny bakterií mléčného kvašení byly identifikovány jako grampozitivní bakterie ve tvaru tyčinek. Stejně tak definuje bakterie mléčného kvašení Wang et al., (2021).

9.1.2 Detekce bakteriocinogenie pomocí vpichového testu

Detekce bakteriocinogenie s citlivými kmeny

V této práci byly sledovány inhibiční účinky bakteriocinů vybraných sbírkových kmenů pomocí vpichového testu. Celkem bylo otestováno 52 kmenů bakterií mléčného kvašení, které byly klasifikovány v šesti různých rodech – *Lacticaseibacillus*, *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Latilactobacillus*, *Lactilactobacillus*, *Lentilactobacillus*. K detekci bakteriocinogenie byly použity citlivé kmeny 717 *Lactilactobacillus sakei* subsp. *sakei* a 832 *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans*. Každý potenciální produkční kmen byl testován 2x vždy ve 2 opakováních. Cílem bylo vyhodnotit a následně změřit velikosti průměrů inhibičních zón, které byly tvořeny okolo vpichu produkčního kmene. Jejich výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Naměřené hodnoty velikostí průměrů inhibičních zón vytvořených produkčními kmeny

CCDM	velikost zóny CCDM 832 Ø (mm)		velikost zóny CCDM 717 Ø (mm)	
	1. pokus	2. pokus	1. pokus	2. pokus
145	0	0	15 ± 0,2	22 ± 0,3
148	0	0	35 ± 0,3	32 ± 0,3
154	0	0	0	0
157	23 ± 0,5	15 ± 0,2	33 ± 0,4	50 ± 0,5
178	15 ± 0,4	12 ± 0,3	20 ± 0,5	40 ± 0,4
181	20 ± 0,4	18 ± 0,2	17 ± 0,4	9 ± 0,5
183	32 ± 0,2	29 ± 0,2	42 ± 0,2	40 ± 0,2
184	38 ± 0,5	36 ± 0,4	40 ± 0,3	42 ± 0,4
186	19 ± 0,3	0	24 ± 0,3	21 ± 0,5
187	0	0	30 ± 0,2	41 ± 0,3
188	0	0	0	0
191	0	0	35 ± 0,5	70 ± 0,1
193	47 ± 0,2	45 ± 0,3	56 ± 0,4	58 ± 0,3

Tabulka 8: Naměřené hodnoty velikostí průměrů inhibičních zón vytvořených produkčními kmeny (pokračování)

CCDM	velikost zóny CCDM 832 Ø (mm)		velikost zóny CCDM 717 Ø (mm)	
	1. pokus	2. pokus	1. pokus	2. pokus
194	0	0	0	0
195	18 ± 0,4	20 ± 0,3	31 ± 0,5	32 ± 0,5
197	0	0	0	0
198	0	0	0	0
199	48 ± 0,2	39 ± 4	58 ± 0,3	56 ± 0,2
217	18 ± 0,4	11 ± 3	56 ± 0,3	58 ± 0,3
289	16 ± 0,3	12 ± 4	20 ± 0,4	15 ± 0,5
336	10 ± 0,4	12 ± 3	16 ± 0,2	7 ± 0,4
339	0	0	8 ± 0,2	5 ± 0,2
364	0	0	35 ± 0,5	48 ± 0,3
375	0	0	42 ± 0,5	47 ± 0,5
381	0	0	30 ± 0,4	42 ± 0,3
383	0	25 ± 5	40 ± 0,2	39 ± 0,4
384	0	0	19 ± 0,3	26 ± 0,3
385	0	0	44 ± 0,2	46 ± 0,3
387	0	0	46 ± 0,4	57 ± 0,2
388	0	0	63 ± 0,3	65 ± 0,2
391	40 ± 0,4	0	27 ± 0,5	24 ± 0,4
393	5 ± 0,2	0	0	7 ± 0,2
394	0	0	0	0
406	12 ± 0,4	19 ± 0,2	8 ± 0,2	40 ± 0,2
422	35 ± 0,3	26 ± 0,3	37 ± 0,4	41 ± 0,3
476	18 ± 0,5	22 ± 0,3	27 ± 0,3	22 ± 0,2
535	0	0	21 ± 0,5	15 ± 0,4
579	25 ± 0,3	22 ± 0,2	12 ± 0,4	19 ± 0,5
650	0	0	2 ± 0,3	9 ± 0,2
741	0	0	0	0
776	18 ± 0,4	31 ± 0,3	32 ± 0,5	36 ± 0,5
792	10 ± 0,3	5 ± 0,2	34 ± 0,2	40 ± 0,2
807	6 ± 0,5	11 ± 0,2	0	0
821	32 ± 0,3	27 ± 0,2	39 ± 0,4	41 ± 0,3
828	47 ± 0,5	52 ± 0,3	50 ± 0,6	52 ± 0,5
834	0	0	31 ± 0,2	26 ± 0,2
888	0	0	16 ± 0,3	9 ± 0,2
963 A	26 ± 0,3	24 ± 0,2	47 ± 0,5	43 ± 0,4
963 B	45 ± 0,4	35 ± 0,3	35 ± 0,3	36 ± 0,3
982	55 ± 0,6	42 ± 0,3	48 ± 0,2	45 ± 0,3

Z výsledků, které jsou uvedeny v tabulce 8, je patrné, že testování bakteriální producenti dokázaly lépe inhibovat růst citlivého kmene 717 *Lactilactobacillus sakei* subsp. *sakei*. Inhibiční zóny byly zaznamenány u 44/52 bakteriálních producentů. Nejvyšší inhibiční účinky byly zaznamenány u kmene 388 *Lactiplantibacillus plantarum* izolovaného z kozího sýra. Stejně tak i Todorov a Dicks, (2006) potvrzují ve své studii potlačení aktivity *Lactilactobacillus sakei* subsp. *sakei* účinkem produkčních kmenů bakterií mléčného kvašení. Růst citlivého kmene 832 *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* dokázalo inhibovat 29/52 bakteriálních producentů, přičemž nejvyšší inhibiční účinek, vyplývající z výsledných průměrů inhibičních zón, vykazoval kmen 828 *Lentilactobacillus hilgardii* izolovaný z vína.

Detekce bakteriocinogenie s patogeny

Vybrané produkční kmeny, u kterých byly zaznamenány inhibiční účinky vůči citlivým kmenům, byly podrobeny dalším testům. Také Trmčič et al., (2008) zmiňuje, že myšlenka použití bakteriocinogenních kmenů k inhibici technologicky nežádoucích bakterií, které představují zdravotní riziko, není nová. Cílem bylo zjistit, zda tyto bakteriociny vykazují antibakteriální aktivitu vůči některým patogenním/podmíněně patogenním bakteriím. Otestováno bylo celkem 30 produkčních kmenů bakterií mléčného kvašení. Každý potenciální produkční kmen byl testován 2x. Jako indikátorové mikroorganismy byly použity kmeny *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Vyhodnocení proběhlo stejně jako v předchozím případě, opět byly zjištěny a změřeny velikosti průměrů inhibičních zón vytvořených kolem vpichu produkčního kmene. Výsledné hodnoty jsou zaznamenány v tabulce 9.

Tabulka 9: Naměřené hodnoty velikostí průměrů inhibičních zón

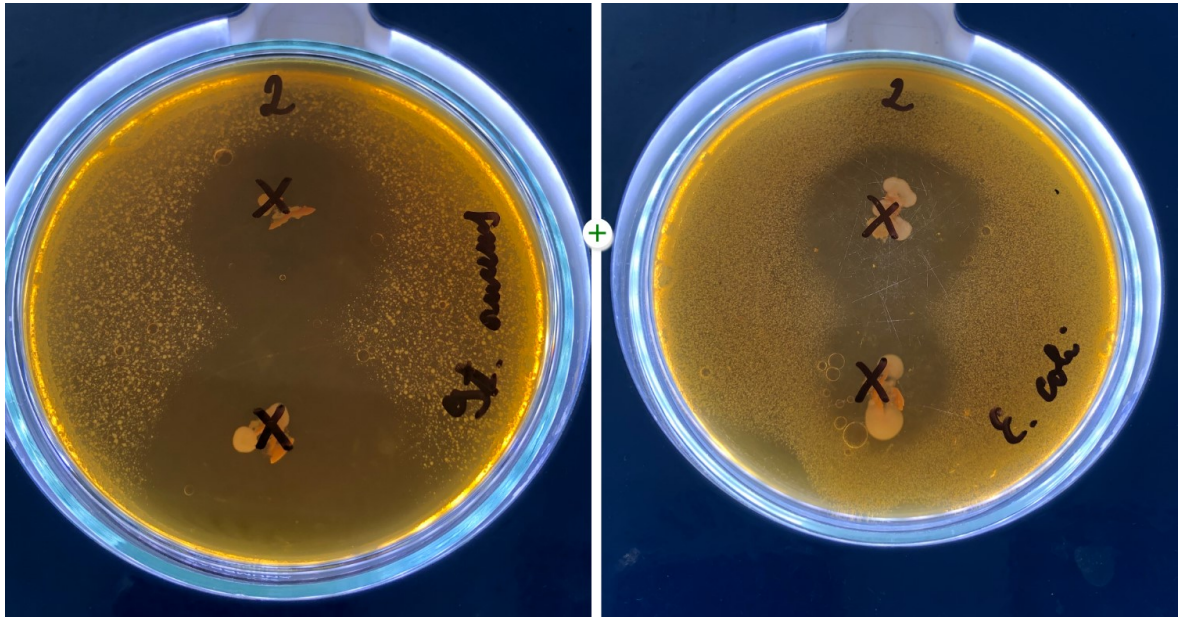
	<i>Bacillus cereus</i> velikost zóny CCM Ø	<i>Escherichia coli</i> velikost zóny CCM Ø	<i>Staphylococcus aureus</i> velikost zóny CCM Ø
14	7 ± 0,3	49 ± 0,4	0
14	0	60 ± 0,5	0
15	19 ± 0,2	25 ± 0,3	16 ± 0,5
17	47 ± 0,4	35 ± 0,2	25 ± 0,4
18	14 ± 0,3	0	0
18	5 ± 0,5	45 ± 0,2	15 ± 0,5
18	8 ± 0,3	26 ± 0,3	13 ± 0,2
18	7 ± 0,2	21 ± 0,5	0
19	20 ± 0,4	11 ± 0,3	0
19	17 ± 0,5	0	15 ± 0,2

Tabulka 9: Naměřené hodnoty velikostí průměrů inhibičních zón (pokračování)

CCDM	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	velikost zóny CCM Ø	velikost zóny CCM Ø	velikost zóny CCM Ø
195	19 ± 0,4	42 ± 0,3	16 ± 0,2
199	29 ± 0,4	45 ± 0,3	0
289	20 ± 0,2	28 ± 0,5	0
339	12 ± 0,6	23 ± 0,3	11 ± 0,2
364	17 ± 0,2	0	0
381	57 ± 0,4	50 ± 0,3	18 ± 0,4
383	10 ± 0,5	0	20 ± 0,2
384	15 ± 0,2	0	22 ± 0,3
387	0	10 ± 0,5	0
391	27 ± 0,4	55 ± 0,4	0
406	0	0	0
422	10 ± 0,3	30 ± 0,5	21 ± 0,4
476	12 ± 0,2	29 ± 0,3	0
776	4 ± 0,3	23 ± 0,2	21 ± 0,3
792	70 ± 0,2	19 ± 0,2	0
821	41 ± 0,5	51 ± 0,4	18 ± 0,5
963 A	14 ± 0,2	16 ± 0,3	0
963 B	25 ± 0,4	12 ± 0,2	39 ± 0,5

Z výsledků uvedených v tabulce 9 vyplývá, že bakteriociny vybraných sbírkových kmenů vykazovaly nejvyšší antimikrobiální aktivitu vůči patogenu *Bacillus cereus*. Jeho růst dokázalo inhibovat 27/30 testovaných produkčních kmenů. Mgomi et al., (2023) ve své studii uvádí, že druhy *Lactiplantibacillus plantarum* a *Lacticaseibacillus paracasei* vykazovaly proti těmto patogenním bakteriím silný antibakteriální účinek v rozsahu 8,9 do 9,2 mm inhibiční zóny. V našem experimentu se u těchto kmenů velikost zóny pohybovala od 5 do 70 mm. Nejslabší antimikrobiální aktivita byla zaznamenána u *Staphylococcus aureus*, jehož růst inhibovalo pouze 16/30 testovaných producentů. Zajímavé je, že Todorov a Dicks, (2006) během svého testování mléčných bakterií nedetekovali žádný kmen, který by inhiboval růst patogenní bakterie *Staphylococcus aureus*. Růst podmíněně patogenní bakterie *Escherichia coli* potlačilo 24/30 testovaných produkčních kmenů. Mgomi et al., (2023) uvádí, že *Lactiplantibacillus plantarum* i *Lacticasei paracasei* projevíly antibakteriální aktivitu vůči bakteriím *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. V našem případě byly zóny měřitelné pouze u kmene *Lactiplantibacillus plantarum*. Kmen *Lacticaseibacillus paracasei* sub. *paracasei* antibakteriální aktivitu neprojevil.

Pouze 11/30 testovaných produkčních kmenů dokázalo inhibovat růst všech třech indikátorových bakterií, z nichž většina byla rodu *Lactiplantibacillus*. Přítomnost více než jednoho genu zodpovědného za produkci bakteriocinů není pro bakteriální kmen věci ojedinělou, což dokazují nejen výsledky této práce, ale i mnoho studií, jako například Todorov et al., (2013).

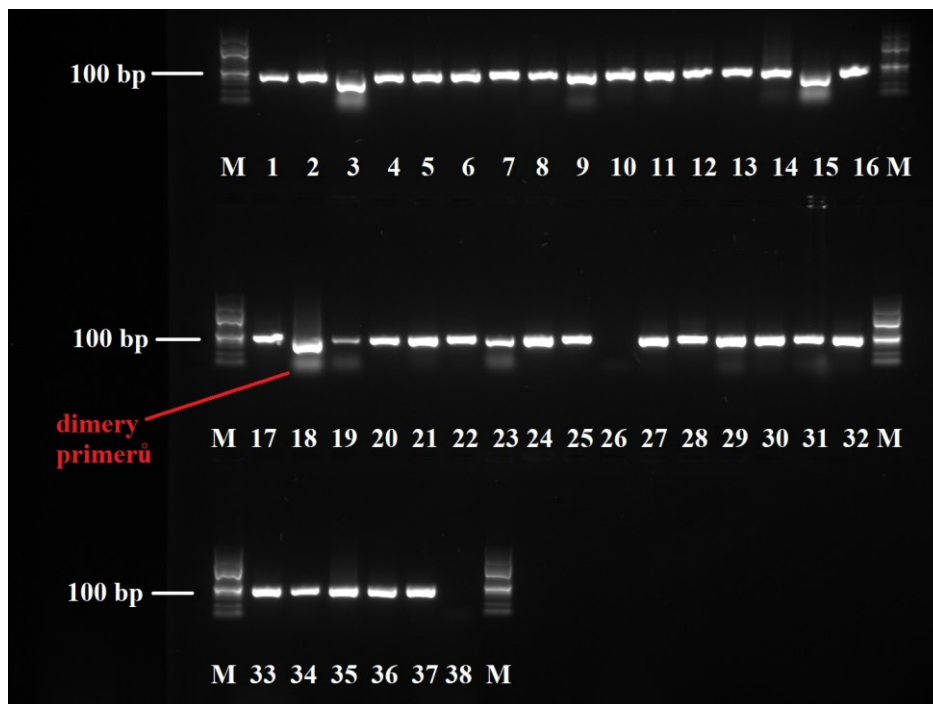


Obrázek 2: Vpichový test: aktivita bakteriocinů projevující se vytvořením inhibiční zóny kolem produkčního kmene

9.2 Experiment II

9.2.1 Genotypizace bakteriocinů metodou PCR

K detekci bakteriocinových genů byla použita metoda PCR za použití primerů S1 a S2. Jejich sekvence jsou uvedeny v tabulce 5. Amplifikované produkty byly vizualizovány pomocí elektroforézy v 1,5 % agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem. Získaný produkt byl dlouhý 100 bp.



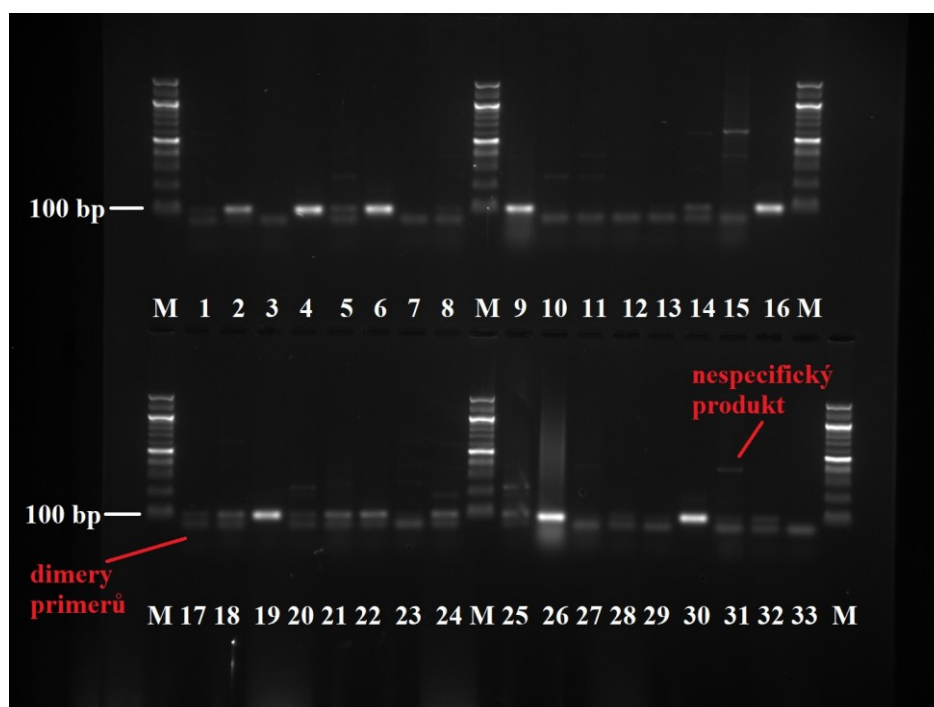
Obrázek 3: PCR produkty získané amplifikací pomocí primeru *SI*
dráha M – marker, dráha 1-37 - vzorky (tab. 10), dráha 38 – negativní kontrola

Získané výsledky jsou zpracovány v tabulce 10.

Tabulka 10: Výsledky genotypizace bakteriocinů při použití primeru *SI*

Dráha	vzorek	přítomnost genu	dráha	vzorek	přítomnost genu
1	145 CCDM	+	20	381 CCDM	+
2	148 CCDM	+	21	383 CCDM	+
3	154 CCDM	+	22	384 CCDM	+
4	157 CCDM	+	23	385 CCDM	+
5	178 CCDM	+	24	387 CCDM	+
6	183 CCDM	+	25	388 CCDM	+
7	184 CCDM	+	26	394 CCDM	-
8	186 CCDM	+	27	391 CCDM	+
9	188 CCDM	+	28	422 CCDM	+
10	191 CCDM	+	29	535 CCDM	+
11	194 CCDM	+	30	650 CCDM	+
12	195 CCDM	+	31	792 CCDM	+
13	199 CCDM	+	32	807 CCDM	+
14	198 CCDM	+	33	821 CCDM	+
15	217 CCDM	+	34	892 CCDM	+
16	289 CCDM	+	35	963 A CCDM	+
17	339 CCDM	+	36	963 B CCDM	+
18	364 CCDM	+	37	982 CCDM	+
19	375 CCDM	+	38	negativní kontrola	

Testování byly podrobeny bakteriální kmeny klasifikované ve čtyřech různých rodech: *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Latilactobacillus* a *Lacticaseibacillus*. Z výsledků uvedených v tabulce 10 vyplývá, že gen kódující produkci plantaricinu G byl zjištěn u 36/37 testovaných produkčních kmenů bakterií mléčného kvašení. Pouze u kmene 394 *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* byl výsledek na přítomnost genu negativní, pro kmen 792 však identifikovatelný byl, což indikuje, že přítomnost tohoto genu byla u rodu *Lacticaseibacillus* kmenově závislá. Kmen 394 zároveň nevykazoval antimikrobiální aktivitu vůči citlivým kmenům 717 a 832, která byla zjišťována pomocí vpichového testu. Darbandi et al., (2021) ve svých výsledcích uvádí, že geny kódující syntézu plantaricinu G byly indetifikovatelné u 50 % testovaných produkčních kmenů bakterií mléčného kvašení a většinu z nich představovaly kmeny *Lactiplantibacillus plantarum*. V našem experimentu byl plantaricin G identifikovatelný u všech testovaných kmenů *Lactiplantibacillus plantarum*. U vzorků 154, 188, 217, 364, 375, 385, 535 a 792 byly vedle žádoucích produktů vytvořeny i nežádoucí produkty, které nedosahovaly délky 100 bp – tzv. primer dimery. Důvodem vzniku těchto produktů jsou obvykle nevhodně navržené primery. Tyto primery obsahují ve svém úseku komplementární báze, v důsledku toho může dojít v průběhu PCR reakce k jejich spojení, začnou se chovat jako templáty a jsou amplifikovány spolu s žádoucími produkty.



Obrázek 4: PCR produkty získané amplifikací pomocí primeru S2
dráha M – marker, dráha 1-32 - vzorky (tab. 11), dráha 33 – negativní kontrola

Získané výsledky jsou zpracované v tabulce 11.

Tabulka 11: Výsledky genotypizace bakteriocinů při použití primeru S2

Dráha	vzorek	přítomnost genu	dráha	vzorek	přítomnost genu
1	145 CCDM	+	17	339 CCDM	+
2	148 CCDM	+	18	364 CCDM	+
3	154 CCDM	-	19	375 CCDM	+
4	157 CCDM	+	20	381 CCDM	+
5	178 CCDM	+	21	383 CCDM	+
6	183 CCDM	+	22	384 CCDM	+
7	184 CCDM	-	23	385 CCDM	+
8	186 CCDM	+	24	387 CCDM	+
9	188 CCDM	+	25	388 CCDM	+
10	191 CCDM	-	26	394 CCDM	+
11	194 CCDM	-	27	391 CCDM	-
12	195 CCDM	-	28	406 CCDM	+
13	198 CCDM	-	29	422 CCDM	+
14	199 CCDM	+	30	476 CCDM	+
15	217 CCDM	-	31	535 CCDM	+
16	289 CCDM	+	32	650 CCDM	+

Stejně tak jako v předchozím případě byly testovány bakteriální kmeny klasifikované ve čtyřech různých rodech: *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Latilactobacillus* a *Lacticaseibacillus*. Z výsledků, které jsou uvedeny v tabulce 11 lze vyvodit, že gen kódující produkci plantaricinu A byl identifikovatelný u 24/32 testovaných kmenů bakterií mléčného kvašení, tedy u 75 % producentů. Darbandi et al., (2021) uvádí, že geny kódující produkci plantaricinu A byly identifikovatelné u 20 % produkčních kmenů. Přítomnost genu byla zjištěna u kmene 364 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, zatímco u kmene 154 nikoliv. Stejný případ byl zaznamenán i u kmenů *Lactobacillus acidophilus* pod označením 217 a 406. Podle zmíněných výsledků lze tedy říct, že přítomnost tohoto genu byla u rodu *Lactobacillus* kmenově závislá. U bakteriálních kmenů *Lactiplantibacillus plantarum* značených čísly 184, 191, 194, 195 a 391 byly výsledky na přítomnost genu negativní, zatímco pro ostatní otestované kmeny *Lactiplantibacillus plantarum* vyšly pozitivně, což znamená, že i u rodu *Lactiplantibacillus* byla přítomnost genu kmenově závislá. Kmenová závislost byla zaznamenána i u rodu *Lacticaseibacillus*, kterou dokazuje přítomnost genu u kmene 199 *Lacticaseibacillus casei* subsp. *casei* a jeho nepřítomnost u kmene 198.

U 17/32 vzorků vznikly vedle žádoucích produktů opětovně primer dimery. Kromě nich byl u některých vzorků zaznamenán vznik nespecifických produktů. Jednalo se o kmeny pod označením 145, 178, 183, 186, 188, 191, 194, 199, 217, 364, 381, 383, 385, 387, 388, 391, 476, 535. Některé z nespecifických produktů dosahovaly délky až 500 bp. Příčinou jejich vzniku bývá nejčastěji nízká teplota při nasedání primerů. Jejich vzniku by se dalo předejít použitím touchdown PCR, jejíž princip spočívá v postupném snižování a tím i optimalizaci teploty annealingu.

ZÁVĚR

Bakteriociny jsou antimikrobiální látky bílkovinné povahy syntetizované prostřednictvím ribozomů. Jejich nejvýznamnějšími producenty jsou bakterie mléčného kvašení. Tyto látky jsou aktivně zkoumány hlavně z důvodu vznikající rezistence na antibiotika.

Hlavním cílem této práce byla genotypizace bakteriocinů u potravinářsky významných bakterií. Genová typizace bakteriocinů byla provedena metodou PCR. Experimentální část byla rozdělena na dvě části. V experimentu I byla práce zaměřena na sledování antimikrobiálního účinku bakteriocinů vůči příbuzným druhům bakterií mléčného kvašení, ale také vůči některým patogenním/podmíněně patogenním bakteriím prostřednictvím kultivačních metod. Jako kultivační metoda byla zvolena metoda vpichu, kde se aktivita bakteriocinů projevila vytvořením tzv. inhibiční zóny kolem nárůstu produkčního kmene. Testování byly podrobeny sbírkové kmeny CCDM bakterií mléčného kvašení spolu s patogenními/podmíněně patogenními kmeny CCM.

Na základě experimentálních výsledků bylo zjištěno, že gen zodpovídající za produkci plantaricinu G byl identifikovatelný pro všechny testované rody: *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lactilactobacillus* a *Lacticaseibacillus*, přičemž u rodu *Lacticaseibacillus* byla jeho přítomnost kmenově závislá (*Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*). Gen kódující syntézu plantaricinu A byl též identifikovatelný pro všechny testované rody a jeho přítomnost byla kmenově závislá u rodů *Lactobacillus* (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*), *Lacticaseibacillus* (*Lacticaseibacillus casei* subsp. *casei*) a *Lactiplantibacillus* (*Lactiplantibacillus plantarum*).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

BHATTACHARYA, Dipanwita; NANDA, Pramod Kumar; PATEIRO, Mirian; LORENZO, José M.; DHAR, Pubali et al., 2022. Lactic Acid Bacteria and Bacteriocins: Novel Biotechnological Approach for Biopreservation of Meat and Meat Products. Online. *Microorganisms*. Roč. 10, č. 10. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102058>.

BROGDEN, Kim A., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Online. *Nature Reviews Microbiology*. Roč. 3, č. 3, s. 238-250. ISSN 1740-1526. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>.

CINTAS, L M; RODRIGUEZ, J M; FERNANDEZ, M F; SLETTEN, K; NES, I F et al., 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. Online. *Applied and Environmental Microbiology*. Roč. 61, č. 7, s. 2643-2648. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/aem.61.7.2643-2648.1995>.

DABA, Ghoson Mosbah a ELKHATEEB, Waill Ahmed, 2024. Ribozomálně syntetizované bakteriociny bakterií mléčného kvašení: Jednoduchost, a přitom široký potenciál – přehled. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. Roč. 256. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128325>.

DARBANDI, Atieh; ASADI, Arezoo; MAHDIZADE ARI, Marzieh; OHADI, Elnaz; TALEBI, Malihe et al., 2022. Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. Online. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. Roč. 36, č. 1. ISSN 0887-8013. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>.

DARBANDI, Atieh; GHANAVATI, Roya; ASADI, Arezoo; MIRKLANTARI, Šiva; HASANNEJAD-BIBALAN, Meysam et al., 2021. Prevalence bakteriocinových genů u kmenů *Lactobacillus* izolovaných ze vzorků stolice zdravých jedinců a jejich inhibiční účinek proti alimentárním patogenům. Online. *Íránský žurnál základních lékařských věd*. Roč. 24, č. 8, s. 1117–1125. Dostupné z: <https://doi.org/10.22038/ijbms.2021.53299.11998>.

DELGADO, Amélia; BRITO, Dulce; FEVEREIRO, Pedro; TENREIRO, Rogério a PERES, Cidália, 2005. Bioactivity quantification of crude bacteriocin solutions. Online. *Journal of Microbiological Methods*. Roč. 62, č. 1, s. 121-124. ISSN 01677012. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.01.006>.

TRIPATHI, Nishant a SAPRA, Amit, 2024. Gramovo barvení. Online. In: Ostrov pokladů (FL). StatPearls Publishing, s. 1-12. Dostupné

z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>.

GU, Qing, 2023. Bacteriocins. 1. Springer Singapur. ISBN 978-981-99-2661-9.

GUO, Xing; MA, Lingling; QIAO, Zhu; LUO, Lingli; ZHANG, Yu et al. The antibacterial mechanism of the novel bacteriocin LpH25 and the synergistic preservation effect of this bacteriocin and Nisin in fresh milk. Online. LWT. 2024, roč. 194. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.115766>.

HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, Juan Carlos; MARTÍNEZ-TAPIA, Abigail; LAZCANO-HERNÁNDEZ, Gebim; GARCÍA-PÉREZ, Blanca Estela a CASTREJÓN-JIMÉNEZ, Nayeli Shantal, 2021. Bakteriociny z bakterií mléčného kvašení. Výkonná alternativa jako antimikrobiální, probiotika a imunomodulátory ve veterinární medicíně. Online. Zvířata. Roč. 11, č. 4. ISSN 2076-2615. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ani11040979> .

HUANG, Huey W., 2000. Action of Antimicrobial Peptides: Two-State Model. Online. Biochemistry. 2000-07-01, roč. 39, č. 29, s. 8347-8352. ISSN 0006-2960. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/bi000946l>.

LAHIRI, Dibyajit; NAG, Moupriya; DUTTA, Bandita; SARKAR, Tanmay; PATI, Siddhartha et al. Bacteriocin: A natural approach for food safety and food security. Online. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2022, roč. 10. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1005918>.

LÜCKE, Friedrich-Karl, 2024. Overview of Biopreservation. Online. In: Encyclopedia of Food Safety. Elsevier, s. 491-498. ISBN 9780128225202. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822521-9.00075-7>.

MACWANA, Sunita J. a MURIANA, Peter M., 2012. 'bacteriocin PCR array' pro identifikaci strukturních genů souvisejících s bacteriocinem u bakterií mléčného kvašení. Online. Journal of Microbiological Methods. Roč. 88, č. 2, s. 197-204. ISSN 01677012. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.11.008> .

MGOMI, Fedrick C.; YANG, Yi-ran; CHENG, Gen a YANG, Zhen-quan, 2023. Lactic acid bacteria biofilms and their antimicrobial potential against pathogenic microorganisms. Online. Biofilm. Roč. 5. ISSN 25902075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2023.100118>.

MOSTAFIDI, Mahdieh; SANJABI, Mohammad Reza; SHIRKHAN, Faezeh a ZAHEDI, Maryam Tamaskani, 2020. A review of recent trends in the development of the microbial safety of fruits and vegetables. Online. Trends in Food Science & Technology. Roč. 103, s. 321-332. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.009>.

NEGASH, Abebe Worku; TSEHAI, Berhanu Andualem a FALKINHAM, Joseph. Current Applications of Bacteriocin. Online. International Journal of Microbiology. 2020, roč. 2020, s. 1-7. ISSN 1687-9198. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2020/4374891>.

NIKU-PAAVOLA, M. -L.; LAITILA, A.; MATTILA-SANDHOLM, T. a HAIKARA, A., 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. Online. Journal of Applied Microbiology. Roč. 86, č. 1, s. 29-35. ISSN 1364-5072. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00632.x>.

OBERG, Taylor S.; MCMAHON, Donald J.; CULUMBER, Michele D.; MCAULIFFE, Olivia a OBERG, Craig J., 2022. Invited review: Review of taxonomic changes in dairy-related lactobacilli. Online. Journal of Dairy Science. Roč. 105, č. 4, s. 2750-2770. ISSN 00220302. Dostupné z: <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21138>.

PEREZ, Rodney H; ZENDO, Takeshi a SONOMOTO, Kenji. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. Online. Microbial Cell Factories. 2014, roč. 13, č. S1. ISSN 1475-2859. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S3>.

QIAO, Nanzhen; WITTOUCK, Stijn; MATTARELLI, Paola; ZHENG, Jinshui; LEBEER, Sarah et al., 2022. After the storm—Perspectives on the taxonomy of Lactobacillaceae. Online. JDS Communications. Roč. 3, č. 3, s. 222-227. ISSN 26669102. Dostupné z: <https://doi.org/10.3168/jdsc.2021-0183>.

SAR, C; SANTOSO, B; MWENYA, B; GAMO, Y; KOBAYASHI, T et al., 2004. Manipulation of rumen methanogenesis by the combination of nitrate with β 1-4 galactooligosaccharides or nisin in sheep. Online. Animal Feed Science and Technology. Roč. 115, č. 1-2, s. 129-142. ISSN 03778401. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.01.006>.

SHAHRIR, Sayyid Zulhelimie; KEE, Phei Er; NG, Hui Suan; TAN, Joo Shun a LAN, John Chi-Wei, 2024. Evaluation of antimicrobial effect of bacteriocin produced by *Lactobacillus*

acidophilus utilizing molasses and corn steep liquor. Online. Biochemical Engineering Journal. Roč. 205. ISSN 1369703X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2024.109266>.

SIMONS, Alexis; ALHANOUT, Kamel a DUVAL, Raphaël E. Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact against Multidrug-Resistant Bacteria. Online. Microorganisms. 2020, roč. 8, č. 5. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050639>.

TANG, Huang; HUANG, Wanqiu a YAO, Yu-Feng, 2023. The metabolites of lactic acid bacteria: classification, biosynthesis and modulation of gut microbiota. Online. Microbial Cell. 2023-03-06, roč. 10, č. 3, s. 49-62. ISSN 23112638. Dostupné z: <https://doi.org/10.15698/mic2023.03.792>.

TANG, Zhiru; YIN, Yulong; ZHANG, Youming; HUANG, Ruilin; SUN, Zhihong et al., 2009. Effects of dietary supplementation with an expressed fusion peptide bovine lactoferricin–lactoferrampin on performance, immune function and intestinal mucosal morphology in piglets weaned at age 21 d. Online. British Journal of Nutrition. 2009-04-14, roč. 101, č. 7, s. 998-1005. ISSN 0007-1145. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/S0007114508055633>.

TODOROV, S.D. a DICKS, L.M.T., 2006. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. Online. Process Biochemistry. Roč. 41, č. 1, s. 11-19. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.026>.

TODOROV, Svetoslav D.; RACHMAN, Cinta; FOURRIER, Angélique; DICKS, Leon M.T.; VAN REENEN, Carol A. et al., 2011. Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked salmon. Online. Anaerobe. Roč. 17, č. 1, s. 23-31. ISSN 10759964. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.01.004>.

TODOROV, Svetoslav Dimitrov; POPOV, Igor; TÝDNY, Richard a CHIKINDAS, Michael Leonidas, 2022. Použití bakteriocinů a bakteriocinogenních prospěšných organismů v potravinářských produktech: výhody, výzvy, obavy. Online. Potraviny. Roč. 11, č. 19. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods11193145>.

TODOROV, Svetoslav Dimitrov; VAZ-VELHO, Manuela; DE MELO FRANCO, Bernadette Dora Gombossy a HOLZAPFEL, Wilhelm Heinrich, 2013. Částečná charakterizace bakteriocinů produkovaných třemi kmeny *Lactobacillus sakei*, izolovaného

ze salpicao, fermentovaného masného výrobku ze severozápadního Portugalska. Online. *Kontrola potravin*. Roč. 30, č. 1, s. 111-121. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.07.022> .

TRMČIĆ, A.; OBERMAJER, T.; ROGELJ, I. a BOGOVIĆ MATIJAŠIĆ, B., 2008. Krátké sdělení: Na kultuře nezávislá detekce bakteriocinových genů bakterií mléčného kvašení ve dvou tradičních slovinských sýrech ze syrového mléka a jejich mikrobiálních konsorciích. Online. *Journal of Dairy Science* . Roč. 91, č. 12, s. 4535-4541. ISSN 00220302. Dostupné z: <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1396> .

VERMA, Deepak Kumar; THAKUR, Mamta; SINGH, Smita; TRIPATHY, Soubhagya; GUPTA, Alok Kumar et al., 2022. Bacteriocins as antimicrobial and preservative agents in food: Biosynthesis, separation and application. Online. *Food Bioscience*. Roč. 46. ISSN 22124292. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101594>.

WANG, Yaqi; WU, Jiangtao; LV, Mengxin; SHAO, Zhen; HUNGWE, Meluleki et al., 2021. Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. Online. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021-5-12, roč. 9. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>.

YANG, Wanjie; KANG, Xiaolong; YANG, Qingfeng; LIN, Yao a FANG, Meiyong, 2013. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. Online. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. Roč. 4, č. 1. ISSN 2049-1891. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-2>.

ZIMINA, Maria; BABICH, Olga; PROSEKOV, Alexander; SUKHIKH, Stanislav; IVANOVA, Svetlana et al., 2020. Overview of Global Trends in Classification, Methods of Preparation and Application of Bacteriocins. Online. *Antibiotics (Basel)*. Roč. 9, č. 9, s. 3. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antibiotika9090553>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABC	ATP Binding Cassette (ATP transportní protein)
ATP	Adenosintrifosfát
BHI	Brain heart infusion agar
Bp	Base pairs (páry bází)
ČR	Česká republika
DNA	Deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GRAS	Generally Recognized as Safe (všeobecně uznávaný jako bezpečný)
LAB	Lactic acid bacteria (bakterie mléčného kvašení)
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MRS	Lactobacillus deMan, Rogosa and Sharpe agar
PCR	Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
QPS	Kvalifikovaný předpoklad bezpečnosti
RNA	Ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
TAE	Tris-acetát-EDTA
UV	Ultraviolet (ultrafialové)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Aplikace bakteriocinů v potravinářském průmyslu (Gu, 2023, upraveno)	20
Obrázek 2: Vpichový test: aktivita bakteriocinů projevující se vytvořením inhibiční zóny kolem produkčního kmene.....	43
Obrázek 3: PCR produkty získané amplifikací pomocí primeru S1	44
Obrázek 4: PCR produkty získané amplifikací pomocí primeru S2.....	45

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Klasifikace bakteriocinů produkovaných grampozitivními bakteriemi (Simons et al., 2020, upraveno)	16
Tabulka 2: Klasifikace bakteriocinů produkovaných gramnegativními bakteriemi (Simons et al., 2020, upraveno)	17
Tabulka 3: Seznam a charakteristika použitých sbírkových kmenů CCM.....	31
Tabulka 4: Seznam a charakteristika použitých sbírkových kmenů CCDM	32
Tabulka 5: Sekvence a charakteristika primerů	37
Tabulka 6: Složení reakční směsi pro PCR	37
Tabulka 7: Podmínky jednotlivých reakčních fází PCR.....	37
Tabulka 8: Naměřené hodnoty velikostí průměrů inhibičních zón vytvořených produkčními kmeny.....	39
Tabulka 9: Naměřené hodnoty velikostí průměrů inhibičních zón.....	41
Tabulka 10: Výsledky genotypizace bakteriocinů při použití primeru S1	44
Tabulka 11: Výsledky genotypizace bakteriocinů při použití primeru S2	46

