

Inhibiční vliv monoacylglycerolu kyseliny laurové na mikroorganizmy

Kristýna Janečková

Bakalářská práce
2009



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kristýna JANEČKOVÁ**

Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Inhibiční vliv monoacylglycerolu kyseliny laurové na mikroorganismy**

Zásady pro vypracování:

- V teoretické části zpracujte literární rešerši týkající se charakteristiky, významu a využití monoacylglycerolů v potravinářství, popř. i kosmetice. Popište antimikrobní účinky monoacylglycerolů a mastných kyselin.
- Popište antimikrobní účinky monoacylglycerolů a mastných kyselin.
- V praktické části proveďte sledování vlivu různých koncentrací monoacylglycerolu kyseliny laurové na růst vybraných grampozitivních a gramnegativních bakterií.
- Na základě teoretické části a výsledků praktické části formulujte návrhy a doporučení, týkající se využití monoacylglycerolu kyseliny laurové jako antimikrobní látky a zhodnoťte jeho využitelnost v potravinářství, popř. i kosmetice.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1]Bergsson, G., Steingrímsson, Ó., Thormar, H. (2002). Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerides on *Helicobacter pylori*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 20: 258-262.

[2]Davidson, P.M., Sofos, J.N., Branen, A.L. (2005). *Antimicrobials in food*. CRC Press, Boca Raton. 706 p.

[3]Kabara, J.J., Swieczkowski, D.M., Conley, A.J., Truant, J.P. (1972). Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2: 23-28.

[4]Moonen, H., Bas, H. (2004). Mono- and diglycerides. In Whitehurst, R.J. (ed.) *Emulsifiers in Food Technology*, 40 -- 57. Blackwell Publishing.

[5]Mouloungui, Z., Rakotonrazafy, V., Peyrou, G., Gachen C., Eychenne V. (1998). Pure α -monoglycerides for industrial applications. *Agro Food Ind. Hi-Tech* 9: 10-14.

[6]Pokorný, J. a kol. (1986). *Technologie tuků*. SNTL, Praha. 452 s.

[7]Thormar, H., Bergsson, G. (2001). Antimicrobial effects of lipids. *Recent Devel. Antiviral Res.* 1: 157-173.

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce:

12. února 2009

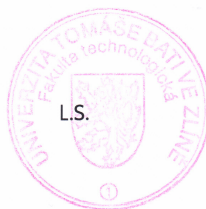
Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2009

Ve Zlíně dne 12. února 2009



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Podstatou bakalářské práce bylo určit citlivost vybraných bakterií vůči účinkům monolaurinu. Monolaurin je považován za přírodní surfaktant, který nachází široké uplatnění jako emulgátor v potravinářském a kosmetickém průmyslu. Antimikrobiální aktivita byla určena jako minimální inhibiční koncentrace monolaurinu. Výsledky ukazují, že bakterie s buněčnou stěnou grampozitivního typu jsou poměrně citlivé k účinkům monoacylglycerolu kyseliny laurové. Pro *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* a *Micrococcus luteus* byla stanovena minimální inhibiční koncentrace $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Monolaurin v koncentracích do $1500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ nepřekážel v růstu bakterií s gramnegativní buněčnou stěnou, s výjimkou rodu *Pseudomonas*.

Klíčová slova: monolaurin, minimální inhibiční koncentrace, bakterie

ABSTRACT

The objectives of this study were to determine the *in vitro* susceptibility of selected bacteria to monolaurin commonly present in bovine milk fat. Glycerin monolaurate is a naturally occurring surfactant that is used widely as an emulsifier in food and cosmetics industries. Antimicrobial activity was expressed as minimum inhibitory concentration. The results indicate that grampositive bacteria are quite sensitive to monoacylglyceride of lauric acid. Minimal inhibitory concentrations showed that monolaurin at concentration of $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ is able to stop completely the growth of *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Micrococcus luteus*. Monolaurate at concentrations up to $1500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ did not inhibit growth against gramnegative bacteria with except in genus *Pseudomonas*.

Keywords: monolaurate, minimum inhibitory concentration, bacteria

Poděkování

Za odbornou pomoc, cenné rady a připomínky bych chtěla poděkovat vedoucí své bakalářské práce RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. Dále děkuji doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. za odbornou pomoc při vyhodnocení a zpracování dat.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautor.

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD.....	8
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 ESTERY GLYCEROLU	10
1.1 MONOACYLGLYCEROLY	10
1.1.1 Charakteristika monoacylglycerolů.....	10
1.1.2 Příprava monoacylglycerolů.....	11
1.1.2.1 Glycerolýza	11
1.1.2.2 Esterifikační reakce karboxylových kyselin s alkoholy	12
1.1.2.3 Hydrolýza esterů	13
1.1.2.4 Adice MK na glycidol otevřením epoxidového kruhu.....	14
1.1.3 Význam monoacylglycerolů.....	14
1.1.4 Mechanismus účinku mastných kyselin a monoacylglycerolů.....	16
1.1.5 Antimikrobiální působení mastných kyselin a monoacylglycerolů.....	17
2 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH BAKTERIÍ.....	21
2.1 BAKTERIE S BUNĚČNOU STĚNOU GRAMNEGATIVNÍHO TYPU	21
2.1.1 Gramnegativní aerobní tyčinky a koky.....	21
2.1.2 Fakultativně anaerobní gramnegativní tyčinky	22
2.2 BAKTERIE S BUNĚČNOU STĚNOU GRAMPOZITIVNÍHO TYPU	26
2.2.1 Grampozitivní koky.....	26
2.2.2 Sporulující grampozitivní tyčinky a koky	28
II PRAKTICKÁ ČÁST	30
3 CÍL PRÁCE	31
4 METODIKA	32
4.1 POUŽITÉ ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY	32
4.2 MATERIÁL	32
4.2.1 Živná média.....	32
4.2.2 Chemikálie	33
4.2.3 Použité bakteriální kmeny.....	33
4.3 PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍHO ROZTOKU MAG C _{12:0}	34
4.4 RESUSCITACE MIKROORGANIZMŮ.....	34
4.5 PŘÍPRAVA SUSPENZE BAKTERIÍ	34
4.6 SLEDOVÁNÍ INHIBIČNÍHO VLIVU MONOLAURINU NA RŮST BAKTERIÍ	35
5 VÝSLEDKY	37
5.1 SLEDOVÁNÍ VLIVU MONOLAURINU NA RŮST BAKTERIÍ S GRAMNEGATIVNÍ BUNĚČNOU STĚNOU	38
5.2 SLEDOVÁNÍ VLIVU MONOLAURINU NA RŮST BAKTERIÍ S GRAMPOZITIVNÍ BUNĚČNOU STĚNOU	46
6 DISKUZE	54

ZÁVĚR	58
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	59
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	64
SEZNAM OBRÁZKŮ	65
SEZNAM TABULEK.....	66
SEZNAM PŘÍLOH.....	67

ÚVOD

Již odedávna jsou při přípravě potravin využívány metody, které slouží k uchování jejich čerstvosti a zdravotní nezávadnosti, a to z důvodu kompenzace sezónních výkyvů či neúrody. Metody mohou být fyzikální, chemické nebo biologické. Mezi základní fyzikální metody pro prodloužení udržitelnosti potravin patřilo sušení, chlazení a tepelné zpracování, z biologických metod fermentace. Podstatou chemických metod byl přídavek konzervačních látek, z nichž nejvíce byly používány sůl, dusitaný a siřičitany. Postupem času se přidávaly i jiné konzervační prostředky jako jsou kyseliny sorbová a benzoová a jejich soli. V poslední době je snahou výrobců minimalizovat použití syntetických látek a vyhovět tak spotřebitelům, kteří upřednostňují látky přírodní povahy. Právě monoacylglyceroly jsou látky přírodního charakteru, u kterých byla prokázána antimikrobiální aktivita proti široké škále mikroorganismů podílejících se na kažení potravin a vzniku alimentárního onemocnění. Monoacylglyceroly splňují i jiné požadavky na antimikrobiální látky. Pro udržení ve vodném prostředí, které je vhodné pro růst mikroorganismů, je nezbytná hydrofilita. Z důvodu interakce s cytoplazmatickou membránou je důležitý lipofilní charakter. Další výhodou oproti antibiotikům je několik nesespecifických mechanismů působení, což znesnadňuje vývoj rezistence.

Podle vyhlášky Ministerstva zdravotnictví č. 4/2008 sb. jsou monoacylglyceroly označovány jako přídatné látky, které se mohou používat při výrobě potravin v podobě emulgátorů [1], tj. látek se schopností snižovat mezipovrchové napětí na rozhraní dvou nemísitelných kapalin.

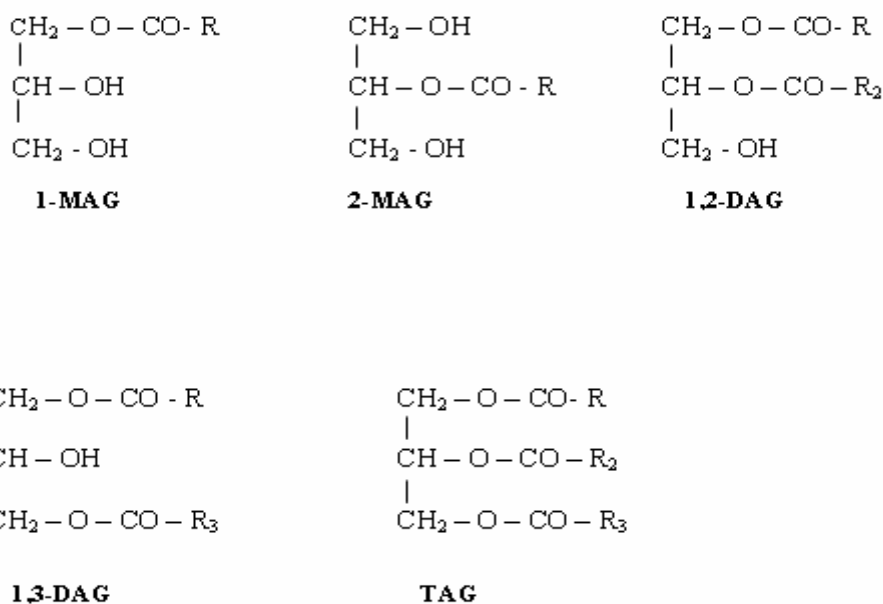
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ESTERY GLYCEROLU

Glycerol (1,2,3- propantriol) je trojsytný alkohol, viskózní hygroskopická kapalina sladké chuti, dobře rozpustná ve vodě [2].

Na glycerol může být estericky vázána jedna, dvě nebo tři mastné kyseliny (MK). Podle počtu vázaných zbytků rozlišujeme tři typy: (Obr. 1)

- monoacylglyceroly (MAG),
- diacylglyceroly (DAG),
- triacylglyceroly (TAG) [3].



Obr. 1. Estery glycerolů [3]

1.1 Monoacylglyceroly

1.1.1 Charakteristika monoacylglycerolů

U monoacylglycerolů je na glycerol esterově vázána jen jedna mastná kyselina. Substitucí jednoho vodíku hydroxylové skupiny acylem mohou vzniknout dva izomerní monoacylglyceroly, tj. 1-monoacylglycerol a 2-monoacylglycerol. V potravinách se však nejčastěji vyskytují 1-monoacylglyceroly [4,5].

Monoacylglyceroly jsou označovány jako parciální estery. Estery glycerolu s nasycenými mastnými kyselinami jsou většinou tuhé, polymorfní krystalické látky [4]. Body tání jsou blízké bodům tání jednotlivých mastných kyselin. Monoacylglyceroly se vyznačují svou rozpustností v alkoholu a organických rozpouštědlech (chloroform, dietyleter), v petroletheru jsou však nerozpustné [3].

MAG se přirozeně nacházejí v mléčném tuku, jehož součástí je i TAG, fosfoglyceridy a sfingolipidy. Dále obsahuje široké spektrum mastných kyselin. Mezi nasycené MK obsažené v mléčném tuku patří kyselina máselná ($C_{4:0}$), kapronová ($C_{6:0}$), kaprylová ($C_{8:0}$), kaprinová ($C_{10:0}$), laurová ($C_{12:0}$) a palmitová ($C_{16:0}$), z nenasycených MK kyselina olejová ($C_{18:1}$) a linolová ($C_{18:2}$). TAG, které představují významnou složku mléčného tuku, jsou žaludečními lipázami rozloženy na MK a MAG. Na rozdíl od TAG a DAG mají MAG a MK antimikrobiální vlastnosti [6].

1.1.2 Příprava monoacylglycerolů

První zmínka o synteticky vyrobeném monoacylglycerolu pochází z roku 1853, počátky průmyslové výroby byly zaznamenány v roce 1960, kdy byl MAG vyroben pomocí glycerolýzy z TAG. V dnešní době jsou MAG vyráběny chemickou syntézou z různorodých substrátů a jejich derivátů [7].

Monoacylglyceroly se mohou vyrábět následujícími způsoby:

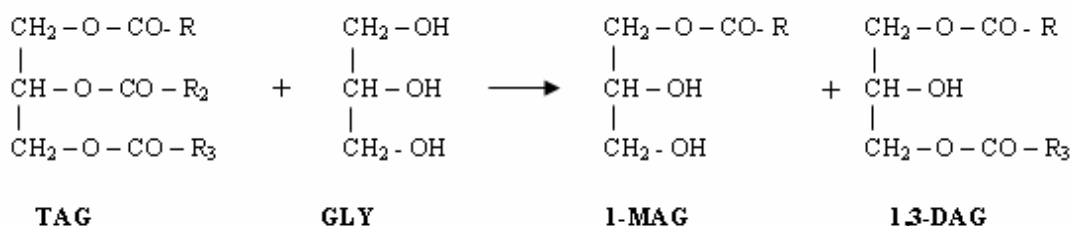
- glycerolýzou,
- esterifikací karboxylových kyselin s alkoholy,
- hydrolýzou esterů,
- adicí MK na glycidol otevřením epoxidového kruhu [5, 7].

1.1.2.1 Glycerolýza

Monoacylglyceroly se nejčastěji vyrábí reesterifikací tuků glycerolem nebo-li glycerolýzou. Jedná se o reakci triacylglycerolu s glycerolem (Obr. 2). Reakce se provádí při vysokých teplotách 200 – 240 °C. Důležitá je přítomnost alkalických katalyzátorů, kterými mohou

být oxid vápenatý nebo hydroxid draselný. Glycerolýza je ukončena při teplotě 203 °C za jednu hodinu. Reakční směs se ochladí a katalyzátor se rozloží kyselinou fosforečnou nebo citronovou. Nerozpuštěný glycerol se odstředí nebo se odstraní samovolnou sedimentací. Při tomto procesu vzniká směs monoacylglycerolů (50 – 55 %), diacylglycerolů (30 – 35 %), triacylglycerolů (5 %), volných mastných kyselin (1 %) a glycerolu (8 %) [5].

Produkty glycerolýzy se dále upravují molekulární destilací, kdy se zvýší obsah monoacylglycerolu až na 95 %. Molekulární destilace probíhá ve třech destilačních stupních. Nejprve se oddestiluje část volného glycerolu při teplotě 160 °C a tlaku 0,2 – 1 kPa. Poté se teplota zvýší na 180 °C a tlak 5 – 10 Pa a dochází k oddestilování zbytku glycerolu, volných mastných kyselin a malého množství monoacylglycerolů o nižší molekulární hmotnosti. Vlastní destilace monoacylglycerolů probíhá v poslední fázi při teplotě 200 – 210 °C a tlaku 0,8 – 4 Pa [5].



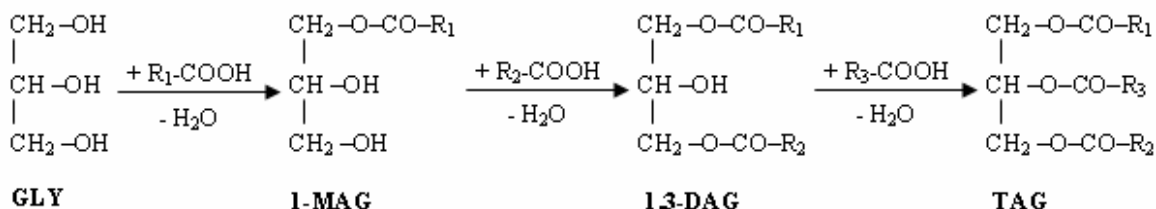
Obr. 2. Glycerolýza tuků [5]

1.1.2.2 Esterifikační reakce karboxylových kyselin s alkoholy

Esterifikace karboxylových kyselin s alkoholy je považována za iontovou reakci. Výsledkem reakce karboxylových kyselin s alkoholy jsou estery a voda. Při této reakci nejdříve vznikají monoacylglyceroly, z nichž další esterifikací vznikají diacylglyceroly a triacylglyceroly (Obr. 3). Reakce je ovlivněna přítomností katalyzátorů. Nejčastěji se používají katalyzátory alkalické, obzvláště hydroxylové ionty, také se mohou používat alkoholáty alkalických kovů. Méně časté je používání kyselých katalyzátorů jako je kyselina sírová, různé sulfonové kyseliny nebo fluorid boritý [5].

Mechanismus esterifikace zahrnuje několik kroků. V první fázi vytvoří kyselina s vodíkovým iontem vazbu s hydroxylovou skupinou, poté dochází k disociaci za odštěpení vody. Uvolněný uhlíkový atom se váže na hydroxylovou skupinu alkoholu. V poslední fázi

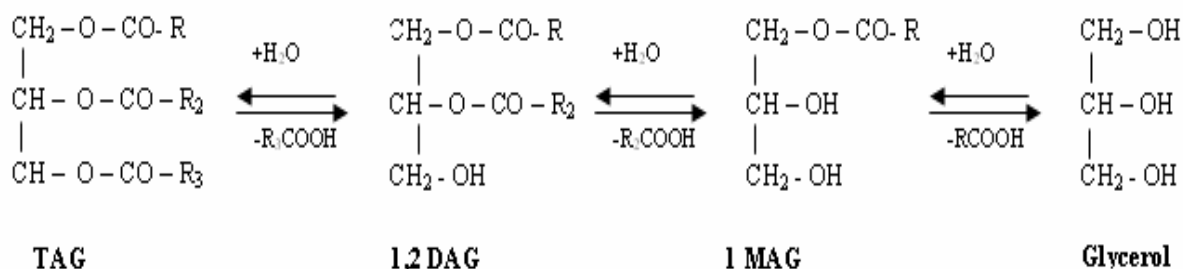
se od kladně nabitého kyslíkového atomu odštěpí proton, to má za následek obnovení kyselosti prostředí a vzniká ester [3].



Obr. 3. Schéma esterifikace [3]

1.1.2.3 Hydrolýza esterů

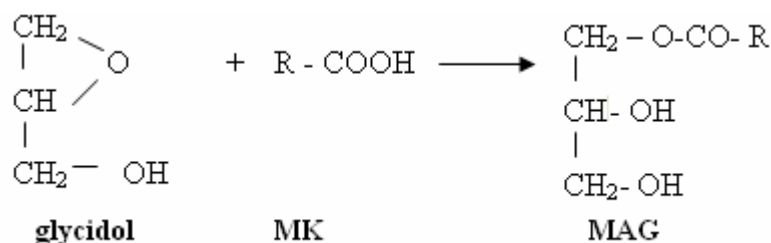
Hydrolýza je opakem esterifikace. Hydrolýzu esterů podporuje voda, které je v potravinách obvykle přebytek, a proto mají hydrolytické reakce v potravinách větší význam než esterifikační reakce. Na reakci má velký vliv pH prostředí, protože jde o iontovou reakci. Reakce je podporována přítomností katalyzátorů, kterými mohou být kyseliny nebo hydroxylové ionty [3]. Mechanismus reakce spočívá v tom, že molekula triacylglycerolu přijme molekulu vody, dojde k odštěpení mastné kyseliny a vzniku diacylglycerolu. Další hydrolýzou postupně vzniká monoacylglycerol až volný glycerol (Obr. 4). V současnosti tato reakce slouží k výrobě mastných kyselin, monoacylglyceroly jsou vedlejšími produkty a proto musí být ze směsi izolovány [5].



Obr. 4. Průběh hydrolýzy [3]

1.1.2.4 Adice MK na glycidol otevřením epoxidového kruhu

Mezi další způsoby syntézy monoacylglycerolů patří otevření epoxidového kruhu glycidolu (2,3-epoxy-1-propanolu) s následující nukleofilní adicí mastných kyselin (Obr. 5). Jako katalyzátory se používají terciální aminy, amoniové soli a komplexy tranzitních kovů jako je chrom, titan nebo kobalt. Reakce se vyznačuje vysokou regiospecifitou a univerzálností. Vysoká výtěžnost, snadná příprava, malé množství katalyzátoru a relativně nízká reakční teplota (90 °C) přinášejí velké výhody použitelnosti uvedené metody. Výsledný produkt obsahuje část příměsí (katalyzátor a glycidol), proto se provádí jeho přečištění [8].



Obr. 5. Schéma adice MK na glycidol [7]

1.1.3 Význam monoacylglycerolů

MAG jsou považovány za neionogenní surfaktanty se širokým uplatněním jako emulgátory v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém odvětví.

Jejich význam spočívá v amfifilní struktuře, zahrnující alifatický lipofilní řetězec a dvě hydroxylové skupiny tvořící hydrofilní část [7]. Vlastnosti emulgátorů jsou závislé na poměru velikosti hydrofilní a hydrofobní části molekuly, což udává hodnota HLB (hydrofobic-lipofilic balance). Monoacylglyceroly mají hodnotu HLB velmi nízkou [5]. Mají větší zastoupení ve své lipofilní části, proto se vyznačují tendencí tvořit emulze typu voda v oleji (V/O) [7]. Emulgátory umožňují vznik a stabilizaci emulzí. Jejich účinek spočívá ve snížení mezipovrchového napětí na rozhraní dvou nemísitelných kapalin [10].

Při zahřívání MAG ve vodě dochází k jejich roztavení za tvorby gelu. Struktura gelu je lamelární a podobá se lipidovým dvojvrstvám [9]. Ve vodném roztoku se seskupují tak, že

tvoří hydrofilní obal, uvnitř kterého jsou hydrofobní části. Povaha uhlíkového řetězce MAG má vliv na teplotu tání. Se zvyšujícím počtem uhlíků se teplota tání zvyšuje, se zvyšujícím počtem dvojných vazeb se naopak snižuje [7].

V potravinářském průmyslu, kde se destilovaný MAG využívá od roku 1969, zlepšují konzistenci, nutriční a organoleptické vlastnosti potravin. Uplatnění nachází hlavně při technologickém zpracování margarínů, mražených smetanových krémů a pekárenských výrobků [7].

V mlékárenském průmyslu se MAG používají při výrobě mražených smetanových krémů. Usnadňují zašlehávání vzduchu, výrobku dávají větší pevnost a zjemňují jeho strukturu. Kromě monoacylglycerových emulgátorů se mohou používat sorbitanové estery a jejich směsi s oxyetylovanými emulgátory [7, 11].

V cukrovinkářské technologii nahradily vaječný bílek při průmyslové výrobě šlehaných hmot [7].

Mezi důležité vlastnosti monoacylglycerolů patří schopnost interakce s bílkovinami mouky. Výsledkem interakce je zlepšení reologických vlastností kynutých těst. Podílí se na zvýšení pružnosti těsta, i pokud byla na přípravu těsta použita mouka s malým obsahem lepku. Zlepšená struktura těsta zadržuje CO₂ vznikající při kynutí, což má za následek rovnoměrnou pórovitost, křehkost a větší objem konečného produktu [7].

Pro zajištění jemné distribuce kapek vody v olejové fázi, stabilní krystalickou strukturu a roztíratelnost patří MAG mezi základní přísady při výrobě emulgovaných tuků. V tukovém průmyslu se mohou uplatnit destilované nasycené MAG v rozmezí 0,2 až 0,5 % nebo nedeštělovaná směs v rozmezí 0,3 až 0,6 % [9]. Nejčastěji se používají MAG kyseliny stearové, palmitové, olejové a linolové [7]. MAG jsou také součástí margarínů s nízkým obsahem tuku. V těchto výrobcích je obsah tuků menší než obsah vody, a proto jsou přidávány MAG obsahující ve své molekule nenasycenou MK [9].

V kosmetickém průmyslu se MAG využívají pro svou odolnost vůči oxidaci, chemickou netečnost, bezbarvost, snášenlivost pokožkou a sliznicí, emulgační vlastnosti a dále se uplatňují jako emolienty. Další vlastností MAG je výborná kompatibilita s kůží, snadný a rychlý průnik. Kůže je přirozeně chráněna MAG mající ve své molekule kyselinu laurovou, palmitovou a stearovou. Přídavkem monolaurinu do krémů se zajistí ochranný film vytvo-

řením emulze s vodou. Tímto způsobem je pokožka také zvláčňována. Vytvořený film s hydrofilním povrchem může absorbovat polární a dermatologicky aktivní látky [7].

Monolaurin v kombinaci s jeho mono- a diacetátem je součástí antiperspirantů. Zlepšují odolnost mýdel proti popraskání. Nejširší uplatnění obecně nachází v krémech a pleťových vodách z důvodu stabilizace emulze V/O/V [7].

MAG se rovněž uplatňují v textilním a plastikářském průmyslu. V plastikářském průmyslu se přidávají do výrobků z důvodu změkčujících, lubrikačních a antistatických vlastností. V textilním průmyslu se MAG používají při výrobě polyolefinových vláken. U textilií zvyšuje odolnost vůči vodě, barevnou stálost a kontrast [7].

1.1.4 Mechanismus účinku mastných kyselin a monoacylglycerolů

Na rozdíl od antibiotik, mastné kyseliny a jejich estery mohou působit několika nescifickými mechanismy. Inhibiční účinek spočívá především v negativním působení na cytoplazmatickou membránu, kde jsou přítomny enzymy spojené s kyslíkovou absorpcí [12]. Mechanismus není zcela definovaný, dochází k přerušení propustnosti cytoplazmatické membrány a inhibici absorpce aminokyselin [13]. Působení a inhibice MK a MAG závisí na použité koncentraci. Ve vysokých koncentracích jsou účinky ireverzibilní a baktericidní, kdy způsobují např. u *Enterococcus faecalis* přerušení oxidační fosforylace a následnou inhibici transportu látek závislých na energii. Některé MK brání regeneraci adenosintrifosfátu (ATP) a jeho účasti v biosyntetických reakcích buňky. Vlivem detergenčních účinků nastává porušení cytoplazmatické membrány a odpojení energetických systémů. Funkce membrány jsou přerušeny i v důsledku vytvoření vysoce uspořádané vrstvy na povrchu buňky. Růstová inhibice u grampozitivní bakterie (G^+) *Bacillus cereus* byla snížena glykolytickými sloučeninami, zvláště glukózou, fruktózou a jen mírně nebo vůbec sloučeninami, které se uplatňují v citrátovém cyklu. V lidských fibroplastech nebyl pozorován žádný účinek MK v koncentracích, které kompletně inhibují růst MO, nebyla potlačena syntéza ATP ani transport aminokyselin [12].

Monolaurin účinkuje synergicky s penicilinem G v koncentracích nižších než je jeho kritická micelární koncentrace [12]. Aktivita proti gramnegativním bakteriím (G^-) se zvyšuje v kombinaci s vysokými, nebo naopak s velmi nízkými teplotami, okyselovacími přípravky a v neposlední řadě v přítomnosti chelatačních činidel (EDTA). Uvedené faktory či látky zvyšují přístupnost cytoplazmatické membrány. Monolaurin zabraňuje produkci exoenzy-

mů a virulenci buněk *Staphylococcus aureus*, inhibuje biosyntézu lipidů a teichoové kyseliny u rodu *Streptococcus*. Blokuje rezistenci *Enterococcus faecalis* k vankomycinu, povzbuzuje proteolytické enzymy zodpovědný za aktivaci autolýzy buňky. Obecně je aktivita MAG závislá na přítomnosti sacharidů (škrob), proteinů (krevní albumin), lipidů (fosfolipidy) a povrchově aktivních látek (cholesterol). Předpokládá se, že rezistence bakterií vůči monolaurinu je zprostředkována změnami v jejich povrchové hydrofobičnosti omezující přístup k potenciálním cílům v cytoplazmatické membráně [13].

1.1.5 Antimikrobiální působení mastných kyselin a monoacylglycerolů

Antimikrobiální činnost mastných kyselin byla využívána téměř 4000 let ve formě mýdel. Výzkumy jejich antimikrobiálních vlastností začaly v 30. a 40. letech 20. století. V roce 1954 navrhnul Nieman ve své ranné práci spojení mezi přírodními tuky a rezistencí k bakteriím. Až v 70. letech výzkumy ukázaly, že efekt je závislý na přítomnosti lipázy, která uvolní mastné kyseliny a monoacylglyceroly [14].

Antimikrobiální účinek MAG je závislý na počtu uhlíků, poloze a zastoupení dvojných vazeb v řetězci mastných kyselin. Grampozitivní bakterie jsou velmi citlivé na mastné kyseliny s krátkým a středně dlouhým uhlíkovým řetězcem a jejich estery [15]. Ve své buněčné stěně postrádají lipopolysacharidy, proto jsou citlivější k účinkům lipidů [16]. Bakterie s buněčnou stěnou gramnegativního typu jsou poněkud odolnější k inhibičnímu účinku MAG [15]. Byly však popsány i výjimky, např. *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori* [16].

Antimikrobiální aktivita monolaurinu, monoacylglycerolu kyseliny laurové, byla zkoumána proti široké škále G^+ bakterií, v podmínkách *in vitro* a modelových potravinových systémech. Účinek monolaurinu se značně zvyšuje v přítomnosti dalších sloučenin např. EDTA [17] a organických kyselin, nejčastěji kyseliny mléčné [18]. Problémem při aplikaci monolaurinu do potravin může být jeho snížená rozpustnost ve vodných roztocích a snížená aktivita v přítomnosti určitých složek potravin [17]. Jeho aktivita je negativně ovlivňována v přítomnosti škrobu [18].

Laktoperoxidázový systém (LPS- obsahující laktoperoxidázu, thiokyanatan a peroxid vodíku) spolu s monolaurinem patří mezi potenciální přírodní antimikrobiální látky, které se mohou aplikovat do potravin. LPS je, na rozdíl od monolaurinu, považován za látku půso-

bící mikrobicidně na G⁻ bakterie. Jejich kombinace o koncentraci 5 – 200 mg.kg⁻¹ inhibuje růst *E. coli* O157:H7 a *Staphylococcus aureus*. Inhibiční účinek LPS v kombinaci s následujícími sloučeninami klesá v pořadí: kyselina palmitoolejová, monopalmitoolein, kyselina laurová, kaprylová, laurylsulfát sodný [19].

Další látkou zvyšující antimikrobiální aktivitu proti G⁻ bakteriím je etylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), která působí inhibičně v kombinaci s nizinem, lysozymem a monolaurinem. Nízké koncentrace EDTA působily synergicky s nizinem a lysozymem proti *Listeria monocytogenes*. Další synergický efekt nastává při kombinaci monolaurinu s laktoferinem, kdy dochází k inhibici růstu *E. coli* O157:H7, naopak růst *E. coli* O104:H21 nebyl nijak ovlivněn [20]. Účinek samotného nizinu se zvyšuje v prostředí s vysokým hydrostatickým tlakem, teplotou, dusitany a dalšími bakteriociny, organickými kyselinami, sacharózou, estery mastných kyselin, enzymatickým systémem jako je laktoperoxidáza, lysozym. Nizin spolu s monolaurinem působí synergicky při inhibici růstu *Bacillus licheniformis* [21].

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) monolaurinu se mění v závislosti na kultivační teplotě. MIC monolaurinu proti *Listeria monocytogenes* v teplotním rozmezí 25 – 35 °C byla 16 µg.ml⁻¹. Pokud bylo teplotní rozmezí sníženo na 15 °C hodnoty MIC byly o polovinu nižší, 8 µg.ml⁻¹ [17]. Monolaurin je proti *L. monocytogenes* více účinný v odstředěném mléce, než v plnotučném při teplotě 4°C [18]. Dále je minimální inhibiční koncentrace závislá na použitém živném médiu a velikost inokula [17]. Kombinovaný efekt MAG a teploty byl také použit na inaktivaci *Bacillus cereus*. Monoacylglycerol kyseliny laurové a linolenové snížily odolnost spor v závislosti na teplotě, kdežto monoacylglycerol kyseliny myristové a linolové odolnost spor naopak zvýšily. Při teplotě 91 °C a použité koncentraci 988 µg.ml⁻¹ byla odolnost spor nejvíce snížena účinkem monoacylglycerolu kyseliny laurové, dále pak linolenové, myristové a linolové. Účinek monolaurinu byl nejeftektivnější, možným důvodem je jeho přírodní povaha a výborné emulgující schopnosti [22]. Dále byl zkoumán účinek monolaurinu v přítomnosti etanolu na růst buněk *Listeria monocytogenes*. Etanol v množství do 1,25 % neinhiboval růst buněk, inhibice nastala po přidavku etanolu v množství 5 %. Monolaurin působil inhibičně již po přidavku 0,001 %. Při použití obou inhibičních látek, etanol významně nesnížil původní MIC monolaurinu [23].

Trotter a kolektiv [24] se ve své studii zabývali inhibičními účinky monolaurinu v různých hodnotách pH a koncentracích NaCl, vzhledem k růstu *Streptococcus iniae* (patogen kolo-

nizující povrch ryb). Studie určila minimální inhibiční účinek monolaurinu proti *Streptococcus iniae* na $12,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Dále byla sledována kombinace $6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ monolaurinu v přítomnosti 1,12 – 6,95 % NaCl při pH v rozmezí 4,26 – 8,88. Monolaurinu o koncentraci $6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ redukoval růst *S. iniae* při pH 6 bez ohledu na koncentraci soli.

Monolaurin se řadí mezi surfaktanty, které se používají k redukci bakteriálních toxinů. *In vitro* studie sledovala účinky monolaurinu na růst a produkci toxinů potenciálně patogenních bakterií. Schlievert a kolektiv [25] zjistili, že monolaurin inhiboval růst *Streptococcus* v koncentracích $10 - 20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, kdy se jeho účinkem snižovala produkce enterotoxinu a hemolyzinu. Také byla prokázána inhibice grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* v koncentracích $100 - 300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Růstová inhibice však může být potlačena produkcí lyzinu. Enterotoxin uvolňovaný do prostředí z buněk *Escherichia coli* nebyl inaktivován monolaurinem. Naopak koncentrace, které inaktivovaly růst *Staphylococcus aureus*, inaktivovaly i jeho hemolyzin a enterotoxin A. Studie dokazuje, že monolaurin je účinný v zabránění produkce exotoxinů patogenních grampozitivních bakterií.

Monoacylglycerol kyseliny laurové se používá jako látka, která slouží k inhibici v exponenciální fázi růstu *Staphylococcus aureus*. Monolaurin potlačuje růst *Enterococcus faecalis*, který se vyznačuje svou rezistencí k vankomycinu [26].

Lee a kolektiv [27] hledali látku, která by potlačila růst *S. aureus* a *B. cereus*. Antimikrobiální efekt kyseliny linolenové se zvýšil po přidavku monolaurinu. Minimální inhibiční koncentrace kyseliny linolenové na růst *B. cereus* byla $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a *S. aureus* $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. MIC monolaurinu proti *B. cereus* i *S. aureus* odpovídá hodnota $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Po přidavku $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ monolaurinu byl pozorován synergický účinek s podstatnou růstovou inhibicí. MIC na růst *B. cereus* byla stanovena v kombinaci kyseliny linolenové o koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a monolaurinu $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. *S. aureus* byl poněkud odolnější MIC odpovídala přidavku $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kyseliny linolenové, zatímco koncentrace monolaurinu zůstala stejná.

Citlivostí dvou kmenů *Clostridium perfringens* na mastné kyseliny se zabývala ve své studii Skřivanová a kolektiv [28]. Antimikrobiální aktivita mastných kyselin byla vyjádřena jako koncentrace, ve které bylo využito pouze 50 % glukózy. Kyselina laurová měla aktivitu nejvyšší. Účinek mastných kyselin klesal v pořadí: laurová, myristová, kaprinová, olejo-
vá, kaprylová, mastné kyseliny, které mají ve své molekule méně než šest uhlíků využití substrátu neovlivnily. Kyselina laurová a kaprinová v rozmezí pH 5,0 – 5,3 významně sní-

žily počet životaschopných buněk obou kmenů. Kyselina laurová redukovala počet vitálních buněk i při pH větším jak 6.

Inhibiční aktivita samotného monolaurinu proti G^- bakterií není již tak významná. Na růst G^- bakterií vykazují inhibiční účinky ty monoacylglyceroly, které mají ve své molekule navázanou jinou mastnou kyselinu. *Campylobacter jejuni*, který je nejběžnější příčinou infekce přenášené potravinami, je vysoce inhibován monokaprinem [29]. Růst *Helicobacter pylori* významně inhibuje kyselina linolová a arachidonová. Kyselina laurová, jako jediná nasycená MK se středně dlouhým řetězcem, částečně zpomaluje růst *Helicobacter pylori* [30]. MIC kyseliny laurové v prostředí o pH 7,4 je $274 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, monolaurinu $137 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Snížením hodnoty pH se zvyšuje účinek kyseliny laurové, kdežto účinek monolaurinu ovlivněn není [31].

Baktericidní aktivita MAG $C_{12:1}$ (monoacylglycerol kyseliny dodecenové) na růst vegetativních buněk *H. pylori* je několikanásobně nižší než aktivita monolaurinu. Stupeň nasycení je pro intenzitu účinku velmi důležitý [30].

Lipidy přidané ke kravskému mléku inaktivují řadu patogenů např. respirační syncytiální vir (RSV), herpes simplex vir typu 1, řadu streptokoků. U kyseliny laurové byla prokázána antivirová aktivita proti viru vezikulární stomatitidy (VSV) při koncentraci $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [32]. Účinná je také proti RSV, kdy koncentrací 10 mmol/l došlo ke snížení z 6 log na méně než 1,5 log [33].

Kontaminace potravin plísněmi je vážným problémem, především produkce mykotoxinů. Jako ochranné prostředky se používají kyselina sorbová, benzoová a jejich soli. Bylo zjištěno, že tvorbu plísňových spor inhibují také 1-laurylglycerol a 1-lauryldiglycerol. Ke studii byla směs acylglycerolů připravena z kokosového oleje, který obsahuje 45 – 48 % kyseliny laurové [34]. Kyselina laurová a monolaurin mají mikrobistatické účinky na růst *Aspergillus niger*. Kyselina laurová působila při vyšší MIC ($686 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) než monolaurin ($55 - 494 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) [35].

2 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH BAKTERIÍ

Bakterie se podle taxonomického hlediska řadí do domény *Bacteria*. Dle anatomické struktury, chemického složení buněčné stěny a cytoplazmatické membrány jsou bakterie členěny do tří fenotypových oddělení:

- bakterie s buněčnou stěnou gramnegativního typu,
- bakterie s buněčnou stěnou grampozitivního typu,
- bakterie bez buněčné stěny (mykoplazmata).

Každé oddělení obsahuje několik sekcí, do nichž jsou řazeny jednotlivé bakterie podle specifických vlastností (tvar buňky, vztah ke kyslíku, tvorba spor) [36].

2.1 Bakterie s buněčnou stěnou gramnegativního typu

2.1.1 Gramnegativní aerobní tyčinky a koky

- Rod *Pseudomonas*

Rod *Pseudomonas* patří do čeledi *Pseudomonadaceae*. Jsou to rovné, mírně zakřivené aerobní tyčinky rozměrů 0,5 – 1 x 1,5 – 5 μm [37]. Kolonie jsou větších rozměrů, často hladké a plazivé. Pohybují se pomocí polárních bičíků (monotricha nebo lofotricha). Vyznačují se produkcí ve vodě rozpustných fenazinových exopigmentů žluté, zelené, modré nebo červené barvy [38]. Patogenní a některé saprofytické druhy mají optimální teplotu růstu 37 °C, ostatní jsou mezofilní nebo psychrotrofní [39]. Jako zdroj energie a uhlíku využívá nejrůznější organické sloučeniny, nevyžaduje vysoké nároky na růstové látky [40].

Zástupci zmíněného rodu se vyskytují v půdě, povrchových vodách, na rostlinách, ovoci a zelenině. Představují převažující mikroflóru čerstvých potravin. Mezi kontaminované potraviny patří drůbeží maso a produkty mořských plodů [41], také kontaminují obilí [42]. Často způsobují mikrobiální kažení masa (převážně od povrchu dovnitř) při jeho skladování za chladírenských teplot. Tvoří dominantní druh na povrchu tvarohu a účastní se kažení vajec. Pseudomonády jsou velmi rezistentní k nepříznivým vlivům vnějšího prostředí [41]. Některé druhy se používají pro průmyslové oxidace různých organických sloučenin, při výrobě léků. Pseudomonády patří k mikrobům s vysokým stupněm rezistence k antibiotikům, proto je třeba léčbu infekcí provádět vždy podle stanovené citlivosti na antibiotika [43].

- *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa tvoří rovné tyčinky, na jednom pólu mají bičík. V mikroskopickém preparátu se vyskytují jednotlivě, zřídka ve dvojicích nebo v podobě kratších řetízků [37]. Vytváří žluto-zelený fluoreskující pigment (pyoverdin) nebo namodralé zbarvení (pyocyanin). Roste pouze za aerobních podmínek, při teplotách 5 – 43 °C s růstovým optimem 37 °C [38]. Jde o příležitostně patogenní druh, který se z půdy a vody dostává do krmiva a s prachem na lidskou pokožku. K infekci dochází po vniknutí do ran. Je příčinou hnisání ran, spálenin a zánětu močového měchýře [44]. *P. aeruginosa* může vyvolat akutní gastroenteritidu nebo enterokolitidu u osob s oslabenou imunitou. Způsobují kontaminaci potravin (zelenina, mléko, masné výrobky), vhodným prostředím jejich výskytu jsou rajská jablka. Intenzivně rozkládá bílkoviny, mléko alkalizuje, koaguluje a peptonizuje. Mimo živočišný organismus dlouhodobě přežívá ve vlhkém prostředí. V přírodě je značně rozšířený [41].

- *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas fluorescens tvoří rovné nebo nepatrně zakřivené tyčinky pohybující se pomocí několika bičíků. Optimální teplota růstu je 20 – 25 °C, roste dobře i při 5 °C. Kolonie mají nazelenalý odstín [38]. Vyskytuje se v půdě, vodě, chlazených potravinách, mase a mléčných výrobcích. Způsobuje rozklad bílkovin a tuků (žluknutí masa) při nízkých teplotách [44].

2.1.2 Fakultativně anaerobní gramnegativní tyčinky

- Rod *Escherichia*

Rod *Escherichia* patří spolu s rody *Citrobacter*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia* a dalšími do čeledi *Enterobacteriaceae* [40]. Z morfologického hlediska jsou to tyčinkovité bakterie o šířce 0,5 – 1 µm a délce 2 – 4 µm mající velký význam z hygienického hlediska [41]. Rod *Escherichia* zahrnuje čtyři druhy: *E. hermannii*, *E. fergusonii*, *E. vulneris* a *E. coli* [42]. Jednotlivé druhy kolonizují střevní trakt různých živočichů [40].

- *Escherichia coli*

Escherichia coli (dříve *Bacterium coli commune*) je považována za modelový mikroorganismus v genetice a mikrobiologii. V mikroskopickém preparátu tvoří jednotlivé tyčinky nebo dlouhé řetízky. Většina z nich má peritrichní bičíky, popřípadě fimbrie (pilusy). Optimální teplota růstu je 37 °C, ale může růst v širokém rozmezí 15 – 45 °C. Přežívá teplotu až 55 °C po dobu 60 minut, dokonce i 60 °C po dobu 15 minut. *E. coli* je vůči růstovým podmínkám nenáročná, snadno se přizpůsobí a roste v podobě hladkých, nízkých kolonií. Podílí se na udržení optimálního střevního mikrobiálního osídlení, produkuje vitaminy (B komplex, K). Některé druhy mohou být nebezpečným patogenem [42].

E. coli je rozdělena podle možného onemocnění do několika kategorií:

- enteropatogenní (EPEC),
- enterotoxigenní (ETEC),
- enteroinvazivní (EIEC),
- enterohemorragické (EHEC),
- enteroagregativní (EAggEC) [45].

EPEC způsobuje vodnatý průjem doprovázený zvracením a horečkou, převážně se vyskytuje u dětí mladších 3 let.

ETEC je charakteristická vodnatým průjmem s abnormálními křečemi, horečkou, malátností a zvracením. Je podobný průjmu způsobeným bakterií *Vibrio cholerae*. Je hlavní příčinou průjmu dětí v rozvojových zemích a cestovatelů.

EIEC způsobuje průjem, který má velmi podobné příznaky jako průjem způsobený bakterií *Shigella*.

EHEC způsobuje krvavý průjem, dochází k produkci nebezpečných vero-cytotoxinů

EAggEC charakteristickým rysem je stálý průjem, který často trvá více jak čtrnáct dnů, zvláště citlivé jsou děti [45].

- Rod *Salmonella*

Salmonella tvoří pohyblivé tyčinky poměrně odolné vůči vnějším vlivům. Jsou obligátně patogenní, některé pouze pro člověka, většina i pro zvířata [38]. Na rostlinách a potravinách přežívají několik měsíců, zachovávají si svou virulenci. Jsou velmi citlivé na chladírenské a mrazírenské teploty. K jejich devitalizaci dochází okamžitým zahřátím na 72 °C, při 57 °C za 10 minut. Při pasteraci mléka nebo vaječné směsi jsou usmrceny [41]. V současnosti rod *Salmonella* obsahuje pouze dva druhy *S. enterica* a *S. bongori*. *S. enterica* se člení do 6 poddruhů s více jak 2500 sérovary. Zástupci tohoto rodu se pohybují pomocí bičků kromě *S. Pullorum* a *S. Gallinarum*. Jejich optimální teplota růstu je 35 – 37 °C [45]. Vyskytují se v zažívacím traktu domácích zvířat a hlodavců, nemocných lidí a bacilonosičů, v drůbežích vejcích. Pro člověka jsou primárně patogenní, proniká do submukózy tenkého střeva, lymfatických cév a krevním řečištěm do jater a sleziny, kde dochází k aktivnímu množení [43].

- *Salmonella enterica*

Mezi potravinářsky významné sérovary patří *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis, *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium, *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Typhi, *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Choleraesuis. Většinou způsobují gastrointestinální nemoci [42].

- Rod *Proteus*

Buňky rodu *Proteus* jsou velmi pohyblivé, na agarových půdách jsou charakteristické plazivým růstem, vyznačují se silně se rozrůstajícími koloniemi s dlouhými výběžky [40]. Příčinou jejich pohybu je přítomnost peritrichálně umístěných bičků. Tvar buněk je velmi rozmanitý (kromě tyčinek nalezneme i kulovité a vláknité tvary) [37]. Patří mezi nejrozšířenější proteolytické bakterie. Jde o saprofyty střevního ústrojí zvířat a člověka, odkud se dostávají do půdy a odpadních vod [42]. Nejčastěji se nachází na potravinách bílkovinné povahy. Izolují se z masa, sekané a salátů různého složení, dále způsobují kažení vajec, rozkládají tuk, jsou součástí mikroflory syrového mléka [41]. K antibiotikům a dezinfekčním prostředkům jsou značně rezistentní [42]. Mohou být příčinou gastroenteritíd [38] a infekcí močových cest [43].

- *Proteus mirabilis*

Jednotlivé buňky *Proteus mirabilis* jsou 0,5 – 0,6 x 1 – 3 µm velké fakultativně anaerobní tyčinky. Většina kmenů je pohyblivá, velmi častá je přítomnost adhezivních fimbrií. Vyznačuje se plazivým růstem a hnilobným zápachem [37].

- Rod *Citrobacter*

Zástupci rodu *Citrobacter* jsou součástí běžné střevní mikroflory. Pokud se však vyskytují ve vyšších koncentracích mohou být příčinou střevních onemocnění oslabených jedinců. Jedná se o podmíněně patogenní druh. Jako jediný zdroj uhlíku využívají citrát [42]. Sekundárním stanovištěm těchto mikroobů je voda, půda a kal. Zástupci rodu *Citrobacter* byli nalezeni v široké škále potravin, včetně masa, sladkovodních ryb a koření [45].

- *Citrobacter freundii*

Citrobacter freundii se vyskytuje ve formě rovných tyčinek o velikosti 1 x 2 – 6 µm. V mikroskopickém preparátu se vyskytují samostatně nebo v kratších řetízích. Rostou na běžných půdách s optimální teplotou 37 °C, patří mezi koliformní bakterie [37].

Enterotoxigenní *Citrobacter freundii* může být příčinou průjemových onemocnění, na rozdíl od dalších dvou druhů *C. diversus* a *C. amalonaticus*. Ve většině zemí nejsou vzorky postižených pacientů vyšetřovány na přítomnost této bakterie [45].

- Rod *Serratia*

Rod *Serratia* tvoří drobné pohyblivé tyčinky produkující červený nebo oranžový pigment (prodigiosin). Vyznačují se svou proteolytickou a lipolytickou aktivitou [38]. Nejvyšší procento otrav z potravin způsobuje *S. liquefaciens* [42]. Nepigmentující kmeny způsobují zánětlivá onemocnění. Buňky rodu *Serratia* se podílejí na mikrobiálním kažení masa, *S. liquefaciens* způsobuje vady masa baleného. Mezi další vady patří červená hniloba vajec, která se projevuje méně výrazným zápachem [41].

- *Serratia marcescens*

Buňky *Serratia marcescens* měří 0,5 x 0,5 – 1 μm . Jedná se o podmíněně patogenní druh. Za přístupu vzduchu většina kmenů tvoří oranžově-červený pigment prodigiosin, který je rozpustný v alkoholu, éteru a chloroformu [37]. Velmi dobře roste na povrchu rajských jablek [41].

2.2 Bakterie s buněčnou stěnou grampozitivního typu

2.2.1 Grampozitivní koky

- Rod *Micrococcus*

Rod *Micrococcus* zahrnuje přísně aerobní druhy, které se shlukují do balíčků. Zástupci výše uvedeného rodu tvoří žluté, oranžové nebo růžové pigmenty. Barviva chrání buňku před letálním účinkem ultrafialové složky slunečního světla, a proto jsou považovány za vzdušnou kontaminaci [40]. Jejich velkou předností je růst v přítomnosti NaCl. Z technologického hlediska nachází uplatnění při výrobě sýrů jako součást mazové kultury (*Kocuria rosea*, starší název *Micrococcus roseus*) [36]. Při výrobě tepelně neopracovaných fermentovaných salámů se používají mírně okyselující startovací kultury, jejichž součástí jsou zástupci čeledi *Micrococcaceae*. Jako méně významná kontaminace se mohou vyskytovat v mléčných výrobcích, také mohou být součástí bohatého spektra mikroflóry tekutých složek majonéz. Dále se podílí na kažení výrobků z lasturovitých vodních živočichů [41].

- *Micrococcus luteus*

Micrococcus luteus tvoří menší nepohyblivé kokovité buňky uspořádané v tetrádách o velikosti 0,9 – 1,8 μm . Optimální kultivační teplota růstu je 25 – 37 °C. Tvoří žluté karotenoidní barvivo. Na krevním agaru nevyvolává hemolýzu [37].

- Rod *Enterococcus*

Rod *Enterococcus* vznikl společně s rodem *Lactococcus* vyčleněním z rodu *Streptococcus*. Patří mezi bakterie mléčného kvašení. Enterokoky, na rozdíl od streptokoků, osidlují střevní trakt člověka a jiných savců [40], další jejich odlišností je schopnost přežití v širokém teplotním rozmezí a hodnot pH [38]. Jsou považovány za indikátory fekálního znečištění.

Problémem je, že se vyskytují i na rostlinách, které nebyly znečištěny fekáliemi. Enterokoky ve srovnání s enterobakteriemi jsou odolnější vůči nepříznivým podmínkám, jsou považovány za termorezistentní mikroby (přežívají termizaci, některé druhy i šetrnou pasteraci). Při výrobě sušeného mléka je obsah enterokoků ostře sledován. V potravinářském průmyslu se některé druhy využívají jako součásti čistých mlékařských kultur. Pro urychlení proteolýzy při výrobě sýru Čedar se do mléka může přidávat *Enterococcus durans*. Jako součást probiotické kultury se využívá i *Enterococcus faecium* [41].

- *Enterococcus faecalis*

Původní název této bakterie byl *Streptococcus faecalis*. *Enterococcus faecalis* tvoří oválné buňky, jejichž rozměry jsou menší než 2 μm . Může způsobit těžkou infekci, zejména v nemocničním prostředí. Tato bakterie se vyznačuje vysokou odolností vůči běžným antibiotikům [37].

- Rod *Staphylococcus*

Bakterie rodu *Staphylococcus* tvoří nepravidelné hroznovité shluky [38]. Roste v přítomnosti 7 – 10 % NaCl, některé druhy se přizpůsobí i 20 % NaCl. Maximální koncentrace, která ještě umožňuje růst je závislá na teplotě, pH, a_w a oxidačně-redukčním potenciálu [42]. Nejčastěji se vyskytují na kůži a mukózních membránách zvířat a člověka, například v dutině nosní, podpaží. Ze zdravotního hlediska jsou některé druhy považovány za velmi nebezpečné mikrobiální patogeny.

- *Staphylococcus aureus*

Kolonie jsou žlutě zbarvené, na krevním agaru způsobuje úplnou hemolýzu. Některé kmeny jsou opouzdřené. Přestože se jedná o mezofilní druh, *S. aureus* je schopen růst ve velmi nízkých teplotách - růst byl zaznamenán i při 6,7 °C. Vyznačuje se velkou odolností k různým sloučeninám, kterými mohou být chlorid rtuťnatý, neomycin, polymyxin [42]. Roste v přítomnosti kyseliny mléčné, většinou nekontaminuje čerstvé a zmražené potraviny [45]. Stafylokoková otrava potravinami byla studována již v roce 1894, později v roce 1914. Schopnost *S. aureus* způsobovat otravu potravinami byla dokázána až v roce 1930. Stafylokoková gastroenteritida vzniká požitím potraviny, která je infikována enterotoxi-

nem. Produkce enterotoxinu nastává v teplotním rozmezí 10 – 46 °C, varem se inaktivuje. Nebezpečí otrav nastává pouze při konzumaci tepelně neošetřených výrobků [42]. Dále může způsobovat angínu, hnisavé onemocnění kůže a hnisání ran [38].

2.2.2 Sporulující grampozitivní tyčinky a koky

- Rod *Bacillus*

Rod *Bacillus* patří mezi mezofilní mikroorganismy s optimálními růstovými podmínkami 30 – 45 °C [45]. Hlavním morfologickým znakem bakterií rodu *Bacillus* je tvorba spor, které odolávají nepříznivým vnějším podmínkám. Negativní technologický význam je zesílen odolností spor vůči sanitačním a technologickým opatřením, jimiž je ostatní mikroflóra usmrcena. Přežívají základní ošetření při výrobě potravin (termizaci, pasteraci, sušení, mrazení, uzení) [38]. Řada druhů *Bacillus* se využívá k průmyslové tvorbě antibiotik polypeptidové povahy (bacitracin) [40].

- *Bacillus cereus*

Bacillus cereus je aerobní, sporulující tyčinka. Kolonie mají celistvý okraj. Minimální teplota růstu je 4 – 5 °C, maximální 48 – 50 °C. Roste v širokém rozmezí pH od 4,9 do 9,3 [42]. Běžně se vyskytuje ve vodě, půdě a prachu. Ve větším množství je nebezpečný v potravinách obsahujících lecitin, který enzymaticky mění na jedovatý lyzolecitin a fosfocholin. Byl izolovaný z široké škály potravin, zvláště rostlinného původu, ale také z masa, ryb a mléčných výrobků. Ve vysokém počtu se nachází na povrchu kravského vemene, způsobuje kažení pasterovaného mléka, majonéz, obilí a koření [41]. V roce 1949 se objevila první zmínka o tom, že *B. cereus* způsobuje otravu potravinami (dávivý a průjmový syndrom). Dávivý syndrom je způsobený produkcí cyklického polypeptidu. Příznaky nákazy jsou nadavování, zvracení a žaludeční křeče. Inkubační doba je velmi krátká 3 – 5 hodin. Druhou nákazou je průjmový syndrom. Inkubační doba je poněkud delší 8 – 16 hodin. Symptomy jsou silné bolesti břicha, křeče a vodnatý průjem, jsou způsobené produkcí enterotoxinu. Dávivý syndrom převažuje v zemích, jejich hlavní produkcí je rýže. V evropských státech se spíše setkáváme se syndromem průjmovým způsobeným kontaminovanými masnými výrobky nebo zeleninou [45].

- *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis tvoří větší tyčinky v nepravidelných shlucích. Spory jsou velmi odolné, přežívají až tříhodinový var, oválné a nezduřují buňku. Optimální teplota růstu je 30 °C. Nachází se v půdě a ve vzduchu. Často kontaminuje potraviny. Slizotvorné varianty *B. subtilis* mohou způsobit tuhost nebo-li nitkovitost chleba [41]. Jako v předchozím případě *B. subtilis* může způsobit otravy potravinami, které mají podobný charakter [45].

- *Bacillus sphaericus*

Bacillus sphaericus tvoří kulaté endospory, které zduřují buňku a jsou uloženy terminálně. Vyskytuje se v půdě, mořských sedimentech, potravinách a zvláště v mléce. Pro své insekticidní účinky se využívá k hubení hmyzu a komárů [46].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo zhodnotit inhibiční účinky 1-monoacylglycerolu kyseliny laurové na růst vybraných bakterií s buněčnou stěnou grampozitivního a gramnegativního typu.

- V teoretické části byla vypracována literární rešerše, která zahrnovala výrobu, vlastnosti a možnou aplikaci monoacylglycerolů, další část byla věnována antimikrobiální aktivitě monoacylglycerolů,
- v praktické části byla sledována inhibice růstu bakterií vlivem monoacylglycerolu kyseliny laurové o koncentraci 25 – 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$,
- k otestování účinku monolaurinu byly vybrány bakterie rodů: *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia* a *Staphylococcus*,
- na základě teoretické a praktické části byly zhodnoceny a formulovány návrhy a doporučení využití monolaurinu.

4 METODIKA

4.1 Použité zařízení a pomůcky

- Autokláv Systec 2540 EL
- Automatické mikropipety Biohit
- Bakteriologické kličky
- Biologický termostat Membert INE 600
- Flow Box Clean Air
- Chladnička Elektrolux
- Laboratorní předvážky KERN
- Laboratorní sklo
 - Kádinky
 - Petriho misky
 - Zkumavky
- Mikrotitrační destička
- Mikrovlná trouba Elektrolux

4.2 Materiál

4.2.1 Živná média

Masopeptonový bujon (MPB)

Kultivační médium bylo použito na pomnožení buněk MO

Složení:

Masový výtazek	3,0 g
Pepton	5,0 g
Chlorid sodný.....	3,0 g
Destilovaná voda.....	1000,0 ml

Masopeptonový agar (MPA)

Živné médium sloužilo k uchování bakteriálních kultur.

Složení:

Masový výtažek	3,0 g
Pepton	5,0 g
Chlorid sodný.....	3,0 g
Destilovaná voda.....	1000,0 ml
Agar.....	15 g/l

Po navážení a dokonalém smíchání všech uvedených komponent bylo upraveno pH na hodnotu 7,2. Pro zajištění sterility byly kultivační půdy sterilovány v autoklávu při 132 °C po dobu 20 minut.

4.2.2 Chemikálie

- Monoacylglycerol kyseliny laurové
- Etanol

4.2.3 Použité bakteriální kmeny

<i>Bacillus cereus</i>	CCM 2010
<i>Bacillus sphaericus</i>	CCM 1615
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	CCM 4062
<i>Citrobacter freundii</i>	CCM 7187
<i>Enterococcus faecalis</i>	CCM 2665
<i>Enterococcus faecalis</i>	CCM 4224
<i>Enterococcus faecalis</i>	CCM 7247
<i>Escherichia coli</i>	CCM 3954
<i>Micrococcus luteus</i>	CCM 732
<i>Proteus mirabilis</i>	CCM 7188

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 3955
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CCM 2798
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis	CCM 4420
<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	CCM 303
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	CCM 3653

4.3 Příprava zásobního roztoku MAG C_{12:0}

Zásobní roztok monoacylglycerolu kyseliny laurové (MAG C_{12:0}) byl připraven následujícím způsobem. V 10 ml absolutního etanolu byla rozpuštěna navážka 5 g MAG C_{12:0}. Tímto postupem byl zásobní roztok připraven v koncentraci 5 % (w/v). Zásobní roztok byl uchován při laboratorní teplotě.

4.4 Resuscitace mikroorganismů

Mikroorganismy byly poskytnuty z České sbírky mikroorganismů (CCM). Nejprve byla provedena resuscitace jednotlivých bakteriálních kmenů, které byly uchovány v želatino- vých discích. Příslušný MO byl sterilní pinzetou přenesen do zkondenzované vody šikmého MPA, kde se částečně rozpustil a poté byl očkovan roztěrem pomocí očkovací klíčky po povrchu půdy. Šikmý MPA byl kultivován při 30 °C po dobu 24 hodin. Po izolaci jednotlivých bakteriálních kolonií byl z nárůstu na šikmém MPA proveden frakcionovaný (křížový) roztěr na Petriho misky s MPA. Po celou dobu byly vyizolované bakterie uchovávány na Petriho miskách s MPA. Po 3 – 4 týdnech byly jednotlivé bakteriální kmeny přeočkovány a dále uchovávány při teplotě 4 ± 2 °C.

4.5 Příprava suspenze bakterií

K vlastnímu experimentu byla použita suspenze bakterií. Z vyizolovaných bakteriálních kmenů pomocí frakcionovaného roztěru byla sterilně očkovací klíčkou odebrána vyizolovaná kolonie příslušné bakterie. Bakteriální kolonie byla naočkována do zkumavky se 4 ml tekutého masopeptonového bujonu. Tekuté živné médium MPB slouží k pomnožení bakterií. Připravená bakteriální suspenze byla kultivována při 30 °C do druhého dne.

4.6 Sledování inhibičního vlivu monolaurinu na růst bakterií

Účinek monoacylglycerolu kyseliny laurové na růst bakterií byl sledován pomocí optické hustoty (O.D.) suspenze buněk, která byla měřena přístrojem TECAN Sunrice TW/TC (TECAN, Rakousko). Intenzita nárůstu vegetativních buněk bakterií byla měřena při vlnové délce 600 nm, každých 30 minut po dobu 24 hodin při 25 ± 2 °C.

Vlastní stanovení bylo provedeno pomocí mikrotitrační destičky (Obr. 6). Mikrotitrační destička se skládá z 8 řad, přičemž každá řada obsahuje 12 jamek. Růst mikroorganismů byl sledován v několika koncentracích monoacylglycerolu kyseliny laurové: 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Použité koncentrace monolaurinu byly připraveny následujícím způsobem. Do zkumavky se 4 ml tekutého bujónu bylo sterilní cestou zaočkováno spočtené množství zásobního roztoku MAG C_{12:0}. Konkrétní množství zásobního roztoku monolaurinu na přípravu použitých koncentrací je znázorněno v tabulce 1.

Tab. 1. Množství přídatku MAG C_{12:0} pro získání dané koncentrace

%	Koncentrace MAG [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Množství MAG [μl]	Výsledné množství bujónu [ml]
0,15	1500	120	4
0,1	1000	80	4
0,005	500	40	4
0,025	250	20	4
0,01	100	8	4
0,005	50	4	4
0,0025	25	2	4

Na jedné mikrotitrační destičce byl sledován růst pěti bakteriálních kmenů v sedmi různých koncentracích MAG C_{12:0}. Nárůst buněk s monolaurinem o příslušné koncentraci se zaočkováním mikroorganizmem byl sledován dvakrát. Do každé jamky bylo napipetováno 200 μl tekutého bujónu s příslušnou koncentrací monolaurinu. Do připraveného živného média byla zaočkována příslušná suspenze bakteriálních kultur v množství 5 μl . Jako pozi-

tivní kontrola byly použity jamky, do kterých bylo napipetováno 200 μl tekutého bujonu bez MAG C_{12:0} se zaočkovanou suspenzí bakterií.

	Bez MO		M1		M2		M3		M4		M5	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
B												25
C												50
D												100
E												250
F												500
G												1000
H												1500

Obr. 6. Schéma mikrotitrační destičky

M1-M5- znázorňuje použité bakteriální kmeny

K vyhodnocení vlivu monolaurinu na růst vybraných bakterií byly použity dva způsoby. Po 24 hodinové kultivaci byly z naměřených hodnot sestaveny růstové křivky. Pomocí závislosti optické denzidy na čase (t).

Principem druhého způsobu vyhodnocení bylo spočítání relativní hodnoty optické denzidy v čase z naměřených hodnot [$y=\ln(\text{O.D.}_t/\text{O.D.}_0)$]. Závislost logaritmu relativní hodnoty O.D. (y) na čase (t) byla popsána pomocí Gompertzova modelu [47]:

$$y = A \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_m \cdot e}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right\}$$

Kde: μ_m vyjadřuje specifickou růstovou rychlost [h^{-1}]

λ vyjadřuje dobu fáze lagu [h]

A vyjadřuje asymptotu, která je definovaná jako maximální dosažená hodnota

$$[A=\ln(\text{O.D.}_\infty/\text{O.D.}_0)]$$

Pro výpočet parametru μ_m , λ , A byla použita nelineární regresivní analýza pro následující podmínky $\mu_m > 0$, $\lambda > 0$ a $A > 0$. K výpočtu byl použit statistický software Unistat[®] 5.5. Kvalita navržených modelů byla posouzena pomocí korelačního koeficientu (r).

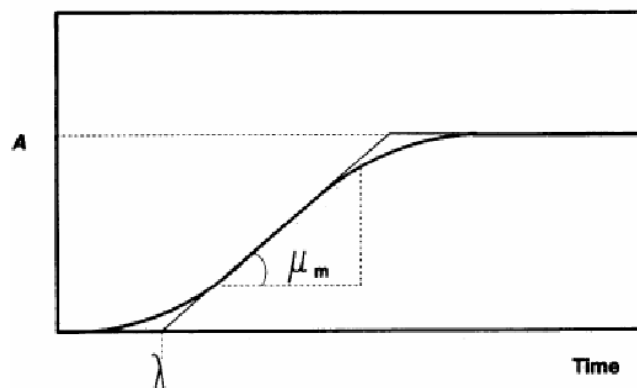
5 VÝSLEDKY

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) je považována za koncentraci, která neumožní další růst vegetativních buněk. Koncentrace, která způsobí odumření přítomných bakteriálních buněk se nazývá minimální baktericidní koncentrace (MBC) [48].

Pro vyhodnocení inhibičního účinku byly u bakterií sledovány tři růstové parametry:

- Délka lag fáze (λ),
- Maximální hodnota růstu (A),
- Specifická růstová rychlost (μ).

Přičemž doba fáze lagu je označována jako přípravná fáze, během níž nedochází k rozmnožování, zvětšuje se enzymatický systém, buňky mohou i odumírat. Maximální hodnota růstu vyjadřuje nejvyšší dosaženou hodnotu hustoty bakteriální suspenze. Růstová rychlost se stanoví na základě hodnot získaných v exponenciální fázi křivky (log fáze). Exponenciální fáze je charakteristická nejkratší generační dobou, která je po celé období konstantní.



Obr. 7. Růstová křivka

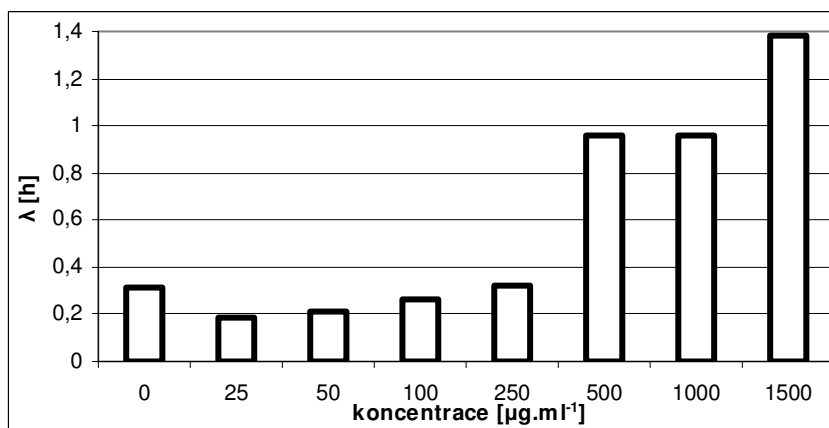
Růstové křivky mikroorganismů na působení inhibiční látky jsou součástí příloh.

5.1 Sledování vlivu monolaurinu na růst bakterií s gramnegativní buňčnou stěnou

Inhibiční vliv monolaurinu byl pozorován u různých druhů gramnegativních bakterií. Převážná většina gramnegativních bakterií je považována ze technologicky škodlivé, často se vyskytují patogenní nebo podmíněně patogenní kmeny.

Citrobacter freundii CCM 7187

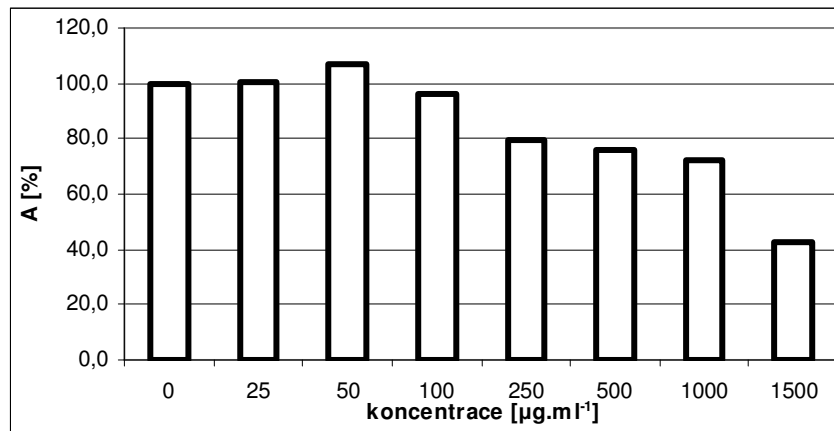
Vliv monoacylglycerolu kyseliny laurové na růst vegetativních buněk *Citrobacter freundii* CCM 7187 byl pozorován v intervalu koncentrací $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ – $1500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Přítomnost inhibiční látky negativně neovlivnila růst buněk. Růstová křivka MO v přítomnosti monolaurinu o koncentraci $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ má téměř shodný průběh jako růst samotného MO bez inhibiční látky (Příloha P.I.A). Liší se pouze v době lagu (Obr. 8), kdy doba lagu *Citrobacter freundii* CCM 7187 byla 0,3 h, po přidavku $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se zkrátila na 0,2 h. V obou případech se jedná o velmi krátkou dobu přizpůsobení růstu.



Obr. 8. Vliv monolaurinu na dobu lagu *C. freundii* CCM 7187

Koncentrace monolaurinu vyšší jak $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dokonce vykazovaly na dobu lagu mírné stimulační účinky na růst *Citrobacter freundii* CCM 7187. Maximální hodnoty nárůstu bakteriální suspenze bylo dosaženo v koncentraci $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Nejvyšší sledovaná koncentrace monolaurinu způsobila prodloužení fáze lagu na 1,39 h a maximální hodnota nárůstu bakteriální suspenze byla pouze 42 % (Obr. 9). Z růstových křivek je patrné, že v koncentracích 500 a $1500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ nastala fáze odumírání po 9 hodinové kultivaci, narozdíl od koncentrací 0 , 25 , $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kdy po 24 hodinové kultivaci fáze odumírání nezapoča-

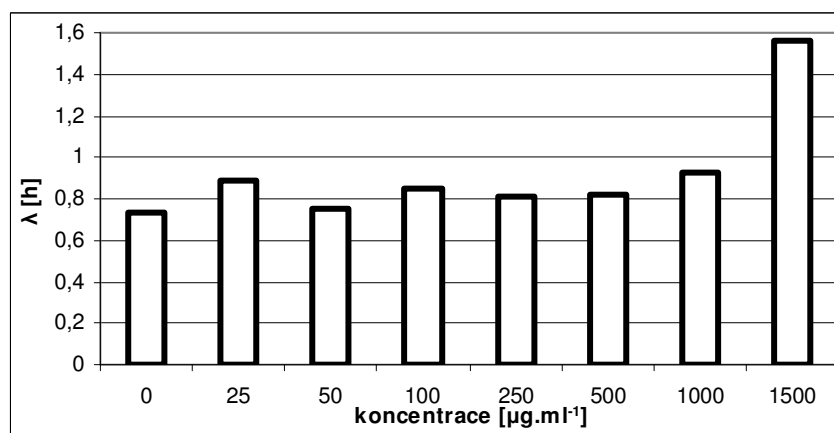
la. Vyšší koncentrace monolaurinu specifickou růstovou rychlost úměrně snižovaly z 1,05 na 0,31 h⁻¹ (P.I.B).



Obr. 9. Vliv monolaurinu na růst *C. freundii* CCM 7187

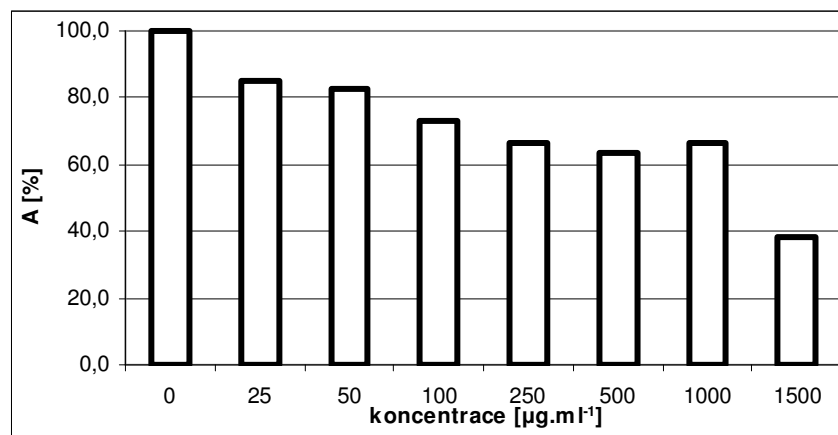
***Escherichia coli* CCM 3954**

Z průběhu růstových křivek (P.II.A) lze vyhodnotit, že zvyšující se koncentrací se zvyšuje inhibiční efekt monoacylglycerolu kyseliny laurové na růst buněk *Escherichia coli* CCM 3954. Fáze lagu při sledování růstu *Escherichia coli* CCM 3954 bez inhibiční látky trvala 0,75 h. V přítomnosti monolaurinu o koncentraci 1500 µg.ml⁻¹ byla lag fáze prodloužena na 1,56 h, což je o 0,63 h déle než v přítomnosti druhé nejvyšší sledované koncentraci 1000 µg.ml⁻¹ (Obr. 10).



Obr. 10. Vliv monolaurinu na dobu lagu *E. coli* CCM 3954

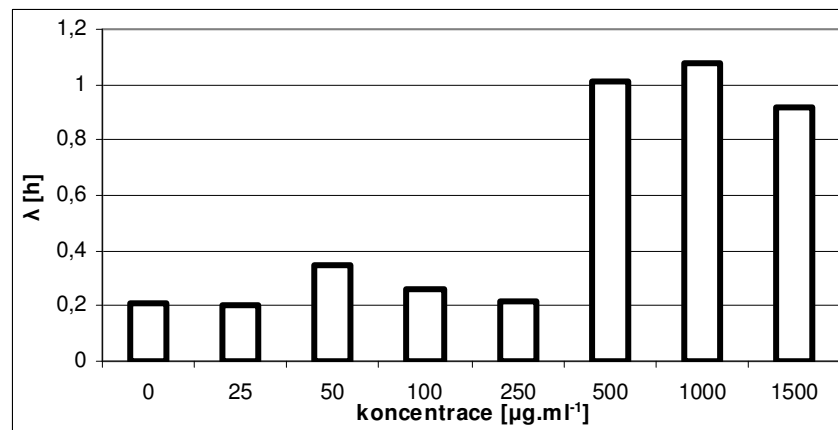
Růstová křivka bakterie *Escherichia coli* má prodlouženou exponenciální fázi. Hustota bakteriální suspenze v koncentraci 25 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ má podobný charakter růstu jako růstová křivka kontroly, za kterou je považován růst bakterií bez přítomnosti monolaurinu. Koncentrace monolaurinu 25 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ nevykazují inhibiční účinek. Koncentrace 1500 a 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ má kratší fázi exponenciálního růstu, přičemž maximální hodnota v koncentraci 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dosáhla pouze 38 % (Obr. 11) a poté nastala fáze odumírání. V koncentraci 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dosahovala hustota bakteriální suspenze 64 %, poté nastala velmi rychlá fáze odumírání.



Obr. 11. Vliv monolaurinu na růst *E. coli* CCM 3954

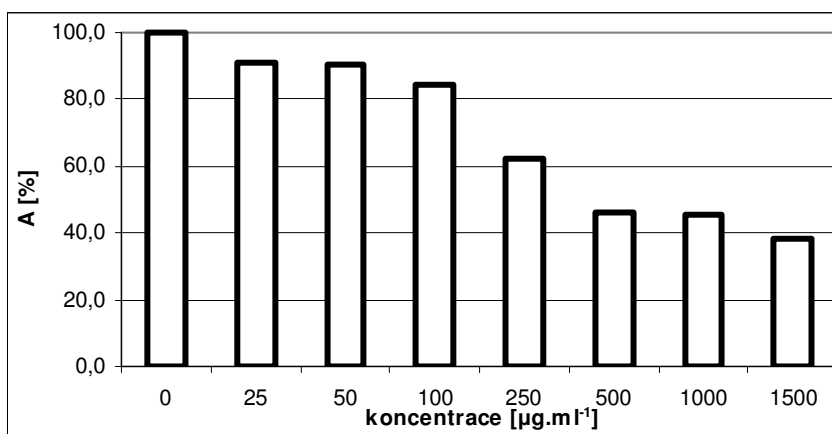
Proteus mirabilis CCM 7188

Pro stanovení účinku monolaurinu na růst gramnegativní bakterie *Proteus mirabilis* CCM 7188 byla zvolena stejná škála koncentrací jako u předchozích měření.



Obr.12. Vliv monolaurinu na dobu lagu *P. mirabilis* CCM 7188

Růstové křivky v přítomnosti monolaurinu o dvou nejnižších koncentracích (25 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) měly téměř shodný průběh jako růstová křivka samotné bakterie kultivované bez přítomnosti monolaurinu (P.III.A). Maximální růstové hodnoty dosahovaly až 91 % původního nárůstu. Ze sloupcového grafu znázorňující maximální dosažené hodnoty růstu bakteriální suspenze (Obr. 13) je patrné, že v přítomnosti monolaurinu o koncentraci 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bylo dosaženo pouze 38 % nárůstu. V přítomnosti monoacylglycerolu kyseliny laurové o koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bylo dosaženo 85 % nárůstu a po 24 hodinové kultivaci, stejně jako i v koncentraci 25 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, nenastala fáze odumírání. V přítomnosti vyšších sledovaných koncentracích nastala fáze odumírání již po 9 hodině kultivaci. Použité koncentrace nezpůsobovaly úplný inhibiční efekt. Ovlivnění fáze lagu je prezentováno na Obr. 12. Koncentrace 500, 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ způsobily prodloužení fáze lagu na 1 a 1,1 h, v přítomnosti monolaurinu o nejvyšší koncentraci doba lagu mírně poklesla na 0,9 h.

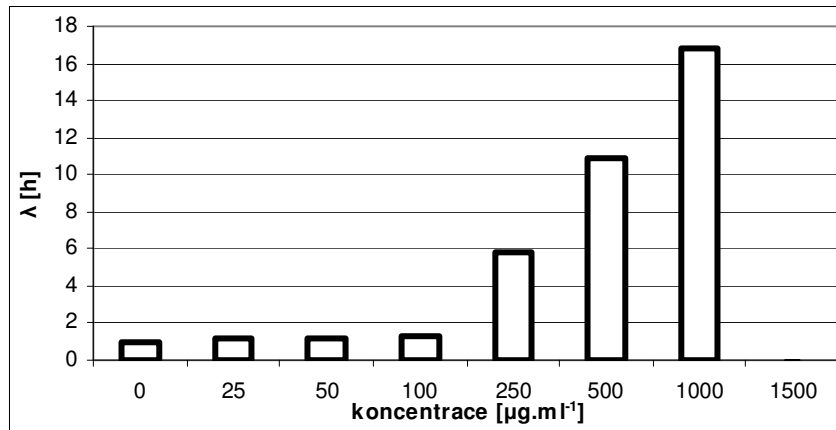


Obr. 13. Vliv monolaurinu na růst *P. mirabilis* CCM 7188

Pseudomonas aeruginosa CCM 3955

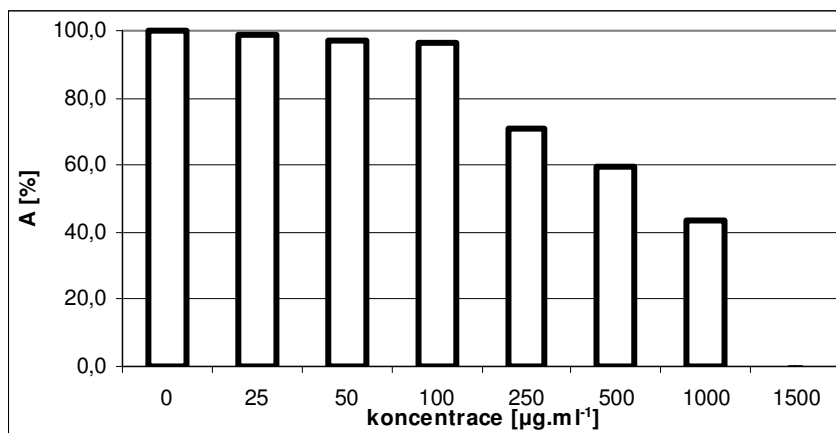
Další testovanou bakterií, u které byl sledován vliv inhibičního účinku monoacylglycerolu kyseliny laurové v koncentracích 25 – 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955. Růstová křivka gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 se vyznačuje delší dobou lagu 0,9 h (Obr. 14). Po 7,5 hodinové kultivaci nastává fáze zpomaleného růstu po předchozí velmi krátké exponenciální fázi (P.IV.A). Jako u předchozích mikroorganismů 25, 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ koncentrace inhibiční látky neovlivnila růst vegetativních buněk *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955. Dokazuje to i hodnota maximálního nárůstu, která je nad 96 % (Obr. 15). Hustota bakteriální suspenze kultivované v prostředí s

$250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ má poněkud odlišný charakter od průběhu růstové křivky znázorňující kontrolu. Počáteční fáze lagu stoupá na 6 hodin, prostředí s $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ způsobilo prodloužení lag fáze na 11 hodin. Přípravná fáze v přítomnosti monolaurinu o koncentraci $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla prodloužena na 17 h, maximální hodnota nárůstu byla pouze 43 %.



Obr. 14. Vliv monolaurinu na dobu lagu *P. aeruginosa* CCM 3955

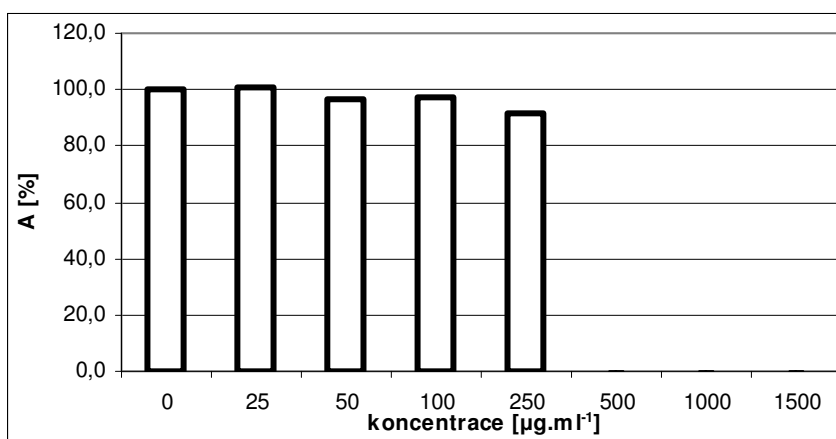
Monoacylglycerol kyseliny laurové v koncentraci $1500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ měl inhibiční účinek na růst *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955.



Obr. 15. Vliv monolaurinu na růst *P. aeruginosa* CCM 3955

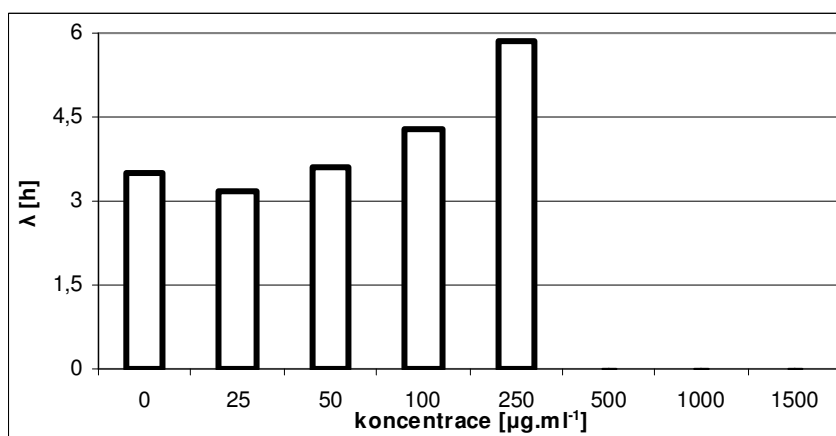
Pseudomonas fluorescens CCM 2798

Buňky *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798 jsou k působení monolaurinu poměrně citlivé. Kultivační prostředí s přidavkem monolaurinu ve vyšších koncentracích působilo inhibičně. Inhibice růstu monolaurinem byla pozorována od koncentrace 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Při koncentraci 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bylo dosaženo o 6 % většího nárůstu hustoty bakteriální suspenze než růst mikroorganismu v prostředí bez inhibiční látky. Maximální hodnoty nárůstu bakteriálních buněk se snižovaly až do koncentrace 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, poté růst ustal (Obr. 17).



Obr. 16. Vliv monolaurinu na růst *P. fluorescens* CCM 2798

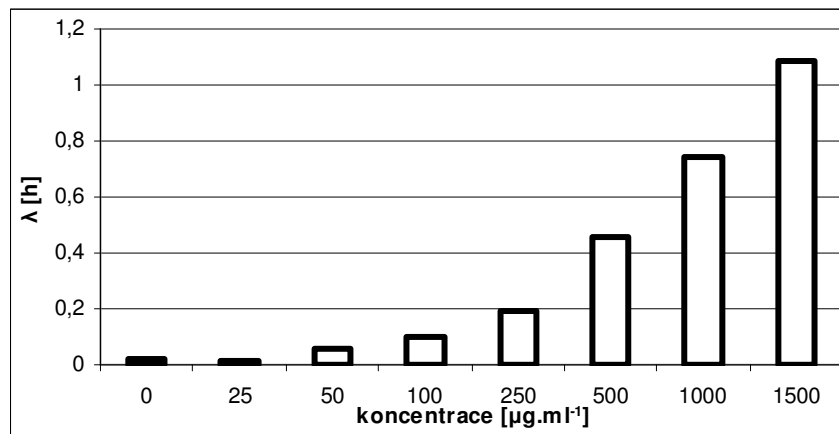
Doba lag fáze v přítomnosti inhibiční látky o nejnižší koncentraci byla 3 hod. Koncentrace 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ způsobila prodloužení fáze lagu na 6 hod (Obr. 17).



Obr. 17. Vliv monolaurinu na dobu lagu *P. fluorescens* CCM 2798

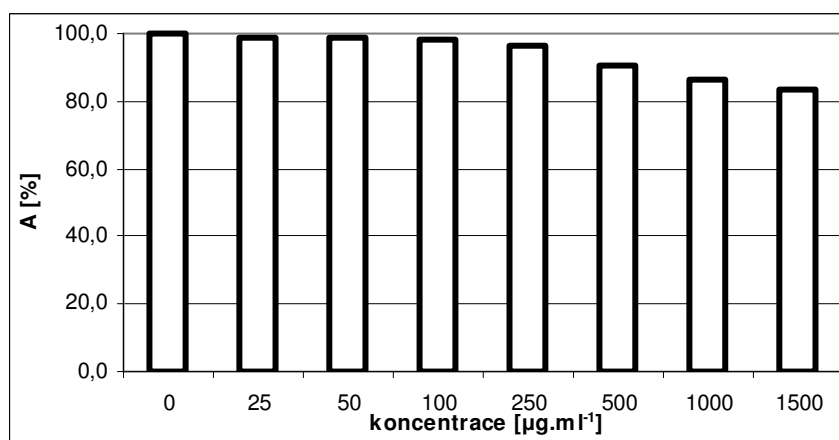
***Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303**

Vůči růstu buněk *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303 nebyly prokázány inhibiční účinky monolaurinu. Z růstové křivky (P.V.A) zástupce rodu *Serratia* je patrné, že fáze lagu trvala 0,023 h (Obr. 18) naopak logaritmická fáze byla značně prodloužena, fáze odumírání v průběhu 24 h kultivace nenastala.



Obr. 18. Vliv monolaurinu na dobu lagu *S. marcescens* CCM 303

Nízké testované koncentrace monoacylglycerolu kyseliny laurové neovlivnily růst vegetativních buněk. Hustota bakteriální suspenze při koncentraci 25, 50 a 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dosahovala maximální hodnoty 99%, což poukazuje na velkou odolnost sledované bakterie (Obr. 19). Charakter růstových křivek byl se zvyšující koncentrací přítomné inhibiční látky odlišný. V přítomnosti monolaurinu o koncentraci 500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ byly vegetativní buňky schopné 90 % nárůstu, lag fáze byla prodloužena na 0,5 h.

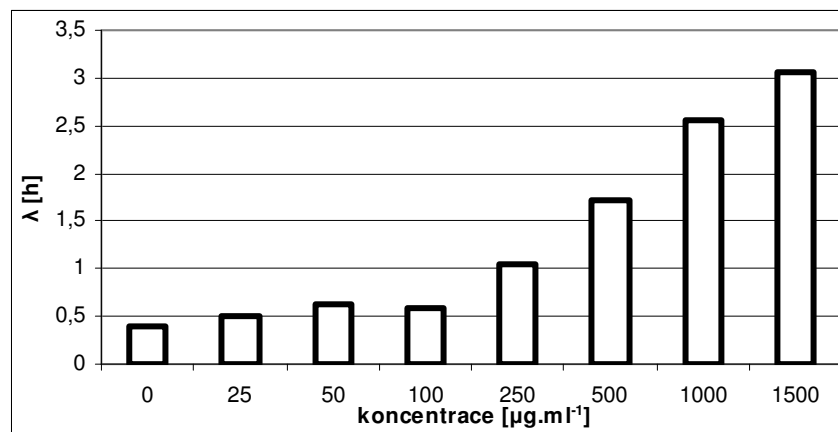


Obr.19. Vliv monolaurinu na růst *S. marcescens* CCM 303

Další dvě použité koncentrace (1000 a 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) měly obdobný účinek na růst buněk. V prostředí s inhibiční látkou o koncentraci 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dosahovala suspenze bakterií 84 % nárůstu, doba lagu byla 1,1 h. Ani v této koncentraci však nebyla započata fáze odumírání. Průměrná rychlost růstu jednotlivých buněk se snižovala s rostoucí koncentrací testované látky.

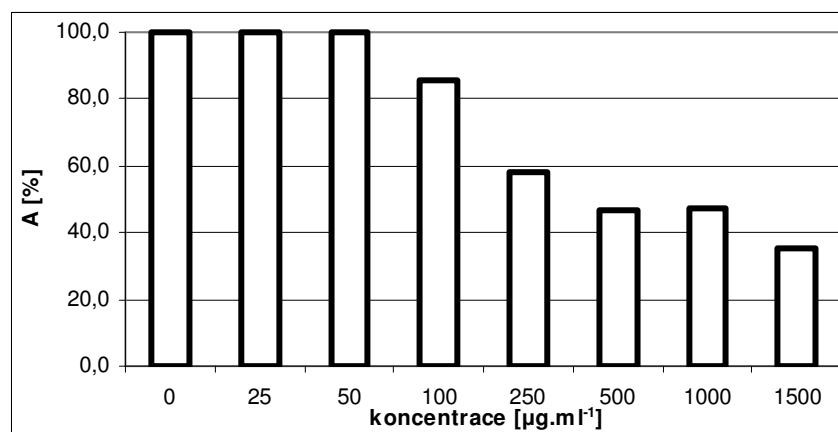
Salmonella enterica subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

Účinky monolaurinu na růst buněk zástupce rodu *Salmonella* popisují Obr. 20 a 21. Se zvyšující se koncentrací monolaurinu se zvyšovala délka lag fáze. Koncentrace 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ způsobila prodloužení doby lagu na 0,51 h, 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ na 1,05 h a 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ na 3,06 h.



Obr. 20. Vliv monolaurinu na dobu lagu *S. enterica* CCM 4420

Přítomnost inhibiční látky v koncentracích 25, 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ neovlivnila výrazným způsobem nárůst bakteriální suspenze, která dosahovala hodnot 99, 98 a 86 %.



Obr. 21. Vliv monolaurinu na růst *S. enterica* CCM 4420

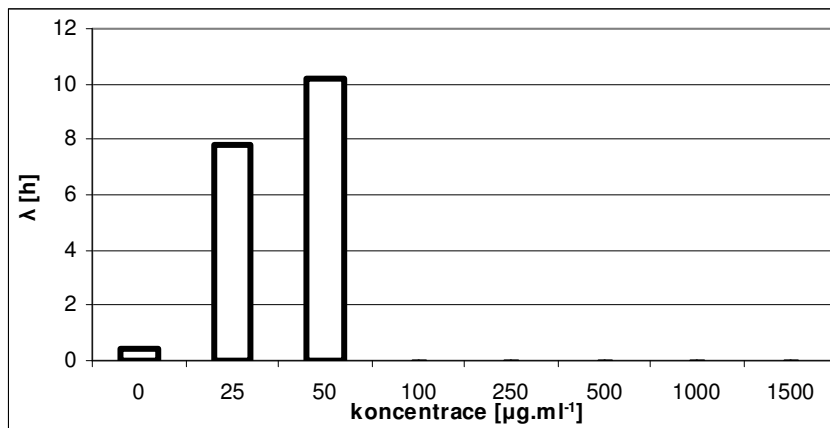
Průběh růstových křivek v přítomnosti nízkých koncentracích monolaurinu (25 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) má téměř shodný průběh jako průběh růstu samotného mikroorganismu (P.VI.A). Z růstové křivky v přítomnosti monoacylglycerolu kyseliny laurové o koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ je patrný poloviční nárůst hustoty bakteriální suspenze. Vyšší koncentrace jako 500, 1000 a 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ způsobily značný pokles hustoty bakteriální suspenze. Nejvyšší sledovaná koncentrace dosahovala pouze 35% nárůstu bakterií. Monolaurin o koncentraci 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ vytvářel nepříznivé prostředí pro růst vegetativních buněk testované bakterie, dokazuje to prodloužení fáze lagu a nízký maximální nárůst. Růstová rychlost v intervalu koncentrací 25 – 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se snížila z 1,19 na 0,55 h^{-1} (P.VI.B).

5.2 Sledování vlivu monolaurinu na růst bakterií s grampozitivní buňčnou stěnou

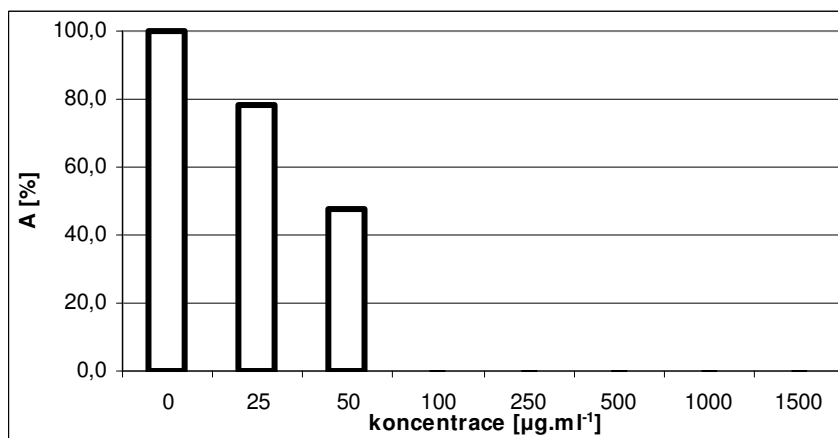
Pro sledování inhibičního vlivu monolaurinu byly použity grampozitivní bakterie, které zahrnují bakterie vyskytující se běžně v ovzduší, bakterie, které mohou u oslabených jedinců vyvolat alimentární onemocnění, aerobní bakterie vyznačující se tvorbou spor nežádoucích při technologickém zpracování potravin, také mohou být příčinou závadnosti potravin při dlouhodobém skladování.

***Bacillus cereus* CCM 2010, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062, *Bacillus sphaericus* CCM 1615**

Prvními testovanými grampozitivními bakteriemi na vliv monolaurinu byly bakterie z rodu *Bacillus*. Po aplikaci nejnižší koncentrace monolaurinu nebyl zaznamenán nárůst bakteriálních buněk *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis*. Koncentrace 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ měla zcela inhibiční účinky vůči růstu vegetativních buněk bakterií *Bacillus cereus* CCM 2010, *Bacillus subtilis* CCM 4062. Růst bakterie *Bacillus sphaericus* CCM 1615 se vyznačoval poměrně krátkou dobou lagu (0,5 h), delší fází exponenciálního růstu, během 24 hodinové kultivaci nezapočatou fází odumírání. Bakteriální buňky se dokázaly přizpůsobit monoacylglycerolu kyseliny laurové pouze do koncentrace 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Koncentrace 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ prodloužila lag fázi na 10 h (Obr. 22).

Obr. 22. Vliv monolaurinu na dobu lagu *B. sphaericus* CCM 1615

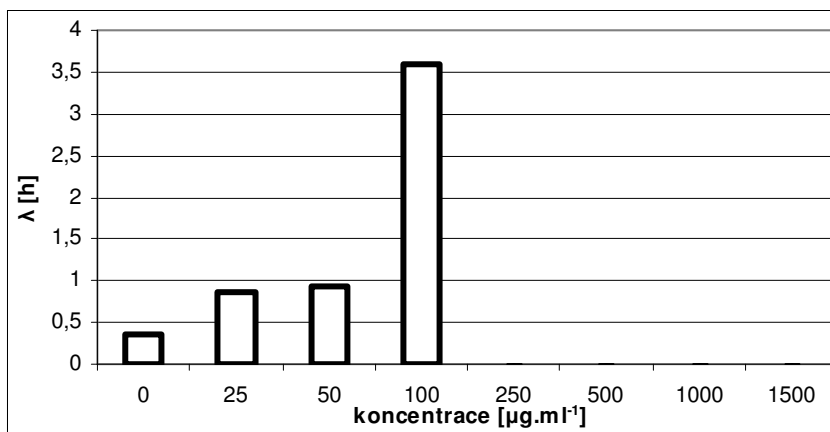
Hustota bakteriální suspenze v přítomnosti MAG o koncentraci $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$ dosáhla hodnoty maximálního nárůstu 78 %, o koncentraci $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ pouze 48 %, což poukazuje na značnou citlivost testované bakterie (Obr. 23). Koncentrace $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ dosahovala průměrné specifické rychlosti $0,7 \text{ h}^{-1}$, což je o $0,4 \text{ h}^{-1}$ nižší rychlost než v přítomnosti monolaurinu o koncentraci $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Inhibiční účinek monoacylglycerolu kyseliny laurové na růst *Bacillus sphaericus* CCM 1615 byl prokázán koncentrací $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$.

Obr. 23. Vliv monolaurinu na růst *B. sphaericus* CCM 1615

Enterococcus faecalis CCM 2665

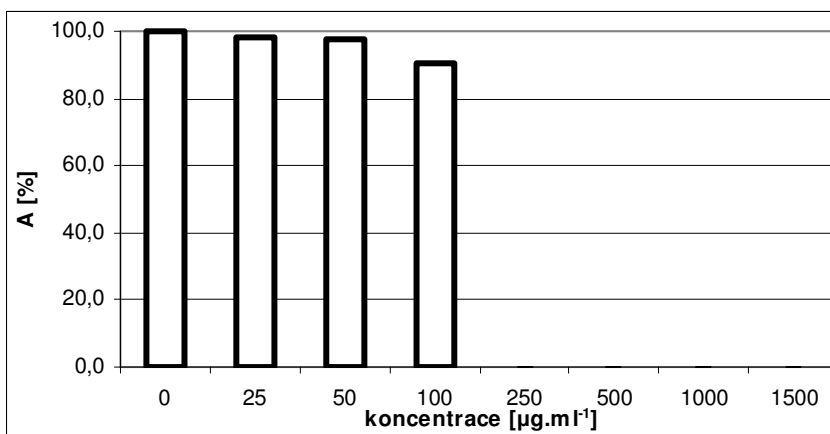
Pro sledování účinku monolaurinu na růst *Enterococcus faecalis* CCM 2665 byl zvolen stejný rozsah koncentrací monolaurinu jako při sledování ostatních bakterií ($25 - 1500 \mu\text{g.ml}^{-1}$). Testovaná látka působila na růst vegetativních buněk ve vyšších kon-

centracích zcela inhibičně, kdy došlo k úplnému zastavení růstu. Růstová křivka *Enterococcus faecalis* CCM 2665 bez přítomnosti monolaurinu se vyznačuje kratší dobou lagu, která probíhala pouze 0,35 h (Obr. 24), po 5 hodinové kultivaci započala fáze odumírání (P.VII.A).



Obr. 24. Vliv monolaurinu na dobu lagu *E. faecalis* CCM 2665

Se zvyšující koncentrací se postupně fáze lagu prodlužovala, při koncentraci $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ trvala 0,9 h. Poslední koncentrací ($100 \mu\text{g.ml}^{-1}$), kdy *Enterococcus faecalis* CCM 2665 byl schopen růst, byla lag fáze prodloužena na 3,6 h. Monolaurin způsobil prodloužení přípravné fáze o 3,25 h. Maximální hodnota hustoty bakteriální suspenze (Obr. 25) v přítomnosti monoacylglycerolu kyseliny laurové o koncentraci $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ dosahovala 98 % nárůstu. Nízké koncentrace neměly vliv na růst buněk, hodnota lagu se zvyšovala nepatrně a maximální nárůst se blížil 100 %.

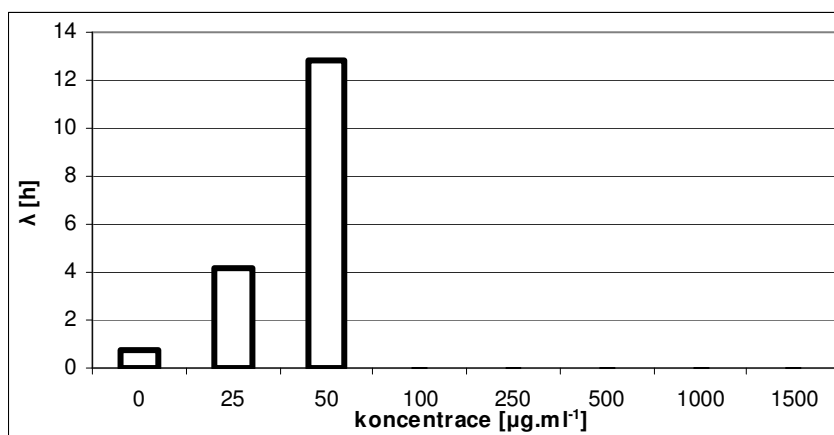


Obr. 25. Vliv monolaurinu na růst *E. faecalis* CCM 2665

V prostředí o koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ došlo k menšímu poklesu hustoty bakteriální suspenze na 90,5 %. Zcela opačné působení monolaurinu nastalo při koncentraci $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, kdy došlo k inhibici růstu. Ve vyšších koncentracích ($250 - 1500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) nebyly vegetativní buňky schopny se přizpůsobit podmínkám vnějšmu prostředí.

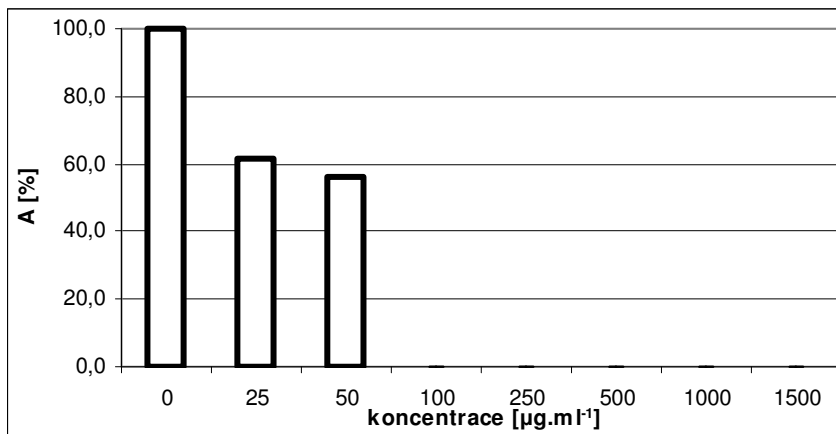
Enterococcus faecalis CCM 4224

Z růstových křivek testované bakterie *Enterococcus faecalis* CCM 4224 (P.VIII.A) je patrné, že koncentrace vyšší než $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ způsobily inhibici růstu. Bakterie se dokázala přizpůsobit monolaurinu pouze do koncentrace $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Délka lag fáze bakterie v prostředí bez inhibiční látky byla 0,7 h (Obr. 26), po 13 hodinách kultivace započala fáze odumírání. Přítomnost monolaurinu o koncentraci $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ způsobila prodloužení fáze lagu na 4,2 h. Velký rozdíl v délce lag fáze nastal při koncentraci $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, kdy docházelo k 12,9 hodinovému přizpůsobování se monolaurinu.



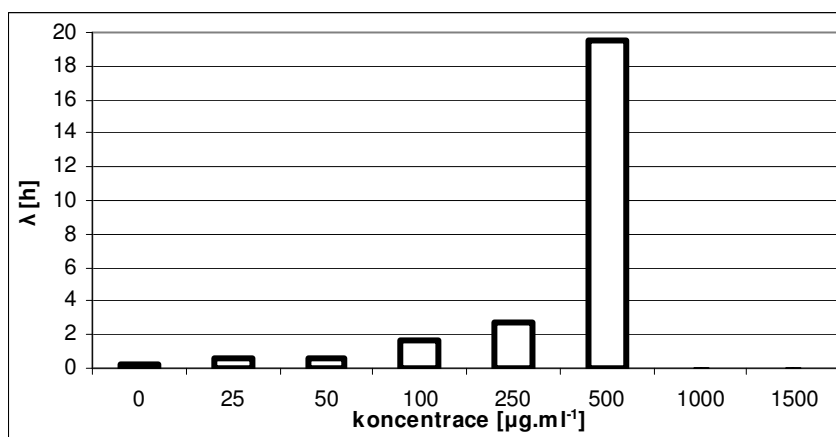
Obr. 26. Vliv monolaurinu na dobu lagu *E. faecium* CCM 4224

Koncentrací monolaurinu $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se hustota bakteriální suspenze snížila téměř na polovinu (62 %). I přes delší počáteční fázi přizpůsobování dosáhla hustota bakteriální suspenze v přítomnosti inhibiční látky o koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ maximální hodnoty 57 % (Obr. 27). Koncentrace monolaurinu $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ způsobila růstovou inhibici. *Enterococcus faecalis* CCM 4224 byl schopen růstu pouze do koncentrace $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Obr. 27. Vliv monolaurinu na růst *E. faecalis* CCM 4224

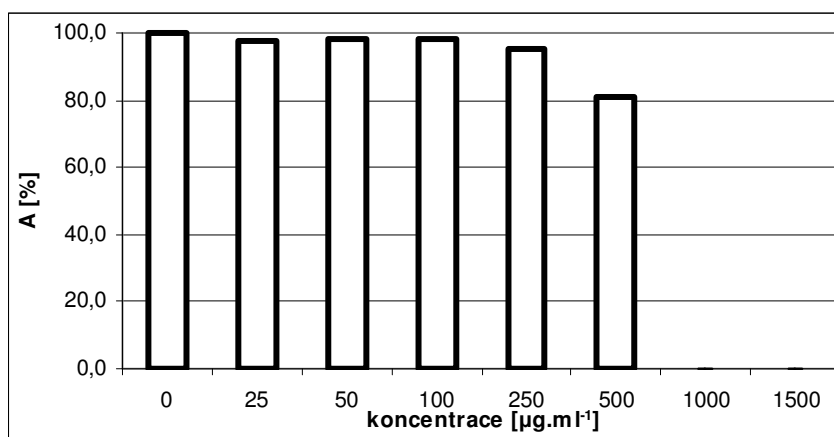
Enterococcus faecalis CCM 7247

Posledním sledovaným zástupcem rodu *Enterococcus* byl *Enterococcus faecalis* CCM 7247, jehož inhibice byla testována v koncentracích monolaurinu 25 – 1500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. U zmíněného bakteriálního kmene byla pozorována inhibice růstu vlivem monoacylglycerolu kyseliny laurové o koncentraci 1000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Hodnota lag fáze v přítomnosti monolaurinu o nejnižší testované koncentraci byla 0,58 h, vlivem vyšší koncentrace (250 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) se prodloužila na 2,70 h, přičemž nejvyšší koncentrace (500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) při které byly buňky schopny růstu prodloužila délku přípravné fáze až na 19,5 h (Obr. 28).

Obr. 28. Vliv monolaurinu na dobu lagu *E. faecium* CCM 7247

Nízké koncentrace monolaurinu neovlivnily růst buněk. Hustota bakteriální suspenze se nepatrně snižovala. Účinkem monolaurinu o koncentraci 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ poklesl maximální

nárůst bakteriální suspenze na 97 %, v koncentraci 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla maximální hustota bakteriální suspenze nepatrně vyšší, dosahovala 99 a 98 % nárůstu. V přítomnosti vyšší koncentrace inhibiční látky (500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) byla maximální hustota bakteriální suspenze 81 % (Obr. 29). Buňky *Enterococcus faecalis* CCM 7247 se dokázaly přizpůsobit prostředí, ve kterém byl monoacylglycerol v nízké koncentraci, kdežto vyšší koncentrace (1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) měly zcela inhibiční účinky. Průměrná rychlost nárůstu byla v koncentraci 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 1,7 h^{-1} , koncentrací 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se snížila na 1,1 h^{-1} , koncentrací 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se opět zvýšila na 1,4 h^{-1} (P.IX.B).



Obr. 29. Vliv monolaurinu na růst *E. faecalis* CCM 7247

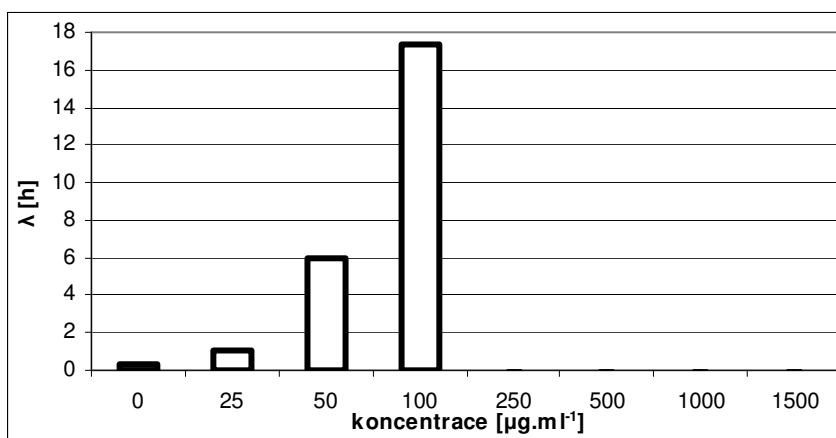
Micrococcus luteus CCM 732

V neposlední řadě byl testován účinek monolaurinu na růst vegetativních buněk *Micrococcus luteus* CCM 732. Pro srovnání byly použité stejné koncentrace monoacylglycerolu kyseliny laurové jako v předchozích případech (25 – 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Z růstových křivek je patrné, že růst mikroorganismu bez přítomnosti cizorodé látky se vyznačovala plynulým nárůstem hustoty bakteriální suspenze, kdy po 4 hodinové lag fázi nastala dlouhá fáze exponenciálního růstu bez započaté fáze odumírání (P.X.A). Nejnižší sledovaná koncentrace monolaurinu (25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) způsobila inhibici růstu.

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* CCM 3653

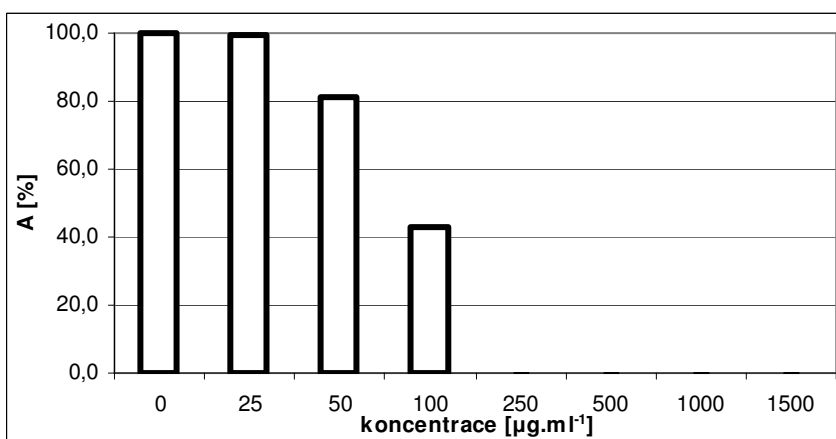
Inhibiční efekt monolaurinu byl sledován u další bakterie s grampozitivní buněčnou stěnou patřící do čeledi *Staphylococcaceae*. Po aplikaci monoacylglycerolu kyseliny laurové

v koncentraci $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ došlo k úplné inhibici růstu. Růstová křivka *Staphylococcus aureus* CCM 3653 bez přítomnosti inhibiční látky se vyznačovala poměrně krátkou fází lagu (0,36 h), nepatrnou fází exponenciálního růstu, po 6,5 hodinové kultivaci započala fáze stacionární, kdežto fáze odumírání během 24 hodinové kultivaci nenastala (P.XI.A). V přítomnosti monolaurinu o koncentraci $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se prodloužila doba lagu na 5,92 h, což je o 5,56 h delší doba v porovnání s růstovou křivkou bakterie bez aplikace monolaurinu (Obr. 30). Koncentrace $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ prodloužila délku lagu až na 17,34 h.



Obr. 30. Vliv monolaurinu na dobu lagu *S. aureus* CCM 3653

V koncentraci $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dosáhla hustota bakteriální suspenze téměř 100% (Obr. 31), koncentrací $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se snížila na méně než polovinu (43 %).



Ob. 31. Vliv monolaurinu na růst *S. aureus* CCM 3653

Specifická růstová rychlost se zvyšující koncentrací inhibiční látky klesala. V koncentraci $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla růstová rychlost $0,76 \text{ h}^{-1}$. V přítomnosti monolaurinu o koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se růstová rychlost snížila o $0,44 \text{ h}^{-1}$. Inhibiční účinek nastal od koncentrace $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, kdy vegetativní buňky se již nepřizpůsobily vnějšímu prostředí.

6 DISKUZE

Cílem práce bylo zhodnotit inhibiční účinky monoacylglycerolu kyseliny laurové, neionogenní povrchově aktivní látky, na růst bakterií s grampozitivní a gramnegativní buněčnou stěnou. Monoacylglycerol kyseliny laurové je látka obsahující ve své molekule krátký řetěz nasycené mastné kyseliny, přirozeně se vyskytující v kravském mléce [6]. Inhibiční látka byla aplikovaná v koncentracích 25 – 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, přičemž byly sledovány růstové křivky 7 gramnegativních a 8 grampozitivních bakterií. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí Gompertzova modelu, jehož podstatou je sledování tří růstových parametrů. Zwietering a kol. [47] ve své studii určili Gompertzův model jako nejvhodnější k popisu růstové křivky bakterií a tedy k vyhodnocení inhibice růstu mikroorganismů. Na základě získaných hodnot měření optické denzity suspenze buněk byly sestaveny sloupcové grafy, které vyjadřují prodloužení fáze lagu, maximální hodnotu hustoty bakteriální suspenze a specifickou rychlost růstu během 24 hodinové kultivace. Vyhodnocením výše uvedených parametrů byla určena míra inhibičního účinku zvoleného 1-monoacylglycerolu.

Bakterie s buněčnou stěnou gramnegativního typu byly k inhibičním účinkům monolaurinu odolnější v porovnání s bakteriemi s buněčnou stěnou grampozitivního typu. Dokázaly se více přizpůsobit nepříznivým podmínkám. Nejnižší sledovaná koncentrace monolaurinu 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ nepůsobila inhibičně na růst žádného zástupce bakterií s gramnegativní buněčnou stěnou. Ve dvou nejnižších koncentracích monoacylglycerolu kyseliny laurové (25 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) měly růstové křivky obdobný průběh jako růstová křivka sledovaných bakterií bez přítomnosti monolaurinu. Odlišný růst v přítomnosti monolaurinu vykazovala *Serratia marcescens*, jejíž růstové křivky se velmi podobaly růstu bez monolaurinu až do koncentrace 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Maximální hustota bakteriální suspenze v přítomnosti inhibiční látky v koncentracích 25, 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u bakterií patřících do rodu *Salmonella*, *Citrobacter* a *Serratia* dosahovala nad 85 %. Jedná se tedy o poměrně odolné bakterie u nichž nebyl patrný inhibiční účinek. Další dva sledované druhy z čeledi *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* a *Proteus mirabilis*, byly k monolaurinu citlivější, kdy po aplikaci monolaurinu v koncentraci 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dosahovaly maximálního nárůstu 38 %. Nejodolnější bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* byla *Serratia marcescens*, u níž v přítomnosti monolaurinu o koncentraci 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ stále docházelo k 86 % nárůstu bakteriální suspenze, v nejvyšší testované koncentraci monolaurinu došlo k 84% nárůstu. Byla pozorována pouze 16% inhibice růstu. Naopak u *Proteus mirabilis* byla patrná 62% inhibice. Další odolnější bakterií

byl *Citrobacter freundii*, který v porovnání s bakterií *Serratia marcescens* v prostředí monolaurinu o koncentraci $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dosahoval o 14 % nižšího maximálního nárůstu, ale koncentrace $1500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ o 41 % nižšího nárůstu.

Mezi dalšími gramnegativními bakteriemi, u kterých byl vyhodnocován vliv monolaurinu, byli zástupci rodu *Pseudomonas*. Na rozdíl od bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*, byl u bakterií rodu *Pseudomonas* pozorován úplný inhibiční účinek monolaurinu. V přítomnosti inhibiční látky o koncentraci 25, 50 a $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ nebyla pozorována inhibice vyšší jak 5 %. V počátečních testovaných koncentracích se bakterie z rodu *Pseudomonas* poměrně snadno dokázaly přizpůsobit přítomnosti monoacylglycerolu kyseliny laurové. *Pseudomonas fluorescens* byl k účinkům monolaurinu citlivější než *Pseudomonas aeruginosa*. I když maximální hustota bakteriální suspenze *P. aeruginosa* byla při koncentraci monolaurinu $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ o 21 % nižší než hustota suspenze *P. fluorescens*, po aplikaci monolaurinu ve vyšších koncentracích stále docházelo k nárůstu buněk *P. aeruginosa*, kdežto u *P. fluorescens* již k nárůstu nedocházelo. Monolaurin působil na růst buněk *P. aeruginosa* inhibičně až po aplikaci nejvyšší testované koncentrace ($1500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Již po přidavku monolaurinu o koncentraci $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla pozorována úplné inhibice *P. fluorescens*.

O poměrně velké odolnosti gramnegativních bakterií vypovídají i další studie. Růžička a kol. [49] neprokázali inhibiční účinek monolaurinu v koncentraci $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u bakterií *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa*. *E. coli* je považována za modelový mikroorganismus, mnoho studií se zabývalo právě chováním této bakterie v přítomnosti monoacylglycerolů. Inhibice bakterie *Escherichia coli* monolaurinem však nebyla dokázána [25]. Petschov a kol. [30] uvedli, že monolaurin zpomaluje růst *Helicobacter pylori*. Citlivost gramnegativních bakterií lze zvýšit v prostředí s dalšími látkami, kterými mohou být EDTA, nizin nebo laktoferin [20].

Z literárních zdrojů vyplývá, že grampozitivní bakterie jsou poměrně citlivé k účinkům monolaurinu. U všech sledovaných bakteriálních kmenů byla účinkem monolaurinu prokázána inhibice. Ke sledování vlivu monolaurinu byli vybráni zástupci rodu *Enterococcus*. Nejméně odolný byl *Enterococcus faecalis* CCM 4224, který po aplikaci nejnižší koncentrace monolaurinu do živného média dosahoval maximální hustoty bakteriální suspenze pouze 62 %, koncentrací $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se jeho maximální nárůst snížil na 56 %. V dalších koncentracích monolaurinu růst bakterií nebyl zaznamenán. *Enterococcus faecalis* CCM 2664 a *Enterococcus faecalis* CCM 7247 byly inhibovány koncentrací vyšší než pře-

dešlý kmen. Inhibice *Enterococcus faecalis* CCM 2665 nastala v přítomnosti monolaurinu o koncentraci $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Zajímavé je, že *Enterococcus faecalis* CCM 2665 byl koncentrací monolaurinu $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ inhibován pouze z 9,5 %, kdežto koncentrací $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ již nastala 100 % inhibice. Poslední kmen z rodu *Enterococcus*, *Enterococcus faecalis* CCM 7247, byl schopen 82 % nárůstu v prostředí monoacylglycerolu kyseliny laurové o koncentraci $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Až při koncentraci $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl prokázán inhibiční vliv monolaurinu. Ze všech testovaných bakterií s buněčnou stěnou grampozitivního typu byl nejodolnější k inhibičním vlivům monolaurinu právě *Enterococcus faecalis* CCM 7247, který se jako jediný dokázal přizpůsobit koncentraci $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Inhibiční účinek monolaurinu proti *Enterococcus faecalis* dokazuje ve své práci i Dufour a kol. [13]. Schlievert a kol. [25] ve své studii uvedli, že účinkem monolaurinu se inhibuje růst *Streptococcus* (taxonomicky příbuzný enterokokům) a snižuje se produkce enterotoxinu. Vlivem monolaurinu na růst bakterií rodu *Streptococcus* se také zabýval Trotter a kol. [24].

Ze sporulujících bakterií byly hodnoceny následující kmeny: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus sphaericus*. Ze zjištěných hodnot je patrné, že bakterie rodu *Bacillus* jsou velmi citlivé k účinkům monolaurinu. Pouze *Bacillus sphaericus* se dokázal přizpůsobit prostředí s inhibiční látkou v koncentraci 25 a $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, jehož maximální hodnoty růstu dosahovaly 78 a 48 %. Po aplikaci vyšších koncentrací již docházelo k úplné inhibici. *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis* byly inhibovány vlivem monolaurinu o koncentraci $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Antimikrobiální efekt monolaurinu byl sledován u dalších dvou bakteriálních kmenů (*Staphylococcus aureus* a *Micrococcus luteus*). Monolaurin způsobil významnou redukci počtu buněk *Staphylococcus aureus* již koncentrací $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. U obou sledovaných bakterií byl prokázán inhibiční účinek monoacylglycerolu kyseliny laurové, přičemž *Staphylococcus aureus* se dokázal více přizpůsobit účinkům inhibiční látky, jeho růst byl zaznamenán v přítomnosti monolaurinu o koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, kdy maximální hodnota nárůstu bakteriální suspenze dosahovala 43 %. *Micrococcus luteus* byl inhibován již nejnižší aplikovanou koncentrací monolaurinu. Ruzin a kol. [26] uvedli, že monolaurin se může používat jako látka, která snižuje exponenciální fázi růstu *S. aureus*.

Na základě zjištěných výsledků lze konstatovat, že bakterie s buněčnou stěnou grampozitivního typu jsou poměrně citlivé k účinkům monolaurinu. U třech mikroorganismů (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* a *Micrococcus luteus*) byl zaznamenán inhibiční účinek při nejnižší testované koncentraci monolaurinu ($25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Z výše uvedených výsledků dále vyplývá, že monolaurin může nalézt uplatnění v potravinářském i kosmetickém průmyslu jako látka inhibující růst především grampozitivních bakterií. V dostupné literatuře je monolaurin označován za jeden z účinnějších monoacylglycerolů proti růstu gramnegativních bakterií. Navíc byly nalezeny látky působící synergicky, což může vést k vytvoření vhodného systému na ochranu potravin či kosmetických prostředků. Kromě toho, že by monolaurin zastával antimikrobiální funkci, mohl by být využit i jeho emulgační účinek.

ZÁVĚR

Předložená práce je zaměřená na inhibiční účinky monoacylglycerolů a možnosti jejich využití jako antimikrobiálních aditiv. Podstatou bakalářské práce bylo zhodnotit inhibiční účinky monoacylglycerolu kyseliny laurové vůči růstu vybraných bakterií s buněčnou stěnou gramnegativního a grampozitivního typu, které mohou kontaminovat různé potraviny a kosmetické výrobky.

Ze získaných výsledků při sledování vlivu monolaurinu na růst mikroorganismů bylo možné učinit následující závěry:

- gramnegativní bakterie jsou k účinkům monolaurinu odolnější než grampozitivní bakterie,
- z gramnegativních testovaných bakterií nastala inhibice růstu vlivem monolaurinu u bakterií *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955,
- monoacylglycerol kyseliny laurové nevykazoval inhibiční účinky vůči zástupcům čeledi *Enterobacteriaceae*,
- nejodolnější gramnegativní bakterií k účinkům inhibiční látky byla *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303, naopak nejcitlivější *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798, kdy minimální inhibiční koncentrace byla $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$,
- u bakterií s buněčnou stěnou grampozitivního typu byl patrný inhibiční účinek monolaurinu proti všem sledovaným kmenům,
- nejodolnější grampozitivní bakterií k účinkům monolaurinu byl *Enterococcus faecalis* CCM 7247,
- MIC monolaurinu byla u bakterií *Bacillus cereus* CCM 2010, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062 a *Micrococcus luteus* CCM 732 stanovena $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$,
- monolaurin o koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ způsobil inhibici kmenů *Bacillus sphaericus* CCM 1615 a *Enterococcus faecalis* CCM 4224,
- koncentrace $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ způsobil inhibici *Enterococcus faecalis* CCM 2665 a *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3653, koncentrace $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ *Enterococcus faecalis* CCM 7247.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin
- [2] Kodíček M., *Biochemické pojmy*, VŠCHT Praha, 2004
- [3] Davídek J., Janíček G., Pokorný J., *Chemie potravin*, Praha, 1983
- [4] Velíšek J., *Chemie potravin*, Tábor, 1999
- [5] Pokorný J., Dubská L., *Technologie tuků*, Praha, 1986
- [6] Sprong R.C., Hulstein F.E., Van der Meer R., *Bactericidal activities of milk lipids, Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, vol. 45, p. 1298 - 1301
- [7] Mouloungui Z., Rakotondrazafy V., Peyrou G., Gachen C., Eychenne V., *Pure α -monoglycerides for industrial applications*. Agro Food Ind. Hi-Tech, 1998, p. 10-14
- [8] Janiš R., Krejčí J., Klásek A., *Preparation of 1-monoacylglycerols from glycidol and fatty acids catalyzed by the chromium(III)-fatty acid system*, Eur. J. Lipid Sci. Technol., 2000, vol. 102, p. 351 – 354.
- [9] Systematika povrchově aktivních látek [online]. [cit 2009-3-15] Dostupný z WWW: <<http://www.cepac.cz>>
- [10] Povrchová energie a povrchové napětí [online]. [cit 2009-3-15] Dostupný z WWW: <<http://www.cepac.cz>>
- [11] Moonen H., Bas H., 2004, *Mono- and diglycerides*. In Whitehurst, R.J. (ed) *Emulsifiers in Food Technology*, 40 – 57. Blackwell Publishing
- [12] Davinson P. M., Sofos J. N., Brannern A. L., *Antimicrobials in food*, CRC Press, Boca Raton, 2005
- [13] Dufour M., Manson J.M., Bremer P.J., Dufour J.P., Cook G.R., Simmonds R.S., *Characterization of Monolaurin Resistance in Enterococcus faecalis*, Applied and Environment Mikrobiology, 2007, vol. 73, p.5507 - 5515

- [14] Sun C.Q., O'Conner J., Robertson A.M., *The antimicrobial properties of milkfat after partial hydrolysis by calf pregastric lipase*, *Chemico-Biological Interactions*, 2002, vol. 140, p. 185 - 198
- [15] Kristmundsdóttir T., Árnadóttir S.G., Bergsson G., Thormar H., *Development and evaluation of microbicidal hydrogels containing monoglyceride as the active ingredient*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1999, vol. 88, p.1010 - 1015
- [16] Sprong R.C., Hulstein M.F.E., Meer R., *Bovine milk fat components inhibit foodborne pathogens*, *International Dairy Journal*, 2002, vol 12, p 209 - 215
- [17] Bala M.F.A., Marshall D.L., *Testing matrix, inoculum size, and incubation temperature affect monolaurin activity against Listeria monocytogenes*, *Food Microbiology*, 1996, vol. 13, p. 467 - 473
- [18] Stecchini M.L., Di Luch R., Bortolussi G., Del Torre M., *Evaluation of lactic and monolaurin to control Listeria monocytogenes on Stracchino cheese*, *Food microbiology*, 1996, vol 13, p 483 - 488
- [19] McLay J.C., Kennedy M.J., O'Rourke A.L., Elliot R.M., Simmonds R.S., *Inhibition of bacterial foodborne pathogens by the lactoperoxidase system in combination with monolaurin*, *International of Food Microbiology*, 2002, vol. 73, p.1 - 9
- [20] Branen J.K., Davidson P.M., *Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by et hylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin*, *International Journal of Food Microbiology*, 2004, vol. 90, p. 63 - 74
- [21] Mansour M., Milliére J.B., *An inhibitor synergistic effect of a nisin- monolaurin combination on Bacillus sp. Vegetative cells in milk*, *Food Microbiology*, 2001, vol. 18, p. 87 - 94
- [22] Chaibi A., Ababouch L.H., Ghouila M.R., Busta F.F., *Effect of monoglycerides on the thermal inactivation kinetics of Bacillus cereus F 4165/75 spores*, *Food Microbiology*, 1998, vol 15, p. 527 - 537
- [23] Deog – Hwan Oh, Marshall L., *Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against Listeria monocytogenes*, *International Journal of Food Microbiology*, 1993, vol 20, p. 239 - 246

- [24] Trotter T.N., Marshall D.L., *Influence of pH and NaCl on monolaurin inactivation of Streptococcus iniae*, Food Microbiology, 2003, vol. 20, p. 187 - 192
- [25] Schlievert P.M., Deringer J.R., Kim M.H., Projan S.J., Novick R.P., *Effect of glycerol monolaurate on bacterial growth and toxin production*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1992, vol. 36, p. 626 - 631
- [26] Ruzin A., Novick R.P., *Glycerol monolaurate inhibits induction of vancomycin resistance in Enterococcus faecalis*, Journal of Bacteriology, 1998, vol. 180, p. 182 – 185
- [27] Lee Y.J., Kim S. Y., Shin H.D., *Antimicrobial synergistic effect of Linolenic acid and monoglyceride against Bacillus cereus and Staphylococcus aureus*, Journal of agricultural and food chemistry, 2002, vol. 50, p. 2193 – 2199
- [28] Skřivanová E., Marounek M., Dlouhá G., Kaňka J., *Susceptibility of Clostridium perfringens to C₈ – C₁₈ fatty acids*, Letters in Applied Microbiology, 2005, vol. 41, p. 77 - 81
- [29] Thormar H., Hilmanson H., Bergsson G., *Stable concentrated emulsion of 1-monoglyceride of capric acid (monocaprin) with microbicidal activities against the food-borne bacteria Campylobacter jejuni, Salmonella spp., and Escherichia coli*, Applied and Environmental Microbiology, 2006, vol. 72, p. 522 – 526
- [30] Petschow B.W., Batema R.P., Ford L.L., *Susceptibility of Helicobacter pylori to bactericidal properties of medium – chain monoglycerides and free fatty acids*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1996, vol. 40, p.302 - 306
- [31] Sun C.Q., O Connor J., Robertson A.M., *Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against Helicobacter pylori*, Immunology and Medical Microbiology, 2003, vol. 36, p. 9 – 17
- [32] Isaacs C.H.E., Litov R.E., Thormar H., *Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk*, Nutritional Biochemistry, 1995, vol. 6, p. 362 – 366

- [33] Hilmarsson H., Traustason B.S., Kristmundsdóttir T., Thormar H., *Virucidal activities of medium- and long- chain fatty alcohols and lipids against respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 2: comparison at different pH levels*, Archives of Virology, 2007, vol. 152, p. 2225 – 2236
- [34] Říhářková Z., Filip V., Plocková M., Šmidrkal J., Červenková R., *Inhibition of Aspergillus niger DMF 0801 by monoacylglycerols prepared from coconut oil*, Czech J. Food Sci., 2002, vol. 20, p. 48 - 52
- [35] Říhářková Z., Plocková M., Filip V., Šmidrkal J., *Antifungal activity of lauric acid derivatives against Aspergillus niger*, Eur Food Res Technol, 2001, vol. 213, p. 488 – 490
- [36] Sedláček I., *Taxonomie prokaryot*, Brno, 2007
- [37] Vařejka F., Mráz O., Smolka J., *Speciální veterinární mikrobiologie*, Praha, 1989
- [38] Žižka B., Korbelová M., *Mikrobiologie I pro SPŠ potravinářské*, Praha, 1992
- [39] *Potravinářská mikrobiologie I- Mikroorganizy v potravinářství* [online]. [cit 2008-9-29] Dostupný z WWW: <<http://www.cepac.cz>>
- [40] Šilhánková L., *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*, Praha, 2002
- [41] Górnier F., Valík L., *Aplikovaná mikrobiológia požívatín*, Bratislava, 2004
- [42] Jay J.M., *Modern food microbiology*, An Aspen publication, 2000
- [43] Ryšková O., *Mikrobiologie pro studující zubního lékaře*, Praha, 2004
- [44] Žižka B., *Mikrobiologie*, Praha, 1979
- [45] Barbara M.L., Baird-Parker T.C., Gould G.W., *The Microbiological Safety and Quality of Food*, Maryland, 2000
- [46] Dostupný z WWW: <http://www.bacillusphaericus.com/>
- [47] Zwietering M. H., Jongenburger I., Rombouts F. M., Riet K. V., *Modeling of the bacterial growth curve*, Applied and environmental microbiology, 1990, vol. 56, p. 1875 – 1881

- [48] Kallanoor A., Vasudevan P., Nair M.K.M., Hoagland, T., Venkitanarayanan, K., *Inactivation of bacterial fish pathogens by medium-chain lipid molecules (caprylic acid, monokaprylin and sodium caprylate)*, Aquaculture Research, 2007, vol. 38, p. 1293-1300
- [49] Růžička J., Velclová K., Janiš R., Krejčí J., *Antimicrobial effect of 1- monoacylglycerols prepared by catalytic reaction of glycidol with fatty acids*, Eur Food Res Technol, 2003, vol. 217, p. 329 – 331

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ATP	Adenozintrifosfát
DAG	Diacylglycerol
EDTA	Etylendiamintetraoctová kyselina.
G ⁺	Bakterie s buněčnou stěnou grampozitivního typu.
G ⁻	Bakterie s buněčnou stěnou gramnegativního typu.
GLY	Glycerol
LPS	Laktoperoxidázový systém
MAG	Monoacylglycerol
MK	Mastná kyselina
MO	Mikroorganismus
RSV	Respirační syncytinální vir
TAG	Triacylglycerol
VSV	Vir vezikulární stomatitidy

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Estery glycerolů [3].....	10
Obr. 2. Glycerolýza tuků [5]	12
Obr. 3. Schéma esterifikace [3].....	13
Obr. 4. Průběh hydrolýzy [3]	13
Obr. 5. Schéma adice MK na glycidol [7]	14
Obr. 6. Schéma mikrotitrační destičky.....	36
Obr. 7. Růstová křivka.....	37
Obr. 8. Vliv monolaurinu na dobu lagu <i>C. freundii</i> CCM 7187.....	38
Obr. 9. Vliv monolaurinu na růst <i>C. freundii</i> CCM 7187.....	39
Obr. 10. Vliv monolaurinu na dobu lagu <i>E. coli</i> CCM 3954.....	39
Obr. 11. Vliv monolaurinu na růst <i>E. coli</i> CCM 3954.....	40
Obr.12. Vliv monolaurinu na dobu lagu <i>P. mirabilis</i> CCM 7188	40
Obr. 13. Vliv monolaurinu na růst <i>P. mirabilis</i> CCM 7188	41
Obr. 14. Vliv monolaurinu na dobu lagu <i>P. aeruginosa</i> CCM 3955.....	42
Obr. 15. Vliv monolaurinu na růst <i>P. aeruginosa</i> CCM 3955.....	42
Obr. 16. Vliv monolaurinu na růst <i>P. fluorescens</i> CCM 2798	43
Obr. 17. Vliv monolaurinu na dobu lagu <i>P. fluorescens</i> CCM 2798.....	43
Obr. 18. Vliv monolaurinu na dobu lagu <i>S. marcescens</i> CCM 303.....	44
Obr.19. Vliv monolaurinu na růst <i>S. marcescens</i> CCM 303	44
Obr. 20. Vliv monolaurinu na dobu lagu <i>S. enterica</i> CCM 4420	45
Obr. 21. Vliv monolaurinu na růst <i>S. enterica</i> CCM 4420.....	45
Obr. 22. Vliv monolaurinu na dobu lagu <i>B. sphaericus</i> CCM 1615	47
Obr. 23. Vliv monolaurinu na růst <i>B. sphaericus</i> CCM 1615	47
Obr. 24. Vliv monolaurinu na dobu lagu <i>E. faecalis</i> CCM 2665	48
Obr. 25. Vliv monolaurinu na růst <i>E. faecalis</i> CCM 2665	48
Obr. 26. Vliv monolaurinu na dobu lagu <i>E. faecium</i> CCM 4224	49
Obr. 27. Vliv monolaurinu na růst <i>E. faecalis</i> CCM 4224.....	50
Obr. 28. Vliv monolaurinu na dobu lagu <i>E. faecium</i> CCM 7247	50
Obr. 29. Vliv monolaurinu na růst <i>E. faecalis</i> CCM 7247	51
Obr. 30. Vliv monolaurinu na dobu lagu <i>S. aureus</i> CCM 3653	52
Ob. 31. Vliv monolaurinu na růst <i>S. aureus</i> CCM 3653	52

SEZNAM TABULEK

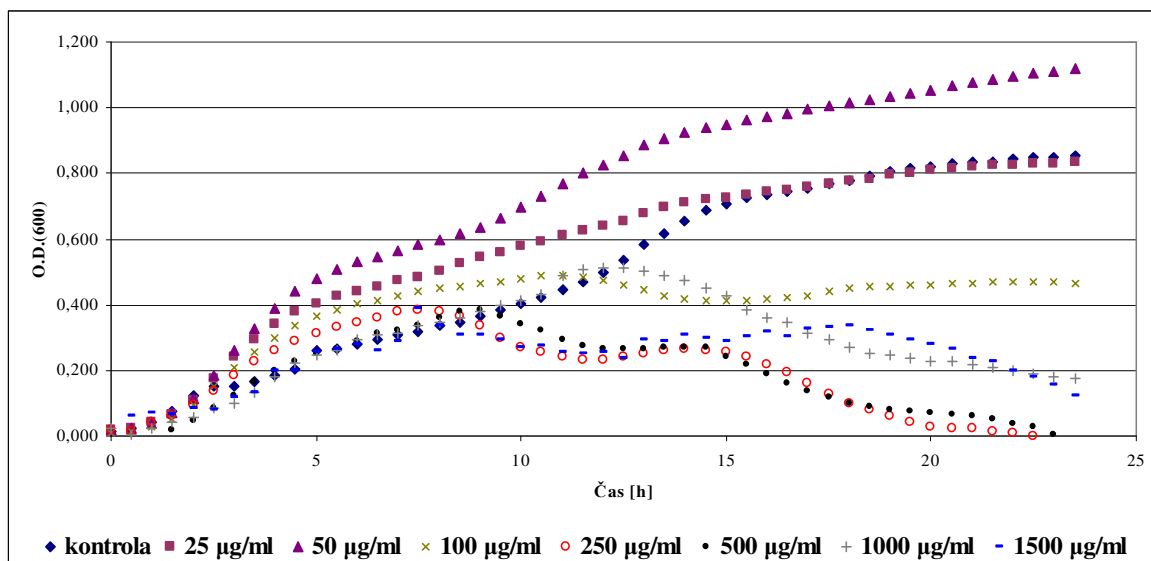
Tab. 1. Množství přídavku MAG C12:0 pro získání dané koncentrace	35
--	----

SEZNAM PŘÍLOH

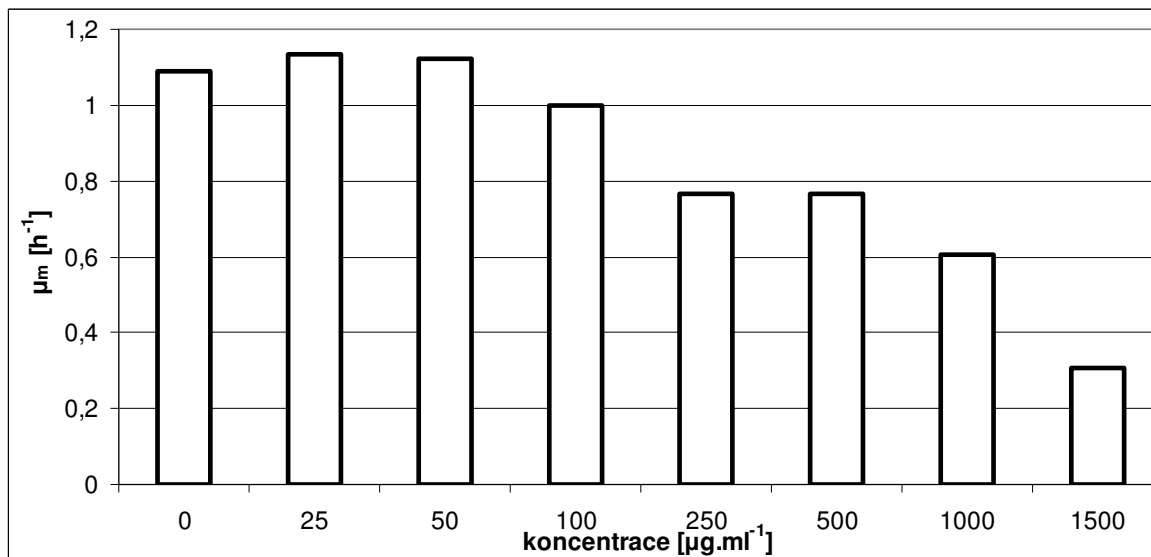
- P. I Účinek monolaurinu na růst *C. freundii* CCM 7187
- P. II Účinek monolaurinu na růst *E. coli* CCM 3954
- P. III Účinek monolaurinu na růst *P. mirabilis* CCM 7188
- P. IV Účinek monolaurinu na růst *P. aeruginosa* CCM 3955
- P. V Účinek monolaurinu na růst *S. marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303
- P. VI Účinek monolaurinu na růst *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 3954
- P. VII Účinek monolaurinu na růst *E. faecalis* CCM 2665
- P. VIII Účinek monolaurinu na růst *E. faecalis* CCM 4224
- P. IX Účinek monolaurinu na růst *E. faecalis* CCM 7247
- P. X Účinek monolaurinu na růst *M. luteus* CCM 732
- P. XI Účinek monolaurinu na růst *S. aureus* subsp. *aureus* CCM 3653

P. I. ÚČINEK MONOLAUURINU NA RŮST *C. FREUNDII* CCM 7187

P. I. A. Vliv monolaurinu na růst *C. freundii* CCM 7187

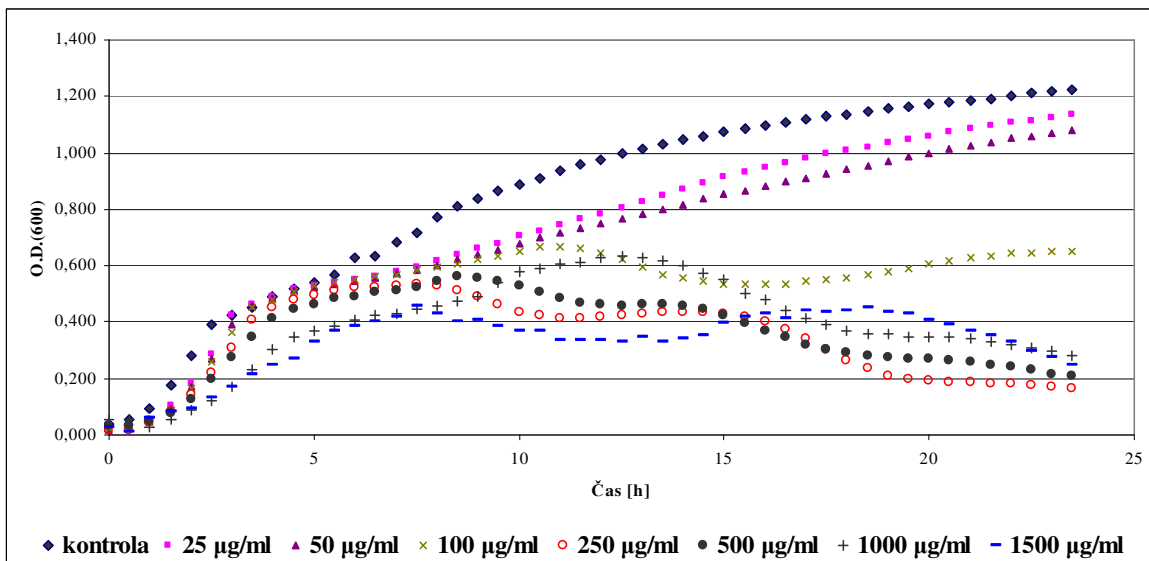


P. I. B. Specifická růstová rychlost *C. freundii* CCM 7187

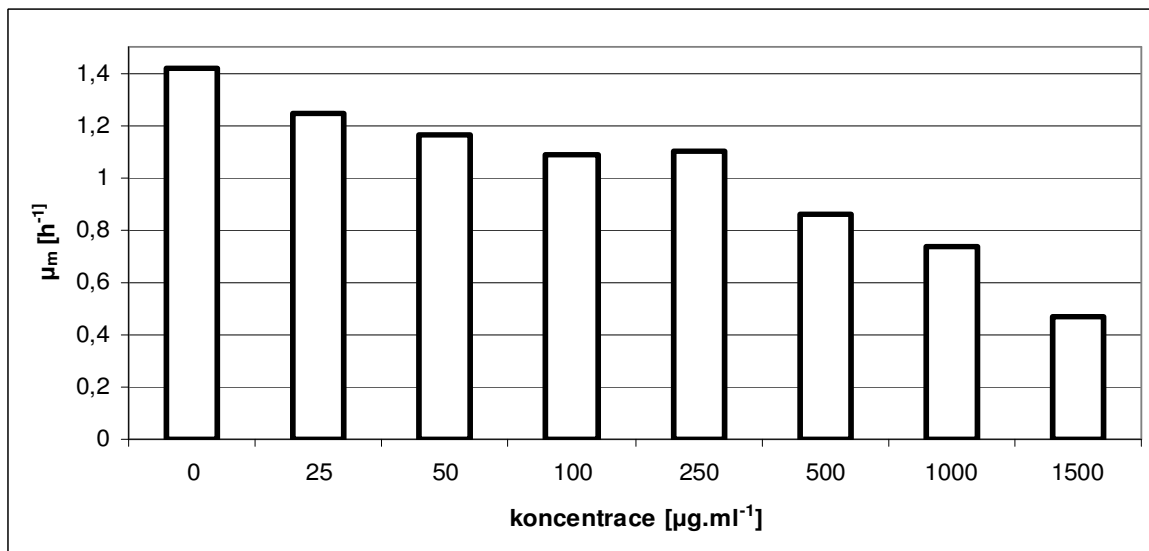


P. II. ÚČINEK MONOLAURINU NA RŮST *E. COLI* CCM 3954

P. II. A. Vliv monolaurinu na růst *E. coli* CCM 3954

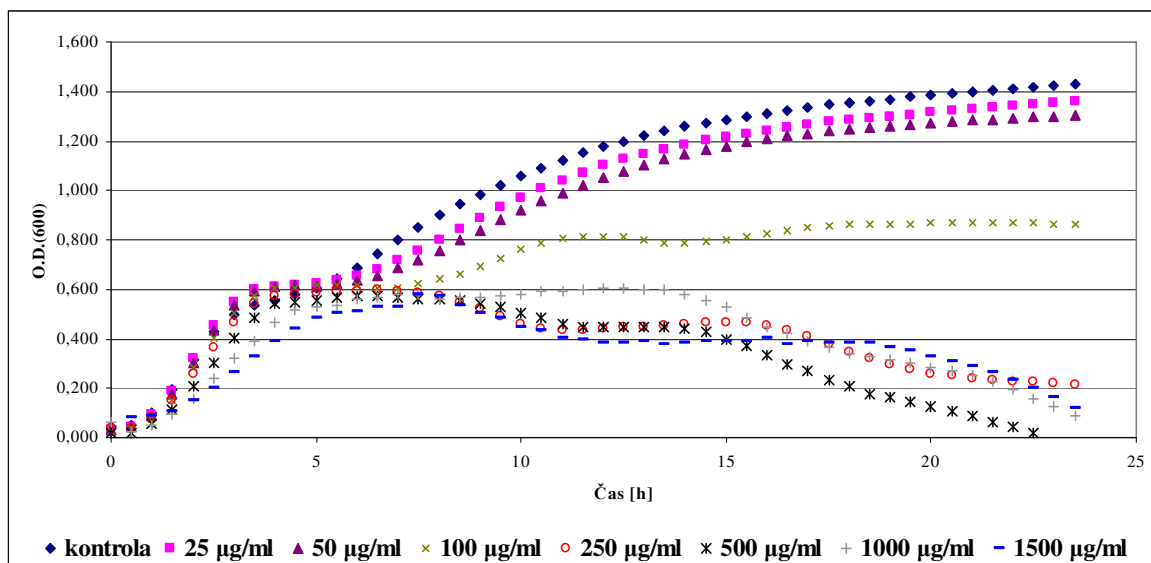


P. II. B. Specifická růstová rychlost *E. coli* CCM 3954

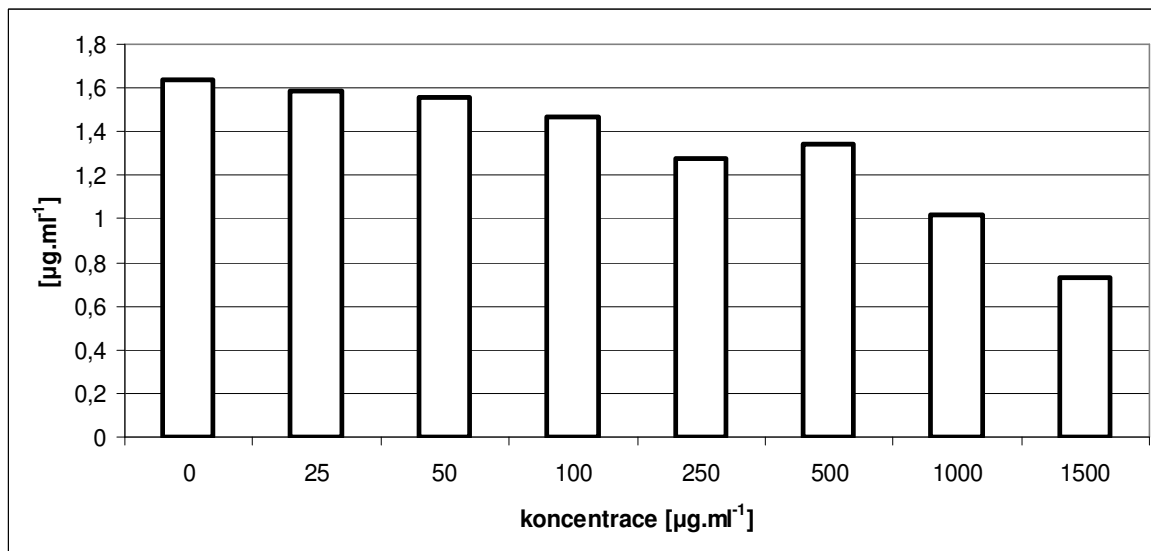


P. III. ÚČINEK MONOLAURINU NA RŮST *P. MIRABILIS* CCM 7188

P. III. A. Vliv monolaurinu na růst *P. mirabilis* CCM 7188

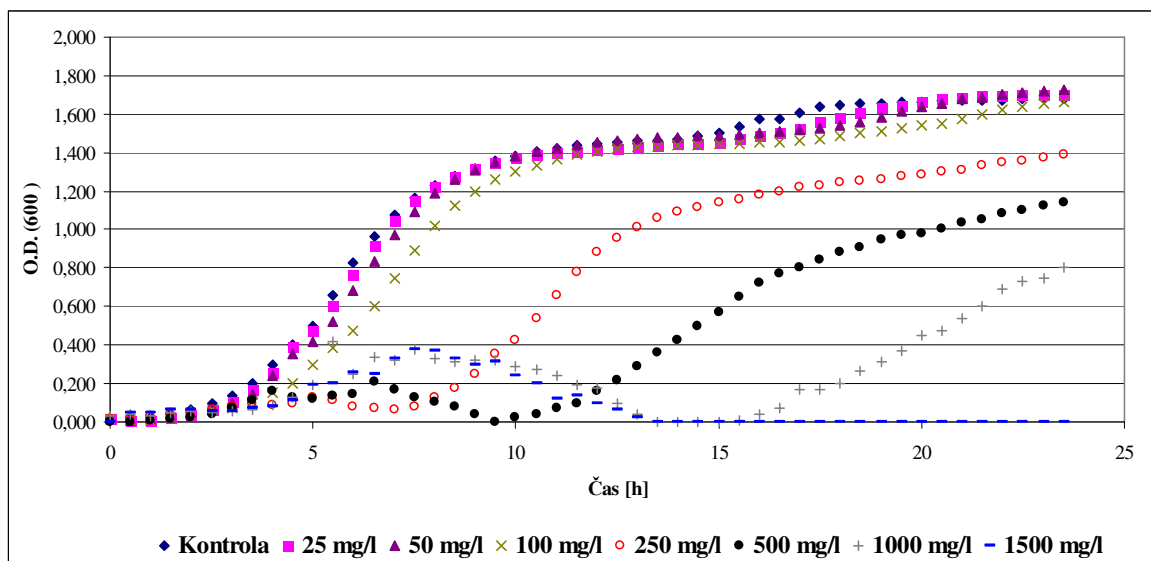


P. III. B. Specifická růstová rychlost *P. mirabilis* CCM 7188

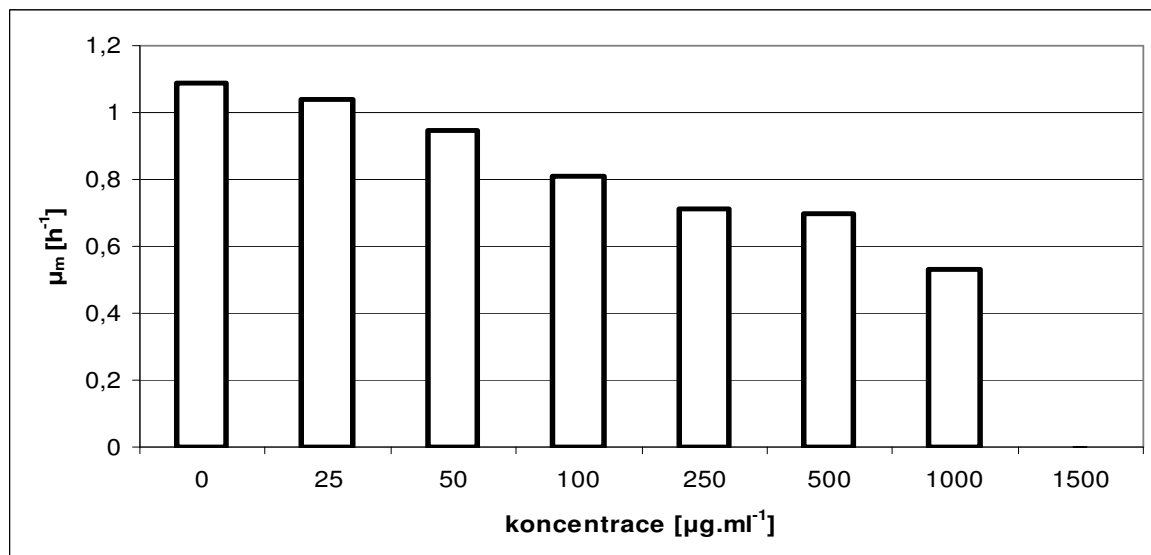


P. IV. ÚČINEK MONOLAURINU NA RŮST *P. AERUGINOSA* CCM 3955

P. IV. A. Vliv monolaurinu na růst *P. aeruginosa* CCM 3955

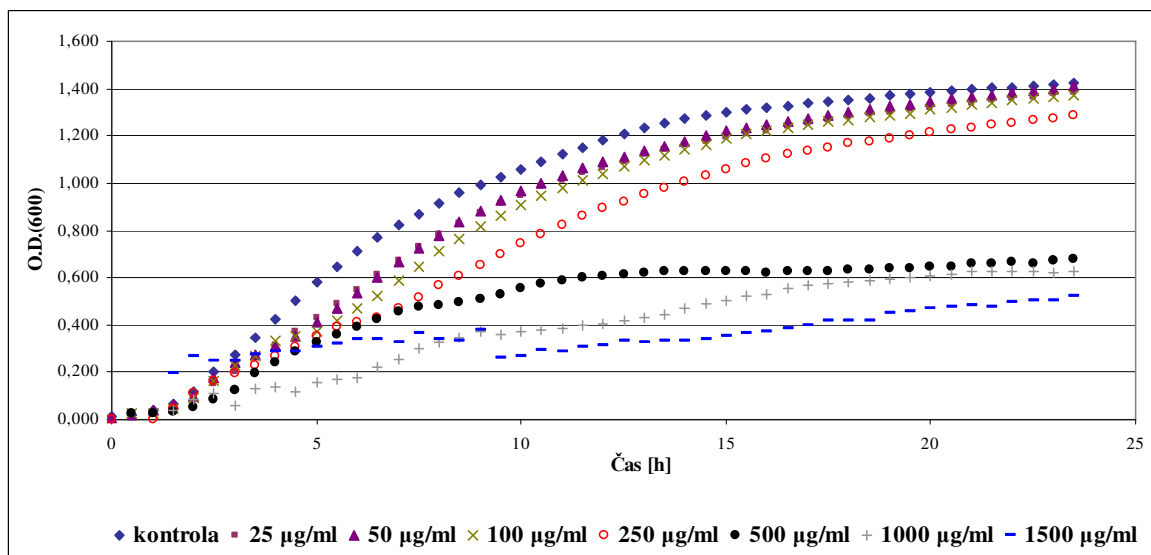


P. IV. B. Specifická růstová rychlost *P. aeruginosa* CCM 3955

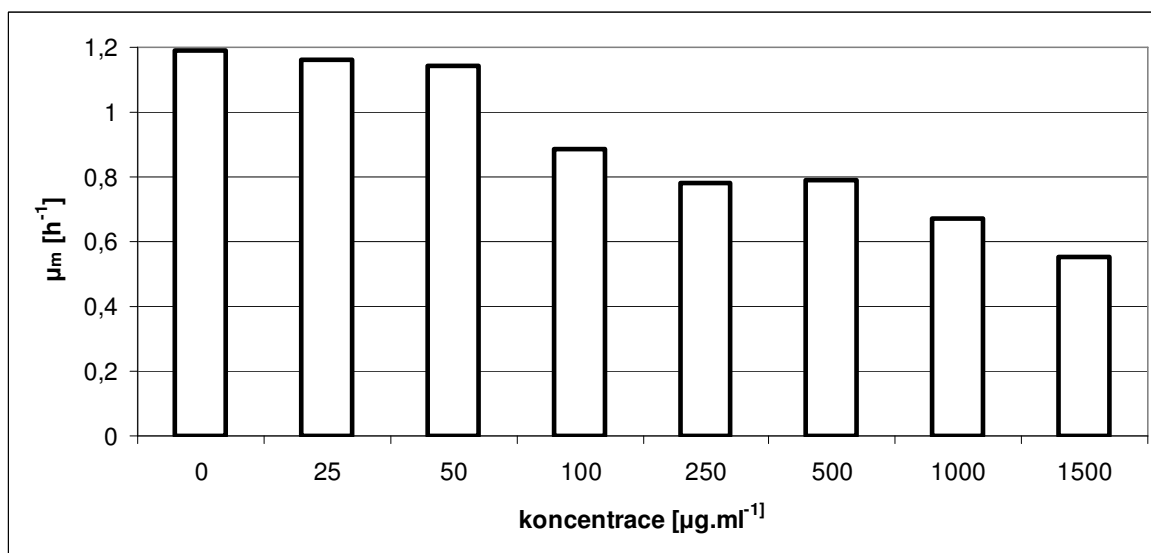


P. V. ÚČINEK MONOLAURINU NA RŮST *S. MARCESCENS* SUBSP. *MARCESCENS* CCM 303

P. V. A. Vliv monolaurinu na růst *S. marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303

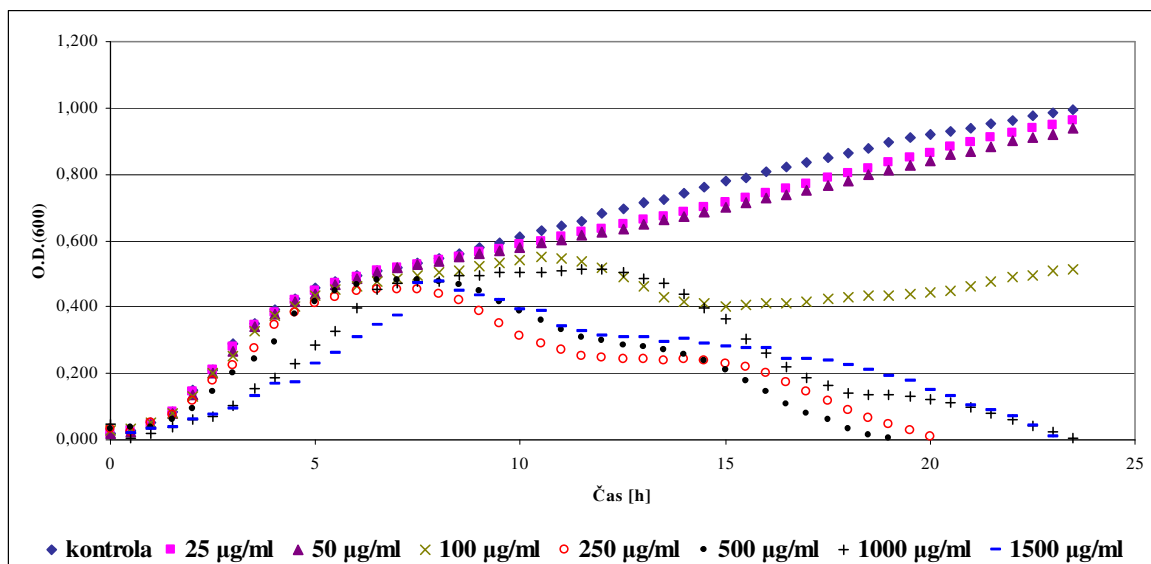


P. V. B. Specifická růstová rychlost *S. marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303

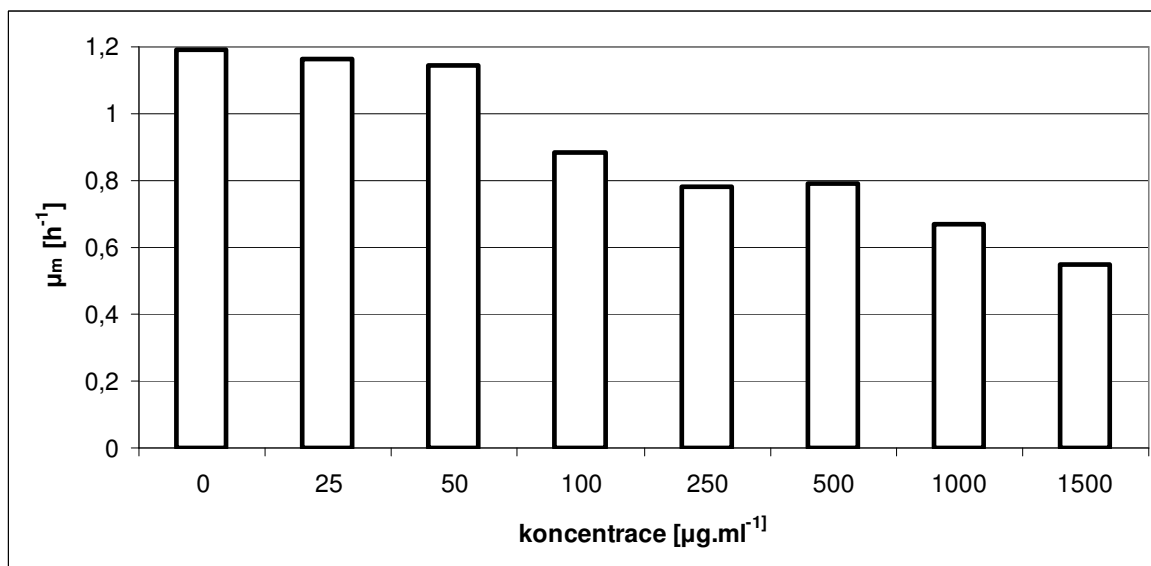


P. VI. ÚČINEK MONOLAURINU NA RŮST *S. ENTERICA* SUBSP. *ENTERICA* SER. ENTERITIDIS CCM 4420

P. VI. A. Vliv monolaurinu na růst *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

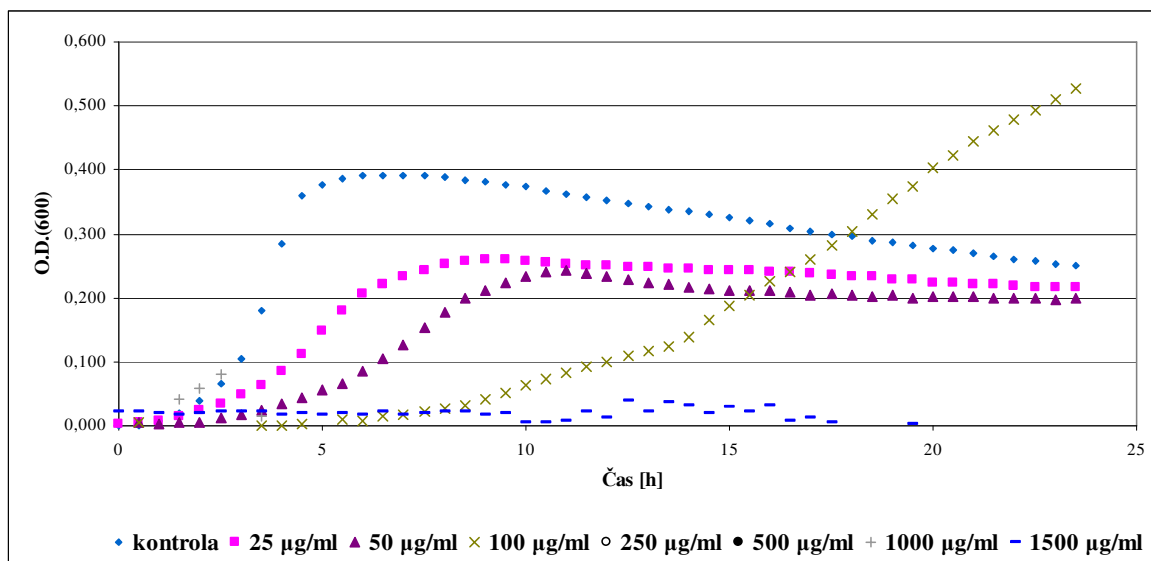


P. VI. B. Specifická růstová rychlost *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

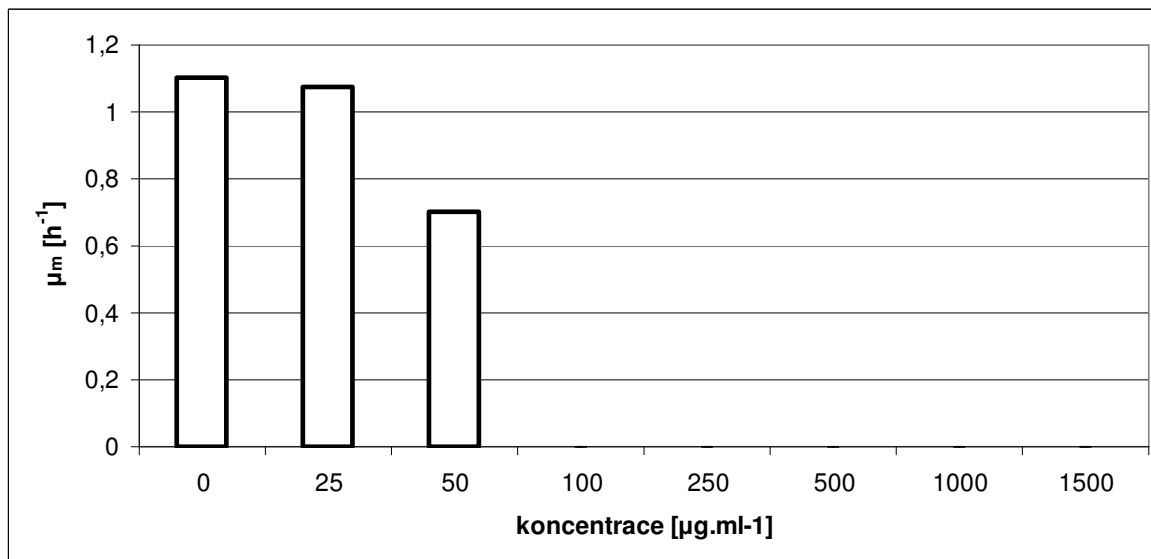


P. VII. ÚČINEK MONOLAURINU NA RŮST *E. FAECALIS* CCM 2665

P. VII. A. Vliv monolaurinu na růst *E. faecalis* CCM 2665

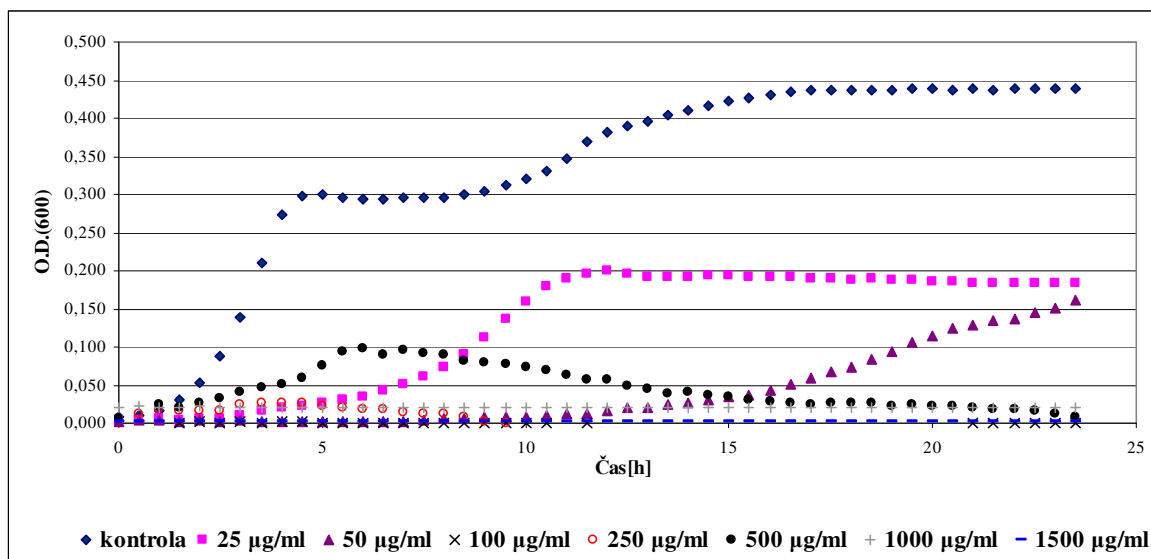


P. VII. B. Specifická růstová rychlost *E. faecalis* CCM 2665

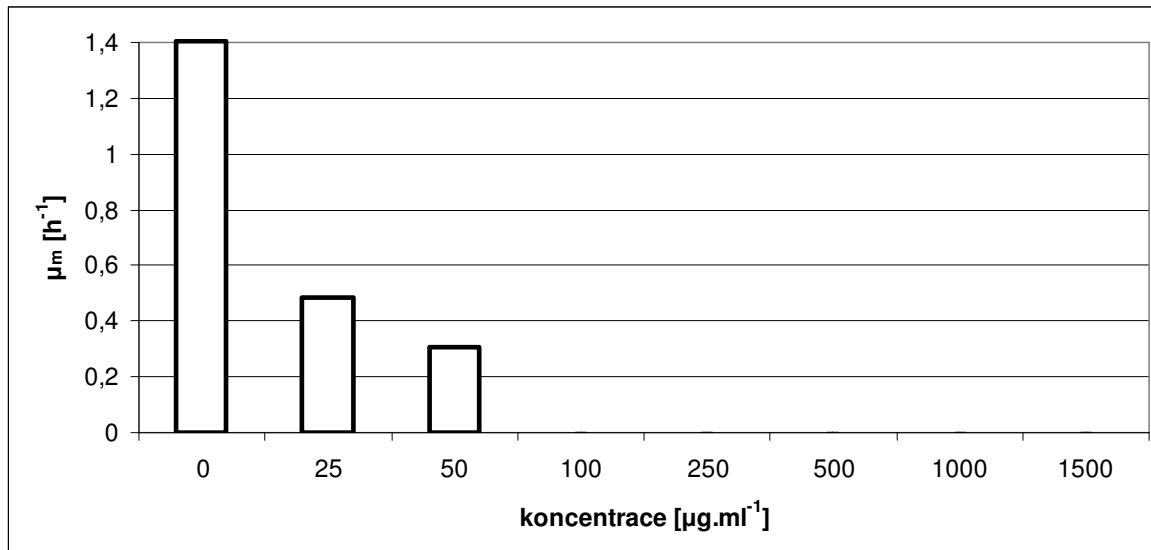


P. VIII. ÚČINEK MONOLAURINU NA RŮST *E. FAECALIS* CCM 4224

P. VIII. A. Vliv monolaurinu na růst *E. faecalis* CCM 4224

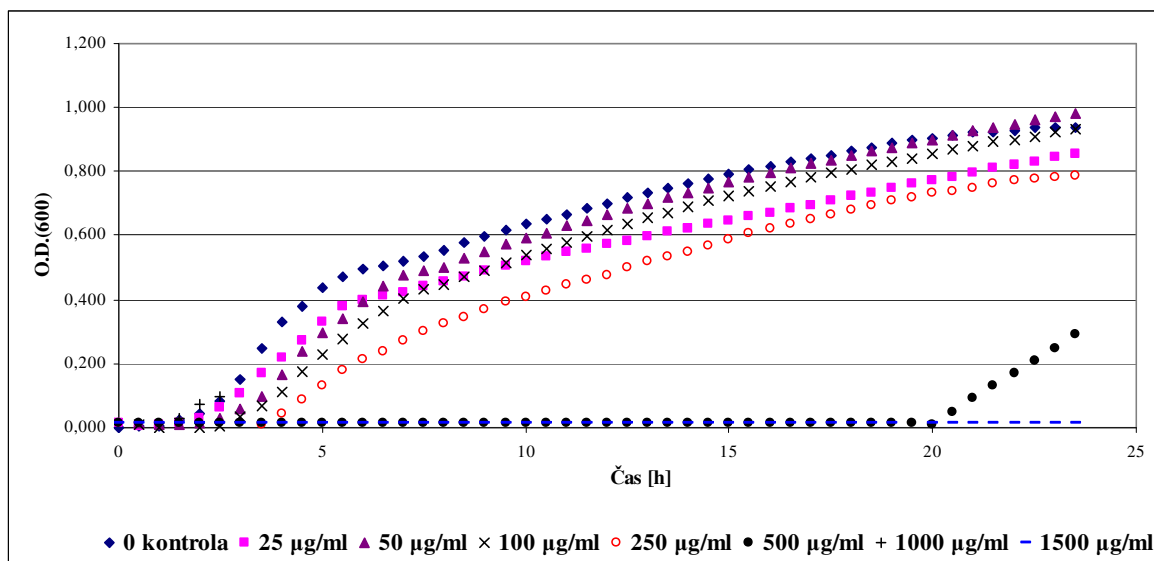


P. VIII. B. Specifická růstová rychlost *E. faecalis* CCM 4224

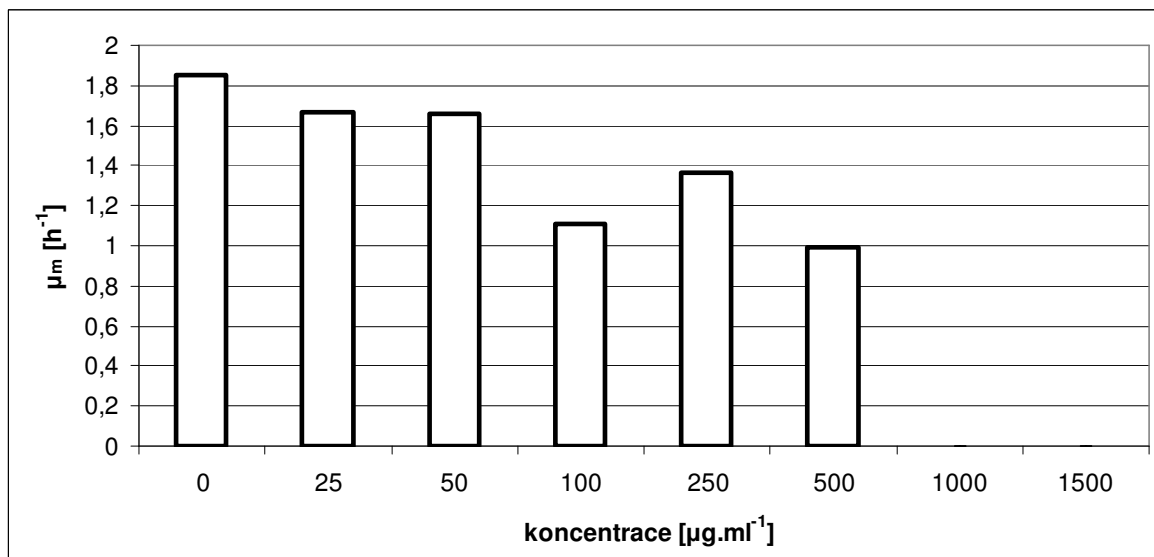


P. IX. ÚČINEK MONOLAURINU NA RŮST *E. FAECALIS* CCM 7247

P. IX. A. Vliv monolaurinu na růst *E. faecalis* CCM 7247

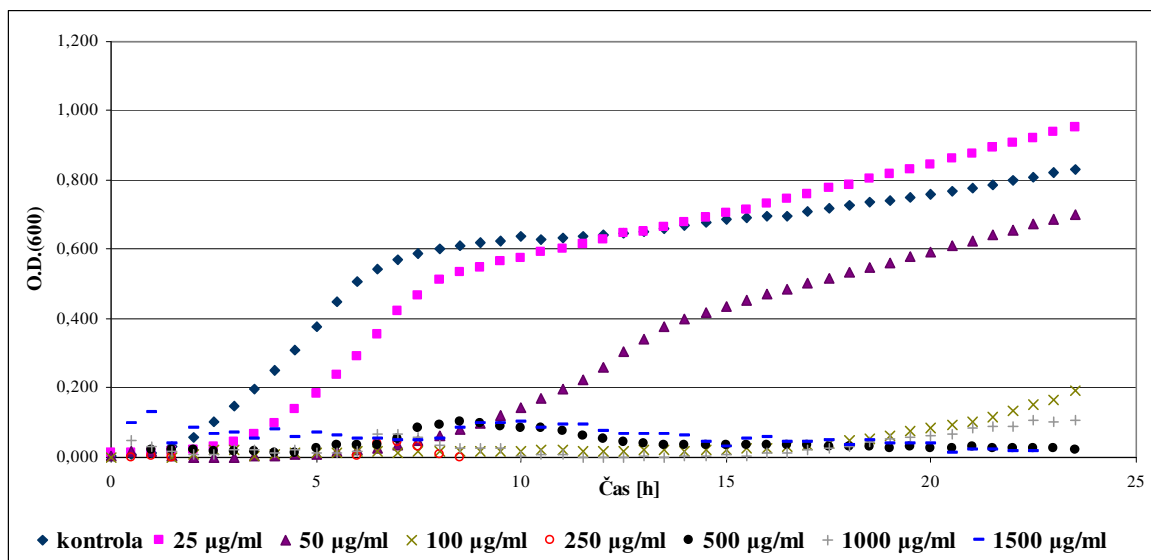


P. IX. B. Specifická růstová rychlost *E. faecalis* CCM 7247



P. XI. ÚČINEK MONOLAURINU NA RŮST *S. AUREUS* SUBSP. *AUREUS* CCM 3653

P. XI. A. Vliv monolaurinu na růst *S. aureus* subsp. *aureus* CCM 3653



P. XI. B. Specifická růstová rychlost *S. aureus* subsp. *aureus* CCM 732

