

Studium vybraných vlastností kmenů *Streptococcus thermophilus*

Bc. Hana Miklíková

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav biochemie a analýzy potravin
akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Hana MIKLÍKOVÁ**
Osobní číslo: **T080508**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Studium vybraných vlastností kmenů *Streptococcus thermophilus***

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika *Streptococcus thermophilus*.
2. Produkce exopolysacharidů.
3. Produkce ureázy a acidifikace.
4. Rezistence vůči antibiotikům.

II. Praktická část

1. Stanovení produkce exopolysacharidů kmeny *Streptococcus thermophilus*.
2. Schopnost kmenů *Streptococcus thermophilus* produkovat enzym ureázu.
3. Schopnost kmenů *Streptococcus thermophilus* acidifikovat prostředí.
4. Stanovení rezistence kmenů *Streptococcus thermophilus* vůči vybraným antibiotikům.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] GÖRNER, F., VALÍK, L'. Aplikovaná mikrobiologie požívatin, Bratislava 2004.

[2] DUBOC P., MOLLET B. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry, Switzerland 2001.

[3] DE VUYST L., ZAMFIR M. et al. Exopolysaccharide-producing Streptococcus thermophilus strains as functional starter cultures in the production of fermented milks, Belgium 2003.

[4] SALMINEN S. et al. Lactic Acid Bacteria, New York 2004.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Zuzana Vaňátková

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

4. ledna 2010

Termín odevzdání diplomové práce:

19. května 2010

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan




prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 3. 5. 2010


.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Diplomová práce se zaměřila na charakterizaci kmenů *Streptococcus thermophilus* dle vybraných vlastností důležitých z hlediska technologie a bezpečnosti potravin. Studovanými vlastnostmi jak v teoretické, tak praktické části byly produkce exopolysacharidů, produkce enzymu ureáza, schopnost acidifikace a rezistence vůči antibiotikům. Bylo zjištěno, že studované kmeny jsou z technologického i bezpečnostního hlediska vhodné k výrobě fermentovaných mléčných výrobků a to z důvodu technologicky významné produkce exopolysacharidů, které mohou přispět ke zlepšení textury a stabilizaci těchto výrobků. Dále bylo prokázáno, že studované kmeny *Streptococcus thermophilus* se řadily ke středně i vysoce okyselujícím druhům a také bylo zjištěno, že metabolismus močoviny nemá žádný vliv na acidifikační aktivitu daných kmenů. Poslední vlastností, která byla sledována, byla rezistence vůči antibiotikům, kdy byly dané kmeny určeny jako citlivé.

Klíčová slova: *Streptococcus thermophilus*, exopolysacharidy, ureáza, acidifikace, antibiotika

ABSTRACT

This thesis focused on the characterization of *Streptococcus thermophilus* strains according to chosen properties, that are important from technological and safety point of view. Exopolysaccharide production, production of the enzyme urease, acidification ability and resistance against antibiotics were the studied properties in both theoretical and practical part. It was found that the studied strains are both technological and safety point of view suitable for the manufacture of fermented dairy products because of the technologically significant products EPS, which can help improve texture and stabilization of these products. It was also shown that the studied strains belonged to *Streptococcus thermophilus* to medium and high acidifying species and found that the metabolism of urea has no effect on the acidification activity of the strains. The last feature that was observed was resistance to antibiotics, when the strains were identified as sensitive.

Keywords: *Streptococcus thermophilus*, exopolysaccharides, urease, acidification, antibiotics.

Chtěla bych poděkovat Ing. Zuzaně Vaňátkové, vedoucí mé diplomové práce, za odborné vedení, cenné rady, připomínky a odkazy na zdroje informací.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 CHARAKTERISTIKA RODU STREPTOCOCCUS	12
1.1 <i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i>	13
1.1.1 Charakteristika a výskyt bakterie <i>Streptococcus thermophilus</i>	13
1.1.2 Průmyslové využití bakterie <i>Streptococcus thermophilus</i>	14
2 EXOPOLYSACHARIDY	16
2.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA POLYSACHARIDŮ	16
2.2 CHARAKTERISTIKA EXOPOLYSACHARIDŮ.....	16
2.3 ROZDĚLENÍ EXOPOLYSACHARIDŮ.....	17
2.4 VÝZNAM EXOPOLYSACHARIDŮ	18
3 PRODUKCE UREÁZY	19
3.1 MOČOVINA (UREA).....	19
3.2 ENZYM UREÁZA	19
3.2.1 Ureázová aktivita u bakterie <i>Streptococcus thermophilus</i>	20
3.2.2 Vliv produkce ureázy na acidifikaci	20
4 ACIDIFIKACE	21
4.1 KYSANÉ MLÉČNÉ VÝROBKY A KYSACÍ SCHOPNOST	21
4.2 KYSELINA MLÉČNÁ JAKO KONEČNÝ PRODUKT KVAŠENÍ.....	21
4.2.1 Výskyt a vznik kyseliny mléčné	22
4.2.1.1 Fermentační postup.....	23
5 REZISTENCE VŮČI ANTIBIOTIKŮM	24
5.1 ANTIBIOTIKA.....	24
5.1.1 Dělení antibiotik.....	25
5.1.2 Účinek antibiotik.....	25
5.1.3 Postantibiotický účinek	26
5.1.4 Produkující kmeny	26
5.1.5 Použití antibiotik	26
5.2 ODOLNOST VŮČI ANTIBIOTIKŮM BAKTERIE <i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i>	28
5.3 JEDNOTLIVÁ ANTIBIOTIKA.....	28
5.3.1 Peniciliny.....	28
5.3.2 Streptomycin	29
5.3.3 Tetracykliny	29
5.3.4 Polypeptidy	30
5.3.5 Chloramfenikol, rifampicin.....	30
5.3.6 Fluorochinolony	30
5.3.7 Sulfonamidy	30
5.3.8 Antimykotika.....	30
II PRAKTICKÁ ČÁST	33
6 CÍL PRÁCE	34
7 MATERIÁL	35

7.1	POUŽITÉ MIKROORGANIZMY.....	35
7.2	KULTIVAČNÍ MÉDIA A ROZTOKY.....	36
7.2.1	Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu.....	37
7.3	KOMPONENTY PRO PCR.....	38
7.4	POUŽITÁ ANTIBIOTIKA.....	39
7.5	PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	40
8	METODY.....	41
8.1	METODY STANOVENÍ EXOPOLYSACHARIDŮ.....	41
8.1.1	Plotnová metoda s rutheinovou červení pro stanovení produkce exopolysacharidů.....	41
8.1.2	Stanovení exopolysacharidů metodou PCR.....	41
8.2	DŮKAZ PRODUKCE UREÁZY.....	43
8.2.1	Metoda dle Lanyi.....	43
8.3	ACIDIFIKAČNÍ AKTIVITA.....	43
8.3.1	Metoda dle Lombardi a kol.....	43
8.4	DŮKAZ REZISTENCE VŮČI ANTIBIOTIKŮM.....	44
8.4.1	Diskový difuzní test.....	44
9	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	45
9.1	PRODUKCE EXOPOLYSACHARIDŮ.....	45
9.1.1	Plotnová metoda s ruteinovou červení.....	45
9.1.2	Stanovení exopolysacharidů metodou PCR.....	48
9.2	DŮKAZ PRODUKCE UREÁZY.....	50
9.3	ACIDIFIKAČNÍ AKTIVITA.....	52
9.4	DŮKAZ REZISTENCE VŮČI ANTIBIOTIKŮM.....	55
	ZÁVĚR.....	60
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	61
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	67
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	68
	SEZNAM TABULEK.....	69

ÚVOD

Streptococcus thermophilus je grampozitivní fakultativně anaerobní bakterie. Tento mikroorganismus netvoří spory a je homofermentativní.

Poslední výzkumy odhalily, že *Streptococcus thermophilus* má vlastnosti, které ho činí komerčně nejdůležitějším ze všech bakterií mléčného kvašení (BMK). Je používán jako kultivační iniciátor pro výrobu některých kysaných mléčných produktů, včetně jogurtů nebo sýru Mozzarella.

Kombinace *Streptococcus thermophilus* s bakterií *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se tradičně používá k výrobě jogurtů. Dále se *Streptococcus thermophilus* uplatňuje při výrobě různých druhů sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou [1, 2]. Jednou z hlavních úloh *Streptococcus thermophilus* při fermentaci mléka je jeho rychlá přeměna laktózy na kyselinu mléčnou, což vede ke snížení pH a produkci metabolitů důležitých z hlediska technologie [3].

Streptococcus thermophilus hraje také důležitou roli jako probiotikum, zmírňuje příznaky laktózové intolerance a dalších gastro-intestinálních poruch.

Pro mlékárenský průmysl je důležitá schopnost *Streptococcus thermophilus* produkovat extracelulární polysacharidy. Tyto sloučeniny zlepšují texturu a reologické vlastnosti fermentovaných mléčných produktů jako jogurt, zakysaná smetana a nízkotučná Mozzarella [1, 4, 5].

Streptococcus thermophilus je jedinou bakterií mléčného kvašení vykazující výraznou ureázovou aktivitu [1]. Enzym ureáza je zodpovědný za rozložení močoviny obsažené v mléku na amoniak a oxid uhličitý, čímž zvyšuje pH mléka a prodlužuje čas fermentace [1, 6].

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA RODU STREPTOCOCCUS

Ve starším pojetí jejich klasifikace se rod *Streptococcus* dělí na šest skupin: pyogenní streptokoky, orální streptokoky, jiné streptokoky, anaerobní streptokoky, enterokoky a mléčné streptokoky. V novějším klasifikačním systému je rozdělení do výše uvedených skupin ponechané s výjimkou vynechání anaerobních streptokoků a povýšení enterokoků a mléčných streptokoků na samostatné rody: *Enterococcus* a *Lactococcus* [7].

Z rodu *Streptococcus* byly vyčleněny nehemolyzující nepatogenní druhy používané v mlékárenském průmyslu a byly zařazeny do nově vytvořeného rodu *Lactococcus*. Nejdůležitějším je druh *Lactococcus lactis* (z lat. lac = mléko), který je dále rozdělen na dva poddruhy, a to *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* [8].

Streptokoky tvoří sférické nebo vejčité buňky. Pokud rostou v tekutém médiu jsou uspořádány v párech, kratších či delších řetězcích. Jsou nepohyblivé, nesporulující, grampozitivní, většinou fakultativně anaerobní a kataláza negativní. Streptokoky rostou v rozmezí 25 – 45 °C, optimální teplota je 37 °C a při 10 °C již nerostou [9]. Neredukují dusičnan na dusitan [7, 10].

Bakterie rodu *Streptococcus* mají fakultativně anaerobní katabolický metabolismus a tvoří kyselinu mléčnou jako téměř jediný produkt metabolismu cukrů. Proto se zařazují mezi homofermentativní bakterie [8]. Streptokoky jsou náročné na živiny. Pro svůj růst tyto bakterie vyžadují aminokyseliny, peptidy, puriny, pyrimidiny a vitaminy. Pro optimální růst v syntetických živných médiích je potřebná glukóza nebo jiný fermentovatelný sacharid [9].

Rod *Streptococcus* zahrnuje druhy komenzální, parazitické až patogenní pro lidi a zvířata i saprofytické [9]. Některé nepatogenní streptokoky tvoří hlavní součást mikroflóry ústní dutiny [9].

Způsobuje hnisavá onemocnění, spálu, anginu, zubní kazy apod. Dále patogenní druhy rodu *Streptococcus* tvoří enzymy, které rozkládají červené krvinky a způsobují tak hemolýzu [8]. Saprofytické druhy se vyskytují v přírodě a v potravinách a mají významné využití v potravinářském průmyslu [9].

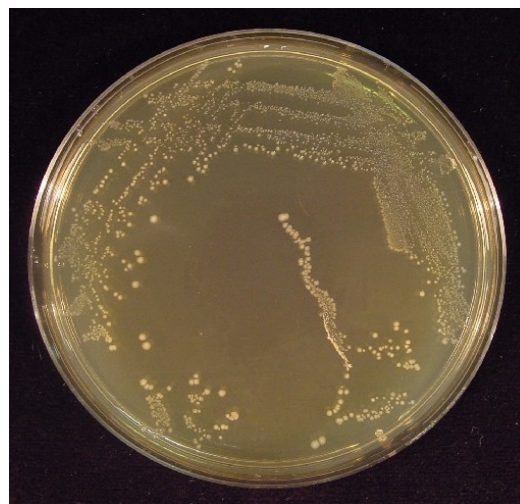
1.1 *Streptococcus thermophilus*

Čeleď *Streptococcaeae*

Buňky *Streptococcus thermophilus* jsou kulovité nebo oválné, zřídka prodloužené – tyčinkovitěho tvaru. Jsou sdružené v párech, krátkých nebo dlouhých řetězcích a tvoří tetrády. Jedná se o grampozitivní (Obr. 1.), nepohyblivé, fakultativně anaerobní, kataláza negativní bakterie [11]. Tyto bakterie neredukují dusičnany na dusitany. Vzhled kolonií (Obr. 2.) jednoho druhu může být ovlivněn teplotou, zdrojem dusíku i jinými látkami. Kolonie jsou od formy drsné až po mukoidní. Hloubkové kolonie mají diskovitý tvar s různě utvářenými okraji. Růst v bujónu je rovněž vzhledově proměnlivý, nikdy však netvoří na povrchu blanku. Jedná se o mikroorganismy chemoorganotrofní, jejichž metabolismus je fermentatorní, z cukrů tvoří především kyselinu mléčnou [9].



Obr. 1. Preparát bakterie *Streptococcus thermophilus* barvený podle Grama [12].



Obr. 2. Vzhled kolonií *Streptococcus thermophilus* na agarové živné půdě M17 [12].

1.1.1 Charakteristika a výskyt bakterie *Streptococcus thermophilus*

Kmeny *Streptococcus thermophilus* zkvašují glukózu, manózu, fruktózu a některé i sacharózu, trehalózu, manitol, melibiózu a ribózu [7, 13, 14]. Naopak sorbitol, rafinózu ani inulin kmeny *Streptococcus thermophilus* nezksvašují [13, 14]. Laktóza vstupuje do

buňky pomocí permeázy jako nefosforylovaný disacharid. Poté je laktóza těmito bakteriemi hydrolyzována pomocí β -galaktozidázy na glukózu a galaktózu [15]. Geny zahrnuté v metabolismu laktózy a galaktózy tvoří genový klastř na chromozomu *Streptococcus thermophilus* [1]. Glukóza je rozložena přes EMP dráhu na pyruvát, posléze laktát prostřednictvím laktátdehydrogenázy [7, 15, 16]. *Streptococcus thermophilus* produkuje dvě dehydrogenázy, čímž se liší od jiných mléčných bakterií, které taktéž mají více než jednu dehydrogenázu, ale tvoří DL-laktát [7, 20]. Volná galaktóza je uvolněna do vnějšího prostředí, kde se hromadí. Jakmile je všechna glukóza vyčerpána využívá *Streptococcus thermophilus* galaktózu dle Leloirovy dráhy.

Streptococcus thermophilus se přirozeně vyskytuje v mléce. Z tohoto důvodu je pro jeho kultivaci nejvhodnějším prostředím právě mléko, které sráží při 30 – 45 °C do druhého dne. Pokud kultivace probíhá v syntetických médiích, jsou zapotřebí vitaminy skupiny B a některé aminokyseliny pro maximální růst [7, 17]. *Streptococcus thermophilus* má omezenou schopnost využívat sacharidy. Přeměna laktózy na laktát při zvýšené teplotě je primární funkcí této bakterie při průmyslové fermentaci mléka. Na rozdíl od ostatních gram-pozitivních bakterií preferuje *Str. thermophilus* laktózu před glukózou jako hlavní zdroj uhlíku a energie [1].

1.1.2 Průmyslové využití bakterie *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus thermophilus je jedním z průmyslově nejvýznamnějších druhů rozsáhlé skupiny bakterií mléčného kvašení [17, 18, 19]. Využívá se při výrobě jogurtů jako startovací kultura složená ze *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Tyto dvě bakterie jsou ve vzájemné symbióze. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* rozkládá kasein na příslušné peptidy a aminokyseliny, které pak ke své výživě využívá *Streptococcus thermophilus*. *Streptococcus thermophilus* zase tvoří kyselinu mléčnou a mravenčí. Kyselina mléčná snižuje pH prostředí na optimum pro růst bakterie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a kyselina mravenčí její růst stimuluje [7, 18, 20].

Dále je *Streptococcus thermophilus* využíván k výrobě sýrů s vysokodohřivanou sýřeninou švýcarského a italského typu (Ementál, Mozzarella, Cheddar, Parmazán, Brick sýr, Provolon, Asiaga). *Streptococcus thermophilus* je aplikován buď samostatně nebo v kombinaci s několika laktobacily a mezofilními kulturami, např. *Lactobacillus helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aj. [1, 3, 18, 20]. Termofilní bakterie mléčného kvašení mají také rozhodující úlohu při zrání tvrdých sýrů řeckého typu

vyráběných z ovčího a kozího mléka. Postavení zmíněných bakterií u těchto typů sýrů je založeno na uplatnění vysoké teploty ohřevu sýřeniny při výrobě. Vytvořená kyselina mléčná slouží nejen jako ochranná složka, ale také jako vhodný substrát pro následující fermentaci propionové kyseliny významnou pro sýry švýcarského typu. Při tomto typu fermentace se navíc tvoří charakteristická oka [21].

2 EXOPOLYSACHARIDY

2.1 Obecná charakteristika polysacharidů

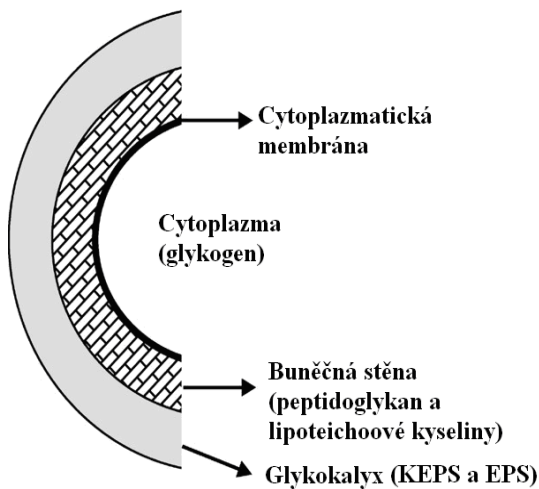
Polysacharidy (PS) jsou vysoce rozmanitá skupina polymerů, lišící se molekulární hmotností, typem vazeb, stupněm větvení a chemickou stavbou. Výsledkem je velký počet různých druhů biomolekul. Tato diverzita nabízí množství aplikací polysacharidových polymerů v potravinářském průmyslu a jako zdraví prospěšné látky. Všeobecně se PS dělí na strukturní a nestrukturní. Strukturní PS jsou součástí strukturních a stavebních materiálů u rostlin, hmyzu nebo bakterií (např. celulóza, pektin, chitin, murein). Nestrukturní PS (škrob, glykogen a inulin) většinou slouží jako zásobárny energie. Mnohé PS jsou využívány v potravinářském průmyslu jako zahušřovadla, stabilizátory, tvarovací a želatinační činidla. Jsou běžně získávány z rostlin (škrob, pektin) a mořských řas (alginát). PS mohou být syntetizovány nejen rostlinami a řasami, ale také mnoha druhy mikroorganismů, včetně kvasinek a bakterií. V dnešní době usiluje potravinářský průmysl o vyvinutí multifunkčních potravních doplňků, které nejen poskytnou požadované vylepšení struktury potravin, ale také budou mít přídavné nutriční vlastnosti. Tyto požadavky vedou k rozsáhlým výzkumům týkajících se porozumění strukturních a funkčních vztahů PS. Získané znalosti jsou předpokladem pro syntézu PS uzpůsobených pro určité aplikace v potravinářském i nepotravinářském průmyslu [22].

2.2 Charakteristika exopolysacharidů

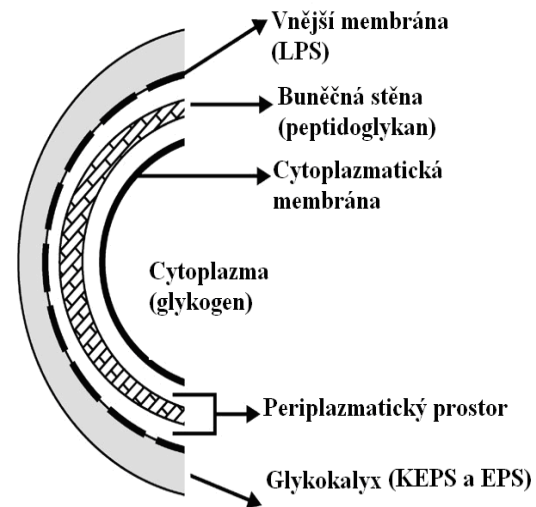
Schopnost produkovat PS je mezi bakteriemi značně rozšířená. Mohou jednat syntetizovat zásobní PS, jako glykogen, který se nachází v cytoplazmě, a jednat strukturní PS buněčné stěny. Jedná se o peptidoglykan a lipoteichoové kyseliny u gram pozitivních bakterií a lipopolysacharidy (LPS) vnější membrány u gram negativních bakterií. Některé bakterie sekretují polysacharidovou vrstvu na svém povrchu, která spolu s menším množstvím glykoproteinů tvoří glykokalyx. Extracelulární polymery mohou být buď kapsulární exopolysacharidy (KEPS), které jsou kovalentně vázány s povrchem buňky, nebo exopolysacharidy (EPS), které tvoří slizovou vrstvu, volně připojenou k buněčnému povrchu nebo exkretovanou do okolí (Obr.3.) [23].

Řada BMK, propionibakterií a bifidobakterií může syntetizovat exopolysacharidy [24].

Grampozitivní bakterie



Gramnegativní bakterie



Obr. 3. Lokalizace polysacharidů produkovaných grampozitivními a gramnegativními bakteriemi [23].

EPS mohou působit jako stabilizátory, látky upravující texturu a látky zvyšující viskozitu konečného výrobku [25]. Hydratační voda a interakce s ostatními mléčnými složkami, jako jsou proteiny a micely, posilují stabilitu kaseinu. Následkem EPS může dojít ke snížení synergeze a zlepšení stability produktu. Kromě toho bylo zjištěno, že EPS mohou pozitivně ovlivnit střevní mikrofloru [25].

2.3 Rozdělení exopolysacharidů

Polysacharidy se dělí na dvě skupiny: homopolysacharidy (HoPS), které jsou složeny pouze z jedné monosacharidové jednotky, jako je např. dextran nebo levan, a heteropolysacharidy (HePS), složeny z různých sacharidových jednotek např. galaktóza, rhamnóza, mannóza, N-acetylglukózamin, N-acetylgalaktózamin nebo glukuronová kyselina.

Chemické složení EPS mezofilních a termofilních bakterií mléčného kvašení se různí v závislosti na konkrétním kmenu. Taktéž byla zaznamenána variabilita molekulové hmotnosti strukturně identických polymerů [1, 4]. Například *Streptococcus thermophilus* LY03 produkoval vysokomolekulární i nízkomolekulární EPS [29]. De Vuyst a kol. [16] ve své práci zjistili, že všechny zkoumané kmeny *Streptococcus thermophilus* syntetizovaly EPS složeny z galaktózy a glukózy, jejichž poměr se u jednotlivých kmenů lišil a pohyboval se v rozmezí 3:1 až 4:1. Dále potvrdili intracelulární hydrolýzu laktózy kmeny *Streptococcus*

thermophilus na glukózu a galaktózu. Glukóza byla zcela přeměněna na kyselinu mléčnou a galaktóza byla vyloučena do vnějšího prostředí. Avšak část galaktózy (po přeměně na glukózu) byla zahrnuta do syntézy EPS. To by mohlo vysvětlit pouze malé rozdíly mezi množstvím mléčné kyseliny a galaktózy. Autoři vypožorovali, že EPS se tvořily hlavně v exponenciální fázi růstu [29].

HoPS jsou syntetizované pomocí enzymů patřících do skupiny glykozytransferáz [22]. Enzymy řídí skládání monosacharidů mimo buňku a požadují jako substrát sacharózu, která poskytuje energii pro elongaci. HoPS se dále dělí do dvou skupin: fruktany a glukany. Fruktany zahrnují levanové a inulinové typy HoPS, zatímco ke glukánům je řazen dextrans, mutan, alteran a β -1,3 glukán [24].

Syntéza HePS je úzce spojena s uhlíkovým metabolismem a s produkcí aktivovaných cukrů v buňce. Skládání prekurzorů (opakujících se jednotek) HePS se uskutečňuje pomocí specifických glykozytransferáz, které připojují aktivované cukry k rostoucímu prekurzoru. Ten je spojen s lipidovým nosičem, pravděpodobně umístěným v membráně. Prekurzory HePS jsou následně přenášeny přes membránu a sestavované mimo buňku [24].

2.4 Význam exopolysacharidů

Přírodní EPS z potravin produkující BMK se využívají v potravinářském průmyslu jako přídatné látky. Extracelulární polysacharidy jsou důležité při výrobě mléčných výrobků, především jogurtů, kysaných mlék, sýrů a mléčných dezertů [31, 32], kde zvyšují viskozitu rozmíchaného koagulátu a snižují vylučování syrovátky [33]. Bakterie produkující EPS, slizotvorné kmeny – tzv. ropy strains byly např. použity ve skandinávských zemích k přirozenému zahustění mlék. Doba tvorby gelu – viskozity závisí na schopnosti acidifikace kmenů, zatímco pH gelu závisí především na přítomnosti exopolysacharidů [34]. Polotekutá struktura jogurtů je výsledkem vzniku trojrozměrné proteinové sítě vznikající během kvašení. Gelová konzistence jogurtů vzniká v souvislosti se snížením pH na 5,6, což způsobuje změny v micelární struktuře. Další snížení hodnoty pH způsobuje složitější a rozsáhlejší propojení kaseinových částic, což vede k vytvoření proteinové sítě, čímž je dána struktura jogurtu [35]. Kromě toho bylo zjištěno [31], že EPS mají antitrombotickou, protinádorovou nebo imunomodulační aktivitu [31], mají za následek snížení cholesterolu v krvi a posilují kolonizaci probiotických bakterií v trávicím traktu [36].

3 PRODUKCE UREÁZY

3.1 Močovina (urea)

Urea je konečný produkt odbourávání bílkovin, přesněji dusíku a aminokyselin. Jedná se o nízkomolekulární látku syntetizovanou v játrech a vylučovanou převážně ledvinami. Je volně difuzibilní přes biologické membrány a je distribuována v celkové tělesné vodě. Stanovuje se v séru, v moči a dalších tělesných tekutinách [37].

Urea je diamid kyseliny uhličitě, karbamid, chemický vzorec je NH_3CONH_2 . Je to bezbarvá krystalická látka (m. h. 60,06 g/mol, teplota tání 132,7 °C), slabě hygroskopická, velmi snadno rozpustná ve vodě, bez náboje, roztoky reagují neutrálně. V silně kyselém prostředí se chová jako velmi slabá jednosytná báze, poskytuje tzv. soli uronia, které při zředění vodou hydrolyzují. Urea lze štěpit alkalickou hydrolyzou i enzymaticky (ureáza) za vzniku CO_2 a NH_3 , silnými oxidačními prostředky se štěpí na CO_2 , N_2 a H_2O . Tavením se odštěpuje NH_3 a vzniká biuret $\text{NH}_2\text{CONHCONH}_2$ (tzv. biuretova reakce, používaná k analytickému stanovení dvou a více peptidových vazeb, tj. ke stanovení peptidů a bílkovin, má název podle této sloučeniny, která také poskytuje pozitivní reakci s biuretovým činidlem – alkalickým roztokem Cu^{2+}) [37].

Z hlediska toxicity patří urea mezi látky velmi slabě nebezpečné (nefrotoxická účinnost, celková smrtící dávka pro člověka je 100 – 1000 g), používá se jako diuretikum, snáší se v dávkách až několik desítek gramů denně.

Močovina je také nejvýznamnějším dusíkatým hnojivem rostlin v řadě zemí (Čína, Indie, USA) [37].

3.2 Enzym ureáza

Enzym ureáza je obecně rozšířeným enzymem u rostlin a je přítomen u řady eukaryotických mikroorganismů a bakterií, u vyšších živočichů nebyla prokázána. Enzym ureáza hraje klíčovou roli v katalýze rozkladu močoviny za vzniku oxidu uhličitěho a amoniaku. Ureáza je enzym, který vykazuje absolutní substrátovou specifitu, což znamená, že hydrolyzuje pouze močovinu a nereaguje s žádnou jinou sloučeninou (ani se substituívanými močoviny nebo biuretem). Pro stanovení aktivity enzymu byla vypracována řada přímých i nepřímých analytických metod. Nejběžnější jsou detekce amoniaku reakcí s indofenolem, stanovení 14 CO_2 a řada enzymatických reakcí spojených se spektrofotome-

trickým měřením oxidace NADPH. Ureázu můžeme získat přímou extrakcí ze semen některých vyšších rostlin a takto získaný preparát lze použít k rozkladu močoviny [38].

3.2.1 Ureázová aktivita u bakterie *Streptococcus thermophilus*

Produkce ureázy je běžná u bakterie *Streptococcus thermophilus*. Ureáza zajišťuje odolnost vůči působení kyseliny mléčné tím, že zpomaluje pokles pH mléka a sýrů v důsledku tvorby amoniaku. Produkce ureázy byla nedávno u bakterie *Streptococcus thermophilus* popsána a bylo zjištěno, že podobná produkce tohoto enzymu je u taxonomicky související bakterie *Streptococcus salivarius* [39]. Výrobní závody zjistily pozitivní produkci ureázy u používaných startovacích kultur, což je nežádoucí vlastnost díky zpomalování fermentace mléka při výrobě zakysaných mléčných výrobků [56].

3.2.2 Vliv produkce ureázy na acidifikaci

Mezi mechanismy stresové reakce hraje produkce ureázy roli v ochraně některých mikroorganismů před škodlivými účinky kyselého prostředí. Tato ochrana spočívá ve zvýšení pH prostředí jako důsledek přeměny močoviny na amoniak a CO₂. Vztah mezi aktivitou ureázy a schopností měnit pH byl dokázán u *Helicobacter pylori*, *Streptococcus mutans* a *Streptococcus salivarius*. V případě BMK používaných jako startovací kultury se ureázová aktivita vyskytuje u bakterie *Streptococcus thermophilus*. Nicméně ureázová aktivita negativně ovlivňuje acidifikační vlastnosti v průběhu fermentace mléka díky změněnému pH [39].

4 ACIDIFIKACE

4.1 Kysané mléčné výrobky a kysací schopnost

Od pradávna byla známa schopnost mléka zkysnout, a tak prodloužit jeho trvanlivost. Kysané mléčné výrobky mají značně nízké pH, mezi 3,0 až 4,5, vodní aktivita je kolem 0,98 a obsah živin tvoří tuk a peptidické látky vzniklé štěpením bílkovin. Laktóza je zkvašena na organické kyseliny, hlavně mléčnou, a někdy dochází i k vývinu plynů ve formě bublinek. Obsah kyseliny mléčné se pohybuje kolem 1 %. Významná je přítomnost vysokých denzit kulturní mikroflóry, ve které dominují laktobacily a mléčné streptokoky. Tato mikroflóra je nejen technologicky významná, ale chrání výrobek před napadením jinou mikroflórou. Výrobky dodávají konzumentům mléčné bílkoviny v natrávené, snadněji vstřebatelné formě a příznivě ovlivňují jejich střevní mikroflóru [40].

Mléko určené pro zpracování na kysané mléčné výrobky nesmí obsahovat inhibiční látky, např. antibiotika, která by brzdila růst kulturní mikroflóry. Zákysy, čili startéry, používané v technologii, musí být čisté a aktivní [40].

Základem technologie je přidávání zákysu do mléka obsahující kulturní mikroflóru. Ta se pomnoží a svou metabolickou činností výrazně změní sensorické a jiné vlastnosti mléka. Kritickými body výroby jsou čistota zákysů, udržování odpovídajících teplot a dob během kysání a plnění do obalů a lahví. U řady výrobků se kysání děje již v obalech určených pro expedici a prodej [40].

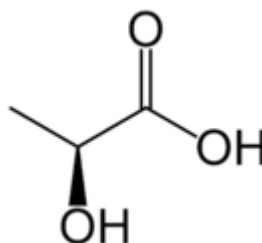
Každý výrobek má obsahovat svoji charakteristickou mikroflóru. Změny lze snadno zjistit sensoricky, popřípadě můžeme provést mikrobiologický rozbor. Přítomnost kulturní mikroflóry hodnotíme jako pozitivní indikátor, který nejen že určuje jakost, ale i zdravotní nezávadnost. Salmonely jsou kulturní mikroflórou inhibovány, a proto se nevyskytují. Kyselé prostředí inhibuje i ostatní nežádoucí mikroflóru [40].

4.2 Kyselina mléčná jako konečný produkt kvašení

Kyselina mléčná (kyselina 2-hydroxypropionová) (Obr. 4), je široce používaná kyselina v potravinářském, farmaceutickém a chemickém průmyslu. Má jeden asymetrický uhlíkový atom, a může se tedy vyskytovat ve dvou opticky aktivních formách. L-mléčná kyselina je pravotočivá a bývá přítomna v mase a vnitřnostech, kde vzniká při tělesné námaze z glykogenu. Tvoří se také při mléčném kvašení cukru, například mikroorganizmem *Lacto-*

bacillus bulgaricus [41]. Levotočivá D-mléčná kyselina vzniká při kvašení cukru jinými mikroorganismy (například: *Bacterium aerogenes*). Opticky inaktivní D,L-mléčná kyselina (racemická) se rovněž tvoří během kvašení za určitých podmínek. Technicky se získává působením mikroorganismu *Lactobacillus delbrueckii* [41]. Bakteriím produkujícím kyselinu mléčnou se dostává v posledních letech velké pozornosti. Zejména kvůli jejich rychlému růstu a vysoké schopnosti produkce této kyseliny [42].

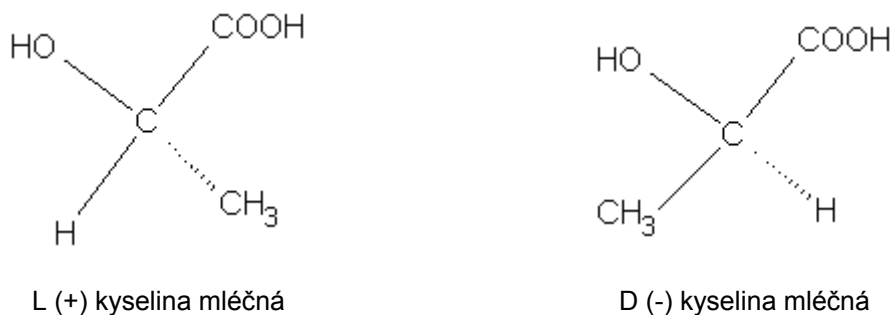
Tato organická kyselina je především používána jako přirozený konzervační prostředek. Nachází se v potravinách, kde dochází ke tvorbě kyseliny mléčné v důsledku přítomnosti BMK. Těmito potravinami např. jsou: různé naložené zeleniny, kysané zelí, kysaná mléka a další zakysané mléčné produkty [43].



Obr. 4. Strukturální vzorec kyseliny mléčné [44].

4.2.1 Výskyt a vznik kyseliny mléčné

Kyselina mléčná je přirozená složka masa. Vzniká v průběhu postmortálních změn. Enzymovou přeměnou svalového glykogenu v anaerobním prostředí. Zdrojem pro vznik je glykogen přirozeně přítomný ve svalovině, ze kterého vzniká glukózo-6-fosfát, jenž přes řadu meziproduktů přechází na kyselinu pyrohroznovou redukující se na kyselinu mléčnou. Množství kyseliny mléčné, které se tak vytvoří, závisí na koncentraci glykogenu, a tedy na fyzickém stavu jatečných zvířat těsně před porážkou [45, 46, 47, 48]. Přirozený obsah kyseliny mléčné v masě je asi 10 g/kg. Toto množství přispívá k chuti masa a k jeho antimikrobiálním vlastnostem [49]. Přirozená kyselina mléčná se ve svalovině vyskytuje ve formě L(+), tj. pravotočivé, zatímco syntetická kyselina mléčná obsahuje oba optické izomery, je to tedy racemát, směs kyseliny L(+) a D(-) (Obr. 5.) Do potravin je možné přidávat jen její přirozenou formu [45].



Obr. 5. Optické izomery L(+) a D(-) kyseliny mléčné [50].

4.2.1.1 Fermentační postup

Fermentace, neboli kvašení, je proces přeměny látek - obvykle sacharidů, za působení mikroorganismů na látky jiné. Kyselina mléčná vzniká v důsledku metabolických aktivit mikroorganismů, v tomto případě se jedná o anaerobní proces, tedy probíhající bez přístupu kyslíku. Fermentačního procesu lze použít i při výrobě jiných organických látek jako etanol nebo kyselina octová [51].

Kyselina mléčná vyrobená biologickou cestou může být vysoce stereospecifická (jen L nebo D stereoizomer). Záleží na tom, jaký výchozí materiál a která kultura mikroorganismů se použije pro kvašení [50].

Při fermentaci je nezbytné dodržovat správnou teplotu a pH prostředí, dodávat bakteriím živiny a zamezit přístupu vzduchu. Existuje mnoho druhů bakterií, lišících se podmínkami, které při rozkladu požadují. Některé jsou velmi náchylné k jejich změnám, jiné zase odolnější. Také druh rozkládaného materiálu (sacharidu) je důležitý, protože každý druh bakterie dokáže štěpit jen určité látky [50].

5 REZISTENCE VŮČI ANTIBIOTIKŮM

5.1 Antibiotika

Antibiotika jsou látky mikrobiálního původu, které ve velkém zředění mají schopnost zastavovat růst, případně inaktivovat bakterie a jiné mikroorganismy. Většina používaných antibiotik působí převážně na bakterie a většina produkčních organismů patří mezi plísňe a aktinomycety [52].

Od výroby prvních několika málo desítek mg nečistého penicilinu v r. 1940 až dodnes, kdy výroba antibiotik přesahuje tisíc tun ročně, uplynulo několik desítek let. Ve výrobě a výzkumu antibiotik se již dosáhlo určité hranice, za kterou bude další rozvoj pomalejší. Dosud je známo několik set antibiotik a pro praktické použití se jich vyrábí ve větších množstvích okolo 30 [52].

Antibiotika mají velký význam ve zdravotnictví, veterinářství, v zemědělství, potravinářství, ale i v technice. V samotném mikrobiologickém průmyslu znamenají vznik nové submerzní technologie fermentace a uskutečnění některých izolačních metod, které byly předtím známy pouze v laboratořích. S rozvojem výroby antibiotik je spojený i rozvoj bioinženýrství [52].

V současné době existuje na trhu asi 150 druhů antibiotik. Vzhledem k požadavkům kontrolních úřadů léčiv, vysokým nákladům na vývoj a výrobu jsou ceny některých antibiotik velmi vysoké a nové preparáty mohou zavádět jen finančně nejsilnější společnosti. Lze říci, že mnohdy lze stejného léčebného efektu dosáhnout i levnějším preparátem [52].

Ne každá látka s antimikrobním účinkem se může používat jako lék. Prvním pochopitelným požadavkem na antibiotikum je, že nesmí poškozovat eukaryotní buňky. Musí tedy splňovat požadavek selektivní toxicity, přičemž účinek na eukaryotní buňky musí být zanedbatelný, nebo, nejlépe, žádný. Přesně vzato, žádné antibiotikum není pro makroorganismus zcela neškodné, neboť není tělu vlastní. Dalším požadavkem je, aby účinkovalo v nízkých koncentracích, řádově v mg/l, a aby těchto hladin dosahovalo přiměřeně brzy. Existuje řada dalších, velmi přísných farmakologických požadavků. Antibiotika jsou nejčastěji produkty půdních mikroorganismů. Svým selektivním účinkem jsou nástrojem přežívání druhu v dané ekologické oblasti. Produkující druhy jsou chráněny před jejich účinkem produkcí enzymů, které antibiotika štěpí [53].

5.1.1 Dělení antibiotik

Antibiotika je možné rozdělit podle více hledisek. Podle spektra účinku vůči mikroorganizmům se dělí na antibiotika s úzkým a širokým spektrem a dále na antibakteriální, antifungální, antiprotozoální a cytostatická antibiotika. Další dělení je podle mechanismu účinku (podle toho, zda inhibují syntézu buněčné stěny, proteosyntézu, syntézu nukleových kyselin aj.), podle producentů (plísňové, bakteriální, z aktinomycet a z jiných organismů), podle použití a také podle chemického složení [52].

5.1.2 Účinek antibiotik

Účinek látky difundující do agaru kolem náhodně vyrostlé kolonie plísně *Penicillium notatum* na kolonie stafylokoků popsal Alexander Flemming ve dvacátých letech. Až dodnes se na tomto principu ozřejmuje antimikrobiální aktivita látek.

Naočkují-li se bakterie do tekuté půdy, růst se projeví zákalem. Za přítomnosti antibiotika se při vhodné vysoké koncentraci půda nezakalí. Vyočkuje-li se nezakalená půda na agar, při pouhém bakteriostatickém účinku vyrostou na agaru bez antibiotika kolonie. Při baktericidním účinku jsou původně do půdy vnesené bakterie usmrceny a kolonie na agaru již nevyrostou.

Orientačně lze účinek antibiotika na bakterie a jeho míru sledovat na agarové plotně. Disk nasycený roztokem antibiotika o vhodné koncentraci se položí na plotnu, na níž jsou hustě naočkovány bakterie. Plotna se inkubuje v termostatu. Antibiotikum difunduje radiálně do agarového gelu. Na živné půdě vyrostou kolonie všude, kde není antibiotikum v inhibiční koncentraci. Tak se v určité vzdálenosti od okraje disku vytvoří inhibiční zóna. Průměr zóny závisí i na citlivosti testovaného kmene. Závisí však i na difuzi antibiotika a na hustotě inokula. Difuze závisí na molekulové hmotnosti a na elektrickém náboji antibiotika, na koncentraci, viskozitě a kvalitě agaru, na teplotě inkubace a dalších okolnostech. Pouze při standardizaci všech faktorů lze usuzovat na stupeň citlivosti mikroba [53].

Podle průměru zón se s použitím standardního kmene se známou citlivostí určuje koncentrace antibiotik v roztocích, v séru a tělesných tekutinách [53].

Na agarové plotně lze také demonstrovat vzájemné ovlivnění účinku dvou antibiotik. Účinek antibiotik v kombinaci může být synergický nebo antagonický. Teoretický význam kombinace antibiotik je zřejmý, kombinace se v terapii podává zejména s cílem rozšíření

spektra účinnosti léčby a dosažení baktericidního účinku. Pro aplikaci je však nutno mít na zřeteli i mechanismus účinku a farmakologické vlastnosti antibiotika [53].

5.1.3 Postantibiotický účinek

Po odstranění mikroba z prostředí, kde jeho růst byl potlačen, pokračuje ještě částečný inhibiční účinek i bez přítomnosti antibiotika. Tento jev se nazývá postantibiotický účinek. U grampozitivních koků lze tento účinek pozorovat *in vitro* u všech antibiotik včetně β -laktamů, zatímco u gramnegativních bakterií u β -laktamů, s výjimkou karbapenemů, daný jev nenastává. Postantibiotický efekt trvá různě dlouho, většinou od 120 minut do pěti hodin. Doba závisí na mikrobiálním druhu, na druhu antibiotika, na jeho koncentraci a délce předchozí expozice. Nastává jen po předchozí expozici antibiotiku v minimální inhibiční koncentraci a vyšší. Je doprovázen prodloužením generační doby, strukturálními cytologickými změnami a snížením biochemické aktivity. Definuje se jako čas potřebný k desetinásobnému vzrůstu počtu buněk po odečtení doby nutné stejnému vzrůstu v kontrolní kultuře. Lze ho prokázat také *in vivo* s výjimkou penicilinů u streptokoků a imipenemu u *Pseudomonas aeruginosa*. Lze předpokládat příznivý účinek v léčbě při přechodném snížení účinné koncentrace [53].

5.1.4 Produkující kmeny

Produkující kmeny získáváme tzv. screeningem z přírody a dalším šlechtěním. Screening předpokládá izolaci až tisíců kmenů mikroorganismů. Mikroorganismy, které produkují účinné látky se naočkují na tekutou půdu a pomocí vhodných testovacích kultur (např. pro cytostatická antibiotika je možné použít specifické mutanty anebo lyzogenní kultury) a chromatografických metod se zjistí spektrum účinku antibiotik a potom s určitou pravděpodobností se může posoudit, zda kmen produkuje již známé látky [52].

5.1.5 Použití antibiotik

Převážná většina antibiotik se používá v medicíně na léčení infekčních chorob, protože antibiotika v nízkých koncentracích účinně potlačují růst mikroorganismů, přičemž nepoškozují makroorganismus [52].

Základní požadavky pro chemoterapeutické látky jsou tyto [52]:

- 1) vysoká účinnost, tj. nízká mikrobicidní a mikrobistatická koncentrace,
- 2) účinnost se nemá snižovat tělesnými tekutinami,

- 3) látka má mít rychlý účinek a nemá vyvolávat rychlejší vznik rezistence mikroorganismů, jako potlačení jejich růstu,
- 4) nemá být toxická akutně ani chronicky,
- 5) nemá rušit tvorbu protilátek, ani fagocytózu,
- 6) nemá inhibovat regeneraci tkání.

Z praktického hlediska je možné ještě dodat dva další požadavky: účinná látka by se měla jednoduše aplikovat a levně vyrábět. Ani jedno antibiotikum není z těchto hledisek ideální, a proto musí pokračovat intenzivní výzkum nových antibiotik a chemoterapeutik na celém světě [52]:

- a) Lékařské použití. Podle toho, zda antibiotikum působí na určité skupiny mikroorganismů a nebo na mikroorganismy taxonomicky poměrně odlišné, hovoříme o antibiotikách s úzkým a se širokým spektrem účinku. Doteď používaná antibiotika účinkují převážně na bakterie, zvláště na grampozitivní. Méně antibiotik se může používat na léčení houbových (kvasinkových a plísňových) infekcí a kromě některých velkých virů zatím nepoznané látky, použitelné na léčení virových infekcí. Poměrně málo antibiotik potlačí i prvoky. Některá antibiotika se používají na dočasné potlačení rozvoje rakoviny.

V lékařské praxi se nejčastěji používají peniciliny, streptomyciny, tetracyklinová antibiotika, chloramfenikol, polypeptidická antibiotika (bacitracin, polymyxin), erytromycin, v menším množství i antifungální antibiotika (grizeofulvin). Často se kombinují i s chemoterapeutiky, případně se střídají. I přes velký úspěch léčby antibiotiky se vyskytují negativní jevy. V první řadě je to vznik rezistentních forem mikroorganismů, které nabývají schopnost odolávat účinku antibiotika. Toto je hlavní důvod, proč lékaři nabádají k velké opatrnosti při mimoléčebném použití antibiotik (jako přísady do krmiva a na prodloužení skladovatelnosti potravin).

- b) Použití antibiotik v zemědělství. Kromě využití antibiotik ve veterinárním lékařství se postupně zavádí i jejich aplikace ve fytopatologii. Potlačují především houbové infekce rostlin. Nejvíce se používají jako přísady do krmiv a to hlavně tetracyklinová antibiotika, penicilín a bacitracin.

- c) Použití antibiotik v potravinářství. V potravinářství se antibiotika, především tetracykliny, používají na prodloužení skladovatelnosti masa, ryb a masových výrobků, popř. i mléka, ale ve většině států se toto použití antibiotik zakazuje [52].

5.2 Odolnost vůči antibiotikům bakterie *Streptococcus thermophilus*

Je mnoho druhů řadících se do rodu *Streptococcus*, ale pouze *Streptococcus thermophilus* je technologicky významný. Nicméně je málo dostupných informací o antibiotické rezistenci tohoto druhu. *Streptococcus thermophilus* je obvykle citlivý vůči chloramfenikolu, tetracyklinu, erytromycinu a ciprofloxacinu. Naproti tomu má střední až vysokou rezistenci k aminoglykozidům – gentamicinu, kanamycinu a streptomycinu [54].

5.3 Jednotlivá antibiotika

Přehled jednotlivých antibiotik je uveden v Tab. 1.

5.3.1 Peniciliny

Přirozený penicilin reprezentovaný penicilinem G, je účinný na pyogenní koky, anaerobní bakterie s výjimkou *Bacteroides fragilis*, na *Treponema pallidum* a aktinomycety. Nevýhodou je citlivost k β -laktamázám [53].

Peniciliny rezistentní k β -laktamázám, meticilin a oxacilin se užívají zejména k léčbě infekcí stafylokoky, jež produkují penicilinázu. Takových kmenů je dnes většina.

Původní penicilinová molekula byla postupně modifikována, aby se získaly užitečnější farmakologické vlastnosti, hlavně však širší spektrum účinnosti. Skupina penicilinů s rozšířeným spektrem účinnosti zahrnuje dle struktury aminopeniciliny, ureidopeniciliny a karboxypeniciliny.

Semisyntetické aminopeniciliny, označované jako peniciliny druhé generace, ampicilin a amoxicilin, jsou již účinné na enterokoky, hemofily, listerie a některé fermentující gramnegativní tyčinky (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, salmonely a shigelly). Jsou však citlivé k β -laktamázám, které se přirozeně vyskytují u některých druhů gramnegativních tyčinek. Neúčinkují na *Pseudomonas aeruginosa* [53].

Proto byla vyvinuta skupina karboxypenicilinů, carbenicilin a tikarcilin, které účinkují proti většině kmenů *Pseudomonas aeruginosa* i *Proteus mirabilis*. Označují se také jako pro-

tipseudomonádové peniciliny nebo peniciliny třetí generace. Dnes se užívá jen ticarcilin, a to výhradně při pseudomonádových infekcích, velmi často v synergické kombinaci s aminoglykosidy.

Čtvrtá generace penicilinů, ureidopeniciliny, zahrnuje azlocilin, mezlocilin a piperacilin. V principu se účinkem podobají tikarcilinu, jsou *in vitro* účinnější u většího počtu kmenů pseudomonad, u skupiny *Enterobacteriaceae*, a citlivá je i většina klebsiel a anaerobní *Bacteroides fragilis*. Při léčbě se však vyšší účinnost této skupiny nepotvrdila [53].

5.3.2 Streptomycin

Streptomycin chemicky patří mezi oligosacharidové deriváty. Jeho molekulu tvoří tři základní složky: inozitový derivát, streptidin, streptóza a *n*-methyl-*L*-glukózamin. Disacharid z dvou posledních se nazývá streptobiózamin. Kromě tohoto streptomycinu, nazývaného, *streptomycin A*, biosynteticky vznikají i jiné streptomyciny: *Streptomycin B* je manozido-streptomycin. *Streptomycin C* má zase hydroxylovou methylskupinu streptózy. Jestliže redukuje *streptomycin A* vodíkem katalyticky, dostáváme dihydrostreptomycin, ve kterém je aldehydická skupina streptózy zredukovaná na alkoholovou. [52].

Streptomycin se vyrábí pomocí kultur *Streptomyces griseus* na půdách s glukózou (2,5 %), sójovou moučkou (4 %), suchými lihovarskými výpalky (0,5 %), s obsahem 0,25 % NaCl. Hodnota pH půdy před sterilizací je 7,3 až 7,5, fermentační teplota je 24 až 30 °C, optimální pH při fermentaci je 7,6 až 8,0. Potřebné je zabezpečit dostatečné větrání a provzdušňování. V prvních stádiích fermentace vzniká *streptomycin B*, který má pouze asi jednu pětinu účinku *streptomycinu A*, a proto je nežádoucím produktem. Během fermentace však koncentrace tohoto *streptomycinu B* klesá, a proto se předpokládá, že by mohl být posledním meziproduktem biosyntézy streptomycinu. Po ukončení fermentace (asi 100 hodin) se půda okyselí na pH 2, mycelium se odfiltruje, filtrát se zneutralizuje a po další filtraci se streptomycin zachytí na karboxylovém ionexu. Z něho se eluuje zředěnou kyselinou, adsorpce a eluce se opakuje a po zahuštění ve vakuu se z roztoku vysráží streptomycin přidavkem nadbytku methanolu. Takový způsob izolace a čištění je podmíněný i charakterem streptomycinu (trojsytná organická zásada) [52].

5.3.3 Tetracykliny

Širokospektrá bakteriostatická antibiotika oxytetracyklin, chlortetracyklin, doxycyklin a minocyklin mají shodnou aktivitu. *In vitro* účinkují na grampozitivní i gramnegativní

bakterie. Pouhý bakteriostatický účinek je však nevýhodou, proto je jejich použití omezeno. Využívá se citlivosti brucel, rickettsií, chlamydií, *Mycoplasma pneumoniae*, aktinomycet [53].

5.3.4 Polypeptidy

Kolistin, případně polymyxin B, byly vyhrazeny pro léčbu infekcí *Pseudomonas aeruginosa*, která je k těmto antibiotikům přirozeně citlivá. Přirozeně rezistentní jsou *Proteus* a *Serratia* [53].

5.3.5 Chloramfenikol, rifampicin

Chloramfenikol, rifampicin jsou nezařazená antibiotika. Chloramfenikol je širokospektré bakteriostatické antibiotikum. Užívá se cíleně k léčbě rickettsióz a břišního tyfu, při zánětu mozkových blan a smíšených bakteriálních infekcích a jako rezervní antibiotikum pro hemofilové infekce. Lze využít jeho aktivity na bakteroidy včetně *Bacteroides fragilis*[53].

5.3.6 Fluorochinolony

Fluorochinolony jsou chemoterapeutika s příznivými antimikrobiálními a farmakologickými vlastnostmi. Byly jich vyvinuty více než dvě desítky, ale jen některé jsou užívány: kromě jiných ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin [53].

5.3.7 Sulfonamidy

Účinkují na některé gramnegativní tyčinky (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*), na *Streptococcus pyogenes*, *Nocardia asteroides*, *Chlamydia pneumoniae* a na parazita *Toxoplasma gondii* [53].

5.3.8 Antimykotika

Používají se při léčbě u nás nejčastějších infekcí vyvolaných kandidami, *Cryptococcus neoformans*, při aspergilózách a infekcích dermatofyty. Antimykotická terapeutika jsou amphotericin B, flucytosin a azoly – flukonazol, ketokonazol a itrakonazol. Terapeutické užití se řídí farmakologickými vlastnostmi a preferenčním specifickým účinkem [53].

Tab. 1. Přehled antibiotik [53].

β-laktamy	peniciliny	přirozené peniciliny	penicilin G	penicilin V				
		peniciliny rezistentní k β-laktamázám	xacilin	naftilin	cloxacilin	dicloxacilin	fluoxacilin	
		aminopeniciliny	ampicilin	amoxicilin/klavulanát	amoxicilin	ampicilin/subactam		
		peniciliny protipseudomonádové	ticarcilin	ticarcilin/subactam	mezlocilin	piperacilin		
	cefalosporiny	cefalosporiny 1. generace	cefalotin	cefazolin	cefalexin			
		cefalosporiny 2. generace	cefuroxim	cefuroxim axetil	cefamandol	cefoxitin	cefactor	
		cefalosporiny 3. generace	ceftriaxon	cefotaxim	celoperazon	ceftazidim	moxalactam	
		cefalosporiny 4. generace	cefepim	cefpirom				
	karbapenemy		imipenem	meropenem				
	monobactamy		aztreonam					
aminoglykosidy			streptomycin	kanamycin	gentamicin	tobramycin	netilmicin	amikacin

Pokračování Tab. 1.

tetracykliny			tetracyklin	doxycyklin	minocyklin			
makrolidy			erythromycin	roxitromycin	azitromycin	josamycin		
linkosamidy			linkomycin	clindamycin				
glykopeptidy			vancomycin	teicoplanin				
chinolony			ciprofloxacin	norfloxacin	ofloxacin	perfloxacín	lomefloxacin	
antimykotika			amphotericin b	ketoconazol	fluconazol	clotrimazol	flucytosin	miconazol
			chloramfenikol					
			spectinomycin					
			rifampin					
			colistin					
			fusidová kyselina					
sulfonamidy			sulfametoxazol	sulfonamid/ trimetoprim				

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo studium vybraných vlastností kmenů bakterie *Streptococcus thermophilus*. Mezi tyto vybrané vlastnosti patřily produkce exopolysacharidů, produkce enzymu ureáza, schopnost acidifikace a rezistence vůči antibiotikům.

7 MATERIÁL

7.1 Použité mikroorganismy

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

- ✓ *Streptococcus thermophilus* CCDM 7
- ✓ *Streptococcus thermophilus* CCDM 45
- ✓ *Streptococcus thermophilus* CCDM 55
- ✓ *Streptococcus thermophilus* CCDM 69
- ✓ *Streptococcus thermophilus* CCDM 70
- ✓ *Streptococcus thermophilus* CCDM 126
- ✓ *Streptococcus thermophilus* CCDM 128
- ✓ *Streptococcus thermophilus* CCDM 129
- ✓ *Streptococcus thermophilus* CCDM 130
- ✓ *Streptococcus thermophilus* CCDM 131
- ✓ *Streptococcus thermophilus* CCDM 224

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

- ✓ *Streptococcus thermophilus* CCM 4757

7.2 Kultivační média a roztoky

Množství jednotlivých složek potřebných k přípravě uvedených kultivačních médií je přepočteno na 1 litr destilované vody. Média byla připravena rozpuštěním daných složek v destilované vodě a následnou sterilizací v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

✓ M17 bujón:

39,21 g	M17 Broth (Oxoid Ltd., Velká Británie)
100 ml	10% glukóza (Lachema a.s., Česká republika)
52 ml	10% laktóza (Lachema a.s., Česká republika)

✓ M17 agar:

39,21 g	M17 Broth (Oxoid Ltd., Velká Británie)
15 g	agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
100 ml	10% glukóza (Lachema a.s., Česká republika)
52 ml	10% laktóza (Lachema a.s., Česká republika)

✓ Agarové živné médium s rutheinovou červení:

5 g	kvasničný extrakt (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
100 g	sušené odstředěné mléko (Promil a.s., Česká republika)
10 g	sacharóza (Lachema a.s., Česká republika)
15 g	agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
0,08 g	rutheinová červeně (Sigma-Aldrich, USA)

✓ Tekuté médium pro ureázovou aktivitu:

roztok A:

2 g	urea (Sigma-Aldrich, USA)
-----	---------------------------

2 ml ethanol (Ing. Petr Lukeš, Česká republika)

4 ml sterilní destilovaná voda

roztok B:

1 g KH_2PO_4 (Ing. Petr Lukeš, Česká republika)

1 g K_2HPO_4 (Ing. Petr Lukeš, Česká republika)

5 g NaCl (Ing. Petr Lukeš, Česká republika)

20 $\mu\text{g/ml}$ fenolová červeň (Lachema a.s., Česká republika)

✓ Fyziologický roztok:

8,5 g NaCl (Ing. Petr Lukeš, Česká republika)

7.2.1 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu

✓ TAE pufr (Tris-acetátový pufr):

121 g TRISMA-base (Sigma, USA)

50 ml 0,5 M EDTA (pH 8, Lach. – Ner. s.r.o., Česká republika)

28,55 ml ledová kyselina octová (Lachema a.s., Česká republika)

Jednotlivé složky byly doplněny destilovanou vodou do 0,5 l a roztok byl vysterilizován při 121 °C 15 minut.

✓ Nanášecí pufr:

10 mg bromfenolová modř (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)

600 μl 10% SDS (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)

1,2 ml glycerol (PENTA, Ing. Petr Švec, Česká republika)

Vše bylo doplněno do 10 ml destilovanou vodou.

- ✓ Agarózový gel (1,5%)

3 g agaróza pro elektroforézu DNA (SeaKem, USA)

200 ml 1x koncentrovaný TAE pufr

- ✓ Ethidiumbromid (10 mg/ml, SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)

7.3 Komponenty pro PCR

- ✓ dNTP směs (10 mM, PCR dNTP mix, Top-Bio s.r.o., Česká republika)
- ✓ *Taq* DNA polymeráza (5000 U/ml, Biolabs, Velká Británie)
- ✓ Reakční pufr (10x koncentrovaný, Thermopol Buffer B9004S, Biolabs, Velká Británie)
- ✓ MgCl₂ (10 mM, Top-Bio s.r.o., Česká republika)
- ✓ primery viz. Tab. 2.

Tab. 2. Oligonukleotidy primerů aplikovaných k určení přítomnosti *eps* genů.

Prime-ry	Sekvence nukleotidů (5'-3')	Reference
<i>epsD/E</i> f	TCATTTTATTCGTAAAACCTCAATTGAYGARY TNCC	[55]
<i>epsD/E</i> r	AATATTATTACGACCTSWNAYYTGCCA	
<i>epsAf</i>	TAGTGACAACGGTTGTACTG	
<i>epsAr</i>	GATCATTATGGACTGTCAC	

7.4 Použitá antibiotika

- ✓ Ampicilin A¹⁰ (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
- ✓ Clindamycin CD² (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
- ✓ Erythromycin E⁵ (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
- ✓ Gentamicin G¹²⁰ (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
- ✓ Streptomycin S¹⁰ (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
- ✓ Tetracyklin T¹⁰ (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)

7.5 Přístroje a pomůcky

- ✓ Běžné laboratorní sklo a mikrobiologické vybavení
- ✓ Biohazard box EUROFLOW EF/S, Clean Air, Holandsko
- ✓ Centrifuga laboratorní - chlazená Z 300 K, HERMLE, Labortechnik, Německo
- ✓ Fotoaparát PANASONIC LS80, Japonsko
- ✓ Fotoaparát PowerShot G6 Canon, Japonsko
- ✓ Denzitometr DENZI-LA-METER, EMO Česká republika
- ✓ Inkubátor mikrobiologický Memmert, Německo
- ✓ Mikropipety: Nichipet (Japonsko), Hirschmann Laborgerate (Německo), Eppendorf
- ✓ Mikrovlnná trouba Electrolux EMM 2005, Švédsko
- ✓ Parní sterilizátor VARIOKLAV 75S, 135S, H+P Labortechnik, Německo
- ✓ pH metr HANNA pH 211 Fisher Scientific, spol. s r.o., Česká republika
- ✓ Předvážky KERN 440-47N (Max 2000 g, d = 0,1 g), Německo
- ✓ Reseach (Fisher Scientific, Velká Británie), BioHit (Fisher Scientific, Velká Británie)
- ✓ Stomacher, Seward, Velká Británie
- ✓ Termoblok Bio TDB-100, Biotech, Česká republika
- ✓ Termocykler DNA Engine, Biotech, Česká republika
- ✓ Termostat BT120, Česká republika
- ✓ Transiluminátor Biotech (dokumentační systém pro elektroforézu), Česká republika
- ✓ Vortex Heidolph REAX top, Německo
- ✓ Zařízení pro elektroforézu model B1A, OWL Separation Systems, Inc., USA
- ✓ Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Major Science MP-300N, Taiwan

8 METODY

8.1 Metody stanovení exopolysacharidů

8.1.1 Plotnová metoda s ruteinovou červení pro stanovení produkce exopolysacharidů [56]

- 1) Bylo připraveno živné médium navážením jednotlivých komponent, uvedených v kapitole 7.2.
- 2) Jednotlivé složky, uvedené v kapitole 7.2. byly smíchány s destilovanou vodou a živná půda byla vysterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.
- 3) Po sterilizaci bylo živné médium rozlito do sterilních Petriho misek a po utužení a předsušení byly na povrch této živné půdy naočkovány jednotlivé kmeny *Streptococcus thermophilus*.
- 4) Naočkované Petriho misky byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin.
- 5) Po této době byla hodnocena produkce exopolysacharidů dle barvy kolonií - růžové až bílé zbarvení – slizotvorné kmeny, červené zbarvení – negativní produkce exopolysacharidů

8.1.2 Stanovení exopolysacharidů metodou PCR

PCR reakční směs:

- ✓ 17,3 µl destilovaná voda
- ✓ 0,5 mM dNTP mix (Top-Bio, Česká republika)
- ✓ 0,8 µl každého primeru
- ✓ 2,5 mM MgCl₂ (Top-Bio, Česká republika)
- ✓ 2,5 µl reakční pufr (NEB BioLabs, USA)
- ✓ 1 U *Taq* polymeráza (NEB BioLabs, USA)
- ✓ 2 µl bakteriální DNA

PCR program pro primery epsD/Ef,r:

- 1) 1 cyklus 94 °C – 5 min,
- 2) 5 cyklů 94 °C – 30 s, 62 °C – 30s, 72 °C – 30s,
- 3) 40 cyklů 94 °C – 30 s, 52 °C – 30 s, 72 °C – 30s,
- 4) 1 cyklus 72 °C – 5 min.

PCR program pro primery epsAf,r

- 1) 1 cyklus 94 °C – 5 min,
- 2) 35 cyklů 94 °C – 15 s, 40 °C – 30s, 72 °C – 1 min,
- 3) 1 cyklus 72 °C – 5 min.

Příprava agarózového gelu (1,5%)

- 2) Bylo naváženo 3 g agarózy a přidáno 200 ml 1x koncentrovaného TAE pufru.
- 3) Směs byla rozvařena v mikrovlnné troubě.
- 4) Po zchlazení na 45 °C byly přidány 3 µl ethidiumbromidu (EtBr).
- 5) Takto připravený agarózový gel byl nalit do předem nachystané formy s hřebínkem a nechal se zatuhnout ve vodorovné poloze při laboratorní teplotě.
- 6) Po zatuhnutí byl hřebínek opatrně odstraněn.

Elektroforéza:

- 1) Připravený gel byl vložen do elektroforetické vany a zalit 1x TAE puftrem tak, aby byl celý gel ponořen.
- 2) Do první jamky gelu bylo nanášeno 15 µl 100 bp DNA markeru.
- 3) Do ostatních jamek bylo nanášeno 12 µl vzorku smíchaného s 3 µl nanášecího pufru.
- 4) Elektroforetická vana byla připojena ke zdroji elektrického napětí a elektroforéza byla spuštěna.

Vizualizace DNA:

- 1) Po proběhnutí elektroforézy byl gel vyjmut z elektroforetické vany a umístěn na transiluminátor.
- 2) Transiluminátor byl spuštěn a gel se prohlížel v UV světle přes plexisklo.
- 3) Pro dokumentaci byl gel vyfotografován.
- 4) Molekulové hmotnosti bandů DNA byly vypočítány programem UltraQuant (Ultra.Lum, USA).

8.2 Důkaz produkce ureázy

8.2.1 Metoda dle Lanyi [56]

- 1) Smícháním předepsaných složek, uvedených v kapitole 7.2. byly připraveny roztoky A a B.
- 2) Roztoky A a B byly smíchány v poměru 1:19 a vzniklé médium bylo rozpipetováno do zkumavek po 5 ml.
- 3) Po přípravě média byla nabrána plná sterilní očkovací klička čerstvě narostené kultury, která byla rozsuspendována v daném médiu.
- 4) Poté proběhla inkubace 1 – 2 hodiny při 37 °C.
- 5) Poté byla pozorována změna barvy média z oranžové na červenofialovou, což značí pozitivní reakci produkce ureázy daným kmenem.

8.3 Acidifikační aktivita

8.3.1 Metoda dle Lombardi a kol. [57]

- 1) Do 10 ml sterilního odstředěného mléka bylo inokulováno 2% inokulum čerstvě narostených kultur v bujónu M17.
- 2) Zkumavky byly po zaočkování inkubovány při 37 °C do vzniku koagulace.

- 3) Do sterilních infuzních lahví bylo odměřeno 50 ml sterilního obnoveného odstředěného mléka, kdy jedna sada lahví byla s přídavkem 10% kvasničného extraktu a druhá bez přídavku.
- 4) Do nachystaných infuzních lahví s mlékem bylo naočkováno dříve získané inokulum (1 %).
- 5) Po zaočkování bylo ihned změřeno pH v jednotlivých lahvích a dále bylo pH měřeno po 3, 6 a 24 hodinách inkubace při 37 °C.
- 6) Hodnoty byly zapisovány do tabulky a zprůměrované hodnoty byly vyjádřeny jako pokles pH a vypočteny jako difference mezi okamžitou hodnotou po inokulaci a hodnotou po 3, 6 a 24 hodinách.

8.4 Důkaz rezistence vůči antibiotikům

8.4.1 Diskový difuzní test

- 1) Bakterie byly naočkovány do tekuté živné půdy M17 a inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin.
- 2) Poté byla z tekuté kultury připravena suspenze o 2. stupni McFarlandovy zákalové stupnice.
- 3) 0,5 ml připravené suspenze bylo očkováno roztěrem na živnou půdu M17.
- 4) Po vsáknutí suspenze byly na povrch půdy kladeny antibiotické disky pomocí sterilní injekční jehly.
- 5) Misky byly inkubovány při 37 °C po dobu 2 dní.
- 6) Po této době byly zhodnoceny inhibiční zóny.

9 VÝSLEDKY A DISKUZE

9.1 Produkce exopolysacharidů

9.1.1 Plotnová metoda s ruteinovou červení

Cílem této metody bylo zjistit, zda vybrané kmeny bakterie *Streptococcus thermophilus* uvedené v kapitole 5 produkují nebo neprodukují exopolysacharidy. Zmíněná plotnová metoda je založená na skutečnosti, že ruteinová červeň má schopnost obarvit buněčnou stěnu neslizotvorných kmenů (tzv. „non-ropy strains“). Neslizotvorné kmeny pak na příslušném agaru vytvářejí červené kolonie. Naopak ruteinová červeň neobarví buněčnou stěnu kmenů produkujících sliz (tzv. „ropy strains“). Tudiž slizotvorné kmeny rostou na tomto agaru v podobě bílých, popř. růžových kolonií.

Vzhled kolonií pozorovaný u jednotlivých kmenů streptokoků po kultivaci na agaru s ruteinovou červení je uveden v Tab. 3.

Tab. 3. Vzhled kolonií jednotlivých kmenů *Streptococcus thermophilus* po kultivaci na agaru s ruteinovou červení.

ČÍSLO KMENE	POPIS KOLONIÍ
CCDM 7	bílé až růžové kolonie, bílý podklad
CCDM 45	narůžovělé kolonie, bílý podklad
CCDM 55	bílé kolonie, bílý podklad
CCDM 69	růžové kolonie, bílý podklad
CCDM 70	bílé kolonie, bílý podklad
CCDM 126	narůžovělé kolonie, bílý podklad
CCDM 128	bílé až růžové kolonie, bílý podklad
CCDM 129	růžové kolonie, bílý podklad
CCDM 130	růžové kolonie, bílý podklad
CCDM 131	růžové kolonie, bílý podklad
CCDM 224	růžové kolonie, bílý podklad
CCDM 4757	růžové kolonie, bílý podklad

Z uvedených výsledků vyplývá, že kmeny CCDM 7, 45, 55, 69, 70, 126, 128, 129, 130, 131, 224 i CCM 4757 produkují exopolysacharidy, protože u těchto kmenů bylo pozorováno bílé až růžové zbarvení kolonií. viz. Obr. 6 a 7. Výsledky můžeme porovnat s výsledky studie podle autorů Mory D. a kol., kteří dokázali produkci exopolysacharidů u 22 kmenů z celkových 44. [56].



Obr. 6. Vzhled kolonií produkce exopolysacharidů kmene CCDM 224.



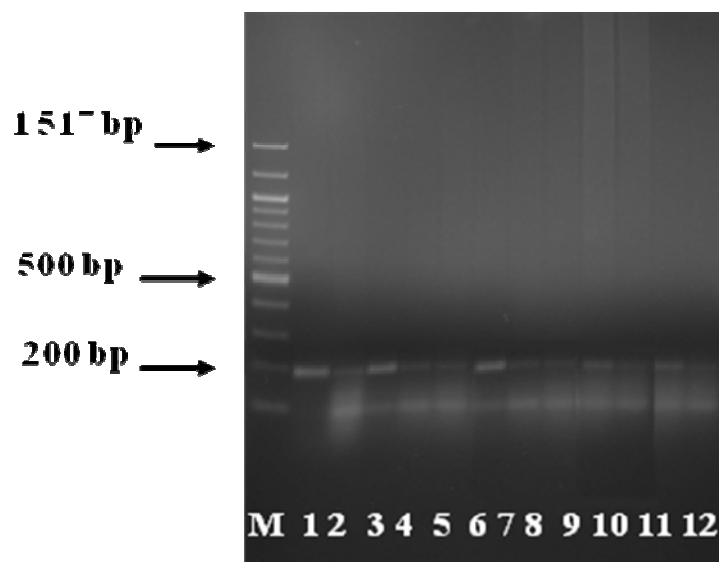
Obr. 7. Vzhled kolonií produkce exopolysacharidů kmene CCM 4757.

9.1.2 Stanovení exopolysacharidů metodou PCR

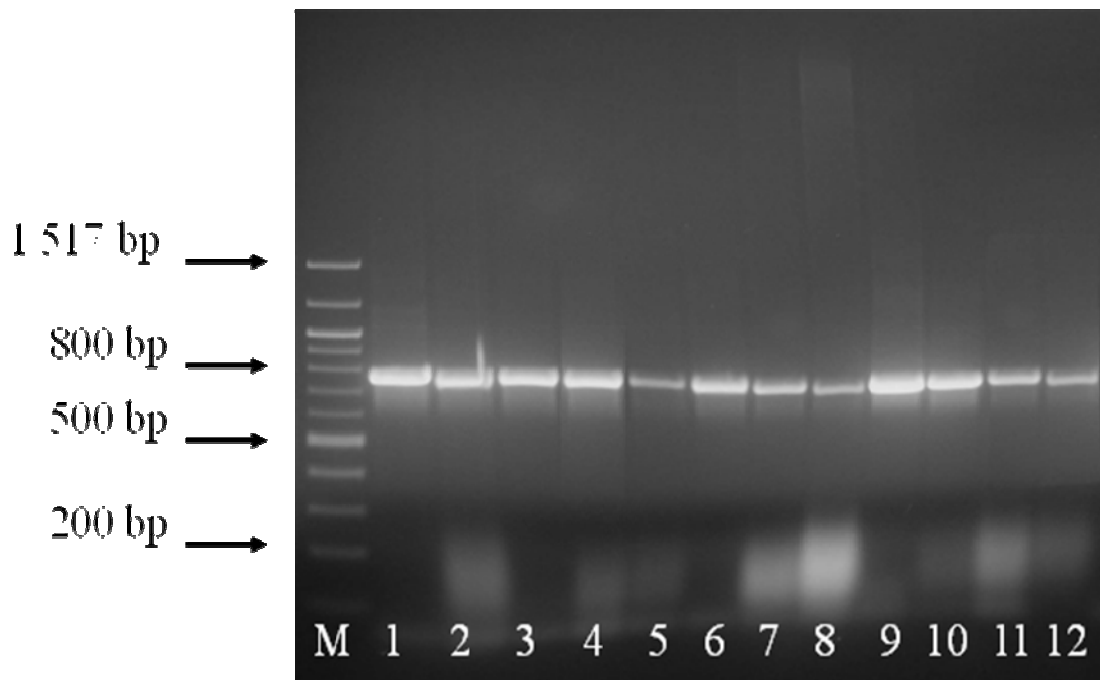
Bakteriální DNA byla z tekutých kultur izolována modifikovanou metodou Gravesa a Swaminathana. Čistá DNA byla uchována v TE pufru PCR reakce byla provedena na přístroji DNA Engine® Peltier Thermal Cycler PTC-200. Přítomnost *eps* genů u kmenů *Streptococcus thermophilus* byla ověřena využitím dvou párů (*epsD/Ef/epsD/Er*, *epsAf/epsAr*) komerčně syntetizovaných primerů, navržených dle Mozzi a kol. [27] viz. Tab. 2.

Přítomnost *eps* genů u kmenů *Streptococcus thermophilus* byla ověřena využitím dvou párů primerů (*epsD/Ef/epsD/Er*, *epsAf/epsAr*). Sada primerů *epsD/Ef/epsD/Er* umožňuje zjistit přítomnost genu pro glykozy-1-fosfáttransferázu, což je enzym zahrnutý do seskupování opakujících se jednotek heteropolysacharidů. Zatímco geny pro regulaci produkce exopolysacharidů je možné detekovat sadou primerů *epsAf/epsAr* [27, 28]. Velikosti PCR

produktů byly stanoveny dle genů *epsD/E* (200 bp) a *epsA* (800 bp). Jak pro gen *epsD/E*, tak pro gen *epsA* byly specifické PCR produkty zaznamenány u všech kmenů zkoumaných streptokoků (Obr. 8., Obr. 9.). Uvedené výsledky lze srovnat s prací Mozzi a kol. [27], kde byla zaznamenána přítomnost genů pro glykozyltransferázu (*epsD/E*) u 40 ze 42 kmenů a pro regulaci produkce exopolysacharidů (*epsA*) u všech testovaných kmenů *Streptococcus thermophilus*. Dále v práci Meulena a kol. [58] bylo zjištěno, že 75 ze 174 kmenů bakterií mléčného kvašení mělo 1 nebo více genů kódujících enzymy účastnící se biosyntézy heteropolysacharidů. Ze zmíněných 75 kmenů obsahovalo gen *epsA* 15 kmenů a gen *epsD/E* 28 kmenů. Aplikace různých sad *eps* primerů by mohla být rychlým způsobem k odhalení kmenů produkujících heteropolysacharidy [58].



Obr. 8. Amplifikace sekvence *epsD/E* genu. M-100 bp DNA marker molekulární hmotnosti, 1-CCDM 7, 2-CCDM 45, 3-CCDM 55, 4-CCDM 69, 5-CCDM 70, 6-CCDM 126, 7-CCDM 128, 8-CCDM 129, 9-CCDM 130, 10-CCDM 131, 11-CCDM 224, 12-CCM 4757.



Obr. 9. Amplifikace sekvence *epsA* genu. M-100 bp DNA marker molekulární hmotnosti, 1-CCDM 7, 2-CCDM 45, 3-CCDM 55, 4-CCDM 69, 5-CCDM 70, 6-CCDM 126, 7-CCDM 128, 8-CCDM 129, 9-CCDM 130, 10-CCDM 131, 11-CCDM 224, 12-CCM 4757.

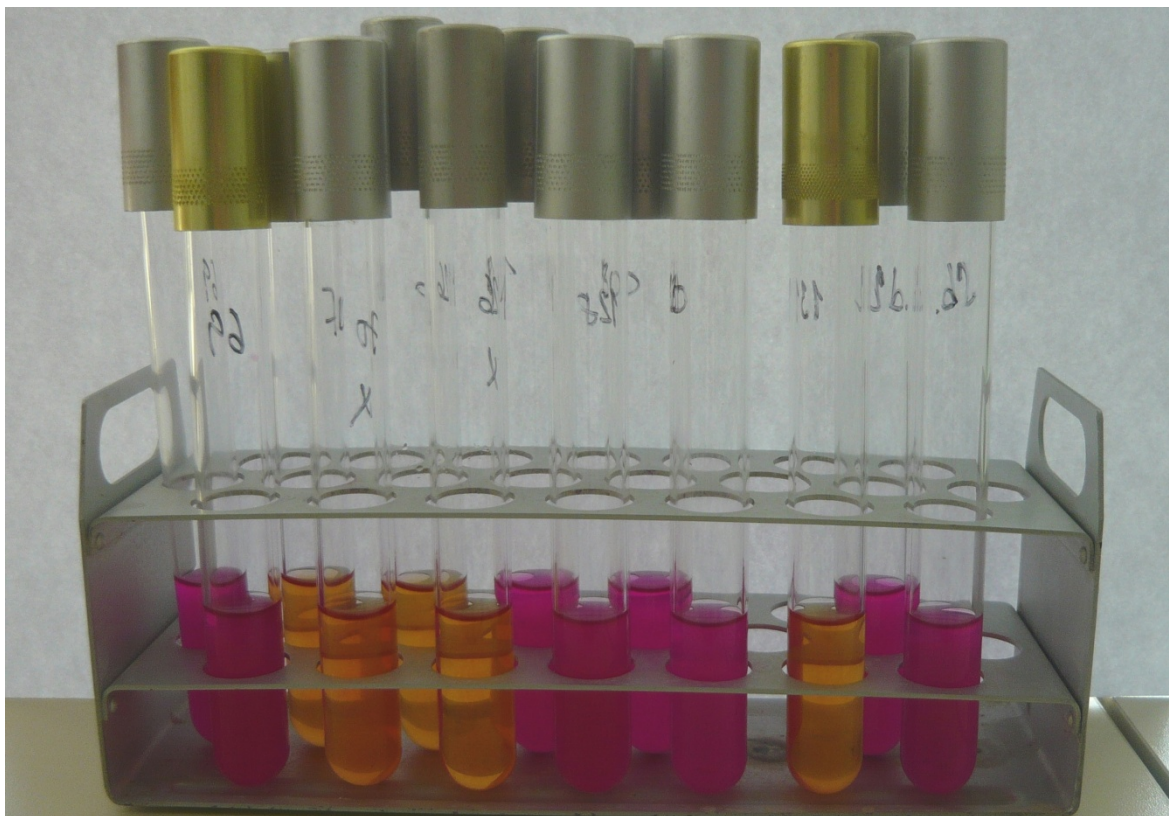
9.2 Důkaz produkce ureázy

Důkaz produkce ureázy byl proveden u všech již studovaných kmenů metodou dle Lanyi [56], kterou bylo zkoumáno, zda dané kmeny produkují enzym ureázu či nikoli. Výsledky byly hodnoceny vizuálně dle zbarvení roztoku. Pozitivní reakce, tedy produkce enzymu ureáza byla sledována jako červenofialové zbarvení. V opačném případě zůstala barva média nezměněna, viz. Obr. 10.

Tab. 4. Pozitivní a negativní reakce produkce enzymu ureáza kmeny *Streptococcus thermophilus*.

ČÍSLO KMENU	VÝSLEDEK REAKCE
CCDM 7	-
CCDM 45	-
CCDM 55	-
CCDM 69	+
CCDM 70	-
CCDM 126	-
CCDM 128	+
CCDM 129	-
CCDM 130	+
CCDM 131	-
CCDM 224	+
CCM 4757	+

Z dosažených výsledků lze říci, že kmeny CCDM 69, 128, 130, 224 a kmen CCM 4757 byly pozitivní na produkci enzymu ureáza a kmeny CCDM 7, 45, 55, 70, 126, 129 a 131 neprodukovaly enzym ureázu. Autoři Mora D. a kol. [56] zjistili, že pouze čtyři kmeny izolované z různých druhů jogurtů neprokazovaly produkci ureázy, u dvou kmenů byla prokázána pomalá ureázová aktivita. Dále bylo zjištěno, že metabolismus močoviny nemá žádný vliv na acidifikační aktivitu daných kmenů.



Obr. 10. Pozitivní a negativní reakce produkce enzymu ureáza

9.3 Acidifikační aktivita

Zjištění schopnosti zkvašování mléka jednotlivými kmeny streptokoků bylo provedeno metodou dle Lombardi a kol. [57]. Výsledky byly vyjádřeny jako pokles pH. Po 24 hodinách inkubace dle Lombardi a kol. [57] byly určeny 3 hlavní skupiny *Streptococcus thermophilus*: nízko okyselující kmeny (diference pH < 1,3), středně okyselující kmeny (diference pH 1,3 – 1,9), vysoce okyselující kmeny (diference pH > 1,9). Schopnost jednotlivých kmenů *Streptococcus thermophilus* zkvašovat mléko byla pozorována inokulací daných kmenů do odstředěného mléka s přídavkem či bez přídavku kvasničného extraktu. Byly měřeny hodnoty pH ihned po zaočkování (0 h), po 3, 6 a 24 h inkubace při 37 °C. Průměrné hodnoty pH získané pro jednotlivé kmeny *Streptococcus thermophilus* během 24 hodinové inkubace v mléce s i bez kvasničného extraktu se pohybovaly v rozmezí 5,6 – 5,7 (Tab. 5).

Acidifikační aktivita byla vyhodnocena Programem STATISTICA Cz (Softwarový systém na analýzu dat), verze 6, www.StatSoft.Cz pomocí General Linear Model, kde byly jako pevné faktory použity čas, kmen a kvasničný extrakt.

Tab. 5. Průměrné pH získané pro jednotlivé kmeny *Streptococcus thermophilus* v průběhu 24 h s přidavkem i bez přidavku kvasničného extraktu.

Kmen	Průměrné pH	Směrodatná odchylka
CCDM 7	5,71	0,05
CCDM 45	5,63	0,05
CCDM 55	5,76	0,05
CCDM 69	5,76	0,05
CCDM 70	5,70	0,05
CCDM 126	5,71	0,05
CCDM 128	5,72	0,05
CCDM 129	5,77	0,05
CCDM 130	5,57	0,05
CCDM 131	5,65	0,05
CCDM 224	5,66	0,05
CCM 4757	5,61	0,05

Tab. 6. Diference pH získaná pro jednotlivé kmeny *Streptococcus thermophilus* během kultivace v mléku s přidavkem i bez přidavku kvasničného extraktu v daných hodinách.

ČÍSLO KMENU	Diference pH po 3 hod		Diference pH po 6 hod		Diference pH po 24 hod	
	bez YE	s YE	bez YE	s YE	bez YE	s YE
CCDM 7	0,05	0,59	0,54	1,89	2,01	2,32
CCDM 45	0,15	0,54	0,91	1,91	2,21	2,27
CCDM 55	0,03	0,64	0,58	1,92	1,66	2,28
CCDM 69	0,04	0,54	0,54	1,77	1,94	2,31
CCDM 70	0,04	0,67	0,66	1,57	2,26	2,28
CCDM 126	0,06	0,60	0,81	1,87	1,97	2,29
CCDM 128	0,06	0,48	0,67	1,81	2,00	2,29
CCDM 129	0,14	0,64	1,00	1,91	2,30	2,46
CCDM 130	0,08	0,61	0,94	1,89	2,15	2,29
CCDM 131	0,11	0,62	0,83	1,90	2,18	2,32
CCDM 224	0,11	0,70	0,66	1,97	2,17	2,44
CCM 4757	0,12	0,59	0,23	1,36	2,38	2,42

Při kultivaci studovaných kmenů *Streptococcus thermophilus* v mléku bez kvasničného extraktu bylo po 24 hodinách inkubace dosaženo hodnot diference pH od 1,66 po 2,38 (Tab. 6). Tedy kmeny *Streptococcus thermophilus* se řadily ke středně i vysoce okyselujícím druhům. Největší diference pH byly pozorovány u kmenů CCDM 129 a CCM 4757. V práci Lombardi a kol. [57] byla naopak většina kmenů středně okyselujících a pouze 3 kmeny z celkových 37 byly vysoce okyselující. Diference pH po 3 hodinách inkubace byly v rozsahu hodnot 0,05 – 0,15 a po 6 hodinách 0,23 – 1,00, což jsou převážně nižší hodnoty než v případě výzkumu Lombardi a kol. [57].

Dle získaných výsledků kultivace daných kmenů streptokoků v mléku s kvasničným extraktem je zřejmé, že všechny kmeny patřily k vysoce okyselujícím druhům. Tomu odpovídají hodnoty difference pH po 24 hodinách inkubace pohybující se v rozmezí 2,27 – 2,46. Nejvyšší hodnoty difference pH byly zaznamenány u kmenů CCDM 129, CCDM 224 a CCM 4757. Kvasničný extrakt viditelně podporoval acidifikační aktivitu jednotlivých kmenů *Streptococcus thermophilus* během 3 a 6 hodin inkubace (Tab. 6.). To potvrdila i statistická analýza, která vyhodnotila účinek kvasničného extraktu jako statisticky významný ($P < 0,001$). Pozitivní vliv kvasničného extraktu na acidifikační aktivitu po 3, 6 i 24 hodinách inkubace byl pozorován i v práci Lombardi a kol. [57]. Statistickým vyhodnocením výsledků byl také potvrzen statisticky významný vliv času na hodnoty pH jednotlivých kmenů streptokoků během 24 h inkubace v mléce s přídavkem i bez přídavku kvasničného extraktu ($P < 0,001$).

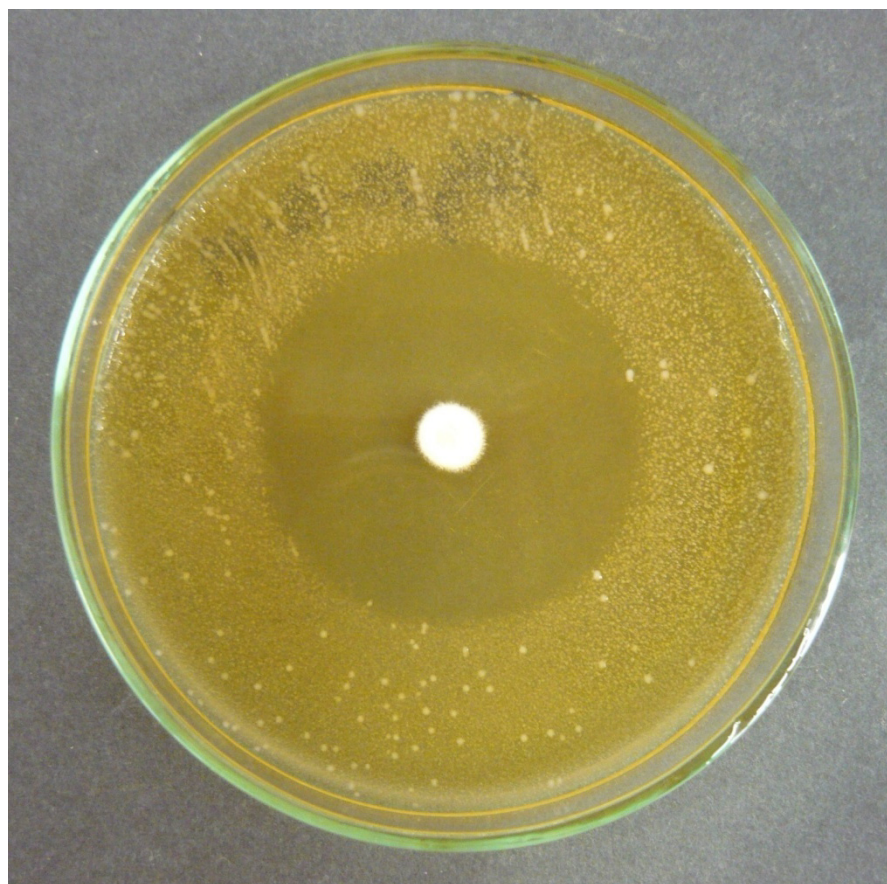
9.4 Důkaz rezistence vůči antibiotikům

Další vlastností, která byla studována u daných 12 kmenů *Streptococcus thermophilus*, byla rezistence vůči vybraným antibiotikům (ampicilin A¹⁰, clindamycin CD², erythromycin E⁵, gentamicin G¹²⁰, streptomycin S¹⁰ a tetracyklin T¹⁰). Byly zaznamenány průměry zón zjištěné pro jednotlivé kmeny streptokoků viz. (Tab. 7.) – Obr. 11. a 12. Bylo zjištěno, že všechny studované kmeny streptokoků byly citlivé vůči všem vybraným antibiotikům (Tab. 8). V práci Lombardi a kol. [57] byly všechny kmeny *Streptococcus macedonicus* (nový druh bakterie podobný *Streptococcus thermophilus*) citlivé vůči clindamycinu, erythromycinu, gentamicinu a tetracyklinu.

Dosažené výsledky souhlasí s tvrzením Ammora a kol. [54], že obvykle je *Streptococcus thermophilus* citlivý k tetracyklinu, erythromycinu a streptomycinu, a že vykazuje variabilní citlivost k ampicilinu, avšak neodpovídají mírné až vysoké rezistenci tohoto druhu ke gentamicinu.

Tab. 7. Průměry zón a směrodatné odchylky z diskového difuzního antibiotického testu.

ANTIBIOTIKUM							
ČÍSLO KMENE		ampicilin A ¹⁰	clindamycin CD ²	erythromycin E ⁵	gentamicin G ¹²⁰	streptomycin S ¹⁰	tetracyklin T ¹⁰
	CCDM 7	35,50±2,50	37,25±2,28	36,25±1,30	27,50±2,50	16,50±1,50	40,00±0,00
	CCDM 45	34,25±1,30	32,75±2,28	33,75±2,59	28,00±2,00	17,00±1,22	36,75±2,28
	CCDM 55	43,50±1,38	47,17±1,57	45,75±0,83	34,00±0,82	23,00±1,53	44,83±0,90
	CCDM 69	45,75±2,59	45,00±0,00	42,00±1,00	30,00±0,00	27,50±2,50	42,50±0,50
	CCDM 70	43,67±1,60	47,20±2,32	45,00±0,00	31,17±1,67	21,33±1,80	43,00±1,87
	CCDM 126	59,00±1,00	55,20±2,64	53,00±2,16	40,75±1,92	26,00±2,35	49,50±0,50
	CCDM 128	43,25±0,43	37,50±2,06	46,25±2,77	32,50±2,57	18,00±1,22	49,75±0,43
	CCDM 129	36,00±1,41	34,50±1,12	45,00±2,55	32,00±2,24	21,83±2,61	38,50±1,50
	CCDM 130	45,00±2,36	46,67±2,36	49,75±2,59	37,50±2,50	22,50±2,50	50,75±2,59
	CCDM 131	48,25±1,79	52,50±2,60	52,00±2,12	37,25±2,77	24,75±2,05	50,25±1,09
CCDM 224	41,25±1,30	29,00±1,73	38,50±2,60	35,50±1,50	22,25±2,28	41,50±2,06	
CCM 4757	36,00±1,58	35,75±2,49	32,00±2,55	32,50±2,50	22,00±1,22	42,25±2,28	



Obr. 11. Inhibiční zóna kmene CCDM 224 pro testované antibiotikum tetracyklin T^{10} .



Obr. 12. Inhibiční zóny kmene CCDM 7 pro testovaná antibiotika gentamicin G^{120} a streptomycin S^{10} .

Tab. 8. Průměry pozorovaných a hraničních inhibičních zón.

antibiotikum	Průměr pozorované zóny												Průměr inhibiční zóny v mm		
	Kmen č.												*citlivý	intermediární	rezistentní
	CCDM 7	CCDM 45	CCDM 55	CCDM 69	CCDM 70	CCDM 126	CCDM 128	CCDM 129	CCDM 130	CCDM 131	CCDM 224	CCM 4757			
Ampicilin A ¹⁰	c* 35,50	c 34,25	c 43,50	c 45,75	c 43,67	c 59,00	c 43,25	c 36,00	c 45,00	c 48,25	c 41,25	c 36,00	18	19 - 25	26
Clindamycin CD ²	c 37,25	c 32,75	c 47,17	c 45,00	c 47,20	c 55,20	c 37,50	c 34,50	c 46,67	c 52,50	c 29,00	c 35,75	19	16 - 18	15
Erythromycin E ⁵	c 36,25	c 33,75	c 45,75	c 42,00	c 45,00	c 53,00	c 46,25	c 45,00	c 49,75	c 52,00	c 38,50	c 32,00	21	16 - 20	15
Gentamycin G ¹²⁰	c 27,50	c 28,00	c 34,00	c 30,00	c 31,17	c 40,75	c 32,50	c 32,00	c 37,50	c 37,25	c 35,50	c 32,50	15	13 - 14	12
Streptomycin S ¹⁰	c 16,50	c 17,00	c 23,00	c 27,50	c 21,33	c 26,00	c 18,00	c 21,83	c 22,50	c 24,75	c 22,25	c 22,00	15	12 - 14	11
Tetracyklin T ¹⁰	c 40,00	c 36,75	c 44,83	c 42,50	c 43,00	c 49,50	c 49,75	c 38,50	c 50,75	c 50,25	c 41,50	c 42,25	23	19 - 22	18

ZÁVĚR

Cílem této práce byla studie vlastností kmenů *Streptococcus thermophilus*.

Z dosažených výsledků je zřejmé, že všechny studované kmeny *Streptococcus thermophilus* jsou s ohledem na technologii a bezpečnost potravin vhodné k výrobě fermentovaných mléčných výrobků.

Z hlediska technologicky významné produkce exopolysacharidů lze říci, že dané kmeny mohou přispět ke zlepšení textury a stabilizaci fermentovaných mléčných výrobků. Speciifické PCR produkty pro gen *epsD/E* i pro gen *epsA* byly zaznamenány u všech studovaných kmenů *Streptococcus thermophilus*, stejně jako byla potvrzena schopnost produkovat exopolysacharidy u všech zkoumaných kmenů této bakterie plotnovou metodou.

Enzym ureázu produkovalo 5 kmenů z 12. Ureáza zajišťuje odolnost vůči působení kyseliny mléčné tím, že zpomaluje pokles pH mléka a sýrů v důsledku tvorby amoniaku. U startovacích kultur ureázová aktivita negativně ovlivňuje acidifikační vlastnosti v průběhu fermentace mléka díky změněnému pH. Naší studií bylo zjištěno, že metabolismus močoviny nemá žádný vliv na acidifikační aktivitu studovaných kmenů.

Z výsledku získaných pro studium acidifikační aktivity daných kmenů *Streptococcus thermophilus* lze konstatovat, že kmeny *Streptococcus thermophilus* patří ke středně i vysoce okyselujícím druhům. Největší difference pH byly pozorovány u kmenů CCDM 129 a CCM 4757. Kvasničný extrakt viditelně podporoval acidifikační aktivitu jednotlivých kmenů *Streptococcus thermophilus* během 3 a 6 hodin inkubace. To potvrdila i statistická analýza, která vyhodnotila účinek kvasničného extraktu jako statisticky významný ($P < 0,001$).

Nakonec byly všechny zkoumané kmeny *Streptococcus thermophilus* určeny jako citlivé vůči všem vybraným antibiotikům.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] IYER, R., TOMAR, S.K., MAHESWARI, T.U., SINGH, R. *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 2010, vol. 20, p. 133 – 141.
- [2] NAIDU, A.S. *Natural Food Antimicrobial Systems*. 1st ed. USA: CRC Press LLC, 2000. 818 p. ISBN 0-8493-2047-X.
- [3] DELORME, CH. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 2008, vol. 126, p. 247 – 277
- [4] BROADBENT, J.R., McMAHON, D.J., WELKER, D.L., OBERG, C.J., MOINEAU, S. Biochemistry, genetics and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: A review. *J. Dairy Sci.*, 2003, vol. 86, p. 407 – 423.
- [5] LEROY, F., DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.*, 2004, vol. 15, p. 67 – 78.
- [6] MONNET, CH., MORA, D., CORRIEU, G. Glutamine synthesis is essential for growth of *Streptococcus thermophilus* in milk and is linked to urea catabolism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, vol. 71, p. 3376 – 3378.
- [7] GÖRNER, F., VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiológia potravín*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004. s. 528. ISBN 80-967064-9-7.
- [8] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře*. 3. dopl. vyd. Praha, Academia, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [9] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno, Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [10] VAŘEJKA, F., MRÁZ, O., SMOLA, J. *Speciální veterinární mikrobiologie*, 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1989. 258 s. ISBN 80-209-0042-X.
- [11] TEPLÝ, M. *Čisté mlékařské kultury: Výroba, kontrola, použití*. Praha, SNTL, 1984. 295 s.

- [12] Masarykova univerzita [online]. 2010 [cit. 2010-02-18]. Dostupný z WWW: <www.sci.muni.cz/mikrob/MiniAtlas/str-t.htm [online]. 2010 [cit. 2010-02-18]. Dostupný z WWW: . >.
- [13] CHERIGUENE, A., CHOUGRANI, F., BEKADA, A.M.A., EL SODA, M., BENSOLTANE, A. Enumeration and identification of lactic acid microflora in Algerian goats' milk. *Afr. J. Biotechnol.*, 2007, vol. 6, p. 1854 – 1861.
- [14] GUESSAS, B., KIHAL, M. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *Afr. J. Biotechnol.*, 2004, vol. 3, p. 339 – 342.
- [15] TAMIME, A.Y., ROBINSON R.K. *Yoghurt science and technology*. 2nd ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 1999. 619 p. ISBN 978-1-85573-399-2.
- [16] DE VUYST, L., VANDERVEKEN, F., VAN DE VEN, S., DEGEEST, B. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *J. Appl. Microbiol.*, 1998, vol. 84, p. 1059 – 1068.
- [17] ROBINSON, R.K. *Dairy microbiology handbook: The microbiology of milk and milk products*. 3rd ed. New York: John Wiley and Sons, 2002. 765 p. ISBN 0-471-38596-4.
- [18] HOLS, P., HANCY, F., FONTAINE, L., GROSSIORD, B., PROZZI, D., LEBLOND-BOURGET, N., DECARIS, B., BOLOTIN, A., DELORME, Ch., EHRLICH, S.D., GUÉDON, E., MONNET, V., RENAULT, P., KLEEREBEZEM, M. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005, vol. 29, p. 435-463.
- [19] TORRIANI, S., VESCOVO, M., DICKS, L. M. T. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: A review. *Ann. Microbiol. Enzimol.*, 1997, vol. 47, p. 29-52.
- [20] HUTKINS, R., HALAMBECK, S. M., MORRIS, H. A. Use of galactose-fermenting *Streptococcus thermophilus* in the manufacture of Swiss, Mozzarella and short-method Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, 1985, vol. 69, p. 1-8.

- [21] WOUTERS, J.T.M., AYAD, E.H.E., HUGENHOLTZ, J., SMIT, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.*, 2002, vol. 12, p. 91-109.
- [22] KORAKLI, M., VOGEL, R.F. Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosyltransferase and therapeutic potential of their synthesised glycans. *Microbiology Biotechnology*. 2006, vol. 77, p. 790-803.
- [23] RUAS-MADIEDO, P., DE LOS REYES-GAVILÁN, C.G. Invited review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal Dairy Science*. 2005, vol. 88, p. 843-856.
- [24] O'CONNOR E.B., BARRETT E., FITZGERALD G., HILL C., STANTON C., ROSS R.P. Production of vitamins, exopolysaccharides and bacteriocins by probiotic bacteria.. *Probiotic Dairy Products*; Blackwell Publishing: Oxford, 2005, p. 173–194.
- [25] DUBOC, P., MOLLET, B. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*. 2001, vol. 11, p. 759-768.
- [26] ALMIRÓN-ROIG, E., et al. The complete cps gene cluster from *Streptococcus thermophilus* NCFB 2393 involved in the biosynthesis of a new exopolysaccharide. *Microbiology* . 2000, vol. 146, p. 2793-2802.
- [27] MOZZI, F., VANINGELGEM, F., HÉBERT, E.M., VAN DER MEULEN, MORENO, M.R.F., DE VALDEZ, G.F., DE VUYST, L. Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, p. 4431 – 4435.
- [28] BROADBENT, J.R., McMAHON, D.J., WELKER, D.L., OBERG, C.J., MOINEAU, S. Biochemistry, genetics and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: A review. *J. Dairy Sci.*, 2003, vol. 86, p. 407 – 423.
- [29] DEGEEST, B., DE VUYST, L. Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide pro-

- duction in a complex medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, vol. 65, p. 2863–2870.
- [30] DE VUYST, L., ZAMFIR, M., MOZZI, F., ADRIANY, T., MARSHALL, V., DEGEEST, B., VANINGELGEM Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. *Int. Dairy J.*, 2003, vol. 13, p. 707–717.
- [31] VELASCO, S., ÅRSKÖLD, E., PAESE, M., GRAGE, H., IRASTORZA, A., RÅDSTRÖM, P., VAN NIEL, E. Environmental factors influencing growth of and exopolysaccharide formation by *Pediococcus parvulus* 2.6. *Int. J. Food Microbiol.* 2006, vol. 111, p. 252–258.
- [32] CANQUIL, N., VILLARROEL, M., BRAVO, S., RUBILAR, M., SHENE, C. Behavior of the rheological parameters of exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 2006, vol. 68, p. 270–279.
- [33] ŠTĚTINA, J., GLACNEROVÁ, E., ŠVIRÁKOVÁ, E., ČURDA, L., TRČKOVÁ, J. *Sborník - XXXIV. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin.* 2004, 485 s. ISBN 80-902671-6-5.
- [34] MAUDE, G., SCHAFFER-LEQUART CHRISTELLE. Gelation and resistance to shearing of fermented milk: Role of exopolysaccharides. *Int. Dairy Journal*, 2007, vol. 17, p. 666–673.
- [35] PURWANDARI, U., SHAH, N., VASILJEVIC, T. Effects of exopolysaccharide-producing strains of *Streptococcus thermophilus* on technological and rheological properties of set-type yoghurt. *International Dairy Journal*, 2007, p. 1344–1352.
- [36] BAUER, R., BEKKER, J. P., VAN WYK, N., DU TOIT, Ch., M.T. DICKS, L., KOSSMANN, J. Exopolysaccharide production by lactose-hydrolyzing bacteria isolated from traditionally fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, p. 260–264.
- [37] JABOR, A. a kolektiv. *Vnitřní prostředí.* 2008, Grada Publishing a.s., 530 s. ISBN 80-247-122-10.
- [38] *Mendelova univerzita v Brně* [online]. 2010-04-20 [cit. 2010-04-20]. <https://is.mendelu.cz/lide/clovek.pl?id=5372;zalozka=5;podrobnosti=1015>. Do-

stupné z

WWW:<<https://is.mendelu.cz/lide/clovek.pl?id=5372;zalozka=5;podrobnosti=1015>>.

- [39] ZOTTA, T., RICCIARDI, A., ROSSANO, R., PARENTE, E. Urease production by *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiol.*, 2008, vol. 25, p. 113 – 119.
- [40] GROSMANN, M. *Mikrobiologie v hygieně*. 1999, Vyškov: Vysoká vojenská škola pozemního vojska, 175 s. ISBN 80-723-103-72.
- [41] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. *Chemie potravin*. 1. vyd. Praha, SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1983, 632 s.
- [42] ZHANG, Z., Y., JIN, B., KELLY, J., M. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. *Biochemical Engineering Journal*, 2007, vol. 35, p. 251–263
- [43] JAMES, M. J. *Modern food microbiology*. 6.th ed. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers. Inc., 2000, 700 s. ISBN 0-8342-1671-X
- [44] *Wikipedia* [online]. 2010 [cit. 2010-05-11]. [Http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Lactic-acid-skeletal.png](http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Lactic-acid-skeletal.png). Dostupné z WWW: <wikipedia.org>.
- [45] HRONKOVÁ, L. *Jakost a využití drubežního separátu v masné výrobě, bakalářská práce*. VVŠ PV Vyškov, 1999.
- [46] KYZLINK, V. *Teoretické základy konzervace potravin*. Praha, SNTL Nakladatelství technické literatury, 1998, 512 s.
- [47] GILL, C. O., NEWTON, K.G. Effect of lactic acid concentration on growth on meat of gramnegative psychrotrophs from a meatworks. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, vol. 43, p. 284 – 288
- [48] MACHÁČKOVÁ, M. Dekontaminace povrchu jatečně upravených těl. *Maso*, 2004, článek 24274
- [49] BOLDER, N. M. Decontamination of meat and poultry carcasses. *Trends in Food Science and Technology*, 1997, vol. 8, p. 221 – 227
- [50] NARAYANAN, Niju, ROYCHOUDHURY, Pradip K., SRIVASTAVA, Aradhana.(+) *lactic acid fermentation and its product polymerization*. *Electronic*

- Journal of Biotechnology* [online]. 2004, no. 7 [cit. 2010-04-15]. Dostupný z WWW <<http://ejbiotechnology.info/content/vol7/issue2/full/7/>>.
- [51] ODÍČEK, M. *fermentace*. From *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2010-05-10]. Dostupné z [www: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=fermentace](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=fermentace)
- [52] HAĽAMA, D., et al. *Technická mikrobiológia*. 1. vyd. Bratislava, 1967, 328 s. ISBN 63-004-68.
- [53] BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK A., VÁVRA J. *Lékařská mikrobiologie bakteriologie virologie parazitologie*. Praha. Marvil, 1996. 558 s.
- [54] AMMOR, M. S., FLÓREZ, A. B., MAYO, B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria. *Food Microbiology*. 2007, vol. 24, p. 559 - 570.
- [55] MOZZI, F., VANINGELGEM, F., HÉBERT, E.M., VAN DER MEULEN, MORENO, M.R.F., DE VALDEZ, G.F., DE VUYST, L. Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, p. 4431 – 4435.
- [56] MORA, D., FORTINA, M.G., PARINI, C., RICCI, G., GATTI, M., GIRAFFA, G., MANACHINI, P. L. Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *J. Appl. Microbiol.*, 2002, vol. 93, p. 278 – 287.
- [57] LOMBARDI, A., GATTI, M., RIZZOTTI, L., TORRIANI, S., ANDRIGHETTO, CH., GIRAFFA, G. Characterization of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from artisanal Italian raw milk cheeses. *Int. Dairy J.*, 2004, vol. 14, p. 967 – 976.
- [58] VAN DER MEULEN, R., GROSU-TUDOR, S., MOZZI, F., VANINGELGEM, F., ZAMFIR, M., DE VALDEZ, G.F., DE VUYST, L. Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, vol. 118, p. 250 – 258.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BMK	Bakterie mléčného kvašení
PS	Polysacharidy
LPS	Lipopolysacharidy
KEPS	Kapsulární exsopolysacharidy
HoPS	Homopolysacharidy
HePS	Heteropolysacharidy
NADPH	Nikotinamidadeninukleotidfosfát
CCDM	Czech Collection of Dairy Microorganism
CCM	Czech Collection of Microorganism

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Preparát bakterie <i>Streptococcus thermophilus</i> barvený podle Grama.....	13
Obr. 2. Vzhled kolonií <i>Streptococcus thermophilus</i> na agarové živné půdě M17	13
Obr. 3. Lokalizace polysacharidů produkovaných grampozitivními a gramnegativními bakteriemi	17
Obr. 4. Strukturní vzorec kyseliny mléčné	22
Obr. 5. Optické izomery L(+) a D(-) kyseliny mléčné	23
Obr. 6. Vzhled kolonií produkce exopolysacharidů kmene CCDM 224.....	47
Obr. 7. Vzhled kolonií produkce exopolysacharidů kmene CCDM 4757.....	48
Obr. 8. Amplifikace sekvence epsD/E genu. M-100 bp DNA marker molekulární hmotnost.....	49
Obr. 9. Amplifikace sekvence epsA genu. M-100 bp DNA marker molekulární hmotnosti	50
Obr. 10. Pozitivní a negativní reakce produkce enzymu ureáza.....	52
Obr. 11. Inhibiční zóna kmene CCDM 224 pro testované antibiotikum tetracyklin T ¹⁰	57
Obr. 12. Inhibiční zóny kmene CCDM 7 pro testovaná antibiotika gentamicin G ¹²⁰ a streptomycin.....	58

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Přehled antibiotik.....	31
Tab. 2. Oligonukleotidy primerů aplikovaných k určení přítomnosti eps genů	38
Tab. 3. Vzhled kolonií jednotlivých kmenů <i>Streptococcus thermophilus</i> po kultivaci na agaru s ruteinovou červení.....	46
Tab. 4. Pozitivní a negativní reakce produkce enzymu ureáza kmeny <i>Streptococcus thermophilus</i>	51
Tab. 5. Průměrné pH získané pro jednotlivé kmeny <i>Streptococcus thermophilus</i> v průběhu 24 h s přidavkem i bez přidavku kvasničného extraktu.....	53
Tab. 6. Diference pH získaná pro jednotlivé kmeny <i>Streptococcus thermophilus</i> během kultivace v mléku s přidavkem i bez přidavku kvasničného extraktu v daných hodinách.....	54
Tab. 7. Průměry zón a směrodatné odchylky z diskového difuzního antibiotického testu.	56
Tab. 8. Průměry pozorovaných a hraničních inhibičních zón	59

