

# **Inhibice růstu vybraných bakterií vlivem monokaprylinu**

Jan Navrátil

---

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: **Jan NAVRÁTIL**

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

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Inhibice růstu vybraných bakterií vlivem monokaprylinu**

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.
- V praktické části proveďte sledování vlivu různých koncentrací monoacylglycerolu kyseliny kaprylové na růst vybraných grampozitivních a gramnegativních bakterií.
- Na základě teoretické části a výsledků praktické části formulujte návrhy a doporučení, týkající se využití monoacylglycerolu kyseliny kaprylové 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., Rakotondrzafy, V., Peyrou, G., Gachen C., Eychenne V. (1998). Pure  $\alpha$ -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:

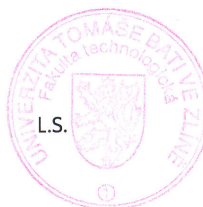
**12. února 2009**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**31. května 2009**

Ve Zlíně dne 31. května 2009

  
doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
děkan



  
prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
vedoucí katedry

## ABSTRAKT

Cílem této práce bylo testovat antimikrobiální aktivitu monoacylglycerolu kyseliny kaprylové (MAG C<sub>8:0</sub>) *in vitro* v kulturách 15 mikroorganismů (*Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia* a *Staphylococcus*). K tomu byly použity koncentrace MAG v rozmezí 25 – 1500 mg.l<sup>-1</sup>. Naměřené hodnoty optické denzity buněk byly vyhodnoceny pomocí Gompertzova modelu. Antimikrobiální aktivita byla vyjádřena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC), která brání růstu. Výsledky naznačují, že monokaprylin při nízkých koncentracích nepůsobí inhibičně. Nejvyšší testovanou koncentrací bylo zcela inhibováno 11 testovaných bakterií (všech 8 gram pozitivních a 3 gram negativní).

Klíčová slova: monokaprylin, inhibiční efekt, bakterie

## ABSTRACT

The purpose of the present study was to test the antimicrobial activity of monoacylglyceride of caprylic acid (MAG C<sub>8:0</sub>) *in vitro* in cultures of microorganisms (*Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia* and *Staphylococcus*). The concentrations which were used were between 25 and 1500 mg.l<sup>-1</sup>. The absorbance readings were modeled through a reparameterized Gompertz equation. Antimicrobial activity was expressed as minimum inhibitory concentration (MIC) that prevented growth. Results indicate that monocaprylin is not effective to prevent of bacteria in low concentration. The highest concentration which was tested completely inhibited growth of eleven bacteria (all eight gram-positive and three gram-negative).

Keywords: monocaprylin, inhibitory effect, bacteria

## **Poděkování**

Chtěl bych poděkovat vedoucí RNDr. Leoně Buňkové, Ph.d. za cenné rady a věcné připomínky při realizaci mé bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.d. za pomoc při vyhodnocení výsledků a Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí za umožnění provedení experimentální části.

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

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>9</b>
<b>1 MONOACYLGLYCEROLY</b> .....	<b>10</b>
1.1 VÝROBA MONOACYLGLYCEROLŮ .....	10
1.1.1 Esterifikace mastné kyseliny glycerolem .....	11
1.1.2 Reesterifikační reakce .....	11
1.1.3 Hydrolýza .....	13
1.1.4 Adice MK na glycidol .....	13
1.2 VLASTNOSTI MONOACYLGLYCEROLŮ .....	13
1.3 PRŮMYSLOVÉ VYUŽITÍ MONOACYLGLYCEROLŮ.....	14
1.4 ANTIMIKROBNÍ ÚČINKY MONOACYLGLYCEROLŮ A MASTNÝCH KYSELIN .....	16
1.4.1 Antimikrobní účinky kyseliny kaprylové a myristové .....	17
1.4.2 Antimikrobní účinky monokaprylinu a monomyristinu.....	19
<b>2 CHARAKTERISTIKA TESTOVNÝCH MIKROORGANIZMŮ</b> .....	<b>21</b>
2.1 ROD <i>PSEUDOMONAS</i> .....	21
2.2 ROD <i>ESCHERICHIA</i> .....	22
2.3 ROD <i>SALMONELLA</i> .....	23
2.4 ROD <i>PROTEUS</i> .....	23
2.5 ROD <i>SERRATIA</i> .....	24
2.6 ROD <i>CITROBACTER</i> .....	24
2.7 ROD <i>MICROCOCCUS</i> .....	25
2.8 ROD <i>STAPHYLOCOCCUS</i> .....	25
2.9 ROD <i>ENTEROCOCCUS</i> .....	26
2.10 ROD <i>BACILLUS</i> .....	27
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>29</b>
<b>3 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>30</b>
<b>4 MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>31</b>
4.1 TESTOVANÉ MIKROORGANIZMY .....	31
4.2 ŽIVNÁ MÉDIA.....	32
4.3 PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....	32
4.4 PŘÍPRAVA ROZTOKU MONOKAPRYLINU .....	33
4.5 PŘÍPRAVA BAKTERIÁLNÍ SUSPENZE.....	33
4.6 SLEDOVÁNÍ RŮSTU BAKTERIÍ.....	34
4.7 DEKONTAMINACE MATERIÁLU .....	35
<b>5 VÝSLEDKY</b> .....	<b>36</b>

5.1	VLIV MONOKAPRYLINU NA RŮST GRAMNEGATIVNÍCH BAKTERIÍ.....	36
5.1.1	Vliv MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>Citrobacter freundii</i> CCM 7107 .....	36
5.1.2	Vliv MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>Escherichia coli</i> CCM 3954 .....	37
5.1.3	Vliv MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188.....	38
5.1.4	Vliv MAG C <sub>8:0</sub> na růst zástupců rodu <i>Pseudomonas</i> .....	38
5.1.5	Vliv MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis CCM 4420 .....	40
5.1.6	Vliv MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> CCM 303.....	40
5.2	VLIV MONOKAPRYLINU NA RŮST GRAMPOZITIVNÍCH BAKTERIÍ.....	41
5.2.1	Vliv MAG C <sub>8:0</sub> na růst zástupců rodu <i>Bacillus</i> .....	41
5.2.2	Vliv MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>Enterococcus faecalis</i> .....	43
5.2.3	Vliv MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>Micrococcus luteus</i> CCM 732 .....	45
5.2.4	Vliv MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3653 .....	45
<b>6</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>47</b>
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>50</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>51</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>56</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>57</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>58</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>59</b>

## ÚVOD

Všudypřítomné mikroorganismy jsou každodenní součástí našeho života, kdy osídlují lidské tělo i okolní prostředí. Jsou nejčastější příčinou zhoršení kvality potravin a kosmetických prostředků. Z hlediska potravin se jedná především o zhoršení organoleptických vlastností a možné riziko alimentárních onemocnění. Mikrobiální kontaminace kosmetických prostředků může být zdrojem infekčních onemocnění kůže s možností přenosu na další osoby. Ačkoli rozklad organické hmoty je přirozený proces pro recyklaci látek v přírodě, v potravinářství i kosmetice je nežádoucí. Některé techniky konzervace jsou známy od pradávna, ale prochází neustálým vývojem. Podmětem je jednak zvyšující se rezistence bakterií k dosavadním inhibičním látkám a také změna životního stylu spotřebitelů i legislativy. Proto jsou vyhledávány nové látky, obzvláště přírodního charakteru, které inhibují růst bakterií.

V posledním letech se zvyšuje zájem o studium monoacylglycerolů, u kterých byla prokázána inhibiční aktivita proti širokému spektru mikroorganismů. Doposud se v potravinářském i kosmetickém průmyslu používají jako emulgátory, pro svou schopnost snižovat mezipovrchové napětí na rozhraní dvou nemísitelných kapalin a umožnit tak vznik emulze. Svě uplatnění nacházejí i v ostatních průmyslových odvětvích jako nosiče aktivních látek, změkčovadla, maziva a antistatické prostředky.

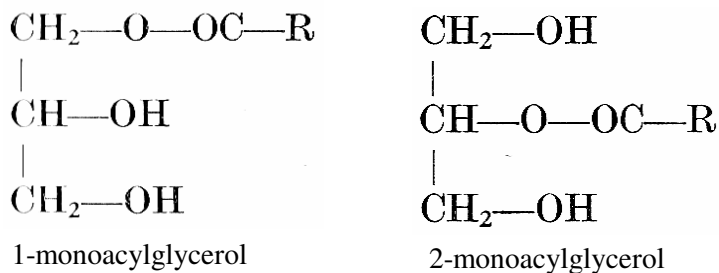
Cílem bakalářské práce je ohodnotit inhibiční vliv monoacylglycerolu kyseliny kaprylové na růst bakterií, které zahrnují běžné kontaminanty, původce alimentárních onemocnění i modelové mikroorganismy.



## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

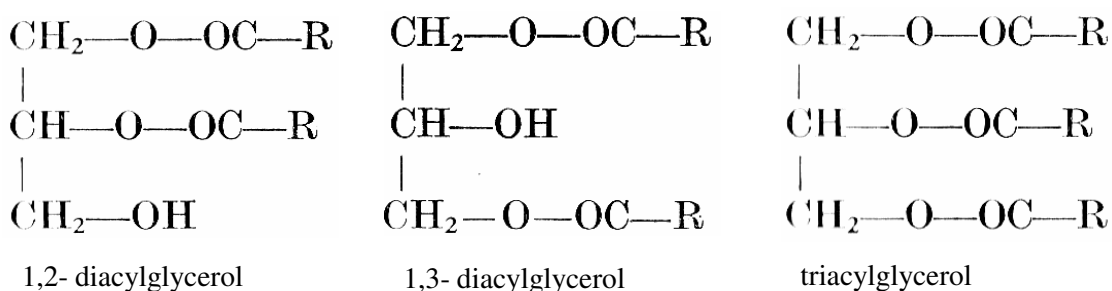
## 1 MONOACYLGLYCEROLY

Monoacylglyceroly (MAG) jsou označovány jako parciální estery glycerolu. Základem je tedy molekula glycerolu, kdy dochází k substituci vodíku hydroxylových skupin a esterovému navázání mastných kyselin. Podle místa navázání mastných kyselin rozlišujeme 1-monoacylglyceroly a 2-monoacylglyceroly ( Obr. 1) [1].



Obr. 1- 1 a 2-Monoacylglycerol [1]

Reakcí dalších mastných kyselin s -OH skupinami glycerolu vznikají diacylglyceroly (DAG) nebo triacylglyceroly (TAG), jejichž struktura je znázorněna na Obr. 2 [2]. Pokud jsou v molekule TAG navázány tři stejné mastné kyseliny, jedná se o jednoduché triacylglyceroly. Pokud jsou navázány dvě nebo tři různé kyseliny jedná se o smíšené triacylglyceroly, které tvoří převážnou část přírodních tuků [1].



Obr. 2- Další estery glycerolu [1]

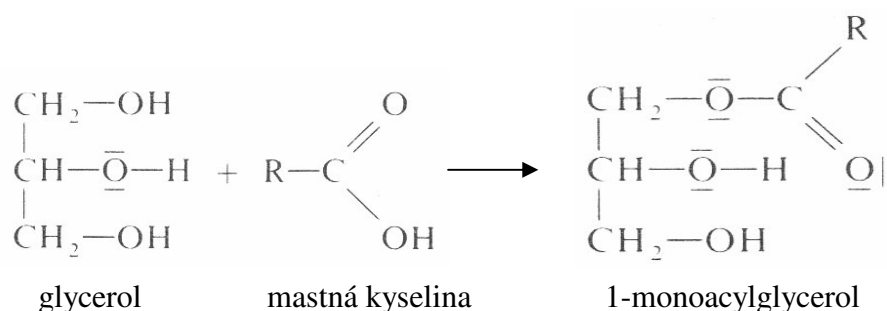
### 1.1 Výroba monoacylglycerolů

Monoacylglyceroly byly poprvé syntetizovány v roce 1853 a asi od roku 1960 byly průmyslově vyráběny glycerolýzou [3]. Lze je vyrábět nukleofilní substitucí atomu vodíku hydroxylové skupiny glycerolu, reesterifikačními reakcemi esterů a glycerolu a také hydrolýzou

triacylglycerolů. Reakce probíhají za vysoké teploty a za katalýzy kyselin nebo zásad [4]. V poslední době byla zkoumána také enzymaticky katalyzovaná glycerolýza triacylglycerolů 1,3- regiospecifickou lipázou mikrobiálního původu (*Pseudomonas* sp.). Nevýhodou pro průmyslové využití je vysoká cena enzymatického přípravku, kterou lze překonat využitím lipázy v imobilizovaném stavu. Pro fixaci lze využít silikagel a umožnit tak opětovné využití a kontinuální výrobu [5].

### 1.1.1 Esterifikace mastné kyseliny glycerolem

Mastné kyseliny tvoří s alkoholy estery. Reakční rychlost klesá s počtem atomů uhlíku v molekule. Hydroxylové skupiny glycerolu nejsou stejně reaktivní. Primární skupina je reaktivnější než sekundární hydroxylová skupina. Tyto reakce jsou katalyzovány enzymy lipázami nebo chemicky kyselinami (kyselina sírová, toluensulfonová), anebo zásadami (metanolát sodný). Za přítomnosti hydroxidu sodného probíhá tato reakce dostatečnou rychlostí při 160 – 240 °C. Esterifikační reakce glycerolu (Obr. 3) probíhá postupně přes MAG, DAG až na TAG. 2-monoacylglycerol je nestabilní a snadno přesmykuje na 1-monoacylglycerol (rovnovážná směs má kolem 90 % 1-izomeru) [6]. V případě výroby parciálních esterů se glycerol přidává v přebytku. Protože jde o málo těkavý alkohol, je možné použití vyšší teploty a vznikající vodu odstraňovat destilací a tím posouvat reakční rovnováhu ve prospěch esterů. Také se využívá azeotropické odstraňování vody benzenem [4].

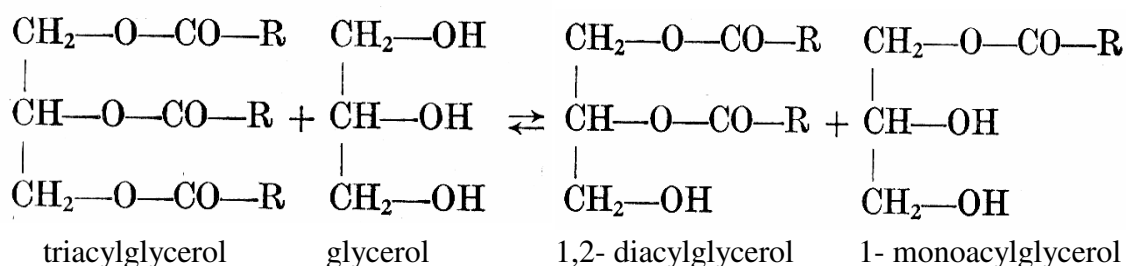


Obr. 3- Schéma esterifikace mastné kyseliny glycerolem [3]

### 1.1.2 Reesterifikační reakce

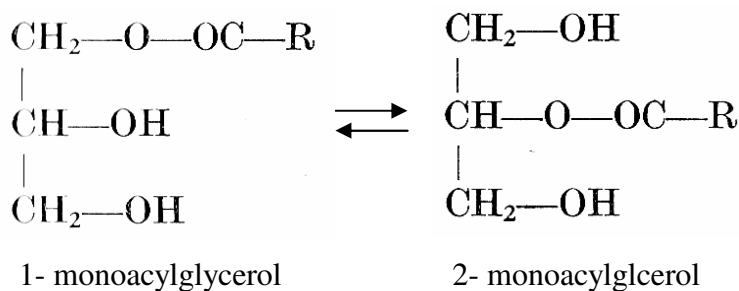
Reesterifikační reakce zahrnují tři typy reakcí - alkoholýza, acidolýza, esterová výměna.

Při alkoholýze dochází k výměně alkoholové složky esteru. Alkoholýza tuků za použití glycerolu (glycerolýza) se využívá pro průmyslovou výrobu monoacylglycerolů. Reakce se provádí nejčastěji při teplotě 200 – 240 °C za přítomnosti asi 0,1 % alkalického katalyzátoru. Výsledkem je směs obsahující 50 – 55 % monoacylglycerolů. Tato směs se dále podrobuje víceetapové molekulární destilaci. Nejprve dochází k oddestilování glycerolu, poté mastných kyselin a v posledním stupni monoacylglycerolů. Vzniká tak destilát obsahující 90 – 95 % MAG [4].



Obr. 4- Schéma glycerolýzy [4]

Alkoholýzou se také rozumí přesmyk esterové skupiny vícefunkčních alkoholů (Obr. 5). K tomu dochází při skladování MAG při vyšší teplotě [6].



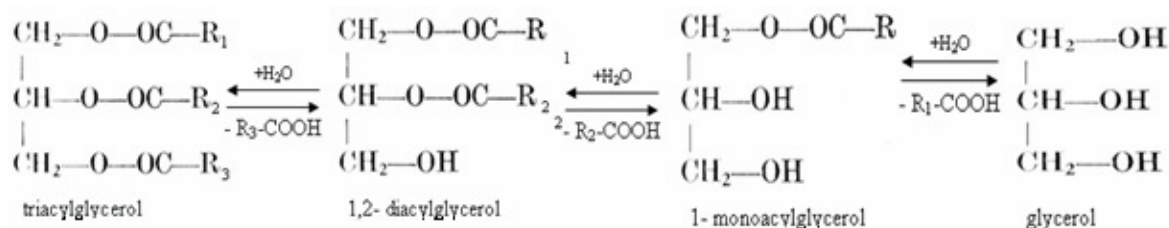
Obr. 5- Schéma intramolekulární alkoholýzy [4]

Acidolýza je reakce, při níž se vyměňuje kyselinová složka esteru. Karboxylová skupina volné kyseliny reaguje s esterem za vzniku meziprojektu, z něhož se uvolní kyselina dříve vázaná v esteru a vzniká nový ester [6].

K esterové výměně dochází při styku dvou esterů, které si za přítomnosti katalyzátorů mohou vyměňovat své alkyly. U TAG může výměna probíhat intramolekulárně [6].

### 1.1.3 Hydrolýza

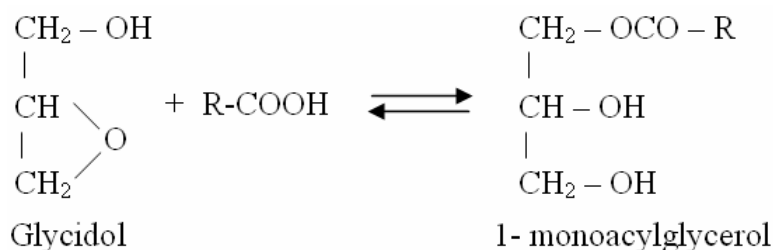
Při hydrolýze (Obr. 6) přijímají molekuly TAG molekulu vody. Odštěpuje se mastná kyselina a DAG. Další hydrolýzou vzniká MAG až volný glycerol. Jako katalyzátory se využívají oxidy nebo hydroxidy kovů druhé skupiny. Reakce probíhá za vysoké teploty a při zvýšeném tlaku. Při enzymatické katalýze probíhá při laboratorní teplotě [4].



Obr. 6- Schéma hydrolýzy triacylglycerolu [4]

### 1.1.4 Adice MK na glycidol

Reakce (Obr. 7) probíhá otevřením epoxidového kruhu glycidolu s následnou nukleofilní adicí mastné kyseliny. Reakce bez přítomnosti katalyzátoru vede k vytvoření směsi MAG, DAG a TAG. Proto se provádí za katalýzy aminů a/nebo kvartérních amoniových solí, komplexů kovů (chrom, kobalt,...) a zásad [3]. Reakce probíhá při relativně nízké reakční teplotě 90 °C. Výsledný produkt obsahuje i jisté množství nežádoucích reziduí katalyzátoru a jedovatý glycidol, proto je nutné jeho přečištění [7].



Obr. 7- Schéma adice MK na glycidol [3]

## 1.2 Vlastnosti monoacylglycerolů

Molekuly MAG se skládají z hydrofobní a hydrofilní části a jsou tedy označovány jako látky amfipatické. Struktura umožňuje orientaci na rozhraní mezi nepolární a polární fází. Hydrofobní část, která je tvořena řetězcem mastné kyseliny směřuje do nepolární fáze (olej, vzduch), zatímco hydrofilní část směřuje do fáze vodné. Takto se nejčastěji vytvoří mono-

molekulární film, který usnadňuje dispergaci a emulgaci. I přesto, že střední atom uhlíku je asymetrický, nevykazují žádnou nebo jen velmi malou optickou aktivitu [6].

Estery s nasycenými mastnými kyselinami jsou většinou tuhé, polymorfní, krystalické látky. Pomalým ochlazením taveniny se připraví nestabilní  $\alpha$  modifikace. Ta přechází v metastabilní modifikaci  $\beta'$ , která zvýšením teploty těsně pod bod tání přechází na stabilní modifikaci  $\beta$ . Pokud je navázána nenasycená mastná kyselina, jedná se o viskózní, olejovité nebo sirupovité kapaliny. Bod tání MAGů je blízký bodu tání přítomné mastné kyseliny a zvyšuje se s délkou uhlovodíkového řetězce. Bod varu bývá značně vysoký. Při skladování za vyšší teploty a při záhřevu může docházet k přesmykům na DAG a glycerol a dále na TAG až se vytvoří rovnovážná směs těchto látek [6].

Monoacylglyceroly jsou látky dobře rozpustné v alkoholu, nerozpustné v petroleteru a vodě. Při zahřívání ve vodě dochází k jejich roztavení a vytváří se gel. Struktura tohoto gelu je laminární a podobá se lipidovým dvojvrstvám. Hodnoty HLB (hydrophilic-lipophilic balance) běžných monoacylglycerolů jsou nízké a jsou vhodné pro stabilizaci emulzí typu voda v oleji [8].

### 1.3 Průmyslové využití monoacylglycerolů

Monoacylglyceroly našly své uplatnění v několika odvětvích průmyslu, kdy asi 60 % připadá na potravinářský průmysl, 16 % na výrobu krmiv, 12 % na kosmetický a farmaceutický průmysl a 12 % je využito v plastikářském a textilním průmyslu [3].

#### Průmysl potravinářský

V potravinářském průmyslu jsou MAG používány díky schopnosti snižovat mezipovrchové napětí. Oblastí, kde jsou hojně využívány tyto látky, je výroba emulgovaných tuků. Zajišťují jemnou distribuci kapiček vody v olejové fázi, stabilní krystalickou strukturu a také dobrou roztíratelnost. U klasických margarínů (60 – 80 % tuku) se používají destilované monoacylglyceroly v množství 0,2 – 0,5 %. Do margarínů s nízkým obsahem tuku (39 – 41 %) musí být pro udržení stability přidávány MAG obsahující nenasycenou mastnou kyselinu [4].

Dále patří MAG mezi suroviny pekárenského průmyslu. Při výrobě pečiva jsou přidávány do těsta pro prodloužení doby čerstvosti, zvýšení fermentační stability a odolnost proti mechanickému šoku. Příčinou prodloužení doby čerstvosti je tvorba komplexů s amylózou,

kdy při chlazení čerstvě upečeného pečiva dochází k opětovné krystalizaci amylozy a šroubovice se vytváří kolem hydrofobní části monoacylglycerolu. Za postupné tvrdnutí střídy je pak zodpovědná krystalizace volné amylozy a zejména amylopektinu. Čerstvost pečiva lze tímto mechanismem prodloužit o 2 – 3 dny [8]. Pro zvýšení odolnosti proti mechanickému šoku se využívá schopnosti interakce s bílkovinami mouky. Výsledkem je zlepšení reologických vlastností kynutých těst, kdy těsto má vyšší pružnost a lépe zadržuje vytvořený oxid uhličitý. Pečivo má rovnoměrnou pórovitost a větší objem. Pro zlepšení pekařských vlastností jsou nejučinnější estery kyseliny diacetylvinné a jantarové s monoacylglyceroly [4].

Značné množství monoacylglycerolových emulgátorů se využívá při výrobě mražených krémů, kdy usnadňují zašlehání vzduchu, zjemňují a zpevňují strukturu. Ve výrobku zajišťují dispergaci tukových částic a brání nadměrné aglomeraci a následnému rozpadu disperze. Tuk také ztrácí antagonistický charakter vůči bílkovinám a směs lze snadněji našlehat [4].

Monoacylglyceroly krystalizované v  $\alpha$  formě napomáhají udržování vlhkosti, což má za následek delší uchování potravin. Za tímto účelem jsou aplikovány nástřikem na drůbež, maso, čerstvé ovoce a zeleninu [3].

#### Kosmetika a farmacie

V kosmetických aplikacích jsou MAG využívány pro emulgační a zvláčňující účinek, pro rozptýlení vody na kůži, schopnost penetrace, chemickou netečnost k aktivním látkám a také proto, že jsou to látky bezbarvé a stabilní vůči oxidaci. Uplatňují se také proti pocení, kdy se monolaurin přidává do deodorantů společně s jeho diacetátem jako tlumič pocení. Jejich přídavek do mýdel zvyšuje odolnost proti popraskání. Ve farmacii se uplatňují jako nosiče aktivních látek a pro úpravu rozpustnosti. V závislosti na koncentraci mohou stimulat či inhibovat ( $> 25$  mg/ml) růst mikroorganismů [3].

#### Plastikářský a textilní průmysl

Textilní průmysl využívá MAG pro antistatické účinky zvláště při výrobě polyolefinových vláken. Také zvyšují stálost barev tkanin. Jako nejvhodnější byl určen monooleát vzhledem k nízké teplotě tání. Při výrobě a zpracování plastů se destilované monoacylglyceroly uplatňují jako změkčovadla, maziva a antistatické prostředky [3].

Mimo výše uvedené jsou užívány jako emulgátory nebo maziva při zpracování kovů a jako agrochemikálie zvyšují penetraci herbicidů do listů rostlin [3].

#### 1.4 Antimikrobní účinky monoacylglycerolů a mastných kyselin

U antimikrobiálních látek je nezbytná rozpustnost ve vodě či hydrofilita pro udržení ve vodné fázi, kde probíhá růst mikroorganismů. Ale zároveň musí mít i částečný lipofilní charakter z důvodu interakce s membránou. Aktivita antimikrobiálních látek může být také ovlivněna teplotou varu. Pokud dochází k záhřevu během zpracování, vysoce těkavé látky se mohou ztrácet. MAG vyhovují těmto podmínkám jednak svou amfipatickou strukturou i vysokým bodem varu [9]. Narozdíl od antibiotik mají mastné kyseliny a jejich estery několik mechanismů působení, které jsou nespecifické. Mechanismus a typ inhibice je závislý na použité koncentraci a doposud nebyl uveden vývoj rezistence k těmto látkám. Efekt těchto látek není dost široký na to, aby se uplatnily jako univerzální ochranné prostředky, ovšem je možná jejich kombinace s ostatními látkami potlačujícími růst bakterií a to nejen v potravinářském průmyslu, ale i jiných odvětvích [7].

Mastné kyseliny a monoacylglyceroly se běžně nacházejí v přírodních produktech (např. mléko, oleje), a proto jsou pravděpodobně netoxické pro sliznice a tkáně lidského těla. Biosyntéza mastných kyselin nastává po požití potravy, když je tělo dostatečně zásobeno energií. Hlavně probíhá v cytosolu jater a omezeně v tukové tkáni a mozku [9].

První bariérou mikroorganismů je buněčná stěna. Ve studiích využívajících elektronovou mikroskopii nebyly zjištěny žádné změny buněčné stěny, velikost ani tvar buněk nebyl ovlivněn. Tento fakt signalizuje, že MAG mohou proniknout rozsáhlou strukturou peptidoglykanu a dosáhnout cytoplazmatické membrány u grampozitivních bakterií [10]. Oproti tomu u gramnegativních bakterií je přítomna lipopolysacharidová vnější membrána, která patrně brání průniku mastných kyselin a monoacylglycerolů a je příčinou vyšší odolnosti těchto bakterií. Pro zvýšení inhibičního účinku je navrhována jejich kombinace s činidly odstraňujícími lipopolysacharidovou vrstvu [11].

Po proniknutí monoacylglyceroly a mastné kyseliny interagují s cytoplazmatickou membránou. Jednak mohou být začleněny do struktury této membrány a jednak mohou svými detergenčními účinky způsobit deformaci. Dochází k přesunutí součástí energetického systému buňky a inhibici syntézy adenosintrifosfátu (ATP). Ten je zásobou energie buňky.



Destabilizace membrány zahrnuje také tvorbu vychlípenin, děr a zvyšuje pórovitost. To má za následek vymývání dalšího ATP. Zásah do hospodaření s energií vede k omezení transportu aminokyselin a ketokyselin do buňky. Na membránu jsou také navázány enzymy spojené s kyslíkovou adsorpcí, které jsou účinky MAG ireverzibilně inaktivovány. Tím je inhibován přísun kyslíku u aerobních bakterií. Tento efekt zhodnotil již v roce 1963 Schoefeld pozorováním savčích mitochondrií [9].

Účinek samotných mastných kyselin spočívá v inaktivaci enzymů. Nedisociované molekuly rychleji prochází membránou a vstupují do buňky. Uvnitř se setkávají s vyšším pH cytoplazmy, které způsobí disociaci. Hromadící se anionty nemohou projít zpět přes membránu a stávají se toxickými pro bakteriální buňku. Uvolněné protony stěžují udržení vnitrobuněčného pH [12].

#### 1.4.1 Antimikrobní účinky kyseliny kaprylové a myristové

Závislost účinku mastných kyselin na pH dokazuje studie, kdy byl sledován růst *Clostridium welchii* při pH 6,5 a 7,5. Vyšší účinek kyseliny kaprylové byl pozorován při nižším pH s minimální inhibiční koncentrací (MIC) 7210 mg.l<sup>-1</sup>. Při pH 7,5 bylo pro dosažení stejného účinku zapotřebí pětkrát vyšší koncentrace. U kyseliny myristové byl pozorován opačný efekt. Při nižším pH byla minimální inhibiční koncentrace 22800 mg.l<sup>-1</sup> a při pH 7,5 přibližně pětkrát nižší [13]. Závislost na pH uvádí také Sun a kol. [14], kteří se zabývali studiem účinku mastných kyselin proti *Helicobacter pylori*, bakterii osídlující žaludek a způsobující zánět a vředy. Při pH 6,5 nebyl pozorován žádný baktericidní účinek kyseliny kaprylové o koncentraci 20 mM (2884 mg.l<sup>-1</sup>). Při pH menším než 5,5 působila stejná koncentrace baktericidně. Při snížení pH pod 5 postačovala koncentrace 10 mM a pod 3,5 pouze 1 mM (144 mg.l<sup>-1</sup>). Pro kyselinu myristovou byla stanovena MIC 5 mM (1512 mg.l<sup>-1</sup>) při pH blízkém neutrálního bodu. V jiné práci hodnotí Sun a kol. [15] účinek kyseliny kaprylové na *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *Klebsiella pneumoniae* a dva kmeny *Escherichia coli*. S klesajícím pH se opět zvyšoval inhibiční účinek a při pH 4,6 byl zcela inhibován růst všech šesti bakterií s MIC menší než 2 mM (288 mg.l<sup>-1</sup>). Proti kmenu *E. coli*, který způsoboval ztrátu hmotnosti a mírný průjem králíků, byla kyselina kaprylové nejefektivnější mastnou kyselinou. Kyselina kaprylová byla účinnější než kyseliny mléčná, citronová a fumarová při stejné koncentraci. Jako jediná způsobila snížení populace bakte-

rií na méně než 2 log CFU.ml<sup>-1</sup> při pH 5,4. Kyselina myristová snížila počet buněk jen nepatrně [16].

Účinky kyselin byly testovány také na *Listeria monocytogenes* a *Escherichia coli* O157:H7. Cílem studie Nair a kol. [17] bylo určit antibakteriální efekt v plnotučném mléce při různých teplotách. Přídavek 50 mM (7211 mg.l<sup>-1</sup>) kyseliny kaprylové způsobil snížení životaschopnosti populace *L. monocytogenes* na méně než 1,0 log CFU.ml<sup>-1</sup> po 6 hodinové kultivaci při 37 °C. Jen nepatrné snížení bylo pozorováno při teplotách nižších (8 a 4 °C). Obdobně i u *E. coli* O157:H7 vykazovala kyselina kaprylová největší aktivitu při 37 °C. Možnou příčinou snížení účinku je podle autorů nižší rozpustnost molekul a propustnost membrány. Aktivita kaprylové kyseliny není ovlivněna přítomností vápenatých iontů, které působí negativně na účinek kyseliny kaprinové [18]. Přídavek sodné soli kyseliny kaprylové nemá již takový efekt jako samotná kyselina. Důkazem je porovnání účinku proti zástupcům patogenů ryb, *Edwardsiella ictaluri*, *E. tarda*, *Streptococcus iniae* a *Yersinia ruckeri*. Minimální inhibiční koncentrace kyseliny se pohybovala v rozmezí 7,5 – 10 mM (1082 – 1442 mg.l<sup>-1</sup>), kdežto sodné soli bylo zapotřebí 25 – 50 mM (4155 – 8311 mg.l<sup>-1</sup>) pro dosažení shodného účinku. Minimální baktericidní koncentrace (MBC) byla zvýšena až desetkrát [19].

Proti *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* Enteritidis nevykazovala kyselina kaprylová o koncentraci 0,5 mM (72 mg.l<sup>-1</sup>) žádný baktericidní účinek, myristová kyselina při stejné koncentraci způsobila jen nepatrné snížení životaschopné populace [20, 21]. Inhibiční účinky vyšších koncentrací kyseliny kaprylové a myristové na kmeny *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium* studovali Skřivanová a kol. [22]. Kaprylová kyselina jako jediná inhibovala růst všech tří kmenů a to o koncentraci 3 000 mg.l<sup>-1</sup>. Kyselina myristová byla při testovaných koncentracích do 5 000 mg.l<sup>-1</sup> neúčinná. Současně byl účinek testován proti dvěma kmenům *Clostridium perfringens*. Myristová kyselina byla účinnější než kaprylová kyselina s MIC 100 – 200 mg.l<sup>-1</sup>, k dosažení stejného účinku bylo zapotřebí desetinásobné množství kaprylové kyseliny. Také byl u kyseliny myristové pozorován lepší baktericidní účinek proti *C. perfringens* [23].

Ve snaze vyvinout kombinovaný antimikrobní a antikoncepční přípravek, který by zároveň chránil proti pohlavně přenosným nemocím, byly testovány účinky mastných kyselin proti *Neisseria gonorrhoeae*. Kyseliny kaprylová a myristová byly nejméně účinné [24]. Nair a kol. [25] označili kyselinu kaprylovou jako možnou alternativní léčbu mastitidy skotu.

Koncentrace 100 mM ( $14\,421\text{ mg.l}^{-1}$ ) působila baktericidně proti *Streptococcus agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, *Str. uberis*, *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*, kdy do 6 hodin způsobila snížení na méně než  $1,0\text{ log CFU.ml}^{-1}$ . Bergsson a kol. [10] uvádí kyselinu kaprylovou a myristovou jako nejméně účinné mastné kyseliny proti streptokokům a stafylokokům.

U mastných kyselin jsou známy také jejich viricidní účinky proti viru herpes simplex typu 2 (HSV-2). Myristová kyselina způsobila snížení o více jako 4,5 log při 10 minutovém ošetření, kdežto kaprylová kyselina byla za stejných podmínek neúčinná [26]. Podobné účinky těchto dvou mastných kyselin byly pozorovány proti respiračnímu syncytiálnímu viru (RSV) [27].

#### 1.4.2 Antimikrobní účinky monokaprylinu a monomyristinu

Obdobně jako u mastných kyselin, byly také testovány účinky jejich esterů s glycerolem. Monoacylglyceroly vykazují antibakteriální aktivitu, ale di- a triacylglyceroly neinhibují bakterie [28]. Nejen, že MAG mají vyšší antimikrobiální aktivitu než odpovídající mastné kyseliny, ale účinek je srovnatelný s běžně užívanými prostředky jako jsou parabeny nebo kyselina sorbová a lze jej zvýšit přidáním chelatačních činidel, organických kyselin [13], laktoferricinu B [29]. Kombinací účinku monokaprylinu (MAG C<sub>8:0</sub>) a kyseliny octové proti *Listeria monocytogenes* se zabývali Garcia a kol. [12]. Jejich studie byla zaměřena na vepřové párky a snížení populace *L. monocytogenes* během skladování při 4 °C po dobu 77 dní. Před balením byly párky ošetřeny v lázni s 50 mM ( $10\,915\text{ mg.l}^{-1}$ ) MAG C<sub>8:0</sub>, 1 % kyseliny octové a 1 % ethanolu. Tato kombinace byla efektivnější, než bez použití kyseliny octové a navíc neovlivnila chuť ani barvu. Baktericidní aktivita monokaprylinu proti *L. monocytogenes* byla prokázána také v mléce. Koncentrací 50 mM byla populace snížena pod  $1,0\text{ log CFU.ml}^{-1}$  při všech testovaných teplotách (37, 8 a 4 °C) [17].

Synergický efekt MAG byl také pozorován v kombinaci s laktoferricinem B, což je peptid s antimikrobiálními účinky, který vzniká z hovězího laktoferinu účinkem pepsinu. Životaschopnost *Staphylococcus aureus* byla snížena monokaprylinem na 32 % a monomyristinem (MAG C<sub>14:0</sub>) na 35 %. V kombinaci s laktoferricinem B byla snížena na méně než 0,004 % [29]. I kyselina linolenová může působit synergicky s monomyristinem proti *S. aureus*. Samotný MAG C<sub>14:0</sub> působil inhibičně při koncentraci  $100\text{ mg.l}^{-1}$ . Stejného účinku bylo dosaženo kombinací  $25\text{ mg.l}^{-1}$  MAG C<sub>14:0</sub> s  $40\text{ mg.l}^{-1}$  kyseliny linolenové [11].

Účinky monoacylglycerolů byly zaměřeny i proti sporulujícím bakteriím, a to jak vegetativním formám, tak i samotným sporám. Na vegetativní formy *Bacillus cereus* působí inhibičně 50 mg.l<sup>-1</sup> MAG C<sub>14:0</sub> [11]. Přídavek 3,6 mM (1089 mg.l<sup>-1</sup>) monomyristinu nesnižuje termorezistenci spor oproti jiným monoacylglycerolům. Naopak, k inaktivaci spor bylo zapotřebí delší tepelné ošetření při 91 °C [30].

Antibakteriální efekt monokaprylinu byl testován na klinické izoláty streptokoků, které jsou původci mastitidy skotu. Koncentrací 50 mM (10915 mg.l<sup>-1</sup>) byl inhibován růst *Streptococcus uberis*, *Str. dysgalactiae* a *Str. agalactiae*. Během 1 minuty byl počet buněk snížen o více než 4,5 log CFU.ml<sup>-1</sup>, po 6 hodinách byl nižší než 1,0 log CFU.ml<sup>-1</sup> [25]. Růst *Str. iniae* byl inhibován 5 mM (1091 mg.l<sup>-1</sup>) monokaprylinu, stejná koncentrace působila i baktericidně [19].

Účinek monokaprylinu a monomyristinu byl testován i na zástupce gramnegativních bakterií. Petschow a kol. [28] ve své studii uvádějí, že monokaprylin byl nejméně efektivní MAG proti čtyřem testovaným kmenům *Helicobacter pylori*. Koncentrace 1 mM (218 mg.l<sup>-1</sup>) neměla žádný účinek, při 5 mM způsobil jen nepatrné snížení počtu buněk. Jiné testované MAG (monokaprin a monolaurin) působily efektivně již při koncentraci 1 mM. Součástí studie bylo také otestování účinku v nápoji Nutrament (obsahuje smetanu, cukry, rostlinné oleje a vitaminy), kde byl účinek monokaprylinu srovnatelný s ostatními MAG. Monomyristin je proti *H. pylori* účinný již při koncentraci 0,9 mM (196 mg.l<sup>-1</sup>) [14]. Monoacylglyceroly mohou inaktivovat také *Neisseria gonorrhoeae*. Bergsson a kol. [24] testovali tento účinek v krátkém inkubačním čase (1 minuta). Oproti 2,5 mM (616 mg.l<sup>-1</sup>) monokaprinu byly MAG C<sub>8:0</sub> i MAG C<sub>14:0</sub> při stejné koncentraci neúčinné.

U monoacylglycerolů je známa antivirová aktivita. Monokaprylin patří mezi nejúčinnější monoacylglyceroly proti RSV, který byl po 10 minutách zcela inaktivován. Monomyristin při stejné koncentraci 10 mM (3024 mg.l<sup>-1</sup>) způsobil jen nepatrné snížení [27]. Obdobné působení bylo pozorováno i proti HSV-2 [26].

## 2 CHARAKTERISTIKA TESTOVNÝCH MIKROORGANIZMŮ

Studium mikroorganismů (MO) s konečným cílem charakterizovat MO a zařadit je určitým způsobem do taxonomických jednotek je obecnou definicí taxonomie prokaryot. Jejím úkolem je identifikovat a popisovat druhy. Do prokaryot spadají doména *Archaea* a *Bacteria*. *Archaea* jsou někdy označovány jako extremofilové, vzhledem k výskytu (slaná či termální prostředí). Doména *Bacteria* se dělí do tří fenotypových oddělení:

- buňky s buněčnou stěnou gramnegativního typu
- buňky s buněčnou stěnou grampozitivního typu
- buňky postrádající buněčnou stěnu

Oddělení se dříve rozdělovala do skupin, ale v současné době se toto dělení již nepoužívá [31]. Z testovaných bakterií se rody *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Serratia* a *Citrobacter* řadí mezi bakterie s buněčnou stěnou gramnegativního typu, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* a *Bacillus* mezi bakterie s buněčnou stěnou grampozitivního typu.

### 2.1 Rod *Pseudomonas*

Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou přísně aerobní krátké nebo střední tyčinky, monotricha nebo lofotricha. Velikost buňky je 0,5 – 1,0 x 1,5 – 5,0  $\mu\text{m}$ . Tvoří kolonie větších rozměrů s hladkým povrchem. Patogenní druhy mají optimální růstovou teplotu 37 °C, řada druhů je psychrotrofních. Někteří zástupci tohoto rodu produkují fenazinová barviva žlutých, zelených, modrých nebo červených odstínů. Uvolňováním barviv do růstového prostředí způsobují nežádoucí zbarvení potravin. Jako zdroj energie jsou schopny využívat nejrůznější organické sloučeniny a jsou bez specifických nároků na růstové faktory. Tvorba proteolytických a lipolytických enzymů jim umožňuje růst na povrchu masa [32]. Bezprostředně po zabíjení a opracování drůbeže tvoří zmíněné bakterie převládající část mikroflóry. Na konci chladírenského uchování tvoří společně s *Alcaligenes* až 95 % přítomných bakterií. Bílkoviny masa štěpí na typicky hnilobné produkty. V chlazeném syrovém mléku reprezentují bakterie *Pseudomonas* 47 – 84 % psychrotrofní mikroflóry a vyznačuje se nejkratšími generačními časy [33].

*Pseudomonas fluorescens*

*Pseudomonas fluorescens* roste při optimální teplotě 20 – 25 °C. Produkuje rozpustný fluoreskující pigment, okolí jeho kolonií se barví slabě do zelena. Dobře roste i při 5 °C, což umožňuje škodit v chlazených potravinách [34]. Dominuje při kažení masa, jehož znakem je osliznutí, tvorba barevných skvrn a zápach. Vzhledem k tomu, že se jedná o přísně aerobní bakterie, neúčastní se na kažení masa uvnitř hmoty [33].

*Pseudomonas aeruginosa*

Optimální teplota růstu *P. aeruginosa* je 37 °C, ale je schopen růstu i při 41 °C. Pro člověka může být patogenní, kdy způsobuje hnisání ran či zánět močového ústrojí. Za vhodných podmínek vytváří žlutozelený fluoreskující pigment nebo také namodralý pigment pyocyanin [35]. U vajec způsobuje tzv. modrou hnilobu [33].

## 2.2 Rod *Escherichia*

*Escherichia* se řadí mezi nesporotvorné fakultativně anaerobní tyčinky s peritrichálním uspořádáním bičíků [37]. Jsou schopny využívat jak respirační tak fermentační metabolismus. Jednotlivé druhy jsou obyvateli střevního traktu živočichů. Optimální teplota růstu je 37 °C, ale jsou schopny růstu v širokém rozmezí 15 – 45 °C. Tyto bakterie mají velký význam z hygienického hlediska [32]. Jednak jsou podmíněnými patogeny a jednak slouží jako indikátorové mikroorganizmy, kdy indikují přítomnost střevních patogenů v potravinách. V potravinářství poukazují na dodržování hygienických podmínek a sanitace při výrobě [36].

*Escherichia coli*

*E. coli* je nejznámější bakterie z rodu *Escherichia* a zároveň nejprozkoumanějším mikrobiálním druhem. Slouží jako modelová bakterie pro genetické, fyziologické a biochemické studie. Velikost bakteriální buňky je 1,0 – 1,5 x 2 – 6 µm. Na agarových půdách tvoří šedivě bílé ploché kolonie [36]. Optimální kultivační teplota je 37 °C, kmeny pocházející přímo z lidských fekálií jsou schopny růstu při 44,5 – 44,8 °C. Heterofermentativně zkvašuje cukry (glukózu, laktózu, některé pentózy) za vzniku kyselin (pyrohroznová, octová a mravenčí) a plynu (oxid uhličitý a vodík) [32]. Fermentací zbytkové laktózy způsobují tzv. ranné duření sýrů a zvýšené množství působí inhibičně na růst mléčných koků [33]. Ente-

ropatogenní kmeny způsobují vodnaté průjmy doprovázené zvracením a horečkou. Onemocnění se vyskytuje u dětí do tří let a od roku 1970 se týká hlavně rozvojových zemí [37].

### 2.3 Rod *Salmonella*

Bakterie rodu *Salmonella* jsou fakultativně anaerobní gramnegativní pohyblivé tyčinky. Jsou schopné růst se v teplotním rozsahu 2 – 47 °C. Nejlépe rostou při optimální teplotě 35 – 37 °C. Pro optimální růst vyžadují pH 6,6 – 8,2, při pH pod 4 nerostou. Primárním stanovištěm bakterií rodu *Salmonella* je střevní trakt ptáků, plazů a hospodářských zvířat. Také mohou být nalezeny i v jiných částech těla, z fekálií mohou být přenášeny hmyzem do vody či potravin [38]. Ve většině zemí jsou hlavní příčinou alimentárních onemocnění z potravin, převážně z drůbeže, vajec a vaječných produktů [37], masa a masných výrobků [38]. Způsobují vodnaté průjmy, občas i zácpu, doprovázené horečkou, bolestí hlavy a zvracením [37].

#### *Salmonella enterica*

V současné době jsou *S. enterica* společně se *S. bongori* jedinými druhy tohoto rodu, které se dále člení na 6 poddruhů. Dříve popsané druhy se označují jako sérovary *S. enterica*. Sérovary Enteritidis jsou nejčastějším původcem gastroenteritid u člověka (v ČR asi 96 %) [31] a jsou původci alimentárních otrav z potravin živočišného původu [34]. Největší onemocnění se vyskytlo v roce 1994 ve Spojených státech, kdy onemocnělo více než 224 000 osob. Příčinou byla zmrzlina vyrobená z mléka, které bylo přepravováno v cisterně, v níž se předtím převážela tekutá vaječná hmota. Za původce onemocnění byl označen sérovar *S. Enteritidis* [38].

### 2.4 Rod *Proteus*

*Proteus* je další bakterií ze sekce gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky. Jedná se o bakterie s peritrichálně uspořádanými bičíky a velikostí buňky 0,4 – 0,8 x 1,0 – 1,3 μm. Při růstu na pevných půdách tvoří rozlézavé kolonie. Nejvyšší rozlézavost lze pozorovat při kultivační teplotě 20 °C. Optimální růstovou teplotou je 37 °C, při níž jsou kolonie malé a kruhového tvaru, ztrácí schopnost plazivého růstu. V některých kulturách můžeme nalézt i kulovité či vláknité útvary [32]. Příslušníci tohoto rodu se vyskytují ve vodě, půdě a střevním traktu. Jsou schopni oxidativní deaminace širokého okruhu aminokyselin za tvorby

amoniaku a ketokyselin. Způsobují tak kažení bílkovinných potravin [37], především kažení masa v hmotě, kterému podléhají nedostatečně vychlazené kusy a maso v bezprostřední blízkosti kostí [33]. U vajec způsobuje tzv. černou hnilobu a také kvašení hořčice s tvorbou plynu [38].

#### *Proteus mirabilis*

Asi u 90 % infekcí způsobených rodem *Proteus* je příčinou druh *P. mirabilis*. Způsobuje vážné infekce ledvin. Schopnost napadnout hostitelské buňky je úzce spjata s plazivým růstem. Vylučují hemolytický toxin a proteázu, která je schopna rozkládat imunoglobuliny [39]. Za posledních 10 let se také *P. mirabilis* spojuje s revmatickými záněty. Je rezistentní k tetracyklinům, ale citlivý na peniciliny a cefalosporiny [40].

## 2.5 Rod *Serratia*

Bakterie rodu *Serratia* jsou aerobní gramnegativní tyčinky patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Produkují červený pigment (prodigiozin) na tuhých živných půdách i v určitých potravinách, nepigmentující kmeny jsou neobvyklé [38]. Jsou schopny růstu v rozmezí 12 – 36 °C s optimem 25 – 30 °C. Přirozeně se vyskytují v půdě, na rostlinách a ve střevním traktu hmyzu [34]. Některé druhy jsou gastrointestinálními patogeny a mohou se přenášet potravinami [37]. U vajec jsou původcem tzv. červené hniloby [38].

#### *Serratia marcescens*

Již přes 30 let se *S. marcescens* zahrnuje mezi nemocniční bakterie. Infekce způsobuje hlavně na novorozeneckých a pooperačních odděleních, byly identifikovány i případy na jednotce intenzivní péče. Je zodpovědná za různé typy infekcí včetně zápalu plic či mozkových blan. U některých kmenů byla prokázána rezistence k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům [41]. Je schopna produkovat chitinázu, lipázu a chlorperoxidázu [42].

## 2.6 Rod *Citrobacter*

Bakterie rodu *Citrobacter* jsou gramnegativní tyčinky osídlující střevní trakt. Velikost buňky je 1,0 x 2,0 – 6,0  $\mu\text{m}$ , vyskytuje se jednotlivě nebo v krátkých řetízcích. Nejlépe roste při teplotě 37 °C. Jako zdroj uhlíku využívá citrát. Přirozeným stanovištěm je voda, půda a lidský zažívací trakt. Je jedním z možných původců zánětu močových cest a nebo meningitidy u dětí [32].



*Citrobacter freundii*

*C. freundii* je převládajícím druhem tohoto rodu. Vyskytuje se v potravinách a to hlavně na zelenině a čerstvém mase [38]. U telat, selat a drůbeže mohou tyto bakterie vyvolat gastrointestinální poruchy. Také byl tento druh izolován z případů akutní mastitidy u skotu a prasnic [35].

**2.7 Rod *Micrococcus***

*Micrococcus* jsou grampozitivní, přísně aerobní koky o velikosti 0,4 – 2,5 µm. Starší kultury se mohou jevit jako gramlabilní až gramnegativní. Kolonie jsou na pevných agarových půdách lesklé, neprůhledné a mazlavé [36]. Je schopen růstu při teplotách od 10 °C s optimem v rozmezí 20 – 25 °C. Při teplotě 45 °C již neroste a nesnáší kyselé prostředí [34]. Je schopen produkovat karotenoidní barvivo žlutých, oranžových i červených odstínů, které pak chrání buňky před letálním účinkem UV záření. Jsou schopné růstu v prostředí s 5 % chloridu sodného. Přírodním stanovištěm je kůže savců, sekundárně se pak vyskytují v mase a mléce [35]. V novodobých studiích se mikrokoky uvádějí jako nejhojněji zastoupený rod během zpracování drůbeže [38] a také tvoří hlavní část mikroflóry mléka [33].

*Micrococcus luteus*

Druh *M. luteus* tvoří na agarových půdách vypouklé kolonie žluté až žlutozelené barvy. V mikroskopickém preparátu lze pozorovat nepravidelné shluky či sarciny [36]. Jedná se o běžného saprofyta kůže savců včetně člověka. Může osídlovat i horní dýchací trakt. Je považován za nepatogenní mikroorganismus [35].

**2.8 Rod *Staphylococcus***

Bakterie rodu *Staphylococcus* jsou nepohyblivé grampozitivní koky o velikosti 0,5 – 1 µm. V mikroskopickém preparátu lze pozorovat jednotlivé buňky či nepravidelné shluky [36]. Jsou schopny růstu v teplotním rozmezí 18 – 40 °C s optimem 30 – 37 °C. Buňky odolávají účinku lysozymu a rostou i v prostředí s 10 % NaCl. Vyskytují se především na sliznicích a kůži zvířat, často jsou izolovány z půdy a vzduchu. Jsou potenciálně patogenním mikroorganismem, tvoří hemolysin, fosfolipázu C a termorezistentní nukleázy [35].

*Staphylococcus aureus*

*S. aureus* je podmíněně patogenní druh, způsobující například infekce kůže, sepse a pneumonii. Jím produkováný enterotoxin je poměrně termostabilní, snáší i půlhodinový var [33]. Na pevných půdách tvoří hladké a lesklé kolonie. Tvoří karotenoidní pigmenty žlutého nebo slabě oranžového zbarvení. Kolonie mohou být bílé či šedé [43]. Někdy bývá ve větším množství přítomný v majonézách, kde se při dostatečně nízké hodnotě pH nerozmnožuje a neprodukuje enterotoxiny. Příčinou kontaminace jsou nejčastěji pracovníci s chronickým onemocněním nosohltanu [33].

**2.9 Rod *Enterococcus***

Tento rod se vyčlenil z rodu *Streptococcus* na základě schopnosti růstu v širokém rozmezí teplot 10 – 45 °C a i při pH 9,6. Patří mezi nepohyblivé fakultativně anaerobní bakterie. Tvoří kulovité nebo vejčité buňky o průměru 2,0 µm, případně mohou být pozorovány jako krátké tyčinky. Na tvar buněk má vliv kultivační médium [36]. Příslušníci tohoto rodu jsou relativně rezistentní k inhibičním látkám jako je octan hlinitý, azid sodný či rhodamid draselný. Přežívají zahřev na teplotu 60 °C po dobu 30 minut [35]. Rostou v bujónu s 6,5 % NaCl a také v přítomnosti 0,1 % metylenové modři [36]. Primárně se vyskytuje ve střevním traktu lidí i zvířat, osídluje také dutinu ústní, žlučník či močovou trubici. V případech onemocnění z potravin způsobených enterokoky jsou symptomy nejasné a proměnlivé, zahrnují nevolnost, křeče a případně průjem. Oproti tomu jsou některé druhy studovány pro probiotické účinky při léčbě střevních poruch [37].

*Enterococcus faecalis*

*E. faecalis* je považován za jednoho z nejdůležitějších nosokominálních patogenů. Byl identifikován jako původce endokarditidy, zánětu močových cest a sepse u novorozenců. Vyznačuje se rezistencí k některým antibiotikům, jako například k vankomycinu [37]. Některé kmeny mohou vyvolávat vady mléčných výrobků, oproti tomu se některé používají jako doplňkové sýrařské kultury [36].

## 2.10 Rod *Bacillus*

*Bacillus* jsou rovné tyčinky patřící do sekce sporulujících grampozitivních tyčinek a koků. Bakterie tvoří při nepříznivých podmínkách uvnitř buňky spory, která je velmi odolná k vysokým teplotám a UV záření. Na živných půdách tvoří typické velké a drsné kolonie s nepravidelnými okraji. Jsou aerobní nebo fakultativně anaerobní [36]. Některé druhy se řadí mezi mezofilní mikroorganismy s růstovým optimem v rozmezí 30 – 45 °C, některé kmeny jsou termofilní a rostou při teplotách kolem 65 °C. Byly nalezeny i psychrotrofní kmeny rostoucí při 4 – 6 °C. Spory i vegetativní buňky se hojně vyskytují v půdě ( $10^5$  –  $10^6$  spor v 1 g) a mohou být nalezeny ve všech syrových i tepelně zpracovaných potravinách vyjma sterilovaných [37]. Tyto bakterie mají bohaté enzymatické vybavení a produkují antibiotika polypeptidové povahy, čehož se využívá při průmyslové výrobě [32].

### *Bacillus cereus*

*B. cereus* je možným původcem infekcí (krve, zápal mozkových blan) a otrav z potravin. Produkuje cyklický peptid, který způsobuje zvracení a křeče. Onemocnění je charakteristické krátkou inkubační dobou (1 – 5 hodin). Dále způsobuje průjmové onemocnění. Jeho příčinou je enterotoxin (toxin působící v tenkém střevu). Symptomy jsou bolesti břicha a vodnatá stolice, dostávají se 8 – 16 hodin po požití infikované potraviny. Oba typy otravy jsou relativně mírné [37]. Pozoruhodný případ otravy *B. cereus* se vyskytl v roce 1986 na Slovensku. Během 30 hodin onemocnělo 347 studentů. Příznaky otravy byly převážně lehké (křeče, zvracení, bolest hlavy) a do dvou dní odezněly. Příčinou bylo mléko tři dny uchovávané v chladničce a opakovaně ohřívané a chlazené. *B. cereus* může také způsobit vadu jogurtů s rozmíchanou sraženinou. Při vyšším obsahu kyslíku a nízkém obsahu kyseliny mléčné způsobují pomocí proteáz sladké sražení, což se projevuje vznikem nesouvislé sraženiny a změnou chuti [33].

### *Bacillus subtilis*

Otravy z potravin způsobené *B. subtilis* jsou podobné jako u druhu *B. cereus* [37]. Za vhodných podmínek způsobuje táhlovitost a nitkovitost chleba. Tato vada se projevuje hlavně při skladování na vlhkém a teplém místě nepříjemným pachem, hořkou chutí a střída se stává mazlavou [33]. Enzymy tohoto rodu našly široké uplatnění jako přísady do pracích prostředků a amyláza se využívá v pivovarnictví [32].

*Bacillus sphaericus*

*B. sphaericus* je běžnou půdní striktně aerobní bakterií. Má jedinečné insekticidní schopnosti proti komářím larvám. Za tímto účelem se prodává komerční výrobek pod názvem Vectolexa. Tyto prostředky jsou efektivnější, než ty proti dospělým komárům [44]. Není schopen využívat pentózy, hexózy a disacharidy jako zdroje uhlíku a energie, ale jsou schopné využívat glukonát, mastné kyseliny a aminokyseliny [45].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

### 3 CÍL PRÁCE

Cíle bakalářské práce byly stanoveny následovně:

- v teoretické části zpracovat literární rešerši týkající se charakteristiky, výroby, významu a využití MAG v potravinářství i jiných průmyslových odvětvích
- popsat antimikrobiální účinky monoacylglycerolů a mastných kyselin se zaměřením na kyselinu kaprylovou a myristovou
- v praktické části sledovat vliv monoacylglycerolu kyseliny kaprylové v koncentracích 25 – 1500 mg.l<sup>-1</sup> na růst vybraných bakterií s buněčnou stěnou grampozitivního i gramnegativního typu
- na základě teoretické části a výsledků praktické části formulovat návrhy týkající se využití monoacylglycerolu kyseliny kaprylové jako antimikrobiální látky

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Testované mikroorganismy

Vliv různých koncentrací monokaprylinu byl sledován na 15 bakteriích, které pocházely z České sbírky mikroorganismů (CCM).

- testované bakterie s buněčnou stěnou gramnegativního typu:

*Citrobacter freundii* CCM 7107

*Escherichia coli* CCM 3954

*Proteus mirabilis* CCM 7188

*Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955

*Pseudomonas fluorescens* CCM 2798

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

*Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303

- testované bakterie s buněčnou stěnou grampozitivního typu:

*Bacillus cereus* CCM 2010

*Bacillus sphaericus* CCM 1615

*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062

*Enterococcus faecalis* CCM 2665

*Enterococcus faecalis* CCM 4224

*Enterococcus faecalis* CCM 7247

*Micrococcus luteus* CCM 732

*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3653

## 4.2 Živná média

### Masopeptonový agar (MPA)

- masový výtažek..... 3,0 g
- pepton ..... 5,0 g
- NaCl..... 3,0 g
- agar..... 15 g
- deionizovaná voda ..... 1000,0 ml

### Masopeptonový bujón (MPB)

- masový výtažek.....3,0 g
- pepton .....5,0 g
- NaCl.....3,0 g
- deionizovaná voda .....1000,0 ml

Po dokonalém rozpuštění a smísení komponent v zásobní láhvi byla půda sterilována v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Poté byla část půdy MPA rozlita na Petriho misky a z části byl připraven šikmý agar. Po utužení byly skladovány při laboratorní teplotě v temnu. Půda MPB byla rozdělena po 4 ml do zkumavek a skladována za stejných podmínek.

## 4.3 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy Sartorius, BA 110S

Autokláv Systec 2540EL

Autokláv Varioklav H+P

Automatické mikropipety Biohit

Biologický termostat Memmert INE 600

Fotometr Tecan Sunrise TW/TC

Flow Box Clean Air



Chladnička Electrolux

Laboratorní předvážky KERN

Laboratorní sklo:

- zásobní lahve 250 ml
- zkumavky
- Petriho misky

Mikrotitrační destičky

#### 4.4 Příprava roztoku monokaprylinu

Zásobní roztok monokaprylinu o koncentraci 5 % (w/v) byl připraven rozpuštěním navážky 0,5 g v 10 ml absolutního etanolu. Růst bakterií byl sledován v rozmezí koncentrací 25 – 1500 mg.l<sup>-1</sup>, které byly připraveny odpipetováním zásobního roztoku do 4 ml MPB. V Tab. 1 jsou znázorněny sledované koncentrace a objem zásobního roztoku potřebný pro přípravu MPB s monokaprylinem.

Tab. 1- Příprava koncentrací monokaprylinu

Koncentrace MAG [mg/l]	25	50	100	250	500	1000	1500
Objem zás. roztoku [μl]	2	4	8	20	40	80	120

#### 4.5 Příprava bakteriální suspenze

Bakterie z České sbírky mikroorganismů byly dodány na želatinových discích. Pro jejich resuscitaci byly použity šikmé agary. Želatinový disk byl rozpuštěn v kondenzované vodě ve spodní části agaru a vyočkován po celé délce agaru. Zkumavky byly kultivovány při 30 °C po dobu 24 hodin. Poté byla část kultury vyočkována křížovým roztěrem na Petriho misky a kultivována za stejných podmínek. Jedna samostatná kolonie typická pro daný druh byla opět vyočkována křížovým roztěrem a kultivována, čímž byla zajištěna čistota bakteriální kultury. Petriho misky byly uchovány při teplotě 4 °C a kolonie byly používány k přípravě bakteriálních suspenzí v MPB.

Pro přípravu suspenze byla pomocí očkovací kličky přenesena jedna samostatná kolonie do zkumavky s MPB. Po 24 hodinové kultivaci při 30 °C byla tato suspenze důkladně promíchána a použita pro vlastní stanovení.

#### 4.6 Sledování růstu bakterií

Růst bakterií v přítomnosti monokaprylinu byl sledován měřením optické denzity při vlnové délce 600 nm s použitím přístroje TECAN Sunrise TW/TC. Tuto metodu popsali Dufour a kol. [46] jako efektivní pro otestování vlivu antibakteriálních látek.

Nejprve byla připravena mikrotitrační destička. Do každé jamky bylo napipetováno 200  $\mu\text{l}$  MPB s příslušnou koncentrací monokaprylinu a zaočkováno bakteriální suspenzí o objemu 5  $\mu\text{l}$ . Destička obsahující 96 jamek umožnila současně sledovat vliv sedmi koncentrací monokaprylinu na pět bakterií, provedení negativní kontroly (MPB s příslušnými koncentracemi MAG C<sub>8:0</sub> bez suspenze bakterií) a pozitivní kontroly (200  $\mu\text{l}$  MPB bez MAG s 5  $\mu\text{l}$  bakteriální suspenze). Přesné rozložení znázorňuje Obr. 8, kde M1 – M5 značí testovaný kmen bakterie a 0, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 je použitá koncentrace monokaprylinu v  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0 M1	0 M1	0 M2	0 M2	0 M3	0 M3	0 M4	0 M4	0 M5	0 M5
B	25	25	25 M1	25 M1	25 M2	25 M2	25 M3	25 M3	25 M4	25 M4	25 M5	25 M5
C	50	50	50 M1	50 M1	50 M2	50 M2	50 M3	50 M3	50 M4	50 M4	50 M5	50 M5
D	100	100	100 M1	100 M1	100 M2	100 M2	100 M3	100 M3	100 M4	100 M4	100 M5	100 M5
E	250	250	250 M1	250 M1	250 M2	250 M2	250 M3	250 M3	250 M4	250 M4	250 M5	250 M5
F	500	500	500 M1	500 M1	500 M2	500 M2	500 M3	500 M3	500 M4	500 M4	500 M5	500 M5
G	1000	1000	1000 M1	1000 M1	1000 M2	1000 M2	1000 M3	1000 M3	1000 M4	1000 M4	1000 M5	1000 M5
H	1500	1500	1500 M1	1500 M1	1500 M2	1500 M2	1500 M3	1500 M3	1500 M4	1500 M4	1500 M5	1500 M5

Obr. 8- Schéma mikrotitrační destičky

Takto připravená mikrotitrační destička byla kultivována při 25 °C po dobu 24 hodin. Optická denzita byla měřena každých 30 minut Na základě naměřených a zprůměrovaných hodnot byly sestaveny růstové křivky (Obr. 9). Dále byly spočteny relativní hodnoty optické denzity v čase  $t$  [ $y = \ln(\text{O.D.}_t / \text{O.D.}_0)$ ] a závislost logaritmu relativní hodnoty na čase byla vyhodnocena pomocí Gompertzova modelu:

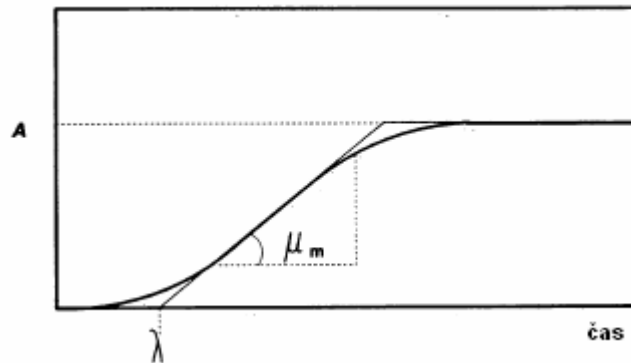
$$y = A \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_m \cdot e}{A} (\lambda - t) + 1\right]\right\}$$

kde: A.... asymptota definovaná jako maximální dosažená hodnota

$\mu_m$ ... maximální specifická růstová rychlost [ $\text{h}^{-1}$ ]

$\lambda$ ... doba lag-fáze [h]

Zwietering a kol. [47] ohodnotili tento model jako nejvhodnější pro popis bakteriálního růstu, kdy jsou sledovány tři parametry růstu. K výpočtu byl použit statistický software Unistat<sup>®</sup> 5.5.



Obr. 9- Růstová křivka [47]

#### 4.7 Dekontaminace materiálu

Použité mikrotitrační destičky, živné půdy, suspenze bakterií a jednorázové pomůcky byly dekontaminovány v autoklávu při teplotě 132 °C po dobu 20 minut. Pracovní plochy byly ošetřeny 70% etanolem.

## 5 VÝSLEDKY

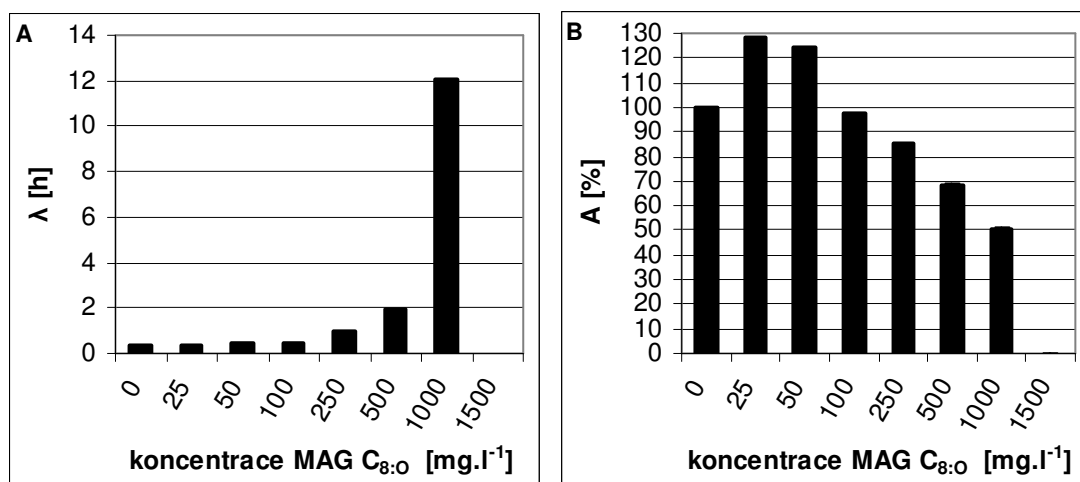
Vliv monoacylglycerolu kyseliny kaprylové na růst bakterií byl sledován v koncentracích 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 mg.l<sup>-1</sup> v MPB. K otestování byly vybrány gramnegativní bakterie (*Citrobacter freundii* CCM 7107, *Escherichia coli* CCM 3954, *Proteus mirabilis* CCM 7188, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420, *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303) a grampozitivní bakterie (*Bacillus cereus* CCM 2010, *Bacillus sphaericus* CCM 1615, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062, *Enterococcus faecalis* CCM 2665, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Enterococcus faecalis* CCM 7247, *Micrococcus luteus* CCM 732, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3653).

Růstové křivky vybraných bakterií v přítomnosti monokaprylinu jsou součástí přílohového materiálu společně s hodnotami růstových parametrů ( $A$ ,  $\lambda$ ,  $\mu_m$ ).

### 5.1 Vliv monokaprylinu na růst gramnegativních bakterií

#### 5.1.1 Vliv MAG C<sub>8:0</sub> na růst *Citrobacter freundii* CCM 7107

U koncentrací monokaprylinu do 100 mg.l<sup>-1</sup> nebyl pozorován žádný inhibiční účinek na růst *Citrobacter freundii* CCM 7107. Naopak, 25 a 50 mg.l<sup>-1</sup> MAG C<sub>8:0</sub> působily stimulačně, kdy oproti kontrole bylo dosaženo o 29 a 25 % vyšší hustoty bakteriální suspenze (Obr. 10B). Také délka lag-fáze (Obr. 10A) nebyla významně ovlivněna a pohybovala se v rozmezí 0,37 – 0,42 hodin.



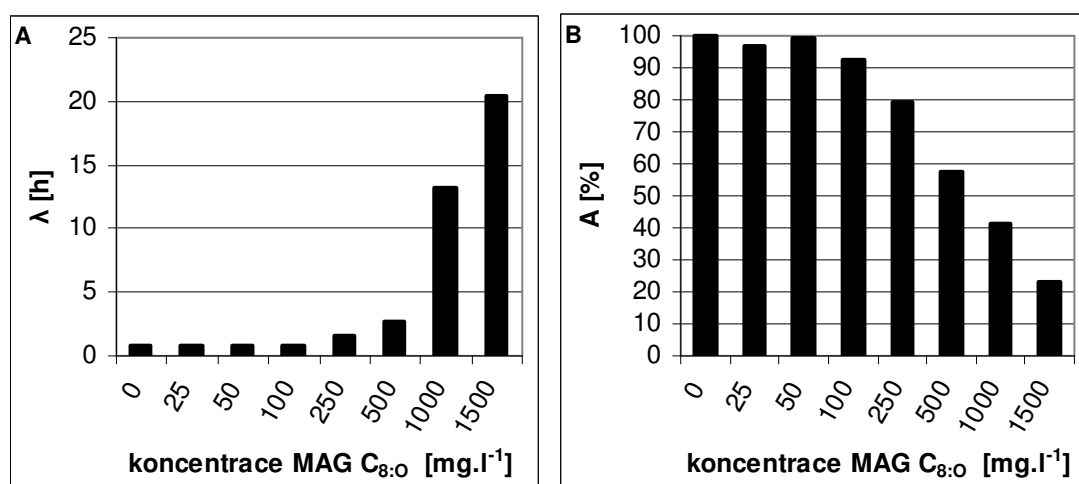
Obr. 10- Účinek MAG C<sub>8:0</sub> na růst *C. freundii* CCM 7107

Vyšší testované koncentrace způsobovaly postupné snižování hustoty buněk, až koncentrace 1500 mg.l<sup>-1</sup> monokaprylinu bylo pro *C. freundii* zcela inhibiční. Koncentrace 250 a 500 mg.l<sup>-1</sup> prodloužily délku lagu na přibližně 1 a 2 hodiny a do 24 hodin bylo dosaženo pouze 85 a 69% nárůstu. V přítomnosti 1000 mg.l<sup>-1</sup> MAG C<sub>8:0</sub> byl snížen růst o 50 % s velmi výrazným prodloužením lag fáze na 12 hodin. Dále při všech testovaných koncentracích nebyla do 24 hodin pozorována fáze odumírání. Růstová rychlost byla postupně snížena s rostoucí koncentrací a to z 1,09 h<sup>-1</sup> na 0,35 h<sup>-1</sup> (Příloha PI).

### 5.1.2 Vliv MAG C<sub>8:0</sub> na růst *Escherichia coli* CCM 3954

Účinky monokaprylinu o koncentracích 25 – 1500 mg.l<sup>-1</sup> na růst *Escherichia coli* CCM 3954 znázorňuje Obr. 11. Nižší testované koncentrace (do 100 mg.l<sup>-1</sup>) výrazně neovlivnily růst *E. coli*, který byl snížen maximálně o 7 % s délkou lag fáze 0,77 – 0,83 hodin. Vyšší koncentrace postupně snižovaly hustotu bakteriální suspenze a prodlužovaly délku lagu. Koncentrace 250 a 500 mg.l<sup>-1</sup> způsobily snížení hustoty buněk na 79 a 57 % se současným prodloužením lag-fáze na 1,58 a 2,67 hodin ve srovnání s kontrolou. Výraznější prodloužení lagu na 13,13 hodin bylo způsobeno koncentrací 1000 mg.l<sup>-1</sup>, kdy bylo dosaženo 41% nárůstu. Úplná inhibice nebyla pozorována ani při 1500 mg.l<sup>-1</sup> MAG C<sub>8:0</sub>. Růst započal až po 20,37 hodinách a na konci kultivace činil nárůst pouze 23 %.

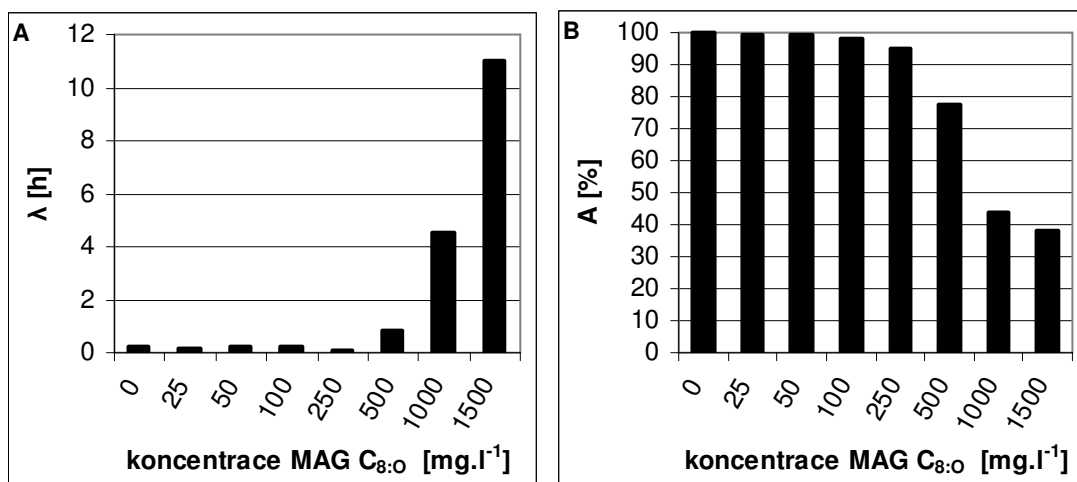
Po 24 hodinách kultivace byly buňky *E.coli* na konci exponenciální fáze či fáze zpomaleného růstu. U kontroly a při nižších koncentracích monokaprylinu se objevil náznak diauxie (Příloha PII A).



Obr. 11- Účinek MAG C<sub>8:0</sub> na růst *E. coli* CCM 3954

### 5.1.3 Vliv MAG C<sub>8:0</sub> na růst *Proteus mirabilis* CCM 7188

Na Obr. 12 jsou znázorněny sledované růstové parametry (délka lagu a maximální hodnota nárůstu) pro *Proteus mirabilis* CCM 7188 v přítomnosti monokaprylinu.



Obr. 12- Účinek MAG C<sub>8:0</sub> na růst *P. mirabilis* CCM 7188

Z grafů je patrné, že koncentracemi do 250 mg.l<sup>-1</sup> nebyl ovlivněn růst této bakterie. Délka lag-fáze nepřesáhla 0,25 hodin a nárůst se pohyboval od 100 do 95 %. Tyto koncentrace způsobily pouze snížení rychlosti růstu a to z 1,64 h<sup>-1</sup> na 1,16 – 1 h<sup>-1</sup> (Příloha PI).

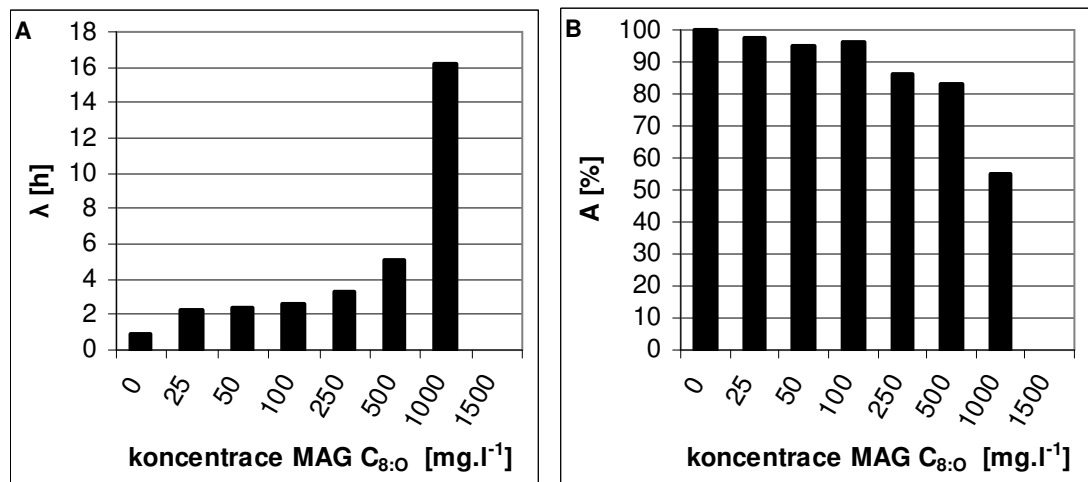
Při 500 mg.l<sup>-1</sup> monokaprylinu započal růst bakterií po 0,85 hodinách a na konci kultivace bylo dosaženo o 22 % nižšího nárůstu. *P. mirabilis* v přítomnosti 1000 a 1500 mg.l<sup>-1</sup> MAG C<sub>8:0</sub> dosahoval přibližně stejné hustoty bakteriální suspenze, a to 44 a 38 %. Výrazněji se lišil v délce lagu (4,5 a 11 hodin).

### 5.1.4 Vliv MAG C<sub>8:0</sub> na růst zástupců rodu *Pseudomonas*

Účinkům monokaprylinu byly vystaveny *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 (Obr. 13) a *P. fluorescens* CCM 2798 (Obr. 14).

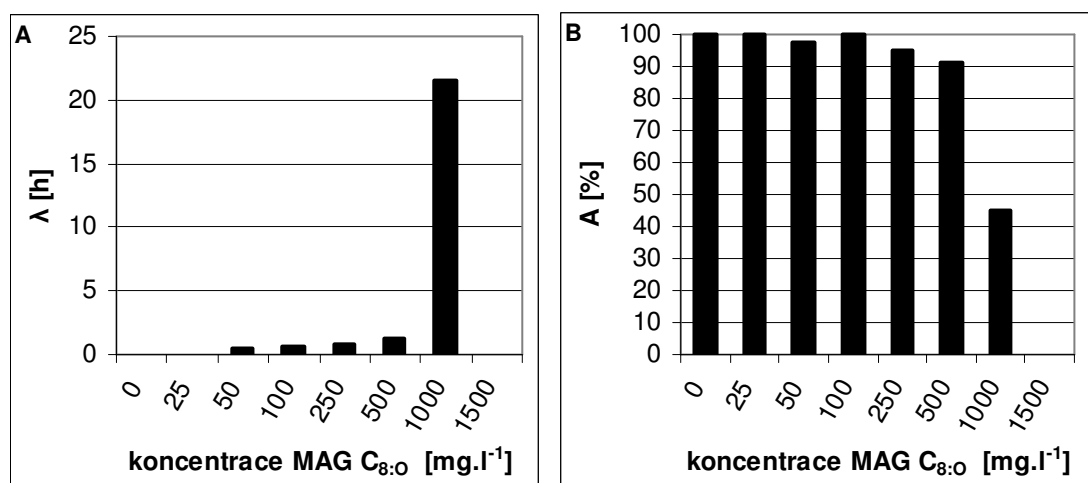
Růst *P. aeruginosa* v kultivačním médiu s monokaprylinem do 100 mg.l<sup>-1</sup> byl téměř shodný jako růst bez inhibiční látky. Hodnoty maximálního nárůstu se pohybovaly v rozmezí 96 – 98 %. Nepatrně byla prodloužena délka lag-fáze z původních 0,93 na více než 2,3 hodin. Koncentrace 250 a 500 mg.l<sup>-1</sup> způsobily snížení hustoty bakteriální suspenze o 14 a 17 % a prodloužily dobu lagu na 3,27 a 5,05 hodin. V přítomnosti 1000 mg.l<sup>-1</sup> MAG C<sub>8:0</sub> započal růst až po 16,19 hodinách, v závěru kultivace bylo dosaženo 54% nárůstu a

buňky se nacházely ve fázi exponenciálního růstu. Nejvyšší testovaná koncentrace působila zcela inhibičně na růst *P. aeruginosa*.



Obr. 13- Účinek MAG C<sub>8:0</sub> na růst *P. aeruginosa* CCM 3955

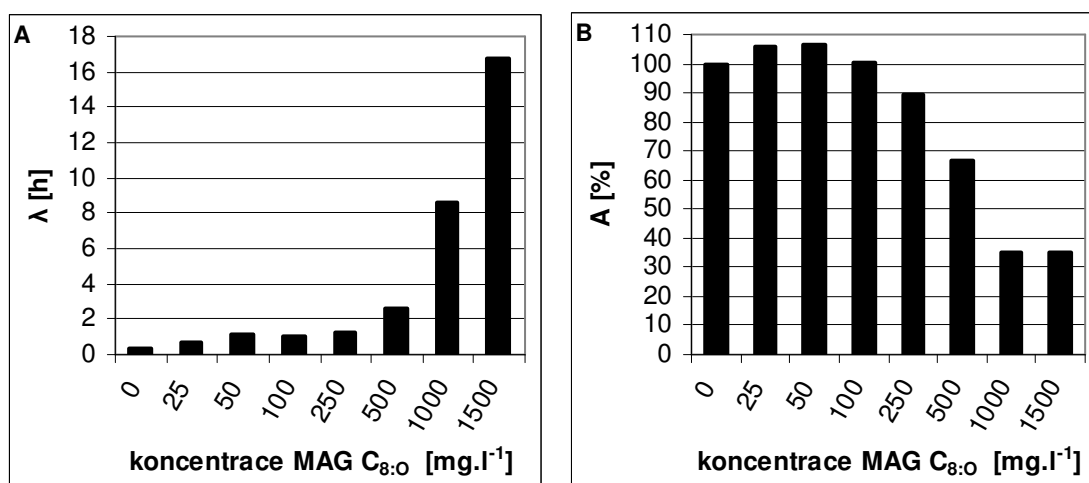
Růstová křivka *P. fluorescens* se vyznačovala velmi krátkou dobou lagu. S rostoucí koncentrací monokaprylinu do 250 mg.l<sup>-1</sup> se doba lagu postupně zvyšovala, ale nepřesáhla 1 hodinu. Současně byl pozorován mírný pokles růstové rychlosti z původní 1,37 až na 0,9 h<sup>-1</sup> (Příloha PI) a hustota bakteriální suspenze se pohybovala v rozmezí 100 – 95 % ve srovnání s kontrolou. Monokaprylin o koncentraci 500 mg.l<sup>-1</sup> způsobil prodloužení lag-fáze na 1,2 hodiny a nárůst byl snížen o 9 %. Koncentrací 1000 mg.l<sup>-1</sup> byla prodloužena fáze lagu na 21,6 hodin a na konci kultivace bylo dosaženo 45% nárůstu ve srovnání s kontrolou. Při 1500 mg.l<sup>-1</sup> MAG C<sub>8:0</sub> nebyla pozorována změna hustoty bakteriální suspenze oproti médiu bez buněk a lze tuto koncentraci považovat za zcela inhibiční.



Obr. 14- Účinek MAG C<sub>8:0</sub> na růst *P. fluorescens* CCM 2798

### 5.1.5 Vliv MAG C<sub>8:0</sub> na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

Obdobně jako u předchozích gramnegativních bakterií, koncentrace do 100 mg.l<sup>-1</sup> neinhibovaly růst *S. Enteritidis* CCM 4420. I přes nepatrné prodloužení lag fáze (Obr. 15A), bylo v závěru kultivace dosaženo stejného nebo vyššího nárůstu ve srovnání s kontrolou. V přítomnosti 25 a 50 mg.l<sup>-1</sup> monokaprylinu byly hodnoty maximálního růstu (Obr. 15B) asi o 6 % vyšší oproti kontrole bez MAG C<sub>8:0</sub>. S dalším zvyšováním koncentrace docházelo s postupným snižováním bakteriální hustoty a prodlužování fáze lagu. Koncentrací 500 mg.l<sup>-1</sup> byl nárůst snížen o 34 % s délkou lagu 2,6 hodin. V prostředí s 1000 mg.l<sup>-1</sup> MAG C<sub>8:0</sub> započal růst po 8,58 hodinách s konečným nárůstem 35 %. Ani přítomnost nejvyšší testované koncentrace nezpůsobila úplnou inhibici růstu *S. Enteritidis*, pouze prodloužila lag-fázi o 16,3 hodin ve srovnání s kontrolou.



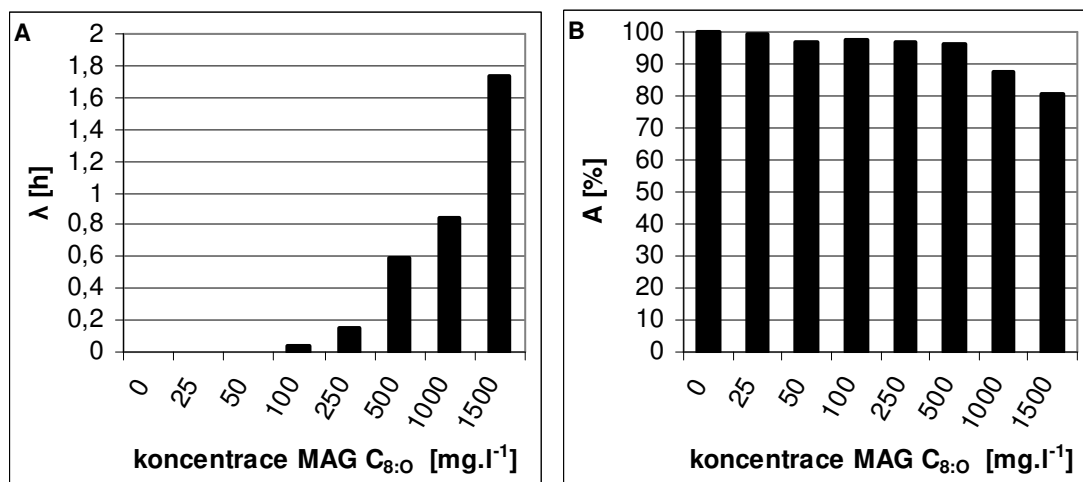
Obr. 15- Účinek MAG C<sub>8:0</sub> na růst *S. Enteritidis* CCM 4420

### 5.1.6 Vliv MAG C<sub>8:0</sub> na růst *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303

Poslední testovanou gramnegativní bakterií byla *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303. Z Obr. 16 je patrné, že monokaprylin nezpůsobil výraznou inhibici růstu při žádné z testovaných koncentrací. Kultivací bez přítomnosti MAG C<sub>8:0</sub> bylo zjištěno, že *S. marcescens* má velmi krátkou lag-fázi a vyznačuje se vysokou růstovou rychlostí 2,62 h<sup>-1</sup> (Příloha PI). S rostoucí koncentrací rychlost růstu postupně klesala až na 0,62 h<sup>-1</sup>. Koncentrace do 500 mg.l<sup>-1</sup> nesnížily nárůst o více jak 4 %. S dalším zvyšováním koncent-



race na 1000 a 1500 mg.l<sup>-1</sup> bylo dosaženo 88 a 80% hustoty bakteriální suspenze a prodloužení doby lagu až na 1,7 hodin (1500 mg.l<sup>-1</sup>).

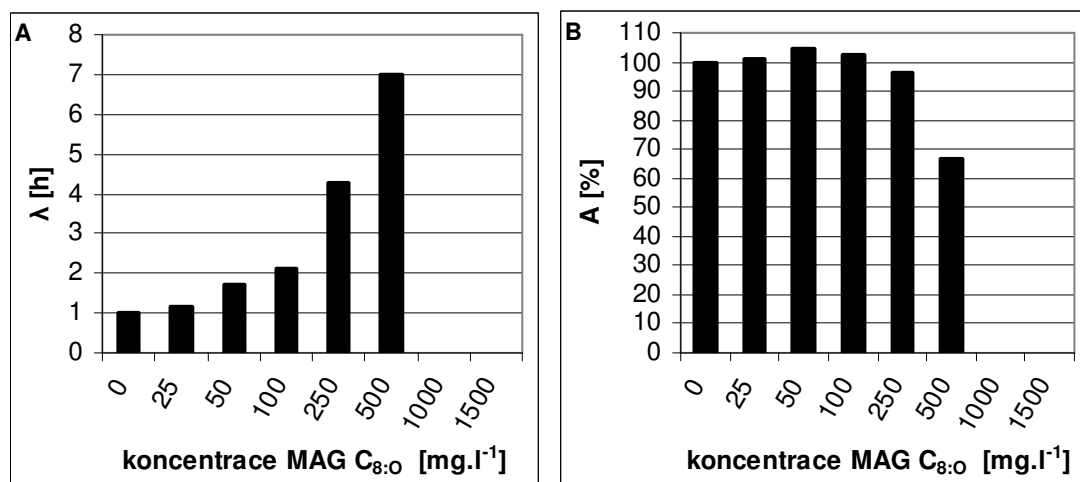


Obr. 16- Účinek MAG C<sub>8:0</sub> na růst *S. marcescens* CCM 303

## 5.2 Vliv monokaprylinu na růst gram pozitivních bakterií

### 5.2.1 Vliv MAG C<sub>8:0</sub> na růst zástupců rodu *Bacillus*

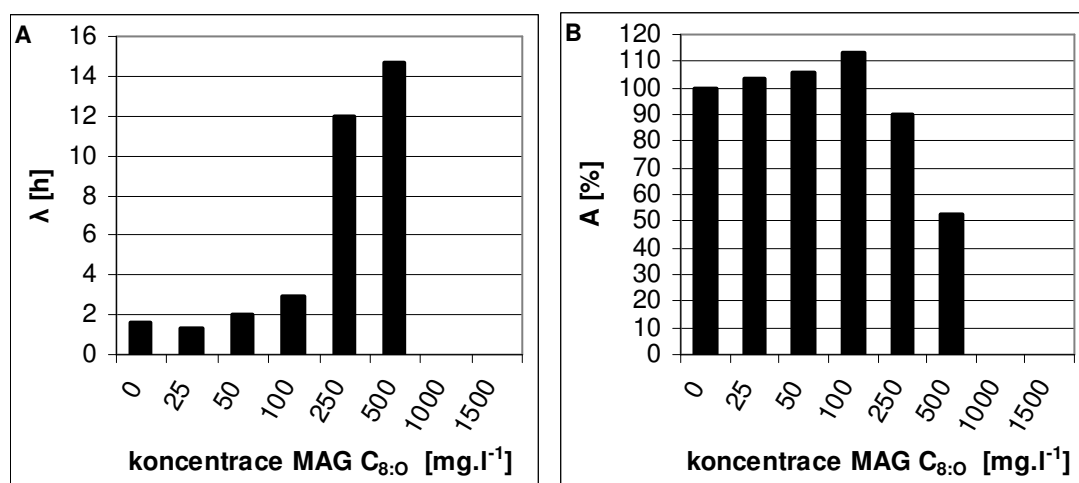
Ze sporulujících bakterií byl testován vliv monoacylglycerolu kyseliny kaprylové na *Bacillus cereus* CCM 2010 (Obr. 17), *B. sphaericus* CCM 1615 (Obr. 18) a *B. subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062 (Obr. 19). Koncentrace do 250 mg.l<sup>-1</sup> nepůsobily inhibičně na růst *B. cereus*. Maximální hustota buněčné suspenze nebyla snížena o více jak 4 %, v některých případech (50 a 100 mg.l<sup>-1</sup>) byla dokonce nepatrně vyšší.



Obr. 17- Účinek MAG C<sub>8:0</sub> na růst *B. cereus* CCM 2010

Doba lagu se postupně prodlužovala a to až na 4,3 hodin při koncentraci 250 mg.l<sup>-1</sup>. V prostředí s 500 mg.l<sup>-1</sup> monokaprylinu bylo dosaženo snížení buněčné hustoty o 34 % s délkou lag-fáze 7 hodin. Při vyšších testovaných koncentracích 1000 a 1500 mg.l<sup>-1</sup> byla pozorována úplná inhibice růstu *B. cereus*.

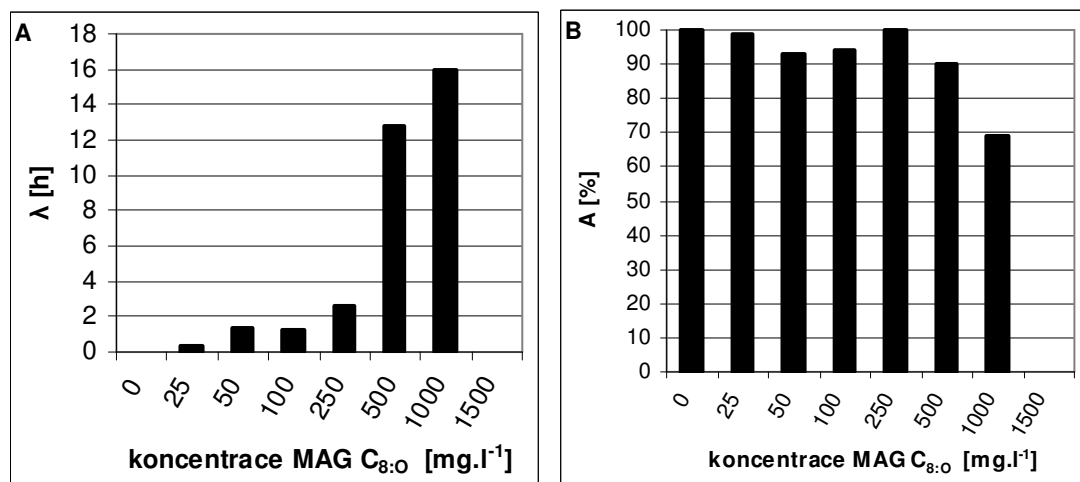
Obdobných výsledků bylo dosaženo i u *B. subtilis*. Koncentrace do 100 mg.l<sup>-1</sup> nepůsobily negativně na růst, se zvyšující se koncentrací se nepatrně zvyšovala hodnota maximálního nárůstu až na 113 %. Doba lag-fáze byla prodloužena na 3 hodiny. Výrazněji byla doba prodloužena přidavkem 250 a 500 mg.l<sup>-1</sup> MAG C<sub>8:0</sub> a to na 12 a 14,7 hodin. Současně byl snížen nárůst o 10 % a koncentrací 500 mg.l<sup>-1</sup> až o 47 %. Růstová rychlost (Příloha PI) klesala se zvyšující se koncentrací až do 250 mg.l<sup>-1</sup> z původní 1,57 h<sup>-1</sup> na 0,72 h<sup>-1</sup>, ale při 500 mg.l<sup>-1</sup> monokaprylinu dosáhla hodnoty 0,84 h<sup>-1</sup>. Vyšší koncentrace zcela inhibovaly růst *B. subtilis*.



Obr. 18- Účinek MAG C<sub>8:0</sub> na růst *B. subtilis* CCM 4062

Třetí testovaná sporulující bakterie *B. sphaericus* byla odolnější vůči monokaprylinu. Koncentrace do 100 mg.l<sup>-1</sup> nesnížily růst o více jak 7 % s mírným prodloužením fáze lagu na 1,4 hodin. V přítomnosti monokaprylinu o koncentraci 250 mg.l<sup>-1</sup> započal růst po 2,6 hodinách, ale i přesto bylo dosaženo téměř shodného nárůstu jako bez přidavku inhibiční látky. Koncentrace 500 mg.l<sup>-1</sup> způsobila snížení hustoty bakteriální suspenze pouze o 10 %, ale výrazně prodloužila dobu lagu na 12,8 hodin. *B. sphaericus* byl schopen růstu i při přidavku 1000 mg.l<sup>-1</sup> MAG C<sub>8:0</sub> do kultivačního média. V závěru kultivace bylo dosaženo 69% nárůstu i přes výrazné prodloužení lagu na 16 hodin. Při nejvyšší testované koncentraci

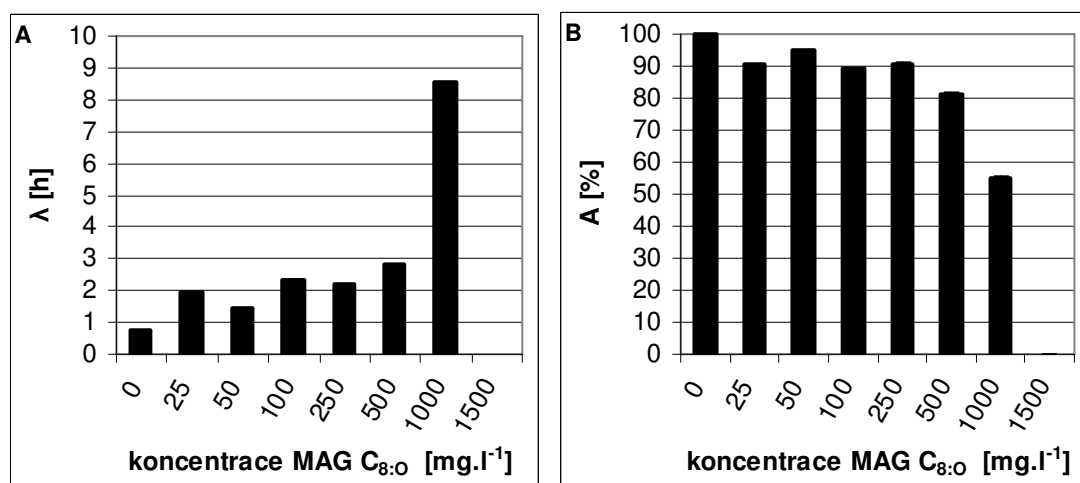
nebylo zaznamenáno zvýšení optické hustoty buněčné suspenze, lze ji tedy považovat za inhibiční pro *B. sphaericus*.



Obr. 19- Účinek MAG C<sub>8:0</sub> na růst *B. sphaericus* CCM 1615

### 5.2.2 Vliv MAG C<sub>8:0</sub> na růst *Enterococcus faecalis*

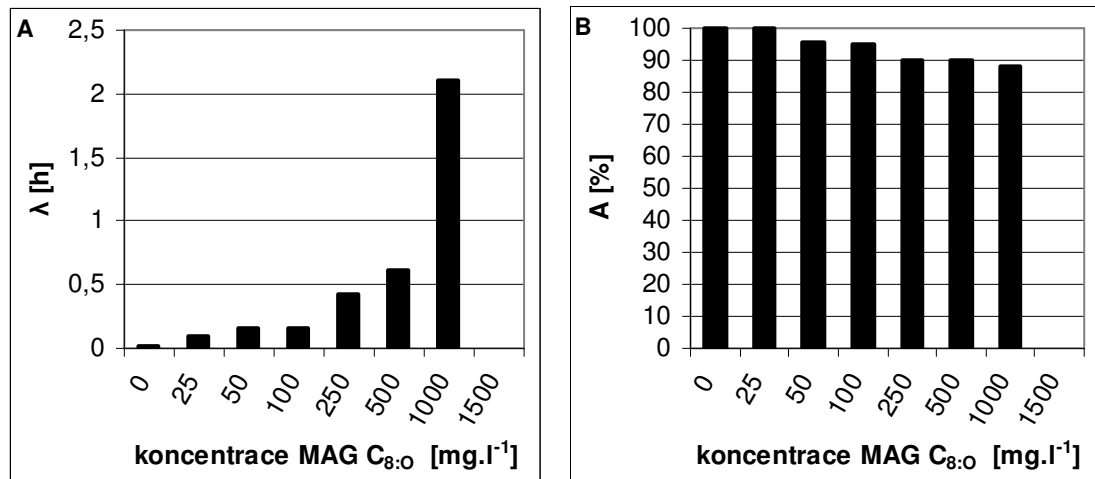
Růst v přítomnosti monokaprylinu byl sledován u kmenů *Enterococcus faecalis* CCM 4224 (Obr. 20), *E. faecalis* CCM 7247 (Obr. 21) a *E. faecalis* CCM 2665 (Obr. 22). Koncentrace do 100 mg.l<sup>-1</sup> způsobily snížení hustoty bakteriální suspenze *E. faecalis* CCM 4224 maximálně o 11 %. Doba lagu nebyla prodloužena o více jak 1,6 hodin ve srovnání s kontrolou. Přídavkem 250 mg.l<sup>-1</sup> monokaprylinu bylo dosaženo téměř stejného efektu jako při 100 mg.l<sup>-1</sup>. Při koncentraci 500 mg.l<sup>-1</sup> bylo pozorováno snížení nárůstu o 19 %.



Obr. 20- Účinek MAG C<sub>8:0</sub> na růst *E. faecalis* CCM 4224

V živném médiu obsahujícím  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$  MAG  $\text{C}_{8:0}$  byl *E. faecalis* CCM 4224 ještě schopen růstu. Lag-fáze byla prodloužena na 8,6 hodin a v závěru kultivace bylo dosaženo 55% nárůstu. Nejvyšší testovaná koncentrace působila zcela inhibičně.

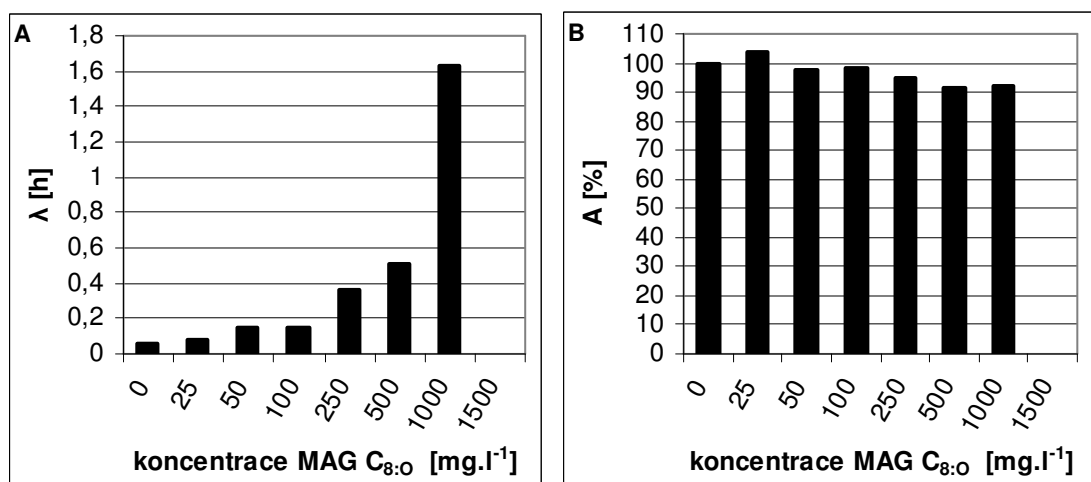
Druhý testovaný kmen *E. faecalis* CCM 7247 byl vůči monokaprylinu odolnější.



Obr. 21- Účinek MAG  $\text{C}_{8:0}$  na růst *E. faecalis* CCM 7247

Koncentrace do  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$  nezpůsobily výraznou inhibici růstu, kdy maximální nárůst nebyl snížen o více jak 12 %. Délka lag-fáze byla prodloužena pouze na 2,1 hodin v přítomnosti  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$  MAG  $\text{C}_{8:0}$ . Při přidavku  $1500 \text{ mg.l}^{-1}$  monokaprylinu nebyl zaznamenán růst kmene *E. faecalis* CCM 7247.

Poslední testovaný kmen *E. faecalis* CCM 2665 byl inhibován účinkem monokaprylinu ještě méně. Dokonce při koncentraci  $25 \text{ mg.l}^{-1}$  bylo pozorováno zvýšení nárůstu o 4 %.

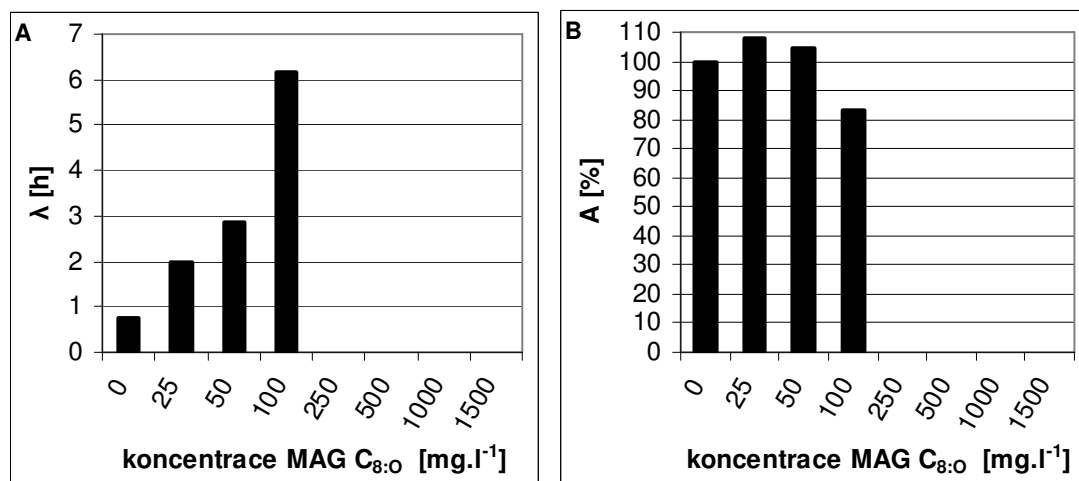


Obr. 22- Účinek MAG  $\text{C}_{8:0}$  na růst *E. faecalis* CCM 2665

Koncentrace do  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$  nesnížily nárůst o více jak 9 %. Rostoucí koncentrace způsobily nepatrné prodloužení délky lag-fáze. Z původní hodnoty menší než 0,1 hodin byla prodloužena pouze na 1,6 hodin při koncentraci  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$ . V přítomnosti monokaprylinu o koncentraci  $1500 \text{ mg.l}^{-1}$  nebyl zaznamenán růst ani u *E. faecalis* CCM 2665. Růstová rychlost (Příloha PI) s rostoucí koncentrací klesala. Největší snížení bylo pozorováno u *E. faecalis* CCM 7247 z  $2,08 \text{ h}^{-1}$  na  $0,51 \text{ h}^{-1}$ .

### 5.2.3 Vliv MAG C<sub>8:0</sub> na růst *Micrococcus luteus* CCM 732

Účinky monokaprylinu o koncentracích 25 –  $1500 \text{ mg.l}^{-1}$  na růst *Micrococcus luteus* CCM 3954 jsou znázorněny na Obr. 23. Již koncentrace  $25 \text{ mg.l}^{-1}$  způsobila prodloužení doby lagu z původních 0,7 hodin na 2 hodiny, ale v závěru kultivace činil nárůst 108 %.



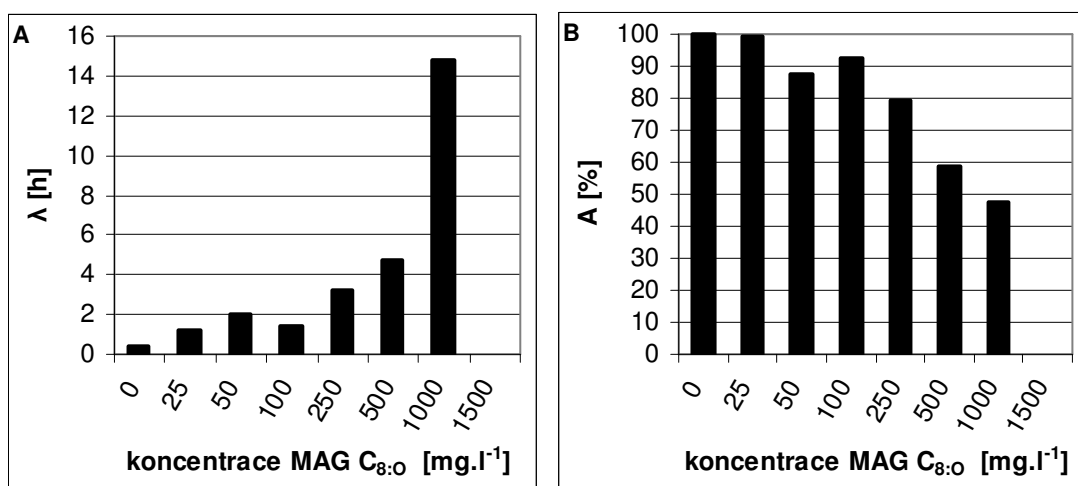
Obr. 23- Účinek MAG C<sub>8:0</sub> na růst *M. luteus* CCM 732

Koncentrací  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  byla lag-fáze více prodloužena na 2,9 hodin s nárůstem o 5 % vyšším ve srovnání s kontrolou. Přídavek monokaprylinu o koncentraci  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  způsobil částečnou inhibici. Růst započal po 6,15 hodinách a dosáhl 83% nárůstu. Růstová rychlost (Příloha PI) se pohybovala v rozmezí  $0,41 - 0,47 \text{ h}^{-1}$ . Při vyšších koncentracích než  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  nebyl zaznamenán růst *M. luteus* a  $250 \text{ mg.l}^{-1}$  MAG C<sub>8:0</sub> bylo označeno jako minimální inhibiční koncentrace.

### 5.2.4 Vliv MAG C<sub>8:0</sub> na růst *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3653

Poslední testovanou bakterií s buněčnou stěnou grampozitivního typu byl *Staphylococcus aureus* CCM 3653 (Obr. 24). Při koncentraci  $25 \text{ mg.l}^{-1}$  bylo dosaženo téměř stejného ná-

růstu jako u kontroly bez MAG s mírným prodloužením lag-fáze. Koncentrace 50 a 100 mg.l<sup>-1</sup> způsobily snížení hustoty bakteriální suspenze o 12 a 8 % a doba lagu nepřesáhla 2 hodiny. V přítomnosti 250 mg.l<sup>-1</sup> monokaprylinu bylo dosaženo 80% nárůstu a dvojnásobné množství (500 mg.l<sup>-1</sup>) snížilo hustotu bakteriální suspenze o 41 %. Výrazné prodloužení délky lag-fáze bylo pozorováno při koncentraci 1000 mg.l<sup>-1</sup>, a to na 14,8 hodin. V závěru kultivace nebylo dosaženo ani polovičního nárůstu oproti kontrole. Při nejvyšší testované koncentraci bylo dosaženo úplné inhibice růstu *S. aureus*.



Obr. 24- Účinek MAG C<sub>8:0</sub> na růst *S. aureus* CCM 3653

## 6 DISKUZE

Potraviny a kosmetické výrobky podléhají při získávání, výrobě, skladování a distribuci fyzikálním, chemickým a mikrobiologickým vlivům. Ty mohou mít za následek jednak ekonomické ztráty, ale především nebezpečné jsou mikrobiální otravy z potravin. Za jistých okolností může být potravinami přenášena řada infekčních nemocí, ale existují i takové infekce, které jsou spojovány výhradně s konzumací potravin (např. listerióza, botulizmus). Pro prodloužení údržnosti potravin byla vypracována řada metod, které předchází růstu mikroorganismů (chlazení, mražení, sušení či přidavek konzervačních prostředků), a nebo které usmrcují bakterie (pasterace, sterilace) [37]. I přesto, že antimikrobiální aktivita mastných kyselin ve formě mýdel je známa odedávna, v poslední době je hojně diskutovaným tématem. Podnětem může být jednak zvyšující se rezistence bakterií vůči antibiotikům, či změna životního stylu konzumentů, kteří se více přiklánějí ke konzervaci přírodními přísadami.

Cílem této práce bylo sledovat růst bakterií *in vitro* v přítomnosti monokaprylinu, monoacylglycerolu kyseliny kaprylové, v rozmezí koncentrací 25 – 1500 mg.l<sup>-1</sup>. K tomu byla vybrána automatizovaná metoda měření optické denzity v 30-ti minutových intervalech pomocí mikrotitrační destičky. Pro lepší porovnání byly pomocí Gompertzova modelu vypočítány růstové parametry.

Z výsledků vyplývá, že chování bakterií v přítomnosti monokaprylinu je velmi různorodé. Již rozdílné složení buněčné stěny naznačuje možné odlišné reakce na přidavek inhibiční látky. Bakterie s buněčnou stěnou grampozitivního typu byly vůči MAG C<sub>8:0</sub> citlivější, kdy nejvyšší koncentrací 1500 mg.l<sup>-1</sup> bylo zamezeno růstu všech testovaných grampozitivních bakterií. U některých byla minimální inhibiční koncentrace ještě nižší. Pro dva zástupce sporulujících bakterií, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* a *B. cereus*, byla stanovena MIC monokaprylinu na 1000 mg.l<sup>-1</sup>. *B. sphaericus* dosáhl při této koncentraci 69 % původního nárůstu, ovšem množení buněk bylo oddáleno o 16 hodin.

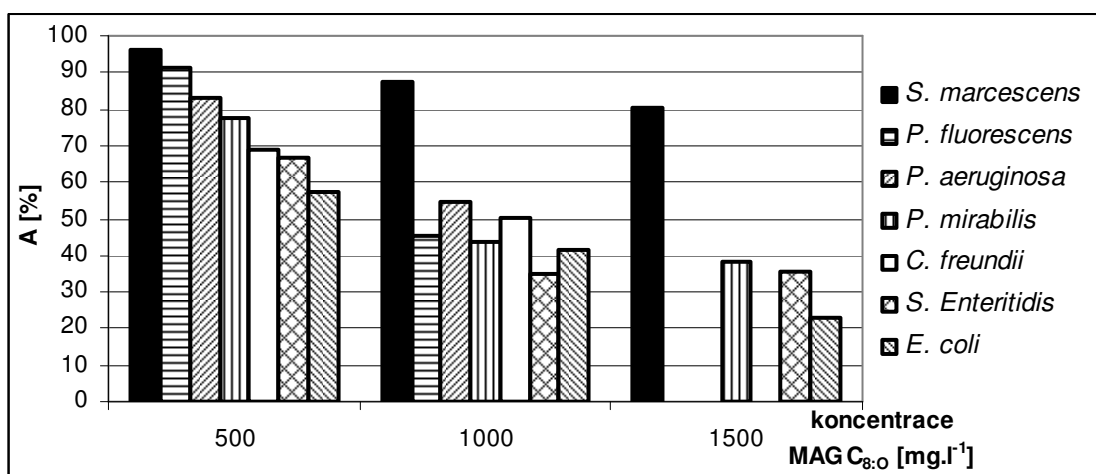
Vnímavost bakterií na monokaprylin se neliší pouze v rámci rodu, jak tomu bylo u bacilů, ale také v rámci druhu *Enterococcus faecalis*. Kmeny *E. faecalis* CCM 2665 a *E. faecalis* CCM 7247 byly relativně odolnější než třetí testovaný kmen. Přídavek monokaprylinu v koncentracích do 1000 mg.l<sup>-1</sup> nesnížil maximální nárůst o více jak 12 %. K dosažení obdobného účinku u třetího kmene *E. faecalis* CCM 4224 postačilo 250 mg.l<sup>-1</sup> MAG C<sub>8:0</sub>.

Minimální inhibiční koncentrace pro všechny tři kmeny byla  $1500 \text{ mg.l}^{-1}$ . Z gram pozitivních koků byl účinku monokaprylinu vystaven dále *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* a *Micrococcus luteus*. Obdobně jako předchozí koky i *S. aureus* byl schopen růst i v kultivačním médiu s  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$  MAG C<sub>8:0</sub>. Lag-fáze byla o 14,4 hodin delší ve srovnání s kontrolou a nebylo dosaženo ani poloviční hustoty bakteriální suspenze. V přítomnosti  $500 \text{ mg.l}^{-1}$  bylo dosaženo téměř 60% nárůstu, ale Wakabayashi a kol. [29] uvádí životaschopnost jen 32 % buněk. Dále navrhují kombinaci s  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$  laktoferricinu B, kdy byl růst snížen pod 0,0013 %. Bergsson a kol. [10] uvádějí, že monokaprylin nevykazuje baktericidní aktivitu proti *S. aureus* při koncentraci 10 mM ( $2183 \text{ mg.l}^{-1}$ ) ve srovnání s jinými monoacylglyceroly.

*M. luteus* byl nejcitlivější bakterií vůči monokaprylinu s minimální inhibiční koncentrací  $250 \text{ mg.l}^{-1}$ . Ovšem přidávkem 25 či  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  MAG C<sub>8:0</sub> byl růst mikrokoka stimulován, ale ne více jako o 8 %.

Pro otestování účinků MAG je často z gram pozitivních bakterií vybírána *Listeria monocytogenes*. Monokaprylin nevykazuje výrazný inhibiční či baktericidní účinek, ale lze jej zvýšit kombinací s kyselinou octovou [12].

U bakterií s buněčnou stěnou gramnegativního typu byl pozorován menší inhibiční účinek. Úplná inhibice růstu nastala pouze u tří ze sedmi testovaných gramnegativních bakterií. Na Obr. 25 je znázorněn maximální nárůst gramnegativních bakterií v relativních % při použití 500, 1000 a  $1500 \text{ mg.l}^{-1}$  MAG C<sub>8:0</sub>.



Obr. 25- Účinek MAG C<sub>8:0</sub> na růst gramnegativních bakterií



Přídavek  $1500 \text{ mg.l}^{-1}$  MAG  $\text{C}_{8:0}$  zabránil růstu *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* a *P. aeruginosa*. V přítomnosti  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$  MAG  $\text{C}_{8:0}$  byla u všech tří bakterií výrazně prodloužena lag-fáze na více jak 12 hodin. Nízké koncentrace 25 a  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  MAG  $\text{C}_{8:0}$  působily u *C. freundii* stimulačně, což se projevilo zvýšením maximálního nárůstu do 30 %. Nepatrná stimulace těmito koncentracemi byla pozorována také u *S. Enteritidis*, ale nepřesáhla 6 %. Navíc, ani nejvyšší testovaná koncentrace nezpůsobila úplnou inhibici *S. Enteritidis*, kdy bylo dosaženo 35% nárůstu oproti kontrole bez MAG. Obdobného účinku dosahoval monokaprylin i v koncentraci  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$ , ale s kratší dobou lagu. Růst *S. Enteritidis* lze inhibovat přídavkem  $3000 \text{ mg.l}^{-1}$  kyseliny kaprylové, jak uvádí Skřivanová a kol. [22].

Úplná inhibice růstu nebyla pozorována ani u dalších bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*. *Escherichia coli* byla druhou nejcitlivější bakterií této čeledi, která v kultivačním médiu s  $1500 \text{ mg.l}^{-1}$  MAG  $\text{C}_{8:0}$  dosahovala pouze 23% nárůstu. Růst *E. coli* je možné inhibovat přídavkem  $2000 \text{ mg.l}^{-1}$  kyseliny kaprylové nebo  $5000 \text{ mg.l}^{-1}$  kaprinové, ostatní mastné kyseliny jsou neúčinné [22]. *P. mirabilis* byl také poměrně odolnou bakterií vůči monokaprylinu. Jako u jiných gramnegativních bakterií byla v přítomnosti  $1500 \text{ mg.l}^{-1}$  prodloužena fáze lagu na více jak 10 hodin. Žádný výrazný inhibiční účinek nebyl pozorován ani u *Serratia marcescens* subsp. *marcescens*, která byla z testovaných bakterií nejodolnější. Nejvyšší testovaná koncentrace snížila nárůst pouze o 20 %. K podobnému účinku postačovala u ostatních gramnegativních bakterií koncentrace 250 –  $500 \text{ mg.l}^{-1}$ , s výjimkou *P. fluorescens*.

Ve studiích, zabývajících se účinkem monoacylglycerolů a mastných kyselin, se často objevují také gramnegativní bakterie *Helicobacter pylori* a *Neisseria gonorrhoeae*. Monokaprylin je uváděn jako nejméně účinný MAG proti *H. pylori*, původci chronického zánětu žaludku [28]. Podobné výsledky jsou publikovány také pro *N. gonorrhoeae* [24], pohlavně přenášenou bakterii. Nejvyšších baktericidních účinků proti oběma bakteriím bylo dosaženo při použití monokaprinu nebo monolaurinu.

## ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo sledovat vliv 1-monoacylglycerolu kyseliny kaprylové na růst bakterií, které mohou být původci alimentárních onemocnění, nebo které se podílejí na kažení potravin. Růst bakterií byl sledován 24 hodin měřením optické denzity s použitím mikrotitrační destičky. Stanovená minimální inhibiční koncentrace představuje koncentraci, při které nebyla pozorována změna optické denzity. Výsledky lze shrnout v následujících bodech:

- z 15 testovaných bakterií bylo dosaženo úplné inhibice u 11 bakterií, z toho 8 grampozitivních a 3 gramnegativních
- nejcitlivější bakterií byl *Micrococcus luteus* s MIC 250 mg.l<sup>-1</sup>
- nejcitlivější bakterií s buněčnou stěnou gramnegativního typu byl *Pseudomonas fluorescens* s MIC 1500 mg.l<sup>-1</sup>
- nejodolnější bakterií byla *Serratia marcescens* subsp. *marcescens*
- u *Citrobacter freundii* a *Salmonella Enteritidis* a *Micrococcus luteus* byla pozorována stimulace růstu při koncentracích 25 a 50 mg.l<sup>-1</sup>, u *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* i při koncentraci 100 mg.l<sup>-1</sup>

Monokaprylin by se mohl uplatnit jako inhibiční látka v potravinářství či kosmetickém průmyslu především proti grampozitivním bakteriím. I přesto, že inhibiční koncentrace splňuje požadavek na nejvyšší povolené množství dané vyhláškou Ministerstva zdravotnictví č. 4/2008 Sb., v dostupné literatuře jsou popsány účinnější monoacylglyceroly.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., Potravinařská biochemie I, Zlín, 2007
- [2] VELÍŠEK, J., Chemie potravin, Tábor, 1999
- [3] MOULOUNGUI, Z., RAKOTONDRAZAFY, V., PEYROU, G., GACHEN C., EYCHENNE V. (1998). Pure  $\alpha$ -monoglycerides for industrial applications. *Agro Food Ind. Hi-Tech* 9: 10-14
- [4] POKORNÝ, J., DUBSKÁ, L., Technologie tuků, Praha, 1986
- [5] KAEWTHONG, W., SIRISANNEEYAKUL, S., PRASERTSAN, P. KITTIKUN, A., Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase, *Process Biochemistry*, 2005, vol. 40, p. 1525-1530
- [6] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J., Chemie potravin, Praha, 1983
- [7] JANIŠ, R., KREJČÍ, J., KLÁSEK, A., Preparation of 1-monoacylglycerols from glycidol and fatty acid catalyzed by the chromium(III)-fatty acid system, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2000, vol. 102, p. 351-354
- [8] Systematika povrchově aktivních látek [online]. [cit 2009-2-21] Dostupný z WWW: <[www.cepac.cz](http://www.cepac.cz)>
- [9] DAVINSON, P.M., SOFOS, J.N., BRANNERN, A.L., Antimicrobials in food, CRC Press, Boca Raton, 2005
- [10] BERGSSON, G., ARNFINNSSON, J., STEINGRÍMSSON, Ó, THORMAR, H., Killing of Gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides, *AMPIS*, 2001, vol. 109, p. 670-678
- [11] LEE, J.Y., KIM, Y.S., SHIN, D.W., 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
- [12] GARCIA, M., AMALARADJOU, M.A.R., NAIR, M.K.M., ANAAMALAI, T.V., SURENDRANATH, S., LEE, S., HOAGLAND, T., DZUREC, D., FAUSTMAN, C., VENKITANARAYANAN, K., Inactivation of *Listeria monocytogenes* on frankfurters by monocaprylin alone or in combination with acetic acid, *Journal of Food Protection*, 2007, vol. 70, no. 7, p. 1594-1599

- [13] KABARA, J.J., The Pharmacological Effect of Lipids, The American Oil Chemists Society, 1978
- [14] SUN, C.Q., O'CONNOR, J., ROBERTON, A.M., Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*, *Immunology and Medical Microbiology*, 2003, vol. 36, p. 9-17
- [15] SUN, C.Q., O'CONNOR, J., ROBERTON, A.M., The antimicrobial properties of milkfat after partial hydrolysis by calf pregastric lipase, *Chemico-Biological Interactions*, 2002, vol. 140, p. 185-198
- [16] SKŘIVANOVÁ, E., MAROUNEK, M., Influence of pH on Antimicrobial Activity of Organic Acids against Rabbit Enteropathogenic Strain of *Escherichia coli*, *Folia Microbiologica*, 2007, vol. 52, p. 70-72
- [17] NAIR, M.K.M., VASUDEVAN, P., HOAGLAND, T., VENKITANARAYANAN, K., Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in milk by caprylic acid and monokaprylin, *Food Microbiology*, 2004, vol. 21, p. 611-616
- [18] MAROUNEK, M., SKŘIVANOVÁ, E., RADA, V., Susceptibility of *Escherichia coli* to C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub> Fatty Acids, *Folia Microbiologica*, 2003, vol. 48, p. 731-735
- [19] KOLLANOOR, 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
- [20] SPRONG, R.C., HULSTEIN, M.F.E., MEER, R.V., Bacterial Activities of Milk Lipids, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, vol. 45, p. 1298-1301
- [21] SPRONG, R.C., HULSTEIN, M.F.E., MEER, R.V., Bovine milk fat components inhibit food-borne pathogens, *International Dairy Journal*, 2002, vol. 12, p. 209-215
- [22] SKŘIVANOVÁ, E., MAROUNEK, M., BENDA, V., BŘEZINA, P., Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin, *Veterinární Medicina*, 2006, vol. 51, p. 81-88

- [23] SKŘIVANOVÁ, E., MAROUNEK, M., DLOUHÁ, G., KAŇKA, J., Susceptibility of *Clostridium perfringens* to C<sub>2</sub> – C<sub>18</sub> fatty acids, Letters in Applied Microbiology, 2005, vol. 41, p. 77-81
- [24] BERGSSON, G., STEINGRÍMSSON, Ó., THORMAR H., In Vitro Susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* to Fatty Acids and Monoglycerides, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999, vol. 43, p. 2790-2792
- [25] NAIR M.K.M., JOY J., VASUDEVAN P., HINCKLEY L., HOAGLAND T.A., VENKITANARAYANAN K.S., Antibacterial effect of caprylic acid and monokaprylin on major bacterial mastitis pathogens, Journal of Dairy Science , 2005, vol. 88, p. 3488-3495
- [26] HILMARSOON, H., KRISTMUNDSDÓTTIR, T., THORMAR, H., Virucidal activities of medium- and long-chain fatty alcohols, fatty acids and monoglycerides against herpes simplex virus types 1 and 2: comparison at different pH levels, APMIS, 2005, vol. 113, p. 58-65
- [27] HILMARSOON, H., TRAUSTASON, B.S., KRISTMUNDSDÓTTIR, T., THORMAR, H., Virucidal activities of medium- 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
- [28] 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
- [29] WAKABAYASHI, H., TERAGUCHI, S., TAMURA, Y., Increased *Staphylococcus*-killing Activity of an Antimicrobial Peptide, Lactoferricin B, with Minocycline and Monoacylglycerol, Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2002, vol. 66, p. 2161-2167
- [30] CHAIBI, A., ABABOUCHE, L.H., GHOUILA, M.R., BUSTA, F.F., Effect of monoglycerides on the thermal inactivation kinetics of *Bacillus cereus* F4165/75 spores, Food Microbiology, 1998, vol. 15, 527-537
- [31] SEDLÁČEK, I., Taxonomie prokaryot, Brno, 2007
- [32] ŠILHÁNKOVÁ, L., Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology, Praha, 1995

- [33] GÖRNER, F., VALÍK, L., Aplikovaná mikrobiologie požívání, Bratislava, 2004
- [34] Potravinářská mikrobiologie I- Mikroorganismy v potravinářství. [online]. [cit 2009-3-2] Dostupný z WWW: <[www.cepac.cz](http://www.cepac.cz)>
- [35] VAŘEJKA, F., MRÁZ, O., SMOLA, J., Speciální veterinární mikrobiologie, Praha, 1989
- [36] ŽIŽKA, B., KORBELOVÁ, M., Mikrobiologie I pro SPŠ potravinářské, Praha, 1992
- [37] BARBARA, M.L., BAIRD-PARKER, T.C., GOULD, G.W., The Microbiological Safety and Quality of Food, Maryland, 2000
- [38] JAY, J.M., Modern Food Microbiology, An Aspen publication, 2000
- [39] ALLISON, C., COLEMAN, N., JONES, P.L., HUGHES, C., Ability of *Proteus mirabilis* To Invade Human Urothelial Cells Is Coupled to Motility and Swarming Differentiation, Infection and Immunity, 1992, vol. 60, p. 4740-4746
- [40] O'HARA, C.M., BRENNER, F.W., MILLER, J.M., Classification, Identification, and Clinical Significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*, Clinical Microbiology Reviews, 2000, vol. 13, p. 534-546
- [41] NAUMIUK, L., BARANIAK, A., GNIADKOWSKI, M., KRAWCZYK, B., RYBAK, B., SADOWY, E., SAMET, A., KUR, J., Molecular Epidemiology of *Serratia marcescens* in Two Hospitals in Danzig, Poland, over a 5-Year Period, Journal of Clinical Microbiology, 2004, vol. 42, p. 3108-3116
- [42] HEJAZI, A., FALKINER, F.R., *Serratia marcescens* [online]. [cit 2008-10-3] Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9368530>>
- [43] Staphylococcus aureus [online]. [cit 2008-10-2]. Dostupný z WWW: <<http://old.lf3.cuni.cz/ustavy/mikrobiologie/rep/stau.htm>>
- [44] Bacillus sphaericus [online]. [cit 2008-10-8] Dostupný z WWW: <<http://www.bacillusphaericus.com>>

- [45] BAUMANN, P., CLARK, M.A., BAUMANN, L., BROADWELL, A.H., *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxins [online]. [cit 2008-10-11] Dostupný z WWW:  
<<http://mibr.asm.org/cgi/content/abstract/55/3/425>>
- [46] DUFOUR, M., SIMMONDS, R.S., BREMER, P.J., Development of a method to quantify *in vitro* the synergistic activity of “natural“ antimicrobials, *Food Microbiology*, 2003, vol. 85, p. 249-258
- [47] ZWIETERING, M.H., JONGENBURGER, I., ROMBOUTS, F.M., Modeling of the Bacterial Growth Curve, *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, vol. 56, p. 1875-1881
- [48] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

ATP	adenozintrifosfát
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
DAG	diacylglycerol
HLB	hydrophilic-lipophilic balance
HSV-2	herpes simplex virus typu 2
MAG	monoacylglycerol
MAG C <sub>8:0</sub>	monoacylglycerol kyseliny kaprylové
MAG C <sub>14:0</sub>	monoacylglycerol kyseliny myristové
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MO	mikroorganismus
MPA	masopeptonový agar
MPB	masopeptonový bujón
RSV	respirační syncytiální virus
TAG	triacylglycerol



**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1- 1 a 2-Monoacylglycerol [1] .....	10
Obr. 2- Další estery glycerolu [1] .....	10
Obr. 3- Schéma esterifikace mastné kyseliny glycerolem [3].....	11
Obr. 4- Schéma glycerolýzy [4] .....	12
Obr. 5- Schéma intramolekulární alkoholýzy [4] .....	12
Obr. 6- Schéma hydrolýzy triacylglycerolu [4].....	13
Obr. 7- Schéma adice MK na glycidol [3] .....	13
Obr. 8- Schéma mikrotitrační destičky .....	34
Obr. 9- Růstová křivka [47] .....	35
Obr. 10- Účinek MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>C. freundii</i> CCM 7107 .....	36
Obr. 11- Účinek MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>E. coli</i> CCM 3954 .....	37
Obr. 12- Účinek MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>P. mirabilis</i> CCM 7188 .....	38
Obr. 13- Účinek MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>P. aeruginosa</i> CCM 3955 .....	39
Obr. 14- Účinek MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>P. fluorescens</i> CCM 2798.....	39
Obr. 15- Účinek MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>S. Enteritidis</i> CCM 4420.....	40
Obr. 16- Účinek MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>S. marcescens</i> CCM 303.....	41
Obr. 17- Účinek MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>B. cereus</i> CCM 2010 .....	41
Obr. 18- Účinek MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>B. subtilis</i> CCM 4062 .....	42
Obr. 19- Účinek MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>B. sphaericus</i> CCM 1615.....	43
Obr. 20- Účinek MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>E. faecalis</i> CCM 4224 .....	43
Obr. 21- Účinek MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>E. faecalis</i> CCM 7247 .....	44
Obr. 22- Účinek MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>E. faecalis</i> CCM 2665 .....	44
Obr. 23- Účinek MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>M. luteus</i> CCM 732 .....	45
Obr. 24- Účinek MAG C <sub>8:0</sub> na růst <i>S. aureus</i> CCM 3653 .....	46
Obr. 25- Účinek MAG C <sub>8:0</sub> na růst gramnegativních bakterií .....	48

## SEZNAM TABULEK

Tab. 1- Příprava koncentrací monokaprylinu .....	33
--	----

## SEZNAM PŘÍLOH

P I: Růstové parametry

P II: Růstové křivky vybraných gramnegativních bakterií

P III: Růstové křivky vybraných grampozitivních bakterií

## PŘÍLOHA P I: RŮSTOVÉ PARAMETRY

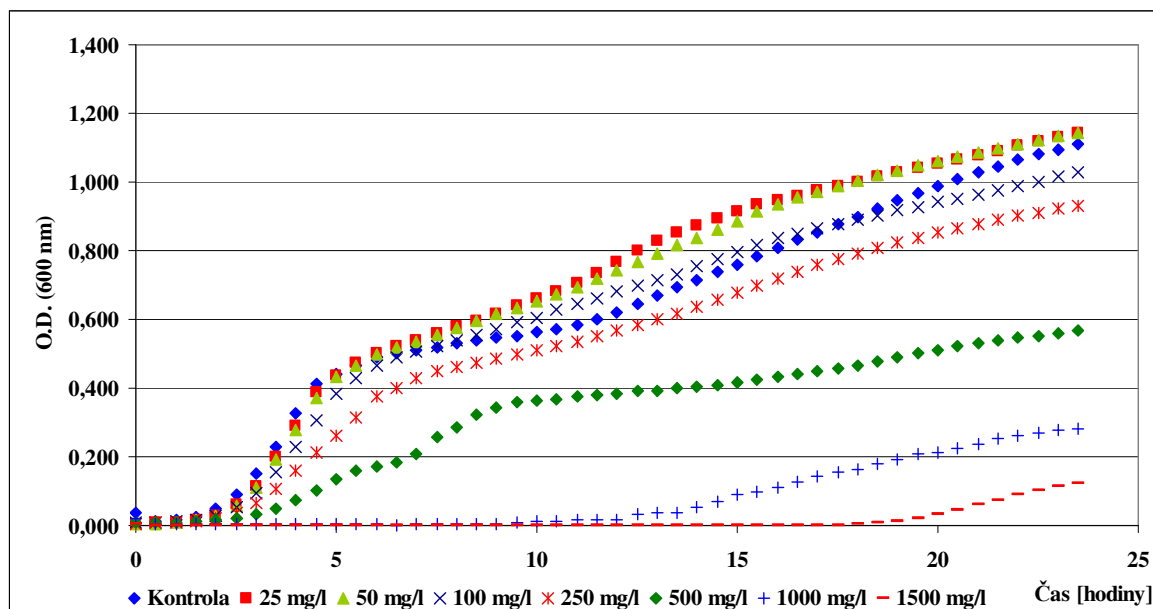
Mikroorganismus	Koncentrace [mg.l <sup>-1</sup> ]	Délka lag-fáze [h]	Max. hodnota [%]	Růstová rychlost [h <sup>-1</sup> ]
<i>B. cereus</i> CCM 2010	0	0,99	100,0	1,89
	25	1,17	100,9	1,52
	50	1,69	104,6	1,46
	100	2,11	102,1	1,16
	250	4,30	96,3	0,74
	500	6,97	66,5	0,41
	1000	NG	NG	NG
	1500	NG	NG	NG
<i>B. sphaericus</i> CCM 1615	0	0,03	100,0	0,94
	25	0,29	99,1	0,92
	50	1,37	92,9	0,94
	100	1,19	93,9	0,94
	250	2,60	99,9	0,82
	500	12,80	90,1	0,70
	1000	16,00	68,9	0,68
	1500	NG	NG	NG
<i>B. subtilis</i> CCM 4062	0	1,58	100,0	1,57
	25	1,29	103,3	1,53
	50	2,00	105,6	1,32
	100	2,95	113,4	1,34
	250	12,00	90,0	0,72
	500	14,69	52,7	0,84
	1000	NG	NG	NG
	1500	NG	NG	NG
<i>C. freundii</i> CCM 7107	0	0,31	100,0	1,09
	25	0,37	128,6	1,02
	50	0,42	124,5	0,89
	100	0,40	97,7	0,67
	250	0,97	85,3	0,57
	500	1,93	68,6	0,40
	1000	12,04	50,5	0,35
	1500	NG	NG	NG
<i>E. coli</i> CCM 3954	0	0,73	100,0	1,42
	25	0,83	97,1	1,17
	50	0,82	99,6	1,21
	100	0,77	92,7	1,02
	250	1,58	79,3	0,91
	500	2,67	57,3	0,57
	1000	13,13	41,3	0,40
	1500	20,37	23,2	0,56

Mikroorganismus	Koncentrace [mg.l <sup>-1</sup> ]	Délka lag-fáze [h]	Max. hodnota [%]	Růstová rychlost [h <sup>-1</sup> ]
<i>E. faecalis</i> CCM 7247	0	0,01	100,0	2,08
	25	0,10	100,3	1,48
	50	0,15	95,9	1,32
	100	0,15	95,0	1,36
	250	0,42	90,3	1,21
	500	0,61	89,9	1,05
	1000	2,11	88,2	0,51
	1500	NG	NG	NG
<i>E. faecalis</i> CCM 2665	0	0,06	100,0	2,09
	25	0,08	103,7	1,62
	50	0,14	97,9	1,67
	100	0,15	98,4	1,34
	250	0,36	95,1	1,41
	500	0,51	91,4	0,99
	1000	1,63	91,8	0,71
	1500	NG	NG	NG
<i>E. faecalis</i> CCM 4224	0	0,74	100,0	1,41
	25	1,92	90,5	1,19
	50	1,46	94,8	1,14
	100	2,31	89,4	1,16
	250	2,23	90,7	1,02
	500	2,80	81,3	0,83
	1000	8,58	55,2	0,44
	1500	NG	NG	NG
<i>M. luteus</i> CCM 732	0	0,74	100,0	0,47
	25	2,00	108,0	0,42
	50	2,85	104,6	0,45
	100	6,15	83,4	0,45
	250	NG	NG	NG
	500	NG	NG	NG
	1000	NG	NG	NG
	1500	NG	NG	NG
<i>P. aeruginosa</i> CCM 3955	0	0,93	100,0	1,09
	25	2,30	97,5	1,06
	50	2,43	95,3	1,01
	100	2,57	96,0	0,96
	250	3,27	86,5	0,82
	500	5,05	82,9	0,62
	1000	16,19	54,8	0,59
	1500	NG	NG	NG

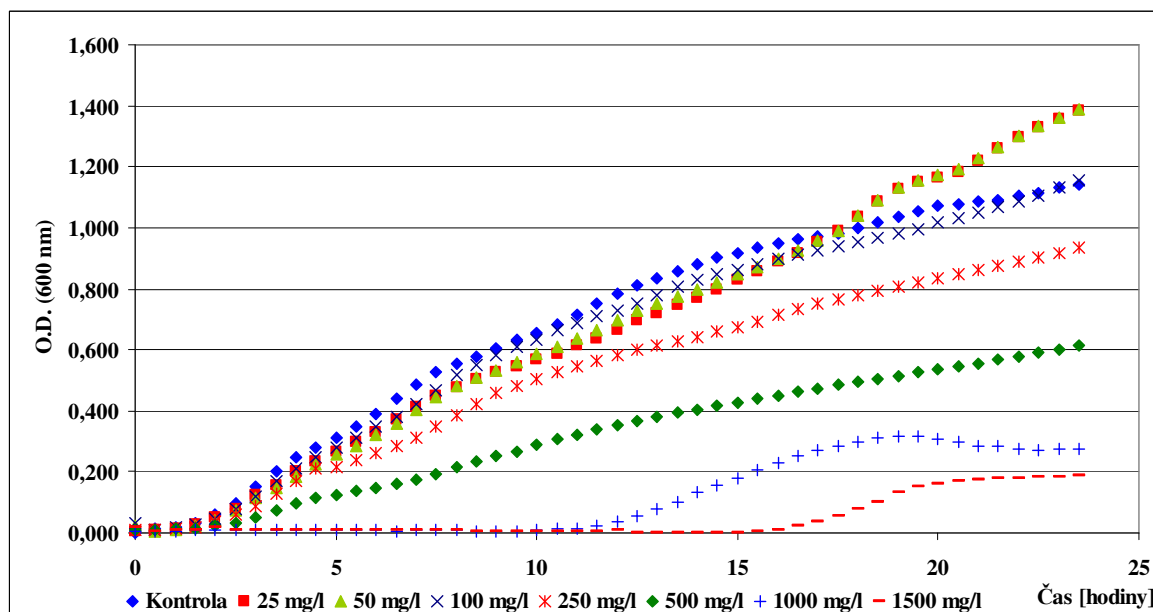
Mikroorganismus	Koncentrace [mg.l <sup>-1</sup> ]	Délka lag-fáze [h]	Max. hodnota [%]	Růstová rychlost [h <sup>-1</sup> ]
<i>P. fluorescens</i> CCM 2798	0	0,01	100,0	1,37
	25	0,06	100,0	1,38
	50	0,42	97,7	1,22
	100	0,70	100,0	1,13
	250	0,86	94,9	0,90
	500	1,21	91,4	0,86
	1000	21,56	45,1	0,60
	1500	NG	NG	NG
<i>P. mirabilis</i> CCM 7188	0	0,21	100,0	1,64
	25	0,12	99,5	1,08
	50	0,19	99,6	1,12
	100	0,25	98,3	1,16
	250	0,09	94,9	1,00
	500	0,85	77,6	0,86
	1000	4,50	43,9	0,56
	1500	11,00	38,0	0,79
<i>S. aureus</i> CCM 3653	0	0,36	100,0	1,19
	25	1,25	99,1	0,96
	50	1,99	87,7	0,97
	100	1,45	92,4	0,87
	250	3,17	79,7	0,75
	500	4,74	58,9	0,55
	1000	14,80	47,3	0,33
	1500	NG	NG	NG
<i>S. Enteritidis</i> CCM 4420	0	0,39	100,0	1,19
	25	0,69	105,9	0,87
	50	1,17	106,3	0,81
	100	1,04	100,3	0,84
	250	1,29	89,6	0,66
	500	2,60	66,4	0,47
	1000	8,58	34,8	0,42
	1500	16,70	35,4	0,43
<i>S. marcescens</i> CCM 303	0	0,0001	100,0	2,62
	25	0,002	99,1	2,75
	50	0,003	97,0	2,45
	100	0,04	97,6	2,15
	250	0,15	96,7	1,84
	500	0,59	96,3	1,12
	1000	0,84	87,6	1,19
	1500	1,73	80,4	0,63

## PŘÍLOHA P II: RŮSTOVÉ KŘIVKY VYBRANÝCH GRAMNEGATIVNÍCH BAKTERIÍ

P II A: Vliv monokaprylinu na růst *Escherichia coli* CCM 3954

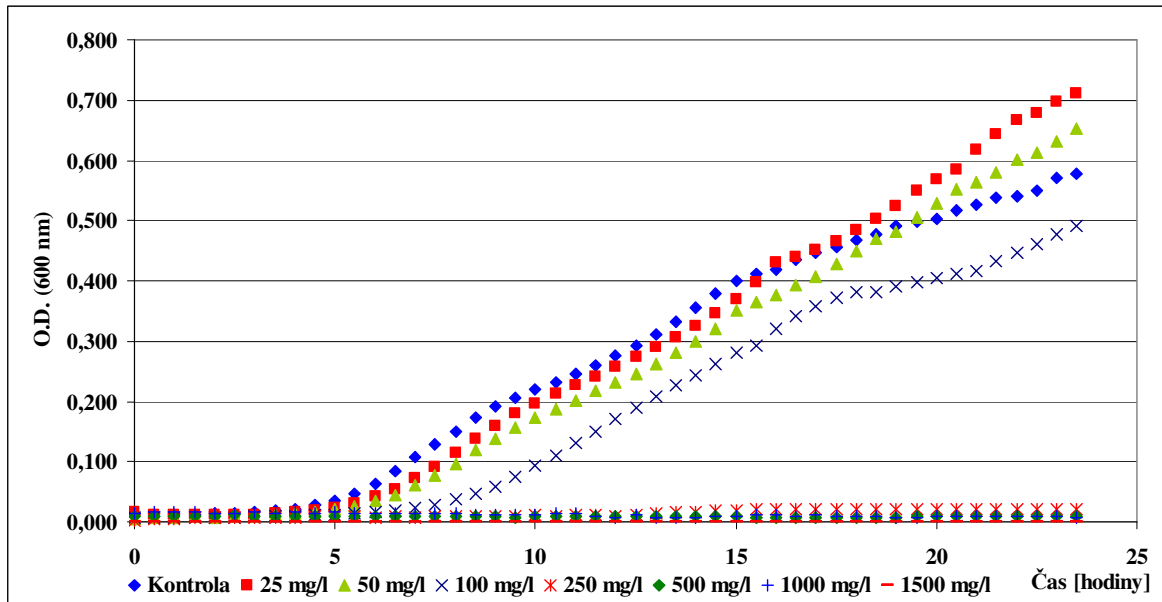


P II B: Vliv monokaprylinu na růst *Citrobacter freundii* CCM 7107



## PŘÍLOHA P III: RŮSTOVÉ KŘIVKY VYBRANÝCH GRAMPOZITIVNÍCH BAKTERIÍ

PIII A: Vliv monokaprylinu na růst *Micrococcus luteus* CCM 732



PIII B: Vliv monokaprylinu na růst *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062

