

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
3. den	bez reakce
5. den IL-8	silná reakce
<i>Bifidobacterium lactis</i>	
3. den Rantes	slabá reakce
MIP-1alfa	slabá reakce
IL-8	silná reakce
5. den	bez reakce
<i>Enterococcus faecium</i>	
3. den IL-8	slabá reakce
Nestimulované buňky	
3. den	IL-8 Slabá reakce

Pro pokusy byly cíleně připraveny koncentrované suspenze bakteriálních buněk vybraných kmenů se záměrem výrazně podpořit aktivaci cytokinů. Vysoké počty bakterií ( $10^9$  v 1 ml) vykazaly nespecifickou reakci testovacího kmene oproti výsledkům výzkumu Kokešová et al. (tisku), kde pro blokovaný pokus byl navržen model s nižší denzitou testovacího kmene ( $10^7$ ). Denzita  $10^7$  pozitivně aktivovala široké spektrum cytokinů. Aktivace cytokinů vysokou denzitou bakteriálních buněk oproti předpokladu vykazala slabší reakci. Kmen *Lactobacillus acidophilus* po pátém dni a *Bifidobacterium lactis* po třetím dni vykazaly silnou aktivaci IL-8. Interleukin 8 je spojován v klinické praxi spojován s mediací zánětlivých procesů.

### 3. Závěr

Naše výsledky neodpovídají výsledkům, které získala ve stejném systému Dr. Kokešová (v tisku), když použila kmen *Lactobacillus casei*, který jsme použili jako standard. Výsledky byly zřejmě ovlivněny námi použitou vyšší koncentrací bakterií. Při použití vyšší koncentrace bakterií dochází k aktivaci prozáněťových cytokinů, proto je důležité hledat experimentálně takové koncentrace, které budou cíleně ovlivňovat tvorbu klonů T lymfocytů. Vzhledem k tomu, že probiotika jsou v současné době neustálou součástí propagace, se zdůrazňováním jejich pozitivního efektu na zažívání, domníváme se, že je důležité sledovat jejich imunomodulační účinky, které jsou dle našich zjištění závislé na použití jednotlivých kmenů. Považujeme za důležité cíleně sledovat tvorbu cytokinů po aktivaci probiotiky a hledat možnosti jejich ještě lepšího terapeutického efektu. Cílem další práce by mělo být nalezení vhodné koncentrace bakterií pro stimulaci mononukleárních buněk, abychom mohli získat standardní výsledky tvorby cytokinů a tím i zjištění, které klony TH lymfocytů jsou aktivovány.

Tato práce vznikla za podpory MŠMT při řešení výzkumného záměru MSM 2672286101.

#### Literatura:

LODINOVÁ-ŽÁDNÍKOVÁ R. (2002): Probiotika v pediatrii. Snížení rizika nosokomiálních infekcí perorálním osídlením probiotickým kmenem *E.coli* po narození a jeho vliv na frekvenci opakovaných infekcí a alergií po 10 a 20 letech. *Alergie*, 4, č. 4, s. 275-280.

- FUJIWARA D., INOUE S, WAKABAYASHI H., FUJII T. (2004): The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both TH1/TH2 cytokine expression and balance. *Int Arch Allergy Immunol.*, 135, 205-215
- TLÁSKAL, P., KOKEŠOVÁ, A., SCHRAMLOVÁ, J. et al. (2003): Probiotika a metabolisme střevních bakterií v léčbě průjmového onemocnění dětí virové etiologie. VZ FN Praha Motol č. 00000064203/6041
- TORII A., TORII S., FUJIWARA S., et. al. (2007): *Lactobacillus acidophilus* kmen L-92 regulates the production of T1 cytokine as well as Th2 cytokines. *Allergol Int.*, 56(3):293-301
- GUIEMONDE M., SAKATA S., KALLIOMAKI M., ISOULARI E., BENNO Y., SALMINEN S. (2006): Effect of maternal consumption of lactobacillus GG on transfer and establishment of fecal bifidobacterial microbiota in neonates. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 42(2),166-70
- LAMMERS KM., BRIDIGI P., VITALI B. et al. (2003): Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 a IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol Med*, 38,(2),165-172
- PARK JH, UM JI, LEE et al. (2002): Encapsulated *Bifidobacterium bifidum* potentiates intestinal IgA production. *Cell Immunol*, 219,22.7
- BOYUM, A. (1968): Isolation of leucocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.*, 97, 31-50
- MOSSMANM T. R. AND COFFMAN R. L. (1989): TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.*, 7, 145-173

Přijato do tisku 20. 2. 2010

Lektorováno 4. 3. 2010

## PRODUKCE BAKTERIOCINŮ A INHIBIČNÍ ÚČINKY VYBRANÝCH KMENŮ *STREPTOCOCCUS SALIVARIUS* SUBSP. *THERMOPHILUS*

Zuzana Vaňátková<sup>1</sup>, Magda Doležalová<sup>1</sup>, Jan Hrabě<sup>1</sup>,  
Vladimír Dráb<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ústav technologie a mikrobiologie potravin,  
Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,  
Česká republika

<sup>2</sup> Výzkumný ústav mlékárenský - Milcom, a.s., Sběrka  
mlékárenských mikroorganismů, Tábor, Česká republika

### Bacteriocin production and inhibitory effects of chosen *Streptococcus thermophilus* strains

#### Abstrakt

Tato práce se zabývala produkcí bakteriocinů vybranými kmeny *Streptococcus thermophilus* a inhibičními účinky těchto streptokoků vůči *Bacillus subtilis* a *Listeria innocua*. Bylo využito celkem 11 kmenů *Str. thermophilus* a jeden kmen *B. subtilis* získané ze Sběrky mlékárenských mikroorganismů (CCDM) a po jednom kmeni *Str. thermophilus*, *Lb. sakei* a *L. innocua* získané z České sbírky mikroorganismů (CCM). Všechny použité kmeny streptokoků byly testovány na produkci bakteriocinu thermophilinu metodou PCR. Gen pro tvorbu thermophilinu (*Streptococcus ther-*

*thermophilin* 13 operon) byl prokázán u 8 z 12 kmenů streptokoků. Inhibiční aktivita *thermophilinu* byla následně zkoumána plotnovou difúzní metodou vůči *Lb. sakei*. Jelikož touto metodou nebyla pozorována žádná antibakteriální aktivita *thermophilinu*, byly studovány inhibiční účinky všech kmenů *Str. thermophilus* vůči *B. subtilis* a *L. innocua* v modelovém systému mléka UHT a na BCP agaru. Z celkových výsledků lze usoudit, že kmeny, u nichž byl zaznamenán gen pro tvorbu *thermophilinu*, vykazovaly výraznější antibakteriální účinky než kmeny neobsahující gen pro tvorbu *thermophilinu*.

**Klíčová slova:** *Streptococcus thermophilus*, bakteriociny, *thermophilin*, inhibiční účinek

## Abstract

This work deals with bacteriocin production by chosen *Streptococcus thermophilus* strains. Subsequent investigation focused on inhibitory effects of given streptococci against *Bacillus subtilis* and *Listeria innocua*. There were used 11 *Str. thermophilus* strains and 1 *B. subtilis* strain obtained from Czech Collection of Dairy Microorganisms (CCDM) and 1 *Str. thermophilus* strains, 1 *Lb. sakei* strain and 1 *L. innocua* strain from Czech Collection of Microorganisms (CCM) in this work. Production of bacteriocin *thermophilin* by studied streptococci was accomplished by PCR method. Gene for *thermophilin* formation (*Streptococcus thermophilus thermophilin* 13 operon) was demonstrated in 8 of total 12 streptococci strains. *Thermophilin* activity against *Lb. sakei* was examined by "the well diffusion assay". Since none antibacterial activity of *thermophilin* was observed, inhibitory effects of *Str. thermophilus* strains against *B. subtilis* and *L. innocua* were studied in model system of UHT milk and on BCP agar. The whole results showed that strains, in which gene for *thermophilin* formation was detected, were more efficient than streptococcal strains without gene for *thermophilin* formation.

**Keywords:** *Streptococcus thermophilus*, bacteriocins, *thermophilin*, inhibitory effect

## Úvod

*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (v praxi pouze *Streptococcus thermophilus*) je jediným streptokokovým druhem spojeným s technologií potravin (Salminen, 2004). Vzhledem k příslušnosti *Streptococcus thermophilus* k bakteriím mléčného kvašení se jedná o grampozitivní, nepohyblivé, nesporulující, katalázanegativní, fakultativně anaerobní koky.

*Streptococcus thermophilus* se přirozeně vyskytuje v mléce. Z tohoto důvodu je pro jeho kultivaci nejvhodnějším prostředím právě mléko, které sráží při 30 - 45 °C do druhého dne (Görner, 2004, Robinson 2002). *Str. thermophilus* patří mezi homofermentativní mléčné bakterie, tudíž z hexózu tvoří především kyselinu mléčnou ve formě L(+) izomeru (Adams, 2008, Salminen, 2004, Tamime

a Robinson, 1999). Produkovaná kyselina mléčná především snižuje pH prostředí až na hodnoty 4 a nižší, což inhibuje mnohé nežádoucí bakterie v potravinách. Nicméně taktéž bylo pozorováno, že kyselina mléčná prochází plazmatickou membránou, čímž napomáhá aktivitě jiných antimikrobiálních látek, např. bakteriocinů, diacetylu (Görner, 2004, Salminen, 2004). Termofilní streptokoky jsou známy produkcí bakteriocinů, tzv. *thermophilinů* (Gálvez, 2008).

Bakteriociny jsou ribozomálně syntetizované sloučeniny produkované bakteriemi za účelem inhibovat růst jiných bakterií (Salminen, 2004, Gálvez, 2008). Jedná se o extracelulárně uvolněné nízkomolekulární peptidy nebo proteiny (obvykle 30 - 60 aminokyselin) (De Souza, 2005, Sahl a Bierbaum, 1998, Settani, 2008). Cílem jejich aktivity je většinou plazmatická membrána bakterií (Savado, 2006). I při nízkých koncentracích mají bakteriociny vysokou antimikrobiální schopnost. Tyto sloučeniny vykazují baktericidní či bakteriostatický účinek na jiné bakterie, buď druhově příbuzné (úzké spektrum působení), nebo bakterie jiného druhu (široké spektrum působení) (De Souza, 2005, Settani, 2008).

V posledních letech se dostává zvláštní pozornosti bakteriocinům produkovaným bakteriemi mléčného kvašení díky jejich potenciální aplikaci v potravinářském průmyslu. Lze je použít jako přírodní konzervační látky působící proti patogenním bakteriím a bakteriím způsobujícím kažení, čímž poskytují mikrobiologicky stabilní potraviny (De Souza, 2005, Gálvez, 2008, Nes, 2004, Vuyst, 2007). Bakterie mléčného kvašení jsou obecně považovány za bezpečné, tedy i jejich bakteriociny jsou hodnoceny jako bezpečné (Gálvez, 2008, Nes, 2004). Mléčné bakterie syntetizují širokou škálu bakteriocinů s molekulovou hmotností v rozmezí 2,5 až 6 kDa (De Souza, 2005, Garneau, 2002, Sit, 2008). Tyto bakteriociny jsou rozděleny do tří hlavních tříd podle jejich biochemických a genetických vlastností, a to třída I, II a III (Drider, 2006). Taktéž byla navržena čtvrtá třída s komplexní strukturou, ale nebyla obecně akceptována. Třída I a II jsou hlavními třídami bakteriocinů díky jejich velkému množství a potenciálnímu komerčnímu využití. Třída I, neboli lantibiotika, jsou malé (< 5 kDa) post-translačně modifikované peptidy obsahující neobvyklé aminokyseliny jako lanthionin a β-metyllanthionin. Bakteriociny třídy II jsou malé (< 10 kDa) nemodifikované termostabilní (až 121 °C) membránově aktivní peptidy neobsahující lanthionin. Třída III obsahuje velké (> 30 kDa) termolabilní proteiny (Salminen, 2004).

Bakteriociny třídy II jsou kationaktivní hydrofobní peptidy o velikosti 20 - 60 aminokyselin (Hécharde a Sahl, 2002). Na základě primární struktury je tato třída rozčleněna na 3 podtřídy, a to Iia, Iib a Iic (Drider, 2006). Pro bakteriociny třídy II je typické úzké inhibiční spektrum (Salminen, 2004). Tyto bakteriociny jsou aktivní hlavně vůči grampozitivním bakteriím s nízkým obsahem G+C, jako jsou bakterie mléčného kvašení, *Listeria*, *Enterococcus* a *Clostridium* (Hécharde a Sahl, 2002). Příkladem bakteriocinů podtřídy Iib jsou např. lactococciny G, F,

lactacin F, plantariciny A, S, EF a JK, thermophiliny A, T, 13, 81 a 347 (Cleveland, 2001, Davidson, 2005, Kabuki, 2007, Salminen, 2004, Savadogo, 2006, Villani, 1995).

Poolman a kol. identifikovali thermophilin 13, který byl poprvé izolován z kmene *Streptococcus thermophilus* Sfi13. Thermophilin 13 je složen ze dvou termostabilních peptidů, a to ThmA (43 AMK) a ThmB (62 AMK). Na rozdíl od ostatních dvoupeptidových bakteriocinů má thermophilin 13 široké spektrum působení. Thermophilin 13 vykazuje aktivitu vůči druhům *Str. thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Propionibacterium*, *E. faecium*, *Cl. botulinum*, *Cl. tyrobutyricum*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* a rodům *Lactobacillus*, *Bacillus* a *Leuconostoc* (Garneau, 2002, Kabuki, 2007, Marciset, 1997).

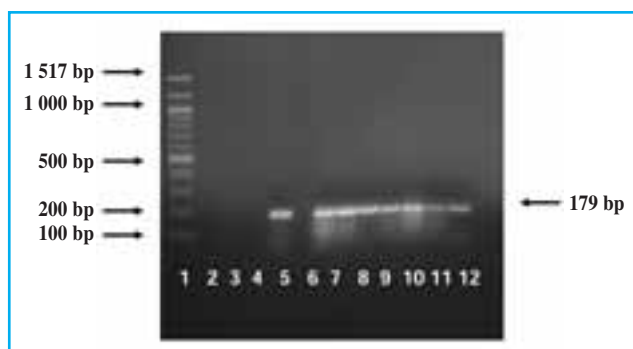
## Materiál a metody

V této práci bylo využito 11 kmenů *Streptococcus thermophilus* získaných ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů (CCDM): CCDM 7, CCDM 45, CCDM 55, CCDM 69, CCDM 70, CCDM 126, CCDM 128, CCDM 129, CCDM 130, CCDM 131, CCDM 224. Dále byl použit 1 kmen *Streptococcus thermophilus* získaný z České sbírky mikroorganismů (CCM), CCM 4757. Kmen *Lb. sakei* CCM 7203 byl použit jako indikátorový kmen antimikrobiálních účinků thermophilinu. Indikátorovými kmeny pro celkové inhibiční účinky streptokoků byl kmen *Bacillus subtilis* CCDM 795 a kmen *Listeria innocua* CCM 4030. Studované kmeny streptokoků a kmen *Lb. sakei* CCM 7203 byly kultivovány v M17 bujónu (Oxoid, United Kingdom) s přídatkem 1 % (w/v) glukózy a 0,5 % (w/v) laktózy (Lach-Ner, ČR) při 37 °C/48 h. Kmen *Bacillus subtilis* CCDM 795 byl kultivován v MPB bujónu obsahujícím 5 g.l<sup>-1</sup> peptonu, 3 g.l<sup>-1</sup> beef extractu (Himedia, India), 3 g.l<sup>-1</sup> NaCl (Sigma-Aldrich, USA) při 37 °C/24 h a kmen *Listeria innocua* v BHI bujónu (Himedia, India) při 37 °C/24 h.

Bakteriální DNA byla z tekutých kultur izolována modifikovanou metodou Gravesa a Swaminathana (1993). Čistá DNA byla uchována v TE pufru (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0; Serva, Germany). PCR reakce byla provedena na přístroji DNA Engine<sup>®</sup> Peltier Thermal Cycler PTC-200 (Bio-Rad, Francie). Přítomnost genu pro thermophilin 13 byla u kmenů *Streptococcus thermophilus* potvrzena využitím komerčně syntetizovaných primerů (Invitrogen, USA) *thmAf/thmAr* (Tabulka 1). Primery byly navrženy pomocí programu Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) na základě sekvence genu *thmA* pro *Streptococcus thermophilus* thermophilin 13 (GenBank: U93029.1, NCBI). Obsah PCR reakční směsi byl: 17,1 µl destilované vody, 0,5 mM dNTP mix (Top-Bio, ČR), 0,8 µM každého primeru, 0,6 mM MgCl<sub>2</sub>

**Tab. 1** Oligonukleotidy primerů použitých k určení přítomnosti thermophilinu.

Primery	Sekvence nukleotidů (5 -3)	Reference
thmAf	TTCGACAGTTGAGGGTGGAT	databáze NCBI
thmAr	CCATACATGCAAGGCTCCT	databáze NCBI



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

(Top-Bio, ČR), 2,5 µl ThermoPol pufru (NEB BioLabs, USA), 1 U *Taq* polymerázy (NEB BioLabs, USA) a 2 µl bakteriální DNA. PCR program byl nastaven následovně:

- I. 1 cyklus 95 °C - 5 min,
- II. 30 cyklů 95 °C - 30 s, 58 °C - 30 s, 72 °C - 30s,
- III. 1 cyklus 72 °C - 5 min.

PCR produkty byly standardně detekovány agarózovou gelovou elektroforézou v 1,5% (w/v) gelu obarvením ethidium bromidem (Sambrook a Russell, 2001). Gely byly dokumentovány digitálním fotoaparátem PowerShot G6 (Canon, Japonsko).

Aktivita thermophilinu byla testována modifikovanou jamkovou difúzní metodou dle Schillinger a Lücke (1989). Kmen *Lactobacillus sakei* CCM 7203 byl využit jako indikátorový kmen inhibičních účinků thermophilinu dle De Martinis a Freitas (2003). Narostlé kultury byly centrifugovány (10 000 rpm, 15 min, 20 °C). Získané supernatanty byly upraveny na pH 6,5 - 7,0 1 mol.l<sup>-1</sup> NaOH a naředěny dvojkovým ředěním. Agarové plotny s půdou M17 byly přelity 10 ml M17 soft agaru (0,7% (w/v) agar), který obsahoval 0,5 ml kultury indikátorového kmene. Po zatuhnutí byly do agaru udělány jamky, do kterých bylo pipetováno 50 µl supernatantu produkčního kmene. Plotny byly kultivovány při 37 °C/24h. Poté byly sledovány zóny inhibice. Výsledky byly vyjádřeny v jednotkách aktivity na ml (AU.ml<sup>-1</sup>) (Barefoot a Klaenhammer, 1983). Jedna jednotka aktivity (AU = activity unit) byla definována jako reciproká hodnota nejvyššího ředění supernatantu, které ještě vytváří jasnou zónu inhibice. Pokud se reciproká hodnota nejvyššího ředění vynásobí hodnotou 100, získá se AU.ml<sup>-1</sup> neředěného supernatantu (Schillinger, 1993).

Inhibiční účinky zkoumaných kmenů *Streptococcus thermophilus* vůči listeriím a bacilům byly prověřeny v modelovém systému mléka UHT (0,5% hm. Ml. Tuku, Populár, Olma, a.s., ČR) dle Švirákové a kol. (2009). Jednalo se o společnou kultivaci streptokoků s *Listeria innocua* CCM 4030 a *Bacillus subtilis* CCDM 795 v mléce při 37 °C po dobu 3 dní. Během kultivace byly sledovány hodnoty pH a počty listerií či bacilů vždy nultý, první a třetí den. Počty listerií byly prováděny na půdě BHI agar (Himedia, India) a počty bacilů na půdě MPA agar obsahující 5 g.l<sup>-1</sup> peptonu,



3 g.l<sup>-1</sup> beef extractu, 15 g.l<sup>-1</sup> agaru (Himedia, India), 3 g.l<sup>-1</sup> NaCl (Sigma-Aldrich, USA). První modelový systém: mléko bylo nejdříve fermentováno streptokoky (densita 10<sup>8</sup> CFU.ml<sup>-1</sup>) a poté bylo zaočkováno listeriami nebo bacily (densita 10<sup>3</sup> CFU.ml<sup>-1</sup>). Druhý modelový systém: streptokoky (densita 10<sup>8</sup> CFU.ml<sup>-1</sup>) byly do mléka inokulovány s listeriami nebo bacily (densita 10<sup>3</sup> CFU.ml<sup>-1</sup>) současně. Taktéž bylo provedeno kontrolní stanovení, tedy kultivace listerií nebo bacilů (densita 10<sup>3</sup> CFU.ml<sup>-1</sup>) v mléce bez streptokoků.

Stanovení inhibičních účinků studovaných kmenů streptokoků na BCP agaru vycházelo z modifikované metody dle Plockové a kol. (2001). BCP agar obsahoval 1,5 % (w/v) agaru, 0,1 g.l<sup>-1</sup> bromkresolpurpurového indikátoru a 250 ml UHT mléka (0,5% hm. ml. tuku, Populár, Olma, a.s., ČR) na 1 litr destilované vody. Jako indikátorové kmeny byly opět použity *Listeria innocua* CCM 4030 a *Bacillus subtilis* CCDM 795. Na sterilní Petriho misky bylo očkováno 20 µl kultury streptokoků, které byly přelity připraveným a vychlazeným BCP agarem. Po zatuhnutí byly Petriho misky kultivovány při 37 °C/48 h. Pak byly

provedeny 2 vpichy (po 5 µl) indikátorového mikroorganismu vedle sebe do agaru. Po vsáknutí byly Petriho misky kultivovány při 37 °C po dobu 7 dní. Během kultivace byl pozorován průměr růstové zóny indikátorového kmene u každého vpichu a zabarvení půdy okolo vpichu. Dále bylo provedeno kontrolní stanovení, tedy na agar byly zaočkovány pouze indikátorové kmeny bez streptokoků.

## Výsledky a diskuze

Přítomnost genu pro thermophilin 13 u daných kmenů streptokoků byla studována metodou PCR pomocí sady primerů *thmAf/thmAr*. Velikost PCR produktu (179 bp) byla stanovena dle genu *thmA* (*Streptococcus thermophilus* thermophilin 13 operon) (NCBI databáze). Specifické PCR produkty byly zaznamenány u 8 z 12 testovaných kmenů streptokoků (Obrázek 1), a to u CCDM 69, CCDM 126, CCDM 128, CCDM 129, CCDM 130, CCDM 131, CCDM 224 a CCM 4757. Zmíněné kmeny byly pro přehlednost označeny jako produkční. Výskyt produkce bakteriocinů u testovaných kmenů streptokoků lze srovnat se studií

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

Kmen	0. den		1. den		3. den	
	pH	CFU.ml <sup>-1</sup>	pH	CFU.ml <sup>-1</sup>	pH	CFU.ml <sup>-1</sup>
CCDM 7	5,21 ± 0,24	(3,83 ± 0,70).10 <sup>4</sup>	4,33 ± 0,03	(9,86 ± 0,60).10 <sup>3</sup>	4,11 ± 0,06	(5,00 ± 0,50).10 <sup>2</sup>
CCDM 45	5,03 ± 0,07	(4,26 ± 0,41).10 <sup>4</sup>	4,60 ± 0,05	(8,94 ± 1,62).10 <sup>5</sup>	4,46 ± 0,05	(2,18 ± 0,31).10 <sup>4</sup>
CCDM 55	4,95 ± 0,09	(2,09 ± 0,37).10 <sup>4</sup>	4,44 ± 0,07	(2,48 ± 0,31).10 <sup>4</sup>	4,34 ± 0,08	(7,77 ± 0,80).10 <sup>3</sup>
CCDM 70	4,26 ± 0,04	(4,00 ± 0,20).10 <sup>2</sup>	4,06 ± 0,01	(4,18 ± 0,21).10 <sup>3</sup>	3,97 ± 0,07	(1,40 ± 0,70).10 <sup>2</sup>
CCDM 69	5,05 ± 0,20	(2,83 ± 0,10).10 <sup>4</sup>	4,56 ± 0,12	(1,01 ± 0,95).10 <sup>5</sup>	4,29 ± 0,04	0
CCDM 126	4,82 ± 0,07	(1,00 ± 0,50).10 <sup>2</sup>	4,35 ± 0,01	(1,82 ± 0,91).10 <sup>2</sup>	4,26 ± 0,01	0
CCDM 128	5,19 ± 0,06	(2,25 ± 1,13).10 <sup>3</sup>	4,74 ± 0,04	(3,45 ± 1,33).10 <sup>3</sup>	4,59 ± 0,06	0
CCDM 129	4,62 ± 0,14	(1,00 ± 0,50).10 <sup>2</sup>	4,27 ± 0,03	(2,00 ± 1,00).10 <sup>2</sup>	4,21 ± 0,02	0
CCDM 130	4,68 ± 0,06	(1,68 ± 0,84).10 <sup>4</sup>	4,35 ± 0,01	(2,09 ± 1,05).10 <sup>3</sup>	4,26 ± 0,05	(4,09 ± 0,52).10 <sup>1</sup>
CCDM 131	4,61 ± 0,09	(1,20 ± 0,62).10 <sup>3</sup>	4,28 ± 0,04	(2,56 ± 0,96).10 <sup>2</sup>	4,21 ± 0,04	0
CCDM 224	4,40 ± 0,01	(1,00 ± 0,50).10 <sup>2</sup>	4,27 ± 0,02	(4,55 ± 1,27).10 <sup>2</sup>	4,27 ± 0,02	0
CCM 4757	4,79 ± 0,04	(3,86 ± 0,70).10 <sup>4</sup>	4,37 ± 0,12	(2,32 ± 1,14).10 <sup>3</sup>	4,14 ± 0,07	(9,55 ± 0,60).10 <sup>1</sup>
<i>Bacillus subtilis</i> CCDM 795	6,65 ± 0,01	(3,69 ± 0,37).10 <sup>4</sup>	6,13 ± 0,24	(2,02 ± 0,78).10 <sup>7</sup>	5,94 ± 0,27	(1,47 ± 0,35).10 <sup>6</sup>

**Tab. 3** Hodnoty pH a počty *Listeria innocua* nultý, první a třetí den kultivace v mléce UHT předem zaočkovaném studovanými kmeny *Str. thermophilus*

Kmen	0. den		1. den		3. den	
	pH	CFU.ml <sup>-1</sup>	pH	CFU.ml <sup>-1</sup>	pH	CFU.ml <sup>-1</sup>
CCDM 7	4,5 ± 0,05	(2,52 ± 0,65).10 <sup>4</sup>	4,16 ± 0,02	(2,64 ± 0,70).10 <sup>4</sup>	4,05 ± 0,05	(1,56 ± 0,44).10 <sup>4</sup>
CCDM 45	4,33 ± 0,07	(5,52 ± 0,42).10 <sup>4</sup>	4,19 ± 0,05	(1,96 ± 0,80).10 <sup>4</sup>	4,10 ± 0,06	(1,12 ± 0,68).10 <sup>4</sup>
CCDM 55	4,63 ± 0,01	(3,40 ± 0,96).10 <sup>4</sup>	4,23 ± 0,03	(6,26 ± 0,51).10 <sup>4</sup>	4,13 ± 0,02	(2,81 ± 0,74).10 <sup>4</sup>
CCDM 70	4,21 ± 0,09	(2,50 ± 0,25).10 <sup>2</sup>	4,13 ± 0,06	(2,72 ± 0,39).10 <sup>2</sup>	4,07 ± 0,07	(1,81 ± 0,42).10 <sup>2</sup>
CCDM 69	4,22 ± 0,15	(2,65 ± 0,40).10 <sup>3</sup>	4,05 ± 0,09	0	3,91 ± 0,06	0
CCDM 126	5,33 ± 0,02	(2,65 ± 1,13).10 <sup>3</sup>	4,55 ± 0,06	(7,18 ± 1,21).10 <sup>3</sup>	4,43 ± 0,04	0
CCDM 128	4,32 ± 0,05	(3,80 ± 0,90).10 <sup>4</sup>	4,18 ± 0,07	(5,11 ± 1,02).10 <sup>4</sup>	4,13 ± 0,06	(2,15 ± 0,92).10 <sup>4</sup>
CCDM 129	4,51 ± 0,08	(4,58 ± 0,70).10 <sup>4</sup>	4,21 ± 0,04	(6,10 ± 0,98).10 <sup>4</sup>	4,12 ± 0,03	(2,24 ± 0,80).10 <sup>4</sup>
CCDM 130	4,31 ± 0,13	(1,02 ± 0,52).10 <sup>4</sup>	4,20 ± 0,08	(1,64 ± 0,45).10 <sup>4</sup>	4,09 ± 0,05	(1,25 ± 0,36).10 <sup>4</sup>
CCDM 131	4,31 ± 0,04	(1,29 ± 0,23).10 <sup>4</sup>	4,17 ± 0,02	(1,11 ± 0,62).10 <sup>4</sup>	4,11 ± 0,04	(8,36 ± 0,76).10 <sup>3</sup>
CCDM 224	4,29 ± 0,06	(4,50 ± 0,84).10 <sup>3</sup>	4,24 ± 0,04	(6,36 ± 1,12).10 <sup>2</sup>	4,24 ± 0,07	0
CCM 4757	4,65 ± 0,07	(1,37 ± 0,34).10 <sup>4</sup>	4,30 ± 0,05	(2,70 ± 0,71).10 <sup>4</sup>	4,15 ± 0,08	(1,15 ± 0,50).10 <sup>4</sup>
<i>Listeria innocua</i> CCM 4030	6,60 ± 0,01	(1,09 ± 0,45).10 <sup>4</sup>	6,58 ± 0,12	(1,56 ± 0,54).10 <sup>6</sup>	5,47 ± 0,09	(8,35 ± 0,41).10 <sup>5</sup>

Clevelanda a kol. (2001), kde bylo určeno 35 produkčních kmenů z celkových 40 kmenů avšak u jiného druhu mléčných bakterií, *Lactococcus lactis*.

S produkčními kmeny byla provedena jamková difúzní metoda za účelem zjištění aktivity daného bakteriocinu. Supernatanty produkčních kmenů byly aplikovány do agaru obsahujícího indikátorový kmen *Lb. sakei* CCM 7203, po inkubaci byly sledovány zóny inhibice. Nicméně ani u jednoho z produkčních kmenů nebyla vytvořena inhibiční zóna. V práci Ivanové a kol. (1998) byla studována inhibiční aktivita thermophilinu 81 a bylo zjištěno, že thermophilin inhiboval pouze málo kmenů blíže příbuzných druhů bakterií mléčného kvašení. Jednalo se o tři kmeny *Str. thermophilus* z 8 testovaných a pouze 1 kmen *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ze 7 testovaných. Získané výsledky tedy ukazují na skutečnost, že studované kmeny streptokoků disponovaly genem zodpovědným za tvorbu thermophilinu, ale antimikrobiální aktivita thermophilinu nebyla fenotypicky prokázána. Z toho důvodu byly provedeny testy inhibičních účinků všech zkoumaných kmenů streptokoků vůči *Bacillus subtilis* a *Listeria innocua*.

Inhibiční účinky studovaných kmenů *Streptococcus thermophilus* byly testovány v modelovém systému mléka UHT. Bylo pozorováno, zda produkční kmeny streptokoků inhibují růst indikátorových kmenů (*Bacillus subtilis* CCDM 795, *Listeria innocua* CCM 4030) ve větší míře než kmeny neprodukční. Taktéž bylo měřeno pH k zohlednění působení produkce kyseliny mléčné danými streptokoky.

V prvním modelovém systému bylo mléko nejdříve fermentováno streptokoky a následně zaočkováno listeriem nebo bacily. Dosahované výsledky inhibičních účinků streptokoků vůči *Bacillus subtilis* ukázaly (Tabulka 2), že kmeny neprodukující thermophilin (CCDM 7, CCDM 45, CCDM 55 a CCDM 70) snižovaly počty bacilů o 1 řád během 3 dnů kultivace. Z těchto kmenů měl největší inhibiční účinek kmen CCDM 70, u kterého bylo zároveň zaznamenáno nejnižší pH. Většina kmenů produkujících thermophilin snižovala počty *B. subtilis* o 2 - 3 řády za

3 dny. Nejvýrazněji snížil počty bacilů produkční kmen CCDM 69 (až o 5 řádů) za 3 dny.

Ve srovnání s kontrolou však dané produkční kmeny streptokoků inhibovaly růst bacilů již 1. den, a to až o 5 řádů. Po třech dnech kultivace byly počty bacilů redukovány o 6 řádů. Navíc kmeny CCDM 69, CCDM 126, CCDM 128, CCDM 129, CCDM 131 a CCDM 224 zcela inhibovaly růst *B. subtilis*.

V prvním modelovém systému streptokoků s *L. innocua* bylo zjištěno (Tabulka 3), že jak neprodukční, tak produkční kmeny zastavily množení listerií během 3 dnů kultivace. Nejúčinnější z neprodukčních kmenů byl kmen CCDM 70, obdobně jako v případě působení streptokoků vůči *B. subtilis*. Produkční kmeny CCDM 69, CCDM 126 a CCDM 224 zcela potlačily růst *L. innocua* během 3 dnů kultivace. U zmíněného kmene CCDM 69 byla pozorována úplná inhibice listerií již 1. den kultivace, což bylo zřejmě způsobeno i nízkým pH.

V prvním modelovém systému mléka UHT byly tedy vůči bacilům i listeriím obecně účinnější kmeny produkující thermophilin. I když nebyl účinek thermophilinu prokázán samostatně pomocí jamkové difúzní metody, zřejmě je v součinnosti s jinými inhibičními látkami (především kyselina mléčná) silnější a tudíž pozorovatelný. Ze všech studovaných produkčních kmenů *Str. thermophilus* měl největší inhibiční účinek vůči *B. subtilis* i *L. innocua* kmen CCDM 69. Z neprodukčních kmenů to pak byl kmen CCDM 70, u kterého byly zaznamenány nejnižší hodnoty pH. Proto by se mohl tento inhibiční účinek přisuzovat produkované kyselině mléčné.

Ve druhém modelovém systému byly do mléka inokulovány streptokoky s bacily nebo listeriem současně. Sledováním inhibičních účinků streptokoků vůči bacilům bylo zjištěno, že kmeny neprodukující thermophilin redukovaly počty bacilů o 1 - 2 řády během 3 dnů kultivace (Tabulka 4). Jediný neprodukční kmen CCDM 70 inhiboval růst bacilů stejně jako kmeny produkční. To může mít opět souvislost s jeho fermentační schopností, neboť po třech dnech kultivace bylo zaznamenáno nejnižší pH právě

**Tab. 4** Hodnoty pH a počty bacilů nultý, první a třetí den kultivace v mléce UHT zaočkovaném studovanými kmeny *Str. thermophilus* a *Bacillus subtilis* současně

Kmen	0. den		1. den		3. den	
	pH	CFU.ml <sup>-1</sup>	pH	CFU.ml <sup>-1</sup>	pH	CFU.ml <sup>-1</sup>
CCDM 7	6,65 ± 0,01	(1,58 ± 0,79).10 <sup>5</sup>	4,49 ± 0,22	(2,66 ± 1,25).10 <sup>6</sup>	4,11 ± 0,06	(2,41 ± 1,05).10 <sup>4</sup>
CCDM 45	6,63 ± 0,04	(2,02 ± 1,01).10 <sup>5</sup>	4,91 ± 0,29	(5,32 ± 1,21).10 <sup>6</sup>	4,38 ± 0,18	(2,64 ± 1,32).10 <sup>4</sup>
CCDM 55	6,63 ± 0,03	(2,11 ± 1,04).10 <sup>5</sup>	4,84 ± 0,25	(5,22 ± 1,48).10 <sup>6</sup>	4,21 ± 0,09	(2,36 ± 0,64).10 <sup>4</sup>
CCDM 70	6,63 ± 0,01	(3,49 ± 1,55).10 <sup>4</sup>	4,25 ± 0,02	(5,10 ± 1,40).10 <sup>4</sup>	4,01 ± 0,08	(4,55 ± 1,50).10 <sup>3</sup>
CCDM 69	6,65 ± 0,01	(2,07 ± 1,03).10 <sup>5</sup>	4,95 ± 0,20	(4,02 ± 1,20).10 <sup>6</sup>	4,29 ± 0,20	(5,00 ± 1,6).10 <sup>3</sup>
CCDM 126	6,71 ± 0,06	(1,07 ± 0,54).10 <sup>5</sup>	4,83 ± 0,03	(1,05 ± 0,96).10 <sup>6</sup>	4,22 ± 0,07	(2,27 ± 0,65).10 <sup>3</sup>
CCDM 128	6,64 ± 0,02	(1,33 ± 0,67).10 <sup>5</sup>	4,84 ± 0,22	(3,08 ± 0,68).10 <sup>6</sup>	4,28 ± 0,08	(4,75 ± 1,06).10 <sup>4</sup>
CCDM 129	6,64 ± 0,01	(1,13 ± 0,56).10 <sup>5</sup>	4,62 ± 0,03	(2,16 ± 0,96).10 <sup>6</sup>	4,19 ± 0,04	(5,00 ± 0,50).10 <sup>3</sup>
CCDM 130	6,64 ± 0,02	(1,01 ± 0,50).10 <sup>5</sup>	4,74 ± 0,07	(1,63 ± 1,13).10 <sup>6</sup>	4,30 ± 0,11	(3,00 ± 0,72).10 <sup>3</sup>
CCDM 131	6,64 ± 0,01	(1,02 ± 0,51).10 <sup>5</sup>	4,56 ± 0,01	(5,29 ± 1,27).10 <sup>5</sup>	4,18 ± 0,01	(1,82 ± 0,53).10 <sup>3</sup>
CCDM 224	6,66 ± 0,01	(1,23 ± 0,62).10 <sup>5</sup>	4,31 ± 0,16	(8,73 ± 0,72).10 <sup>5</sup>	4,16 ± 0,09	(1,82 ± 0,54).10 <sup>3</sup>
CCM 4757	6,70 ± 0,04	(1,44 ± 0,72).10 <sup>5</sup>	4,57 ± 0,15	(2,10 ± 1,30).10 <sup>6</sup>	4,25 ± 0,10	(2,73 ± 0,96).10 <sup>3</sup>
<i>Bacillus subtilis</i> CCDM 795	6,65 ± 0,01	(3,69 ± 0,37).10 <sup>4</sup>	6,13 ± 0,24	(2,02 ± 0,78).10 <sup>7</sup>	5,94 ± 0,27	(1,47 ± 0,35).10 <sup>6</sup>

**Tab. 5** Hodnoty pH a počty listerií nultý, první a třetí den kultivace v mléce UHT zaočkovaném studovanými kmeny *Str. thermophilus* a *Listeria innocua* současně

Kmen	0. den	1. den		3. den		
	pH	CFU.ml <sup>-1</sup>	pH	CFU.ml <sup>-1</sup>	pH	CFU.ml <sup>-1</sup>
CCDM 7	6,65 ± 0,02	(8,50 ± 0,52).10 <sup>2</sup>	4,65 ± 0,08	(8,13 ± 1,10).10 <sup>5</sup>	4,08 ± 0,09	(7,27 ± 1,30).10 <sup>4</sup>
CCDM 45	6,65 ± 0,02	(2,30 ± 0,98).10 <sup>3</sup>	5,03 ± 0,06	(7,52 ± 0,97).10 <sup>6</sup>	4,16 ± 0,08	(3,55 ± 0,70).10 <sup>5</sup>
CCDM 55	6,65 ± 0,05	(1,00 ± 0,48).10 <sup>2</sup>	4,75 ± 0,06	(1,46 ± 0,75).10 <sup>5</sup>	4,11 ± 0,08	(1,10 ± 0,56).10 <sup>3</sup>
CCDM 70	6,59 ± 0,04	(3,50 ± 0,50).10 <sup>2</sup>	4,24 ± 0,05	(1,24 ± 0,80).10 <sup>5</sup>	4,14 ± 0,07	(1,00 ± 0,60).10 <sup>3</sup>
CCDM 69	6,65 ± 0,06	(3,00 ± 0,90).10 <sup>2</sup>	4,21 ± 0,13	(2,73 ± 1,05).10 <sup>3</sup>	3,95 ± 0,15	1,50 ± 0,70).10 <sup>1</sup>
CCDM 126	6,65 ± 0,01	(1,70 ± 0,65).10 <sup>3</sup>	5,60 ± 0,07	(5,60 ± 1,20).10 <sup>6</sup>	4,36 ± 0,05	(6,64 ± 1,21).10 <sup>5</sup>
CCDM 128	6,64 ± 0,01	(1,25 ± 0,74).10 <sup>3</sup>	4,38 ± 0,09	(5,28 ± 1,27).10 <sup>5</sup>	4,09 ± 0,07	(1,00 ± 0,58).10 <sup>4</sup>
CCDM 129	6,60 ± 0,03	(2,00 ± 0,72).10 <sup>2</sup>	4,55 ± 0,15	(3,64 ± 1,14).10 <sup>4</sup>	4,11 ± 0,04	(3,50 ± 0,90).10 <sup>1</sup>
CCDM 130	6,63 ± 0,03	(5,00 ± 1,02).10 <sup>2</sup>	4,39 ± 0,14	(5,45 ± 0,80).10 <sup>4</sup>	4,04 ± 0,04	(7,00 ± 1,35).10 <sup>1</sup>
CCDM 131	6,66 ± 0,01	(1,00 ± 0,41).10 <sup>3</sup>	4,31 ± 0,05	(6,27 ± 0,82).10 <sup>4</sup>	4,14 ± 0,01	(3,00 ± 1,01).10 <sup>3</sup>
CCDM 224	6,65 ± 0,01	(4,00 ± 0,50).10 <sup>2</sup>	4,29 ± 0,09	(5,45 ± 0,79).10 <sup>3</sup>	4,21 ± 0,02	(2,50 ± 0,54).10 <sup>1</sup>
CCM 4757	6,63 ± 0,02	(5,50 ± 1,14).10 <sup>2</sup>	4,44 ± 0,12	(2,36 ± 0,74).10 <sup>4</sup>	4,20 ± 0,02	(6,00 ± 0,60).10 <sup>1</sup>
<i>Listeria innocua</i> CCM 4030	6,60 ± 0,02	(1,09 ± 0,35).10 <sup>3</sup>	6,58 ± 0,18	(1,56 ± 0,86).10 <sup>6</sup>	5,47 ± 0,16	(8,35 ± 0,53).10 <sup>5</sup>

u kmene CCDM 70. Ani u jednoho z kmenů produkujících thermophilin nebyla pozorována výrazná inhibice *B. subtilis*. Většina produkčních kmenů snižovala za 3 dny počty bacilů o 2 - 3 řády, ve srovnání s kontrolou o 3 řády.

Výsledky pozorování inhibičních účinků studovaných kmenů *Str. thermophilus* vůči *L. innocua* ve druhém modelovém systému odhalily (Tabulka 5), že neprodukční kmeny CCDM 7 a CCDM 45 snižovaly počty listerií o 1 řád během 3 dnů. Kmeny CCDM 55 a CCDM 70 byly aktivnější, počty listerií redukovaly o 2 řády za 3 dny. Produkční kmeny CCDM 129, CCDM 130 a CCM 4757 inhibovaly růst *L. innocua* o 3 řády během 3 dnů kultivace. Ostatní produkční kmeny snižovaly počty listerií o 1 - 2 řády. V porovnání s kontrolou však některé produkční kmeny redukovaly počty listerií až o 4 řády. Z těchto kmenů byl nejúčinnější kmen CCDM 69. Nejnížší pH bylo ve druhém modelovém systému se streptokoků a listeriemi naměřeno právě u kmene CCDM 69, stejně jako v případě prvního modelového systému UHT mléka s listeriemi.

I ve druhém modelovém systému mléka UHT měly obecně vyšší antibakteriální účinek vůči bacilům i listeriím

**Tab. 6** Míra inhibičního účinku studovaných kmenů *Streptococcus thermophilus* vůči *Bacillus subtilis* během 7 dnů kultivace na BCP agaru

Kmen	Inhibiční účinek [%]						
	1. den	2. den	3. den	4. den	5. den	6. den	7. den
CCDM 7	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 45	7,5	2,9	2,9	0	0	0	0
CCDM 55	47,5	38,8	27,1	11,9	13,8	5,0	0,9
CCDM 70	72,5	0	0	0	0	0	0
CCDM 69	78,5	83,6	87,1	88,8	90,2	91,0	91,8
CCDM 126	11,0	28,1	21,4	14,4	10,5	2,4	1,6
CCDM 128	66,0	55,0	22,9	21,8	19,2	8,4	7,2
CCDM 129	70,0	78,4	82,9	85,11	86,9	88,0	89,1
CCDM 130	73,5	80,9	84,9	86,8	88,4	89,4	90,4
CCDM 131	72,5	80,2	84,3	86,4	87,9	89,0	90,0
CCDM 224	70,0	78,4	82,9	85,11	86,9	88,0	89,1
CCM 4757	73,5	80,2	84,3	86,4	87,9	89,0	90,0

kmeny produkující thermophilin. Avšak celkový účinek streptokoků vůči daným indikátorovým kmenům byl ve druhém modelovém systému mléka UHT nižší. Taktéž rozdíly mezi produkčními a neprodukčními kmeny streptokoků nebyly tak výrazné jako v prvním modelovém systému. To mohlo být způsobeno vhodnějšími podmínkami pro růst bacilů a listerií díky snížení pH mléka streptokoků až během společné kultivace. Tedy v případě kontaminace mléka před zakysáním jsou mléčné bakterie schopny zastavit růst bacilů či listerií. Zatímco při kontaminaci fermentovaného mléka bacily či listeriemi působí na bakterie nízké pH již od začátku kultivace, čímž dochází k redukci jejich počtů. Znamená to tedy, že pomocí streptokoků lze kontrolovat výskyt a množení bacilů či listerií ve fermentovaných mléčných výrobcích. Tyto poznatky je možno srovnat s prací Švirákové a kol. (2009), kteří taktéž zjistili, že u fermentovaných mlék je aktivita mléčných bakterií vůči listeriím vyšší než u nefermentovaného modelového systému.

Ze stanovení inhibičních účinků studovaných kmenů *Streptococcus thermophilus* vůči *B. subtilis* a *L. innocua* plotnovou metodou s BCP agarem vyplývá, že po 7 dnech kultivace inhibují růst indikátorových mikroorganismů především streptokoků produkující thermophilin (Tabulka 6 a 7). Růst *B. subtilis* byl inhibován nejvíce produkčním kmenem CCDM 69, a to z 91,8 %. Z kmenů neprodukujících thermophilin byl vůči bacilům nejúčinnější kmen CCDM 55. Největší inhibiční účinek vůči *L. innocua* vykazovaly produkční kmeny CCDM 69, CCDM 130 a CCM 4757 a neprodukční kmeny CCDM 55 a CCDM 70. Touto metodou se opět potvrdilo tvrzení, že kmeny produkující thermophilin měly zpravidla vyšší inhibiční účinek vůči bacilům a listeriím než kmeny neprodukční. Taktéž lze tvrdit, že kmen CCDM 69 byl nejúčinnější ze všech zkoumaných kmenů jak vůči bacilům, tak vůči listeriím. Bylo prokázáno, že vyšší antibakteriální aktivita kmenů *Str. thermophilus* produkujících thermophilin vůči *B. subtilis* a *L. innocua* souvisí se schopností tohoto bakteriocinu inhibovat zmíněné druhy bakterií (Garneau, 2002, Marciset, 1997). Ve studii Ivanové a kol. (1998) měl ther-



**Tab. 7** Míra inhibičního účinku studovaných kmenů *Streptococcus thermophilus* vůči *Listeria innocua* během 7 dnů kultivace na BCP agaru

Kmen	Inhibiční účinek [%]						
	1. den	2. den	3. den	4. den	5. den	6. den	7. den
CCDM 7	5,2	4,4	6,25	3,6	3,4	2,2	8,2
CCDM 45	0	1,5	1,25	2,4	3,4	3,3	5,1
CCDM 55	13,8	7,4	15,0	9,6	9,1	7,7	13,3
CCDM 70	25,8	14,7	18,75	9,6	9,1	7,7	13,3
CCDM 69	25,8	29,4	40,0	42,2	45,5	46,7	51,0
CCDM 126	8,62	11,8	21,3	12,0	11,4	11,1	15,3
CCDM 128	22,4	19,1	21,3	12,0	11,4	11,1	15,3
CCDM 129	13,8	26,5	37,5	33,7	37,5	38,9	43,9
CCDM 130	22,4	33,8	43,8	42,2	45,5	46,7	51,0
CCDM 131	34,5	44,1	52,5	51,8	54,5	55,6	59,2
CCDM 224	13,8	26,5	37,5	36,1	39,8	41,1	45,9
CCM 4757	25,8	36,8	46,3	42,2	45,5	46,7	51,0

mophilin 81 taktéž inhibiční účinek vůči *B. subtilis* a *Listeria innocua*.

## Závěr

Výsledky získané metodou PCR prokázaly přítomnost genu pro thermophilin 13 (*Streptococcus thermophilus* thermophilin 13 operon) u 8 z 12 testovaných kmenů *Streptococcus thermophilus*, konkrétně CCDM 69, CCDM 126, CCDM 128, CCDM 129, CCDM 130, CCDM 131, CCDM 224 a CCM 4757. Aktivita thermophilinu vůči bakterii *Lactobacillus sakei* nebyla prokázána. Avšak sledováním inhibičních účinků studovaných kmenů streptokoků vůči *Bacillus subtilis* a *Listeria innocua* bylo zjištěno, že kmeny produkující thermophilin vykazují zpravidla vyšší inhibiční aktivitu než kmeny neprodukcující thermophilin. Dále můžeme konstatovat, že pomocí streptokoků lze kontrolovat výskyt a množení bacilů a listerií ve fermentovaných mléčných výrobcích, a to především díky jejich produkci kyseliny mléčné a thermophilinu. Největší antibakteriální aktivitu vykazoval kmen CCDM 69, tudíž byl vytipován jako nejvhodnější ze všech testovaných kmenů *Streptococcus thermophilus* k využití při výrobě fermentovaných mléčných výrobků či k izolaci a následnému studiu thermophilinu.

## Literatura

- ADAMS, M. R., MOSS, M. O. *Food microbiology*. 3<sup>rd</sup> edition. Cambridge: RSC Publishing, 2008. p. 463. ISBN 978-0-85404-284-5
- BAREFOOT, S. F., KLAENHAMMER, T. R. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1983, vol. 45, p. 1808-1815.
- CLEVELAND, J., MONTVILLE, T. J., NES, I. F., CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 71, p. 1-20.
- DAVIDSON, P. M., SOFOS, J. N., BRANEN, A. L. *Antimicrobials in Food*. 3<sup>rd</sup> edition. *Taylor & Francis Group*, 2005. 720 s. ISBN 0-82474-037-8.
- Databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information) [online]. [cit. 2009-05-12]. Dostupný z WWW: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/2695623?reportgenbank&log\\$=seqview](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/2695623?reportgenbank&log$=seqview)>
- DE MARTINIS, E. C. P., FREITAS, F. Z. Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. *Food Control*. 2003, vol. 14, p. 197-200.

- DRIDER, D. The Continuing Story of Class IIA Bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2006, vol. 70, p. 564-582.
- DE SOUZA, E. L., DA SILVA, C. A., DE SOUSA, C. P. Bacteriocins: Molecules of Fundamental Impact on the Microbial Ecology and Potential Food Biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2005, vol. 48, p. 559-566.
- GÁLVEZ, A., LÓPEZ, R. L., ABRIQUEL, H. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2008, vol. 28, p. 125-152.
- GARNEAU, S., MARTIN, N. I., VEDERAS, J. C. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*. 2002, vol. 84, p. 577-592.
- GÖRNER, F., VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiologie požívatin*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004. s. 528. ISBN 80-967064-9-7
- GRAVES, L. M., SWAMINATHAN, B. Universal Bacterial DNA Isolation Procedure. In: *Diagnostic molecular biology: Principles and applications*. Ed: Persing, D. H., Smith, T. F., Tenover, F. C., White, T. J. Washington DC: American Society of Microbiology. 1993.
- HÉCHARD, Y., SAHL, H.-G. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from gram-positive bacteria. *Biochimie*. 2002, vol. 84, p. 545-557.
- IVANOVA, I., MITEVA, V., STEFANOVA, Ts., PANTEV, A., BUDAKOV, I., DANOVA, S., MONCHEVA, P., NIKOLOVA, I., DOUSSET, X., BOYAVAL, P. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. *International Journal of Food Microbiology*. 1998, vol. 42, p. 147-158.
- KABUKI, T., UENISHI, H., WATANABE, M., SETO, I., NAKAJIMA, H. Characterization of a bacteriocin, Thermophilin 1277, produced by *Streptococcus thermophilus* SBT1277. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, vol. 102, p. 971-980.
- MARCISSET, O., JERONIMUS-STRATINGH, M. C., MOLLET, B., POOLMAN, B. Thermophilin 13, a Nontypical Antilisterial Poration Complex Bacteriocin, That Functions without a Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997, vol. 272, p. 14277-14284.
- NES, I. F., JOHNSBORG, O. Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Current Opinion in Biotechnology*. 2004, vol. 15, p. 100-104.
- PLOCKOVÁ, M., STILES, J., CHUMCHALOVÁ, J., HALFAROVÁ, R. Control of mould growth by *Lactobacillus rhamnosus* VT1 and *Lactobacillus reuteri* CCM 3625 on milk agar plates. *Czech Journal of Food Science*, 2001, vol. 19, p. 46 - 50.
- ROBINSON, R. K. *Dairy microbiology handbook. The microbiology of milk and milk products*. 3<sup>rd</sup> edition. New York: A John Wiley and Sons, Inc., 2002. p.765. ISBN 0-471-38596-4
- SAHL, H.-G., BIERBAUM, G. Lantibiotics: Biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Annual Reviews of Microbiology*. 1998, vol. 52, p. 41-79.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual. Volume 2*. 3<sup>rd</sup> edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. ISBN 0-87969-576-5.
- SALMINEN, S., von WRIGHT, A., OUWEHAND, A. *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects*. 3<sup>rd</sup> edition. New York: Marcel Dekker, Inc., 2004. p. 633. ISBN 0-8247-5332-1
- SAVADOGO, A., OUATTARA, CH. A. T., BASSOLE, I. H. N., TRAORE, S. A. Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview. *African Journal of Biotechnology*. 2006, vol. 5, p. 678-683.
- SCHILLINGER, U., LUCKE, F.-K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989, vol. 55, p. 1901-1906.
- SCHILLINGER, U., STILES, M. E., HOLZAPFEL, W. H. Bacteriocin production by *Carnobacterium piscicola* LV 61. *International Journal of Food Microbiology*. 1993, vol. 20, p. 131-147.
- SETTANNI, L., CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, vol. 121, p. 123-38.
- SIT, C. S., VEDERAS, J. C. Approaches to the discovery of new antibacterial agents based on bacteriocins. *Biochem. Cell Biol.* 2008, vol. 86, p. 116-123.
- ŠVÍRÁKOVÁ, E., TICHOVSKÝ, P., SLOŽILOVÁ, I., KUČEROVÁ, K., PLOCKOVÁ, M. Vliv laktokoků na růst listerií v modelovém systému mléka UHT. In: *Sborník přednášek a posterů. XXXIX. Lenfeldovy a Höklovy dny. VFU Brno*. 2009, s. 43-46.

TAMIME, A. Y., ROBINSON, R. K. *Yoghurt*. Science and technology. 2<sup>nd</sup> edition. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 1999. p. 619. ISBN 1-85573-399-4.

UYST, L., LEROY, F. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2007, vol. 13, p. 194-199.

Přijato do tisku 10. 3. 2010

Lektorováno 3. 5. 2010

## MIKROBIOLOGIE TAVENÝCH SÝRŮ

Leona Buňková<sup>1</sup>, František Buňka<sup>2</sup>, Iva Doležálková<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav technologie tuků tenzidů a kosmetiky,  
Fakulta technologická, UTB ve Zlíně

<sup>2</sup> Ústav technologie a mikrobiologie potravin,  
Fakulta technologická, UTB ve Zlíně

### Microbiology of processed cheese

#### Souhrn

Základní surovinou pro výrobu tavených sýrů jsou přírodní sýry, které jsou tepelně upravovány za přítomnosti tavicích solí. Při procesu tavení za zvýšených teplot dochází k inaktivaci převážné části vegetativních forem mikroorganismů, včetně bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*. Tavicí teploty však nejsou dostatečné pro usmrcení endospor, které proces přežívají, často však bývají oslabeny. Z mikrobiologického hlediska je nejzávažnějším problémem kontaminace tavených sýrů gram pozitivními sporulujícími tyčinkami rodů *Bacillus* a *Clostridium*. Zvláště nežádoucí jsou pak sporulující mikroorganismy druhů *Clostridium butyricum*, *C. tyrobutyricum*, které jsou původci duření sýrů, *C. sporogenes* a *C. lentoputrescens* způsobující bílou hnilobu sýrů. Přítomnost *Bacillus subtilis*, *B. brevis* a *B. cereus* var. *mycooides* je nežádoucí zejména kvůli vzniku hořké chuti. Mikrobiální jakost tavených sýrů je závislá jak na mikrobiologické kvalitě použité suroviny, tak na sekundárních vlivech, které jsou většinou spojeny s dalšími možnostmi kontaminace během výroby, balení a distribuci těchto produktů.

**Klíčová slova:** tavený sýr, mikroflóra, kontaminace, bakterie tvořící spory, mikromycety.

#### Summary

The main ingredients for processed cheese production are natural cheeses, which are treated by heat with the addition of emulsifying salts. During the melting process the majority of vegetative forms of microorganisms are inactivated, including bacteria of the family *Enterobacteriaceae*. However, the melting temperatures are not sufficient for killing bacterial endospores, although the spore-forming microorganisms are often weakened. From a microbiological point of view, the most significant contamination problem of processed cheeses is caused by Gram-positive

spore-forming rod-shaped bacteria of the genus *Bacillus* and *Clostridium*. Highly undesirable microorganisms are spore-forming species *Clostridium butyricum*, *C. tyrobutyricum*, which cause blowing of cheeses and *C. sporogenes* and *C. lentoputrescens*, which are responsible for a white putrefaction of cheeses. *Bacillus subtilis*, *B. brevis* a *B. cereus* var. *mycooides* are dangerous mainly due to the creation of a bitter taste. Microbial quality of processed cheeses depends on the quality of ingredients, as well as on secondary factors which are in most cases related to other possibilities of contamination during production, wrapping and distribution of these products.

**Key words:** processed cheese, microflora, contamination, spore-forming bacteria, micromycetes

### 1. Tavené sýry a jejich vlastnosti

Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb., v platném znění, definuje tavený sýr jako sýr, který byl tepelně upraven za přítomnosti tavicích solí. Tavené sýry jsou vyráběny především diskontinuálním způsobem zahříváním směsi přírodních sýrů s tavicími solemi za částečného podtlaku a stálého míchání, než je dosažena homogenní hmota požadovaných vlastností (Carić & Kaláb, 1997; Buňka et al., 2009). Proces výroby tavených sýrů umožňuje i využití přírodních sýrů, které nejsou vhodné pro přímý prodej, tedy sýrů s různými, především mechanickými vadami (Buňka et al., 2006). Nelze však doporučit použití sýrů s vadami mikrobiologického charakteru, zejména jedná-li se o kontaminaci sporulujícími bakteriemi nebo plísněmi (Glass & Doyle, 2005). Suroviny kontaminované plísněmi jsou rizikové zejména díky možné produkci mykotoxinů (Moss, 2002; Magan & Olsen, 2004).

Vyrobená tavenina je plněna do uzavíratelných obalů. S ohledem na lidské zdraví a bezpečnost hotových výrobků je nutné potlačit rozvoj kontaminující mikroflóry. Životaschopné mikroorganismy, které lze detekovat běžnými kultivačními metodami by v konečném produktu neměly být přítomny, nebo by jejich počet měl být velmi nízký a tedy nevýznamný z hlediska lidského zdraví. Množení kontaminujících mikroorganismů lze zabránit skladováním při chladírenské teplotě. Další možností je autoklávování, které vede k redukci množství bakteriálních spor, nebo použití nepřímých konzervačních metod, jako je např. okyselení prostředí a snížení vodní aktivity (Pflug, 1987; Glass & Doyle, 2005). Teploty vyšší než 100 °C však mohou negativně ovlivnit výslednou kvalitu taveného sýra (Buňka et al., 2004). Tavené sýry vyrobené diskontinuálním způsobem (při použití tavicích teplot 90 - 100 °C) mají při chladírenském skladování (4 - 8 °C) trvanlivost několik měsíců (Schär & Bosset, 2002).

### 2. Mikroorganismy v tavených sýrech

Mikrobiologické změny tavených sýrů závisí na mnoha faktorech, mezi které lze zařadit druh sýra, pH, obsah sušiny, chloridu sodného, koncentrace tavicích solí a teplot-