

- KUCHTÍK, J., ŠUSTOVÁ, K., URBAN, T., ZAPLETAL, D. (2008): Effect of the stage of lactation on milk composition, its properties and the quality of rennet curdling in East Friesian ewes. *Czech Journal of Animal Science*, 53(2), 55-63.
- MCMAHON, D. J., RICHARDSON, G. H., BROWN, R. J. (1984): Enzymic milk coagulation: Role of equations involving coagulation time and curd firmness in describing coagulation. *Journal of Dairy Science*, 67, 1185-1193.
- NÁJERA, A., DE RENOBLES, M., BARRON, L. (2003): Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. *Food Chemistry*, 80(3), 345-352.
- PŘIBYLA, L., ČEJNA, V. (2006): Porovnání vizuální a nefelo-turbidimetrické metody pro měření syřitelnosti mléka. In: *Den mléka*, Praha: ČZU, s. 110-111, ISBN 80-213-1498-2.
- PYTEL, R., ŠUSTOVÁ, K., KUMBÁR, V., NEDOMOVÁ, Š. (2016): A comparison of the determination of the rennet coagulation properties of bovine milk. *Potravinářstvo*, 10(1), 366-371.
- ROGINSKI, H., FUQUAY, J. W., FOX, P. F. (2003): *Encyclopedia of dairy sciences*. Volumes 1 - 4. London: Academic press. ISBN 978-0-12-374402-9.
- SBODIO, O., TERCERO, E., COUTAZ, R., REVELLI, G. (2006): Effect of rennet and sodium chloride concentration on milk coagulation properties efecto de la concentración de enzima y cloruro sódico sobre la coagulación de la leche. *CYTA-Journal of Food*, 5(3), 182-188.
- SKÝPALA, M., PŘIBYLA, L., FALTA, D., CHLÁDEK, G. (2010): Posouzení vlivu vybraných technologických parametrů na syřitelnost kravského mléka. In: *Celostátní přehlídka sýrů 2010*, Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 149-152, ISBN 978-80-7080-760-6.
- SOJKOVÁ, K., HANUŠ, O., GENČUROVÁ, V., VYLETĚLOVÁ, M., MANGA, I., KOPECKÝ, J., JEDELSKÁ, R. (2011): Nefelometricky a tradičně stanovená syřitelnost mléka. In: *Farmářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků VIII*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 33 - 35, ISBN 978-80-7375-509-6.
- ŠUSTOVÁ, K., SÝKORA, V. (2013): *Mlékárenské technologie*. Brno: Mendelova univerzita, 223 s., ISBN 978-80-7375-704-5.
- TAMIME, A. Y. (2006): *Brined cheeses*. Oxford: Blackwell Pub., 324 s. ISBN 978-1-4051-2460-7.

Korespondující autor: Ing. Roman Pytel
Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta,
Ústav technologie potravin, Zemědělská 1, 613 00 Brno,
r.pytel@seznam.cz

Přijato do tisku 11. 6. 2017

Lektorováno 15. 7. 2017

IZOLACE A IDENTIFIKACE BAKTERIOCIN PRODUKUJÍCÍCH ENTEROKOKŮ ZE SÝRŮ A KVASŮ

Jaroslava Marková¹, Markéta Markvartová^{2,1}

¹ Milcom a.s.

² Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Isolation and identification of bacteriocin-producing *Enterococci* from cheeses and sourdoughs

SOUHRN

Tato práce se zabývala problematikou izolace a identifikace enterokoků a detekcí genu pro tvorbu bakteriocinu z IIa třídy. Testované kmeny byly izolovány z jedenácti sýrů a dvou kvasů. Určeny byly pomocí sekvenování, které se opírá o amplifikaci oblasti genu pro 16S rDNA a na

úroveň druhu byly identifikovány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) s primery navrženými do variabilní oblasti genu pro superoxid dismutázu (*sodA*), případně MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií (MALDI-TOF MS). Nejčastěji zastoupenými enterokoky byly: *Enterococcus (E.) faecium*, *E. faecalis* a *E. durans*. Dále byl identifikován *E. gilvus*, který je možné označit jako nežádoucí mikroorganismus. Amplifikace genů pro tvorbu bakteriocinu byla potvrzena na základě sekvenování a porovnávání s databází BLAST na přítomnost genu pro tvorbu enterocinu A u všech izolátů *E. faecium*.

Klíčová slova: *Enterococcus*, identifikace, bakteriocin třídy IIa

SUMMARY

This work was dedicated to issues of isolation and identification enterococci and detection of class IIa bacteriocin-coding genes. Tested strains were isolated from eleven cheeses and two sourdoughs. They were determined by sequencing, based on an amplification of the 16S rDNA gene and identified at species level by means of the polymerase chain reaction (PCR) with species-specific primers based upon the superoxide dismutase gene (*sodA*), alternatively the MALDI-TOF Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). The most frequently represented species were *Enterococcus (E.) faecium*, *faecalis* a *durans*. Another identified strain was *E. gilvus*, which can be describe as an unwanted microorganism. PCR amplification of class IIa bacteriocin-coding genes, sequencing and BLAST search results confirmed that all strains *E. faecium* contained the enterocin A gene.

Key words: *Enterococcus*, identification, bacteriocin class IIa

ÚVOD

Enterokoky patří mezi gram pozitivní koky izolované z nejrůznějších materiálů. Jejich optimální teplota růstu se většinou pohybuje mezi 35-37 °C (Ludwig a kol., 2009). Některé enterokoky se vyznačují tvorbou bakteriocinů. Těto schopnosti se v potravinářském průmyslu využívá k omezení nebo zastavení růstu technologicky nežádoucích i patogenních mikroorganismů (Íspirili a kol., 2017). Enterokoky nejsou běžnou součástí matečných kultur. V posledních letech jsou stále častěji sledované vlastnosti nezákysových bakterií mléčného kvašení (NSLAB). Výzkumy ukazují, že některé tyto bakterie by se mohly stát součástí zákysových kultur. Při zrání některých druhů sýrů mohou hrát velmi specifickou roli při tvorbě sensorických vlastností (Íspirili a kol., 2017). Spolu s těmito vlastnostmi mohou mít enterokoky také předpoklady k tomu stát se probiotickými bakteriemi (Maia a kol., 2017).

Identifikace izolovaných kmenů vyžaduje polyfázový přístup stanovení kombinující fenotypové a genotypové metody. Tyto metody se často zakládají na polymerázové řetězové reakci (PCR) a sekvenování 16S rRNA oblasti.

Hlavní překážkou v identifikačních postupech je nedostatek robustních identifikačních systémů pro všechny druhy bakterií mléčného kvašení. Další možností identifikace je využití metody MALDI-TOF.

Bakteriociny třídy IIa jsou často popisovány jako malé teplotně stabilní peptidy (37-48 aminokyselin) bez posttranslačních modifikací se silným účinkem proti listeriím. Geny pro produkci bakteriocinů jsou většinou lokalizovány na mobilních genetických elementech, např. plazmidech.

METODIKA

Izolace enterokoků

Pro izolaci bylo vybráno 11 zrajících sýrů vyrobených z nepasterovaného mléka a 2 technologicky používané kvasy. Společně s enterokoky byly zachytávány i další bakterie mléčného kvašení - laktobacily, laktokoky atd. Pro izolaci byla použita plotnová metoda s živným médiem KEA (Kanamycin Aeskulin Azide Agar, LABM, UK). Podařilo se vyizolovat enterokoky nejen ze živného agaru, který je pro enterokoky přímo určen, ale také z dalších půd - určených především pro izolaci bakteriálních koků. Další kultivace probíhala v M17 bujonu (M17 broth, HIMEDIA, Indie).

Identifikace izolátů molekulárně-biologickými metodami

a) Příprava hrubých lyzátů

Kultury byly zpracovány formou tzv. hrubých lyzátů, které byly připraveny z 5 ml narostlé kultury v M17 bujonu. Po dvojnásobném promytí odstředěných buněk sterilní PCR vodou (18 M Ω) byl sediment lyzován 100 μ l alkalického lyzačního roztoku (0,05 M NaOH + 0,25 % SDS), povařen 30 minut při 94 °C a rychle zchlazen. Nakonec byly vzorky ředěny 50x PCR-vodou a skladovány při -20 °C do doby analýzy. Ze sbírkových typových kmenů byla DNA izolována pomocí kitu UltraClean[®] Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO, Elisabeth Pharmacol, UK) dle instrukcí výrobce.

b) Sekvenční analýza bakteriálních izolátů pomocí 16S ribozomální DNA

K rychlému rozlišení rodů a některých druhů bakterií bylo použito Sangerovo sekvenování (Sanger a kol., 1977). K amplifikaci byly použity primery fD1 a rP2 dle Weisburg a kol. (1991). Reakční směs pro amplifikaci fragmentu byla připravena ve 25 μ l a obsahovala 12,5 μ l PPP Master Mixu (Top-Bio, ČR), 11 μ l PCR vody, 0,5 μ l každého primeru (10 μ mol.l⁻¹) a 0,5 μ l vzorku DNA (50x zředěného hrubého lyzátu, nebo sbírkového typového kmene izolovaného kitem). Reakce probíhala v termocykleru (Biometra, D) při podmínkách úvodní denaturace 95 °C - 90 s, následovalo

Tab. 1 Primery použité v PCR reakci

Primer	Genový úsek	Sekvence (5'-3')	Velikost produktu (bp)	Teplota annealingu
fD1 ¹⁾	16S rDNA	ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1600	55 °C
rP2 ¹⁾		ccgggatccaagcttACGGCTACCTTGTTACGACTT		
DU1 ²⁾	sodA	CCTACTGATATTAAGACAGCG	295	58 °C
DU2 ²⁾		TAATCCTAAGATAGGTGTTTG		
FL1 ²⁾	sodA	ACTTATGTGACTAACTTAACC	360	58 °C
FL2 ²⁾		TAATGGTGAATCTTGGTTTGG		
FM1 ²⁾	sodA	GAAAAACAATAAGAGAATTAT	215	55 °C
FM2 ²⁾		TGCTTTTTTGAATCTTCTTTA		
GI1 ²⁾	sodA	CTGGCTGGGCTTGGCTAGTGA	98	63 °C
GI2 ²⁾		ATAATCGGTGTTTTACCGTCT		
HI1 ²⁾	sodA	CTTCTGATATGGATGCTGTC	187	58 °C
HI2 ²⁾		TAAATCTTCTTAAATGTTG		
BCgr4NSf1K ³⁾	entA	AAAATATTATGGAAATGGAGT	88	44 °C
BCgr4R1K ³⁾		AGACATTCTGCAATACAA		

¹⁾ Weisburg a kol., 1991; ²⁾ Jackson a kol., 2004; ³⁾ Wieckowicz a kol., 2011

35 cyklů: denaturace DNA 95 °C - 30 s, hybridizace primerů 55 °C - 30 s, syntéza DNA 72 °C - 60 s a závěrečná syntéza 72 °C - 600 s. K vizualizaci byla použita gelová elektroforéza s 1% agarózovým gelem a fluorescenční interkalační barvou GelRed (Biotium, USA). Reakční směs pro sekvenování byla namíchána podle doporučení servisu, který sekvenování prováděl (GATC Biotech, Německo): 5 μ l PCR produktu (20-80 ng/ μ l) a 5 μ l primeru fD1 nebo rP2 (5 pmol/ μ l). Následovalo vyhodnocení získaných dat pomocí softwaru FinchTV (Geospiza, USA). Taxonomická příslušnost jednotlivých kmenů byla vyhodnocena na základě kompatibility se sekvenčními daty v databázi NCBI-BLAST (National Center for Biotechnology Information - Basic Local Alignment Search Tool). Sekvence byly identifikovány a přiřazeny k sekvenčním údajům druhů s maximální možnou shodou bazí (100-98 %).

c) Druhé rozlišení enterokoků

Pro druhé rozlišení enterokoků byla upravena metodika dle Jackson a kol. (2004). Byly využity primery pro *E. duras* (DU1 a DU2), *E. faecium* (FM1 a FM2), *E. faecalis* (FL1 a FL2), *E. hirae* (HI1 a HI2) a *E. gilvus* (GI1 a GI2) - viz. tabulka 1. Reakční směsi pro amplifikaci fragmentu *E. duras*, *E. faecalis*, *E. hirae* a *E. gilvus* byly připraveny ve 20 μ l a obsahovaly 10 μ l KapaHiFi ReadyMixu (Kapa Biosystems, USA), 7 μ l PCR vody, 0,75 μ l každého primeru pro příslušnou reakci (10 μ mol.l⁻¹) a 1,5 μ l vzorku DNA (50x zředěného hrubého lyzátu, nebo sbírkového typového kmene izolovaného kitem). Reakce probíhala v termocykleru (Biometra, Německo) při podmínkách úvodní denaturace 95 °C - 180 s, následovalo 30 cyklů: denaturace DNA 98 °C - 20 s, hybridizace primerů 58 °C (u reakce s primery GI1 a GI2 63 °C) - 15 s, syntéza DNA 72 °C - 45 s a závěrečná syntéza DNA 72 °C - 60 s. Pro *E. faecium* byla namíchána reakce složená ze 2 μ l 10x Taq Buffer s (NH₄)₂SO₄ bez MgCl₂ (Fermentas), 10,62 μ l PCR vody, 0,32 μ l dNTP (10 mM, Fermentas), 0,8 μ l každého primeru (10 μ mol.l⁻¹), 2,8 μ l MgCl₂ (25 mM, Fermentas),

Taq polymeráza 0,16 µl (5 U/µl, Fermentas) a 2,5 µl vzorku DNA (50x zředěného hrubého lyzátu, nebo sbírkového typového kmene izolovaného kitem). Reakce probíhala v termocyklieru (Biometra, Německo) při podmínkách úvodní denaturace 95 °C - 240 s, následovalo 35 cyklů: denaturace DNA 95 °C - 30 s, hybridizace primerů 55 °C - 120 s a závěrečná syntéza DNA 72 °C - 420 s. K vizualizaci byla použita gelová elektroforéza s 1 % agarózovým gelem a fluorescenční interkalační barvou GelRed (Biotium, USA).

d) MALDI-TOF

MALDI-TOF je moderní fenotypová metoda pro rychlou identifikaci mikroorganismů na základě proteinových profilů. Vzorky byly testovány v laboratoři oddělení bakteriologie Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně. Příprava vzorků byla provedena metodou extrakce pomocí ethanolu a kyseliny mravenčí. Výsledky měření byly porovnávány s komerční databází mikroorganismů.

Testování tvorby bakteriocinů

Vzorky enterokoků byly testovány na přítomnost genů pro tvorbu bakteriocinů z třídy IIa dle Wieckowicz a kol., (2011). Zde byly použity primery BCgr4NSf1K a BCgr4R1K. Reakční směsi pro amplifikaci fragmentu byly připraveny ve 25 µl a obsahovaly 12,5 µl CombiTaq PPP MasterMixu (TopBio, ČR), 8,5 µl PCR vody, 1 µl každého primeru (10 µmol.l⁻¹) a 2 µl vzorku DNA (50x zředěného hrubého lyzátu). Reakce probíhala v termocyklieru (Biometra, Německo) při podmínkách úvodní denaturace 94 °C - 300 s, následovalo 32 cyklů: denaturace DNA 94 °C - 45 s, hybridizace primerů 44 °C - 45 s, syntéza DNA 72 °C - 60 s a závěrečná syntéza DNA 72 °C - 300 s. K vizualizaci byla použita gelová elektroforéza s 1 % agarózovým gelem a fluorescenční interkalační barvou GelRed (Biotium, USA). Získané produkty byly pro kontrolu a případné určení bakteriocinu sekvenovány. Sekvenační směs byla namíchána podle doporučení servisu, který sekvenování prováděl (GATC Biotech, Německo): 5 µl PCR produktu (20-80 ng/µl) a 5 µl primeru BCgr4NSf1K nebo BCgr4R1K (5 pmol/µl). Následovalo vyhodnocení získaných dat pomocí příslušného softwaru (Finch TV). Dále byla data porovnána s databází NCBI-BLAST (National Center for Biotechnology Information - Basic Local Alignment Search Tool).

VÝSLEDKY A DISKuze

Izolace a identifikace enterokoků

Celkem bylo získáno a úspěšně identifikováno přes 70 izolátů enterokoků, z nichž byl vybrán užší soubor kmenů pro další testování. Výsledky identifikace izolovaných enterokoků jsou uvedeny v tabulce 2. Pro prvotní zařazení bakterií do rodu, případně příslušného druhu, bylo použito sekvenování pomocí 16S rDNA. K přesnějšímu určení druhu byla použita specifická PCR reakce. Amplifikovaná oblast 16S rDNA je pro druhové rozlišení enterokoků příliš konzervativní. Na výsledcích ze sekve-

Tab. 2 Výsledky identifikace izolovaných enterokoků

Vzorky	Název	IDENTIFIKACE	
		Sekvenace 16S rDNA/MALDI-TOF	PCR (sodA)
Sýr 1	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
Sýr 2	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium, faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
	<i>E. sp.</i>	<i>E. lactis, faecalis, faecium</i>	N
Sýr 3	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium, faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
Sýr 4	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
	<i>E. sp.</i>	<i>E. malodoratus, raffinusus, gilvus</i>	N
Sýr 5	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis, durans, faecium</i>	<i>E. durans</i>
Sýr 6	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
Sýr 7	<i>E. gilvus</i>	<i>E. gilvus, malodoratus, durans</i>	<i>E. gilvus</i>
	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
Sýr 8	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis, durans</i>	<i>E. durans</i>
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
	<i>E. sp.</i>	<i>E. durans, faecium</i>	<i>E. faecium</i>
	<i>E. gilvus</i>	<i>E. gilvus, durans</i>	<i>E. gilvus</i>
Sýr 9	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
	<i>E. gilvus</i>	<i>E. gilvus, durans</i>	<i>E. gilvus</i>
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
Sýr 10	<i>E. durans</i>	<i>E. hirae, durans, lactis</i>	<i>E. durans</i>
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
Sýr 11	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
Kvas 1	<i>E. gilvus</i>	<i>E. gilvus, malodoratus/E. gilvus ++</i>	<i>E. gilvus</i>
Kvas 2	<i>E. hirae</i>	<i>E. hirae, mundti/E. hirae +++</i>	<i>E. hirae</i>

+ + + ... bezpečná rodová identifikace, pravděpodobná druhová identifikace;

+ + + + ... vysoce pravděpodobná identifikace druhu

N... neúspěšná amplifikace

nování vidíme, že primery použité v této práci spolehlivě rozliší enterokoky od ostatních bakterií na úrovni rodu. Pro druhové zařazení byla proto zvolena variabilní oblast genu pro tvorbu superoxid dismutázy (sodA) podle Jackson a kol. (2004). Většina kmenů byla v tomto kroku druhově zařazena. Dva nezařazené kmeny mohou být ze skupiny *E. lactis*, *E. malodoratus* nebo *E. raffinusus*, ke kterým momentálně nemáme dostupné primery. Pro porovnání byly použity sbírkové typové kmeny příslušných mikroorganismů. Enterokoky z kvasů byly identifikovány také pomocí MALDI-TOF. Vedle technologicky potenciálně využitelných enterokoků jako je: *E. faecium*, *E. durans*, *E. faecalis* a *E. hirae* byl ze třech sýrů a jednoho kvasu získán *E. gilvus* (v tabulce tučně). Tento kmen není v literatuře příliš často zmiňován, ale jeho izolát byl nalezen a popsán u pacienta s cholecystitidou (Tyrrell a kol., 2002). Lze tedy předpokládat, že je tento kmen spojen s možnými patogenními nebo podmíněně patogenními vlastnostmi a jeho použití v potravinářském průmyslu je tedy nevhodné.

Testování tvorby bakteriocinů

Tvorba bakteriocinů třídy IIa byla testována pomocí PCR na přítomnost genu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3. Přítomnost genu byla zjištěna především u *E. faecium*. Pozitivní výsledek byl získán i u dvou nezařazených kmenů, u kterých se nepodařilo potvrdit druhové zařazení

Tab. 2 Výsledky identifikace izolovaných enterokoků

Vzorky	Název	Gen pro tvorbu bakteriocinů primery BCgr4NSf1K a BCgr4R1K
Sýr 1	<i>E. faecalis</i>	-
Sýr 2	<i>E. faecium</i>	+
	<i>E. sp.</i>	-
Sýr 3	<i>E. faecium</i>	+
Sýr 4	<i>E. faecalis</i>	-
	<i>E. sp.</i>	-
Sýr 5	<i>E. faecium</i>	+
	<i>E. durans</i>	-
Sýr 6	<i>E. faecium</i>	+
	<i>E. faecalis</i>	-
Sýr 7	<i>E. gilvus</i>	-
	<i>E. faecium</i>	+
	<i>E. faecalis</i>	-
Sýr 8	<i>E. durans</i>	-
	<i>E. faecalis</i>	-
	<i>E. sp.</i>	+
	<i>E. gilvus</i>	-
Sýr 9	<i>E. faecium</i>	+
	<i>E. gilvus</i>	-
	<i>E. faecalis</i>	-
Sýr 10	<i>E. durans</i>	-
	<i>E. faecalis</i>	-
Sýr 11	<i>E. faecium</i>	+
Kvas 1	<i>E. gilvus</i>	N
Kvas 2	<i>E. hirae</i>	N

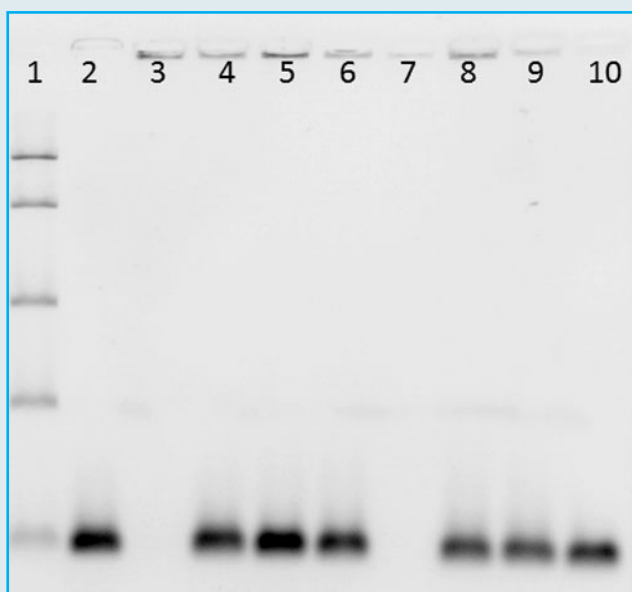
+... pozitivní; -... negativní; N... netestováno

do skupiny *E. faecium*. To může být způsobeno mutací v místě hybridizace primerů, případně přítomností tohoto genu i u jiných druhů enterokoků. Získané fragmenty byly úspěšně osekvenovány a určeny jako enterocin A. Tento výsledek ovšem nezaručuje, že je gen aktivní a tvoří se bakteriociny, které by zabraňovaly růstu nežádoucích mikroorganismů. Tuto skutečnost je potřeba ještě dále analyzovat, nejprve např. biochemickými testy.

ZÁVĚR

Enterokoky byly vyizolovány z jedenácti zrajících sýrů vyrobených z nepasterovaného mléka a dvou kvasů. Izolace byla provedena plotnovou metodou. Identifikace vybraných bakterií probíhala na základě makroskopického a mikroskopického zařazení. Dále také pomocí genetických metod - PCR, sekvenování. Pro dva kmeny enterokoků byla použita identifikace pomocí Maldi-TOF. Z výsledků je patrné, že sýry obsahovaly jeden či více kmenů rodu *Enterococcus*. Nejvíce zastoupenými druhy byly *E. faecium*, *E. faecalis* a *E. durans*. *E. gilvus*, který se vyskytl ve třech případech u sýrů a v jednom kvasu, není technologicky žádoucí, vzhledem k možné patogenitě.

Všechny získané kmeny *E. faecium* byly pozitivní na přítomnost genu kódujícího tvorbu bakteriocinů třídy IIa. Tento výsledek je nutné ověřit v praxi. Přítomnost genu nezaručuje tvorbu bakteriocinů a jejich účinků vůči technologicky nežádoucím bakteriím.



Tab. 1 Elektroforetický gel s finálními PCR produkty (o velikosti cca 88 bp). 1 - FastRuler DNA Ladder, Middle Range (Thermo Scientific, USA), 2 - CCDM 645T *E. faecium*, 3 - negativní kontrola, 4 - *E. faecium* (sýr 3), 5 - *E. faecium* (sýr 5), 6 - *E. faecium* (sýr 6), 7 - *E. faecalis* (sýr 1), 8 - *E. faecium* (sýr 7), 9 - *E. faecium* (sýr 9), 10 - *E. faecium* (sýr 11)

Poděkování

Studie vznikla na základě finanční podpory Ministerstva zemědělství ČR, NAZV, v rámci řešení projektu č. QJ1510338 v programu KUS a institucionální podpory dle rozhodnutí RO1417.

LITERATURA

- İSPIRILI H., DEMİRBAŞ F., DERTLI E. (2017): Characterization of functional properties of *Enterococcus* spp. isolated from Turkish White cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 75, s. 358-365.
- JACKSON CH.F., FEDORKA-CRAY P.J., BERRET J.B. (2004): Use of a genus- and species-specific Multiplex PCR for identification of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (8), s. 3558-3565.
- LUDWIG W., SCHLEIFER K.-H., WHITMAN W.B. (2009): Famil. IV. *Enterococcaceae* fam. nov.. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2. vydání, svazek 3, s. 594-623.
- MAIA L.F., GIAZZI A., BRANDALIZE C., KATSUDA M.S., ROCHA K.R., TERRA M.R., FURLAMENTO M.C. (2017): Isolation and characterization of potential probiotic enterococci strains from soft cheese flora. *African Journal of Microbiology Research*, 11, s. 482-487.
- SANGER F., NICKLEN S., COULSON A. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, s. 5463-5467.
- TYRRELL G.J., TURNBULL L.A., TEIXEIRA L.M., LEFEBVRE J., CARVALHO M. da G.S., FACKLAM R.R., LOVGREN M. (2002): *Enterococcus gilvus* sp. nov. and *Enterococcus pallens* sp. nov. isolated from human clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (4), s. 1140-1145.
- WEISBURG W.G., BARNES S.M., PELLETIER D.A., LANE D.J. (1991): 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173 (2), s. 697-703.
- WIECKOWICZ M., SCHMIDT M., SIP A., GRAJEK W. (2011): Development of a PCR-based assay for rapid detection of class IIa bacteriocin genes. *Letters in Applied Microbiology*, 52, s. 281-289.

Přijato do tisku: 11. 7. 2017

Lektorováno: 25. 7. 2017