

# Antimikrobiální aktivita bakterií izolovaných z fermentovaných potravin

Nina Šonkořová

---

Bakalářská práce  
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická  
Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Nina Šonkořová**  
Osobní číslo: **T21245**  
Studijní program: **B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin**  
Specializace: **Technologie potravin**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Antimikrobiální aktivita bakterií izolovaných z fermentovaných potravin**

## Zásady pro vypracování

I. Zpracujte literární rešerši na téma

Charakteristika analyzovaných fermentovaných potravin.

Charakteristika antimikrobiálních látek produkovaných mikroorganismy.

Využití antimikrobiálních látek v potravinářství.

Metody stanovení antimikrobiální aktivity mikroorganismů.

II. V praktické části

Posuďte antimikrobiální aktivitu mikroorganismů.

Zjištěná data vyhodnoťte, porovnejte s výstupy literární rešerše a zformulujte závěry práce.

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

Seznam doporučené literatury:

[1] Knihy týkající se řešené problematiky.

[2] Vědecké zdroje zahrnuté v databázích ScienceDirect, Web of Science, Scopus, SciFinder Scholar aj.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Khatantuul Purevdorj, Ph.D.**  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **1. ledna 2024**

Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2024**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**Ing. Robert Gál, Ph.D.**  
ředitel ústavu

## **PROHLÁŠENÍ AUTORKY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

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

### **Prohlašuji,**

- že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studentky:

.....  
podpis studentky

## **ABSTRAKT**

Antimikrobiální látky jsou látky produkované mikroorganismy. Vykazují mikrobicidní nebo mikrobistatický účinek. V teoretické části jsou charakterizovány jednotlivé testované potraviny a antimikrobiální látky, popsáno možné použití antimikrobiálních látek v potravinářství a shrnuty metody důkazu jejich produkce. V praktické části této práce je popsána izolace mikroorganismů z potravin, jejich typizace a identifikace, a ověření produkce antimikrobiálních látek.

Klíčová slova: antimikrobiální aktivita, bakterie, antimikrobiální látky, indikátorový mikroorganismus, fermentované potraviny

## **ABSTRACT**

Antimicrobial compounds are substances produced by microorganisms. They exhibit either microbistatic or microbicidal effect. In the theoretical part of this thesis are characterised particular tested foods and antimicrobial substances, the possible use of antimicrobials in the food industry and are summarised methods used for proving their production. The practical part of the thesis describes isolation of microorganisms from foods, their typization and identification and the testing of production of antimicrobial substances.

Keywords: antimicrobial activity, bacteria, antimicrobial substances, indicator strain, fermented foods

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí práce, Ing. Khatantuul Purevdorj, PhD, za její trpělivost, věnovaný čas a ochotu vždy pomoci. Velké díky patří i mé rodině za jejich podporu a motivaci v průběhu celého studia.

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

# OBSAH

ÚVOD.....	8
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>9</b>
<b>1 CHARAKTERISTIKA ANALYZOVANÝCH FERMENTOVANÝCH POTRAVIN .....</b>	<b>10</b>
1.1 TOFU .....	10
1.2 TEMPEH .....	11
1.3 SÓJOVÁ OMÁČKA .....	12
1.4 MISO .....	13
1.5 KOMBUCHA.....	13
1.6 KIMCHI .....	14
1.7 SVRCHNĚ KVAŠENÝ NEALKOHOLICKÝ NÁPOJ FERMENTÁDA.....	15
<b>2 CHARAKTERISTIKA ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK PRODUKOVANÝCH MIKROORGANISMŮ .....</b>	<b>16</b>
2.1 ORGANICKÉ KYSELINY .....	16
2.2 PEROXID VODÍKU H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	17
2.3 BAKTERIOCINY .....	18
<b>3 VYUŽITÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK V POTRAVINÁŘSTVÍ.....</b>	<b>22</b>
<b>4 METODY STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY MIKROORGANISMŮ.....</b>	<b>25</b>
4.1 DIFÚZNÍ METODY .....	26
4.2 DILUČNÍ METODY.....	28
4.3 MIKROSKOPICKÉ METODY .....	29
<b><u>II</u> PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>31</b>
<b>5 CÍL PRÁCE.....</b>	<b>32</b>
<b>6 MATERIÁL.....</b>	<b>33</b>
6.1 POMŮCKY A PŘÍSTROJE .....	33
6.2 ROZTOKY A CHEMIKÁLIE.....	33
6.3 KULTIVAČNÍ MÉDIA .....	33
<b>7 METODIKA .....</b>	<b>38</b>
7.1 PŘEDBĚŽNÁ IDENTIFIKACE ZÍSKANÝCH IZOLÁTŮ .....	39
7.2 IDENTIFIKACE MALDI – TOF.....	41
7.3 OVĚŘENÍ PRODUKCE ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK.....	42
<b>8 VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>44</b>
8.1 VÝSLEDKY PŘEDBĚŽNÉ IDENTIFIKACE ZÍSKANÝCH IZOLÁTŮ .....	44
8.2 ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA .....	47
<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>56</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>58</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>63</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>64</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>65</b>
<b>PŘÍLOHA P I: TABULKA PŘEDBĚŽNÉ TYPIZACE A IDENTIFIKACE IZOLÁTŮ .....</b>	<b>66</b>
<b>PŘÍLOHA P II: SEZNAM KMENŮ VYKAZUJÍCÍCH POZITIVNÍ INHIBIČNÍ AKTIVITU .....</b>	<b>74</b>

## ÚVOD

V dnešní době roste tlak na používání co nejméně „chemie“ v potravinářství. Výzkum se tak orientuje na vývoj konzervačních látek přírodního původu, které by mohly nahradit dosud používané umělé konzervanty. Způsob konzervace, kdy se používá potenciálu přirozeně se vyskytujících mikroorganismů vytvářet metabolity, které napomáhají prodloužení trvanlivosti dané potraviny, se nazývá biologická konzervace (Singh, 2018).

Vedle produkce potravin je základním úkolem potravinářského průmyslu zajistit údržnost a bezpečnost potravin. Je tedy důležité disponovat prostředky pro zabránění výskytu patogenních mikroorganismů. Některé klasické metody sice zajistí údržnost potraviny, mohou ale ovlivnit její výživovou hodnotu a organoleptické vlastnosti. Syntetické konzervanty zase mohou způsobit zdravotní problémy konzumentů. Využití přirozených antimikrobiálních látek by také mohlo přispět k boji proti rezistenci některých patogenních mikroorganismů vůči syntetickým antimikrobiálním látkám (Quinto et al., 2019).

Existuje několik způsobů aplikace přirozených antimikrobiálních látek. Látky mohou být přímo přidány do potraviny, nanесeny na její povrch nebo včleněny do obalových materiálů. Přímá aplikace je nejpoužívanější způsob zajišťující okamžitý účinek, který je však krátkodobý. Naopak vytvoření antimikrobiálního filmu zajistí dlouhodobou ochranu (Lucera et al., 2012).

Jako přírodních konzervantů se v potravinářském průmyslu používá bakteriocinů, zejména nisin. Bakteriociny jsou heterogenní skupina bakteriálních proteinů nebo peptidů, které jsou produkovány bakteriemi a archeí. Nejčastěji jsou ke konzervaci používány bakterie mléčného kvašení a jejich metabolity (nisin), které mají status GRAS (všeobecně uznané za bezpečné) (Darbandi et al., 2022)

Cílem bakalářské práce bylo izolovat mikroorganismy z fermentovaných potravin, identifikovat je a ověřit, zda některé kmeny mají schopnost produkce antimikrobiálních látek vůči zvoleným indikátorovým mikroorganismům.



## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 CHARAKTERISTIKA ANALYZOVANÝCH FERMENTOVANÝCH POTRAVIN

Tradiční fermentované potraviny (včetně nápojů) hrají významnou roli v lidské stravě. Nejenže jde o potraviny v některých kulturách tradiční, zároveň prospívají zdraví. Mezi nejvýznamnější zdravotní benefity patří snížení rizika vzniku kardiovaskulárních onemocnění, zlepšení hladiny glukózy a lipidů v krvi, stimulace imunitního systému, účinek proti rakovině a v neposlední řadě také snížená úmrtnost (Cuamatzin – Garcia et al., 2022).

Fermentace je proces, kdy dochází k rozkladu látek v potravine a jídlo se tak stane chutnějším a biologicky dostupným. Je to starý proces, který se kdysi používal zejména ke konzervaci. Kromě konzervačních účinků a zpřístupnění živin, fermentace dodává potravinám charakteristické sensorické vlastnosti (Kothe et al., 2024).

Existují dva typy fermentace; přirozená neboli spontánní fermentace, kdy jsou mikroorganismy původně přítomny v surovině nebo prostředí. Druhým typem je fermentace kontrolovaná. Při tomto procesu se cíleně vybírají mikroorganismy, které budou použity. Nejčastěji se ve fermentovaných potravinách nacházejí bakterie mléčného kvašení, které jsou známé svými probiotickými účinky (Kirmizigul a Sengun, 2023).

## 1.1 Tofu

Existuje velké množství výrobků ze sóji. Lze je rozdělit na dva hlavní druhy; fermentované (např. tempeh, natto, miso a sójová omáčka) a nefermentované, kam patří například sójové mléko a tofu (Chua a Liu, 2019).

Tato potravina se považuje za jeden z nejlepších rostlinných zdrojů proteinů díky jeho obsahu prospěšných lipidů a bioaktivních látek, jakými jsou mimo jiné také saponiny a fytosteroly. Tofu je klasifikováno jako výrobek čerstvý a nezpracovaný. Vysoká vlhkost a velmi vysoké pH (6-7) činí z tofu vhodné prostředí pro růst nejrůznějších patogenních mikroorganismů (Ali et al., 2021).

Popularita tohoto ze sóji vyrobeného produktu v posledních letech stále stoupá. Je tomu tak zejména díky vysoké výživové hodnotě. Je zdrojem esenciálních aminokyselin, vitamínů, vápníku, železa a draslíku. Navíc se uplatňuje při snižování hladiny cholesterolu (Rossi et al., 2016).

Při správném skladování převládají bakterie mléčného kvašení, nicméně i při uchovávání v chladu je trvanlivost pouze v řádu dnů. Hlavními kmeny podílejícími se na mikrobiální zkáze jsou *Enterobacteriaceae* a pseudomonády (Rossi et al., 2016).

Dominující druhy bakterií izolované z tofu byly: *Lactococcus raffinolactis*, *Paenibacillus polymyxa*, *Streptococcus macedonicus*, *Macroccoccus caseolyticus*. Dále byly zjištěny také *Weissella confusa* a *Lactococcus lactis* (Rossi et al., 2016).

## 1.2 Tempeh

První zmínka o tempehu byla vytvořena v 17. století (Astuti, 1999; Shurtleff & Aoyagi, 2020; Winarno, Winarno, & Ahnan – Winarno, 2017; Ahnan – Winarno et al. 2021).

Dle CODEX Alimentarius je v Indonésii, odkud tento produkt pochází, používán název „tempe“. V angličtině je však používán pojem „tempeh“. Standard v CODEX charakterizuje tuto potravinu jako pevný bílý produkt ve tvaru koláče připravovaný z loupaných vařených sójových bobů, které podléhají „solid state“ fermentaci s *Rhizopus* spp. Mohou se používat pouze druhy *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae* a *Rhizopus stolonifer*. Textura by měla být soudržná. Barva by měla být bílá, odpovídající barvě mycelia *Rhizopus* spp. Typická je chuť masová, houbová a ořechová. Ve vůni by neměl být přítomný pach amoniaku. Do tempehu by neměla být přidávána žádná aditiva a neměly by být přítomny žádné cizí částice. Minimální obsah proteinů se udává na 15 % (w/w) a maximální hodnota vlhkosti by neměla přesáhnout 65 % (w/w). Tuky by měly být přítomny v množství minimálně 7 % (w/w) a hrubá vláknina maximálně 2,5 % (Food and Agriculture Organization-World Health Organization, 2017; Winarno et al., 2021).

Produkce zahrnuje máčení, vyloupání, mytí, vaření, okapání, chlazení, inokulaci, balení a inkubaci, s modifikacemi pořadí a opakování některých kroků podle oblasti výroby (Rahayu, Pambayun, Santoso, Nuraida, & Ardiansyah, 2015; Winarno et al., 2021). Prvním krokem je obvykle máčení, které trvá v rozmezí 6–24 hodin. Tento krok umožňuje snazší oloupaní lusků (Nout & Kiers, 2005; Winarno et al., 2021). Loupání je důležitým krokem, neboť dle CODEX Alimentarius je přítomnost lusků ve finálním produktu považováno za kontaminaci (Food and Agriculture Organization-World Health Organization, 2017; Winarno et al., 2021). Doba vaření je většinou 20–30 minut. Zde se upraví chuť a dojde k eliminaci nežádoucích mikroorganismů (Babu, Bhakayaraj, & Vidhyalakshmi, 2009; Karyadi & Lukito, 1996; Nout & Kiers, 2005; Winarno et al., 2021). Cílem okapání je snížení množství vody v tempehu, protože fermentace vyžaduje hodnoty vlhkosti kolem 62 % a aktivitu vody

0,99 – 1 (Penaloza, Davey, Hedger, & Kell, 1992; Sarrette, Nout, Gervais, & Rombouts, 1992; Winarno et al., 2021). Inokulace se provádí disperzí sporangioforů *Rhizopus* spp., které vytvoří husté mycelium, a to je odebráno před tím, než začne sporulace (Nout & Kiers, 2005; Penaloza, Davey, Hedger, & Kell, 1992; Winarno et al., 2021). Hotový produkt může být ještě upravován nebo konzumován čerstvý. Čerstvý tempeh vydrží při pokojové teplotě asi 3 dny (Moreno et al., 2002; Nout & Rombouts, 1990; Winarno et al., 2021).

Byly izolovány kromě plísní, které se používají jako startérová kultura, také druhy bakterií mléčného kvašení, například *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus reuteri* a další (Radita et al., 2021). Díky procesu fermentace při výrobě tempehu mohou být přítomné také kvasinky. Různorodost jejich druhů závisí na typu použité fermentace (Efriwati et al., 2013).

### 1.3 Sójová omáčka

Toto tradiční čínské ochucovadlo je charakteristické jedinečnými sensorickými vlastnostmi, jako je jasně určitelné aroma a intenzivní umami chuť. Stejně jako všechny další fermentované produkty obsahuje látky s antioxidačními účinky (Feng et al., 2023).

Hnědou barvu a výraznou chuť jí dodávají sója a pšenice skrze komplexní mikrobiologickou kofermentaci a rozpad makromolekulárních látek. Určujícími faktory při hodnocení kvality a chuti omáčky jsou aroma a příchut'. Celková chuť se skládá z 5 podchutí, kterými jsou umami, slaná, sladká, kyselá a hořká (Zhang et al., 2024).

Vyrábí se ze sóji nebo její drtě, mouky případně otrub, soli a vody. Jako startovací kultura funguje *Aspergillus oryzae*. Momentálně existují dva způsoby výroby. První způsob (tzv. „high-salt diluted state method“) je typický použitím roztoku o vysoké koncentraci NaCl, velkým podílem láku ke koji a dlouhou fermentací (cca 6 měsíců). Takto vyrobená omáčka má silně slanou a umami chuť a aroma podobné sóji. Při druhém způsobu (tzv. „low salt solid state method“) se naopak používá roztok NaCl o nízké koncentraci, nízký podíl láku ke koji a doba fermentace jen cca 30 dní (Gao et al., 2023).

Kromě *Aspergillus oryzae* se jako startovací kultura používají také *Aspergillus sojae*, *Rhizopus oryzae*, *Zygosaccharomyces rouxii* (Mogensen et al., 2002; Bernardeau et al., 2006; Bourdichon et al., 2012; Thapa and Tamang, 2015; Tamang, 2016).

## 1.4 Miso

Tradiční fermentovaná pasta ze sóji pochází z Japonska. Ingrediencemi jsou sója, napařená rýže nebo ječmen, sůl a koji kultura. V chuti se kombinují složky slané chuti a umami. Barva může být různá, od bílé, žluté, po červenou až hnědou. Záleží na typu misa. Chuť je jedním z nejdůležitějších ukazatelů kvality, protože může být jednoduše provedeno senzorní hodnocení (Wang et al., 2021).

V japonské kuchyni se pasta používá jako přísada nebo základ různých pokrmů. Typická je miso polévka. Jde o přílohu, která existuje v mnoho variantách s různými druhy zeleniny nebo lokálními produkty (Wang et al., 2021).

Základní složkou pro výrobu pasty je koji. Vyrábí se přidáním koji kultury (*Aspergillus oryzae*) do napařené rýže nebo ječmene. Dále se přidá vařená sója a sůl. Tato směs je uložena do tanku a probíhá fermentace po dobu 2–6 měsíců. V konečném produktu jsou pak přítomny plísně, kvasinky, bakterie mléčného kvašení a další bakterie (Lee et al., 2016). Komerční produkce misa cílí na použití čistých startérových kultur, kdy se používá zástupce bakterií mléčného kvašení *Tetragenococcus halophilus* a kvasinka *Zygosachcaromyces rouxii*. Dalším zástupcem bakterií mléčného kvašení, který však není startérovou kulturou, ale byl identifikován v konečném produktu je *Enterococcus faecium* (Allwood et al., 2021).

## 1.5 Kombucha

Velké oblibě se nyní těší kombucha. Jde o velmi výživný nápoj, který poskytuje mnoho zdravotních benefitů, protože obsahuje probiotické bakterie. S rostoucím zájmem o tento produkt se začínají produkovat i varianty pravé kombuše jen podobné. Také je rozšířená příprava tohoto nápoje v domácnostech (Sanwal et al., 2023).

Proces výroby je založen na aerobní statické fermentaci černého, zeleného nebo oolong čaje. Zde se přidá sacharóza a kultura bakterií a kvasinek (SCOBY) (symbiotická kolonie bakterií a kvasinek). První krok zahrnuje rozpuštění 50-100 gramů sacharózy v 1 litru vařící vody, následovaný máčením čajových lístků po určitou dobu. Následně je oslazený čaj filtrován, autoklávován a ochlazen na 20 °C. Dále je buď SCOBY porost, nebo 20 % předtím fermentovaného čaje, naočkováno do již zfiltrovaného čaje, aby mohl začít proces fermentace, který probíhá v nerezových fermentačních tancích (Sanwal et al., 2023).

Podle Neffe-Skocińska et al., (2017) byly nejideálnější podmínky fermentace stanoveny na 10 dnů při 25 °C. Produkt tak získá výborné vlastnosti. Jakmile z mateřských SCOBY

vzniknou dceřiné, jsou viditelné bublinky plynu a rozvine se charakteristická vůně kombuchy. Na konci procesu vzniká příjemná ovocná, kyselá, jemně perlivá chuť, která se přeměňuje v jemně octovou. Mikroorganismy přítomné v kombuše produkují mnoho metabolitů, mezi kterými jsou i ty prospěšné pro zdraví člověka. Jedná se například o ve vodě rozpustné vitamíny jako vitamín C, B a B<sub>2</sub> (Kirmizigul a Sengun, 2023).

Vzhledem k tomu, že se k výrobě používají kultury kvasinek a bakterií, lze ve výsledném produktu očekávat jejich přítomnost. Identifikované byly například druhy kvasinek *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida stellata*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces* spp., *Schizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces kombuchaensis* a *Toluraspora delbrueckii* (Kurtzman et al., 2001; Teoh et al., 2004; Tamang, Watanabe a Holzapfel, 2016). Důležitým rodem kvasinek uplatňujícím se při fermentaci je *Lachancea* (Chakravorty et al., 2016; Bellut, Krogerus a Arendt, 2020). Dominujícím rodem bakterií je *Gluconacetobacter* (Tamang, Watanabe a Holzapfel, 2016).

## 1.6 Kimchi

Tradiční korejský pokrm připravovaný fermentací různé zeleniny, soli, fermentované rybí omáčky a dalších. Probíhá spontánní fermentace za nízké teploty bez předsterilizace, což se projeví vývojem heterogenní mikrobiální kultury. Proces fermentace je započat díky mikroorganismům přirozeně se vyskytujících v syrové zelenině (Mun et al., 2024).

Vzhledem k malému kalorickému obsahu na 100 gramů lze kimchi považovat za nízkokalorickou potravinu. Zároveň je zdrojem mnoha vitamínů, například C nebo skupiny B. Obsahuje také mnoho minerálů jako jsou vápník, draslík, železo a fosfor. Významné je také obsahem vlákniny (Kirmizigul a Sengun, 2023).

Obecně je kimchi fermentováno za nízkých teplot (od -2 do 10 °C) po dobu 2–3 měsíců. Proces je rozdělen na základě hodnot pH do 3 fází: při pH > 5,2 se hovoří o časně fázi, při hodnot 4,5 – 5,2 se hovoří o prostřední fázi a hodnota pH < 4,5 je pak pozdní fázi (Mun et al., 2024).

Existuje také kimchi, které se fermentuje dlouhou dobu, „Mukeunji“ s typickou kyselou chutí a charakteristickou texturou. Fermentuje se déle než 6 měsíců při teplotách od -2 do 10 °C. Finální fáze fermentace dosahuje hodnot pH ≤ 4 (Mun et al., 2024).

Zásadním faktorem ovlivňujícím fermentaci kimchi je teplota. Ta přímo ovlivňuje růst a různorodost bakterií mléčného kvašení. To je důvodem, proč se kimchi uchovává při chladných teplotách (Jeong et al., 2023).

Probiotické kmeny, které byly z kimchi vyizolovány, se v něm nacházely díky jejich použití pro fermentaci při výrobě tohoto produktu. Byly identifikovány tyto druhy: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactiplatibacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Weissella koreensis*, *Weissella cibaria* (Lee et al., 2015; Beck et al., 2019; Dahiya a Nigam, 2022).

Chang et al., 2008; Nam et al., 2009; Jung et al., 2011 se podařilo kromě mnoha druhů bakterií mléčného kvašení izolovat také některé kmeny kvasinek z rodu *Candida*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, a *Pichia*, dále i halofilní bakterie z rodu *Halococcus* a *Natrialba* (Tamang, Watanabe a Holzappel, 2016).

Jako komerční startérová kultura se používá *Lactobacillus kimchii* (Mogensen et al., 2002; Bernardeau et al., 2006; Bourdichon et al., 2012; Thapa and Tamang, 2015; Tamang et al., 2016).

## 1.7 Svrchně kvašený nealkoholický nápoj Fermentáda

Jedná se o nealkoholický nápoj vyráběný v České republice v Kersku. Výroba spočívá ve svrchním kvašení šťávy ze sicilského citronu, kde citronová šťáva je lisována za studena. Tento produkt je vyráběn bez umělých aromat a konzervantů. Citron obsahuje přirozeně velmi málo cukrů, a i přes přidavek řepného cukru, lze produkt považovat za málo sladký a nízkokalorický (Fermentáda, 2024).

Proces fermentace dává vzniku alkoholu v množství do 0,5 %, proto může být nápoj označován jako nealkoholický. Díky kvašení jsou přítomny prospěšné látky jako jsou mimo jiné vitaminy B a C, flavonoidy nebo například minerály fosfor, draslík a vápník (Fermentáda, 2024)

Tento produkt, charakteristický jemným perlením a burčákovým nádechem, je dostupný celkem ve 3 variantách; bez příchutě, hořká a třešňová (Fermentáda, 2024).

## 2 CHARAKTERISTIKA ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK PRODUKOVANÝCH MIKROORGANISMY

Jde o látky produkované mikroorganismy jako součást jejich imunitních reakcí nebo obranných mechanismů, kdy mikroorganismům pomáhají v soutěži o prostor a obživu. Zejména produkce antimikrobiálních látek jako jsou peroxid vodíku, ethanol, organické kyseliny, enzymy, antibiotika a bakteriociny (Reis et al., 2012; Cesa – Luna et al., 2020; Darbandi et al., 2021), svědčí o značné kompetici mezi mikroorganismy (Cesa – Luna et al., 2020; Darbandi et al., 2021). Nejtypičtějším a nejvíce prostudovanými producenty antimikrobiálních látek, kteří se vyskytují v potravinách, jsou bakterie mléčného kvašení.

### 2.1 Organické kyseliny

Organické kyseliny a jejich soli jsou často používány, protože jejich účinnost je dobře známa a jsou levné. Narušují integritu buněčné membrány a makromolekul, nebo zasahují do transportu živin a metabolismu. Tyto látky mají bakteriostatický efekt. Nejvíce účinné jsou kyseliny octová, propionová a mléčná (Lucera et al., 2012).

Optimální antimikrobiální aktivitu vykazují při nízkém pH. Inhibiční účinek kyselin je dán nedisociovanou formou molekuly, díky čemuž může volně přecházet přes plazmatickou membránu. Ve vnitřním prostředí buňky se molekula setká s vyšším pH a následkem toho disociuje. Tím se uvolní anionty a protony, které by jinak samostatně membránou nemohly prostoupit. Tyto anionty jsou toxické a mají schopnost inhibovat základní metabolické reakce, jako je produkce ATP a esenciálních enzymů (ORGANIC ACIDS: PROMISING MODERN PRESERVATIVES).

*Kyselina mléčná*  $CH_3CH(OH)COOH$

V potravinářském průmyslu má dlouhou historii a procesy její produkce mikroorganismy jsou známy již od počátku minulého století. Je přítomna v mnoha potravinách, například v kyselém zelí, nakládané zelenině, mléčných výrobcích a mnoha fermentovaných potravinách. Funguje jako prostředek zabraňující mikrobiální zkáze nejrůznějších produktů (Reis et al., 2012).

Mechanismus inhibice spočívá v rozpustnosti ještě nedisociované kyseliny v cytoplazmatické membráně a nerozpustnosti disociované formy. Dochází k okyselení cytoplazmy, která má za následek selhání protonových hybných sil. Je ovlivněn



transmembránový pH gradient, kdy ubývá energie dostupné pro růst buňky (Oda et al., 2002; Wee et al., 2006; Reis et al., 2012)

#### *Kyselina octová CH<sub>3</sub>COOH*

Kyselina a její soli se přidávají do potravin za účelem inhibice růstu a potlačení životaschopnosti mikroorganismů. Baktericidní efekt je spíše účinný proti gramnegativním bakteriím (Reis et al., 2012).

Antimikrobiální účinek je založen na nedisociované molekule. Tato kyselina je produkována laktobacily heterofermentativním kvašením (Reis et al., 2012). Při heterofermentativním kvašení bakterie rozkládají hexózy, a to vede k produkci dalších metabolitů. Jako jsou například acetáty, ethanol, oxid uhličitý (John et al., 2002; Reis et al., 2012).

#### *Kyselina propionová CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COOH*

Bakterie přeměňují laktát na propionát, acetát a oxid uhličitý. Tato kyselina má široké využití v potravinářském průmyslu především jako fungistatický přípravek. Velký význam nalézá při kontrole výskytu hub u mléčných a pekařských výrobků (Reis et al., 2012).

Kyselina působí na membrány buněk tak, že neutralizuje elektrochemický gradient protonů. Její účinek je však závislý na kyselině mléčné, která v substrátu způsobí pokles pH (Reis et al., 2012). Přes buněčnou membránu vstoupí do buňky. Zde se nahromadí a ovlivní pH vnitřního prostředí. To naruší transport a metabolickou aktivitu buňky a mikroorganismus tak není schopen života (FOOD ADDITIVES, 2020).

Propionové bakterie jsou v potravinářství využívány nejen pro produkci kyseliny propionové, ale také pro schopnost produkce vitamínu B<sub>12</sub> (Reis et al., 2012).

## **2.2 Peroxid vodíku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Produkují je bakterie mléčného kvašení. Většina těchto bakterií vytváří peroxid oxidací laktátu (Reis et al., 2012). Mechanismus cytotoxické aktivity je založen na produkci vysoce reaktivních hydroxylových radikálů. Vznikají interakcí superoxidového radikálu a peroxidu vodíku (Harber a Weiss, 1934; Linley et al., 2012). Produkce těchto hydroxylových radikálů s krátkou životností je *in vivo* katalyzovaná přítomností iontů přechodných kovů, zejména železa s nábojem – II (Kehrer, 2000; Linley et al., 2012). *In vitro* hydroxylový radikál vystupuje jako oxidační činidlo a reaguje pak s lipidy, proteiny a nukleovými kyselinami (Liochev, 1999; Linley et al., 2012).

Je baktericidní v závislosti na jeho koncentraci, pH a teplotě, která je také velmi důležitá při určování efektivity peroxidu vodíku vůči sporám (Reis et al., 2012).

### 2.3 Bakteriociny

Poprvé byly objeveny před téměř 100 lety. Představují heterogenní skupinu peptidů nebo proteinů syntetizovaných na ribozomech, vykazující antimikrobiální aktivitu vůči druhům blízkým producentům. Většinou to jsou kationty, amfifilní molekuly a látky pronikající membránou (Lucera et al., 2012; Reis et al., 2012; Darbandi et al., 2021).

Klasifikace bakteriocinů je velmi proměnlivá a existuje několik možných způsobů dělení, avšak za základní se považuje dělení do 4 skupin na základě jejich molekulové hmotnosti, citlivosti vůči enzymům, tepelné stabilitě a chemické struktury (Reis et al., 2012; Darbandi et al., 2021; Danguah et al., 2022).

Třidu I tvoří lantibiotika a může být dále rozdělena na Ia a Ib podle toho, jaký náboj a strukturu má látka (Danguah et al., 2022). Ve své primární struktuře mají zabudované aminokyseliny lantionin a metyl-lantionin. Je známo téměř 60 lantibiotik a 30 % pochází z bakterií mléčného kvašení. Jde o látky posttranslačně upravené, tepelně stabilní a jejich místem účinku je buněčná stěna. Působí zejména na grampozitivní bakterie. Podtřída Ia zahrnuje podlouhlé peptidy s kladným nábojem. Mechanismus účinku spočívá v tvorbě pórů. Do této skupiny patří nisin. Zástupci skupiny Ib jsou kulovité, pevní se záporným nebo žádným nábojem. Fungují jako inhibitory katalytických enzymů potřebných pro životní procesy vnímavých bakterií (Ahmad et al., 2017).

Do třídy II patří termostabilní peptidy, které mají molekulové hmotnosti nižší než 10 kDa a také můžou být dále rozděleny na podtřídy (Danguah et al., 2022). Jsou to tepelně stabilní, malá a nemodifikovaná antibiotika, s izoelektrickými body pohybujícími se v rozmezí 8,3–10. Bakteriociny působící proti listeriím jsou seskupeny do třídy IIa. Zástupci jsou leukocin A, acidocin A, mesentericin A, pediocin PA – 1 a sakacin P. Charakteristickým znakem třídy IIb je potřeba alespoň dvou různých peptidů pro aktivitu, a tudíž působí synergisticky. Samostatně vykazují malou nebo žádnou aktivitu. Patří sem laktokocin G a plantariciny. Pro třídu IIc jsou typické malé, tepelně stabilní peptidy, které jsou nesené vedoucím peptidem. Dělí se na dvě skupiny; thiolbiotika a cystibiotika. První jmenované jsou bakteriociny obsahující dva cysteinové zbytky, naopak jeden zbytek mají cystibiotika. Zástupci této třídy jsou laktokocin A, divergicin A a acidocin A (Ahmad et al., 2017).

Naopak třída III obsahuje peptidy termolabilní s vysokou molekulovou hmotností. Patří sem například helveticin J (Danguah et al., 2022). Lytické bakteriociny jsou endopeptidázové peptidy a enzymaticky lyzují buněčnou stěnu. Byly objeveny také nelytické bakteriociny, které splňují charakteristiky III. třídy. Příkladem jsou například helveticin J pocházející z *Lactobacillus helveticus*, dysgalacticin ze *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* a streptokokcin A (Ahmad et al., 2017).

Poslední IV. třída zahrnuje bakteriociny s lipidovými nebo sacharidovými skupinami. Jsou citlivé na glykolytické nebo lipolytické enzymy. Řadí se sem bakteriociny jako jsou plantaricin S a leukonocin S. V této třídě byla objevena cyklická látka podobná bakteriocinu; uberolysin produkovaná *Streptococcus uberis* (Ahmad et al., 2017).

Dalším možným způsobem je rozdělení na bakteriociny produkované grampozitivními bakteriemi a bakteriociny produkované gramnegativními. Bakteriociny produkované grampozitivními bakteriemi jsou kationty amfifilní povahy se schopností prostupovat membránami. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí do 5 do 30 kDa (Kemperman et al., 2003; Cesa – Luna, 2020). Existují dva způsoby, kterými narušují membrány. Buď na ně působí elektrostatickými interakcemi, nebo interakcí s aniontovými membránovými fosfolipidy, které způsobují tvorbu pórů. To má za následek odtékání cytoplazmatických sloučenin (Gillor et al., 2009; Cesa – Luna, 2020). Patří sem všechny bakteriociny produkované bakteriemi mléčného kvašení. Dále se také do této skupiny řadí například bakteriociny produkované rodem *Bacillus* – subtilin a koagulin.

Druhá skupina tvořená bakteriociny produkované gramnegativními bakteriemi je oproti předchozí skupině rozsáhlejší a mají různé mechanismy účinku. Nejznámějším zástupcem této skupiny je kolicin produkovaný *Escherichia coli* (Riley a Wertz, 2002; Cesa – Luna, 2020). Dalším zástupcem jsou mikrociny. Mají malou molekulovou hmotnost a jsou to peptidy hydrofobní povahy (Yang et al., 2014; Kaur a Kaur, 2015; Cesa – Luna, 2020). Rod *Pseudomonas* produkuje bakteriociny zvané pyociny. Napadají buňky skrze specifické receptory (Michel-Briand a Baysse, 2002; Parret a De Mot, 2002; Cesa-Luna, 2020).

#### *Nisin*

Je produkován druhem *Lactococcus lactis* (Lucera et al., 2012). Poprvé byl pozorován v první polovině 20. století a v roce 1947 pojmenován názvem, který se používá dodnes. Je nejlépe popsáným bakteriocinem. Skládá se ze dvou aminokyselin metyl-lantioninu a lantioninu. Patří do třídy lantibiotik (Reis et al., 2012; Darbandi et al., 2021). Zatím bylo určeno a popsáno celkem 8 druhů tohoto bakteriocinu (Darbandi et al., 2021).

Jeho význam spočívá v účinku vůči gramnegativním i grampozitivním bakteriím (Reis et al., 2012). Má dvojí mechanismus účinku. Za první se naváže na hlavní přenašeč peptidoglykanových podjednotek z cytoplazmy do buněčné stěny, kde inhibuje syntézu buněčné stěny a způsobí tak smrt buňky. Za druhé použije molekulu přenašeče jako základ pro tvoření pórů, čímž dochází k vylití buněčného materiálu a následně ke smrti buňky (Reis et al., 2012; Darbandi et al., 2021)

Je nasazován ve výrobě sýrů a sýrových pomazánek k zabránění výskytu spor klostridií (Darbandi et al., 2021).

### *Pediocin*

Pediociny jsou termostabilní baktericidní peptidy produkované některými druhy rodu *Pediococcus*, např. *Pediococcus acidilactici*, *P. cerevisiae* a *P. pentosaceus*. Byla objevena schopnost produkce bakteriocinu podobné pediocinům také u *Lactiplantibacillus plantarum* a *Heyndrickxia coagulans* (dříve *Bacillus coagulans*) (Devi a Halami, 2011; Nes et al., 1996; Reis et al., 2012). Tyto látky hrají významnou roli při konzervaci fermentovaných potravin. Pediociny se řadí do třídy baktericinů I, II a III. N-terminální oblast všech pediocinů zahrnuje vzor známý jako „pediocin box“. Tvorba bakteriocinu většinou probíhá během stacionární růstové fáze (Ray, 1994; Osmanagaoglu et al., 1998; Darbandi et al., 2021).

Mechanismus účinku spočívá v jeho navázání se na buněčnou stěnu, což u citlivých kmenů způsobí konformační změnu buněčné stěny, která vede ke ztrátě její bariérové funkce a umožní bakteriocinu proniknout skrz buněčnou stěnou. Následně také dochází k narušení funkcí cytoplazmatické membrány v důsledku tvorby pórů. Tím dojde ke snížení pH vnitřního prostředí a k inhibici proteinů, které slouží k tvorbě energie v buňce (Gabrielsen et al., 2014; El-Saber Batiha, 2021)

Existují komerčně dostupné pediociny v podobě produktů Alta 2341 a Microgard. Vykazují vyšší účinnost proti některým patogenním mikroorganismům, jako je *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* a *E. coli*, než nisin (Knorr, 1998; Garsa et al., 2014; Darbandi et al., 2021). Aktivita tohoto bakteriocinu je ovlivněna pH, přítomností solí, teplem, enzymovými aktivitami a dobou skladování (Niamah, 2018; El-Saber Batiha et al., 2021).

### *Bifidobakteriociny*

Bifidobakterie disponují kromě schopností produkovat organické kyseliny i schopností produkovat bakteriociny (Bevilacqua et al., 2003; Darbandi, 2021). První bakteriocin

asociovaný s bifidobakteriemi je bifidin produkovaný *Bifidobacterium bifidum* NCDC 1452. Bifidocin A je produkován ve fázi exponenciálního růstu s největší produkcí ve stacionární fázi (Cheikhoussef et al., 2010; Darbandi, 2021). Bifidocin A vykazuje širokou antimikrobiální aktivitu vůči bakteriím způsobujícím mikrobiologickou zkázu, *E.coli*, *L.monocytogenes*, *S.aureus* a na některé kvasinky (Liu et al., 2015; Darbandi, 2021).

Působení bifidocinu A bylo testováno na citlivém kmenu *E. coli*. Bylo zjištěno, že bakteriocin vykazuje účinky baktericidní, nikoliv bakteriostatické. Došlo k lýze buňky, což odpovídá také účinku bifidocinu B (Yildirim et al., 1999; Darbandi, 2021). Antimikrobiální aktivita některých kmenů bifidobakterií je omezena na Gram negativní patogenní bakterie (Mostafa et al., 2015; Darbandi, 2021)

### 3 VYUŽITÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK V POTRAVINÁŘSTVÍ

Kvalita a bezpečnost potravin jsou hlavním cílem potravinářského průmyslu. Vzhledem k tendenci potravin podléhat mikrobiologické zkáze, je třeba aplikovat mechanismy k zabránění tomuto procesu (Ribeiro et al., 2023).

Využívání přirozených antimikrobiálních látek v potravinářství nabralo na významu díky obavám spotřebitelů o účincích umělých konzervantů na jejich zdraví, ale hlavně z důvodu narůstající rezistence mikroorganismů vůči některým syntetickým konzervačním látkám (Batiha et al., 2021).

V dnešní době je stále aktuálnější téma používání syntetických aditiv a konzervantů v potravinářství. Zájem o prodloužení trvanlivosti potravin je stále vyšší a také se zvyšuje tlak na to, aby se jednalo o konzervaci biologickou. Je tedy snaha o nalezení alternativ k chemickým konzervantům a aditivům. Zde nacházejí uplatnění antimikrobiální látky produkované mikroorganismy.

Biologická konzervace je způsob prodloužení trvanlivosti potraviny, kde se využívá potenciálu přirozeně se vyskytující mikroorganismů produkovat metabolity, které napomáhají konzervaci (Singh, 2018).

Biokonzervační látky lze definovat jako přirozeně se vyskytující sloučeniny získané z přírodních zdrojů, jako jsou rostliny, zvířata a mikroorganismy, které prodlužují životnost produktů. Tyto látky buď snižují počet škodlivých mikroorganismů na minimum nebo je zcela eliminují. Zároveň mají pozitivní efekt na funkčnost a kvalitu potraviny (Batiha et al., 2021).

Největšího využití v této oblasti nalézají bakterie mléčného kvašení a jejich metabolity, zejména bakteriociny (Lucera et al., 2012; Singh, 2018; Batiha et al., 2021). Jejich využití jako konzervační látky je výhodné hned z několika hledisek. Snižují riziko otravy jídlem a křížové kontaminace v potravinovém řetězci. Zvyšují dobu údržnosti potravin, ochraňují potraviny v době, kdy prochází úpravou vysokými teplotami a snižují potřebnou intenzitu fyzikálních ošetření. V neposlední řadě také přispívají ke snížení ekonomických ztrát v důsledku zkažení potraviny. Hlavní výhodou je možnost snížení nebo úplného odstranění použití chemických konzervantů (Darbandi et al., 2021).

### *Nisin*

Nejpoužívanějším bakteriocinem pro biologickou konzervaci je nisin. Má široké využití v potravinářském průmyslu, byl schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a drží status GRAS (Reis et al., 2012; Lucera et al., 2012; Singh, 2018; Batiha et al., 2021). Nachází se v masu a fermentovaných mléčných výrobcích, a to kvůli přirozeně vysokému výskytu bakterií mléčného kvašení v těchto výrobcích (Rodrigo a Palop, 2021). Tento bakteriocin byl poprvé použit v 50. letech minulého století pro inhibici růstu *Clostridium tyrobutyricum* způsobující pozdní duření sýrů (Singh, 2018). Nyní je běžně používán v konzervárenství a je klasifikován jako konzervant pod kódem E234 (Reis et al., 2012).

Nisin je tepelně stabilní bakteriocin s působením vůči mnoha druhům mléčných bakterií a grampozitivních bakterií, avšak menšího účinku nabývá při působení na gramnegativní bakterie, kvasinky a plísně (Lucera et al., 2012; Batiha et al., 2021). Zdá se být velmi účinný proti sporám *Clostridium botulinum* (Lucera et al., 2012). Jeho aktivita je závislá na pH; se snižujícím se pH baktericidní účinek vzrůstá (Singh, 2018). Je využíván zejména v masných a mléčných výrobcích (Singh, 2018; Batiha et al., 2021). Vcelku nevýhodou je existence rezistence některých druhů vůči jeho působení (Singh, 2018; Ribeiro et al., 2023). Tento fakt přispívá ke snaze nacházet stále nové látky využitelné pro konzervaci potravin.

Existují dva způsoby, kterými se aplikují antimikrobiální látky do potravin. U přímé metody je látka v přímém kontaktu s potravinou. Uplatňuje se zde sprejování potravin antimikrobiální látkou, mytí, nebo mixování s danou látkou. Naopak u nepřímé nedochází ke kontaktu látky s potravinou. V tomto případě je použito nějakého nosiče, který přeneseme antimikrobiální látku do produktu. Většinou tuto funkci plní obaly (Naqash et al., 2022). Zároveň se do potravin může přidat již samotný bakteriocin, nebo se potravina naočkuje mikroorganismy produkujícími dané antimikrobiální látky. Často se také kombinuje více konzervačních metod najednou (Ribeiro et al., 2023).

### *Jedlé povlaky*

Jako jedlé povlaky se označují připravené tenké vrstvy přirozeně se vyskytujících polymerů. Přidávají se do nich biologicky aktivní látky, které mají antimikrobiální a antioxidační účinky. Tyto povlaky jsou ekologičtější než syntetické materiály (Batiha et al., 2021).

Tyto povlaky jsou v podobě tenkých filmů položeny na povrch potravin a vytvářejí tak bariéru mezi prostředím a potravinou. Film může být aplikován na potravinu buď jejím

ponořením do roztoku nebo nasprejováním materiálu na produkt. Do jedlých povlaků se používají nisin, natamycin a pediocin (Naqash et al., 2022).

V porovnání s přímými metodami poskytuje tento způsob lokalizovaný efekt a zároveň nezasahuje do sensorických a organoleptických vlastností produktů (Batiha et al., 2021).

#### *Zapouzdřené antimikrobiální látky*

Jedlé povlaky jsou sice hojně používány, ale objevují se problémy s desorpcí od obalů, na které jsou aplikovány. To vede ke ztrátě antimikrobiální aktivity. Tento problém řeší zapouzdřené antimikrobiální látky. Aktivní látky se umístí do kapiček nebo kapslí vytvořených z biopolymerních materiálů. Zabrání se tak úniku antimikrobiální látky z obalu nebo povlaku a je zachována antimikrobiální aktivita (Naqash et al., 2021).

Takto bývá zapouzdřen nisin v lipozomech a po přidání do mléka prodlužuje lag fázi *L. monocytogenes*. Další aplikací účinnou v konzervaci sýra jsou nanočástice z chitosanu se zapouzdřeným nisinem (Naqash et al., 2021).

#### *Technologie překážek*

Jde o metodu konzervace, kdy se používají různé konzervační techniky najednou. Například se kombinuje použití antimikrobiálních látek a tepelného záhřevu. Použití bakteriocinů a vysokého hydrostatického tlaku má synergistický účinek při snižování obsahu mikroorganismů v potravině (Batiha et al., 2021). Samostatně použité konzervační metody nedosahují takového účinku, jako v kombinaci. Zvyšují bezpečnost potravin a zároveň zachovávají organoleptické vlastnosti (Ribeiro et al., 2023).



## 4 METODY STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY MIKROORGANISMŮ

Existují různé metody pro zjišťování přítomnosti antimikrobiální aktivity mikroorganismů. Nejčastěji používané jsou diluční a diskové difúzní metody. Dalšími používanými metodami jsou agar spot test, test překrytí agarem, cross streak metoda, radial streak metoda, spot on the lawn assay, Oxford cup metoda, agar well diffusion assay a vesicle – based colorimetric assay (Yadav a Tiwari, 2023). Dle Molina – Romero et al. (2017) mezi často využívané metody patří metoda dvojité vrstvy agaru a simultánní inhibiční analýza (Cesa-Luna, 2020). Inhibiční účinek bakteriocinů je závislý na čase, koncentraci a typu samotného bakteriocinu. Záleží také na tom, zda byly indikátorové mikroorganismy kultivovány na pevném nebo v kapalném médiu (Yadav a Tiwari, 2023).

Yadav et al. (2019) a Wannum et al. (2016) metody detekce inhibičního působení mikroorganismů rozdělují do dvou skupin; indikátor závislé a indikátor nezávislé metody. V případě indikátor závislých metod jsou používány indikátorové mikroorganismy, u indikátorově nezávislých metody tyto přítomny nejsou. U některých indikátorově závislých testů jsou antimikrobiální látky rozředěny v bujónu, kdežto v ostatních testech jsou rozptýleny v agaru a je tak potlačen růst indikátorových mikroorganismů (Wannum et al., 2016, Yadav et al., 2019, Yadav et al., 2023). Tyto metody jsou však náročné na provedení a hlavní nevýhoda zapojení indikátorových kmenů je možnost jejich rezistence k bakteriocinům producentů kmenů (Yadav et al., 2017; Yadav a Tiwari, 2021; Yadav a Tiwari, 2023).

Lze tak namísto výše zmíněných využít indikátorově nezávislou kolorimetrickou metodu. Byla použita k určení antimikrobiální aktivity, která je specifická pro membránově působící antimikrobiální peptidy (Yadav et al., 2017; Yadav a Tiwari, 2023). Tento test sestává z polydiacetylenových vezikul, které jsou syntetizovány za použití fosfolipidů a lipidů, například diacetylenových monomerů. Po vzájemném působení těchto monomerů s membránově působícími látkami dochází k výrazné barvené změně v důsledku narušení struktury vezikul (Wei et al., 2015; Yadav a Tiwari, 2023). Tato metoda byla použita ke zjištění antimikrobiálních peptidů jako jsou magainin, melittin, alamethicin, bakteriociny a halociny (Yadav et al., 2017; Yadav a Tiwari, 2021; Yadav a Tiwari, 2023).

## 4.1 Difúzní metody

### 4.1.1 Agar plug diffusion metoda

Bakteriocin produkující kmen je kultivován ve vhodném médiu, za vyhovujících podmínek. Buňky producenta vylučují bakteriocin v průběhu růstu a ten je rozptýlen v médiu. Kousek agaru s producentem je asepticky odřezán a umístěn na povrch agaru s indikátorovým mikroorganismem (Sarmiento-Vizcaino et al., 2021; Yadav a Tiwari, 2023). Misky jsou inkubovány za vhodných podmínek. Antimikrobiální látky se ze „zátky“ s producentem rozptýlí do agaru s indikátorovým mikroorganismem. Aktivita je patrná z přítomnosti inhibiční zóny kolem „zátky“ (Yadav a Tiwari, 2023).

### 4.1.2 Disková difúzní metoda

Soft agar (0,8 %) s indikátorovým mikroorganismem je převrstven na médium s 1,5 % agarem. V dalším kroku jsou na médium položeny disky (6 mm průměr) s naprodukovaným bakteriocinem ve vhodné koncentraci (Heatley, 1944; Dogra et al., 2022; Yadav a Tiwari, 2023). Plotny jsou inkubovány zóny vytvořené kolem disků poukazují na rozšíření bakteriocinu (Sarmiento-Vizcaino et al., 2021; Yadav a Tiwari, 2023).

### 4.1.3 Jamková difúzní metoda

Hojně používaná metoda pro zjištění mnoha mikrobiálních látek včetně bakteriocinů. Soft agar (0,8 %), obsahující indikátorový mikroorganismus, je převrstven přes 1,5 % agar. Následně jsou v médiu vyřezány 6mm jamky. Do těchto jamek je nadávkován bakteriocin a plotny jsou inkubovány při požadované teplotě. Zóna inhibice růstu je důkazem o antimikrobiální aktivitě bakteriocinu přítomného v dávkovaném supernatantu (de Almeida Junior et al., 2015; Balouiri et al., 2016; Bonhi and Imran, 2021; Yadav a Tiwari, 2023).

### 4.1.4 Oxford Cup/ Cylinder Plate metoda

Tato metoda může být použita pouze pro látky, které snadno difundují agarem. Jde o modifikaci cup a plate metody. Používají se skleněné nebo porcelánové válečky, na jednom konci hladké, s vnějšími zkosenými hranami. Takovéto válečky se naplní bakteriocinem (Schmidt and Moyer, 1944; Ma et al., 2020; Yadav a Tiwari, 2023). Přes noc nakultivovaná kultura indikátorového mikroorganismu je rozprostřena na povrch agaru a po utužení jsou na povrch umístěny sterilní Oxford cups (vnitřní průměr 6 mm, výška 8 mm) (Zhang et al., 2018; Cheng et al., 2022; Yadav a Tiwari, 2023). Do Oxford cups je přidán vhodný objem

supernatantu BMK (bakterie mléčného kvašení) a misky jsou inkubovány (Zhang et al., 2016; Ma et al., 2020; Yadav a Tiwari, 2023). Antibakteriální aktivita je dána průměrem inhibiční zóny vzniklé kolem Oxford cup (Dai et al., 2018; Yadav a Tiwari, 2023).

#### **4.1.5 Agar overlay assay, Agar spot test, Spot on lawn assay**

Přes noc narostené buňky producentského kmene jsou naočkovány ve formě spotů nebo vpichu do vhodného média a inkubovány za optimálních podmínek. Po uplynutí inkubace mohou být narostlé kolonie usmrceny parami chloroformu. Následně soft agar (0,8 %) obsahující indikátorový mikroorganismus je převrstven na pevné médium (Choeisoongnern et al., 2020; Bonhi and Imran, 2021; Yadav a Tiwari, 2023). Takto připravené misky jsou inkubovány při teplotách vhodných pro indikátorový mikroorganismus. Jasně inhibiční zóny kolem naspotovaných izolátů dávají důkaz o přítomnosti antimikrobiální aktivity (Choeisoongnern et al., 2020; Yadav a Tiwari, 2023).

#### **4.1.6 Simultánní inhibice (Simultaneous inhibition)**

V tomto případě spolu interagují oba bakteriální druhy v průběhu celého testu. Přes noc narostlý indikátorový kmen je na povrch agaru rozprostřen pomocí hokejky. Doprostřed takto naočkovaného agaru je naočkována kapka producentského kmene. Po uschnutí kapky jsou misky převráceny a uloženy ke kultivaci při teplotě vhodné pro daný mikroorganismus. Antimikrobiální aktivita je patrná na základě vytvořených inhibičních zón (Cesa-Luna, 2020).

#### **4.1.7 Metoda cross-streak**

Používaná k testování antimikrobiální aktivity bakteriocinů během růstu na pevném médiu (1,5 %). Čerstvě narostlé kolonie producentských mikroorganismů jsou aplikovány na médium uprostřed misky ve formě jedné čáry a inkubovány při podmínkách, které mikroorganismu umožní produkovat bakteriociny do média. Přes noc narostlé kolonie indikátorových mikroorganismů jsou naneseny kolmo k čáře producentského mikroorganismu. Každá z čar s indikátorovým mikroorganismem začíná blízko kraji misky a pokračuje k producentskému kmenu. Misky jsou kultivovány v podmínkách příhodných pro indikátorové mikroorganismy. Absence cílového kmene poblíž kmene producentského naznačuje inhibici. Velikost inhibice růstu je měřena v milimetrech (Sharma et al., 2013; Singh and Mishra, 2013; Chau et al., 2021; Yadav a Tiwari, 2023).

#### 4.1.8 Metoda radial-streak

Vzájemné působení mezi bakteriocin produkujícím kmenem a cílovými kmeny může být zkoumáno pomocí této metody. Čerstvě narostlé kolonie producenta jsou kličkou naneseny ve tvaru kruhu doprostřed misky. Po inkubaci misek jsou přes noc narostlé indikátorové mikroorganismy naneseny paprscitě, od hranice růstu producentského kmene uprostřed po okraje misky. Aktivita producentského kmene je určena z rozdílu průměru kruhu zóny růstu producenta a inhibiční zóny indikátorového mikroorganismu (Verdenelli et al., 2014; Kadyan et al., 2021; Yadav a Tiwari, 2023).

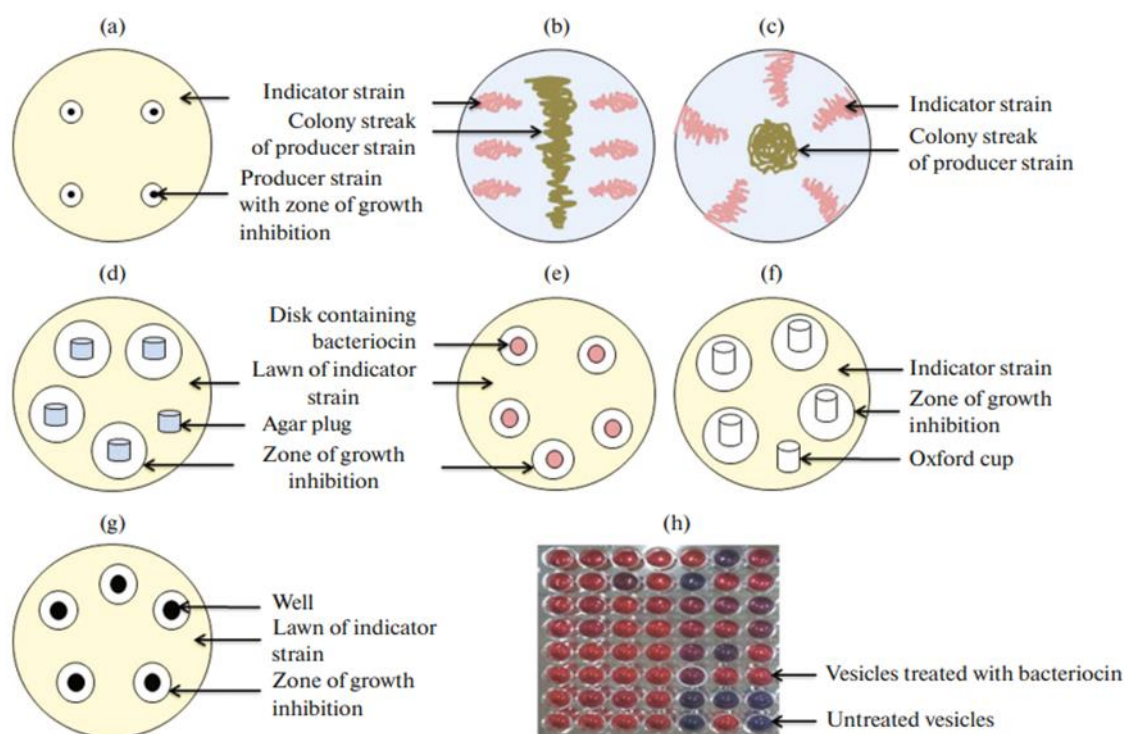


Fig. 1. A schematic diagram showing antimicrobial activity of bacteriocin-producing isolates of lactic acid bacteria using point-inoculation method (a), cross streak method (b), radial streak method (c), agar plug diffusion method (d), disk diffusion method (e), oxford cup method (f), agar well diffusion assay (g), and vesicles-based colorimetric assay (h).

Obrázek 1 Metody stanovení antimikrobiální aktivity (Yadav a Tiwari, 2023)

## 4.2 Diluční metody

### 4.2.1 Bujónová makrodiluce (Broth macrodilution method)

Je to jedna z nejjednodušších metod stanovení antimikrobiální aktivity (Gajic et al., 2022; Yadav a Tiwari, 2023). Jsou připravena dvojnásobná ředění antimikrobiálních látek v příslušném kapalném médiu a naočkována do média obsahujícího indikátorový kmen (Benkova et al., 2020; Yadav a Tiwari, 2023). Po řádné homogenizaci jsou zkumavky

inkubovány. Jako ukazatel mikrobiálního růstu funguje sledování zákalu ve zkumavkách (Balouiri et al., 2016; Yadav a Tiwari, 2023).

Nedostatkem tohoto testu je potřeba velkého množství činidel a prostoru. Další nevýhoda tkví v možnosti pochybení při přípravě roztoku bakteriocinu. Naopak výhodou je kvantitativní výsledek v podobě určení hodnoty minimální inhibiční koncentrace (Benkova et al., 2020; Yadav a Tiwari, 2023).

#### **4.2.2 Bujonová mikrodiluce (Broth microdilution method)**

Bujonová mikrodiluce je praktická a momentálně populární metoda. Provádí se za pomoci sterilní jednorázové polystyrenové mikrotitrační destičky, která obsahuje 96 nebo více jamek. Objem jedné jamky se pohybuje v rozmezí 100–200  $\mu\text{l}$ . Na jedné destičce je tak možná analýza 12 bakteriocinů při 8 ředěních (Gajic et al., 2022; Yadav a Tiwari, 2023). Bakteriocin je rozpuštěn v pufru a 100  $\mu\text{l}$  z každého ředění je přeneseno do jedné jamky v destičce. Následně je do jamek přidán indikátorový kmen. V každé jamce se tak nachází bakteriocin s indikátorovým kmenem. Po homogenizaci je destička uložena k inkubaci. Inhibice indikátoru je určena měřením optické hustoty zjišťovaných a slepých setů (Benkova et al., 2020; Yadav a Tiwari, 2023). Možným způsobem vyhodnocení inhibice růstu indikátorového kmene je, podle Arena et al. (2016) and Gomaa et al. (2017), spočtení procentuální hodnoty inhibice zjišťovaného a slepého vzorku (Yadav a Tiwari, 2023).

V porovnání s makrodiluční metodou je u této metody snadná reprodukovatelnost, potřeba menší množství vzorku, nižší cena a vyšší efektivita. Nevýhodou představuje obtížnost detekce kontaminace. Dalším negativním aspektem je obtížné rozpoznání životaschopnosti inokula a inhibičních účinků požitých rozpouštědel (Balouiri et al., 2016; Benkova et al., 2020; Yadav a Tiwari, 2023).

### **4.3 Mikroskopické metody**

Účinek bakteriocinů na cílové buňky může být pozorován také různými mikroskopickými technikami, například pomocí epifluorescenční a transmisní/skenovací elektronovou mikroskopií. Fluorescenční mikroskopie určuje počet živých a mrtvých buněk za použití propidium jodidu (PI) a 4',6-diamidin-2-fenylindolu (DAPI). Přes noc narostlá kultura indikátorového mikroorganismu je vystavena bakteriocinu. Buňky jsou posbírány centrifugací, dvakrát umyty solným fosfátovým pufrům a resuspendovány v tomtéž pufru. Následně jsou přidány PI a DAPI a inkubovány při 37 °C po dobu 30 minut. DAPI ukazuje

modrou barvu určující živé buňky a PI se projeví červeně znamenající mrtvé buňky (Yadav a Tiwari, 2023).

Pro skenovací elektronovou mikroskopii se nejprve buňky indikátorových mikroorganismů ošetří bakteriociny a následně jsou pozorovány pod mikroskopem. Přes noc narostená kultura indikátorového kmene je vystavena působení bakteriocinu po dobu 18 hodin. Buňky jsou následně posbírány a 4 hodiny fixovány Karnovskyho ustalovačem. Ustalovač je odstraněn centrifugací a poté je vzorek fixován oxidem osmičelým při teplotě 4 °C a po dobu jedné hodiny. Buňky jsou dehydrovány a vysušeny pomocí ethanolu a oxidu uhličitého. Pro pozorování musí být pokryty zlatem (Yadav a Tiwari, 2021; Yadav a Tiwari, 2023).

Transmisní elektronová mikroskopie vyžaduje stejné fixace, jaké jsou prováděny u skenovací elektronové mikroskopie. Buňky jsou opět dehydrovány a usušeny a vloženy do bílé pryskyřice při 55 °C, kde jsou uchovány 48 hodin. Tenké plátky jsou upevněny na měděné podložky a obarveny 2 % uranyl acetátem a citrátem olovnatým (Sheoran and Tiwari, 2019; Yadav a Tiwari, 2023). Mohou být pozorovány změny v buňkách a membránové integritě u buněk ošetřených bakteriociny (Qiao et al., 2021; Yadav a Tiwari, 2023).

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bylo zpracovat literární rešerši týkající se popisu analyzovaných fermentovaných potravin, charakteristiky antimikrobiálních látek, využití antimikrobiálních látek v potravinářství a metod stanovení antimikrobiální aktivity mikroorganismů.

V praktické části bylo cílem nejprve izolovat a identifikovat mikroorganismy z vybraných fermentovaných potravin. Následně posoudit antimikrobiální aktivitu izolovaných mikroorganismů a zjištěná data vyhodnotit, porovnat s výstupy literární rešerše a zformulovat závěry práce.



## 6 MATERIÁL

V této kapitole jsou uvedeny použité pomůcky, kultivační média, roztoky a přístroje.

### 6.1 Pomůcky a přístroje

Sáčky určené pro homogenizaci vzorků, zkumavky, zkumavky Eppendorf, hokejky, bakteriologické kličky jednorázové a žíhací, automatické pipety, sterilní špičky, Petriho misky, zásobní lahve, odměrné válce, kádinky, kapátka, podložní sklíčka, dávkovače, krabičky pro úschovu vzorků k zamražení.

Laboratorní předvážky, stomacher, biohazard box, vortex, autokláv, plynové kahany, optický mikroskop, fotoaparát, termostaty, lednice a mrazák.

### 6.2 Roztoky a chemikálie

- Destilovaná voda
- Imerzní olej
- Krystalová violet'
- Lugolův roztok
- Aceton
- Safranin
- Fyziologický roztok 0,85 %
- 96 % ethanol
- Glycerol 30 %
- 3 % roztok KOH

### 6.3 Kultivační média

Pro kultivaci mikroorganismů a mikrobiologický rozbor byla použita následující média:

- **Acetobacter agar s glukosou** (výrobce HiMedia, Bombai, Indie)

Toto médium se používá k úchově glukosa pozitivních druhů rodu *Acetobacter*

Složení (g/l):

Kvasničný extrakt (10)

Uhličitan vápenatý (10)

Glukosa (3)

Agar (15)

pH 7,4 ± 0,2 (při 25 °C)

- **Agar Type I** (výrobce HiMedia, Bombai, Indie)  
Slouží pro běžná bakteriologická kultivační média.  
Složení (g/l):  
Agar
- **BHI (Brain Heart Infusion)** (výrobce Merck KGaA, Darmstadt, Německo)  
Využívá se pro kultivaci náročných bakterií.  
Složení (g/l):  
Extrakt z mozkové a srdeční tkáně (27,5)  
D (+) glukóza (2)  
Chlorid sodný (5)  
Hydrogenfosforečnan disodný (bezvodý) (2,5)  
pH  $7,4 \pm 0,2$  (při 25 °C)
- **CHYGA (Chloramphenicol Yeast Glucose Agar)** (výrobce HiMedia, Bombai, Indie)  
Médium využívané pro selektivní izolaci kvasinek a plísní.  
Složení (g/l):  
Kvasničný extrakt (5)  
Dextróza (20)  
Chloramfenikol (0,10)  
Agar (14,90)  
pH  $6,6 \pm 0,2$  (při 25 °C)
- **MRS agar** (výrobce HiMedia, Bombai, Indie)  
Využití ke kultivaci rodů *Lactobacillus* a mléčných tyčinek.  
Složení (g/l):  
Proteosový pepton (10)  
Hovězí extrakt (10)  
Kvasničný extrakt (5)  
Dextrosa (glukóza) (20)  
Polysorbát 80 (tween 80) (1)  
Citran amonný (2)  
Octan sodný (5)  
Síran hořečnatý (0,10)  
Síran manganatý (0,05)

Hydrogenfosforečnan (di)draselný (2)

pH  $6,5 \pm 0,2$  (při 25 °C)

- **Mueller-Hinton agar** (výrobce HiMedia, Bombai, Indie)

Používá se ke stanovení minimální inhibiční koncentrace antimikrobiálních látek u aerobních bakterií.

Složení (g/l):

Hovězí masová infuze (300)

Enzymatický hydrolyzát kaseinu (17,5)

Škrob (1,5)

pH  $7,4 \pm 0,2$  (při 25 °C)

- **MYP agar** (výrobce HiMedia, Bombai, Indie)

Pro identifikaci a izolaci rodu *Bacillus* a patogenních stafylokoků.

Složení (g/l):

Peptická trávenina zvířecí tkáně (10)

Masový extrakt (1)

D-mannitol (10)

Chlorid sodný (10)

Fenolová červen (0,025)

Agar (12)

pH  $7,1 \pm 0,2$  (při 25 °C)

- **M17 agar** (výrobce Merck KGaA, Darmstadt, Německo)

Slouží ke kultivaci mléčných koků.

Složení (g/l):

Sójový pepton (5)

Masový pepton (2,5)

Kaseinový pepton (2,5)

Kvasničný extrakt (2,5)

Masový extrakt (5)

D (+) laktóza (5)

Kyselina askorbová (0,5)

Na –  $\beta$  – glycerolfosfát (19)

Síran hořečnatý (0,25)

pH  $7,2 \pm 0,2$  (při 25 °C)

- **Nutrient broth** (výrobce HiMedia, Bombai, Indie)  
Jde o obecně použitelné kultivační médium.  
Složení (g/l):  
Masový pepton (5)  
Hovězí extrakt (1,5)  
Kvasničný extrakt (1,5)  
Chlorid sodný (5)  
pH  $7,4 \pm 0,2$  (při 25 °C)
  
- **PCA (Plate Count Agar)** (výrobce HiMedia, Bombai, Indie)  
Slouží ke stanovení celkového počtu mikroorganismů  
Složení (g/l):  
Enzymatický hydrolyzát kaseinu (5)  
Kvasničný extrakt (2,5)  
Glukóza (1)  
Agar (15)  
pH  $7,0 \pm 0,2$  (při 25 °C)
  
- **Paenibacillus polymyxa agar**  
Pro stanovení *Paenibacillus polymyxa*.  
Složení (g/l):  
Kvasničný extrakt (5)  
Pepton (5)  
Škrob (10)  
Agar (20)
  
- **Slanetz a Bartley médium** (výrobce HiMedia, Bombai, Indie)  
Používá se pro detekci a stanovení počtu *Enterococcus* spp.  
Složení (g/l):  
Tryptosa (20)  
Kvasničný extrakt (5)  
Dextrosa (2)  
Hydrogenfosforečnan (di)sodný (4)  
Azid sodný (0,4)  
Trifenyttetrazolium chlorid (15)

Agar (15)

pH  $7,2 \pm 0,2$  (při 25 °C)

### 6.3.1 Příprava kultivačních médií

V případě bujónu bylo vždy dané množství média dle informací od výrobce na obalu naváženo na laboratorních vahách do skleněných zásobních lahví. Toto médium bylo zalito daným množstvím destilované vody a důkladně rozpuštěno. Následně byl pomocí dávkovače, opláchnutého v destilované vodě, převeden požadovaný objem do zkumavek ve stojanu. Po naplnění byly zkumavky uzavřeny víčky a vloženy do autoklávu ke sterilizaci.

Příprava kultivačních médií pro rozlití do misek probíhala podobně jako výše, avšak ke kultivačnímu médiu byl ještě navážen agar v případě, že již nebyl obsažen přímo ve směsi média. Opět byla přidána destilovaná voda a provedeno rozpuštění. Zavřená zásobní lahev byla vysterilizována v autoklávu. Po proběhnutí procesu byla lahev zchlazena, ale jen do takové míry, aby nedocházelo k tuhnutí agaru v lahvi. Následně bylo médium v biohazard boxu rozlito do sterilních plastových Petriho misek. Po utužení média byly misky uloženy do chladicí skříně a zde skladovány do okamžiku použití.

## 7 METODIKA

Byl proveden mikrobiologický rozbor následujících potravin:

- Tofu
- Tempeh
- Sójová omáčka
- Miso
- Kombucha
- Kimchi
- Fermentáda

Vzorky potravin byly koupeny v běžné obchodní síti. Do sáčku určeného pro homogenizaci bylo odebráno 5 g vzorku potravin a přidáno 45 ml sterilního fyziologického roztoku, který byl použit pro získání požadovaného ředění. Sáček se vzorkem byl vložen do Stomacheru, kde došlo k homogenizaci obsahu po dobu 2 minut. Následně bylo provedeno desítkové ředění, kdy zhomogenizovaný obsah sáčku představoval ředění  $10^{-1}$ . Z tohoto ředění bylo odebráno 0,5 ml a přeneseno do sterilní zkumavky a doplněno 4,5 ml fyziologického roztoku, tak vzniklo ředění  $10^{-2}$ . Ředění  $10^{-3}$  vzniklo odebráním 0,5 ml vzorku ze zkumavky s  $10^{-2}$  ředěním a opět přidáno 4,5 ml fyziologického roztoku. Pro kapalné vzorky (kombucha, fermentáda) byl první vzorek koncentrovaný a následně bylo provedeno ředění  $10^{-1}$  a  $10^{-2}$ . U zbylých, pevných vzorků bylo provedeno ředění od  $10^{-1}$  po  $10^{-3}$ .

Požadované skupiny mikroorganismů byly stanoveny naočkováním 0,1 ml příslušného ředění na misky s danou půdou. Vždy byly paralelně očkované 2 Petriho misky. Ke stanovení celkového počtu mikroorganismů byla použita půda PCA, mléčné koky byly stanovovány na půdě M17, mléčné tyčinky na MRS, enterokoky na médiu Slanetz – Bartley, bacily na půdě MYP. CHYGA sloužila pro izolaci kvasinek, Acetate agar pro kultivaci bakterií rodu *Acetobacter*, dále byly použito médium *Paenibacillus Polymyxa* agar. Po inokulaci byly misky vloženy k inkubaci na 48 hodin. Vzorky na médiu PCA byly uloženy do termostatu 30 °C, vzorky na médiu CHYGA, byly vloženy na psychrofilní kultivaci, zbylé vzorky byly uloženy ke kultivaci při 37 °C.

Na každé misce byly vytipovány kolonie, dostatečné od sebe vzdálené, které byly následně přeočkovány křížovým roztěrem na misku s příslušným médiem. Takto naočkované misky byly uloženy ke kultivaci při příslušných teplotách (viz výše). Po úspěšné kultivaci a provedení testů z izolátů na selektivních půdách, byly vzorky uchovávány na univerzálním médiu.

## 7.1 Předběžná identifikace získaných izolátů

U izolátů byly hodnoceny nejprve jejich makroskopické znaky. Dále bylo provedeno barvení dle Grama, které slouží k rozlišení grampozitivních a gramnegativních bakterií a také kvasinek. Zároveň lze na základě tohoto testu určit tvar buňky mikroorganismů (mikroskopické znaky). V potravinách by měly být přítomny zejména grampozitivní bakterie a v případě fermentovaných potravin také některé druhy kvasinek. Gramovo barvení bylo doplněno KOH testem, kterým se odliší bakterie grampozitivní a gramnegativní. Test je založen na rozdílném složení buněčných stěn jednotlivých druhů bakterií. Dalším testem byl katalasa test, který ověřuje (ne)přítomnost enzymu katalasa u zkoumaných mikroorganismů.

### 7.1.1 Gramovo barvení

Jde o jednu ze základních mikrobiologických metod. Poprvé bylo toto barvení představeno roku 1882 primárně pro identifikaci organismů způsobujících pneumonii. Umožňuje určit, zda se jedná o bakterie grampozitivní ( $G^+$ ) nebo gramnegativní ( $G^-$ ). Barvení je založeno na principu různého složení buněčné stěny a podle toho její schopnosti zakomponovat do sebe barvivo. Buněčná stěna  $G^+$  bakterií obsahuje větší vrstvu peptidoglykanu, zatímco stěna  $G^-$  bakterií obsahuje více lipidů. Nejprve oba druhy bakterií přijmou krystalovou violet, avšak po použití rozpouštědla je lipidová vrstva  $G^-$  bakterií rozložena, tím se ztrácí barva. Naopak u  $G^+$  bakterií jsou důsledkem rozpouštědla uzavřeny póry a je tak zabráněno úniku komplexu violeti s jodem a  $G^+$  bakterie zůstávají zbarvené. Nakonec jsou vzorky barveny fuchsinem, který odbarveným  $G^-$  bakteriím dodá konečnou růžovou barvu. Místo fuchsinu lze použít také safranin (Tripathi a Sapra, 2024).

#### Postup:

Z křížového roztěru bylo sterilně odebrána 1 kolonie a přenesena do kapky destilované vody na podložním skle. Inokulum bylo v kapce dobře rozptýleno a ponecháno na zaschnutí. Následně byl nátěr fixován nad plamenem. Takto připravený preparát byl převrstven krystalovou violetí tak, aby byla pokryta celá plocha nátěru a nechalo se působit 60 s. Následovalo opláchnutí destilovanou vodou a další převrstvení Lugolovým roztokem po dobu 30 s. Dalším krokem bylo opláchnutí preparátu acetonem a závěrečné barvení safraninem v průběhu 60 s. Nakonec byl preparát opláchnut destilovanou vodou a ponechán k uschnutí.

Barvené preparáty byly vyhodnocovány mikroskopicky při zvětšení 1000x za použití imerzního oleje. Stejný postup byl opakován se všemi vzorky, provedena fotodokumentace a vzorky roztrženy.

### 7.1.2 KOH test

Podobně jako u Gramova barvení, je KOH test založen na rozdílech v buněčné stěně bakterií. V přítomnosti hydroxidu draselného je stěna G<sup>-</sup> bakterií rozložena, to způsobí lýzi buňky, a tím je uvolněn její obsah, včetně DNA. Výsledkem je uvolnění viskózního materiálu chromozomů. Bakteriální suspenze je tak hustá a vláknitá při dotyku kličkou. Naopak na G<sup>+</sup> bakterie nemá KOH žádný účinek, neboť tyto mají silnější vrstvu peptidoglykanu, a tudíž nedojde k lýzi buňky a vylití obsahu (Potassium Hydroxide Test – Principle, Procedure, Uses and Interpretation, 2022)

#### Postup:

Na podložní sklíčko byla nanášena kapka 3% roztoku KOH. Do ní byla pomocí sterilní kličky nanášeno inokulum dané kultury a důkladně rozmícháno. Následně byla klička oddalována od suspenze směrem vzhůru a bylo pozorováno, zda se tvořilo viskózní vlákno. Pokud k tomuto jevu dohází, je výsledek označován jako pozitivní a bakterie může být klasifikována jako gramnegativní a naopak. Takto bylo postupováno pro všechny izoláty.

### 7.1.3 Katalasa test

Katalasa je enzym produkovaný některými bakteriemi, který je ochraňuje před peroxidem vodíku. Bakterie s aerobním metabolismem produkují peroxid vodíku. Ten je pro bakterie toxický, může způsobit poškození DNA, lipidů a proteinů. Enzym rozloží peroxid na vodu a kyslík a dochází k uvolňování bublinek kyslíku. Bakterie produkují katalázu jen v případě, že pro její produkci mají gen. Bakterie bez tohoto genu, nebudou enzym produkovat a výsledek bude negativní. Většina aerobních a fakultativně anaerobních bakterií katalázu produkuje (Hartline, 2024).

#### Postup:

Na podložní sklo byla kápnuta kapka 3% roztoku peroxidu vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Následně byla vnesena daná bakteriální kultura a rozmíchána. Pozitivní výsledek nastává v případě, že dochází k jasnému uvolňování bublinek kyslíku. Pokud suspenze zůstává beze změny, jde o výsledek negativní.

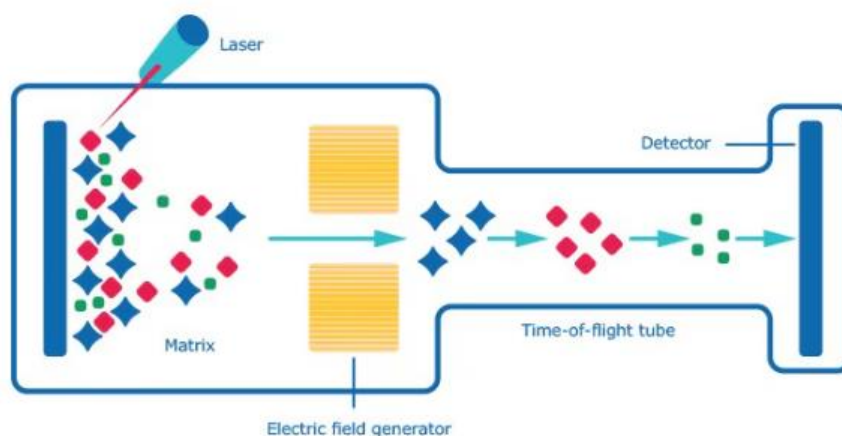


### 7.1.4 Zamražení izolátů

Kolonie, se kterými bylo pracováno, byly uchovány zmrazením. Izoláty byly naočkovány do univerzálního bujónu Nutrient broth a kultivovány v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Po dostatečném nárůstu bylo napipetováno 750 µl izolátu do sterilních Eppendorf zkumavek, a přidáno 750 µl 30 % glycerolu. Takto připravené zkumavky byly uchovávány v kryokrabičkách v mrazicím boxu při -20 °C. Z každé kolonie byly připraveny 2 zkumavky pro zamrazení.

## 7.2 Identifikace MALDI – TOF

MALDI – TOF MS (Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry) byla zavedena roku 1985 dvěma německými vědci; Hillenkampem a Karasem. Laserový paprsek je vyslán na cílové místo s imobilizovaným vzorkem a dochází k desorpci a ionizaci analytu (viz Obrázek 2). Výsledkem jsou ionty s vysokou hmotností. Aby mohlo dojít k ionizaci, musí být matrice schopná absorbovat aplikovanou vlnovou délku. Tyto ionty jsou urychlovány a postupují směrem k detektoru. Zde je měřen čas letu a intenzita jednotlivých iontů. Těžší ionty putují k detektoru delší dobu, zatímco lehčí ionty urazí tutéž vzdálenost rychleji (Hosseini a Martinez – Chapa, 2017).



Obrázek 2 Schéma MALDI – TOF (Mass Spectrometry)

Získaná hmotnostní spektra jsou pro každý mikroorganismus charakteristická. Jsou porovnávány proteinové profily analyzovaných vzorků s referenční databází MALDI biotyper.

### Postup (příprava izolátů):

Zamražené vzorky byly naočkovány do masopeptonového bujónu (Nutrient broth) a ponechány ke kultivaci při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Suspenze byla důkladně promíchána a přenesena křížovým roztěrem na Petriho misky s připraveným agarem. Opět

byly misky vloženy do termostatu a inkubovány při stejných podmínkách jako v případě bujónu. Do Eppendorfovy zkumavky bylo napipetováno 300 µl destilované vody, do které bylo sterilní kličkou přeneseno dostatečné množství biomasy, odebrané z misky s křížovým roztěrem. Následně bylo přidáno 900 µl 96 % ethanolu a směs byla promíchána. Takto připravené vzorky byly uchovány v kryokrabičkách v mrazícím boxu při teplotě -18 °C do doby, než byly převezeny k analýze hmotnostní spektrometrií MALDI – TOF v laboratoři AgroBioTech v Nitře.

### 7.3 Ověření produkce antimikrobiálních látek

Finálním krokem bylo provedení screeningu antimikrobiální aktivity u kmenů izolovaných z fermentovaných potravin. Celkem bylo testováno 190 izolátů na vybrané 4 indikátorové mikroorganismy.

#### 7.3.1 Agar spot test

Postup testu byl sestaven na základě odborné publikace autorky Fijan et al. (2016) a byly provedeny určité modifikace.

##### **Postup:**

##### *1. Předkultivace izolátů*

Nejprve byly vzorky rozmrazeny, promíchány a 100 µl příslušné kultury bylo naočkováno do 5 ml bujónu ve zkumavkách. Kultury byly umístěny ke kultivaci při 37 °C po dobu 18 hodin. Následovalo dávkování kultury na misky s MH (Mueller-Hinton agar) agarem.

##### *2. Dávkování spotů na misky*

V předchozím kroku přes noc nakultivované kultury byly v množství 1 µl nadávkovány na misky s 1,2 % MH agarem. Na jednu misku bylo umístěno celkem 7 spotů příslušných bakteriálních izolátů (2–3–2) nebo 4 spoty tak, aby nemohlo dojít ke vzájemné interakci spotů. Takto připravené misky byly uloženy do termostatu pro kultivaci 24 hodin při teplotě 37 °C.

##### *3. Příprava soft agaru*

Indikátorové mikroorganismy byly, den před samotným přeléváním, přeneseny z křížových roztěrů do zkumavek s 5 ml bujónu BHI. Tyto zkumavky se kultivovaly po dobu přibližně 18 hodin při teplotě 37 °C. Soft agar (0,8 %) byl po dostatečném zchlazení naočkován indikátorovým mikroorganismem. Chlazení probíhalo pod studenou tekoucí vodou na takovou teplotu, aby nedošlo k usmrcení indikátorových mikroorganismů. Následně byly do soft agaru přeneseny 2 ml příslušné zhomogenizované indikátorové kultury.

#### 4. Usmrcování spotů UV zářením a chloroformem

Po 24hodinové kultivaci byly misky vytaženy z termostatu. Pro každý indikátorový mikroorganismus byly připraveny 2 misky se shodnými spoty, aby mohlo být provedeno usmrcení jak UV zářením, tak chloroformem, pro každou misku zvlášť.

První verze misek byla vystavena působení UV záření po dobu 30 minut. Petriho misky byly umístěny do biohazard boxu bez vík a bylo zpuštěno UV záření. Po uplynutí doby byly misky uzavřeny.

U druhé verze misek probíhalo usmrcení pomocí chloroformu. Kruhový filtrační papír o poloměru 3,5 cm byl umístěn do vík skleněných Petriho misek. Na papír bylo v biohazard boxu nadávkováno 0,7 ml chloroformu a na víka rychle přemístěny misky. Co nejrychleji byly misky umístěny dnem nahoru mimo box a vystaveny parám chloroformu po 30 minut. Po tomto čase byly misky přesunuty zpět do biohazard boxu a zbaveny filtračních papírů. Otevřené byly v boxu ponechány cca 5 minut pro vyprcháání zbytkových chloroformových par.

#### 5. Převrstvení soft agarem

Soft agar s indikátorovým mikroorganismem byl důkladně promíchán a následovalo přelévání. Každá miska byla převrstvena 8 ml soft agaru s nadávkovanou indikátorovou kulturou. Cílem bylo rovnoměrné převrstvení celé plochy misky. Po utužení soft agaru byly misky kultivovány 24 hodin při 37 °C.

*Použité indikátorové mikroorganismy:*

- **Gramnegativní bakterie**
  - c) *Escherichia coli*
  - d) *Salmonella Typhimurium*
- **Grampozitivní bakterie**
  - c) *Bacillus cereus*
  - d) *Staphylococcus aureus*
- **Pozitivní kontrola**
  - a) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 671 (producent nisinu) a vůči němu citlivý kmen *Lactiplantibacillus plantarum* P96

#### 6. Odečítání inhibičních zón

Po skončení inkubace byl pozorován vznik inhibičních zón kolem spotů. Za pozitivní výsledek byla považována zóna o velikosti minimálně 1 mm. U zón byl měřen a zaznamenán na základě metodiky dle CDS poloměr mezikruží (Annular radius) v mm.

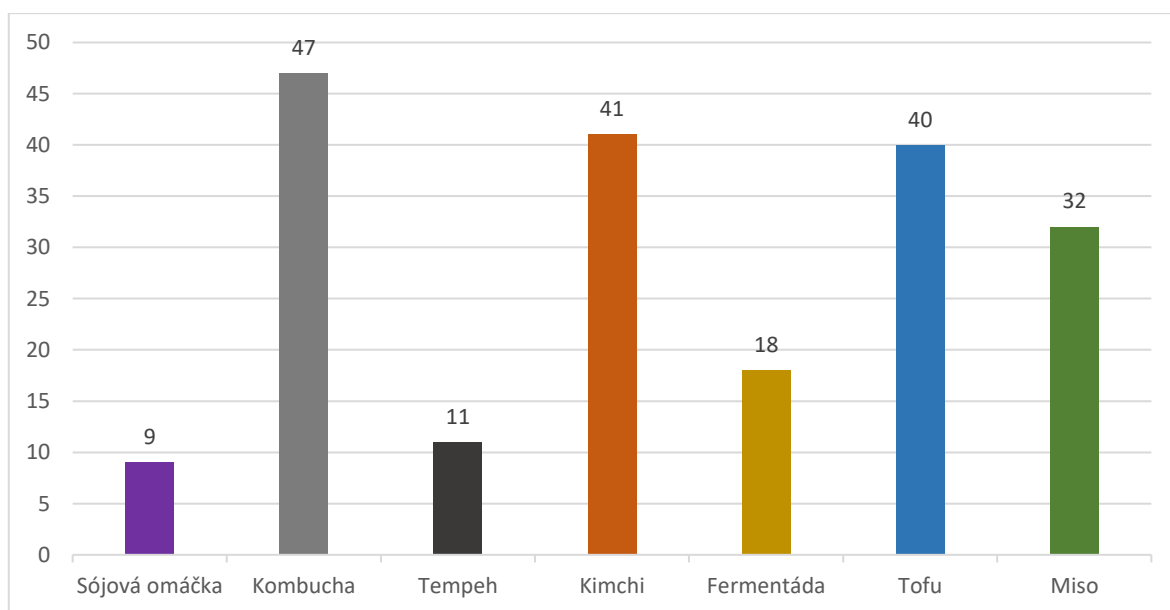
## 8 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této části budou představeny získané výsledky.

### 8.1 Výsledky předběžné identifikace získaných izolátů

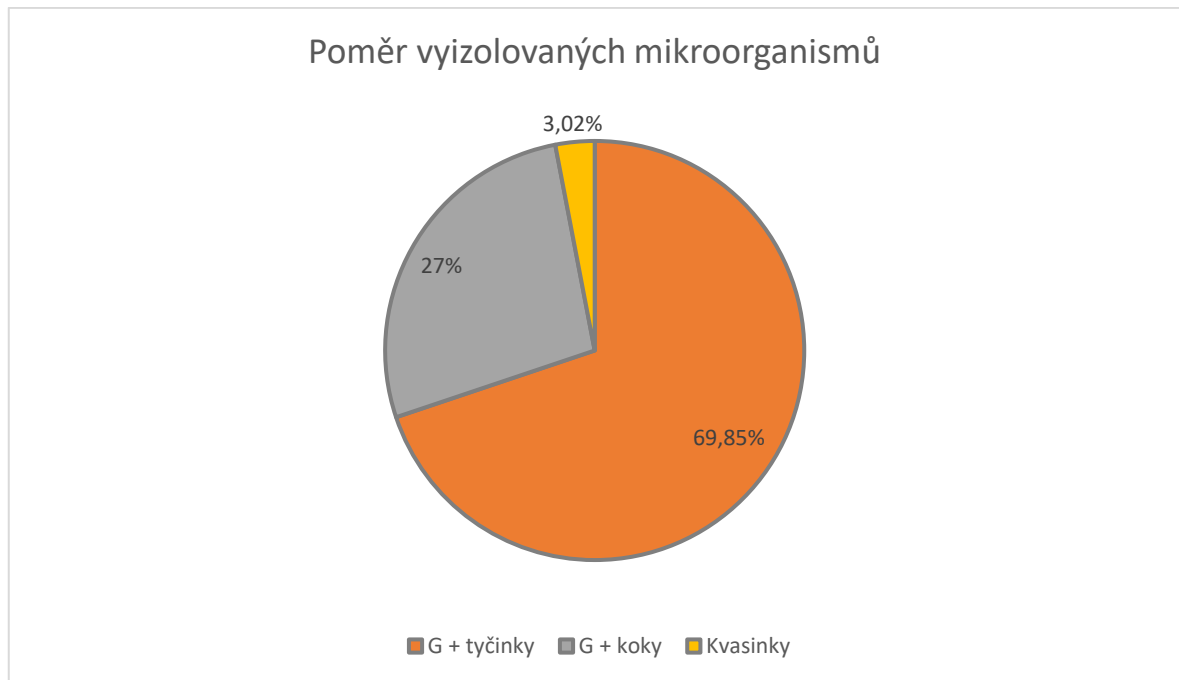
Pro identifikaci a typizaci mikroorganismů byly provedeny některé mikrobiologické a biochemické testy. Výsledky těchto testů jsou z důvodu větší přehlednosti přiloženy v Příloze 1. Celkem bylo pomocí metody MALDI – TOF identifikováno 92 izolátů z celkového počtu 199. Neúspěšná identifikace mohla být způsobena nevhodnou koncentrací daného izolátu. Faktory ovlivňující úspěšnost identifikace dle Popović et al. (2023) zahrnují způsob přípravy vzorků, kultivační podmínky a fáze růstu, ve které se identifikované mikroorganismy nacházejí.

Obrázek 3 graficky znázorňuje celkový počet získaných mikroorganismů z jednotlivých potravin. Celkem bylo získáno 199 mikroorganismů. Devět kmenů bylo izolováno ze sójové omáčky, 47 z kombucha, 11 z tempeh, 41 z kimchi, 18 z fermentáda, 40 z tofu a 32 kmenů z miso pasty.



Obrázek 3 Celkové počty mikroorganismů vyizolovaných z testovaných potravin

Na Obrázku 4 je v grafu možné pozorovat zastoupení jednotlivých mikroorganismů na základě jejich morfologie. Celkem byly zastoupeny 2 typy mikroorganismů – bakterie a kvasinky. Bakterie pak vykazovaly morfologii grampozitivních koků nebo tyčinek. Nejvíce byly zastoupeny grampozitivní tyčinky, a to v počtu 139 izolátů, což odpovídá necelým 70 %. Grampozitivních koků bylo 54, což činí 27 %. Nejméně bylo přítomno kvasinek, ty byly zastoupeny v počtu 6 kmenů a tvořily tak 3 % z celkového počtu 199 izolátů.



Obrázek 4 Morfologické rozdělení izolátů

Sójová omáčka je hnědým dochucovadlem s charakteristickou chutí umami. Získává se komplexní fermentací sóji a pšenice (Zhang et al., 2023). Ze sójové omáčky byly izolovány převážně grampozitivní tyčinky. Identifikací bylo zjištěno, že se jedná o *Bacillus cereus*, který byl vyizolován na půdě PCA, *Bacillus altitudinis*, kultivovaný na totožném médiu. Výskyt těchto mikroorganismů ve fermentovaných produktech ze sóji je běžný a zlepšují kvalitu těchto výrobků (Barus et. al., 2017). Kromě grampozitivních tyčinek byly získány ze vzorku sóji i 3 izoláty grampozitivních koků, jejichž identifikovaným zástupcem je *Staphylococcus epidermidis*. Nejedná se o startovací kulturu, pravděpodobně jde o kontaminaci. Zhang et al. (2023) ve své práci uvádí jako kontaminující bakterii při fermentaci sójové omáčky *Staphylococcus hominis*.

Kombucha je výživný nápoj, kde hlavní roli hraje aerobní statická fermentace černého, zeleného nebo oolong čaje slazeného sacharosou. Pro fermentaci je použita symbiotická kultura bakterií a kvasinek. Mezi bakterie, které se běžně vyskytují v kombuchách, se řadí bakterie octového kvašení patřící do rodů *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* a *Gluconobacter* a také bakterie mléčného kvašení. Většina kvasinek spojených s kombuchou patří mezi druhy rodu *Saccharomyces* (Laureys et al., 2020; Sanwal et al., 2023). Po inokulaci a kultivaci vzorku kombuchy na půdě PCA bylo izolováno celkem 10 kmenů, kde 9 z nich tvořily grampozitivní tyčinky. Identifikací byly dokázáni zástupci rodu *Bacillus*, konkrétně *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis* a *Bacillus altitudinis*. Pět

kmenů kultivovaných na médiu CHYGA tvořily 4 grampozitivní tyčinky a jedna kvasinka, která byla následně identifikována jako *Saccharomyces cerevisiae*. Z půdy MRS byly izolovány grampozitivní tyčinky a dvě kvasinky, jedna byla identifikována na stejný druh jako na předchozím médiu. Opět byl přítomen zástupce *Bacillus amyloliquefaciens*, a také *Bacillus cereus*. Na médiu M17 byly přítomny grampozitivní tyčinky, jen jeden kmen tvořil grampozitivní koky. Kvasinka *Lachancea fermentati* byla izolována z kolonie o velikosti 10 mm na médiu AA. Zbylé kmeny na tomto médiu tvořily grampozitivní tyčinky.

Pro tempeh jsou typickými mikroorganismy bakterie mléčného kvašení, zejména laktobacily a enterokoky, kvasinky a plísně používané jako startérové kultury. V této práci bylo z tempehu izolováno celkem 5 grampozitivních tyčinek, přičemž jeden kmen byl identifikován jako *Bacillus amyloliquefaciens* spp. *plantarum*. Barus et al. (2017) ve své studii analyzovali 24 čerstvých tempehů z Jakarty, Bogoru a Tangerangu. Celkem získali 52 izolátů. Na základě výsledků 16S ribozomální RNA bylo všech 52 izolátů identifikováno jako *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens*, *Brevibacillus brevis* a *Bacillus* sp. Také Lee a Kim (2012) izolovali *Bacillus amyloliquefaciens* z Meju, sójové fermentované potraviny. Dále bylo z tempehu získáno 6 grampozitivních koků, mezi ně byly 2 kmeny identifikovány jako *S. hominis* a *S. epidermidis*.

Tradiční korejskou potravinou je kimchi. Vzniká fermentací různých surovin, jako jsou například zelenina, sůl, fermentovaná rybí omáčka (Mun et al., 2024). Nejvíce mikroorganismů se při jejich izolaci z kimchi podařilo získat na médiu PCA. Převažovaly grampozitivní koky se svým zástupcem z rodu *Staphylococcus*. Některé grampozitivní tyčinky byly identifikovány jako *Bacillus safensis*, *Bacillus licheniformis* a *Bacillus amyloliquefaciens*. Z půdy M17 byly identifikovány izoláty s velikostí kolonie 7 a 9 mm, jednalo se o *Bacillus pumilus* a *Bacillus altitudinis*. Největší kolonie izolovaná z této potraviny dosahovala velikosti 20 mm a jednalo se o grampozitivní tyčinku *Bacillus amyloliquefaciens* spp. *plantarum*. Naopak nejmenší kolonie dosahovala velikosti 0,5 mm a jednalo se o *Staphylococcus hominis*. Hwang et al. (2020) ve své studii prokázali vhodnost využití *Staphylococcus hominis* subsp. *hominis* WiKim0113 jako startérové kultury při výrobě kimchi.

Pro izolaci mikroorganismů ze svrchně kvašeného nealkoholického nápoje (Fermentáda) byly zvoleny půdy M17 a PCA. Z těchto půd bylo izolováno celkem 6 grampozitivních koků a 12 grampozitivních tyčinek. Tři kmeny byly identifikovány jako *S. hominis* a 3 kmeny

jako *Bacillus altitudinis*, *Bacillus cereus* a *Bacillus* spp. Vzhledem k tomu, že se jedná o kvašený nápoj a k jeho výrobě se používají kvasinky, dala by se mezi izoláty očekávat jejich přítomnost. Kvasinky se však nepodařilo izolovat.

Tradiční asijská fermentovaná potravina tofu obsahuje esenciální aminokyseliny, některé vitamíny skupiny B, vápník, železo a draslík (Rossi et al., 2016). Osmdesát procent izolátů získaných z tofu byly grampozitivní tyčinky (32 z celkového počtu 40 izolátů). Nejvíce mikroorganismů bylo vyizolováno po kultivaci na médiu MYP, který slouží pro kultivaci mikroorganismů rodu *Bacillus*. Zde se podařilo z tohoto média získat mikroorganismus *Bacillus altitudinis* s velikostí kolonie 8 mm, s améboidním tvarem, úponkovitými výběžky a plochým, lesklým povrchem. Dále byly 4 kmeny identifikovány jako *Bacillus amyloliquefaciens* a 1 kmen jako *B. cereus*. Mezi grampozitivní koky byly identifikovány kmeny *Staphylococcus epidermidis* a *S. hominis*.

Miso je pasta pocházející z Japonska. Tradičně se vyrábí fermentací sójových bobů, soli a koji kultury. Z celkového počtu 32 izolátů získaných z potraviny miso tvoří 68,8 % grampozitivní tyčinky (22 izolátů). Osm izolátů (25 %) jsou grampozitivní koky. Ze vzorku misa byly izolovány také 2 kvasinky. Z izolovaných grampozitivních tyčinek se podařilo identifikovat 3 druhy rodu *Bacillus*; *Bacillus cereus* (3 izoláty), *Bacillus safensis* (1 izolát), a *Bacillus amyloliquefaciens* (4 izoláty). Onda et al. (2023) ve své práci uvedli přítomnost *Bacillus amyloliquefaciens* ve vzorcích izolovaných z misa.

## 8.2 Antimikrobiální aktivita

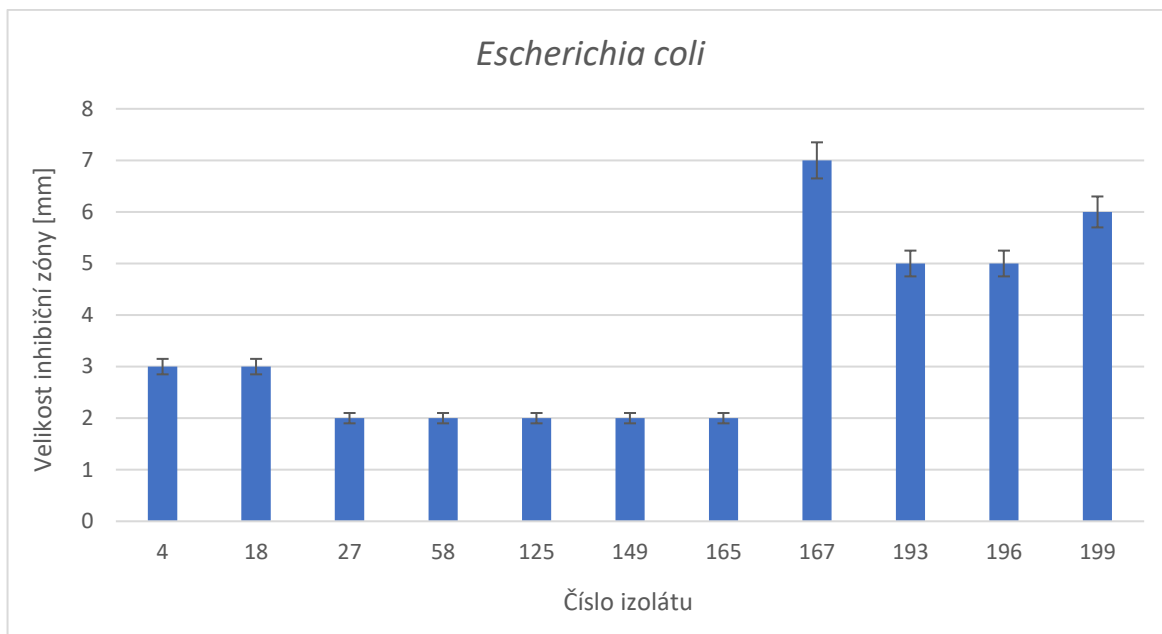
Antimikrobiální aktivita byla izolátů byla sledována vůči 4 indikátorovým mikroorganismům. Pro tento experiment byl použit agar spot test. Způsob jeho provedení a použité indikátorové mikroorganismy jsou shrnuty v podkapitole 7.3.1. Za pozitivní výsledek byl považován vznik inhibiční zóny o velikosti alespoň 1 mm kolem naneseného izolátu. Výsledky jsou zaznamenány ve formě poloměrů mezikruží v mm (Annular radius). Pro každý indikátorový mikroorganismus (kromě *Escherichia coli*) a způsob usmrcení bylo vybráno 20 izolátů s největšími poloměry mezikruží inhibičních zón. Tento postup byl zvolen z důvodu vysokého počtu pozitivních výsledků. Na *Escherichia coli* vykazovalo pouze 11 izolátů inhibiční účinek.

### 8.2.1 Gramnegativní indikátorové mikroorganismy

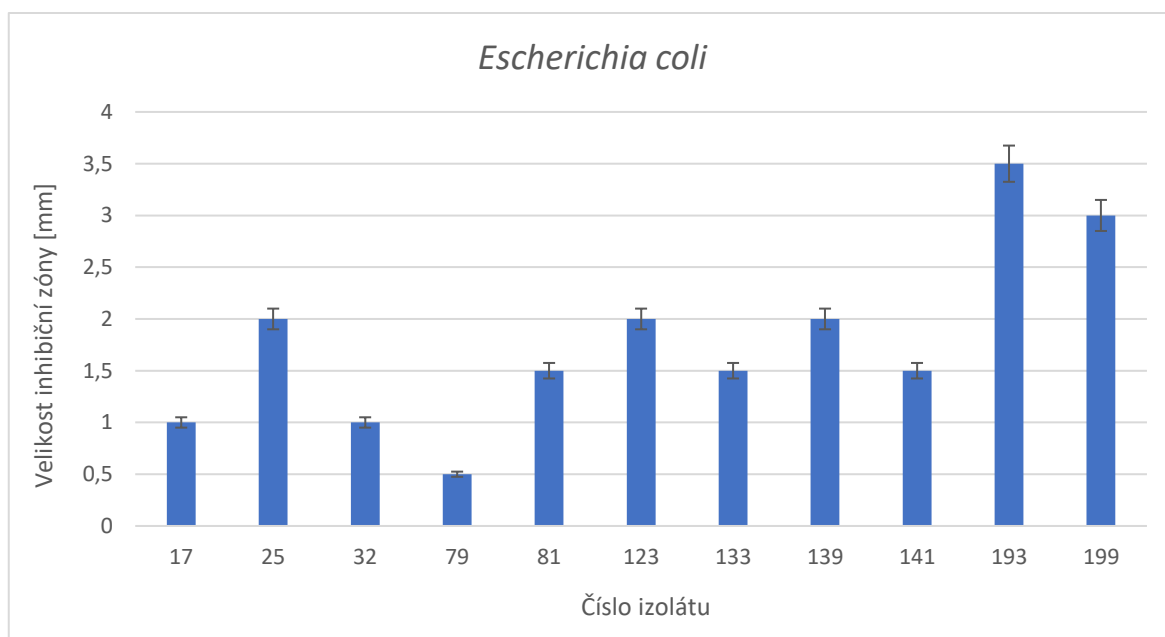
Prvním ze zvolených gramnegativních indikátorových mikroorganismů byl kmen *Escherichia coli*. Z celkových 199 testovaných kmenů inhibiční účinek vůči *E. coli* vykazovalo pouze 11 kmenů. Z obou grafů na obrázku 5 a 6 je patrné, že po usmrcení buněk UV zářením a chloroformem byla u každého způsobu antimikrobiální aktivita zaznamenána u jiných kmenů. Po usmrcení buněk UV zářením antimikrobiální aktivitu vykazovaly kmeny 4, 18, 27, 58, 125, 149, 165, 167, 193, 196 a 199. Po usmrcení buněk chloroformem zase antimikrobiální aktivitu vykazovaly kmeny 17, 25, 32, 79, 81, 123, 133, 139, 141, 193 a 199. Výjimkou jsou izoláty č. 193 a 199, které vykazovaly inhibiční účinek na *E. coli* po působení obou způsobů usmrcení. Kolem obou izolátů se v případě usmrcování buněk UV zářením vytvořila inhibiční zóna s větším průměrem mezikruží než v případě chloroformu. Avšak při působení chloroformu byla zóna grampozitivní tyčinky (193) větší než zóna kvasinky (199) po působení UV záření. Dále je možné pozorovat, že inhibiční zóny kolem chloroformem usmrcených kmenů dosahovaly obecně menších velikostí v porovnání s UV zářením, nicméně nejednalo se o totožné izoláty. Největší inhibiční zónu (7 mm poloměr mezikruží) vytvořil izolát č. 167 – *Bacillus cereus*, izolovaný z miso pasty, druhou největší pak kvasinka – izolát č. 199, s velikostí poloměru mezikruží 6 mm.

Po usmrcení buněk producentických kmenů pomocí UV záření nejvíce kmenů s antimikrobiální aktivitou pocházelo z miso pasty (izoláty číslo 149, 165, 167, 193, 196 a 199). V převážné většině se jednalo o grampozitivní tyčinky. Jediným případem, kdy izolát vykazoval antimikrobiální aktivitu a zároveň se jednalo o grampozitivní kok, byl izolát s číslem 165, který byl identifikován jako *Staphylococcus epidermidis*. V jednom případě inhibičně působil i izolát kvasinky (izolát číslo 199) pocházející z miso pasty. Younis et al. (2017) ve své práci prokázal antimikrobiální působení kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* proti *E. coli* a *Staphylococcus aureus*. Tímto potvrdil výsledky výzkumu Roosita et al. (2011) a Abd Elatif et al. (2016). Rajkowka et al. (2012) také dokázala aktivitu probiotických kvasinek na *S. aureus*. Izolát kvasinky (199) v této práci sice nebyla identifikována, nicméně bylo prokázáno, že má inhibiční účinek na *E. coli*.





Obrázek 5 Inhibiční účinek izolátů po usmrcení UV zářením na indikátorový mikroorganismus *Escherichia coli* (velikost inhibičních zón je uvedena jako poloměr mezikruží v mm)



Obrázek 6 Inhibiční účinek izolátů po usmrcení chloroformem na indikátorový mikroorganismus *Escherichia coli* (velikost inhibičních zón je uvedena jako poloměr mezikruží v mm)

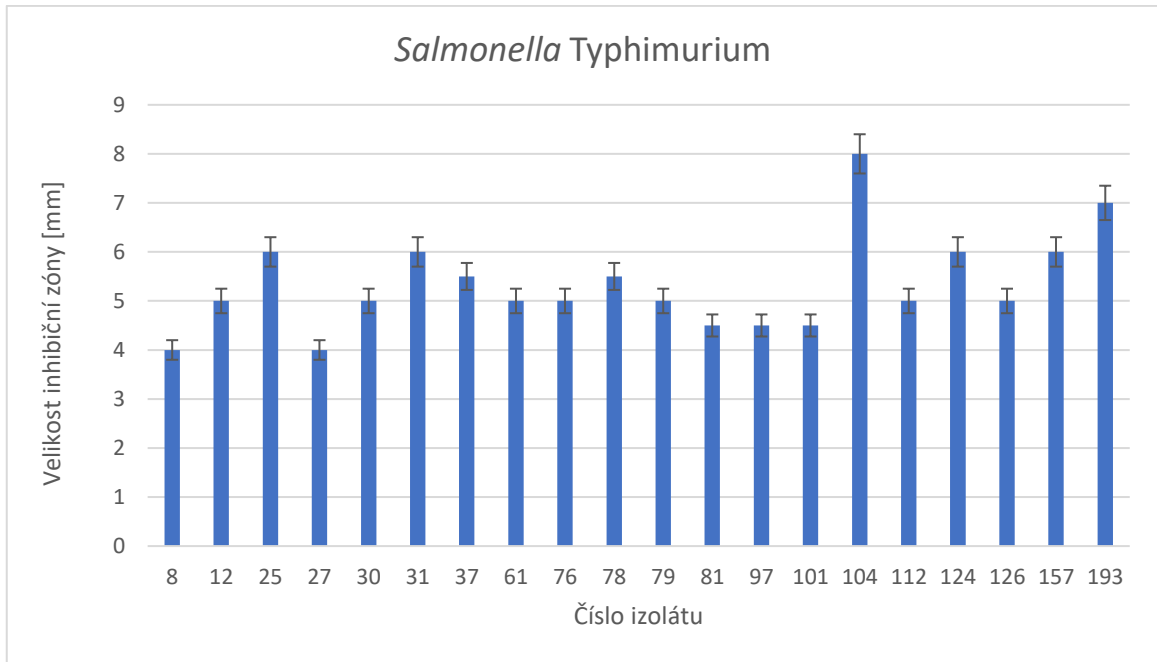
Po působení chloroformem pocházely kmeny s inhibičním účinkem ze třech různých potravin (kombucha, miso, kimchi). Nejvíce kmenů s inhibičním účinkem pocházelo z tofu, a to v počtu 4 izolátů. Inhibiční účinek byl pozorován převážně u izolovaných gram pozitivních tyčinek, v zastoupení 8 kmenů z 11. Identifikací bylo zjištěno, že producenty mikroorganismy by mohly být *Bacillus safensis*, *Bacillus*

*amyloliquefaciens*. Romero – Severson et al. (2021) publikovali výsledky působení *Bacillus safensis* proti *E. coli*, *Xanthomonas axonopodis* a *Pseudomonas syringae*. Kmeny *Bacillus* izolovaly ze semen fazole mungo.

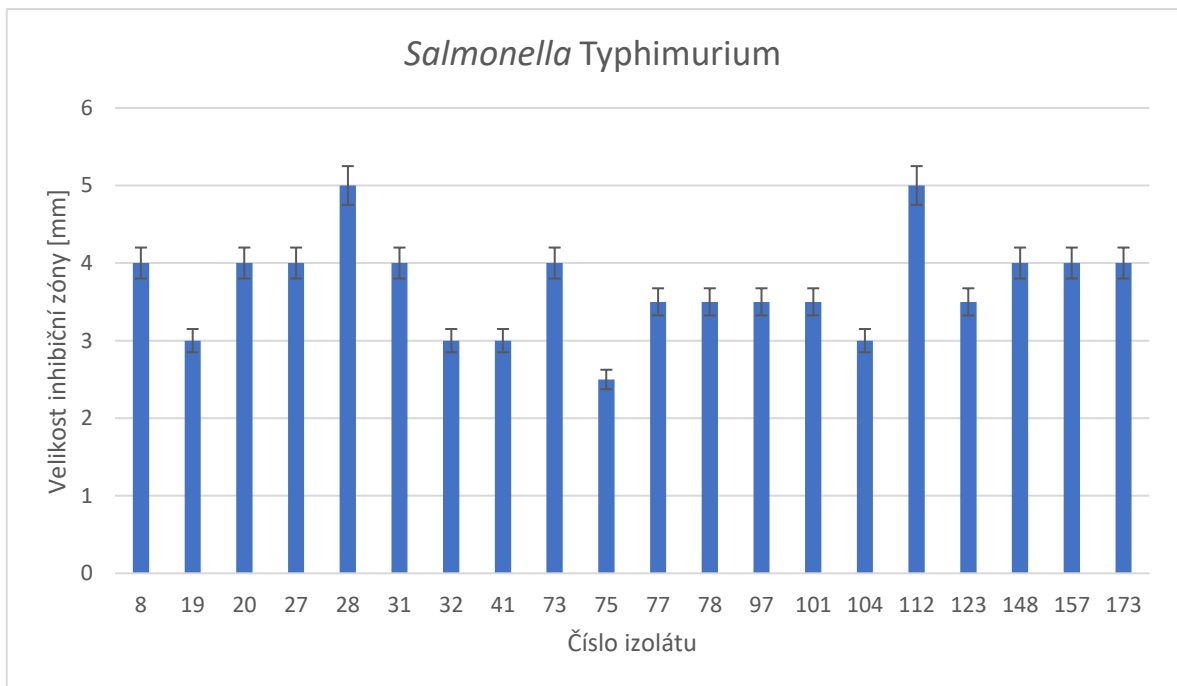
Největší zóna byla detekována u izolátu číslo 193 (poloměr mezikruží 3,5 mm), nejmenší pak u izolátu č. 79 (*Staphylococcus epidermidis*). Dále zóny s velikostí poloměru mezikruží 2 mm vykazovaly 3 izoláty (25, 123 a 139). Dva byly izolovány z tofu a jeden z kombuchy. Jednalo se grampozitivní tyčinky.

U indikátorového mikroorganismu *Salmonella* Typhimurium muselo být vybráno 20 nejvyšších hodnot poloměrů mezikruží inhibičních zón z důvodu velkého množství výsledků (Obr. 7 a Obr. 8). Po usmrcování UV zářením vykazovalo antimikrobiální aktivitu 60 kmenů, při použití chloroformu 52 kmenů. V obou případech byly zastoupeny izoláty z každé testované potraviny a převažovaly kmeny izolované z kombuchy. Vohra et al. (2019) ve své publikaci uvádí velké množství mikroorganismů inhibovaných kombuchou, mezi které patří *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Tyto mikroorganismy se shodují s testovanými v této práci. Jediný kmen s číslem 8 pocházel ze sójové omáčky a jednalo se o grampozitivní koky identifikované jako *Staphylococcus epidermidis*.

V případě působení UV záření se největší zóna vytvořila kolem kmene číslo 104 (8 mm poloměr mezikruží) izolovaného z fermentády, zatímco po působení chloroformu byly největší zóny s poloměrem mezikruží 5 mm pozorovány u kmene *Bacillus amyloliquefaciens* spp. *plantarum* izolovaného z tofu (izolát č. 112) a u kmene č. 28 izolovaného z kombuchy. Nejmenší zóny byly po působení UV záření detekovány u kmenů *S. epidermidis* ze sójové omáčky (izolát č. 8) a u kmene *B. amyloliquefaciens* z kombuchy (izolát č. 27). Po působení chloroformu nejmenší zónu vytvářel kmen *S. hominis* izolovaný z kimchi (izolát č. 75).



Obrázek 7 Inhibiční účinek izolátů po usmrcení UV zářením na indikátorový mikroorganismus *Salmonella Typhimurium* (velikost inhibičních zón je uvedena jako poloměr mezikruží v mm)



Obrázek 8 Inhibiční účinek izolátů po usmrcení chloroformem na indikátorový mikroorganismus *Salmonella Typhimurium* (velikost inhibičních zón je uvedena jako poloměr mezikruží v mm)

Po ošetření buněk chloroformem vykazoval aktivitu stejný počet grampozitivních koků jako grampozitivních tyčinek. Také při usmrcování UV zářením lze pozorovat podobný trend. Zde se nejednalo přesně o polovinu, grampozitivní koky inhibičně působily v 9 případech z 20. Celkem po obou způsobu usmrcení buněk producentických kmenů vykazovaly inhibiční účinek vůči *S. Typhimurium* celkem 12 kmenů grampozitivních koků izolovaných z různých potravin. Pět izolátů bylo identifikováno jako *S. hominis* (izoláty č. 73, 75, 76, 101 a 173) a čtyři izoláty jako *S. epidermidis* (izoláty č. 8, 78, 79 a 157).

Lze vidět, že v grafu znázorňujícím usmrcování izolátů pomocí chloroformu (Obr. 8) jsou velikosti inhibičních zón menší, než je tomu tak u působení UV záření (Obr. 7). V tomto případě existuje několik shodných producentických kmenů. Platí, že inhibiční zóny vytvořené kolem shodných kmenů (8, 27, 31, 78, 97, 101, 104, 112, 157) jsou po působení chloroformu znatelně menší. Výjimkou jsou dva izoláty (8, 27), kde se velikosti zón shodují. Všechny shodné kmeny, až na 97 a 104, se podařilo zidentifikovat. Ve třech případech je výsledkem identifikace *Staphylococcus epidermidis* (izoláty č. 8, 78 a 157) a v jednom případě se jedná o *S. hominis* (izolát č. 101) Izoláty č. 27 a 112 byly identifikovány jako *B. amyloliquefaciens* a izolát č. 31 jako *B. cereus*.

Daas et al. (2018) v publikaci představili výsledky pozitivního antagonistického působení *B. amyloliquefaciens* spp. *plantarum* F11 vůči gramnegativním bakteriím jako například *E. coli* JM109, *S. enterica* spp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 23564 a *P. aeruginosa* ATCC 14217. Dále byla prokázána antimikrobiální aktivita i vůči některým grampozitivním bakteriím a houbám. V této publikaci zkoumaný *Bacillus* byl izolován ze solného jezera v Alžírsku. *Bacillus* v této práci izolovaný z potravin také působil inhibičně vůči grampozitivním i gramnegativním indikátorovým mikroorganismům.

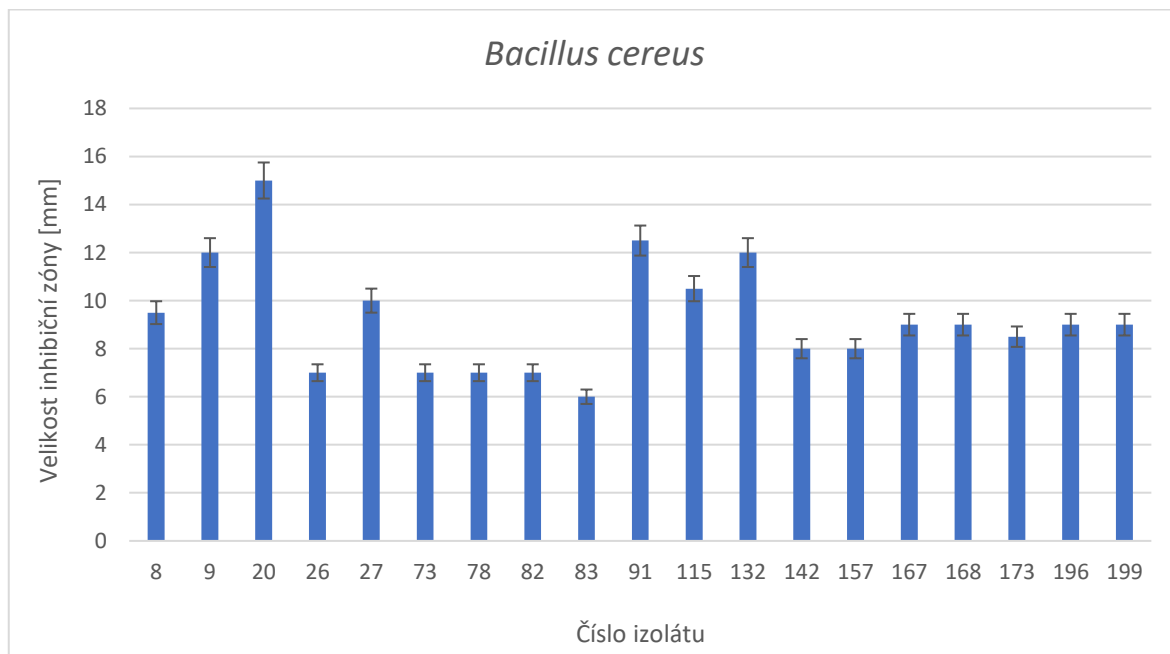
Z výsledků experimentu lze vyvodit, že kmeny izolované z testovaných potravin vykazují menší inhibiční účinek na *Escherichia coli* než na *Salmonella* Typhimurium. Dále lze pozorovat tvorbu větší inhibičních zón v případě usmrcení producentických kmenů UV zářením.

### 8.2.2 Grampozitivní indikátorové mikroorganismy

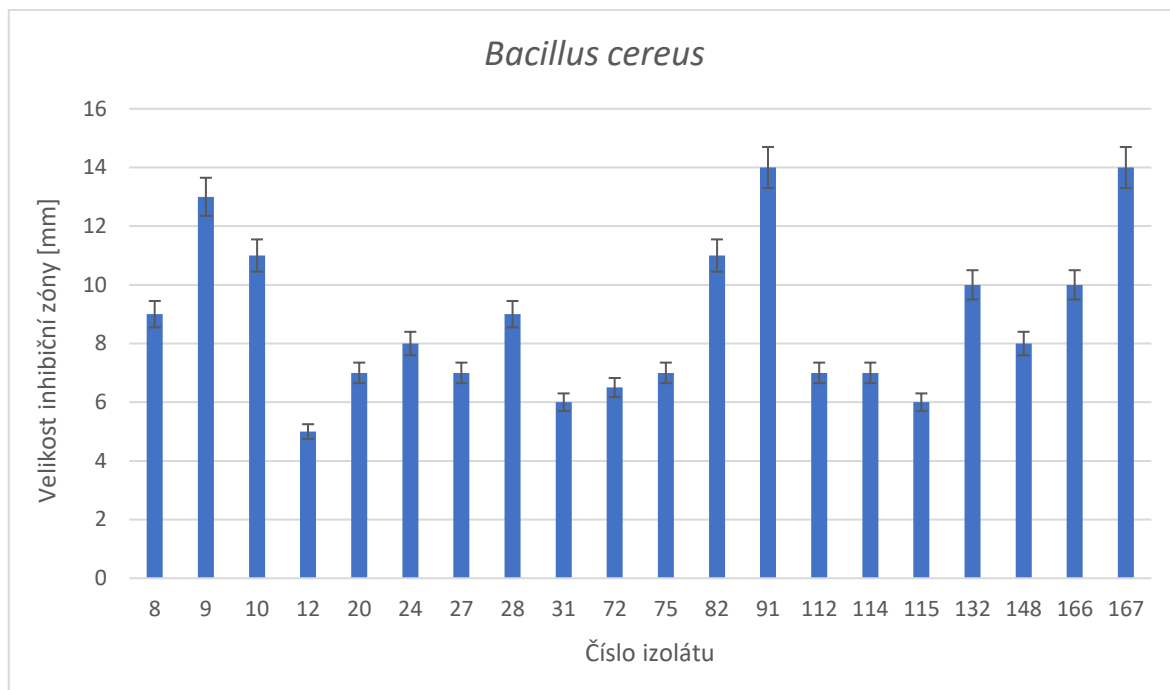
*Bacillus cereus* a *Staphylococcus aureus* byly zvoleny jako grampozitivní indikátorové mikroorganismy. Inhibiční účinek na *Bacillus cereus* vykazovaly jak grampozitivní koky a tyčinky, tak také kvasinky (izolát č. 26 a 199). Jedním z kmenů byla kvasinka izolovaná z kombuchy a druhá z miso pasty. V pracích autorů Abd Elatif et al. (2016) a Younis et al.

(2017) byla také zjištěna antimikrobiální aktivita kmenů kvasinek vůči testovaným patogenním mikroorganismům jako *Salmonella*, *Listeria*, *S. aureus* a *E. coli*. V této práci dále inhibičně působily na *B. cereus* kmeny *Staphylococcus epidermidis* (izoláty č. 8, 78, 132 a 157) a *S. hominis* (izoláty č. 73, 91, 168 a 173). Newstead et al. (2020) uvádějí, že některé kmeny *S. epidermidis* jsou schopné produkce bakteriocinů jako epicidin, epidermin, epilancin, epidermicin a pep5. U kmenů *S. hominis* byla zjištěna schopnost produkce bakteriocinu hominycinu. Antimikrobiální účinek stafylokoků (respektive jejich metabolitů) na *B. cereus* v doposud publikovaných pracích není uváděn.

V literatuře je často uváděn druh *Bacillus* jako mikroorganismus vykazující antimikrobiální aktivitu (Jung et al., 2021, Tran et al., 2022, Vater et al., 2023). V této práci vykazovaly inhibiční účinek na *B. cereus* druhy *B. amyloliquefaciens* (izoláty č. 10, 27, 83 a 112), *B. pumilus* (izolát č. 12) a *B. cereus* (izoláty č. 31 a 167).

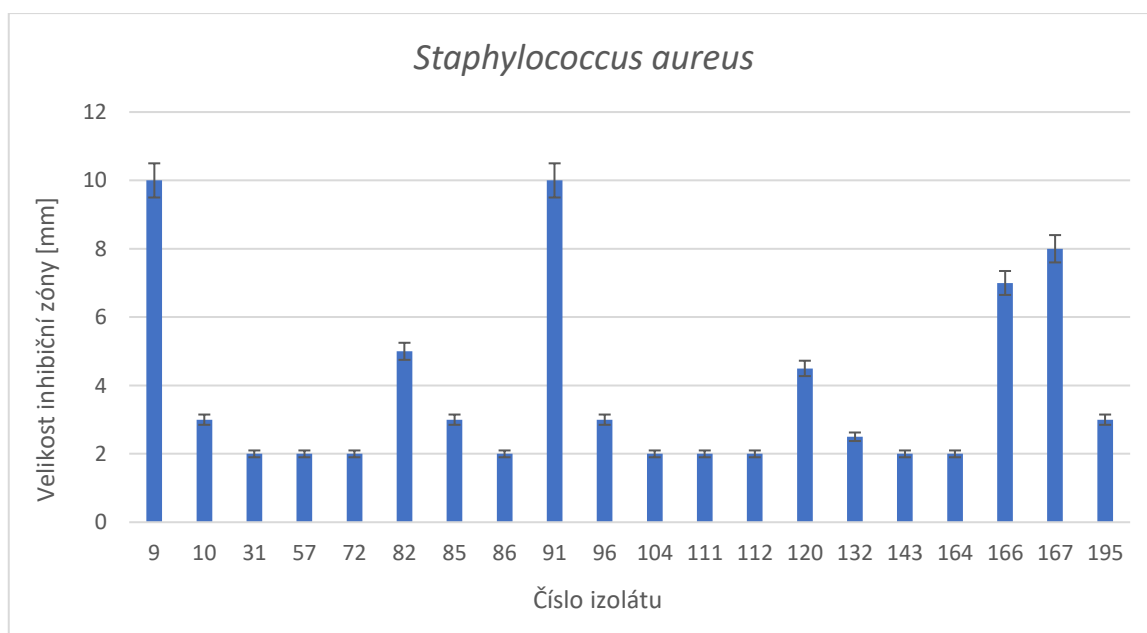


Obrázek 9 Inhibiční účinek izolátů po usmrcení UV zářením na indikátorový mikroorganismus *Bacillus cereus* (velikost inhibičních zón je uvedena jako poloměr mezikruží v mm)



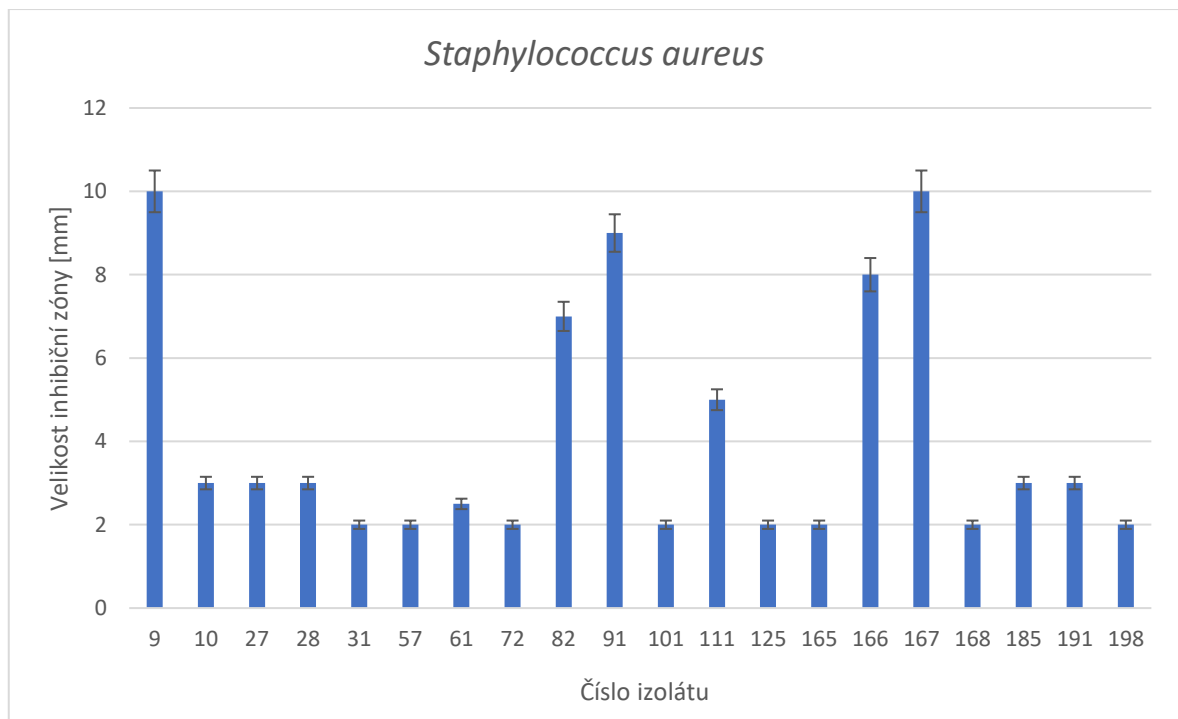
Obrázek 10 Inhibiční účinek izolátů po usmrcení chloroformem na indikátorový mikroorganismus *Bacillus cereus* (velikost inhibičních zón je uvedena jako poloměr mezikruží v mm)

Největší inhibiční zóna v případě usmrcení buněk pomocí UV záření byla pozorována kolem spotu izolátu č. 20 (Obr. 9). Jedná se o grampozitivní tyčinky získané z kombuchy. Naopak v případě usmrcování mikroorganismů chloroformem se jedna z největších zón vytvořila kolem izolátu č. 167 – *Bacillus cereus*. Stejně velkou zónu vytvořil také izolát č. 91 – *Staphylococcus hominis* (Obr. 10).



Obrázek 11 Inhibiční účinek izolátů po usmrcení UV zářením na indikátorový mikroorganismus *Staphylococcus aureus* (velikost inhibičních zón je uvedena jako poloměr mezikruží v mm)

Proti indikátorovému mikroorganismu *Staphylococcus aureus* inhibičně působily zejména kmeny grampozitivních tyčinek (izoláty č. 9, 10, 27, 28, 31, 57, 72, 82, 85, 86, 104, 111, 112, 120, 125, 166, 167, 185, 191 a 195). Mezi ně patří osm kmenů identifikovaných jako *B. amyloliquefaciens* (izoláty č. 10, 27, 72 a 112), *B. pumilus* (izolát č. 86), *B. cereus* (izoláty č. 31 a 167) a *B. safensis* (izolát č. 57). Velikosti inhibičních zón vytvořené kolem těchto kmenů patřily k těm nejmenším (Obr. 11 a 12). Tomuto pravidlu se vymyká zóna detekovaná kolem spotu izolátu č. 167 – *Bacillus cereus*, kdy byl změřen poloměr mezikruží 8 mm po ošetření UV zářením a po ošetření chloroformem dokonce 10 mm.



Obrázek 12 Inhibiční účinek izolátů po usmrcení chloroformem na indikátorový mikroorganismus *Staphylococcus aureus* (velikost inhibičních zón je uvedena jako poloměr mezikruží v mm)

V literatuře bylo z bakterií rodu *Staphylococcus* izolováno několik bakteriocinů a dalších antimikrobiálních látek. Ze *Staphylococcus epidermidis* bylo získáno 6 bakteriocinů, z nichž některé vykazovali inhibiční aktivitu vůči *Staphylococcus aureus*. Také *Staphylococcus hominis* produkuje látky s inhibičním účinkem (Newstead et al., 2020). V této práci bylo zjištěno, že druhy zde identifikované jako *Staphylococcus hominis* a *Staphylococcus epidermidis* vykazovaly antimikrobiální aktivitu vůči každému z testovaných indikátorových mikroorganismů.

## ZÁVĚR

V bakalářské práci byla testována antimikrobiální aktivita mikroorganismů izolovaných z fermentovaných potravin, konkrétně se jednalo o grampozitivní bakterie a kvasinky. Z potravin bylo celkem izolováno 199 mikroorganismů. Tyto izoláty byly následně podrobeny předběžné typizaci a identifikaci pomocí metod MALDI – TOF. Dále pomocí agar spot testu byla hodnocena jejich antimikrobiální aktivita vůči 4 indikátorovým mikroorganismům – *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus cereus* a *Staphylococcus aureus*.

Nejméně citlivým mikroorganismem se prokázala *Escherichia coli*, kdy inhibiční účinek byl pozorován pouze u 11 kmenů z celkových 199. Naopak nejvíce kmenů vykazovalo antimikrobiální aktivitu vůči *Bacillus cereus*, a to 79 kmenů v případě usmrcení kmenů chloroformem a 69 kmenů v případě usmrcování UV zářením z celkového počtu 199 izolátů.

Z výsledků je patrné, že při usmrcování izolovaných kmenů UV zářením došlo ke vzniku pozitivního výsledku u více kmenů, než tomu tak bylo v případě ošetření chloroformem. Výjimkou byl mikroorganismus *Escherichia coli*, u kterého došlo k vytvoření stejného počtu (11) inhibičních zón v obou případech usmrcování.

Největší inhibiční zóna (15 mm) se vytvořila u kmenu číslo 20 (grampozitivní tyčinky) izolovaného z potraviny kombucha, při usmrcování UV zářením a indikátorovým mikroorganismem byl *Bacillus cereus*.

V práci byla zjištěna antimikrobiální aktivita u izolátů patřících do rodu *Staphylococcus* a *Bacillus* vůči testovaným indikátorovým mikroorganismům. Největší antimikrobiální aktivita byla detekována u kmene *B. amyloliquefaciens* izolovaného z kombuchy (izolát č. 27), který inhibičně působil na všechny 4 indikátorové mikroorganismy. Dále antimikrobiální aktivita byla zjištěna také u kmenů *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. safensis*. Tyto izoláty byly získány zejména z kombuchy a kimchi. Co se týká antimikrobiální aktivity stafylokoků, inhibičně působil alespoň na jeden z testovaných indikátorových mikroorganismů. Jednalo se o izoláty identifikované jako *S. hominis* a *S. epidermidis*. Ačkoli kmeny stafylokoků s antimikrobiální aktivitou pocházely z různých potravin, kmeny izolované z kimchi prokázaly větší inhibiční účinek na testované patogeny.

Získané výsledky týkající se antimikrobiální aktivity by mohly být významné pro potravinářský průmysl. Zde by mohly antimikrobiální látky najít využití v prodloužení



trvanlivosti potravin a také k zajištění bezpečnosti potravin kontrolou patogenních mikroorganismů.

Pro přesné určení charakteru antimikrobiálních látek je nutný další výzkum. Obecně je antimikrobiální aktivita pocházející z přírodních zdrojů důležitým a zajímavým tématem, na které se zaměřuje mnoho vědců. Jsou prováděny studie o možnosti aplikace přírodních antimikrobiálních látek nejen v potravinářství.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

ABDELLATIF, Samah S. et al., 2016. Studies on Beneficial Yeasts Isolated from Some Egyptian Dairy Products. *Zagazig Veterinary Journal* [online]. **44**(1), 75 - 84 [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: doi:10.21608/zvjz.2016.7834

AHMAD, Varish et al., 2017. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. **49**(1), 1-11 [cit. 2024-05-17]. ISSN 09248579. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.08.016

AHNAN-WINARNO, Amadeus Driando et al., 2021. Tempeh: A semicentennial review on its health benefits, fermentation, safety, processing, sustainability, and affordability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. **20**(2), 1717-1767 [cit. 2024-05-17]. ISSN 1541-4337. Dostupné z: doi:10.1111/1541-4337.12710

ALI, Fatma, Kangming TIAN a Zheng-Xiang WANG, 2021. Modern techniques efficacy on tofu processing: A review. *Trends in Food Science & Technology* [online]. **116**, 766-785 [cit. 2024-05-17]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2021.07.023

ALLWOOD, Joanne G., Lara T. WAKELING a David C. BEAN, 2021. Fermentation and the microbial community of Japanese koji and miso: A review. *Journal of Food Science* [online]. **86**(6), 2194-2207 [cit. 2024-05-17]. ISSN 0022-1147. Dostupné z: doi:10.1111/1750-3841.15773

AMANING DANQUAH, Cynthia et al., 2022. Antimicrobial Compounds from Microorganisms. *Antibiotics* [online]. **11**(3) [cit. 2024-05-17]. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics11030285

BATIHA, Gaber El-Saber et al., 2021. Application of natural antimicrobials in food preservation: Recent views. *Food Control* [online]. **126**(108066) [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2021.108066

CESA-LUNA, Catherine et al., 2020. The importance of antimicrobial compounds produced by beneficial bacteria on the biocontrol of phytopathogens. *Acta Biológica Colombiana* [online]. **25**(1), 140-154 [cit. 2024-05-17]. ISSN 1900-1649. Dostupné z: doi:10.15446/abc.v25n1.76867

CUAMATZIN-GARCÍA, Leonel et al., 2022. Traditional Fermented Foods and Beverages from around the World and Their Health Benefits. *Microorganisms* [online]. **10**(1151), 1-18 [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms10061151.

DAHIYA, Divakar a Poonam Singh NIGAM, 2023. Use of Characterized Microorganisms in Fermentation of Non-Dairy-Based Substrates to Produce Probiotic Food for Gut-Health and Nutrition. *Fermentation* [online]. **9**(1) [cit. 2024-05-17]. ISSN 2311-5637. Dostupné z: doi:10.3390/fermentation9010001

DARBANDI, Atieh et al., 2022. Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* [online]. **36**(1) [cit. 2024-05-17]. ISSN 0887-8013. Dostupné z: doi:10.1002/jcla.24093

EFRIWATI et al., 2013. Population Dynamics of Yeasts and Lactic Acid Bacteria (LAB) During Tempeh Production. *HAYATI Journal of Biosciences* [online]. **20**(2), 57-64 [cit. 2024-05-17]. ISSN 19783019. Dostupné z: doi:10.4308/hjb.20.2.57

*FOOD ADDITIVES* [online], 2020. [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: <https://foodadditives.net/preservatives/sorbic-acid/>

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION-WORLD HEALTH ORGANIZATION. *CODEX ALIMENTARIUS*. 2017.

FENG, Yunzi et al., 2023. Exploring the core functional microbiota related with flavor compounds in fermented soy sauce from different sources. *Food Research International* [online]. **173**(2023) [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113456>

Fermentáda, 2024. <https://www.fermentada.cz/> [online]. [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: <https://www.fermentada.cz/>

GAO, Xianli et al., 2023. The latest advances on soy sauce research in the past decade: Emphasis on the advances in China. *Food Research International* [online]. **173** [cit. 2024-05-17]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2023.113407

HARTLINE, Rosana, 2024. In: *MICROBIOLOGY LABORATORY MANUAL* [online]. 1.18.1 - 1.18.2 [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: <https://bio.libretexts.org/@go/page/90570>

HOSSEINI, Samira a Sergio O. MARTINEZ-CHAPA, 2017. *Fundamentals of MALDI-ToF-MS Analysis* [online]. Singapore: Springer Singapore [cit. 2024-05-17]. SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology. ISBN 978-981-10-2355-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-10-2356-9

*Identifikace bakterií hmotnostní spektrometrií MALDI TOF* [online], 2020. [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: [https://www.vfu.cz/files/upload/prorektor%20pro%20strategii%20a%20rozvoj/1240\\_07\\_v%C3%BDstup\\_MALDI%20TOF%20MS.pdf](https://www.vfu.cz/files/upload/prorektor%20pro%20strategii%20a%20rozvoj/1240_07_v%C3%BDstup_MALDI%20TOF%20MS.pdf)

CHANG, Hae Choon, 2018. Healthy and safe Korean traditional fermented foods: kimchi and chongkukjang. *Journal of Ethnic Foods* [online]. **5**(3), 161-166 [cit. 2024-05-17]. ISSN 23526181. Dostupné z: doi:10.1016/j.jef.2018.08.003

CHUA, Jian-Yong a Shao-Quan LIU, 2019. Soy whey: More than just wastewater from tofu and soy protein isolate industry. *Trends in Food Science & Technology* [online]. **91**, 24-32 [cit. 2024-05-17]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2019.06.016

JEONG, Chang Hee et al., 2023. Combination approach of paired starter culture and lactic acid on inhibiting autochthonous lactic acid bacteria for extending kimchi shelf life. *Food Control* [online]. [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110167>

JUNG, Sungmin et al., 2021. Bacteriocinogenic Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* Isolated from Kimchi, a Traditional Korean Fermented Cabbage. *Probiotics and*

*Antimicrobial Proteins* [online]. **13**(4), 1195-1212 [cit. 2024-05-17]. ISSN 1867-1306. Dostupné z: doi:10.1007/s12602-021-09772-w

KIRMIZIGUL, Aysegul a Ilkin Yucel SENGUN. Traditional Non-Dairy Fermented Products: A Candidate for Probiotics. *Food Reviews International* [online]. 1-21 [cit. 2024-05-17]. ISSN 8755-9129. Dostupné z: doi:10.1080/87559129.2023.2212040

KOTHE, Caroline Isabel et al., 2024. Exploring the microbial diversity of novel misos with metagenomics. *Food Microbiology* [online]. **117**(2024) [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2023.104372

LEE, Yi-Chen et al., 2016. Reduction of Biogenic Amines during Miso Fermentation by *Lactobacillus plantarum* as a Starter Culture. *Journal of Food Protection* [online]. **79**(9), 1556-1561 [cit. 2024-05-17]. ISSN 0362028X. Dostupné z: doi:10.4315/0362-028X.JFP-16-060

LUCERA, Annalisa et al., 2012. Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology* [online]. **3** [cit. 2024-05-17]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2012.00287

Mass Spectrometry. In: *Merck* [online]. [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/mass-spectrometry/mass-spectrometry-ms>

MUN, So Yeong et al., 2024. *Pediococcus inopinatus* with a well-developed CRISPR-Cas system dominates in long-term fermented kimchi, Mukeunji. *Food Microbiology* [online]. **117** [cit. 2024-05-17]. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2023.104385

NAQASH, S. et al., 2022. Application of Natural Antimicrobial Agents in Different Food Packaging Systems and Their Role in Shelf-life Extension of Food: A Review. *Journal of Packaging Technology and Research* [online]. **6**(2022), 73–89 [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: doi:10.1007/s41783-022-00134-7

NEWSTEAD, Logan L. et al., 2020. Staphylococcal-Produced Bacteriocins and Antimicrobial Peptides: Their Potential as Alternative Treatments for *Staphylococcus aureus* Infections. *Antibiotics* [online]. **9**(2) [cit. 2024-05-17]. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics9020040

*ORGANIC ACIDS: PROMISING MODERN PRESERVATIVES* [online]. [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: [https://journals.co.za/doi/pdf/10.10520/AJA1684498X\\_75](https://journals.co.za/doi/pdf/10.10520/AJA1684498X_75)

*Potassium Hydroxide Test – Principle, Procedure, Uses and Interpretation* [online], 2022. [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: <https://microbiologyinfo.com/potassium-hydroxide-test/>

QUINTO, Emiliano J. et al., 2019. Food Safety through Natural Antimicrobials. *Antibiotics* [online]. **8**(4) [cit. 2024-05-17]. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics8040208

REIS, J. A. et al., 2012. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Engineering Reviews* [online]. **4**(2), 124-140 [cit. 2024-05-17]. ISSN 1866-7910. Dostupné z: doi:10.1007/s12393-012-9051-2

RIBEIRO, Vinicius dos Santos et al., 2023. Antimicrobial substances produced by *Bacillus* spp.: innovations for food application. *Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente* [online]. **13** [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: doi:10.4322/2359-6643.13246

RODRIGO, Dolores a Alfredo PALOP, 2021. Applications of Natural Antimicrobials in Food Packaging and Preservation. *Foods* [online]. **10**(3) [cit. 2024-05-17]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods10030568

ROMERO-SEVERSON, Jeanne et al., 2021. A Seed-Endophytic *Bacillus safensis* Strain With Antimicrobial Activity Has Genes for Novel Bacteriocin-Like Antimicrobial Peptides. *Frontiers in Microbiology* [online]. **12** [cit. 2024-05-17]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2021.734216

ROSSI, Francesca et al., 2016. Microbiological characteristics of fresh tofu produced in small industrial scale and identification of specific spoiling microorganisms (SSO). *LWT-Food Science and Technology* [online]. **70**(2016), 280-285 [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: doi:dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.057

SANWAL, Nikita et al., 2023. Kombucha fermentation: Recent trends in process dynamics, functional bioactivities, toxicity management, and potential applications. *Food Chemistry Advances* [online]. **3**(2023) [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: doi:doi.org/10.1016/j.focha.2023.100421

SEUMAHU, CECILIA ANNA et al., 2013. Bacterial and Fungal Communities in Tempeh as Reveal by Amplified Ribosomal Intergenic Sequence Analysis. *HAYATI Journal of Biosciences* [online]. **20**(2), 65-71 [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: doi:10.4308/hjb.20.2.65

SINGH, Veer Pal, 2018. Recent approaches in food bio-preservation - a review. *Open Veterinary Journal* [online]. **8**(1)(2018), 104-111 [cit. 2024-05-17]. ISSN 2218-6050. Dostupné z: doi:10.4314/ovj.v8i1.16

SUGATHAN, Shiburaj, N. S. PRADEEP a Sabu ABDULHAMEED, ed., 2017. *Bioresources and Bioprocess in Biotechnology* [online]. Singapore: Springer Singapore [cit. 2024-05-17]. ISBN 978-981-10-4282-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-10-4284-3

TAMANG, Jyoti P. et al., 2016. Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. *Frontiers in Microbiology* [online]. **7** [cit. 2024-05-17]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.00578

TAMANG, Jyoti P., Koichi WATANABE a Wilhelm H. HOLZAPFEL, 2016. Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Frontiers in Microbiology* [online]. **7** [cit. 2024-05-17]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.00377

TEOH, Sze Qi et al., 2024. A review on health benefits and processing of tempeh with outlines on its functional microbes. *Future Foods* [online]. **9** [cit. 2024-05-17]. ISSN 26668335. Dostupné z: doi:10.1016/j.fufo.2024.100330

TOPIĆ POPOVIĆ, Natalija et al., 2023. Sample preparation and culture condition effects on MALDI-TOF MS identification of bacteria: A review. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. **42**(5), 1589-1603 [cit. 2024-05-17]. ISSN 0277-7037. Dostupné z: doi:10.1002/mas.21739

TRAN, Charlie et al., 2022. Antimicrobial Bacillus: Metabolites and Their Mode of Action. *Antibiotics* [online]. **11**(1) [cit. 2024-05-17]. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics11010088

Tripathi N, Sapra A. Gram Staining. 2023 Aug 14. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan—. PMID: 32965827.

WANG, Shuo et al., 2020. Effect of volatile compounds on the quality of miso (traditional Japanese fermented soybean paste). *LWT* [online]. **139**(2021) [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110573

YADAV, M. K. a S. K. TIWARI, 2023. Methods for Determination of Antimicrobial Activity of Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Microbiology* [online]. **92**(6), 745-765 [cit. 2024-05-17]. ISSN 0026-2617. Dostupné z: doi:10.1134/S0026261723600520

YOUNIS, Gamal et al., 2017. Antimicrobial activity of yeasts against some pathogenic bacteria. *Veterinary World* [online]. **10**(8), 979-983 [cit. 2024-05-17]. ISSN 09728988. Dostupné z: doi:10.14202/vetworld.2017.979-983

ZHANG, Shuyu et al., 2024. Bacteriostatic mechanism of Lactiplantibacillus plantarum CS3 cell-free supernatant of on soy sauce spoilage bacteria. *Food Bioscience* [online]. **59** [cit. 2024-05-17]. ISSN 22124292. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbio.2024.104147

ZHANG, Wei et al., 2024. Fermentation-promoting effect of three salt-tolerant Staphylococcus and their co-fermentation flavor characteristics with Zygosaccharomyces rouxii in soy sauce brewing. *Food Chemistry* [online]. **432** [cit. 2024-05-17]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2023.137245

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

BHI	Srdeční mozková infuse
DAPI	4', 6 – diamidin – 2 – fenyldol
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
G –	Gramnegativní
G +	Grampozitivní
GRAS	Všeobecně uznáno za bezpečné
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxid vodíku
KOH	Hydroxid draselný
MALDI – TOF	Hmotnostní spektrometrie
MH	Mueller – Hinton agar
MRS	„de Mann, Rogosa a Sharpe agar“
NaCl	Chlorid sodný
PCA	„Plate count agar“
PI	Propidium iodid
SCOPY	Symbiotická kultura bakterií a kvasinek)

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 Metody stanovení antimikrobiální aktivity (Yadav a Tiwari, 2023).....	28
Obrázek 2 Schéma MALDI – TOF (Sigmaaldrich, 2024).....	41
Obrázek 3 Celkové počty mikroorganismů vyzolovaných z testovaných potravin .....	44
Obrázek 4 Morfologické rozdělení izolátů .....	45
Obrázek 5 Inhibiční účinek izolátů po usmrcení UV zářením na indikátorový mikroorganismus <i>Escherichia coli</i> (velikost inhibičních zón je uvedena jako poloměr mezikruží v mm).....	49
Obrázek 6 Inhibiční účinek izolátů po usmrcení chloroformem na indikátorový mikroorganismus <i>Escherichia coli</i> (velikost inhibičních zón je uvedena jako poloměr mezikruží v mm).....	49
Obrázek 7 Inhibiční účinek izolátů po usmrcení UV zářením na indikátorový mikroorganismus <i>Salmonella</i> Typhimurium (velikost inhibičních zón je uvedena jako poloměr mezikruží v mm).....	51
Obrázek 8 Inhibiční účinek izolátů po usmrcení chloroformem na indikátorový mikroorganismus <i>Salmonella</i> Typhimurium (velikost inhibičních zón je uvedena jako poloměr mezikruží v mm).....	51
Obrázek 9 Inhibiční účinek izolátů po usmrcení UV zářením na indikátorový mikroorganismus <i>Bacillus cereus</i> (velikost inhibičních zón je uvedena jako poloměr mezikruží v mm).....	53
Obrázek 10 Inhibiční účinek izolátů po usmrcení chloroformem na indikátorový mikroorganismus <i>Bacillus cereus</i> (velikost inhibičních zón je uvedena jako poloměr mezikruží v mm).....	54
Obrázek 11 Inhibiční účinek izolátů po usmrcení UV zářením na indikátorový mikroorganismus <i>Staphylococcus aureus</i> (velikost inhibičních zón je uvedena jako poloměr mezikruží v mm).....	55
Obrázek 12 Inhibiční účinek izolátů po usmrcení chloroformem na indikátorový mikroorganismus <i>Staphylococcus aureus</i> (velikost inhibičních zón je uvedena jako poloměr mezikruží v mm).....	55



## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Tabulka předběžné typizace a identifikace izolátů

Příloha P II: Seznam kmenů vykazujících pozitivní inhibiční aktivitu

## PŘÍLOHA P I: TABULKA PŘEDBĚŽNÉ TYPIZACE A IDENTIFIKACE IZOLÁTŮ

Tabulka 1a Výsledná identifikace izolátů

Č. izolátu	Potravina	Kultivační médium	Gramovo barvení	KOH test	Kataláza test	MALDI - TOF
1	Sójová omáčka	PCA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus cereus</i>
2	Sójová omáčka	PCA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus altitudinis</i>
3	Sójová omáčka	PCA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus cereus</i>
4	Sójová omáčka	PCA	G +, tyčinky	G +	-	Neúspěšná identifikace
5	Sójová omáčka	PCA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
6	Sójová omáčka	PCA	G +, koky	G +	+	Neúspěšná identifikace
7	Sójová omáčka	PCA	G +, koky	G +	+	Neúspěšná identifikace
8	Sójová omáčka	PCA	G +, koky	G +	+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
9	Sójová omáčka	PCA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
10	Kombucha	PCA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
11	Kombucha	PCA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
12	Kombucha	PCA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus pumilus</i>
13	Kombucha	PCA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
14	Kombucha	PCA	G +, koky	G +	+	Neúspěšná identifikace
15	Kombucha	PCA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus safensis</i>
16	Kombucha	PCA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus altitudinis</i>
17	Kombucha	PCA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus safensis</i>
18	Kombucha	PCA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
19	Kombucha	PCA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
20	Kombucha	CHYGA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
21	Kombucha	CHYGA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
22	Kombucha	CHYGA	Kvasinka		-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
23	Kombucha	CHYGA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
24	Kombucha	CHYGA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
25	Kombucha	MRS	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace

Tabulka 1b Výsledná identifikace izolátů – pokračování

Č. izolátu	Potravina	Kultivační médium	Gramovo barvení	KOH test	Kataláza test	MALDI - TOF
26	Kombucha	MRS	Kvasinka	G +	+	Neúspěšná identifikace
27	Kombucha	MRS	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
28	Kombucha	MRS	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
29	Kombucha	MRS	Kvasinka		+	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
30	Kombucha	MRS	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
31	Kombucha	MRS	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus cereus</i>
32	Kombucha	MRS	G +, tyčinky	G +	-	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
33	Kombucha	M17	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
34	Kombucha	M17	G +, koky	G +	+	Neúspěšná identifikace
35	Kombucha	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
36	Kombucha	M17	G +, tyčinky	G +	-	Neúspěšná identifikace
37	Kombucha	M17	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
38	Kombucha	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
39	Kombucha	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
40	Kombucha	M17	G +, tyčinky	G +	-	Neúspěšná identifikace
41	Kombucha	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
42	Kombucha	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
43	Kombucha	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
44	Kombucha	AA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
45	Kombucha	AA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
46	Kombucha	AA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
47	Kombucha	AA	Kvasinka		+	<i>Lachancea fermentati</i>
48	Kombucha	AA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus cereus</i>
49	Kombucha	AA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus cereus</i>
50	Kombucha	AA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus cereus</i>

Tabulka 1c Výsledná identifikace izolátů – pokračování

Č. izolátu	Potravina	Kultivační médium	Gramovo barvení	KOH test	Kataláza test	MALDI - TOF
51	Tempeh	PCA	G +, koky	G +	+	Neúspěšná identifikace
52	Kombucha	AA	G +, koky	G +	+	Neúspěšná identifikace
53	Kombucha	AA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
54	Kombucha	AA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus altitudinis</i>
55	Kombucha	AA	G +, koky	G +	+	<i>Staphylococcus hominis</i>
56	Kombucha	AA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
57	Kombucha	AA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus safensis</i>
58	Tempeh	PCA	G +, koky	G +	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
59	Tempeh	PCA	G +, koky	G +	+	Neúspěšná identifikace
60	Tempeh	PCA	G +, koky	G +	+	Neúspěšná identifikace
61	Tempeh	PCA	G +, koky	G +	-	Neúspěšná identifikace
62	Tempeh	PCA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
63	Tempeh	PCA	G +, koky	G +	+	Neúspěšná identifikace
64	Tempeh	PCA	G +, koky	G +	+	<i>Staphylococcus hominis</i>
65	Tempeh	PCA	G +, tyčinky	G +	-	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> spp. <i>plantarum</i>
66	Tempeh	PCA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
67	Kimchi	PCA	G +, tyčinky	G +	-	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> spp. <i>plantarum</i>
68	Kimchi	PCA	G +, koky	G +	+	Neúspěšná identifikace
69	Kimchi	PCA	G +, koky	G +	-	<i>Staphylococcus hominis</i>
70	Kimchi	PCA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus licheniformis</i>
71	Kimchi	PCA	G +, koky	G +	-	<i>Staphylococcus hominis</i>
72	Kimchi	PCA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
73	Kimchi	PCA	G +, koky	G +	+	<i>Staphylococcus hominis</i>
74	Kimchi	PCA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus licheniformis</i>
75	Kimchi	PCA	G +, koky	G +	+	<i>Staphylococcus hominis</i>

Tabulka 1d Výsledná identifikace izolátů – pokračování

Č. izolátu	Potravina	Kultivační médium	Gramovo barvení	KOH test	Kataláza test	MALDI - TOF
76	Kimchi	PCA	G +, koky	G +	+	<i>Staphylococcus hominis</i>
77	Kimchi	PCA	G +, koky	G +	-	<i>Staphylococcus hominis</i>
78	Kimchi	PCA	G +, koky	G +	+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
79	Kimchi	PCA	G +, koky	G +	+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
80	Kimchi	M17	G +, tyčinky	G +	-	Neúspěšná identifikace
81	Kimchi	M17	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
82	Kimchi	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
82 . 2	Kimchi	MRS	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
83	Kimchi	MRS	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> spp. <i>plantarum</i>
84	Kimchi	MRS	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
85	Kimchi	MRS	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
86	Kimchi	M17	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus pumilus</i>
87	Kimchi	M17	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus licheniformis</i>
88	Kimchi	M17	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus licheniformis</i>
89	Kimchi	M17	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus altitudinis</i>
90	Kimchi	AA	G +, koky	G +	+	Neúspěšná identifikace
91	Kimchi	AA	G +, koky	G +	+	<i>Staphylococcus hominis</i>
92	Kimchi	AA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
93	Kimchi	AA	G +, koky	G +	+	<i>Bacillus safensis</i>
94	Kimchi	AA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
95	Kimchi	AA	G +, koky	G +	+	Neúspěšná identifikace
96	Fermentáda	PCA	G +, koky	G +	+	Neúspěšná identifikace
97	Fermentáda	PCA	G +, koky	G +	+	Neúspěšná identifikace
98	Fermentáda	PCA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus altitudinis</i>
99	Fermentáda	PCA	G +, koky	G +	+	<i>Staphylococcus hominis</i>
100	Fermentáda	PCA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace

Tabulka 1e Výsledná identifikace izolátů – pokračování

Č. izolátu	Potravina	Kultivační médium	Gramovo barvení	KOH test	Kataláza test	MALDI - TOF
101	Fermentáda	PCA	G +, koky	G +	+	<i>Staphylococcus hominis</i>
102	Fermentáda	PCA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus</i> sp.
103	Fermentáda	PCA	G +, koky	G +	+	<i>Staphylococcus hominis</i>
104	Fermentáda	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
105	Fermentáda	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
106	Fermentáda	M17	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus cereus</i>
107	Fermentáda	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
108	Fermentáda	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
109	Fermentáda	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
110	Tofu	PCA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
111	Tofu	PCA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
112	Tofu	PCA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> spp. <i>plantarum</i>
113	Tofu	PCA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus cereus</i>
114	Tofu	PCA	G +, koky	G +	+	<i>Staphylococcus hominis</i>
115	Tofu	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
116	Tofu	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
117	Tofu	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
118	Tofu	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
119	Tofu	M17	G +, tyčinky	G +	-	Neúspěšná identifikace
120	Tofu	M17	G +, tyčinky	G +	-	Neúspěšná identifikace
121	Tofu	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
122	Tofu	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
123	Tofu	MRS	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
124	Tofu	MRS	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> spp. <i>plantarum</i>
125	Tofu	Paenibacillus polymixa agar	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace

Tabulka 1f Výsledná identifikace izolátů – pokračování

Č. izolátu	Potravina	Kultivační médium	Gramovo barvení	KOH test	Kataláza test	MALDI - TOF
126	Tofu	Paenibacillus polymixa agar	G +, tyčinky	G +	-	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
127	Tofu	Paenibacillus polymixa agar	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
128	Tofu	Paenibacillus polymixa agar	G +, tyčinky	G +	-	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
129	Tofu	Paenibacillus polymixa agar	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
130	Tofu	MYP	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus altitudinis</i>
131	Tofu	MYP	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
132	Tofu	MYP	G +, koky	G +	+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
133	Tofu	MYP	G +, koky	G +	+	Neúspěšná identifikace
134	Tofu	MYP	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
135	Tofu	MYP	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
136	Tofu	MYP	G +, koky	G +	-	Neúspěšná identifikace
137	Tofu	MYP	G +, koky	G +	+	Neúspěšná identifikace
138	Tofu	MYP	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
139	Tofu	MYP	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
140	Tofu	MYP	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
141	Tofu	MYP	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
142	Tofu	MYP	G +, koky	G +	-	Neúspěšná identifikace
143	Tofu	MYP	G +, koky	G +	+	<i>Staphylococcus hominis</i>
144	Tofu	MYP	G +, koky	G +	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
145	Miso	Paenibacillus polymixa agar	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus safensis</i>
146	Miso	Paenibacillus polymixa agar	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus cereus</i>
147	Miso	Paenibacillus polymixa agar	G +, koky	G +	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
148	Miso	Paenibacillus polymixa agar	G +, koky	G +	+	Neúspěšná identifikace
149	Miso	Paenibacillus polymixa agar	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
150	Miso	Paenibacillus polymixa agar	G +, tyčinky	G +	-	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>

Tabulka 1g Výsledná identifikace izolátů – pokračování

Č. izolátu	Potravina	Kultivační médium	Gramovo barvení	KOH test	Kataláza test	MALDI - TOF
151	Miso	PCA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
152	Miso	PCA	G +, koky	G +	+	<i>Staphylococcus hominis</i>
153	Miso	PCA	G +, koky	G +	+	<i>Staphylococcus hominis</i>
154	Miso	PCA	G +, tyčinky	G +	-	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
155	Miso	PCA	G +, koky	G +	-	<i>Staphylococcus hominis</i>
156	Miso	PCA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus cereus</i>
157	Miso	PCA	G +, koky	G +	+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
158	Miso	MRS	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
159	Miso	MRS	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
160	Miso	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
161	Miso	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
162	Miso	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
163	Miso	M17	G +, tyčinky	G +	-	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
164	Miso	MRS	Kvasinka		+	Neúspěšná identifikace
165	Miso	MRS	G +, koky	G +	+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
166	Miso	MRS	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
167	Miso	MRS	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus cereus</i>
168	Miso	MRS	G +, koky	G +	+	<i>Staphylococcus hominis</i>
169	Miso	MRS	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
170	Kombucha	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
171	Tempeh	PCA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
172	Tempeh	PCA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
173	Kimchi	PCA	G +, koky	G +	+	<i>Staphylococcus hominis</i>
174	Kimchi	PCA	G +, koky	G +	+	Neúspěšná identifikace
175	Kimchi	PCA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace



Tabulka 1h Výsledná identifikace izolátů – pokračování

Č. izolátu	Potravina	Kultivační médium	Gramovo barvení	KOH test	Kataláza test	MALDI - TOF
176	Kimchi	PCA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
177	Kimchi	PCA	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus safensis</i>
178	Kimchi	PCA	G +, koky	G +	+	Neúspěšná identifikace
179	Kimchi	M17	G +, koky	G +	+	<i>Staphylococcus hominis</i>
180	Kimchi	AA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
181	Kimchi	AA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
182	Kimchi	AA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
183	Kimchi	AA	G +, koky	G +	+	Neúspěšná identifikace
184	Fermentáda	M17	G +, koky	G +	+	Neúspěšná identifikace
185	Fermentáda	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
186	Fermentáda	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
187	Fermentáda	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
188	Tofu	M17	G +, tyčinky	G +	-	Neúspěšná identifikace
189	Tofu	MYP	G +, tyčinky	G +	-	Neúspěšná identifikace
190	Tofu	MYP	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
191	Tofu	MYP	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
192	Tofu	MYP	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
193	Miso	Paenibacillus polymixa agar	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
194	Miso	Paenibacillus polymixa agar	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
195	Miso	PCA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
196	Miso	PCA	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
197	Miso	M17	G +, tyčinky	G +	+	Neúspěšná identifikace
198	Miso	MRS	G +, tyčinky	G +	+	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> spp. <i>plantarum</i>
199	Miso	MRS	Kvasinka		+	Neúspěšná identifikace

## PŘÍLOHA P II: SEZNAM KMENŮ VYKAZUJÍCÍCH POZITIVNÍ INHIBIČNÍ AKTIVITU

Tabulka 2a: Kmeny vykazující antimikrobiální aktivitu

<i>Staphylococcus aureus</i> (UV)		
Č. izolátu	Průměr spotu [mm]	Poloměr mezikruží [mm]
3	6	1
9	6	10
10	6	3
23	8	1
31	6	2
41	5	1
55	4	1,5
57	8	2
66	5	1
72	6	2
73	10	1
82	10	5
85	13	3
86	7	2
91	7	10
96	8	3
104	5	2
111	9	2
112	10	2
114	13	1
115	9	1
116	8	1,5
120	4	4,5
132	6	2,5
141	4	1,5
142	6	2
143	6	2
164	3	2
166	8	7
167	6	8
185	10	1
195	8	3
199	7	2

Tabulka 2b: Kmeny vykazující antimikrobiální aktivitu - pokračování

<i>Staphylococcus aureus</i> (chloroform)		
Č. izolátu	Průměr spotu [mm]	Poloměr mezikruží [mm]
8	6	1
9	5	10
10	7	3
19	6	1
23	8	1
27	7	3
28	8	3
31	7	2
39	6	1
51	7	1
56	5	1
57	7	2
60	8	1
61	8,5	2,5
72	10	2
82	7	7
91	8	9
101	5	2
111	8	5
115	18	1
123	8	1
125	9	2
133	7	1,5
165	5	2
166	9	8
167	11	10
168	8	2
173	8	1
185	9	2
191	4	3
198	5	2

Tabulka 2c: Kmeny vykazující antimikrobiální aktivitu - pokračování

<i>Bacillus cereus</i> (UV)		
Č. izolátu	Průměr spotu [mm]	Poloměr mezikruží [mm]
8	6,5	9,5
9	6	12
12	9	4
13	8,5	3,5
19	6	4
20	5	15
23	6	5
26	7	7
27	6	10
29	8	3
28	8	3
30	8	4
31	8,5	4,5
37	6,5	3,5
41	6	4
46	7	4
50	5	5
51	7	4,5
55	4	5
66	6	3,5
70	8	5
73	10	7
74	7	3
75	8	4
76	9	3
78	7	7
79	7	3
81	5	4
82	10	7
83	6	6
84	7,5	2
87	9	5
88	4	3
91	5,5	12,5
95	9	0,5
96	7	2,5
97	5,5	4,5
99	6	4
101	5	4
103	5	3
104	5	5
111	8	3
114	7,5	3,5

Tabulka 2d: Kmeny vykazující antimikrobiální aktivitu - pokračování

<i>Bacillus cereus</i> (UV)		
Č. izolátu	Průměr spotu [mm]	Poloměr mezikruží [mm]
115	4,5	10,5
123	5,5	5,5
124	6	4
125	5,5	1,5
127	6	5
128	6	5
131	5	2
132	6	12
133	5	4
134	5,5	3,5
141	5	5
142	9	8
149	7	4
150	4	4
152	6	3,5
154	9	3
157	6	8
165	10	5
166	7	5
167	6	9
168	6	9
173	6,5	8,5
177	5	4
185	6	2,5
191	4	4
195	9	2
196	8,5	5,5
199	8	9

Tabulka 2e: Kmeny vykazující antimikrobiální aktivitu - pokračování

<i>Bacillus cereus</i> (chloroform)		
Č. izolátu	Průměr spotu [mm]	Poloměr mezikruží [mm]
8	4	9
9	6	13
10	3	11
12	11	5
13	8	4
19	4	2
20	9	7
24	6	8
26	9	3,5
27	7	7
28	7	9
31	7	6
38	4	3
50	4	2
51	8	2
55	5	2
57	8	4,5
70	8	2
72	13,5	6,5
75	7	7
78	10	3
79	6	2
82	9	11
84	5	3
87	8	3,5
91	6	14
95	7	4
97	4	3
99	5	4
101	7	4
103	5	3
104	3	1
111	7	3
112	8	7
114	10	7
115	18	6
124	7	2
125	9	1
128	6	4
132	13	10
133	6	2
141	6	4
148	10	8

Tabulka 2e: Kmeny vykazující antimikrobiální aktivitu - pokračování

<i>Bacillus cereus</i> (chloroform)		
Č. izolátu	Průměr spotu [mm]	Poloměr mezikruží [mm]
149	5	1
152	4,5	4
154	5	3
157	11,5	3,5
165	13,5	4,5
166	6	10
167	5	14
168	22	3
173	12	3
195	7	2
198	5	5
199	13	2

Tabulka 2f: Kmeny vykazující antimikrobiální aktivitu - pokračování

<i>Salmonella Typhimurium</i> (UV)		
Č. izolátu	Průměr spotu [mm]	Poloměr mezikruží [mm]
4	6,5	2,5
8	9	4
9	5	3
10	4	2
12	5	5
20	5	2
21	9	3
22	6	2,5
25	5	6
26	4,5	3,5
27	15	4
28	8	3
30	5	5
31	5	6
32	12	2
37	5	5,5
38	5,5	2,5
50	7,5	3,5
61	5	5
66	6	3
71	14	2
73	7	2
75	12,5	2,5
76	5	5
77	7	3
78	5,5	5,5
79	7	5
81	5	4,5
83	10	3
95	7,5	2,5
97	6,5	4,5
101	6,5	4,5
104	7	8
112	7	5
124	7	6
126	7	5
130	5	3
132	15	2
134	7,5	3,5
141	6,5	3,5
149	9	3
150	8	3
154	9	3

Tabulka 2g: Kmeny vykazující antimikrobiální aktivitu - pokračování



*Salmonella* Typhimurium (UV)

Č. izolátu	Průměr spotu [mm]	Poloměr mezikruží [mm]
157	6	6
163	6	3
164	8	2
165	7	3
166	7	2
168	6,5	3,5
173	8	2
193	3	7
198	6	3
199	5	2

Tabulka 2h: Kmeny vykazující antimikrobiální aktivitu - pokračování

<i>Salmonella</i> Typhimurium (chloroform)		
Č. izolátu	Průměr spotu [mm]	Poloměr mezikruží [mm]
4	6	1,5
8	7	4
19	4	3
20	5	4
21	8	2
22	10	2
27	8	4
28	5	5
31	8	4
32	7	3
33	9	1
37	8	2
41	7	3
55	5,5	1,5
67	3,5	2
73	7	4
75	10	2,5
77	10	3,5
78	5,5	3,5
82	5	2
83	8	2
88	5	1,5
97	5,5	3,5
100	7	1
101	6	3,5
104	5	3
112	7	5
123	11,5	3,5
127	9,5	1,5
134	5	2
137	6	2
141	5	2
147	5	1,5
148	5	4
150	9	2
152	7	2
157	7	4
163	5	2
164	6	2
165	5	2
168	8	1
173	5	4
193	3,5	2
198	5	1

Tabulka 2i: Kmeny vykazující antimikrobiální aktivitu - pokračování

<i>E. coli</i> (UV)		
Č. izolátu	Průměr spotu [mm]	Poloměr mezikruží [mm]
4	6	3
18	6	3
27	8	2
58	6	2
125	4	2
149	5	2
165	7	2
167	8	7
193	10	5
196	12	5
199	9	6

Tabulka 2j: Kmeny vykazující antimikrobiální aktivitu - pokračování

<i>E. coli</i> (chloroform)		
Č. izolátu	Průměr spotu [mm]	Poloměr mezikruží [mm]
17	4,5	1
25	5	2
32	6	1
79	6,5	0,5
81	7	1,5
123	6	2
133	4,5	1,5
139	8	2
141	4,5	1,5
193	9	3,5
199	9	3