

Inhibiční působení protektivních kultur na bakterie rodu *Enterococcus* s dekarboxylázovou aktivitou

Iva Březinová

Bakalářská práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Iva Březinová**
Osobní číslo: **T12237**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Inhibiční působení protektivních kultur na bakterie rodu *Enterococcus* s dekarboxylázovou aktivitou**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Inhibiční látky produkované mikroorganismy využívané v potravinářství.
2. Protektivní kultury.
3. Charakteristika rodu *Enterococcus*.
4. Produkce biogenních aminů enterokoků.

II. Praktická část

1. Monitoring citlivosti dekarboxyláza pozitivních enterokoků vůči protektivním kulturám.
2. Zpracování výsledků.
3. Formulace závěrů na základě získaných výsledků.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] JAY, James M, Martin J LOESSNER a David A GOLDNER. Modern food microbiology. New York: Springer, 2005, 790 s. ISBN 03-872-3180-3.

[2] ADAMS, Martin a M NOUT. Fermentation and food safety. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers, 2001, xi, 290 p. ISBN 08-342-1843-7.

[3] BHUNIA, Arun K. Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis. New York: Springer, c2008, xviii, 276 p. ISBN 03-877-4536-X.

[4] MODI, H.A. Microbial spoilage of foods: mechanisms and pathogenesis. Jaipur, India: Aavishkar Publishers, Distributors, 2009, xviii, 276 p. ISBN 978-817-9102-855.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

2. února 2015

Termín odevzdání bakalářské práce:

4. května 2015

Ve Zlíně dne 2. února 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Březinová Iva

Obor: Chemie a technologie potravin

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně ...4.5.2015...

.....
Březinová

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit inhibiční působení protektivních kultur na bakterie rodu *Enterococcus*, které mají schopnost vytvářet biogenní aminy. Vysoké koncentrace těchto látek v potravinách mohou působit nepříznivě na zdraví konzumentů. Bylo zjištěno, že největší inhibiční efekt vykazují *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* a některé kmeny *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Tyto protektivní kultury nejvíce ovlivňovaly růst bakterií *Enterococcus faecium* a *Enterococcus* sp. Teoretická část této práce se zabývá bakteriociny, což jsou látky vykazující antimikrobiální účinky. Dále byly popsány protektivní kultury, rod *Enterococcus* a biogenní aminy produkované tímto rodem.

Klíčová slova: bakteriociny, biogenní aminy, rod *Enterococcus*, protektivní kultury

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate inhibitory effect of protective cultures on decarboxylase-positive enterococci. High concentration of biogenic amines in food can affect consumer's health. The highest inhibitory effect has observed in *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* and some strains of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. These protective cultures mostly inhibited *Enterococcus faecium* and *Enterococcus* sp. Bacteriocins, protective cultures, genus *Enterococcus* and biogenic amines are described in theoretical part.

Keywords: bacteriocin, biogenic amines, genus *Enterococcus*, protective cultures

Poděkování patří doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné rady, vedení a pomoc při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. za statistické vyhodnocení výsledků. Také děkuji Ing. Khatantuul Purevdorj za pomoc při práci v laboratoři.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 INHIBIČNÍ LÁTKY PRODUKOVANÉ MIKROORGANIZMY VYUŽÍVANÉ V POTRAVINÁŘSTVÍ	12
1.1 BAKTERIOCINY.....	12
1.1.1 Bakteriociny gramnegativních bakterií.....	13
1.1.2 Bakteriociny grampozitivních bakterií.....	13
1.1.2.1 Třída I – lantibiotika	13
1.1.2.2 Třída II	14
1.1.2.3 Třída III.....	15
1.1.2.4 Třída IV.....	15
1.1.3 Antimikrobiální peptidy eukaryot.....	17
1.1.4 Rozdíl mezi bakteriociny a antibiotiky	17
1.1.5 Bakteriociny v mase a masných výrobcích.....	17
1.1.6 Bakteriociny v obalech.....	18
1.1.7 Enterociny	18
1.1.8 Nisin	19
2 PROTEKTIVNÍ KULTURY.....	21
2.1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ (BMK).....	21
2.1.1 Rod <i>Lactobacillus</i>	22
2.1.2 Rod <i>Lactococcus</i>	23
3 CHARAKTERISTIKA RODU <i>ENTEROCOCCUS</i>.....	24
3.1 FYZIOLOGIE.....	25
3.2 PATOGENITA	25
3.2.1 Enterokoková endokarditida	26
3.2.2 Bakteriémie	26
3.3 ENTEROKOKY JAKO PROBIOTIKA.....	26
3.4 VÝSKYT ENTEROKOKŮ V POTRAVINÁCH	27
4 PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ ENTEROKOKY.....	28
4.1 ÚČINKY BIOGENNÍCH AMINŮ NA ČLOVĚKA.....	28
4.2 HISTAMIN.....	29
4.3 TYRAMIN.....	29
4.4 DETEKCE BIOGENNÍCH AMINŮ	30
II PRAKTICKÁ ČÁST	31
5 MATERIÁLY A METODY	32
5.1 ZAŘÍZENÍ.....	32
5.2 MATERIÁL.....	32
5.2.1 Živná média.....	32
5.2.2 Chemikálie	33
5.2.3 Použité mikroorganismy	33

5.3	PŘÍPRAVA TEKUTÝCH ŽIVNÝCH PŮD.....	36
5.4	PŘÍPRAVA TUHÝCH ŽIVNÝCH PŮD.....	37
5.5	INOKULACE MIKROORGANISMŮ	37
5.6	SLEDOVÁNÍ INHIBIČNÍHO PŮSOBENÍ PROTEKTIVNÍCH KULTUR NA BAKTERIE S DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITOU POMOCÍ DIFÚZNÍ JAMKOVÉ METODY	37
5.7	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	39
6	VÝSLEDKY.....	40
6.1	PŮSOBENÍ PROTEKTIVNÍCH KULTUR CCDM670, 686, 689, 695, 698, 731, 71 NA DEKARBOXYLÁZA POZITIVNÍ KMENY	40
6.2	PŮSOBENÍ PROTEKTIVNÍCH KULTUR CCDM79, 414, 416, 418, 671, 702, 945 NA DEKARBOXYLÁZA POZITIVNÍ KMENY	46
6.3	PŮSOBENÍ PROTEKTIVNÍCH KULTUR CCDM62, 82, 125, 149, 215, 340, 377 NA DEKARBOXYLÁZA POZITIVNÍ KMENY	47
7	DISKUZE.....	48
	ZÁVĚR	52
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	53
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	59
	SEZNAM OBRÁZKŮ	60
	SEZNAM TABULEK.....	61

ÚVOD

Potraviny jako jsou sýry, fermentované masné výrobky, zelenina, víno, pivo patří mezi rizikové z pohledu obsahu vysokých koncentrací biogenních aminů. Výskyt velkého množství biogenních aminů právě u těchto potravin je dán činností mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou, které jsou v procesu výroby záměrně přidávány do těchto produktů. Nadměrný příjem biogenních aminů může mít negativní dopad na zdravotní stav konzumentů. Potraviny sloužící k výživě lidí musí vykazovat zdravotní nezávadnost, také z toho důvodu vzniká snaha zabránit výskytu velkého množství biogenních aminů v potravinách.

Jednou z možných variant jak snížit koncentraci biogenních aminů v potravinách je aplikace protektivních kultur. Jedná se o mikroorganismy, které produkují bakteriociny nebo jiné látky, jež inhibují růst ostatních mikroorganismů. Předmětem této bakalářské práce bylo studium inhibičních vlivů vybraných protektivních kultur na bakterie s dekarboxylázovou aktivitou rodu *Enterococcus*, jež byly izolovány z masa a masných výrobků. Znalost a pochopení inhibičního působení protektivních kultur by mohly hrát důležitou roli v procesu výroby již zmiňovaných rizikových potravin.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 INHIBIČNÍ LÁTKY PRODUKOVANÉ MIKROORGANIZMY VYUŽÍVANÉ V POTRAVINÁŘSTVÍ

Již od dob Louise Pasteura a Roberta Kocha byla potřeba vědecky kontrolovat nežádoucí mikroorganismy v našem prostředí. Penicilin, který byl náhodou objeven Alexandrem Flemingem roku 1929, umožnil používání terapeutických antibiotik, ovšem nadměrné užívání antibiotik v posledních několika desetiletích vedlo k vyvinutí rezistence bakteriálních kmenů k antibiotikům. Z tohoto důvodu byl Evropskou unií roku 2006 odsouhlasen úplný zákaz používání antibiotických prostředků přidávaných do krmiv na podporu růstu pro hospodářská zvířata [1, 2].

V potravinářství se využívá mnoho chemických látek jako konzervačních činidel, jedná se například o kyselinu benzoovou a benzoly, sorbovou kyselinu a sorbáty, parabeny, siřičitany, dusitany a další. Spotřebitelé se neustále obávají možných nepříznivých účinků těchto látek, tudíž vyžadují potraviny čerstvé, popřípadě potraviny s dlouhou dobou minimální trvanlivosti, pro jejíž dosažení byly použity přírodní konzervační látky nebo jiné technologické operace než přídavek konzervačních látek. Tato skutečnost vedla k zahájení mnoha výzkumů zabývajících se hledáním účinných, ale přírodních konzervačních látek, mezi které patří bakteriociny [1, 3, 4].

1.1 Bakteriociny

Bakteriociny jsou ribozomálně syntetizované antibakteriální peptidy, které produkuje většina bakterií (gramnegativních i grampozitivních), rostoucích v přírodních ekosystémech, s úzkým specifickým účinkem proti kmenům stejných nebo blízce příbuzných druhů. Jsou složeny z peptidů nebo peptidových komplexů, typicky obsahujících 30 – 60 aminokyselinových zbytků a jsou v bioaktivní formě produkovány extracelulárně. Mechanismus účinku spočívá v narušení cytoplazmatické membrány, kdy dochází k vytvoření porů ve fosfolipidové dvojvrstvě. Dále může dojít k inhibici proteosyntézy, klíčení spor nebo tvorby peptidoglykanu (mureinu). Bakteriociny jsou pouze jednou kategorií látek produkováných bakteriemi, které vykazují inhibiční účinky. Již roku 1679 Antonie van Leeuwenhoek dokumentoval antibiózu, neboli vzájemné potlačování růstu a jiných životních projevů jednoho organismu druhým. Kromě bakteriocinů produkují bakterie i jiné inhibiční látky, kyseliny, které snižují pH prostředí, malé molekuly mající negativní vliv na bakterie v okolí, např. peroxid vodíku, diacetyl, hypothiokyanát (aniont $[\text{OSCN}]^-$), reuterin

(sekundární metabolit, produkovaný bakterií *Lactobacillus reuteri*), antibiotika, lytická činidla, toxiny. S tak širokým rozsahem možných inhibičních produktů se může stát, že některé inhibiční účinky nemusí být vyvolány bakteriociny. Proto při studii účinků bakteriocinů musíme vždy vědět, v jakém množství jsou přítomny organické kyseliny a dbát na odstranění jejich kyselých účinků. Některé bakterie mohou produkovat více než 1 bakteriocin např. *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus mutans* a 1 bakteriocin může být produkován různými bakteriemi. Schopnost syntetizovat jeden nebo více bakteriocinů je velmi výhodná vlastnost, která dává danému mikroorganismu příležitost pro přežití tím, že může inhibovat růst konkurenčních organismů v daném prostředí. Ukázalo se, že je výhodné pracovat s bakteriociny při aplikaci bariérové teorie, která využívá synergie kombinací více konzervačních prostředků [1, 5, 10].

1.1.1 Bakteriociny gramnegativních bakterií

Prvním objeveným bakteriocinem byl kolicin, baktericidní peptid produkovaný bakterií *Escherichia coli* a příbuznými druhy čeledi *Enterobacteriaceae*, který působí proti blízkým kmenům *Escherichia coli*. Bakteriociny produkované gramnegativními bakteriemi jsou celkově větší než bakteriociny grampozitivních bakterií, mají specifický receptor, který slouží k navázání na buňku, kterou inhibují. Mohou působit třemi různými mechanismy:

1. tvorba iontových kanálků v cytoplazmatické membráně
2. hydrolýza DNA pomocí nukleáz
3. inhibice proteosyntézy [1, 5].

1.1.2 Bakteriociny grampozitivních bakterií

Bakteriociny produkované grampozitivními bakteriemi obvykle nemají specifický receptor pro navázání buňky, ale existují i výjimky. Většinou mají nižší molekulovou hmotnost než bakteriociny produkované gramnegativními bakteriemi. Běžně se rozdělují do 4 tříd [1].

1.1.2.1 Třída I – lantibiotika

Lantibiotika jsou malé (< 5 kDa) peptidy, obsahují neobvyklé aminokyseliny lanthionin, methyllanthionin, dehydroalanin a dehydrobutyrin a podstupují rozsáhlé posttranslační úpravy. Většina těchto bakteriocinů má poměrně široké spektrum účinku, neinhibují pouze příbuzné bakterie patřící do rodů *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, účinkují také proti méně příbuzným grampozi-

tivním bakteriím, jako jsou *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* a *Clostridium botulinum*. Některé bakteriociny této třídy, např. nisin a termofilin 13, brání vyklíčení spor *Bacillus cereus* a *Clostridium botulinum*. Bakteriociny patřící do této třídy se dále dělí podle chemické struktury a antimikrobiální aktivity na 2 typy A a B [1, 5, 13].

1. Lantibiotika typu A

Do této skupiny řadíme prodloužené lineární hydrofobní peptidy s kladným nábojem. Jejich účinek spočívá ve vytvoření pórů, které jsou plně propustné pro veškeré látky, čímž dochází ke ztrátě protonmotivní síly (protonového gradientu), membránového potenciálu a látek nutných k existenci buňky, zejména intracelulárního ATP a aminokyselin [1, 6, 8].

2. Lantibiotika typu B

Lantibiotika typu B jsou menší kulaté peptidy mající negativní nebo nulový náboj. Antimikrobiální aktivita souvisí s inhibicí specifických enzymů [1, 8].

1.1.2.2 Třída II

Tato třída je třídou nejpočetnější a nejvíce prostudovanou. Řadíme zde malé (< 10 kDa) kulaté tepelně stabilní peptidy, které neobsahují lanthion a nepodléhají následným posttranslačním úpravám. Jsou rozděleny do 3 podskupin [1, 6, 13].

1. Třída II–a

Tato třída, označovaná také jako cystibiotika, zahrnuje peptidy podobné pediocinu, obsahující ve své molekule cystein. A to minimálně 2 cysteinové zbytky, které mezi sebou vytvářejí disulfidové můstky. Přičemž pediocin PA-1, enterocin A a divercin V41 vynikají tím, že obsahují o jeden pár cysteinových zbytků více, mají tedy i o jednu disulfidovou vazbu víc. Tyto bakteriociny mají poměrně úzké spektrum účinku, to znamená, že inhibují pouze úzce příbuzné grampozitivní bakterie. Obecně platí, že rody *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* jsou na bakteriociny této třídy velmi citlivé, naproti tomu rod *Lactococcus* je více rezistentní. Bylo zjištěno, že pediocin PA-1 inhibuje různé druhy *Enterococcus*, *Lactobacillus* a *Pediococcus*, avšak pouze jeden z 11 testovaných druhů *Lactococcus*. Tato podskupina je významná svým účinkem proti listerii, proto se předpokládá, že budou dalšími bakteriociny schválenými pro využití v potravinářství. Prozatím je jejich aplikace do potravin pouze ve fázi testování. Všechny bakteriociny třídy II–a jsou produ-

kovány bakteriemi mléčného kvašení. Samotné produkující kmeny jsou proti bakteriocinům imunní, díky syntéze proteinů, které obsahují 88 – 114 aminokyselin [1, 6].

2. Třída II–b

Dvoupeptidové bakteriociny, které ke své plné funkci vyžadují přítomnost dvou různých peptidů [7].

3. Třída II–c

Tato třída zahrnuje všechny zbývající nízkomolekulární bakteriociny, které nepatří do předešlých dvou podskupin [1].

1.1.2.3 Třída III

Bakteriociny patřící do této třídy nejsou moc dobře charakterizovány. Jedná se o velké (>30 kDa), tepelně labilní proteiny [1].

1.1.2.4 Třída IV

Bakteriociny třídy IV jsou komplexní bakteriociny, jejichž molekula se skládá z proteinové části a části neproteinové, která může být tvořena např. lipidy, sacharidy, polysacharidy [1, 7].

Zástupce jednotlivých tříd popřípadě podtříd bakteriocinů spolu s produkujícími kmeny nalezneme v *Tab. 1*.

Tab. 1 Příklady bakteriocinů a produkujících kmenů jednotlivých tříd [1, 7]

BAKTERIOCIN	PRODUCENT
Třída I-typ A lantibiotika	
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
lactocin S	<i>Lactobacillus sakei</i>
lacticin 3147	<i>Lactococcus lactis</i>
thermophilin 13	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Třída I-typ B lantibiotika	
Mersacidin	<i>Bacillus subtilis</i>
Cinnamycin	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
Ancovenin	<i>Streptomyces</i> sp.
Duramycin	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
Actagardin	<i>Actinoplanes</i> sp.
Třída II-a	
pediocin PA-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>
sakacin A	<i>Lactobacillus sakei</i>
sakacin P	<i>Lactobacillus sakei</i>
mesentericin Y105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
enterocin A	<i>Enterococcus faecium</i>
divercin V41	<i>Carnobacterium divergens</i>
lactococcin MFII	<i>Lactococcus lactis</i>
Třída II-b	
lactococcin G	<i>Lactococcus lactis</i>
lactococcin M	<i>Lactococcus lactis</i>
lactacin F	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
plantaricin A	<i>Lactobacillus plantarum</i>
plantaricin S	<i>Lactobacillus plantarum</i>
plantaricin EF	<i>Lactobacillus plantarum</i>
plantaricin JK	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Třída II-c	
acidocin B	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
carnobacteriocin A	<i>Carnobacterium piscicola</i>
divergicin A	<i>Carnobacterium divergens</i>
enterocin P	<i>Enterococcus faecium</i>
enterocin B	<i>Enterococcus faecium</i>
Třída III	
helveticin J	<i>Lactobacillus helveticus</i>
helveticin V-1829	<i>Lactobacillus helveticus</i>

1.1.3 Antimikrobiální peptidy eukaryot

Eukaryotické mikroorganismy jsou taktéž schopny produkovat antibakteriální peptidy, které slouží jako ochrana před infekcí nebo proti konkurenci, přičemž hostitele chrání různými mechanismy účinku. Nejčastěji jde o porušení semipermeability cytoplazmatické membrány, která se stává propustnou, což vede k nevratnému úniku buněčného materiálu a následné smrti buňky. Produkce těchto peptidů je součástí imunity. Eukaryotické peptidy vykazují různý stupeň toxicity, např. defensiny, které jsou produkovány lidskými neutrofilny (bílé krvinky, které se řadí mezi granulocyty) a jsou ve vysokých koncentracích cytotoxické vůči produkujícím buňkám. Právě díky své toxicitě jsou tyto peptidy nevhodné pro použití v potravinářském průmyslu [9, 10].

1.1.4 Rozdíl mezi bakteriociny a antibiotiky

Bakteriociny jsou v literatuře často zaměňovány za antibiotika, to by ale znemožňovalo jejich použití v potravinářském průmyslu, protože antibiotika se v potravinách vyskytovat nesmějí. Tudíž je rozlišení těchto pojmů velmi důležité. Rozdíl je již v samotné aplikaci. Bakteriociny se přidávají do potravin, kdežto antibiotika nám slouží jako léky a jsou to sekundární metabolity mikroorganismů, zatímco bakteriociny jsou syntetizovány ribozomálně a mají velice úzké spektrum účinku. Spektrum účinku antibiotik je širší. Hostitelské buňky vykazují imunitu na bakteriociny, nikoli na antibiotika. Rezistence na bakteriociny je zajištěna strukturální změnou membrány. Organismy vykazující rezistenci na antibiotika nemusí být rezistentní na bakteriociny. Zatím nebyla zaznamenána toxicita bakteriocinů, což neplatí pro antibiotika [1, 10].

1.1.5 Bakteriociny v mase a masných výrobcích

Bakteriociny by neměly být používány jako jediná konzervační činidla, ale spíše jako součást více překážek bariérového systému. Bakterie mléčného kvašení se běžně vyskytují v mase, a proto byly bakteriociny těchto bakterií důkladně zkoumány a izolovány, přičemž jedním z nejlépe prozkoumaných je nisin. Dusitany a dusičnany mohou být přirozenou složkou potravin, zejména rychle rostoucí zeleniny, jako jsou saláty, při jejichž pěstování byla použita dusíkatá hnojiva a tyto látky se pak dostávají kořenovým systémem z půdy do rostliny. Dusitany a dusičnany se záměrně přidávají do masa a masných výrobků, z důvodu inhibice sporulujících bakterií zejména proto, že napomáhají udržovat spotřebiteli požadovanou červenou či růžovou barvu masa. Dusičnany nepředstavují pro dospělé osoby zá-

važnější riziko, protože jejich nadbytek se z těla snadno vyloučí močí. Problém nastává, jestliže v organismu dojde k redukci dusičnanů na dusitany, které následně mohou reagovat s aminokyselinami za vzniku nitrozaminů, sloučenin vykazujících karcinogenní, teratogenní a mutagenní účinky. Obavy ze zdravotní závadnosti těchto sloučenin vedly k hledání nových alternativních metod konzervace. Řešením by mohla být kombinace nisinu spolu s nižšími dávkami dusičnanů. Dále byly zkoumány účinky nisinu na bakterii *Listeria monocytogenes*, nesporulující, fakultativně anaerobní bakterii, která je hojně rozšířena v prostředí. Dokáže růst v širokém rozmezí pH 4,1 – 9,6 i teploty 0 – 45 °C, roste tedy při chladírenských teplotách. Je velmi odolná vůči vysychání a roste při vysokých koncentracích NaCl (přežívají i v prostředí s koncentrací NaCl 25%). Odolává i nízké vodní aktivitě ($a_w = 0,9$). Kvůli její vysoké odolnosti a patogenitě je považována za jeden z hlavních problémů z hlediska bezpečnosti potravin. Způsobuje onemocnění zvané listerióza, které může mít fatální průběh končící smrtí a v případě těhotných žen hrozí nebezpečí potratu. *Listeria monocytogenes* se běžně vyskytuje v mase syrovém, ale také ve vařených a hotových masných výrobcích. Proběhla řada výzkumů, ve kterých byl testován účinek nisinu společně s různými kombinacemi NaCl, pH, teploty a vlivu modifikované atmosféry. Tyto výzkumy poskytovaly poměrně slibné výsledky v eliminaci této bakterie [10, 11].

1.1.6 Bakteriociny v obalech

V posledních desetiletích se vědci aktivně ve výzkumech věnovali začlenění bakteriocinů do obalových fólií z důvodu zabránění kontaminace potravin patogenními mikroorganismy a mikroorganismy způsobujícími kažení potravin. Antimikrobiální balicí fólie zabraňuje růstu mikroorganismů na povrchu potravin v místech, kde je fólie v přímém kontaktu s potravinou. Ukázalo se, že nejúčinnější je pozvolné uvolňování bakteriocinů z obalů na povrch potraviny, protože jinak může být antimikrobiální aktivita snížena nebo úplně redukována v důsledku inaktivace bakteriocinů složkami potravin. Existují 2 způsoby pro přípravu obalů obsahující bakteriociny:

1. začlenění bakteriocinů přímo do polymeru
2. vytvoření nátěru (povlaku) bakteriocinu na povrchu fólie [10].

1.1.7 Enterociny

Enterociny jsou bakteriociny produkované enterokoky a jsou zvláště účinné proti listeriím, klostridiím a stafylokokům.

Jedná se například o:

- cytotoxin – třída I, produkován bakterií *Enterococcus faecalis*
- enterocin A, enterocin P, enterocin CRL35 – třída II–a, produkovány bakterií *Enterococcus faecium*
- mundticin – třída II-c, produkován bakterií *Enterococcus mundtii*
- enterocin AS–48, enterocin B, enterocin L50 A, enterocin L50 B, enterocin Q – mají neobvyklé strukturální či genetické znaky, kterými se odlišují od známých bakteriocinů, proto je nelze zařadit do klasického rozdělení. Jsou produkovány bakterií *Enterococcus faecium* [12, 14].

Z důvodu nemožného zařazení některých enterocinů do tříd bakteriocinů, bylo navrženo nové zjednodušené rozdělení, založené na struktuře a podobnosti aminokyselinové sekvence bakteriocinů [14].

Enterokoky jsou přirozenou součástí gastrointestinálního traktu živočichů a jsou považovány za indikátory fekálního znečištění vody a potravin. Mohou být také původci nozokomiálních nákaz a velké množství kmenů vykazuje rezistenci na antibiotika. Nicméně hrají velmi důležitou roli při zrání sýrů a výrobě fermentovaných masných výrobků, díky tomu, že jsou odolné vůči nepříznivým chemickým i fyzikálním podmínkám (přežívají vysoké i nízké teploty, vysoké koncentrace soli). V sýrařství je důležitá inhibice bakterie *Clostridium tyrobutyricum*, která způsobuje nežádoucí pozdní dužení sýrů. Enterociny tedy mají dobrý předpoklad pro užití jako konzervační látky pro sýry a zeleninu [13, 14].

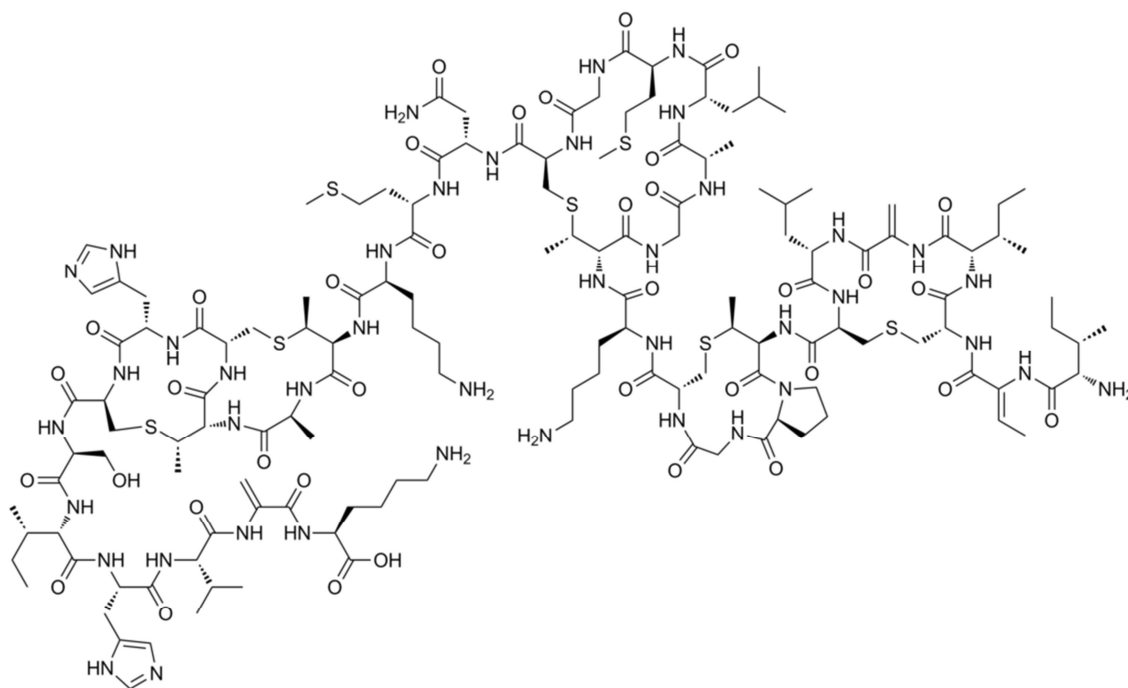
1.1.8 Nisin

Bakteriociny produkované grampozitivními bakteriemi jsou nejvíce zkoumány kvůli jejich potenciálu pro komerční využití v potravinách. Mezi nejdůležitější a nejvíce prozkoumané patří nisin, který je používán již dlouho a je účinný proti původcům alimentárních onemocnění. Již v dávných dobách docházelo při výrobě sýru ke špatnému nebo pomalému kysání mléka, což bylo způsobeno hlavně bakteriofágy, ale bylo také zjištěno, že některé mléčné laktokoky (původně streptokoky) mohou inhibovat růst ostatních. Roku 1928 byl poprvé zjištěn pravděpodobný inhibiční efekt nisinu. O 23 let později byl nisin poprvé testován jako konzervační prostředek, avšak až roku 1988 jej schválil FAD (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) pro použití do pasterizovaných tavených sýrů a salátových dresingů. Nisin je peptid, který se skládá z 34 aminokyselin (*Obr. 1*) a vyskytuje se v šesti různých formách označovaných písmeny A až E, produkován bakterií *Lactococcus lac-*

tis subsp. *lactis*. Nejreaktivnější formou je nisin A, který se od přírodní formy označované písmenem Z liší substitucí histidinu za kyselinu asparagovou [1, 14].

Nisin řadíme do třídy I – lantibiotika typu A. Mechanismus účinku spočívá ve vytvoření pórů v membráně buňky. Obvykle nemá žádný vliv na gramnegativní bakterie, kvůli neschopnosti nisinu proniknout přes vnější membránu k membráně cytoplazmatické, avšak společným působením nisinu a ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA) inhibuje i tyto bakterie. Dále běžně neinhibuje kvasinky a plísně. Za normálních podmínek tedy působí pouze na grampozitivní bakterie a to konkrétně na bakterie mléčného kvašení a patogeny, jako jsou *Listeria*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, sporulující bakterie *Bacillus* a *Clostridium*, přičemž spory těchto bakterií jsou na nisin citlivější než jejich vegetativní formy. Nejcitlivější je nisin na spory, které jsou narušeny působením vysokých teplot a nacházejí se v kyselém prostředí, proto se nisin nejčastěji používá v konzervářském průmyslu. Mechanismus, kterým nisin zabraňuje klíčení spor, není zcela znám, ale předpokládá se, že inhibice je způsobena vazbami nisinu na sulfhydrylové skupiny [14].

Použití nisinu jako konzervantu je schváleno ve více než padesáti zemích. Výbor WHO stanovil maximální denní dávku nisinu 0,86 mg/kg hmotnosti dospělého člověka. Nisin se běžně přidává do konzervovaných polévek, ledu pro uchování čerstvých ryb, majonéz, mléčných výrobků a konzerv [1, 14].



Obr. 1 Struktura nisinu [15]

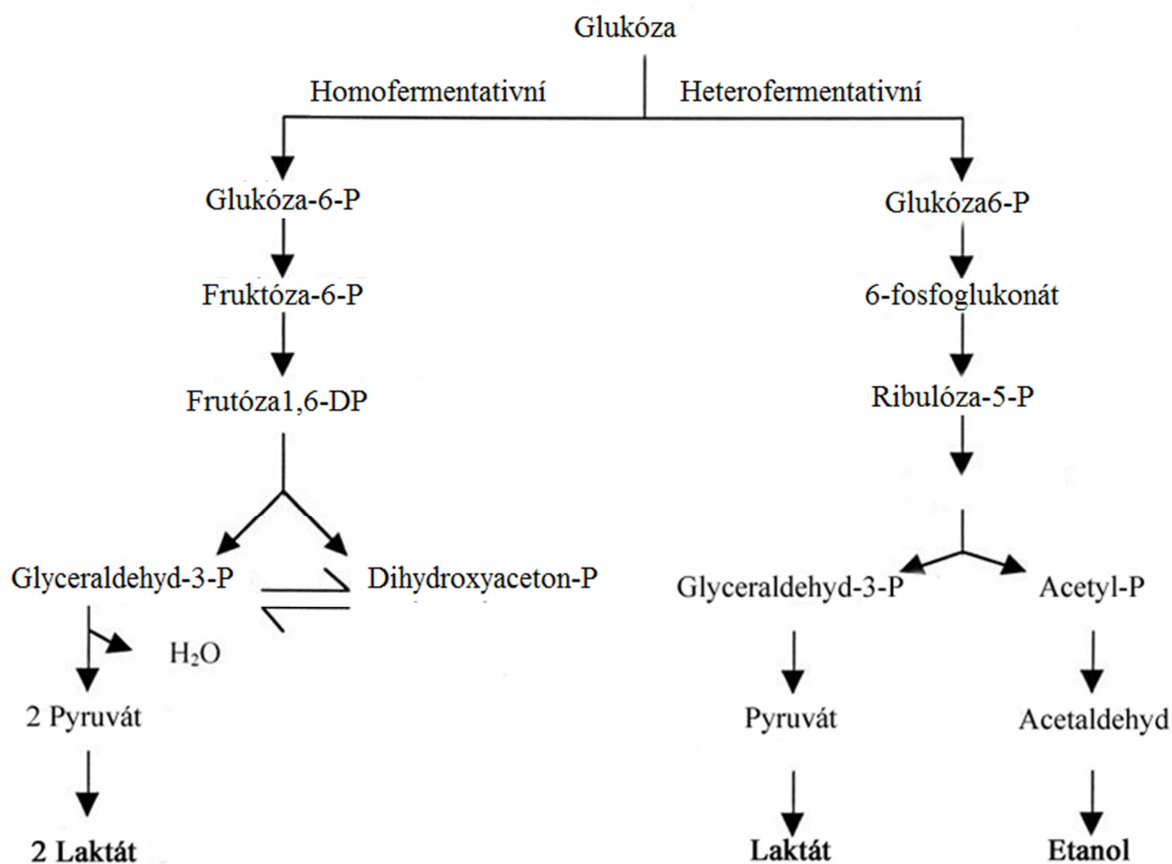
2 PROTEKTIVNÍ KULTURY

Protektivní neboli ochranné kultury jsou mikroorganismy, jejichž metabolické produkty inhibují či regulují růst nežádoucích bakterií, kvasinek nebo plísní v potravinách. Tyto nežádoucí mikroby mohou mít toxigenní či patogenní vlastnosti a mohou způsobovat kažení potravin [16].

Ochranné kultury jsou součástí startovacích kultur, zodpovědných za kvašení při výrobě fermentovaných potravin. Tyto potraviny mají mnohem delší trvanlivost, než potraviny nefermentované, to je dáno právě produkty metabolismu startovacích kultur, jako jsou organické kyseliny, peroxid vodíku, diacetyl, reuterin a bakteriociny. Ovšem tyto kultury nevytváří pouze látky inhibiční, ale také látky ovlivňující organoleptické vlastnosti výrobku [16].

2.1 Bakterie mléčného kvašení (BMK)

Bakterie mléčného kvašení tvoří heterogenní skupinu mikroorganismů, jejichž hlavním společným znakem je produkce kyseliny mléčné z různých substrátů. Řadíme zde grampozitivní, fakultativně anaerobní, nesporulující koky nebo tyčinky, schopné růstu při nízkých hodnotách pH. Na základě konečných produktů fermentace sacharidů se dělí na homofermentativní a heterofermentativní. Homofermentativní BMK, u nichž fermentace sacharidů probíhá po Embden-Meyerhof-Parnasově (EMP) dráze, produkují hlavně kyselinu mléčnou (*Obr. 2*). Patří zde *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* a některé laktobacily. Zatímco heterofermentativní BMK produkují kyselinu mléčnou zhruba z 50% a dále tvoří kyselinu octovou, CO₂, etanol a další látky (*Obr. 2*), k jejichž produkci využívají EMP nebo 6-fosfoglukonát/fosfoketolázovou dráhu. Do této skupiny řadíme rody *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus* a některé laktobacily [17, 19].



Obr. 2 Průběh homo a heterofermentativního kvašení [19]

BMK jsou hojně rozšířeny, přirozeně se vyskytují v mléce, zažívacím a urogenitálním traktu lidí a zvířat, jsou součástí rostlin a mnohých potravin. Především jsou využívány pro výrobu fermentovaných výrobků, ale některé druhy slouží také jako probiotika [17, 18].

2.1.1 Rod *Lactobacillus*

Je velice rozmanitá skupina, čítající více než 80 druhů. Patří do čeledi *Lactobacillaceae* a jedná se o grampozitivní, fakultativně anaerobní tyčinky. Produkují kyselinu mléčnou, přičemž druhy *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* patří mezi homofermentativní BMK a druhy *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus fermentum* jsou heterofermentativní. Tento rod je tedy velmi významný v potravinářském průmyslu pro výrobu kysaných mlék, jogurtů, sýrů, kvašeného zelí, okurek a dalších produktů. Avšak důležitou roli hraje také v průmyslu farmaceutickém, kde slouží jako probiotika (např. *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*) [20, 21].

2.1.2 Rod *Lactococcus*

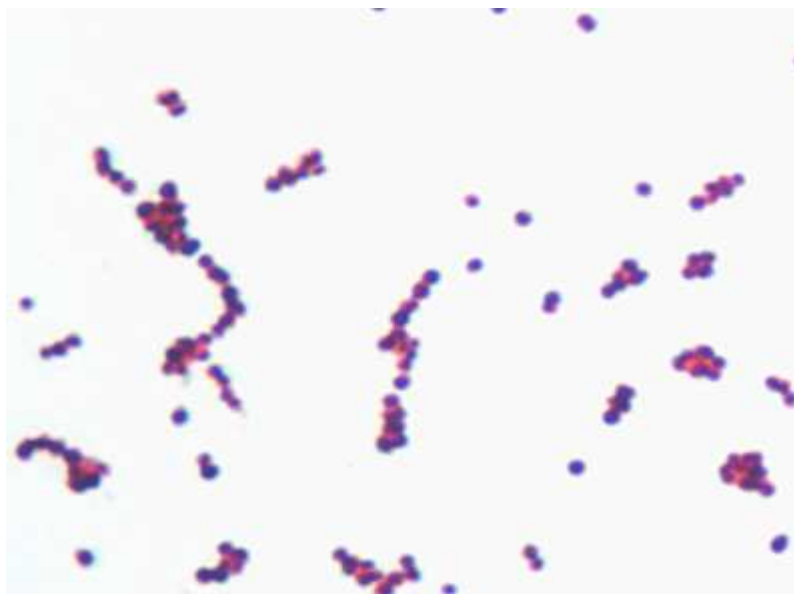
Zástupci toho rodu jsou grampozitivní, kataláza-negativní, fakultativně anaerobní koky, vyskytující se samostatně, v párech nebo řetězcích. Dříve byly považovány za součást rodu *Streptococcus*, avšak roku 1985 byly s této skupiny vyčleněny. Jedná se o homofermentativní BMK. Je známo 7 druhů, a to *Lactococcus lactis* (má 4 poddruhy, z nichž nejdůležitější jsou *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus chuangangensis*, *Lactococcus fuisi* [22, 23].

Laktokoky jsou hojně rozšířeny v mléce a mléčných výrobcích, jsou součástí rostlin, hmyzu, ryb a živočichů. Podobně jako laktobacily jsou využívány pro výrobu fermentovaných potravin [24].

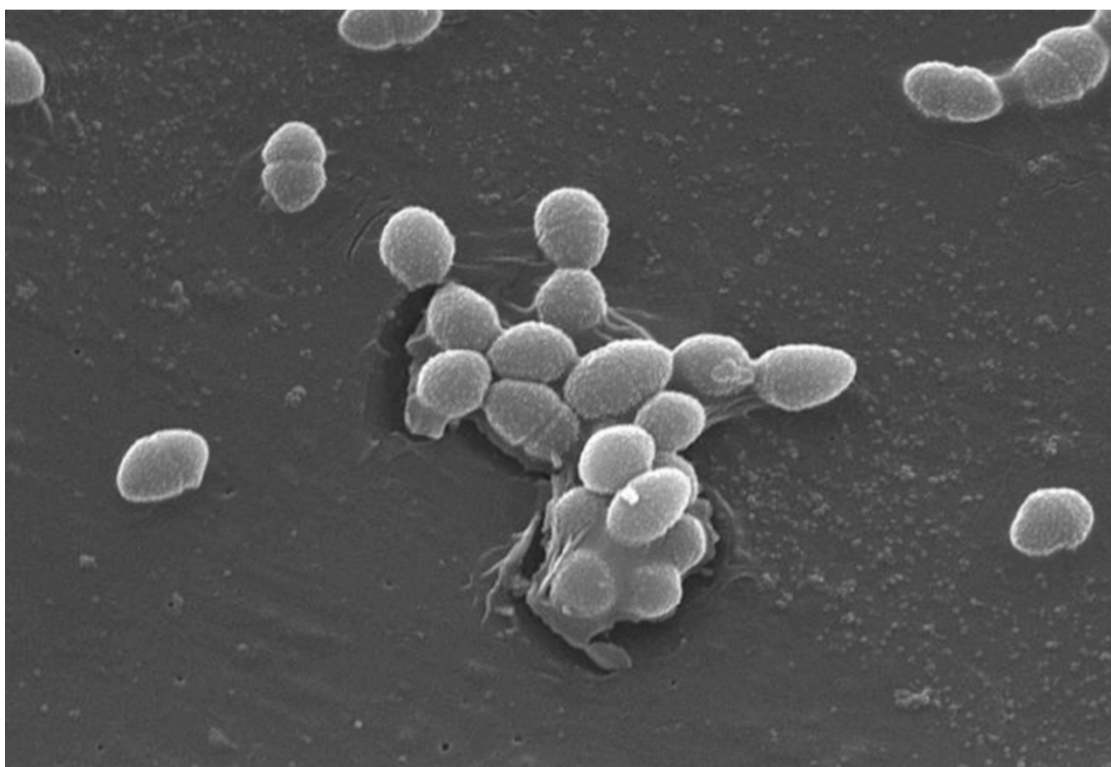
3 CHARAKTERISTIKA RODU *ENTEROCOCCUS*

Enterokoky jsou grampozitivní (*Obr. 3*), kataláza-negativní, oxidáza-negativní, fakultativně anaerobní, nesporulující koky. Jsou zpravidla oválného tvaru a mohou se vyskytovat v krátkých řetězcích, dvojicích nebo jako jednotlivé buňky. Většina druhů dokáže hydrolyzovat eskulin v přítomnosti žlučových solí (40%). Produkují bakteriociny, nazývané enterociny, které byly blíže popsány v kapitole 1.1.7. Produkují kyselinu mléčnou jakožto konečný produkt fermentace glukózy, patří tak mezi bakterie mléčného kvašení. Rod *Enterococcus* je nejrozporuplnější skupinou bakterií mléčného kvašení, a to proto, že má zásadní význam při zrání mnoha druhů sýrů, užívá se jako probiotikum, ale na druhou stranu mohou být některé kmeny původci nozokomiálních (nemocničních) nákaz, produkovat virulentní faktory a být rezistentní k některým antibiotikům [13, 27].

Původně byly enterokoky známy jako D skupina streptokoků, avšak roku 1980 bylo na základě DNA –DNA a DNA –RNA hybridizace prokázáno, že enterokoky se od streptokoků odlišují geneticky i fenotypově a byly z této skupiny vyčleněny. Dnes je známo více než 28 druhů enterokoků a to např. *E. asini*, *E. avium*, *E. canis*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. Ratti*, *E. saccharolyticus*, *E. saccharominimus*, *E. solitarius*, *E. sulfureus*, a *E. villorum* [27]. Snímek bakterie *Enterococcus faecalis* zachycený pomocí elektronového mikroskopu lze pozorovat na *Obr. 4*.



Obr. 3 Enterococcus durans – preparát barven dle Grama [29]



Obr. 4 Snímek bakterie *Enterococcus faecalis* pořízen pomocí skenovacího elektronového mikroskopu [28]

3.1 Fyziologie

Rod *Enterococcus* běžně roste v rozmezí teplot 0 – 45 °C a přežívá záhřev 60 °C po dobu 30 minut v neutrálním médiu. Optimální podmínky pro růst enterokoků jsou 37 °C a pH 7,5. Snáší nízkou vodní aktivitu, je schopen růstu v přítomnosti NaCl (6,5 %) a při pH 9,6. Tohoto kritéria se běžně využívá pro odlišení enterokoků od streptokoků a laktokoků. Vyskytují se hojně v potravinách, kde mohou produkovat biogenní aminy (látky vznikající z volných aminokyselin účinkem mikroorganismů, vykazujících dekarboxylázovou aktivitu) [25].

3.2 Patogenita

Enterokoky byly uznány jako potenciálně patogenní mikroorganismy na přelomu 20. století. Mají schopnost přizpůsobit se životnímu prostředí a nepříznivým podmínkám. Jsou také známy svou rezistencí na antibiotika, která se neustále zvyšuje. Mají jak přirozenou rezistenci (specifická pro kmen či druh), tak i získanou (vznik mutací původní bakteriální DNA a její následné předání dceřiným buňkám), tato vlastnost je velmi důležitá pro nosokomiální patogeny, jako jsou *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. gallina-*

rum, *E. casseiflavus*, *E. raffinosus*, *E. mundtii*. Tyto bakterie jsou odolné vůči tradičně užívaným antibiotikům (ampilicin, vankomycin, cefalosporiny, penicilin, aminoglykozidy). Mezi nejvýznamnější onemocnění způsobená enterokoky patří: infekce močových cest, nozokomiální infekce a superinfekce, meningitida, bakteriální endokarditida, bakteriémie [25, 26].

3.2.1 Enterokoková endokarditida

Endokarditida je zánět endokardu. Jedná se o závažné onemocnění vedoucí k úmrtí 20 – 30 % pacientů, které se projevuje embolií, krvácením do spojivek, zánětem ledvin, nitrolebním krvácením, srdečním selháním. Nejčastěji je vyvolána druhem *Enterococcus faecalis*. Léčba spočívá v podávání vysokých dávek antibiotik po velmi dlouhou dobu (nejméně jeden měsíc). Druh antibiotik se odvíjí od mikrobiálního původce a zjištěné citlivosti [30].

3.2.2 Bakteriémie

Při bakteriémii jsou bakterie přítomny v krvi. Krev je za normálních podmínek sterilní. Bakterie mohou do krevního řečiště vstupovat v průběhu operace, pomocí katétrů, jehel či jiných cizích těles vstupujících do žil (časté u narkomanů), při bakteriálním zápalu plic (přechod bakterií z plic, jakožto velice dobře prokrveného orgánu, do krve). Projevuje se sepsemi (otrava krve) a septickými šoky (organizmus reaguje velmi agresivně proti bakteriím a spolu se škodlivými účinky bakterií může dojít k úmrtí pacienta) [26, 31].

3.3 Enterokoky jako probiotika

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které jsou záměrně přidávány do potravin, vykazují příznivý účinek na zdraví konzumenta a zajišťují rovnováhu střevní mikroflóry. Přidávají se do jogurtů, fermentovaných i nefermentovaných mlék, kojenecké výživy, farmaceutických prostředků. Probiotická mikroflóra má velké množství příznivých účinků: zvyšování imunity, zajištění rovnováhy střevní mikroflóry, prevence rakoviny střev, léčba průjmu vzniklého v důsledku užívání antibiotik, prevence vředů. Kmeny, které lidé využívají jako probiotika, byly izolovány z lidského gastrointestinálního traktu a obvykle se jedná o zástupce rodů *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, z rodu *Enterococcus* jsou to hlavně *Enterococcus faecium* a *Enterococcus faecalis*. Avšak narůstající rezistence enterokoků k antibiotikům vede k obavám z jejich užívání jakožto probiotik [27].

3.4 Výskyt enterokoků v potravinách

Jak již bylo zmíněno, v gastrointestinálním traktu lidí a zvířat se vyskytují *Enterococcus faecalis* a *E. faecium*, avšak výskyt těchto druhů v potravinách nemusí nutně ukazovat na znečištění fekáliemi, protože odolnost enterokoků k pasteračním teplotám a schopnost přizpůsobovat se různým substrátům umožňuje těmto bakteriím kolonizaci mnoha potravin. Enterokoky se běžně vyskytují v syrovém mléce a mléčných výrobcích. Mléko je ideálním médiem pro růst těchto mikroorganismů. Ve velkém množství mohou být přítomny v sýřenině a zrajících sýrech, kde hrají velmi důležitou roli díky jejich proteolytické a lipolytické aktivitě, kterými přispívají k vývoji typické chuti a vůni těchto sýrů. Mnoho výzkumů také potvrdilo jejich výskyt v pasterovaném a UHT mléku [25, 27].

Dále se vyskytují v mase a masných výrobcích. Do syrového masa enterokoky přechází při porážce, proříznutím střev a následným potřísněním svaloviny jejich obsahem, prostřednictvím řezných ran a vpichů. Nacházejí se i v tepelně opracovaných masných výrobcích, kdy se po přežití vysokých teplot mohou podílet na kažení těchto výrobků. Ve středomořských oblastech vyrábějí místní řezníci fermentované masné výrobky bez použití startovacích kultur. Za fermentaci odpovídá přirozeně se vyskytující mikroflóra masa (rody *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* a kvasinky), která umožňuje vznik typických organoleptických vlastností produktů [25, 26, 27].

Enterokoky byly izolovány ze zeleniny a z oliv a jsou přítomny také v zelenině fermentované. Do fermentovaných potravin se přidávají záměrně jakožto startovací kultury, ale také jako kultury protektivní, které svou schopností produkovat bakteriociny inhibují růst nežádoucích patogenů, jako je *Listeria monocytogenes* [24, 25, 27].

4 PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ ENTEROKOKY

Biogenní aminy jsou organické báze s aromatickou, alifatickou či heterocyklickou strukturou, které vznikají dekarboxylací aminokyselin. Jsou přítomny v prokaryotických i eukaryotických buňkách a vyskytují se přirozeně v malých koncentracích v potravinách (původem z tkání a pletiv), ale také se do potravin dostávají činností mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou. Tyto mikroorganismy se v potravinách mohou vyskytovat přirozeně, nebo do nich vnikají v průběhu technologického zpracování, jakožto sekundární kontaminanty. Aktivitu a syntézu dekarboxylázových enzymů ovlivňuje teplota, přítomnost volných aminokyselin, vodní aktivita, pH, koncentrace NaCl a redoxní potenciál. Schopnost produkovat biogenní aminy závisí na daném bakteriálním kmenu, zda dokáže produkovat příslušné dekarboxylázové enzymy. Dekarboxylázovou aktivitu vykazují mnohé bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, jako je *Escherichia coli*. Dále se jedná o rody: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Carnobacterium* a další. Z biogenních aminů se nejvíce sledují histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, tryptamin, spermin a spermidin, kdy jejich vysoká koncentrace v potravinách jako jsou ryby, sýry, víno, pivo, fermentované masné výrobky a zelenina, může indikovat zvýšený výskyt kontaminující mikroflóry [32, 33, 34].

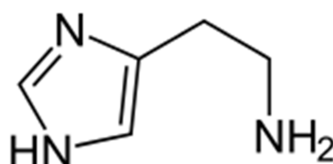
4.1 Účinky biogenních aminů na člověka

Biogenní aminy mají jak pozitivní, tak i negativní dopad na organismus člověka. Hrají důležitou roli při syntéze bílkovin, ovlivňují krevní tlak, působí jako lokální hormony a neurotransmitery. Neurony, krevní a žírné buňky obsahují histamin. Avšak konzumace potravin s vysokými koncentracemi biogenních aminů může být pro člověka toxická. U citlivých jedinců, či lidí, kteří užívají léky působící jako antidepresiva (inhibitory monoaminoxidáz), popřípadě mající nedostatek aminooxidáz (enzymy způsobující degradaci biogenních aminů), který může být způsoben užíváním drog, alkoholu či nemocemi gastrointestinálního traktu, mohou způsobovat potíže i nízké koncentrace biogenních aminů. Mezi typické příznaky signalizující nadměrný příjem biogenních aminů patří potíže s dýcháním, pocení, bolesti hlavy, pálení v ústech, kopřivka, nevolnost, zvracení, zvýšení či snížení krevního tlaku [32, 33, 34, 35, 36, 37].

4.2 Histamin

Histamin společně s tyraminem patří mezi nejprostudovanější biogenní aminy, díky jejich vazoaktivním (působící na cévy) a psychoaktivním (ovlivňující psychiku) účinkům a spojitostí s potravinovými otravami. Byl uznán jako původce tzv. scombroid otravy (otrava vznikající po konzumaci zkažených ryb, či jiných mořských plodů) [38, 39].

Histamin vzniká dekarboxylací aminokyseliny histidinu. Po chemické stránce se jedná o imidazolethylamin (*Obr. 5*). Silně histamin produkující druhy jsou *Morganella*, *Klebsiella*, *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* i *Enterococcus*. Jeho nadměrné uvolňování při alergických reakcích způsobuje kopřivku a zúžení průdušek, proto je nutné potlačit jeho působení při léčbě alergií [38, 40].

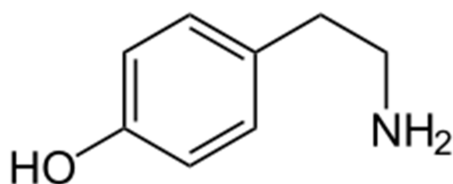


Obr. 5 Histamin [41]

4.3 Tyramin

Tyramin (*Obr. 6*) vzniká dekarboxylací tyrozinu a ve velké míře se vyskytuje ve fermentovaných výrobcích. Výskyt tyraminu v potravinách závisí na koncentraci volného tyrozinu a přítomnosti mikroorganismů, majících tyrozin-dekarboxylázovou aktivitu. Technologické zpracování potravin a zrací procesy také ovlivňují koncentraci tyraminu v potravinách. Je tudíž nutné určit vliv vnějších faktorů na růst a produkci tyraminu mikroorganismy. Například růst a produkce tyraminu u bakterie *Enterococcus faecium* jsou nejvíce ovlivňovány účinkem pH. Častými producenty tyraminu jsou rody *Enterococcus*, *Carnobacterium* a *Lactobacillus* [36, 38, 42].

Toxické dávky tyraminu v potravinách se pohybují okolo 20 – 80 mg/kg potravin. Rozpětí je poněkud široké, protože zohledňuje individuální působení tohoto aminu na každého jedince. Startovací kultury mohou zvyšovat množství tyraminu, ale i jiných biogenních aminů v potravinách, proto je k tomuto účelu nutné zvolit mikroorganismy nevykazující dekarboxylázovou aktivitu [43].



Obr. 6 Tyramin [44]

4.4 Detekce biogenních aminů

Přítomnost biogenních aminů může být detekována různými metodami. Například pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, hmotnostní spektrometrie, tenkovrstvé chromatografie či enzymatického testu. Vzhledem k nepříznivým účinkům biogenních aminů na zdraví konzumenta je jejich včasná detekce pro potravinářský průmysl velmi důležitá [40].

V klasickém postupu identifikace, například tyraminu, se nechají mikroorganismy s tyrozin-dekarboxylázovou aktivitou kultivovat v jejich optimálním médiu, které je obohaceno o tyrozin v přesně definovaném množství a slouží jako substrát pro dekarboxylaci. Následně se stanovuje, zda byl vytvořen tyramin, popřípadě v jakém množství. Rychlou a nejvíce využívanou metodou pro zjištění přítomnosti tyraminu je izokratická vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – high-performance liquid chromatography). Jedná se o chromatografickou techniku, sloužící k separaci složek vzorku za účelem stanovení jejich přítomnosti a koncentraci [46].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 MATERIÁLY A METODY

5.1 Zařízení

- Autokláv VARIOKLAV
- Automatický dávkovač
- Automatické pipety
- Bakteriologická klička
- Biologický termostat MEMMERT
- Biohazard box TELSTAR
- Centrifuga HETTICH ROTANTA 460
- Exikátor
- Injekční jehla Terumo modrá 0,6mm x 30mm
- Laboratorní předvážky KERN
- Laboratorní sklo a plasty (zkumavky, Petriho misky, eppendorfkové mikroskopické zkumavky)
- Lednička Elektrolux
- pH metr pH Spear
- Vortex
- Zařízení pro deionizaci vody Aqua Osmotic

5.2 Materiál

5.2.1 Živná média

- M-17 (Merck)
 - použití: 42,5 g na 1000 ml
 - pH: $7,2 \pm 0,2$ při 25°C
 - Pro přípravu 400 ml média M-17 bylo třeba použít navážku 17 g.
- MRS (Merck)
 - použití: 52,2 g na 1000 ml
 - pH: $5,7 \pm 0,2$ při 25°C
 - Pro přípravu 300 ml média MRS bylo třeba použít navážku 15,66 g.

5.2.2 Chemikálie

- 0,6 M HCl a 10% NaOH pro úpravu pH
- Fyziologický roztok
příprava: 8,5 g NaCl na 1000 ml destilované vody
- Destilovaná voda pro přípravu živných médií a fyziologického roztoku

5.2.3 Použité mikroorganismy

Producenti biogenních aminů - tyto bakteriální kmeny byly testovány na citlivost vůči vybraným protektivním kulturám a byly získány ze sbírky Ústavu inženýrství životního prostředí Fakulty technologické UTB. Kmeny byly izolovány z masa a masných výrobků.

Enterococcus durans B151

Enterococcus durans B152

Enterococcus durans B153

Enterococcus durans B154

Enterococcus durans B160

Enterococcus durans B169

Enterococcus faecalis B131

Enterococcus faecalis B142

Enterococcus faecium B129

Enterococcus faecium B133

Enterococcus faecium B143

Enterococcus faecium B144

Enterococcus faecium B145

Enterococcus hirae B76

Enterococcus hirae B122

Enterococcus hirae B124

Enterococcus hirae B147

Enterococcus faecium E25

Enterococcus faecium E27

Enterococcus faecium E2

Enterococcus faecium E11

Enterococcus faecium E13

Enterococcus faecium E8

Enterococcus faecium E14

Enterococcus faecium E5

Enterococcus faecium E17

Enterococcus sp. E16

Enterococcus sp. E21

Enterococcus sp. E26

Enterococcus sp. E28

Enterococcus sp. E15

Enterococcus sp. E30

Enterococcus sp. E18

Protektivní kultury - tyto bakteriální kmeny byly získány ze Sbírký Laktoflora sídlící v Táboře (pobočka Výzkumného ústavu mlékárenského). Jedná se o následující sbírkové kmeny, které jsou společně s příslušnými produkty metabolismu uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2 Protektivní kultury a jejich produkty metabolismu

Rod	Druh	Označení kmene	Metabolity
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	CCDM945	
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	CCDM79	peroxid vodíku, acidocin D20079
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	CCDM149	bakteriocin či bakteriocin podobné látky
<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>	CCDM377	protein s molekulovou hmotností > 50 kDa
<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>	CCDM340	
<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>	CCDM214	bakteriocin či bakteriocin podobné látky
<i>Lactobacillus</i>	<i>helveticus</i>	CCDM62	
<i>Lactobacillus</i>	<i>helveticus</i>	CCDM82	bakteriocin či bakteriocin podobné látky
<i>Lactobacillus</i>	<i>helveticus</i>	CCDM125	
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	CCDM670	nisin
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	CCDM686	nisin
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	CCDM689	nisin
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	CCDM695	nisin
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	CCDM698	nisin
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	CCDM731	nisin
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	CCDM71	nisin
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	CCDM414	nisin
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	CCDM418	nisin
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	CCDM416	nisin
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	CCDM702	nisin
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	CCDM671	nisin

Kontrolní kultury:

Jako kontrolní kmeny byly použity kmeny produkující biogenní aminy, u nichž již dříve byla zjištěna citlivost vůči kmenům produkujícím bakteriociny. Za tímto účelem byly použity 2 sady kmenů. Kmeny pocházející z VÚM (Výzkumný ústav mlékárenský pobočka Tábor) a byly izolovány z přírodních sýrů.

Lactobacillus curvatus subsp. *curvatus* T2

Lactobacillus curvatus subsp. *curvatus* T3

Lactobacillus curvatus subsp. *curvatus* T8

Lactobacillus curvatus T15

Lactobacillus curvatus subsp. *curvatus* T37

Do druhé skupiny byly zařazeny kmeny pocházející ze Sbírký Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze. V tomto případě se jednalo o kontaminanty, které byly izolovány z piva.

Lactobacillus brevis P16

Lactobacillus brevis P20

Lactobacillus brevis P33

Lactobacillus plantarum P89

Lactobacillus plantarum P94

Lactobacillus plantarum P96

Lactobacillus brevis P98

5.3 Příprava tekutých živných pŮd

Vypočtené množství navážky média M-17 a MRS bylo zalito odpovídajícím množstvím destilované vody, dokonale promícháno a rozpuštěno. Následně bylo dávkováno 5 ml suspenze do čistých zkumavek, ty byly opatřeny vršky a pro zajištění sterility média autoklávovány (121 °C po dobu 20 minut).

5.4 Příprava tuhých živných půd

Nejprve bylo vypočteno potřebné množství média M-17 nebo MRS a agaru. Obě návážky byly zality odpovídajícím množstvím destilované vody. Vloženy do autoklávu a sterilovány při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Následně byla média ochlazená na teplotu přibližně 50 °C a rozlita do Petriho misek, obsahujících citlivé kmeny. Obsahy misek (kultivační půda a inokulum) byly dokonale promíchány krouživými pohyby a byly ponechány k zatuhnutí.

5.5 Inokulace mikroorganismů

Jednotlivé bakteriální kmeny byly dlouhodobě uchovávány v eppendorfkových mikrozkušnicích při mrazírenských teplotách (-18 °C). Mikroorganismy byly vyjmuty z mrazničky a ponechány při laboratorní teplotě k rozmrznutí. Bakteriální kmeny byly inokulovány dle bakteriálního rodu.

Kmeny produkující biogenní aminy byly pomocí automatické pipety ve sterilním prostředí nadávkovány do již připraveného sterilního média M-17. Nejprve byl obsah eppendorfkovy mikrozkušnice promíchán nasátím a vypuštěním a poté bylo napipetováno 100 µl bakteriální suspenze do sterilního živného média M-17. Příslušné mikroorganismy byly kultivovány při teplotě 30 °C do druhého dne.

Protektivní kultury byly inokulovány podobně jako kultury produkující biogenní aminy. Pro inokulaci bylo použito 150 µl příslušného bakteriálního kmene, toto množství bylo vypuštěno do sterilního média M-17 a kultivováno při 30 °C po dobu tří dnů.

Kontrolní kultury mají odlišné požadavky na živné médium a podmínky kultivace. Bylo pipetováno 150 µl suspenze kontrolních kultur do média MRS, následně byly kultivovány při 37 °C za anaerobních podmínek do druhého dne.

5.6 Sledování inhibičního působení protektivních kultur na bakterie s dekarboxylázovou aktivitou pomocí difúzní jamkové metody

Nejdříve bylo provedeno desítkové ředění citlivých kmenů, kdy bylo odebráno 0,5 ml suspenze daného mikroorganismu, která byla nadávkována do zkumavky obsahující 4,5 ml fyziologického roztoku, tímto bylo získáno ředění 10^{-1} , z této zkumavky bylo odebráno opět 0,5 ml již zředěné suspenze a nadávkováno do zkumavky obsahující 4,5 ml

sterilního fyziologického roztoku, čím bylo získáno ředění 10^{-2} . Stejným postupem bylo vytvořeno ředění 10^{-3} .

V dalším kroku byla nadávkována ředění 10^{-2} a 10^{-3} do předepsaných sterilních Petriho misek vždy po 1 ml.

Petriho misky byly zality sterilní živnou půdou o teplotě cca 45 – 50 °C (citlivé kmeny půdou M-17, kontrolní kmeny půdou MRS) a ještě teplá tekutá půda byla krouživými pohyby pečlivě promíchána s bakteriální suspenzí a následně byly misky ponechány v klidu k zatuhnutí živného média.

Do již ztuhlých agarů byly pomocí sterilního nástroje vytvořeny pravidelné jamky o průměru 0,65 cm. Ideálně vytvořená jamka měla hladké okraje bez přítomnosti úlomků agaru. V případě, kdy se obsah jamky nepodařilo zcela vyjmout, byla k tomuto účelu použita vyžíhaná injekční jehla, jejíž konec byl zahnut do pravého úhlu, takto byl ulpělý agar jednoduše odstraněn. Pro začištění okrajů jamky byla použita vyžíhaná bakteriologická klička. Počet jamek odpovídal počtu testovaných protektivních kultur.

Do vytvořených jamek byly dávkovány supernatanty protektivních kultur obsahující bakteriociny, které byly získány následujícím způsobem. Protektivní kultury byly po třídní kultivaci v médiu M-17 při teplotě 30 °C odstředěny (10000 otáček, 20 °C, 15 minut). Velmi opatrně byl separován sediment. Vodný podíl (supernatant) byl neutralizován tak, že bylo upraveno pH pomocí 10% NaOH a 0,6 M HCl, aby případné zóny nevznikaly v důsledku působení nízkého pH. Optimální pH se pohybovalo v rozmezí 6,03-6,06. Následně bylo napipetováno 100 µl takto upraveného supernatantu do jamek v agaru.

Velmi opatrně (aby nedošlo k vylití supernatantů z jamek) byly Petriho misky přeneseny do termostatu, který byl vytemperován na teplotu 37 °C. Kultivace proběhla do dalšího dne, kdy byly odečteny výsledky. Byl hodnocen výskyt zón okolo jamek naplněných supernatantem. V případě výskytu zóny byl změřen její průměr.

Na Obr. 7 lze pozorovat inhibiční působení protektivních kultur *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM731 a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM71. Inhibiční efekt se projevuje vytvořením zón, které společně s průměrem jamky (0,65 cm) dosahovaly 1,2 cm (CCDM731) a 1,15 cm (CCDM71). Naproti tomu kmeny *Lactobacillus helveticus* CCDM82 a *Lactobacillus helveticus* CCDM125, inhibiční účinek nevykazovaly.



Obr. 7 Působení protektivních kmenů CCDM82, 125, 71, 731 na *Enterococcus sp. E15* při ředění kultury 10^{-2}

5.7 Statistické vyhodnocení výsledků

Výsledky analýzy inhibičního působení protektivních (inhibičních) kultur na růst testovaných kmenů bakterií rodu *Enterococcus* byly statisticky vyhodnoceny pomocí neparametrických testů, konkrétně Kruskal-Wallisova testu a Wilcoxonova testu na hladině významnosti 5 % ($P < 0,05$). Ke statistickému vyhodnocení výsledků byl použit software UNISTAT[®], verze 6.5.04 (Unistat, Ltd., Londýn, Velká Británie).

6 VÝSLEDKY

Pro studium inhibičních účinků protektivních kultur na bakterie s dekarboxylázovou aktivitou (citlivé kmeny) bylo použito 21 protektivních kmenů, 33 citlivých kmenů a 12 kmenů kontrolních. V rámci jednoho pokusu bylo testováno 7 protektivních kultur na všech 33 citlivých kmenech, a to při ředění 10^{-2} a 10^{-3} , tím bylo provedeno celkem 462 testů. Bylo provedeno více než 20 pokusů, avšak pro celkové vyhodnocení nebyly použity všechny. Do statistického vyhodnocení (jednalo se o 1389 testů) byly zahrnuty pouze ty pokusy, u kterých byly pozorovány pozitivní výsledky kontrolních kultur a dále do nich bylo zahrnuto pouze ředění 10^{-2} , protože vzniklé zóny se při ředění 10^{-2} lépe vyhodnocovaly (průměry zón bylo možné změřit přesněji). Jako kontrolní kultury byly určeny ty bakteriální kmeny (jednalo se především o laktobacily), u kterých byly prokázány inhibiční účinky námi testovaných protektivních kultur. Srovnání s kontrolními kulturami nebylo použito u protektivních kultur CCDM62, 82, 125, 149, 215, 340, 37, protože pro tyto kmeny doposud nebyly nalezeny mikroorganizmy, na které by tyto protektivní kmeny vykazovaly inhibiční účinek. Ze začátku, než došlo k osvojení difúzní jamkové metody, bylo mnoho pokusů neúspěšných (zóny nebyly vytvořeny ani u kontrolních kultur).

6.1 Působení protektivních kultur CCDM670, 686, 689, 695, 698, 731, 71 na dekarboxyláza pozitivní kmeny

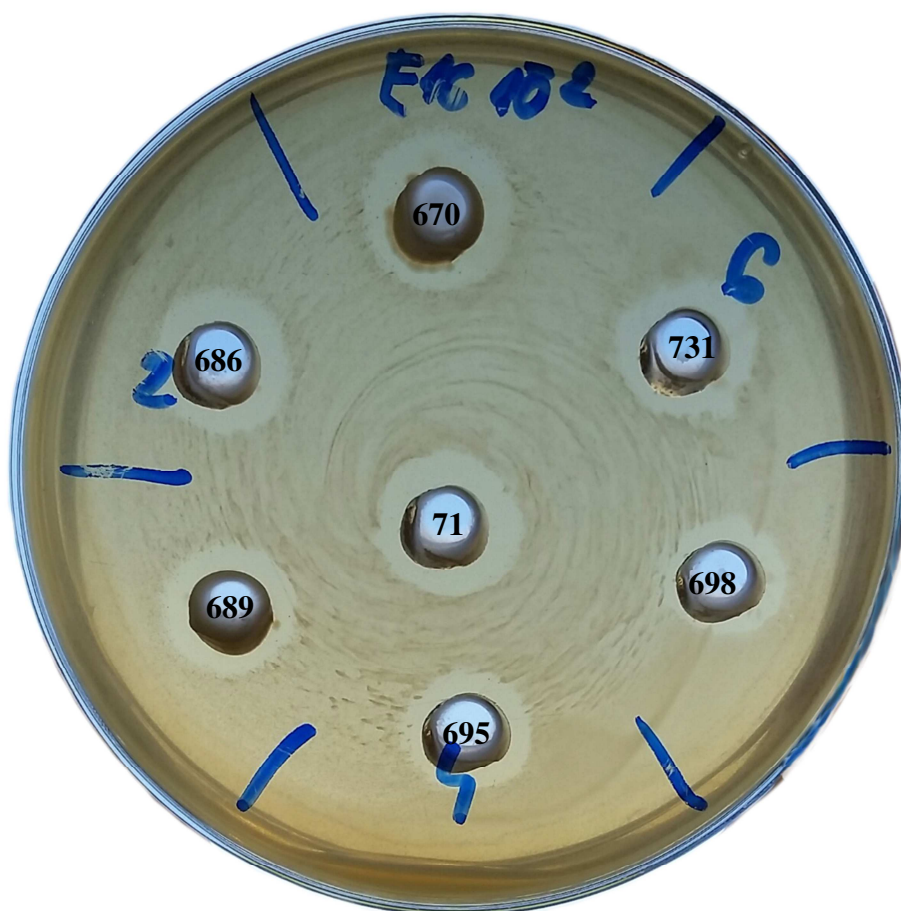
Největší pozornost byla věnována právě této skupině protektivních kultur, protože ty jako jediné vykazovaly inhibiční účinky na testované kmeny. Jak již bylo zmíněno, v průběhu testování bylo získáno mnoho výsledků, avšak z důvodu přehlednosti zde budou v jednotlivých tabulkách uvedeny pouze ty nejvýznamnější z nich.

V *Tab. 3* jsou uvedeny průměry zón vzniklé působením protektivních kultur na kmen *Enterococcus* sp. E16. Největší inhibiční účinky vykazovaly protektivní kmeny CCDM760 a CCDM71 (*Obr. 8*). Dále jsou v *Tab. 4* zaznamenány průměry zón, které byly vytvořeny inhibicí kontrolního kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T3 (*Obr. 9*)

Tab. 3 Průměry zón vytvořené působením protektivních kultur na bakterii *Enterococcus sp. E16*

Protektivní kmeny	E16	
	Ředění	
	10 ⁻²	10 ⁻³
	ø jamka [0,65 cm] + zóna [cm]	ø jamka [0,65 cm] + zóna [cm]
760	1,35	N
686	1,25	N
689	1,25	N
695	1,15	N
698	1,1	N
731	1,2	N
71	1,35	N

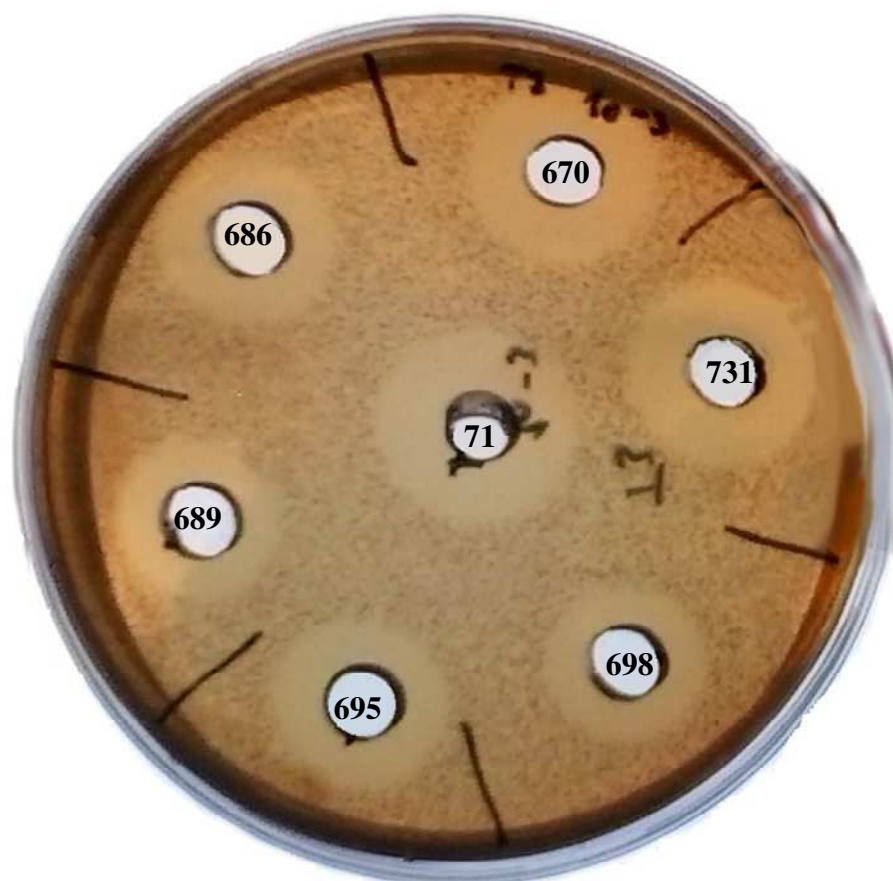
Poznámka: N - náznak zóny, toto označení bylo používáno v případech, kdy byla vytvořena zóna nepravidelná, neohraničená či zóna velmi malých rozměrů.



Obr. 8 Inhibiční působení protektivních kultur CCDM670, 686, 689, 695, 698, 731, 71 na *Enterococcus sp. E16* při ředění kultury 10⁻²

Tab. 4 Průměry zón vytvořené působením protektivních kultur na kontrolní kmen *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T3

Protektivní kmeny	T3	
	Ředění	
	10 ⁻²	10 ⁻³
	ø jamka [0,65 cm] + zóna [cm]	ø jamka [0,65 cm] + zóna [cm]
760	1,9	1,8
686	1,7	1,6
689	1,6	1,6
695	1,6	1,7
698	1,5	1,5
731	2	1,9
71	1,7	2



Obr. 9 Inhibiční působení protektivních kmenů CCDM670, 686, 689, 695, 698, 731, 71 na kontrolní kmen *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T3 při ředění kultury 10⁻³

Z Tab. 5 je patrné, že obecně větší inhibiční účinky protektivních kultur byly pozorovány na kmenech s označením E. Největší inhibiční zóna (1,4 cm) byla vytvořena působením kultury *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM731 na *Enterococcus* sp. E28. Protektivní kmeny CCDM731 a CCDM71 vykazovaly značný inhibiční efekt na kmeny s dekarboxylázovou aktivitou E14, E16, E18, E25, průměry těchto zón se pohybovaly v rozmezí 1,2 - 1,35 cm. Protektivní kmen CCDM760 významně účinkoval na citlivé kmeny E15 a E16 (velikost zón 1,3 a 1,35 cm). Kmen CCDM686 nejvíce bránil růstu *Enterococcus faecium* E5 (zóna 1,3 cm) a kmen CCDM698 velmi ovlivňoval růst bakterie *Enterococcus faecium* E14.

V porovnání s kontrolními kmeny (Tab. 6) bylo zjištěno, že tyto kontroly jsou mnohem citlivější k účinkům protektivních kmenů, protože zóny dosahovaly mnohem větších rozměrů (až 2 cm). Avšak působení kmenů CCDM731 a CCDM71 sejevilo i u této sady mikroorganismů nejslibněji.

Tab. 5 Průměry zón vytvořené působením protektivních kultur na citlivé kmeny

Protektivní kmeny		760	686	689	695	698	731	71
Citlivé kmeny	Ředění	ø jamky [0,65 cm] + zóna [cm]						
B76	10 ⁻²	0,7	-	-	-	0,7	0,7	0,7
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-
B122	10 ⁻²	1,15	1,1	1	1	1	1,1	1,2
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-
B124	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-
B129	10 ⁻²	1,1	1,1	0,7	0,7	0,7	1,2	1,2
	10 ⁻³	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
B131	10 ⁻²	1,1	1,1	1,1	1	0,7	1,1	1,1
	10 ⁻³	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	-
B133	10 ⁻²	1,1	1,1	0,7	0,7	0,7	0,7	1,2
	10 ⁻³	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
B142	10 ⁻²	0,7	-	-	-	-	0,7	0,7
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-
B143	10 ⁻²	-	0,7	-	-	-	-	0,7
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-
B144	10 ⁻²	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
	10 ⁻³	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
B147	10 ⁻²	0,7	-	-	-	-	0,7	0,7
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-
B151	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-
B152	10 ⁻²	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
	10 ⁻³	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
B153	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-
B154	10 ⁻²	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-
B160	10 ⁻²	1,1	1,1	0,7	1,1	1,1	1,1	0,7
	10 ⁻³	0,7	-	-	0,7	0,7	0,7	0,7
B169	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-
E2	10 ⁻²	1	1,1	1,1	0,7	1,1	1,2	1,15
	10 ⁻³	0,7	-	-	-	-	0,7	0,7
E5	10 ⁻²	1,25	1,3	1,25	1,25	1,25	1,2	1,3
	10 ⁻³	0,7	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1

Protektivní kmeny		760	686	689	695	698	731	71
Citlivé kmeny	Ředění	ø jamky [0,65 cm] + zóna [cm]						
E8	10^{-2}	1,1	1,1	1	1,2	1,2	1,3	1,3
	10^{-3}	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
E11	10^{-2}	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,3
	10^{-3}	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
E13	10^{-2}	0,7	1,1	1,1	1,1	0,7	0,7	0,7
	10^{-3}	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
E14	10^{-2}	1,2	1,2	1,25	1,2	1,3	1,3	1,3
	10^{-3}	-	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
E15	10^{-2}	1,3	1,25	1,2	1	1,2	1,3	1,15
	10^{-3}	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
E16	10^{-2}	1,35	1,25	1,25	1,15	1,1	1,2	1,35
	10^{-3}	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
E17	10^{-2}	0,7	0,7	1,05	1,1	0,7	0,7	0,7
	10^{-3}	-	-	-	-	-	-	-
E18	10^{-2}	1,05	0,7	1,1	1,1	1,15	1,25	1,3
	10^{-3}	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
E21	10^{-2}	1,15	1,2	1,2	1	1,1	1,1	1,3
	10^{-3}	-	-	-	-	-	-	-
E25	10^{-2}	1,2	1,15	1,1	1,1	1,1	1,2	1,3
	10^{-3}	-	0,7	-	-	-	-	-
E26	10^{-2}	1,05	1,1	1	1,05	0,7	0,7	1,2
	10^{-3}	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
E27	10^{-2}	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
	10^{-3}	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
E28	10^{-2}	1,3	1,25	1,25	1,2	1,2	1,4	0,7
	10^{-3}	-	-	-	-	-	-	-
E30	10^{-2}	0,7	0,7	0,7	1,1	0,7	1	1,25
	10^{-3}	-	-	0,7	-	-	-	-

Poznámka: - zóna nebyla vytvořena.

Tab. 6 Průměry zón vytvořené působením protektivních kultur na kontrolní kmeny

Protektivní kmeny		760	686	689	695	698	731	71
Kontrolní kmeny	Ředění	ø jamky [0,65 cm] + inhibiční zóna [cm]						
T2	10 ⁻²	1,7	1,6	1,6	1,65	1,6	1,85	1,75
	10 ⁻³	1,7	1,6	1,6	1,7	1,7	1,9	2
T3	10 ⁻²	1,2	1	1,2	1,2	1	1,3	1,5
	10 ⁻³	1,3	1	1	1,5	1	1,5	1,5
T37	10 ⁻²	1,5	1,5	1,6	1,5	1,5	1,55	1,6
	10 ⁻³	1,7	1,7	1,7	1,6	1,7	1,8	1,6
P94	10 ⁻²	1,6	1,5	1,6	1,8	1,5	1,6	1,5
	10 ⁻³	1,65	1,6	1,45	1,6	1,6	1,8	1,6
P96	10 ⁻²	1,7	1,5	1,5	1,5	1,5	1,7	1,6
	10 ⁻³	1,8	1,8	1,7	1,7	1,65	1,7	1,7
P98	10 ⁻²	1,5	1,4	1,3	1,3	1,5	1,6	1,5
	10 ⁻³	1,5	1,3	1,3	1,3	1,3	1,6	1,4

6.2 Působení protektivních kultur CCDM79, 414, 416, 418, 671, 702, 945 na dekarboxyláza pozitivní kmeny

Tyto protektivní kultury nevykazovaly inhibiční působení na citlivé mikroorganismy při aplikaci obou ředění.

Inhibiční působení těchto kultur bylo zjištěno pouze u kontrolních kmenů T3, T15, P16 (Tab. 7). U *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM418 nebyl prokázán inhibiční efekt na žádném z testovaných mikroorganismů.

Tab. 7 Průměry zón vytvořené působením protektivních kultur na kontrolní kmeny při ředění 10^{-2}

Protektivní kmeny	79	414	416	418	671	702	945
Kontrolní kmeny	ø jamky [0,65 cm] + zóna [cm]						
T2	-	-	-	-	-	-	-
T3	1,3	1,35	0,7	-	0,7	0,7	0,7
T8	-	-	-	-	-	-	-
T15	1,2	1,1	0,7	-	0,7	0,7	0,7
P16	1,6	1,6	1,2	-	1,2	1,2	1,2
P20	-	-	-	-	-	-	-
P33	-	-	-	-	-	-	-

Poznámka: - zóna nebyla vytvořena.

6.3 Působení protektivních kultur CCDM62, 82, 125, 149, 215, 340, 377 na dekarboxyláza pozitivní kmeny

Tato skupina protektivních mikroorganismů nepůsobila inhibičně na žádný z citlivých kmenů. Pro tyto protektivní kmeny nebyly známy ani účinky na jiné mikroorganismy, nebyly pro ně zjištěny kontrolní kultury.

7 DISKUZE

Bakterie mléčného kvašení hrají velice důležitou roli v potravinářském průmyslu. Využívá se schopnosti těchto bakterií přetvářet sacharidy na kyselinu mléčnou a další produkty. Tato jejich vlastnost nám umožňuje vyrábět jogurty, zakysaná mléka, kefíry, sýry, fermentovanou zeleninu, masné výrobky atd. Díky produkci kyseliny mléčné dochází ke snížení pH potraviny čímž se prodlužuje i její udržitelnost. Mezi BMK patří rody *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus* a další [17].

Problémem je, že některé z těchto rodů jako je například *Enterococcus*, dokáží produkovat biogenní aminy. Tyto látky jsou v nízkých koncentracích pro člověka prospěšné, dokonce i potřebné, protože zajišťují různé fyziologické funkce. Avšak zvláště u fermentovaných potravin se biogenní aminy vyskytují v poměrně vysokých koncentracích, které mohou nepříznivě působit na zdraví konzumentů. Předávkování biogenními aminy se může projevat různě od nevolnosti, kopřivky, bolesti břicha až po zvracení, bolesti hlavy, zvýšení či snížení krevního tlaku. Navíc některé kmeny rodu *Enterococcus* patří mezi patogenní mikroorganismy, které jsou v potravinách silně nežádoucí. I z toho důvodu, se musí dbát na pečlivý výběr kmenů, které budou tvořit součást startovacích kultur [24, 33].

Existují protektivní kmeny, které produkují látky vykazující baktericidní účinek. Mezi tyto látky patří mimo jiné bakteriociny. Spektrum účinku bakteriocinů je velmi specifické (účinkují pouze na příbuzné bakteriální kmeny) [5].

Cílem této práce bylo zjistit inhibiční působení vybraných protektivních kultur na bakterie rodu *Enterococcus*. V průběhu studia byl testován účinek 21 protektivních kultur na 33 dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Enterococcus*. Při každém testování bylo provedeno zároveň kontrolní stanovení s kmeny, u kterých již v předchozích experimentech byla zjištěna citlivost vůči produkčním kmenům, tedy s mikroorganismy, u kterých byl inhibiční účinek daného supernatantu již prokázán. Mezi kontrolními kulturami byly zastoupeny kmeny rodu *Lactobacillus*. U laktobacilů byla zjištěna mnohem větší citlivost na produkované bakteriociny než u rodu *Enterococcus*, proto je pravděpodobné, že v případě, kdy protektivní kultura neinhibuje růst laktobacilů, nebude inhibovat ani růst enterokoků. Kontroly byly aplikovány zejména z toho důvodu, že kdyby u těchto kmenů nebyly vytvořeny zóny, znamenalo by to, že supernatanty neobsahují požadované inhibiční látky nebo je neobsahují v dostatečném množství. Kdyby nebyla provedena tato kontrola, mohli by-

chom se mylně domnívat, že dané protektivní kultury nevykazují dostatečné inhibiční působení.

Z 21 testovaných protektivních kmenů vykazovalo inhibiční efekt pouze 7, a to *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM670, *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM686, *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM689, *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM695, *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM698, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM731, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM71, proto této skupině byla věnována největší pozornost a byla opakovaně testována. Tyto mikroorganismy produkovaly bakteriocin nisin (dle sdělení poskytovatele kultur). Přičemž nejvíce ovlivňovaly růst enterokoků kmeny CCDM731 a CCDM71.

Pomocí statistického programu UNISTAT[®] Verze 6.5.04. bylo porovnáno inhibiční působení protektivních kultur na všechny citlivé kmeny a byly zjištěny výsledky statisticky významné (hladina významnosti menší než 5%) a výsledky statisticky nevýznamné ($P \geq 0,05$). Dle výsledků je patrné, že kmen vykazující dekarboxylázovou aktivitu E15 (zóna o velikosti 1,3 cm) je citlivější na inhibiční působení protektivní kultury CCDM731 nežli dekarboxyláza pozitivní kmen E27, u něhož byl pozorován pouze náznak výskytu zóny (0,7 cm). Velikosti inhibičních zón těchto dvou kmenů se lišily v průměru o 0,55 cm, což je rozdíl statisticky významný ($P = 0,0001$). Srovnáme-li působení kmene CCDM731 na kmen E15 a na kmen E2 zjišťujeme výsledek, jež je statisticky nevýznamný ($P = 0,2183$), tudíž můžeme říci, že tyto 2 kmeny vykazovaly obdobnou citlivost vůči protektivní kultuře CCDM731 (průměrný rozdíl ve velikosti zón = 0,05 cm). Porovnáme-li působení inhibičního kmene CCDM71 na citlivý kmen E16 s ostatními citlivými kmeny můžeme říci, že kmen CCDM71 vykazuje obdobné inhibiční působení na kmeny s dekarboxylázovou aktivitou E2, E5, E8, E14, E18, E21, E25, E30, protože zde byla hladina významnosti větší než 0,05 ($P \geq 0,2$), z toho vyplývá, že rozdíly mezi vytvořenými zónami byly malé (zóny dosahovaly obdobných rozměrů). Naproti tomu byl u ostatních citlivých kmenů pozorován výskyt mnohem menších zón v důsledku působení kmene CCDM71, tedy rozdíly mezi zónami byly velké ($P \leq 0,05$).

V průběhu studia bylo zjištěno, že úprava pH supernatantů je velmi důležitá. Při jednom z testů nebylo upraveno pH a při odečtech byly zjištěny zóny přibližně o průměrech 1,15 cm. Testování bylo opakováno se stejnými mikroorganismy, avšak s již upraveným pH. Při tomto opakování zóny vytvořeny nebyly. Tímto bylo dokázáno, že zóny, které byly

pozorovány při prvním testování, nebyly vytvořeny díky účinkům bakteriocinů, ale vznikly v důsledku nízkého pH supernatantu.

Bylo publikováno mnoho prací, které se zabývají inhibičním působením protektivních kultur. Například Ghrairi a kol. [47] ve své práci studovali inhibiční působení *Enterococcus faecium*, taktéž pomocí difúzní jamkové metody. Bakterie *Enterococcus faecium* MMT21 byla izolována ze sýru rigouta a Tuniských tradičních sýrů a bylo zjištěno, že produkuje 2 bakteriociny a to enterocin A a enterocin B. Tyto bakteriociny patří do třídy II. Tato studie prokázala inhibiční působení *Enterococcus faecium* MMT21 na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* a *Staphylococcus aureus*. Dále bylo v této studii zjištěno, že *Enterococcus faecium* MMT21 nevykazuje inhibiční působení na *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Escherichia coli*, *Pediococcus acidilactici*. Bakterie *Enterococcus faecium* MMT21 je vhodná pro použití jakožto startovací kultura, díky tomu, že dokáže inhibovat růst patogenní *Listeria monocytogenes* a navíc vykazuje vysokou proteolytickou aktivitu, která je žádoucí při výrobě zrajících sýrů. [47]

Kruger a kol. [48] se zabývali inhibičním působením nisinu, který byl produkován bakteriemi mléčného kvašení, jež byly izolovány z rukoly. V této studii byly citlivé mikroorganismy naočkovány na agarovou plotnu s vhodným médiem, na jehož povrch bylo dávkováno 10 µl supernatantu. Po kultivaci byl pozorován výskyt zón, přičemž zóna o velikosti větší než 5 mm byla považována za pozitivní výsledek. Bylo zjištěno, že nisin inhibuje růst *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*. Největší inhibiční efekt byl zaznamenán u *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei*, kde byla pozorována zóna o průměru 26 mm. U bakterie *Enterococcus faecium* dosahovaly zóny rozměrů 9 – 15 mm v závislosti na kmenu [48]. Inhibiční efekt nisinu na *Enterococcus faecium* byl prokázán i v této bakalářské práci, kdy největší zóny byly pozorovány u *Enterococcus faecium* E14 (13 mm včetně jamky).

Ve studii Tükel a kol. [49] byl podrobně zkoumán inhibiční vliv nisinu, který byl produkován bakterií *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MC38. Tato bakterie byla izolována z Tureckých tradičních sýrů. Účinek nisinu byl testován na mnoha mikroorganismech, patřících do rodů *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Listeria*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* a

Clostridium. Inhibiční aktivita nisinu byla sledována pomocí výskytu zón. Přičemž vznik zóny, jejíž rozměry se pohybovaly v intervalu od 5 do 10 mm, byl považován za nízkou účinnost nisinu a vznik zóny o velikosti větší než 10 mm byl považován za vysokou účinnost. Bylo zjištěno, že nisin produkovaný bakterií *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MC38 neinhibuje růst žádné ze všech testovaných gramnegativních bakterií. Naproti tomu byl potvrzen pozitivní výsledek u všech testovaných grampozitivních bakterií, přičemž na 7 z nich vykazoval nisin nízký účinek (jednalo se o kmeny z rodu *Lactococcus*, *Staphylococcus* a *Clostridium*). U zbývajících 23 kmenů byl pozorován vznik zón větších rozměrů, což dokazuje větší citlivost těchto kmenů k účinkům nisinu. Mezi tyto kmeny patřily i *Enterococcus faecalis* LMG2708 a *Enterococcus faecalis* LMG2602 [49]. V této bakalářské práci byl sledován účinek nisinu taktéž na bakterii *Enterococcus faecalis*. Bylo zjištěno, že nisin inhibuje růst pouze bakterie *Enterococcus faecalis* B131 a to pouze s nízkým účinkem (velikost zóny 11 mm včetně jamky 6,5 mm). U kmene B142 byl vliv nisinu zanedbatelný, protože v tomto případě zóny pozorovány nebyly, popřípadě byly pozorovány náznaky zón (zóna nepravidelná, neohraničená či zóna velmi malých rozměrů).

ZÁVĚR

V průběhu práce bylo testováno inhibiční působení protektivních kultur na bakterie s dekarboxylázovou aktivitou rodu *Enterococcus* (33 kmenů). Celkem bylo testováno 21 protektivních kultur, přičemž inhibiční účinek byl pozorován pouze u následujících kmenů, jež produkovaly nisin (dle sdělení poskytovatele kultur).

Lactococcus lactis biovar. *diacetylactis* CCDM670

Lactococcus lactis biovar. *diacetylactis* CCDM686

Lactococcus lactis biovar. *diacetylactis* CCDM689

Lactococcus lactis biovar. *diacetylactis* CCDM695

Lactococcus lactis biovar. *diacetylactis* CCDM698

Lactococcus lactis subsp. *lactis* CCDM731

Lactococcus lactis subsp. *lactis* CCDM71

Dále bylo zjištěno, že těchto 7 kmenů nejvíce ovlivňovalo růst bakterií *Enterococcus faecium* a *Enterococcus* sp., jež nesly označení E.

Výsledky této práce byly porovnány s jinými studiemi, jež se zabývaly obdobnou problematikou, tedy inhibičním působením nisinu. Kruger a kol. [48] prokázali inhibiční působení nisinu na *Enterococcus faecium*, také v této práci byl zjištěn značný vliv nisinu na tuto bakterii. Tükel a kol. [49] zjistili významný inhibiční účinek nisinu na *Enterococcus faecalis*. V této práci byly testovány pouze dva kmeny *Enterococcus faecalis*, jež nevykazovaly velkou citlivost vůči nisinu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] CHEN, H. a D. G. HOOVER. Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2003, roč. 2.
- [2] WHO podporuje zákaz používání antibiotických prostředků na podporu růstu. *Informační centrum bezpečnosti potravin* [online]. 2003 [cit. 2015-03-11].
Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/who-podporuje-zakaz-pouzivani-antibiotickyh-prostredku-na-podporu-rustu.aspx>
- [3] SIT, Clarissa S. a John C. VEDERAS. Approaches to the discovery of new anti-bacterial agents based on bacteriocins. *Biochemistry and Cell Biology*. 2008, vol. 86, issue 2, s. 116-123. DOI: 10.1139/O07-153.
- [4] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 623 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [5] LACROIX, Christophe. *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation*. United Kingdom: Woodhead publishing, 2011. ISBN 978-1-84569-669-6.
- [6] ENNAHAR, Saïd, Toshihiro SASHIHARA, Kenji SONOMOTO a Ayaaki ISHIZAKI. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*. 2000, č. 24, s. 85-106.
- [7] JACK, Ralph W., John R. TAGG, Ray.BIBEK. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Microbiological reviews*. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1995, roč. 59, č. 2, 171–200.
- [8] DUFOUR, Alain, Thomas HINDRÉ, Dominique HARAS a Jean-Paul LE PENNEC. The biology of lantibiotics from the lacticin 481 group is coming of age. *FEMS Microbiology Reviews*. 2007, vol. 31, issue 2, s. 134-167.
DOI: 10.1111/j.1574-6976.2006.00045.x.
- [9] *Přehled fyziologie člověka*. 1. vyd. Redaktor Jaroslav Pokorný. Praha: Karolinum, 2002, 255 s. ISBN 80-246-0229-6.
- [10] Thomas J. MONTVILLE, Ingolf F. NES a Michael L. CHIKINDAS. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, č. 71, s. 1-20.

- [11] Dusičnany a dusitany. *A-Z Slovník pro spotřebitele* [online]. [cit. 2015-03-11].
Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76479.aspx>
- [12] MORENO, M. R. Foulquie', R. CALLEWAERT, B. DEVREESE, J. VAN BEEUMEN a L. DE VUYST. Isolation and biochemical characterisation of enterocins. *Journal of Applied Microbiology*. 2003, č. 94, s. 214-229.
- [13] FRANZ, Charles M. A. P., Marco J. VAN BELKUM, Wilhelm H. HOLZAPFEL, Hikmate ABRIOUEL a Antonio GÁLVEZ. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiology Reviews*. 2007, vol. 31, issue 3, s. 293-310. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00064.x.
- [14] MURDOCK, C. A., J. CLEVELAND, K. R. MATTHEWS a M. L. CHIKINDAS. The synergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7. *Letters in Applied Microbiology*. 2007, vol. 44, issue 3, s. 255-261. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2006.02076.x.
- [15] Nisin. *Wikipedia.com* [online]. [cit. 2015-03-11].
Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Nisin>
- [16] R. F. VOGEL, W. P. HAMMES, M. HABERMEYER, K. H. ENGEL, D. KNORR a G. EIS-ENBRAND. Protective cultures. *European Food and Feed Cultures Association - EFFCA*. 2011, č. 55, s. 654-662.
- [17] KLAENHAMMER, Todd R., Rodolphe BARRANGOU, B. Logan BUCK, M. Andrea AZCARATE-PERIL a Eric ALTERMANN. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, vol. 29, issue 3, s. 393-409. DOI: 10.1016/j.fmre.2005.04.007.
- [18] HUFNER, E., T. MARKIETON, S. CHAILLOU, A.-M. CRUTZ-LE COQ, M. ZAGOREC a C. HERTEL. Identification of *Lactobacillus sakei* Genes Induced during Meat Fermentation and Their Role in Survival and Growth. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007-04-11, vol. 73, issue 8, s. 2522-2531. DOI: 10.1128/AEM.02396-06.
- [19] CAPLICE E., G. F. FITZGERALD. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 1999, č. 50, s. 131-149.

- [20] CANCHAYA, C., M. J. CLAEISSON, G. F. FITZGERALD, D. VAN SINDEREN a P. W. O'TOOLE. Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. *Microbiology*. 2006-11-01, vol. 152, issue 11, s. 3185-3196. DOI: 10.1099/mic.0.29140-0.
- [21] *Lactobacillus* bacteria. *Encyclopedia Britannica* [online]. 12.9.2014 [cit. 2015-03-16].
Dostupné z: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/327373/Lactobacillus>
- [22] FACKLAM, Richard a J. A. ELLIOTT. Identification, Classification, and Clinical Relevance of Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci, Excluding the Streptococci and Enterococci. *Clinical microbiology reviews*. 1995, roč. 8, č. 4, s. 479-495.
- [23] KIM, Wonyong, Thomas J. MONTVILLE, Ingolf F. NES a Michael L. CHIKINDAS. The genus *Lactococcus*. *Lactic Acid Bacteria*. Chichester, UK: John Wiley, 2014-04-30, č. 71, s. 429. DOI: 10.1002/9781118655252.ch26.
- [24] ADAMS, Martin a M NOUT. *Fermentation and food safety*. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers, 2001, xi, 290 p. ISBN 0834218437.
- [25] GARDINI, Fausto, Maria MARTUSCELLI, Marisa Carmela CARUSO, Fernanda GALGANO, Maria Antonietta CRUDELE, Fabio FAVATI, Maria Elisabetta GUERZONI a Giovanna SUZZI. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, č. 64, s. 105-117.
- [26] ARIAS, C. A. a B. E. MURRAY. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2008, č. 6, s. 637-655.
- [27] MORENO, M. R. Foulquie', P. SARANTINOPOULOS, E. TSAKALIDOU a L. DE VUYST. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 2006, č. 106, 1 – 24.
- [28] *Enterococcus faecalis*. *Wikipedia.com* [online]. [cit. 2015-03-11].
Dostupné z: http://pl.wikipedia.org/wiki/Enterococcus_faecalis

- [29] Characterization of *Enterococcus durans*. *Biowiki* [online]. [cit. 2015-03-11].
Dostupné z:
http://biowiki.hgtc.edu/index.php?title=Characterization_of_Enterococcus_durans_by_Wendy_Hammond,_Danielle_Kmieciak,_Kelly_Boutalous_and_Constance_Bell
- [30] Infekční endokarditida. *IKEM* [online]. [cit. 2015-03-11].
Dostupné z: <http://www.ikem.cz/www?docid=1005921>
- [31] Sepse - otrava krve. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online]. [cit. 2015-03-11]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/?q=sepsse-otrava-krve>
- [32] LINARES, Daniel M., María FERNÁNDEZ, M. Cruz MARTÍN a Miguel A. ÁLVAREZ. Tyramine biosynthesis in *Enterococcus durans* is transcriptionally regulated by the extracellular pH and tyrosine concentration. *Microbial Biotechnology* 2009, vol. 2, issue 6, s. 625-633. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2009.00117.x.
- [33] RAUSCHER-GABERNIG, Elke, Roland GROSSGUT, Friedrich BAUER a Peter PAULSEN. Assessment of alimentary histamine exposure of consumers in Austria. *Food Control*. 2009, č. 20, s. 423-429.
- [34] GREIF, Gabriel, Mária GREIFOVÁ, Ján DVORAN, Jolana KAROVIČOVÁ a Viola BUCHTOVÁ. Štúdium rastu a produkcie biogénnych amínov niektorými mikroorganizmami za modelových podmienok. *Czech J. Food Sci.* 1999, roč. 17, č. 1, s. 15-21.
- [35] BOVER-CID, Sara, Teresa HERNÁNDEZ-JOVER, M. Jesffls MIGUÉLEZ-ARRIZADO a M. Carmen VIDAL-CAROU. Contribution of contaminant enterobacteria and lactic acid bacteria to biogenic amine accumulation in spontaneous fermentation of pork sausages. *Eur Food Res Technol.* 2003, č. 216, s. 477-482.
- [36] GARDINI, F., S. BOVER-CID, R. TOFALO, N. BELLETTI, V. GATTO, G. SUZZI a S. TORRIANI. Modeling the Aminogenic Potential of *Enterococcus faecalis* EF37 in Dry Fermented Sausages through Chemical and Molecular Approaches. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008-04-28, vol. 74, issue 9, s. 2740-2750. DOI: 10.1128/AEM.02267-07
- [37] LEUSCHNER, R. G. K. a W. P. HAMMEST. Tyramine Degradation by Micrococci During Ripening of Fermented Sausage. *Meat Science*. 1998, roč. 49, č. 3, s. 289-296.

- [38] CONNIL, Nathalie, Yoann LE BRETON, Xavier DOUSSET, Yanick AUFFRAY, Alain RINCE a Hervé PRÉVOST. Identification of the *Enterococcus faecalis* Tyrosine Decarboxylase. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 2002, roč. 68, č. 7, s. 3537-3544.
- [39] Vazoaktivní. *Velký lékařský slovník* [online]. [cit. 2015-03-11].
Dostupné z: <http://www.lekarske.slovniky.cz/pojem/vazoaktivni>
- [40] ÖZOĞUL, F. Production of biogenic amines by *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Hafnia alvei* using a rapid HPLC method. *European Food Research and Technology*. 2004, vol. 219, issue 5, s. 465-469. DOI: 10.1007/s00217-004-0988-0.
- [41] Histamin. *Wikipedia.org* [online]. [cit. 2015-03-11].
Dostupné z: http://no.wikipedia.org/wiki/Histamin#mediaviewer/File:Histamin_-_Histamine.svg
- [42] MARCOBAL, Ángela, Pedro JESÚS MARTÍN-ÁLVAREZ, María Victoria MORENO-ARRIBAS a Rosario MUÑOZ. A multifactorial design for studying factors influencing growth and tyramine. *Research in Microbiology*. 2006, č. 157, s. 417-424.
- [43] BURDYCHOVÁ, Radka a Vlastimil DOHNAL. Využití HPLC ke stanovení produktu exprese genu pro mikrobiální tyrosindekarboxylázu. *Chem. Listy*. 2007, č. 101, s. 907-910.
- [44] Tyramin. *Wikipedia.com* [online]. [cit. 2015-03-11].
Dostupné z: http://de.wikipedia.org/wiki/Tyramin#mediaviewer/File:Tyramin_-_Tyramine.svg
- [45] LEUSCHNER, Renata G., Martina, HEIDEL a Walter P. HAMMES. Histamine and tyramine degradation by food fermenting. *International Journal of Food Microbiology*. 1998, č. 39, s. 1-10.
- [46] NEDJELJKO Bilic. Rapid identification of biogenic amine-producing bacterial cultures using isocratic high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1996, roč. 719, č. 719, s. 321-326.
- [47] GHRAIRY, T., J. FRERE, J. M. BERJERAUD a M. MANAI. Purification and characterisation of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food Control*. 2008, č. 19, s. 162-169.

- [48] KRUGER, Monika Francisca, Matheus de Souza BARBOSA, Antonio MIRANDA, Mariza LANDGRAF, Maria Teresa DESTRO a Bernadette Dora Gombossy DE MELO FRANCO. Isolation of bacteriocinogenic strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from rocket salad (*Eruca sativa* Mill.) and evidences of production of a variant of nisin with modification in the leader-peptide. *Food Control*. 2013, č. 33, s. 467-476.
- [49] TÜKEL, ÇAĞLA, M. DILEK AVŞAROĞLU, ÖMER ŞİMŞEK a MUSTAFA AKÇELİK. ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A NOVEL BACTERIOCIN PRODUCED BY *LACTOCOCCUS LACTIS* SSP. *LACTIS* MC38. *Journal of Food Safety*. 2007, vol. 27, issue 1, s. -. DOI: 10.1111/j.1745-4565.2007.00056.x.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BMK	Bakterie mléčného kvašení.
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
EMP	Embden-Meyerhof-Parnasova dráha
FAD	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
kDa	Kilodalton
P	Fosfát
DP	Difosfát
UHT	Ultratepelné ošetření
UTB	Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
VÚM	Výzkumný ústav mlékárenský
WHO	Světová zdravotnická organizace

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1</i> Struktura nisinu [15]	20
<i>Obr. 2</i> Průběh homo a heterofermentativního kvašení [19].....	22
<i>Obr. 3</i> <i>Enterococcus durans</i> – preparát barven dle Grama [29].....	24
<i>Obr. 4</i> Snímek bakterie <i>Enterococcus faecalis</i> pořízen pomocí skenovacího elektronového mikroskopu [28].....	25
<i>Obr. 5</i> Histamin [41]	29
<i>Obr. 6</i> Tyramin [44]	30
<i>Obr. 7</i> Působení protektivních kmenů CCDM82, 125, 71, 731 na <i>Enterococcus sp. E15</i> při ředění kultury 10^{-2}	39
<i>Obr. 8</i> Inhibiční působení protektivních kultur CCDM670, 686, 689, 695, 698, 731, 71 na <i>Enterococcus sp. E16</i> při ředění kultury 10^{-2}	41
<i>Obr. 9</i> Inhibiční působení protektivních kmenů CCDM670, 686, 689, 695, 698, 731, 71 na kontrolní kmen <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> T3 při ředění kultury 10^{-3}	42

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1 Příklady bakteriocinů a produkujejících kmenů jednotlivých tříd [1, 7]</i>	<i>16</i>
<i>Tab. 2 Protektivní kultury a jejich produkty metabolismu.....</i>	<i>35</i>
<i>Tab. 3 Průměry zón vytvořené působením protektivních kultur na bakterii Enterococcus sp. E16</i>	<i>41</i>
<i>Tab. 4 Průměry zón vytvořené působením protektivních kultur na kontrolní kmen Lactobacillus curvatus subsp. curvatus T3</i>	<i>42</i>
<i>Tab. 5 Průměry zón vytvořené působením protektivních kultur na citlivé kmeney</i>	<i>44</i>
<i>Tab. 6 Průměry zón vytvořené působením protektivních kultur na kontrolní kmeney</i>	<i>46</i>
<i>Tab. 7 Průměry zón vytvořené působením protektivních kultur na kontrolní kmeney při ředění 10⁻²</i>	<i>47</i>