

Dekarboxylázová aktivita vybraných bakterií v prostředí s přidavkem bakteriocinů

Bc. Eva Theimrová

Diplomová práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Eva Theimrová**
Osobní číslo: **T13749**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Dekarboxylázová aktivita vybraných bakterií v prostředí s přidavkem bakteriocinů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Bakterie mléčného kvašení a jejich využití, protektivní kultury.
2. Vlastnosti a použití bakteriocinů.
3. Charakteristika a význam biogenních aminů.

II. Praktická část

1. Citlivost vybraných bakterií vůči bakteriocinům.
2. Dekarboxylázová aktivita vybraných bakterií v prostředí s bakteriociny.
3. Vyhodnocení výsledků.
4. Formulace závěrů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, vol. 29, iss. 2-3, s. 213-231.

[2] VUYST, L., VANDAMME, E. J. Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and application. Springer Science and Business Media New York, 1994, 537 s. ISBN: 978-1-4613-6146-6.

[3] JACK, R. W., TAGG, J. R., RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive Bacteria. *Microbiological Reviews*, 1995, vol. 59, s. 171-200.

[4] SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 1996, vol. 29, iss. 7, s. 675-690.

[5] CHEN, H., HOOVER, D. G. Bacteriocins and their Food Applications, *Reviews in Food Science and Food Safety*, 2002, vol. 2, s. 82-100.

[6] CAPLICE, E., FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation, *International Journal of Food Microbiology*, 1999, vol. 50, s. 131-149.

[7] MOZZI, F., RAYA, R. R., VIGNOLO, G. M. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Application*, Blackwell Publishing, 2010, 414 s., ISBN: 978-0-813-81583-1.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

2. února 2015

Termín odevzdání diplomové práce:

22. dubna 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: Theimrová Eva

Obor: 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 22.4.2015

.....Theimrová.....

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 díla 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 užít 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 přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá sledováním produkce biogenních aminů bakteriemi *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 a *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T3 v závislosti na přidavku bakteriocinu nisinu. Teoretická část je zaměřena na bakterie mléčného kvašení, jejich charakteristiku, jednotlivé druhy a využití v potravinářství. Dále jsou zde popsány bakteriociny produkované těmito bakteriemi se zaměřením na nisin. Nakonec je věnována pozornost charakteristice, funkci a výskytu biogenních aminů.

V praktické části byl proveden skrining 21 kmenů bakterií izolovaných z piva a ze sýru na jejich dekarboxylázovou aktivitu. Na základě získaných výsledků byly vybrány 2 kmeny vykazující nejvyšší dekarboxylázovou aktivitu. U těchto kmenů byla sledována produkce biogenních aminů (tyraminu, sperminu) v závislosti na vybraných faktorech (přídavek nisinu, teplota). Produkce biogenních aminů byla analyzována pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detekcí po předchozí derivatizaci dansylchloridem. U obou kmenů byl obsah biogenních aminů vyšší během kultivace při 30 °C. S přidavkem nisinu o vyšší koncentraci došlo ke snížení obsahu biogenních aminů. Přídavek nisinu v různých časových intervalech neměl jednoznačný vliv na obsah biogenních aminů v bujónu.

Klíčová slova: bakterie mléčného kvašení, bakteriociny, biogenní aminy.

ABSTRACT

This thesis deals with monitoring of biogenic amines production by bacteria *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 and *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T3 depending on the addition of bacteriocin nisin. The theoretical part is focused on lactic acid bacteria, their characteristics, species and use in food processing. Further there is description of the bacteriocins produced by these bacteria, focusing on nisin. Finally, attention is being paid to the characteristics, function and the occurrence of biogenic amines in food.

In practical part there was performed screening of 21 bacterial strains isolated from beer and cheese on their decarboxylase activity. On the basis of the obtained results have been selected 2 strains with the highest decarboxylase activity. In these strains was monitored production of biogenic amines (tyramine, spermine) depending on selected factors (addition of nisin, temperature). Production of biogenic amines was analyzed by high performance liquid chromatography with UV/VIS detection after derivatization with dansylchloride. For both strains was the content of biogenic amines higher during cultivation at 30 °C. With the addition of higher concentration of nisin came to a reduction of the content of biogenic amines. The addition of nisin in different time intervals didn't have a clear effect on the content of biogenic amines in medium.

Keywords: lactic acid bacteria, bacteriocins, biogenic amines.

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí své diplomové práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za cenné rady, připomínky, metodické vedení praktické i teoretické práce, trpělivost a čas, který mi věnovala při zpracování mé diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat laborantkám Lence Machálkové, Bc. Veronice Kučabové a Ing. Ludmile Zálešákové za ochotu a pomoc při zpracování praktické části této diplomové práce. Poděkování patří i mé rodině, přátelům a mému příteli za jejich neustálou podporu.

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

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	13
1.1 DRUHY BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	13
1.1.1 Rod <i>Streptococcus</i>	14
1.1.2 Rod <i>Lactococcus</i>	14
1.1.3 Rod <i>Enterococcus</i>	15
1.1.4 Rod <i>Leuconostoc</i>	16
1.1.5 Rod <i>Pediococcus</i>	16
1.1.6 Rod <i>Lactobacillus</i>	17
1.1.7 Rod <i>Bifidobacterium</i>	18
1.2 PROBIOTICKÉ KULTURY	18
1.3 VYUŽITÍ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	20
1.3.1 BMK ve fermentovaných mléčných výrobcích.....	21
1.3.2 BMK ve fermentovaných masných výrobcích	22
1.3.3 BMK ve fermentované zelenině.....	23
2 BAKTERIOCINY	25
2.1 DĚLENÍ BAKTERIOCINŮ.....	25
2.1.1 Bakteriociny I. třídy -lantibiotika	26
2.1.2 Bakteriociny II. třídy – nízkomolekulární bakteriociny	27
2.1.3 Bakteriociny III. třídy – vysokomolekulární bakteriociny.....	27
2.1.4 Bakteriociny IV. třídy – komplexní bakteriociny.....	27
2.2 NISIN	28
2.2.1 Aktivita nisinu	28
2.2.2 Využití nisinu	29
3 AMINY	31
3.1 VÝSKYT A VYUŽITÍ AMINŮ.....	32
4 BIOGENNÍ AMINY	33
4.1 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU BIOGENNÍCH AMINŮ	34
4.2 FUNKCE BIOGENNÍCH AMINŮ	34
4.3 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ.....	35
4.3.1 Biogenní aminy ve vínu	35
4.3.2 Biogenní aminy v pivu	36
4.3.3 Biogenní aminy v sýrech	36
4.3.4 Biogenní aminy v mase a masných výrobcích	37
II PRAKTICKÁ ČÁST	39
5 CÍL PRÁCE	40
6 MATERIÁL A METODY	41

6.1	POUŽITÉ MIKROORGANIZMY	41
6.2	KULTIVAČNÍ MÉDIA A ROZTOKY	42
6.2.1	MRS Agar	42
6.2.2	Modifikovaný MRS bujón	42
6.2.3	Fyziologický roztok.....	42
6.3	STANOVENÍ CITLIVOSTI VYBRANÝCH MIKROORGANIZMŮ	42
6.3.1	Příprava nisinu	43
6.3.2	Difúzní metody.....	43
6.4	SLEDOVÁNÍ VLIVU PŘÍDAVKU NISINU NA RŮST A DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITU BAKTERIÍ.....	44
6.4.1	Kultivační podmínky.....	44
6.4.2	Příprava vzorků pro derivatizaci	45
6.4.3	Derivatizace vzorků.....	45
6.4.4	Vlastní chromatografické stanovení.....	45
6.4.5	Stanovení nárůstu buněk	46
6.4.6	Statistické vyhodnocení výsledků	46
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	47
7.1	POČÁTEČNÍ SKRÍNING CITLIVOSTI DEKARBOXYLÁZA-POZITIVNÍCH KMENŮ K NISINU	47
7.2	PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ U VYBRANÝCH BAKTERIÍ IZOLOVANÝCH Z PIVA A SÝRŮ	50
7.3	VLIV VNĚJŠÍCH FAKTORŮ NA PRODUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ U KMENE <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> RIBM 2-89	52
7.3.1	Produkce tyraminu během kultivace při teplotě 30 °C.....	52
7.3.2	Produkce tyraminu během kultivace při teplotě 12 °C.....	56
7.3.3	Produkce sperminu během kultivace při teplotě 30 °C	59
7.3.4	Produkce sperminu během kultivace při teplotě 12 °C	61
7.4	VLIV VNĚJŠÍCH FAKTORŮ NA PRODUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ U KMENE <i>LACTOBACILLUS CURVATUS</i> SUBSP. <i>CURVATUS</i> T3	64
7.4.1	Produkce tyraminu během kultivace při teplotě kultivace 30 °C.....	64
7.4.2	Produkce tyraminu během kultivace při teplotě kultivace 12 °C.....	68
7.4.3	Produkce sperminu během kultivace při teplotě kultivace 30 °C	70
7.4.4	Produkce sperminu během kultivace při teplotě kultivace 12 °C	73
7.5	SOUHRNNÁ DISKUZE.....	76
	ZÁVĚR	82
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	83
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	89
	SEZNAM OBRÁZKŮ	90
	SEZNAM TABULEK.....	92
	SEZNAM PŘÍLOH.....	93

ÚVOD

Bakterie mléčného kvašení lze charakterizovat jako grampozitivní, aerotolerantní, nesporující, kataláza-negativní bakterie náročné na živiny. Nejčastěji se vyskytují ve formě koků nebo tyčinek. Jedná se o jednu z nejvíce průmyslově významných skupin bakterií. V potravinářství mají široké spektrum využití. Používají se při výrobě fermentovaných potravin. Během fermentace přeměňují sacharidy na kyselinu mléčnou a další vedlejší produkty, jako je kyselina octová, ethanol, oxid uhličitý, aceton, diacetyl. Vzniklé produkty se výrazně podílí na chuti a vůni potravin. Tyto bakterie se vyskytují nejčastěji v pivu, vínu, mléku, mléčných výrobcích, mase, masných výrobcích či fermentované zelenině. Kromě potravin jsou součástí běžné mikroflóry člověka a zvířat. Mezi bakterie mléčného kvašení řadíme rody *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* a další [1, 2, 3].

Bakteriociny jsou látky s antibiotickými účinky produkované především bakteriemi mléčného kvašení. Jedná se o ribozomálně syntetizované peptidy, které jsou štěpeny proteázami v lidském zažívacím traktu. Často jsou zaměňovány s antibiotiky. Hlavním rozdílem je, že antibiotika nejsou ribozomálně syntetizována. Dále se liší ve spektru a mechanismu účinnosti či toxicitě. Většinu bakteriocinů tvoří kationtové, hydrofobní nebo amfifilní molekuly složené z 20 až 60 aminokyselin. Tyto látky působí inhibičně zejména na druhově podobné bakterie. Důležité je, že působí proti patogenním bakteriím nebo bakteriím podílejících se na kažení potravin a tím prodlužují trvanlivost potravin [4, 5, 6].

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární dusíkaté látky vznikající dekarboxylací aminokyselin nebo aminací aldehydů a ketonů. Vyskytují se v rostlinných a živočišných buňkách, kde zajišťují řadu důležitých funkcí. V malém množství jsou pro lidský organismus nepostradatelné, ale ve vysokých koncentracích se mohou projevit jako látky psychoaktivní a vazomotorické. K hlavním příznakům při nadměrné konzumaci biogenních aminů patří hypotenze, hypertenze, bušení srdce, zvracení, dýchací potíže nebo migrény. Vyskytují se v širokém sortimentu potravin, nejčastěji je nalezneme v mléčných výrobcích, masných výrobcích, pivu či vínu [7, 8, 9].

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Bakterie mléčného kvašení (BMK) zahrnují heterogenní skupinu mikroorganismů, jejichž společným znakem je produkce kyseliny mléčné ze sacharidů. BMK jsou grampozitivní, nesporulující, kataláza-negativní, mikroaerofilní bakterie náročné na živiny. Ke svému růstu vyžadují přítomnost laktózy, aminokyselin, vitamínu B a dalších různorodých látek. Tyto živiny si nejsou BMK schopny samy syntetizovat. Poskytují jim je potraviny či rozkládající se rostliny. Tyto skupiny bakterií se vyskytují nejčastěji ve tvaru tyčinek či koků. Mezi nejznámější bakterie mléčného kvašení patří rody *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* [10, 11, 12, 13].

Z potravinářského hlediska mají tyto bakterie velký technologický význam. Vyskytují se v různých potravinách jak rostlinného, tak živočišného původu. BMK jsou důležitou součástí technologicky významných společenstev mikroorganismů, které se využívají při fermentačních procesech při kvašení potravin. Jako tradiční startovací kultury pro fermentaci se podílí na tvorbě textury a aroma výše zmíněných potravin. Kromě potravin lze BMK nalézt v zažívacím traktu člověka nebo zvířat, či v rozkládajících se rostlinách [14, 15, 16, 17]. Během fermentačního procesu produkují látky škodlivé pro ostatní nežádoucí bakterie a vytváří prostředí nevhodné pro růst těchto bakterií. Z tohoto důvodu se mohou používat ke konzervaci potravin. Dalším významným faktorem BMK během fermentace je schopnost snížit pH prostředí až na hodnotu pH 4 a méně, čímž také inhibují růst nežádoucích bakterií. BMK mají lipolytické a proteolytické vlastnosti. Dokáží ve svém metabolismu tvořit štěpné produkty z bílkovin - peptidy a aminokyseliny, které slouží jako zdroj dusíku [17, 18].

Během fermentace potravin dochází k přeměně jednoduchých cukrů na kyselinu mléčnou a celou řadu dalších látek, jako jsou acetoin, diacetyl, 2,3-butandiol, které se podílí na tvorbě chuti dané potraviny. Enzymatické reakce probíhající během fermentace upravují také organoleptické, reologické a nutriční vlastnosti potravin [18].

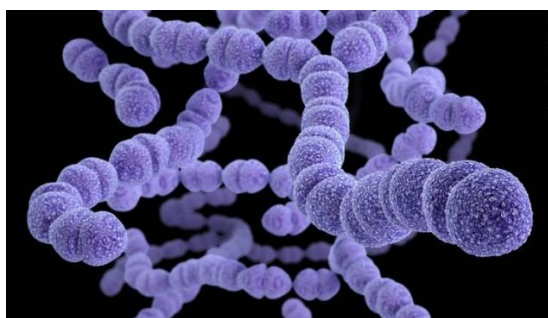
1.1 Druhy bakterií mléčného kvašení

BMK lze třídit podle hlavních a vedlejších produktů fermentace na homofermentativní a heterofermentativní. Společným znakem obou skupin je tvorba kyseliny mléčné ze zkvasitelných sacharidů. Homofermentativní BMK přeměňují sacharidy téměř výlučně na kyseli-

nu mléčnou, kdežto při heterofermentativním metabolismu vznikají kromě kyseliny mléčné i další produkty jako je kyselina octová, oxid uhličitý a za určitých podmínek i ethanol. Podmínkou heterofermentativního metabolismu je, že kyselina mléčná musí tvořit nejméně 50% z celkového množství vznikajících produktů. Z morfologického hlediska jsou si bakterie mléčného kvašení podobné. Vyskytují se ve formě koků nebo tyčinek, které mohou být uspořádány v párech, krátkých či dlouhých řetězcích nebo paličkách [18].

1.1.1 Rod *Streptococcus*

Jedná se o sférické nebo ovoidní nepohyblivé buňky s průměrem menším než 2 μm . Tyto bakterie nejsou schopny tvořit spory. Nejčastěji jsou uspořádány ve dvojicích či krátkých nebo delších řetězcích. Řadí se mezi mezofilní mikroorganismy (MO), což znamená, že optimální teplota jejich růstu je 37 °C. Bakterie rodu *Streptococcus* (obr. 1) jsou homofermentativní a náročné na živiny. Pro svůj růst vyžadují široké spektrum živin – aminokyseliny, peptidy, puriny, pyrimidiny a vitaminy. Některé druhy fermentují kromě sacharidů i organické kyseliny (malonová, citrónová) a aminokyseliny (arginin a serin). V laboratorních podmínkách rostou na polotuhých médiích s přidavkem krevního séra a glukózy ve formě drobných, většinou bezbarvých kolonií. Vyskytují se v dýchacím a zažívacím traktu či na pokožce lidí i zvířat. Z potravinářského hlediska se vyskytují v mléku, mléčných výrobcích, plodech rostlin. V poslední době byly z rodu *Streptococcus* vyčleněny 2 samostatné rody: *Lactococcus* a *Enterococcus* [1, 18, 19].

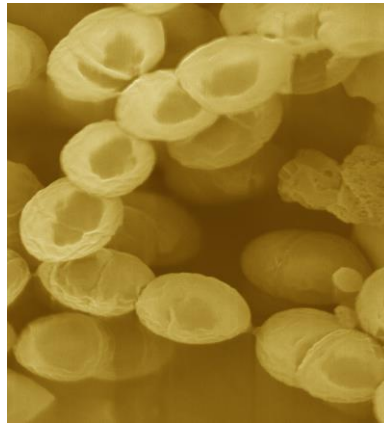


Obr. 1. *Streptococcus pneumoniae* [20]

1.1.2 Rod *Lactococcus*

Buňky tohoto rodu jsou ovoidní nebo sférické vyskytující se po dvou nebo v krátkých řetězcích. Tyto bakterie jsou kataláza i oxidáza-negativní, nepohyblivé a bez pouzder. Optimální teplota růstu je 37 °C. Rostou i při 10 °C, ale při 45 °C již nikoliv. Nerostou také při

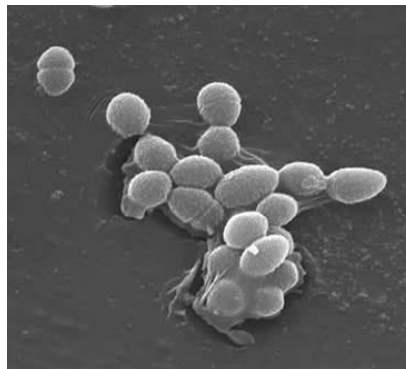
vysoké koncentraci chloridu sodného (asi 6,5 %). Pro lidský organismus jsou považovány za nepatogenní. Vyskytují se nejčastěji v mléce a mléčných výrobcích, kde se využívají jako startovací kultury. Dále se vyskytují na rostlinných materiálech. Na obr. 2 můžeme vidět bakterie rodu *Lactococcus* [1, 18, 19].



Obr. 2. *Lactococcus lactis* [21]

1.1.3 Rod *Enterococcus*

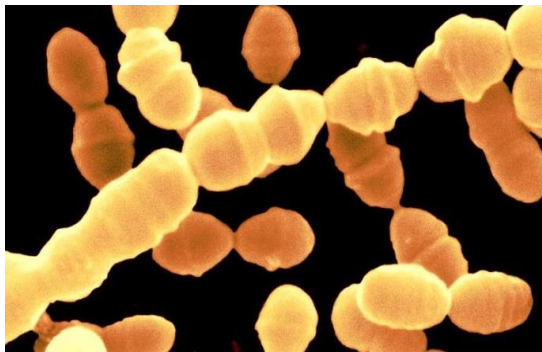
Bakterie tohoto rodu jsou velmi odolné vůči nejrůznějším podmínkám v prostředí. Rostou v širokém rozmezí teplot (10 až 45 °C), při pH 9,6 a v bujónu s přítomností 6,5% chloridu sodného nebo 40% žluče. Jedná se o termorezistentní bakterie - mohou přežít záhřev až 60 °C po dobu 30 minut. Ačkoliv enterokoky nejsou technologicky významné mikroorganismy, v potravinách rostlinného i živočišného původu se vyskytují ve značném množství jako původní mikroflóra. Například tvoří součást přirozené mikroflóry sýrů, fermentovaných salámů a šunek. V potravinářství se používají některé skupiny enterokoků jako indikátory fekálního znečištění pitné vody. Tvar buněk enterokoků můžeme vidět na obr. 3 [18, 19].



Obr. 3. *Enterococcus faecalis* [22]

1.1.4 Rod *Leuconostoc*

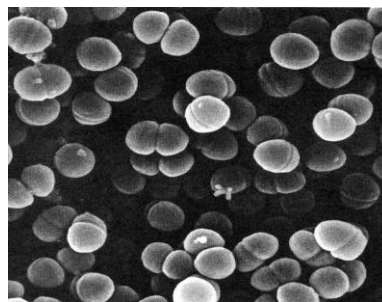
Leukonostoky jsou heterofermentativní bakterie kulatého nebo čočkovitého tvaru uspořádané po dvou nebo v řetízcích (viz obr. 4). Na kultivačních půdách tvoří zpravidla drobné kulaté hladké šedobílé kolonie. Některé z těchto bakterií snášejí prostředí vysokou koncentrací sacharózy (55 až 60 %), a proto mohou kontaminovat sladké potraviny (limonády, slazené minerální vody). Tyto bakterie se účastní fermentace zeleniny (např. zelí), masa a masných výrobků [8, 19, 23].



Obr. 4. *Leuconostoc mesenteroides* [24]

1.1.5 Rod *Pediococcus*

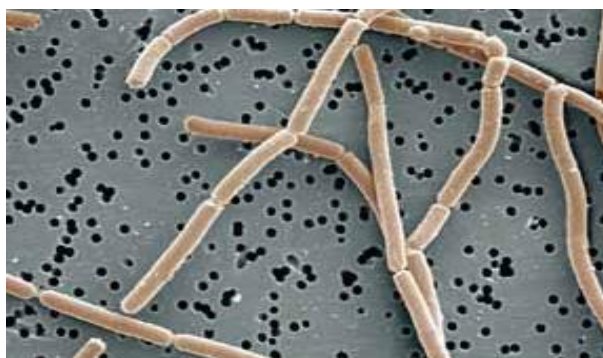
Bakterie rodu *Pediococcus* (obr. 5.) jsou homofermentativní kokovité buňky uspořádané ve dvou na sobě kolmých rovinách (tetrádách). Nejčastěji bývají uspořádány v párech. Na živných půdách tvoří hladké okrouhlé šedé kolonie s průměrem 1 až 2,5 mm. Jejich původní výskyt je v rostlinách, ze kterých se dostávají do daných potravin. V některých potravinách jsou žádoucí a jsou součástí fermentační mikroflóry, jinde nežádoucí. Díky jejich halotolerantnosti se uplatňují při výrobě salámů, klobás, okurek a zelí. Nežádoucí jsou v pivu, kde produkují acetoin, který se při kontaktu se vzdušným kyslíkem mění na diacetyl a ten nepříznivě ovlivňuje chuť piva [1, 18, 19].



Obr. 5. *Pediococcus* [25]

1.1.6 Rod *Lactobacillus*

Tyto buňky mají tvar pravidelných, obvykle delších, tyčinek. Mohou být i kokovitěho tvaru uspořádané v palisádách nebo krátkých řetězcích (viz obr. 6). Optimální růstová teplota těchto mikroorganismů je 30 až 40 °C a optimální pH se pohybuje mezi 5,5 až 6,2. Na agarových půdách rostou ve formě mléčných hladkých lesklých kolonií o průměru 2 až 5 mm. Laktobacily jsou široce rozšířené v prostředí, obzvláště v nejrůznějších potravinách živočišného nebo rostlinného původu, v nápojích, čisté i znečištěné vodě, kysaném zelí, silá-žích. Běžně osídlují gastrointestinální trakt ptáků a savců, včetně člověka. V přírodě se nacházejí v malém množství na povrchu neporušených rostlin. Ve velkém množství se vyskytují v rozkládajícím rostlinném materiálu – zejména v kazícím se ovoci. Dále je nalezneme v mléce, mléčných výrobcích, mase, masných výrobcích a v marinovaných rybích výrobcích [18, 19, 20].



Obr. 6. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* [26]

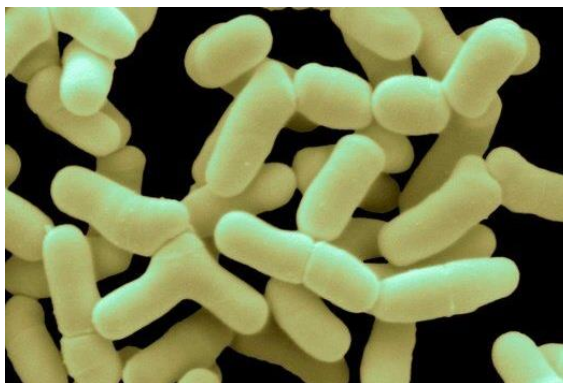
Na základě konečných produktů fermentace je možné rozdělit laktobacily na 3 skupiny [18, 19].:

- a) I. skupina – obligátně homofermentativní: tato skupina fermentuje hexózy výhradně na kyselinu mléčnou, pentózy ani glukonát nefermentuje. Do této skupiny patří tyto bakterie: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*.
- b) II. skupina – fakultativně heterofermentativní: tato skupina fermentuje hexózy na kyselinu mléčnou nebo na směs kyseliny mléčné, octové, mravenčí a ethanolu. Fermentuje také pentózy na kyselinu mléčnou a octovou. Do této skupiny řadíme tyto bakterie: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sake*.

- c) III. skupina – obligátně heterofermentativní: tato skupina fermentuje hexózy na směs kyseliny mléčné, octové a oxidu uhličitého. Pentózy fermentují na kyselinu mléčnou a octovou. Do této skupiny patří bakterie: *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus kefir* [18, 19].

1.1.7 Rod *Bifidobacterium*

Tento rod se přímo neřadí mezi bakterie mléčného kvašení. Jedná se o fylogeneticky nepříbuzné bakterie, které mají podobné vlastnosti jako mléčné bakterie, ale taxonomicky se řadí do skupiny jiné. Bifidobakterie (obr. 7) mají nepravidelný tvar a nejčastěji se vyskytují ve tvaru tyčinek. Rostou jednotlivě, v řetězcích či v hvězdicovitém nebo palisádovém uspořádání. Na kultivačním médiu rostou ve formě hladkých vypouklých lesklých bílých kolonií s hladkými okraji. Nerostou za přístupu kyslíku. Tyto bakterie jsou přirozenou součástí mikroflóry v lidském organismu, podporují zde trávení a posilují imunitní systém. Významnou roli hrají v intestinálním traktu novorozenců, kde produkují kyselinu mléčnou a octovou, které inhibují růst nežádoucích bakterií a stimulují intestinální peristaltiku [1, 18, 19].



Obr 7. *Bifidobacterium bifidum* [27]

1.2 Probiotické kultury

Termín probiotika je odvozen z řeckého jazyka a v překladu znamená "pro život". Poprvé byl použit v roce 1965 k popisu látky vylučované jedním mikroorganizmem, která stimuluje růst dalších mikroorganismů [28].

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které se záměrně přidávají do potravin s cílem podpořit zdraví konzumenta. Tyto látky jsou stále více využívány, jelikož působí pozitivně na udržování zdravé střevní mikroflóry. Dále mohou chránit lidský organismus před zažívacími poruchami, včetně infekcí a zánětlivých onemocnění střev. Kmeny těchto bakterií inhibují patogenní bakterie. Probiotika jsou schopny přiléhat na střevní stěnu a tím zabránit přilnutí střevním patogenům a následnému onemocnění. Jsou schopné produkovat antimikrobiální látky, které sníží počet nežádoucích životaschopných buněk. Produkují zejména kyselinu mléčnou, kyselinu octovou, oxid uhličitý nebo peroxid vodíku [2, 16, 29, 30].

Účinná probiotika by měla mít tyto vlastnosti:

- vyvíjet příznivý účinek na zdraví hostitele,
- být nepatogenní a netoxická,
- udržovat svoji životaschopnost během skladování a zpracování,
- mít dobré sensorické vlastnosti.

Zdravotní výhody spojené s příjmem těchto látek spočívají ve zvýšení odolnosti proti infekčním onemocněním zažívacího traktu, potlačení rakoviny, snížení hladiny cholesterolu či zlepšení trávení [2, 18].

Mezi nejznámější bakterie s probiotickými účinky patří: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium* sp., *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* [18].

Potraviny obsahující probiotika jsou označovány jako "funkční potraviny". V posledních letech došlo díky rozsáhlým výzkumům ke zvýšení množství těchto potravin. Funkční potraviny jsou používány za účelem prevence civilizačních chorob. Probiotické kultury jsou nejčastěji přidávány do jogurtů a dalších fermentovaných mléčných výrobků [31].

Další využití těchto kultur má význam u jedinců, kteří trpí intolerancí na laktózu. Tito jedinci nemají schopnost sami si vytvořit enzym β -galaktozidázu, který štěpí disacharid laktózu. Nestrávený cukr ve střevech je zdrojem živin pro střevní bakterie, které tento cukr přeměňují na plyny a další látky dráždící tlusté střevo a způsobují nadýmání či průjem. Bylo dokázáno, že přítomnost životaschopných startovacích kultur v jogurtu může být pro tyto jedince přínosem. Vyplývá to z přítomnosti β -galaktozidázy v bakteriálních buňkách. Bak-

terie prochází žaludkem a při vstupu do tenkého střeva dochází k interakci se žlučí, zvýší se prostupnost buněk, čímž se umožní vstup laktózy do buněk a následně dojde k její hydrolýze. Aby byla tato metoda účinná, je důležitá vysoká aktivita β -galaktozidázy v jogurtových kulturách a zachování této aktivity během přepravy a skladování těchto výrobků. Toto využití je ovšem pouze výjimečné [10].

V současné době roste zájem využití probiotik v krmivech pro hospodářská zvířata. Hlavním potenciálem je náhrada antibiotik. Důležitá je správná kombinace směsi jednotlivých bakteriálních druhů, aby bylo dosaženo požadovaného účinku. Probiotika u hospodářských zvířat nejen inhibují střevní patogeny, ale mohou poskytnout některé specifické živiny, které podporují růst zvířat nebo zvyšují chuť k jídlu [10].

Výzkum těchto kultur bude probíhat neustále, jelikož roste poptávka po probiotických výrobcích. Budou zkoumány účinky probiotik v souvislosti s alergiemi a různými druhy onemocnění. Snaha bude i o zajištění větší životaschopnosti a stability těchto kultur [32].

1.3 Využití bakterií mléčného kvašení

BMK mají široké spektrum využití. Ve velkém měřítku se uplatňují v potravinářském průmyslu. Cílem potravinářství je hledání a výběr nejvhodnějších kmenů BMK pro dosažení dlouhodobé vysoké kvality výrobků. Před použitím kmenů v potravinářství je nutné dané kmeny identifikovat a charakterizovat. Nejčastěji se používají k výrobě fermentovaných potravin (tab. 1). Fermentaci lze považovat za jeden z nejstarších způsobů pro dosažení požadované trvanlivosti a sensorické hodnoty potravin. BMK zkracují dobu zrání těchto výrobků, minimalizují výrobní ztráty, zlepšují sensorické vlastnosti a potlačují růst nežádoucích mikroorganismů. Fermentační proces musí být řízen a kontrolován, aby nedošlo k tvorbě nadměrného množství kyseliny mléčné a tím příliš vysoké kyselosti výrobku [12].

Ve fermentovaných výrobcích se používají jako tzv. startovací kultury. Kultury mohou být dodány ve formě tekuté, zmrazené či sušené. Startovací kultury se mohou dále dělit na základě jejich teploty růstu na mezofilní a termofilní. Mezofilní kultury mají optimální teplotu růstu při teplotě 30 °C a lze mezi ně zařadit bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc lactis*. Právě při teplotě 30 °C

produkují tyto bakterie nejvíce kyseliny mléčné. Termofilní kultury nejlépe rostou při teplotě 45 °C. Mezi tyto druhy patří bakterie *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus debrueckii*, *Lactobacillus helveticus* [12].

1.3.1 BMK ve fermentovaných mléčných výrobcích

Startovací kultury v mléčných výrobcích se mohou skládat z jednotlivých kmenů použitých samostatně nebo v jejich kombinované směsi [10].

Jogurt patří k celosvětově nejrozšířenějším fermentovaným výrobkům s využitím termofilní kultury. Ve většině zemí je jogurt definován jako produkt získaný kvašením mléka s jogurtovou mikrobiální kulturou, která zahrnuje kmeny *Lactobacillus debrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*. Jedná se o termofilní bakterie, které pro svůj růst vyžadují teplotu 45 °C. Obvykle se přidávají v poměru 1:1. Tyto MO žijí v symbiotickém vztahu. Nejdříve rostou bakterie *Streptococcus thermophilus*, které vyprodukují kyselinu mléčnou a současně sníží množství kyslíku, čímž vytvoří prostředí vhodné pro růst bakterií *Lactobacillus debrueckii* subsp. *bulgaricus*. Ty následně štěpí bílkoviny na peptidy a aminokyseliny, které znovu využívá *Streptococcus thermophilus*. Ten je citlivější na kyselé prostředí, proto během skladování jogurtů může dojít k jeho poklesu. Fermentace jogurtů může probíhat ve fermentačním tanku a poté následuje plnění do obalů nebo přímo ve spotřebitelských obalech [10].

Kysané podmásí se vyrábí kysáním mléka. Při jeho výrobě se používají směsi mezofilních BMK produkujících jak kyselinu mléčnou, tak i jiné aromatické látky, zejména diacetyl. Tuto látku získávají z kyseliny citronové, proto se do mléka při výrobě podmásí může přidávat malé množství citrátu sodného. K výrobě se využívají druhy *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Poslední dva zmíněné kmeny produkují diacetyl a významně se podílí na tvorbě aroma podmásí [10].

Acidofilní mléko je fermentovaný mléčný výrobek s výraznou vůní. Základní kulturou pro výrobu je *Lactobacillus acidophilus*. Tento kmen pozitivně působí na lidský organismus. Nevýhodou je vysoká produkce kyseliny mléčné, což má za následek příliš vysokou kyselost výrobku. Proto je konzumace tohoto výrobku omezená [10].

Kefír se vyrábí z mléka s přidavkem kyselých kultur z původních kefirových zrn nebo z kultur uměle vytvořených. Kefírová zrna jsou složena z polysacharidů, biomasy kvasinek a bakterií. Zrna vyžadují náležitou péči a hygienu, aby nedošlo k výskytu koliformních bakterií, které by měly negativní vliv na výsledný produkt. Biomasa kvasinek tvoří *Saccharomyces kefir*, *Candida kefir*. Z bakterií jsou přítomny laktokoky, laktobacily a leukonostoky. Typické aroma tvoří rovnováha vzniklých produktů – kyselina mléčná, diacetyl, acetaldehyd, ethanol. Během kvašení vzniká oxid uhličitý, který dodává kefiru šumivý charakter [10].

Sýry tvoří rozsáhlou skupinu mléčných výrobků. Volba startovacích kultur závisí na požadovaném množství kyseliny mléčné během výroby, proteolytické aktivitě vybraných kmenů a podmínkách během výroby a skladování (pH, teplota, množství NaCl). Jako primární kultury se používají bakterie *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* sp., *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus debrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus debrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*. První dva zmíněné MO se používají u většiny sýrů, zatímco zbylé se používají u sýrů ošetřených vyšší teplotou – Ementál nebo Čedar. Primární kultury mají za úkol přeměňovat laktózu na kyselinu mléčnou a tím snižovat pH surovin. Kromě primárních kultur se využívají i tzv. kultury sekundární, které vytváří typické aroma pro daný druh sýru. U sýrů s vysokodohříváním sýřeninou se využívají kultury *Propionibacterium freundenreichii* vytvářející oxid uhličitý podílející se na tvorbě sýrových ok. U sýrů s plísní na povrchu se používá plíseň *Penicillium camemberti* nebo *Penicillium caisecolum*. Pro sýry s plísní v těstě je typická plíseň *Penicillium roqueforti*. U sýrů zrajících pod mazem se používají jako sekundární kultury kvasinky *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, které vytvoří vhodné podmínky pro růst bakterie *Brevibacterium linens*, tvořící na povrchu sýrů typický žlutooranžový maz [10, 33, 34, 35].

1.3.2 BMK ve fermentovaných masných výrobcích

Fermentované masné výrobky jsou definovány jako masné výrobky složené z masa, tuku, solí, dusičnanů nebo dusitanů a koření. Tyto suroviny se smíchají a vzniklá směs se plní do obalů. Přidají se startovací kultury a probíhá fermentace. Následuje sušení a zrání. Takto získané výrobky mají dlouhou dobu trvanlivosti. Dříve se startovací kultury nepřidávaly, fermentace probíhala pomocí mikroorganismů přítomných v původních surovinách, MO pocházejících z náradí používaného během výroby nebo MO z prostředí. Tento způsob

výroby byl příliš dlouhý, proto se přešlo na modernější způsob výroby pomocí přidavku startovacích kultur. Jako startovací kultury se využívají rody *Pediococcus* (*P. acidilactici*, *P. pentosaceus*), *Leuconostoc*, *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. sake*). Kromě BMK se zde využívají i mikrokoky a stafylokoky. Zástupci stafylokoků jsou zodpovědní za lipolýzu, čímž přispívají k uvolnění mastných kyselin. U zrajících uzenin s plísní na povrchu výrobku se používají rody *Penicillium nalgiovense*, *P. chrysogenum* [35, 36, 37].

1.3.3 BMK ve fermentované zelenině

Fermentace rostlinného materiálu je starověká metoda konzervace, jejíž počátky pochází z Asie. V Evropě existuje asi 21 druhů kvašené zeleniny, mezi nejznámější patří kysané zelí, okurky a olivy. Na rostlinném materiálu byly nalezeny tyto bakterie: *Lactobacillus* (*L. brevis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. mesenteroides*), *Pediococcus* (*P. acidilactici*, *P. pentosaceus*), *Leuconostoc*, *Enterococcus* (*E. faecalis*), *Lactococcus* (*L. lactis*). Přestože byly z rostlinného materiálu izolovány rody *Lactococcus* a *Enterococcus*, jejich podíl na ve spontánním kvašení je téměř nulový. Dominující jsou rody *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*. Během fermentace, zejména u zelí, může dojít k produkci nežádoucího slizu. Tento sliz je produkován bakterií *L. mesenteroides* [2, 35].

Tabulka 1: Bakterie mléčného kvašení ve fermentovaných produktech [3]

Fermentované produkty	Bakterie mléčného kvašení
Tvrdé sýry bez ok	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
Sýry s malými oky	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Švýcarské a italské sýry	<i>Lb. debrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. debrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>
Máslo a podmáslí	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Jogurty	<i>Lb. debrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>
Fermentované probiotické mléko	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i>
Kefír	<i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. kefiranofacies</i> , <i>Lb. brevis</i>
Fermentované párky	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
Kysané zelí	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>P. acidilactici</i>
Fermentované olivy	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pentosus</i>
Fermentovaná zelenina	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. fermentum</i>
Víno	<i>O. oeni</i> , <i>Lb. sake</i>
<p><i>B.</i> = <i>Bifidobacterium</i>, <i>L.</i> = <i>Lactococcus</i>, <i>Lb.</i> = <i>Lactobacillus</i>, <i>Leuc.</i> = <i>Leuconostoc</i>, <i>O.</i> = <i>Oenococcus</i>, <i>P.</i> = <i>Pediococcus</i>, <i>S.</i> = <i>Streptococcus</i></p>	

2 BAKTERIOCINY

Bakteriociny jsou malé antimikrobiální peptidy nebo proteiny produkované bakteriemi. Prvním objeveným bakteriocinem byl v roce 1925 tzv. kolicin produkovaný kulturami bakterií *Escherichia coli*. Původní význam termínu bakteriocin byl do jisté míry ovlivněn účinky kolicinu – to znamená, že bakteriociny byly původně definovány jako bakteriocidní proteiny vyznačující se smrtící účinkem na úzký rozsah příbuzných bakterií. Později byly mezi těmito druhy rozpoznány rozdíly. Bakteriociny produkované grampozitivními bakteriemi mají širší spektrum účinku a nižší molekulovou hmotnost [4, 5, 38, 39, 40].

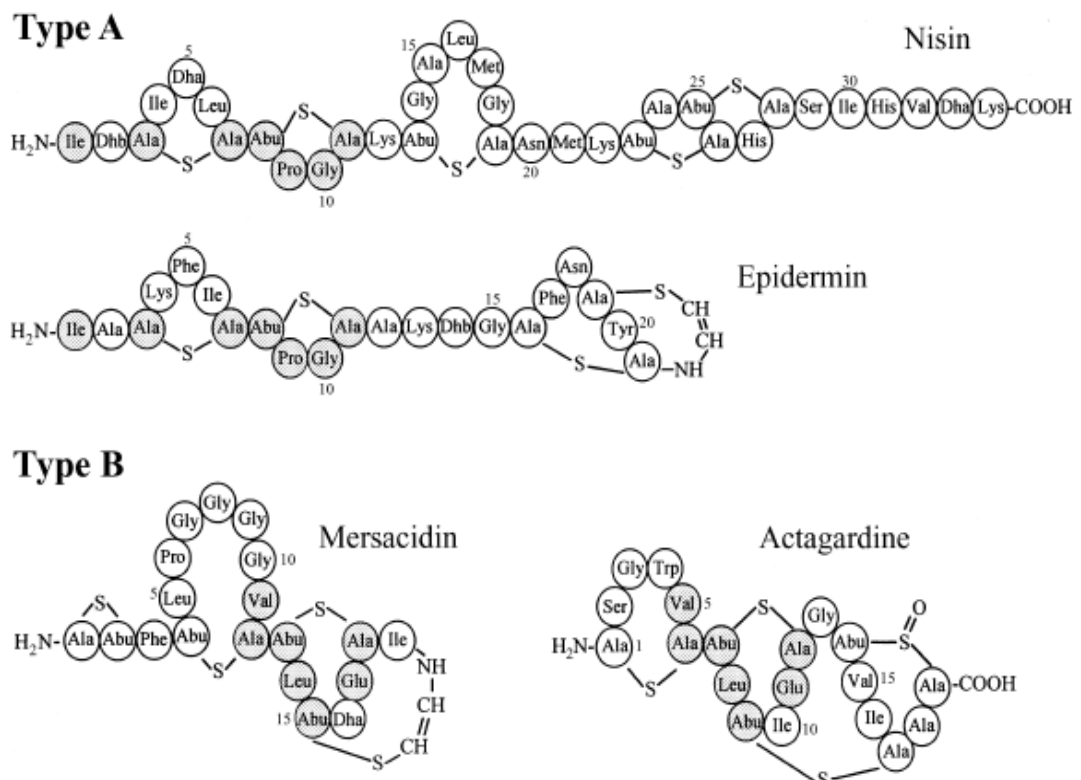
Za normálních okolností jsou bakteriociny produkované BMK kationtové, hydrofobní nebo amfifilní molekuly složené z 20-60 aminokyselinových zbytků. Jejich antimikrobiální účinek působí na široké spektrum mikroorganismů přispívajících ke kažení potravin nebo potravinové patogeny, jako je *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* nebo gramnegativní bakterie *Escherichia coli* a *Salmonella*. Mnoho bakteriocinů způsobuje letální účinek porušením permeability membrány cílového organismu nebo porušením buněčné stěny. Prioritně působí proti peptidoglykanu grampozitivních bakterií, protože gramnegativní bakterie se proti jejich účinkům chrání buněčnou stěnou, která má jiné složení než u bakterií grampozitivních. Bakteriociny mohou být v potravinářském průmyslu vyprodukovány během spontánní fermentace potravin. V mnohem vyšším množství jsou produkovány během řízené fermentace *in vitro* za optimálních fyzikálních a chemických podmínek. Cílem je absence limitujících faktorů, jako je silná difúze, inaktivace proteázami či adsorpce na části potravin. Například snížením pH se sníží adsorpce bakteriocinů na molekuly potravin a tím se zvýší jejich biologická dostupnost. Zvýšením koncentrace NaCl dojde ke snížení biologické dostupnosti. Purifikace bakteriocinů probíhá nejčastěji srážením síranem amonným, extrakcí chloroformem nebo methanolem a následně vysokotlakou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi. [4, 5, 38, 39, 40, 41].

2.1 Dělení bakteriocinů

Bakteriociny jsou rozděleny podle velikosti molekuly do 4 tříd.

2.1.1 Bakteirociny I. třídy -lantibiotika

Do první třídy řadíme tzv. lantibiotika. Jedná se o malé peptidy s molekulovou hmotností < 5 kDa obsahující 19 až 50 aminokyselin. Tyto peptidy obsahují neobvyklou polycyklickou thioetherovou aminokyselinu lanthionin nebo methyllanthionin. Dále obsahují nenasycené aminokyseliny dehydroalanin a dehydrobutyryn. Lantibiotika se dále dělí podle chemické struktury a antimikrobiální aktivity na typ A a typ B (obr. 8). Lantibiotika typu A jsou flexibilní, prodloužené peptidy s pozitivním nábojem. Svůj účinek projevují vytvořením pórů v bakteriální membráně. Lantibiotika typu B jsou menší kulovité peptidy s negativním nebo nulovým nábojem. Do této třídy můžeme zařadit nisin, epidermin, gallidermin, lacticin 3147 či subtilin. Lantibiotika mají potenciální využití v potravinářství díky jejich širokému spektru účinnosti, vysoké stabilitě, autoregulačnímu systému – jsou schopny přizpůsobit se okolním podmínkám a jsou cenově dostupné [5, 6, 42, 43, 44].



Obr. 8. Sekvence aminokyselin lantibiotik typu A a B [43]

2.1.2 Bakteriociny II. třídy – nízkomolekulární bakteriociny

Jedná se o malé tepelně stabilní hydrofobní peptidy s molekulovou hmotností < 10 kDa. Peptidy jsou obvykle složeny z 30 až 100 aminokyselin. Tyto látky neobsahují lanthionin a tvoří největší skupinu bakteriocinů. Jsou rozděleny do 3 podskupin [5, 44].

Podskupina IIa zahrnuje pediocinové bakteriociny s N-terminální koncovou sekvencí Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Cys. Pediociny jsou produkovány rodem *Pediococcus*. Pediokoky se používají jako startovací kultury ve fermentovaném mase, masných výrobcích a fermentované zelenině. Této podskupině je věnována velká pozornost díky jejich působení proti patogení *Listeria monocytogenes*. Bakteriociny této podskupiny mají ve srovnání s lantibiotiky užší spektrum účinnosti. Jsou aktivní proti bakteriím *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*. Rezistentní vůči této podskupině jsou zástupci rodu *Lactococcus*. Tyto bakteriociny jsou společně s bakteriociny I. třídy stabilní v kyselém prostředí a se zvyšujícím se pH klesá jejich tepelná stabilita. Prototypem této třídy je pediocin PA-1/AcH. Podobný tomuto bakteriocinu je sakacin 674 produkováný bakterií *L. sake*. Do této podskupiny patří dále bakteriociny leucocin A či enterocin P [5, 44].

Podskupina IIb zahrnuje bakteriociny skládající se ze dvou peptidů a patří sem např. lactococcin G nebo lacticin F. Podskupinu IIc tvoří ostatní bakteriociny, řadíme sem např. lactococcin A či plantaricin A [5, 44].

2.1.3 Bakteriociny III. třídy – vysokomolekulární bakteriociny

Tuto třídu tvoří tepelně labilní bakteriociny s molekulovou hmotností > 30 kDa. O této třídě bakteriocinů není dostatečné množství informací. Patří sem např. helveticin J nebo caseicin 80 [5].

2.1.4 Bakteriociny IV. třídy – komplexní bakteriociny

Tyto bakteriociny obsahují kromě proteinové části jednu nebo více částí neproteinových – sacharidových nebo lipidových. Do této skupiny řadíme např. lactocin 27, pediocin SJ-1, plantaricin [5].

2.2 Nisin

Jedná se o polypeptid s nízkou molekulovou hmotností používaný ke konzervaci potravin přes více než 50 let. Byl objeven v roce 1928. Strukturu tvoří 34 aminokyselinový polypeptid s molekulovou hmotností 3510 daltonů. Nisin se řadí mezi lantibiotika. Je produkován bakterií mléčné startovací kultury *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Má mnohem širší spektrum účinnosti oproti jiným bakteriocinům a vysokou úroveň bezpečnosti. Působí proti různým rodům grampozitivních bakterií. Důležité je, že působí i proti sporotvorným bakteriím *Bacillus* a *Clostridium*. Díky jeho účinnosti proti těmto sporotvorným bakteriím se využívá jako konzervační prostředek u pasterizovaných nebo jinak tepelně ošetřených potravin, které nejsou plně sterilizovány. Spory jsou na nisin citlivější než samostatné buňky a k citlivosti také přispívá vyšší kyselost prostředí. Dalším faktorem ovlivňujícím citlivost spor je teplota. Spory, které přežily záhřev 121 °C po dobu 3 minut, jsou k nisinu 10 krát citlivější než spory, které nebyly tepelně ošetřeny. Tento bakteriocin není účinný proti gramnegativním bakteriím, kvasinkám a plísním. Dlouhá léta byly prováděny výzkumy týkající se bezpečnosti nisinu pro lidské zdraví a v roce 1962 byly publikovány výsledky prokazující bezpečnost této látky. Od roku 1969 byl schválen světovou zdravotnickou organizací (WHO) přídavek nisinu do potravin. Jako přídatná látka se vyskytuje pod kódem E234. Existuje 6 forem nisinu označených A, B, C, D, E, Z. Nisin A je charakterizován nejvyšší aktivitou. Forma Z je přírodní varianta nisinu lišící se od formy A substitucí zbytku histidinu kyselinou asparagovou [5, 6, 38].

Tento primární metabolit vyroben ribozomální transkripcí a translací se nevyužívá v lidské a veterinární medicíně ani jako přísada do krmení pro zvířata. Bylo dokázáno, že nisin nepřispívá k rezistenci vůči antibiotikům. Komerčně se dodává nejčastěji v práškové formě. Nisin ve formě prášku je extrémně stabilní, pokud je skladován při teplotě do 25 °C a chráněn proti přímému slunečnímu záření. Rozpustnost a stabilita je ovlivněna hodnotou pH roztoku. Optimální tepelná stabilita je při pH 3-3,5. Rozpustnost je lepší při nízkých hodnotách pH. Při pH 2,2 je rozpustnost 56 mg/l, při zvýšení pH na 6 dochází k poklesu rozpustnosti na 1,5 mg/l a při hodnotě pH 8,5 je rozpustnost nisinu pouze 0,25 mg/l [5, 38].

2.2.1 Aktivita nisinu

Aktivita nisinu se uvádí v jednotkách $\mu\text{g/l}$ nebo $\mu\text{g/kg}$. Čistý nisin je považován pro použití v potravinách za příliš silný, proto se používají jeho koncentráty obsahující nejméně 2,5 %

této látky. Jeho aktivita v rámci potravinového systému závisí na mnoha faktorech – pH, tepelném zpracování, aktivitě vody, ochranné atmosféře, ostatních přídatných látkách. Mezi obsahem vody a tímto bakteriocinem je synergický vztah. Nisin funguje lépe v kapalných nebo homogenních potravinách ve srovnání s pevnými heterogenními výrobky. V prvním případě dojde k rovnoměrnému rozložení bakteriocinu v celé potravinové matrici. Tuto látku však není vhodné používat v kombinaci s některými potravinovými přídatnými látkami. Nisin je degradován v přítomnosti disiřičitanu sodného používaného jako antioxidantu nebo bělidla a oxidu titaničitého. Účinnost nisinu snižují i polyvalentní kationty Ca^{2+} , Mg^{2+} . Na druhou stranu s některými sloučeninami má synergický vztah. Mezi tyto sloučeniny patří esenciální oleje, organické kyseliny, jiné bakteriociny, česnekový extrakt, lysozym, chelatační činidla, laktoperoxidáza, neionogenní amfoterní povrchově aktivní látky a emulgátory [5, 6, 38].

Během skladování potravin dochází k poklesu obsahu nisinu. Pokles závisí na teplotě skladování, přičemž během chladírenského skladování je množství relativně stabilní oproti skladování při teplotě okolí. V tepelně neošetřených potravinách může být sníženo množství nisinu kvůli proteolytickým enzymům získaným z mikrobiálních, živočišných nebo rostlinných buněk z potravin. Mezi enzymy schopné degradovat nisin patří pankreatin a α -chymotrypsin. Pro stanovení vhodné koncentrace nisinu se používá difúzní test. Jako indikátorový mikroorganismus se používá grampozitivní bakterie *Micrococcus luteus*, která dobře roste při 30 °C a je velmi citlivá na nisin. V přítomnosti nisinu dochází k tvorbě inhibičních zón, u nichž se měří jejich průměr [5, 38].

2.2.2 Využití nisinu

Pasterizované mléko a mléčné produkty: Zájem o použití nisinu v těchto výrobcích pochází často ze zemí s teplým podnebím, které nemají dostatečné chladírenské zařízení a chlazenou dopravu. Nisin zde může chránit výrobky proti vyšším teplotám a prodloužit tak jejich trvanlivost. Využívá se i v ostatních zemích při skladování za chladírenských teplot. Laktokoky produkující nisin se přirozeně vyskytují v mléce, proto zde může být v nízké koncentraci nisin přítomen. Např. u pasterizovaného mléka ošetřeného teplotou 72 °C po dobu 15 sekund se výrazně zvýšila doba trvanlivosti při skladovací teplotě 10 °C a přidavku nisinu 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Nisin může být přidán do pasterizovaných mléčných dezertů. Přidáním 3,75 $\mu\text{g}/\text{g}$ této účinné látky byla prodloužena trvanlivost těchto výrobků skladovaných při

teplotě 12 °C z 6 dnů na 35. Ve zmrzlinách snižuje během výrobního procesu a skladování při teplotě 18 °C po dobu 3 měsíců množství bakterie *Listeria monocytogenes*. Z ostatních mléčných výrobků se tento bakteriocin uplatňuje ve šlehačce, smetaně či jogurtu [38].

V mase a masných výrobcích se používá jako konzervační prostředek společně s chelatačními činidly, kdy působí na patogenní bakterie *E. coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium a *Staphylococcus aureus*. První studie použití nisinu ve vařených masných výrobcích byly zaměřeny na snížení hladiny dusitanů, které musí být přidávány do masných výrobků z důvodu tvorby požadované růžové barvy. Tato látka je účinnější ve výrobcích s vyšším podílem libové svaloviny. Využívá se v klobásách a šunkách [38].

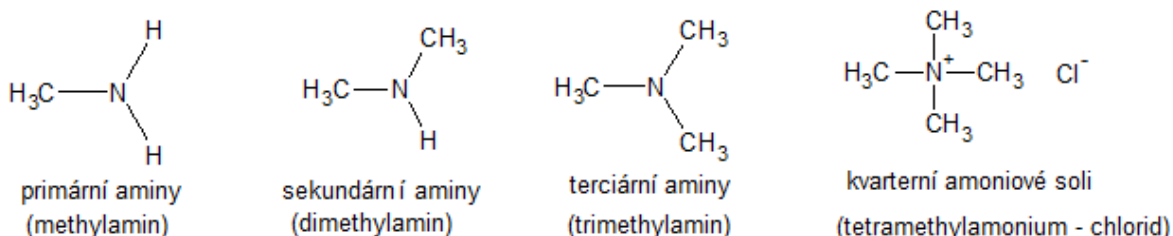
Ryby a mořské produkty: Je patrné, že reálným problémem čerstvých mořských produktů je psychrotrofní patogen *Listeria monocytogenes*. Většina těchto produktů není před spotřebou tepelně opracována. Typickými zástupci jsou uzený losos nebo pstruh. Mořské výrobky jsou obvykle baleny vakuově nebo v modifikované atmosféře, kdy je z obalu odstraněn kyslík a nahrazen oxidem uhličitým. Obsah NaCl je < 5% a pH vyšší než 5. Nisin v kombinaci s atmosférou oxidu uhličitého způsobuje zvýšenou účinnost proti tomuto patogenu. Použití nisinu nemá negativní vliv na senzoryckou kvalitu ryb - přijatelné smyslové vlastnosti jsou zachovány po dobu jednoho týdne i více [38].

Nisin se může využívat v alkoholických nápojích jako je pivo či víno [38].

3 AMINY

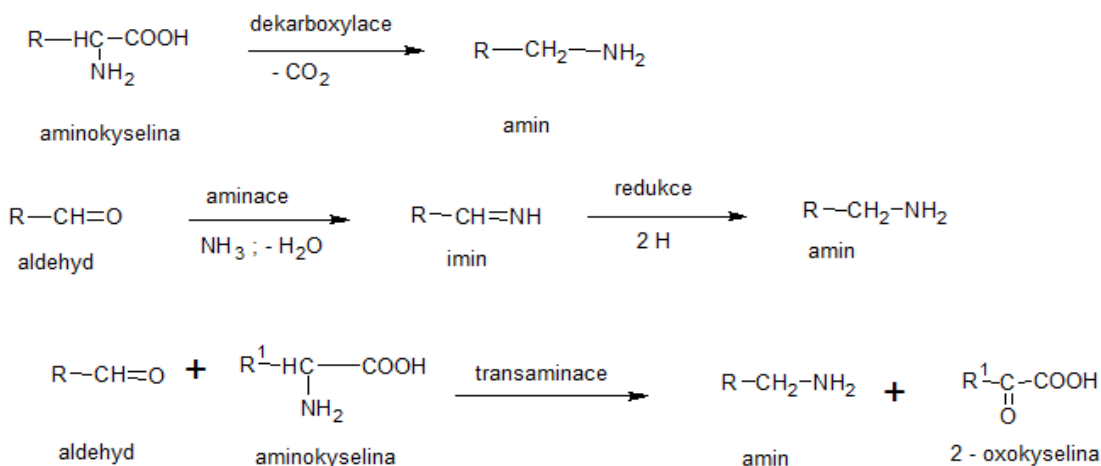
Aminy jsou sloučeniny vyskytující se v živých organismech jako produkty metabolismu. Jedná se o deriváty amoniaku, ve kterých dochází k nahrazení atomů vodíku uhlovodíkovými zbytky. Podle stupně substituce atomů vodíků lze rozlišit aminy na čtyři třídy (obr. 9):

- Primární aminy: R_1NH_2
- Sekundární aminy: R_2NH_2
- Terciární aminy: R_3NH_2
- Kvartérní amoniové soli: $R_4N^+(OH)^-$



Obr. 9. Struktura aminů [45]

Primární aminy vznikají dekarboxylací aminokyselin katalyzovanou dekarboxylázami nebo jako produkty jiných enzymově katalyzovaných reakcí - aminací či transaminací aldehydů. K dekarboxylaci aminokyselin dochází hlavně v živočišných materiálech, kdežto vznik aminů z aldehydů se uplatňuje především v rostlinných materiálech (obr. 10). Sekundární a terciární aminy nevznikají z aminokyselin, ale z jiných prekurzorů [45, 46].



Obr. 10. Vznik aminů [45]

Aminy obsahující ve své struktuře 1 až 5 uhlíků mají fyzikální vlastnosti velmi podobné amoniaku. Vyznačují se vysokou rozpustností ve vodě a charakteristickým zápachem po amoniaku. Jejich rozpustnost značně klesá se zvyšující se molekulovou hmotností. Aminy se mohou vyskytovat ve formě acyklické nebo aromatické. Aromatické aminy jsou zpravidla husté kapaliny nebo pevné látky, nerozpustné ve vodě s typickou výraznou vůní. Acyklické aminy methylamin, dimethylamin, trimethylamin a ethylamin mají při pokojové teplotě plynou povahu. Ostatní acyklické aminy jsou kapaliny či pevné látky [45, 46].

Důležité jsou aminokyseliny obsahující alifatický nebo aromatický řetězec, jehož součástí je aminoskupina NH_2 a karboxylová skupina COOH . Při rozkladu se uvolňují více či méně složité aminy charakteristické hnilobným zápachem. Ty se mohou dále rozložit až na oxid uhličitý a amoniak [45, 46].

3.1 Výskyt a využití aminů

Velké množství aminů i jejich derivátů se vyskytuje běžně v živé přírodě. Z rostlin bylo izolováno přes pět tisíc alkaloidů, které jsou ze strukturního hlediska řazeny mezi aminy. Jedná se o látky s vysokou biologickou aktivitou. Mezi nejznámější patří toxický nikotin obsažený v tabáku, chinin sloužící k léčbě malárie či kokain, který je stimulantem nervového systému. Důležité jsou tzv. neurotransmitery podílející se na přenosu vzruchu u živočichů, mezi které lze zařadit adrenalin, hormon stresové reakce vylučovaný nadledvinkami nebo serotonin, což je hormon syntetizovaný v mozku ovlivňující náladu či krevní srážlivost. Aminy tvoří v mnoha potravinách typické aroma, slouží tedy jako vonné látky a to hlavně u potravin živočišného původu jako jsou sýry, maso, ryby a vodní živočichové [45, 46].

Tyto látky mají široké spektrum využití. Používají se jako insekticidy, fungicidy, barviva, povrchově aktivní látky, herbicidy, inhibitory koroze a mají uplatnění ve farmaceutickém průmyslu [45].

4 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární organické báze vykazující biologickou aktivitu. Jedná se o produkty běžné metabolické aktivity rostlin, živočichů a mikroorganismů. Některé z těchto látek mají významné biologické vlastnosti, neboť se uplatňují jako tkáňové hormony (histamin), stavební látky, které se účastní biosyntézy dalších hormonů živočichů, fytohormony, auxiny, alkaloidy či další sekundární metabolity rostlin [7, 8, 47].

V potravinách vznikají především dekarboxylací přirozených aminokyselin působením enzymů dekarboxyláz (tabulka 2), kterými jsou vybaveny četné druhy hnilobných bakterií, ale také řada bakterií mléčného kvašení. Dále mohou vznikat aminací nebo transaminací z aminokyselin a karbonylových sloučenin působením enzymů transaminas [7, 47].

Tabulka 2: Prekurzory biogenních aminů [45]

Původní aminokyselina	Vzniklý biogenní amin
Histidin	Histamin
Lysin	Kadaverin
Arginin <i>via</i> ornitin, citrulin	Putrescin
Arginin	Agmatin
Fenylalanin	Fenylethylamin
Tyrosin	Tyramin
Tryptofan	Tryptamin

V nízkých koncentracích jsou přirozenou složkou potravin a jsou pro člověka důležité, avšak ve vysokých koncentracích působí jako látky vasoaktivní a psychoaktivní. Psychoaktivní aminy působí jako přenašeči v centrálním nervovém systému a vasoaktivní aminy mohou působit přímo či nepřímo na vaskulární systém. Mezi nejčastější příznaky při požití vysokého množství BA patří hypertenze či hypotenze, bušení srdce, zvracení, dýchací potíže či migrény [7, 8, 47].

Podle chemické struktury lze BA rozdělit na aromatické, alifatické, heterocyklické a polyaminy (tabulka 3) [47].

Tabulka 3: Rozdělení biogenních aminů [47]

Aromatické biogenní aminy	Tyramin, 2-fenylethylamin
Alifatické biogenní aminy	Putrescin, kadaverin
Heterocyklické biogenní aminy	Histamin, tryptamin
Polyaminy	Spermin, spermidin

4.1 Faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů

Vzhledem k tomu, že jsou BA tvořeny dekarboxylázovou aktivitou daných bakterií, mělo by dojít k maximálnímu zamezení bakteriálního růstu. Během výrobního procesu by měly být dodrženy hygienické podmínky a tím zamezit kontaminaci vyráběné potraviny. Důležitými faktory jsou dostupnost substrátu pro dané MO, pH, teplota a koncentrace soli. Přítomnost zkvasitelných cukrů, jako je glukóza, zvyšuje intenzitu růstu bakterií a také jejich dekarboxylázovou aktivitu. Optimální koncentrace glukózy pro růst bakterií by se měla pohybovat od 0,5% do 2%. Při vyšší koncentraci (3%) je dekarboxylázová aktivita inhibována. Tvorba biogenních aminů je vyšší v kyselém prostředí, ideální je pH 4-5,5 [8, 9].

Důležité je také dodržovat vhodnou teplotu během skladování. Při příliš vysoké teplotě dojde k růstu a množení MO a následně ke zvýšení produkce BA. Například snížením teploty z 10 °C na 2 °C se množství BA snížilo až dvacetkrát. Optimální teplota pro růst MO s dekarboxylázovou aktivitou je 20-37 °C. Bylo zjištěno, že s rostoucím obsahem NaCl byla produkce BA potlačena [8, 9].

Dalším významným faktorem ovlivňujícím biosyntézu BA je přístup kyslíku. Většina MO podílející se na produkci BA jsou fakultativně anaerobní, z čehož lze odvodit, že za přístupu kyslíku bude produkce BA vyšší kvůli rychlejšímu růstu bakterií [8, 48].

4.2 Funkce biogenních aminů

Hlavní funkcí BA je účast na látkové přeměně u člověka, zvířat, rostlin a mikroorganismů. Tím mohou ovlivňovat spoustu procesů probíhajících v organismu (např. udržovat tělesnou teplotu, krevní tlak či příjem potravy). Působí jako antioxidanty, čímž dochází k zneškod-

nění volných radikálů. Jsou také významným zdrojem dusíku a prekurzory pro různé syntézy, jako je syntéza proteinů, hormonů, nukleových kyselin a alkaloidů [48].

Polyaminy spermin a spermidin plní jako vícefunkční kationty řadu významných biologických funkcí. Účastní se proteosyntézy a biosyntézy nukleových kyselin, tzn. při růstu a dělení buněk. Polyaminy podílející se na biologických pochodech u živočichů mohou pocházet ze třech zdrojů: produkované mikroflórou trávicího traktu, endogenně vytvořené v buňkách nebo přijímané potravou. Zvýšený příjem potravních polyaminů je žádoucí pro urychlené hojení ran, popálenin, vývoj a obnovu střevní mukózy. Naopak osoby s nádorovým onemocněním by měly mít příjem těchto látek co nejnižší. Zvýšený obsah polyaminů je v játrech a ledvinách. Lze říci, že v potravinách živočišného původu je více sperminu než spermidinu, kdežto u produktů rostlinných je tomu naopak [45].

4.3 Výskyt biogenních aminů

Prakticky ve všech potravinách, kde se vyskytují bílkoviny nebo volné aminokyseliny, můžeme očekávat výskyt biogenních aminů. Celkové množství BA záleží na druhu dané potraviny a množství přítomných mikroorganismů. Biogenní aminy lze nalézt v širokém sortimentu potravin. Nejčastěji se nachází ve fermentovaných potravinách, například v mléčných výrobcích (především v sýrech), masných výrobcích, rybách, vínu a pivu [8, 9].

U nefermentovaných potravin může velké množství BA poukazovat na nežádoucí mikrobiální kontaminaci. Tím pádem mohou být BA použity v nefermentovaných potravinách jako indikátory mikrobiálního kažení. Nicméně přítomnost BA v těchto potravinách nemusí korelovat s růstem mikroorganismů způsobujících kažení, jelikož všechny mikroorganismy nemusí být dekarboxyláza-pozitivní. U fermentovaných potravin lze předpokládat obsah vyššího množství mikroorganismů a také biogenních aminů [8, 9].

4.3.1 Biogenní aminy ve vínu

Ve vínu bylo identifikováno více než 20 biogenních aminů. Jejich celková koncentrace se pohybuje v rozmezí od několika málo mg/l až po 50 mg/l v závislosti na kvalitě vína. Variabilita aminů je závislá na použité surovině, rozdílném procesu výroby, délce a podmínkách skladování. BA ve víně mohou pocházet ze suroviny nebo vznikat během fermentačního procesu. Již v hroznech se vyskytuje histamin, tyramin, spermin a spermidin. Ve vyšší koncentraci se ve víně nachází histamin, tyramin, putrescin. Kadaverin a fenylethylamin se

zde vyskytují pouze v nízkých koncentracích. Putrescin a kadaverin jsou často spojovány s nedostatečnou hygienou během zpracování hroznů. Nejčastěji se na produkci BA ve vínu podílí bakterie rodu *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Oenococcus* sp. Na produkci tyraminu a histaminu má vysoký podíl bakterie *Leuconostoc mesenteroides*. K celkovému obsahu BA přispívá výrazně bakterie *Oenococcus oeni*. Množství BA je vyšší u vín, kde probíhá během výroby jablečno-mléčné kvašení. Hodnota pH je nejdůležitějším faktorem určujícím biologickou aktivitu bakterií a jejich rozmanitost. S narůstající hodnotou pH roste počet MO a roste množství BA. Bílá vína mají obvykle vyšší kyselost než vína červená, proto zde lze předpokládat nižší koncentraci BA [49, 50].

Obecně platí, že toxická dávka pro alkoholické nápoje je 20 mg/l pro histamin, 40 mg/l pro tyramin. Již 3 mg/l fenylethylaminu mohou mít negativní fyziologické účinky [49].

4.3.2 Biogenní aminy v pivu

Biogenní aminy obsažené v pivu mohou být rozděleny do dvou skupin. První skupina zahrnuje putrescin, spermidin, spermin a agmatin a lze je považovat za primární složky pocházející ze sladu. Zatímco druhou skupinu tvoří BA vznikající činností kontaminující mikroflóry a řadíme zde histamin, tyramin a kadaverin. Na tvorbě tyraminu a tryptaminu se podílí bakterie *Pediococcus* sp., především *Pediococcus damnosus*. Z laktobacilů se na tvorbě BA podílí zejména *Lactobacillus brevis*. V nealkoholických pivech se množství BA výrazně neliší od alkoholických, což naznačuje, že odlišná výroba neovlivní množství těchto látek. Vysoká spotřeba piva, zejména v České republice (140 až 170 l/osobu/rok), může být příčinou nadměrného příjmu BA naším organismem [51].

4.3.3 Biogenní aminy v sýrech

Hlavními producenty BA v sýrech jsou grampozitivní bakterie. Bakterie mléčného kvašení se podílí na produkci histaminu a tyraminu. Tyto dva biogenní aminy jsou v sýrech zastoupeny nejvíce. Rody *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* přispívající k tvorbě BA mohou být přítomny v mléce nebo se do surovin dostávají během zpracování (tab. 4). Některé bakterie mohou být součástí startovacích kultur. Množství BA závisí jak na typu sýru, tak na způsobu výroby. Mezi parametry ovlivňující množství těchto látek patří: počet mikroorganismů v mléce, intenzita tepelného ošetření, doba a podmínky zrání a následné skladování. Doba zrání je kritickým faktorem pro tvorbu BA, jelikož dochází

k proteolýze, a tím k uvolnění aminokyselin, které mohou být následně dekarboxylovány a vznikají již zmíněné BA. Z toho vyplývá, že obsah BA ve zrajících sýrech je mnohem vyšší než v sýrech nezrajících. Obsah BA závisí také na množství organických kyselin. Tam, kde je vysoký obsah organických kyselin, je také vyšší koncentrace BA. Dalšími faktory ovlivňující množství BA v sýrech jsou obsah soli a teplota skladování. Vysoké koncentrace soli inhibují tvorbu BA. U sýrů zrajících při teplotě 16 °C došlo ke dvojnásobnému zvýšení proteolytické aktivity MO než u vzorků zrajících při teplotě 10 °C, a tím došlo k intenzivnější tvorbě BA. Bylo stanoveno, že zvýšením teploty během skladování by se mohla snížit doba zrání přibližně na jednu polovinu. Došlo by ovšem k nárůstu koncentrace BA, která by mohla být nebezpečná pro lidské zdraví [49, 52, 53].

4.3.4 Biogenní aminy v mase a masných výrobcích

Mezi nejrozšířenější biogenní aminy v mase a masných výrobcích patří tyramin, kadaverin, putrescin a také histamin. U čerstvého masa se vyskytují ve významném množství pouze polyaminy spermin a spermidin. Obsah sperminu se pohybuje obvykle mezi 20-60 mg/kg. Hladina spermidinu jen zřídka překročí hranici 10 mg/kg. Tyramin, putrescin a kadaverin se tvoří až v průběhu skladování. Nejvyšší koncentrace těchto látek je na povrchu masa a můžeme ji snížit účinným oplachem. Kromě množství přítomných MO, pH, koncentraci soli, ovlivňuje množství BA redoxní potenciál, přičemž snížený redoxní potenciál stimuluje produkci histaminu. Existuje také vztah mezi obsahem BA a velikostí masných výrobků. Průměr těchto výrobků ovlivňuje prostředí, ve kterém rostou mikroorganismy, např. u masného výrobku s větším průměrem je nižší koncentrace soli a vyšší aktivita vody. Větší průměr může být jedním z důvodů pro vyšší obsah určitých aminů – tyraminu a putrescinu. Důležité je vybrat vhodné startovací kultury s aminooxidázovou aktivitou zabraňující tvorbě vysoké hladiny BA. Během skladování masa dochází k nárůstu tyraminu, putrescinu a kadaverinu a snižuje se obsah sperminu a spermidinu [54].

Tabulka 4: Významné mikroorganismy produkující biogenní aminy [7]

Potravina	Mikroorganismy	Produkované biogenní aminy
Ryby	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Staphylococcus xylosum</i>	Histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, agmatin, spermin, spermidin
Sýry	<i>Latobacillus buchneri</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Bacillus macerans</i> , <i>Propionibacterium</i> sp.	Histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin
Maso a masné výrobky	<i>Pediococcus</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., čeled' <i>Enterobacteriaceae</i>	Histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, fenylethylamin, tryptamin
Fermentovaná zelenina	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus</i> sp.	Histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, fenylethylamin, tryptamin
Fermentované produkty ze sóji	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Trichosporon beigllii</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Histamin, kadaverin putrescin, tyramin, tryptamin

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části práce bylo charakterizovat bakterie mléčného kvašení, jejich význam a výskyt v potravinách. Dále zde byly popsány bakteriociny produkované těmito bakteriemi a biogenní aminy.

Cílem praktické části bylo zkoumat citlivost jednotlivých kmenů bakterií produkujících biogenní aminy vůči odlišným koncentracím nisinu pomocí difúzních metod. Dalším cílem bylo provést počáteční skrínig vybraných kultur mikroorganismů na produkci biogenních aminů, na jehož základě byly vybrány 2 kmeny schopné vyprodukovat významnější detekovatelná množství biogenních aminů – *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 a *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T3. U těchto dvou kmenů byla studována produkce biogenních aminů tyraminu a sperminu v závislosti na vnějších podmínkách:

- vliv přídavku nisinu v koncentracích: 14,3 µg/ml, 35,7 µg/ml, 71,5 µg/ml
- vliv přídavku nisinu v daných koncentracích v různých časových intervalech
- teplota kultivace: 30 ± 1 °C a 12 ± 1 °C

Biogenní aminy byly stanoveny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV/VIS detekcí po předchozí derivatizaci dansylchloridem.

Na základě získaných výsledků z jednotlivých měření byly formulovány závěry, které popisují tvorbu biogenních aminů sledovanými kmeny bakterií mléčného kvašení během kultivace za různých podmínek.

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Použité mikroorganismy

Byly použity bakteriální kultury (21 kmenů) izolované z piva – tyto kmeny byly získány z Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze (RIBM). Dále byly použity kultury izolované ze sýrů – tyto kmeny poskytl Výzkumný ústav mlékárenský se sídlem v Táboře (kmeny označeny písmenem T). Testované kmeny jsou shrnuty v tabulce 5.

Tabulka 5: Použité kmeny mikroorganismů

Izoláty z piva	Izoláty ze sýrů
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-33	<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> T2
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-50	<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> T3
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-62	<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> T8
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-67	<i>Lactobacillus curvatus</i> T15
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-68	<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> T36
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-69	
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-70	
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-72	
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-78	
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-93	
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-98	
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-101	
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-111	
<i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89	
<i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-96	
<i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-113	

6.2 Kultivační média a roztoky

Veškeré použité chemikálie byly pořízeny od společností Sigma-Aldrich – St. Louis USA a Merck – Darmstadt Německo.

6.2.1 MRS Agar

Bylo vypočítáno a naváženo dané množství živné půdy a rozpuštěno ve 400 ml vody společně s agarem. Směs byla důkladně promíchána a následně proběhla sterilace v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Sterilované půdy byly opět promíchány a za aseptických podmínek rozlity na Petriho misky.

6.2.2 Modifikovaný MRS bujón

Dekarboxylázová aktivita daných kmenů byla zjištěna pomocí kultivace v tekuté živné půdě s příslušnými aminokyselinami (AMK; tyrozin, arginin) jako prekurzory příslušných biogenních aminů. Každá aminokyselina byla navážena v koncentraci 0,3 % (w/v). V závislosti na sledovaných vnějších faktorech byly do určitých zkumavek s bujónem MRS o objemu 7 ml přidány různé koncentrace nisinu. Takto připravené zkumavky byly kultivovány při dané teplotě a v určitých časových intervalech byly prováděny odběry a přidáván nisin (viz kapitola 6.4).

6.2.3 Fyziologický roztok

Fyziologický roztok byl připraven pro desítkové ředění vzorků. Na přípravu byl použit chlorid sodný v koncentraci 8,5 g/l. Takto připravený roztok byl rozpipetován po 4,5 ml do zkumavek a sterilován v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

6.3 Stanovení citlivosti vybraných mikroorganismů

U vybraných kmenů byla zkoumána jejich citlivost k 5 odlišným koncentracím nisinu. Nisin byl použit v následujících koncentracích: 1000 mg/l, 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l.

6.3.1 Příprava nisinu

Bylo naváženo 20 mg nisinu (Sigma-Aldrich) a rozpuštěno v 20 ml sterilní vody, aby výsledná koncentrace roztoku byla 1000 mg/l. Po rozpuštění byl roztok filtrován pomocí sterilního stříkačkového filtru o porozitě 0,22 μm a sterilní roztok byl odpipetován po 1 ml do sterilních eppendorfkových zkumavek a zmrazen.

6.3.2 Difúzní metody

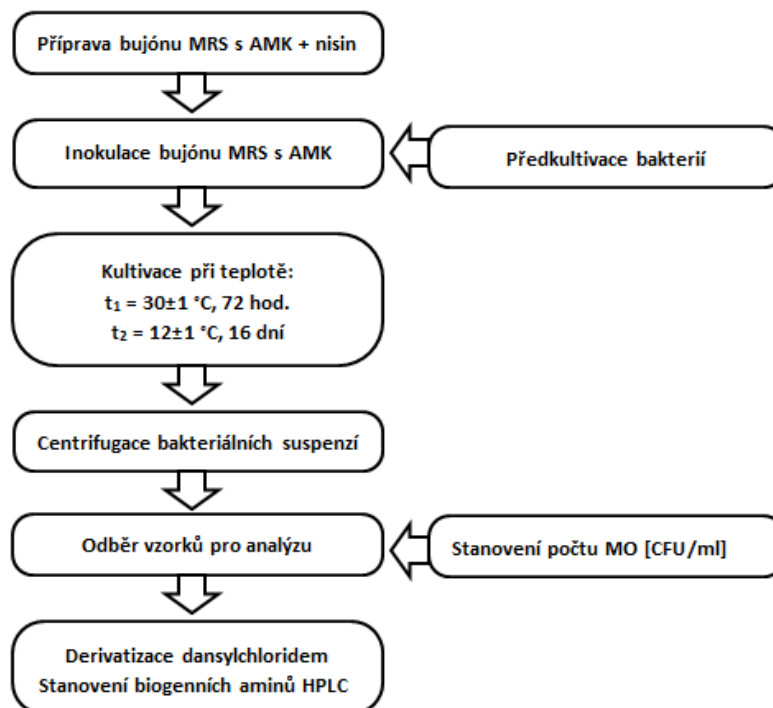
Na ověření inhibičních účinků nisinu byla použita difúzní jamková metoda na agarových plotnách. Kultura byla připravena z křížových roztěrů z pevných půd tak, že byla odebrána do fyziologického roztoku, aby konečná hodnota optické hustoty dle McFarlanda byla 0,5. Následně bylo napipetováno 100 μl připravené testované kultury na sterilní Petriho misku a přelito dostatečně zchlazenou půdou MRS. Po přelití došlo k rovnoměrnému promíchání kultury s půdou. Po utužení bylo uděláno do tuhého agaru sterilním nástrojem 6 jamek pro antimikrobiální látku. Do pěti jamek byly nadávkovány odlišné koncentrace nisinu a šestá jamka sloužila jako kontrola (do této jamky byla dávkována sterilní destilovaná voda). Takto připravené Petriho misky byly kultivovány v anaerostatu při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. Po kultivaci byly měřeny průměry jednotlivých inhibičních zón. Na základě velikosti inhibičních zón byla zjištěna citlivost jednotlivých kmenů [55].

Dále byl použit diskový difúzní test na agarových plotnách. Tento test spočívá v přípravě pevné půdy MRS, na kterou bylo zaočkováno 100 μl připravené testované kultury (kultura připravena jako u difúzní jamkové metody – zákal 0,5 dle McFarlanda) a rovnoměrně rozetřena pomocí sterilní hokejky. Dále byly připraveny dané koncentrace nisinu, které byly aplikovány na sterilní disky z filtračního papíru. Nasycené disky byly následně asepticky položeny pomocí pinzety na připravené půdy s testovanými mikroorganismy. Takto připravené Petriho misky byly kultivovány v anaerostatu při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. Po kultivaci byly měřeny průměry inhibičních zón. Na základě velikosti inhibičních zón byla zjištěna citlivost jednotlivých kmenů [55].

6.4 Sledování vlivu přidavku nisinu na růst a dekarboxylázovou aktivitu bakterií

6.4.1 Kultivační podmínky

Kultura z MRS agaru byla přeočkována do 7 ml MRS bujónu s danými AMK a kultivována 48 hodin při teplotě 30 °C. Poté bylo přeočkováno 100 µl kultury do 7 ml MRS bujónu s AMK a kultivováno při stejné teplotě opět 48 hodin za účelem indukce dekarboxylačních enzymů. Ze stejného důvodu následovalo ještě jedno přeočkování. Po 24 hodinách kultivace byly veškeré zkumavky s MRS bujónem s AMK zaočkovány 100 µl takto připravené kultury. Všechny zaočkované zkumavky (celkem 1132) byly kultivovány při teplotě 30 ± 1 °C nebo 12 ± 1 °C. Při teplotě 30 °C byly vzorky odebrány po 0, 2, 5, 9, 12, 24, 48 a 72 hodinách kultivace a při teplotě 12 °C po 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14 a 16 dnech inkubace. Ve stejných časových intervalech byl do zaočkovaných zkumavek přidán nisin ve 3 koncentracích a kultivace s takto připravenými zkumavkami probíhala až do konce experimentu (72 hodin/ 16dnů). Pro experiment byly použity kmeny, které produkovaly biogenní aminy a zároveň byly citlivé k nisinu (*L. plantarum* RIBM 2-89, *L. curvatus* subsp. *curvatus* T3). Schéma experimentu můžeme vidět na obr. 11.



Obr. 11. Schéma experimentu

6.4.2 Příprava vzorků pro derivatizaci

Po kultivaci byl MRS bujón s příslušnými kulturami zcentrifugován při 4600 ot/min po dobu 15 minut při teplotě 15 °C. Ze získaného supernatantu bylo odpipetováno 700 µl do tří eppendorfových zkumavek a zředěno kyselinou chloristou ($c = 1,2 \text{ mol/l}$, Merck) v poměru 1:1 (w/v). Vzorky byly před provedením analýzy uloženy v mrazícím zařízení při teplotě -18 °C.

6.4.3 Derivatizace vzorků

Derivatizace byla provedena dle návodu dostupného v laboratoři Ústavu technologie potravin.

Ke vzorkům supernatantů bujónů upraveným kyselinou chloristou bylo přidáno 100 µl 1,7-heptandiaminu (Sigma-Aldrich) v koncentraci 500 mg/l jako interního standardu. Z této směsi byl odpipetován 1 ml do derivatizační nádoby. Do vzorků v derivatizačních nádobkách bylo přidáno 1,5 ml karbonátového pufru o pH 11,1-11,2. Pro přípravu pufru bylo nejprve naváženo potřebné množství hydrogenuhličitanu sodného (Merck), který má pH asi 8,5 a následně k němu byl přidáván uhličitan sodný (Merck), který má vyšší pH. Tímto bylo upraveno pH. Po přidavku pufru byly přidány 2 ml čerstvě připraveného roztoku dan-sylchloridu (Sigma-Aldrich) o koncentraci 5 g/l v acetonu (Merck). Derivatizační nádoby byly dobře uzavřeny a třepány v temnu asi 20 hodin. Po uplynulé době bylo ke vzorkům přidáno 200 µl prolinu (Sigma-Aldrich) a třepáno další hodinu. Byly přidány 3 ml heptanu (Sigma-Aldrich) a všechny nádoby byly ručně třepány asi 3 minuty. Do vialky byl odpipetován 1 ml heptanové vrstvy, obsah vialky byl odpařen do sucha pod proudem dusíku při teplotě 60 °C. Suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich). Vzorky byly uloženy v chladničce při teplotě cca 4 °C [47, 56].

6.4.4 Vlastní chromatografické stanovení

Před analýzou byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 µm a dávkovány do chromatografického systému. Výsledky výskytu biogenních aminů byly vyhodnoceny pomocí mobilní a stacionární fáze na koloně Zorbax C18 RRHD s rozměry 3 x 50 mm a pórovitostí 1,8 µm. Průtok kolonou byl 0,45 ml/min. Stanovení se provádělo při teplotě 30 °C a vlnové délce 254 nm (UV/VIS-DAD detektorem). Výsledky byly hod-

noceny pomocí softwaru CLARITY. Byla stanovena produkce tyraminu a sperminu. Metoda pro stanovení BA byla upravena dle Dadákové a kol. [56].

6.4.5 Stanovení nárůstu buněk

Nárůst buněk byl sledován plotnovou metodou na půdách MRS v příslušných časových intervalech. Odběr vzorků probíhal paralelně s odběrem vzorků pro stanovení množství biogenních aminů. Daný kmen byl zředěn desítkovým ředěním a zaočkován na misky. Takto připravené misky byly kultivovány při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin. Získané výsledky byly přepočteny a vyjádřeny jako celkový počet MO na mililitr (CFU/ml).

6.4.6 Statistické vyhodnocení výsledků

Výsledky analýzy inhibičního působení nisinu v daných koncentracích na produkci biogenních aminů testovanými bakteriemi 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).

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Počáteční skrínig citlivosti dekarboxyláza-pozitivních kmenů k nisinu

V první části experimentu byl proveden skrínig 21 kmenů bakterií mléčného kvašení produkujících biogenní aminy vyizolovaných z piva a sýrů vůči inhibičnímu působení bakteriocinu nisinu. U těchto kmenů byla sledována inhibiční aktivita nisinu v 5 koncentracích: $c_1 = 1000 \text{ mg/l}$, $c_2 = 500 \text{ mg/l}$, $c_3 = 250 \text{ mg/l}$, $c_4 = 125 \text{ mg/l}$, $c_5 = 62,5 \text{ mg/l}$. Výsledky počátečního skrínigu inhibiční aktivity jsou shrnuty v tabulkách 6 – 9. V tabulkách 6, 7 jsou uvedeny průměry inhibičních zón při použití difúzní jamkové metody. V tabulkách 8, 9 jsou uvedeny průměry inhibičních zón při použití difúzní diskové metody.

Tabulka 6: Průměr inhibičních zón při aplikaci nisinu v 5 koncentracích na kmeny BMK izolované z piva zjištěný pomocí difúzní jamkové metody

Kmeny izolované z piva	Průměr inhibičních zón [cm]				
	c_1	c_2	c_3	c_4	c_5
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-33	0,9	0,7	0	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-50	1,3	0,8	0	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-62	1,5	0,9	0,8	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-67	1,1	0,9	0,8	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-68	1,1	0,8	0	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-69	0,8	0,6	0	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-70	0,9	0	0	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-72	1	0,7	0,7	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-78	1	0,7	0,7	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-93	1	0	0	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-98	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-101	0,9	0,7	0	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-111	0,8	0	0	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89	1,1	0,7	0,6	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-96	0,7	0	0	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-113	0,8	0	0	0	0

Kde: c_1 - koncentrace nisinu 1000 mg/l, c_2 – koncentrace nisinu 500 mg/l, c_3 - koncentrace nisinu 250 mg/l, c_4 - koncentrace nisinu 125 mg/l, c_5 - koncentrace nisinu 62,5 mg/l.

Tabulka 7: Průměr inhibičních zón při aplikaci nisinu v 5 koncentracích na kmeny BMK izolované ze sýrů zjištěný pomocí difúzní jamkové metody

Kmeny izolované ze sýrů	Průměr inhibičních zón [cm]				
	c ₁	c ₂	c ₃	c ₄	c ₅
<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> T2	1,5	1,2	1	0,9	0,7
<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> T3	1,3	1,0	0,7	0	0
<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> T8	1,3	0,7	0,5	0	0
<i>Lactobacillus curvatus</i> T15	1,4	0,9	0,9	0,8	0,6
<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> T36	1,0	0,7	0,6	0	0

Kde: c₁ - koncentrace nisinu 1000 mg/l, c₂ – koncentrace nisinu 500 mg/l, c₃ - koncentrace nisinu 250 mg/l, c₄ - koncentrace nisinu 125 mg/l, c₅ - koncentrace nisinu 62,5 mg/l.

Tabulka 8: Průměr inhibičních zón při aplikaci nisinu v 5 koncentracích na kmeny BMK izolované z piva zjištěný pomocí difúzní diskové metody

Kmeny izolované z piva	Průměr inhibičních zón [cm]				
	c ₁	c ₂	c ₃	c ₄	c ₅
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-33	0,8	0,7	0,4	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-50	1,2	0,7	0	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-62	1,3	1,0	0,8	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-67	1,2	0,8	0,6	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-68	1,0	0,8	0,6	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-69	0,7	0,6	0	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-70	0,9	0	0	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-72	1,0	0,7	0,6	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-78	1,1	0,8	0,7	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-93	1	0,6	0	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-98	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-101	0,9	0,8	0	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-111	0,9	0	0	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89	1,0	0,8	0,7	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-96	0,6	0,4	0	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-113	0,7	0	0	0	0

Kde: c₁ - koncentrace nisinu 1000 mg/l, c₂ – koncentrace nisinu 500 mg/l, c₃ - koncentrace nisinu 250 mg/l, c₄ - koncentrace nisinu 125 mg/l, c₅ - koncentrace nisinu 62,5 mg/l.

Tabulka 9: Průměr inhibičních zón při aplikaci nisinu v 5 koncentracích na kmeny BMK izolované ze sýrů zjištěný pomocí difúzní diskové metody

Kmeny izolované ze sýrů	Průměr inhibičních zón [cm]				
	c ₁	c ₂	c ₃	c ₄	c ₅
<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> T2	1,6	1,4	1	0,8	0,7
<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> T3	1,3	1,1	0,8	0	0
<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> T8	1,2	0,8	0,5	0	0
<i>Lactobacillus curvatus</i> T15	1,3	1,0	0,9	0,8	0,6
<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> T36	1,1	0,8	0,7	0	0

Kde: c₁ - koncentrace nisinu 1000 mg/l, c₂ – koncentrace nisinu 500 mg/l, c₃ - koncentrace nisinu 250 mg/l, c₄ - koncentrace nisinu 125 mg/l, c₅ - koncentrace nisinu 62,5 mg/l.

Z tabulek 6 a 7 lze vidět, že u kmenů izolovaných ze sýrů byl zjištěn větší průměr inhibičních zón. Lze tedy říci, že tyto kmeny jsou vůči působení bakteriocinu nisinu citlivější než kmeny izolované z piva. Největší průměr inhibičních zón byl naměřen u kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T2. U tohoto mikroorganismu byly zóny měřitelné u všech testovaných koncentrací nisinu. U všech aplikovaných koncentrací nisinu byly zóny měřitelné i u bakterie *Lactobacillus curvatus* T15. U zbylých kmenů izolovaných ze sýrů (*Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T3, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T8, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T36) byly zóny měřitelné pouze tehdy, pokud byl nisin aplikován v koncentracích 1000 mg/l, 500 mg/l a 250 mg/l.

Z tabulky 6 lze určit, že u kmenů izolovaných z piva nebyly pozorovány zóny, jestliže byl nisin testován ve dvou nejnižších koncentracích (125 mg/l a 62,5 mg/l). U kmenů *Lactobacillus brevis* RIBM 2-93, *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-96, *Lactobacillus brevis* RIBM 2-111 a *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-113 byla viditelná inhibiční zóna pouze při nejvyšší aplikované koncentraci nisinu (1000 mg/l). Žádná inhibiční zóna nebyla pozorována u *Lactobacillus brevis* RIBM 2-98. Z toho vyplývá, že tento mikroorganismus je odolný vůči působení nisinu. Viditelné inhibiční zóny při testovaných koncentracích bakteriocinu nisinu 1000 mg/l, 500 mg/l a 250 mg/l byly pozorovány u kmenů *Lactobacillus brevis* RIBM 2-62, *Lactobacillus brevis* RIBM 2-67, *Lactobacillus brevis* RIBM 2-72, *Lactobacillus brevis* RIBM 2-78, *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89.

Výsledky při použití diskového difúzního testu byly podobné jako při použití jamkové difúzní metody. Naměřené průměry zón se odlišovaly pouze minimálně. Jiný průměr inhibič-

ních zón může být způsoben například odlišnou tloušťkou vrstvy pevné půdy. Tyto výsledky poukazují na to, že k dosažení inhibice postačuje i menší množství aplikovaného nisinu.

7.2 Produkce biogenních aminů u vybraných bakterií izolovaných z piva a sýrů

Následně byla u vybraných 21 kmenů provedena analýza produkce 8 biogenních aminů (tryptaminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu). Biogenní aminy tryptamin, fenyletylamin, kadaverin a histamin nebyly detekovány u žádného z testovaných kmenů. Výsledky této analýzy jsou shrnuty v tabulce 10.

Tabulka 10: Produkce biogenních aminů [mg/l] u analyzovaných kmenů BMK

Testované kmeny	Biogenní aminy [mg/l]				Suma
	Putrescin	Tyramin	Spermidin	Spermin	
RIBM 2-33	-	5,74±0,19	0,32±0,01	0,36±0,01	6,42
RIBM 2-50	-	1,82±0,03	0,32±0,02	0,71±0,05	2,85
RIBM 2-62	-	3,48±0,12	0,38±0,01	0,74±0,06	4,60
RIBM 2-67	-	1,92±0,08	0,34±0,02	0,62±0,02	2,87
RIBM 2-68	-	1,55±0,09	0,29±0,01	0,59±0,03	2,43
RIBM 2-69	-	1,84±0,12	0,43±0,02	0,60±0,03	2,86
RIBM 2-70	-	1,55±0,07	0,40±0,02	2,53±0,24	4,48
RIBM 2-72	-	1,91±0,05	0,36±0,03	3,91±0,28	6,19
RIBM 2-78	-	1,27±0,04	0,30±0,01	0,55±0,02	2,12
RIBM 2-89	-	85,37±4,99	0,35±0,02	0,60±0,02	86,31
RIBM 2-93	-	87,23±4,95	0,37±0,03	0,69±0,04	88,29
RIBM 2-96	-	73,11±3,76	0,51±0,02	0,45±0,02	74,06
RIBM 2-98	-	3,75±0,14	0,42±0,02	2,17±0,11	6,34
RIBM 2-101	-	1,46±0,03	0,28±0,02	1,68±0,09	3,41
RIBM 2-111	-	1,33±0,06	0,31±0,00	0,52±0,01	2,17
RIBM 2-113	-	2,41±0,17	0,32±0,01	1,13±0,09	3,85
T2	-	1,99±0,09	0,32±0,02	2,51±0,09	4,82
T3	-	85,38±2,59	0,50±0,03	1,02±0,06	86,90
T8	-	1,81±0,14	0,21±0,02	1,49±0,04	3,51
T15	129,13±4,16	82,01±1,10	0,36±0,03	0,53±0,03	212,02
T36	-	77,81±3,63	0,47±0,04	1,13±0,10	79,40

Kde: - biogenní amin nebyl detekován

Dle množství produkce biogenních aminů byly pro další experimenty vybrány kmeny *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 a *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T3. U těchto kmenů byla provedena další analýza produkce biogenních aminů s přidavkem odlišných koncentrací nisinu. Testované koncentrace bakteriocinu byly voleny tak, aby byly suboptimální, tzn., aby došlo k částečné, nikoliv úplné, inhibici růstu (případně produkce biogenních aminů) vybraných testovaných bakterií izolovaných z piva a sýru. Tento prvotní skrínig působení nisinu na produkci biogenních aminů byl proveden po kultivaci bakterií při optimální teplotě (30 °C). Biogenní aminy tryptamin, fenyletylamin, putrescin, kadaverin a histamin nebyly detekovány u žádného z testovaných vzorků. Výsledky této analýzy jsou shrnuty v tabulce 11.

Tabulka 11: Produkce biogenních aminů [mg/l] analyzovaných kmenů s přidavkem nisinu

Testované kmeny / koncentrace nisinu	Biogenní aminy [mg/l]			Suma
	Tyramin	Spermidin	Spermin	
RIBM - 2-89 / 71,5 µg/ml	5,25±0,3	2,4±0,1	-	6,65
RIBM - 2-89 / 35,7 µg/ml	16,4±0,2	0,9±0,1	20,9±0,9	38,20
RIBM - 2-89 / 14,3 µg/ml	18,17±0,5	1,3±0,1	28,7±0,8	48,17
RIBM - 2-89 / bez nisinu	192,5±6,3	1,6±0,1	11,6±0,3	205,70
T3 / 71,5 µg/ml	13,21±0,9	1,4±0,1	28,12±1,2	42,73
T3 / 35,7 µg/ml	14,3±0,9	1±0,1	37,3±0,8	52,60
T3 / 14,3 µg/ml	17,15±0,5	1,2±0,1	38,3±1,1	56,65
T3 / bez nisinu	31,85±0,3	1,1±0,1	27,54±1,5	60,49

Kde: - biogenní amin nebyl detekován

Z prvotních výsledků uvedených v tabulce 11 je patrné, že po kultivaci kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 bylo detekováno vyšší množství biogenních aminů bez přidavku nisinu než u kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T3. U obou kmenů klesalo množství vyprodukovaného tyraminu s rostoucí koncentrací nisinu. U kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T3 bylo detekováno vyšší množství sperminu.

S vybranými kmeny a koncentracemi nisinu byla zpracována druhá část praktické části, kde byl pozorován vliv vnějších podmínek (teploty, přidavku bakteriocinu nisinu v suboptimálních koncentracích a přidavek nisinu k rostoucím buňkám v různých časových intervalech) na produkci BA.

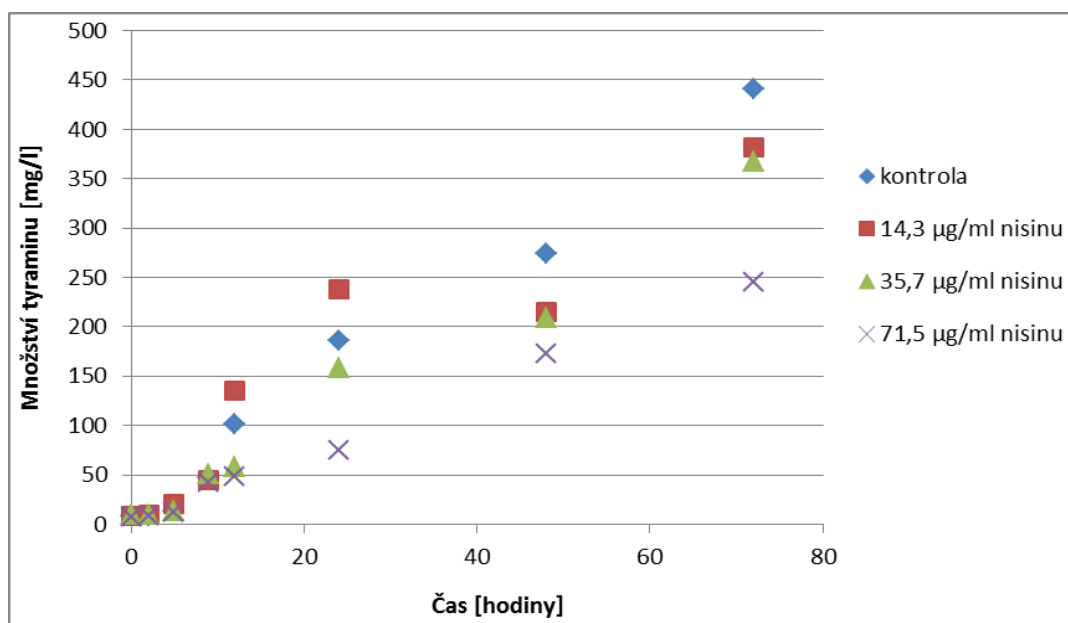
7.3 Vliv vnějších faktorů na produkci biogenních aminů u kmene

Lactobacillus plantarum RIBM 2-89

U sledovaného kmene byla pozorována kinetika produkce biogenních aminů v závislosti na odlišných faktorech. Mezi tyto faktory byl zařazen přídavek nisinů v koncentracích 14,3 $\mu\text{g/ml}$, 35,7 $\mu\text{g/ml}$, 71,5 $\mu\text{g/ml}$; vliv přídávku nisinů v daných koncentracích k rostoucím bakteriím v 8 časových intervalech; teplota kultivace 30 ± 1 $^{\circ}\text{C}$ a 12 ± 1 $^{\circ}\text{C}$. Jako kontrola sloužily vzorky bez přídávku nisinů. Z biogenních aminů a polyaminů byly na základě předchozích výsledků (kapitola 7. 2.) sledovány tyramin a spermin. Paralelně se stanovením obsahu biogenních aminů byl sledován i celkový počet mikroorganismů narostlých na Petriho miskách s půdou MRS v daném čase odběru. Růstové křivky mikroorganismů můžeme vidět v příloze P1. Srovnáme-li růstové křivky a vývoj produkce BA, tak je patrné, že k rozvoji BA dochází v exponenciální a následně i stacionární fázi růstu testované bakterie.

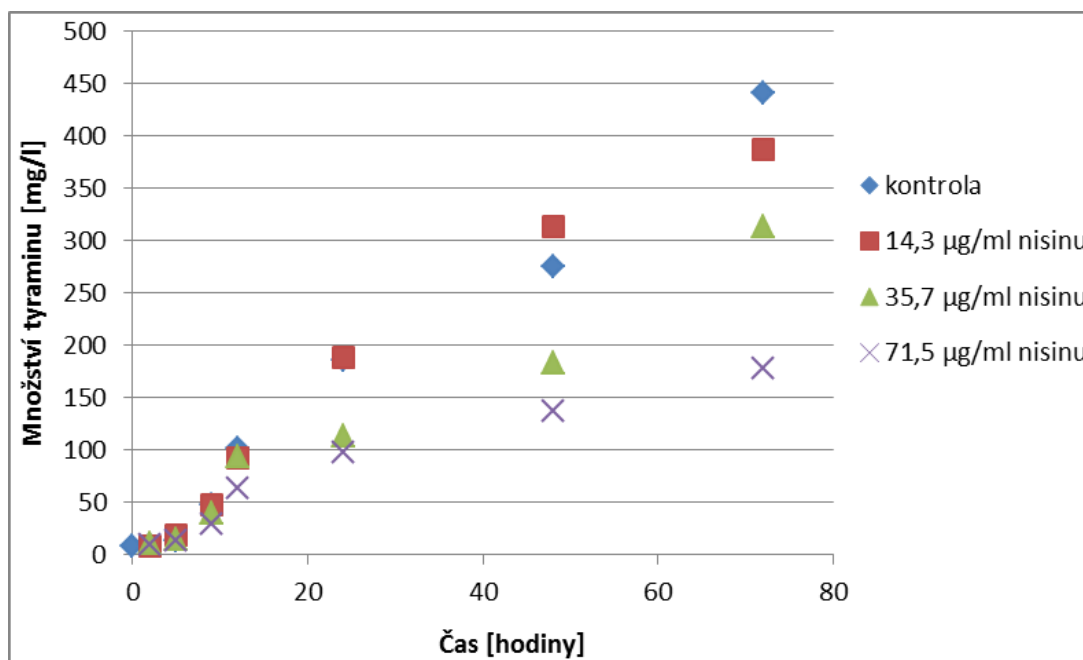
7.3.1 Produkce tyraminu během kultivace při teplotě 30 $^{\circ}\text{C}$

Když byl *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 kultivován při teplotě 30 $^{\circ}\text{C}$, byly vzorky odebírány po 0, 2, 5, 9, 12, 24, 48 a 72 hodinách. V každém čase (mimo časy 48 a 72 hodin) byl do určitých zkumavek s rostoucími buňkami (všechny zkumavky zaočkované v čase 0) přidán nisin v testovaných koncentracích.



Obr. 12. Vliv přídávku nisinů v čase 0 na kinetiku produkce tyraminu u kmene *L. plantarum* během kultivace při 30 $^{\circ}\text{C}$.

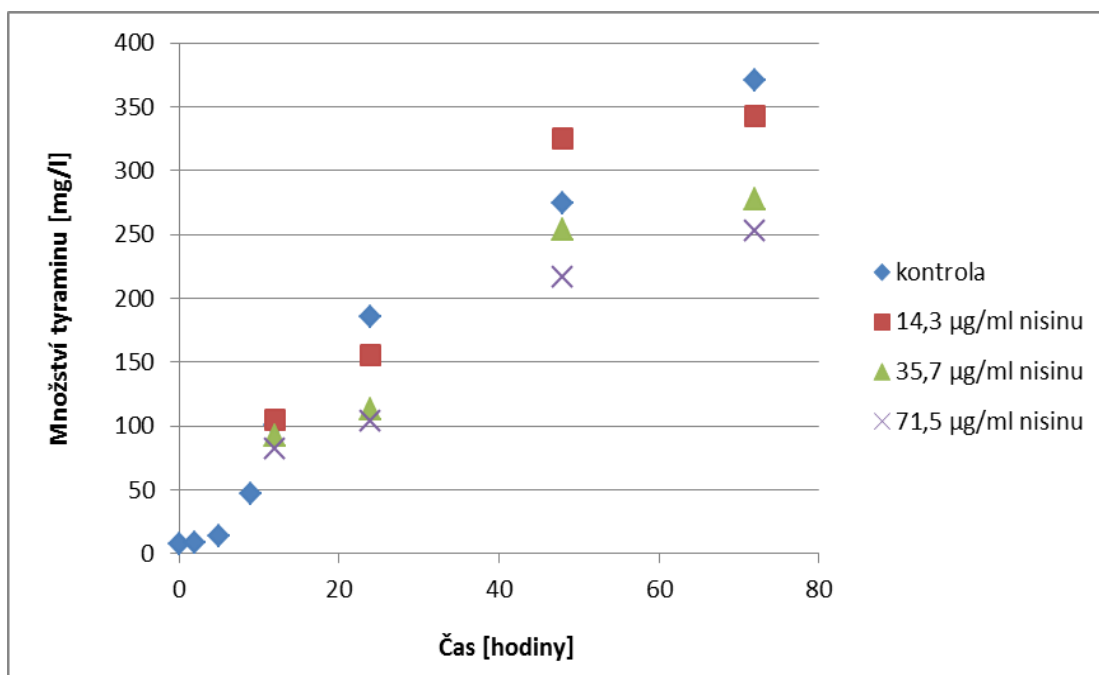
Z obrázku 12 je patrné, že v průběhu 72 hodin docházelo k navýšení množství vyprodukovaného tyraminu. V čase byl u kontrolního vzorku obsah tyraminu pouze 8,1 mg/l. Po 72 hodinách kultivace došlo k navýšení množství tyraminu na 440,6 mg/l. Příklad přidavku nisinu ve všech třech koncentracích měl během prvních 9 hodin kultivace minimální vliv na obsah tyraminu. Od 12. hodiny se množství tyraminu v supernatantu po kultivaci uvedeného kmene snížilo vlivem přidavku nisinu o koncentracích 35,7 a 71,5 $\mu\text{g/ml}$. Po přidavku nisinu v nejnižší testované koncentraci bylo počáteční množství tyraminu 8,1 mg/l po 72 hodinách vzrostlo na 382,3 mg/l. Po přidavku 35,7 $\mu\text{g/ml}$ nisinu byl obsah nisinu na počátku kultivace 10,2 mg/l a na konci vzrostl na 367,6 mg/l. Při přidavku nejvyšší koncentrace nisinu bylo počáteční množství tyraminu 7,5 mg/l a na konci kultivace dosáhlo hodnoty 245 mg/l. Ve srovnání s kontrolou měl přidavek nisinu statisticky významný vliv na produkci tyraminu ($P < 0,05$). Působení prvních 2 koncentrací nisinu bylo srovnatelné ($P > 0,05$), zatímco přidavek nejvyšší koncentrace nisinu měl na produkci, resp. redukci, tyraminu významnější vliv ($P < 0,05$).



Obr. 13. Vliv přidavku nisinu v čase 2 hodiny na kinetiku produkce tyraminu u kmene *L. plantarum* během kultivace při 30 °C.

Na obrázku 13 lze vidět postupné navyšování produkce tyraminu kmenem *L. plantarum* RIBM 2-89, kdy byl sledován vliv přidavku nisinu po 2 hodinách od počátku kultivace buněk. Množství tyraminu u kontrolních vzorků bylo stejné jako v případě, kdy byl bakte-

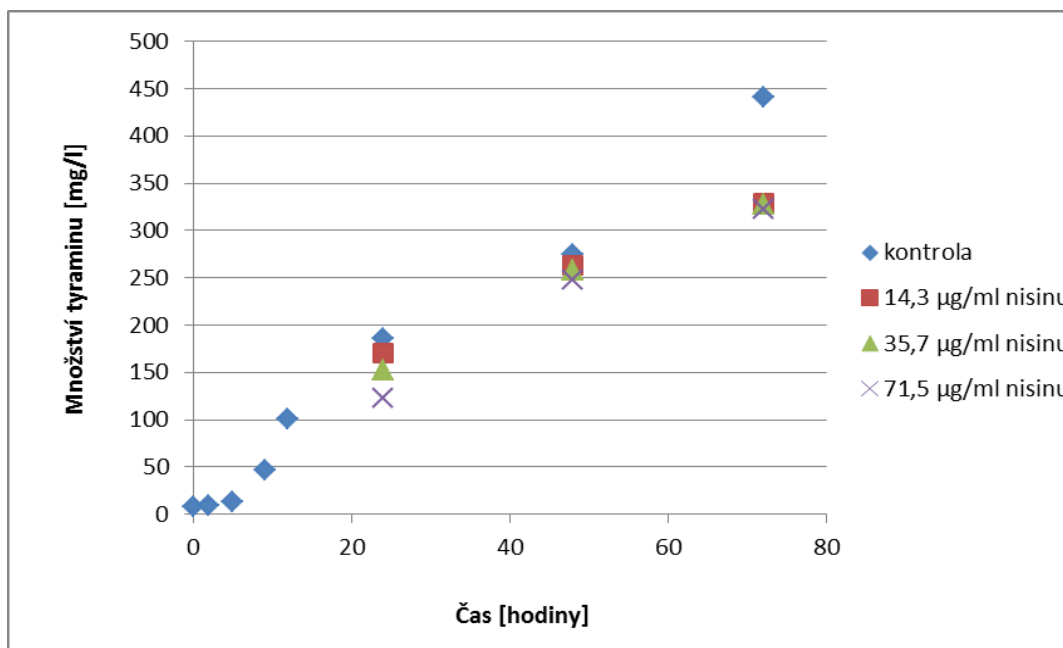
riocin aplikován ihned na počátku kultivace po zaočkování buněk (viz obr. 11). Toto je dáno tím, že celý experiment byl realizován najednou (kinetika produkce u 1 kmene při dané teplotě) a tak mohla být použita pouze jedna kontrolní série zkumavek se zaočkovaným mikroorganizmem bez přídavku nisinu. Z grafu lze určit, že čím vyšší koncentrace nisinu byla přidána, tím bylo množství vyprodukovaného tyraminu nižší. Po 72 hodinách kultivace bylo množství tyraminu, který byl detekován v sedimentech bujónů po kultivaci buněk s přídavkem 14,3 $\mu\text{g/ml}$ nisinu nižší o 12,3% než u kontroly, s přídavkem 35,7 $\mu\text{g/ml}$ nisinu nižší o 29,1% a s přídavkem 71,5 $\mu\text{g/ml}$ nisinu kleslo množství tyraminu o 59,8%. Ve srovnání s přídavkem nisinu v čase 0 došlo k poklesu obsahu tyraminu. Po 72 hodinách kultivace byl obsah tyraminu po přídavku nisinu s nejvyšší koncentrací po 2 hodinách kultivace nižší o 27,6 %, než když byl nisin přidán na počátku kultivace



Obr. 14. Vliv přídavku nisinu v čase 12 hodin na kinetiku produkce tyraminu u kmene *L. plantarum* během kultivace při 30 °C.

Z grafů (obr. 14, 15) vyplývá, že obsah tyraminu, který vznikl dekarboxylací aminokyseliny tyrozinu, byl vyšší ve druhém případě (obr. 15). Lze tedy říci, že přídavek nisinu v pozdějších hodinách nesnížil obsah tyraminu tak, jako jeho přídavek v hodinách dřívějších. Pokud byl bakteriocin přidán až po 12 hodinách kultivace bakterií (obr. 14), došlo k poklesu obsahu tyraminu v kultivačním médiu oproti kontrole na konci kultivace (po 72

hodinách) po přidavku 14,3 µg/ml nisinu o 7,5%, po přidavku 35,7 µg/ml nisinu o 24,9%, po přidavku 71,5 µg/ml nisinu o 31,8%.



Obr. 15. Vliv přidavku nisinu v čase 24 hodin na kinetiku produkce tyraminu u kmene *L. plantarum* během kultivace při 30 °C.

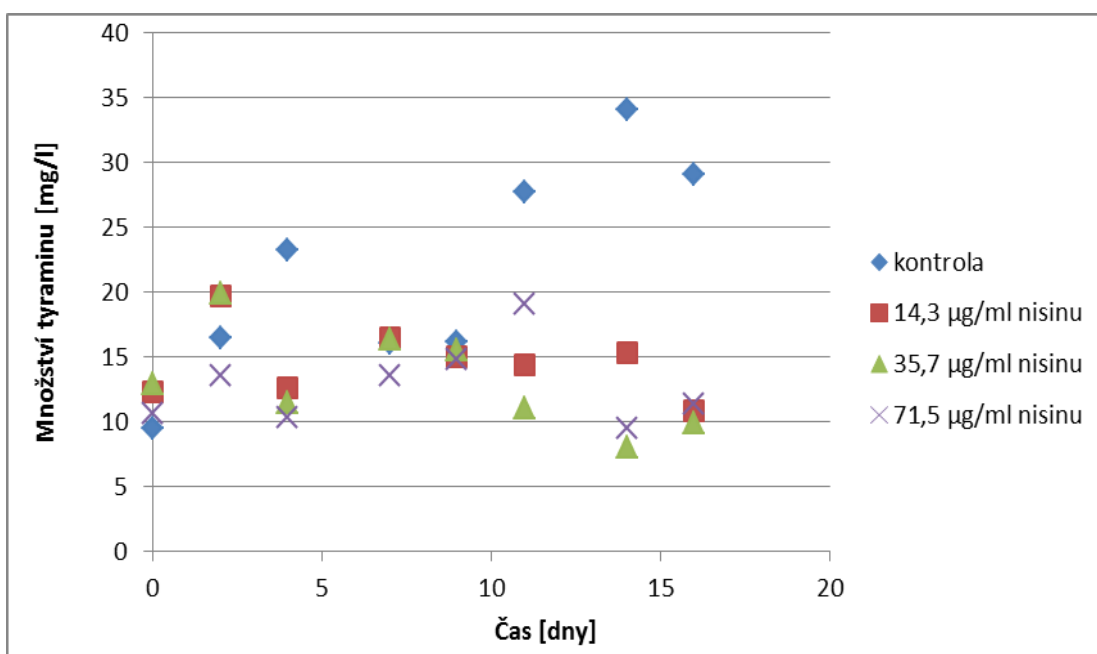
Z obr. 15 je patrné, že pokud byl nisin aplikován do kultivačního média s testovaným kmenem až po 1 dnu (24 hodinách), došlo na konci kultivace (po 72 hodinách) k poklesu produkce tyraminu ve srovnání s kontrolou po přidavku 14,3 µg/ml nisinu o 25,5%, po přidavku 35,7 µg/ml nisinu o 25,9%, po přidavku 71,5 µg/ml nisinu o 26,8%. Po přidavku nisinu v tomto čase (obr. 14) se množství tyraminu, který byl detekován v bujóněch s přidavkem všech tří testovaných koncentrací nisinu, lišilo minimálně ($P > 0,05$). Zjištěná množství tohoto biogenního aminu se po 72 hodinách kultivace pohybovala v rozmezí 320-330 mg/l (u kontroly byl obsah tyraminu 440,6 mg/l). U přidavku nisinu po 12 i 24 hodinách kultivace byl pozorován statisticky významný rozdíl mezi kontrolou a všemi třemi aplikovanými koncentracemi nisinu ($P < 0,05$) – nisin měl vliv na snížení produkce tyraminu. Při srovnání jednotlivých koncentrací nisinu nebyl účinek signifikantní ($P > 0,05$). Totéž platilo, když byl nisin přidán po 24 hodinách.

Na základě výsledků patrných z obrázků 12 až 15 lze konstatovat, že přidavek nisinu měl vliv na obsah tyraminu ($P < 0,05$), který byl vyprodukován bakterií *L. plantarum* RIBM 2-89. Lze říci, že většinou platilo pravidlo, čím vyšší koncentrace nisinu byla přidána, tím byl

zjištěný obsah tyraminu po kultivaci nižší. Z výsledků rovněž nelze jednoznačně popsat vliv přídavku nisinu v jednotlivých časových intervalech během kultivace testovaného kmene, jelikož jednou došlo k poklesu, jindy zase k navýšení obsahu tyraminu.

7.3.2 Produkce tyraminu během kultivace při teplotě 12 °C

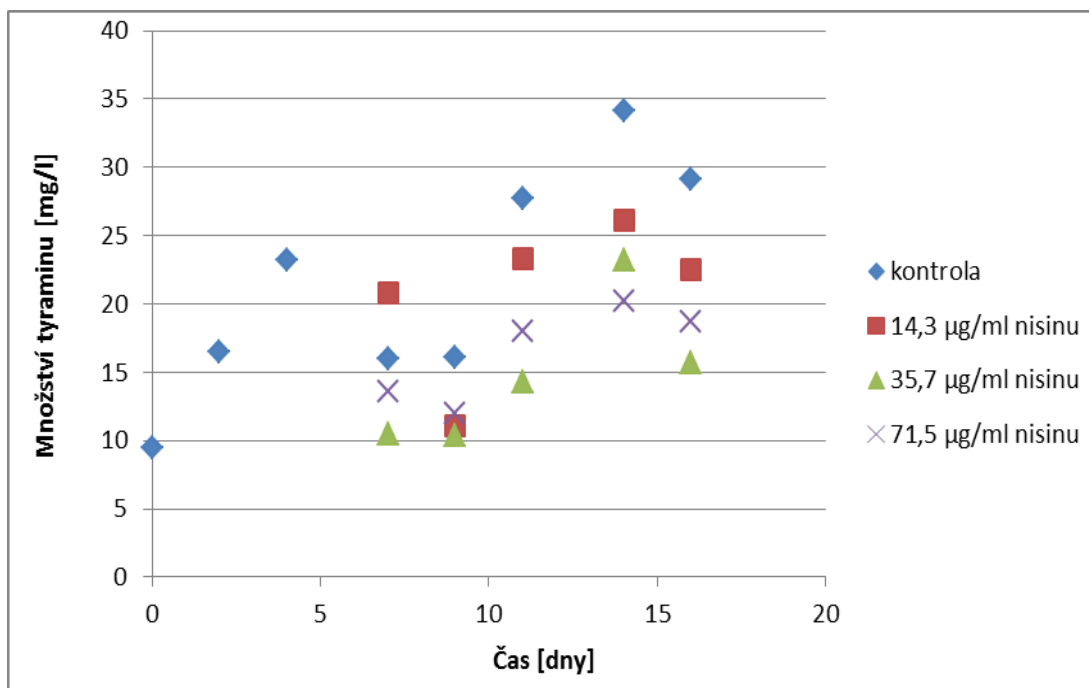
Když byl *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 kultivován při teplotě 12 °C, byly vzorky odebrány po 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14 a 16 dnech. V každém čase (mimo 14. a 16. den) byl do určitých zkumavek s rostoucími buňkami (všechny zkumavky zaočkovány v čase 0) přidán nisin v testovaných koncentracích.



Obr. 16. Vliv přídavku nisinu na počátku kultivace na kinetiku produkce tyraminu u kmene *L. plantarum* během kultivace při 12 °C.

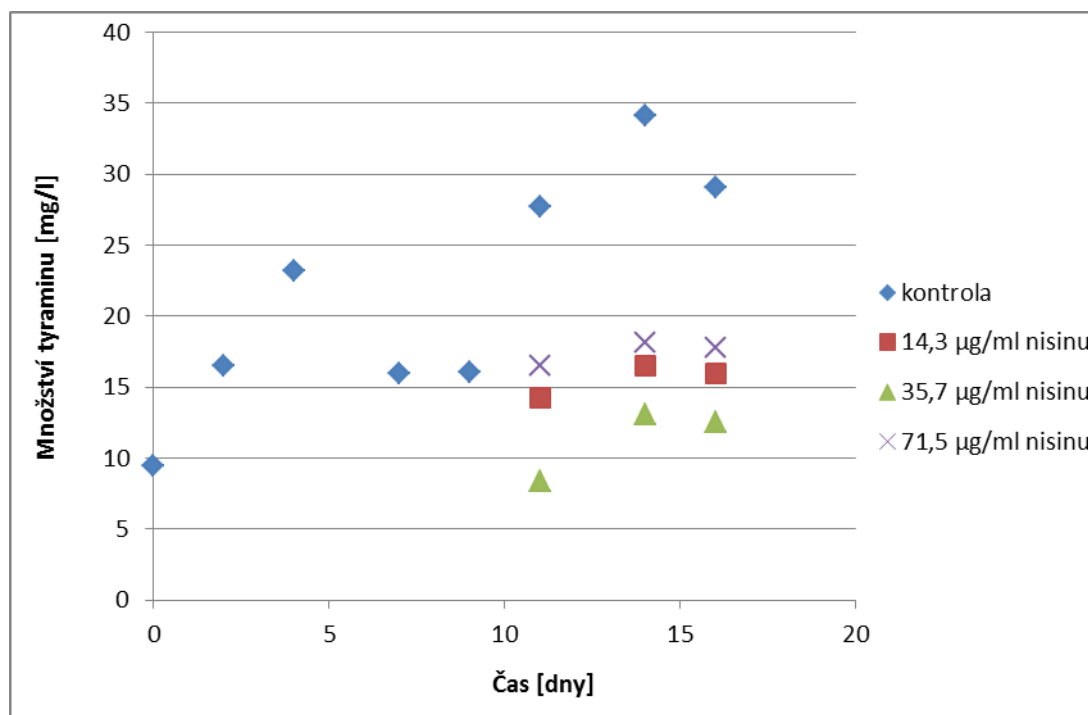
Z grafu na obr. 16 je patrné, že obsah vyprodukovaného tyraminu ve vzorcích bujónu po kultivaci *L. plantarum* RIBM 2-89 při teplotě 12 °C bez přídavku nisinu postupně rostl. Nejvyšší množství tohoto biogenního aminu bylo detekováno 14. den kultivace (34,1 mg/l). Následně množství kleslo na 29,1 mg/l (16. den). Během prvních 4 dnů kultivace nedošlo vlivem přídavku nisinu k výraznějšímu snížení obsahu tyraminu v supernatantech bujónů ($P > 0,05$). Od 11. dne došlo v důsledku přídavkem nisinu k výraznějšímu

poklesu dekarboxylace aminokyseliny tyrozinu ($P < 0,05$). Na konci kultivace (16. den) byla zjištěná množství tyraminu v bujónech po kultivaci buněk následující: s přidavkem 14,3 $\mu\text{g/ml}$ nisinu 10,8 mg/l, tedy o 62,9 % méně než u kontroly, s přidavkem 35,7 $\mu\text{g/ml}$ nisinu 9,9 mg/l (méně o 65,9 % než u kontroly), s přidavkem 71,5 $\mu\text{g/ml}$ nisinu 11,3 mg/l (méně o 61,2 % než u kontroly). Z tohoto vyplývá, že nejvyšší koncentrace nisinu nesnížila množství tyraminu více než první dvě koncentrace.



Obr. 17. Vliv přidavku nisinu 7. den kultivace na kinetiku produkce tyraminu u kmene *L. plantarum* během kultivace při 12 °C.

Z grafů na obrázcích 17 a 18 je patrné, že množství tyraminu, které testovaný kmen bakterie vyprodukoval, stoupalo do 14. dne kultivace a následně došlo k mírnému poklesu. Na obr. 17 lze pozorovat, že po přidavku nisinu o nejnižší testované koncentraci bylo množství tyraminu, který vznikl v důsledku metabolické aktivity *L. plantarum* RIBM 2-89, nejvyšší. Avšak neplatí zde zcela pravidlo, že s nejvyšší aplikovanou koncentrací nisinu bylo detekované množství tyraminu nejnižší – nejnižší množství bylo detekováno u bujónů s přidavkem nisinu o koncentraci 35,7 $\mu\text{g/ml}$. U přidavku nisinu 7. den byl pozorován statisticky významný rozdíl pouze mezi kontrolou a koncentrací nisinu 35,7 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0,05$).



Obr. 18. Vliv přidavku nisinu 11. den kultivace na kinetiku produkce tyraminu u kmene *L. plantarum* během kultivace při 12 °C.

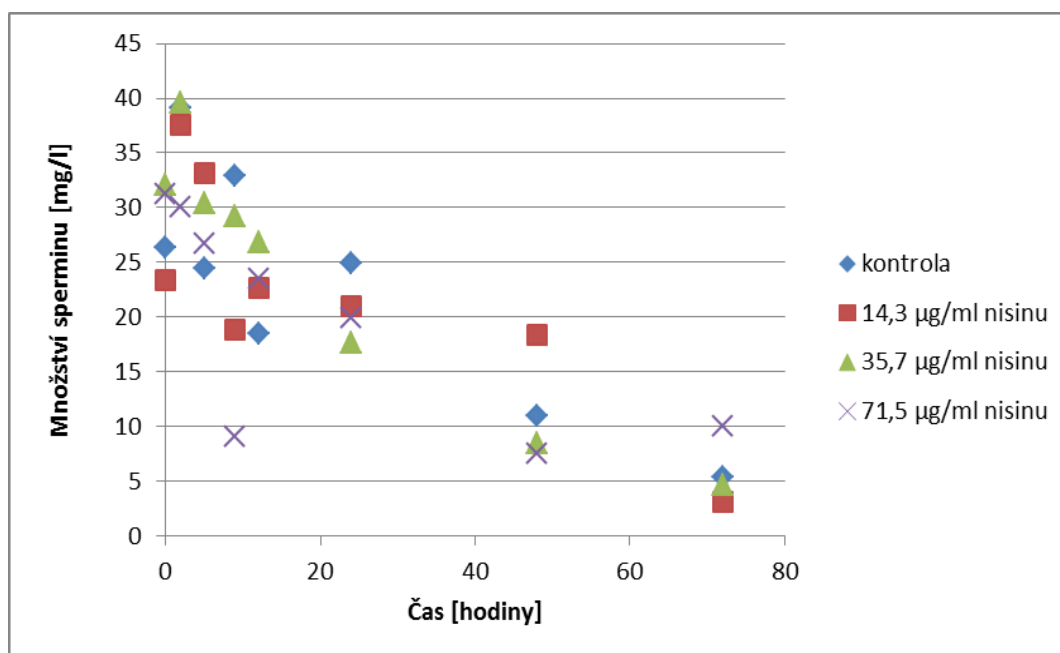
Z obr. 18 je patrné, že nejvyšší obsah tyraminu byl detekován po přidavku nisinu s nejvyšší koncentrací. Pokud byl nisin k rostoucím buňkám přidán po 11 dnech kultivace, byl na konci inkubace zaznamenán signifikantní rozdíl mezi bujóny bez nisinu (kontrola) a s přidavkem bakteriocinu ($P < 0,05$), přičemž jednotlivé koncentrace ovlivňovaly produkci tyraminu odlišně ($P < 0,05$). Nejnižší množství tyraminu bylo detekováno v bujónu s přidavkem 35,7 µg/ml nisinu. Z toho vyplývá, že přidavek nisinu ve vyšší koncentraci nesnížil množství dekarboxylázovou aktivitu testované bakterie více, než koncentrace nižší ($P > 0,05$). Nejnižší množství tyraminu bylo, z pohledu přidavku nisinu v různých časech, vyprodukováno, pokud byl bakteriocin do média přidán na počátku kultivace. Po přidavku nisinu 7. den kultivace vzrostlo množství biogenního aminu o 39,5 % a následně po přidavku nisinu 11. den kleslo o 20,4 %. Na obr. 17 a 18 lze vidět, že nisin snížil obsah biogenního aminu v kultivačním médiu, ale neplatilo, že vyšší koncentrace této látky inhibovala více tyrozindekarboxylázu bakterie podílející se na tvorbě tyraminu.

Při srovnání produkce tyraminu u *L. plantarum* RIBM 2-89 během kultivace při teplotě 30 a 12 °C byl pozorován významný rozdíl. Když byl tento kmen kultivován při vyšší teplotě, bylo množství tyraminu, který byl vyprodukován v bujónu bez přidavku nisinu, po 72 ho-

dinách kultivace 440,6 mg/l, zatímco během kultivace při 12 °C bylo zjištěné množství po 16 dnech kultivace 29,1 mg/l. Při nižší kultivační teplotě došlo k poklesu produkce tyraminu o 93,4%.

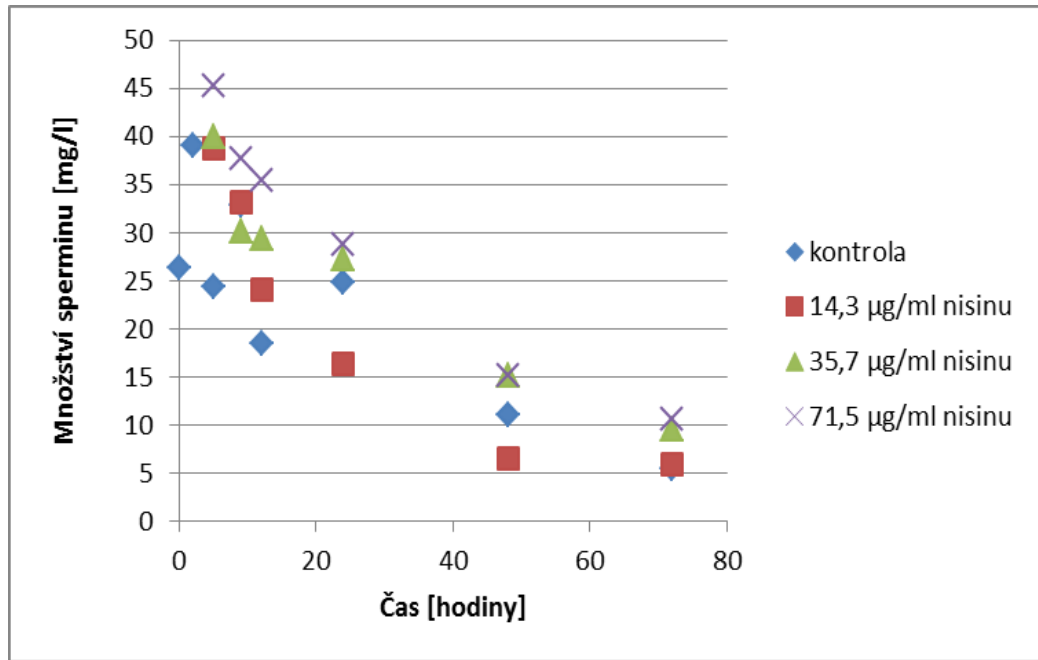
7.3.3 Produkce sperminu během kultivace při teplotě 30 °C

Množství sperminu v kultivačním médiu bez přídavku nisinu se pohybovalo v rozmezí 5,4 – 39,1 mg/k (obr. 19).

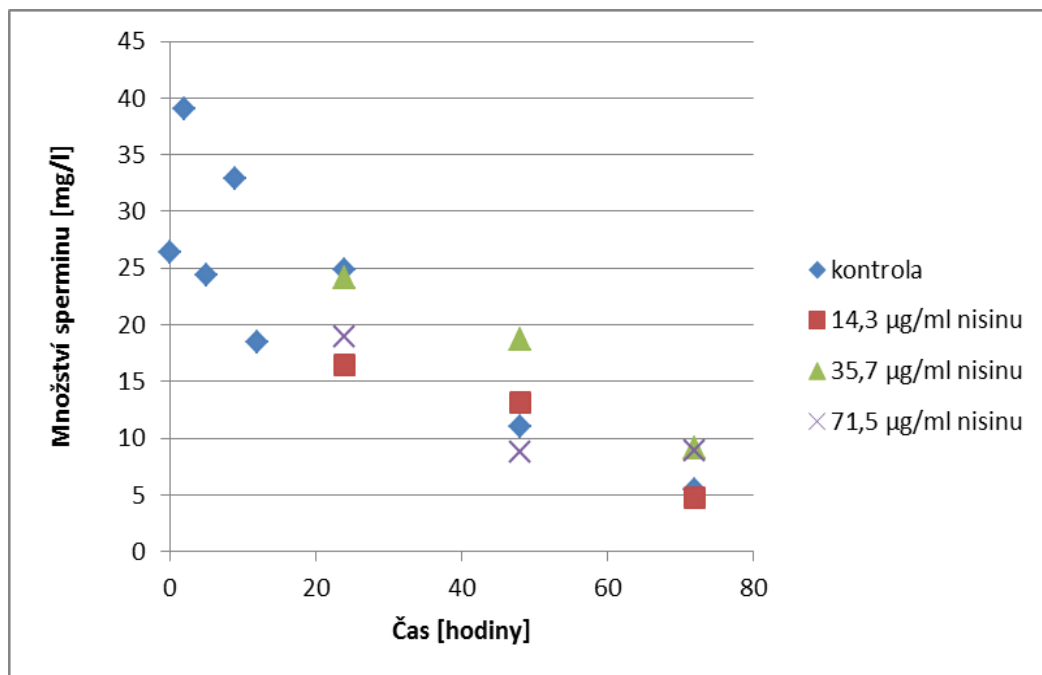


Obr. 19. Vliv přídavku nisinu v čase 0 na kinetiku produkce sperminu u kmene *L. plantarum* během kultivace při 30 °C.

Z výsledků uvedených na obr. 19 je patrné, že nejvyšší množství sperminu (39,1 mg/l) bylo stanoveno v bujónu po 2. hodině kultivace. Nejnižší množství tohoto polyaminu bylo v bujónech detekováno na konci kultivace (po 72 hodinách). Po 48 a 72 hodinách kultivace došlo k poklesu obsahu sperminu v kultivačních médiích oproti počátku kultivace o 58,3% a 79,5%. Vlivem přídavku nisinu o různých koncentracích nedošlo k poklesu sperminu v kultivačních médiích, jako tomu bylo u tyraminu ($P > 0,05$). Po 72 hodinách kultivace byla detekovaná množství sperminu následující: u kontroly bez přídavku bakteriocinu 5,4 mg/ml, s přídavkem 14,3 µg/ml nisinu 3,1 mg/ml, s přídavkem 35,7 µg/ml nisinu 4,6 mg/l a s přídavkem 71,5 µg/ml nisinu 10 mg/l. Tudíž lze konstatovat, že přídavek vyšší koncentrace nisinu zvýšil obsah sperminu.



Obr. 20. Vliv přidavku nisinu v čase 5 hodin na kinetiku produkce sperminu u kmene *L. plantarum* během kultivace při 30 °C.

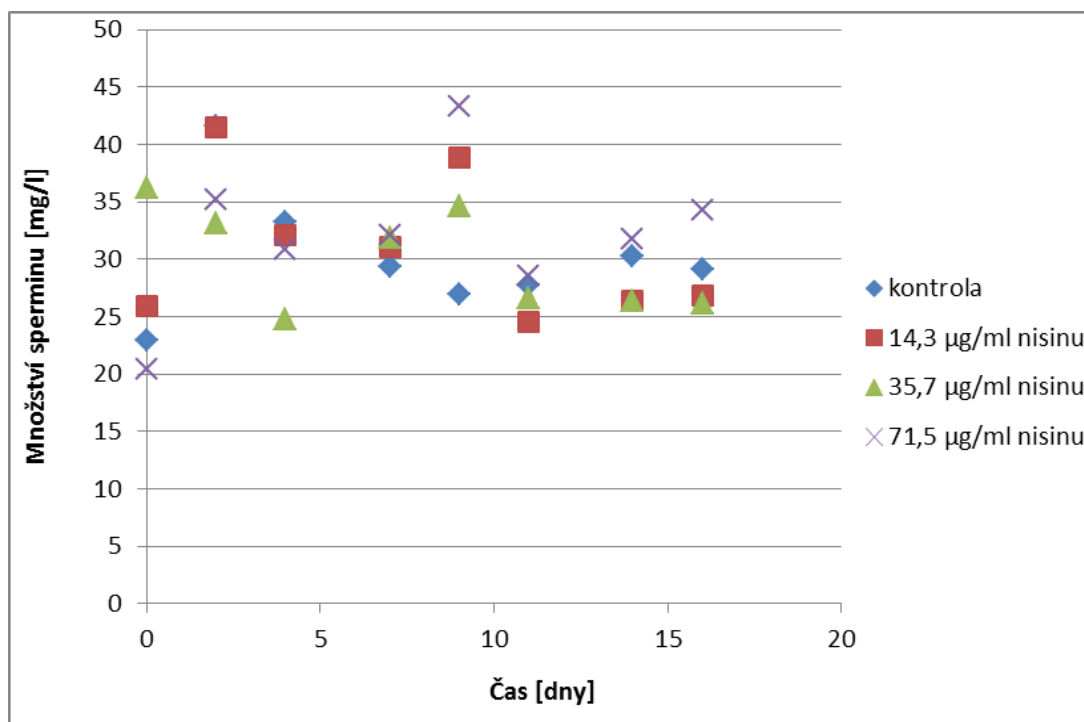


Obr. 21. Vliv přidavku nisinu v čase 24 hodin na kinetiku produkce sperminu u kmene *L. plantarum* během kultivace při 30 °C.

Z grafických výsledků uvedených na obrázcích 20 a 21 je patrné, že s rostoucí dobou kultivace klesalo množství sperminu. To může být způsobeno tím, že spermin inhibuje růst dekarboxyláza pozitivních bakterií [57]. Nejnižší množství polyaminu bylo detekováno po 72 hodinách kultivace s přidavkem nisinu o koncentraci 14,3 µg/ml (4,8 mg/l, obr. 20). Z obr. 20 je zřejmé, že čím byla koncentrace nisinu vyšší, tím byl detekován vyšší obsah sperminu v bujónu ($P > 0,05$). Po přidavku nisinu v 5. hodině kultivace měly ve srovnání s kontrolou dvě vyšší koncentrace nisinu první den kultivace statisticky prokazatelný vliv na produkci sperminu ($P < 0,05$). Na konci kultivace (72. hodina) nebyl v množství detekovaného sperminu mezi nejvyšší aplikovanou koncentrací bakteriocinu a kontrolou pozorován statisticky významný rozdíl ($P > 0,05$).

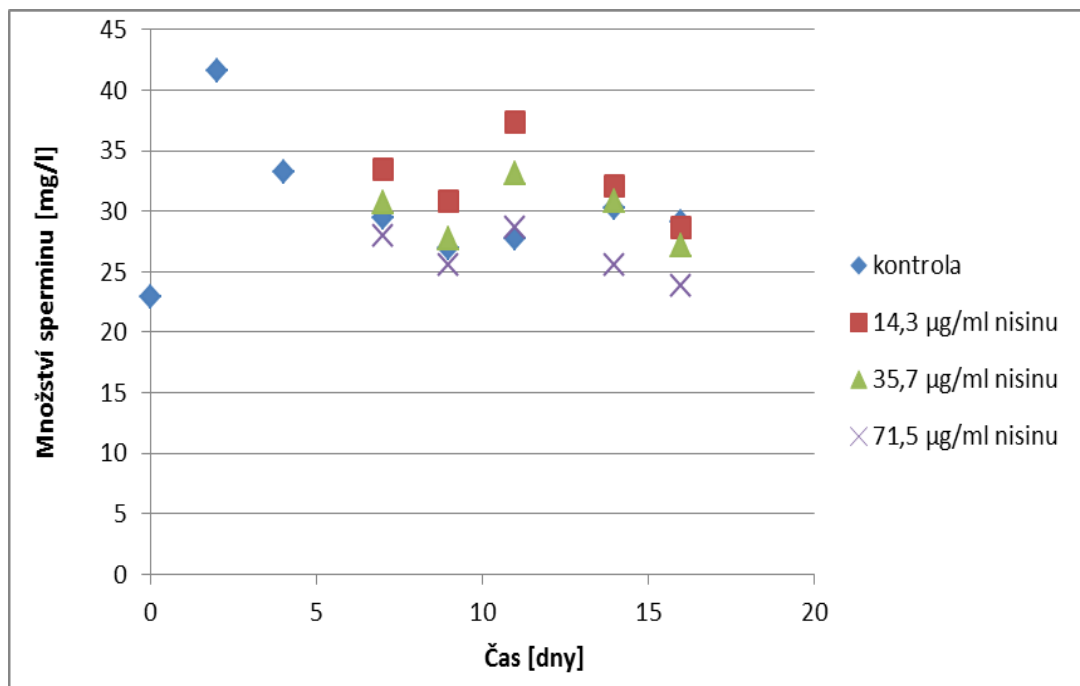
7.3.4 Produkce sperminu během kultivace při teplotě 12 °C

Množství sperminu, které bylo zjištěno v bujónech po kultivaci *L. plantarum* RIBM 2-89 při teplotě 12 °C bez přidavku nisinu, se pohybovalo v relativně v malém rozmezí, a to 22,9 - 41,6 mg/l (obr. 22).

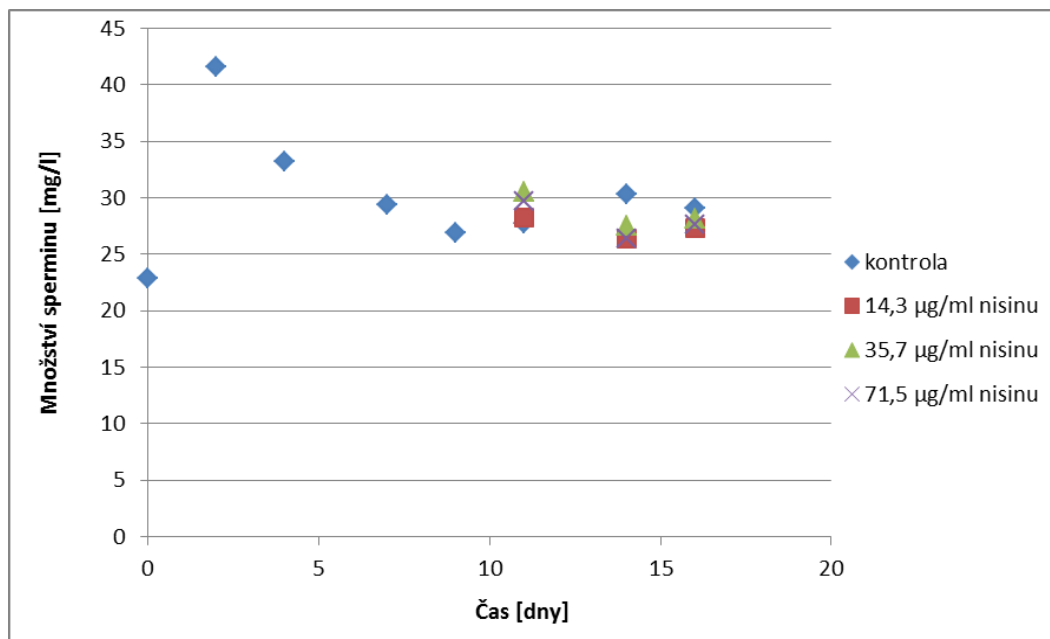


Obr. 22. Vliv přidavku nisinu na počátku kultivace na kinetiku produkce sperminu u kmene *L. plantarum* během kultivace při 12 °C.

Z výsledků uvedených na obr. 22 je patrné, že obsah sperminu v bujónu rostl do 2. dne kultivace, následně došlo k mírnému poklesu. Devátý den kultivace množství vyprodukovaného polyaminu opět stoupl, 11. den kleslo a po zbytek kultivace došlo k mírnému navýšení. Na začátku kultivace došlo ke snížení obsahu sperminu přidávkem 71,5 $\mu\text{g/ml}$ nisinu, avšak od 9. dne byl obsah sperminu v supernatantech po kultivaci buněk nejvyšší po přidání nisinu o nejvyšší koncentraci. Nejnižší obsah sperminu byl nejčastěji po přidání nisinu o koncentraci 35,7 $\mu\text{g/ml}$.



Obr. 23. Vliv přidavku nisinu 7. den kultivace na kinetiku produkce sperminu u kmene *L. plantarum* během kultivace při 12 °C



Obr. 24. Vliv přidavku nisinu 11. den kultivace na kinetiku produkce sperminu u kmene *L. plantarum* během kultivace při 12 °C

Na obr. 23 můžeme vidět, že množství sperminu, které bylo detekováno v médiích po kultivaci testované bakterie, nejprve kleslo, poté se opět mírně zvýšilo a od 14. dne kultivace klesalo. V tomto případě přidavek nisinu o koncentraci 71,5 µg/ml po 7 dnech kultivace bakterií snížil množství sperminu nejvíce ze všech tří testovaných koncentrací ($P > 0,05$). Největší obsah sperminu byl stanoven po přidavku 14,3 µg/ml nisinu ($P > 0,05$). Na konci kultivace (16 dnů) testovaného kmene byly v bujóněch s přidavky bakteriocinu zaznamenány následující poklesy (oproti kontrole bez přidavku nisinu) množství tohoto polyaminu: po přidavku 14,3 µg/ml nisinu o 1,7 %, po přidavku 35,7 µg/ml nisinu nižší o 6,5 % a po přidavku 71,5 µg/ml nisinu nižší o 18,2 %. Když byl nisin přidán po 11 dnech kultivace (obr. 24), obsah sperminu byl ve všech analyzovaných bujóněch (s přidavkem tří koncentrací nisinu) téměř stejný (26,4 - 30,5 mg/l) ($P > 0,05$). Z grafu můžeme vidět, že nejnižší množství bylo stanoveno po 14 dnech kultivace. Po přidavku nisinu 7. den kultivace neměl nisin vliv na produkci sperminu ($P > 0,05$), zatímco po přidavku nisinu 16. den měly všechny 3 koncentrace statisticky významný vliv na obsah sperminu ($P < 0,05$).

Z obr. 22, 23, 24 je patrné, že přidavek nisinu v jednotlivých časových intervalech měl minimální vliv na obsah sperminu ($P > 0,05$). Množství sperminu v kultivačních médiích bylo obdobné, jak když byl přidán nisin na počátku kultivace ($P > 0,05$).

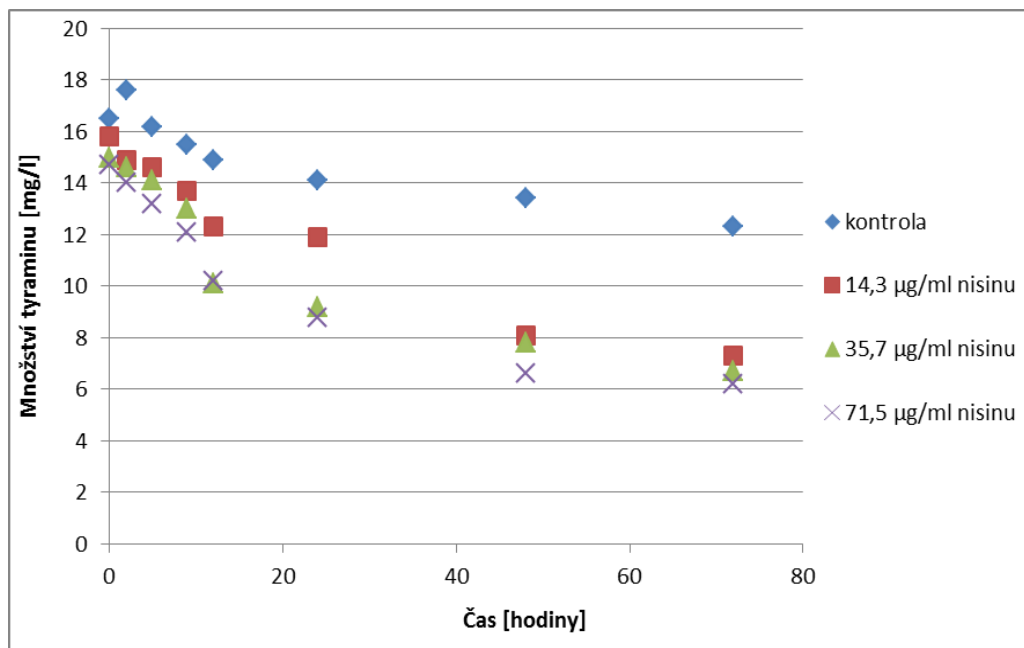
Při srovnání produkce sperminu u *L. plantarum* RIBM 2-89 během kultivace při teplotách 30 a 12 °C nebyl pozorován významný rozdíl v produkci polyaminu během prvních 24 hodinách/11 dní kultivace. Následně došlo k výraznějšímu snížení obsahu sperminu během kultivace při 30 °C. Po 72 hodinách kultivace při 30 °C byl obsah sperminu v bujónu nižší o 81,4% než po 16 dnech kultivace při 12 °C.

7.4 Vliv vnějších faktorů na produkci biogenních aminů u kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T3

U sledovaného kmene byla pozorována produkce biogenních aminů v závislosti na vnějších faktorech (stejně faktory jako u kmene *L. plantarum* RIBM 2-89). Jako kontrola sloužily opět vzorky bez přídavku nisinu. Z biogenních aminů a polyaminů byly sledovány tyramin a spermin, protože tyto aminy byly detekovány při prvotním skríningu (kapitola 7.2.; tabulka 11). Paralelně se stanovením obsahu biogenních aminů byl sledován i celkový počet mikroorganismů narostlých na Petriho miskách s půdou MRS v daném čase odběru. Růstově křivky mikroorganismů můžeme vidět v příloze P1 a po jejich srovnání s produkcí biogenních aminů je opět patrné, že produkce obou detekovaných aminů započala během exponenciální fáze růstu a pokračovala i ve fázi stacionární.

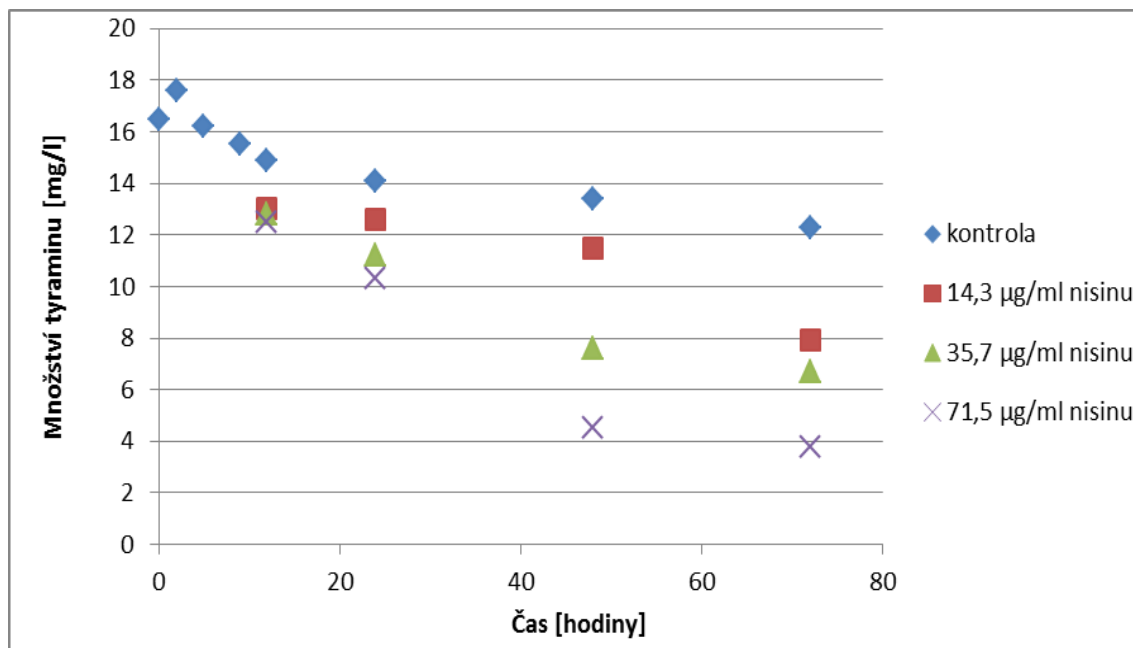
7.4.1 Produkce tyraminu během kultivace při teplotě kultivace 30 °C

Během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T3 při teplotě 30 °C byly vzorky pro analýzu kinetiky produkce tyraminu odebírány po 0, 2, 5, 9, 12, 24, 48 a 72 hodinách. V každém čase (kromě posledních dvou uvedených) byl do určitých zkumavek přidáván nisin v testovaných koncentracích.



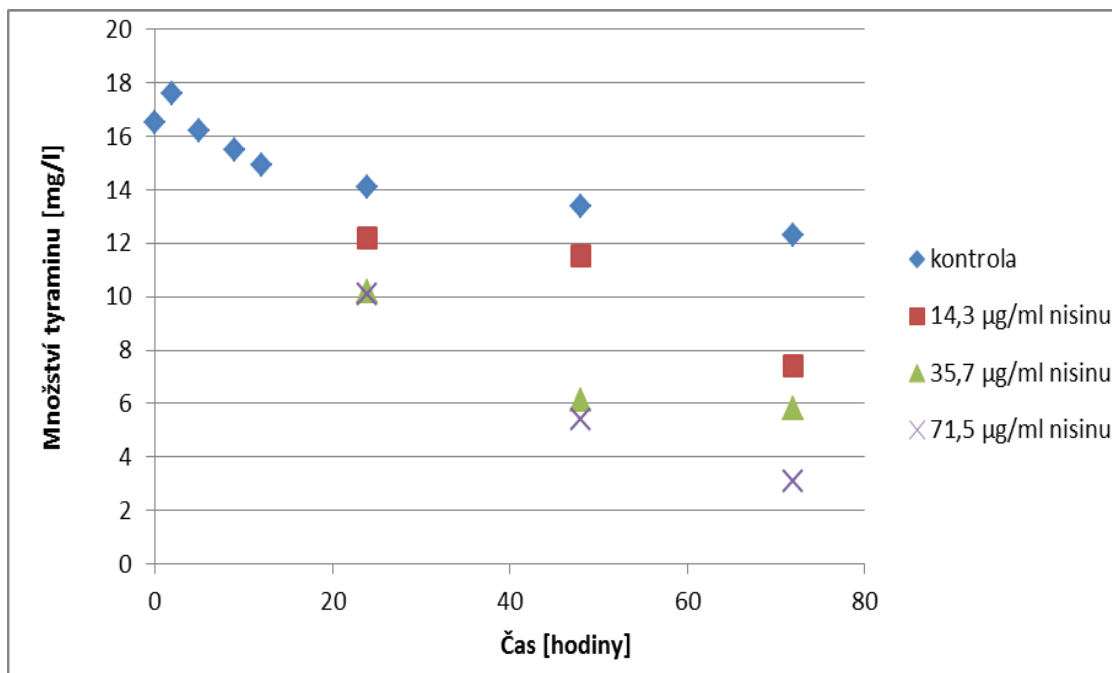
Obr. 25. Vliv přidavku nisinu v čase 0 na kinetiku produkce tyraminu u kmene *Lactobacillus curvatus* během kultivace při 30 °C.

Z obrázku 25 je patrné, že v průběhu kultivace s narůstajícím časem docházelo k poklesu množství vyprodukovaného tyraminu. Na počátku experimentu byl u kontrolního média detekován tyramin v množství 16,5 mg/l. Po 72 hodinách kultivace došlo k poklesu množství tyraminu v bujónu na 12,3 mg/l. Přídavek nisinu měl vliv na obsah tyraminu během celé doby kultivace, přičemž během prvních 12 hodin kultivace tento vliv nebyl významný ($P > 0,05$), poté byl nejprve po 12 a 24 hodinách inkubace pozorován významný rozdíl po aplikaci dvou vyšších koncentrací ($P < 0,05$) a od druhého dne kultivace již byl zjištěn signifikantní vliv mezi přidavkem nisinu a kontrolními vzorky ($P < 0,05$). S přidavkem nisinu ve všech třech testovaných koncentracích se snížil obsah tyraminu v bujónu po kultivaci bakterie. Při přidavku 14,3 µg/ml nisinu bylo počáteční množství tyraminu 15,8 µg/ml a po 72 hodinách kleslo na 7,3 mg/l, což je méně o 40,7 %. Při přidavku 35,7 µg/ml nisinu byl obsah tyraminu na počátku kultivace 15,0 mg/l a na konci kultivace klesl na 6,7 mg/l (proti kontrole méně o 45,5 %). Při přidavku nejvyšší koncentrace nisinu bylo počáteční množství tyraminu 14,7 mg/l a na konci kultivace pouze 6,2 mg/l (ve srovnání s kontrolou méně o 49,6 %).



Obr. 26. Vliv přidavku nisinu v čase 12 hodin na kinetiku produkce tyraminu u kmene *Lactobacillus curvatus* během kultivace při 30 °C.

Na obrázku 26 můžeme vidět, že s přidavkem nisinu k rostoucím buňkám v pozdější době došlo v bujónech k mírnému navýšení tyraminu ve srovnání s přidavkem bakteriocinu na počátku kultivace (obr. 25). Množství tyraminu u kontrolních vzorků bylo z důvodu jedné sady kontrolních zkumavek shodné jako v případě sledování produkce biogenního aminu po přidavku nisinu na počátku kultivace (obr. 25). Z grafů na obrázku 25 a 26 lze vyčíst, že čím vyšší koncentrace nisinu byla k inkubovaným buňkám přidána, tím bylo zjištěné množství tyraminu nižší. Po 72 hodinách kultivace bylo množství tyraminu v MRS bujónu po přidavku 14,3 µg/ml nisinu po 12 hodinách kultivace nižší o 35,8 % než u kontrolních vzorků bez přidavku bakteriocinu, po přidavku 35,7 µg/ml nisinu po 12 hodinách inkubace nižší o 45,5 % a po přidavku 71,5 µg/ml nisinu kleslo množství tyraminu o 69,1 %. Ve srovnání s přidavkem nisinu na počátku inkubace testovaného kmene (v čase 0) došlo v případě pozdějšího přidavku bakteriocinu k mírnému zvýšení obsahu tyraminu po přidavku dvou nižších koncentrací nisinu, avšak po přidavku nisinu nejvyšší koncentrace byl obsah tyraminu nižší. U přidavku nisinu v 12. hodině kultivace měly všechny koncentrace nisinu po 72 hodinách inkubace statisticky významný vliv na produkci tyraminu ($P < 0,05$), přičemž přidavek nejnižší a nejvyšší koncentrace nisinu měl odlišný vliv na obsah biogenního aminu ($P < 0,05$).



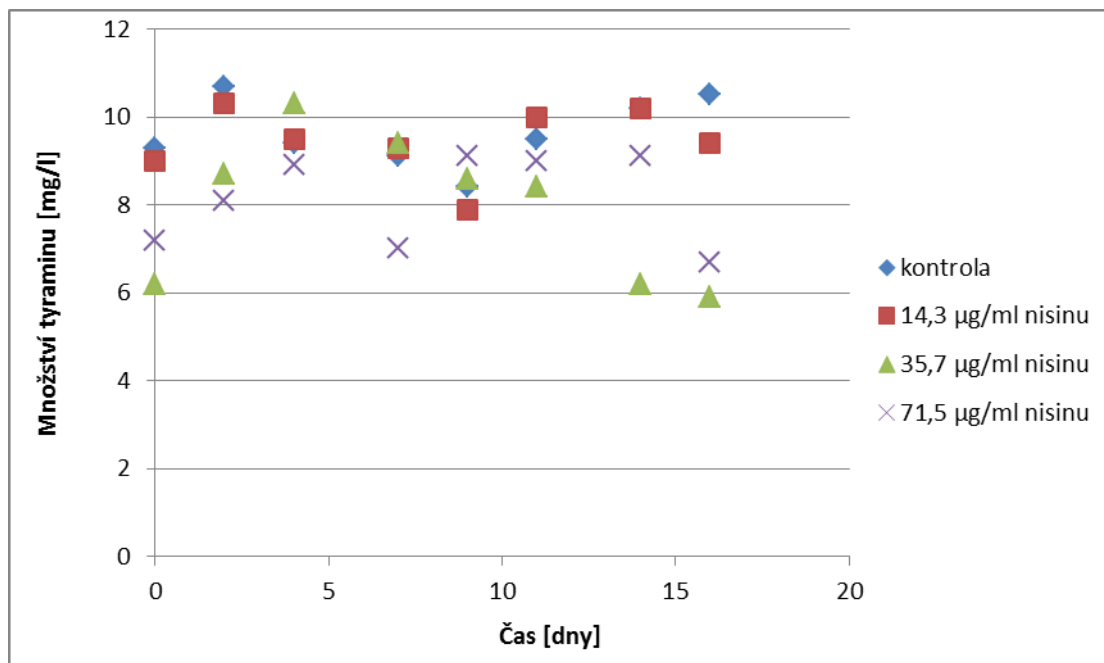
Obr. 27. Vliv přidavku nisinu v čase 24 hodin na kinetiku produkce tyraminu u kmene *Lactobacillus curvatus* během kultivace při 30 °C.

Z grafu na obr. 27 lze vyvodit, že s přidavkem nisinu k rostoucím buňkám po 24 hodinách kultivace došlo k mírnému snížení detekovaného tyraminu oproti přidavku inhibiční látky po 12 hodinách kultivace ($P > 0,05$). Když byl přidán nisin o nejnižší testované koncentraci, došlo k poklesu zjištěného množství tyraminu oproti kontrole o 39,8 %, po přidavku nisinu nejvyšší koncentrace došlo k poklesu o 74,8 %.

Z obrázků 25, 26, 27 lze usoudit, že přidavek nisinu měl vliv na obsah tyraminu v MRS po kultivaci *L. curvatus* subsp. *curvatus* T3. Čím vyšší koncentrace nisinu byla přidána, tím byl zjištěný obsah tyraminu nižší. Nejnižší množství tyraminu bylo detekováno v médiu po přidavku nisinu o nejvyšší koncentraci po 24 hodinách kultivace (3,1 mg/l). Nejvyšší obsah tyraminu byl detekován v bujónu po kultivaci bez přidavku nisinu po 2 hodinách kultivace testovaného bakteriálního kmene (17,6 mg/l). Když byl bakteriocin přidán ke konci kultivace (po 24 hodinách), měl na produkci tyraminu statisticky významný vliv nisin ve všech koncentracích ($P < 0,05$). Vliv 2 nižších koncentrací na produkci tyraminu byl obdobný ($P > 0,05$), zatímco přidavek nejvyšší koncentrace se odlišoval ($P < 0,05$).

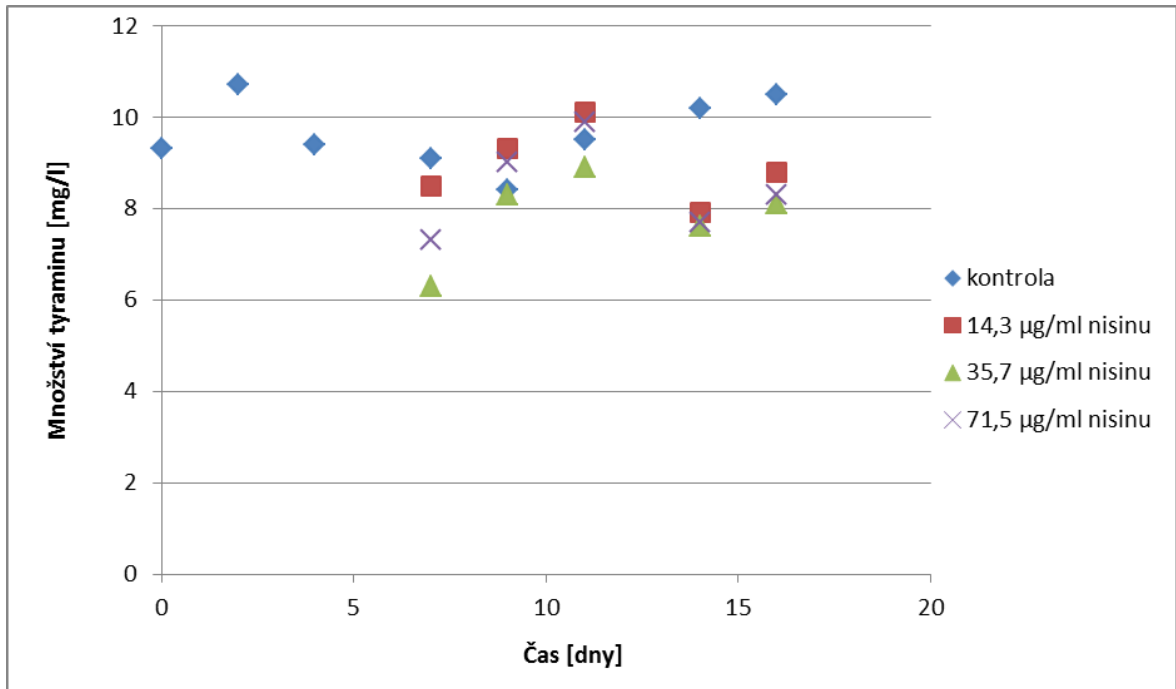
7.4.2 Produkce tyraminu během kultivace při teplotě kultivace 12 °C

Zjištěná množství tyraminu v bujónech po kultivaci bakterií bez přídavku nisinu se pohybovala v rozmezí 8,4 – 10,7 mg/l (obr. 28).

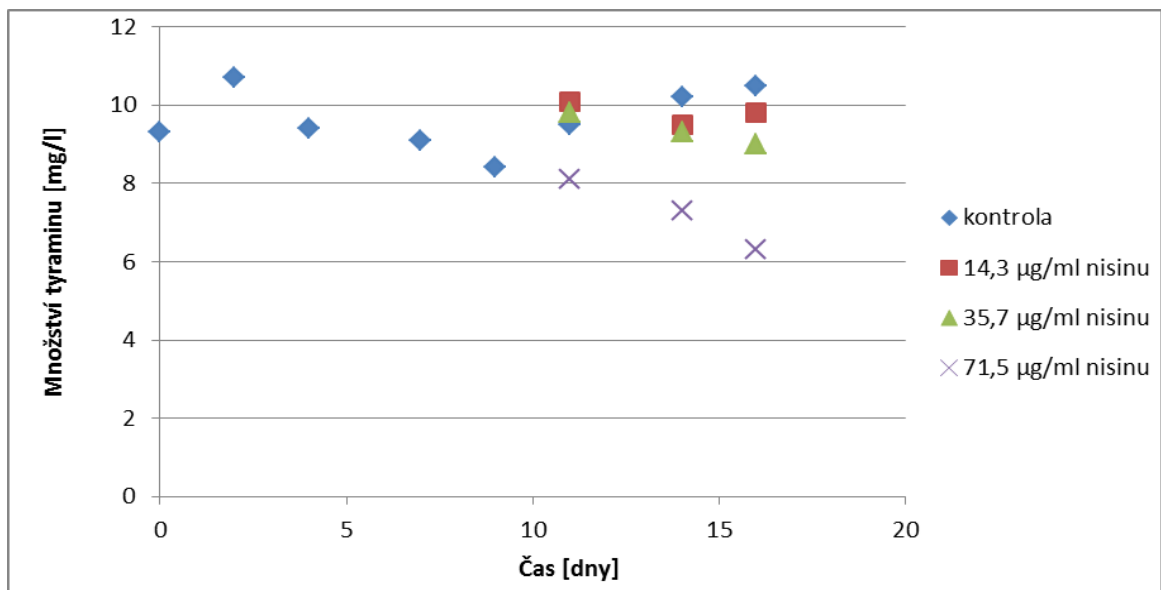


Obr. 28. Vliv přídavku nisinu na počátku kultivace na kinetiku produkce tyraminu u kmene *Lactobacillus curvatus* během kultivace při 12 °C.

Na obr. 28 můžeme vidět, že množství tyraminu, který byl produkován buňkami během prvních 2 hodin, vzrostlo, poté došlo k jeho snížení (do 7. hodiny kultivace) a od 9. hodiny kultivace opět rostlo. V tomto případě přídavek nisinu o koncentraci 35,7 µg/ml k inkubovaným bakteriím snížil množství tyraminu nejvíce ze všech tří aplikovaných koncentrací. Největší obsah tyraminu byl stanoven v médiu po přídavku 14,3 µg/ml nisinu. Množství biogenního aminu po 16 dnech kultivace bylo v MRS po přídavku 14,3 µg/ml nisinu o 10,5 % nižší než u kontrolních vzorků (bez přídavku bakteriocinu) ($P > 0,05$), po přídavku 35,7 µg/ml nisinu bylo nižší o 43,8 % a po přídavku 71,5 µg/ml nisinu o 36,2 %.



Obr. 29. Vliv přidavku nisinu 7. den kultivace na kinetiku produkce tyraminu u kmene *Lactobacillus curvatus* během kultivace při 12 °C.



Obr. 30. Vliv přidavku nisinu 11. den kultivace na kinetiku produkce tyraminu u kmene *Lactobacillus curvatus* během kultivace při 12 °C.

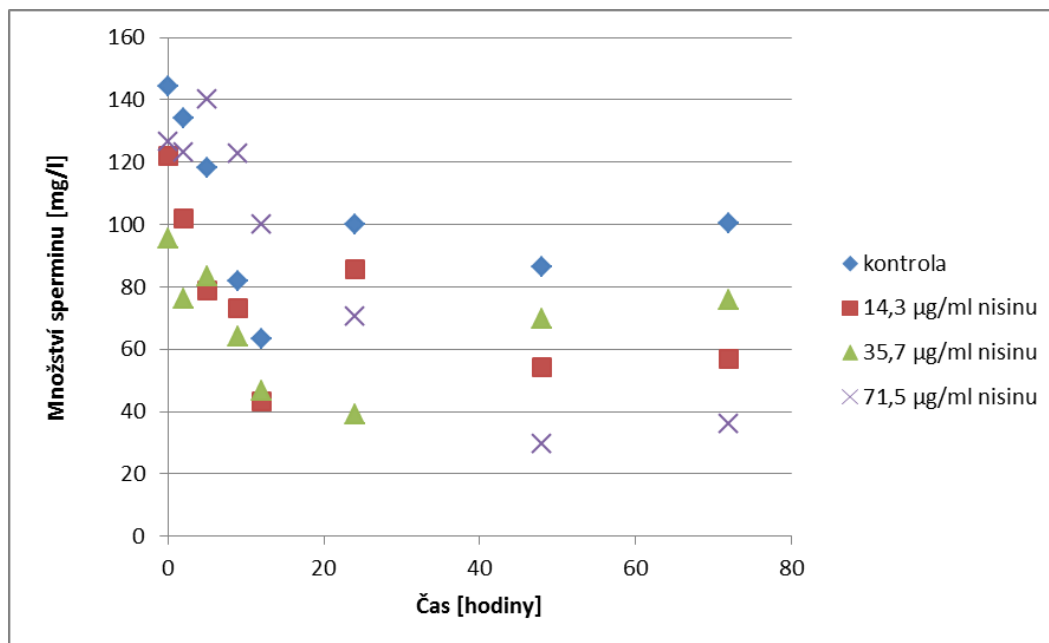
Na obr. 29 můžeme vidět, že množství tyraminu, který byl produkován *L. curvatus*, stoupla do 11. dne kultivace, následně došlo k poklesu a poté došlo opět k mírnému zvýšení. V tomto případě měl na produkci tohoto biogenního aminu největší vliv přidavek nisinu o koncentraci 35,7 µg/ml (stejně jako u obr. 28), po jehož aplikaci byl pozorován největší

pokles tohoto aminu v kultivačním médiu ($P < 0,05$). Obsah tyraminu byl v bujónu po kultivaci testovaného kmene po přidavku 14,3 $\mu\text{g/ml}$ nisinu 8,8 mg/ml, po přidavku 14,3 $\mu\text{g/ml}$ nisinu 8,1 mg/ml a po přidavku 71,5 $\mu\text{g/ml}$ nisinu 8,3 mg/l. Po přidavku nisinu 7. den nebyl pozorován významný rozdíl po přidavku prvních 2 koncentrací nisinu ($P > 0,05$), zatímco nisin s nejvyšší koncentrací statisticky významně ovlivňoval obsah tyraminu ($P < 0,05$). Z výsledků uvedených na obr. 30 lze vyvodit, že obsah tyraminu v bujónech od 11. dne kultivace klesal. Na rozdíl od přidavku bakteriocinu v dřívějších fázích kultivace (obr. 28 a 29) bylo stanoveno nejmenší množství tyraminu v MRS po přidavku nisinu o nejvyšší aplikované koncentraci (o 40,0 % méně než u kontroly po 16 dnech kultivace) ($P < 0,05$). Po 11 dnech kultivace se přidavek nisinu 2 nižších koncentrací významně neprojevil ($P > 0,05$), zatímco po 16 dnech kultivace měl přidavek nisinu statisticky významný vliv ($P < 0,05$) na produkci tyraminu. Když byl nisin přidán 14. den kultivace, koncentrace nisinu měly odlišný vliv na obsah tyraminu. Mezi kontrolou a nejnižší koncentrací nisinu nebyl pozorován významný rozdíl ($P > 0,05$).

Při srovnání produkce tyraminu u *L. curvatus* subsp. *curvatus* T3 během kultivace při 30 a 12 °C byl obsah vyšší v bujónech během kultivace při teplotě 30 °C. Když byl tento kmen kultivován při vyšší teplotě, bylo zjištěné množství tyraminu po 72 hodinách inkubace 12,3 mg/l, zatímco během kultivace při teplotě 12 °C bylo po 16 dnech detekováno 10,5 mg/l tohoto biogenního aminu. Při nižší kultivační teplotě došlo k poklesu vyprodukovaného tyraminu o 14,6 %.

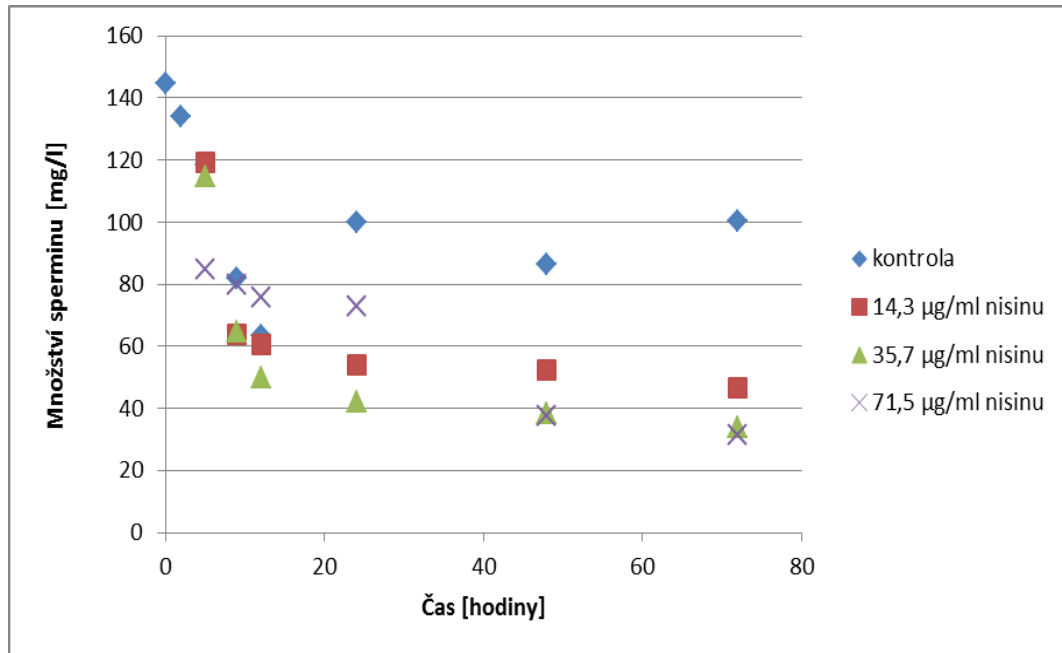
7.4.3 Produkce sperminu během kultivace při teplotě kultivace 30 °C

Množství sperminu se v bujónech bez přidavku nisinu během kultivace *L. curvatus* subsp. *curvatus* T3 pohybovalo v rozmezí 63,3 – 144,5 mg/l (obr. 31).

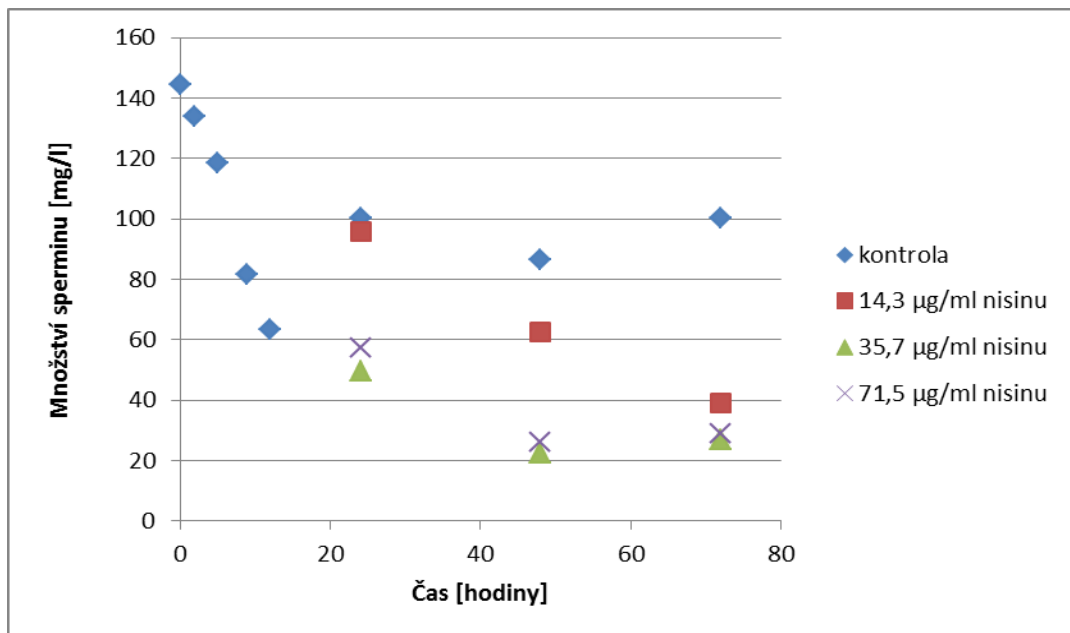


Obr. 31. Vliv přidavku nisinu v čase 0 na kinetiku produkce sperminu u kmene *Lactobacillus curvatus* během kultivace při 30 °C.

Z obr. 31 je patrné, že během prvních 12 hodin kultivace nedošlo ke snížení produkce sperminu v důsledku přidavku nisinu v nejvyšší testované koncentraci, naopak v bujónu byl obsah sperminu nejvyšší. Množství polyaminu pozvolna klesalo do 12. hodiny kultivace, poté se obsah mírně zvýšil a po 48 hodinách opět klesl. Nejvyšší množství sperminu (144,5 mg/l) bylo stanoveno na počátku kultivace v MRS bez přidavku nisinu. Nejnižší množství bylo detekováno po 48 hodinách kultivace v bujónu s přidavkem nisinu o nejvyšší testované koncentraci (29,7 mg/ml). Z toho lze usoudit, že s rostoucí dobou kultivace měl přídavek nisinu o nejvyšší koncentraci vliv na snížení obsahu sperminu v kultivačním médiu ($P < 0,05$). Vlivem přidavku nisinu o různých koncentracích došlo ke konci kultivace k poklesu obsahu sperminu v bujónech (po 48 a 72 hodinách), přičemž přídavek nisinu v koncentraci 35,7 µg/l neměl na pokles produkce signifikantní vliv ($P > 0,05$), zatímco u dvou zbývajících koncentrací byl tento vliv statisticky významný ($P < 0,05$). Po 72 hodinách byla stanovena následující množství sperminu v MRS bujónech: u kontrolního vzorku 100,3 mg/ml, s přidavkem 14,3 µg/ml nisinu 56,8 mg/ml, s přidavkem 35,7 µg/ml nisinu 74,6 mg/l, s přidavkem 71,5 µg/ml nisinu 36,1 mg/l.



Obr. 32. Vliv přidavku nisinu v čase 5 hodin na kinetiku produkce sperminu u kmene *Lactobacillus curvatus* během kultivace při 30 °C.



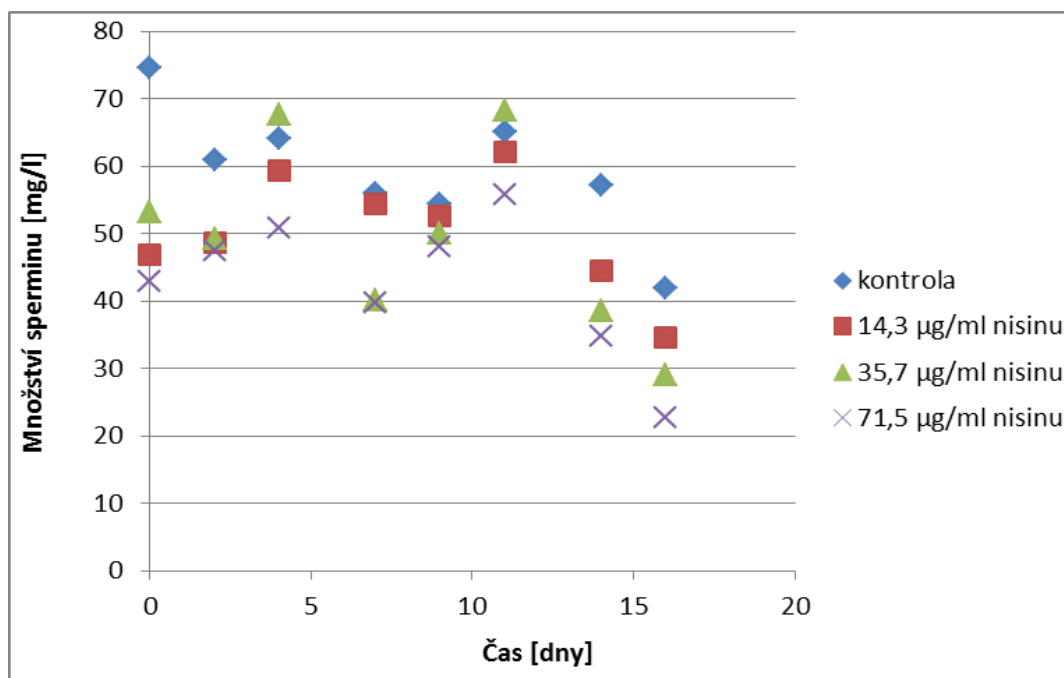
Obr. 33. Vliv přidavku nisinu v čase 24 hodin na kinetiku produkce sperminu u kmene *Lactobacillus curvatus* během kultivace při 30 °C.

Z výsledků na obrázcích 32 a 33 lze vyvodit, že s rostoucí dobou kultivace v kultivačním médiu klesalo množství sperminu. To může být způsobeno tím, že nisin inhibuje růst dekarboxyláza pozitivních bakterií [57]. Jestliže byl k rostoucím buňkám přidán nisin o kon-

centraci 71,5 $\mu\text{g/ml}$ po 5 hodinách kultivace (obr. 32), bylo po 72 hodinách kultivace v MRS detekováno nejnižší množství sperminu (31,3 mg/l). Nejvyšší aplikovaná koncentrace nisinu nezpůsobila do 24. hodiny kultivace výraznější pokles sperminu v bujónu než koncentrace nižší ($P > 0,05$). Na obr. 33 lze vidět, že vlivem nisinu o koncentraci 35,7 $\mu\text{g/ml}$ byl obsah sperminu oproti kontrolním vzorkům snížen nejvíce ($P < 0,05$). Nejméně sperminu bylo v supernatantech po inkubaci buněk detekováno po 48 hodinách kultivace (22,3 mg/l). Po 72 hodinách kultivace (obr. 32) bylo množství sperminu v kultivačním médiu s přidavkem 14,3 $\mu\text{g/ml}$ nisinu nižší o 61,0 % než u kontrolního bujónu, s přidavkem 35,9 $\mu\text{g/ml}$ nisinu byl obsah nižší o 73,3 % a po přidavku 71,5 $\mu\text{g/ml}$ nisinu o 71,3 %. Přídavek nisinu ve všech koncentracích měl statisticky významný vliv na produkci sperminu během celé doby kultivace ($P < 0,05$).

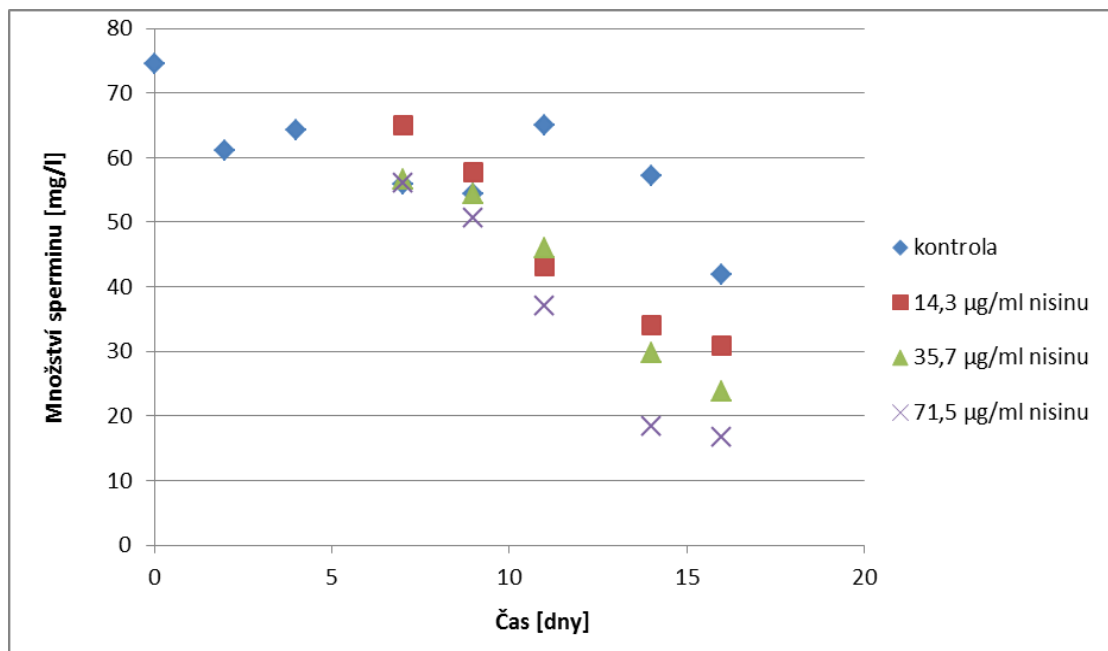
7.4.4 Produkce sperminu během kultivace při teplotě kultivace 12 °C

Během kultivace kmene *L. curvatus* subsp. *curvatus* T3 při teplotě 12 °C se obsah tyraminu v bujónech bez přidavku nisinu pohyboval v rozmezí 41,9 – 74,6 mg/l (obr. 34).

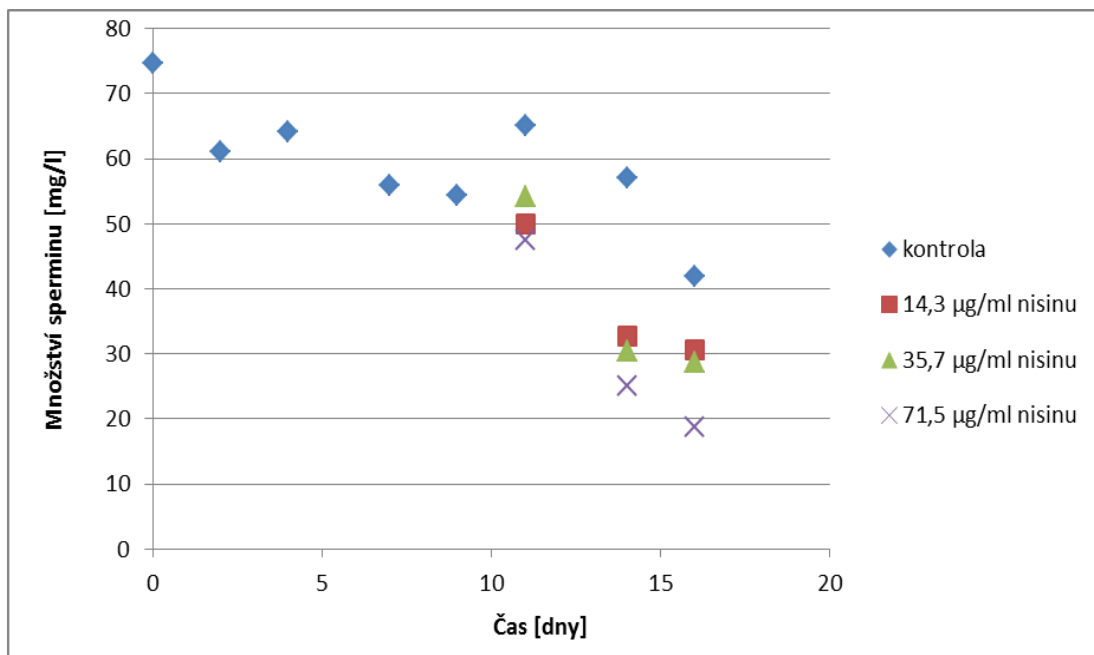


Obr. 34. Vliv přidavku nisinu na počátku kultivace na kinetiku produkce sperminu u kmene *Lactobacillus curvatus* během kultivace při 12 °C.

Obsah sperminu v MRS u sledovaného kmene během kultivace kolísal, 16. den byl v MRS obsah sperminu 41,9 mg/l (obr. 34). Nejvyšší množství tohoto polyaminu bylo detekováno v médiu bez přídavku nisinu na počátku kultivace (74,6 mg/l). Po 16 dnech kultivace klesl obsah sperminu v bujónu bez přídavku nisinu téměř o polovinu (o 43,8 %). Vlivem přídavku dvou nižších koncentrací nisinu došlo v průběhu kultivace k statisticky nevýznamnému poklesu sperminu oproti kontrole ($P > 0,05$), zatímco při aplikaci nejvyšší koncentrace byl ve srovnání s kontrolou zaznamenán signifikantní rozdíl ($P < 0,05$). Po 72 hodinách kultivace byl v MRS s přídavkem 14,3 $\mu\text{g/ml}$ nisinu detekován spermin v množství 34,6 mg/ml (o 17,4 % méně než v MRS bez přídavku nisinu), s přídavkem 75,9 $\mu\text{g/ml}$ nisinu 29,0 mg/l (o 30,8 % méně než v MRS bez přídavku nisinu), s přídavkem 71,5 $\mu\text{g/ml}$ nisinu 22,7 mg/l (o 45,8 % méně než v MRS bez přídavku nisinu).



Obr. 35. Vliv přídavku nisinu 7. den kultivace na kinetiku produkce sperminu u kmene *Lactobacillus curvatus* během kultivace při 12 °C



Obr. 36. Vliv přidavku nisinu 11. den kultivace na kinetiku produkce sperminu u kmene *Lactobacillus curvatus* během kultivace při 12 °C

Z výsledků, které jsou graficky uvedeny na obrázku 35 a 36, lze vyvodit, že s rostoucí dobou kultivace klesalo množství sperminu v kultivačním médiu. Když byl nisin k rostoucím buňkám do média přidán později (11. den), došlo k mírnému zvýšení detekovaného množství sperminu oproti tomu, když byl bakteriocin ke studovanému kmenu laktobacilu přidán dříve (5. den). Nejnižší množství polyaminu bylo detekováno v MRS po přidavku nisinu o nejvyšší koncentraci po 16 dnech kultivace (obr. 35), a to 16,7 mg/l. Po 16 dnech kultivace (obr. 36) bylo množství sperminu v bujónu s přidavkem 14,3 µg/ml nisinu nižší o 27,0 % než u kontrolních vzorků bez bakteriocinu, s přidavkem 75,9 µg/ml nisinu byl obsah nižší o 31,3 % a po přidavku 71,5 µg/ml nisinu o 55,1 %. Po 11 dnech kultivace se přidavek nisinu o nejnižší koncentraci významně neprojevil ($P > 0,05$), zatímco po 14 dnech kultivace měl přidavek nisinu statisticky významný vliv ($P < 0,05$) na produkci sperminu. Přídavek nisinu nejvyšší v koncentraci měl statisticky významný vliv na produkci polyaminu během celé doby kultivace ($P < 0,05$).

Z obrázků 34 až 36 lze usoudit, že odlišná koncentrace přidaného nisinu měla vliv na obsah sperminu v kultivačním médiu. Zpravidla platilo, že čím vyšší koncentrace nisinu byla do bujónu přidána, tím byl detekován nižší obsah sperminu.

Při srovnání produkce sperminu u *L. curvatus* subsp. *curvatus* T3 během kultivace při teplotě 30 a 12 °C došlo k poklesu obsahu sperminu v médiu během kultivace při 12 °C. Když byl tento kmen kultivován při 30 °C, bylo zjištěno množství sperminu v médiu bez přídavku nisinu po 72 hodinách 100,3 mg/l, zatímco během kultivace při 12 °C bylo zjištěné množství polyaminu po 16 dnech 41,9 mg/l. Při nižší kultivační teplotě došlo v bujónech po kultivaci testovaných bakterií k poklesu sperminu o více než polovinu (o 58,2 %).

7.5 Souhrnná diskuze

V diplomové práci byl sledován vliv vnějších faktorů, především přídavek bakteriocinu nisinu ve třech koncentracích v různých časových intervalech, na produkci biogenních aminů u dvou kmenů laktobacilů, které byly izolovány z piva a přírodního sýru. Tento experiment byl prováděn z důvodu, že nisin je povolen přidávat do potravin [58] a mohl by mít pozitivní vliv na lidské zdraví tím, že sníží produkci biogenních aminů.

Ze získaných výsledků je patrné, že kmen *L. plantarum* RIBM 2-89 produkoval vyšší množství tyraminu než kmen *L. curvatus* subsp. *curvatus* T3, přičemž vyšší produkce byla u obou kmenů zjištěna během kultivace při 30 °C. U kmene *L. plantarum* RIBM 2-89 došlo během kultivace k výraznému zvýšení vyprodukovaného tyraminu. U kmene *L. curvatus* subsp. *curvatus* T3 tomu bylo naopak, během kultivace došlo k mírnému snížení obsahu tyraminu v kultivačním médiu. S přídavkem nisinu v čase došlo k poklesu tyraminu u obou kmenů během kultivace při teplotě 30 °C. Oproti tomu během kultivace při nižší testované teplotě došlo s přídavkem nisinu v čase k mírnému navýšení tyraminu v médiu. Zpravidla platilo, že čím vyšší koncentrace nisinu byla do bujónu k bakteriím přidána, tím byl obsah vyprodukovaných biogenních aminů nižší.

Vyšší obsah sperminu byl detekován v bujónech po kultivaci kmene *L. curvatus* subsp. *curvatus* T3. Nejvyšší produkce polyaminu byla u tohoto kmene zjištěna během kultivace při 30 °C. Na rozdíl od těchto výsledků, u kmene *L. plantarum* RIBM 2-89 bylo detekováno vyšší množství sperminu během kultivace při 12 °C. U kmene *L. curvatus* subsp. *curvatus* T3 došlo v důsledku přídavku nisinu v čase k poklesu sperminu v bujónu, přičemž platilo, že čím vyšší koncentrace nisinu byla do média přidána, tím byl zjištěný obsah sperminu nižší. U kmene *L. plantarum* RIBM 2-89 bylo dosaženo podobných výsledků, přídavek nisinu v čase rovněž vedl k poklesu sperminu s tím rozdílem, že vždy neplatilo, že vyšší

koncentrace nisinu více snižovala obsah sperminu v bujónu. V tomto případě po přidavku nižších koncentrací nisinu byl v bujónu detekován nižší obsah sperminu.

Snížením obsahu biogenních aminů v potravinách se zabývá mnoho výzkumných pracovníků a mezinárodních agentur. Metody jsou založené na inhibici růstu mikroorganismů nebo jejich dekarboxylázové činnosti s cílem zlepšit kvalitu potravin. Přídavkem bakteriocinů, respektive nisinu, za účelem snížení produkce biogenních aminů se doposud zabývalo minimum studií, tudíž je velmi obtížné porovnat výsledky získané v této diplomové práci s jinými výzkumy. Z tohoto důvodu se tedy diskuze bude věnovat převážně jiným možnostem snížení produkce biogenních aminů.

Autory Tabanelli et al. [59] byla zkoumána antimikrobiální aktivita určitých kmenů laktokoků izolovaných z kravského mléka na jiné grampozitivní koky řazené rovněž mezi BMK. Na základě jejich inhibičního účinku byly vybrány 3 kmeny - *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CG27, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* VR84, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* EG46. Byla studována jejich inhibiční aktivita proti bakterii *Enterococcus faecalis* EF37 produkující tyramin a bakterii *Streptococcus thermophilus* PRI60 produkující histamin. Bylo prokázáno, že vybrané 3 kmeny produkují bakteriociny nisin Z a lakticin 481 schopné inhibovat dekarboxyláza pozitivní bakterie. Produkce tyraminu bez přidavku konkurenčních produkčních kultur dosáhla po 48 hodinách kultivace cca 300 mg/l, zatímco přítomnost produkčních laktokoků produkci tyraminu snížila. Po 48 hodinách kultivace nepřesáhla koncentrace tyraminu 80 mg/l. Použité kmeny laktokoků vykazovaly větší inhibiční účinky proti bakterii *Streptococcus thermophilus* PRI60 produkující histamin než proti bakterii *Enterococcus faecalis* EF37 produkující tyramin. Zejména nisin Z, produkovaný kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* VR84, způsobil usmrcení streptokoků. Kmen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CG27 byl účinnější než *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* EG46. Množství vyprodukovaného histaminu bez použití laktokoků činilo po 48 hodinách kultivace cca 200 mg/l, s přidavkem konkurenčních kultur klesl obsah histaminu při stejné kultivační době na 75 mg/l. Tato studie ukázala, že produkce bakteriocinů přidanými kulturami snížila množství biogenních aminů. Dále můžeme říci, že různé typy bakteriocinů mohou mít odlišné účinky na produkci biogenních aminů u dekarboxyláza pozitivních kmenů.

Autory Wu et al. [60] byl zkoumán vliv přidavku kultur *Lactobacillus plantarum* a *Zygosaccharomyces rouxii* během výroby čínského zelí. Byl sledován rozdíl produkce biogenních aminů u spontánně kvašeného zelí (bez přidaných kultur) a u zelí s přidavkem výše

uvedených kultur. Akumulace biogenních aminů putrescinu, kadaverinu a tyraminu byla sledována po celou dobu výroby zelí (8 dnů). U spontánního kvašení rostl obsah putrescinu s rostoucím časem fermentace. Nejvyšší množství putrescinu bylo zjištěno 4. den (45,9 mg/kg). Následně hladina putrescinu mírně klesala. Během celého kultivačního procesu s přidavkem kultur hladina putrescinu prudce klesala. Po 8 dnech kultivace byla úroveň putrescinu 13x nižší než u spontánní fermentace. Podobné výsledky byly získány i v případě dalších biogenních aminů kadaverinu a tyraminu. Tento výzkum ukazuje, že kultury *Lactobacillus plantarum* a *Zygosacharomyces rouxii* mohou při výrobě kysaného zelí snižovat obsah biogenních aminů.

Degradace histaminu halotolerantní bakterií *Staphylococcus carnosus* izolované z rybí omáčky byla zkoumána autory Zaman et al. [61]. Při této studii byl zkoumán vliv pH na růst a schopnost degradace histaminu této bakterie. Optimální růst této bakterie byl pozorován při pH 8. Hodnota pH také ovlivňovala degradační účinek. Největší degradace histaminu byla sledována v rozmezí pH 5-7. Při pH 6 byla degradace biogenního aminu nejvyšší, po 24 hodinách kultivace *S. carnosus* při 37 °C došlo ke snížení množství histaminu až o 32,5 %. Ostatní hodnoty pH podporovaly degradaci histaminu méně. Při pH 8 byla zjištěna míra degradace histaminu 5,3 % a při pH 9 pouze 1,2 %. Dále byl zkoumán vliv soli (NaCl) na růst a degradační schopnost *Staphylococcus carnosus*. Tato halotolerantní bakterie rostla jak v přítomnosti, tak i nepřítomnosti soli. Optimální růst byl zaznamenán při 9% koncentraci soli. Při 18% koncentraci soli sledovaný kmen bakterie stále rostl, avšak počet buněk byl znatelně menší. Největší míra degradace histaminu byla pozorována v prostředí s 9% koncentrací soli – bylo degradováno až 39,1 % histaminu. *Staphylococcus carnosus* vykazoval snížení množství histaminu také při koncentraci soli 18 %, a to o 22,1 %. Kromě pH a obsahu soli byla zkoumána teplota vhodná k degradaci. Bakterie rostly v rozmezí teplot 30-40 °C. Optimální teplota růstu byla 35 °C. Při teplotě 45 °C byl růst téměř zastaven. Nejvyšší degradační aktivita byla zjištěna při teplotě 40 °C, kdy bylo eliminováno 23,5 % histaminu. Závěrem lze říci, že *Staphylococcus carnosus* po celou dobu kultivace v podmínkách *in vitro* (5 dní) degradoval obsah histaminu. Hladina histaminu se mírně zvýšila od třetího dne kultivace, což mohlo být způsobeno přítomností dekarboxyláza pozitivních bakterií. Testovaný kmen *S. carnosus* můž být použit ke snížení histaminu během kvašení potravin s vyšším obsahem soli.

Autory Gardini et al. bylo [62] zkoumáno použití bakterie *Staphylococcus xylosus* jako startovací kultury do klobás a její vliv na obsah biogenních aminů. V tomto výzkumu byl použit jako startovací kultura kromě kmene *Staphylococcus xylosus* S81 ještě kmen *Lactobacillus sakei* G20 zajišťující tradiční sensorické vlastnosti klobás. Je známo, že tento kmen nemá dekarboxylázovou aktivitu a v důsledku toho není schopen tvořit biogenní aminy. Byly vytvořeny 3 kombinace vzorků: vzorek A (kontrolní) - do klobás nebyly přidány startovací kultury ani histamin, vzorek B - do klobás byl přidán histamin (150 mg/kg) a startovací kultury přidány nebyly, vzorek C - do klobás byl přidán histamin (150 mg/kg) i startovací kultury (*Staphylococcus xylosus* S81, *Lactobacillus sakei* G20). Vzorky zrály 21 dní a v průběhu zrání byly detekovány biogenní aminy. U vzorku A nebyl histamin detekován, což znamená, že přirozená mikroflóra klobás tento amin neprodukovala. Ve vzorku B došlo z počátku fermentace ke snížení obsahu histaminu (prvních 6 dní zrání), avšak po 21 dnech vzrostl jeho obsah na nejvyšší detekovanou koncentraci (241 mg/kg). U vzorku C byla hladina histaminu prvních 5 dní konstantní. Následně došlo ke zvýšení na maximální koncentraci histaminu (206 mg/kg). Další dny se obsah histaminu snižoval a na konci zrání byl zjištěn obsah této látky 113 mg/kg. Kromě histaminu byly klobásy podrobeny analýze také na putrescin a tyramin. Množství putrescinu bylo na konci zrání 3x vyšší u vzorku B (307 mg/kg) než u vzorku A (109 mg/kg). Ve vzorku C bylo množství putrescinu pouze 11 mg/kg. Nejvyšší detekované množství tyraminu na konci zrání bylo u vzorku B (523 mg/kg). Ve vzorku A byl obsah tyraminu 404 mg/kg a ve vzorku C 375 mg/kg. Z dosažených výsledků lze konstatovat, že přídavek kultury *Staphylococcus xylosus* S81 měl pozitivní vliv na obsah biogenních aminů – snížil jejich obsah.

Autory Garcia-Ruiz et al. [63] byl prováděn výzkum schopnosti bakterií mléčného kvašení degradovat ve víně biogenní aminy histamin, tyramin a putrescin. Celkem bylo použito 85 kmenů bakterií mléčného kvašení – *Oenococcus oeni* (42 kmenů), *Pediococcus parvulus* (7 kmenů), *Pediococcus pentosaceus* (4 kmeny), *Lactobacillus plantarum* (6 kmenů), *Lactobacillus hilgardii* (9 kmenů), *Lactobacillus zeae* (3 kmeny), *Lactobacillus casei* (7 kmenů), *Lactobacillus paracasei* (5 kmenů), *Leuconostoc mesenteroides* (2 kmeny). Z 85 testovaných kmenů bylo 25 % schopno degradovat histamin, 18 % tyramin a putrescin. K dalším studiím bylo vybráno 9 kmenů, které degradovaly ≥ 10 % některého z výše uvedených BA. Tyto kmeny byly schopné degradovat alespoň 2 ze 3 testovaných BA. Lze říci, že putrescin byl degradován ve větší míře než histamin a tyramin. Největší poten-

ciál pro degradaci BA měly kmeny *Lactobacillus* a *Pediococcus* (zejména *L. plantarum*, *L. casei*, *P. pentosaceus*). Bylo také zjištěno, že kmeny *Oenococcus oeni* nemají potenciál k degradaci biogenních aminů ve víně. Tato studie naznačuje, že bakterie mléčného kvašení vyskytující se ve víně mohou mít vliv na snížení produkce biogenních aminů.

Redukci biogenních aminů použitím vysokotlakého ošetření při výrobě sýrů se zabývali Calzada et al. [64]. Při zpracování byl použit hydrostatický tlak 400 a 600 MPa. Vysokotlaké ošetření bylo aplikováno na sýrech po dobu 5 minut 21. a 35. den zrání. Vlivem vysokého tlaku došlo ke snížení počtu dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů, a tím i ke snížení detekovaného množství BA. Pokles počtu mikroorganismů při ošetření tlakem 600 MPa byl podstatně výraznější než při aplikaci tlaku 400 MPa. První den zrání byl obsah biogenních aminů v sýrech pod detekčním limitem. Nicméně 21. den zrání bylo v neošetřených sýrech detekováno 371 mg/kg biogenních aminů, 35. den bylo stanovené značné množství vyprodukovaných BA (740 mg/kg) a až do 60. dne se celkové množství BA zvyšovalo až na hodnotu 1089 mg/kg. V sýrech ošetřených tlakem 400 MPa bylo celkové množství BA po 60 dnech zrání 728-794 mg/kg a v sýrech ošetřených tlakem 600 MPa to bylo ještě méně (377-656 mg/kg). Celkový obsah BA vzrostl při chladírenském skladování sýrů po 240 dnech až na koncentraci 3690 mg/kg v sýrech neošetřených, v sýrech ošetřených nižší hodnotou tlaku (400 MPa) bylo zjištěné množství BA zhruba o třetinu nižší (2022-3276 mg/kg) a v sýrech ošetřených tlakem 600 MPa byly po 240denním skladování detekovány biogenní aminy v méně jak třetinovém podílu (896-1011 mg/kg). Nejčastěji byly detekovány biogenní aminy tyramin, putrescin, kadaverin a tryptamin. Spermin a spermidin nebyly stanoveny v žádném z testovaných vzorků.

Snížením biogenních aminů pomocí bakterie *Lactobacillus plantarum* v masných výrobcích (klobásách z kapra) se zabýval Zhang et al. [65]. *Lactobacillus plantarum* ZY-40 byl získán z fermentovaných rybích výrobků. Během fermentace při výrobě rybích klobás byl sledován růst mikroorganismů, pH a přítomnost biogenních aminů. Byly připraveny 2 šarže výrobků - šarže A byla zaočkována kmenem *L. plantarum* TY-40, šarže B byla kontrolní, neobsahovala výše uvedený kmen. V šarži A byl během fermentace potlačen růst bakterií *Pseudomonas* a enterobakterií. Dále byl sledován počet kvasinek, který se u obou šarží téměř nelišil. Z tohoto poznatku lze vyvodit závěr, že *L. plantarum* TY-40 nepotlačoval růst kvasinek. Přidaný mikroorganismus způsobil rychlé okyselení klobás, čímž také potlačil růst určitých nežádoucích mikroorganismů. Hlavními aminy vytvořenými během fer-

mentace těchto rybích klobás byly putrescin, kadaverin a tyramin. *L. plantarum* TY-40 výrazně snížil obsah putrescinu a kadaverinu, a to až o 70 %, což koreluje se snížením počtu enterobakterií, které se pravděpodobně podílely na tvorbě většiny detekovaných aminů. Zjištěná množství tyraminu byla obdobná u šarže A i B, což naznačuje, že *L. plantarum* TY-40 zřejmě nebyl schopen inhibovat bakterie podílející se na tvorbě tyraminu. Závěrem lze říci, že *L. plantarum* TY-40 způsobil rychlé okyselení klobás, inhiboval růst nežádoucích bakterií a snížil akumulaci biogenních aminů putrescinu a kadaverinu.

Autory Kim et al. [66] byla zjištěna redukce obsahu biogenních aminů v sójové pastě pomocí gama záření. Byl sledován vliv obsahu soli a dávka gama záření během fermentace při teplotě 25 °C po dobu 12 týdnů. Sójová pasta byla připravena ve třech modifikacích s různými koncentracemi soli – 6, 8 a 12 %, kde pasta obsahující 12 % NaCl sloužila jako kontrola. Sójové pasty byly ozářeny třemi dávkami gama záření (5, 10 a 15 kGy). Důležitým faktorem pro růst dekarboxyláza pozitivních bakterií je pH. Výsledky ukázaly, že nižší koncentrace soli způsobila pokles pH. Ozáření snížení pH nezpůsobilo. Proto málo solené neozářené vzorky mohou mít optimální pH pro růst bakterií podílejících se na tvorbě BA. V sójové pastě byly detekovány BA putrescin, kadaverin, tryptamin, fenyethylamin, spermidin, histamin, tyramin, agmatin. U ozářených vzorků s nižším obsahem soli bylo detekováno vyšší množství biogenních aminů než u vzorků s vyšším obsahem soli. Také dávka záření ovlivnila bakterie produkující BA. Čím byla dávka gama záření vyšší, tím byla produkce BA nižší. Z této studie vyplývá, že gama záření může snížit množství BA v potravinách.

ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na zmapování kinetiky produkce biogenních aminů kmeny *L. plantarum* RIBM 2-89 a *L. curvatus* subsp. *curvatus* T3 v závislosti na vnějších faktorech. Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie byly sledovány změny obsahu biogenních aminů v závislosti na přidavku nisinu ve 3 různých koncentracích (14,3 µg/ml, 35,7 µg/ml a 71,5 µg/ml), přidavku nisinu k rostoucím buňkám v daných časových intervalech a teploty kultivace (30 ± 1 °C a 12 ± 1 °C).

Na základě této studie lze konstatovat tyto výsledky:

- Oba testované kmeny produkovaly biogenní aminy tyramin a spermin.
- Nejvyšší obsah tyraminu byl detekován u kmene *L. plantarum* RIBM 2-89 po 72 hodinách kultivace při teplotě 30 °C v bujónu bez přidavku nisinu (440,6 mg/l).
- Kultivační teplota 12 °C zpomalovala růst mikroorganismů a v důsledku toho byla zjištěna nižší produkce tyraminu i sperminu.
- Z většiny výsledků je patrné, že s přidavkem nisinu o vyšší koncentraci došlo ke snížení obsahu biogenních aminů v bujónech po kultivaci sledovaných bakterií.
- Vliv přidavku nisinu v různých časových intervalech neměl jednoznačný vliv na obsah biogenních aminů v kultivačním médiu.
- Nejvyšší obsah sperminu byl detekován u kmene *L. curvatus* subsp. *curvatus* T3 na počátku kultivace při 30 °C v bujónu bez přidavku nisinu (144,5 mg/l).
- Během kultivace při teplotě 12 °C byl stanoven nejvyšší obsah sperminu u kmene *L. curvatus* subsp. *curvatus* T3 v bujónu bez přidavku nisinu na počátku kultivace.

Je důležité sledovat množství biogenních aminů v potravinách a faktory ovlivňující jejich vznik, jelikož mohou sloužit jako indikátory kvality potravin.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] LAHTINEN, S., OUWEHAND, A. C., SALMINEN, S., WRIGHT, A. V. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 4th ed. Taylor & Francis Group, 2012, s. 798, ISBN: 978-1-4398-3677-4.
- [2] SALMINEN, S., WRIGHT, A., OUWEHAND, A. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3th ed. Marcel Dekker, 2004, s. 656, ISBN: 0-8247-5332-1.
- [3] LEROY, F., VUYST, L. *Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry*. Trends in Food Science & Technology, 2004, vol. 15, s. 67-78.
- [4] LEROY, F., VUYST, L. *Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification and food application*. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2007, vol. 13, iss. 4, s. 194-199.
- [5] CHEN, H., HOOVER, D. G. *Bacteriocins and their Food Applications*. Food Science and Food Safety, 2003, vol. 2, iss. 3, s. 82-100.
- [6] CLEVELAND, J., MONTVILLE, T. J., NES, I. F., CHIKINDAS, M. L. *Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation*. International Journal of Food Microbiology, 2001, vol. 7, iss.1, s. 1-20.
- [7] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. 1. vyd. OSSIS, 1999, 368 s. ISBN 80-902-3912-9.
- [8] SILLA SANTOS, M. H. *Biogenic amines: their importance in foods*. International Journal of Food Microbiology, 1996, vol. 29, iss. 2-3, s. 213-231.
- [9] SHALABY, A. R. *Significance of biogenic amines to food safety and human health*. Food Research International, 1996, vol. 29, iss. 7, s. 675-690.
- [10] MARTH, E. H., STEELE, J. L. *Applied dairy microbiology*. 2nd ed. Marcel Dekker New York, 2001, s. 759, ISBN: 0-8247-0536-X.
- [11] VUYST, L., VANDAMME, E. J. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*. Springer Science Business Media New York, 1994, s. 539, ISBN: 978-1-4613-6146-6.

- [12] MOZZI, F., RAYA, R. R., VIGNOLO, G. M. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel applications*. Wiley-Blackwell, 2010, s. 408, ISBN: 978-0-8138-1583-1.
- [13] ADAMS, M. R., MOSS, M. O. *Food microbiology*. 3rd ed. The Royal Society of Chemistry, 2008, s. 477, ISBN: 978-0-85404-284-5.
- [14] RAY, B., BHUNIA, A. *Fundamental food microbiology*. 4th ed. CRC Press, 2007, s. 535, ISBN: 978-0-8493-7529-3.
- [15] SALMINEN, S., WRIGHT, A., OUWEHAND, A. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3rd ed. Marcel Dekker New York, 2005, s. 630, ISBN: 0-8247-5332-1.
- [16] MOUSAVI, Z. E., MOUSAVI, S. M., RAZAVI, S. H., EMAM-DJOMEH, Z., KIANI, H. *Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, vol. 27, iss. 1, s. 123-128.
- [17] KLABAN, V. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. vyd. Praha: Galén, 2005, s. 654, ISBN: 80-7262-341-9.
- [18] GÖRNER, F., VALÍK, Ľ. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, s. 528, ISBN 80-967-0649-7.
- [19] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2006, s. 270, ISBN: 80-210-4207-9.
- [20] *Streptococcus pneumoniae* [online]. 2007 [cit. 2015-02-07]. Dostupné z: https://bioweb.uwlax.edu/bio203/f2013/schaefer_rya2/references.htm
- [21] *Lactococcus lactis* [online]. [cit. 2015-02-07]. Dostupné z: <http://bioinfo.bact.wisc.edu/themicrobialworld/LactococcusHome.html>
- [22] *Enterococcus faecalis* [online]. 2011 [cit. 2015-02-07]. Dostupné z: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Enterococcus_faecalis
- [23] MODI, H. A. *Microbial spoilage of foods*. Aavishkar Publishers, 2009, s. 193, ISBN: 978-81-7910-285-5.

- [24] *Leuconostoc mesenteroides* [online]. [cit. 2015-02-07]. Dostupné z: http://www.visualphotos.com/image/1x3745842/leuconostoc_mesenteroides_leuconostoc
- [25] *Pediococcus* [online]. 2010 [cit. 2015-02-07]. Dostupné z: http://lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Pediococcus&lang=5
- [26] *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* [online]. 2010 [cit. 2015-02-07]. Dostupné z: http://www.probiotic-cn.com/Lactobacillus_delbrueckii_subsp_lactis.html
- [27] *Bifidobacterium bifidum* [online]. [cit. 2015-02-07]. Dostupné z: <http://imgarcade.com/1/bifidobacterium-bifidum/>
- [28] SCHREZENMEIR, J., VRESE, M. *Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches a definition*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2001, vol. 73, s. 361-364.
- [29] FULLER, R. *Probiotics in human medicine*. Gut, 1991, vol. 32, s. 439-442.
- [30] COLLINS, M. D., GIBSON, G. R. *Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut*. The American Journal of Clinical Nutrition, 1999, vol. 69, s. 1052-1057.
- [31] GIBSON, G. R., WILLIAMS, CH. M. *Functional foods*. Woodhead Publishing Limited, 2000, s. 374, ISBN: 0-8493-0851-8.
- [32] SAARELA, M., MOGENSEN, G., FONDEN, R., MATTO, J., MATTILASANDHOLM, T. *Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties*. Journal of Biotechnology, 2000, vol. 84, iss. 3, s. 197-215.
- [33] FERNANDES, R. *Microbiology handbook: dairy products*. Leatherhead Publishing, 2009, s. 175, ISBN: 978-1-905224-62-3.
- [34] FOX, P. F., McSWEENEY, P. L. H., COGAN, T. M., GUINEE, T. P. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. 3rd ed., Amsterdam: Elsevier, 2004, s. 199-213. ISBN: 0-1226-3653-82.
- [35] HUTKINS, R., W. *Microbiology and Technology of Fermented Food*. Blackwell Publishing, 2006, s. 488, ISBN: 978-0-8138-0018-9.

- [36] HUGAS, M., MONFORT, J. *Bacterial starter cultures for meat fermentation*. 1996, Food Chemistry, vol. 59, iss. 4, s. 547-554.
- [37] LEROY, F., VERLUYTEN, J., VUYST, L. *Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation*. International Journal of Food Microbiology, 2006, vol. 106, iss. 3, s. 270-285.
- [38] DAVIDSON, P. M., SOFOS, J. N., BRANEN, A. L. *Antimicrobials in food*. 3rd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005, s. 706, ISBN: 0-8247-4037-8.
- [39] JAY, J. M., LOESSNER, M. J., GOLDEN, D. A. *Modern food microbiology*. 7th ed. New York Springer Science+Business Media, 2005, s. 782, ISBN: 0-387-23180-3.
- [40] REEVES, P. *The bacteriocins*. Bacteriology reviews, 1965, vol. 29, iss. 1, s. 24-45.
- [41] GARNEAU, S., MARTIN, N. I., VEDRAS, J. C. *Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. Biochimie, 2002, vol. 84, s. 577-592.
- [42] GILLOR, O., NIGRO, L. M., RILEY, A. M. *Genetically Engineered Bacteriocins and their Potential as the Next Generation of Antimicrobials*. Current Pharmaceutical Design, 2005, vol. 11, iss. 8, s. 1067-1075.
- [43] BRÖTZ, H., SAHL, H. G. *New insights into the mechanism of action of lantibiotics – diverse biological effects by binding to the same molecular target*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2000, vol. 46, s. 1-6.
- [44] CAPLICE, E., FITZGERALD, G. F. *Food fermentation: role of microorganism in food production and preservation*, International Journal of Food Microbiology, 1999, vol. 50, s. 131-149.
- [45] SVOBODA, J. *Organická chemie I*. Vydavatelství VŠCHT, Praha 2005, ISBN: 80-7080-561-7.
- [46] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*. OSSIS Tábor, 2009, ISBN: 80-902391-4-5.
- [47] SMĚLÁ, D. a kol. *Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování*. Chemické listy, 2004, č. 98, s. 432-437.
- [48] KOHAJDOVÁ, Z., KAROVIČOVÁ, J., GREIF, G. *Biogénne aminy v potravinách*. Potravinárstvo, 1(2)/2008, ISSN: 1337-0960, s. 30-49.

- [49] SPANNO, G., RUSSO, P., LONVAUD-FUNEL, A., LUCAS, P. et al. *Biogenic amines in fermented foods*. European Journal of Clinical Nutrition, 2010, vol. 64, s. 95-100.
- [50] LONVAUD-FUNEL, A. *Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria*. FEMS Microbiology Letters, 2001, vol. 199, iss. 1, s. 9-13.
- [51] KALACĚ, P., KRĚŽEK, M. *A Review of Biogenic Amines and Polyamines in Beer*. Journal of The Institute of Brewing, 2009, vol. 109, iss. 2, s. 123-128.
- [52] NOVELLA-RODRĚGUEZ, S., VECIANA-NOGUĚS, M. T., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M. C. *Distribution of Biogenic Amines and Polyamines in Cheese*. Journal of Food Science, 2003, vol. 68, iss. 3, s. 750-755.
- [53] LOIZZO, M. R., MENICHINI, F., PICCI, N., PUOCI, F., SPIZZIRRI, G., RESTUCCIA, D. *Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese*. Trends in Food Science & Technology, 2012, s. 1-18.
- [54] STADNIK, J., DOLATOWSKI, Z. J., *Biogenic amines in meat and fermented meat products*. Acta Scientiarum Polonorum, 2009, vol. 9, iss. 3, s. 251-263.
- [55] JANDOVĚ, B., KOTOUĚKOVĚ, L. *Praktikum z mikrobiologie*, 1. vyd. Brno: Vydavatelství MU, 1996, s. 67, ISBN: 80-210-1374-5.
- [56] DADĚKOVĚ, E., KRĚŽEK, M., PELIKĚNOVĚ, T. *Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC)*. Food Chemistry, 2009, vol. 116, iss. 1, s. 365-370.
- [57] PEGG, A. E. *The function of spermine*. International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 2014, vol. 66, iss. 1, s. 8-18.
- [58] EVROPSKĚ UNIE. *NařĚzení Komise (EU) ě. 1129/2011 ze dne 11. Listopadu 2011, kterým se mĚní přĚloha II nařĚzení EvropskĚho parlamentu a Rady (ES) ě. 1333/2008 vytvořením seznamu potravinĚrskĚch přĚdatnĚch lĚtek Unie (Text s vĚznamem pro EHP)*. ŬřednĚ vĚstnĚk EvropskĚ Unie, 12. listopadu 2011.
- [59] TABANELLI, G., MONTANARI, CH., BARGOSII, E., LANCIOTTI, R. et al. *Control of tyramine and histamine accumulation by lactic acid bacteria using bacteriocin forming lactococci*. International Journal of Food Microbiology, 2014, vol. 190, s. 14-23.

- [60] WU, CH., ZHENG, J., HUANG, J., ZHOU, R. *Reduced nitrite and biogenic amine concentrations and improved flavor components of Chinese sauerkraut via co-culture of *Lactobacillus plantarum* and *Zygosaccharomyces rouxii**. *Annals of Microbiology*, 2014, vol. 64, iss. 2, s. 847-857.
- [61] ZAMAN, M. Z., BAKAR, F. A., SELAMAT, J., BAKAR, J., ANG, S. S., CHONG, CH. W. *Degradation of histamine by the halotolerant *Staphylococcus carnosus* FS19 isolate obtained from fish sauce*. *Food Control*, 2014, vol. 40, s. 58-63.
- [62] GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CRUDELE, M. A., PAPARELLA, A., SUZZI, G. *Use of *Staphylococcus xylosus* as a starter culture in dried sausages: effect on the biogenic amine content*. *Meat Science*, 2002, vol. 61, s. 275-283.
- [63] GARCIA-RUIZ, A., GONZÁLEZ-ROMPINELLI, E. M., BARTOLOMÉ, B., MORENO-ARRIBAS, M. V. *Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines*. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, vol. 148, s. 115-120.
- [64] CALZADA, J., OLMO, A., PICÓN, A., GAYA, P., NUNEZ, M. *Reducing biogenic-amine-producing bacteria, decarboxylase activity, and biogenic amines in raw milk cheese by high-pressure treatments*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, vol. 79, iss. 4, s. 1277-1283.
- [65] ZHANG, Q., LIN, S., NIE, X. *Reduction of biogenic amine accumulation in silver carp sausage by an amine-negative *Lactobacillus plantarum**. *Food Control*, 2013, vol. 32, iss. 2, s. 496-500.
- [66] KIM, J. H., KIMM, D. H., AHN, H. J., PARK, H. J., BYUN, M. W. *Reduction of the biogenic amine contents in low salt-fermented soybean paste by gamma irradiation*. *Food Control*, 2005, vol. 16, iss.1, s. 43-49.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BMK Bakterie mléčného kvašení.

Tzv. Takzvané.

MO Mikroorganizmy.

BA Biogenní aminy.

NaCl Chlorid sodný.

AMK Aminokyseliny.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> [20].....	14
Obr. 2. <i>Lactococcus lactis</i> [21].....	15
Obr. 3. <i>Enterococcus faecalis</i> [22]	15
Obr. 4. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> [24]	16
Obr. 5. <i>Pediococcus</i> [25]	16
Obr. 6. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> [26].....	17
Obr. 7. <i>Bifidobacterium bifidum</i> [27]	18
Obr. 8. Sekvence aminokyselin lantibiotik typu A a B [43]	26
Obr. 9. Struktura aminů [45].....	31
Obr. 10. Vznik aminů [45].....	31
Obr. 11. Schéma experimentu.....	44
Obr. 12. Vliv přídavku nisinu v čase 0 na kinetiku produkce tyraminu u kmene <i>L. plantarum</i> během kultivace při 30 °C.	52
Obr. 13. Vliv přídavku nisinu v čase 2 hodiny na kinetiku produkce tyraminu u kmene <i>L. plantarum</i> během kultivace při 30 °C.	53
Obr. 14. Vliv přídavku nisinu v čase 12 hodin na kinetiku produkce tyraminu u kmene <i>L. plantarum</i> během kultivace při 30 °C.	54
Obr. 15. Vliv přídavku nisinu v čase 24 hodin na kinetiku produkce tyraminu u kmene <i>L. plantarum</i> během kultivace při 30 °C.	55
Obr. 16. Vliv přídavku nisinu na počátku kultivace na kinetiku produkce tyraminu u kmene <i>L. plantarum</i> během kultivace při 12 °C.	56
Obr. 17. Vliv přídavku nisinu 7. den kultivace na kinetiku produkce tyraminu u kmene <i>L. plantarum</i> během kultivace při 12 °C.	57
Obr. 18. Vliv přídavku nisinu 11. den kultivace na kinetiku produkce tyraminu u kmene <i>L. plantarum</i> během kultivace při 12 °C.	58
Obr. 19. Vliv přídavku nisinu v čase 0 na kinetiku produkce sperminu u kmene <i>L. plantarum</i> během kultivace při 30 °C.	59
Obr. 20. Vliv přídavku nisinu v čase 5 hodin na kinetiku produkce sperminu u kmene <i>L. plantarum</i> během kultivace při 30 °C.	60
Obr. 21. Vliv přídavku nisinu v čase 24 hodin na kinetiku produkce sperminu u kmene <i>L. plantarum</i> během kultivace při 30 °C.	60

Obr. 22. Vliv přídavku nisinu na počátku kultivace na kinetiku produkce sperminu u kmene <i>L. plantarum</i> během kultivace při 12 °C.	61
Obr. 23. Vliv přídavku nisinu 7. den kultivace na kinetiku produkce sperminu u kmene <i>L. plantarum</i> během kultivace při 12 °C	62
Obr. 24. Vliv přídavku nisinu 11. den kultivace na kinetiku produkce sperminu u kmene <i>L. plantarum</i> během kultivace při 12 °C	63
Obr. 25. Vliv přídavku nisinu v čase 0 na kinetiku produkce tyraminu u kmene <i>Lactobacillus curvatus</i> během kultivace při 30 °C.	65
Obr. 26. Vliv přídavku nisinu v čase 12 hodin na kinetiku produkce tyraminu u kmene <i>Lactobacillus curvatus</i> během kultivace při 30 °C.....	66
Obr. 27. Vliv přídavku nisinu v čase 24 hodin na kinetiku produkce tyraminu u kmene <i>Lactobacillus curvatus</i> během kultivace při 30 °C.....	67
Obr. 28. Vliv přídavku nisinu na počátku kultivace na kinetiku produkce tyraminu u kmene <i>Lactobacillus curvatus</i> během kultivace při 12 °C.....	68
Obr. 29. Vliv přídavku nisinu 7. den kultivace na kinetiku produkce tyraminu u kmene <i>Lactobacillus curvatus</i> během kultivace při 12 °C.....	69
Obr. 30. Vliv přídavku nisinu 11. den kultivace na kinetiku produkce tyraminu u kmene <i>Lactobacillus curvatus</i> během kultivace při 12 °C.....	69
Obr. 31. Vliv přídavku nisinu v čase 0 na kinetiku produkce sperminu u kmene <i>Lactobacillus curvatus</i> během kultivace při 30 °C.	71
Obr. 32. Vliv přídavku nisinu v čase 5 hodin na kinetiku produkce sperminu u kmene <i>Lactobacillus curvatus</i> během kultivace při 30 °C.	72
Obr. 33. Vliv přídavku nisinu v čase 24 hodin na kinetiku produkce sperminu u kmene <i>Lactobacillus curvatus</i> během kultivace při 30 °C.....	72
Obr. 34. Vliv přídavku nisinu na počátku kultivace na kinetiku produkce sperminu u kmene <i>Lactobacillus curvatus</i> během kultivace při 12 °C.....	73
Obr. 35. Vliv přídavku nisinu 7. den kultivace na kinetiku produkce sperminu u kmene <i>Lactobacillus curvatus</i> během kultivace při 12 °C.....	74
Obr. 36. Vliv přídavku nisinu 11. den kultivace na kinetiku produkce sperminu u kmene <i>Lactobacillus curvatus</i> během kultivace při 12 °C.....	75

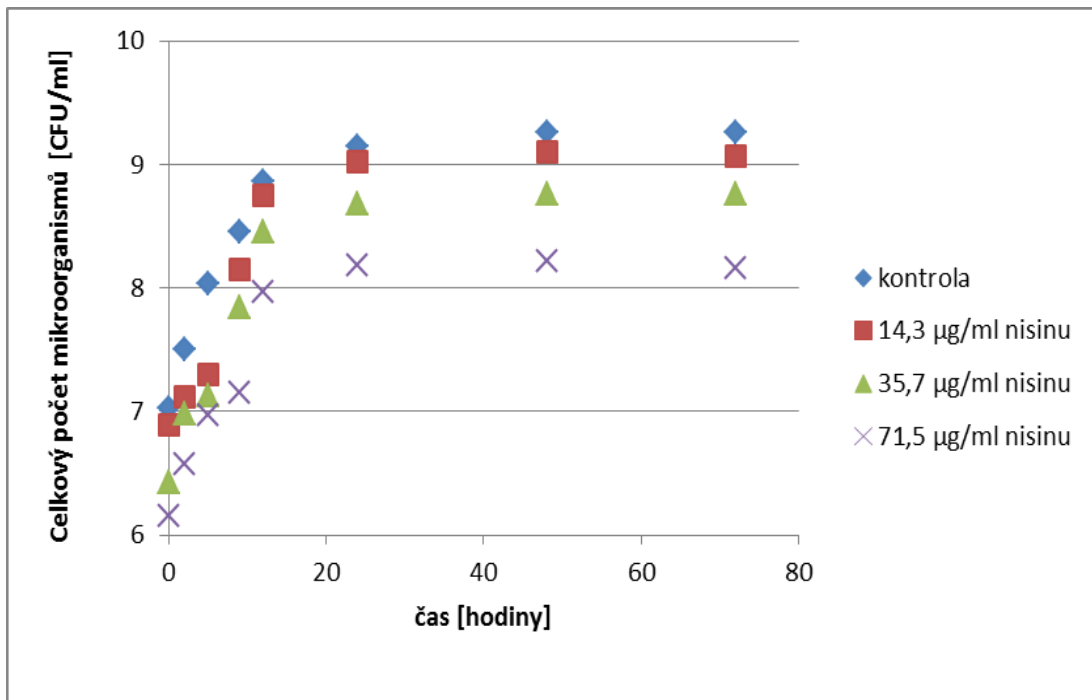
SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Bakterie mléčného kvašení ve fermentovaných produktech [3].....	24
Tabulka 2: Prekurzory biogenních aminů [45]	33
Tabulka 3: Rozdělení biogenních aminů [47].....	34
Tabulka 4: Významné mikroorganismy produkující biogenní aminy [7].....	38
Tabulka 5: Použité kmeny mikroorganismů.....	41
Tabulka 6: Průměr inhibičních zón při aplikaci nisinu v 5 koncentracích na kmeny BMK izolované z piva zjištěný pomocí difúzní jamkové metody	47
Tabulka 7: Průměr inhibičních zón při aplikaci nisinu v 5 koncentracích na kmeny BMK izolované ze sýrů zjištěný pomocí difúzní jamkové metody.....	48
Tabulka 8: Průměr inhibičních zón při aplikaci nisinu v 5 koncentracích na kmeny BMK izolované z piva zjištěný pomocí difúzní diskové metody.....	48
Tabulka 9: Průměr inhibičních zón při aplikaci nisinu v 5 koncentracích na kmeny BMK izolované ze sýrů zjištěný pomocí difúzní diskové metody	49
Tabulka 10: Produkce biogenních aminů [mg/l] u analyzovaných kmenů BMK.....	50
Tabulka 11: Produkce biogenních aminů [mg/l] analyzovaných kmenů s přídavkem nisinu	51

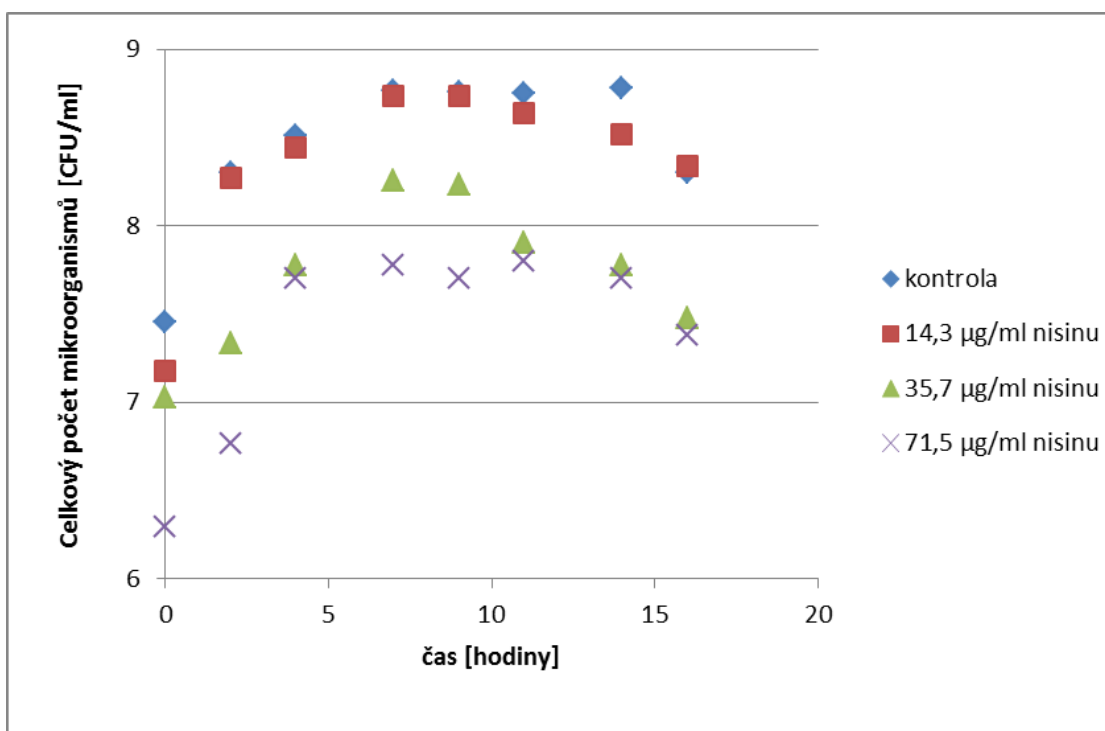
SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: Růstové křivky mikroorganismů

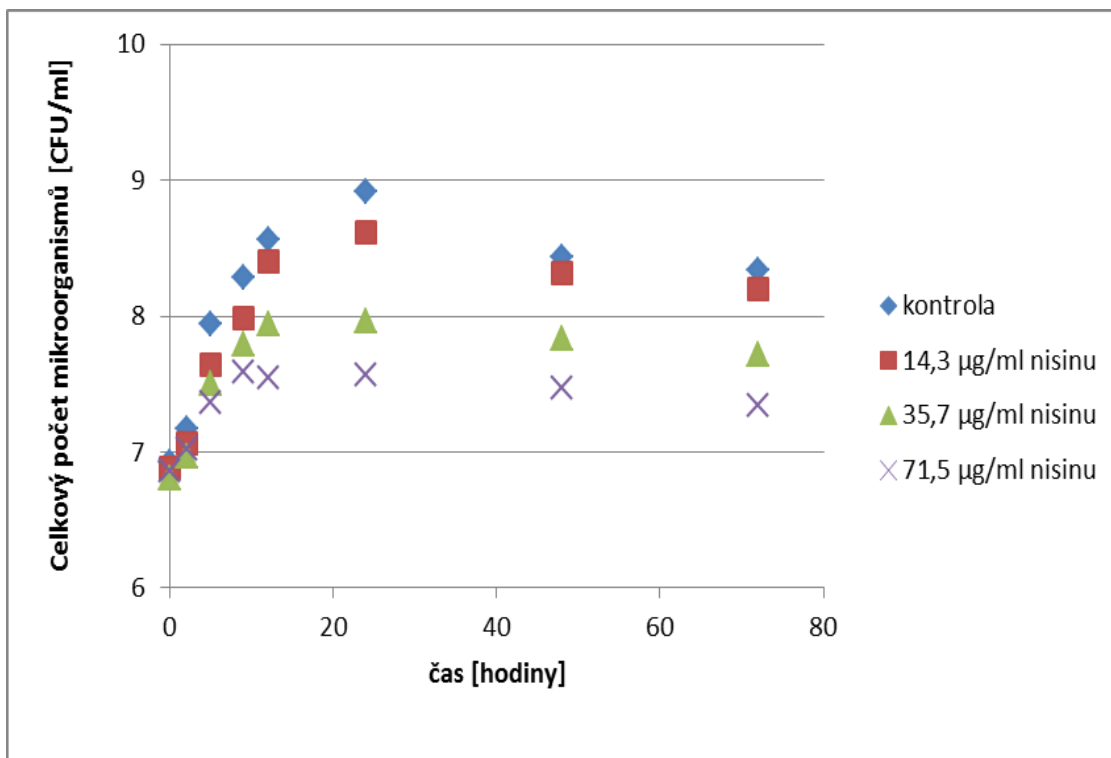
PŘÍLOHA PI: RŮSTOVÉ KŘIVKY MIKROORGANIZMŮ



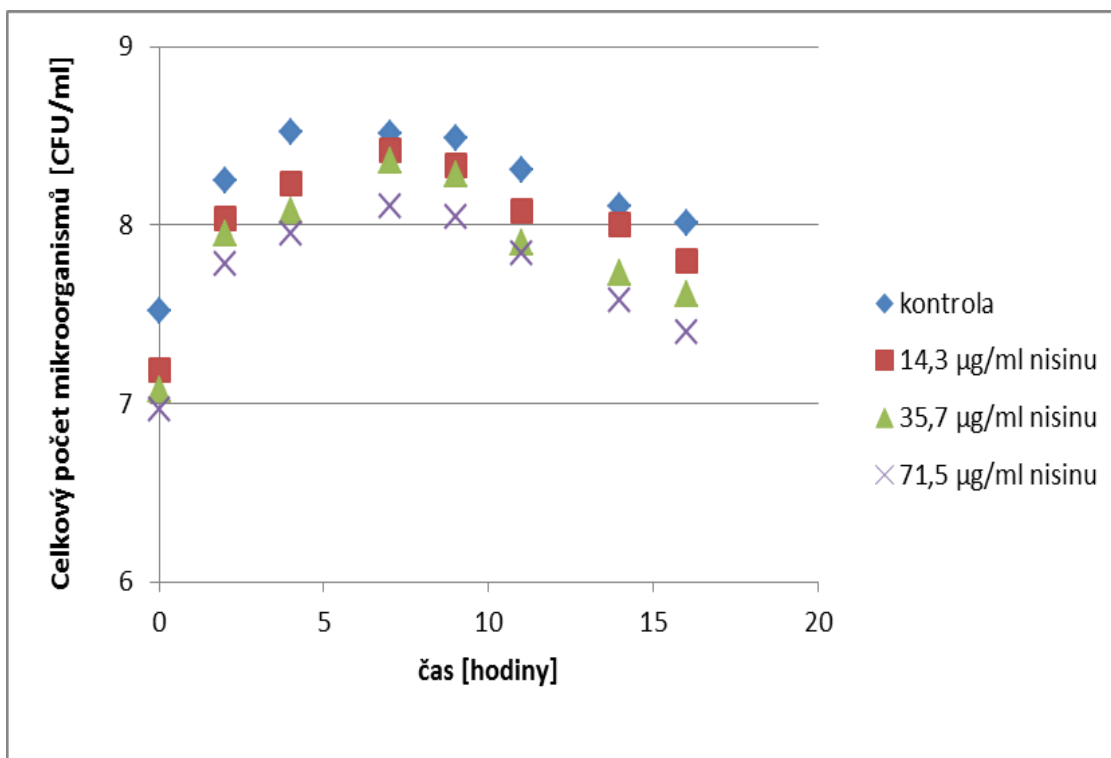
Růstová křivka u kmene *L. plantarum* během kultivace při 30 °C



Růstová křivka u kmene *L. plantarum* během kultivace při 12 °C



Růstová křivka u kmene *L. curvatus* během kultivace při 30 °C



Růstová křivka u kmene *L. curvatus* během kultivace při 12 °C