

Inhibiční působení protektivních kultur na vybrané bakterie mléčného kvašení s dekarboxylázovou aktivitou

Bc. Ivana Zicháčková

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. Ivana Zicháčková**
Osobní číslo: **T13467**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Inhibiční působení protektivních kultur na vybrané bakterie mléčného kvašení s dekarboxylázovou aktivitou**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika bakterií mléčného kvašení.
2. Inhibiční látky produkované v potravinářství.
3. Protektivní kultury.
4. Produkce biogenních aminů.

II. Praktická část

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

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] LACROIX, Edited by Christophe. Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation. Oxford: Woodhead Publishing, 2011. ISBN 978-085-7090-522.

[2] SALMINEN, Seppo, Atte von WRIGHT a Arthur OUWEHAND. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. 3rd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, c2004, 633 p. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 139. ISBN 08-247-5332-1.

[3] HALÁSZ, Anna, Ágnes BARÁTH, Livia SIMON-SARKADI a Wilhelm HOLZAPFEL. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. Trends in Food Science. 1994, vol. 5, issue 2, s. 42-49. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0924-2244\(94\)90070-1](http://dx.doi.org/10.1016/0924-2244(94)90070-1).

[4] MESSENS, Winy a Luc DE VUYST. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs a review. International Journal of Food Microbiology. 2002, vol. 72, 1-2, s. 31-43. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00611-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160501006110>

[5] CAPLICE, E. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology. vol. 50, 1-2, s. 131-149. DOI: 10.1016/S0168-1605(99)00082-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160599000823>.

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: Zicháčková Ivana

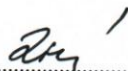
Obor: Technologie potravin

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 20. 4. 2015


.....

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

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

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

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

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

- (3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).
- ³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:
- (1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odírá-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 přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá sledováním inhibičního působení protektivních kultur na mikroorganismy schopné produkovat biogenní aminy (s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou). Sledování těchto mechanismů je se zaměřením na vybrané bakterie mléčného kvašení.

Teoretická část popisuje vybrané rody bakterií mléčného kvašení, jejich stručnou charakteristiku a metabolismus laktózy. Dále jsou popsány přírodní a mikroorganismy produkované inhibiční látky, požadavky a průmyslové využití protektivních kultur a nakonec charakteristika, producenti a biologické účinky biogenních aminů.

V praktické části této práce bylo zmapováno inhibiční působení protektivních mikroorganismů na dekarboxyláza pozitivní bakterie metodou agar-well diffusion test. V další části experimentu byla sledována kinetika produkce biogenních aminů v podmínkách *in vitro* u kmene *Lactobacillus plantarum* za zvyšujícího se přídatku protektivní kultury *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* nebo jeho metabolitů v čase. Vzniklé biogenní aminy byly stanoveny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s pre-kolonovou derivatizací danzylchloridem (DCI) a UV/VIS detekcí.

Klíčová slova: bakterie mléčného kvašení, mikroorganismus, protektivní kultury, inhibice, bakteriocin, biogenní aminy

ABSTRACT

This work deals with monitoring the inhibitory effect of protective cultures for microorganisms which can produce biogenic amines (with positive decarboxylase activity). Watching these mechanisms is specialization on chosen lactic acid bacteria.

The theoretical part describes genera of lactic acid bacteria, their brief characterization and metabolism of lactose. The following describes the inhibitory substances produced by microorganisms and from nature, the requirements and industrial use of protective cultures and finally characteristic, producers and biological effects of biogenic amines.

In the practical part of this work was monitored inhibitory effect of protective microorganism to bacteria with decarboxylase activity using agar-well diffusion test. In the next part of the experiment was observed kinetics of production of biogenic amines *in vitro* on strain *Lactobacillus plantarum* with increasing addition in time of protective cultures *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* or their relevant metabolites (supernatants). The resulting biogenic amines were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with pre-column derivatization of dansyl-chloride (DCI) and UV / VIS detection.

Keywords: lactic acid bacteria, microorganisms, the protective culture, inhibition, biogenic amines, bacteriocin

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc. RNDr. Leoně Buňkové Ph.D., za čas, ochotu, cenné rady, připomínky a materiály, které mi při vzniku práce poskytla.

Dále mé poděkování patří doc. Ing. Františku Buňkovi Ph.D., za pomoc při zpracování a vyhodnocení dosažených výsledků a také Ing. Khatantuul Pudevдорj a Ing. Ludmile Zálešákové za pomoc a rady při měření praktické části této diplomové práce.

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

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 CHARAKTERISTIKA BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	13
1.1 TAXONOMIE A KLASIFIKACE BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	13
1.2 VÝSKYT A VÝZNAM BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	14
1.3 METABOLIZMUS SACHARIDŮ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	15
1.4 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH RODŮ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	17
1.4.1 Rod <i>Lactobacillus</i>	17
1.4.2 Rod <i>Lactococcus</i>	18
1.4.3 Rod <i>Streptococcus</i>	18
1.4.4 Rod <i>Enterococcus</i>	19
1.4.5 Rod <i>Leuconostoc</i>	19
2 INHIBIČNÍ LÁTKY PRODUKOVANÉ POTRAVINÁŘSKY VÝZNAMNÝMI MIKROORGANIZMY	21
2.1 PŘÍRODNÍ INHIBIČNÍ LÁTKY	21
2.1.1 Mléko	22
2.1.2 Vežce	22
2.1.3 Rostlinné materiály	23
2.2 INHIBIČNÍ LÁTKY PRODUKOVANÉ MIKROORGANIZMY	23
2.2.1 Nisin	26
2.2.2 Lacticiny.....	28
2.2.3 Lactococciny	28
2.2.4 Enterociny	29
2.3 PRODUCENTI INHIBIČNÍCH LÁTEK A VYUŽITÍ V POTRAVINÁŘSTVÍ	29
3 PROTEKTIVNÍ KULTURY	31
3.1 CHARAKTERISTIKA A POŽADAVKY NA PROTEKTIVNÍ KULTURY	31
3.2 APLIKACE PROTEKTIVNÍCH KULTUR	32
3.3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PRODUKCI ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK A MOŽNOSTI MODIFIKACE	33
4 PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ	36
4.1 VZNIK A VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ.....	36
4.2 MIKROORGANIZMY PRODUKUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY	37
4.3 BIOLOGICKÉ ÚČINKY BIOGENNÍCH AMINŮ	39
II PRAKTICKÁ ČÁST	40
5 CÍL PRÁCE	41
6 MATERIÁL A METODIKA	42
6.1 POUŽITÉ INHIBIČNÍ BAKTERIÁLNÍ KULTURY	42
6.2 POUŽITÉ DEKARBOXYLÁZA POZITIVNÍ BAKTERIÁLNÍ KULTURY	43
6.3 KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	45
6.4 METODIKA EXPERIMENTU	46
6.4.1 Agar-well diffusion test.....	46
6.4.2 Sledování kinetiky tvorby biogenních aminů	47

6.4.2.1	Stanovení produkce biogenních aminů.....	50
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	52
7.1	INHIBIČNÍ PŮSOBNÍ PROTEKTIVNÍCH KULTUR NA VYBRANÉ BMK PRODUKUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY.....	52
7.2	SLEDOVÁNÍ KINETIKY PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ ZA ZVYŠUJÍCÍHO SE PŘÍDAVKU ANTIMIKROBIÁLNÍHO KMENE ČI JEHO METABOLITŮ	59
7.2.1	Produkce sperminu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89 za přídavku inhibiční kultury nebo supernatantu <i>Lactococcus lactis</i> CCDM 686	59
7.2.2	Produkce sperminu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89 za přídavku inhibiční kultury nebo supernatantu <i>Lactococcus lactis</i> CCDM 689	62
7.2.3	Produkce tyraminu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89 za přídavku inhibiční kultury nebo supernatantu <i>Lactococcus lactis</i> CCDM 686	65
7.2.4	Produkce tyraminu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89 za přídavku inhibiční kultury nebo supernatantu <i>Lactococcus lactis</i> CCDM 689	68
7.3	DISKUZE.....	71
	ZÁVĚR	76
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	78
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	85
	SEZNAM OBRÁZKŮ	86
	SEZNAM TABULEK.....	88
	SEZNAM PŘÍLOH.....	89

ÚVOD

Skupina bakterií mléčného kvašení představuje heterogenní skupinu mikroorganismů, vyskytující se na rozmanitých stanovištích, od střevního traktu teplokrevných živočichů, přes životní prostředí až po potraviny. Řada z těchto mikroorganismů plní důležité technologické funkce při výrobě potravin, jako součást startovacích kultur. Využívány jsou především jejich metabolity k dosažení požadovaných sensorických a texturních vlastností, prodloužení trvanlivosti, zdravotní nezávadnosti či zabránění pomnožení patogenní a kontaminující mikroflóry. Ovšem ne všechny bakterie mléčného kvašení mají jen pozitivní vlastnosti. Některé druhy nebo kmeny mohou být nechtěnými kontaminanty při výrobě potravin, součástí takzvaných non-starterových kultur, podílet se na kažení potravin či disponují pozitivní dekarboxylázovou aktivitu s následnou produkcí biogenních aminů.

Biogenní aminy jsou skupina látek přírodního původu, které vykazují biologickou aktivitu a pokud jsou přijímány ve vysokých dávkách, mohou mít negativní vliv na lidské zdraví. Nejvyšší obsah bývá zpravidla u fermentovaných potravin, jako jsou například fermentované mléčné a masné výrobky, pivo, víno a u ryb. Před použitím je proto důležité kultury otestovat na dekarboxylázovou aktivitu.

Spotřebitelé preferují čerstvé a nezávadné potraviny. V posledních letech většina konzumentů zaujímá negativní postoj při použití chemických látek k výrobě a ošetření potravin. Použití vybraných startovacích kultur, či mikroorganismů produkující bakteriociny je proto jedním z nejperspektivnějších opatření pro splnění těchto požadavků a k prevenci či zabránění (nebo alespoň zpomalení) tvorby biogenních aminů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Bakterie mléčného kvašení je označení pro funkčně související skupinu mikroorganismů, jež mají nezastupitelný význam při výrobě potravin a nápojů. Bakterie mléčného kvašení (BMK) souhrnně tvoří skupinu grampozitivních bakterií s podobnými morfolo­gickými, fyziologickými, metabolickými a ekologickými vlastnostmi. Obecně se jedná o nesporulující, acidotolerantní, kataláza negativní, nepohyblivé, fakultativně anaerobní tyčinky a koky (samostatně, v párech nebo řetězcích), které produkují kyselinu mléčnou jako hlavní konečný produkt v průběhu fermentace sacharidů. Většina BMK je zařazována mezi mezofilní mikroorganismy, ale jsou schopné růst i v rozmezí teplot od 10 do 45 °C. Pro svůj růst vyžadují nutričně bohatá média obsahující sacharidy, aminokyseliny, peptidy, nukleotidové báze, mastné kyseliny, vitaminy a minerální látky [1, 2, 3].

Skupina těchto bakterií je v posledních 50 letech předmětem mnoha vědeckých studií a dnes reprezentují jednu z nejpodstatnějších a rychle se vyvíjejících oblastí v potravinářství [6].

BMK jsou uměle vytvořená skupina fylogeneticky příbuzných rodů. Někdy jsou do této skupiny chybně zařazovány i rody *Bifidobacterium*, *Brevibacterium* a *Propionibacterium*, ačkoliv jde o mikroorganismy fylogeneticky nepříbuzné s odlišným typem metabolismu [1, 4, 5].

1.1 Taxonomie a klasifikace bakterií mléčného kvašení

Klasifikace BMK do různých rodů je založena především na morfologii, způsobu fermentace sacharidů, nároků na kyslík, přítomnost růstových faktorů, optimální teplotě růstu, tvorbě různých izomerních forem kyseliny mléčné (D(-), L(+)) nebo obě formy), toleranci vůči kyselému nebo zásaditému prostředí, schopnosti růstu při vysokých koncentracích solí a také dle složení buněčné stěny [1, 7].

Nicméně s popisem nových rodů a druhů je stále obtížnější využívat tyto klasické metody založené na biochemických a fenotypických kritériích. Ačkoliv tyto charakteristiky slouží jako prvotní identifikační hledisko při posuzování, nelze je považovat za dostačující a zcela objektivní. Dnešní sofistikované molekulárně-biologické metody umožňují podrobně analyzovat jednotlivé rody i druhy na molekulární úrovni a přesně definovat fylogenetické vztahy mikroorganismů. Mezi nejčastější metody patří sekvencování genů, polymerázová

řetězová reakce, DNA/DNA hybridizace a studium genů pro 16S rRNA. Díky vynálezu těchto metod došlo v taxonomii BMK k velkým změnám a reklasifikaci [1, 6, 9].

BMK se řadí do kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales*, zahrnující 7 čeledí. Mezi technologicky nejvýznamnější rody patří: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus* a *Vagococcus*. Všechny uvedené rody se řadí do kmene s nízkým obsahem G+C < 50 % (podíl guanino-cytosinového komplementárního páru v rámci určité DNA) [1, 3, 8].

1.2 Výskyt a význam bakterií mléčného kvašení

BMK patří mezi všeobecně hojně se vyskytující mikroorganismy. Zpravidla se nacházejí v prostředí bohatém na živiny a vyšším obsahem CO₂ v atmosféře. V životním prostředí jsou nejčastěji přítomny na tlejících rostlinných materiálech, tvoří dominantní část mikroflóry gastrointestinálního a urogenitálního traktu člověka i zvířat, tvoří přirozenou mikroflóru na sliznicích ženských pohlavních orgánů a v dutině ústní. BMK byly izolovány i z poškozených živočišných tkání, siláží a chlévské mrvy. Přirozeně se nacházejí i v potravinách, např. v mléku, těstu, nápojích, ve fermentovaných mléčných (jogurty, sýry, kysané mléčné výrobky) a masných výrobcích (trvanlivé fermentované salámy), zelenině (olivy, okurky, zelí) a krmivech [1, 6, 9, 10].

BMK patřily mezi první mikroorganismy využívané člověkem ke zpracování potravin. Specifických funkčních vlastností a výsledných produktů metabolismu se dodnes celosvětově využívá pro výrobu fermentovaných výrobků. Nejenže mají pozitivní vliv na organoleptické vlastnosti výrobků, jako je chuť, vůně, textura a často i výživová hodnota, ale mohou také sloužit jako přirozený nástroj k prodloužení trvanlivosti a zvýšení bezpečnosti potravin tím, že produkují přirozené antibakteriální metabolity inhibující patogenní mikroorganismy [6, 11, 12, 13]. Ačkoliv jsou BMK obecně považovány za prospěšné a bezpečné, přesto mohou mít i negativní zdravotní a technologický dopad. Při zpracování potravin mohou působit jako kontaminanty a zhoršovat senzorické vlastnosti finálního výrobku. U jistých BMK byla prokázána dekarboxylační činnost vedoucí ke vzniku biogenních aminů, které, pokud jsou konzumovány v příliš vysoké koncentraci, mohou vyvolat alimentární intoxikace. Další zástupci BMK, především z rodu enterokoků a streptokoků, mohou v ojedinělých případech mít patogenní efekt především u starších lidí a pacientů s oslabenou imunitou [1, 2, 6, 14, 15].

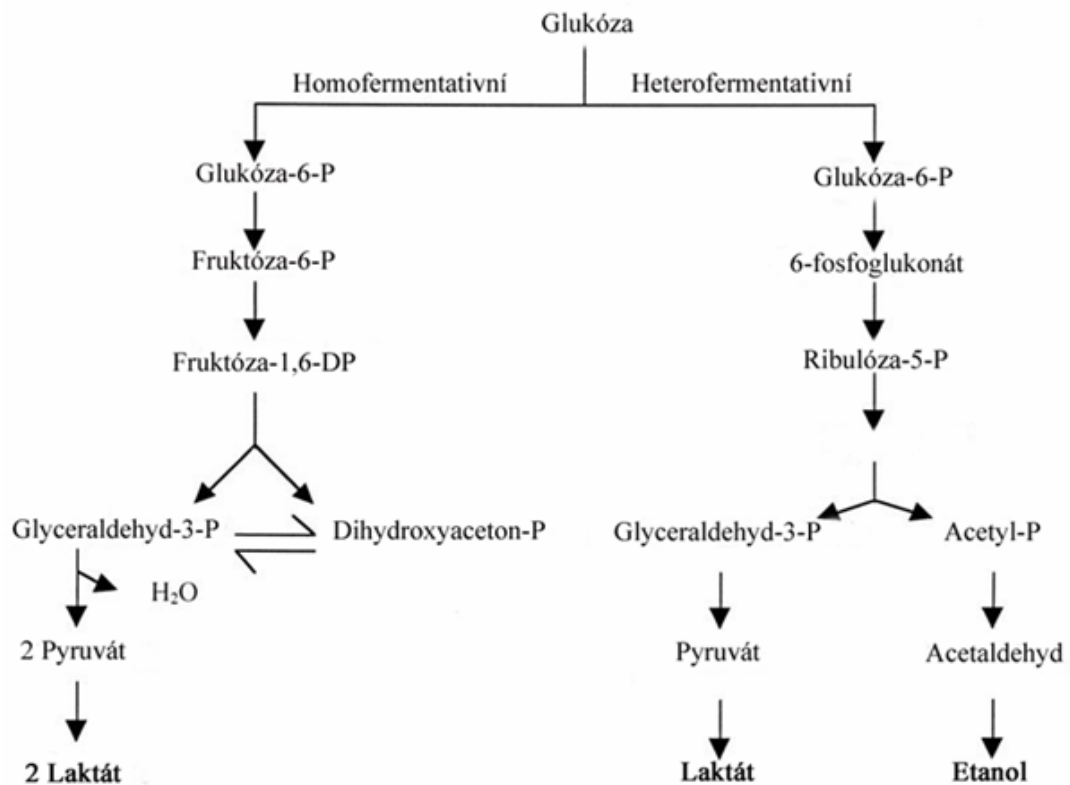
1.3 Metabolismus sacharidů bakterií mléčného kvašení

Metabolismus sacharidů BMK, neboli mléčné kvašení, je anaerobní pochod, při kterém bakterie spotřebovávají jednoduché sacharidy za vzniku kyseliny mléčné. Substrát je fosforylován a vzniklá energie (ve formě adenosintrifosfátu) je spotřebována pro biosyntetické účely buňky [1].

Transport sacharidů přes cytoplazmatickou membránu je uskutečňován dvěma způsoby. Rod *Lactococcus* pomocí fosfotransferázového systému transportuje do buňky celou molekulu sacharidu s následnou fosforylací a rozštěpením na glukózu a galaktózu-6-fosfát. Rody *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Bifidobacterium* využívají nosiče laktóza permeázu, který je z bioenergetického pohledu výhodnější, a po vstupu do buňky se substrát štěpí na glukózu a galaktózu. Glukóza je dále metabolizována glykolýzou, galaktóza je fosforylována a následně pomocí Leloiroy dráhy přeměněna na glukóza-6-fosfát vstupující taktéž do glykolýzy, a nebo je galaktóza-6-fosfát podrobena dvojité fosforylaci na tagatózu-1,6-difosfát, která je dále štěpena na dihydroxyacetonfosfát a glyceraldehyd-3-fosfát vstupující do glykolýzy. Dalším sledem biochemických reakcí vzniká v procesu glykolýzy kyselina pyrohroznová (pyruvát), která je následně redukována za pomoci enzymu laktátdehydrogenázy za vzniku kyseliny mléčné (laktátu) (obr. 1). Kyselina mléčná může být v L (+), D (-) formě, případně ve směsi obou forem. [1, 3, 13, 16].

Dle konečného metabolitu fermentace sacharidů dělíme BMK do několika skupin:

- striktně homofermentativní
- striktně heterofermentativní
- fakultativně heterofermentativní



Obrázek 1: Obecný mechanismus fermentace glukózy u BMK [17, upraveno]

Striktně homofermentativní BMK metabolizují výhradně Embden-Meyerhof-Parnasovou (EMP) drahou. Kyselina mléčná tvoří více než 90 % finálních produktů. Energetický výtěžek z jednoho molu glukózy jsou 2 moly kyseliny mléčné a 2 moly ATP. Do této skupiny se řadí některé laktobacily, jako např. *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus*, *Lb. jensenii* [1, 3, 13, 16].

Striktně heterofermentativní BMK uskutečňují fermentaci sacharidů pomocí 6-fosfoglukonát/fosfoketolázové dráhy. Mezi produkty fermentace patří kyselina mléčná (okolo 50 %), kyselina octová, oxid uhličitý, etanol a některé další minoritní produkty. Teoreticky vzniká z 1 molu glukózy 1 mol kyseliny mléčné, CO₂ a etanolu a 2 moly ATP. Do této skupiny se řadí některé laktobacily, např. *Lb. brevis*, *Lb. kefir*, *Lb. reuteri*, *Lb. fermentum* [1, 3, 7, 16].

Fakultativně heterofermentativní BMK disponují enzymy umožňující fermentaci hexóz po obou metabolických drahách. Nejčastěji dochází k přechodu z homofermentativní na heterofermentativní (a naopak) při změně růstových podmínek. Do této skupiny se řadí zástupci rodů *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*

coccus a některé *Lactobacillus* (např. *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* a další) [1, 3, 7, 13, 16, 18].

1.4 Charakteristika vybraných rodů bakterií mléčného kvašení

1.4.1 Rod *Lactobacillus*

Lactobacillus je nejrozmanitější a nejrozsáhlejší rod ve skupině bakterií mléčného kvašení. V době psaní této práce (říjen 2014) bylo do tohoto rodu platně zahrnuto 223 druhů [19]. Skupina těchto mikroorganismů je značně heterogenní, neboť zahrnuje druhy s širokou škálou fenotypových, biochemických a fyziologických vlastností. Nestejnorodost je možné doložit na základě různého obsahu G+C, které kolísá u různých druhů v rozmezí 32-53 %. Obecně se jedná o grampozitivní, nesporulující obvykle delší nepohyblivé tyčinky, zpravidla rovné, občas kokobacily. Upřednostňují především mezofilní či mírně termofilní teploty, s horní hranicí asi 40 °C. Pro svůj růst vyžadují prostředí nutričně bohaté s dostatkem zkvasitelných sacharidů, štěpných produktů bílkovin, nukleových kyselin, estery mastných kyselin a vitaminy skupiny B. Laktobacily jsou acidotolerantní až acidofilní a produkty svého metabolismu dokážou snížit pH prostředí až na 4,0. Je možné je označit za všudypřítomné, neboť se přirozeně vyskytují na rostlinných materiálech, v trávicím traktu, vagině i v dutině ústní člověka, ve výkalech a odpadních vodách a taktéž ve fermentovaných nebo kazících se potravinách. Díky pozitivním technologickým vlastnostem se využívají pro výrobu potravin [1, 3, 6].

Rod *Lactobacillus* byl poprvé popsán v roce 1901. Na základě optimální teploty růstu a způsobu zkvašování sacharidů byl v roce 1919 rozdělen do tří podrodů (*Thermobacterium*, *Streptobacterium* a *Betabacterium*). Díky neustálé identifikaci nových druhů a dokonalejšímu studiu mikroorganismů, bylo nutné provést reklasifikaci a laktobacily rozdělit do tří skupin jak je známe dnes – striktně homofermentativní, striktně heterofermentativní a fakultativně heterofermentativní. S vývojem nových molekulárně-diagnostických metod založených na studiu genů pro 16S rRNA je možné studovat širokou rozmanitost tohoto rodu a určit fylogenetické vztahy. V současné době máme k dispozici u některých druhů kompletní sekvence celého genomu, např. *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus brevis* ATCC367, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCCBAA365 a mnohé další [1, 4, 6, 8].

1.4.2 Rod *Lactococcus*

Laktokoky jsou grampozitivní fakultativně anaerobní sférické nebo ovoidní koky, většinou v párech nebo kratších řetězcích. *Lactococcus* má homofermentativní typ metabolismu a jako hlavní produkt L(+) kyselinu mléčnou. Z technologického hlediska je významná produkce exopolysacharidů a diacetylu. Optimální růstová teplota je 30 °C, avšak růst je možný i v rozmezí teplot od 10 do 40 °C. Některé druhy, např. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* dokáže dobře růst i při koncentraci NaCl 4 %. Tak jako všechny BMK vyžaduje nutričně bohatá komplexní média obsahující dostatek zkvasitelných cukrů, aminokyseliny, peptidy a taktéž esenciální vitaminy skupiny B. Izolovány byly z rostlinných materiálů, povrchových vod, mléka a mléčných výrobků [1, 13, 16, 20].

Rod *Lactococcus* byl vytvořen až v roce 1986, neboť dříve byl zahrnován do rodu streptokoků (streptokoky sérologické skupiny N). Odlišení bylo provedeno na základě sérologické typizace N antigenu dle metody Lancefieldové. V současné době je popsáno 13 druhů laktokoků z nichž nejdůležitější význam mají poddruhy *L. lactis* subsp. *cremoris* a *L. lactis* subsp. *lactis*. Obsah G+C je v rozmezí 33-37 % [1, 3, 19, 20].

1.4.3 Rod *Streptococcus*

Původně se rod *Streptococcus* rozlišoval na základě morfologických, fyziologických, sérologických a biochemických charakteristik. Do tohoto rodu byla zahrnována široká škála mikroorganismů, včetně těch vysoce patogenních *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, a dalších. Na základě nových poznatků byla po roce 1980 provedena taxonomická revize a reklasifikace a společný rod *Streptococcus* byl rozdělen do jednotlivých rodů *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus* a *Streptococcus*. V současné době zahrnuje tento rod 129 druhů [1, 16, 19].

Streptokoky jsou grampozitivní, anaerobní či aerotolerantní, kataláza negativní, nesporulující, kulovité nebo vejčité buňky v párech nebo delších řetězcích. Jsou homofermentativní, sacharidy metabolizují především na L(+) kyselinu mléčnou. Optimální teplota růstu se pohybuje v rozmezí od 10 °C do 44 °C. Je schopný růst při koncentraci NaCl do 6,5 % a při pH až 9,6. Vyžaduje komplexní živná média s dostatkem nutrientů. Přirozeně se vyskytuje na pokožce, v trávicím i urogenitálním traktu člověka, na rostlinách, v půdě, mléce a mléčných výrobcích. Z technologického hlediska má největší význam *Streptococcus thermophilus*, který je součástí základní jogurtové kultury. Obsah G+C u tohoto druhu je 40 % [1, 3, 16, 19, 21].

1.4.4 Rod *Enterococcus*

Enterokoky byly původně zařazovány jako streptokoky sérologické skupiny D, nicméně díky možnostem hybridizace DNA-DNA a DNA-RNA se ukázalo, že jsou fylogeneticky vzdálené a proto byly po roce 1980 vyčleněny jako samostatný rod. V současné době je známo 54 druhů [19, 22].

Enterokoky jsou grampozitivní, kataláza negativní, aerotolerantní koky, kulovité nebo vejčité, většinou v párech, krátkých řetězcích nebo ve shlucích. Některé druhy mohou být pohyblivé. Disponují převážně homofermentativním typem metabolismu, hlavní produkt L(+) kyselina mléčná bez tvorby plynu. Rostou v rozmezí teplot od 10 do 45 °C, některé druhy přežívají i záhřev po dobu 30 minut při teplotě 60 °C. Většina enterokoků je schopná růst i v poměrně extrémních podmínkách. Přežívají v přítomnosti NaCl o 6,5 % koncentraci a také 40 % žlučové soli, při pH 9,6. Řadu vlastností sdílejí s rody *Streptococcus* a *Lactococcus*. Bakterie tohoto rodu jsou všudypřítomné mikroorganizmy. Převládající stanoviště je v gastrointestinálním traktu zvířat a lidí, dále byly izolovány z půdy, rostlin, povrchových vod a také jako kontaminanty některých potravin (zpracované maso, mlékárenské výrobky). Naopak v řadě zrajících sýrů jsou žádoucí pro vývoj typických organoleptických vlastností, dále se mohou používat jako součást probiotických či protektivních kultur [15, 22].

Na rozdíl od většiny BMK není tento rod obecně považován za bezpečný. Některé kmeny mohou být rezistentní k antibiotikům, mohou produkovat biogenní aminy či vykazovat patogenitu tím, že produkují virulentní faktory. Proto je nutné a vysoce žádoucí rozlišit jednotlivé kmeny na základě virulence a tím lépe sledovat případnou patogenitu této heterogenní skupiny bakterií [15, 22].

1.4.5 Rod *Leuconostoc*

Rod *Leuconostoc* tvoří grampozitivní, nepohyblivé, kataláza negativní koky nebo tyčinky v párech a řetězcích. Řadí se mezi fakultativně anaerobní, mezofilní bakterie s heterofermentativním typem metabolismu produkující D(-) kyselinu mléčnou, etanol, oxidu uhličitého, diacetyl a další sensoricky významné látky. Optimální teplota růstu je v rozmezí od 18 do 25 °C, některé druhy jsou schopny růst při teplotách i pod 10 °C. Snáší prostředí s koncentrací NaCl 7 %, nerostou při hodnotách pH pod 4,8. Některé kmeny jsou značně osmotolerantní, což může v některých odvětvích průmyslu působit značné potíže. Tento rod byl taktéž podroben taxonomické revizi, některé druhy (např. *Oenococcus oeni*) byly

přesunuty do jiných rodů. Obsah G+C se pohybuje v rozmezí 38-41 % a v současné době je popsáno 30 druhů [1, 3, 16, 23].

Leuconostoc tvoří součást přirozené mikroflóry na rostlinných materiálech, dále byl izolován z mléka a mléčných výrobků, masa, ryb, ovoce, zeleniny a obilovin. V průmyslu se využívá především jako prvek aromatvorné kultury a u některých výrobků je žádoucí tvorba polysacharidů. Možné je i využití jako součást probiotických kultur a pozitivní výživový efekt mohou mít i jako producenti vitamínu K (*Leuconostoc mesenteroides*) a kyseliny listové. Naopak jako nežádoucí kontaminanty jsou posuzovány v cukrovarnictví. Původně byl tento rod považován za bezpečný, nicméně v posledních letech byly hlášeny zprávy o možném zdroji infekce od této bakterie, a proto je v současnosti považován za oportunní patogen, který je dokonce rezistentní na některá antibiotika. Kromě toho byla u tohoto rodu prokázána dekarboxylační aktivita s následnou produkcí biogenních aminů, které představují vážné zdravotní riziko. Na druhou stranu některé druhy je možné využít jako součást protektivních kultur, neboť produkují antimikrobiální látky a bakteriociny, které inhibují patogenní mikroorganismy [3, 16, 23].

2 INHIBIČNÍ LÁTKY PRODUKOVANÉ POTRAVINÁŘSKY VÝZNAMNÝMI MIKROORGANIZMY

Historie a snaha o uchování potravin je aplikována již několik tisíc let. Většina potravin představuje bohatý zdroj živin pro mikroorganismy a jsou tedy poměrně náchylné ke znehodnocení a rozvoji nežádoucí mikroflóry. Mezi první metody konzervace patří sušení, solení, zmrazení a fermentace. Díky technickému a vědeckému pokroku se objevily i různé nové metody, mezi něž patří použití vyšších teplot (pasterace, sterilace), ozařování a aplikace chemických konzervačních látek. Spotřebitelé vyžadují potraviny, které mají nejdelší možnou dobu trvanlivosti bez jakýchkoliv sensorických změn, nepředstavují žádné zdravotní riziko, pokud možno jsou minimálně zpracované a případně mají lepší výživové a organoleptické vlastnosti. U citlivějších jedinců se navíc na některé chemické konzervační látky může vyskytnout alergická reakce nebo mohou sloužit jako prekurzory pro vznik vedlejších produktů, například nitrosaminy z dusičnanů. Proto je vysoce žádoucí hledat bezpečné a přírodní konzervační látky, které mají minimum nežádoucích účinků [24].

Bioprezervace potravin zahrnuje použití bezpečných mikroorganismů a/nebo jejich metabolitů pro prodloužení údržnosti potravin a je vhodnou alternativou k fyzikálnímu a chemickému ošetření. Obzvláště zajímavé jsou v tomto ohledu bakterie mléčného kvašení, které vykazují antagonistické vlastnosti vůči mnohým nežádoucím bakteriím. Již dříve byla skupina těchto bakterií využívána pro přípravu fermentovaného mléka, masa či zeleniny a jsou proto obecně považovány za bezpečné. Produktem jejich metabolismu je z převážné části kyselina mléčná, dále kyselina octová, oxid uhličitý či peroxid vodíku, což do značné míry inhibuje růst nežádoucí mikroflóry. Navíc mezi skupinou BMK je velký počet kmenů, které produkují ribozomálně syntetizované antimikrobiální peptidy a proteiny, známé jako bakteriociny [24, 25].

2.1 Přírodní inhibiční látky

Přírodní antimikrobiální látky mají poměrně četné zastoupení v prostředí. Vyskytují se u zvířat i v rostlinách, kde plní primární funkci jako obranné mechanismy. Tyto sloučeniny vykazující antimikrobiální aktivitu se mohou vyskytovat jako přirozené složky v potravine, a nebo mohou být záměrně přidávány [26].

2.1.1 Mléko

Mléko je sekret mléčných žláz savců, který slouží jako zdroj energie a k přenosu imunity z matky na mládě. Profylaktické a terapeutické výhody mléka, včetně jeho bioaktivních složek byly využívány po staletí. V posledních letech se v mlékárenském průmyslu začaly z různých zdrojů tyto látky záměrně izolovat [26].

Laktoferin (taktéž laktotransferin), je multifunkční globulární glykoprotein, který je hojně zastoupen v různých tělních sekretech, jako jsou mléko, sliny, slzy či v nosním sekretu. Laktoferin je jednou ze složek imunitního systému, jehož primární úlohou je vyvázat volné železo, čímž odstraní jeden ze základních substrátů pro růst bakterií [27]. Laktoperoxidáza je enzym spadající do skupiny oxidoreduktáz, který představuje významný obranný mechanismus při ochraně mléčné žlázy při laktaci. Inhibuje růst koliformních bakterií, stafylokoků a streptokoků. Mechanismus působení je založen na oxidaci tiokyanátu na hypotio- kyanát, což je vysoce reaktivní oxidační činidlo destruující bakteriální membránu [28]. Laktoglobulin je hlavní syrovátkový protein vykazující široké antimikrobiální působení proti širokému spektru mikrobiálních patogenů. Ačkoliv jeho aplikace v potravinách má prozatím především technologický význam, zvažuje se jeho využití i pro různé potravinové doplňky a speciální potravinářské výrobky. Laktolipidy mohou také sloužit jako antimikrobiální činidla, které jsou součástí především obranného systému sliznic. Antimikrobiální aktivita je způsobena mastnými kyselinami a monoacylglyceroly, které mohou poměrně rychle destabilizovat bakteriální membrány [26].

2.1.2 Vejce

Vejce je poměrně dobrým příkladem produktu, které je za normálních okolností dobře chráněno jeho vlastním antimikrobiálním systémem a to po poměrně dlouhou dobu [29]. Lysozym je enzym, jehož největším zdrojem je vaječný bílek, dále je obsažen ve slinách, slzách, nosním hlenu, krevní plazmě, moči a mateřském mléce. Patří do třídy enzymů, které hydrolyzují buněčné stěny grampozitivních bakterií, a to konkrétně vazbu β -1,4 mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetyl-glukosaminem v peptidoglykanu. Lysozym je poměrně atraktivní konzervační prostředek, neboť je pro člověka zcela neškodný. Po smísení se žloutkem se jeho aktivita snižuje [26, 28]. Ovotransferin je monomerní glykoprotein, jehož antimikrobiální působení spočívá ve schopnosti reverzibilně navázat ionty železa, čímž odstraní jeden z nezbytných růstových faktorů pro patogenní mikroorganismy. Dále je zajímavá skutečnost, že kyselou proteolýzou molekuly ovotransferinu vznikají spe-

cifické asparaginové sekvence, které taktéž vykazují antimikrobiální aktivitu proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím [26, 30]. Avidin je základní glykoprotein v syrovém vaječném bílku, který je schopen inhibovat růst bakterií či kvasinek a taktéž může působit jako lytický enzym. Jeho antimikrobiální efekt je dán schopností vázat až čtyři molekuly biotinu (růstový faktor mikroorganismů) s mimořádně vysokou afinitou [26].

2.1.3 Rostlinné materiály

Fytochemikálie jsou látky vykazující biologickou aktivitu, včetně antimikrobiální, vyskytující se ve stoncích rostlin, listech, kůře, květech a plodech. Koření, byliny i jejich silice mají různý stupeň biologické aktivity a často koncentrace antimikrobiální látky je natolik nízká, že přímé použití by negativně ovlivňovalo senzorycké vlastnosti potravin. Nicméně mohou určitým podílem přispívat k celkovému bariérovému systému. K účinným látkám se řadí saponiny, což jsou sloučeniny chránící rostliny před biotickým stresem a také vyvolávají antibakteriální, antimykotické a antivirové aktivity, dále flavonoidy, isoflavonoidy, tiosulfáty, katechiny a glukosinoláty [26, 30].

2.2 Inhibiční látky produkované mikroorganismy

Velká část mikroorganismů je schopna produkovat značné množství metabolitů (organické kyseliny, toxiny, lytické enzymy, vitaminy, biogenní aminy, peroxid vodíku, diacetyl, atp.). Některé z těchto látek mohou vykazovat inhibiční účinky na růst jiných mikroorganismů. Inhibice jednoho kmene jiným může být založena na různém mechanismu účinku a produkce je často ovlivněna podmínkami v růstovém prostředí [16].

Nicméně, antimikrobiální látky, které přitahují největší pozornost, jsou bakteriociny. Prakticky všechny mikroorganismy jsou schopny je produkovat. Bakteriociny je možné definovat jako ribozomálně syntetizované antimikrobiální látky proteinové povahy. Díky svým antimikrobiálním schopnostem představují velký potenciál při bioprezervaci a prodlužování údržnosti potravinářských výrobků bez použití tepelného či chemického ošetření, což splňuje nejmodernější požadavky spotřebitelů [31].

První objev existence bakteriocinů byl v roce 1925. Byl produkován kmenem *Escherichia coli* vůči jiné kultuře *Escherichia coli* a nazván kolicin. Termín kolicin je nyní používán pro specifický baktericidní protein produkováný kmeny *E. coli* a úzce související s inhibiční aktivitou vůči čeledi *Enterobacteriaceae*. V současné době se pojem bakteriociny

používá k označení baktericidních bioaktivních peptidů nebo proteinů produkovaných mnoha bakteriálními kmeny z grampozitivních i gramnegativních zástupců [32].

Chemicky se jedná o jedno řetězcové (někdy i dvou řetězcové) proteinové molekuly, které se skládají obvykle z 20 až 60 aminokyselin, s molekulovou hmotností od 2 500 do 6 000 Da, ribozomálně syntetizované, procházející pouze malými posttranslačními úpravami. Za normálních okolností jsou bakteriociny kationové, hydrofobní nebo amfifilní molekuly mající struktury šroubovice nebo skládaného listu (případně obojí) a mohou mít volné tiolové, tioesterové či disulfidické skupiny. Přítomnost amfipatické alfa-helikální struktury s protilehlými polárními a nepolárními skupinami podél hlavní osy umožňuje bakteriocinům interagovat s hydrofilními či hydrofobními skupinami, které jsou navázány na membránovém povrchu bakteriální buňky, což vede k destabilizaci funkčních struktur a usmrcení. V současné době jsou známy aminokyselinové sekvence u 45 bakteriocinů a tyto studie ukázaly, že některé z bakteriocinů, které byly původně uvedeny pod různými názvy, mají stejné aminokyselinové složení (např. pediocin AcH a pediocin PA-1 nebo sarcin P a bavaricin A) [28].

Pokud jde o inhibiční spektrum, lze bakteriociny dělit do dvou skupin. První skupina zahrnuje bakteriociny, které mají spektrum účinnosti pouze na úzce příbuzné bakterie, které patří do stejného rodu, například lactocin 21, lactocid B, diplococin, helveticin J. Do druhé skupiny se řadí bakteriociny, které mají relativně široké spektrum účinnosti, například nisin, pediocin, leuconocin. Obecně vykazují i při nízkých koncentracích poměrně vysokou antimikrobiální účinnost [1,28].

Některé další obecné rysy bakteriocinů produkovaných BMK [1, 28]:

- Produkční kmen je rezistentní vůči svému vlastnímu bakteriocinu, ale může vykazovat citlivost na jiné bakteriociny (například *Pediococcus acidilactici* produkující pediocin AcH je citlivý vůči nisinu A, ale rezistentní vůči sarcinu A)
- Mikroorganismus může produkovat více než jeden bakteriocin (např. *Lactococcus lactis* produkuje lactococin A, B a M)
- Kmeny z různých druhů a rodů mohou produkovat stejné bakteriociny (např. pediocin AcH je produkován kmeny *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus coagulans*)

- Kmeny z různých poddruhů mohou produkovat různé bakteriociny (např. odlišné kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* produkují nisin A či laktacin 481) [1, 28].

Co se týče mechanismu působení, je obecně přijata hypotéza, že bakteriocin interaguje s mikroorganizmem na základě specifické či nespecifické adsorpce na buněčném povrchu. Primárním cílem bakteriocinů je navázání se na cytoplazmatickou membránu a pozměnění membránové struktury, což má za následek změnu v permeabilitě membrány. Další mechanismus spočívá v narušení membránového transportu a protonmotivní síly a tím vede k potlačení energetické produkce a biosyntézy proteinů a nukleových kyselin [31].

Někteří autoři řadí bakteriociny do skupiny antibiotik, ale vzhledem k jejich mechanismu syntézy, struktury a funkce patří do samostatné a odlišné skupiny antimikrobiálních látek. Na základě molekulárních struktur jsou rozděleny do několika skupin [1]:

- **Třída I – nízkomolekulární antibiotika** [1, 28, 32]:
 - Malé molekuly (<5 kDa)
 - Obsahují zbytky neobvyklých aminokyselin, jako je například 3-metyllanthionin, lanthionin
 - Tepelně stabilní
 - Další dělení do dvou skupin (lantibiotika typu A, lantibiotika typu B)
 - Producenti z rodů *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*
 - Nisin, epidermin, lactocin S, gallidermin
- **Třída II – nízkomolekulární peptidické bakteriociny** [1, 28, 32]:
 - Největší skupina, která byla charakterizována
 - Malé molekuly (<10 kDa)
 - Tepelně stabilní, nemodifikované
 - Neobsahují lanthionin
 - Další dělení do tří skupin
 - Producenti z rodů *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*

- Lasicin F, helvetin J, caseicin 80, leucocin A, enterocin P a další

- **Třída III – velké proteiny** [1, 28, 32]:
 - Velké proteiny (>30 kDa)
 - Tepelně labilní
 - Skupina není tak dobře charakterizována jako předešlé
 - Lactacin A a B a V-1829

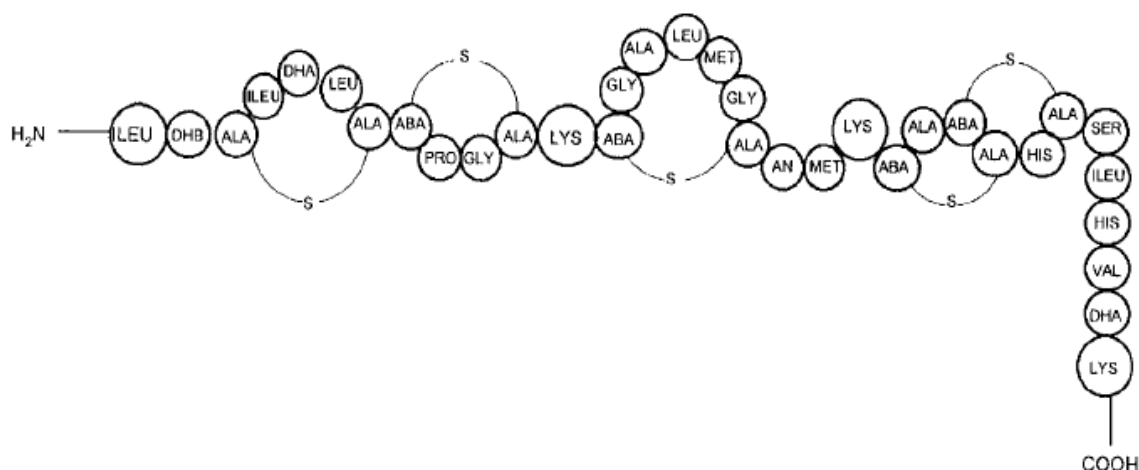
- **Třída IV – komplexní bakteriociny** [1, 28, 32]:
 - Ke své aktivitě vyžadují přítomnost sacharidové nebo lipidové skupiny

Tato skupina prozatím nebyla dostatečně charakterizována na biochemické úrovni [1, 28, 32].

2.2.1 Nisin

Nisin je jeden z nejznámějších a nejdůležitějších zástupců bakteriocinů, řadících se do třídy I, antibiotika typu A. Poprvé byl objeven v roce 1928, kdy produkční mléčné koky způsobovaly problémy při výrobě sýra v důsledku inhibice startovacích kultur. Jeho struktura však byla objasněna mnohem později a to až v roce 1971. Je produkován několika kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* [1, 28, 32].

Nisin je polypeptid skládající se z 34 aminokyselin s molekulovou hmotností 3510 Da. Jeho struktura je atypická tím, že obsahuje jeden lanthioninový kruh a čtyři methyllanthioninové kruhy (Obr. 2). Bylo objeveno a popsáno 6 různých forem (označeny jako nisin A, B, C, D, E a Z). Nisin má přirozenou variantu ve formě Z, který se odlišuje od velmi strukturně podobné varianty A tím, že aminokyselina histidin v poloze 27 je nahrazena asparaginem. Tato změna má vliv na rozpustnost a také na antimikrobiální aktivitu, která se touto substitucí zvyšuje [1, 25].



Obrázek 2: Struktura nisinu A [1]

Nisin má široké spektrum působení vůči grampozitivním bakteriím. Baktericidní účinek byl prokázán na většinu BMK, dále *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, vegetativní buňky *Bacillus* spp. a *Clostridium* spp., jakož i na některé spory rodů *Bacillus* a *Clostridium*. Primárním místem působení je cytoplazmatická membrána. U gramnegativních bakterií je účinný pouze v případě, že došlo k poškození membrány v důsledku působení chelatačních činidel (např. EDTA), nisin je pak schopen se navázat na ionty hořčíku z lipopolysacharidové vrstvy vnější membrány. Způsob účinku nisinu byl dlouhodobě intenzivně studován a bylo navrženo několik mechanismů působení. Bylo prokázáno, že inhibuje biosyntézu peptidoglykanu, interaguje s prekurzory lipidů v buněčné stěně a je také schopen tvorby pórů, což vede k difúzi malých sloučenin (jako jsou aminokyseliny a ATP), a následně k porušení protonmotivní síly a k zastavení biosyntézy makromolekul (jako jsou DNA, RNA a proteiny). Dále bylo prokázáno, že je schopen indukovat autolýzu u buněk stafylokoků [1, 3, 4, 28, 32].

Použití nisinu jako konzervačního prostředku v potravinách podléhá schválení regulačních úřadů v jednotlivých zemích. Ve Spojeném království a některých dalších zemích, byl k dispozici na trhu již od roku 1950, na druhou stranu v USA bylo používání schváleno až v roce 1988. Dnes se již ví, že nisin je pro člověka neškodný, neboť je v trávicím traktu štěpen proteázami a tím pádem se stává nefunkční. Nisin je tepelně stabilní, čehož se využívá při konzervaci tepelně opracovaných výrobků (hlavně tavené sýry a konzervy), kde zabraňuje vyklíčení mikrobiálních spor. Dále se v některých zemích používá ve výrobcích jako je šlehačka, mléčné dezerty, koláče, pasterizované polévky a vejce, dresinky, omáčky, ovocné džusy a pivo. Naopak je nutné kontrolovat produkci u startovacích kultur, neboť

může dojít během výroby k nechtěné inhibici laktobacilů (např. při výrobě sýrů) [1, 4, 28, 32].

2.2.2 Lacticiny

Lacticin 3147 je bakteriocin produkovaný *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* v exponenciální fázi růstu. Jedná se o tepelně stabilní bílkovinnou sloučeninu, která se skládá ze dvou peptidů (LtnA1 a LtnA2). Pro plnou antimikrobiální aktivitu je nutná jejich synergická aktivita. LtnA1 je peptid skládající se z 30 aminokyselin s molekulovou hmotností 3306 Da, zatímco LtnA2 je peptid z 29 aminokyselin s molekulovou hmotností 2847 Da. Jsou kódovány plazmidově a podléhají komplexním posttranslačním úpravám. Řadí se do tříd lantibiotik, ale díky synergetickému působení se v některé literatuře řadí do třídy II. Lacticin 3147 má poměrně široké spektrum působení. Inhibuje patogeny, jako jsou *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* spp., tak i mnohé BMK (*Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp.). Mechanismus působení je velmi podobný jako u nisinu, tzn., že indukuje tvorbu pórů v cytoplazmatické membráně, vazbou na lipidy způsobuje konformační změny a také dokáže vytvářet póry v buněčné stěně. Nejčastější aplikace je do mléčných výrobků [1, 25].

Lacticin 481 je bakteriocin s úzkým spektrem působení produkovaný *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Lantibiotikum lacticin 481 je syntetizován ribozomálně, molekulová hmotnost je 2901 Da. Inhibiční působení vykazuje na všechny druhy laktokoků, na některé laktobacily a leukonostoky. Obzvláště vysokou citlivost vykazuje *Clostridium tyrobutyricum* [25].

2.2.3 Lactococciny

Lactococciny jsou bakteriociny náležící do třídy II, produkované *Lactococcus lactis*. Lactococcin G je produkován na konci exponenciální růstové fáze a inhibuje růst především BMK a některé druhy klostridií. Je složen z jednotlivých peptidů α_1 (39 AMK) a β (35 AMK) a vytváří spirálovitou strukturu. Kladně nabitý C-konec peptidu alfa umožňuje proniknutí do buněčné membrány citlivých mikroorganismů a vznik pórů, uvolňování iontů a smrt buněk. Naproti tomu lactococcin 972 má odlišný mechanismus a to, že vykazuje svoji aktivitu pouze u dělících se buněk, kde inhibuje tvorbu septa. U nedělících se buněk nevykazuje žádnou aktivitu. Lactococciny obecně mají užší spektrum působení, což před-

stavuje jistou výhodu při průmyslových aplikacích, kdy nedochází k inhibici startovacích kultur [1, 24].

2.2.4 Enterociny

Enterociny jsou bakteriociny produkované *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* a *E. mundtii*. Charakterizováno bylo několik druhů a to enterocin A, AS-48, EJ97, L50, P, Q, 1071, enterolysin A, bakteriocin 31, mundticin a mudticin KS. Někteří autoři je všechny řadí do jedné skupiny (bakteriociny třídy II a IV), ale některé z nich mají neobvyklé genetické znaky a strukturu, což vedlo k vytvoření samostatného klasifikačního seskupení. Jeden z nejprostudovanějších bakteriocinů v této skupině je enterocin AS-48. Jedná se o kruhovou molekulu, kdy N-konec je navázán na C-konec a spojen pomocí amidové vazby. Je syntetizován ribozomálně a poté podroben posttranslačním úpravám a cyklizaci. Je extrémně tepelně stabilní (aktivní při teplotě do 80 °C, nebo i pod bodem mrazu) a snáší i pH v rozmezí od 3 do 8. Je složen ze 70 aminokyselin sestavených do struktury pěti alfa šroubovic s vysokým podílem hydrofobních aminokyselin (49 %) přítomných ve středu cyklické struktury, což hraje důležitou roli v antimikrobiální aktivitě. Enterocin AS-48 vykazuje mimořádně široké spektrum účinku proti většině grampozitivních a gramnegativních bakterií. Jako nejcitlivější se ukázala *L. monocytogenes*. Díky tomuto rozsáhlému působení má velký potenciál jako konzervační prostředek, např. při výrobě sýrů, fermentovaných uzenin, kondenzovaného mléka, atp. [1, 25, 32].

Enterolysin produkovaný *E. faecalis* LMG 2333 je poměrně velká molekula tvořena 316 aminokyselinami, s molekulovou hmotností 34501 Da, tepelně labilní, řadící se do třídy III. Inhibiční efekt vykazuje k enterokokům, pediokokům, laktokokům a laktobacilům. Enterocin B se skládá z 53 aminokyselin, molekulová hmotnost 5463 Da a je účinný proti *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Enterococcus* a *Lactobacillus* spp. Využití je možné při konzervaci piva a mléčných výrobků [1, 24].

2.3 Producenti inhibičních látek a využití v potravinářství

Antimikrobiální látky produkované mikroorganismy, především bakteriociny, mají na trhu strategické postavení a představují velký potenciál. Výzkum pro vhodnou aplikaci probíhá již několik desítek let a tyto látky mohou představovat lepší a levnější alternativu oproti chemickým konzervačním činidlům. Bakteriociny produkované BMK jsou obecně považovány za bezpečné (vyjma cytolisinu vylučovaného *E. faecalis*) a v trávicím traktu do-

cháží k jejich inaktivaci působením proteáz. Primární důvod pro použití je prodloužení údržnosti, čímž dojde ke snížení ekonomických ztrát v důsledku znehodnocení potravin, dále náhrada chemických konzervačních látek, snížení intenzity fyzikálního ošetření, eliminace patogenů, a uspokojit požadavky zákazníků po čerstvých a minimálně ošetřených potravinách. V následující tabulce (Tab. 1) jsou shrnuty produkční kmeny bakteriocinů a možnosti aplikace [24, 25].

Tabulka 1: Využití kultur produkujících bakteriociny ke konzervaci potravin [1, 24, 25, 28, 31]

Produkční kmen	Bakteriocin	Citlivý mikroorganismus	Druh konzervované potravin
<i>L. lactis</i> *	nisin A	G+ *	zelenina, pečivo
<i>L. lactis</i>	lacticin 3147	G+	mléčné výrobky, fermentované masné výrobky
<i>L. lactis</i>	lacticin 481	BMK, klostridia	sýr, masné výrobky, zelenina
<i>Lb. sakei</i> 706 *	sakacin A	<i>Listeria monocytogenes</i>	vakuově balené maso
<i>E. faecalis</i> A-48-32*	enterocin AS-48	<i>S. aureus</i>	mléko
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 40FEL3	nisin A	<i>L. monocytogenes</i>	cottage sýr
<i>L. lactis</i> IFPL 3593	lacticin 3147	<i>Cl. tyrobutyricum</i> *	polotvrdé sýry
<i>Lb. sakei</i>	sakacin P	<i>L. monocytogenes</i>	fermentované salámy
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> INIA 415	nisin Z, lacticin 481	<i>Cl. feijerinckii</i>	ovčí sýry
<i>E. mundtii</i>	mundticin	<i>L. monocytogenes</i>	uzený losos

* G+ - grampozitivní bakterie

* *L.* – rod *Lactococcus*

* *Lb.* – rod *Lactobacillus*

* *E.* – rod *Enterococcus*

* *Cl.* – rod *Clostridium*

3 PROTEKTIVNÍ KULTURY

Využití bakterií mléčného kvašení, které zpomalují růst nežádoucích mikroorganismů a tím prodlužují údržnost potravin, bylo praktikováno již od starověku. Nejdříve intuitivně, posléze se tyto praktiky opřely o vědecké poznatky. Jeden z prvních badatelů věnujících se této oblasti byl Louis Pasteur, který zkoumal mezibakteriální inhibici (pravděpodobně u *Escherichia coli*) naočkovaných v moči. V první polovině dvacátého století byla provedena základní charakteristika antimikrobiálních látek produkovaných mikroorganismy (bakteriociny). O několik let později, v roce 1953 byl v Anglii jeden z nejvýznamnějších zástupců bakteriocinů, nisin, jako první uveden na trh. Později byl nisin schválen EU a FDA (Food and Drug Administration) ve více než 50 zemích. V posledních třiceti letech se grampozitivní bakterie a zejména BMK staly významnou součástí při bioprezervaci potravin a součástí protektivních, tzv. „ochranných“ kultur [25, 33].

3.1 Charakteristika a požadavky na protektivní kultury

Bioprezervace potravin zahrnuje procesy vedoucí k prodloužení údržnosti potravin a zachování či zlepšení zdravotní nezávadnosti za použití mikroorganismů nebo jejich extracelulárních metabolitů, které jsou schopny inhibovat růst jiných mikroorganismů v důsledku produkce antimikrobiálních látek. Ochrana zdraví spotřebitele patří mezi nejdůležitější aspekty, především pokud se jedná o potraviny k přímé spotřebě. Startovací kultura má význam hlavně technologický (například cílená produkce kyseliny mléčné), zatímco primárním účelem aplikace protektivních kultur je cílená produkce látek antimikrobiálních, jež mají nezanedbatelný potenciál při zlepšení mikrobiologické bezpečnosti potravin, což podporuje systém správné výrobní praxe a tím dochází ke snížení rizika růstu a přežívání patogenů. Důležitým předpokladem pro úspěšnou aplikaci protektivních kultur je jejich schopnost produkovat dostatečně aktivní metabolity antagonistické proti širokému spektru příslušného patogenního mikroorganismu, původcům znehodnocujícím potraviny nebo plísním [11, 12]. Obecné mechanismy interference nejsou zatím zcela objasněny, ale předpokládá se, že mezi mikroorganismy dochází ke konkurenčnímu boji o živiny (jsou schopny využívat dostupné zdroje uhlíku rychleji než nežádoucí konkurence) a adhezní místa, nepříznivým změnám životního prostředí nebo ke kombinaci těchto jevů [25, 30]. Navíc každá antimikrobiální látka použitá pro konzervaci potravin většinou nepůsobí samostatně, ale dochází k synergetickému působení, což má za následek zvýšení účinnosti a vznik tzv. bariérového efektu [10].

Ačkoliv jsou některé BMK spojovány s původci kažení potravin či možnou patogenitou, většina z nich je považována za neškodnou. Mnohé kmeny BMK jsou na seznamu GRAS (tzn., že jsou obecně považovány za bezpečné). Protektivní kultury musejí splňovat několik důležitých aspektů:

- bezpečné (nesmí představovat žádné zdravotní riziko)
- schválené (označeny GRAS)
- žádný negativní vliv na sensorické vlastnosti produktu
- účinnost i při nízkých koncentracích
- ekonomicky dostupné a jednoduché na přípravu
- stabilní během zpracování a skladování [12, 25, 30 25, 30].

3.2 Aplikace protektivních kultur

Protektivní a startovací kultury BMK produkují rozmanitou škálu metabolitů s antimikrobiální aktivitou. Mezi nejvýznamnější látky patří především kyseliny mléčná, octová a propionová (snížení pH), oxid uhličitý (potlačení aerobní mikroflóry), diacetyl, peroxid vodíku, reuterin, fenylmléčná kyselina, cyklické dipeptidy, proteinové sloučeniny (bakteriociny, fungicidy), 3-hydroxy-mastné kyseliny, kyselina kapronová [10, 12, 25].

Jak bylo zmíněno již dříve, protektivní neboli ochranné kultury mají několik důležitých funkcí, které se využívají při výrobě a skladování potravin. Jedna z nejdůležitějších je schopnost zabránit růstu a množení nežádoucích mikroorganismů při výrobě fermentovaných produktů. BMK dokážou inhibovat růst bakterií *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium* sp., non-starterových BMK, kvasinek (*Candida*, *Debaryomyces*), plísní (*Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*) a také mikroorganismů schopných produkovat biogenní aminy [1, 34, 35]. Další pozitivní vlastností je schopnost urychlit zrání sýrů prostřednictvím zvýšené lyze buněk zákysové kultury. Během tohoto procesu dochází k uvolnění intracelulárních proteináz a peptidáz, což vede k rychlejšímu nástupu proteolýzy a tedy i k rychlejším změnám bílkovin. Touto schopností vynikají především nisin-produkující kmeny [38]. Ačkoliv využití ochranných kultur se nabízí v různých potravinářských komoditách, zcela největší význam má při produkci mléčných a fermentovaných masných výrobků [25]. Příklady průmyslových aplikací, včetně inhibovaných mikroorganismů jsou shrnuty v následující tabulce (tabulka 2).

Tabulka 2: Průmyslové aplikace protektivních kultur [25, 36, 37]

Bakteriální kultura	Surovina	Inhibovaný mikroorganismus
<i>E. faecalis</i> A-48-32	mléko, čerstvý sýr	<i>S. aureus</i>
<i>L. lactis</i> ESI 515	mléko	<i>L. monocytogenes</i>
<i>L. lactis</i> TAB 50	polotvrdé sýry	<i>S. aureus</i>
<i>Lb. casei</i> ATCC 393	suché salámy	
<i>E. faecium</i> DPC 1146	sýr čedar	<i>L. monocytogenes</i>
<i>L. lactis</i> CL 1	polotvrdý sýr	<i>L. monocytogenes</i>
<i>L. lactis</i> IPLA 729	sýr	<i>S. aureus</i>
<i>Lb. sakei</i>	fermentované masné výrobky	produkující BA
<i>Pediococcus acidilactici</i>	krutí klobásy	<i>L. monocytogenes</i>

3.3 Faktory ovlivňující produkci antimikrobiálních látek a možnosti modifikace

Stejně tak jako vnější podmínky ovlivňují růst, rozmnožování a metabolismus bakterií, mají tím pádem i přímý dopad na produkci antimikrobiálních látek. Fermentační média mohou ovlivňovat schopnost kmene produkovat detekovatelná množství inhibiční látky, její stabilitu či citlivost nežádoucích mikroorganismů. Účinnost může být ovlivněna délkou a podmínkami během skladování (ačkoliv stabilita inhibičních látek je jeden z požadavků pro jejich použití) a taktéž vlastnostmi surovin. Protektivní kultury nemusejí být pro některé potraviny vhodné, neboť vykazují například enzymovou či chemickou aktivitu nebo byly během zpracování podrobeny fyzikálnímu či chemickému ošetření. Taktéž vysoký obsah tuku, na který se mohou antimikrobiální látky navázat pomocí nespecifické hydrofobní interakce, představuje problém [25, 26, 37, 39].

Teplota má přímý účinek na rychlost bakteriálního růstu a tím pádem může ovlivnit produkci antimikrobiálních látek. Vyšší teploty mají vliv na plasmidy obsahující genetickou informaci, která je potřebná pro produkci bakteriocinů. Na druhé straně většina bakteriocinů je dostatečně tepelně stabilní, tudíž může zůstat aktivní i v době, kdy v médiu nejsou přítomny životaschopné buňky. Teplota má navíc vliv na tekutost membrány a může vést

ke snížení účinnosti tvorby pórů u inhibovaných mikroorganismů. Stacionární fáze růstu je povětšinou doprovázena snižováním antimikrobiální aktivity a to z několika důvodů: v pozdějších fázích růstu dochází k rozkladu látek působením přítomných proteináz, díky přítomnosti kyselin může docházet k destabilizaci bakteriocinů a může docházet k adsorpci bakteriocinů na složky růstového média či v produkčních buňkách. Dalším faktorem, který ovlivňuje produkci, může být hodnota pH. Obecně má většina bakteriocinů vyšší antimikrobiální aktivitu při nižších hodnotách ($\text{pH} < 5$) v důsledku zvýšené rozpustnosti a menší agregaci hydrofilních peptidů [11, 25, 26].

Z těchto důvodů je aplikace možná třemi způsoby:

- *in vitro*: přímé použití bakteriocinů, vyprodukovaných za standardizovaných růstových podmínek a jejich následná izolace z fermentačního média
- *in situ*: přímé použití mikroorganismů produkujících antimikrobiální látky k výrobě potravin (aplikace protektivních, sekundárních kultur)
- aplikace směsných kultur produkujících rozličné antimikrobiální látky (respektive bakteriociny) [25, 38].

Systémová biologie, která byla nazvána vědou 21. století, je relativně nový vědecký směr v biologii, který se zabývá studiem biologických funkcí a mechanismů v živých systémech. Spojuje studium genomiky, transkriptomiky (popis kompletních sad transkriptomů), proteomiky a metaboliky, které popisuje komplexním studiem těchto interakcí, které jsou vytvářeny matematickým modelováním s cílem vytvářet modely pro biologickou interpretaci a predikci chování organismů. Základním bodem těchto poznatků je sekvencování genomu, které poskytuje velké množství informací. Systémová biologie díky těmto poznatkům poskytuje silný nástroj pro komplexní pohled na metabolický aparát organismů, spíše než na konkrétní jednotlivé pochody v buňce a bude mít jistě obrovský dopad na budoucí vývoj startovacích a protektivních kultur. Tyto znalosti budou tvořit základní screeningové přístupy pro rychlou detekci více žádoucích kmenů a umožní určit, které kmeny jsou pro konkrétní aplikaci vhodnější. Bude možné produkovat výrobky s více žádoucími vlastnostmi, jako je chuť, textura, delší trvanlivost či výrobky zdraví prospěšné. Nové molekulárně-biologické metody umožňují lepší nahlédnutí do této problematiky a tím zvyšovat efektivitu využití těchto organismů. Dalším možností je žádaná genetická modifikace metabolismu konkrétních mikroorganismů pro zlepšení jejich metabolické produktivity. Tato strategie již byla úspěšně použita například u kmene *Lactococcus cremoris* DPC 4268 pře-

nosem plazmidu kódující lacticin 3147 z kmene *Lactococcus lactis* DPC 3147 u startovací kultury použité k výrobě sýru čedar. I přesto, že byly provedeny mnohé úspěšně provedené pokusy, mohou některé modifikované kmeny otestované v laboratoři vykazovat vhodné vlastnosti, nicméně po aplikaci do reálných systémů (potravin) se mohou vyskytnout odchylky od žádaných vlastností. Nicméně problémem stále zůstává negativní přístup spotřebitelů k rekombinantním technologiím a také regulační a legislativní překážky pro používání geneticky modifikovaných organismů, které se navíc v jednotlivých zemích liší. Podobně požadavky na označování jsou velmi odlišné v různých částech světa, a proto se předpokládá, že i přes velký potenciál těchto metod bude řešení těchto otázek velmi pomalý proces a získané vědecké poznatky budou dalece předcházet před průmyslovým využitím v potravinářském průmyslu [38, 40, 41].

4 PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární organické dusíkaté bazické sloučeniny odvozené od aminokyselin, které disponují vysokou biologickou aktivitou a mohou být syntetizovány či degradovány jako produkty běžné metabolické činnosti rostlin, zvířat či mikroorganismů. Dle chemické struktury se mohou dělit na alifatické (putrescin, kadaverin), aromatické (tyramin, β -fenyletylamin), heterocyklické (histamin, tryptamin) a polyaminy (spermin, spermidin, putrescin, kadaverin, agmatin, tabulka 3) [42, 43].

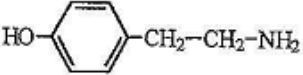
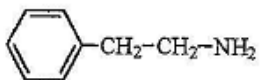
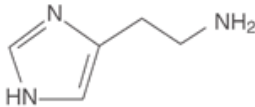
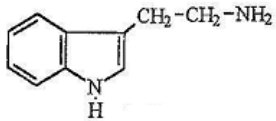

4.1 Vznik a výskyt biogenních aminů

Biogenní aminy jsou syntetizovány v potravinách ze specifických volných aminokyselin procesem dekarboxylace působením enzymů dekarboxyláz (třída lyázy), při kterém se odbourává karboxylová skupina aminokyseliny a odštěpí se oxid uhličitý. Proces dekarboxylace může postupovat přes dvě biochemické dráhy. První cesta je zapříčiněna přítomností endogenních, přirozeně se vyskytujících enzymů v surovině nebo činností exogenních mikrobiálních enzymů [14, 42, 44].

Vznik biogenních aminů v potravinách je závislý na splnění několika podmínek:

- přítomnost dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů,
- přítomnost prekurzorů (aminokyselin) v potravíně,
- vhodné podmínky pro množení a růst mikroorganismů [6, 42].

Tabulka 3: Chemická struktura a prekurzory biogenních aminů [42, 46]

	Prekurzorová aminokyselina	Biogenní amin	Chemický vzorec
aromatické	tyrozin	tyramin	
	fenylalanin	fenyletylamin	
heterocyklické	histidin	histamin	
	tryptofan	tryptamin	
alifatické	arginin ornitin citrulin	putrescin	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{NH}_2 \qquad \qquad \qquad \text{NH}_2 \end{array}$
	lyzin	kadaverin	
polyamin	putrescin spermidin	spermin	$\begin{array}{c} (\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3 \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{NH}_2 \qquad \qquad \qquad \text{NH}_2 \end{array}$
	putrescin spermin	spermidin	$\begin{array}{c} (\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4 \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{NH}_2 \qquad \qquad \qquad \text{NH}_2 \end{array}$

Přítomnost biogenních aminů byla hlášena v různých potravinách. Obzvláště vysoký obsah bývá v potravinách fermentovaných nebo bohatých na bílkoviny či volné aminokyseliny, jako jsou zrající sýry, mléčné výrobky, maso a fermentované salámy, víno, jablečný mošt, pivo, zelenina, kysané zelí, ryby, atp. [42, 43, 44].

4.2 Mikroorganismy produkující biogenní aminy

Mikroorganismy schopné produkovat biogenní aminy disponující enzymy zajišťující pozitivní dekarboxylázovou aktivitu. Tyto mikroorganismy se mohou v potravinách vyskytovat

přirozeně jako součást směsných startovacích kultur. U nefermentovaných potravin jde většinou o kontaminující mikroflóru během výroby a skladování. Obsah biogenních aminů může být ukazatelem vstupní jakosti surovin a hygieny celého výrobního procesu, včetně skladování. Vysoké koncentrace těchto látek mohou být indikátorem kontaminace a pokračujícího stupně kažení [6, 42, 45].

Množství je obvykle závislé na několika parametrech, včetně kvalitativní a kvantitativní složení mikroflóry, dostupnosti substrátu (zejména aminokyselin, sacharidů a pyridoxalfosfátu), teplotě, pH (optimum pro dekarboxylázovou aktivitu se pohybuje v rozmezí 4 – 5,5), přítomnosti soli, kvalitě vstupních surovin, době skladování či zrání výrobku (čím je doba skladování delší, tím je zpravidla i vyšší obsah biogenních aminů), hygienických podmínkách během výroby, rozsahu proteolýzy (s rozsáhlejší proteolýzou se obsah biogenních aminů zpravidla zvyšuje), výrobních podmínkách a taktéž na použitém druhu startovací kultury (je nutné vybírat kmeny s negativní dekarboxylázovou aktivitou) [44].

Mezi mikroorganismy, které jsou schopny produkovat biogenní aminy, a vykazují tedy pozitivní dekarboxylační aktivitu se řadí nejčastěji rody náležící do čeledí *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae* a *Micrococaceae*. Enterobakterie jsou považovány za skupinu mikroorganismů s nejvýznamnější dekarboxylační aktivitou. Mnoho zástupců produkuje obzvláště vysoké množství kadaverinu, putrescinu a histaminu. Mezi bakterie produkující biogenní aminy se řadí například *Escherichia coli*, *Enterobacter (aerogenes, cloacae)*, *Klebsiella (pneumoniae, oxytoca, variicola)*, *Proteus vulgaris*, *Serratia (marcescens, liquefaciens, plymuthica, fonticola, grimesii)*, *Morganella morganii*, *Salmonella*, *Hafnia alvei*, *Edwardsiella* spp, *Raoultella (ornithinolytica, planticola)*. Ze skupiny bakterií mléčného kvašení jsou rovněž mnohé kmeny dekarboxyláza pozitivní produkující tyramin, histamin, putrescin, kadaverin, spermin, spermidin či fenyletylamin. Mezi hlavní producenty se řadí například *Lactobacillus (brevis, hilgardii, malidelbrueckii* subsp. *bulgaricus, curvatus, brevis, casei, paracasei, plantarum)*, *Lactococcus (lactis, cremoris)*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Oenococcus*. Mezi produkující dále patří například *Staphylococcus (aureus, epidermidis, capitis, pasteurii)*, *Bacillus (cereus, coagulans, subtilis, megaterium, amyloliquefaciens)*, *Photobacterium (phosphoreum, damsela)*, *Vibrio* spp, *Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides* a mnohé další. Seznam dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů se díky novým poznatkům a moderním detekčním metodám neustále zvětšuje a je i nadále možné očekávat další rozšíření tohoto dlouhého seznamu [1, 14, 42, 44].

4.3 Biologické účinky biogenních aminů

Biogenní aminy získaly své označení proto, že jsou vytvářeny metabolismem živých organismů, kde plní řadu důležitých funkcí. V nízkých koncentracích je jejich přítomnost nutná pro správné fungování organismu a k zajištění důležitých biologických funkcí. Histamin se podílí na uvolňování adrenalinu a noradrenalinu, stimuluje hladké svalstvo v děloze a trávicím traktu, řídí sekreci žaludeční kyseliny. Tyramin zvyšuje hladinu cukru v krvi, uvolňuje noradrenalin, zvyšuje srdeční frekvenci, zrychluje dýchání. Putrescin a kadaverin mají vliv na stabilizaci makromolekul, hypotenzi a zvyšují toxicitu jiných aminů. Fenyletylamin a tryptamin zvyšují krevní tlak a způsobuje migrény [47].

Nadměrný příjem zapříčiněný konzumací potravin s vysokým obsahem těchto látek může však představovat pro lidské zdraví negativní toxikologické účinky. Škodlivost biogenních aminů pro spotřebitele je značně závislá na přijaté dávce, věku a zdravotním stavu jednotlivců. Zdravotní riziko může taktéž představovat genetická indispozice odbourávání těchto látek. Obecně citlivější jsou děti, nemocní a starší lidé. Mezi typické příznaky otravy patří hypotenze nebo naopak hypertenze, bolest hlavy, nevolnost, alergické reakce, dýchací potíže, pocení, bušení srdce a ve výjimečných případech i smrt [6, 42, 47].

Běžné koncentrace biogenních aminů přijatých ve stravě je za normálních podmínek organismus bez problému schopen odbourat díky účinnému detoxikačnímu mechanismu ve střevním traktu. Jedná se o systém, který je založený především na činnosti enzymů monoaminoxidázy, diaminoxidázy, histidinmetyltransferázy a histaminázy. Pokud však dojde k jeho narušení (vlivem nadměrné konzumace alkoholu, vysoký příjem biogenních aminů v potravě, jedinci se zhoršenou funkcí jater, lidé užívající léky působící jako inhibitory enzymů, např. antidepresiva, antiparkinsonika) a tím snížení detoxikační kapacity, může docházet ke zdravotním problémům, případně až k intoxikaci [42, 47].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo zmapování inhibičního působení protektivních kultur produkující bakteriociny na vybrané bakterie mléčného kvašení s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou.

Dále byla u kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 monitorována kinetika produkce biogenních aminů v čase za zvyšujícího se přídatku antimikrobiálního kmene či jeho metabolitů v podmínkách *in vitro*.

Biogenní aminy byly stanoveny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s pre-kolonovou derivatizací danzylchloridem a UV/VIS detekcí.

6 MATERIÁL A METODIKA

6.1 Použité inhibiční bakteriální kultury

V experimentální části bylo použito celkem 22 kmenů získaných ze Sbírký čistých mlékařských mikroorganismů Laktoflora (Culture Collection of Dairy Microorganisms - CCDM) MILCOM a.s., v Praze. Konkrétní použité kmeny jsou uvedeny v tabulce 4, včetně metabolitů inhibující růst jiných mikroorganismů (dle informací od poskytovatele kultur).

Tabulka 4: Použité kmeny inhibičních kultur

Označení kmeny	Rod	Druh	Produkce metabolitů
CCDM 945	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	
CCDM 79	<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	peroxid vodíku, acidocin C20079
CCDM 149	<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	bakteriocin podobné látky
CCDM 377	<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>	protein s mol.hmotností >50 kDa
CCDM 340	<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>	
CCDM 214	<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>	bakteriocin podobné látky
CCDM 215	<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>	bakteriocin podobné látky
CCDM 62	<i>Lactobacillus</i>	<i>helveticus</i>	
CCDM 82	<i>Lactobacillus</i>	<i>helveticus</i>	bakteriocin podobné látky
CCDM 125	<i>Lactobacillus</i>	<i>helveticus</i>	
CCDM 670	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis biovar. diacetylactis</i>	nisin
CCDM 686	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis biovar. diacetylactis</i>	nisin
CCDM 689	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis biovar. diacetylactis</i>	nisin
CCDM 695	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis biovar. diacetylactis</i>	nisin
CCDM 698	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis biovar. diacetylactis</i>	nisin
CCDM 731	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis subsp. lactis</i>	nisin
CCDM 71	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis subsp. lactis</i>	nisin
CCDM 414	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis subsp. lactis</i>	nisin
CCDM 418	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis subsp. lactis</i>	nisin
CCDM 416	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis subsp. lactis</i>	nisin
CCDM 702	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis subsp. lactis</i>	nisin
CCDM 671	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis subsp. lactis</i>	nisin

6.2 Použité dekarboxyláza pozitivní bakteriální kultury

V experimentální části bylo použito celkem 53 kmenů, z toho 11 izolátů získaných ze sbírky bakterií Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí, Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, 15 izolátů získaných z MILCOM a.s., pobočky v Táboře (označeny písmenem T), 19 kmenů izolovaných jako kontaminanty piva (získány ze sbírky mikroorganismů Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze – RIBM) a 8 kmenů získaných ze Sbírký čistých mlékařských mikroorganismů Laktoflora (CCDM) MILCOM a.s., v Praze. Jednotlivé kmeny, původ a označení jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Použité kmeny dekarboxyláza pozitivních kultur

Označení kmene	Rod	Druh	Původ
CCDM 53	<i>Enterococcus</i>	<i>durans</i>	sbírkový kmen
CCDM 48	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	sbírkový kmen
CCDM 141	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	sbírkový kmen
CCDM 824	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	sbírkový kmen
CCDM 946	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	sbírkový kmen
CCDM 1004	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	sbírkový kmen
CCDM 364	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	sbírkový kmen
CCDM 224	<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	sbírkový kmen
T2	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>	izolát ze sýru
T3	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	izolát ze sýru
T8	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	izolát ze sýru
T15	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>	izolát ze sýru
T19	<i>Enterococcus</i>	sp.	izolát ze sýru
T20	<i>Enterococcus</i>	sp.	izolát ze sýru
T24	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	izolát ze sýru
T36	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	izolát ze sýru

T37	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	izolát ze sýru
T41	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>	izolát ze sýru
T43	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	izolát ze sýru
T50	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	izolát ze sýru
T51	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	izolát ze sýru
T52	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	izolát ze sýru
T63	<i>Leuconostoc</i>	<i>pseudomesenteroides</i>	izolát ze sýru
A1-3	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>	izolát ze sýru
A1-7	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	izolát ze sýru
AIV-11	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei/paracasei</i>	izolát ze sýru
AIV-13	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei/paracasei</i>	izolát ze sýru
AIV-7	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	izolát ze sýru
RIBM 2-16	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	izolát z piva
RIBM 2-20	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	izolát z piva
RIBM 2-33	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	izolát z piva
RIBM 2-50	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	izolát z piva
RIBM 2-62	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	izolát z piva
RIBM 2-67	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	izolát z piva
RIBM 2-68	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	izolát z piva
RIBM 2-69	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	izolát z piva
RIBM 2-70	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	izolát z piva
RIBM 2-72	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	izolát z piva
RIBM 2-78	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	izolát z piva
RIBM 2-93	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	izolát z piva
RIBM 2-98	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	izolát z piva
RIBM 2-101	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	izolát z piva
RIBM 2-111	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	izolát z piva
RIBM 2-89	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	izolát z piva
RIBM 2-94	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	izolát z piva
RIBM 2-96	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	izolát z piva

RIBM 2-113	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei/paracasei</i>	izolát z piva
B125	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	izolát z masa
B103	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>	izolát z masa
B170	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	izolát z masa
B171	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	izolát z masa
B149	<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	izolát z masa
B150	<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	izolát z masa

6.3 Kultivační média

Použité živné půdy pro kultivaci mikroorganismů byly vyrobeny společností Merck.

MRS bujón byl připraven dle výrobcem doporučeného dávkování 52,2 g/l, rozlit do zkumavek a po uzavření sterilován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

MRS agar pro stanovení celkového počtu mikroorganismů (BMK) byl připraven rozpuštěním 52,2 g/l MRS Broth a 15 g/l agaru. Připravená půda byla sterilována při 121 °C po dobu 15 minut a za aseptických podmínek rozlita do Petriho misek.

Modifikovaný MRS bujón pro vyhodnocení dekarboxylázové aktivity u *Lactobacillus plantarum* byl připraven rozpuštěním 52,2 g/l MRS Broth a dvou aminokyselin (tyrozinu a argininu). Tyto aminokyseliny byly přidány v koncentraci 0,3 % (w/v). Připravená půda byla rozlita do zkumavek a po uzavření sterilována při 121 °C po dobu 15 minut.

Modifikovaný MRS agar pro stanovení inhibičního působení protektivních kultur byl připraven rozpuštěním 52,2 g/l MRS Broth a 28,75 g/l agaru. Připravená půda byla sterilována při 121 °C po dobu 15 minut a rozlita do Petriho misek.

M17 bujón byl připraven dle výrobcem doporučeného dávkování 42,5 g/l, rozlit do zkumavek a po uzavření sterilován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

M17 agar pro stanovení celkového počtu mikroorganismů byl připraven rozpuštěním 42,5 g/l M17 Broth a 15 g/l agaru. Připravená půda byla sterilována při 121 °C po dobu 15 minut a asepticky rozlita do Petriho misek.

Modifikovaný M17 agar pro stanovení inhibičního působení protektivních kultur byl připraven rozpuštěním 42,5 g/l MRS Broth a 25 g/l agaru. Připravená půda byla sterilována při 121 °C po dobu 15 minut a rozlita do Petriho misek.

6.4 Metodika experimentu

6.4.1 Agar-well diffusion test

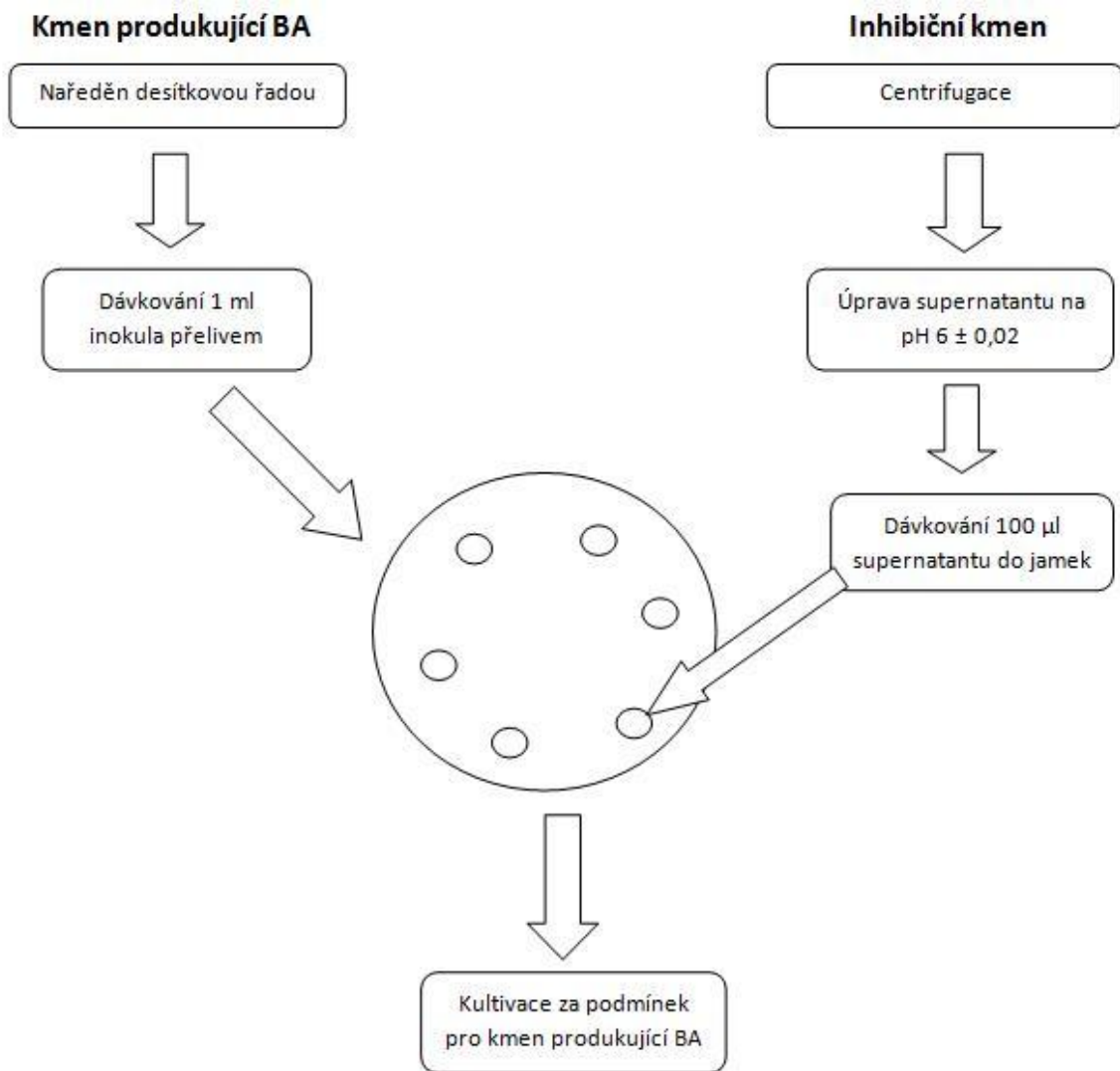
Kultivační bujóny MRS a M17 se zaočkovanou kulturou inhibičních či produkčních kmenů byly kultivovány za optimálních podmínek pro zvolený druh mikroorganismu (při teplotě 30 ± 1 °C nebo 37 ± 1 °C, an/aerobní prostředí) 72 hodin. Tyto podmínky byly voleny dle doporučení poskytovatele kultur.

Produkční kmeny byly po kultivaci naředěny desítkovou řadou až do ředění 10^{-4} . Na Petriho misky byla dávkována v množství 1 ml dvě ředění, a to 10^{-3} a 10^{-4} následně byla suspenze buněk přelita sterilní živnou půdou se zvýšeným přídatkem agaru (modifikovaný MRS nebo M17 agar). Po utužení byly do agaru vytvořeny jamky sterilním nástrojem.

Inokulum vzniklé kultivací inhibičních kmenů bylo zcentrifugováno při 10 000 ot/min, teplotě 15 °C, po dobu 12 minut. Získaný supernatant byl odpipetován do čistých zkumavek a neutralizován hydroxidem sodným ($c = 0,25$ M) na pH $6 \pm 0,02$. Takto upravený supernatant byl v množství 100 μ l dávkován do příslušných jamek vytvořených v Petriho miskách s inhibovanou kulturou. Schéma experimentu je shrnuto na obr. 3.

Kultivace probíhala za podmínek vhodných pro inhibovaný mikroorganismus (při teplotě 30 ± 1 °C nebo 37 ± 1 °C, dle doporučení poskytovatele kultur 24-48 hodin). Každý dekarboxyláza pozitivní kmen byl otestován každým z 22 inhibičních kmenů.

Vyhodnocení bylo provedeno měřením inhibičních zón a následným statistickým zpracováním 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).



Obrázek 3: Schéma experimentu agar well-diffusion test

6.4.2 Sledování kinetiky tvorby biogenních aminů

V experimentální části této práce byl sledován účinek vybraných vnějších faktorů (přidávek inhibiční kultury nebo příslušného supernatantu) na produkci biogenních aminů u kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89. Inhibiční kmeny byly zvoleny *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 a *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 689. Schéma experimentu je shrnuto na obr. 4.

Zaočkováním 7 ml kultivačního média MRS s přidavkem 0,3 % (w/v) tyrozinu a argininu (každá aminokyselina /AMK/ v uvedené koncentraci), jako prekurzory příslušných biogenních aminů, bylo připraveno inokulum, které bylo kultivováno při teplotě 30 ± 1 °C po dobu 24-48 hodin. Poté bylo přeočkováno 100 µl do 7 ml MRS bujónů s AMK a kultivo-

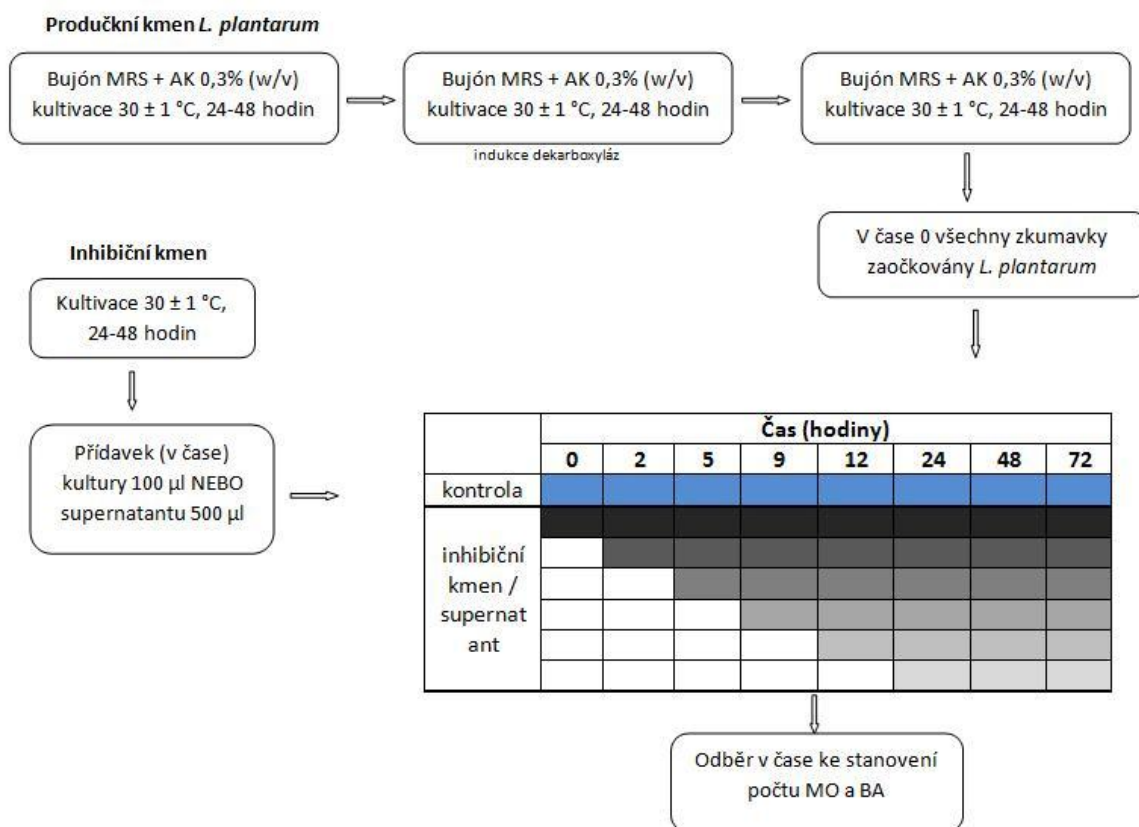
vány při stejných podmínkách a následně byl stejný postup za účelem indukce dekarboxylačních enzymů opět opakován.

Inhibiční kmen byl připraven zaočkováním příslušné kultury do tekutého kultivačního média M17, které bylo kultivováno při teplotě 30 ± 1 °C 24-48 hodin. Supernatant byl získán odstředěním inokula při 10 000 ot/min, teplotě 15 °C, po dobu 12 minut.

Experiment byl rozdělen na 2 části – testování inhibiční kultury CCDM 686 a CCDM 689 a dále testování supernatantu od příslušných kultur. V čase 0 byly všechny zkumavky s kultivačním médiem (7 ml MRS bujónu), které byly analyzovány, zaočkovány 100 μ l inokula *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 a kultivovány při teplotě 30 ± 1 °C.

Přídavek inhibiční kultury (v množství 100 μ l) nebo supernatantu (v množství 500 μ l) byl proveden v časech po 0, 2, 5, 9, 12, 24, 48 a 72 hodinách kultivace. Inhibiční kultura, resp. supernatant, byla v uvedených asech vždy přidávána do nové sady zkumavek se zaočkováným kmenem *Lb. plantarum* RIBM 2-89 (inokulace v čase 0 hodin) byly testovány dekarboxyláza pozitivním kmenem zaočkovány všechny zkumavky, které byly analyzovány. Schéma experimentu je znázorněno na obrázku 4.

Odběr vzorků pro stanovení počtu mikroorganismů a vyhodnocení růstové křivky bakterií probíhal po 0, 2, 5, 9, 12, 24, 48 a 72 hodinách kultivace. Odebrané vzorky byly naředěny desítkovou řadou a v množství 100 μ l očkovány na Petriho misky roztěrem. Živné půdy byly kultivovány při 30 ± 1 °C po dobu 47 - 72 hodin. Získané výsledky byly přepočteny a vyjádřeny jako celkový počet mikroorganismů na mililitr (vyjádřených jako log CFU/ml).



Obrázek 4: Schéma experimentu sledování kinetiky tvorby BA

(modrou barvou znázorněny odběry u kontrolních vzorků bez přídavku inhibiční látky, černou odběry u vzorků, ke kterým byla inhibiční látka přidána ihned na počátku experimentu – v čase 0, a odstíny šedé vzorky, ke kterým byla inhibiční látka přidávána v jednotlivých časových intervalech).

Odběr vzorků pro stanovení biogenních aminů probíhal po 0, 2, 5, 9, 12, 24, 48 a 72 hodinách kultivace. Odebrané vzorky byly odstředěny při 4 600 ot/min, teplotě 15 °C, po dobu 15 minut. Získaný supernatant byl rozdělen do tří eppendorfkových zkumavek po 750 µl a zředěn kyselinou chloristou ($c = 1,2 \text{ mol/l}$) v poměru 1:1 (bylo přidáno 750 µl kyseliny).

Při aplikaci bakteriální kultury jako použité inhibiční látky bylo nutné provést odlišení růstu na kultivačním médiu a stanovení počtu jednotlivých mikroorganismů (rodů *Lactobacillus* a *Lactococcus*). Z tohoto důvodu byla provedena cílená modifikace kultivačních pūd (uvedeno v tab. 6). Stanovení počtu *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 a *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 689 bylo získáno odečtením počtu narostlých kolonií na pūdě MRS od počtu kolonií na pūdě M17.

Tabulka 6: Použité kultivační půdy pro stanovení počtu mikroorganismů

Inhibiční látka	Použitá půda	Kultivace	Modifikace půdy	pH půdy
supernatant	MRS	<i>Lb. plantarum</i> RIBM 2-89	-	5,7±0,2
kultura	MRS	<i>Lb. plantarum</i> RIBM 2-89	snížení pH (NaOH, c= 0,25 M), přídavek agaru 20 g/l	4,5±0,2
	M17	<i>Lb. plantarum</i> RIBM 2-89, <i>L. lactis</i> CCDM 689	-	7,2±0,2

6.4.2.1 Stanovení produkce biogenních aminů

Vzorky byly upraveny dle návodu dostupného v laboratoři Ústavu technologie potravin:

K upraveným vzorkům bylo přidáno 100 µl 1,7-heptandiaminu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 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 uhličitánového pufru s pH 11,0 – 11,1 a 2 ml čerstvě připraveného roztoku danzylchloridu o koncentraci 5 g/l v acetonu (Merck). Derivatizační nádoby byly dobře uzavřeny a dány třepat 20 hodin v temnu. Následně bylo do každého vzorku přidáno 200 µl roztoku prolinu (Sigma-Aldrich) čímž se zastavila derivatizační reakce. Směs s prolinem se třepala další hodinu. Danzylderiváty byly extrahovány ručním vytřepáním (3 minuty) do 3 ml heptanu (Sigma-Aldrich). Poté byl z derivatizačních nádobek do vialek odpipetován 1 ml heptanové vrstvy a odpařen do sucha při teplotě 60 ± 2 °C pod proudem dusíku. Suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich) a vzorky byly uchovávány do doby analýzy v mrazicím zařízení při teplotách pod -18 °C.

Před vlastní analýzou byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 µm a nanoseny na kolonu (Zorbax ECLIPSE Plus C18, 50 mm x 3 mm, pórovitost 1,8 µm, průtok 0,45 ml/min) s chromatografickým systémem (binární pumpa a autosampler Agilent Technologies 1260 Infinity, USA) s degaserem, s UV/VIS-DAD detektorem ($\lambda = 254$ nm) a termostatem (Agilent Technologies, USA) a promývány gradientově mobilní fází uvedenou v tabulce 7.

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru CLARITY. Byla stanovena produkce tyraminu a sperminu. Vyhodnocení bylo provedeno měřením inhibičních zón a následným

statistickým zpracováním 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).

Tabulka 7: Gradientový eluční program HPLC

Čas [min]	10% acetonitril [%]	100% acetonitril [%]
0,0	41	59
0,1	41	59
1,9	37	63
3,5	18	82
4,0	0	100
9,5	0	100
11,5	41	59
15,5	41	59

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Inhibiční působení protektivních kultur na vybrané BMK produkující biogenní aminy

První fáze experimentu spočívala v provedení monitoringu 53 kmenů bakterií mléčného kvašení různého původu produkující biogenní aminy vůči inhibičnímu působení 22 sbírkových kmenů bakterií mléčného kvašení produkující bakteriociny.

V následujících tabulkách (tab. 8 - 13) jsou shrnuty získané výsledky velikosti inhibičních zón. Uvedené výsledky jsou průměrnou hodnotou velikosti inhibiční zóny na Petriho misce při použití agar well-diffusion test (difúzní jamková metoda).

Tabulka 8: Velikost inhibičních zón (v mm) na sbírkové kmeny BMK

Protektivní kulty	Produkční kmeny (sbírkové kmeny CCDM*)							
	*53	*48	*641	*824	*946	*1004	*364	*224
CCDM 945	0	2,75	0	0	0	0	3	0
CCDM 79	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 149	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 377	0	1	1,25	0	0	0	0	0
CCDM 340	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 214	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 215	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 62	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 82	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 125	0	0	0	0	2	0	2,5	0
CCDM 670	0	0	0	0	0	0	4,5	0
CCDM 686	0	0	0	0	0	0	3,5	0
CCDM 689	0	0	0	0	0	0	4,5	0
CCDM 695	0	0	0	0	0	0	4,25	0
CCDM 698	0	0	0	0	0	0	3,5	0
CCDM 731	0	0	0	0	0	0	2,5	0
CCDM 71	0	0	0	0	0	0	3,5	0
CCDM 414	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 418	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 416	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 702	0	0	0	0	0	0	3,5	0
CCDM 671	0	0	0	0	0	0	1,75	0

* Dekarboxyláza pozitivní kmeny získané ze sbírky Laktoflora (CCDM, stejné označení jako v tabulce 5)

Z tabulky číslo 8 je na první pohled patrné, že kmeny *E. durans* (CCDM 53), *S. thermophilus* (CCDM 224) a *L. lactis* subsp. *lactis* (CCDM 1004) vykazují zcela nulovou citlivost vůči působení inhibičních kultur. Naopak kmen B016 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (CCDM 364), který je součástí jogurtové kultury a potencionální produkce tyraminu, vykazoval značnou citlivost obzvláště vůči některým inhibičním kmenům produkující nisin. U tohoto kmene byly naměřeny největší inhibiční zóny. U kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* (CCDM 48 a CCDM 141) byla prokázána inhibiční aktivita pouze u použité protektivní kultury CCDM 377 a v případě CCDM 945 pouze u kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 ($P > 0,05$). U kmenů *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946 byl shledán statisticky nevýznamný rozdíl ($P > 0,05$) při použití inhibiční kultury CCDM 125.

Tabulka 9: Velikost inhibičních zón (v mm) na vybrané kmeny BMK izolované ze sýrů

Protektivní kmeny	Produkční kmeny (izoláty ze sýrů)									
	T2	T3	T8	T15	T19	T20	T24	T36	T37	T41
CCDM 945	2	2	3,5	2	0	0	4,5	3,5	3,5	4
CCDM 79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 149	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 377	1,5	2	1,5	1,5	0	0	1	1,5	1,5	1,5
CCDM 340	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 214	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 215	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 125	2	3	0	3	0	0	4	3	4	0
CCDM 670	4,5	5	4	4	0	0	4,5	4	4	4
CCDM 686	4	4	2,5	3,5	0	0	1	0,75	3	2
CCDM 689	4	3,75	3	3	0	0	2,75	3,5	2,5	3
CCDM 695	3,75	3,25	4	3,5	0	0	1,5	2	2,5	3,5
CCDM 698	3,5	4,25	4	3	0	0	2,5	2	2,5	3,5
CCDM 731	4,5	5	2,5	5	0	0	3,5	1,25	1,25	4
CCDM 71	5	5,5	3,5	5	0	0	4	1,25	1,5	4,5
CCDM 414	0	0	0,5	0	0	0	0,5	0	0	1,5
CCDM 418	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 416	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 702	2,5	3	2,5	3	0	0	3	1,25	1,5	4
CCDM 671	1	2	1,5	2	0	0	2	0,25	0	3,5

Tabulka 10: Velikost inhibičních zón (v mm) na vybrané kmeny BMK izolované ze sýrů

Protektivní kmeny	Produkční kmeny (izoláty ze sýrů)									
	T43	T50	T51	T52	T63	AI-3	AI-7	AIV-7	AIV-11	AIV-13
CCDM 945	0	2	2	2	1	2,75	2,5	0	2,5	2
CCDM 79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 149	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 377	1	0	0	0	0	1	1	2	1	0
CCDM 340	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 214	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 215	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 125	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 670	0	0	0	0	0	4	3,5	4,75	4,75	4,75
CCDM 686	0	0	0	0	0	2	4,75	4,5	4,5	5,5
CCDM 689	0	0	0	0	0	3	2,5	4	5,5	5,5
CCDM 695	0	0	0	0	0	3	4	2,75	5	4,5
CCDM 698	0	0	0	0	0	3,5	4,5	4,25	5,5	5,25
CCDM 731	0	0	0	0	0	4	5,5	4,75	5	4
CCDM 71	0	0	0	0	0	4,5	6	5	5,5	4
CCDM 414	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 418	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 416	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 702	0	0	0	0	0	4,5	6	5,5	6	4,5
CCDM 671	0	0	0	0	0	3	4,5	3,75	3,5	3,25

Všechny produkční kmeny BMK izolovaných ze sýrů nevykazovaly citlivost vůči protektivním kulturám CCDM 79, 149, 340, 214, 215, 62 a 82. Rod *Enterococcus* (T19, T20, T43) nebyl citlivý na působení inhibičních kultur, pouze v případě *E. faecalis* (T43) byla zaznamenána citlivost vůči CCDM 377, avšak naměřená zóna byla pouze 1 mm a tento výsledek nebyl statisticky významný ($P > 0,05$). Největší naměřené inhibiční zóny byly zaznamenány u druhů rodu *Lactobacillus*, a to zejména v případě testování inhibičních kultur CCDM 670, 686, 689, 695, 698, 731, 71. Největší naměřená zóna byla zaznamenána u kmene *Lb. plantarum* AI-7 vůči působení CCDM 71 a 702 (*L. lactis* subsp. *lactis*) ve veli-

kosti 6 mm ($P < 0,05$), což lze považovat za statisticky významný rozdíl. Kmeny *Lb. curvatus* vykazovaly podobnou citlivost vůči působení protektivních kultur, drobné rozdíly ve velikosti inhibičních zón byly zaznamenány u kmene T8 a T41 na působení CCDM 414 ($P > 0,05$).

Tabulka 11: Velikost inhibičních zón v milimetrech na vybrané kmeny BMK izolované z piva

Protektivní kmeny	Produkční kmeny (izoláty z piva – RIBM*)									
	*2-16	2-20	2-33	2-50	2-62	2-67	2-68	2-69	2-70	2-72
CCDM 945	3,5	3	2,25	3	3	2,25	0	3	3	3
CCDM 79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 149	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 377	1,75	1,5	1,5	1	1	2	2,25	1,5	1	1,5
CCDM 340	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 214	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 215	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 125	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 670	2,5	3,5	3,5	3	3,75	3,5	3,5	3,5	3,5	4
CCDM 686	2,5	3	3,5	3	3,5	3,5	2,5	3,5	3,75	3,75
CCDM 689	2,75	3,25	4,25	4	4	3,75	3,5	3,75	3,75	3,75
CCDM 695	2,5	2,5	3	2,75	3	2,75	2,25	2,5	2,75	3
CCDM 698	3	3	4	3,5	4	3	3	3,5	3	3,5
CCDM 731	4,5	4,5	4,75	5	5	4,5	4	4,5	4,25	5
CCDM 71	5	5,5	4	5	4,75	4,75	4,5	4,5	4,5	5
CCDM 414	3,5	4	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 418	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 416	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 702	4	4,5	3	3,25	5,25	2,5	3,5	4	3,75	4,25
CCDM 671	3	4	2,5	3	4	2	2	3	3	4

* Dekarboxyláza pozitivní kmeny získané z Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze (RIBM; stejné označení jako v tabulce 5).

Tabulka 12: Velikost inhibičních zón (v mm) na vybrané kmeny BMK izolované z piva

Protektivní kmeny	Produkční kmeny (izoláty z piva – RIBM*)								
	*2-78	2-93	2-98	2-101	2-111	2-89	2-94	2-96	2-113
CCDM 945	2	3	2,75	3	2,5	3,25	3	3,25	2,75
CCDM 79	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 149	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 377	2	2,5	2	2	3	1,5	1,5	1,5	1
CCDM 340	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 214	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 215	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 62	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 82	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 125	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 670	4,5	3	2,5	0,75	4	2	2,5	0,75	1
CCDM 686	3,5	3	2,75	1,5	1,5	3	2	1,25	1,75
CCDM 689	4	3,5	2,75	2,5	1,75	2,5	2	2	2
CCDM 695	3,5	3,5	2,5	2,5	3	2,5	2,25	2,25	3
CCDM 698	4	3	2	2,5	3	3	1,5	2,75	2
CCDM 731	4	5,5	3,25	4	4,75	4,25	2,5	4,75	4
CCDM 71	4	6,25	3,25	4	4,5	4,5	2,75	5	4
CCDM 414	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 418	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 416	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDM 702	3,5	5	2,25	3,5	4,5	4	2,25	4,75	3,75
CCDM 671	2,25	4,5	1,5	1,25	2,5	2,25	1,25	3	3

* Dekarboxyláza pozitivní kmeny získané z Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v praze (RIBM; stejné označení jako v tabulce 5).

U kmenů izolovaných z piva nebyl zaznamenán žádný inhibiční efekt u protektivních kultur CCDM 79, 149, 340, 214, 215, 62, 82, 414, 418 a 416. Obecně lze říci, že všechny izoláty z piva vykazují větší citlivost vůči protektivním kulturám z rodu *Lactococcus* než vůči *Lactobacillus*. Největší inhibiční zóny byly pozorovány u protektivní CCDM 71 (*L. lactis* ssp. *lactis*), konkrétně u *Lb. brevis* RIBM 2-93 o velikosti 6,25 mm, což lze považovat za statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$).

Tabulka 13: Velikost inhibičních zón (v mm) na vybrané kmeny BMK izolované z masa

Protektivní kmeny	Produkční kmeny (izoláty z masa)					
	B125	B103	B170	B171	B149	B150
CCDM 945	0	3	0	0	0,5	1,5
CCDM 79	0	0	0	0	0	0
CCDM 149	0	0	0	0	0	0
CCDM 377	1	2	0	0	0	0
CCDM 340	0	0	0	0	0	0
CCDM 214	0	0	0	0	0	0
CCDM 215	0	0	0	0	0	0
CCDM 62	0	0	0	0	0	0
CCDM 82	0	0	0	0	0	0
CCDM 125	0	0	0	0	0	0
CCDM 670	5,5	4	0	0	0	0
CCDM 686	4,5	3,5	0	0	0	0
CCDM 689	5,5	3	0	0	0	0
CCDM 695	5,5	2,5	0	0	0	0
CCDM 698	5,5	3	0	0	0	0
CCDM 731	2,5	3,5	0	0	0	0
CCDM 71	3	4	0	0	0	0
CCDM 414	2,5	1,5	0	0	0	0
CCDM 418	0	0	0	0	0	0
CCDM 416	0	0	0	0	0	0
CCDM 702	4,5	2,5	0	0	0	0
CCDM 671	1,5	2,5	0	0	0	0

Z tabulky č. 13 je na první pohled zřejmé, že kmeny *Leuc. mesenteroides* B 170 a B171 nebyly citlivé na inhibiční působení vůči žádné z použitých protektivních kultur. Kmeny *Streptococcus salivarius* B149 a B150 vykazovaly citlivost pouze proti CCDM 945, a ačkoliv rozdíl ve velikosti inhibiční zóny činil 1 mm, není tento výsledek považován za statisticky významný ($P > 0,05$). Kmeny B125 a B103, náležící do rodu *Lactobacillus* byly nejcitlivější vůči inhibičním kulturám z rodu *Lactococcus* (CCDM 670, – 414, CCDM 702

a CCDM 671). Kmeny B125 a B103 vykazovaly citlivost vůči stejným inhibičním kulturám (rozdíl zaznamenán pouze u CCDM 945), avšak získané výsledky se lišily ve velikosti inhibičních zón, které poukázaly na statisticky významné rozdíly ve velikosti inhibičního účinku ($P < 0,05$).

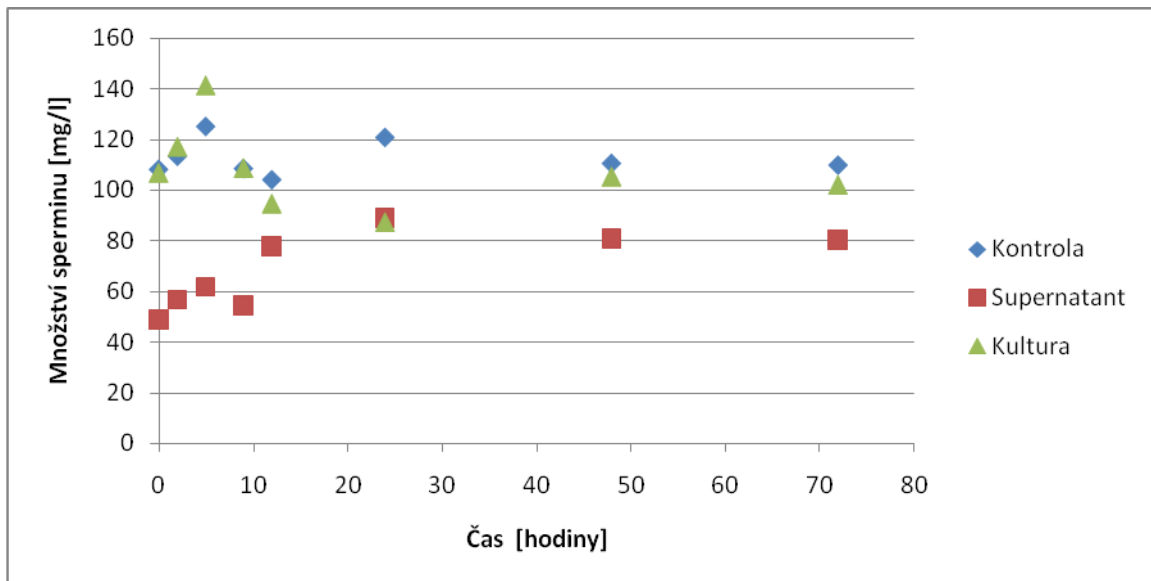
7.2 Sledování kinetiky produkce biogenních aminů za zvyšujícího se přídatku antimikrobiálního kmene či jeho metabolitů

U kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 byla během kultivace monitorována kinetika produkce biogenních aminů v závislosti na přídatku inhibiční kultury *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 a *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 689, či příslušných supernatantů (metabolitů) daných kultur, a to v různých časových intervalech (0, 2, 5, 9, 12, 24, 48 a 72 hodin od počátku kultivace produkčního kmene) při teplotě 30 ± 1 °C. Kontrolní vzorky byly kultivovány bez přídatku inhibiční kultury či supernatantu. Biogenní aminy tryptamin, fenyletylamin, putrescin, kadaverin, histamin a spermidin nebyly detekovány. Současně se stanovením biogenních aminů byl sledován i celkový počet mikroorganismů v konkrétním čase odběrů vzorků. Celý experiment byl realizován tak, že se souběžně prováděly veškeré pokusy s použitím inhibičního supernatantu a v druhé fázi inhibiční kultury, tudíž mohla být použita jen jedna série kontrolních vzorků pro daný inhibiční činitel (bez přídatku inhibiční látky).

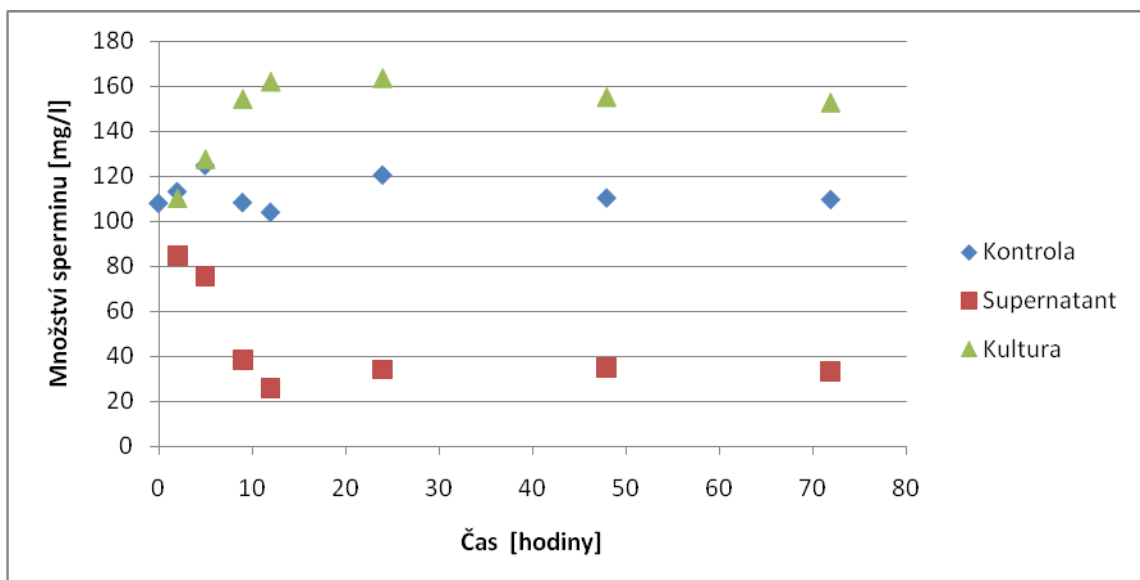
7.2.1 Produkce sperminu kmenem *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 za přídatku inhibiční kultury nebo supernatantu *Lactococcus lactis* CCDM 686

Během kultivace *Lb. plantarum* došlo k navýšení množství vyprodukovaného sperminu (viz obrázek 5). U kontrolního vzorku se během 72 hodin obsah zvýšil jen nepatrně ($P > 0,05$) z původní hodnoty 108,1 mg/l na konečnou hodnotu 109,8 mg/l. Přídavek inhibiční kultury CCDM 686 měl takřka zanedbatelný vliv na produkci sperminu ($P > 0,05$). Rozdíl byl zaznamenán pouze v čase 5 hodin ($P > 0,05$), kdy kontrolní vzorek obsahoval 125,0 mg/l sperminu a vzorek s přídatkem inhibiční kultury 141,4 mg/l a v čase 24 hodin kdy došlo ke snížení množství vyprodukovaného sperminu ($P > 0,05$) na 87,5 mg/l oproti kontrolnímu vzorku 120,7 mg/l. Po přídatku inhibičního supernatantu příslušné kultury byl obsah sperminu na začátku kultivace 48,5 mg/l a po 72 hodinách 80,17 mg/l ($P < 0,05$). Největší inhibiční efekt byl zaznamenán v čase 5 hodin ($P < 0,05$), kdy obsah sperminu činil 61,7 mg/l oproti kontrolnímu vzorku 125,0 mg/l. Z obrázku je na první pohled zřejmé, že

supernatant měl významný inhibiční efekt především v prvních 9 hodinách kultivace ($P < 0,05$).



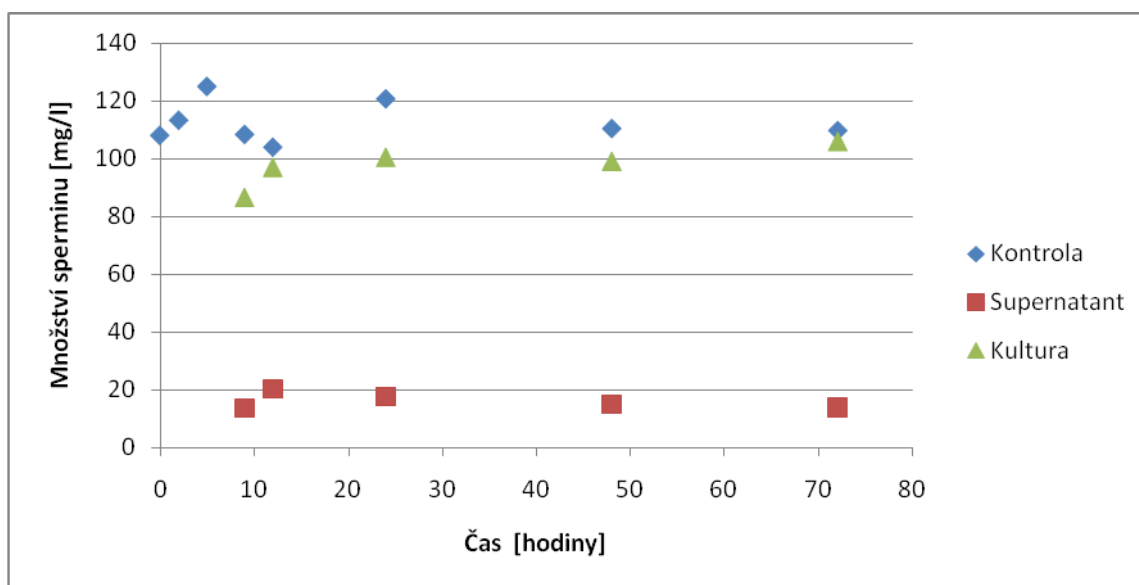
Obrázek 5: Vliv přidavku *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 v čase 0 hodin na produkci sperminu u kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89



Obrázek 6: Vliv přidavku *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 v čase 2 hodiny na produkci sperminu u kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89

Z grafu na obrázku 6 je na první pohled zřejmé, že přidavek inhibičního supernatantu CCDM 686 měl efekt na produkci sperminu, statisticky významný rozdíl ve snížení pro-

dukce nastal v čase 9, 12, 24, 48 a 72 hodin ($P < 0,05$). Oproti kontrolnímu vzorku došlo po přidavku supernatantu po 2 hodinách kultivace ke snížení z původních 113,3 mg/l na 84,5 mg/l, tedy o 24,1 % ($P > 0,05$). Po 72 hodinách činil rozdíl 69,8 % z původních 109,8 mg/l na 33,2 mg/l. Naopak po přidavku inhibiční kultury došlo ke zvýšení množství sperminu, obzvláště v prvních 12 hodinách. Během další kultivace se množství sperminu významně neměnilo, oproti množství detekované v čase 9 hodin, a po 72 hodinách byl obsah oproti kontrolnímu vzorku navýšen o 39,1 % na 152,7 mg/l ($P < 0,05$).



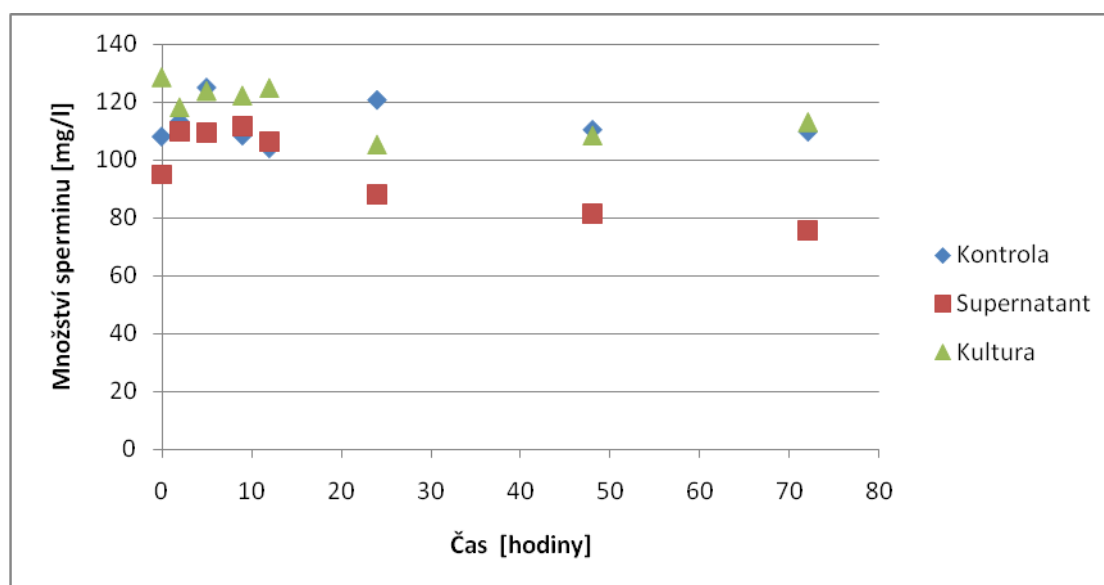
Obrázek 7: Vliv přidavku *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 v čase 9 hodin na produkci sperminu u kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89

Přídavek inhibiční kultury ($P > 0,05$) i supernatantu ($P < 0,05$) v čase 9 hodin měl inhibiční vliv na produkci sperminu (viz obrázek 7) ve srovnání s kontrolou. Po přidavku supernatantu v čase 9 hodin došlo ke snížení vyprodukovaného sperminu na 13,6 mg/l, což představuje redukci o 87,5 %. V dalším odběrovém čase 12 hodin bylo zaznamenáno mírné navýšení množství sperminu na 20,2 mg/l ($P < 0,05$), ale posléze došlo opět ke snížení jeho obsahu a po zbývajícím čase kultivace se jeho obsah významně neměnil oproti první detekované hodnotě v čase 9 hodin. Redukční vliv na množství vyprodukovaného sperminu měl taktéž přídavek inhibiční kultury a to ve všech odběrných časech. Největší rozdíl byl zaznamenán v čase 9 hodin, a to snížení na 86,5 mg/l, což představuje rozdíl oproti kontrolní hodnotě 20,2 % ($P < 0,05$). V dalších odběrných časech bylo zaznamenáno mírné navýšení množství a v čase 72 hodin byl obsah oproti kontrolnímu vzorku snížen o 3,3 % ($P > 0,05$).

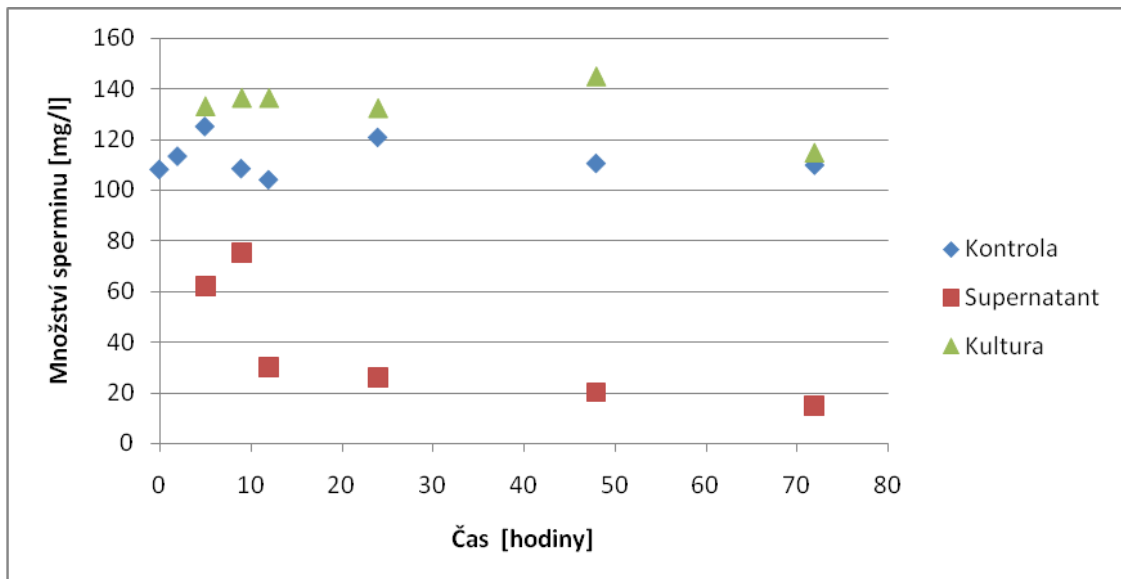
Získané výsledky po přidavku inhibiční kultury *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 nebo příslušného supernatantu jsou v souladu s počtem mikroorganismů a růstovou křivkou (viz příloha 1) z které je viditelné, že přídavek inhibičního činitele má přímý vliv na snížení počtu produkčního kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 a tím pádem i na obsah vyprodukovaného sperminu.

7.2.2 Produkce sperminu kmenem *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 za přidavku inhibiční kultury nebo supernatantu *Lactococcus lactis* CCDM 689

Na obrázku 8 lze pozorovat, že u kontrolního vzorku rostlo množství vyprodukovaného sperminu v prvních 5 hodinách ($P < 0,05$). Nejvyšší detekované množství u kontroly bylo zaznamenáno v čase 5 hodin a to 125,0 mg/l. Přídavek inhibičního supernatantu měl vliv na snížení v časech 0, 2, 5, 24, 48 a 72 hodin. V časech 9 a 12 hodin došlo po přidavku supernatantu naopak k mírnému navýšení množství ($P > 0,05$) vyprodukovaného sperminu o 3,2 % (9 hodin) a 2,4 % (12 hodin). V čase 72 hodin bylo zaznamenáno významné snížení vyprodukovaného sperminu ($P < 0,05$) na množství 75,7 mg/l což odpovídá snížení o 31,0 %. Po přidavku inhibiční kultury došlo v časech 0 a 12 hodin k významnému navýšení množství sperminu ($P < 0,05$). Největší inhibiční efekt byl zaznamenán v čase 24 hodin, kdy bylo detekováno 105,4 mg/l což představuje redukcí o 12,7 % ($P > 0,05$). V čase 48 hodin bylo množství sperminu s kontrolou takřka totožné.

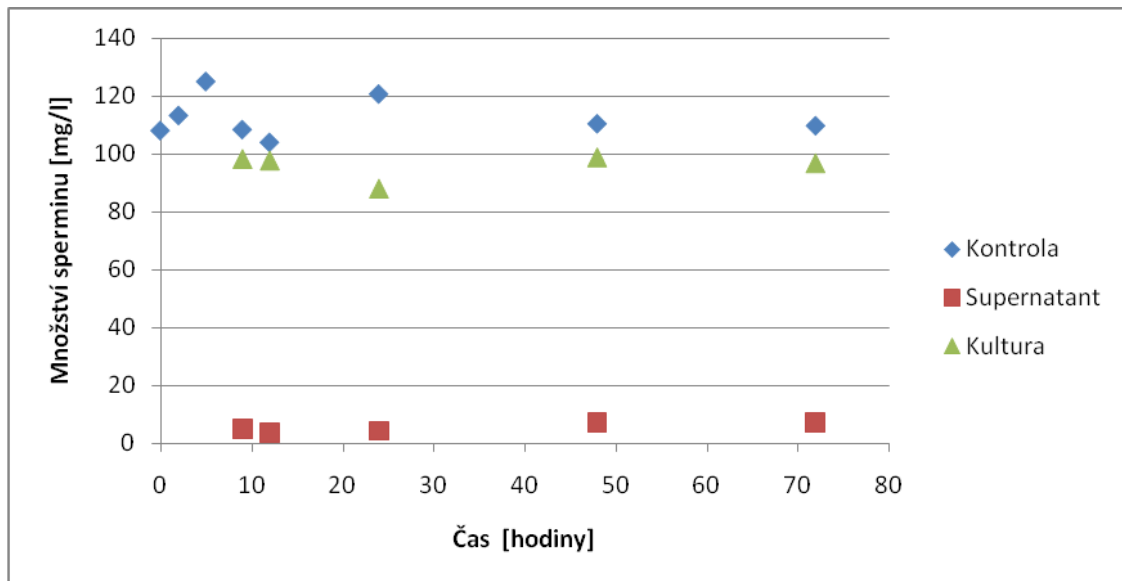


Obrázek 8: Vliv přidavku *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 689 v čase 0 hodin na produkci sperminu u kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89



Obrázek 9: Vliv přidavku *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 689 v čase 5 hodin na produkci sperminu u kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89

Na obrázku 9 lze pozorovat, že přidavek supernatantu měl redukční vliv na množství vyprodukovaného sperminu. Ačkoliv v čase 9 hodin došlo k navýšení ve srovnání s přidavkem v čase 5 hodin ($P < 0,05$), a to z 62,0 mg/l na 75,2 mg/l (o 17,6 %), v dalších hodinách měl již přidavek významný inhibiční efekt ($P < 0,05$). K prudkému poklesu došlo po přidavku po 12 hodinách, kdy se obsah snížil na 30,0 mg/l, což představuje redukci o 60,1 % (oproti vzorku po přidavku v čase 5 hodin) a konečné množství v čase 72 hodin činilo 14,8 mg/l, redukce oproti kontrole 86,5 % ($P < 0,05$). Přidavek inhibiční kultury v žádném čase nevedl ke snížení množství vyprodukovaného sperminu. Ve všech případech došlo naopak ke zvýšení jeho obsahu, kdy největší rozdíl ($P < 0,05$) byl pozorován v čase 48 hodin, kontrolní hodnota byla 110,5 mg/l a po přidavku kultury 144,9 mg/l (navýšení o 31,1 %). V čase 72 hodin byl obsah sperminu nejnižší, a to 114,9 mg/l (ve srovnání po přidavku inhibiční kultury).



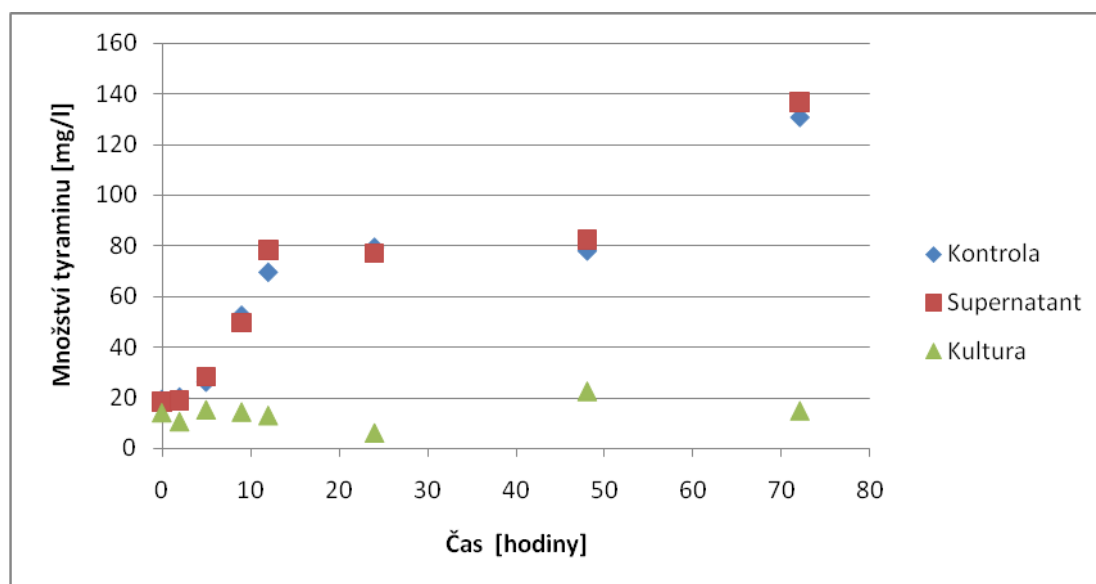
Obrázek 10: Vliv přidavku *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 689 v čase 9 hodin na produkci sperminu u kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89

Na obrázku 10 je zřejmé, že inhibiční vliv na produkci sperminu u kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 byl zaznamenán po přidavku supernatantu i kultury a to ve všech časech. Supernatant snížil obsah z 108,4 mg/l na 4,9 mg/l (oproti kontrole o 95,5 %) v čase 9 hodin ($P < 0,05$), na konci kultivace v čase 72 hodin došlo k redukci ($P < 0,05$) z kontrolních 109,8 mg/l na 7,1 mg/l, tedy o 93,6 %. Po přidavku kultury byl taktéž zaznamenán inhibiční efekt, který však byl méně patrný. Nicméně v čase 9 hodin došlo ke snížení ($P > 0,05$) oproti kontrole na 98,2 mg/l (redukce o 9,5 %) a v čase 72 hodin na 96,8 mg/l (redukce o 11,9 %). V čase 48 hodin byl detekován nejvyšší obsah sperminu ve srovnání s jednotlivými přidavky v čase u supernatantu v množství 7,2 mg/l a u inhibiční kultury 98,7 mg/l.

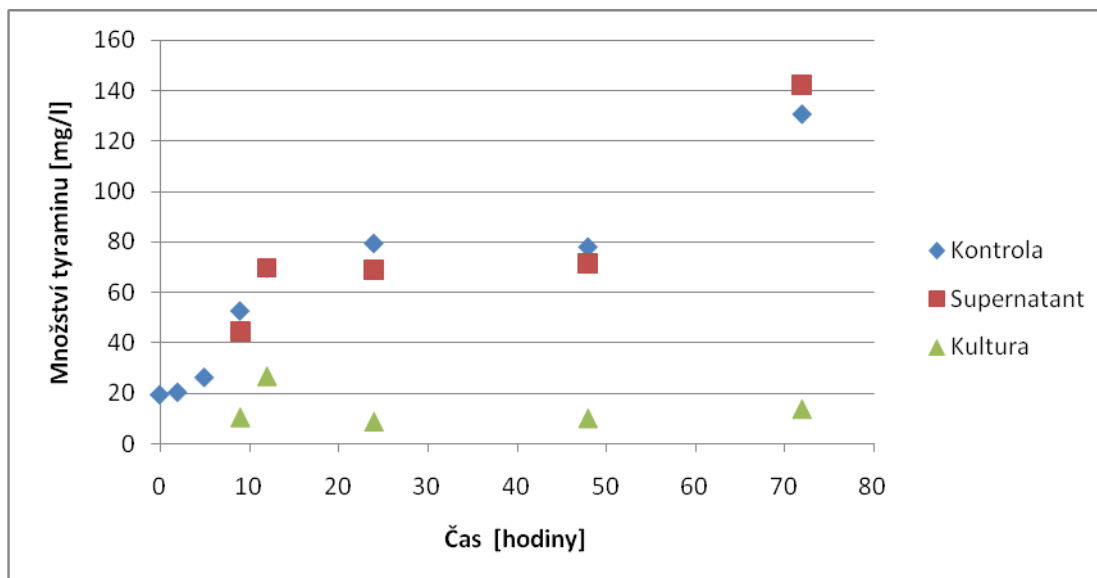
Výsledky kinetiky tvorby BA mají přímou souvislost s počtem životaschopných buněk produkčního kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89. Z růstových křivek (viz příloha 2) je patrné, že po přidavku inhibiční kultury *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 689 nebo příslušného supernatantu dochází ke snížení počtu *Lb. plantarum* RIBM 2-89a tím pádem i ke snížení produkce sperminu.

7.2.3 Produkce tyraminu kmenem *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 za přídavku inhibiční kultury nebo supernatantu *Lactococcus lactis* CCDM 686

Na obrázku 11 je možné sledovat vývoj množství vyprodukovaného tyraminu po přídavku inhibičního činitele v čase. U kontrolních vzorků došlo k trvalému navyšování množství tyraminu v čase. Na první pohled je zřejmé, že přídavek inhibiční kultury měl významný vliv na redukci tyraminu ($P < 0,05$), a to v časech 0, 2, 9, 24, 48 a 72 hodin. Oproti kontrole došlo po přídavku inhibiční kultury k redukci množství vyprodukovaného tyraminu a to ve všech detekovaných časech. Nejpatrnější byl rozdíl v množství tyraminu oproti kontrole v čase 72 hodin, kdy se množství snížilo z 130,7 mg/l na 14,6 mg/l, což představuje redukci o 88,8 %. Nejvyšší množství tyraminu 22,4 mg/l bylo zaznamenáno v čase 48 hodin ve srovnání s ostatními přídavky inhibiční kultury. Přídavek inhibičního supernatantu neměl výrazný efekt na snížení produkce tyraminu. Přídavek v časech 0, 2, 9 a 24 hodin vedl k nepatrnému snížení jeho množství ($P > 0,05$), v řádu jednotek, a naopak v časech přídavku 5, 12, 48 a 72 hodin vedl ke zvýšení obsahu. Konečná hodnota v čase 72 hodin byla oproti kontrole vyšší o 4,6 % ($P > 0,05$).

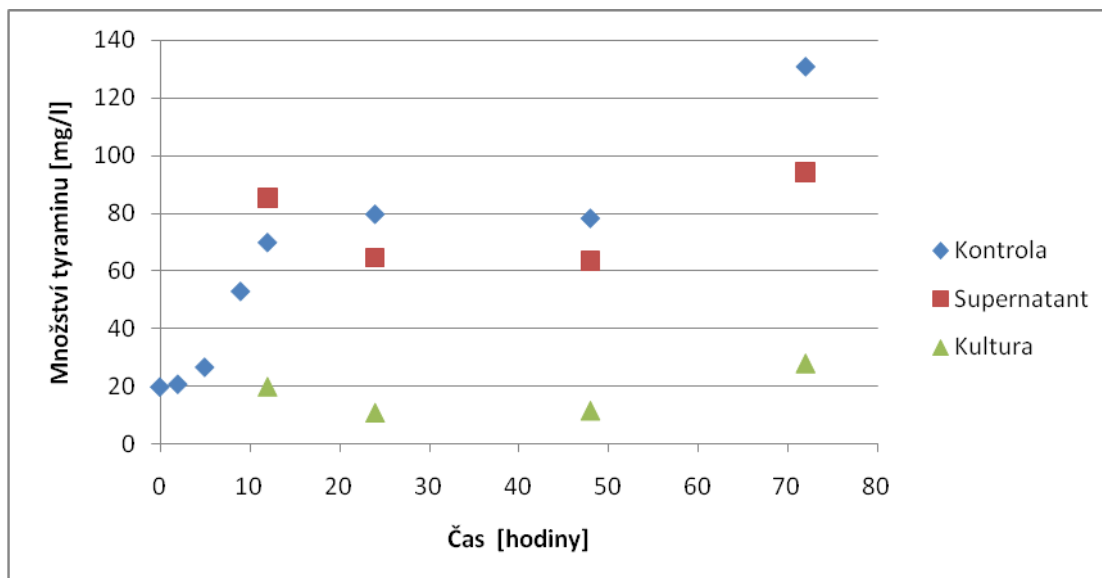


Obrázek 11: Vliv přídavku *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 v čase 0 hodin na produkci tyraminu u kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89



Obrázek 12: Vliv přidavku *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 v čase 9 hodin na produkci tyraminu u kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89

Na obrázku 12 je pozorovatelné, že přidavek inhibiční kultury měl ve všech časech zřejmý redukční efekt ($P < 0,05$) na množství vyprodukovaného tyraminu ve srovnání s kontrolními vzorky. V čase 12 hodin bylo detekováno nejvyšší zaznamenané množství ve vzorcích s navyšujícím se přidavkem inhibiční kultury, a to 26,5 mg/l, což ale i přesto vedlo k redukcí oproti kontrolním vzorkům o 62,0 % ($P < 0,05$). V časech 9, 24, 48 a 72 hodin nepřekročilo množství tyraminu hodnotu 13,5 mg/l. Inhibiční efekt supernatantu na množství tyraminu oproti kontrolním vzorkům byl zaznamenán ($P > 0,05$) v časech 9, 24 a 48 hodin. V čase 12 hodin bylo množství tyraminu ve stejném množství jako u kontroly, a to 69,6 mg/l. V čase 72 hodin naopak došlo k navýšení množství ($P < 0,05$) na 142,4 mg/l což představuje rozdíl 9,0 %.



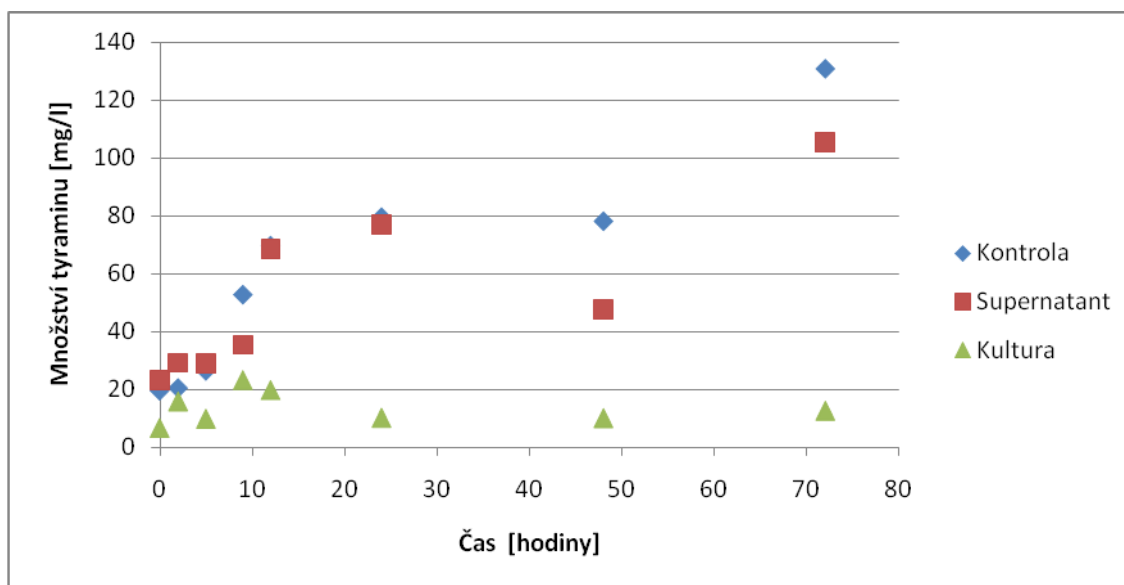
Obrázek 13: Vliv přidavku *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 v čase 12 hodin na produkci tyraminu u kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89

Přídavek inhibiční kultury měl ve všech monitorovaných časech vliv na množství vyprodukovaného tyraminu ve srovnání s kontrolou (obrázek 13). V čase 12 hodin bylo zaznamenáno množství 19,9 mg/l, v čase 24 a 48 hodin došlo ke snížení množství ($P < 0,05$). V čase 72 hodin byl obsah tyraminu nejvyšší 28,0 mg/l, ale zároveň v tomto čase byl zaznamenána taktéž největší redukce 78,6 % oproti kontrolnímu vzorku ($P < 0,05$). Po přidavku inhibičního supernatantu došlo v čase 12 hodin k navýšení množství ($P > 0,05$) oproti kontrolnímu vzorku na 85,1 mg/l, ale v dalších časech měl přídavek již redukční vliv. Konečná hodnota v čase 72 hodin byla o 28 % nižší než v kontrolním vzorku ($P > 0,05$).

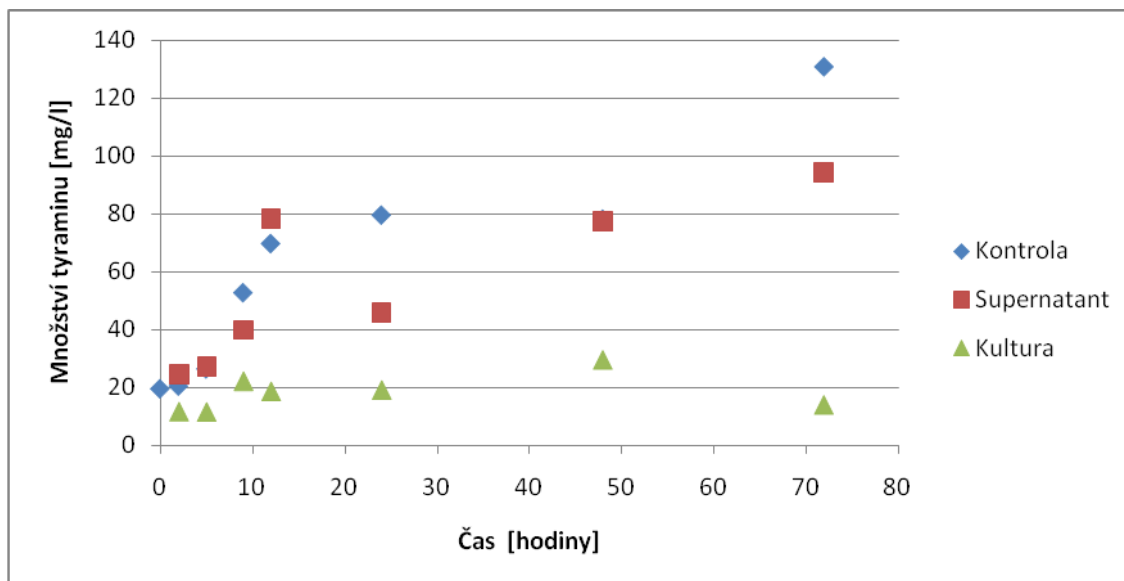
Dosažené výsledky po přidavku inhibiční kultury *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 nebo příslušného supernatantu jsou v korelaci s počtem mikroorganismů a růstovou křivkou kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 (viz příloha 1), z které je patrné, že ve srovnání s kontrolou byly počty mikroorganismů nižší v obou případech (po přidavku kultury nebo supernatantu).

7.2.4 Produkce tyraminu kmenem *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 za přídavku inhibiční kultury nebo supernatantu *Lactococcus lactis* CCDM 689

Z obrázku 14 je patrné, že po přídavku inhibiční kultury došlo u kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 ke snížení vyprodukovaného tyraminu oproti srovnání s kontrolou ve všech případech. V počátečních přídavcích obsah tyraminu mírně stoupal a v čase 9 hodin byla detekována nejvyšší hodnota tyraminu 23,2 mg/l. V dalších časech přídavku jeho obsah již postupně klesal a v konečném čase 72 hodin bylo zaznamenáno množství 12,7 mg/l což představuje redukci ($P < 0,05$) oproti kontrole 90,3 %. Po přídavku supernatantu došlo v časech 0, 2 a 5 hodin k navýšení obsahu tyraminu, ale pozdější přídavky měly již inhibující efekt. Nejvyšší hodnota byla zaznamenána v čase 72 hodin a to 105,6 mg/l. Největší redukce o 39,1 % byla v čase 48 hodin ($P > 0,05$).

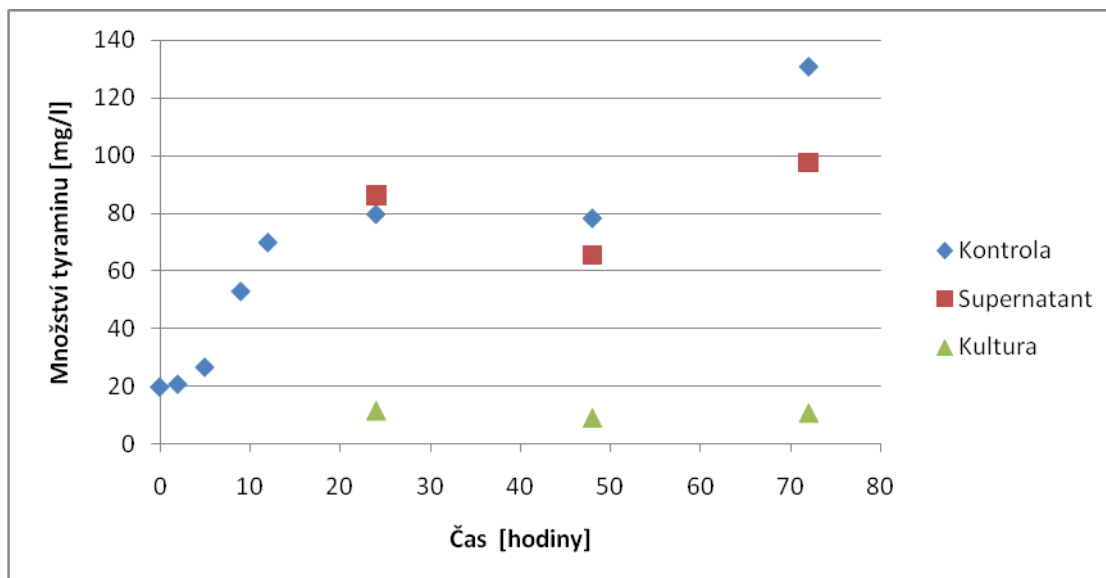


Obrázek 14: Vliv přídavku *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 689 v čase 0 hodin na produkci tyraminu u kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89



Obrázek 15: Vliv přidavku *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 689 v čase 2 hodiny na produkci tyraminu u kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89

Z obrázku 15 je zřejmé, že přidavek inhibiční kultury měl významný vliv ($P < 0,05$) na snížení produkce tyraminu. K největší redukci docházelo s pozdějšími přidavky a to konkrétně v časech 12, 24, 48 a 72 hodin. V čase 2 a 5 hodin, nebyl přidavek na inhibiční aktivitu příliš patrný, přesto však snížení množství vyprodukovaného tyraminu bylo statisticky významné ($P < 0,05$). V čase 72 hodin byl zaznamenán největší efekt ($P < 0,05$) na snížení vyprodukovaného množství tyraminu ve srovnání s kontrolou, a to na 14,0 mg/l, což představuje redukci o 89,3 %. Naopak přidavek supernatantu v čase 12 hodin vedl ke zvýšení množství vyprodukovaného tyraminu o 12,4 %. S pozdějším přidavkem (čas 24, 48 a 72 hodin) byl již patrný inhibiční efekt ve srovnání s kontrolou. Významnější redukce byla zaznamenána v čase 24 hodin ($P < 0,05$) na hodnotu 45,7 mg/l a v čase 72 hodin na hodnotu 94,4 mg/l.



Obrázek 16: Vliv přidavku *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 689 v čase 24 hodin na produkci tyraminu u kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89

Na obrázku 16 lze pozorovat viditelný rozdíl v množství vyprodukovaného tyraminu po přidavku inhibiční kultury. Ve všech časech došlo k významnému snížení produkce ($P < 0,05$) tohoto biogenního aminu. Nejvyšší detekované množství nepřesáhlo hodnotu 11,6 mg/l v čase 24 hodin. Největší inhibiční efekt je pozorovatelný v čase přidavku 72 hodin ($P < 0,05$), kdy z původní kontrolní hodnoty 130,7 mg/l došlo k redukci na 10,8 mg/l což představuje snížení množství o 91,7 %. Přídavek inhibičního supernatantu není na první pohled tak patrný. V čase 24 hodin došlo naopak k mírnému navýšení vyprodukovaného množství ($P > 0,05$) o 8,4 %, ale v pozdějších časech byla již zaznamenána inhibiční aktivita. Nejvyšší naměřená hodnota 97,6 mg/l v čase 72 hodin, představovala zároveň i největší redukci ($P > 0,05$) a to o 25,3 %.

Souhrnně lze konstatovat, že naměřené výsledky jsou v souvislosti s počtem mikroorganismů a s uvedenou růstovou křivkou (viz příloha 2). Lze pozorovat, že po přidavku inhibiční kultury *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 689 dochází k inhibici růstu produkčního kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 a tedy i ke snížení produkce tyraminu. Při porovnání růstové křivky (viz příloha 2) s grafy produkce tyraminu po přidavku inhibičního činitele (obrázek 14 – 16) je patrná i souvislost, že inhibiční kultura má významnější vliv na redukci množství tyraminu.

7.3 Diskuze

V této diplomové práci byla sledována inhibiční aktivita vybraných bakterií mléčného kvašení produkující antimikrobiální látky, především bakteriociny, na vybrané bakterie mléčného kvašení s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou.

Ze získaných dat, lze odvodit, že taxonomicky příbuzný bakteriální druh produkující bakteriocin je zpravidla vůči inhibičnímu působení téhož rodu rezistentní, což se prokázalo v případě použití inhibiční kultury *Enterococcus faecium* CCDM 945, která neinhibovala růst *Enterococcus durans* CCDM 53, *Enterococcus faecalis* T43 ani *Enterococcus* sp. T19 a T20. Totéž se podařilo prokázat u rodu *Lactobacillus*, konkrétně rodů *Lb. acidophilus*, *Lb. gasseri* a *Lb. helveticus*, který ve většině případů neinhiboval růst *Lactobacillus curvatus*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* či *Lb. sakei*. Pouze u inhibičního kmene *Lactobacillus gasseri* CCDM 377 byla u většiny zmíněných laktobacilů detekována inhibiční aktivita, což je pravděpodobně zapříčiněno tím, že inhibiční *Lb. gasseri* produkuje specifický protein se sofistikovaným inhibičním mechanismem, který představuje jistou konkurenční výhodu. Během monitoringu citlivosti se také podařilo prokázat, že citlivost vůči inhibičním látkám je častěji podobná v rámci určitého druhu než, že by byla tato vlastnost typická pro konkrétní rod. Kupříkladu všechny testované kultury *Lactobacillus brevis* vykazovaly inhibiční působení vůči kulturám CCDM 670, CCDM 686, CCDM 689, CCDM 695, CCDM 698, CCDM 731, CCDM 71, CCDM 702 a CCDM 671. Nicméně i v rámci jednoho druhu mohou existovat rozdíly v inhibiční aktivitě, dány pravděpodobně rozdílností kmene, a vykazovat tedy různou citlivost na působení inhibičních kultur. Například *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 byl inhibován *Lactobacillus helveticus* CCDM 125, ale *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 nevykazoval žádnou citlivost vůči působení této kultury. Takovéto odchylky mohou být pravděpodobně způsobeny různými mutacemi v rámci určitého bakteriálního kmene či specifickými degradačními procesy uvnitř buňky. Dále se podařilo zjistit, že zvýšená citlivost na inhibiční látky je pravděpodobnější, pokud dochází k inhibici u rozdílných bakteriálních rodů. V tomto případě se jedná konkrétně o inhibici rodem *Lactococcus* (který dle předchozího screeningu produkuje nisin) a vykazoval poměrně dobré inhibiční účinky na rod *Lactobacillus*.

Při sledování kinetiky tvorby biogenních aminů v čase u *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 při teplotě kultivace 30 °C bylo zjištěno, že po přidavku inhibiční kultury nebo přísluš-

ného supernatantu měl vliv na konečný obsah vyprodukovaného sledovaného biogenního aminu. Obecně lze konstatovat, že přídavky v pozdějších časech měly vyšší efekt.

Konkrétně přídavek supernatantu kultury CCDM 686 měl inhibiční efekt na růst produkčního kmene a tím pádem i na množství vytvořeného sperminu. Nejnižší zaznamenané množství bylo v případě aplikace supernatantu ve dvanácté hodině, kdy se množství sperminu snížilo po 72 hodinách kultivace až na 4,3 mg/l. Naopak po přídavku inhibiční kultury CCDM 686 došlo ve většině případů k postupnému navýšení množství vyprodukovaného sperminu a inhibiční efekt byl minimální. Z tohoto lze usoudit, že inhibiční kmen *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* pravděpodobně taktéž disponuje dekarboxylační aktivitou a tudíž došlo k akumulaci sperminu v kultivačním bujónu. Při použití supernatantu kultury CCDM 689 na produkci sperminu byl sledován obdobný efekt. Supernatant vykazoval inhibiční vliv, a to především v přídavku v pozdějších časech, kdy se po 72 hodinách obsah sperminu ve srovnání s kontrolními vzorky několikanásobně snížil. Při použití inhibiční kultury, došlo především v prvních hodinách kultivace ke zvýšení množství sperminu a taktéž až pozdější přídavky zapříčinily inhibiční působení.

Opačný trend lze pozorovat po přídavku inhibičního supernatantu CCDM 686 na produkci tyraminu. Přídavky v prvních hodinách kultivace neměly výrazný vliv na změnu obsahu tyraminu, ale v pozdějších hodinách vykazovaly vzorky již výraznější rozdíly. Od přídavku inhibiční kultury, respektive supernatantu v čase 2, 5 a 12 hodin byl v konečném čase obsah tyraminu nižší ve srovnání s kontrolou, naopak od přídavku v časech 9 a 24 hodin se konečný obsah navýšil. Mnohem zajímavější výsledky byly dosaženy, při testování inhibiční kultury CCDM 686, neboť ve všech případech byly detekovány nižší hodnoty tyraminu ve srovnání s kontrolou. Nejvyšší detekovaná hodnota tyraminu byla od přídavku ve 12 hodině v konečném čase 28 mg/l.

Podobných výsledků bylo dosaženo i v případě použití inhibičního supernatantu kultury CCDM 689, který neměl příliš významný vliv na redukci vyprodukovaného množství tyraminu. Ke snížení konečného množství po 72 hodinách kultivace došlo u vzorků, do kterých byl supernatant aplikován od 0, 2, 9 a 24 hodin. Při použití inhibiční kultury CCDM 689 bylo možné pozorovat vliv na snížení tyraminu již od prvních hodin kultivace. Nejlepších výsledků bylo dosaženo v pozdějších časech aplikace.

Obecně lze shrnout, že přídavek inhibičního kmene či supernatantu má vliv na snížení produkce biogenních aminů. Nicméně u konkrétních biogenních aminů velmi záleží, zda je

použita inhibiční kultura, tj. životaschopné buňky, či pouze příslušný supernatant. Taktéž je nutné otestovat použité kultury na dekarboxylázovou aktivitu a zamezit tím případnému nechtěnému zvýšení množství biogenních aminů a zkreslení výsledků. Při použití inhibiční kultury CCDM 686 či CCDM 689 se podařilo ve zkoumaných vzorcích snížit množství vyprodukovaného tyraminu, což si lze vysvětlit několika způsoby. Inhibiční kultura produkovala dostatečné množství inhibiční látky, která měla pozitivní vliv na snížení bakteriální populace (produkčního *Lb. plantarum* RIBM 2-89) a tudíž přímý vliv na snížení vyprodukovaného množství tyraminu. Další možností je, že inhibiční kmen disponuje tyramin oxidázou vedoucí k degradaci tohoto biogenního aminu nebo, tyramin spotřebovávají pro biosyntetické pochody v buňce.

Díky nežádoucím účinkům na zdraví konzumentů, je sledování množství biogenních aminů v potravinách v posledních letech velmi aktuálním tématem. Na možnostech zastavení či alespoň snížení produkce a akumulace se podílí mnoho výzkumných pracovníků či vědeckých pracovišť. Jelikož cesta k cíli není vždy jednoduchá a výzkumy jsou zdoluhavé, není v současné době ani mnoho dostupných studií, které by se zabývaly snížením produkce biogenních aminů za použití bakterií produkující bakteriociny. Proto jsou v následující diskuzi použity články alespoň s co nejbližší tematikou.

Autor Zhang et al [45] vypracoval studii týkající se schopnosti snížení hromadění biogenních aminů pomocí dekarboxyláza negativní *Lactobacillus plantarum* ZY-40 během výrobního procesu fermentovaných rybích klobás. Zároveň byly vyhodnoceny parametry jako počet mikroorganismů, pH a obsah volných aminokyselin. Jako vstupní surovina sloužil čerstvý tolstolobik, který prošel následným technologickým opracováním, a vzniklé dílo bylo rozděleno do dvou šarží. Do první šarže byla aplikována kultura *Lactobacillus plantarum* ZY-40 a jako kontrolní vzorky byly použity výrobky z druhé šarže, které neobsahovaly výše zmíněnou protektivní kulturu. Poté byly výrobky podrobeny zracímu procesu za definovaných podmínek a 3 náhodně vybrané výrobky z každé šarže byly podrobeny mikrobiální a chemické analýze. U výrobků s protektivní kulturou z první šarže bylo dosaženo po zracím procesu snížení růstu nežádoucích bakterií *Pseudomonas* a *Enterobacteriaceae*, což bylo zapříčiněno produkcí kyseliny mléčné metabolizmem *Lb. plantarum* a díky tomu k rychlému poklesu pH. Podařilo se také snížit obsah putrescinu a kadaverinu o více než 70 %, ale akumulace tyraminu nebyla ovlivněna. Dosažené výsledky lze odůvodnit tím, že snížení počtu bakterií s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou (*Pseudomonas* a *Enterobacteriaceae*) vedlo taktéž k nižší produkci biogenních aminů. Na druhou stranu *Lb.*

plantarum nedokázal inhibovat růst bakterií schopných produkovat tyramin. Pro výrobu bezpečnějších produktů je tedy přínosné použít startovací kulturu BMK, která zabraňuje nadměrné produkci a akumulaci biogenních aminů.

Capozzi et al. [48] se zabýval studiem degradace biogenních aminů *in vitro*, s použitím *Lactobacillus plantarum* a možném potencionálním využití pro snížení jejich akumulace ve vínu. Ve své práci analyzovali 26 kmenů *Lactobacillus plantarum* pro svou schopnost degradovat biogenní aminy, které se běžně vyskytují v průběhu kvašení vína. Zkumavky s MRS bujónem (a příslušnými aminokyselinami, jako prekurzory biogenních aminů) byly zaočkovány degradačním kmenem *Lb. plantarum*. Jako kontrolní vzorky byly použity zkumavky bez přídavku *Lb. plantarum*. Vzorky MRS bujónu byly odebírány po 24 hodinách a obsah biogenních aminů stanoven pomocí HPLC. Bylo zjištěno, že dva kmeny izolátů z červeného vína *Lb. plantarum* byly schopny degradovat putrescin a tyramin a tím pádem snížit jejich obsah v potencionálním finálním výrobku. Dále byl potvrzen vědecký důkaz o tom, že schopnost degradovat biogenní aminy je specifická vlastnost pro určitý druh i kmen.

Autor Tabanelli et al. [35] zkoumal 25 bakterií mléčného kvašení izolovaných z mléka na schopnost produkovat bakteriociny. Výsledky ukázaly, že tři kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* vyhověly těmto kritériím a byly schopny bakteriociny produkovat. Syntetizované antimikrobiální látky vykazovaly účinnost proti dvěma bakteriím mléčného kvašení s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou. Konkrétně se jednalo o *Enterococcus faecalis* EF37 schopný produkovat tyramin a *Streptococcus thermophilus* PRI60 produkující histamin. Zaočkovaný bujón s příslušnými aminokyselinami, produkčním kmenem a inhibičním laktokokem byl po kultivaci analyzován pomocí HPLC s pre-kolonovou derivatizací na stanovení produkce biogenních aminů. Ze získaných dat bylo možné vyhodnotit, že společná kultivace *E. faecalis* EF37 společně s laktokoky vedla k výrazné inhibici růstu tohoto produkčního kmene, a tím pádem byla snížena i akumulace tyraminu. Všechny inhibiční laktokoky vykazovaly větší inhibiční efekt vůči streptokokům ve srovnání s *E. faecalis* EF37, zejména kmen *L. lactis* subsp. *lactis* VR84 dokázal streptokoky usmrtit. Další dva kmeny laktokoků nevykazovaly smrtící účinek proti *S. thermophilus* PRI60, ale byly schopny inhibovat jeho růst a tím i snížit akumulaci histaminu. Dále tato předběžná studie potvrdila, že různé bakteriociny mohou mít různé účinky na produkci BA na stejný kmen a taktéž, že inhibiční efekt je silně závislý na poměru na prvotní koncentraci buněk produkčních i inhibičních kmenů.

Autorka Latorre-Moratalla et al. [49] se zabývala studiem možnosti snížení biogenních aminů během výroby tradičních fermentovaných regionálních klobás. Kontrolní vzorky byly vyrobeny paralelně bez přídavku startovací kultury. Jako startovací kultury byly použity mikroorganismy již dříve izolované z těchto regionálních masných výrobků. U všech kmenů byla prokázána negativní dekarboxylázová aktivita. Vyrobené vzorky byly podrobeny analýzám na stanovení obsahu biogenních aminů ve třech fázích výroby (hotové dílo před plněním, po fermentačním procesu a finální výrobek připravený ke konzumaci po zracím procesu). Snížení množství akumulace biogenních aminů byla silně závislá na použitém druhu a kmenu daného mikroorganismu. Největšího snížení tyraminu (62 %) a histaminu (71 %) bylo dosaženo za použití *Lactobacillus sakei* v řecké klobáse thasou. Naopak v portugalském chourisu se podařilo za použití kultury *Staphylococcus equorum* snížení množství kadaverinu o 45 %. Ve španělském fuetu při použití kombinace kultury *Lb. sakei* CTC6626 a *S. xylosus* CTC6013 se podařilo snížit množství tyraminu o 19 % a při použití kmene *Lb. sakei* CTC494 a *S. xylosus* CTC6013 vedlo ke snížení o 50 %. Celkově proto lze říci, že aplikované výrobní postupy, použité přísady a vstupní suroviny mají u vybraných produktů velmi odlišné účinky na snížení množství biogenních aminů ve srovnání s kontrolními vzorky.

Rabie et al. [50] ve své práci zkoumal možnost snížení obsahu biogenních aminů ve spontánně kvašeném zelí prostřednictvím přídavku specifických kmenů bakterií mléčného kvašení. Pro tyto účely byly vybrány kmeny *Lactobacillus plantarum* 2142, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 2763 a *Lactobacillus curvatus* 2771. Kvašené zelí zakoupené v komerční síti bylo přendáno do skleněných lahví, smíseno s roztokem chloridu sodného a zaočkováno některým z uvedených laktobacilů v množství 10^6 CFU/ml. Kontrolní vzorek byl bez přídavku kultury. Inkubace probíhala 10 dní při teplotě 15 °C a doba skladování činila 45 dní při teplotě 5 – 6 °C. Po uplynutí této doby bylo stanoveno množství volných aminokyselin a biogenních aminů. Ze získaných dat bylo zjištěno, že všechny vzorky inokulované laktobacily obsahovaly menší obsah biogenních aminů ve srovnání s kontrolou. Každý z analyzovaných biogenních aminů byl detekován na hranici detekce (pod 100 ppm). U kontrolního vzorku byl zjištěn obsah putrescinu a v menším množství také tyraminu a histaminu. Závěrem lze říci, že všechny testované kmeny se ukázaly jako vhodné protektivní kultury.

ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na zmapování inhibičního působení protektivních kultur na vybrané bakterie mléčného kvašení s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou a dále byla u kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 monitorována kinetika produkce biogenních aminů v čase za zvyšujícího se přídávku antimikrobiálního kmene (*Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 / CCDM 689) či jeho metabolitů v podmínkách *in vitro*.

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že:

- citlivost vůči působení inhibiční kultury byla rozdílná v rámci rodu, druhu i kmene
- inhibiční *Enterococcus faecium* CCDM 945 neinhiboval mikroorganismy produkující biogenní aminy v rámci svého rodu
- pomocí kapalinové chromatografie byla stanovena produkce biogenních aminů sperminu a tyraminu u *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89
- produkce biogenních aminů tryptaminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu a spermidinu nebyla u *Lb. plantarum* RIBM 2-89 zaznamenána
- přídavek supernatantu kultury *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 měl inhibiční vliv na produkci sperminu u *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89
- přídavek supernatantu kultury *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 689 měl inhibiční vliv na produkci sperminu u *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89
- přídavek kultury *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 měl inhibiční vliv na produkci tyraminu u *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89
- přídavek kultury *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 689 měl inhibiční vliv na produkci tyraminu u *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89
- obecně měli významnější inhibiční efekt přídávky v pozdějším čase

Dosažené poznatky naznačují vzájemné antagonistické působení bakterií a možnosti snížení akumulace biogenních aminů v potravinách s použitím protektivních kultur. Dosažení bezpečných a zdravotně nezávadných potravin je důležitým cílem pro výrobce i konzumenty a využití mechanismů působení inhibičních kultur je možností, jak tohoto dosáhnout přírodní cestou. Určitě je důležité tyto mechanismy prozkoumat hlouběji, najít vzájemné

vztahy mezi jednotlivými organizmy a aplikovat tyto experimenty i do reálných systémů (potravin).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SALMINEN, Seppo, Atte von WRIGHT a Arthur OUWEHAND. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. 3rd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, c2004, 633 p. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 139. ISBN 08-247-5332-1. \nl{ }.
- [2] KLAENHAMMER, T, R BARRANGOU, B BUCK, M AZCARATEPERIL a E ALTERMANN. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, vol. 29, issue 3, s. 393-409. DOI: 10.1016/j.femsre.2005.04.007.
- [3] ADAMS, M a M MOSS. *Food microbiology*. 3rd ed. Cambridge, UK: RSC Publishing, c2008, xiv, 463 p. ISBN 08-540-4284-9.
- [4] SONOMOTO, Kenji a Atsushi YOKOTA. *Lactic acid bacteria and bifidobacteria: current progress in advanced research*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, c2011, viii, 286 p. ISBN 19-044-5582-4.
- [5] KLIJN, A, A MERCENIER a F ARIGONI. Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, vol. 29, issue 3, s. 491-509. DOI: 10.1016/j.femsre.2005.04.010. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.femsre.2005.04.010>.
- [6] BERNARDEAU, Marion, Micheline GUGUEN a Jean Paul VERNOUX. Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiology Reviews*. 2006, vol. 30, issue 4, s. 487-513. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2006.00020.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1574-6976.2006.00020.x>.
- [7] AN, Ying, Yoshikazu ADACHI a Yasuki OGAWA. Classification of lactic acid bacteria isolated from chigee and mare milk collected in Inner Mongolia. *Animal Science Journal*. 2004, vol. 75, issue 3, s. 245-252. DOI: 10.1111/j.1740-0929.2004.00183.x.
- [8] CLAESSION, Marcus J., Douwe VAN SINDEREN a Paul W. O'TOOLE. The genus *Lactobacillus* a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiology Letters*. 2007, vol. 269, issue 1, s. 22-28. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00596.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1574-6968.2006.00596.x>.

- [9] PRITCHARD, Graham G. a Tim COOLBEAR. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993, vol. 12, 1-3, s. 179-206. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1993.tb00018.x.
- [20] SCHNÜRER, Johan a Jesper MAGNUSSON. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science*. 2005, vol. 16, 1-3, s. 70-78. DOI: 10.1016/j.tifs.2004.02.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224404001943>.
- [31] MESSENS, Winy a Luc De VUYST. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs—a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2002, vol. 72, 1-2, s. 31-43. DOI: 10.1016/s0168-1605(01)00611-0. Dostupné z: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro.
- [42] GHANBARI, Mahdi, Mansooreh JAMI, Konrad J. DOMIG, Wolfgang KNEIFEL, Michael E. STILES, Panchanathan MANIVASAGAN, Jayachandran VENKATESAN, Se-Kwon KIM, Belal J, Zaiton HASSAN a Nazamid SAARI. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria – A review. *LWT - Food Science and Technology*. 2013, vol. 54, issue 2, s. 341-360. DOI: 10.5772/51026.
- [53] NEVES, A, W POOL, J KOK, O KUIPERS a H SANTOS. Overview on sugar metabolism and its control in – The input from in vivo NMR. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, vol. 29, issue 3, s. 531-554. DOI: 10.1016/j.femsre.2005.04.005. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.femsre.2005.04.005>.
- [64] LANDETE, J.M., S. FERRER a I. PARDO. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control*. 2007, vol. 18, issue 12, s.1569-1574. DOI: 10.1016/j.foodcont.2006.12.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713507000059>.
- [75] GIRAFFA, Giorgio. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*. 2002, vol. 26, issue 2, s. 163-171. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00608.x.
- [86] HUTKINS, Robert W. *Microbiology and technology of fermented foods*. 1st ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2006, xi, 473 p. ISBN 978-0-8138-0018-9.
- [97] CAPLICE, E. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1999, vol. 50, 1-2, s. 131-149 [cit. 2015-02-16]. DOI: 10.1016/s0168-1605(99)00082-3.

- [108] DEVOS, W a E VAUGHAN. Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 1994, vol. 15, 2-3, s. 217-237. DOI: 10.1016/0168-6445(94)90114-7.
- [119] StrainInfo. *StrainInfo* [online]. 2014 [cit. 2014-10-30]. Dostupné z: <http://www.straininfo.net/taxa/832>.
- [20] WEGMANN, U., M. O'CONNELL-MOTHERWAY, A. ZOMER, G. BUIST, C. SHEARMAN, C. CANCHAYA, M. VENTURA, A. GOESMANN, M. J. GASSON, O. P. KUIPERS, D. VAN SINDEREN a J. KOK. Complete Genome Sequence of the Prototype Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Journal of Bacteriology*. 2007-04-03, vol. 189, issue 8, s. 3256-3270. DOI: 10.1128/JB.01768-06. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.01768-06>.
- [212] DELORME, C. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus* ☆. *International Journal of Food Microbiology*. 2008-09-01, vol. 126, issue 3, s. 274-277. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160507004448>.
- [22] OGIER, J a P SERROR. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus ☆. *International Journal of Food Microbiology*. 2008-09-01, vol. 126, issue 3, s. 291-301. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.017. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160507004473>.
- [23] HEMME, Denis a Catherine FOUCAUD-SCHEUNEMANN. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*. 2004, vol. 14, issue 6, s. 467-494. DOI: 10.1016/j.idairyj.2003.10.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694603002413>.
- [24] RAI, V a Jamuna A BAI. *Microbial food safety and preservation techniques*. p. ISBN 978-146-6593-060.
- [25] LACROIX, Edited by Christophe. *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation*. Oxford: Woodhead Publishing, 2011. ISBN 9780857090522.
- [26] NAIDU, A. *Natural food antimicrobial systems*. Boca Raton, FL: CRC Press, c2000, xiv, 818 p. ISBN 084932047x.

- [27] FARNAUD, Sebastien a Robert W EVANS. Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology* [online]. 2003, vol. 40, issue 7, s. 395-405 [cit. 2015-04-06]. DOI: 10.1016/s0161-5890(03)00152-4.
- [28] SKOVGAARD, Niels, S. J. FORSYTHE, P. R. HAYES, S. J. FORSYTHE, P. R. HAYES, M.G. KATSIKOIANNI a Y.F. MISSIRLIS. *Fundamental food microbiology. Third edition.* Washington: Crc press, 2003. ISBN 10.1039/9781847550880.
- [29] INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). *Microbial ecology of food commodities.* 2nd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, c2005, xvi, 763 p. ISBN 03-064-8675-X.
- [30] JAY, James M. *Modern food microbiology.* 7th ed. New York: Springer, 2005, 790 s. ISBN 03-872-3180-3.
- [313] JUNEJA, Vijay K a John Nikolaos SOFOS. *Control of foodborne microorganisms.* New York: Marcel Dekker, c2002, xi, 535 p. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.). ISBN 08-247-0573-4.
- [32] DAVIDSON, P, John Nikolaos SOFOS a Alfred Larry BRANEN. *Antimicrobials in food.* 3rd ed. Boca Raton: Taylor, 2005, 706 p. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 145. ISBN 978-082-4740-375.
- [33] VANDENBERGH, Peter A. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews.* 1993, vol. 12, 1-3, s. 221-237. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1993.tb00020.x. Dostupné z: <http://femsre.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00020.x>.
- [34] CIZEIKIENE, Dalia, Grazina JUODEIKIENE, Algimantas PASKEVICIUS a Elena BARTKIENE. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control.* 2013, vol. 31, issue 2, s. 539-545. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.12.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713512006561>.
- [35] TABANELLI, Giulia, Chiara MONTANARI, Eleonora BARGOSSI, Rosalba LANCIOTTI, Veronica GATTO, Giovanna FELIS, Sandra TORRIANI a Fausto GARDINI. Control of tyramine and histamine accumulation by lactic acid bacte-

- ria using bacteriocin forming lactococci. *International Journal of Food Microbiology*. 2014, vol. 190, č. 3, s. 14-23. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.023. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160514004279>.
- [36] SIDIRA, Marianthi, Alex GALANIS, Anastasios NIKOLAOU, Maria KANELLAKI a Yiannis KOURKOUTAS. Evaluation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 protective effect against spoilage of probiotic dry-fermented sausages. *Food Control*. 2014, vol. 42, s. 315-320. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.02.024. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713514000930>.
- [37] RAHMAN, Shafiur. *Handbook of food preservation: second edicion*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, c2007, xvii, 1068 p. Food science and technology (Taylor, 94. ISBN 15-744-4606-1.
- [38] BESHKOVA, Dora a Ginka FRENGOVA. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in Life Sciences*. 2012, vol. 12, issue 4, s. 419-432. DOI: 10.1002/elsc.201100127. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elsc.201100127>.
- [39] DICKS, L.M.T., F.D. MELLETT a L.C. HOFFMAN. Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. *Meat Science*. 2004, vol. 66, issue 3, s. 703-708. DOI: 10.1016/j.meatsci.2003.07.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030917400300192X>.
- [40] MILLS, SUSAN, ORLA O'SULLIVAN, COLIN HILL, GERALD FITZGERALD a R PAUL ROSS. The changing face of dairy starter culture research: From genomics to economics. *International Journal of Dairy Technology*. 2010, vol. 63, issue 2, s. 149-170. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2010.00563.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-0307.2010.00563.x>.
- [414] PEDERSEN, M, S IVERSEN, K SORENSEN a E JOHANSEN. The long and winding road from the research laboratory to industrial applications of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, vol. 29, issue 3, s. 611-624. DOI: 10.1016/j.femsre.2005.04.001. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.femsre.2005.04.001>.

- [42] HALÁSZ, Anna, Ágnes BARÁTH, Livia SIMON-SARKADI a Wilhelm HOLZAPFEL. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science*. 1994, vol. 5, issue 2, s. 42-49. DOI: 10.1016/0924-2244(94)90070-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0924224494900701>.
- [43] CHONG, C. Y., Abu BAKAR a F. RUSSLY. The effects of food processing on biogenic amines formation. *International Food Research Journal*. 2011, roč. 18, č. 3, s. 867-876.
- [44] ÖZOGUL, Fatih a Yesim ÖZOGUL. The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures. *European Food Research and Technology*. 2007-6-11, vol. 225, 3-4, s. 385-394. DOI: 10.1007/s00217-006-0429-3. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-006-0429-3>.
- [45] ZHANG, Qilin, Shenglin LIN a Xiaohua NIE. Reduction of biogenic amine accumulation in silver carp sausage by an amine-negative *Lactobacillus plantarum*. *Food Control* [online]. 2013, vol. 32, issue 2, s. 496-500 [cit. 2015-02-16]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.01.029.
- [46] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-86659-03-8.
- [47] SHALABY, Ali R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 1996, vol. 29, issue 7, s. 675-690. DOI: 10.1016/S0963-9969(96)00066-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399699600066X>.
- [48] CAPOZZI, Vittorio, Pasquale RUSSO, Victor LADERO, María FERNÁNDEZ, Daniela FIOCCO, Miguel A. ALVAREZ, Francesco GRIECO a Giuseppe SPANO. Biogenic Amines Degradation by *Lactobacillus plantarum*: Toward a Potential Application in Wine. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2012, vol. 3 [cit. 2015-04-20]. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00122.
- [49] LATORRE-MORATALLA, M.L., S. BOVER-CID, R. TALON, M. GARRIGA, E. ZANARDI, A. IANIERI, M.J. FRAQUEZA, M. ELIAS, E.H. DROSINOS a M.C. VIDAL-CAROU. Strategies to reduce biogenic amine accumulation in traditional sausage manufacturing. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2010, vol. 43, issue 1, s. 20-25 [cit. 2015-04-21]. DOI: 10.1016/j.lwt.2009.06.018.

- [50] RABIE, Mohamed A., Hassan SILIHA, Soher EL-SAYDY, Ahmed A. EL-BADAWY a F. Xavier MALCATA. Reduced biogenic amine contents in sauerkraut via addition of selected lactic acid bacteria. *Food Chemistry* [online]. 2011, vol. 129, issue 4, s. 1778-1782 [cit. 2015-04-21]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.05.106.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BMK	Bakterie mléčného kvašení
BA	Biogenní aminy
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CCDM	Culture Collection of Dairy Microorganisms
CFU	Colony Forming Unit

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Obecný mechanismus fermentace glukózy u BMK [17, upraveno]	16
Obrázek 2: Struktura nisinu A [1].....	27
Obrázek 3: Schéma experimentu agar well-diffusion test	47
Obrázek 4: Schéma experimentu sledování kinetiky tvorby BA.....	49
Obrázek 5: Vliv přídavku <i>Lactococcus lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> CCDM 686 v čase 0 hodin na produkci sperminu u kmene <i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89	60
Obrázek 6: Vliv přídavku <i>Lactococcus lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> CCDM 686 v čase 2 hodiny na produkci sperminu u kmene <i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89	60
Obrázek 7: Vliv přídavku <i>Lactococcus lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> CCDM 686 v čase 9 hodin na produkci sperminu u kmene <i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89	61
Obrázek 8: Vliv přídavku <i>Lactococcus lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> CCDM 689 v čase 0 hodin na produkci sperminu u kmene <i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89	62
Obrázek 9: Vliv přídavku <i>Lactococcus lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> CCDM 689 v čase 5 hodin na produkci sperminu u kmene <i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89	63
Obrázek 10: Vliv přídavku <i>Lactococcus lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> CCDM 689 v čase 9 hodin na produkci sperminu u kmene <i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89.....	64
Obrázek 11: Vliv přídavku <i>Lactococcus lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> CCDM 686 v čase 0 hodin na produkci tyraminu u kmene <i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89.....	65
Obrázek 12: Vliv přídavku <i>Lactococcus lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> CCDM 686 v čase 9 hodin na produkci tyraminu u kmene <i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89.....	66
Obrázek 13: Vliv přídavku <i>Lactococcus lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> CCDM 686 v čase 12 hodin na produkci tyraminu u kmene <i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89.....	67
Obrázek 14: Vliv přídavku <i>Lactococcus lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> CCDM 689 v čase 0 hodin na produkci tyraminu u kmene <i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89.....	68
Obrázek 15: Vliv přídavku <i>Lactococcus lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> CCDM 689 v čase 2 hodiny na produkci tyraminu u kmene <i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89.....	69

Obrázek 16: Vliv přídavku <i>Lactococcus lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> CCDM 689 v čase 24 hodin na produkci tyraminu u kmene <i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89.....	70
--	----

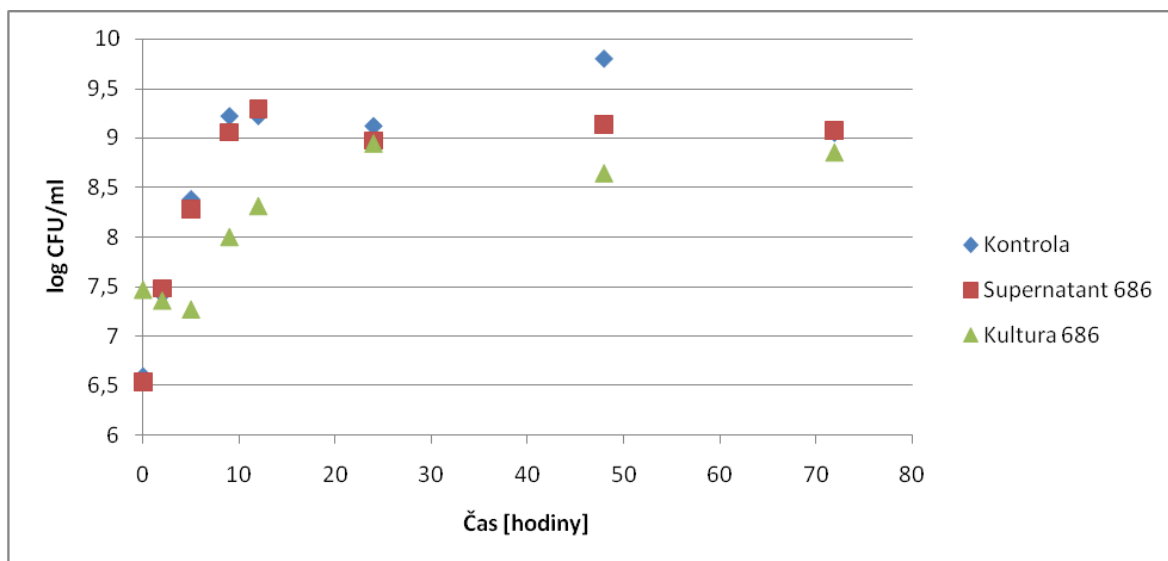
SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Využití kultur produkujících bakteriociny ke konzervaci potravin [1, 24, 25, 28, 31].....	30
Tabulka 2: Průmyslové aplikace protektivních kultur [25, 36, 37]	33
Tabulka 3: Chemická struktura a prekurzory biogenních aminů [42, 46]	37
Tabulka 4: Použité kmeny inhibičních kultur	42
Tabulka 5: Použité kmeny dekarboxyláza pozitivních kultur	43
Tabulka 6: Použité kultivační půdy pro stanovení počtu mikroorganismů	50
Tabulka 7: Gradientový eluční program HPLC.....	51
Tabulka 8: Velikost inhibičních zón (v mm) na sbírkové kmeny BMK	52
Tabulka 9: Velikost inhibičních zón (v mm) na vybrané kmeny BMK izolované ze sýrů	54
Tabulka 10: Velikost inhibičních zón (v mm) na vybrané kmeny BMK izolované ze sýrů	55
Tabulka 11: Velikost inhibičních zón v milimetrech na vybrané kmeny BMK izolované z piva.....	56
Tabulka 12: Velikost inhibičních zón (v mm) na vybrané kmeny BMK izolované z piva	57
Tabulka 13: Velikost inhibičních zón (v mm) na vybrané kmeny BMK izolované z masa.....	58

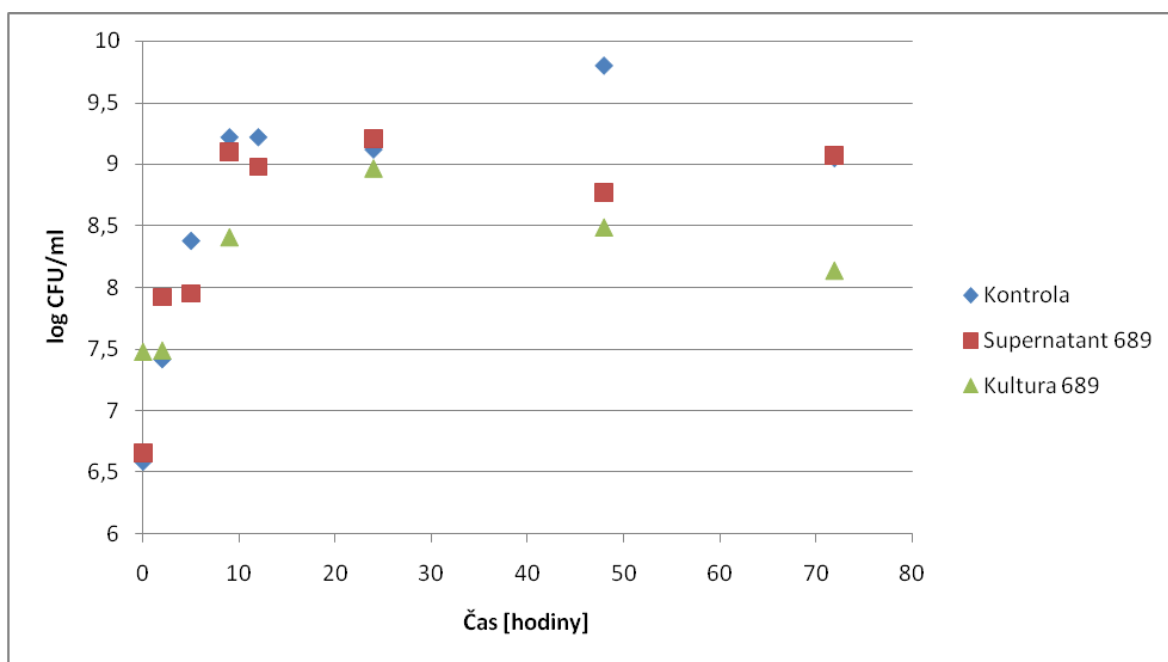
SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Růstová křivka u produkčního kmene <i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89 po přidavku inhibiční kultury <i>Lactococcus lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> CCDM 686 nebo příslušného supernatantu	90
Příloha 2: Růstová křivka u produkčního kmene <i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89 po přidavku inhibiční kultury <i>Lactococcus lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> CCDM 689 nebo příslušného supernatantu	90

PŘÍLOHA P I: RŮSTOVÁ KŘIVKA *LACTOBACILLUS PLANTARUM*



Příloha 1: Růstová křivka u produkčního kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 po přidavku inhibiční kultury *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 nebo příslušného supernatantu



Příloha 2: Růstová křivka u produkčního kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 po přidavku inhibiční kultury *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 689 nebo příslušného supernatantu