

Inhibiční působení vybraných mastných kyselin na bakterie produkující biogenní aminy

Lenka Bradáčová

Bakalářská práce
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lenka Bradáčová**
Osobní číslo: **T16925**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Inhibiční působení vybraných mastných kyselin na bakterie produkující biogenní aminy**

Zásady pro vypracování:

1. Charakterizace biogenních aminů a jejich výskt a význam v potravinách.
2. Antimikrobní účinky mastných kyselin.
3. Stanovení minimálních inhibičních koncentrací vybraných mastných kyselin na dekarboxyláza-pozitivní bakterie.
4. Zpracování výsledků a formulace závěrů práce.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd.* Tábor: OSSIS, 2009.

[2] KALAČ, P. Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005–mid 2013. *Food Chemistry*, 161, 27–39. 2012.

[3] DAVIDSON, P. M., SOFOS, J. N., BRANNERN, A. L. *Antimicrobials in food*, CRC Press, Boca Raton, 2005.

[4] *Vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect, SciFinder Scholar, Medline aj.*

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

2. února 2019

Termín odevzdání bakalářské práce:

15. května 2019

Ve Zlíně dne 2. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Jiří Miček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno:

Obor:

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 obhajoby ¹⁾;
- 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. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ 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 § 60 ³⁾ 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

.....

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 vzdělávacího zařízení (školní dílo).

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

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

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

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

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá problematikou antibakteriálního působení mastných kyselin na bakterie schopné vytvářet látky zvané biogenní aminy. V teoretické části jsou charakterizovány biogenní aminy a popsán jejich výskyt v potravinách. Druhá kapitola pojednává o vlivu mastných kyselin na buňku a popisuje mechanismus účinku. Zmíněn je vliv antibakteriální a antifungální. Praktická část práce má za cíl stanovit minimální inhibiční koncentraci mastných kyselin na bakterie produkující biogenní aminy. Zkoumán je inhibiční efekt kyseliny kaprylové, kaprinové a laurové na 10 vybraných kmenech bakterií zahrnující zástupce laktokoků, enterokoků a enterobakterií. Z výsledků vyplývá, že kyselina laurová působí nejsilněji ze všech tří mastných kyselin. Inhibovala u většiny zvolených kmenů již při nejnižší koncentraci 500 mg/l.

Klíčová slova: biogenní aminy, mastná kyselina, bakterie, inhibiční efekt

ABSTRACT

Bachelor thesis deals with the problem of antibacterial action of fatty acids on bacteria capable of producing biogenic amines. In the theoretical part are characterized biogenic amines and described their appearance in food. The second chapter discusses the fatty acid injection of the cell and describes the mechanism of work dealing with the problem of antibacterial action of fatty acids on bacteria capable of producing biogenic amines. The influence of antibacterial and antifungal is mentioned. The practical part of the study aims to establish a minimum inhibitory concentration of fatty acids on bacteria producing biogenic amines. The inhibitory effect of the caprylic, capric and lauric acid is investigated on 10 selected strains of bacteria, including representatives of dairy cocci, *Enterococcus* and enterobacteria. The results show that lauric acid has the strongest effect from all three fatty acids. Most of the selected strains at the lowest concentration of 500 mg/l.

Keywords: biogenic amines, fatty acid, bacteria, inhibitory effect

Ráda bych poděkovala mojí vedoucí bakalářské práce, paní doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za ochotu, trpělivost a pomoc při vypracování mojí bakalářské práce. Poděkování patří také mojí rodině za podporu při studiu.

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

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1 BIOGENNÍ AMINY.....	11
1.1 CHARAKTERISTIKA.....	11
1.2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ.....	12
1.3 VLIV BIOGENNÍCH AMINŮ NA LIDSKÝ ORGANIZMUS.....	14
1.4 BIOGENNÍ AMINY V POTRAVINÁCH.....	16
1.4.1 Výskyt biogenních aminů v sýrech.....	16
1.4.2 Výskyt biogenních aminů v mase a fermentovaných masných výrobcích.....	18
1.4.2.1 Starterové kultury.....	19
1.4.2.2 Index biogenních aminů (BAI).....	20
1.4.3 Výskyt biogenních aminů v rybím mase.....	21
1.4.4 Výskyt biogenních aminů ve víně.....	21
1.4.5 Výskyt biogenních aminů v pivu.....	22
2 ANTIMIKROBNÍ PŮSOBNÍ MASTNÝCH KYSELIN.....	23
2.1 MASTNÉ KYSELINY.....	23
2.1.1 Volné mastné kyseliny (VMK).....	23
2.1.1.1 Antibakteriální aktivita volných mastných kyselin.....	24
2.1.1.2 Antifungální účinky volných mastných kyselin.....	25
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	27
3 CÍL PRÁCE.....	28
4 MATERIÁL, VYBAVENÍ, METODY.....	29
4.1 MATERIÁL.....	29
4.1.1 Kultivační média.....	29
4.1.2 Mikroorganismy.....	30
4.1.3 Mastné kyseliny.....	30
4.1.3.1 Mikrotitrační diluční metoda.....	30
4.1.3.2 Záznamník růstu buněk.....	31
4.1.4 Fyziologický roztok.....	32
4.2 VYBAVENÍ.....	32
4.3 METODY.....	32
4.3.1 Příprava mikroorganismů.....	32
4.3.2 Mikrotitrační diluční metoda.....	32
4.3.3 Záznamník růstu buněk.....	33
5 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	34
5.1 PŮSOBNÍ MASTNÝCH KYSELIN NA BAKTERIE RODU <i>ENTEROCOCCUS</i>	34
5.1.1 Působení mastných kyselin na <i>Enterococcus durans</i> CCDM 2665.....	34
5.1.2 Působení mastných kyselin na <i>Enterococcus durans</i> CCDM 53.....	35
5.1.3 Působení mastných kyselin na <i>Enterococcus faecalis</i> CCDM 4224.....	37

5.2	PŮSOBENÍ MASTNÝCH KYSELIN NA ROD <i>LACTOCOCCUS</i>	38
5.2.1	Působení mastných kyselin na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141	38
5.2.2	Působení mastných kyselin na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004	40
5.2.3	Působení mastných kyselin na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48.....	41
5.2.4	Působení mastných kyselin na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824	43
5.2.5	Působení mastných kyselin na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946	44
5.3	PŮSOBENÍ MASTNÝCH KYSELIN NA ENTEROBAKTERIE.....	45
5.3.1	Působení mastných kyselin na <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188.....	45
5.3.2	Působení mastných kyselin na <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis CCM 4420	47
5.4	STANOVENÍ MINIMÁLNÍCH INHIBIČNÍCH KONCENTRACÍ.....	48
5.5	DISKUZE.....	50
	ZÁVĚR	52
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	53
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	58
	SEZNAM OBRÁZKŮ	59
	SEZNAM TABULEK.....	61

ÚVOD

V metabolismu některých buněk běžně vznikají a zanikají mnohé biologicky aktivní a významné sloučeniny. Mezi takové patří také látky, které označujeme jako biogenní aminy. Tyto látky se svým působením podílí na ovlivnění biologických funkcí a průběhu biochemických reakcí vlastních i cizích buněk. V potravinách jsou produkovány dekarboxylačními mikroorganismy, pokud existuje prostředí s vhodnými podmínkami pro syntézu. Při určitých koncentracích mohou způsobovat zdravotní komplikace, až otravy. Jejich výskyt v potravinách ovlivňuje dostatečný výskyt jejich prekurzorů s kombinací vhodných podmínek prostředí, které ovlivňuje zacházení se surovinami přes výrobu až po skladování produktů. Obsah jednotlivých biogenních aminů často poukazuje na proces kažení, resp. čerstvosti surovin, nebo finálních potravinářských produktů. Při výrobě některých potravin je jejich zvýšená produkce během skladování, zrání, sušení, aj. nežádoucí. Z takových důvodů je vhodný přídavek látek, které inhibují tvorbu těchto sloučenin. Jednou z variant omezení jejich růstu je působení mastných kyselin na bakterie, jejichž enzymatický aparát dokáže tyto látky ve vhodném prostředí tvořit. Antimikrobní působení některých mastných kyselin bylo známo již dříve. Podle toho, na jaký druh mikroorganismu mastná kyselina působí se jedná o antibakteriální, či antifungální aj. účinek. Rozhodujícím faktem při antibakteriální aktivitě mastných kyselin je jejich struktura, tzn. délka řetězce, popř. pozice a počet dienových vazeb.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

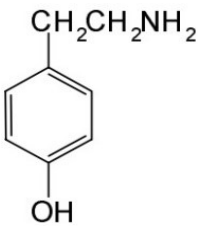
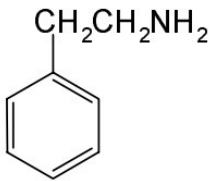
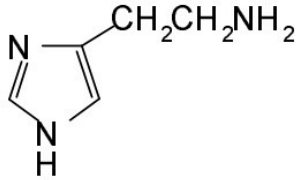
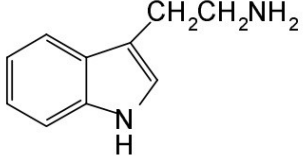
1.1 Charakteristika

Biogenní aminy (BA) jsou přirozené organické antinutriční látky vznikající jako produkt metabolismu organismů - mikrobiálních, živočišných a rostlinných. Jedná se o nízkomolekulární, bazické sloučeniny odvozené od aminokyselin.

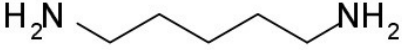
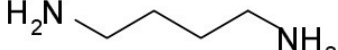
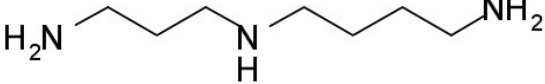
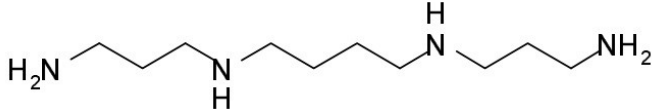
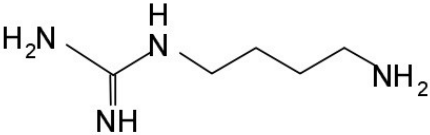
Podle chemické struktury je dělíme na:

- aromatické - tyramin (TYM), 2-fenylethylamin (PEA)
- alifatické - kadaverin (CAD)
- heterocyklické - histamin (HIM), tryptamin (TRM)
- polyaminy - putrescin (PUT), spermidin (SPD), spermin (SPM), agmatin (AGM) [1]

Tabulka 1 Strukturní vzorce biogenních aminů

Biogenní amin	Strukturní vzorec
Tyramin	
2-fenylethylamin	
Histamin	
Tryptamin	

Tabulka 1 Pokračování strukturních vzorců biogenních aminů

Biogenní amin	Strukturní vzorec
Kadaverin	
Putrescin	
Spermidin	
Spermin	
Agmatin	

1.2 Faktory ovlivňující vznik biogenních aminů

Důležitým předpokladem vzniku a množství vyprodukovaných BA je přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou, tj. produkujících enzymy dekarboxylázy. Tyto enzymy patří do skupiny enzymů závislých na pyridoxalfosfátu, jenž využívají ke správnému fungování kofaktor pyridoxal-5'-fosfát. V procesu dekarboxylace volných aminokyselin odštěpují molekulu oxidu uhličitého z aminokyseliny za vzniku bazického aminu. Možnou cestou vzniku BA v organizmech je také transaminace aminokyselin a karbonylových sloučenin. Samotná přítomnost vhodných enzymů, resp. průběh příslušných reakcí není dostačující. Potřebné je nastolení vhodných podmínek pro růst a množení mikroorganismů umožňující vznik BA. [3]

Mezi takové podmínky řadíme: [3]

- přítomnost volných aminokyselin a cukrů při optimální koncentraci 0,5-2%
- teplota
- pH 4,0-5,5
- přítomnost NaCl (většinou inhibiční charakter, kromě HIM a TYM)
- dodržování hygienických postupů při práci se surovinami
- pro fermentované potraviny volit starterové kultury bez dekarboxylázové aktivity

Proteolýza je rozhodujícím faktorem pro dostatečný vznik volných aminokyselin, jenž slouží jako nezbytný substrát pro formaci BA. [3]

Teplota má také důležitý vliv na obsah BA v potravinách. Velkých změn se v množství vzniklých BA odehrává při skladování potravin, resp. působením teploty při skladování. Při teplotách vyšších než 10 °C může obsah BA dosáhnout i toxických dávek, neboť rychlost vzniku BA se zvyšuje se stoupající teplotou. Produkce BA je výrazně snížena při nízkých teplotách vlivem inhibice mikrobiálního růstu a enzymatické aktivity. *Morganella morganii* je známý producent histaminu v mořských plodech, i při teplotách kolem 7-10 °C. [4,5] Zjistilo se, že *Klebsiella pneumoniae* produkuje kadaverin intenzivněji při 20 °C, než při 10 °C, zatímco *Enterobacter cloacae* byl schopen produkovat putrescin při 20 °C, ale nikoliv při 10 °C. [6] V chlazených potravinách (chlazené čerstvé ryby uložené v ledu) mohou psychrotolerantní bakterie aktivně přispívat k akumulaci BA i při teplotách skladování nižších než 5 °C, např. *Photobacterium phosphoreum* a *Morganella psychrotolerans*. [7,8,9]

Hodnota pH prostředí je významným faktorem ovlivňujícím dekarboxylační aktivitu mikroorganismů. Nízké pH inhibuje růst většiny bakterií majících dekarboxylační aktivitu. Na druhou stranu některé bakterie vytváří příslušné enzymy a uskutečňují vznik BA jako součást ochrany buňky před kyselým prostředím. [10,11]

Přestože vyšší koncentrace NaCl způsobuje inhibici tvorby většiny BA, histamin a tyramin chrání některé bakterie proti vysokému osmotickému tlaku a jejich obsah v takovém prostředí vzrůstá. Mezi základní podmínky neřadíme přítomnost kyslíku, neboť dekarboxylační aktivitu vykazují mikroorganismy jak aerobní, anaerobní, tak i fakultativně anaerobní. [3]

Starterové kultury se využívají za cílem vylepšit a stabilizovat kvalitu fermentovaných produktů. Jejich přítomnost by neměla negativně ovlivnit výsledné vlastnosti potraviny. [12]

1.3 Vliv biogenních aminů na lidský organizmus

Některé BA (např. HIM, TYM) mohou podněcovat účinky jiných a mít tak vliv na průběh fyziologických funkcí lidského těla, viz. tab. 2. Jiné mohou být zdrojem dusíku a v různých biochemických reakcích sloužit jako prekurzory hormonů, nukleových kyselin nebo proteinů, nebo mít vliv při imunitních reakcích organismu (HIM). V potravinách se podílejí na tvorbě výsledného aroma. [13,14,15]

Tabulka 2 Toxikologické a farmakologické účinky BA v potravinách [14]

Prekurzor	Biogenní amin	Fyziologický účinek	Toxikologický účinek přímý	Toxikologický účinek nepřímý
histidin	histamin	vazodilatace hormonální změny vliv na růst a vývoj buněk alergické reakce	otrava histaminem nesnášenlivost histaminu	není znám
tyrosin	tyramin	vazokonstrikce ovlivnění hormonální hladiny	nesnášenlivost tyraminu	není znám
tryptofan	tryptamin	vazokonstrikce ovlivnění hormonální hladiny	málo známé	není znám
lysin	putrescin	prekurzor pro spermin a spermidin	hypotenze	podněcuje toxické účinky HIM a TYM
ornithin	kadaverin	regulátor růstu karcinogenní	bradykardia tachykardia	karcinogenní účinky
putrescin	spermin spermidin	syntéza proteinů regulace nukleových kyselin	málo známé	karcinogenní účinky
L-arginin	agmatin	hormonální mediátor antiproliferační účinek	není známé	málo známé

Z toxikologického hlediska mohou být zejména sekundární aminy prekurzory karcinogenních sloučenin N-nitrosoaminů. Na rozdíl od primárních aminů tvoří stabilní nebezpečné produkty s kyselinou dusitou. [3] Přísady používané k úpravě potravin jsou nejčastějším zdrojem dusitanů v potravinách, ze kterých se vytváří kyselina dusitá a následně oxid dusitý. Volné elektrony amoniového dusíku jsou následně přijímány oxidem dusitým za tvorby N-nitrosamoniového ionu. Odevzdáním protonu z dusíkového atomu tohoto ionu se vytváří N-nitrosamin. [16]

Lidský organismus umí do určité míry odbourávat BA, což hraje klíčovou úlohu proti akumulaci těchto látek v organismu. U zdravých jedinců dochází k metabolizaci BA ve střevním traktu pomocí enzymů aminooxidáz a transferáz:

- monoaminooxidáza (MAO, EC 1.4.3.4)
- diaminoxidáza (DAO, EC 1.4.3.6)
- polyaminooxidáza (PAO, EC 1.5.3.11)
- histamin N-methyltransferáza (HNMT, EC 2.1.1.8) [17]

Monoaminooxidáza se podílí na rozkladu katecholaminů (noradrenalin, adrenalin, dopamin), serotoninu, melatoninu, tyraminu a dalších látek patřících do skupiny monoaminů. Rozeznáváme dvě aktivní formy tohoto enzymu, tj. MAO-A a MAO-B. Společně s diaminoxidázou se nachází v leukocytech tenkého střeva a jater, odkud se následně dostávají produkty oxidace BA do krevního řečiště. Polyaminy jsou nejprve acetylovány, následně oxidovány pomocí DAO nebo polyaminooxidázy. PAO odbourává spermin přes spermidin na putrescin až do konečné fáze oxidu uhličitého a amonných iontů. Účinnost detoxifikačního systému BA v lidském těle není dostačující u jedinců trpících alergiemi nebo užívajících léčiva působící inhibičně na MAO a DAO (antihistaminika, antimalarika, psychofarmaka, aj.). Při konzumaci vysokého množství BA v potravě dochází k narušení detoxifikace a vznikající BA se akumulují v organismu. [3,14,18]

Pacienti s gastrointestinálním onemocněním (např. Crohnova choroba, gastritida, ulcerózní kolitida, syndrom dráždivého střeva) mají sníženou aktivitu aminooxidáz ve střevním traktu a jsou tak vystaveni vyššímu riziku hromadění a účinkům BA v jejich těle. [19]

1.4 Biogenní aminy v potravinách

Přítomnost biogenních aminů může být očekávána téměř v každé potravine (masné produkty, ryby a rybí výrobky, mléko a výrobky z něj, čokoláda, vejce, víno, pivo, ovoce, aj.) skládající se kromě jiných složek z proteinů a volných aminokyselin, při nastavení vhodných podmínek pro dekarboxylační a životní aktivitu mikroorganismů. V nízkých koncentracích jsou tyto biologicky aktivní látky přirozeně přítomné téměř ve všech potravinách také z toho důvodu, neboť v rostlinných a živočišných pletivech vykonávají spoustu důležitých funkcí, např. jsou tkáňovými hormony (histamin), protoalkaloidy (hordein, gramin) nebo stavebními látkami, jenž se účastní biosyntézy dalších hormonů živočichů a sekundárních metabolitů rostlin. Některé jsou součástí fosfolipidů a vitaminů, halucinogeny (meskalin, psilocybin), jiné jsou toxické. [3,13,14,15,16,20]

Nejvyšší obsah se vyskytuje u rybího masa a výrobků, ve fermentovaných výrobcích jako jsou sýry, masné produkty, zelenina a produkty ze sóji. U alkoholických nápojů se jedná zejména o pivo a některá vína. [14]

V potravinách nefermentovaných nachází BA uplatnění jako dobrý ukazatel rozkladu a kvašení dané hmoty. U zkažených produktů se velmi často objevují vysoké koncentrace histaminu a putrescinu [21]

Mezi nejvýznamnější bakteriální zástupce produkující BA v rybím masu patří *Clostridium perfringens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus* spp. a *Staphylococcus xylosum*. Hojný výskyt v sýrech způsobují zejména *Lactobacillus buchneri*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus macerans* a *Propionibacterium* spp.. Ve fermentovaných masných výrobcích se podílejí na vzniku bakterie rodu *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, a také zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*. U vína patří k nejdůležitějším mikroorganismům bakterie *Pediococcus cerevisiae* a u piva příslušní zástupci kvasinek. [3]

1.4.1 Výskyt biogenních aminů v sýrech

Sýry patří k potravinám s vysokým obsahem bílkovin. Působením enzymatické a mikrobiální aktivity dochází k degradaci přítomných kaseinových bílkovin. Tvoří se volné aminokyseliny jako základní substrát pro tvorbu BA. Dominantním faktorem vzniku BA v sýrech

je také délka zrání a skladování produktů. V procesu zrání se zvyšuje množství BA z použitého mléka (do 1 mg/kg) na jednotky až stovky mg/kg výsledného produktu. Stanovení hladiny BA v sýru může sloužit jako parametr hygienické kvality nebo jako indikátor stupně proteolýzy. Podle hladiny BA můžeme také odhadnout čerstvost nebo proces kažení výrobku. Z tohoto důvodu je podstatné ovládnutí hygienických standardů při získávání mléka a poté dodržování správné výrobní praxe. [6,22,23,24]

Hlavní BA vyskytující se v sýrech jsou tyramin, histamin, putrescin, kadaverin. Hodnoty těchto látek se pohybují až ve stovkách mg/kg. Nižší hodnoty zaznamenáváme v sýrech u tryptaminu a 2-fenylethylaminu. Dle typu sýra se liší složení a hladina jednotlivých BA. Vysoký obsah těchto biologicky aktivních látek byl zjištěn u sýrů měkkých zrajících (např. Zlato, Camembert) a s vysokodohřívanou sýřeninou (např. Grana Padano, sýry ementálského typu). Sýry kozí, plísňové a s nízkodohřívanou sýřeninou obsahují zvýšená množství BA. Nízká koncentrace BA se nejčastěji vyskytuje u sýrů smetanových, měkkých termizovaných a také čerstvých (např. mozzarella, cottage). [25]

Přestože histamin není zařazen v tab. 3, jeho obsah v sýrech bývá stejně vysoký nebo nižší, jako u výše zmíněných BA. Po rybách patří právě sýry k druhým nejčastějším potravinám, u kterých došlo k otravě histaminem. První zaznamenaný případ se stal v roce 1967 v Holandsku po požití sýru Gouda. Od té doby byly zaznamenány mnohé případy u dalších typů sýrů na území Severní Ameriky i Evropy. [26]

Tabulka 3 Nejčastější BA v různých typech sýrů [26]

Typ sýra	Biogenní aminy
Brie	kadaverin, putrescin
Čedar	kadaverin, 2-fenylethylamin
Gouda	kadaverin, putrescin, tryptamin, tyramin
Mozzarella	kadaverin
Parmesan	tryptamin
Edam	2-fenylethylamin, putrescin, tryptamin, tyramin

Tabulka 4 Obsah BA [mg/kg] v čerstvých vzorcích vybraných sýrů [24]

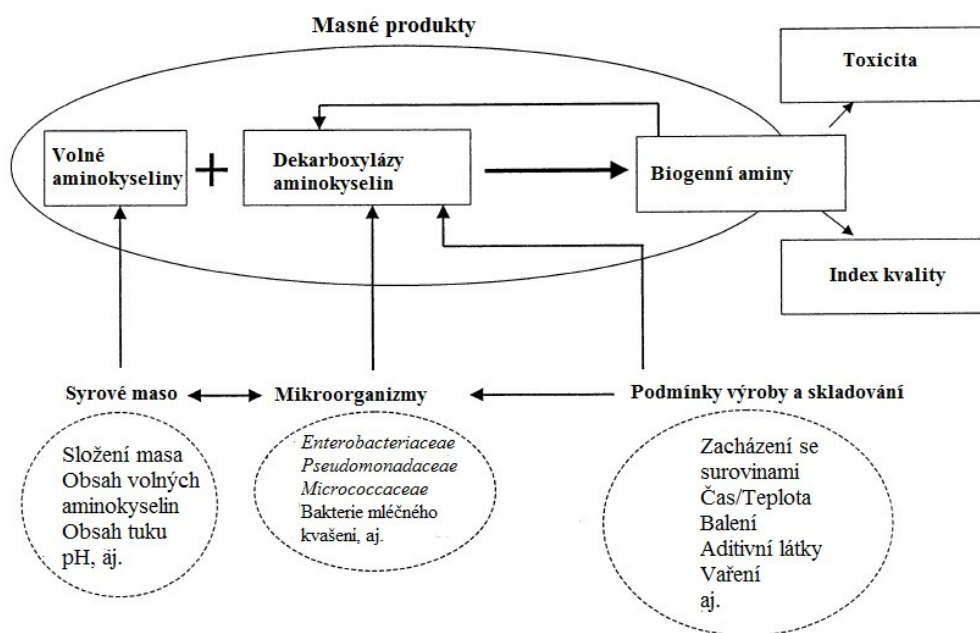
-	Typ sýra				
	Nezrající	Tvrdý zrající z pasterova- ného mléka	Tvrdý zrající ze syrového mléka	Kozí sýr	Plísňový sýr
TYM	nd-0,6	nd-301,4	nd-609,4	nd-830,5	nd-1585,4
HIS	nd	nd-163,6	nd-391,4	nd-88,4	nd-376,6
PEA	nd	nd-32,0	nd-29,7	nd-11,7	nd-39,7
TRM	nd	nd-45,1	nd-33,8	nd-17,4	nd-128,8
PUT	nd-3,1	nd-611,7	nd-670,1	nd-191,8	3,0-257,2
CAD	nd-1,5	nd-710,1	0,9-368,5	nd-88,7	nd-2101,4
SPD	nd-0,8	nd-43,0	nd-39,6	nd-14,5	nd-71,6
SPM	nd-1,1	nd-18,7	nd-21,5	nd-3,6	nd-18,9
AGM	nd	nd-22,0	nd-27,2	nd-3,2	nd-28,5

Legenda: nd - nedetekováno

1.4.2 Výskyt biogenních aminů v mase a fermentovaných masných výrobcích

Hlavní zastoupení BA v mase patří tyraminu, kadaverinu, putrescinu a histaminu. Ve značném množství obsahuje čerstvé maso také polyaminy spermidin a spermin. Zejména maso teplokrevných živočichů obsahuje vyšší dávky sperminu, tj. 20-60 mg/kg. Na druhou stranu obsah spermidinu v mase přesahuje velmi zřídka 10 mg/kg. Rozdílný obsah výše zmíněných dvou polyaminů je typický pro potraviny živočišného původu ve srovnání s těmi pocházejícími z rostlinných zdrojů. Výskyt BA ve fermentovaných masných výrobcích je ovlivněn kombinací faktorů, jejichž návaznost je znázorněna ve schématu na obr. 1. Nízká kvalita vstupních surovin, popřípadě jejich sekundární kontaminace mívají často za následek zvýšený obsah BA ve fermentovaných masných výrobcích. Nevhodné zacházení během výrobního postupu a skladování surovin ovlivňuje taktéž zvýšený výskyt BA v těchto výrobcích. Celkový počet BA v takových produktech se pohybuje v jednotkách až stovkách mg/100 g. U fermentovaných masných výrobků se využívají v procesu zrání k fermentaci starterové kultury mikroorganismů. Působením jejich enzymatického a metabolického aparátu dochází

k fermentaci. Takové mikroorganismy avšak samy často vykazují dekarboxylázovou aktivitu a přispívají tedy ke zvýšení obsahu BA ve výrobku. Během fermentačních dějů se zvyšuje obsah volných aminokyselin zvýšením neproteinové frakce dusíku. Zvýšení kyselosti prostředí, dehydratace výrobku a působení chloridu sodného podporují působení některých endogenních enzymů uskutečňujících proteázovou aktivitu v mase. Značný vliv na obsah BA ve fermentovaných masných výrobcích má metoda zpracování, přítomnost aditivních látek, průměr salámu, aj. Při delším skladování vzniká větší obsah BA. [3,27]



Obrázek 1 Faktory ovlivňující produkci BA v mase a masných produktech [28]

1.4.2.1 Starterové kultury

Volba vhodné starterové kultury s aminooxidázovou aktivitou má velký vliv při výrobě fermentovaných masných výrobků. Některé kmeny *Staphylococcus xylosus* dokáží rozložit poměrně značné množství histaminu a tyraminu v těchto výrobcích. Aminooxidázovou aktivitu vykazují bakterie *Staphylococcus carnosum*, *Brevibacterium linens* a také zástupci bakterií mléčného kvašení, např. rody *Lactobacillus*, *Pediococcus*. Při výběru mikroorganismů pro výrobu takových výrobků musí být zohledněny specifické požadavky na daný fermentační proces. Starterové kultury způsobují okyselení prostředí produkcí kyseliny mléčné, čímž dojde k nastolení nízkého pH. Tento efekt napomáhá při sušení a tvorbě charakteristické barvy a pevnosti sušených fermentovaných masných výrobků. Mikrokoky vykazují proteolytické a lipolytické účinky a ve spolupráci s koaguláza-negativními stafylokoky se podílí na tvorbě výsledné barvy a aroma výrobku. Produkci enzymu katalázy chrání výrobky před žluknutím.

V technologickém procesu je obvyklé zastoupení jednoho nebo více kmenů bakterií mléčného kvašení v kombinaci s kmeny mikrokoků a stafylokoků. V evropských zemích převládá používání kmenů *Lactobacillus curvatus* a *Lactobacillus sakei*. Bakterie *L. sakei* se jeví jako vhodnější pro použití jako starterová kultura, neboť na rozdíl od bakterie *L. curvatus* umí produkovat nižší počet BA. Použití pouze *L. sakei* může mít preventivní vliv na nižší obsah BA ve fermentovaných masných výrobcích. [27]

1.4.2.2 Index biogenních aminů (BAI)

Koncentrace některých BA (TYR, PUT, CAD) přirozeně roste během procesu výroby a skladování masa a produktů z něj, zatímco u jiných (SPM, SPD) klesá, nebo zůstává konstantní. Obsah BA v potravině slouží jako ukazatel úrovně hygienických podmínek zacházení se surovinou a jejím následným zpracováním. Z těchto důvodů byl zaveden tzv. index biogenních aminů (BAI), jehož hodnota poukazuje na kvalitu, resp. proces kažení dané suroviny. Objektivnější výsledky jsou častěji u čerstvého masa a tepelně ošetřených produktů než u fermentovaných, kde může hodnotu ovlivnit aktivita starterových kultur.

Hodnotu BAI vypočítáme podle vztahu:

$$BAI = \frac{c_{HIM} + c_{PUT} + c_{CAD}}{1 + c_{SPM} + c_{SPD}}$$

kde:

HIM	histamin
PUT	putrescin
CAD	kadaverin
SPM	spermin
SPD	spermidin
c	koncentrace BA [mg/kg] [27]

BAI < 1 velmi kvalitní maso

BAI 10 a více špatná kvalita, možné kažení

Čerstvé maso by mělo obsahovat velmi nízké koncentrace nebo nulové PUT a CAD, avšak v důsledku kažení masa dochází ke zvýšení obsahu těchto BA. [3,28]

1.4.3 Výskyt biogenních aminů v rybím mase

Nejčastějším původcem intoxikací způsobených biogenními aminy jsou ryby a některé mořské plody. Jsou to zejména zástupci čeledi *Scrombridae*, jimž se přisuzuje nejvíce případů otravy histaminem. Dle latinského názvu čeledi se označuje tato intoxikace jako skombrotoxikóza. Dostatečný obsah volného histidinu v mase těchto ryb slouží jako nutný předpoklad pro vznik BA. Histidin je následně v tělech těchto živočichů metabolizován dvěma mechanismy. Deaminací aminokyseliny histidinu na kyselinu urokanovou, nebo dekarboxylací za vzniku histaminu. Deaminace probíhá za normálních fyziologických podmínek častěji. Dekarboxylační reakce se mohou uplatňovat při bakteriální kontaminaci masa. Vytvořit dostatečně vysoké dávky histaminu pro způsobení zdravotních komplikací však také dokáže běžná mikrobiální populace těl mořských ryb. V rybí svalovině se průměrně nachází asi 1-15 mg HIM na 100 g masa. Za nevhodných skladovacích podmínek se mohou hodnoty dostat až k toxickým dávkám, tj. nad 100 mg/100 g. V rybím mase nezaznamenáváme přítomnost pouze HIM. Byly nalezeny také četné dávky jiných BA, a to v tělech makrel, sledů, tuňáka a sardinek. Pro posouzení kvality rybího masa z pohledu výskytu BA slouží hodnota výše zmiňovaného indexu biogenních aminů. [3,6,20]

1.4.4 Výskyt biogenních aminů ve víně

BA jsou tvořeny během různých etap výroby i během skladování vína. Při výrobě vína se uplatňují dva významné typy fermentace. Alkoholové kvašení, kdy za anaerobních podmínek aktivitou kvasinek dochází ke zkvašování rostlinných sacharidů za vzniku ethanolu, oxidu uhličitého, uvolňuje se energie a teplo. Největší produkci BA v této fázi vykazují kvasinky *Kloeckera*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida* a *Saccharomyces cerevisiae*. Po alkoholovém kvašení nastává jablečno-mléčné kvašení. Během tohoto spontánního procesu vzniká laktát dekarboxylací kyseliny jablečné činností bakterií mléčného kvašení. Tato přeměna se podílí na snížení kyselosti nápoje. Produkují se také aromatické látky, látky ovlivňující chuť a vůni vína. Průběh umožňují některé rody bakterií – *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* a *Pediococcus*. Jako nejběžnější kultura umožňující tento proces se využívají kmeny bakterie *Oenococcus oeni*. Tato bakterie dokáže rozkládat arginin za produkce aminokyseliny ornithinu, který slouží jako prekurzor BA putrescinu. Na konci alkoholového kvašení je často množství BA nižší, zatímco v průběhu jablečno-mléčného kvašení se mírně zvýší. Přídavkem oxidu siřičitého je možno zmírnit průběh malolaktické fermentace. [2,29]

1.4.5 Výskyt biogenních aminů v pivu

Z pohledu mikrobiologie patří pivo k potravinám s nízkým rizikem náchylnosti ke kažení. Tento fakt podporuje hned několik aspektů, prvním z nich je přítomnost ethanolu dle typu piva v rozmezí 0,5-10 % w/w, složek hořkého chmele 17-55 mg/kg iso- α -kyselin, vysoký obsah oxidu uhličitého (většinou 0,5 % w/w) a nízké pH v rozmezí 3,8-4,7. Další podstatný vliv na nižší přítomnost mikroorganismů má velmi nízká přítomnost kyslíku pod 0,1 ppm. Pouhé stopy glukózy, maltózy a maltotriózy nepodporují prostředí vhodné pro mikroorganismy. Přesto některé bakterie se dokáží pomnožit i během výrobního a skladovacího procesu. Produkují tak látky způsobující organoleptické vady a vznik nežádoucích sloučenin, např. BA. Při překročení určitých dávek v BA organismu se projevuje jejich přítomnost některými nepříjemnými symptomy, jako jsou např. migrény, bolesti hlavy, závrať, hypertenze, aj. Pro některé konzumenty se tak pivo stává rizikovou skupinou potravin. Vysoký příjem BA není zapříčiněn hojnou produkcí těchto látek v nápoji, ale zvýšenou spotřebou piva. Z přítomnosti živin a dostatku prekurzorů tak rychle vznikají BA. V poslední řadě vliv BA na organismus a jejich delší dobu působení může ovlivnit přítomnost alkoholu, inhibitoru monoaminoxidázy, enzymu, jenž hraje klíčovou roli v odbourávání BA z lidského těla. BA vyskytující se v pivech ve větším zastoupení mohou pocházet z dekarboxylační činnosti příslušných mikroorganismů. V takovém případě se jedná zejména o HIM, TYM a CAD. Další původ BA v pivu bývá zapříčiněn jejich přítomností již v surovinách pro výrobu, jako jsou chmel, slad a mladina. Přítomností pivovarských kvasinek a v původním sladu zaznamenáváme vyšší koncentraci AGM, SPD, SPM, a PUT, než u chmele a jiných složek pro výrobu piva. Hladiny HIM, PEA, TYM a CAD se zvyšují během klíčení ječmene. Na skutečné složení a koncentraci jednotlivých BA ve sladu mají velký vliv teplota, intenzita zrání a odrůda ječmene. Během hlavní fermentace mladiny stoupají hladiny TYR, HIM, a CAD. Počátkem rmutování bývá snížen výskyt PUT a AGM. Bakterie izolované během fermentace při výrobě piva odpovědné za produkci zejména TYM a TRM byly identifikovány jako zástupci rodu *Pediococcus*, např. *P. damnosus*. Efektivním způsobem snížení produkce TYM je možnost promytí použitých kvasinek kyselinou fosforečnou, což snižuje přítomnost zástupců rodu *Pediococcus* a tím i koncentraci TYR. [30,31]

2 ANTIMIKROBNÍ PŮSOBNÍ MASTNÝCH KYSELIN

2.1 Mastné kyseliny

Látky patřící do skupiny lipidů se skládají z mnoha chemických sloučenin. Mezi takové látky řadíme monoacylglyceroly, diacylglyceroly, triacylglyceroly, fosfatidy, cerebrosidy, steroly, terpeny, alkoholy a mastné kyseliny (MK). MK ve svých řetězcích obsahují uhlík, vodík a kyslík. Délka uhlovodíkových řetězců se liší, avšak společným znakem je přítomnost karboxylové skupiny na jednom konci skeletu. MK pocházející z přírodních zdrojů ve většině případů mají řetězec o sudém počtu atomů uhlíku, neboť v procesu jejich syntézy dochází k adici dvou uhlíkatých jednotek na dvouuhlíkový prekurzor acetyl-CoA. MK dělíme podle přítomnosti a počtu násobných vazeb v molekule. Nasycené MK neobsahují žádné násobné vazby. Mononenasycené MK obsahují jednu dvojnou nebo trojnou vazbu v řetězci a polynenasycené dvě a více takových vazeb. U nenasyčených MK obsahujících dvojnou vazbu rozeznáváme dle relativní polohy alkylových skupin dvě možné konfigurace, *cis* a *trans*. Častější výskyt u MK v přírodě zaznamenáváme v *cis* konfiguraci. [32]

2.1.1 Volné mastné kyseliny (VMK)

Nedílnou součástí buněčných struktur jsou látky lipidické povahy – fosfolipidy a triacylglyceroly. MK mohou být uvolněny z lipidů enzymatickou aktivitou. Enzymy lipázy hydrolyzují a odloučí MK z lipidu. Jejich aktivita může být specifická ke konkrétní skupině lipidů. Někdy mohou být odštěpeny MK na základě jejich pozice v lipidu, délce a nenasycenosti uhlovodíkového řetězce. V těchto případech vznikají volné mastné kyseliny. Na jednom konci uhlovodíkového řetězce obsahují hydrofilní karboxylovou skupinu a na druhém methylovou skupinu. Uhlovodíkový řetězec je hydrofobní, tím pádem celá molekula je amfipatická. Biologická aktivita VMK má úlohu v obraně hostitele proti potenciálním patogenním nebo oportunistickým mikroorganismům. Některé takové účinky jsou vybrány v tab. 5. [33]

Tabulka 5 Účinky vybraných mastných kyselin [33]

Mastná kyselina	Sumární vzorec a nasycenost vazeb	Inhibice
Kaprylová	C8:0	řasy, G+ bakterie, protozoa, viry
Kapronová	C10:0	řasy, G+ a G- bakterie, houby, protozoa, viry
Laurová	C12:0	řasy, G+ a G- bakterie, houby, protozoa, viry
Myristová	C14:0	G+ a G- bakterie, houby, viry
Palmitolejová	C16:1 ^{Δ9}	G+ a G- bakterie, houby, viry
Olejová	C18:1 ^{Δ9}	řasy, G+ a G- bakterie, houby, protozoa, viry
Arachidonová	C20:4 ^{Δ5, 8, 11, 14}	řasy, viry, G+ a G- bakterie
Dokosapentaenová	C22:5 ^{Δ5, 8, 11, 14, 17}	G+ a G- bakterie

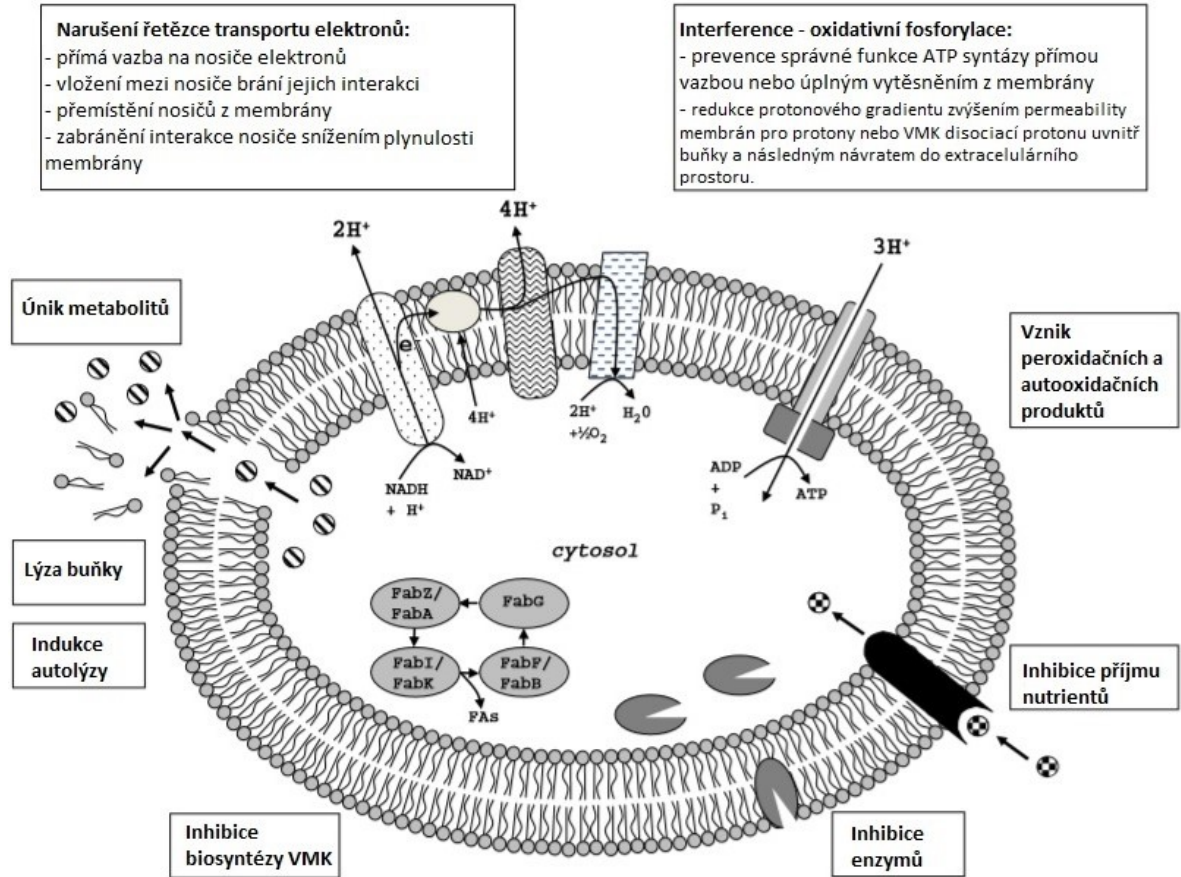
2.1.1.1 Antibakteriální aktivita volných mastných kyselin

Antibakteriální aktivita volných mastných kyselin je ovlivněna jejich strukturou a tvarem, tzn. délkou řetězce, pozicí a počtem dvojných vazeb. Významnou se ukazuje přítomnost hydroxylové skupiny, která je součástí karboxylové, protože methylované VMK vykazují sníženou, nebo dokonce žádnou inhibiční aktivitu. Nenasycené VMK se středně dlouhým a krátkým řetězce obvykle zaznamenávají intenzivnější vliv proti růstu gram-pozitivních než gramnegativních bakterií. Dvojně vazby v konfiguraci *cis* ovlivňují inhibici pozitivněji než jejich *trans* izomery. Možné vysvětlení tkví ve faktu, že struktura *trans* nenasycených MK se podobá nasyceným a tyto mají nižší efekt než nasycené o řetězci se stejným počtem atomů uhlíku. U nasycených MK působí nejsilněji kyseliny s 10 nebo 12 uhlíky. Není přesně známo, jak VMK uplatňují svoje antibakteriální působení. Pravděpodobným hlavním cílem je membrána bakteriálních buněk a zásah do četných procesů probíhajících uvnitř a na membráně. Takové chování je schematicky znázorněno na obr. 2. Některé negativní účinky na bakteriální buňky mohou být zapříčiněny také detergentními vlastnostmi VMK vycházejí-

cími z jejich amfipatické struktury. VMK mohou ovlivnit produkci bakteriální energie narušením řetězce transportu elektronů a narušením oxidační fosforylace. Řetězec transportu elektronů je lokalizován na vnitřní membráně buněk gram-pozitivních a gram-negativních bakterií. Jedná se o systém, ve kterém jsou přenášeny elektrony pomocí specifických přenašečů za postupného snižování jejich energie. Posledním krokem je přenesení dvou elektronů na akceptor kyslík za vzniku molekuly vody. Působením nenasycených VMK dochází ke kompletní dislokaci elektronů mezi přenašeči a na membráně, což způsobí zvýšení plynulosti membrány, což vede k její rostoucí nestabilitě. Mezi další působení VMK patří únik buněčných metabolitů z buňky bakterie, kompletní lýza buněk a autolýza. Membránové a cytozolické enzymy, včetně požadovaných pro biosyntézu mastných kyselin mohou být inhibovány ve své aktivitě. Působením přímo na transportní protein způsobují narušení příjmu živin buňkou, což může být také nepřímý výsledek neschopnosti buňky produkovat ATP. Peroxidační a autooxidační produkty VMK mohou mít také škodlivé účinky na buňku a hrají roli při jejím usmrcení. [33]

2.1.1.2 Antifungální účinky volných mastných kyselin

Mastné kyseliny a jejich deriváty se jeví jako vhodné alternativy antimikrobiálních látek. Jejich účinnost mnohdy nedosahuje efektu některých chemických fungicidů, avšak možnost biologického rozkladu je řadí k látkám s menším rizikem pro životní prostředí. MK jsou povolenými potravinářskými přídatnými látkami. Neméně je významný i fakt, že vůči antifungálním MK zaznamenáváme nižší rezistenci u patogenních hub. Nejdůležitějším cílem antifungálních mastných kyselin je buněčná membrána. Zvýšením membránové permeability způsobují únik intracelulárních složek a buněčnou smrt. Další cíle zahrnují zastavení syntézy proteinů analogy kyseliny myristové, metabolismem mastných kyselin a aktivitou topoisomerázy. U nenasycených MK je důležitá přítomnost hydrofobní skupiny. Zvýšení hydrofobicity s delší délkou řetězce však může snížit rozpustnost MK ve vodných systémech. Kyselina laurová (C12:0) má nejvhodnější rozložení mezi hydrofilními a hydrofobními skupinami. Kyselina kaprylová (C8:0) má inhibiční účinky na zástupce kvasinek i vřeckovýtusných hub, jako jsou např. *Alternaria solani*, *Cucumerinum lagenarium*, *Fusarium oxysporum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Myrothecium verrucaria*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma viride*. Kyselina kaprinová (C10:0) působí antifungálně proti zástupcům rodu *Alternaria*, *Apergillus*, *Candida*, *Rhodotorula*, aj. [34]



Obrázek 2 Schématické znázornění možného antibakteriálního působení VMK na buňku [33]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo stanovení inhibičního vlivu vybraných mastných kyselin na bakterie s dekarboxylázovou aktivitou.

Dílčí cíle práce:

Teoretická část:

- charakteristika biogenních aminů
- popis výskytu biogenních aminů v potravinách
- charakteristika antimikrobního působení mastných kyselin

Praktická část:

- příprava příslušných koncentrací mastných kyselin
- sledování inhibičního vlivu daných mastných kyselin na vybrané kmeny bakterií
- zpracování dat
- stanovení minimálních inhibičních koncentrací mastných kyselin na dekarboxyláza-pozitivní bakterie

4 MATERIÁL, VYBAVENÍ, METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Kultivační média

Mikroorganismy byly pomnoženy na půdách BHI (Brain Heart Infusion; HiMedia) a M17 (Terzaghiho agar; HiMedia). Pro patogenní koky a nutričně náročné mikroorganismy byla použita půda BHI. Laktokoky byly pomnoženy na půdě M17. Samotné stanovení bylo provedeno v příslušných bujonech. K přípravě agarů a bujonů byla využita destilovaná voda. Půdy byly autoklávovány při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Tabulka 6 Složení půdy BHI

Složka	Množství [g/l]
telecí mozková infuze	200,0
hovězí mozková infuze	250,0
proteosový pepton	10,0
NaCl	5,0
hydrogenfosforečnan disodný	2,5
dextróza	2,0

Pro přípravu 1 l bujónu je třeba 37,0 g agaru.

Tabulka 7 Složení půdy M17

Složka	Množství [g/l]
enzymatický hydrolyzát kaseinu	2,50
masový pepton	2,50
sójový pepton	5,00
kvasničný extrakt	2,50
hovězí extrakt	5,00
laktóza	5,00

Složka	Množství [g/l]
kyselina askorbová	0,50
síran hořečnatý	0,25
β -glycerolfosforečnan disodný	19,00

Pro přípravu 1 l bujónu je třeba 42,25 g agaru.

4.1.2 Mikroorganizmy

Pro tuto bakalářskou práci bylo využito 10 kmenů dekarboxyláza-pozitivních bakterií. Bakterie byly získány ze sbírky mlékařských kultur Laktoflora (CCDM) a z České sbírky mikroorganismů (CCM).

- *Enterococcus durans* CCDM 2665
- *Enterococcus faecalis* CCDM 53
- *Enterococcus faecalis* CCDM 4224
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946
- *Proteus mirabilis* CCM 7188
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

4.1.3 Mastné kyseliny

4.1.3.1 Mikrotitrační diluční metoda

Pro stanovení minimálních inhibičních koncentrací byly použity kyseliny kaprylová (C8:0), kaprinová (C10:0) a laurová (C12:0). Zásobní 5 % (w/v) roztok byl pro každou kyselinu připraven rozpuštěním 2,25 g kyseliny (všechny Sigma-Aldrich) ve 45 ml ethanolu (Sigma-Aldrich). Roztok každé kyseliny byl naředěn příslušným bujónem na požadované koncentrace do celkového objemu 1 ml, viz. tab. 8. Pro každou destičku byly roztoky s bujónem připraveny nové.

Tabulka 8 Příprava koncentrací MK

c_{MK} [mg/ml]	V_B [μ l]	V_K [μ l]
500	990	10
1000	980	20
1500	970	30
2000	960	40
2500	950	50

kde:

c_{MK} – výsledná koncentrace mastné kyseliny [mg/ml]

V_B – objem bujónu [μ l]

V_K – objem kyseliny [μ l]

4.1.3.2 Záznamník růstu buněk

Inhibiční působení jednotlivých MK na mikroorganismus *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 byl pozorován pomocí záznamníku růstu buněk RTS-1C (BioSan). Pro tento úkol byly kyseliny naředěny do bujónu BHI dle tab. 9.

Zásobní 5 % (w/v) roztok mastných kyselin byl použit jako u mikrotitrační diluční metody.

Tabulka 9 Příprava koncentrací MK – záznamník růstu buněk

c_{MK} [mg/ml]	V_B [μ l]	V_K [μ l]
500	19800	200
1000	19600	400
1500	19400	600
2000	19200	800
2500	19000	1000

kde:

c_{MK} – výsledná koncentrace mastné kyseliny [mg/ml]

V_B – objem bujónu [μ l]

V_K – objem kyseliny [μ l]

4.1.4 Fyziologický roztok

Pro přípravu suspenze bakterií byl využit 0,9 % (w/v) fyziologický roztok připravený rozpuštěním 1,35 g NaCl (Penta) ve 150 ml destilované vody a následně autoklávován.

4.2 Vybavení

Pro vypracování této bakalářské práce byla využita níže uvedená zařízení a pomůcky:

- Analytické váhy Sartorius, BA 110 S
- Autokláv Systec 2540EL
- Automatické mikropipety Finnpipette F2, Nichyrio
- Biologický termostat Memmert INE 600
- Chladnička Electrolux
- Fotometr TECAN Sunrise TW/TC
- Osobní bioreaktor RTS – 1C (záznamník růstu buněk; BioSan)
- tuby TubeSpin Bioreactor 50 ml
- laboratorní vybavení (sklo, pomůcky)

4.3 Metody

4.3.1 Příprava mikroorganismů

Kmeny bakterií byly uchovávány v mrazícím boxu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po vyjmutí byly oživeny v příslušných bujónech při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně byly zaočkovány na pevné půdy křížovým rozetěrem a kultivovány 24 h při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po kultivaci byla pro diluční metodu i osobní bioreaktor připravena suspenze buněk ve fyziologickém roztoku o zákalu 1,0 dle stupnice McFarlanda.

4.3.2 Mikrotitrační diluční metoda

Inhibiční efekt byl určen na základě měření optické hustoty suspenze buněk v bujónu o požadované koncentraci MK pomocí fotometru TECAN Sunrise TW/TC. Do každé jamky mikrotitrační destičky byl napipetován objem 200 μl kultivačního média s příslušnou koncentrací MK. Poté bylo do každé jamky napipetováno 5 μl suspenze bakterií. Do prvního řádku byl napipetován pouze bujón bez mikroorganismu. Destička byla měřena kontinuálně 24 h při teplotě $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a vlnové délce 600 nm. Následně byly sestrojeny grafy závislosti optické

denzity na čase. Z vypracovaných růstových křivek byla odečtena minimální inhibiční koncentrace (MIC) dané kyseliny pro každý mikroorganismus.

Tabulka 10 Schéma zaočkování mikrotitrační destičky

-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
B	C8 0	C8 0	C8 500	C8 500	C8 1000	C8 1000	C8 1500	C8 1500	C8 2000	C8 2000	C8 2500	C8 2500
C	C10 0	C10 0	C10 500	C10 500	C10 1000	C10 1000	C10 1500	C10 1500	C10 2000	C10 2000	C10 2500	C10 2500
D	C12 0	C12 0	C12 500	C12 500	C12 1000	C12 1000	C12 1500	C12 1500	C12 2000	C12 2000	C12 2500	C12 2500

Legenda: b – bujón; C8 – kyselina kaprylová; C10 – kyselina kaprinová; C12 – kyselina laurová; čísla ve druhém řádku buněk udávají koncentraci dané kyseliny [mg/l]

4.3.3 Záznamník růstu buněk

Inhibiční efekt na růst bakterie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 byl proveden pomocí osobního bioreaktoru RTS – 1C (BioSan). Do speciální tuby (TubeSpin Bioreactor) s membránovým filtrem ve víčku o objemu 50 ml byl napipetován bujón a mastná kyselina dle tab. 8, aby byla vytvořena výsledná koncentrace MK. Poté bylo přidáno 50 µl suspenze buněk. Přístroj měřil optickou denzitu suspenze buněk v tubě a zároveň byla zaznamenávána růstová křivka v závislosti na délce kultivace. Měření bylo prováděno kontinuálně 24 h při teplotě 30 °C. Po ukončení záznamu růstu bakterie byla odečtena MIC pro každou kyselinu. Bylo provedeno zhodnocení jednotlivých metod.

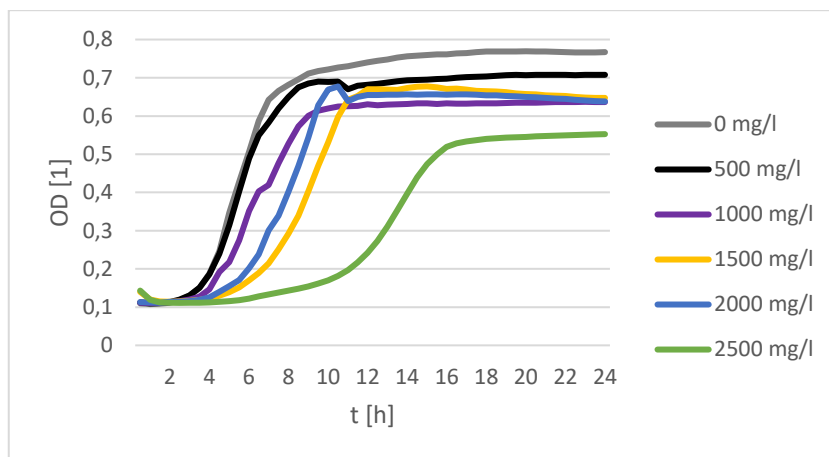
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Po získání dat z obou metod byly sestrojeny růstové křivky bakterií. Grafy závislosti optické denzity na čase znázorňují inhibiční účinky příslušné koncentrace kyseliny na zvolený mikroorganismus.

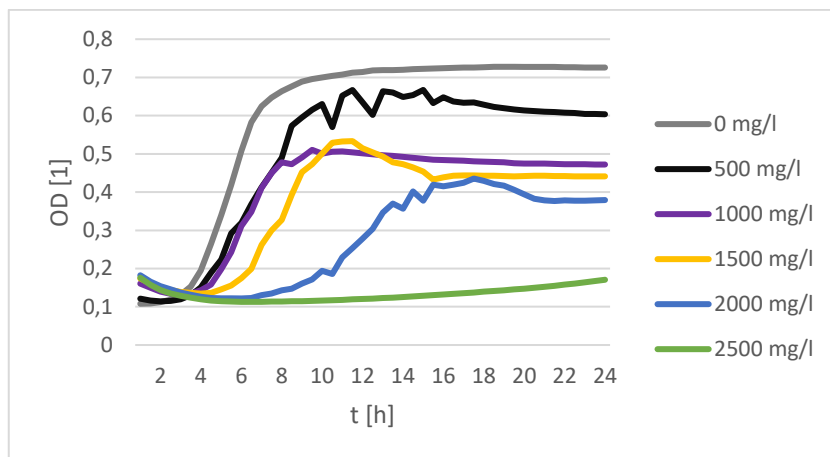
5.1 Působení mastných kyselin na bakterie rodu *Enterococcus*

5.1.1 Působení mastných kyselin na *Enterococcus durans* CCDM 2665

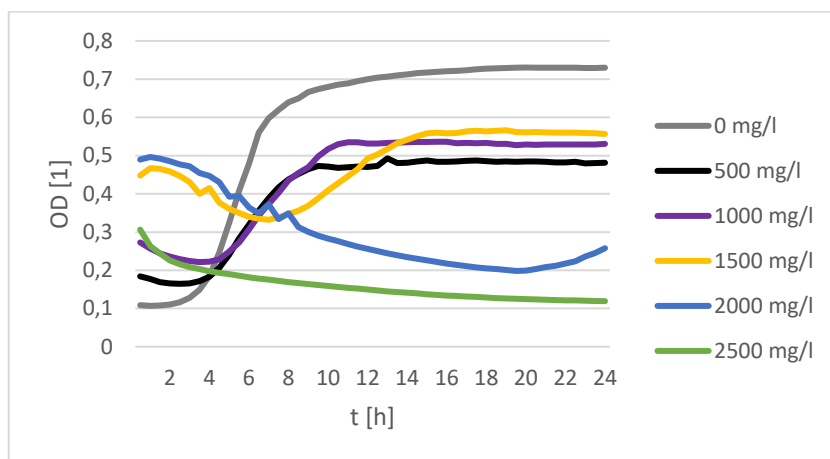
Inhibiční působení mastných kyselin na bakterii *Enterococcus durans* CCDM 2665 bylo, podobně jako u ostatních laktokoků, sledováno pomocí mikrodiluční metody. Z obrázků 3-5 je patrné, že zvolené mastné kyseliny příliš neinhibovaly růst této bakterie. Nejlepší účinky vykazovala kyselina laurová v testovaných koncentracích 1500, 2000 a 2500 mg/l, kdy docházelo k poklesu optické denzity. Nejmenší inhibiční účinky byly zaznamenány u kyseliny kaprylové, kdy nedošlo k zastavení růstu této bakterie. V nejvyšší aplikované koncentraci (2500 mg/l) došlo pouze k prodloužení doby lagu o cca 5 hodin a ke snížení celkového nárůstu buněk.



Obrázek 3 Inhibiční vliv kyseliny kaprylové na *Enterococcus durans* CCDM 2665



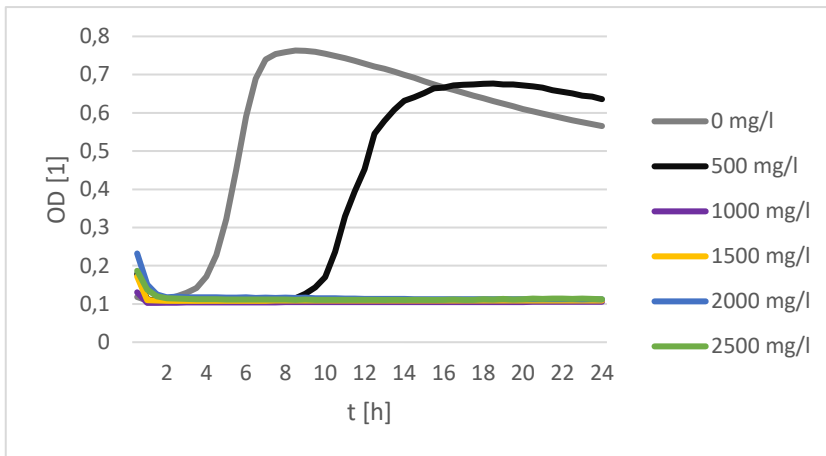
Obrázek 4 Inhibiční vliv kyseliny kaprinové na *Enterococcus durans* CCDM 2665



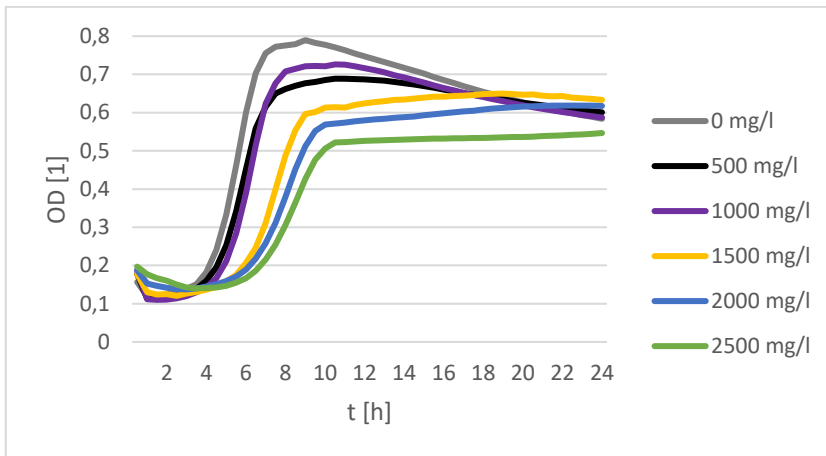
Obrázek 5 Inhibiční vliv kyseliny laurové na *Enterococcus durans* CCDM 2665

5.1.2 Působení mastných kyselin na *Enterococcus durans* CCDM 53

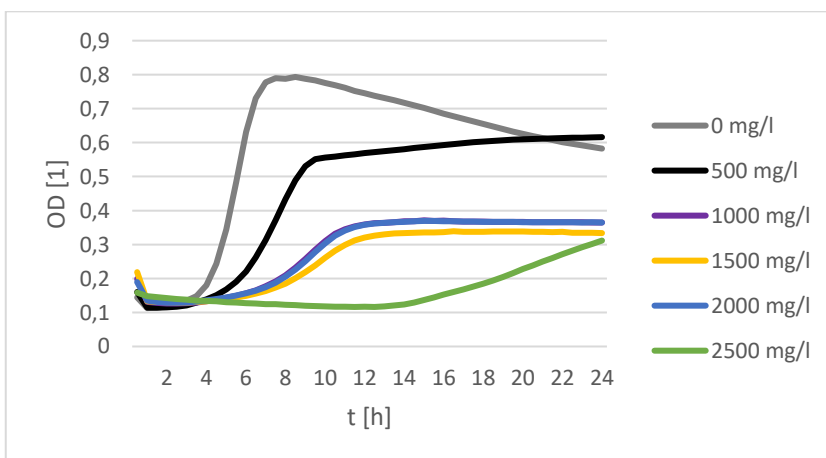
Dalším zástupcem z rodu *Enterococcus* byla bakterie *Enterococcus durans* CCDM 53. Omezení růstu bylo pozorováno u všech tří mastných kyselin. Nejnižší koncentrace inhibující růst bakterie byla určena u kyseliny kaprylové na základě grafu na obr. 6, a to 1000 mg/l. Mikroorganismus nevykazoval žádný růst ani v prvních hodinách kultivace, inhibice byla okamžitá. Aplikace kyseliny kaprylové do bujónu v koncentraci 500 mg/l způsobila prodloužení lag fáze až na 8 hodin. Z grafu na obr. 7 je patrné, že kyselina kaprinová neomezila růst *E. durans* CCDM 53. Ani u jedné z testovaných koncentrací nedošlo k prodloužení lag fáze a snížení denzity buněčné suspenze. Kyselina kaprinová působila tedy nejslaběji ze všech tří kyselin na daný mikroorganismus. Kyselina laurová vykazovala slabší vliv než kyselina kaprylová. K výraznějšímu prodloužení lag fáze a viditelné inhibici bakterie došlo až při nejvyšší koncentraci (2500 mg/l).



Obrázek 6 Působení kyseliny kaprylové na *Enterococcus durans* CCDM 53



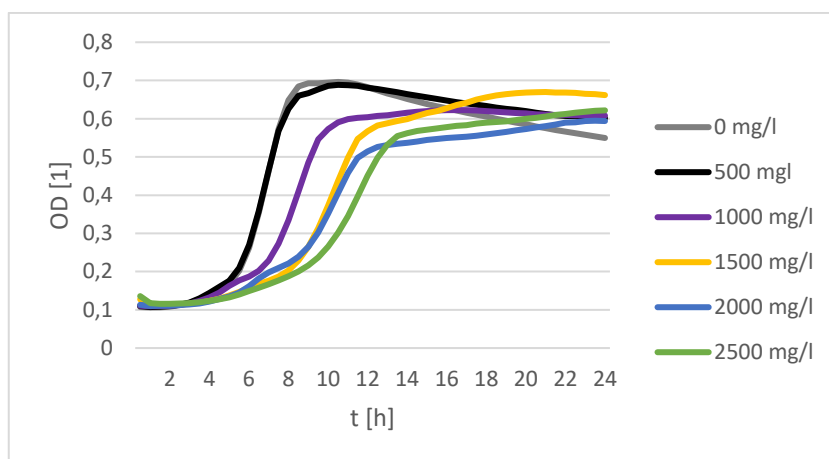
Obrázek 7 Působení kyseliny kaprinové na *Enterococcus durans* CCDM 53



Obrázek 8 Působení kyseliny laurové na *Enterococcus durans* CCDM 53

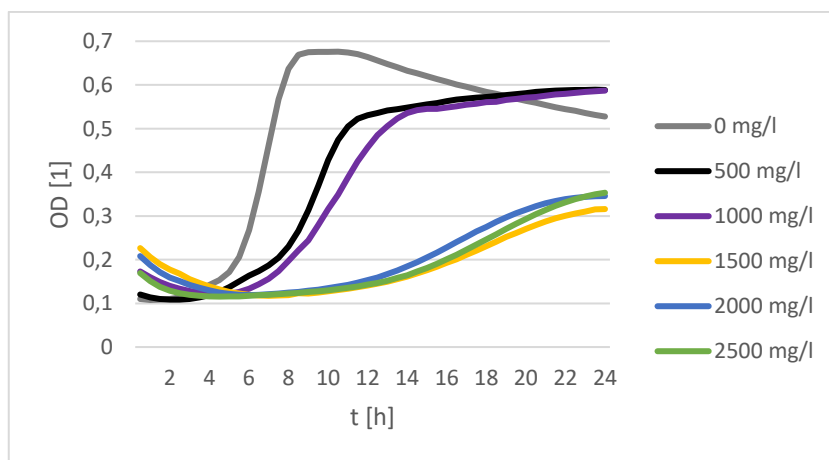
5.1.3 Působení mastných kyselin na *Enterococcus faecalis* CCDM 4224

Posledním vyšetřovaným kmenem z rodu *Enterococcus* byl *Enterococcus faecalis* CCDM 4224. Kyselina kaprylová působila na daný kmen nejslaběji. Růstové křivky u všech koncentrací vykazují podobný charakter. U koncentrace nejvyšší (2500 mg/l) došlo k prodloužení lag fáze kolem pouhých 3 hodin.



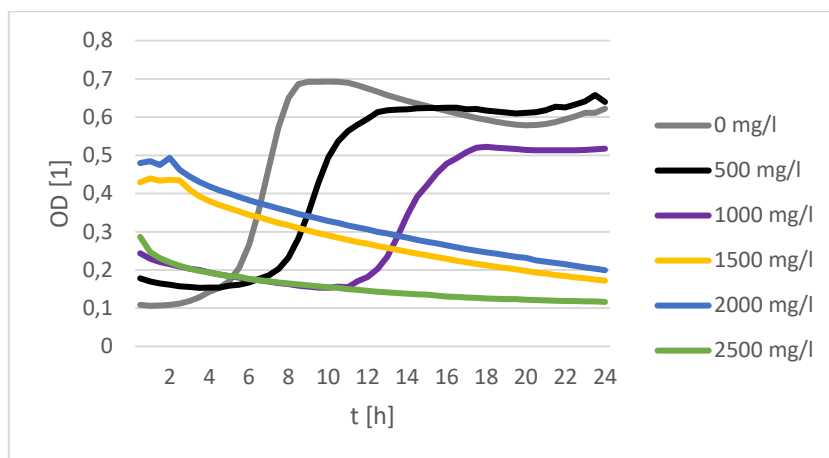
Obrázek 9 Vliv kyseliny kaprylové na *Enterococcus faecalis* CCDM 4224

Podle grafu na obr. 10 je patrné, že k inhibici *E. faecalis* CCDM 4224 kyselinou kaprinovou nestačily ani její vyšší koncentrace v živném médiu. Koncentrace 500 mg/l a 1000 mg/l vykazují téměř shodný průběh růstové křivky bakterie. K prodloužení lag fáze došlo o pouhé 2 hodiny a následně je z křivky patrný nárůst hustoty suspenze buněk, tudíž další množení bakterie. Vyšší koncentrace kyseliny (1500-2500 mg/l) způsobily zřetelnější prodloužení lag fáze růstu (o cca 8 hodin), nicméně bakterie dále pokračovala v množení.



Obrázek 10 Vliv kyseliny kaprinové na *Enterococcus faecalis* CCDM 4224

Výraznější inhibiční efekt na růst tohoto kmene byl pozorován na grafu z obr. 11. Kyselina laurová jednoznačně zamezila růstu buněk již při koncentraci 1500 mg/l.

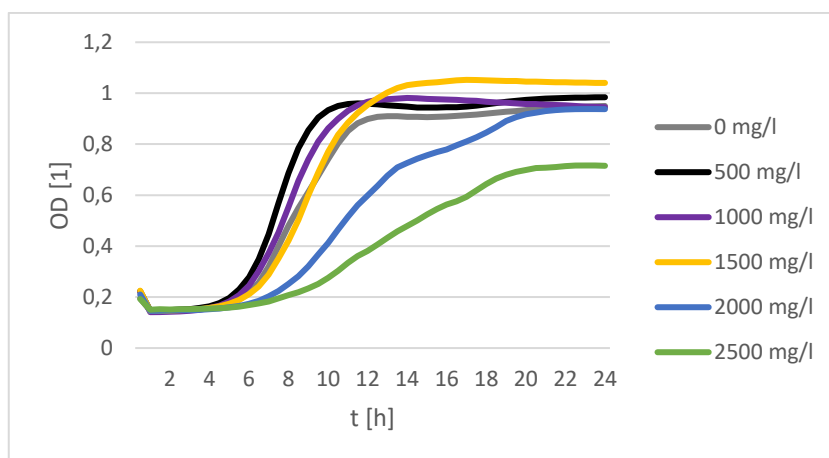


Obrázek 11 Vliv kyseliny laurové na *Enterococcus faecalis* CCDM 4224

5.2 Působení mastných kyselin na rod *Lactococcus*

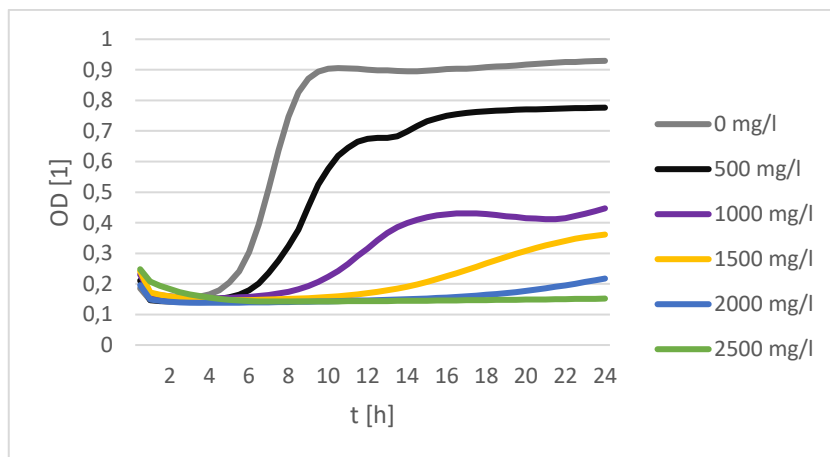
5.2.1 Působení mastných kyselin na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141

Druhou skupinou mikroorganismů, na níž byl pozorován vliv mastných kyselin je rod *Lactococcus*. Prvním sledovaným kmenem byl *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141. Z grafu na obr. 12 je vidět působení kyseliny kaprylové na růst buněk tohoto kmene. Oproti ostatním sledovaným kyselinám je patrný nejslabší účinek, viz. obr. 13 a 14. Ani nejvyšší koncentrace kyseliny kaprylové nestačila k zastavení množení buněk a k inhibici u tohoto kmene tedy vůbec nedošlo.



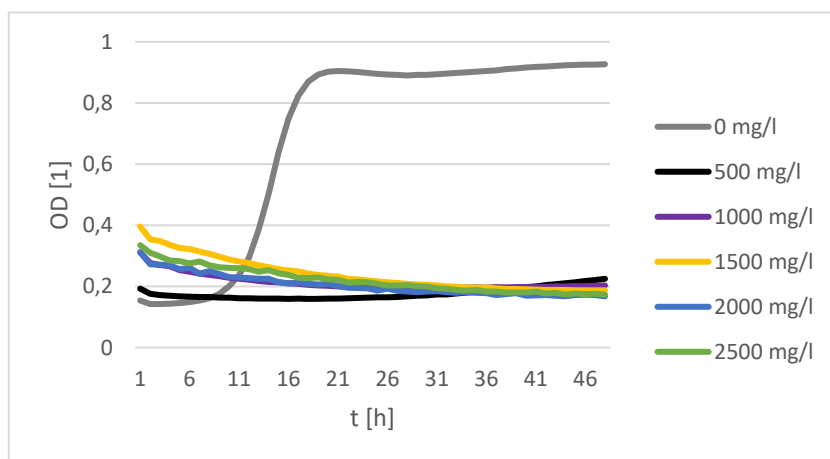
Obrázek 12 Působení kyseliny kaprylové na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141

Lepších výsledků bylo dosaženo působením kyseliny kaprinové. Z grafu na obr. 13 je patrné, že se zvyšující se koncentrací mastné kyseliny se prodlužuje doba lagu. Je také možné pozorovat rozdíl mezi koncentracemi 500 mg/l a 1000 mg/l. V případě koncentrace 1000 mg/l je zřetelně kratší log fáze růstové křivky. MIC pro kyselinu kaprinovou byla stanovena na 2000 mg/l.



Obrázek 13 Působení kyseliny kaprinové na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141

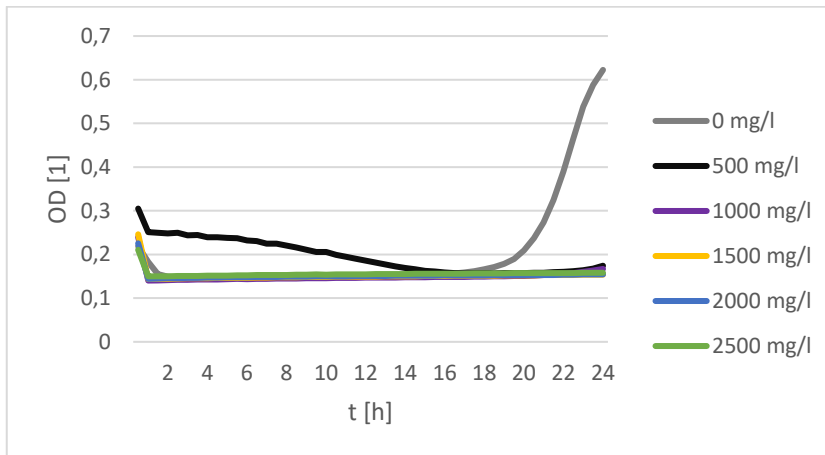
Nejsilnější inhibiční efekt ze všech tří mastných kyselin na daný kmen vykazovala kyselina laurová. Dle růstových křivek na obr. 14 je vidět, že ani u jediné z koncentrací 500-2500 mg/l nedošlo ke vzniku charakteristických fází růstové křivky. MIC pro kyselinu laurovou na daný kmen je tedy nejnižší ze zvolených koncentrací (500 mg/l).



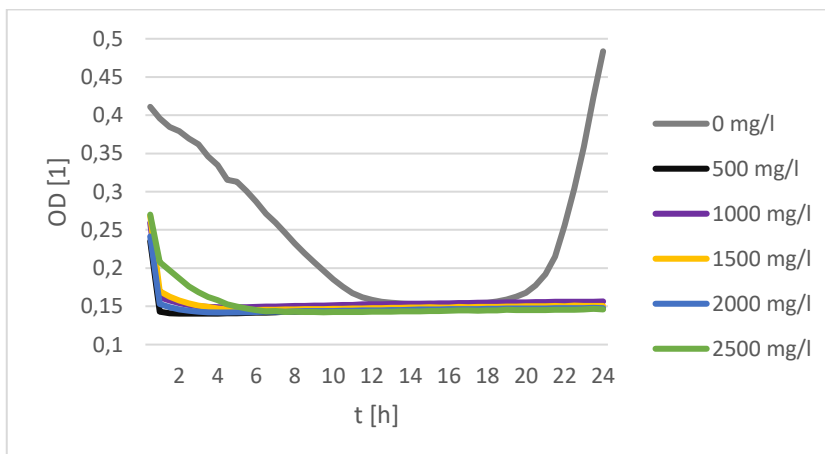
Obrázek 14 Působení kyseliny laurové na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141

5.2.2 Působení mastných kyselin na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

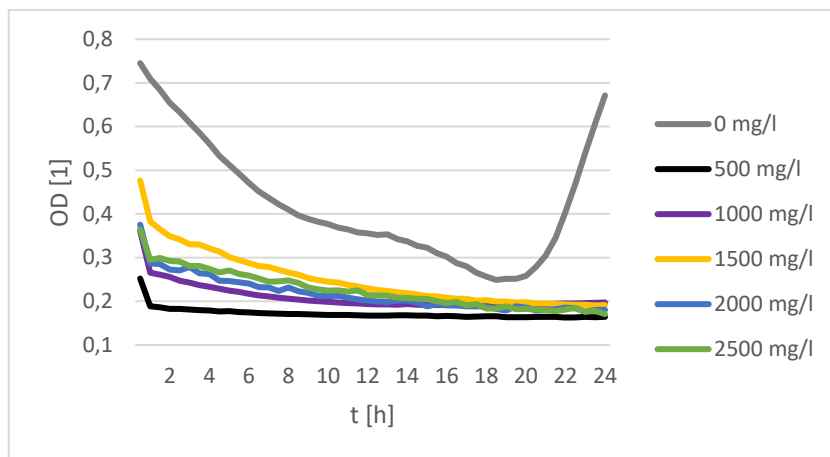
Druhým zástupcem rodu *Lactococcus* byl kmen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004. V tomto případě došlo k okamžitému a úplnému zastavení množení buněk již při nejnižší koncentraci (500 mg/l) u všech tří mastných kyselin, viz. obr. 15-17.



Obrázek 15 Vliv kyseliny kaprylové na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004



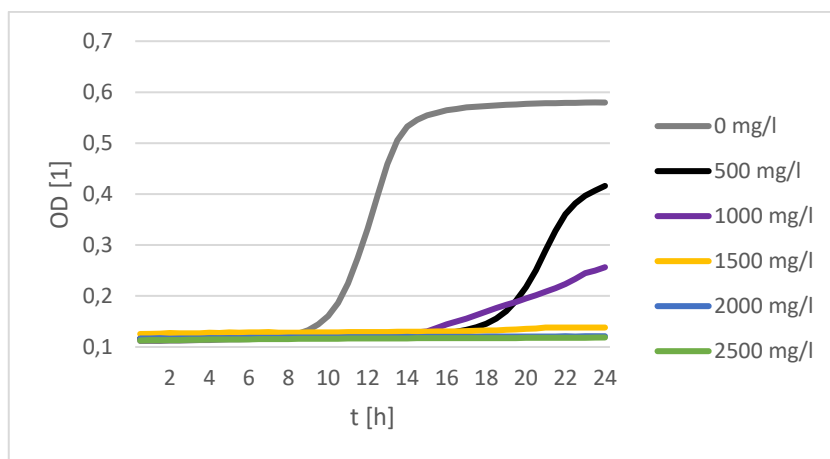
Obrázek 16 Vliv kyseliny kaprinové na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004



Obrázek 17 Vliv kyseliny laurové na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

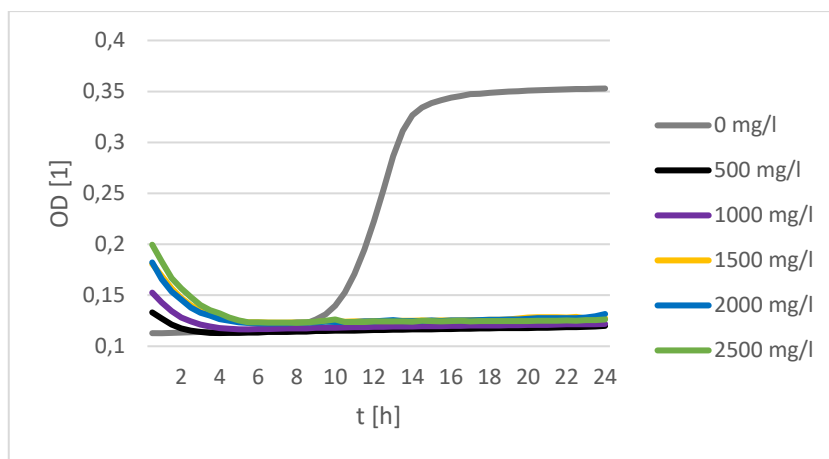
5.2.3 Působení mastných kyselin na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

Kyselina laurová vykazovala z daných mastných kyselin nejslabší vliv na tento kmen. Odolnost bakterie je patrná při koncentraci 500 mg/l, kde i přes delší dobu lag fáze nakonec stoupá hustota zákalu buněk a bakterie se dále množí. Při koncentraci 1000 mg/l je patrné výraznější omezení růstu, ale po 14 hodinách se bakterie dále množí. Při koncentraci 1500 mg/l není patrný růst ani po 20 hodinách, a proto byla stanovena tato koncentrace jako MIC.

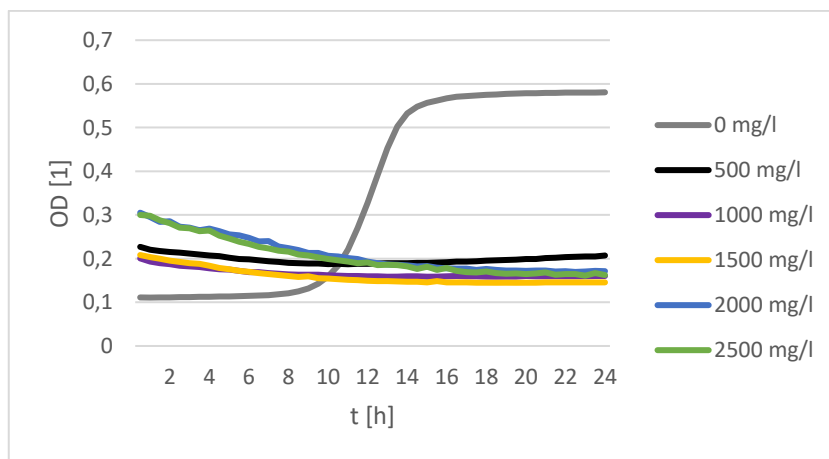


Obrázek 18 Působení kyseliny kaprylové na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

U kyseliny kaprinové a laurové je dle grafů na obr. 19 a 20 patrný inhibiční efekt již při nejnižší koncentraci (500 mg/l). Kyselina kaprinová má ve srovnání s ostatními dvěma kyselinami silnější účinky na daný kmen, neboť k úplnému zastavení růstu došlo po cca 6 hodinách, což je patrné z grafu na obr. 19. U kyseliny laurové došlo k úplné inhibici růstu buněk až po cca 13 hodinách u koncentrace 1500 mg/l. Avšak u vyšších koncentrací byl růst zastaven až po cca 20 hodinách měření, dle grafu na obr. 20.



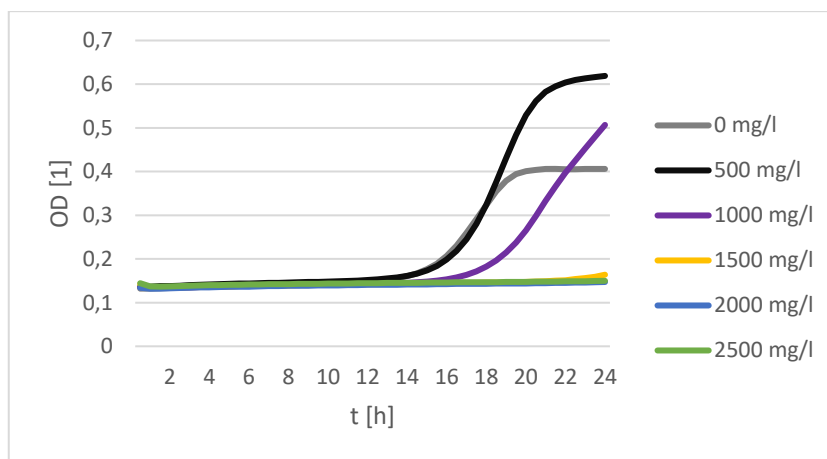
Obrázek 19 Působení kyseliny kaprinové na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48



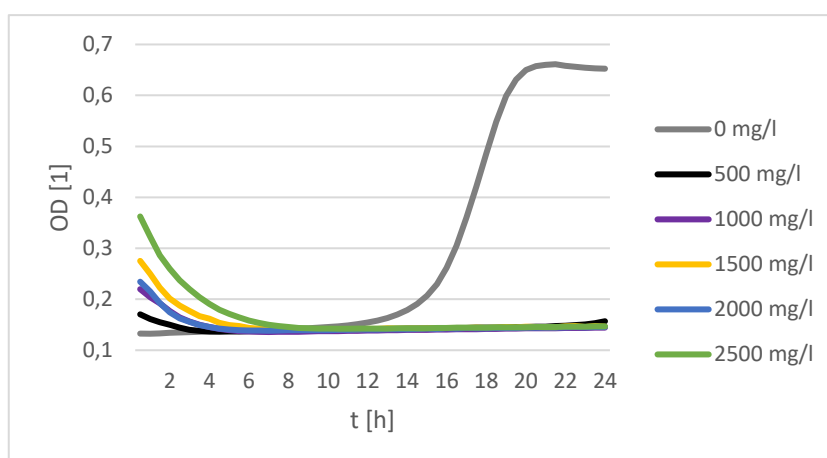
Obrázek 20 Působení kyseliny laurové na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

5.2.4 Působení mastných kyselin na *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

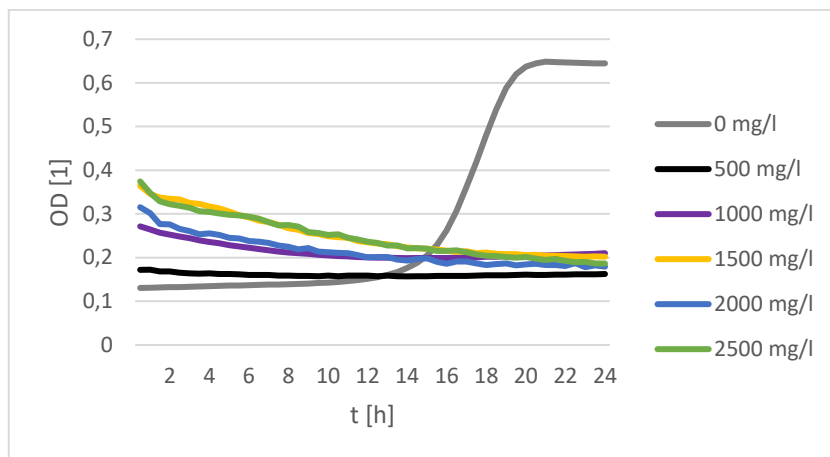
Vůči zástupci *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 vykazovala nejslabší vliv kyselina kaprylová. Neumožnila růst buněk až při koncentraci 1500 mg/l, což je ve srovnání s dalšími dvěma kyselinami nejvyšší hodnota. Z grafu na obr. 21 je možné pozorovat rozdíl mezi koncentracemi 1000 a 1500 mg/l. Při koncentraci 1000 mg/l kyseliny kaprylové v médiu dosahuje hustota suspenze buněk k hodnotě 0,5 a následná koncentrace 1500 mg/l již způsobuje úplnou inhibici růstu buněk. Kyseliny kaprinová a laurová vykazovaly u bakterie *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 podobných výsledků jako u *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48. Dle grafů na obr. 22 a 23 můžeme konstatovat, že MIC byla v obou případech 500 mg/l. Kyselina kaprinová působila silněji než kyselina laurová, k úplnému zastavení růstu buněk došlo, dle grafu na obr. 22 po cca 7 hodinách.



Obrázek 21 Inhibiční vliv kyseliny kaprylové na *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824



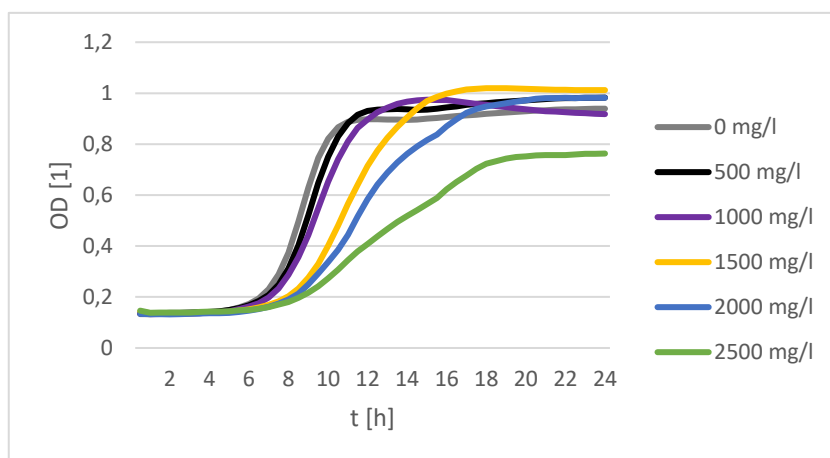
Obrázek 22 Inhibiční vliv kyseliny kaprinové na *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824



Obrázek 23 Inhibiční vliv kyseliny laurové na *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

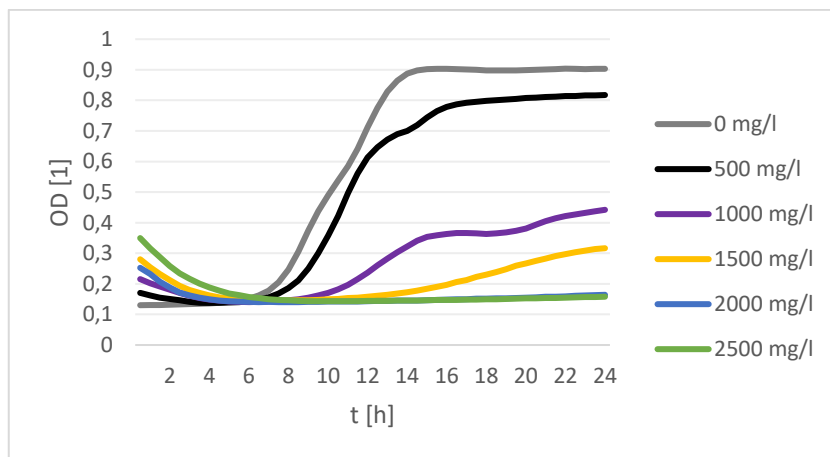
5.2.5 Působení mastných kyselin na *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946

Posledním zkoumaným zástupcem rodu *Lactococcus* byl *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946. Působením kyseliny kaprylové nebyl prokázán inhibiční efekt ani u jedné ze zvolených koncentrací, dle grafu na obr. 24. Ve srovnání s dalšími dvěma kyselinami měla nejslabší efekt právě kyselina kaprylová na zvolený kmen.



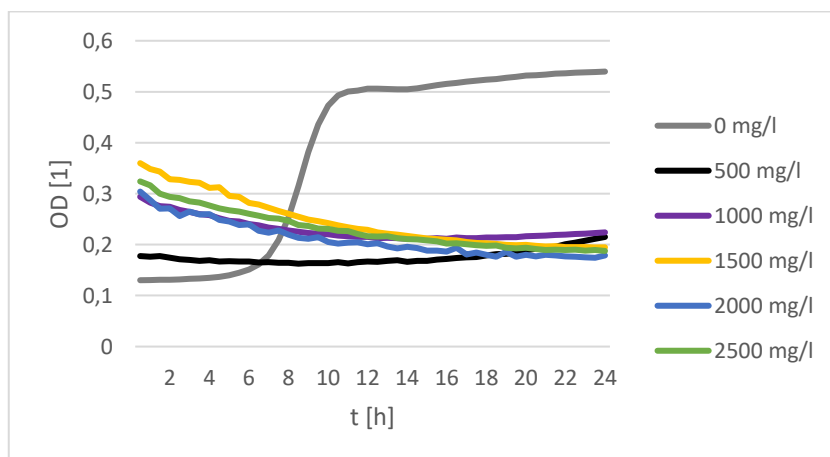
Obrázek 24 Inhibiční působení kyseliny kaprylové na *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946

Naopak kyselina kaprinová ovlivňovala růst kmene znatelněji než kyselina kaprylová. Již při koncentraci 1000 mg/l je možno na obr. 25 pozorovat, jak klesla hustota suspenze buněk v médiu z cca 0,9 na 0,5. Přesto bakterie dále rostla. Většího zpomalení růstu bylo dosaženo koncentrací 1500 mg/l, avšak také je možno na grafu obr. 25 pozorovat růst buněk. Úplné zastavení množení buněk bylo dosaženo až koncentrací 2000 mg/l.



Obrázek 25 Inhibiční působení kyseliny kaprinové na *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946

Nejlépeších výsledků bylo dosaženo působením kyseliny laurové na zvolený kmen bakterie. K okamžité inhibici růstu buněk došlo již od začátku kultivace média pro nejnižší koncentraci kyseliny (500 mg/l).



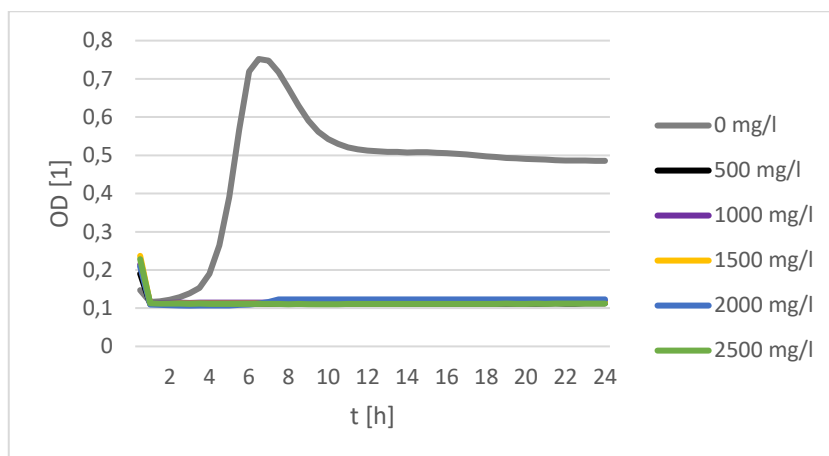
Obrázek 26 Inhibiční působení kyseliny laurové na *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946

5.3 Působení mastných kyselin na enterobakterie

5.3.1 Působení mastných kyselin na *Proteus mirabilis* CCM 7188

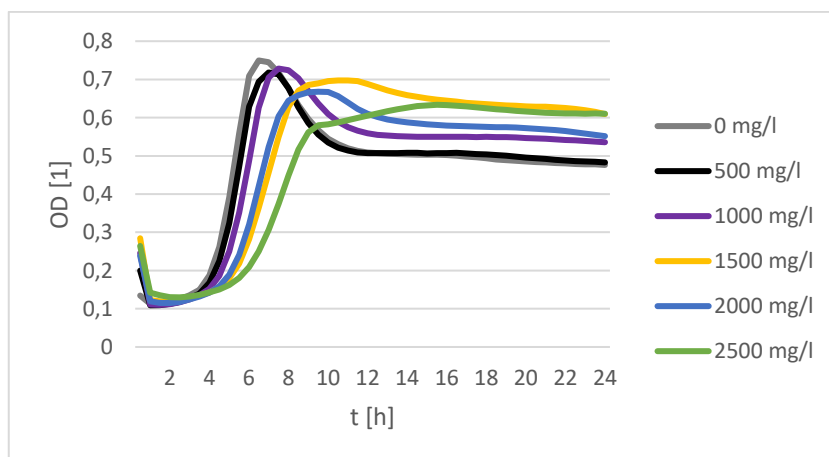
Třetí skupinou testovaných mikroorganismů byly enterobakterie. Byl zkoumán inhibiční vliv mastných kyselin na *Proteus mirabilis* CCM 7188 a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420. Na rozdíl od laktokoků, kde kyselina kaprylová dosahovala slabších účinků, u *Proteus mirabilis* CCM 7188 byla pozorována úplná inhibice. Dle grafu na

obr. 27 můžeme konstatovat, že k růstu buněk nedošlo po celou délku měření hustoty zákalu suspenze.



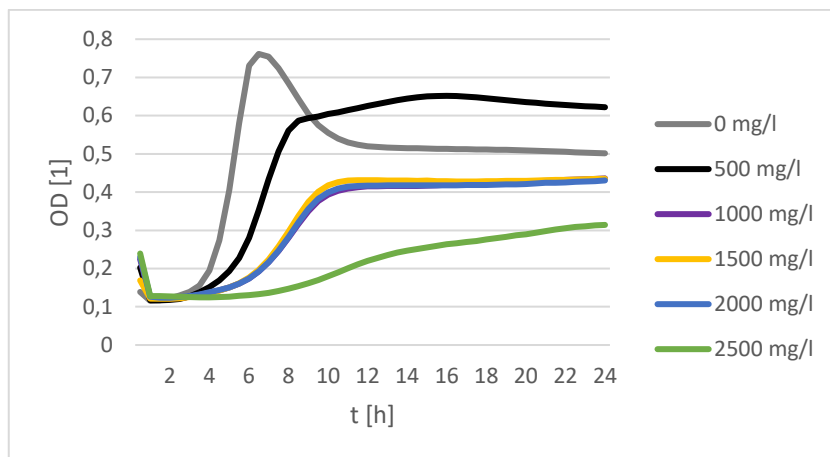
Obrázek 27 Inhibiční vliv kyseliny kaprylové na *Proteus mirabilis* CCM 7188

Naprostě odlišných výsledků bylo získáno působením kyseliny kaprinové na tuto bakterii. Dle grafu na obr. 28 je zřejmé, že nedošlo k žádnému ovlivnění růstu buněk. *P. mirabilis* CCM 7188 vykazoval nejvyšší odolnost vůči kyselině kaprinové ze všech testovaných mastných kyselin.



Obrázek 28 Inhibiční vliv kyseliny kaprinové na *Proteus mirabilis* CCM 7188

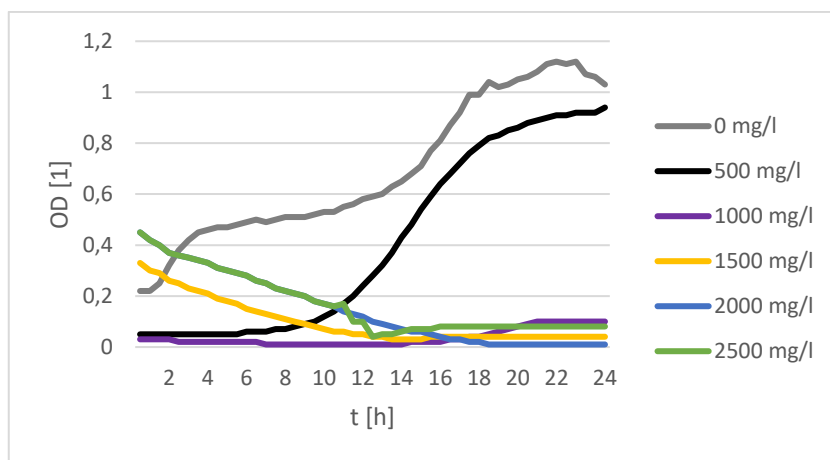
Dle grafu na obr. 29 byl vytvořen průběh růstu buněk dané bakterie působením kyseliny laurové. Působením koncentrace 500 mg/l v médiu nebyla pozorována inhibice. Při koncentracích 1000-2000 mg/l došlo k prodloužení lag fáze o cca 2 hodiny, zkrácení log fáze, ale pokračoval růst buněk. Při nejvyšší koncentraci (2500 mg/l) došlo k prodloužení lag fáze o cca 5 hodin, přesto nedošlo k zastavení růstu bakterie.



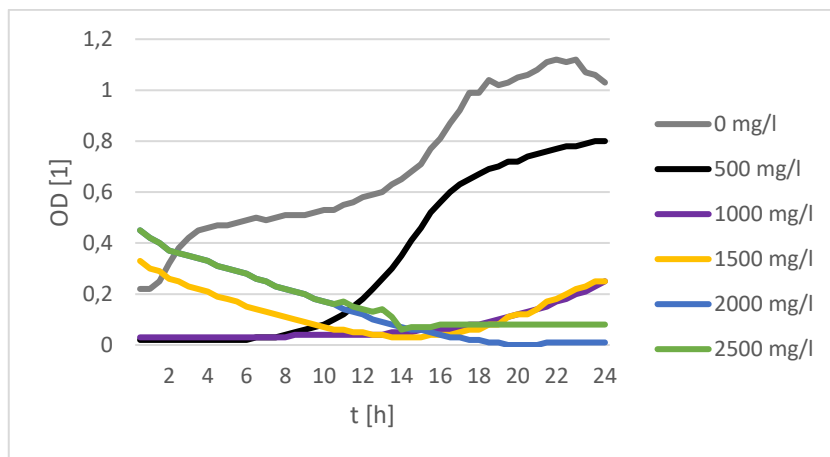
Obrázek 29 Inhibiční vliv kyseliny laurové na *Proteus mirabilis* CCM 7188

5.3.2 Působení mastných kyselin na *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

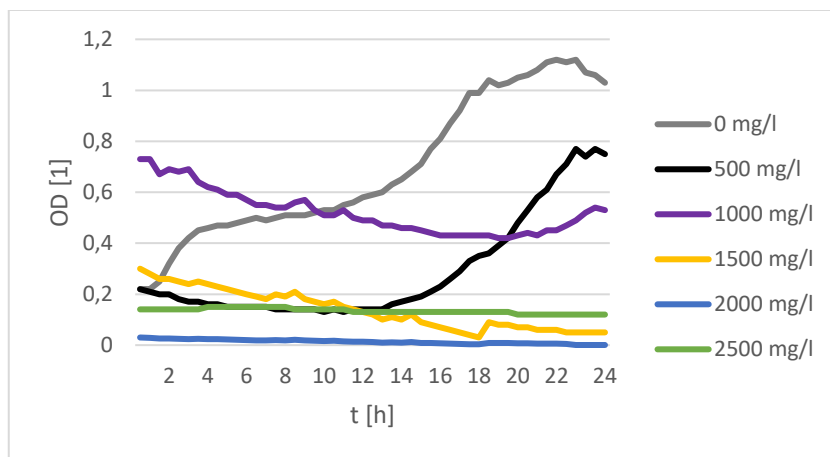
Inhibiční působení testovaných mastných kyselin na tento kmen bylo sledováno pomocí záznamníku růstu buněk. U tohoto kmene bylo dosaženo stejných MIC (1000 mg/l) u všech kyselin, jak je patrné z grafů na obr. 30-32. Působením kyseliny kaprylové došlo při její aplikaci v koncentraci 500 mg/l k prodloužení lag fáze o cca 8 hodin. U dalších dvou testovaných kyselin byla délka této fáze o něco delší, což značí, že v koncentraci 500 mg/l působila tato kyselina na daný kmen nejsilněji. U vyšších koncentrací došlo ke znatelnějšímu vlivu všech tří mastných kyselin. Nejsilněji působila kyselina laurová, neboť optická denzita zákalu média byla nejnižší hned u dvou koncentrací (2000 a 2500 mg/l). V těchto případech byla téměř konstantní po celou délku kultivace.



Obrázek 30 Inhibiční působení kyseliny kaprylové na *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420



Obrázek 31 Inhibiční působení kyseliny kaprinové na *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420



Obrázek 32 Inhibiční působení kyseliny laurové na *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

5.4 Stanovení minimálních inhibičních koncentrací

V tab. 11 jsou shrnuty výsledky působení jednotlivých mastných kyselin na testované dekarboxyláza-pozitivní bakterie. Výsledky jsou prezentovány jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) dané kyseliny.

Z tabulky je patrné, že nejvíce citlivou bakterií na aplikované kyseliny byl *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004. Ze všech použitých mastných kyselin došlo k téměř úplnému zastavení růstu již od začátku kultivace při nejnižší aplikované koncentraci (500 mg/l). Naopak nejodolnějším kmenem byl *Enterococcus faecalis* CCDM 4224. V případě hned dvou mastných kyselin (kaprylové a kaprinové) nebylo pozorováno zastavení růstu buněk. Dalším

mikroorganizmem, u kterého nedošlo k zastavení růstu buněk, byl *Proteus mirabilis* CCM 7188. V tomto případě se jednalo o rezistenci vůči působení kyselin kaprinové a laurové. Zajímavé je, že v případě ostatních zkoumaných kmenů působila kyselina laurová vždy inhibičně a v některých případech nejsilněji ze zvolených kyselin. Ze všech tří mastných kyselin vykazovala zastavení růstu mikroorganismů při nízkých koncentracích nejčastěji kyselina laurová. MIC pro tuto kyselinu byla ve více případech již 500 mg/l. Kyselina kaprylová vykazovala slabší účinky na rod *Lactococcus* než kyselina kaprinová. Z výsledků rovněž vyplývá, že vůči působení mastných kyselin byl ze zástupců enterobakterií odolnější *Proteus mirabilis* CCM 7188, kde ve dvou případech nedošlo k inhibici vůbec. Oproti tomu v případě kyseliny kaprylové stačila nejnižší koncentrace 500 mg/l k zastavení růstu.

Tabulka 11 Minimální inhibiční koncentrace mastných kyselin

Mikroorganismus	MIC C8:0 [mg/l]	MIC C10:0 [mg/l]	MIC C12:0 [mg/l]
<i>E. durans</i> CCDM 2665	-	2500	2000
<i>E. faecalis</i> CCDM 53	1000	-	2500
<i>E. faecalis</i> CCDM 4224	-	-	1500
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141	-	2000	500
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004	500	500	500
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48	1500	500	500
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824	1500	500	500
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946	-	2000	500
<i>P. mirabilis</i> CCM 7188	500	-	-
<i>S. Enteritidis</i> CCM 4420	1000	1000	1000

Legenda: – nebyla pozorována inhibice u žádné z testovaných koncentrací; MIC – minimální inhibiční koncentrace; C8:0 – kyselina kaprylová; C10:0 kyselina kaprinová; C12:0 – kyselina laurová

5.5 Diskuze

Cílem praktické části této bakalářské práce bylo stanovení minimálních inhibičních koncentrací mastných kyselin kaprylové, kaprinové a laurové na 10 vybraných kmenů bakterií. Metabolismus všech zvolených mikroorganismů disponuje schopností produkovat biogenní aminy.

Po získání dat z mikrotitrační diluční metody i ze záznamníku růstu buněk byly sestrojeny růstové křivky bakterií. Po vynesení grafické závislosti optické denzity na čase kultivace byly pozorovány inhibiční vlivy jednotlivých mastných kyselin.

Bylo vypracováno mnoho prací zabývajících se antimikrobním působením látek na bakteriální buňku. V diplomové práci Čechové [35] byl zkoumán vliv mastných kyselin a jejich monoacylglycerolů taktéž na zástupce rodu *Enterococcus*, *Lactococcus* a enterobakterií. Z práce vyplývá, že monoacylglyceroly (MAG) mastných kyselin kaprylové, kaprinové a laurové vykazují výraznější inhibiční efekt než samotné mastné kyseliny, zejména po delší kultivaci (48 h). Mastné kyseliny byly použity v nízkých koncentracích (25-1500 mg/l). V této bakalářské práci byly využity u stejných kyselin vyšší koncentrace (500-2500 mg/l) a byl pozorován výraznější inhibiční efekt na zvolené kmeny. V práci Čechové byl dále prokázán nejvyšší inhibiční efekt MAG C12:0 na kmen *Enterococcus faecalis* CCDM 4224. V této studii byla dokázána odolnost tohoto kmene ve srovnání s ostatními jako jedna z nejvyšších. Inhibiční efekt byl pozorován až u kyseliny laurové v koncentraci 1500 mg/l. V jiné diplomové práci Voltnerové [36] byla stanovena MIC u kyseliny laurové již 100 mg/l při působení na gram-pozitivní bakterii *S.aureus*.

V jiné studii byl zkoumán vliv kyseliny kaprylové na vybrané bakterie. Ze zvolených zástupců došlo k úplné inhibici růstu buněk *S.aureus* při aplikaci této kyseliny v koncentraci 0,25 % v/v. K zastavení růstu bakterie *E.coli* byla zapotřebí kyselina kaprylová v koncentraci 0,75 % v/v. Ještě vyšší koncentrace (2 % v/v) potom zastavila růst buněk bakterie *Serratia marcescens*. [37] Je tedy patrné, že pro inhibici gram-negativních bakterií bylo třeba vyšších koncentrací kyseliny kaprylové.

Experiment vypracovaný na jedné japonské univerzitě zkoumal antibakteriální vliv mastných kyselin na dvě gram-pozitivní bakterie, *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis*. [38] Mezi zvolenými MK byly také kyseliny kaprylová, kaprinová a laurová. Hodnota MIC u saturovaných MK roste se zkracujícím se řetězcem kyseliny. MIC pro kyselinu laurovou byla stanoven na 18,8 mg/l u obou testovaných mikroorganismů. Vyšších hodnot

MIC bylo dosaženo u kyseliny kaprinové (100 mg/l) taktéž u obou bakterií. U kyseliny s nejkratším řetězcem bylo dosaženo nejvyšší MIC 350 mg/l u *S. epidermidis* a 400 mg/l u *S. aureus*. Ve srovnání s touto prací, u zkoumaných gram-pozitivních zástupců z rodů *Enterococcus* a *Lactococcus* nelze jednoznačně určit podobnost s výsledky japonského experimentu. Trend klesající délky řetězce saturovaných MK a s tím rostoucí hodnota MIC se dá vyčíst z tab. 11 u *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946.

Pro stanovení MIC u inhibičních látek na bakterie je vhodnější využití záznamníku růstu buněk než mikrotitrační diluční metody. Při práci se speciálními tubami (TubeSpin Bioreactor) je rychlejší doba manipulace, naplnění média a samotné inokulace. Nedochozí tak ke zbytečné kontaminaci spadem, nebo i jiným způsobem. Samotné měření je okamžitě zaznamenáváno do grafu závislosti optické denzity média na čase kultivace. Je tedy možno pohodlným způsobem kontrolovat pokračování experimentu a popřípadě jej zastavit, nebo upravit. Každý bioreaktor má vlastní ovládání a je možno upravit parametry (teplotu, frekvenci měření, intervaly mezi protřepáváním, aj.) během experimentu samostatně. Není potřeba rušit celý pokus, kvůli jednomu měření. Nevýhodou tohoto postupu může být vnímán fakt, že na jedno měření připadá jeden bioreaktor. Existuje tedy jisté omezení v rychlosti naměření dat experimentu, která je tak limitována počtem zařízení v laboratoři.

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala vlivem kyselin kaprylové, kaprinové a laurové na bakterie produkující biogenní aminy. Hlavním úkolem bylo stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) u jednotlivých mastných kyselin při působení na 10 vybraných kmenů dekarboxyláza-pozitivních bakterií.

Z výsledků je patrné, že:

- nejsilnější efekt vykazovala kyselina laurová. U 10 zkoumaných kmenů bakterií inhibovala v 5 případech již při koncentraci 500 mg/l,
- nejslaběji na testované kmeny působila kyselina kaprylová,
- nejodolnějším kmenem ze všech testovaných bakterií byl *Enterococcus faecalis* CCDM 4224. K zastavení růstu nedošlo vůbec v případě kyseliny kaprylové ani kaprinové. U kyseliny laurové došlo k úplné inhibici až při vyšší koncentraci 1500 mg/l,
- ze zástupců laktokoků byla zjištěna nejnižší MIC (500 mg/l) u všech tří mastných kyselin u *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004,
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 byly nejodolnější kmeny ze zástupců testovaných laktokoků vůči působení výše zmíněných tří mastných kyselin,
- u zástupců enterobakterií byla stanovena nejnižší MIC u kmene *Proteus mirabilis* CCM 7188 a to 500 mg/l pro kyselinu kaprylovou. Tento kmen byl zároveň nejodolnější ze zástupců enterobakterií a jediným testovaným mikroorganizmem, který neinhibovala kyselina laurová.

Pro stanovení MIC u látek inhibujících růst bakterií je vhodnější použití záznamníku růstu buněk. Metoda nabízí více výhod než nevýhod.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SHALABY, Ali R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* [online]. 1996, **29**(7), 675-690 [cit. 2019-01-15]. DOI: 10.1016/S0963-9969(96)00066-X. ISSN 09639969. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399699600066X>
- [2] GUO, Yan-Yun, Yan-Ping YANG, Qian PENG a Ye HAN. Biogenic amines in wine: a review. *International Journal of Food Science & Technology*[online]. 2015, **50**(7), 1523-1532 [cit. 2019-02-24]. DOI: 10.1111/ijfs.12833. ISSN 09505423. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/ijfs.12833>
- [3] KOMPRDA, Tomáš. *Obecná hygiena potravin*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004. ISBN 978-80-7157-757-7.
- [4] KIM, S.H., R.J. PRICE, M.T. MORRISSEY, K.G. FIELD, C.I. WEI a H. AN. Histamine Production by *Morganella morganii* in Mackerel, Albacore, Mahi-mahi, and Salmon at Various Storage Temperatures. *Journal of Food Science* [online]. 2002, **67**(4), 1522-1528 [cit. 2019-03-14]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb10316.x. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10316.x>
- [5] LEHANE, Leigh a June OLLEY. Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2000, **58**(1-2), 1-37 [cit. 2019-03-18]. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00296-8. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160500002968>
- [6] HALÁSZ, Anna, Ágnes BARÁTH, Livia SIMON-SARKADI a Wilhelm HOLZAPFEL. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 1994, **5**(2), 42-49 [cit. 2019-03-22]. DOI: 10.1016/0924-2244(94)90070-1. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0924224494900701>
- [7] LAKSHMANAN, R., R. JEYA SHAKILA a G. JEYASEKARAN. Survival of amine-forming bacteria during the ice storage of fish and shrimp. *Food Microbiology* [online]. 2002, **19**(6), 617-625 [cit. 2019-04-13]. DOI: 10.1006/fmic.2002.0481. ISSN 07400020. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002002904818>
- [8] EMBORG, J. *Morganella psychrotolerans* sp. nov., a histamine-producing bacterium isolated from various seafoods. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND*

EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY [online]. 2006, **56**(10), 2473-2479 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1099/ijms.0.64357-0. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <http://ijms.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.64357-0>

[9] ARULKUMAR, Abimannan, Sadayan PARAMASIVAM, Palanivel RAMESHTHANGAM a Mohamed A. RABIE. Changes on biogenic, volatile amines and microbial quality of the blue swimmer crab (*Portunus pelagicus*) muscle during storage. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2017, **54**(8), 2503-2511 [cit. 2019-05-18]. DOI: 10.1007/s13197-017-2694-5. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-017-2694-5>

[10] MOLENAAR, D, J S BOSSCHER, B TEN BRINK, A J DRIESSEN a W N KONINGS. Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Bacteriology* [online]. 1993, **175**(10), 2864-2870 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1128/jb.175.10.2864-2870.1993. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <http://jb.asm.org/lookup/doi/10.1128/jb.175.10.2864-2870.1993>

[11] MAIJALA, RIITTA L., SUSANNA H. EEROLA, MATTI A. AHO a JORMA A. HIRN. The Effect of GDL-induced pH Decrease on the Formation of Biogenic Amines in Meat. *Journal of Food Protection* [online]. 1993, **56**(2), 125-129 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.4315/0362-028X-56.2.125. ISSN 0362-028X. Dostupné z: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-56.2.125>

[12] BOVER-CID, SARA, MARIA IZQUIERDO-PULIDO a M. CARMEN VIDAL-CAROU. Mixed Starter Cultures To Control Biogenic Amine Production in Dry Fermented Sausages. *Journal of Food Protection* [online]. 2000, **63**(11), 1556-1562 [cit. 2019-02-21]. DOI: 10.4315/0362-028X-63.11.1556. ISSN 0362-028X. Dostupné z: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-63.11.1556>

[13] TITTARELLI, Fabrizia, Giorgia PERPETUINI, Paola DI GIANVITO a Rosanna TOFALO. Biogenic amines producing and degrading bacteria: A snapshot from raw ewes' cheese. *LWT* [online]. 2019, 101, 1-9 [cit. 2019-02-21]. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.11.030. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643818309812>

[14] PRESTER, Ljerka. Biogenic amines in ready-to-eat foods. *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 397-416 [cit. 2019-04-22].

DOI: 10.1016/B978-0-12-801916-0.00022-4. ISBN 9780128019160. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128019160000224>

[15] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 1*. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902391-5-3.

[16] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. Praha: Academia, 1992. ISBN 8020004386.

[17] MAINTZ, Laura a Natalija NOVAK. Histamine and histamine intolerance. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2007, **85**(5), 1185-1196 [cit. 2019-05-18]. DOI: 10.1093/ajcn/85.5.1185. ISSN 0002-9165. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/85/5/1185/4633007>

[18] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. (2009): *Chemie potravin 2*. 3 vyd. OSSIS Tábor, 624.

[19] KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. Biogenic Amines in Food. *Chem. Pap.*, Vol. 59, No. 1, 2005, p. 70-79.

[20] SILLA SANTOS H., M.: Biogenic amines: their importance in food. *International Journal of Food Microbiology* 29, 1996, 213-231, ISBN 978-80-86659-16-9.

[21] PACHECO-AGUILAR, R., M.E. LUGO-SÁNCHEZ, R.E. VILLEGAS-OZUNA a R. ROBLES-BURGUEÑO. Histamine Quantification in Monterey Sardine Muscle and Canned Products from Northwestern Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 1998, **11**(2), 188-195 [cit. 2019-02-02]. DOI: 10.1006/jfca.1998.0574. ISSN 08891575. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157598905749>

[22] INNOCENTE N., D'AGOSTIN P. (2002) Formation of biogenic amines in a typical semi hard Italian cheese. *Journal of Food Protection*, **65**(9), 1498–501.

[23] EL-ZAHAR, Kahled M., Ahmed M. Abd EL-ZAHER a Mohamed Fawzy RAMADAN. Levels of biogenic amines in cheeses and their impact on biochemical and histological parameters in rats. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 2014, **57**(1), 73-81. DOI: 10.1007/s13765-013-4136-z. ISSN 1738-2203.

[24] NOVELLA-RODRIGUEZ, S., M.T. VECIANA-NOGUES, M. IZQUIERDO-PULIDO a M.C. VIDAL-CAROU. Distribution of Biogenic Amines and Polyamines in Cheese. *Journal of Food Science* [online]. 2003, 20 July 2006, **68**(3), 750-756 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb08236.x. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2003.tb08236.x>

- [25] JANOUŠKOVÁ, Magda. *Biogenní aminy*. Brno, 2010. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Vedoucí práce RNDr. Danuše Lefnerová, Ph.D.
- [26] JAYNE E. STRATTON, ROBERT W. HUTKINS, and STEVE L. TAYLOR (1991) Biogenic Amines in Cheese and other Fermented Foods: A Review. *Journal of Food Protection*, June 1991, Vol. 54, No. 6, pp. 460-470.
- [27] STADNIK, Joanna a Zbigniew J. DOLATOWSKI. BIOGENIC AMINES IN MEAT AND FERMENTED MEAT PRODUCTS*. *Acta Scientiarum Polonorum* [online]. 2010, 2010, **9**(3), 251-263 [cit. 2019-02-19]. ISSN 1889-9594. Dostupné z: https://www.food.acta-pol.net/pub/1_3_2010.pdf
- [28] RUIZ-CAPILLAS, CLAUDIA a FRANCISCO JIMÉNEZ-COLMENERO. Biogenic Amines in Meat and Meat Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2005, **44**(7-8), 489-599 [cit. 2019-02-20]. DOI: 10.1080/10408690490489341. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408690490489341>
- [29] Accumulation of Biogenic Amines in Wine: Role of Alcoholic and Malolactic Fermentation. *Fermentation* [online]. 2018, **4**(1) [cit. 2019-05-18]. DOI: 10.3390/fermentation4010006. ISSN 2311-5637. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2311-5637/4/1/6>
- [30] POVEDA, J.M. Biogenic amines and free amino acids in craft beers from the Spanish market: A statistical approach. *Food Control* [online]. 2019, **96**, 227-233 [cit. 2019-04-08]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.09.012. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713518304651>
- [31] KALACĚ, P., KŘÍŽEK, M. (2003). A review of biogenic amines and polyamines in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 109, 123–128. <https://doi.org/10.1002/j.20500416.2003.tb00141.x>.
- [32] CHOW, Ching Kuang, ed. *Fatty Acids in Foods and their Health Implications* [online]. CRC Press, 2007 [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.1201/9781420006902. ISBN 9780429127557.
- [33] DESBOIS, Andrew P. a Valerie J. SMITH. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2010, **85**(6), 1629-1642 [cit. 2019-04-13]. DOI: 10.1007/s00253-009-2355-3. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-009-2355-3>

- [34] Pohl, Carolina & L F Kock, Johan & Thibane, Vuyisile. (2011). Antifungal free fatty acids: A Review. *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. 1.
- [35] ČECHOVÁ, Erika. *Vliv monoacylglycerolů na bakterie s dekarboxylázovou aktivitou*. Zlín, 2018. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.
- [36] VOLTNEROVÁ, Nikola. *Suplementy pro pozitivní ovlivnění lidského mikrobiomu*. Pardubice, 2018. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.
- [37] KAŠPÁRKOVÁ, Eva. *Účinek kyseliny kaprylové na vybrané kmeny bakterií*. Zlín, 2006. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.
- [38] WATANABE, Takamasa, Yoshiaki YAMAMOTO, Maki MIURA, Hiroyuki KONNO, Shigekazu YANO a Yoshimune NONOMURA. Systematic Analysis of Selective Bactericidal Activity of Fatty Acids against *Staphylococcus aureus* with Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration. *Journal of Oleo Science* [online]. 2019, **68**(3), 291-296 [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.5650/jos.ess18220. ISSN 1345-8957. Dostupné z: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jos/68/3/68_ess18220/_article

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AGM	agmatin
ATP	adenosintrifosfát
BA	biogenní amin
CAD	kadaverin
DAO	diaminooxidáza
HIM	histamin
MAO	monoaminooxidáza
MAO-A	monoaminooxidáza typu A
MAO-B	monoaminooxidáza typu B
MAG	monoacylglycerol
MK	mastná kyselina
PAO	polyaminooxidáza
PEA	2-fenylethylamin
PUT	putrescin
SPD	spermidin
SPM	spermin
TRM	tryptamin
TYM	tyramin
VMK	volná mastná kyselina

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1 Faktory ovlivňující produkci BA v mase a masných produktech [28].....</i>	19
<i>Obrázek 2 Schématické znázornění možného antibakteriálního působení VMK na buňku [33].....</i>	26
<i>Obrázek 3 Inhibiční vliv kyseliny kaprylové na Enterococcus durans CCDM 2665 .</i>	34
<i>Obrázek 4 Inhibiční vliv kyseliny kaprinové na Enterococcus durans CCDM 2665 .</i>	35
<i>Obrázek 5 Inhibiční vliv kyseliny laurové na Enterococcus durans CCDM 2665</i>	35
<i>Obrázek 6 Působení kyseliny kaprylové na Enterococcus durans CCDM 53</i>	36
<i>Obrázek 7 Působení kyseliny kaprinové na Enterococcus durans CCDM 53</i>	36
<i>Obrázek 8 Působení kyseliny laurové na Enterococcus durans CCDM 53</i>	36
<i>Obrázek 9 Vliv kyseliny kaprylové na Enterococcus faecalis CCDM 4224.....</i>	37
<i>Obrázek 10 Vliv kyseliny kaprinové na Enterococcus faecalis CCDM 4224.....</i>	37
<i>Obrázek 11 Vliv kyseliny laurové na Enterococcus faecalis CCDM 4224</i>	38
<i>Obrázek 12 Působení kyseliny kaprylové na Lactococcus lactis subsp. lactis CCDM 141</i>	38
<i>Obrázek 13 Působení kyseliny kaprinové na Lactococcus lactis subsp. lactis CCDM 141</i>	39
<i>Obrázek 14 Působení kyseliny laurové na Lactococcus lactis subsp. lactis CCDM 141</i>	39
<i>Obrázek 15 Vliv kyseliny kaprylové na Lactococcus lactis subsp. lactis CCDM 1004</i>	40
<i>Obrázek 16 Vliv kyseliny kaprinové na Lactococcus lactis subsp. lactis CCDM 1004</i>	40
<i>Obrázek 17 Vliv kyseliny laurové na Lactococcus lactis subsp. lactis CCDM 1004 .</i>	41
<i>Obrázek 18 Působení kyseliny kaprylové na Lactococcus lactis subsp. lactis CCDM 48</i>	41
<i>Obrázek 19 Působení kyseliny kaprinové na Lactococcus lactis subsp. lactis CCDM 48</i>	42
<i>Obrázek 20 Působení kyseliny laurové na Lactococcus lactis subsp. lactis CCDM 48</i>	42
<i>Obrázek 21 Inhibiční vliv kyseliny kaprylové na Lactococcus lactis subsp. cremoris CCDM 824</i>	43

<i>Obrázek 22 Inhibiční vliv kyseliny kaprinové na L. lactis subsp. cremoris CCDM 824</i>	43
<i>Obrázek 23 Inhibiční vliv kyseliny laurové na Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> CCDM 824	44
<i>Obrázek 24 Inhibiční působení kyseliny kaprylové na Lactococcus lactis subsp.</i> <i>cremoris CCDM 946</i>	44
<i>Obrázek 25 Inhibiční působení kyseliny kaprinové na Lactococcus lactis subsp.</i> <i>cremoris CCDM 946</i>	45
<i>Obrázek 26 Inhibiční působení kyseliny laurové na Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> CCDM 946	45
<i>Obrázek 27 Inhibiční vliv kyseliny kaprylové na Proteus mirabilis CCM 7188</i>	46
<i>Obrázek 28 Inhibiční vliv kyseliny kaprinové na Proteus mirabilis CCM 7188</i>	46
<i>Obrázek 29 Inhibiční vliv kyseliny laurové na Proteus mirabilis CCM 7188</i>	47
<i>Obrázek 30 Inhibiční působení kyseliny kaprylové na Salmonella enterica subsp.</i> <i>enterica ser. Enteritidis CCM 4420</i>	47
<i>Obrázek 31 Inhibiční působení kyseliny kaprinové na Salmonella enterica subsp.</i> <i>enterica ser. Enteritidis CCM 4420</i>	48
<i>Obrázek 32 Inhibiční působení kyseliny laurové na Salmonella enterica subsp.</i> <i>enterica ser. Enteritidis CCM 4420</i>	48

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1</i> Strukturní vzorce biogenních aminů	11
<i>Tabulka 2</i> Toxikologické a farmakologické účinky BA v potravinách [14]	14
<i>Tabulka 3</i> Nejčastější BA v různých typech sýrů [26]	17
<i>Tabulka 4</i> Obsah BA [mg/kg] v čerstvých vzorcích vybraných sýrů [24]	18
<i>Tabulka 5</i> Účinky vybraných mastných kyselin [33]	24
<i>Tabulka 6</i> Složení půdy BHI	29
<i>Tabulka 7</i> Složení půdy M17	29
<i>Tabulka 8</i> Příprava koncentrací MK	31
<i>Tabulka 9</i> Příprava koncentrací MK – záznamník růstu buněk	31
<i>Tabulka 10</i> Schéma zaočkování mikrotitrační destičky	33
<i>Tabulka 11</i> Minimální inhibiční koncentrace mastných kyselin	49