

Vliv protektivní kultury na produkci vybraných biogenních aminů u *Lactobacillus curvatus* v podmínkách *in vitro* a v mléce

Bc. Adéla Žalková

Diplomová práce
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla Žalková**
Osobní číslo: **T15316**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Vliv protektivní kultury na produkci vybraných biogenních aminů u *Lactobacillus curvatus* v podmínkách *in vitro* a v mléce**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika bakterií mléčného kvašení a protektivních kultur.
2. Inhibiční látky produkované v potravinářství.
3. Produkce biogenních aminů a možnosti jejich snížení v potravinách.

II. Praktická část

1. Sledování vybraných faktorů (pH prostředí, přidavku nisinu a protektivní kultury *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) na produkci biogenních aminů u kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* v podmínkách *in vitro* a v mléce.
2. Stanovení biogenních aminů kapalinovou chromatografií.
3. Zpracování výsledků.
4. Formulace závěrů na základě získaných výsledků.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] CHEN, H. a D. G. HOOVER. Bacteriocins and their Food Applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2003, vol. 2, s. 82-100.

[2] HUTKINS, Robert W. Microbiology and technology of fermented foods. 1st ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2006, xi, 473 p. ISBN 978-081-3800-189.

[3] 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.

[4] BENKERROUM, Noreddine. Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2016, vol. 15, s. 801-826.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

3. února 2017

Termín odevzdání diplomové práce:

28. dubna 2017

Ve Zlíně dne 3. února 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



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

Příjmení a jméno: ŽALKOVA' ADELA

Obor: TP

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 užit 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 28.4.2017.

.....Žalková.....

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). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

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

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

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá sledováním vybraných faktorů působících na dekarboxylázovou aktivitu *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* v podmínkách *in vitro* a v mléce. V teoretické části jsou charakterizovány bakterie mléčného kvašení a protektivní kultury, dále jsou popsány inhibiční látky produkované v potravinách, zejména bakteriociny a poslední kapitola se zabývá biogenními aminy a možnostmi jejich snížení.

V praktické části byla sledována kinetika produkce biogenních aminů v podmínkách *in vitro* a v mléce u kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* za přídavku nisinu, protektivní kultury *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nebo jejích metabolitů v čase. Dále byl sledován i vliv pH prostředí. Produkce biogenních aminů tyraminu a sperminu byla stanovena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detekcí po předchozí derivatizaci dansylchloridem. V podmínkách *in vitro* nedošlo k inhibici produkce biogenních aminů v přítomnosti nisinu ani protektivních kultur či jejich metabolitů. Nicméně v některých případech se snížila koncentrace tyraminu až o 81 % a sperminu o 25 % po 72 hodinách kultivace po přídavku protektivních kultur do mléka.

Klíčová slova: biogenní aminy, bakterie mléčného kvašení, bakteriociny, protektivní kultury, nisin, HPLC

ABSTRACT

This thesis deals with monitoring influence of selected factors on decarboxylase activity of *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus in vitro* and in milk. The theoretical part describes lactic acid bacteria and protective cultures, the following are described the inhibitory substances produced by microorganisms in food, mainly bacteriocins and finally part deals with biogenic amines and possibilities of their reduction.

In the practical part of this work was observed kinetics of production biogenic amines *in vitro* and in milk on strain *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* with addition of nisin, protective culture *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* or their supernatants in time. The influence of pH was monitored too. The production of biogenic amines tyramine and spermine was determined by high performance liquid chromatography with UV/VIS detection after derivatization with dansylchloride. Nisin and protective cultures or their supernatants did not inhibit the production of biogenic amines *in vitro*. However, in some cases addition of protective cultures decreased the production of tyramine by 81 % and spermine by 25 % for 72 hours of incubation in milk.

Keywords: biogenic amines, lactic acid bacteria, bacteriocin, protective culture, nisin, HPLC

Poděkování patří vedoucí mé diplomové práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za cenné rady, připomínky a čas, který mi věnovala při zpracování této práce.

Dále bych chtěla poděkovat Ing. Khatantuul Pudevдорj za ochotu a pomoc při praktické části a také laborantkám Bc. Veronice Kučabové a Ing. Ludmile Zálešákové za ochotu a pomoc v laboratořích. Také děkuji rodičům a příteli za podporu při studiu.

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ A PROTEKTIVNÍ KULTURY	13
1.1 CHARAKTERISTIKA BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	13
1.1.1 Taxonomické zařazení	13
1.1.2 Metabolismus bakterií mléčného kvašení.....	14
1.1.3 Význam bakterií mléčného kvašení v potravinářství.....	15
1.2 ROD <i>LACTOCOCCUS</i>	16
1.3 ROD <i>LACTOBACILLUS</i>	16
1.4 VÝZNAM PROTEKTIVNÍCH KULTUR.....	17
2 BAKTERIOCINY	19
2.1 BAKTERIOCINY I. TŘÍDY	20
2.1.1 Lantibiotika typu A	20
2.1.2 Lantibiotika typu B	23
2.2 BAKTERIOCINY II. TŘÍDY.....	23
2.2.1 Bakteriociny IIa. třídy	23
2.2.2 Bakteriociny IIb. třídy.....	24
2.3 BAKTERIOCINY III. TŘÍDY	24
2.4 UPLATNĚNÍ BAKTERIOCINŮ V POTRAVINÁŘSTVÍ	24
3 BIOGENNÍ AMINY	27
3.1 FUNKCE BIOGENNÍCH AMINŮ.....	27
3.2 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH.....	27
3.3 PODMÍNKY VZNIKU BIOGENNÍCH AMINŮ	28
3.4 MOŽNOSTI SNÍŽENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH.....	29
II PRAKTICKÁ ČÁST	31
4 CÍL PRÁCE	32
5 MATERIÁL, POMŮCKY, METODY	33
5.1 POUŽITÉ MIKROORGANIZMY.....	33
5.2 KULTIVAČNÍ MÉDIA A ROZTOKY.....	33
5.2.1 Příprava tekutých pŮd	33
5.2.2 Příprava tuhých pŮd	34
5.2.3 Fyziologický roztok	34
5.2.4 Nisin	34
5.2.5 Mléko a bujon MRS pro vlastní experiment.....	34

5.3	KULTIVACE MIKROORGANISMŮ	35
5.4	PŘÍPRAVA SUPERNATANTU	36
5.5	SLEDOVÁNÍ PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ V PŘÍTOMNOSTI PROTEKTIVNÍ KULTURY NEBO NISINU	36
5.6	DERIVATIZACE VZORKŮ	37
5.7	STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ POMOCÍ HPLC	37
5.8	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	38
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	39
6.1	VLIV VYBRANÝCH FAKTORŮ NA PRODUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ U <i>LACTOBACILLUS CURVATUS</i> SUBSP. <i>CURVATUS</i> T2 V MLÉCE	39
6.1.1	Experimenty v mléce bez přídavku aminokyselin	39
6.1.2	Experimenty v mléce s přídavkem aminokyselin	42
6.1.3	Stanovení pH v průběhu experimentů	43
6.1.4	Stanovení počtu mikroorganismů	44
6.2	VLIV VYBRANÝCH FAKTORŮ NA PRODUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ U <i>LACTOBACILLUS CURVATUS</i> SUBSP. <i>CURVATUS</i> T2 V PODMÍNKÁCH <i>IN VITRO</i>	44
6.2.1	Stanovení pH v průběhu experimentů	47
6.2.2	Stanovení počtu mikroorganismů	48
6.3	DISKUZE	48
	ZÁVĚR	53
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	54
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	63
	SEZNAM OBRÁZKŮ	64
	SEZNAM TABULEK	65

ÚVOD

Biogenní aminy jsou organické bazické dusíkaté sloučeniny vznikající hlavně z aminokyseliny dekarboxylázovou aktivitou mikroorganismů. Vyskytují se proto v mnoha druzích potravin, které obsahují bílkoviny. Lidé přijímají biogenní aminy v potravě každý den. Problém může nastat, pokud jsou detoxikační enzymy (mono- a diaminooxidázy) v lidském těle inhibovány buď geneticky, nebo příjmem alkoholu či antidepresiv. Rovněž konzumace potravin s vyšší koncentrací biogenních aminů může způsobit intoxikaci, mezi jejíž symptomy patří například nevolnost, bolest hlavy, zvýšení nebo snížení krevního tlaku. Proto v současné době se mnoho studií zabývá možnostmi, jak snížit obsah biogenních aminů v potravinách. Jednou z těchto možností je inhibice dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů pomocí bakteriocinů vyprodukovaných bakteriemi mléčného kvašení (Alvarez a Moreno-Arribas, 2014; Karovičová a Kohajdová, 2005; Linares et al., 2011; Van Ba et al.; 2016).

Bakteriociny jsou antimikrobiální peptidy syntetizované na bakteriálních ribozomech. Inhibují růst jiných bakterií, většinou blízce příbuzných druhů a rodů. Díky tomu by mohly být používány jako potravinářské konzervační látky. Jediným bakteriocinem schváleným jako potravinářské aditivum je nisin, produkovaný kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Nisin je aktivní proti mnoha grampozitivním bakteriím a brání i germinaci spor (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Cleveland et al., 2001; Chen a Hoover, 2003; Davidson et al., 2005).

Bakterie mléčného kvašení tvoří heterogenní skupinu mikroorganismů, jejichž společným znakem je fermentace sacharidů primárně na kyselinu mléčnou. Tradičně se využívají při výrobě mnoha potravin a jsou považovány obecně za prospěšné mikroorganismy. Během fermentace produkují nejen sensoricky aktivní látky, ale zajišťují i bezpečnost a skladovatelnost potravin syntézou organických kyselin, bakteriocinů, diacetylu a dalších antimikrobiálně působících sloučenin (Holzapfel a Wood, 2014; Lacroix, 2011; Liu et al., 2014; Salminen et al., 2012).

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ A PROTEKTIVNÍ KULTURY

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou definovány jako heterogenní skupina mikrobů, které fermentují různé živiny primárně na kyselinu mléčnou. Vyskytují se v prostředích bohatých na cukry (potraviny, krmiva), ale i v lidských a zvířecích dutinách a sliznicích, rostlinných materiálech a odpadních vodách (Liu et al., 2014). Tradičně jsou spojeny s výrobou potravin a jsou považovány obecně za prospěšné mikroorganismy. Přesto některé druhy či kmeny byly uznány za lidské a zvířecí podmíněné patogeny (Salminen et al., 2012).

1.1 Charakteristika bakterií mléčného kvašení

BMK představují skupinu grampozitivních, kataláza negativních bakterií, které mají společné určité morfologické, metabolické a fyziologické vlastnosti. Jsou to nesporulující, nerespirující, fakultativně anaerobní koky a tyčinky (Salminen et al., 2012).

Jsou popisovány většinou jako mezofilní, ale některé BMK mohou růst i při chladírenských (4 °C) nebo naopak vyšších teplotách (45 °C). Obvykle preferují pH v rozmezí 4 – 4,5, ale některé kmeny mohou tolerovat a růst i při pH vyšších než 9 nebo nižších než 3,2. BMK jsou značně tolerantní ke zvýšené kyselosti prostředí, což je důležité při výrobě potravin. Vyžadují ale k růstu bohaté a komplexní prostředí obsahující živiny jako sacharidy, aminokyseliny, puriny, pyrimidiny, vitaminy skupiny B, minerální látky a další růstové faktory (Bamforth, 2005; Holzapfel a Wood, 2014; Salminen et al., 2012).

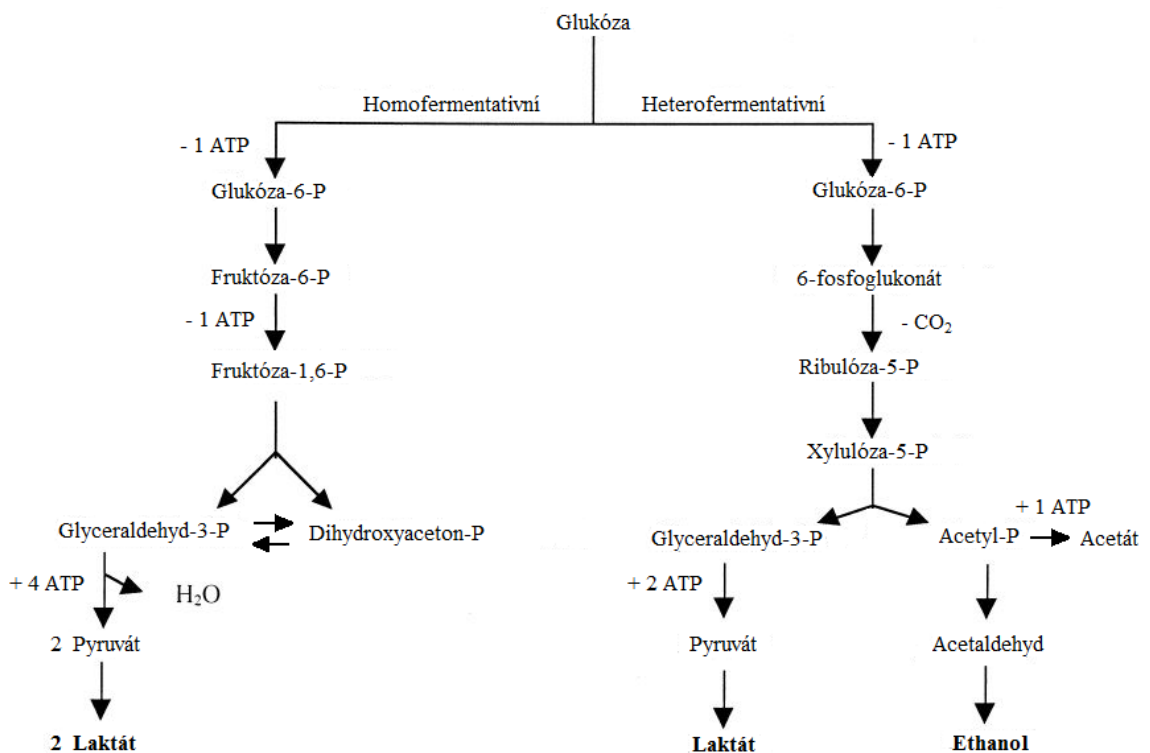
1.1.1 Taxonomické zařazení

Podle současné klasifikace se BMK řadí ke kmenu *Firmicutes* s nízkým obsahem guaninu a cytozinu (G+C) v DNA (≤ 55 mol %), k třídě *Bacilli*, řádu *Lactobacillales* s 6 čeleděmi: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* a *Streptococcaceae* zahrnujícími 36 rodů a více než 200 druhů, jejichž počet se stále zvyšuje. BMK se fylogeneticky mohou dělit na základě podobnosti genomu studovaného pomocí molekulárně biologických metod. Nově popsané rody se nejsnadněji určují pomocí oligonukleotidových sond, polymerázovou řetězovou reakcí nebo přímým sekvencováním genu pro 16S rRNA. Na základě těchto analýz bylo zjištěno například u rodu *Bifidobacterium*, který je často mylně řazen mezi BMK, že jeho DNA obsahuje více než 55 mol % G+C a že patří do kmene *Actinobacteria*. Klasifikace BMK do různých rodů je z velké části založena také na morfologii, způsobu fermentace glukózy, konfiguraci pro-

dukované kyseliny mléčné a schopnosti růst při různých teplotách, různém pH či vysoké koncentraci soli (Holzapfel a Wood, 2014; Salminen et al., 2004).

1.1.2 Metabolismus bakterií mléčného kvašení

Vzhledem k tomu, že BMK jsou nerespirující, musí získávat energii na úrovni fosforylace substrátu. Existují 2 základní dráhy fermentace hexóz. Homofermentativní metabolizují sacharidy prostřednictvím glykolýzy, která běží po Embden-Meyerhof-Parnasově dráze, kdy 95 % konečných produktů představuje kyselina mléčná, kdežto heterofermentativní BMK využívají tzv. fosfoketolázovou dráhu, při níž vzniká kromě kyseliny mléčné i kyselina octová, etanol a oxid uhličitý. Zjednodušené schéma těchto 2 drah je uvedeno na Obr. 1, z něhož je patrné, že homofermentativní BMK získají 2 moly ATP z 1 molu glukózy, kdežto heterofermentativním způsobem pouze 1 mol ATP, pokud je acetylfosfát redukován na etanol, v případě konverze na acetát vzniká další 1 mol ATP (Bamforth, 2005; Salminen et al., 2012).



Obr. 1 Zjednodušené schéma fermentace glukózy (upraveno dle Bamforth, 2005)

Pentózy mohou být metabolizovány pouze heterofermentativně, kdy do fosfoketolázové dráhy vstupují ribulóza-5-fosfát nebo xylulóza-5-fosfát, pak už ale nevzniká CO_2 (Salminen et al., 2012).

Typ fermentace je rovněž důležitým taxonomickým kritériem. Mezi obligátně heterofermentativní rody se řadí *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella* a některé laktobacily (*Lbc. brevis*, *Lbc. fermentum*). Obligátně homofermentativní jsou pouze některé druhy z rodu *Lactobacillus* (například *Lbc. delbrueckii*, *Lbc. helveticus*). Ostatní rody BMK jsou fakultativně heterofermentativní, kdy mohou fermentovat hexózy i pentózy (Salminen et al., 2012).

Pro BMK je důležitý taky metabolismus disacharidu laktózy z důvodu jeho přítomnosti v mléce. Laktóza může do buňky vstupovat buď prostřednictvím specifické permeázy a být metabolizována Leloirovou dráhou, nebo pomocí fosfoenolpyruvát dependentního fosfotransferázového systému, kdy při transportu dojde k fosforylaci cukru, ten je dále rozštěpen enzymem fosfo- β -D-galaktozidázou na glukózu a galaktózu-6-fosfát, metabolizovanou dráhou tagatóza-6-fosfát. *Lactococcus lactis* používá fosfotransferázový systém, kdežto pro většinu ostatních rodů (leukonostoky, laktobacily) je typický přenos pomocí permeázy (Holzapfel a Wood, 2014; Salminen et al., 2012).

1.1.3 Význam bakterií mléčného kvašení v potravinářství

Bakterie mléčného kvašení jsou jednou z nejvíce průmyslově využívaných skupin bakterií. Včetně výroby potravin se používají i k syntéze makromolekul, enzymů a metabolitů, dále se používají jako probiotika (Holzapfel a Wood, 2014).

Už po celá staletí se využívají k výrobě bezpečných, skladovatelných a organolepticky příjemných potravin, zejména mléčných a masných výrobků. Dále jsou nezbytné pro výrobu vína, kaka, kávy, kvásku, siláže a fermentované zeleniny. Během procesu fermentace vznikají mimo kyselinu mléčnou i významné sensoricky aktivní látky, které udělují potravině charakteristické aroma. Tyto sloučeniny vznikají nejen glykolýzou a pyruvátovým metabolismem, ale i lipolýzou a proteolýzou. Tyto biochemické procesy jsou důležité i pro texturu výrobku (Holzapfel a Wood, 2014). Tradičně se využívala spontánní fermentace pomocí přítomných bakterií v surovině, v současné době se provádí většinou záměrným přidáním startérové kultury, v důsledku čehož je možná větší kontrola procesu a standardizace konečných produktů (De Vuyst a Leroy, 2007).

Hlavními BMK v lidském střevě jsou laktobacily a leukonostoky, což je důvod, proč se zejména zástupci rodu *Lactobacillus* používají jako probiotika. Ta jsou definována podle FAO/WHO jako živé mikroorganismy, které po podání v přiměřeném množství posky-

tují zdravotní přínos pro hostitele. V probiotických mléčných výrobcích najdeme často *Lbc. acidophilus*, *Lbc. gasseri*, *Lbc. helveticus*, *Lbc. (para)casei* a mnoho dalších (Holzapfel a Wood, 2014).

1.2 Rod *Lactococcus*

Laktokoky mají charakteristický ovoidní tvar buněk, které se vyskytují samostatně, ve dvojicích nebo řetězcích. Vyskytují se hojně v rostlinách, rybách a jiných zvířatech. V potravinách jsou nejhojnější *Lc. lactis* subsp. *lactis* a *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, které se používají jako startéry ve fermentovaných mléčných výrobcích. Jejich hlavní rolí během fermentace je konzervace potravin díky jejich schopnosti produkovat organické kyseliny a bakteriociny, hlavně nisin, dále také tvorba aroma produkcí alkoholů a karbonylových sloučenin metabolismem citrátu, aminokyselin a lipidů, vznik sýrových ok u sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou a vývoj textury produkcí exopolysacharidů (Bamforth, 2005; Holzapfel a Wood, 2014). Hlavními rozdíly mezi těmito 2 druhy je jejich tolerance k soli a schopnost hydrolyzovat arginin, kdy obojí je typické pro *Lc. lactis* subsp. *lactis* (Liu et al., 2014).

1.3 Rod *Lactobacillus*

Laktobacily tvoří největší skupinu BMK. Často se organizují do řetězků a nacházejí se v rozmanitých prostředích, od potravin přes rostliny, půdu až po lidské sliznice. Využívají se v potravinářství jako startérové kultury pro výrobu jogurtů, sýrů, kefiru, kysaného zelí a nakládané zeleniny. Důležité jsou i v pekárenství, kde se společně s kvasinkami podílejí na výrobě kvásku. V pivu a víně se můžou podílet na chuti nápoje, ale zároveň můžou působit i jako kontaminanty. Například *Lbc. sakei* se používá ve fermentovaných masných výrobcích a přirozeně se vyskytuje v čerstvém mase a rybách. Druhy *Lbc. plantarum* a *Lbc. buchneri* se používají při výrobě siláže (Bamforth, 2005; Holzapfel a Wood, 2014; Liu et al., 2014; Salminen et al., 2012).

Podobně jako laktokoky produkcí organických kyselin snižují pH a tím prodlužují trvanlivost potravin. Mohou rovněž metabolizovat i bílkoviny (například kaseiny v mléce) nebo lipidy, čímž částečně určují strukturu a chuť výrobku a zlepšují stravitelnost proteinů (Holzapfel a Wood, 2014).

Některé kmeny *Lbc. curvatus* mohou být nejprve pohyblivé, ale pohyblivost později ztrácí. Buňky jsou zakřivené ve tvaru fazole o velikosti 0,7-0,9 x 1-2 µm a vyskytují se v párech

nebo krátkých řetězcích. Izoláty byly získány z mléka, siláže, kysaného zelí, těsta a masných výrobků (Holzapfel a Wood, 2014).

1.4 Význam protektivních kultur

V posledních letech se stále více spotřebitelů znepokojuje nad možným negativním působením syntetických potravinářských konzervačních látek, na druhou stranu roste poptávka po trvanlivých potravinách, což má za následek hledání přírodních konzervačních činidel odvozených z rostlinných, živočišných a mikrobiálních zdrojů (Lanciotti et al., 2003).

Biokonzervace je zkoumána jako prostředek pro zvýšení trvanlivosti potravin, zejména za přítomnosti BMK, které produkcí různých antimikrobiálních látek mohou omezovat růst jiných mikroorganismů. Mezi tyto látky lze zařadit zejména bakteriociny, o nichž bude pojednáno v další kapitole. Kromě nich antimikrobiálně působí i organické kyseliny, peroxid vodíku, etanol, oxid uhličitý, diacetyl, reuterin a antifungálně také mastné kyseliny (Bamforth, 2005; Holzapfel a Wood, 2014; Lacroix, 2011).

V důsledku produkce organických kyselin klesá pH, což působí inhibičně na mnoho mikroorganismů. Navíc bylo prokázáno, že nedisociované kyseliny snadno pronikají bakteriální cytoplazmatickou membránou, hromadí se v cytoplasmě a ovlivňují metabolické procesy, čímž dochází k inhibici růstu nebo dokonce až k zániku buňky (Salminen et al., 2012).

Protože BMK postrádají katalázu, dochází v prostředí k hromadění peroxidu vodíku, který má silný oxidační účinek na membránové lipidy a buněčné proteiny. H_2O_2 může také aktivovat laktoperoxidázový systém v čerstvém mléce a vyvolat tvorbu hypothiokyanátu a dalších antimikrobiálních látek. Bohužel flavoproteiny a peroxidázy mohou rozkládat peroxid vodíku, a tím pádem snižovat jeho antibakteriální aktivitu (Caplice a Fitzgerald, 1999).

Oxid uhličitý působí inhibičně zejména na aerobní mikroorganismy, dále je schopen procházet přes buněčnou membránu a snižovat vnější i vnitřní pH buňky. Při nižších koncentracích může však stimulovat růst některých bakterií (Caplice a Fitzgerald, 1999).

Diacetyl, zodpovědný za máslové aroma, je produktem citrátového metabolismu. Gramnegativní bakterie, plísně a kvasinky jsou na něj citlivější než grampozitivní bakterie. Pravděpodobně narušuje utilizaci argininu (Caplice a Fitzgerald, 1999).

Reuterin, sloučenina odvozená od glycerolu, je produkován druhy rodu *Lactobacillus*, konkrétně *Lbc. reuteri*, *Lbc. brevis*, *Lbc. buchneri*. Jedná se o širokospektrální antimikrobiální sloučeninu, která je aktivní proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, kvasinkám, houbám, prvokům a virům (Salminen et al., 2012). Jeho aktivita tkví v inhibici ribonukleotidreduktázy (Caplice a Fitzgerald, 1999).

Příspěvek acetaldehydu k biokonzervaci je menší, neboť prahová hodnota pro vnímání chuti je nižší než hladina nezbytná pro dosažení inhibice mikroorganismů. Obdobně je to i s etanolem kvůli nízkému vyprodukovanému množství BMK (Caplice a Fitzgerald, 1999).

Je žádoucí, aby protektivní kultury byly bezpečné pro lidské zdraví, stabilní během skladování, efektivní v nízkých koncentracích a široce účinné proti hlavním infekčním a potravině kazícím mikroorganismům a aby neměly negativní dopad na organoleptické vlastnosti potraviny (Lacroix, 2011).

2 BAKTERIOCINY

Bakteriociny jsou antimikrobiální peptidy syntetizovány na bakteriálních ribozomech, které mohou být dále zpracovány posttranslační modifikací a poté exportovány do vnějšího prostředí (Alvarez-Sieiro et al., 2016).

Bývají často zaměňovány s antibiotiky, od nichž se ale liší tím, že mají ribozomální původ (antibiotika jsou sekundární metabolity) a obecně úzkou specifickou účinku proti kmenům stejných nebo blízké příbuzných druhů a rodů. Zatímco antibiotika mají variabilní spektrum účinku a jejich účinnost spočívá v narušení syntézy a funkce buněčné stěny, cytoplazmatické membrány a intracelulárních metabolitů, bakteriociny narušují cytoplazmatickou membránu tvorbou pórů a v některých případech zasahují do biosyntézy buněčné stěny. Významným rozdílem je mechanismus rezistence. Rezistence vůči antibiotikům je většinou spojena s genetickými determinanty, tudíž je usnadněn přenos rezistence mezi buňkami. Rezistence na bakteriocin se může projevit fyziologickou změnou cytoplazmatické membrány citlivé buňky či produkcí enzymu nisinázy, degradujícího nisin. Není ale zcela jasné, zda se jedná o změny genetické nebo jsou pouze výsledkem adaptace. Tento fakt je důležitý z hlediska případné dlouhodobé využitelnosti bakteriocinu v potravinách kvůli prevenci šíření rezistentních buněk. Jejich další výhodou je také to, že nevyvolávají alergické reakce u lidí, jako je tomu v případě antibiotik. Navíc jsou bakteriociny rychle štěpeny proteázami v lidském trávicím ústrojí. Díky těmto vlastnostem by mohly být používány jako potravinářské konzervační látky (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Cleveland et al., 2001; Chen a Hoover, 2003).

Bakteriociny mohou produkovat gramnegativní i grampozitivní bakterie. Schopnost syntézy bakteriocinů může být pro organismus značně výhodná z důvodu eliminace konkurenčního organismu ze své ekologické niky. Producent je imunní vůči svému bakteriocinu (Dufour et al., 2007; Chen a Hoover, 2003; Salminen et al., 2012).

Gratia v roce 1925 objevil „princip V“ produkovaný kmenem *Escherichia coli* proti jiné kultuře *E. coli*. Tento objev byl v roce 1946 nazván kolicinem. Pojem bakteriocin byl použit Jacobem v roce 1953 jako obecný termín pro vysoce specifické antibakteriální proteiny (Chen a Hoover, 2003).

Bakteriociny tvoří heterogenní skupinu a to vedlo k jejich rozdělení do 4 tříd: lantibiotika, tepelně stabilní peptidy, tepelně labilní proteiny a komplexní bakteriociny skládající se z proteinu a další látky. Novější publikace spojují třídu III a IV, jiné navrhují univerzální

klasifikaci, která by mohla být aplikována na většinu bakteriocinů, nehledě na to, zda je producentem grampozitivní či gramnegativní bakterie. Toto schéma zahrnuje 4 třídy: I, lantibiotika; II, nemodifikované peptidy; III, velké proteiny a IV, cyklické peptidy (Dufour et al., 2007). I přes to některé bakteriociny nezapadají do žádné třídy, proto Alvarez-Sieiro et al. (2016) mírně upravili tuto klasifikaci, kdy do třídy I řadí ribozomálně produkované a posttranslačně modifikované peptidy do velikosti 10 kDa. V následujících kapitolách bude kladen důraz zejména na třídy I (lantibiotika) a II, protože s velkou pravděpodobností právě tyto bakteriociny by mohly být použity v potravinářských aplikacích.

2.1 Bakteriociny I. třídy

Mezi bakteriociny I. třídy se řadí malé (< 5 kDa) peptidy, obsahující neobvyklé aminokyseliny (Chen a Hoover, 2003).

Všechna lantibiotika jsou syntetizována z prekurzorového peptidu kódovaného strukturálním genem. Tento peptid je podroben enzymatické modifikaci, kdy dochází k odstranění N-konce a dehydrataci serinu a treoninu, což vede k tvorbě 2,3-didehydroalaninu (Dha) a 2,3-didehydrobutyriu (Dhb). Thioetérovou vazbou mezi Dha, Dhb a cysteinem se vytváří lantionin (Lan), případně 3-metyllantionin (MeLan). V důsledku toho vznikají polycyklické struktury, které napomáhají včlenění bakteriocinu do membrány cílové buňky. Taky se předpokládá, že udržují rigiditu peptidu a chrání jej před proteolytickými enzymy a tepelnou denaturací (Dufour et al., 2007; Chen a Hoover, 2003).

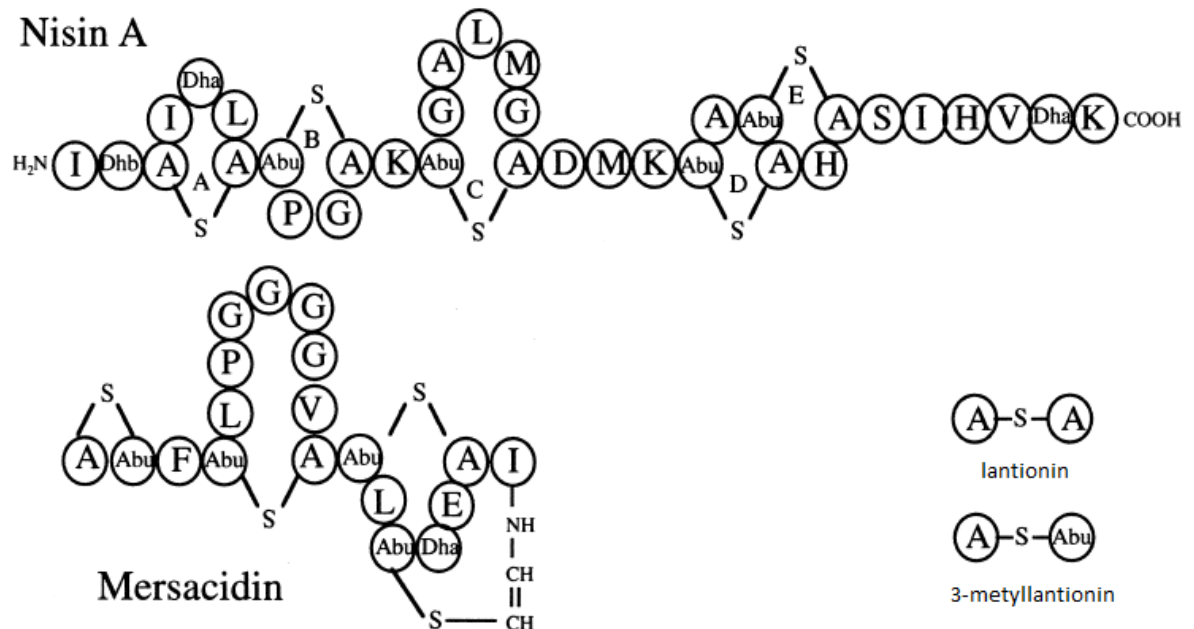
Lantibiotika, produkovaná grampozitivními bakteriemi, mohou obecně uplatnit svou antimikrobiální aktivitu pouze proti grampozitivním bakteriím, účinnost proti gramnegativním druhům lze pozorovat v případě narušení vnější membrány (McAuliffe et al., 2001).

Lantibiotika se dále dělí na typ A a B nejen podle chemické struktury, kterou lze vidět na Obr. 2, ale i antimikrobiální aktivity. Typ A zahrnuje velmi rozdílné struktury a může se dělit ještě na 3 podtypy: AI protáhlé a flexibilní (například nisin), AII peptidy s nemůstkovým N-terminálním zakončením a globulárním C-koncem (lakticin 481) a AIII skládající se z 2 peptidů (laktocin S) (Dufour et al., 2007; Chen a Hoover, 2003).

2.1.1 Lantibiotika typu A

Lantibiotika typu A mají amfifilní lineární řetězec s pozitivním nábojem, obsahujícím většinou maximálně 34 aminokyselin, které se podobají uspořádáním Lan můstků. Jejich účinek se projevuje vytvořením pórů v cytoplazmatické membráně, čímž způsobí rozptýlení

protonmotivní síly, tedy zbaví buňku esenciálního zdroje energie, což vede k buněčné smrti. Bylo ale zjištěno, že například účinnost nisinu závisí na koncentraci lipidu II v membráně citlivých buněk (Chen a Hoover, 2003; McAuliffe et al., 2001; Salminen et al., 2012).



Obr. 2 Struktura lantibiotik typu A (nisin A) a B (mersacidin)

(upraveno dle McAuliffe et al., 2001)

Nejvýznamnějším zástupcem lantibiotik typu A je nisin. Nisin je antibakteriální polypeptid obsahující 34 aminokyselin s molekulovou hmotností 3510 Da produkovaný kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Existuje nejméně 6 forem nisinu, označených písmeny, kdy forma A je nejaktivnější a využívá se komerčně. Je zajímavé, že nisin objevil Rogers už v roce 1928, tedy o rok dříve, než byl objeven penicilin (Chen a Hoover, 2003; Lacroix, 2011).

Nisin je aktivní proti mnoha gram pozitivním bakteriím, které jsou uvedeny v Tab. 1, ale brání i germinaci spor bacilů a klostridií. Spory bývají obvykle citlivější než buňky a jejich citlivost se zvyšuje ještě s klesajícím pH a tepelným zpracováním. Ovšem nisin pravděpodobně působí pouze sporostaticky, proto musí být přítomen po celou dobu použitelnosti výrobku. Vnější membrána účinně chrání gramnegativní bakterie před nisinem, proto by musela být nejprve narušena například chelatačním činidlem (EDTA), subletálním účinkem tepla, hydrostatickým tlakem, pulzujícím elektrickým polem nebo zmrazením (Davidson et al., 2005; Lacroix, 2011; McAuliffe et al., 2001).

Tab. 1 Grampozitivní druhy bakterií citlivé na nisin (upraveno dle Davidson et al., 2005)

Rod	Druh	Popis
<i>Alicyclobacillus</i>	<i>acidoterrestris</i>	Tvoří spory, způsobuje kažení ovocných šťáv.
<i>Bacillus</i>	<i>brevis, cereus, coagulans, licheniformis, macerans, megaterium, pumilus, subtilis, sporothermodurans</i>	Tvoří spory, způsobuje kažení potravin a některé druhy i alimentární intoxikaci.
<i>Brochothrix</i>	<i>thermosphacta</i>	Způsobuje kažení masa.
<i>Clostridium</i>	<i>bifermentans, botulinum, butyricum, histolyticum, pasteurianum, perfringens, putrificum, sordelli, sporogenes, tertium, thermosaccharolyticum, tyrobutyricum</i>	Tvoří spory, způsobuje kažení potravin a některé druhy i alimentární intoxikaci.
<i>Desulfotomaculum</i>	<i>nigrificans</i>	Tvoří spory, způsobuje černání konzerv.
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis, faecium</i>	Kažení potravin
<i>Geobacillus</i>	<i>stearothermophilus</i>	Tvoří spory, způsobuje kažení potravin.
<i>Kocuria</i>	<i>varians</i>	
<i>Lactobacillus</i>	<i>spp., bulgaricus, brevis, buchneri, casei, curvatus, helveticus, fermentum, lactis, plantarum</i>	Způsobuje kažení většinou kyselých výrobků (víno, pivo, dresinky).
<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	
<i>Listeria</i>	<i>innocua, monocytogenes</i>	Podmíněný patogen
<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	
<i>Oenococcus</i>	<i>oeni</i>	
<i>Pediococcus</i>	<i>spp., damnosus, pentosaceus</i>	Kažení piva, vína
<i>Sporolactobacillus</i>	<i>inulinus</i>	Tvoří spory.
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	Alimentární intoxikace

Jako konzervační činidlo se začal nisin používat v roce 1950, kdy měl zabránit klostridiím v kažení ementálu. Nyní je schválen jako potravinářská přídatná látka ve více než 50 státech (Lacroix, 2011). Podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách se nisin označuje kódem E234 a může se přidávat v maximálním množství 12,5 mg/kg do zrajících a tavených sýrů a výrobků, 10 mg/kg

do mascarpone a clotted cream, 6,25 mg/kg do pasterizovaných tekutých vajec a 3 mg/kg do pudinků z krupice a tapioky a podobných výrobků.

Nisin ve formě prášku vykazuje vynikající stabilitu, pokud je chráněn před přímým slunečním zářením, vlhkostí a teplotou vyšší než 22 °C. Optimální pH pro aktivní působení nisinu je 3,0-3,5, kdy po autoklávování si zanechává více než 80 % své aktivity. Jeho rozpustnost též závisí na pH, kdy při pH 2,2 je nejvyšší (56 mg/ml) a postupně klesá až na 0,25 mg/ml při pH 8,5. V potravinách se používají mnohem nižší koncentrace nisinu, proto jeho rozpustnost nepředstavuje při výrobě potravin problém (Davidson et al., 2005; Lacroix, 2011).

Aktivita nisinu v potravinách závisí na mnoho faktorech. V rámci bariérového efektu jeho aktivitu zvyšují další překážky, jako tepelné ošetření, nízká aktivita vody, ochranná atmosféra, nízké pH a teplota. Naopak ji může snižovat přítomnost siřičitanů nebo vícemocných kationtů (Ca^{2+} , Mg^{2+}). Nisin funguje lépe v tekutých a homogenních potravinách, kde se může lépe a rovnoměrně distribuovat. Během skladování dochází k poklesu jeho množství v závislosti na teplotě, kdy za chladu je relativně stabilní, ale při pokojové teplotě je ztráta aktivity mnohem rychlejší. V tepelně neopracovaných potravinách může být degradován proteolytickými enzymy mikroorganismů, rostlin a zvířat (Davidson et al., 2005).

2.1.2 Lantibiotika typu B

Lantibiotika typu B, zahrnující například mersacidin, cinnamycin, jsou globulární peptidy s negativním nebo žádným nábojem s maximálně 19 zbytky aminokyselin. Jejich antimikrobiální aktivita souvisí s inhibicí specifických enzymů, například účastnících se biosyntézy buněčné stěny (Chen a Hoover, 2003; McAuliffe et al., 2001).

2.2 Bakteriociny II. třídy

Bakteriociny II. třídy jsou malé (<10 kDa), tepelně stabilní peptidy, které neobsahují lantionin a nepodléhají modifikaci. Dělí se zpravidla do 3 podskupin: IIa obsahující pediocinu podobné peptidy se silným antilisteriovým účinkem, IIb zahrnuje bakteriociny vyžadující 2 různé peptidy k aktivitě a IIc zbývající peptidy této třídy (Chen a Hoover, 2003).

2.2.1 Bakteriociny IIa. třídy

Pediocinu podobné bakteriociny IIa. třídy mají širokospektrální antimikrobiální aktivitu, zvláště proti listeriím. Na kationtovém N-konci se nacházejí 2 cysteinové zbytky, spojené

disulfidickou vazbou, a konstantní sekvence –Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys, která se pravděpodobně podílí na cílových interakcích, protože nahrazením disulfidického můstku hydrofobní interakcí se zachovala aktivita peptidu. Hydrofobní C-konec je méně konzervativní a je nejspíš zapojen do specifikace cílové buňky. Tyto bakteriociny mají společnou strukturu, N-konec je ve formě β -skládaného listu zavěšeného na α -helixu C-konce (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Salminen et al., 2012).

Tato skupina bakteriocinů může být dále členěna do 8 skupin podle chemické struktury. Každopádně nejvíce studovaným zástupcem je pediocin PA-1 (Alvarez-Sieiro et al., 2016).

Mechanismus účinku se skládá z 3 kroků: pediocin se naváže na receptory manóza fosfotransferázového systému, vloží se do cytoplazmatické membrány a nakonec vytvoří pór (Alvarez-Sieiro et al., 2016).

2.2.2 Bakteriociny IIb. třídy

Do třídy IIb patří bakteriociny skládající se z 2 velmi odlišných peptidů, kdy plná aktivita vyžaduje přítomnost obou peptidů v přibližně stejném množství. Zástupcem je například laktokocin G. V termofilinu 13 mají jednotlivé peptidy antimikrobiální aktivitu samy o sobě, ale jejich kombinací se aktivita zvyšuje (Alvarez-Sieiro et al., 2016).

Peptidy laktokocinu G pravděpodobně vytváří strukturu helix-helix, která penetruje membránou a interaguje s receptorem na membráně citlivých bakterií, což způsobí její netěsnost a únik buněčné hmoty do vnějšího prostředí (Alvarez-Sieiro et al., 2016).

2.3 Bakteriociny III. třídy

Bakteriociny třídy III jsou velké (> 10 kDa), tepelně nestabilní, nemodifikované proteiny, sestávající se z různých domén. Mohou mít bakteriolytický mechanismus účinku, kdy například enterolyzin A, millericin B štěpí vazby v peptidoglykanu. Na druhou stranu nelytické bakteriociny (třeba dysgalacticin) se vážou na fosfotransferázové systémy cukrů, čímž inhibují příjem cukru a způsobují prostup malých molekul membránou (Alvarez-Sieiro et al., 2016).

2.4 Uplatnění bakteriocinů v potravinářství

Bezpečnost potravin je velkým světovým problémem. Se zvyšováním masové výroby se prodlužuje doba uložení potravin v distribučních řetězcích a to může vést ke zvýšení výskytu alimentárních nemocí. Spotřebitelé ale nechtějí vysoké dávky chemických synte-

tických konzervačních látek v potravinách a hledají kvalitní potraviny s dlouhou trvanlivostí, které budou ale minimálně zpracované. Řešením by mohly být bakteriociny, které prodlouží údržnost potravin bez škodlivého působení (Davidson et al., 2005).

Přestože bakteriociny mohou být produkovány mnoha bakteriemi, zvláštní pozornost si získaly bakterie mléčného kvašení vzhledem k jejich možnosti uplatnění v potravinářském průmyslu. Tyto bakterie jsou obecně považovány za bezpečné, proto i jejich metabolity a bakteriociny se považují za bezpečné sloučeniny s dalšími výhodnými vlastnostmi, jako je například stabilita nebo že nemění chuť a vůni výrobku. Navíc jejich antibakteriální spektra zahrnují většinou mikroorganismy přispívající ke kažení potravin a patogeny přenosné potravinami, jako například *Listeria monocytogenes* nebo *Staphylococcus aureus*. Kromě toho by měly přispět i ke konkurenceschopnosti produkčních buněk (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Drider, 2007).

Produkce a účinnost bakteriocinů v potravinách značně závisí na fyzikálně-chemických faktorech (pH, teplota, aktivita vody, redoxní potenciál, čas) a na složení a struktuře potraviny (Gálvez et al., 2007).

Bakteriociny mohou být aplikovány do potravin třemi způsoby (Chen a Hoover, 2003):

- Inokulací BMK, které produkují daný bakteriocin, přímo do potraviny,
- Přidáním purifikovaného bakteriocinu,
- Použitím produktu již dříve zkvašeného bakteriemi produkujícími bakteriociny jako přísady při zpracování potravin.

V poslední době se bakteriociny stávají i součástí aktivních obalových fólií pro kontrolu růstu patogenních bakterií, kdy jsou bakteriociny postupně uvolňovány do potraviny, čímž se předchází inaktivaci bakteriocinu interakcí se složkami výrobku. Bakteriocin může být začleněn přímo do biodegradovatelných proteinových filmů z kukuřice či sóji, nebo může být adsorbován na povrchu polymerů (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Santiago-Silva et al., 2009; Zacharof a Lovitt, 2012).

Jediným bakteriocinem schváleným jako potravinářské aditivum zůstává nisin, ale široce studován je i pediocin PA-1/AcH, který není sice úředně uznán jako konzervační činidlo, ale i přesto se využívá v mase a masných výrobcích pro dekontaminaci či kontrolu růstu patogenu *Listeria monocytogenes*, který roste i při chladírenských teplotách nebo nízké aktivitě vody (Ahmad et al., 2017; Salminen et al., 2012; Woraprayote et al., 2016).

Ekonomicky výhodným a praktickým řešením při výrobě potravin je použití více konzervačních metod, které vytváří řadu překážek pro mikroorganismy. Bylo prokázáno, že přídavek chemických konzervačních látek, záhřev, pulzní elektrické pole, vysoký hydrostatický tlak, balení ve vakuu či modifikované atmosféře zvyšuje aktivitu mnoha bakteriocidů. Navíc se zlepšuje bezpečnost, sensorické a nutriční vlastnosti potravin (Woraprayote et al., 2016).

3 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy (BA) jsou organické bazické dusíkaté sloučeniny s biologickou aktivitou. Vznikají hlavně dekarboxylací aminokyselin, dále aminací nebo transaminací aldehydů a ketonů. Jsou produkovány metabolismem rostlin, živočichů a mikroorganismů (Karovičová a Kohajdová, 2005; Linares et al., 2011).

Podle chemické struktury mohou být BA děleny na alifatické (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatické (tyramin, fenyletylamin) a heterocyklické (histamin, tryptamin). Někteří autoři rozdělují BA podle počtu aminových skupin na monoaminy (tyramin, fenyletylamin), diaminy (putrescin, kadaverin) a polyaminy (spermin a spermidin) (Karovičová a Kohajdová, 2005; Linares et al., 2011).

3.1 Funkce biogenních aminů

BA jsou zdrojem dusíku a prekurzory pro syntézu alkaloidů, hormonů, nukleových kyselin, proteinů nebo karcinogenních N-nitrososloučenin. V organismu mohou ovlivňovat řadu procesů, například regulaci tělesné teploty, zvýšení či snížení krevního tlaku, příjem potravy (Karovičová a Kohajdová, 2005).

V rostlinách se putrescin, spermin a spermidin podílejí na buněčném dělení, kvetení, vývoji plodu a reakci na stres. Polyaminy jsou důležité pro růst, renovaci a metabolismus každého orgánu v těle a pro zachování metabolické aktivity a imunity střeva. Na druhou stranu podporují i růst nádorových buněk, a proto jedním z hlavních cílů výzkumu léčby rakoviny je inhibice biosyntézy polyaminů (Karovičová a Kohajdová, 2005).

V prokaryotických buňkách není funkce BA jasná. Pravděpodobně souvisí s mechanismem obrany bakterie v kyselém prostředí, protože dekarboxylázové enzymy jsou indukovány přítomností kyselého prostředí a specifické aminokyseliny. Dekarboxylace zvyšuje možnost přežití díky spotřebě protonů a vyloučení aminů a CO₂ do prostředí, čímž obnovuje vnější pH. Dále by mohly zprostředkovávat osmotickou a oxidační reakci na stres (Bover Cid et al., 2008; Linares et al., 2011).

3.2 Výskyt biogenních aminů v potravinách

Biogenní aminy se vyskytují v mnoha druzích potravin jako důsledek dekarboxylace volných aminokyselin pomocí enzymů dekarboxyláz, pocházejících ze startérových kultur (BMK) nebo bakterií způsobujících kažení potravin. Biogenní aminy tedy lidé přijímají

denně v potravě a v tenkém střevě bývají rychle detoxikovány pomocí enzymů mono- a diaminoxidáz, histamin navíc pomocí metyl- nebo acetyltransferázy. Problém nastává v případě nefunkčnosti těchto enzymů, která může být způsobena geneticky nebo příjmem inhibitorů v podobě alkoholu nebo antidepresiv. Také vysoké koncentrace BA v potravinách mohou způsobit intoxikaci, která se projevuje horečkou, bolestí hlavy, nevolností, bušením srdce, zvýšením či snížením krevního tlaku (Alvarez a Moreno-Arribas, 2014; Van Ba et al., 2016).

Mezi potraviny obsahující vysoké koncentrace biogenních aminů patří ryby a výrobky z nich, dále fermentované potraviny, zejména masné a mléčné výrobky, některé druhy zeleniny, piva a vína. V nefermentovaných potravinách slouží BA jako indikátor mikrobiálního kažení (Alvarez a Moreno-Arribas, 2014).

V současné době je dán Nařízením komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny, limit pouze pro histamin ve výši 100 mg/kg v produktech rybolovu, z druhů ryb spojovaných s vysokým množstvím histidinu (zejména čeledí *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae*, *Scombresosidae*), ve výši 200 mg/kg v produktech rybolovu, které byly ošetřeny enzymatickým zráním v láku, vyrobené z druhů ryb spojovaných s vysokým množstvím histidinu a ve výši 400 mg/kg v rybí omáčce vyrobené fermentací produktů rybolovu. Dané kritérium se vztahuje na produkty uvedené na trh po dobu jejich údržnosti.

Množství jednotlivých biogenních aminů může být stanoveno pomocí vysokoúčinné kapalinové, tenkovrstvé či plynové chromatografie nebo kapilární elektroforézou, kdy analýzy BA se provádí kvůli kontrole surovin, meziproductů a produktů nebo monitoringu průběhu fermentace (Önal, 2007).

3.3 Podmínky vzniku biogenních aminů

Protože BA vznikají v potravinách většinou kvůli dekarboxylázové aktivitě mikroorganismů, podmínky nutné pro jejich tvorbu jsou následující: dostupnost volných aminokyselin (produkty proteolýzy), přítomnost dekarboxyláza pozitivního mikroorganismu a vhodné podmínky pro jeho růst. Důležitým faktorem je přítomnost pyridoxal-5-fosfátu, nezbytného pro funkci dekarboxylázy (Bover Cid et al., 2008; Karovičová a Kohajdová, 2005).

Jak již bylo uvedeno výše, dekarboxylázová aktivita je silnější v kyselém pH. Dále je tvorba BA ovlivňována množstvím živin, teplotou (optimální je 20 – 37 °C), přítomností kyslí-

ku nebo obsahem soli (může zvyšovat i snižovat, záleží na konkrétním mikroorganismu a dekarboxyláze). Při výrobě potravin je tedy produkce biogenních aminů ovlivněna vnitřními (pH, aktivitou vody, velikostí a složením potraviny) a vnějšími technologickými faktory (teplotou, relativní vlhkostí vzduchu, délkou výrobního procesu a skladování) (Alvarez a Moreno-Arribas, 2014; Karovičová a Kohajdová, 2005; Latorre-Moratalla et al., 2012).

3.4 Možnosti snížení obsahu biogenních aminů v potravinách

Histamin a tyramin jsou považovány za nejtoxičtější BA, putrescin a kadaverin jejich účinky ještě zesilují. Tyto aminy jsou navíc termostabilní, a proto nejsou inaktivovány tepelným ošetřením. Z toho důvodu se v současné době hledají metody, které by umožnily prevenci nebo řízení tvorby BA při výrobě potravin. V první řadě je důležité dodržovat správnou hygienickou a výrobní praxi a zajistit další otázky týkající se bezpečnosti potravin. Uchovávání potravin pod 5 °C, používání potravinářských aditiv a konzervantů, vysokého hydrostatického tlaku, ozařování, balení ve vakuu nebo v modifikované atmosféře inhibuje bakterie nebo jejich dekarboxylázovou aktivitu a tím zpozdí tvorbu BA v potravinách (Alvarez a Moreno-Arribas, 2014; Naila et al., 2010).

Různé studie (Bover-Cid a Holzapfel, 1999; Shiling et al., 2016; Van Ba et al., 2016) zjistily, že dekarboxylázovou aktivitu vykazují i bakterie mléčného kvašení, které se používají jako startérové kultury. Vysoké počty laktobacilů a enterokoků korelují s vysokou koncentrací BA, některé kmeny *Lactobacillus curvatus*, *Lbc. brevis* a *Lbc. buchneri* byly shledány významnými producenty tyraminu. Proto se hledají takové kultury, které neprodukují BA a které navíc mohou kontrolovat a předcházet tvorbě BA svou schopností produkovat antimikrobiální látky a snižovat pH prostředí, které inhibuje růst dekarboxyláza pozitivních bakterií.

Například při výrobě sýrů je hlavním zdrojem dekarboxyláza pozitivních bakterií syrové mléko. Počty těchto bakterií mohou být sníženy baktofugací, pasterací, vysokotlakou homogenizací a jejich růst může být inhibován pomocí startérové kultury produkující bakteriociny (Calzada et al., 2013).

Další možností je degradace vzniklých BA pomocí enzymů aminosidáz, které byly popsány například u *Staphylococcus xylosus*, *S. carnosus*, které společně s *Lactobacillus plantarum* nebo *Lbc. sakei* jsou vhodnou startérovou kulturou pro výrobu masných ferment-

tovaných výrobků s nízkým obsahem BA (Sun et al., 2016; Van Ba et al., 2016), u *Bacillus polymyxa* (snížení histaminu o 34 % během fermentace solených rybích výrobků (Lee et al., 2016)) nebo u *Lactobacillus casei* (snižuje koncentraci histaminu a tyraminu v průběhu zrání sýru (Herrero-Fresno et al., 2012)). Oxidativní deaminací BA vzniká aldehyd, amoniak a peroxid vodíku (Zaman et al., 2011).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je sledování vlivu vybraných faktorů na produkci biogenních aminů u kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* v podmínkách *in vitro* a v mléce.

Cílem teoretické části bylo:

- charakterizovat bakterie mléčného kvašení a protektivní kultury,
- definovat inhibiční látky produkované v potravinách, zejména bakteriociny,
- popsat biogenní aminy a možnosti jejich snížení v potravinách.

Cílem praktické části bylo:

- sledovat vliv vybraných faktorů (pH prostředí, přídavku nisinu a protektivní kultury *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) na produkci vybraných biogenních aminů u kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* v podmínkách *in vitro* a v mléce,
- stanovit produkci biogenních aminů pomocí HPLC,
- zpracovat výsledky,
- formulovat závěry na základě získaných výsledků.

5 MATERIÁL, POMŮCKY, METODY

5.1 Použité mikroorganismy

V této práci byl sledován vliv různých faktorů, zejména protektivní kultury, na produkci vybraných biogenních aminů u dekarboxyláza pozitivního kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T2, který byl získán z Výzkumného ústavu mlékařenského, pobočky v Táboře.

Jako protektivní kultury byly použity dva kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* s označením CCDM 686 a CCDM 689, které byly získány ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora® (CCDM). Poskytovatel testovaných kmenů uvádí, že tyto 2 kmeny produkují nisin.

5.2 Kultivační média a roztoky

5.2.1 Příprava tekutých půd

Dané množství média bylo naváženo (váhy Kern) a rozpuštěno v požadovaném objemu destilované vody. Poté byl bujon M17 nadávkován po 5 ml a bujon MRS po 6 ml do zkumavek, které byly následně sterilovány v autoklávu (Varioklav) při teplotě 121 °C po dobu 20 minut a připraveny pro kultivaci laktokoků a laktobacilů.

M17 bujon

M17 Broth (HiMedia)..... 42,5 g

Destilovaná voda..... 1000ml

MRS (bujon dle de Man Rogosy a Sharpeho)

MRS Broth (HiMedia)..... 52,2 g

Destilovaná voda..... 1000 ml

Dále bylo připraveno stejným postupem i MRS s přidávkem aminokyselin (AMK) fenylalaninu, tyrozinu, ornitinu a argininu, každé o koncentraci 0,2 % (w/v), které sloužilo k „vybuzení“ laktobacilů k produkci BA před vlastním pokusem.

5.2.2 Příprava tuhých pŮd

Navážené množství média a agaru bylo rozpuštěno v určitém objemu destilované vody a sterilováno v autoklávu (Varioklav) při 121 °C po dobu 20 minut. Tuhé pŮdy byly používány k uchovávání mikroorganismů a stanovení počtu kolonií.

MRS

MRS Broth (HiMedia) 52,2 g
Živný agar č. 1 (HiMedia) 15 g
Destilovaná voda..... 1000 ml

M17

M17 Broth (HiMedia) 42,5 g
Živný agar č. 1 (HiMedia) 15 g
Destilovaná voda..... 1000 ml

5.2.3 Fyziologický roztok

Fyziologický roztok byl připraven navážením 8,5 g chloridu sodného (Penta) a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody. Následně byl roztok nadávkován do zkumavek po 4,5 ml a sterilován v autoklávu (Varioklav) při 121 °C po dobu 20 minut.

5.2.4 Nisin

Bylo naváženo 100 mg nisinu (Sigma-Aldrich) na analytických vahách (Ohaus) a rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. Takto připravený roztok o koncentraci 1000 mg/l byl zfiltrován přes sterilní stříkačkový filtr o porozitě 0,22 μm do sterilních zkumavek a zmrazen pro pozdější použití.

5.2.5 Mléko a bujon MRS pro vlastní experiment

Vlastní experiment probíhal:

- v obnoveném mléku bez přídavku AMK (úprava pH na hodnoty 5,5; 6,0 a 7,0),
- v obnoveném mléku s přídavkem AMK o koncentraci 0,3 % (w/v) pouze při pH 6,
- v bujonu MRS s přídavkem aminokyselin rovněž o koncentraci 0,3 % (w/v) a pH 5,5; 6,0 a 7,0.

Byly použity tyto aminokyseliny jako prekurzory BA (vše Sigma-Aldrich): L-tyrozin, L-arginin, L-lyzin monohydrochlorid, L-ornitinhydrochlorid, L-fenylalanin a L-histidin.

MRS bujon byl připraven podle postupu popsáním již výše, dále bylo upraveno pH (5,5; 6,0; 7,0) a pomocí dávkovače byl rozplněn po 7 ml do zkumavek a sterilován při 121°C po dobu 20 minut. Celkový počet analyzovaných zkumavek s bujonem s AMK byl 384.

Na přípravu 1000 ml obnoveného mléka bylo naváženo 100 g sušeného odstředěného mléka (Moravia Lacto a.s.), v některých případech byly přidány aminokyseliny, dále bylo upraveno pH mléka (6,0; 7,0) a poté bylo nadávkováno do zkumavek po 7 ml a sterilováno v autoklávu při teplotě 110 °C po dobu 10 minut.

Obnovené mléko o pH 5,5 se při sterilaci sráželo, protože se hodnota pH blížila k izoelektrickému bodu kaseinů 4,6 a navíc s klesajícím pH klesá termostabilita mléka (Buňka et al., 2013, s. 108). Proto muselo být použito UHT odstředěné mléko (K-Classic), u něhož bylo upraveno pH na hodnotu 5,5 a rozpipetováno po 7 ml do sterilních zkumavek ve sterilním prostředí BioHazard boxu. Celkem bylo analyzováno 408 zkumavek s mlékem bez přídavku aminokyselin a 144 zkumavek s mlékem s přídavkem aminokyselin.

Bujon i mléko bylo připraveno i bez úpravy pH jako kontrola.

5.3 Kultivace mikroorganismů

Dekarboxyláza pozitivní *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* a protektivní kultury *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* byly uchovávány na Petriho miskách s příslušnou půdou při 8 °C.

Kultury laktokoků z Petriho misek byly zaočkovány 24 hodin před začátkem experimentu do zkumavek s bujonem M17 a kultivovány při teplotě 30 °C v termostatu (Memmert).

Kultura laktobacilu z Petriho misky byla přenesena nejprve do zkumavky s bujonem MRS s aminokyselinami, aby došlo k indukci buněk. Po 24-hodinové kultivaci při 30 °C v anaerobním prostředí bylo odpipetováno 100 µl suspenze do nové zkumavky s bujonem MRS s přídavkem AMK a byl kultivován při stejných podmínkách. Tento postup byl opakován ještě jednou, tedy laktobacily byly nejprve třikrát přeočkovány, aby došlo k „vybuzení“ buněk k produkci BA a poté bylo z poslední zkumavky odpipetováno 100 µl do více

zkumavek s bujonem MRS bez AMK, které byly následně kultivovány při 30 °C po dobu 24 hodin v anaerobním prostředí.

5.4 Příprava supernatantu

Z narostlých protektivních kultur, které byly kultivovány 3 dny při 30 °C, byl odstředěn supernatant při 4 600 otáčkách/min. po dobu 20 minut při 15 °C na centrifuze (Rotanta 460R). Supernatant, obsahující inhibiční látky, byl upraven na pH 6 pomocí 10% NaOH (Lach-ner), aby se zabránilo vlivu kyselého prostředí na testované laktobacily a projevil se jen účinek nisinu. Po úpravě pH byl supernatant zfiltrován přes sterilní stříkačkový filtr o porozitě 0,22 µm do sterilních zkumavek.

5.5 Sledování produkce biogenních aminů v přítomnosti protektivní kultury nebo nisinu

Bylo odebráno 100 µl bakteriální suspenze laktobacilů produkujících biogenní aminy a zaočkováno do mléka bez přídavku či s přídavkem AMK, nebo do bujonu MRS s AMK, k němuž bylo přidáno:

- bez přídavku další látky (kontrolní vzorky),
- 50 µl protektivní kultury, narostlé za 24 hodin,
- 500 µl supernatantu protektivní kultury,
- 350 µl nisinu o koncentraci 1000 mg/l, aby výsledná koncentrace v médiu byla 50 mg/l.

Takto zaočkované zkumavky byly kultivovány při 30 °C a odběry probíhaly v čase 0, 2, 5, 9, 12, 24, 48 a 72 hodin.

Každá kombinace faktorů byla opakována ve 3 zkumavkách. Celkově bylo zanalyzováno 936 zkumavek. Při odběru v daném čase byly odebrány příslušné zkumavky, v každé zkumavce bylo za aseptických podmínek změřeno třikrát pH pomocí pH metru (CyberScan), poté byly odstředěny na centrifuze při 4 600 otáčkách/min. po dobu 20 minut při 15 °C. Z každé zkumavky bylo odebráno 2 x 700 µl supernatantu a napipetováno do 2 eppendorfkových mikrozkušavek. K supernatantu byl přidán stejný objem kyseliny chloristé (Merck) o koncentraci 1,2 mol/l. Eppendorfkové mikrozkušavky se vzorky byly uchovávány v mrazicím zařízení při -18 °C do doby derivatizace. Celkově bylo derivatizováno 1 872 vzorků.

Dále byl v průběhu experimentu zjišťován plotnovou metodou nárůst bakterií a to při odběrech v časech 0, 24 a 72 hodin. V médiu/ mléku o pH 5,5; 6,0 a 7,0 byly zjišťovány počty buněk pouze u zkumavek s přidavkem supernatantu protektivní kultury a nisinu. Počty kolonií byly stanoveny plotnovou metodou následovně:

- ze všech 3 stejných zkumavek byl odebrán 1 ml do prázdné sterilní zkumavky,
- pomocí sterilního fyziologického roztoku bylo provedeno desítkové ředění,
- z požadovaného ředění bylo odebráno 50 μ l na Petriho misku s MRS a rozetřeno pomocí sterilní hokejky po celé misce,
- inokulované Petriho misky byly kultivovány při 30 °C po dobu 24 hodin v anaerobním prostředí a poté vyhodnoceny a spočítáno CFU/ml.

5.6 Derivatizace vzorků

Derivatizace vzorků byla provedena podle návodu dostupného v laboratoři Ústavu technologie potravin:

Do derivatizační nádoby bylo nejprve napipetováno 100 μ l vnitřního standardu 1,7-diaminoheptanu (Sigma-Aldrich) v koncentraci 500 mg/l. K němu byl přidán 1 ml vzorku. Dále byl přidán 1,5 ml karbonátového pufru s pH 11,0 – 11,1 a 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu (Sigma-Aldrich) v acetonu (Sigma-Aldrich) o koncentraci 5 g/l. Nádoby byly uzavřeny a nechaly se třepat 20 hodin v temnu. Po uplynutí této doby bylo přidáno 200 μ l prolinu (Merck) a nádoby byly opět uzavřeny a třepány 1 hodinu. Poté byly přidány 3 ml heptanu (Sigma-Aldrich) a následovalo 3-minutové ruční třepání. Z heptanové vrstvy byl odpipetován 1 ml do vialky a odpařen při teplotě 60 °C do sucha pod proudem dusíku. Suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich) a uchováván v mrazícím zařízení při teplotě -18 °C do doby analýzy.

5.7 Stanovení biogenních aminů pomocí HPLC

Bezprostředně před analýzou byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 μ m a naneseny na kolonu (Zorbax C18 RRHD s rozměry 3 x 50 mm, pórovitostí 1,8 μ m a průtokem 0,45 ml/min) s chromatografickým systémem (binární pumpa a autosampler Agilent Technologies 1260 Infinity, USA) s degaserem, s UV/VIS-DAD detektorem při vlnové délce 254 nm a termostatem (Agilent Technologies, USA) a byly promývány gradientově mobilní fází uvedenou v Tab. 2 při teplotě 30 °C. Chromatogramy byly vyhodnoceny pomocí softwaru Clarity. Byla stanovena produkce tyraminu a sperminu.

Tab. 2 Lineární 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

5.8 Statistické vyhodnocení výsledků

Výsledky produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T2 v bujónu MRS a v mléce byly statisticky vyhodnoceny pomocí neparametrických testů, konkrétně Kruskal-Wallisova testu a Wilcoxonova testu na hladině významnosti 5 % ($P < 0,05$). Ke statistickému vyhodnocení výsledků byl použit software UNISTAT[®], verze 6.5.04 (Unistat, Ltd., Londýn, Velká Británie).

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této práci byl zjišťován vliv 2 kmenů protektivní kultury *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a jejich supernatantů na produkci biogenních aminů v čase u kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T2 v bujonu MRS s přidavkem AMK při iniciačním pH 5,5; 6,0; 7,0 a v mléce bez přidavku AMK při pH 5,5; 6,0; 7,0 a v mléce s přidavkem AMK při pH 6,0. Dekarboxylázová aktivita laktobacila při 30 °C byla stanovena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Bylo zjištěno, že kmen *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T2 produkuje zejména tyramin a spermin, zbývající BA byly buď produkovány v zanedbatelném množství, nebo nebyly detekovány vůbec. Kromě produkce BA byla v průběhu experimentu sledována také změna pH a celkový počet mikroorganismů.

Všechny kombinace uvedených faktorů byly testovány ve 3 opakováních. Získané hodnoty produkce BA byly zprůměrovány a vyhodnoceny ve formě grafů. Celkově bylo vyhodnoceno 1 872 vzorků.

6.1 Vliv vybraných faktorů na produkci biogenních aminů u *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T2 v mléce

6.1.1 Experimenty v mléce bez přidavku aminokyselin

Byl sledován vliv protektivní kultury a nisinu na produkci tyraminu a sperminu u kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T2 v mléce bez AMK v závislosti na iniciačním pH. Produkce tyraminu (nejvyšší hodnota $2,4 \pm 0,9$ mg/l) byla mnohem nižší než produkce sperminu (maximální hodnota 44 ± 6 mg/l).

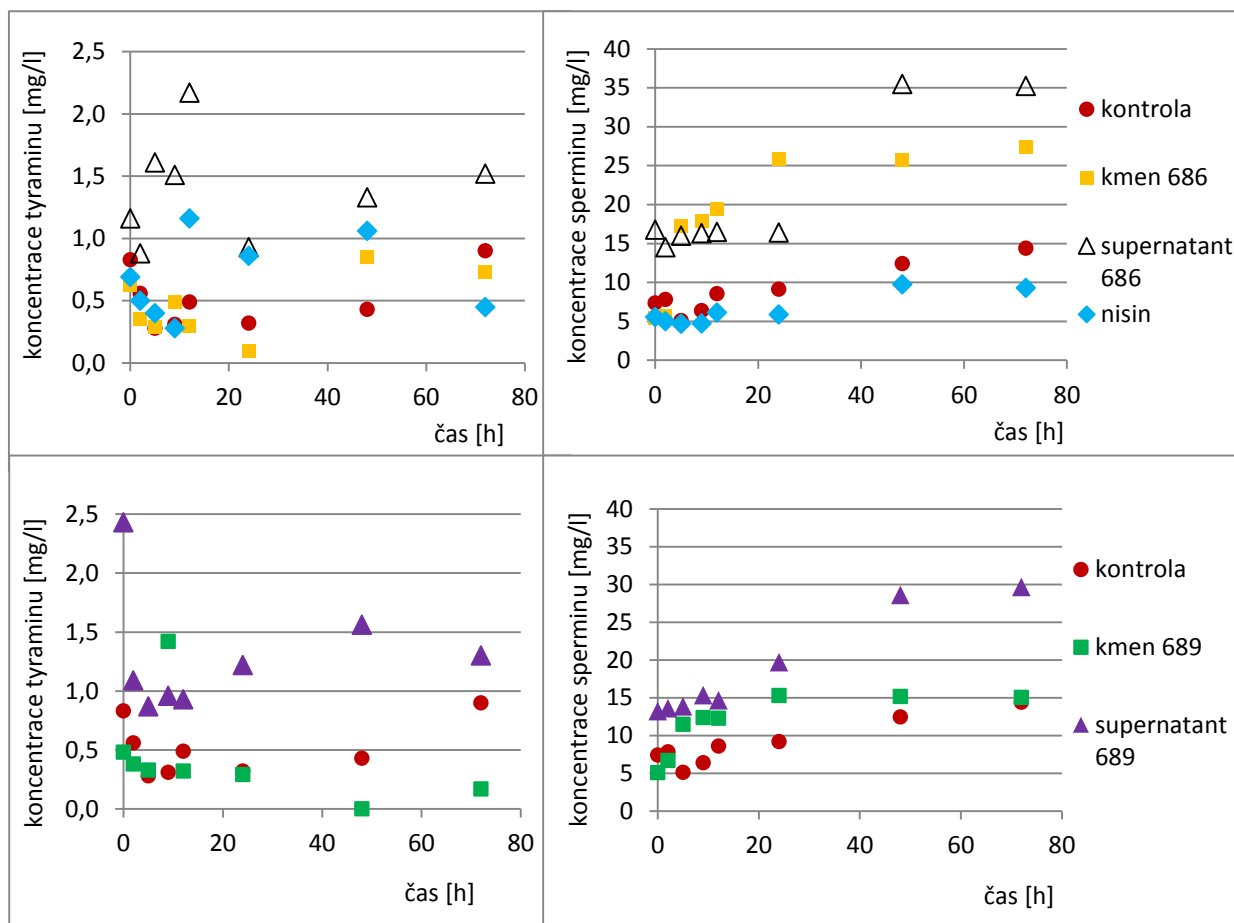
Při iniciačním pH 5,5 (viz Obr. 3) došlo po 72 hodinách k mírné inhibici produkce tyraminu přidanými protektivními kmeny 686 i 689 oproti kontrole, ale pouze v případě kmene 689 byl rozdíl statisticky významný ($P < 0,05$). Produkce sperminu byla snížena jen po přidavku nisinu, ale nejednalo se o signifikantní rozdíl ($P \geq 0,05$).

Při iniciačním pH 6,0 (viz Obr. 4) došlo k statisticky nevýznamné inhibici ($P \geq 0,05$) produkce tyraminu po přidavku protektivního kmene 689.

Koncentrace tyraminu mírně klesla po přidavku protektivních kmenů i při iniciačním pH 7,0 (viz Obr. 5). Rovněž produkce sperminu se snížila pouze po přidavku nisinu, jako při iniciačním pH 5,5, ale zde se jednalo statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$). Průběh

produkce biogenních aminů při těchto dvou pH je podobný, jen při pH 7,0 se po 72 hodinách dosahuje nižších koncentrací tyraminu i sperminu.

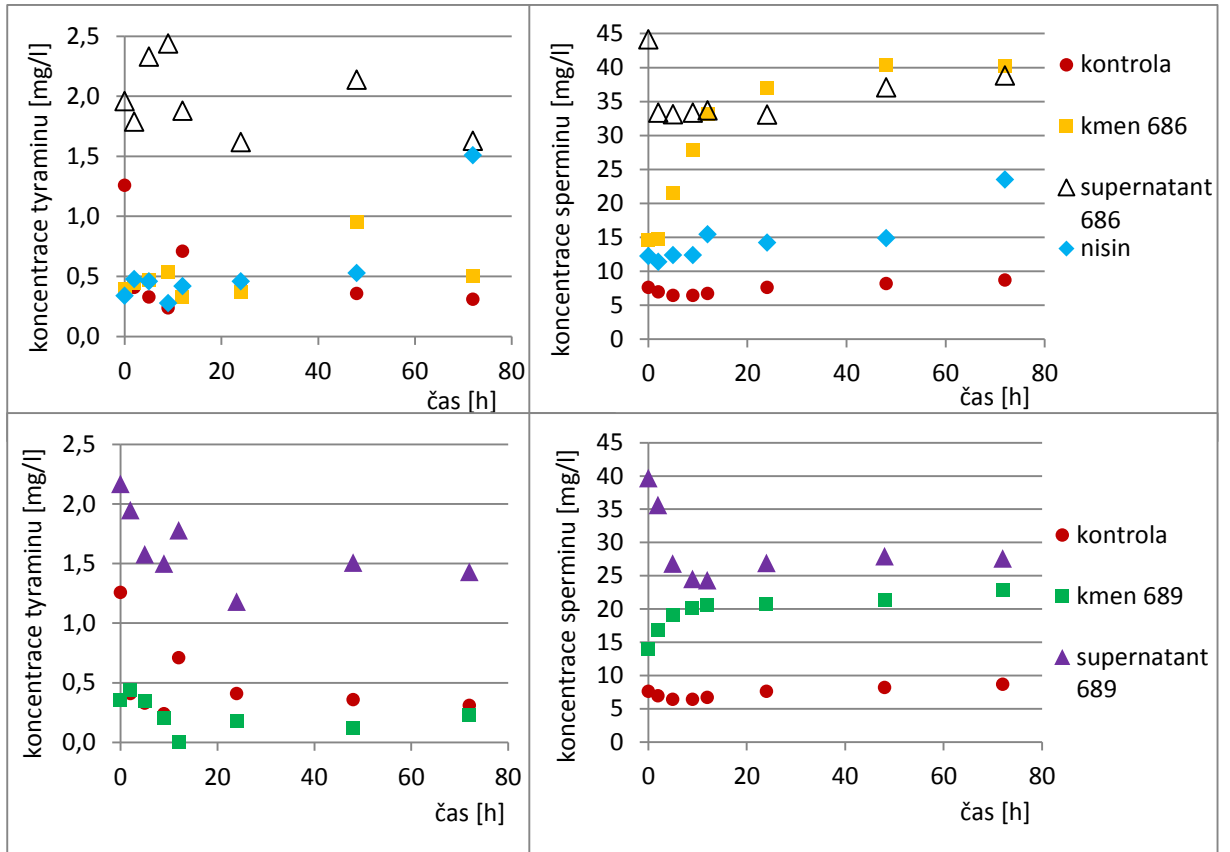
Celkově nejnižší koncentrace biogenních aminů po 72 hodinách kultivace byly zjištěny při iniciačním pH 7,0, kdežto nejvyšší množství BA byla vyprodukována ve většině případů při pH 6,0, třebaže v porovnání s pH 5,5 není v produkci tyraminu (kromě přídavku nisinu) statisticky významný rozdíl ($P \geq 0,05$).



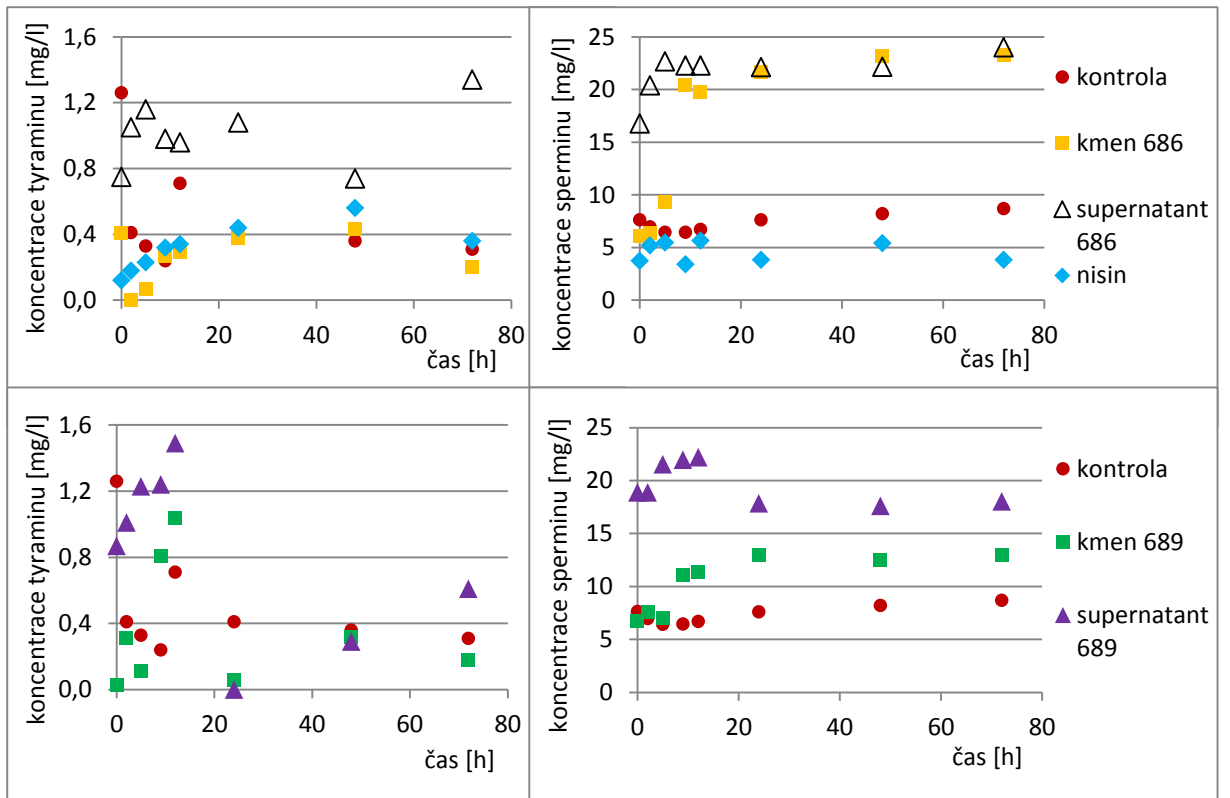
Obr. 3 Grafy závislosti produkce biogenních aminů na čase v mléce při iniciačním pH 5,5

Přídavek supernatantu produkci biogenních aminů nesnižoval, naopak koncentrace tyraminu i sperminu při přídavku supernatantu byla již od počátku vyšší a jeho vliv na produkci BA byl nejednoznačný při daných pH. Při iniciačním pH 5,5 produkce sperminu nejprve stagnovala, po 24 hodinách začala růst, při pH 6,0 nejdříve klesala a opět po 24 hodinách začala stoupat, při pH 7,0 nejprve vzrostla a po 24 hodinách se množství sperminu už nijak výrazně neměnilo.

Zjištěné koncentrace tyraminu nemají oproti sperminu tak výrazné trendy pravděpodobně z důvodu nízkých koncentrací a vyšších směrodatných odchylek.



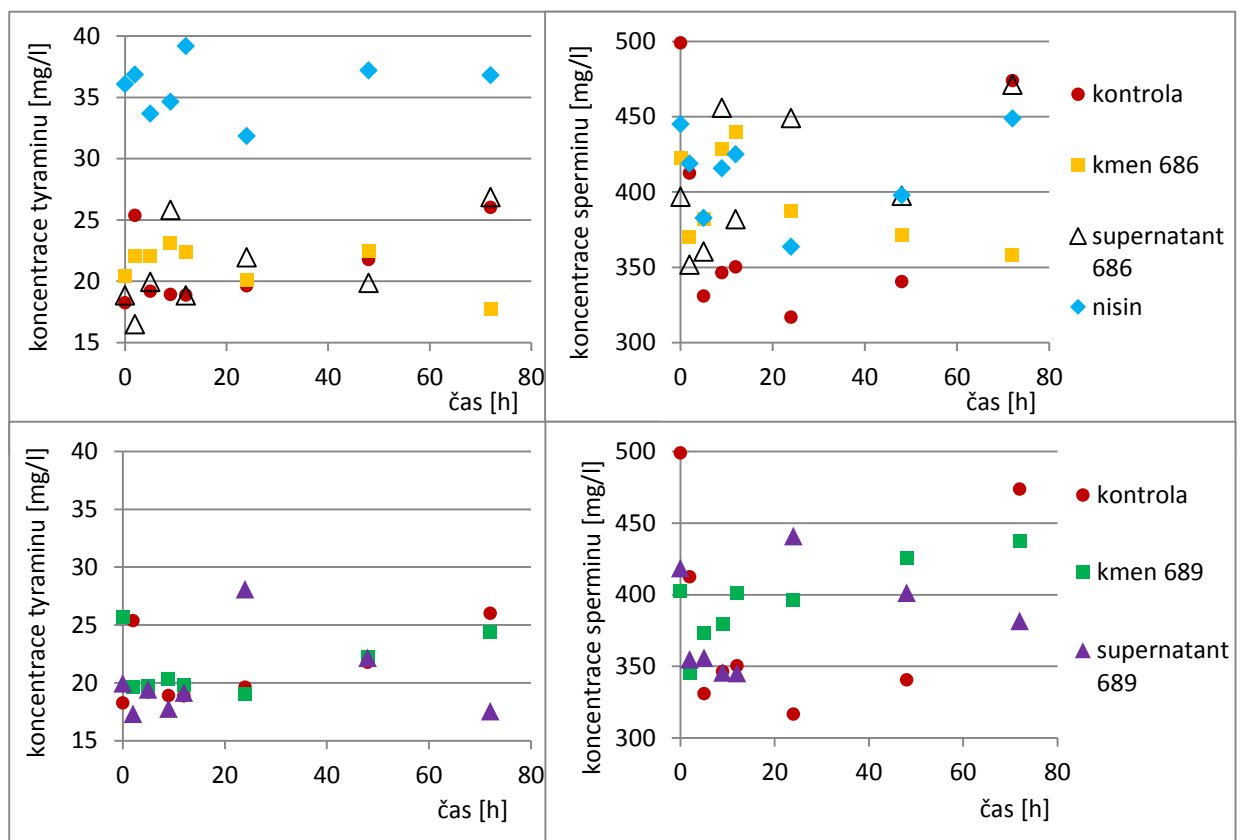
Obr. 4 Grafy závislosti produkce biogenních aminů na čase v mléce při iniciačním pH 6,0



Obr. 5 Grafy závislosti produkce biogenních aminů na čase v mléce při iniciačním pH 7,0

6.1.2 Experimenty v mléce s přidavkem aminokyselin

Ve druhé části experimentu byl sledován vliv protektivní kultury a nisinu na produkci tyraminu a sperminu (viz Obr. 6) u kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T2 v mléce s přidavkem AMK při iniciačním pH 6,0. V porovnání s produkcí BA v mléce bez AMK je ihned patrný rozdíl v koncentracích tyraminu i sperminu, kdy produkce sperminu se zvýšila nejméně 10x a tyraminu 20x po přidavku prekurzorů biogenních aminů. Stejně jako v mléce bez AMK i zde je značný rozdíl mezi koncentrací tyraminu (nejvyšší hodnota 39 ± 3 mg/l) a sperminu (nejvyšší množství 499 ± 47 mg/l).



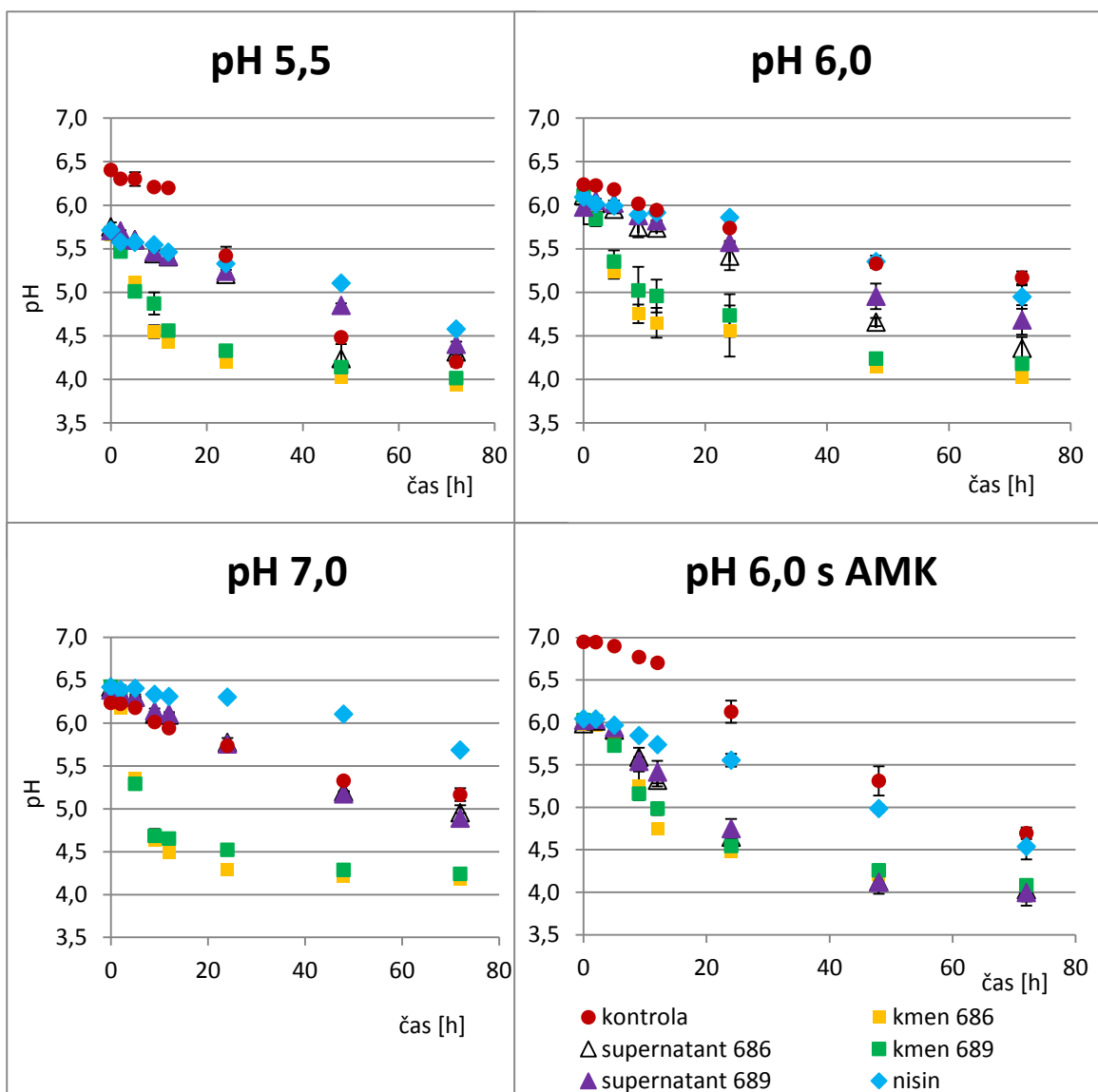
Obr. 6 Grafy závislosti produkce BA na čase v mléce s AMK při iniciačním pH 6,0

Produkce tyraminu byla mírně inhibována protektivními kmeny i jejich supernatanty, kdy v případech přidavku kmene 686 a supernatantu 689 byly rozdíly signifikantní oproti kontrole ($P < 0,05$). Naopak přidavek nisinu koncentraci tyraminu, která byla od počátku experimentu vyšší, nijak neovlivňoval.

Koncentrace sperminu ve všech případech nejprve poklesla a poté došlo k jeho zvýšení. Po 72 hodinách kultivace byla hodnota sperminu ve všech případech nižší oproti kontrole, ale k statisticky významné inhibici ($P < 0,05$) došlo zejména po přidavku suspenze buněk kmene 686.

6.1.3 Stanovení pH v průběhu experimentů

Kromě dekarboxylázové aktivity byla sledována i změna pH v čase. Na Obr. 7 lze pozorovat, že při všech experimentech klesalo pH. Nejrychlejší pokles pH až na hodnotu 4 byl v přítomnosti protektivních kmenů laktokoků, nejpomalejší v přítomnosti nisinu. U kontrolních vzorků došlo k výraznému poklesu pH až po 24 hodinách.



Obr. 7 Změna pH během experimentů kultivace *Lbc. curvatus* subsp. *curvatus* v mléce bez AMK s iniciačním pH 5,5; 6,0; 7,0 a v mléce s AMK při pH 6,0 při přidavku protektivních kultur a nisinu

6.1.4 Stanovení počtu mikroorganismů

Pomocí plotnové metody byly zjišťovány během experimentů i počty mikroorganismů, které jsou uvedeny v Tab. 3. V mléce bez AMK se počet laktobacilů zvýšil až o 2 logaritmické řády do 72 hodin, s výjimkou kontrolních vzorků mléka, u kterých mírně poklesl počet kolonií tvořících jednotek po 24 hodinách. Nisin v mléce při iniciačním pH 7,0 pravděpodobně inhiboval 1. den růst laktobacilů, ale poté byl jeho účinek překonán a počet bakterií vzrostl. Totéž platí i pro nisin v mléce s AMK při pH 6,0. V mléce s AMK kromě nisinu došlo nejprve k nárůstu bakterií o 1 logaritmický řád po 24 hodinách a poté se jejich počet snížil.

Tab. 3 Počet mikroorganismů vyjádřených v log CFU/ml v závislosti na čase pro jednotlivé dílčí pokusy v mléce

	0 h	24 h	72 h
kontrola pro pH 5,5	6,86	7,87	7,66
pH 5,5 supernatant 686	6,40	8,00	8,41
pH 5,5 supernatant 689	7,20	7,60	8,43
pH 5,5 nisin	7,20	7,79	7,85
kontrola pro pH 6,0 a 7,0	7,20	7,81	7,76
pH 6,0 supernatant 686	7,18	7,26	8,82
pH 6,0 supernatant 689	6,76	6,76	7,69
pH 6,0 nisin	6,59	7,30	7,96
pH 7,0 supernatant 686	6,90	7,80	8,18
pH 7,0 supernatant 689	6,41	7,64	8,23
pH 7,0 nisin	6,53	6,15	7,68
kontrola pH 6,0 s AMK	7,66	8,85	8,28
pH 6,0 s AMK supernatant 686	7,76	8,98	8,63
pH 6,0 s AMK supernatant 689	7,73	8,79	8,30
pH 6,0 s AMK nisin	7,73	7,68	8,23

6.2 Vliv vybraných faktorů na produkci biogenních aminů u *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T2 v podmínkách *in vitro*

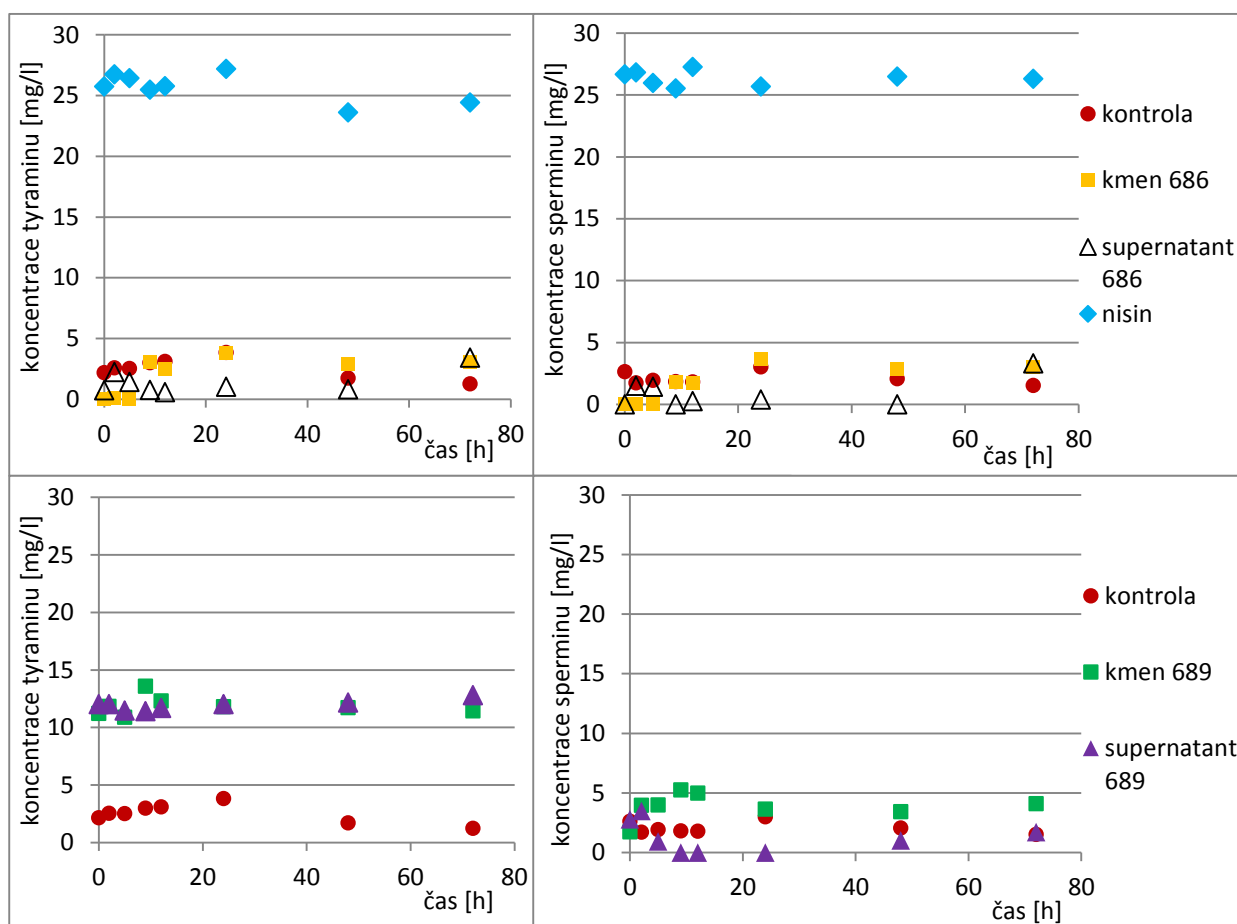
Vliv protektivních kultur a nisinu na produkci tyraminu a sperminu u kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T2 v závislosti na iniciačním pH byl sledován rovněž v podmínkách *in vitro*, přesněji v bujónu MRS s přidávkem aminokyselin o koncentraci 0,3 % (w/v).

V produkci tyraminu (nejvyšší hodnota 27 ± 2 mg/l) a sperminu (32 ± 2 mg/l) v bujonu není rozdíl ve srovnání s experimenty v mléce a navíc ve většině případů byl tyramin produkován ve větší míře než spermin. Obecně koncentrace tyraminu v bujonu je vyšší než v mléce bez AMK, ale nepatrně nižší než v mléce s AMK, kdežto obsah sperminu, vyprodukovaného v podmínkách *in vitro*, je nižší než v mléce s AMK i bez AMK.

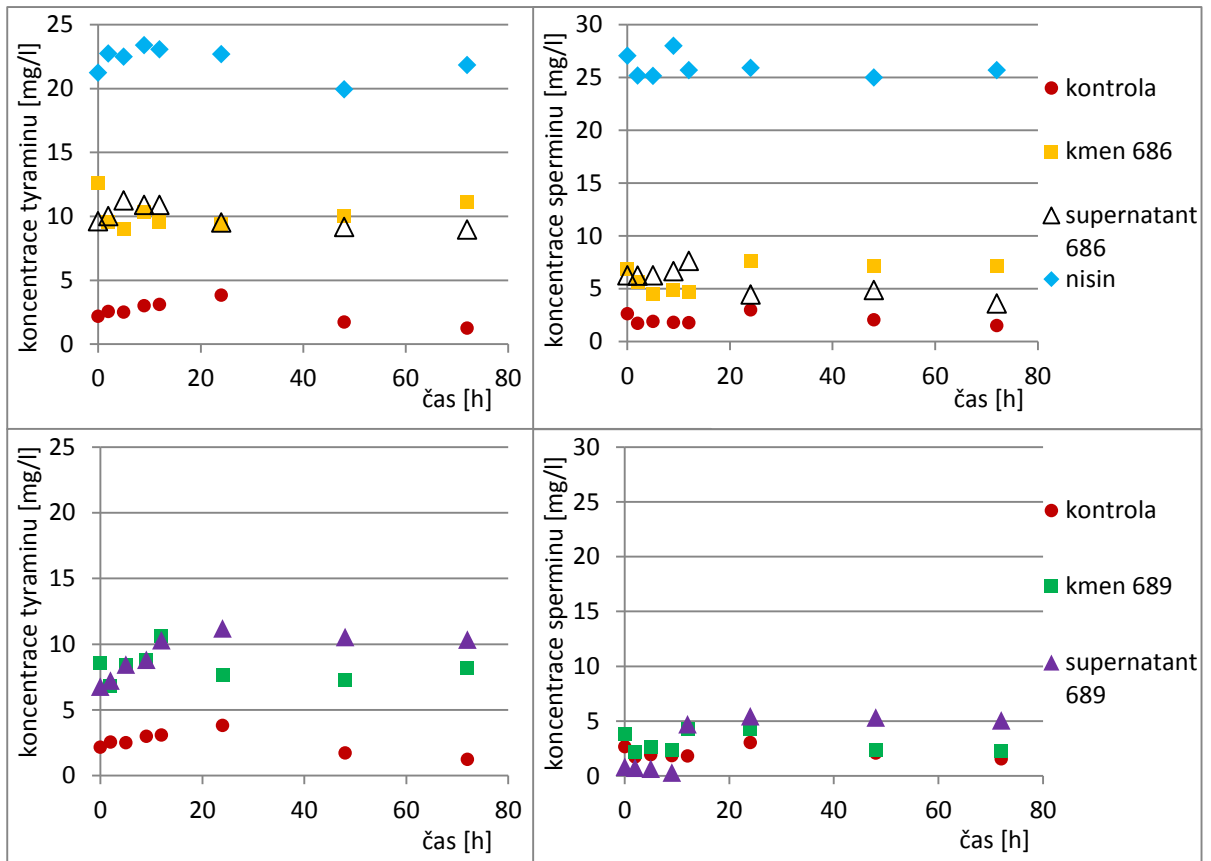
Žádný přídavek nisinu ani protektivního kmene nebo jeho supernatantu nesnížil produkci biogenních aminů oproti kontrole po 72 hodinách kultivace. Ve většině případů se koncentrace tyraminu a sperminu od počátku pokusu významně neměnila.

Při iniciačním pH 5,5 (viz Obr. 8) je statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) v produkci tyraminu při přidavku kmene 686 a kmene 689, zatímco u sperminu je tento rozdíl statisticky nevýznamný ($P \geq 0,05$). Totéž platí i pro iniciační pH 7,0 (viz Obr. 10).

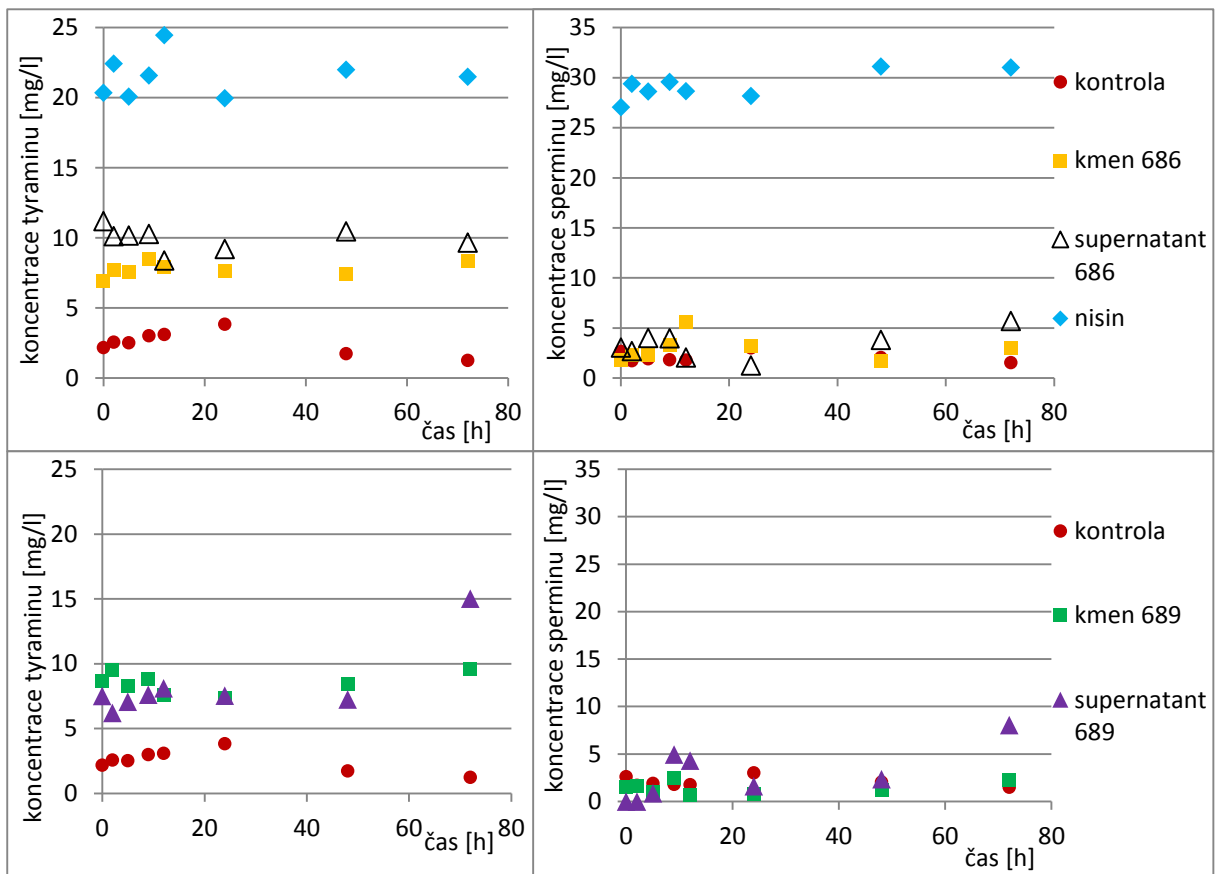
Na Obr. 9 lze pozorovat produkci BA při iniciačním pH 6,0, kde naopak při produkci sperminu je statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) mezi přidavky kmenů 686 a 689.



Obr. 8 Grafy závislosti produkce biogenních aminů na čase *in vitro* při iniciačním pH 5,5



Obr. 9 Grafy závislosti produkce biogenních aminů na čase in vitro při iniciačním pH 6,0

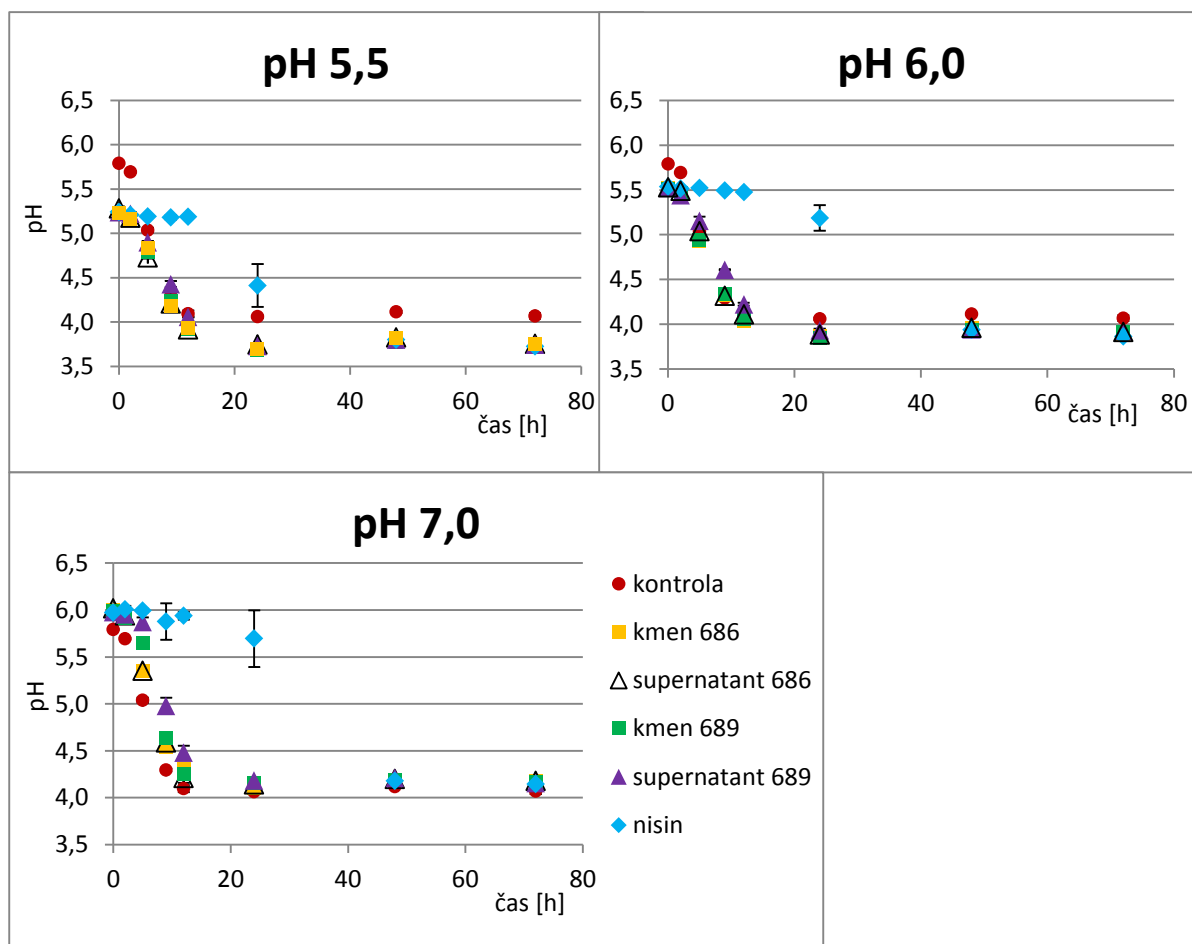


Obr. 10 Grafy závislosti produkce biogenních aminů na čase in vitro při iniciačním pH 7,0

Z výsledků vyplývá, že produkce BA v bujonu nebyla příliš závislá na pH, protože nelze jednoznačně říci, že by při nižším pH produkovaly více tyraminu a sperminu jako v mléce.

6.2.1 Stanovení pH v průběhu experimentů

Během experimentu se při každém odběru sledovala i změna pH, která je znázorněna v grafech na Obr. 11. V bujonu došlo ke snížení pH podobně, jako tomu bylo u mléka. Rozdíl ale spočíval v průběhu poklesu pH. V mléce pH klesalo spíše lineárně, kdežto v bujonu exponenciálně, přesněji došlo k rychlému zvýšení kyselosti do 12 hodin, poté se hodnota pH významně neměnila. Tomuto modelu se vymyká pouze pokus s přidavkem nisinu, kdy pravděpodobně do 12 hodin nisin inhiboval růst laktobacilů, poté ale došlo k velmi rychlému snížení pH na tytéž hodnoty jako u jiných faktorů.



Obr. 11 Změna pH během experimentů kultivace *Lbc. curvatus* subsp. *curvatus* v bujonu s AMK s iniciačním pH 5,5; 6,0; 7,0 a přidavkem protektivních kultur a nisinu

Nižší pH na začátku pokusů neodpovídají přesně pH, na která byl bujon před sterilací upraven. Pravděpodobně v průběhu sterilace dochází k degradacím a chemickým reakcím mezi složkami bujonu, což vede ke snížení pH.

6.2.2 Stanovení počtu mikroorganismů

Během pokusů byly zjišťovány mimo jiné i počty mikroorganismů plotnovou metodou a výsledky jsou uvedeny v Tab. 4. Ve většině případů se zvýšil počet laktobacilů dokonce až o 2 logaritmické řády do 24 hodin, poté se jejich počty snížily. Tento trend koresponduje s vývojem pH, kdy docházelo k rychlému poklesu pH zřejmě v důsledku rychlého pomnožení laktobacilů a dosažení stacionární fáze růstu, kdy se již pH neměnilo a začalo převažovat odumírání buněk.

Výjimkou je opět pokus s nisinem, kdy při pH 6,0 došlo k výraznému nárůstu až po 72 hodinách a při pH 7,0 se počet laktobacilů výrazně od počátečního množství nezvýšil. Tento trend opět kopíruje trend změny pH během experimentu.

Tab. 4 Počet mikroorganismů vyjádřených v log CFU/ml v závislosti na čase pro jednotlivé dílčí pokusy v podmínkách *in vitro*

	0 h	24 h	72 h
kontrola	7,74	9,30	7,76
pH 5,5 supernatant 686	7,72	9,54	8,04
pH 5,5 supernatant 689	7,60	9,56	9,15
pH 5,5 nisin	7,73	9,11	8,84
pH 6,0 supernatant 686	7,79	9,58	8,52
pH 6,0 supernatant 689	7,76	9,40	8,48
pH 6,0 nisin	7,46	7,90	9,18
pH 7,0 supernatant 686	7,82	9,41	8,45
pH 7,0 supernatant 689	7,64	9,38	8,72
pH 7,0 nisin	7,66	8,08	8,00

6.3 Diskuze

V rámci praktické části byla sledována kinetika produkce biogenních aminů v čase v podmínkách *in vitro* a v mléce u kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* za pří-

pravku nisinu, 2 kmenů protektivní kultury *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nebo jejich supernatantů v závislosti na pH prostředí (5,5; 6,0 a 7,0) a teplotě 30 °C.

Daná teplota byla zvolena z důvodu optimální teploty růstu a hodnoty pH byly vybrány tak, aby se co nejvíce přibližovaly technologickým parametrům při výrobě přírodních sýrů. Protože je produkce biogenních aminů závislá na dostupnosti volných aminokyselin (Fernández et al., 2007; Gardini et al., 2001; Marcobal et al., 2006), byly aminokyseliny přidány do kultivačního média i mléka, aby v mléce simulovaly volné aminokyseliny vzniklé proteolýzou v průběhu zrání sýrů. Fakt, že důležitým faktorem ovlivňujícím produkci BA je množství volných AMK, byl potvrzen při experimentech v mléce bez přídavku/s přídavkem AMK, kdy produkce tyraminu a sperminu po přídavku aminokyselin vzrostla 10krát až 20krát.

Dalším faktorem ovlivňujícím dekarboxylázovou aktivitu bakterií je pH prostředí, protože dekarboxylázy jsou indukovány v kyselém pH a slouží jako obranný mechanismus bakterie proti nepříznivému kyselému pH, což potvrzuje řada studií (Bover Cid et al., 2008; Greif et al., 2006; Linares et al., 2011; Marcobal et al., 2006). Tento fakt souhlasí i s experimentem v mléce, kdy při iniciačním pH 5,5 a 6,0 bylo vyprodukováno více biogenních aminů než při pH 7,0. Dále pomocí změny pH v průběhu experimentu by mohla být vysvětlena otázka, proč ve většině případů má kontrola nižší produkci BA než vzorky s přídavky protektivních kultur, když se očekával přesný opak. Tento jev mohl nastat z důvodu rychlejšího poklesu pH u vzorků s přídavky protektivních kmenů než u kontroly, jejíž pH bylo od počátku vyšší a snižovalo se pozvolněji. Například i Fernández et al. (2007) ve své studii zjistil, že největší vliv na syntézu tyraminu u kmene *Enterococcus durans* mělo právě pH, kdy při pH 5,0 bylo vyprodukováno největší množství tyraminu, i přestože se sledovaný kmen enterokoka při tomto pH množil pomaleji než při pH 6,8. Naopak ve studii Gardini et al. (2001), kde byla sledována produkce BA *Enterococcus faecalis* v odstředěném mléce po 72 hodinách při různých hodnotách pH a koncentracích NaCl, bylo zjištěno, že produkce BA klesala se zvyšující se koncentrací soli a snižujícím se pH.

V podmínkách *in vitro* nemělo pH takový vliv na produkci tyraminu a sperminu jako při experimentech v mléce.

Mezi další významné faktory patří i teplota prostředí, protože ovlivňuje enzymatickou aktivitu mikroorganismů, tedy i produkci BA. Dekarboxylázová aktivita je tedy přímoúměrná teplotě a délce skladování (Kalhotka et al., 2011). To potvrzuje i studie (Kim et al., 2011),

kteřá se zabývala detekcí BA v korejském rýžovém víně po dobu 30 dní při 4 a 20 °C. Při vyšší teplotě byly první biogenní aminy detekovány již 3. den a množství BA postupně narůstalo, kdežto při 4 °C nebyly BA kromě putrescinu vůbec detekovány.

Podle Fernández et al. (2007) a Moreno-Arribas a Lonvaud-Funel (1999) se aktivita dekarboxylázy snižuje se zvyšující se koncentrací daného biogenního aminu. To by vysvětlovalo, proč po dosažení určité koncentrace biogenního aminu docházelo ke stagnaci, jako například koncentrace sperminu se po 24 hodinách kultivace většinou neměnila v mléce bez AMK.

V průběhu kultivace docházelo občas i ke snižování množství BA, což si vysvětlovali ve studii Greif et al. (2006) tím, že pravděpodobně došlo k interakcím biogenního aminu se složkami média a také že vlivem nepříznivého kyselého prostředí mohlo dojít k lyzi buněk, z nichž se uvolnily aminooxidázy do prostředí.

Santos et al. (2003) prováděli experiment v mléce a rovněž zjistili, že při vyšší teplotě došlo k rychlejšímu poklesu pH a větší produkci BA. Nárůst sperminu byl rapidnější, což se očekávalo, protože spermin a spermidin jsou esenciální růstové faktory pro mnohé mikroorganismy. To by vysvětlovalo, proč koncentrace sperminu v mléce byla o tolik vyšší než tyraminu. Navíc spermin může být syntetizován z ornitinu i argininu. Igarashi a Kashiwagi (2010) s Shah a Swiatlo (2008) popisují, že polyaminy jsou nezbytné nejen pro normální růst buněk, ale mohou regulovat i biosyntézu, degradaci a transport nukleových kyselin, tvorbu biofilmu, ochranu před oxidačním a kyselým stresem a mnoho dalších funkcí. Naopak *in vitro* se tato teorie nepotvrdila, koncentrace sperminu byla podobná nebo nižší než tyraminu.

Podle Tabanelli et al. (2014) má velký vliv na produkci BA počáteční koncentrace dekarboxyláza pozitivních bakterií, kdy při nižších koncentracích *Enterococcus faecalis* (2-4 log CFU/ml) došlo k výrazné inhibici pomocí *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, produkujícího bakteriociny (přídavek kmenů v množství 7 log CFU/ml), ale při vyšších koncentracích (5-6 log CFU/ml) byla inhibice nepatrná. Ale růst *Streptococcus thermophilus* byl inhibován při všech počátečních koncentracích. Z toho vyplývá, že citlivost mikroorganismů na bakteriociny je variabilní a pravděpodobně *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T2 není tak citlivý na inhibiční působení nisinu a protektivních kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 686 a 689, jak se předpokládalo. Na druhou stranu je nutné si uvědomit v návaznosti na tuto studii, že nisin byl v subletální koncentraci a přídavek protektivního

kmene do zkumavek byl poloviční oproti inokulu dekarboxyláza pozitivního laktobacila, proto nemuselo dojít k očekávaným významným inhibicím. Totéž platí i ve srovnání se studií Joosten a Nuñez (1996), v níž zjišťovali produkci histaminu *Lactobacillus buchneri* v sýrech po 4 měsících zrání, kdy do mléka byly přidány i 3 kmeny produkující bakteriociny. Ve všech případech došlo k inhibici růstu laktobacila a množství histaminu bylo pod 10 mg/kg oproti kontrole, u níž byl zjištěn histamin v množství 177 – 214 mg/kg v závislosti na výchozích koncentracích inokula (1,9; 19 a 190 CFU/ml), přičemž přídavek protektivních kmenů byl 1%. Takto nízké inokulum laktobacilů bylo zvoleno z toho důvodu, že syrové mléko obsahuje obecně nízký počet laktobacilů.

Supernatanty protektivních kultur ve většině případů neinhibovaly produkci tyraminu a sperminu. Pouze supernatant kmene 689 při pH 6,0 v mléce s AMK inhiboval tvorbu tyraminu o 33 % a sperminu o 20 %. Naproti tomu například po přidavku supernatantu kmene 686 v mléce bez AMK o pH 5,5 se zvýšila produkce tyraminu o 69 % a sperminu dokonce o 145 % oproti kontrolním vzorkům po 72 hodinách kultivace. Velmi rozdílné výsledky získaly i ve studii Toy et al. (2015), kde zjišťovali inhibiční účinek supernatantů získaných z *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Pediococcus acidophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Streptococcus thermophilus*, kdy supernatanty *S. thermophilus* a *P. acidophilus* inhibovaly produkci tyraminu *Salmonella* Paratyphi až o 98 %, nicméně supernatanty *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* a *Lc. lactis* subsp. *lactis* stimulovaly tvorbu tyraminu u *Listeria monocytogenes* až o 160 %. V podobné studii Özogul et al. (2015) zkoumali inhibiční působení stejných supernatantů na produkci BA z ornitinu a zjistili, že ve všech případech došlo ke snížení koncentrace putrescinu minimálně o 65 %, na druhou stranu se zvýšilo množství jiných BA, zejména sperminu. Podobné jevy byly pozorovány i při experimentech v mléce, například při pH 7,0 po přidavku kmene 686 se snížila produkce tyraminu kmenem *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T2 o 36 %, ale koncentrace sperminu se zvýšila o 167 %.

Ve studiích Kuley a Özogul (2011) a Özogul (2011) došli k zajímavému závěru, že protektivní kmeny BMK a dekarboxyláza pozitivní alimentární patogeny by neměly být přítomny společně v potravině, protože BMK měly stimulační účinky na produkci BA patogeny, což není žádoucí v potravinářském průmyslu. Taktéž v této práci v mnoha případech došlo k navýšení koncentrace BA po přidavku protektivních kultur pravděpodobně z důvodu rychlého snížení pH, kdy tato stresová situace vyvolala tvorbu biogenních aminů, aby se zvýšilo pH prostředí.

Použitím dekarboxyláza negativních startérů a modifikací výroby se může dosáhnout snížení BA v potravinách, jako například ve studii Latorre-Moratalla et al. (2010), v níž zjistili, že účinnější strategií bylo použití autochtonních startérů než změna typu a koncentrace cukru. Důležitou roli hrají i technologické a hygienické podmínky při výrobě, což dosvědčuje studie Latorre-Moratalla et al. (2012), kde tradiční podmínky zpracování (malý průměr klobás, nízké teploty a relativní vlhkost) byly vhodnější než průmyslové. Každopádně aby se zabránilo růstu potenciálních aminogenních bakterií, třeba *Lbc. curvatus*, doporučuje se použití dekarboxyláza negativních startérů. Rovněž je důležitá povaha a počet dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů v surovinách, na což upozornili Roig-Sagués a Eerola (1997). Podle nich použitý startér *Lactobacillus sakei* inhiboval tvorbu pouze některých biogenních aminů, ale tvorbu histaminu a tyraminu nepotlačoval, třebaže bakterie produkující tyto BA byly ve velmi nízkých koncentracích a startér byl převládajícím mikroorganizmem. Proto je nutné vyrábět z kvalitních surovin, které obsahují nejen nízký celkový počet mikroorganismů, ale také dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů. Tyto výsledky jsou v souladu se studii (Bover Cid et al., 2009 a Xie et al., 2016), kteří uvádějí, že dekarboxyláza negativní startérové kultury měly antagonistický účinek na aminopozitivní bakterie, ovšem jejich účinek může být snížen vysokými počty kontaminujících mikroorganismů, takže inhibice souvisela s počtem buněk bakterií, produkujících BA, nikoliv s dekarboxylázovou aktivitou.

Je tedy nutné zvýšit pozornost nejen při výběru kvalitních surovin s nízkými počty mikroorganismů, vhodných technologických a hygienických podmínek při výrobě, ale i při výběru startérů, aby byly dekarboxyláza negativní, inhibovaly růst kontaminujících mikroorganismů a současně aby jejich prostřednictvím bylo dosaženo požadovaných organoleptických vlastností výrobku. Protože například ve studii (Van Ba et al., 2016) zkoušeli různé směsi startérů při výrobě fermentovaných klobás, a zjistili, že ve všech pokusech se zvýšila výtěžnost, došlo k poklesu pH, zlepšila se chuť a snížil se obsah putrescinu, ale zvýšila se míra oxidace tuků a v některých případech se zvýšil obsah tyraminu.

Produkce BA závisí především na druhu přítomné mikroflóry, dostupnosti prekurzorů a fyzikálně chemických faktorech, jako je teplota, pH, obsah kyslíku, soli a cukru (Zaman et al., 2009).

Na základě těchto výsledků lze pozorovat, že produkci biogenních aminů ovlivňuje řada faktorů, a proto by měla být studována hlavně při výrobě reálných potravin.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo sledovat kinetiku produkce biogenních aminů v čase v podmínkách *in vitro* a v mléce u kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T2 za přítomnosti nisinu, 2 kmenů protektivní kultury *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 nebo jejich supernatantů v závislosti na pH prostředí (5,5; 6,0 a 7,0) a teplotě 30 °C.

Zjištěné výsledky lze shrnout do následujících bodů:

- Pomocí HPLC byla stanovena produkce tyraminu a sperminu, ostatní biogenní aminy byly detekovány v zanedbatelném množství nebo vůbec.
- Produkce biogenních aminů v mléce s AMK vzrostla 10krát až 20krát oproti mléku bez přídavku AMK.
- Produkce sperminu v mléce byla mnohonásobně vyšší než tyraminu.
- Iniciační pH mléka mělo významný vliv na produkci biogenních aminů, při pH 5,5 a 6,0 bylo vyprodukováno větší množství než při pH 7,0.
- S klesajícím pH mléka v průběhu kultivace se většinou zvyšovala produkce biogenních aminů.
- Kmen CCDM 686 inhiboval produkci tyraminu v mléce při pH 5,5; 7,0 a také při pH 6,0 s AMK až o 36 % a také snížil koncentraci sperminu při pH 6,0 s AMK o 25 %. Jeho supernatant produkci biogenních aminů nesnižoval.
- Kmen CCDM 689 inhiboval významně produkci tyraminu v mléce při pH 5,5 a 7,0 až o 81 %, obsah sperminu byl snížen pouze při pH 6,0 v mléce s přídavkem AMK. Jeho supernatant snížil produkci biogenních aminů pouze v mléce s AMK, přesněji obsah tyraminu klesl o 33 % a sperminu o 20 %.
- Nisin inhiboval produkci tyraminu při pH 5,5 o 50 % a sperminu při pH 5,5 o 35 % a při pH 7,0 dokonce o 56 %.
- Nisin, protektivní kultury ani jejich supernatanty neinhibovaly produkci biogenních aminů v podmínkách *in vitro*.
- Produkce biogenních aminů v bujónu nebyla závislá na pH.

Z uvedených výsledků vyplývá, že produkci biogenních aminů v potravinách může ovlivňovat řada faktorů. Protože se *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* choval jinak v mléce než v bujónu, měl by být vliv faktorů studován přímo při výrobě potravin.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- AHMAD, V., M. S. KHAN, Q. M. S. JAMAL, M. A. ALZOHAIRY, M. A. AL KARAAWI a M. U. SIDDIQUI, 2017. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. **49**(1), 1-11 [cit. 2017-02-06]. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.08.016. ISSN 09248579. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857916302709>
- ALVAREZ, M. A. a M. V. MORENO-ARRIBAS, 2014. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science & Technology* [online]. **39**(2), 146-155 [cit. 2017-02-13]. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.07.007. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224414001599>
- ALVAREZ-SIEIRO, P., M. MONTALBÁN-LÓPEZ, D. MU a O.P. KUIPERS, 2016. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **100**(7), 2939-2951 [cit. 2016-11-20]. DOI: 10.1007/s00253-016-7343-9. ISSN 01757598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-7343-9>
- BAMFORTH, Ch. W., 2005. *Food, fermentation, and micro-organisms*. Ames, Iowa: Blackwell Science. ISBN 978-0632-05987-4
- BOVER CID, S. a W. H. HOLZAPFEL, 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **53**(1), 33-41 [cit. 2017-02-15]. DOI: 10.1016/S0168-1605(99)00152-X. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816059900152X>
- BOVER CID, S., M. J. MIGUÉLEZ-ARRIZADO, B. BECKER, W. H. HOLZAPFEL a M. C. VIDAL-CAROU, 2008. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiology* [online]. **25**(2), 269-277 [cit. 2017-02-06]. DOI: 10.1016/j.fm.2007.10.013. ISSN 07400020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002007001359>
- BOVER CID, S., S. TORRIANI, V. GATTO, R. TOFALO, G. SUZZI, N. BELLETTI a F. GARDINI, 2009. Relationships between microbial population dynamics and putrescine and cadaverine accumulation during dry fermented sausage ripening. *Journal of Applied Microbiology* [online]. **106**(4), 1397-1407 [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.1111/j.1365-

2672.2008.04108.x. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2008.04108.x>

BUŇKA, F., V. PACHLOVÁ, L. BUŇKOVÁ a M. ČERNÍKOVÁ, 2013. *Mlékárenská technologie I*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. ISBN 978-80-7454-254-1.

CALZADA, J., A. DEL OLMO, A. PICÓN, P. GAYA a M. NUNEZ, 2013. Reducing Biogenic-Amine-Producing Bacteria, Decarboxylase Activity, and Biogenic Amines in Raw Milk Cheese by High-Pressure Treatments. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **79**(4), 1277-1283 [cit. 2017-02-15]. DOI: 10.1128/AEM.03368-12. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/79/4/1277.full>

CAPLICE, E. a G. F. FITZGERALD, 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **50**, 131-149 [cit. 2016-11-19]. DOI: 10.1016/S0168-1605(99)00082-3. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160599000823>

CLEVELAND, J., T. J. MONTVILLE, I. F. NES a M. L. CHIKINDAS, 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **71**(1), 1-20 [cit. 2016-11-25]. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00560-8. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160501005608>

DAVIDSON, P. M., J. N. SOFOS a A. L. BRANEN, 2005. *Antimicrobials in food*. 3rd ed. Boca Raton: Taylor & Francis. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 145. ISBN 9780824740375.

DE VUYST, L. a F. LEROY, 2007. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* [online]. **13**(4), 194-199 [cit. 2016-11-20]. DOI: 10.1159/000104752. ISSN 14641801. Dostupné z: <http://www.karger.com/?doi=10.1159/000104752>

DRIDER D. editor, 2007. *Antimicrobial Peptides: Food, Veterinary and Medical Applications*. Basel: S. Karger. ISBN 9783805583558.

DUFOUR, A., T. HINDRÉ, D. HARAS a J.- P. Le PENNEC, 2007. The biology of lantibiotics from the lactacin 481 group is coming of age. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. **31**(2), 134-167 [cit. 2016-11-20]. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2006.00045.x. ISSN 15746976. Dostupné z: <http://femsre.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2006.00045.x>

FERNÁNDEZ, M., D. M. LINARES, A. RODRÍGUEZ a M. A. ALVAREZ, 2007. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **73**(6), 1400-1406 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1007/s00253-006-0596-y. ISSN 01757598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0596-y>

GÁLVEZ, A., H. ABRIOUEL, R. L. LÓPEZ a N. B. OMAR, 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **120**(1-2), 51-70 [cit. 2017-02-06]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160507003066>

GARDINI, F., M. MARTUSCELLI, M. C. CARUSO, F. GALGANO, M. A. CRUDELE, F. FAVATI, M. E. GUERZONI a G. SUZZI, 2001. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **64**(1-2), 105-117 [cit. 2017-04-27]. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00445-1. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160500004451>

GREIF, G., M. GREIFOVÁ a J. KAROVIČOVÁ, 2006. Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter* spp. bacteria in model conditions. *Journal of Food and Nutrition Research* [online]. **45**(1), 21–29 [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: <http://www.vup.sk/en/index.php?mainID=2&navID=34&version=2&volume=45&article=778>

HERRERO-FRESNO, A., N. MARTÍNEZ, E. SÁNCHEZ-LLANA, M. DÍAZ, M. FERNÁNDEZ, M. C. MARTIN, V. LADERO a M. A. ALVAREZ, 2012. *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **157**(2), 297-304 [cit. 2017-02-15]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.002. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816051200284X>

HOLZAPFEL, H.- W. a J. B. WOOD (eds.), 2014. *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*. Chichester: Wiley Blackwell. ISBN 978-1-4443-3383-1.

CHEN H. a D. G. HOOVER, 2003. Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. **2**(3), 82-100 [cit. 2016-11-20]. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2003.tb00016.x. ISSN 15414337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00016.x>

- IGARASHI, K. a K. KASHIWAGI, 2010. Modulation of cellular function by polyamines. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. **42**(1), 39-51 [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.07.009. ISSN 13572725. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272509002015>
- JOOSTEN, H. M. L. J. a M. NUÑEZ, 1996. Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **62**(4), 1178–1181 [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/62/4/1178.long>
- KALHOTKA, L., M. NĚMCOVÁ, M. VYLETĚLOVÁ a Š. HAVLÍKOVÁ, 2011. Dekarboxylasová aktivita bacillus licheniformis a její ovlivnění teplotou a dobou kultivace. *Mlékařské listy* [online]. (124), 8-11 [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2011/124_s._viii-xi.pdf
- KAROVÍČOVÁ, J. a Z. KOHAJDOVÁ, 2005. Biogenic Amines in Food. *ChemInform* [online]. **36**(34), 70-79 [cit. 2017-02-06]. DOI: 10.1002/chin.200534338. ISSN 09317597. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/chin.200534338>
- KIM, J. Y., D. KIM, P. PARK, H.-I. KANG, E. K. RYU a S.M. KIM, 2011. Effects of storage temperature and time on the biogenic amine content and microflora in Korean turbid rice wine, Makgeolli. *Food Chemistry* [online]. **128**(1), 87-92 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.02.081. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611003645>
- KULEY, E. a F. ÖZOGUL, 2011. Synergistic and antagonistic effect of lactic acid bacteria on tyramine production by food-borne pathogenic bacteria in tyrosine decarboxylase broth. *Food Chemistry* [online]. **127**(3), 1163-1168 [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.01.118. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611002251>
- LACROIX, Ch. (edited), 2011. *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation*. Oxford: Woodhead Publishing. ISBN 9780857090522.
- LANCIOTTI, R., F. PATRIGNANI, F. BAGNOLINI, M. E. GUERZONI a F. GARDINI, 2003. Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology* [online]. **20**(5), 537-543 [cit.

2016-11-19]. DOI: 10.1016/S0740-0020(02)00159-4. ISSN 07400020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002002001594>

LATORRE-MORATALLA, M. L., S. BOVER-CID, J. BOSCH-FUSTÉ a M. C. VIDAL-CAROU, 2012. Influence of technological conditions of sausage fermentation on the aminogenic activity of *L. curvatus* CTC273. *Food Microbiology* [online]. **29**(1), 43-48 [cit. 2017-02-14]. DOI: 10.1016/j.fm.2011.08.004. ISSN 07400020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002011001894>

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, 2010. Strategies to reduce biogenic amine accumulation in traditional sausage manufacturing. *LWT - Food Science and Technology* [online]. **43**(1), 20-25 [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.1016/j.lwt.2009.06.018. ISSN 00236438. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364380900190X>

LEE, Y.- Ch., H.- F. KUNG, Ch.- Y. HUANG, T.- Ch. HUANG a Y.- H. TSAI, 2016. Reduction of histamine and biogenic amines during salted fish fermentation by *Bacillus polymyxa* as a starter culture. *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. **24**(1), 157-163 [cit. 2017-02-15]. DOI: 10.1016/j.jfda.2015.02.002. ISSN 10219498. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949815000289>

LINARES, D. M., M. MARTÍN, V. LADERO, M. A. ALVAREZ a M. FERNÁNDEZ, 2011. Biogenic Amines in Dairy Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. **51**(7), 691-703 [cit. 2017-02-06]. DOI: 10.1080/10408398.2011.582813. ISSN 10408398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2011.582813>

LIU, W., H. PANG, H. ZHANG a Y. CAI, 2014. Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. *Lactic Acid Bacteria* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, s. 103 [cit. 2016-09-16]. DOI: 10.1007/978-94-017-8841-0_2. ISBN 978-94-017-8840-3. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-8841-0_2

MARCOBAL, Á., P. J. MARTÍN-ÁLVAREZ, M. V. MORENO-ARRIBAS a R. MUÑOZ, 2006. A multifactorial design for studying factors influencing growth and tyramine production of the lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* CECT 4669 and *Enterococcus faecium* BIFI-58. *Research in Microbiology* [online]. **157**(5), 417-424 [cit. 2017-04-27]. DOI: 10.1016/j.resmic.2005.11.006. ISSN 09232508. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250805002779>

MCAULIFFE, O., R. P. ROSS a C. HILL, 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. **25**(3), 285-308 [cit. 2016-11-25]. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00579.x. ISSN 15746976. Dostupné z: <http://femsre.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00579.x>

MORENO-ARRIBAS, V. a A. LONVAUD-FUNEL, 1999. Tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. brevis* ATCC 367. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **180**(1), 55-60 [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb08777.x. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08777.x>

NAILA, A., S. FLINT, G. FLETCHER, P. BREMER a G. MEERDINK, 2010. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science* [online]. **75**(7), R139-R150 [cit. 2017-02-15]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x>

Nářízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?qid=1480167074661&uri=CELEX:02008R1333-20160525> [cit. 2016-11-26].

Nářízení komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:02005R2073-20170101&qid=1487082378956&from=CS#E0023> [cit. 2017-02-14].

ÖNAL, A., 2007. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry* [online]. **103**(4), 1475-1486 [cit. 2017-02-14]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.08.028. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814606006972>

ÖZOGUL, F., 2011. Effects of specific lactic acid bacteria species on biogenic amine production by foodborne pathogen. *International Journal of Food Science & Technology* [online]. **46**(3), 478-484 [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2010.02511.x. ISSN 09505423. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2010.02511.x>

ÖZOGUL, F., G. TABANELLI, N. TOY a F. GARDINI, 2015. Impact of Cell-free Supernatant of Lactic Acid Bacteria on Putrescine and Other Polyamine Formation by Foodborne Pathogens in Ornithine Decarboxylase Broth. *Journal of Agricultural and Food Che-*

mistry [online]. **63**(24), 5828-5835 [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b02410. ISSN 00218561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.5b02410>

ROIG-SAGUÉS, A. a S. EEROLA, 1997. Biogenic amines in meat inoculated with *Lactobacillus sake* starter strains and an amine-positive lactic acid bacterium. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* [online]. **205**(3), 227-231 [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.1007/s002170050156. ISSN 14314649. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002170050156>

SALMINEN, S., A. von WRIGHT a A. OUWEHAND, 2004. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. 3rd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 139. ISBN 0824753321.

SALMINEN, S., S. LAHTINEN, A. C. OUWEHAND a A. von WRIGTH, 2012. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis. ISBN 9781439836774.

SANTIAGO-SILVA, P., N. F. F. SOARES, J. E. NÓBREGA, M. A. W. JÚNIOR, K. B. F. BARBOSA, A. C. P. VOLP, E. R. M. A. ZERDAS a N. J. WÜRLITZER, 2009. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA® 2351) on preservation of sliced ham. *Food Control* [online]. **20**(1), 85-89 [cit. 2017-02-06]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.02.006. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713508000613>

SANTOS, W. C., M. R. SOUZA, M. M. O. P. CERQUEIRA a M. B. A. GLÓRIA, 2003. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. *Food Chemistry* [online]. **81**(4), 595-606 [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00502-2. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814602005022>

SHAH, P. a E. SWIATLO, 2008. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Molecular Microbiology* [online]. **68**(1), 4-16 [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06126.x. ISSN 0950382x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2008.06126.x>

SHILING, L., J. CAIHONG, X. XINGLIAN, X. CHENGJIAN, L. KAIXIONG a S. RUIHUA, 2016. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria and *Enterobacteria*. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. **33**(1), 19-26 [cit. 2017-02-15]. DOI: 10.17221/197/2014-CJFS. ISSN 12121800. Dostupné z:

<http://www.agriculturejournals.cz/web/cjfs.htm?volume=33&firstPage=19&type=publishedArticle>

SUN, Q., Q. CHEN, F. LI, D. ZHENG a B. KONG, 2016. Biogenic amine inhibition and quality protection of Harbin dry sausages by inoculation with *Staphylococcus xylosum* and *Lactobacillus plantarum*. *Food Control* [online]. **68**, 358-366 [cit. 2017-02-15]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.04.021. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713516301918>

TABANELLI, G., C. MONTANARI, E. BARGOSSA, R. LANCIOTTI, V. GATTO, G. FELIS, S. TORRIANI a F. GARDINI, 2014. Control of tyramine and histamine accumulation by lactic acid bacteria using bacteriocin forming lactococci. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **190**, 14-23 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.023. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160514004279>

TOY, N., F. ÖZOGUL a Y. ÖZOGUL, 2015. The influence of the cell free solution of lactic acid bacteria on tyramine production by food borne-pathogens in tyrosine decarboxylase broth. *Food Chemistry* [online]. **173**, 45-53 [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.10.001. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614015581>

VAN BA, H., H.-W. SEO, J.-H. KIM, S.-H. CHO, Y.-S. KIM, J.-S. HAM, B.-Y. PARK, H.-W. KIM, T.-B. KIM a P.-N. SEONG, 2016. The effects of starter culture types on the technological quality, lipid oxidation and biogenic amines in fermented sausages. *LWT - Food Science and Technology* [online]. **74**, 191-198 [cit. 2017-02-13]. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.07.019. ISSN 00236438. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643816304224>

WORAPRAYOTE, W., Y. MALILA, S. SORAPUKDEE, A. SWETWIWATHANA, S. BENJAKUL a W. VISESSANGUAN, 2016. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science* [online]. **120**, 118-132 [cit. 2017-02-06]. DOI: 10.1016/j.meatsci.2016.04.004. ISSN 03091740. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174016300985>

XIE, C., H. WANG, S. DENG a X.-L. XU, 2016. The inhibition of cell-free supernatant of *Lactobacillus plantarum* on production of putrescine and cadaverine by four amine-positive bacteria *in vitro*. *LWT - Food Science and Technology* [online]. **67**, 106-111 [cit.

2017-05-01]. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.11.028. ISSN 00236438. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643815303200>

ZACHAROF, M. P. a R. W. LOVITT, 2012. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia* [online]. **2**, 50-56 [cit. 2017-02-06]. DOI: 10.1016/j.apcbee.2012.06.010. ISSN 22126708. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212670812000814>

ZAMAN, M. Z., A. S. ABDULAMIR, F. ABU BAKAR, J. SELAMAT a J. BAKAR, 2009. A Review: Microbiological, Physicochemical and Health Impact of High Level of Biogenic Amines in Fish Sauce. *American Journal of Applied Sciences* [online]. **6(6)**, 1199-1211 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.3844/ajassp.2009.1199.1211. ISSN 15469239. Dostupné z: <http://www.thescipub.com/abstract/?doi=ajassp.2009.1199.1211>

ZAMAN, M. Z., F. ABU BAKAR, S. JINAP a J. BAKAR, 2011. Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **145(1)**, 84-91 [cit. 2017-02-15]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.031. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160510006628>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BMK	Bakterie mléčného kvašení
BA	Biogenní aminy
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
WHO	Světová zdravotnická organizace
MRS	De Man Rogosa Sharpe Agar
M17	M17 Broth
Lan	Lanthionin
MeLan	3-methylanthionin
Dha	2,3-didehydroalanin
Dhb	2,3-didehydrobutyryn
GRAS	Generally Recognized As Safe (Všeobecně považované za bezpečné)
ATP	Adenzin trifosfát
CCDM	Czech Collection of Dairy Microorganisms (Sbírka mlékařských mikroorganismů)
AMK	Aminokyseliny
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<i>Lbc.</i>	<i>Lactobacillus</i>
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EDTA	Etylendiamintetraoctová kyselina

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1 Zjednodušené schéma fermentace glukózy</i>	14
<i>Obr. 2 Struktura lantibiotik typu A (nisin A) a B (mersacidin)</i>	21
<i>Obr. 3 Grafy závislosti produkce biogenních aminů na čase v mléce při iniciačním pH 5,5</i>	40
<i>Obr. 4 Grafy závislosti produkce biogenních aminů na čase v mléce při iniciačním pH 6,0</i>	41
<i>Obr. 5 Grafy závislosti produkce biogenních aminů na čase v mléce při iniciačním pH 7,0</i>	41
<i>Obr. 6 Grafy závislosti produkce BA na čase v mléce s AMK při iniciačním pH 6,0</i>	42
<i>Obr. 7 Změna pH během experimentů kultivace <i>Lbc. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> v mléce</i>	43
<i>Obr. 8 Grafy závislosti produkce biogenních aminů na čase in vitro při iniciačním pH 5,5</i>	45
<i>Obr. 9 Grafy závislosti produkce biogenních aminů na čase in vitro při iniciačním pH 6,0</i>	46
<i>Obr. 10 Grafy závislosti produkce biogenních aminů na čase in vitro při iniciačním pH 7,0</i>	46
<i>Obr. 11 Změna pH během experimentů kultivace <i>Lbc. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> v bujonu</i>	47

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1 Grampozitivní druhy bakterií citlivé na nisin</i>	22
<i>Tab. 2 Lineární gradientový eluční program HPLC</i>	38
<i>Tab. 3 Počet mikroorganismů vyjádřených v log CFU/ml v závislosti na čase pro jednotlivé dílčí pokusy v mléce</i>	44
<i>Tab. 4 Počet mikroorganismů vyjádřených v log CFU/ml v závislosti na čase pro jednotlivé dílčí pokusy v podmínkách in vitro</i>	48