

Bakteriociny produkované bakteriemi mléčného kvašení a jejich využití v potravinářství

Tereza Rusz

Bakalářská práce
2021

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Tereza Ruz**
Osobní číslo: **T18756**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Bakteriociny produkované bakteriemi mléčného kvašení a jejich využití v potravinářství**

Zásady pro vypracování

Zpracujte literární rešerši na zadané téma zahrnující následující body:

1. Charakterizace a dělení bakteriocinů produkované bakteriemi mléčného kvašení.
2. Mechanismus působení těchto látek.
3. Možnosti aplikace v potravinářském průmyslu.
4. Formulace závěru.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] SALMINEN, Seppo, Atte von WRIGHT a Arthur OUWEHAND. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. 3rd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, 2004, 633 p. ISBN 08-247-5332-1
- [2] DAVIDSON, P. M., SOFOS, J. N., BRANNERN, A. L. Antimicrobials in food. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2005, 721 p. ISBN 0-8247-4037-8
- [3] Vědecké zdroje zahrnuté v databázích ScienceDirect, Web of Science, Scopus, SciFinder Scholar aj.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Khatantuul Purevdorj**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **21. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Robert Gál, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 8. února 2021

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – 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);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Bakteriociny jsou antimikrobní peptidy, jejichž producenty jsou jak bakterie gramnegativní, tak grampozitivní. Tato bakalářská práce je zaměřená na bakteriociny produkované grampozitivními bakteriemi zejména bakteriemi mléčného kvašení. Tyto bakterie jsou běžně používanými mikroorganismy v potravinářském průmyslu a jejich bezpečnost potvrzuje status GRAS (Všeobecně považovaný za bezpečný) schválený Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv – FDA (Food and Drug Administration). Schopnost antimikrobního účinku bakteriocinů bakterií mléčného kvašení je využívána pro kontrolu nežádoucích mikroorganismů v potravinářském průmyslu. Tato práce popisuje jejich charakterizaci a rozdělení do jednotlivých skupin a podskupin, biosyntetickou dráhu, mechanismy účinků těchto látek na cílové buňky a jejich možné využití jako konzervanty potravin.

Klíčová slova: bakterie mléčného kvašení, bakteriociny, konzervace potravin, bioprezervace

ABSTRACT

Bacteriocins are antimicrobial peptides synthesized by gram negative and gram positive bacteria. This bachelor thesis deals with bacteriocins produced by gram positive bacteria, specifically by lactic acid bacteria, which are commonly used in food production where their safety is confirmed by the GRAS status (Generally Recognized as Safe) approved by the FDA (Food and Drug Administration). Lactic acid bacteriocins are used in food industry due to their capability of controlling undesirable microorganisms. This thesis describes bacteriocins characteristics, division into groups and subgroups, biosynthetic pathway, mode of action of these substances against target cells and their potential use as a food preservatives.

Keywords: lactic acid bacteria, bacteriocins, food preservation, biopreservation,

Za odborné vedení mé bakalářské práce a také za cenné a velmi podnětné rady při zpracovávání děkuji paní ing. Khatantuul Purevdorj. Rodině a příteli děkuji za podporu ve studiu a velkou míru trpělivosti.

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 KONZERVACE POTRAVIN	11
1.1 ALIMENTÁRNÍ ONEMOCNĚNÍ.....	13
1.1.1 Grampozitivní bakterie	14
1.1.2 Gramnegativní bakterie.....	15
1.1.3 Viry, priony, paraziti, červi	16
1.2 ZPŮSOBY KONZERVACE POTRAVIN A JEJICH ROZDĚLENÍ.....	17
1.2.1 Fyzikální metody konzervace potravin.....	18
1.2.2 Chemické metody konzervace potravin.....	19
1.2.3 Biologické metody konzervace potravin	19
2 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	22
2.1 TAXONOMIE BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	22
2.2 ROZDĚLENÍ PODLE KONEČNÉHO PRODUKTU FERMENTACE SACHARIDŮ	22
2.2.1 Homofermentativní bakterie	23
2.2.2 Heterofermentativní bakterie	23
2.2.3 Fakultativně heterofermentativní bakterie	24
2.3 VÝSKYT A VYUŽITÍ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	24
2.4 ANTIMIKROBNÍ VLASTNOSTI BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	24
3 CHARAKTERIZACE BAKTERIOCINŮ PRODUKOVANÝCH BMK	26
3.1 HISTORIE BAKTERIOCINŮ.....	26
3.2 CHARAKTERIZACE BAKTERIOCINŮ	26
3.3 SROVNÁNÍ BAKTERIOCINŮ S ANTIBIOTIKY	27
4 KLASIFIKACE BAKTERIOCINŮ BMK	29
4.1 TŘÍDA I.	29
4.1.1 Lantibiotika A	30
4.1.2 Lantibiotika B.....	30
4.2 TŘÍDA II.....	30
4.2.1 Podtřída IIa.....	31
4.2.2 Podtřída IIb.....	31
4.2.3 Podtřída IIc.....	32
4.2.4 Podtřída IId.....	32
4.3 TŘÍDA III.	32
4.4 TŘÍDA IV.	33
5 BIOSYNTÉZA BAKTERIOCINŮ	34
5.1 GENY PRO SYNTÉZU BAKTERIOCINŮ.....	34
5.2 BIOSYNTÉZA LANTIBIOTIK.....	35

5.2.1	Biosyntéza nisinu.....	35
5.3	BIOSYNTÉZA NELANTIBIOTIK.....	36
5.3.1	Biosyntéza pediocinu.....	37
5.4	REGULACE BIOSYNTÉZY BAKTERIOCINŮ.....	37
5.5	IMUNITA PRODUKČNÍCH BUNĚK	37
6	MECHANISMUS PŮSOBENÍ BAKTERIOCINŮ.....	38
6.1	MECHANISMUS ÚČINKU LANTIBIOTIK.....	38
6.1.1	Inhibice syntézy buněčné stěny.....	38
6.1.2	Permeabilizace cytoplasmatické membrány	39
6.2	MECHANISMUS ÚČINKU NELANTIBIOTIK.....	40
7	VYUŽITÍ BAKTERIOCINŮ V POTRAVINÁŘSTVÍ.....	43
7.1	PŘÍMÁ APLIKACE BAKTERIOCINŮ DO POTRAVIN	43
7.1.1	Nisin.....	44
7.1.2	Pediocin	45
7.2	APLIKACE KMENU SCHOPNÉHO PODUKCE BAKTERIOCINŮ	45
7.3	BIOAKTIVNÍ POTRAVINOVÉ OBALY.....	46
7.4	VYUŽITÍ BAKTERIOCINU V KONZERVACI POTRAVIN	47
7.4.1	Mlékárenský průmysl	47
7.4.2	Masný průmysl	48
7.4.3	Ovoce, zeelenina a alkoholické nápoje	49
	ZÁVĚR.....	50
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	52
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	60
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	62
	SEZNAM TABULEK	63

ÚVOD

Konzervace potravin byla odjakživa pro člověka důležitou součástí života pro jeho přežití. Ne v každém ročním období byl přístup k čerstvé potravě, a tak bylo nutné vymyslet postup konzervace potravin, aby byla zachována jejich čerstvost a požitelnost i v dalších ročních obdobích. V posledních desetiletích je v konzervaci potravin dominantní chemický průmysl, jehož produkty pro zachování mikrobiologické stability jsou nejvíce ověřené a na trhu nejvíce uplatňované. K dnešnímu dni je chemie propojena s potravinami v rozsáhlém měřítku. S tím spojený průmysl je si toho vědom, a proto nabízí kromě konzervačních látek také širokou škálu potravinářských aditiv, ku příkladu barviva, stabilizátory, zahušňovačla a mnoho dalších. Tyto látky začaly být v potravinářském průmyslu nadměrně používány, a proto množství odpůrců chemického ošetření potravin roste [1, 2].

Dnešní uvědomělý spotřebitel vyhledává v potravinách látky přírodního charakteru. Mezi ně patří **bakteriociny**. Tyto látky peptidické povahy jsou produktem biosyntézy bakterií. Zejména bakteriociny bakterií mléčného kvašení jsou vhodnými kandidáty pro uplatnění v potravinářském průmyslu. Výhodou bakteriocinů syntetizovaných bakteriemi mléčného kvašení je rovněž ověřená bezpečnost některých produkčních kmenů. Díky antimikrobním vlastnostem jsou bakteriociny schopny inhibice růstu znehodnocujících bakterií. Účinkem proti patogenům v potravinách mohou snížit výskyt alimentárních onemocnění neboli nemoci přenášených z potravin. Kromě toho mají spoustu fyzikálně-chemických vlastností, které mohou jejich potenciální aplikaci v potravinářství zvyšovat. Antimikrobní peptidy bakterií mléčného kvašení lze do potravin aplikovat několika způsoby. Působení bakteriocinů nijak nenarušuje organoleptické vlastnosti potraviny a pro spotřebitele jsou neškodné [3, 4].

Bakterie mléčného kvašení tedy nemají za úkol jen zkvašovat sacharidy na kyselinu mléčnou a dávat tak fermentovaným produktům specifickou chuť a zvyšovat její probiotické vlastnosti, ale také potraviny konzervovat přírodním způsobem, jak je vyžadováno u čím dál tím více spotřebitelů [5].

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KONZERVACE POTRAVIN

Snaha prodloužit trvanlivost samotných potravin a surovin pro jejich přípravu bylo odjakživa cílem lidstva. Primárním důvodem bylo zajištění potravy na období, kdy je jí nedostatek a nelze ji jednoduše sehnat. Ať už to byla změna ročního období jako zima nebo klimatické změny jako sucho [2]. Nejjednodušším způsobem pro uchování potravin na zimní období bylo skladování suchých plodů, jako ořechy a semena [6]. Delší trvanlivost u suchých potravin tohoto typu způsobila, že mezi další jednotlivé postupy byla snaha sušení ovoce a masa či ryb na intenzivním slunečním světle a dále využití nižších teplot v období zimy pro jejich zmrazení [2, 6]. Naopak tepelné opracování potravy a její sušení teplým vzduchem přinesl oheň. S postupem času metod konzervace potravin začalo přibývat a dnes potravinářský průmysl představuje širokou škálu možností, jak potraviny zachovat co nejdéle čerstvé [2].

Konzervace potravin představuje zásadní proces, umožňující zachování pestré nabídky potravin co nejdelší dobu. Primární funkcí konzervačních metod je zabránění zhoršení kvality potravin minimalizací změn, ke kterým dochází během jejich skladování a současně tak zajistit jejich zdravotní nezávadnost. Při použití konzervačních technik je důležité dodržet parametry pro zachování kvality potravinářského výrobku. Jde o nenarušení organoleptických vlastností a zajištění minimální ztráty živin. Konzervační technika musí být u jednotlivých potravin proveditelná a efektivní [7]. Řádná konzervace a následně skladování potraviny jsou důležitými parametry určující délku zachování jejich kvality a mikrobiologické stability [8]. Znehodnocení potravin může mít fyziologický, chemický nebo mikrobiologický charakter a projevuje se například změnou organoleptických vlastností potraviny (např. barva, struktura, vůně, chuť a konzistence). Nejčastější je v potravinářském průmyslu znehodnocení potravin způsobené mikroorganismy. Představuje i jistá nebezpečí, která souvisí s výskytem velmi závažných onemocnění přenášených potravinami [8]. Všechny uvedené procesy mohou probíhat samostatně, synergicky nebo jeden stimuluje další [8, 9].

K fyziologickým změnám dochází v potravinách při skladování a u potravin rostlinného původu po sklizni. Mimo jiné jsou to procesy dýchání a uvolňování ethylenu. Další příčinou fyziologických změn v potravinách je poškození chladem, nedostatek vody, teplotní stres, mechanické poškození. Tyto procesy způsobují ztráty zásobních látek jako sacharidy, bílkoviny, tuky a urychlují tak jejich zrání, měknutí, vysychání, tmavnutí, hnědnutí [9].

Kažení potravin může v potravinách nastat v důsledku chemických reakcí založených na rozkladu složky potravin vččetně bílkovin, sacharidů a lipidů. Každá reakce má různé optimální podmínky a jejich výskyt ovlivňuje barvu, chuť, aroma nebo texturu potravinářského výrobku. Příkladem jsou enzymatické reakce, kdy enzymy působí jako katalyzátory a ovlivňují tak rychlost chemických reakcí [10]. V potravinách se vyskytují přirozeně nebo jsou produkovány mikroorganismy. V závislosti na typu enzymů může docházet ke změně barvy, chuti, vůně, konzistence [9]. Typické enzymatické reakce jsou katalyzovány enzymem polyfenoloxidasou, která reaguje s fenolovými sloučeninami potravin a kyslíkem. Výsledkem reakce je tvorba nežádoucích hnědých pigmentů. Vyšší riziko enzymatického hnědnutí představují potraviny, u kterých došlo k poškození buněk pletiva. Neenzymatické hnědnutí potravin způsobují Maillardovy reakce, kdy dochází k reakci mezi aminokyselinami bílkoviny a redukcujícími sacharidy za vzniku karbonylových sloučenin a následně hnědých pigmentů – melanoidinů. U masa a masných výrobků může docházet k oxidačním reakcím myoglobinu a oxymyoglobinu, což je příčinou změny barvy masa z červené na hnědou. Sacharidy v potravinách mohou podléhat řadou hydrolytických reakcí pomocí kyselých a enzymatické hydrolyzy. Ke znehodnocení lipidů dochází nejčastěji v důsledku oxidačních reakcí nebo působení lipolytických enzymů. Během autooxidačních reakcí lipidů dochází ke žluknutí nenasycených mastných kyselin působením například kyslíku nebo volného radikálu a tvorbě vysoce aromatických látek (aldehydy, ketony) a trans-nenasycených mastných kyselin [10].

Mikrobiální kažení je běžnou příčinou znehodnocení potravin [10]. Z chemického hlediska jsou v potravinách obsaženy látky (voda, sacharidy, lipidy, bílkoviny), které jsou pro mikroorganismy vhodným zdrojem živin a představují tak pro ně příznivé prostředí pro růst a množení [11]. Kromě mikroskopických hub a kvasinek jsou hlavními mikroorganismy způsobující kažení potravin bakterie [6]. Každý mikroorganismus má specifické požadavky pro optimální růst a množení. Mezi faktory určující jejich výskyt patří: vodní aktivita, pH prostředí, optimální teplota růstu, dostupnost kyslíku a přítomnost antimikrobiálních látek. Pro přežití v nepříznivých podmínkách jsou některé mikroby schopny tvorby spor. Potraviny, u kterých je velké riziko brzkého mikrobiálního kažení jsou: čerstvé ovoce, zelenina, ovocné šťávy a zejména potraviny obsahující vysoké množství bílkovin (maso, ryby) [10].

Výskyt mikroorganismů v potravinách úzce souvisí s jejich chemickým znehodnocením [8]. Některé mikroorganismy jsou schopné produkce extracelulárních a intracelulárních enzymů, které mají za následek enzymatické štěpení složek potravin [10]. Tyto enzymy slouží jako

katalyzátory chemických reakcí v potravinách. Příkladem je nevratná proteolýza pomocí proteolytických enzymů. Ta zahrnuje hydrolyzu peptidových vazeb proteinů. Ty se po proteolýze přeměňují na aminokyseliny (AK) [8]. Mezi producenty těchto enzymů patří: *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp. nebo *Flavobacterium* spp. Hydrolytické žluknutí tuků způsobují lipolytické enzymy. U těchto reakcí dochází k odštěpení mastných kyselin z molekuly triacylglycerolu. Producenty lipolytických enzymů jsou: *Pseudomonas* spp., *Lactobacillus* spp., *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp. a *Sacharomyces* spp. Znehodnocení potravin mikroorganismy může být způsobeno nežádoucími fermentačními procesy sacharidů [10]. Mikroorganismy jsou rovněž zodpovědné za nežádoucí procesy kvašení. Alkoholové kvašení je způsobeno činností kvasinek a dochází k tvorbě ethanolu. Mléčné kvašení je způsobeno bakteriemi mléčného kvašení. Rozděleno je na kvašení homofermentativní, u kterého je produktem převážně kyselina mléčná a na heterofermentativní, kde kromě kyseliny mléčné jsou dalšími produkty ethanol a oxid uhličitý. U máselného kvašení je produktem kyselina máselná a mikroorganismem způsobujícím tento druh kvašení je *Clostridium butyricum* [9].

Kažení potravin způsobené bakteriemi a jinými mikroorganismy vede k řadě nežádoucích reakcí projevujících se změnou organoleptických vlastností, za které zodpovídají metabolické látky produkované během mikrobiálního kažení nebo produkty chemických reakcí. Jedná se o organické kyseliny, alkoholy, estery, karbonyly, aminy, sloučeniny síry, plyny (CO₂, H₂, NH₃, H₂S), fluoreskující pigmenty, amoniak nebo merkaptany. Na povrchu potravin se mikrobiologické kažení potravin projevuje například tvorbou slizu, plesnivěním nebo celkovou změnou struktury [12].

Mikrobiální kontaminace, a s ní spojené zkažení potravin, přináší ekonomické ztráty. Tyto potraviny již nejsou vhodné k lidské spotřebě. Mnohem závažnější riziko ale představuje výskyt patogenních mikroorganismů a jejich toxinů v potravinách, které způsobují onemocnění z potravin neboli takzvané alimentární onemocnění [12].

1.1 Alimentární onemocnění

Pod pojmem alimentární nákaza nebo onemocnění se rozumí infekce nebo intoxikace způsobené nejčastěji pozřením potravin kontaminované patogenními mikroorganismy nebo jejich toxiny. Alimentární infekce zahrnuje vniknutí patogenu, jeho množení v gastrointestinálním traktu (GIT) člověka a vyvolání onemocnění. Kontaminace potravin mikroorganismy mohou mít primární nebo sekundární charakter. U primární kontaminace

dochází k mikrobiální kontaminaci surovin nebo vody pro potravinářské zpracování. Příkladem jsou vejce, maso nebo kontaminace těl zvířat před jatečným opracováním. K sekundární kontaminaci pak dochází během zpracování potravin v potravinářském provozu, dále její skladování nebo distribuci. Větší riziko výskytu mikroorganismů je tak v potravinách, které po zpracování jsou určeny k přímé spotřebě a nejsou nijak tepelně upravovány. Příčinou nákazy z potravin jsou jak bakterie grampozitivní (G^+), tak i gramnegativní (G^-) a dále viry, priony, červi nebo paraziti. Hlavní problém v potravinářském průmyslu představuje výskyt bakterií, jako: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni* [4].

1.1.1 Grampozitivní bakterie

Příkladem grampozitivních bakterií způsobujících onemocnění z potravin je *Staphylococcus aureus*. Tento mikroorganismus intoxikuje potraviny enterotoxinem známým jako stafylokokový enterotoxin (SE), kterých je známo více než 20 druhů. *S. aureus* se vyskytuje zhruba u třetiny lidí na kůži a sliznicích. Pokud nedojde k jejich narušení a proniknutí mikroorganismu do tkáně, nevyvolává žádné zdravotní potíže. Zařazuje se tak do podmíněných patogenů. Mezi příznaky onemocnění vyvolané SE patří zvracení, průjem, bolest hlavy, křeče svalů. Lehčí průběh tohoto onemocnění převážně odezní samo do 24 hodin [13].

Dalším G^+ mikroorganismem je *Bacillus cereus*, který je velmi rozšířený a vyskytuje se v půdě, vodě nebo na rostlinách. Je to sporotvorný mikroorganismus, jehož spory jsou vysoce termorezistentní. Entertoxikóza způsobená *B. cereus*, je zapříčiněná produkcí enterotoxinu A nebo B, nastává při hojném pomnožení tohoto mikroorganismu v potravinách. Průběh onemocnění má podobné příznaky jako enteritidy vyvolané SE [14]. Mikroorganismy, které jsou schopny produkce velmi účinných toxinů je rod *Clostridium*, který je rovněž schopen produkce termorezistentních spor. Odolávají rovněž vůči kyselému pH žaludeční šťávy díky ochraně pomocí bílkovin obsažených v potravě a dostávají se do střeva. Potravinami s vysokým rizikem výskytu klostridií jsou nejčastěji doma vyrobené, nesterilizované masové a zeleninové konzervy nebo ovocné kompoty. Mezi komerční rizikové potraviny patří hermeticky vakuově balené maso, sýry nebo uzeniny. Patogenních druhů je přibližně 15 a ačkoli tyto druhy sdílejí mnoho podobností nemoci, které způsobují a toxiny za nich odpovědné jsou pro každý druh jedinečné. Příkladem je *Clostridium perfringens*, který je za normálních okolností přítomen ve stolici. Nejznámějším druhem je

však původce botulismu, a tedy *Clostridium botulinum*, který je zodpovědný za závažné a často smrtelné otravy z potravin kvůli neurotoxickým účinkům toxinu zvaným botulotoxin [15].

Další nebezpečnou hrozbu v potravinách je *Listeria monocytogenes*, přirozeně se vyskytující ve vodě a půdě. Tento původce onemocnění zvaného listerióza je nebezpečný pro některé skupiny, jako jsou starší osoby, lidé s narušeným imunitním systémem, novorozenci a dále těhotné ženy kvůli teratogenním účinkům tohoto onemocnění. Riziko může vyvolávat konzumace tepelně neošetřeného mléka nebo zrajících sýrů. Listerióze lze předcházet dostatečným sanitačním režimem zejména v prvovýrobě mléka, pravidelným čištěním a dezinfekcí vemen dojnic, zchlazením nadojeného mléka po pasteraci a zkrmováním dobytka dostatečně prokysaných siláží [16].

1.1.2 Gramnegativní bakterie

Jednou z nejčastěji hlášených příčin akutní bakteriální enteritidy je přítomnost bakterie *Campylobacter* v potravinách. Především v drůbežím a vepřovém mase. *Campylobacter* je celosvětově označován jako hlavní původce bakteriální gastroenteritidy zvané kamylobakteriíza. Toto onemocnění je způsobeno převážně druhem *Campylobacter jejuni*. Mezi příznaky infekce patří zvětšení lymfatických uzlin, které bývají často zanícené. Nebezpečím mohou být nedovařené párky, především pokud obsahují přírodní střívka, plody moře a další syrové nebo nedostatečně tepelně upravené potraviny. Účinnou inaktivaci bakterií *Campylobacter* představuje vystavení vysokým teplotám nad 63 °C cca 16 vteřin nebo použití chemických látek jako fenol, sloučeniny s obsahem jódu nebo vysokoprocentní alkohol [17].

Další z G⁻ bakterií způsobujících alimentární onemocnění je *Escherichia coli*. Tato přirozeně vyskytující bakterie tvoří součást mikroflóry osídlením střev lidí a jiných savců nebo ptáků. Patogenní kmeny *E. coli* mohou způsobit závažné onemocnění infekcí. Enteropatogenní kmeny jsou příčinou průjemových onemocnění. Každoročně je na celém světě téměř 1,7 miliardy případů těchto průjemových onemocnění a řadí se mezi druhou nejčastější příčinou úmrtí dětí mladších pěti let. Nakažení probíhá fekálně-orální cestou konzumací kontaminovaných potravin především používáním fekálií jako hnojiva. Výskytu onemocnění lze tedy zabránit zlepšením hygienických návyků [18].

Dalším bakteriálním původcem alimentárních onemocnění gramnegativních bakterií je *Salmonella* spp. Způsobuje onemocnění zvané salmonelóza, která je považována za významné zoonotické onemocnění. Nejčastějším sérotypem způsobujícím onemocnění je

Salmonella enteritidis.. Onemocnění probíhá v několika formách, mezi tři nejvýznamnější patří akutní gastroenteritida, která sama ustupuje do cca 3 dnů, následně střevní tyfus nebo pouze jako stav nosičství. Mezi příznaky onemocnění salmonelózou patří vysoké teploty, bolest hlavy, nechutenství nebo průjem. Onemocnění je přenášeno fekálně-orální cestou kontaminovanou vodou nebo potravinou. Nejčastěji se *Salmonella* vyskytuje v potravinách jako vejce a výrobky z nich nebo drůbeží maso a je jeden z primárních příčin nemocí přenášených potravinami [19]. *Shigella* spp. je gramnegativní původce onemocnění, které může vést ke krvavému průjmu, známému také jako bacilární úplavice nebo shigelóza.

Dalším mikroorganismem způsobujícím alimentární onemocnění ze skupiny gramnegativních bakterií je *Yersinia*. Tento rod zahrnuje několik druhů. Jedním z nich je *Yersinia enterocolitica*. způsobují zoonotické onemocnění zvané yersinióza. Tato významná gastroenteritida se projevuje akutním průjmem a ve vzácných případech může dokonce způsobit sepsi a přenáší se převážně fekálně-orální cestou. Za onemocnění způsobené yersiniózou je zodpovědná konzumace kontaminovaného vepřového masa a masných výrobků. K inaktivaci je zapotřebí ošetření potravin teplotou přesahující 63 °C [20].

1.1.3 Viry, priony, paraziti, červi

Kromě bakterií mohou být alimentární onemocnění z potravin způsobeny řadou dalších původců nákazy, jako jsou viry, priony, paraziti, červi. Mezi významné viry způsobující alimentární infekce patří zejména RNA viry. Příkladem je virus hepatitidy typu A z rodu *Hepatitisvirus* způsobující onemocnění zvané žloutenka typu A, často nazývaná také nemocí špinavých rukou. Dále virus klíšťové encefalitidy, kdy nakažení tímto virem může způsobit konzumaci syrového mléka infikovaného zvířete. Virus, který může způsobit nákazu konzumací potravin znečištěné trusem nebo močí nakažených hlodavců. Mezi další RNA viry přenášených fekálně-orální cestou je *Poliovirus* z čeledi *Picornaviridae*, způsobující onemocnění poliomyelitidu neboli dětskou obrnu. Ostatní viry, pro které slouží potravina jako vehikulum přenosu onemocnění jsou rotaviry nebo noroviry. Kromě virů skupinou způsobující nemoci z potravin jsou paraziti jako: *Giardia intestinalis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* (původce onemocnění zvaného améboza), *Toxoplasma gondii* (onemocnění – toxoplazmóza) nebo *Cryptosporidium parvum* a další. Příklady červů způsobujících alimentární onemocnění jsou: tasemnice bezbranná a tasemnice dlouhá, svalovec stočený (*Trichinella spiralis*), roup dětský (*Enterobius vermicularis*) nebo škrkavka dětská (*Ascaris lumbricoides*) [21].

1.2 Způsoby konzervace potravin a jejich rozdělení

Cílem konzervačních metod je zejména připravení nepříznivého prostředí pro mikroorganismy a zabránění tak jejich šíření v potravinách [5]. V dnešní době existují různé typy konzervačních metod, které lze použít k udržení mikrobiologické stability potravinářských výrobků a eliminovat tak výskyt alimentárních onemocnění [11]. Hlavní rozdělení je na tři skupiny, a to na metody: fyzikální, chemické a biologické. U fyzikálních konzervačních metod se využívá metody termické, kdy se pro konzervaci používají různé teploty, buď vysoká (pasterace, sterilace) nebo nízká (chlazení, mrazení). Dále také použití ochranné atmosféry (oxid uhličitý, dusík) a snižování vodní aktivity díky zahuštění nebo sušení potraviny. Biologické metody využívají schopnosti fermentace sacharidů určitých druhů bakterií. Konzervačními látkami jsou metabolity procesu kvašení jako kyselina mléčná, octová nebo alkohol podle druhu kvašení. Chemické metody využívají chemické látky působící bakteriostaticky nebo baktericidně. Mezi tyto látky se řadí: oxid siřičitý, kyselina sorbová nebo kyselina benzoová [9]. Další rozdělení chemických konzervačních látek je na konzervanty přírodního původu a původu syntetického [11].

Uvedené konzervační postupy lze zařadit dle způsobu účinku na mikroorganismy do jedné ze tří skupin konzervačních metod [22]:

1. vylučování mikroorganismů z prostředí,
2. přímá inaktivace mikroorganismů (abiosa),
3. nepřímá inaktivace mikroorganismů (anabiosa).

U metody vylučování mikroorganismů z prostředí dochází k snížení počtu mikroorganismů. Jedná se především o dodržování hygienických postupů v potravinářském zařízení, udržování celkové čistoty místnosti, sterilace používaného nářadí a přístrojů, zamezení kontaminace vzduchu. Dále operace, u kterých dochází k odstraňování mikroorganismů ze surovin určených k výrobě potravin a nápojů, jako ultrafiltrace (filtrace přes polopropustnou membránu nepropustnou pro mikroorganismy), baktofugace (odstranění mikroorganismů odstředivou silou). Abiotická metoda zahrnuje přímou inaktivaci mikroorganismů. Cílem abiotických konzervačních metod je usmrcení optimálně většiny mikroorganismů v potravinách. Využívá se k tomu fyzikálních metod, jako: tepelný záhřev (pasterace, sterilace, blanšírování) nebo záření (UV, β -záření, ionizační záření). Po konzervačních zákrocích využívající přímou inaktivaci mikroorganismů zůstávají jejich buňky přítomné v potravine, ale již v neaktivní formě. U nepřímé inaktivaci mikrobů neboli anabiosy, dochází

k upravení prostředí potraviny a zvýšení její odolnosti zabráněním růstu a rozmnožováním mikroorganismů. Mezi tyto procesy patří konzervace potravin s využitím nižších teplot, dále osmoanabiosa, chemoanabiosa, cenoanabiosa. Principem osmoanabiosy je snížení vodní aktivity (a_w) sušením nebo zahušťováním. Chemoanabiosa využívá působení chemických látek na mikroorganismy a cenoanabiosa prodlužuje trvanlivost potravin pomocí biologických konzervačních technik s využitím různých druhů kvašení (mléčné, ethanolové, octové) [9, 22].

1.2.1 Fyzikální metody konzervace potravin

Fyzikální konzervace potravin zahrnují použití vysoké nebo nízké teploty, sušení, zahušťování, záření nebo používání potravinářských obalů, ochranné atmosféry nebo vakua. Tyto metody se běžně používají při komerční konzervaci potravin a některé z nich mají v potravinářství dlouhou historii [7].

Termické fyzikální metody zahrnují pasteraci, při které dochází k zahřátí potraviny na teplotu nepřesahující 100 °C. Cílem je zničení vegetativních forem patogenů a jiných mikrobů. Sterilizace na rozdíl od pasterace využívá tepelného záhřevu nad 100 °C a výsledkem je zničení usmrcení jak vegetativních forem mikroorganismů, tak jejich spor [9]. Další termickou metoda je blanšírování. Cílem blanšírování je inaktivace mikroorganismů pomocí horké páry nebo ponořením do horké vody [9, 22].

Účinná metoda prodloužení trvanlivosti je použití nízké teploty [7]. Konzervační techniky sníženou teplotou zahrnují chlazení potravin na teplotu skladování. Cílem je snížení teploty pod hranici optimálního růstu rizikových mezofilních mikroorganismů. V případě tepelně opracovaných výrobků je teplota skladování v rozmezí -1 do 4 °C. Tato teplota skladování zpomaluje růst nežádoucích mikroorganismů a zamezuje produkci toxinů. Chladírenské skladování ovoce a zeleniny ovlivňují urychlení nebo zpomalení fyziologických procesů. Teplota skladování je limitována nejnižší teplotou, která může u potravin způsobit poškození chladem vedoucích k nežádoucím fyziologickým změnám potraviny. Rychlé snížení teploty na -18 °C je žádoucí při zmrazování potravin a následném skladování při této teplotě. Kvalita zmrazené potraviny závisí na rychlosti zmrazování, aby došlo co nejrychleji k překročení teplotní hranice, ve které se led tvoří v co největší míře (od -1 do -6 °C). Výsledkem je pak vyšší počet malých krystalků ledu a co nejmenší poškození tkáně nebo pletiva potraviny. Rozmrazené potraviny jsou náchylnější k mikrobiálnímu kažení než před zmrazením [22]. Další metoda je založená na přidávku do potraviny látky, která zvyšuje osmotický tlak prostředí a v důsledku osmotických jevů dochází ke snížení vodní aktivity. Příkladem je

proslazování nebo přidavek chloridu sodného. Vodu z potravin je možné rovněž odstranit pomocí sušení, zahuštění nebo lyofilizací [9, 22]. Jednou z nejstarších technik konzervace potravin je sušení neboli dehydratace. Princip sušení spočívá v odpařování vody a tím zvyšování hmotnosti sušiny. Existují různé způsoby sušení: sušení na slunci, pečení, horkovzdušné sušení, sušení na vyhřátém povrchu a vakuové sušení [7]. Lyofilizace využívá schopnosti sublimace neboli přeměny vody z pevného skupenství na páru. Potravina je nejprve zmrazená na teplotu -20 až -40 °C a následně dochází k sušení ve vakuu při tlaku 0,13 – 1,3 hPa (hektopascalů). U výrobků konzervovaných metodami založenými na snížení vodní aktivity je nezbytné, aby byly zabaleny ve voděodolných obalech a nedocházelo tak ke zpětnému navýšení obsahu vody [22]. Prodloužení trvanlivosti lze rovněž pomocí ochranné atmosféry. Ta zahrnuje použití například dusíku, argonu nebo oxidu uhličitého [9]. Fyzikální metody založené na konzervaci potravin dále zahrnují použití UV záření, β -záření, ionizační záření, ultrazvuk nebo vysoký hydrostatický tlak ke konzervaci potravin [22].

1.2.2 Chemické metody konzervace potravin

Konzervační látky se řadí do skupiny potravinářských přídatných látek. Dle Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách, se pojem „konzervanty“ rozumí látky, které prodlužují trvanlivost potravin tím, že je chrání proti zkáze způsobené mikroorganismy, nebo které potraviny chrání před růstem patogenních mikroorganismů. Aby tyto látky mohly být používány v potravinářském průmysle, nesmí představovat zdravotní riziko pro spotřebitele a jejich bezpečnost musí být schválena Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA). Mezi významné chemické konzervační látky, kterých použití je povoleno za účelem patří kyselina sorbová, kyselina benzoová, parabeny, siřičitany, oxid siřičitý, dusitany [22]. Účinky jejich působení spočívají v přidání malých dávek těchto látek do potravin a nemají vliv na chuťové a sensorické vlastnosti potraviny [9].

1.2.3 Biologické metody konzervace potravin

I přes uznávané požadavky na potravinářské přídatné látky, dnešní spotřebitel tyto látky v potravinách raději nevyhledává [1]. Potravinářský průmysl se tak zaměřuje na vývoj a výzkum konzervačních látek [4]. Nároky spotřebitelů, trendy a legislativa ale představují výzvu k dosažení tohoto cíle [23]. V dnešní době spotřebitelé dávají přednost potravinám, jejichž trvanlivost byla prodloužena přírodními konzervačními látkami [24]. Je to jeden z důvodů, proč se výzkumy konzervace potravin zaměřují kromě syntetických chemických

konzervantů i na jejich přirozenější alternativy. K těmto účelům konzervace potravin jsou využívány rostliny, zvířata, mikroorganismy a jejich metabolity. Vzhledem k tomu, že se zájem o prodloužení trvanlivosti neustále zvyšuje, vyvíjejí se nové přírodní antimikrobiální sloučeniny různého původu. Technologie specializující se na tyto přírodní látky prodlužující trvanlivost a zvyšující mikrobiální bezpečnost potravin se nazývá bioprezervace. K těmto účelům konzervace potravin jsou využívány rostliny, zvířata, mikroorganismy a jejich metabolity. Vzhledem k tomu, že se zájem o bioprezervaci neustále zvyšuje, vyvíjejí se nové přírodní antimikrobiální sloučeniny různého původu [4].

Významnými bakteriemi využívanými za účelem bioprezervace potravin jsou bakterie mléčného kvašení (BMK). Obecně tyto mikroorganismy představují velký biotechnologický potenciál pro využití zejména v potravinářském průmyslu [25]. V potravinách se vyskytují přirozeně nebo je jejich inokulace záměrná za účelem výroby fermentovaných mléčných, masných, ovocných a zeleninových potravin [26, 27]. Kromě zlepšení organoleptických vlastností potravin fermentací, jako probiotické kultury mohou mít příznivý vliv na zdraví spotřebitele [28]. Označovány jsou rovněž jako protektivní kultury, díky schopnosti inhibice růstu patogenních mikroorganismů ve fermentovaných potravinách. Kromě prokazatelné antimikrobní účinnosti musí protektivní kultury vykazovat určité vlastnosti. Hlavní podmínkou je zdravotní nezávadnost, kdy nesmí být patogenní, toxické a nesmí produkovat biogenní aminy. Většina bakterií mléčného kvašení tuto podmínku splňuje a má status GRAS (Všeobecně považovaný za bezpečný), který jejich bezpečnost použití potvrzuje [27].

Bakterie mléčného kvašení jsou schopny produkce různých antimikrobních látek potlačujících růst nežádoucích mikroorganismů [27]. V posledních desetiletích se studie zaměřují na jejich metabolity bílkovinné povahy neboli bakteriociny a jejich využití za účelem biologické konzervace. Schopnost produkce těchto antimikrobních látek mají kromě BMK i jiné grampozitivní (G^+) nebo gramnegativní (G^-) bakterie [29, 30]. Zájem o bakteriociny produkované bakteriemi mléčného kvašení je zejména právě kvůli ověřené bezpečnosti těchto bakterií a jejich dlouholeté tradici používání v potravinářství [27]. Bioprezervace potravin bakteriociny BMK přináší přirozenější způsob konzervace potravin vedoucí ke snížení chemicky syntetizovaných ekvivalentů. Podnět ke studiím těchto látek představuje rovněž jejich proteinová povaha. Díky ní jsou degradovány proteázami trávicího traktu a nedochází k interferenci antimikrobních peptidů s přirozeně vyskytujícími se bakteriemi střevní mikroflóry [27]. Potenciál uplatnění zvyšují i jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, a tedy jejich termostabilita a odolnost vůči změnám pH [31]. Dnes jsou studie

těchto antimikrobních látek zaměřeny na hledání nových, účinnějších a cenově dostupnějších bakteriocinů. Použití bakteriocinů v konzervaci zahrnuje několik aplikací. Jednou z nich je inokulace kmenu schopného produkce bakteriocinů za účelem fermentace potravin [32].

2 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou skupinou přirozeně vyskytujících se grampozitivních bakterií, spojených určitými morfologickými, fyziologickými a metabolickými vlastnostmi. Jsou to nesporulující, nepohyblivé katalasa-negativní tyčinky nebo koky, které postrádají cytochromy [5]. Ve vztahu ke kyslíku jsou anaerobní nebo fakultativně anaerobní a mají schopnost růstu v teplotním rozmezí od 10 °C do 45 °C. Jsou to organismy acidotolerantní, kdy pH růstu BMK je v rozmezí 4,4 až 9,6 [33].

2.1 Taxonomie bakterií mléčného kvašení

Podle současné taxonomie je zařazení bakterií mléčného kvašení do systému následující:

doména: *Bacteria*

kmen: *Firmicutes*

třída: *Bacilli*

řád: *Lactobacillales*

čeleď: *Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae, Streptococcaceae*

Mezi rody BMK patří: *Abiotrophia, Aerococcus, Agitococcus, Alkalibacterium, Allofustis, Alloicoccus, Atopobacter, Atopococcus, Atopostipes, Carnobacterium, Desemzia, Dolosicoccus, Dolosigranulum, Enterococcus, Eremococcus, Globicatella, Granulicatella, Ignavigranum, Isobaculum, Lactobacillus, Lactococcus, Lactosphaera, Lactovum, Leuconostoc, Marinilactibacillus, Melissococcus, Oenococcus, Paralactobacillus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Trichococcus, Vagococcus, Weissella*.

Rod *Bifidobacterium* z čeledi *Bifidobacteriaceae* byl historicky rovněž řazen do skupiny BMK. Přesto, že druhy *Bifidobacterium* v podstatě odpovídají obecnému popisu bakterií mléčného kvašení jsou dnes zařazeny do druhé větve grampozitivních bakterií, tedy: kmene *Actinobacteria*, třídy *Actinobacteria*, řádu *Bifidobacteriales* a čeledi *Bifidobacteriaceae* [5, 33].

2.2 Rozdělení podle konečného produktu fermentace sacharidů

Bakterie mléčného kvašení patří do skupiny chemoorganotrofních mikroorganismů, pro které slouží organické látky jako zdroj uhlíku a energie [5]. Využívají proces zvaný

fermentace, kde dochází k fosforylaci substrátu za anaerobních podmínek a tvorbě organických nebo anorganických látek a syntéze nukleotidu adenosin trifosfátu (ATP), který buňce slouží jako zásoba energie. Nejčastější výchozí substráty pro fermentaci představují sacharidy a jejich deriváty nebo meziprodukty jejich metabolismu [34]. Jedním z hlavních produktů mléčného kvašení sacharidů je kyselina mléčná. Ta je nejčastěji produkována v L (+) formě, nebo méně často v D (-) formě, popř. ve směsi obou enantiomerů. Některé BMK jsou schopny konverze L (+) formy na D (-) formu a naopak, díky aktivitě enzymu racemázy [35]. Kromě kyseliny mléčné jsou dalšími produkty i jiné látky organického či anorganického původu, podle kterých jsou BMK řazeny do dvou skupin, rozdělujících bakterie mléčného kvašení na homofermentativní a heterofermentativní. Jednotlivé druhy fermentace mají odlišné metabolismy glukosy [33]. Přesnější rozdělení bakterií mléčného kvašení podle konečného produktu fermentace sacharidů zahrnuje ještě skupinu fakultativně heterofermentativních BMK [29].

2.2.1 Homofermentativní bakterie

U homofermentativních bakterií probíhá fermentace sacharidů výhradně Embden-Meyerhof-Parnasovou (EMP) dráhou a fermentovaný sacharid je metabolizován téměř jen na kyselinu mléčnou (>90 %) [33]. Teoreticky sledem reakcí EMP dráhy u homofermentace je výtěžek 2 molů kyseliny mléčné a 2 molů nukleotidu ATP z jednoho molu spotřebované glukosy [5]. Mezi homofermentativní bakterie patří například: *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactiplantibacillus plantarum* a *Lactobacillus acidophilus* [29].

2.2.2 Heterofermentativní bakterie

Bakterie heterofermentativní produkují rovněž kyselinu mléčnou ale v menším množství (>50 %). Kromě této kyseliny jsou dalšími produkty: oxid uhličitý (CO₂), vodík (H₂), kyselina octová, kyselina mravenčí nebo ethanol. Tato fermentace sacharidů probíhá 6-fosfoglukonát/fosfoketolázovou dráhou (6-PG/PK dráha) [5]. Při heterofermentaci je teoretický výtěžek při spotřebování stejného množství glukosy jako u homofermentace (1 mol glukosy) rovněž 2 moly nukleotidu ATP ale pouze 1 mol kyseliny mléčné a následně 1 mol ethanolu a 1 mol CO₂ [5]. Do skupiny heterofermentativních bakterií patří například rody *Leuconostoc*, *Oenococcus* a některé druhy rodu *Lactobacillus* – *Limosilactobacillus fermentum* nebo *Levilactobacillus brevis* [29].

2.2.3 Fakultativně heterofermentativní bakterie

U skupiny fakultativně heterofermentativních BMK, probíhá fermentace hexóz pomocí EMP dráhy nebo heterofermentace po 6-PG/PK dráze. Řadí se zde zástupci rodů *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus* nebo *Tetragenococcus* [29].

2.3 Výskyt a využití bakterií mléčného kvašení

Výskyt BMK je závislý na vhodném prostředí. Jsou velmi náročné na živiny a vyhledávají prostředí bohaté na látky, které lze snadno fermentovat. Jsou to například právě sacharidy, vitamíny, peptidy, aminokyseliny (AK), nukleotidy a jiné biomolekuly. Přirozeně se nacházejí v potravinách živočišného původu (mléko, maso), rostlinného původu (kysané výrobky) a v přírodě rostliny, půda). Mezi bakteriemi mléčného kvašení a člověkem existuje jistý symbiotický vztah. Jsou součástí lidské mikroflóry, osidlují například sliznici dutiny ústní nebo gastrointestinální trakt a díky schopnosti acidotolerance dokážou přetrvávat i v kyselém prostředí urogenitálních orgánů [33].

Široké využití mají v potravinářském průmyslu, kde z hlediska technologie má pro výrobu fermentovaných výrobků největší význam metabolismus sacharidů. V menší míře je pak uplatněna schopnost degradace proteinů [33]. Nacházejí se tedy zejména v mléčných kysaných produktech jako jogurty, kefíry, acidofilní mléka, ale také ve fermentovaných nápojích jako kombucha. Kromě tvorby specifických složek potravin ovlivňující organoleptické vlastnosti produktu (aroma, chuť, vzhled, konzistence) [36]. Některé kmeny BMK v optimální dávce zvyšují probiotické vlastnosti dané potraviny a mají tak příznivý vliv na zdraví. Kromě výše popsaných vlastností mají BMK díky schopnostem produkce antimikrobních látek, rovněž využití v bioprezervaci potravin, což je technika konzervace potravin, při níž je využíván jejich potenciál antimikrobního působení vůči ostatním bakteriím, a tím prodloužení doby trvanlivosti výrobku a zabezpečení jeho zdravotní nezávadnosti [37].

2.4 Antimikrobní vlastnosti bakterií mléčného kvašení

Mnohé BMK jsou schopny vykazovat inhibiční efekt proti růstu ostatních přítomných bakterií v potravině a zamezit tak produkci jejich toxinů [38]. Inhibiční aktivitu vůči jiným mikroorganismům zajišťují u bakterií mléčného kvašení organické kyseliny, které jsou ve své nedisociované formě schopny potlačit růst hnilobných bakterií z čeledi

Enterobacteriaceae nebo *Pseudomonadaceae*. Účinně rovněž potlačují růst bakterií způsobujících alimentární onemocnění jako *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Listeria* a mikroorganismů produkujících toxiny (*Staphylococcus aureus*). Mezi další inhibiční látky produkované bakteriemi mléčného kvašení patří: peroxid vodíku, oxid uhličitý, mastné kyseliny, nízkomolekulární látky (acetaldehyd, diacetyl, reuterin), enzymy (lysozym, peroxidasa), deriváty aminokyselin [33, 38].

Velmi významnými metabolity BMK s antimikrobním působením jsou látky proteinové povahy neboli bakteriociny, které inhibují růst příbuzných bakterií jako *Clostridium* nebo *Listeria* [38]. Bakterie mléčného kvašení tyto peptidy syntetizují ribosomální cestou a antimikrobní vlastnosti projevují primárně vůči příbuzným kmenům bakterií. Některé kmeny ale produkují bakteriociny, které jsou schopny inhibice bakteriálních buněk, které nejsou příbuzné s kmenem bakterií mléčného kvašení [32]. Rezistence vůči antimikrobnímu působení svých vlastních bakteriocinů spočívá na specifickém imunitním systému, který zabraňuje ničení produkčních bakteriálních buněk [3]. Mezi taxonomicky nejvýznamnější BMK, které produkují bakteriociny jsou zařazeny rody: *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella* [1]. Jeden mikroorganismus může být přitom producentem více bakteriocinů [3].

3 CHARAKTERIZACE BAKTERIOCINŮ PRODUKOVANÝCH BMK

3.1 Historie bakteriocinů

První antimikrobní peptidy – koliciny, byly popsány ve druhé polovině dvacátých let 20. století. Tyto látky identifikoval mikrobiolog André Gratia v roce 1925 a byly izolovány z bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* – *Escherichia coli*. Název „koliciny“ dostaly až v roce 1946 [1, 3]. Inhibiční účinky měly koliciny jednoho kmene bakterie *Escherichia coli* proti druhému kmeni *E. coli*. Od doby objevu kolicinu začaly látky tohoto charakteru přitahovat pozornost vědců po celém světě a postupem času byly objevovány další peptidy s antimikrobním účinkem u dalších bakterií jak grampozitivních, tak gramnegativních [1, 39]. Význam bakteriocin měl původně stejnou definici jako kolicin – baktericidní protein, jehož vlastnostmi byly: úzké rozmezí aktivity a rovněž adsorpce na specifické receptory buněčného obalu bakterie. Další studie těchto látek prokázala, že bakteriociny grampozitivních bakterií nemají na buněčném obalu specifické receptory pro adsorpci. Jejich molekulární hmotnost je menší než u kolicinů a jejich způsoby ničení buněk se rovněž liší, což rozšiřuje jejich spektrum působení [1].

Začátky komerčního používání bakteriocinů za účelem konzervace potravin se datují od roku 1953. V tomto roce byl poprvé použit bakteriocin nisin, produkováný kmenem *Lactococcus lactis* [3, 40]. V roce 1988 získal nisin status GRAS od amerického Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Vývoj bakteriocinů jako konzervantů potravin a antimikrobních látek pokračuje až do 21. století [3]. Dnes je známo více než 230 bakteriocinů, které jsou produkovány BMK. Sto sedmáct z nich bylo identifikováno a podrobněji popsáno [25].

3.2 Charakterizace bakteriocinů

Bakteriociny produkované BMK se vyznačují svou biochemickou, genetickou, strukturní a metabolickou aktivitou. Jejich molekulová hmotnost je mnohdy v rozsahu od 2 kDA (kilodaltonů) do více než 30 kDA. Tyto molekuly jsou amfifilní, což znamená, že mají současně hydrofilní, tak hydrofobní vlastnosti [41]. Jsou většinou tolerantní k vysokým teplotám a působí v širokém rozmezí pH [32]. Nenarušují organoleptické vlastnosti potravin, jelikož nejsou nositeli barvy, chuti ani zápachu, což zvyšuje potenciál jejich využití v potravinářském průmyslu [3, 37]. Účinky antimikrobního působení těchto peptidů jsou efektivní již ve velmi nízkých koncentracích, často nanomolárních [42]. Aktivní jsou

vůči celé řadě potravinářských patogenů způsobujících alimentární onemocnění nebo bakteriím znehodnocujících potraviny [32]. Spektrum působení bakteriocinů závisí na původu cílových skupin mikroorganismů. Většinou je spektrum působení bakteriocinů relativně úzké a jejich antimikrobní účinek se projevuje vůči mikroorganismům taxonomicky blízkých jejich producentům [37]. Pokud bakteriociny inhibují bakterie, které nejsou příbuzné s produkčním kmenem, jsou považovány za bakteriociny širokospektrální [3, 32]. Antimikrobní aktivitu vůči cílovým mikroorganismům mohou projevovat bakteriostaticky, kdy bakteriociny pouze inhibují růst a množení bakterií, nebo baktericidně, kdy bakteriociny působí letálně na cílové buňky bakterií [37]. Obecně cílem působení bakteriocinů je cytoplazmatická membrána nebo buněčná stěna bakterií [42]. Bakteriální buňky produkující bakteriocin jsou odolné vůči jejich působení, na základě produkce specifických imunitních proteinů [3]. Díky proteinové povaze jsou bakteriociny hydrolyticky snadno degradovatelné pomocí proteolytických trávicích enzymů [3] pankreatické šťávy (trypsin, chymotrypsin) [32].

3.3 Srovnání bakteriocinů s antibiotiky

Antibiotika i bakteriociny mají stejnou vlastnost – obě tyto látky jsou antimikrobní. Existuje ale mezi nimi řada rozdílů. Příkladem je syntéza, kde na rozdíl od antibiotik jsou bakteriociny syntetizovány mikroorganismy ribosomálně v počáteční fázi růstu. Na syntéze antibiotik se podílí několik komplexů enzymů a jsou metabolity sekundárními. Spektrum působení je u bakteriocinů nižší ve srovnání s antibiotiky, díky antimikrobnímu účinku bakteriocinů na specifické kmeny bakterií spojené s druhy bakterií, které tyto látky produkují. Pro efektivní antimikrobní účinek bakteriociny působí při nižších koncentracích než v případě použití antibiotik. Dalším důležitým rozdílem je schopnost trávicích enzymů inaktivovat bakteriociny, které pak nemají vliv na přirozeně vyskytující se mikroorganismy v GIT člověka [3,29], Další rozdíly mezi bakteriociny a antibiotiky zobrazuje tabulka 1.

Tabulka 1: Porovnání bakteriocinů s antibiotiky [43].

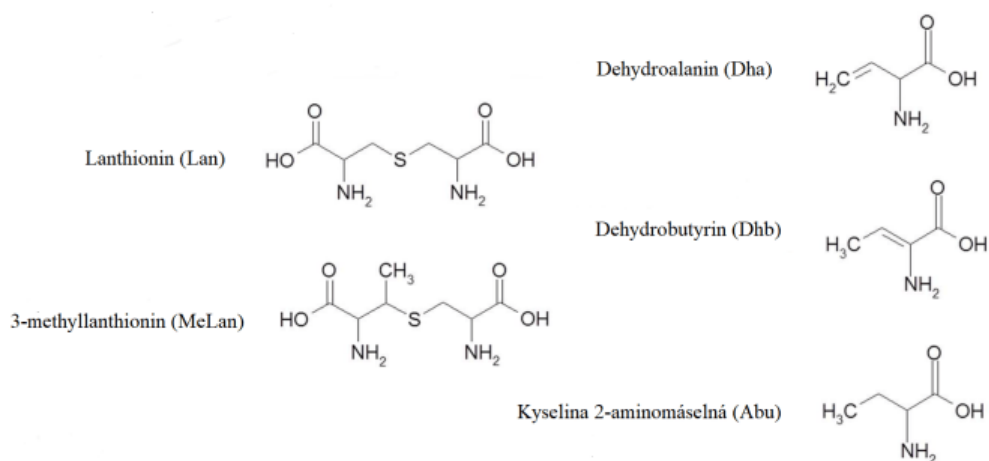
Charakterizace	Bakteriociny	Antibiotika
Aplikace	Potravinářství	Medicína
Syntéza	Ribosomální,	Polyenzymatické komplexy, sekundární metabolit
Aktivita	Úzké spektrum	Širší spektrum
Imunita hostitelských buněk	Ano	Ne
Mechanismus rezistence nebo tolerance cílových buněk	Obvykle adaptace ovlivňující složení buněčné membrány	Obvykle geneticky přenosný determinant ovlivňující různá místa v závislosti na způsobu působení
Mechanismus účinku	Tvorba pórů, inhibice biosyntézy buněčné stěny	Buněčná membrána nebo intracelulární cíle
Toxicita / vedlejší účinky	Nejsou známe	Ano

4 KLASIFIKACE BAKTERIOCINŮ BMK

Za posledních třicet let se klasifikace bakteriocinů měnila a byla revidována na základě výsledků rozsáhlých výzkumů molekulární struktury a mechanismu jejich účinku [44]. Obecně jsou bakteriociny rozděleny na dvě základní skupiny, a to bakteriociny G^+ bakterií a bakteriociny G^- bakterií [41]. V roce 1993 byly bakteriociny G^+ bakterií, včetně BMK, rozděleny Klaenhammerem do čtyř hlavních tříd na: lantibiotika, nízkomolekulární, vysokomolekulární a komplexní bakteriociny [37]. Klasifikace bakteriocinů je založená na jejich chemické struktuře, molekulové hmotnosti, posttranslačních modifikací a mechanismu účinků. Jednotlivé třídy jsou rozděleny na podtřídy [37].

4.1 Třída I.

První třídou jsou látky zvané lantibiotika. Z chemického hlediska jsou to polypeptidy obsahující neobvyklé aminokyseliny, jejichž výskyt je výsledkem posttranslačních modifikací molekuly zahrnující dehydrataci a cyklizaci specifických zbytků aminokyselin (AK) [30]. Obvyklý počet aminokyselin v peptidovém řetězci je v rozmezí 19 až 50 AK. Patří mezi ně charakteristické polycyklické thioetherové aminokyseliny, jako je lanthionin (Lan) nebo 3-methylalanthionin (MeLan). Dalšími AK lantibiotik jsou nenasycené AK, jako dehydroalanin (Dha), dehydrobutyrin (Dhb) a kyselina 2-aminomáselná (Abu) [1, 26, 44]. Bakteriociny první třídy produkované BMK jsou velmi malé a jejich molekulová hmotnost nepřesahuje 5 kDa [44]. Stabilní jsou vůči vysokým teplotám, širokému rozmezí pH a proteolýze. Tuto první třídu lze dále rozdělit na dvě podtřídy podle antimikrobní aktivity jednotlivých bakteriocinů a také na základě jejich chemické struktury na lantibiotika A a lantibiotika B [1, 30].



Obrázek 1: Strukturální vzorce neobvyklých aminokyselin I. třídy bakteriocinů gram pozitivních bakterií [30].

4.1.1 Lantibiotika A

Lantibiotika podtřídy A jsou lineární, kladně nabitě, polodlouhé a pružné molekuly, které svým prostorovým uspořádáním připomínají šroub. Jsou to amfipatické molekuly obsahující ve své struktuře polární (hydrofilní) a nepolární (hydrofobní) část [37]. Jsou to malé peptidy s molekulovou hmotností v rozmezí 2-4 kDA [44]. Do této podtřídy se řadí například **nisin** produkovaný *Lactococcus lactis*, **laktocin** produkovaný *Lactilactobacillus sakei*, **lakticin 481** produkovaný *Lactococcus lactis*, **enterocin W** produkovaný *Enterococcus faecalis*, **salivaricin A** produkovaný *Streptococcus salivarius* a **mutacin I** produkovaný *Streptococcus mutans* [1, 45, 46].

4.1.2 Lantibiotika B

Lantibiotika podtřídy B jsou na rozdíl od lantibiotik podtřídy A neohebné, globulární molekuly záporně nabitě nebo bez náboje a jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 2-3 kDA [37, 44]. Příklady těchto bakteriocinů jsou: **lakticin 3147** produkovaný *Lactobacillus lactis* a **cytolysin** jehož producentem je *Enterococcus faecalis* [46].

4.2 Třída II.

Největší skupinu bakteriocinů tvoří třída II. Do této třídy se řadí nízkomolekulární bakteriociny o velikosti do 10 kDA [1]. Na rozdíl od třídy I. nepodstupují posttranslační modifikace, ale pouze jednoduché modifikace, jako je cyklizace molekuly nebo tvorba

disulfidických můstků. Také neobsahují neobvyklé AK, jako lanthionin, a proto jsou označovány jako nelantibiotické bakteriociny [41, 47]. Definované jsou jako tepelně odolné, hydrofobní, nemodifikované peptidy s kladným nábojem [47]. Další charakteristikou této skupiny je vysoká hodnota izoelektrického bodu. Jsou membránově aktivní a jejich antimikrobní působení je účinné hlavně proti grampozitivním bakteriím s nízkým podílem guanino-cytosinových komplementárních páru (GC) v rámci jejich DNA (deoxyribonukleová kyselina). Dále působí i proti bakteriím rodu *Listeria* a *Clostridium*. Rozděleny jsou do čtyř hlavních podskupin: IIa, IIb, IIc a IId [37].

4.2.1 Podtřída IIa

První podskupinou podtřídy IIa jsou pediociny. Tyto bakteriociny produkované zástupci rodu *Pediococcus* a dalšími BMK se vyznačují silným antibakteriálním účinkem proti potravinovým patogenům. Jejich účinek je zejména směřován na bakterie rodu *Listeria* a *Staphylococcus*. Kromě těchto G⁺ bakterií projevují antimikrobní aktivitu i vůči některým G⁻ mikroorganismům, jako je *Pseudomonas* a *Escherichia coli* [32, 37]. Za příklady bakteriocinů podtřídy IIa lze uvést: **pediocin PA-1** (*Pediococcus acidilactici*), **pediocin AcH** (*Lactiplantibacillus plantarum*), **leukocin C** (*Leuconostoc mesenteroides*), **sakaciny A a P** (*Lactobacillus sakei*), **enterocin A** (*Enterococcus faecalis*), **enterocin P** (*Enterococcus faecium*), **barvicin A** (*Lactilactobacillus sakei*) a **barvicin MN** (*Lactilactobacillus sakei*) [1, 30, 41, 46, 47]. Způsob účinku těchto bakteriocinů je díky schopnostem permeabilizace buněčné membrány citlivých druhů buněk. Díky jejich fyzikálně-chemickým vlastnostem a silnému antimikrobnímu účinku je tato podskupina nejvíce zkoumaná ze všech skupin a podskupin [37]. Popsáno bylo v této podskupině více než 50 jednotlivých bakteriocinů [41].

4.2.2 Podtřída IIb

Do druhé podskupiny patří dvoupeptidové bakteriociny, které vyžadují přítomnost dvou samostatných, navzájem doplňujících se peptidů působících synergicky pro vytvoření antimikrobního účinku [1, 44]. Samostatně peptidy neprojevují žádnou nebo pouze zanedbatelnou antimikrobní aktivitu [47]. Účinek dvojice komplementárních peptidů je v nanomolárním až pikomolárním rozsahu. Jednotlivé bakteriociny třídy IIb obsahují zároveň hydrofobní a hydrofilní oblast a většinou jsou to látky s kladným nábojem [47]. První bakteriocin izolovaný z BMK, který obsahoval dva peptidy, byl **laktocin 705**. Producentem tohoto bakteriocinu je *Lactilactobacillus curvatus*. Dalšími zástupci této

podtřídy jsou **laktacin F** (*Lactobacillus acidophilus*), **laktokokcin G a M** (*Lactococcus lactis*), **enterocin 1071** (*Enterococcus faecalis*), **enterocin X** (*Enterococcus faecium*), **enterocin L50** (*Enterococcus faecium*), **plantariciny EF a JK** (*Lactiplantibacillus plantarum*) [1, 3, 41, 46].

4.2.3 Podtřída IIc

V podtřídě IIc jsou seskupeny malé bakteriociny s globulární strukturou, díky níž získávají odolnost vůči působení některých proteáz a peptidáz mnohem více než jiné podskupiny [37]. Tato podskupina zahrnuje: **laktokokcin A** (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), **divergicin A** (*Carnobacterium divergens*), **acidocin B** (*Lactobacillus acidophilus*) [30] **karnocyklin A** (*Carnobacterium maltaromaticum*), **reuterin 6** (*Limosilactobacillus reuteri*) [3, 41] **enterocin P a B** (*Enterococcus*), **garvicin ML** (*Lactococcus garvieae*) [1, 41] a **gasericin A** (*Lactobacillus gasseri*) [46].

4.2.4 Podtřída IIId

Tato podtřída shromažďuje všechny bakteriociny, které nebyly zahrnuty do výše uvedených podskupin. Od ostatních se významně liší svou molekulární strukturou a mechanismy sekrece a působení jiných nelantibiotických bakteriocinů [30, 37].

4.3 Třída III.

Na rozdíl od první a druhé třídy, jsou ve třetí třídě shromážděny velké antimikrobní peptidy označovány jako vysokomolekulární, podle jejich molekulové hmotnosti přesahující až 30 kDA. Tyto velké peptidy jsou labilní vůči vysokým teplotám a jsou buď lytické nebo nelytické [30]. Producenty bakteriocinů III. třídy jsou BMK rodu *Lactobacillus* a *Enterococcus* a mezi příklady lze uvést: **helveticiny J a V** produkované *Lactobacillus helveticus* [44], **enterolysin A** (*Enterococcus faecalis*) **zoocin A** (*Streptococcus equi*), [26, 30, 37]. **lakticin A** (*Lactobacillus delbrueckii*), **acidophilucin A** (*Lactobacillus acidophilus*) [46]. Dalším příkladem je **helveticin M** syntetizovaný *Lactobacillus crispatus* [26]. Tato třída bakteriocinů je nejméně známou a charakterizovanou skupinou, proto mechanismus jejich účinku nebyl doposud plně popsán [47]. Některé zdroje tuto skupinu nezahrnují do klasifikace bakteriocinů rozdělující tyto látky na čtyři třídy a je řazena samostatně jako bakteriolyliny [44].

4.4 Třída IV.

Čtvrtá třída bakteriocinů jsou specifické molekuly skládající z proteinové části, tvořící komplexy s jinými makromolekulami, jako jsou lipidy nebo sacharidy [47]. Přítomnost lipidové nebo sacharidové skupiny tyto bakteriociny vyžadují k dosažení plné antibakteriální aktivity [37]. Příklady těchto komplexních bakteriocinů jsou **plantaricin S** (*Lactiplantibacillus plantarum*) nebo **leuconocin S** (*Leuconostoc paramesenteroides*) [30].

5 BIOSYNTÉZA BAKTERIOCINŮ

Schopnost syntézy bakteriocinů využívají některé kmeny bakterií mléčného kvašení v souvislosti s nedostatkem živin. Ten může být způsobený nárůstem populace soupeřící o stejné podmínky. Z toho důvodu jsou antimikrobní účinky bakteriocinů často zaměřeny na kmeny příbuzné bakteriálním buňkám produkujícím bakteriociny. Syntéza antimikrobních peptidů probíhá během nebo na konci fáze exponenciálního růstu [41, 47]. V této fázi dochází ke zvýšení nárůstu biomasy a s ní spojenou produkcí specifických peptidů, neboli autoindukčních peptidů. Jejich funkcí je aktivace genové exprese pro biosyntézu bakteriocinů [41].

Obecně jsou bakteriociny syntetizovány jako neaktivní formy peptidu neboli pre-peptidy obsahující N-terminální vedoucí konec, kde peptid končí $-NH_2$ skupinou a C-terminální konec, kde je peptid ukončen karboxylovou skupinou $-COOH$ [47]. Tyto prekursory bakteriocinů jsou posttranslačně modifikovány a dochází ke štěpení N-terminální vedoucího peptidu proteolytickými enzymy přítomnými v cytoplazmě. Výsledkem je aktivní bakteriocin, který je uvolněný mimo produkční buňku [26, 41, 45, 46]. Extracelulární transport bakteriocinů je prostředkován transportními ABC (ATP Binding Cassette) proteiny, které přenášejí aktivní bakteriocin přes cytoplasmatickou membránu za spotřeby ATP [45].

5.1 Geny pro syntézu bakteriocinů

Geny, které kódují produkci bakteriocinů a jejich imunitu jsou obvykle organizovány v operonových shlucích umístěných na chromozomech nebo na plazmidech [3]. V případě, že buňka produkuje více než jeden bakteriocin, mohou být geny kódovány jak plazmidem, tak současně chromozomem [47]. Hlavní geny podílející se na biosyntéze bakteriocinů jsou [3, 41]:

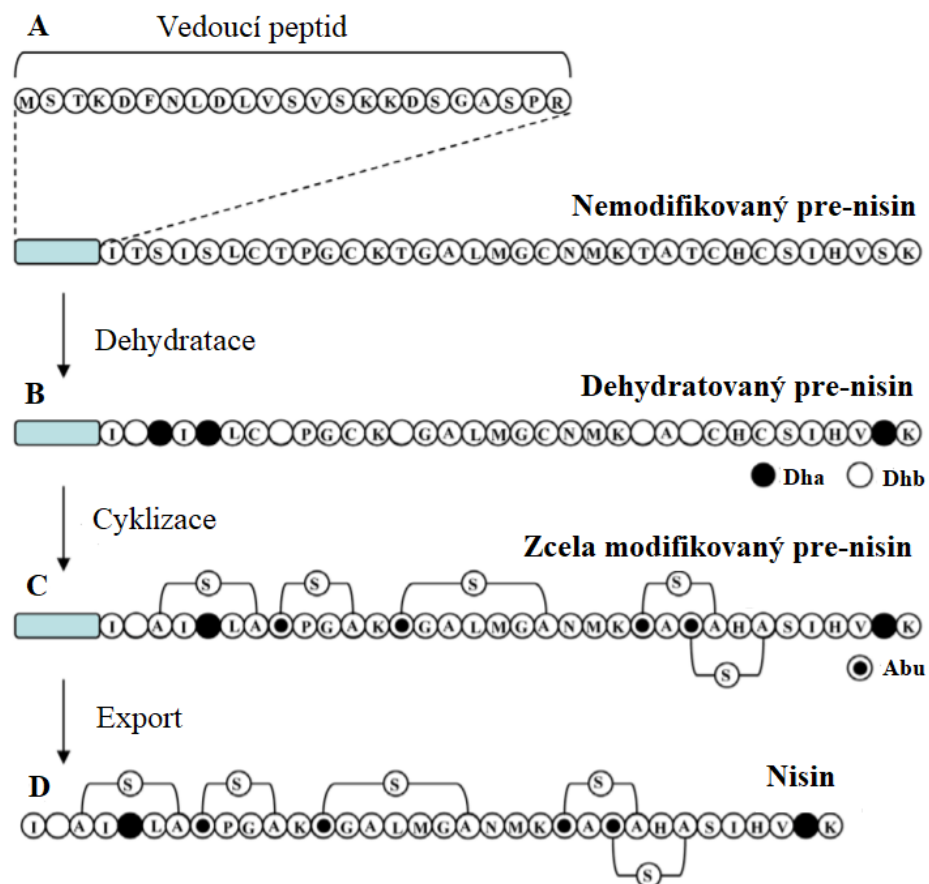
- 1) strukturální geny, které jsou zodpovědné za produkci biologicky neaktivního peptidu takzvaného pre-peptidu,
- 2) gen pro vytvoření specifické imunity, která chrání buňky před antimikrobním účinkem bakteriocinů,
- 3) gen kódující proteiny ABC transportéru, který je zodpovědný za vyloučení buněk mimo produkční buňku,
- 4) gen kódující doplňkový protein pro tento proces.

5.2 Biosyntéza lantibiotik

Lantibiotika jsou podskupinou lanthiopeptidů, které jsou obecně charakterizovány přítomností specifických aminokyselin, jako je lanthionin nebo 3-methylanthionin [48] vznikajících v posttranslačních modifikacích molekuly [46]. V molekule obsahují bakteriociny I. třídy kovalentní thioetherové můstky, které jsou rovněž výsledkem posttranslačních modifikací, kdy dochází k dehydrataci AK Ser a Thr na Dha nebo Dhb pomocí enzymu dehydratázy [48]. Thioetherové vazby vedou k vytvoření vnitřních kruhů v molekule, které dávají lantibiotickým bakteriocinům cyklickou strukturu zvyšující biologickou aktivitu a odolnost vůči proteolýze [46]. Po dehydrataci následuje enzymatická stereoselektivní adice thiolu z AK Cys na nenasycenou aminokyselinu [48]. Výsledkem je thioetherová vazba v polypeptidovém řetězci lantibiotického bakteriocinu [46]. Právě díky těmto posttranslačním modifikacím je proces biosyntézy bakteriocinů I. třídy složitější, než je tomu u jiných nelantibiotických bakteriocinů [45]. U této skupiny dojde ke změně struktury bakteriocinu účinkem dvou enzymů - dehydratáza, cykláza. Molekula bakteriocinů tak může získat podobu lineárního peptidu, který je zařazen do podskupiny lantibiotik A. Peptidy s konečnou globulární podobou se řadí do podskupiny lantibiotik B [48].

5.2.1 Biosyntéza nisinu

Biosyntézu lantibiotik, neboli bakteriocinů I. třídy, lze popsat nisinem, který je typickým lantibiotickým bakteriocinem produkovaným BMK (*Lactococcus lactis*) [47]. Nisin je produkovaný ribosomálně ze strukturálního genu nisinu A jako pre-nisin A, který obsahuje ve své molekule 57 aminokyselin (Obr. 2A). Následně je molekula podrobena posttranslačním úpravám pomocí genů nisB a nisC. Tyto úpravy zahrnují dehydrataci aminokyselin Ser a Thr na Dha a Dhb (Obr. 2B). Cyklizace molekuly vede k vytvoření několik thioetherových můstků (S). Můstky jsou tvořeny mezi AK alaninem (Ala) a alaninem, kdy dochází ke tvorbě specifické aminokyseliny lanthioninu. Aminokyselina 3-methylanthionin je pak výsledkem tvorby thioetherových můstků mezi AK Ala a kyselinou aminomáselnou (Obr. 2C). Při transportu nisinu mimo buňku je štěpen N-terminální konec pre-nisinu pomocí genů nisT a nisP. Před štěpením obsahuje pre-nisin 23 AK. Výsledkem je aktivní forma nisinu A s obsahem 34 AK (Obr. 2D). Regulace genové exprese u nisinu je zajištěná dvousložkovým regulačním systémem, kde nisin působí jako autoinduktor [45, 47, 49].



Obrázek 2: Modifikace pre-nisinu [49].

5.3 Biosyntéza nelantibiotik

Obecně biosyntéza nelantibiotických bakteriocinů probíhá podobným způsobem s menšími rozdíly. U této skupiny bakteriocinů nedochází k začlenění neobvyklých aminokyselin do molekuly a žádným specializovaným posttranslačním úpravám, než štěpení pre-peptidu, zrání a export aktivního bakteriocinu mimo produkční buňku pomocí ABC transportéru. [30, 47, 50, 51].

U téměř všech bakteriocinů II třídy je pre-peptid složen z N-terminální vedoucí oblasti, kde dochází k jeho štěpení. Toto místo je složeno ze dvou glycinových částí (GG) [50]. Transportní proteiny ABC pomáhají rozpoznávat vedoucí peptidy typu GG a během transmembránové translokace tuto sekvenci odstraňují a vylučují plně aktivní bakteriocin [45]. Výjimkou jsou bakteriociny třídy IIc, které obsahují specifickou signální sekvenci (sec-systém) v N-terminální oblasti a jejich vyloučení z buňky přes cytoplasmatickou membránu probíhá pomocí sekreční dráhy [50].

5.3.1 Biosyntéza pediocinu

Příkladem pro biosyntézu bakteriocinů II třídy je pediocin PA-1 produkovaný bakterií *Pediococcus acidilactici*, který obsahuje 44 AK a jeho molekulová hmotnost je 4,6 kDa. Na produkci pediocinu se podílejí geny lokalizované v pediocinovém operónu [46]. Expese pediocinu je na rozdíl od nisinu regulovaná třísložkovým regulačním systémem [51]. U pediocinu se odstraní vedoucí peptid obsahující 18 až 24 AK a vyloučí se mimo buňku pomocí ABC transportéru a doplňkovými proteiny. Na rozdíl od jiných prekursorů bakteriocinů vykazuje prekursor pediocinu biologickou aktivitu. Aby se zabránilo antimikrobním účinkům na produkční buňku je pediocin po syntéze rychle transportován mimo buňku [51].

5.4 Regulace biosyntézy bakteriocinů

Genová expese a syntéza bakteriocinů je zprostředkována vícesložkovými regulačními systémy. Zpravidla jde o dvousložkový nebo třísložkový regulační systém [26], který zahrnuje: 1) autoindukční peptid (pouze třísložkový systém), 2) receptor vázaný na povrch buňky, 3) regulátor [45]. V exponenciální fázi růstu buněk dochází k dosažení prahové koncentrace autoindukčních peptidů, ty se následně vážou na receptor transmembránového enzymu histidinkinasy, který je součástí regulačního systému bakteriální buňky. Výsledkem autofosforylace histidinového zbytku je málo stabilní sloučenina a fosfátová skupina je přenesena na regulátor. Fosforylací regulátoru dojde k aktivaci expese genů pro syntézu bakteriocinů [41].

5.5 Imunita produkčních buněk

Bakteriální kmeny produkující bakteriociny se musí chránit před jejich baktericidní aktivitou. Proto si produkční kmeny vytvořily obranný imunitní systém, který se skládá ze dvou různých složek: transportní transmembránový systém a imunitní gen. V několika případech, třeba u nisinu, tyto složky fungují synergicky [48]. Imunitní geny jsou proteinové povahy a obsahují od 51 až do 150 AK a rozdíly v přítomnosti a expresi těchto genů má vliv na citlivost produkčních buněk na bakteriociny. Imunita BMK závisí na imunitním proteinu, který zůstává vázaný na vnější stranu cytoplasmatické membrány bakteriální buňky a chrání buňku vyplněním pórů na membráně způsobených účinkem bakteriocinu. Následuje regulace bakteriocinů na povrchu buňky pomocí transportního systému [45].

6 MECHANISMUS PŮSOBENÍ BAKTERIOCINŮ

Citlivost buněk na účinek bakteriocinů závisí na chemickém složení buněčné stěny a koncentraci a aktivitě bakteriocinu, kdy může nastat baktericidní účinek vedoucí k buněčné smrti nebo účinek bakteriostatický kdy dojde i inhibici růstu buněk. Rychlá smrt cílových buněk může nastat i při nízkých koncentracích bakteriocinu, pokud buňka vykazuje vysokou citlivost na jeho baktericidní účinky. Dalšími parametry určující citlivost buněk na antimikrobní účinky bakteriocinu je fáze růstu a podmínky prostředí jako: teplota, pH nebo přítomnost dalších antimikrobních sloučenin [32, 41].

Mechanismy účinku bakteriocinů grampozitivních bakterií se mohou lišit u jednotlivých skupin. Po průchodu bakteriocinu buněčnou stěnou některé bakteriociny směřují své účinky na lipid II, který je prekurzorem peptidoglykanu v buněčné stěně a inhibují tak jeho syntézu. Další bakteriociny používají lipid II nebo systém manosa-fosfotransferázy pro usnadnění tvorby pórů v buněčné stěně a narušení protonového gradientu cytoplasmatické membrány, který se podílí na přenosu iontů, metabolitů a syntéze ATP, a dochází k buněčné smrti [32, 41].

6.1 Mechanismus účinku lantibiotik

U bakteriocinů I. třídy neboli lantibiotik jsou známy dva způsoby mechanismu účinku [49]. Prvním způsobem je inhibice syntézy buněčné stěny a je obvyklý při nižších koncentracích bakteriocinů. Druhý způsob je naopak obvyklý při vyšších koncentracích bakteriocinu, kdy dochází k vytvoření pórů a vypuštění obsahu buňky do vnějšího prostředí. Nejvíce prozkoumaným bakteriocinem této třídy je nisin, který využívá oba mechanismy účinku [32, 41, 45].

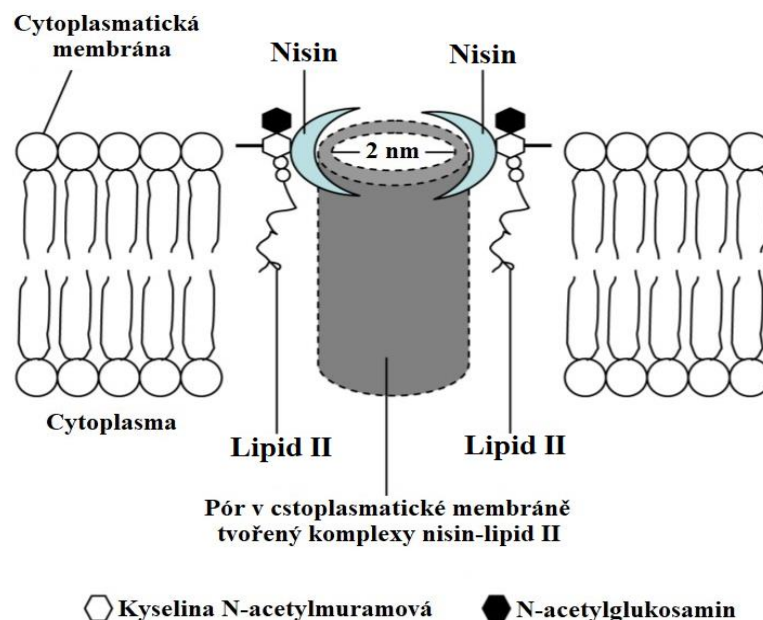
6.1.1 Inhibice syntézy buněčné stěny

Buněčnou stěnu grampozitivních bakterií tvoří silná vrstva peptidoglykanu neboli mureinu. Peptidoglykan je složený z aminosacharidových podjednotek (kyselina N-acetylmuramová a N-acetylglukosaminu). Kromě toho obsahuje aniontové složky, jako je kyselina teichoová, kyselina teichuronová a kyselina lipoteichoová. Další záporně nabitě molekuly v buněčné stěně grampozitivních bakteriálních buněk jsou kyselé polysacharidy nebo fosfolipidy. Nisin je kladně nabitá molekula schopen snadně difundovat přes tuto membránu prostřednictvím hydrofobních nebo elektrostatických interakcí s těmito aniontovými složkami. Následuje připojení bakteriocinu k lipidu II, který je prekursorem syntézy buněčné

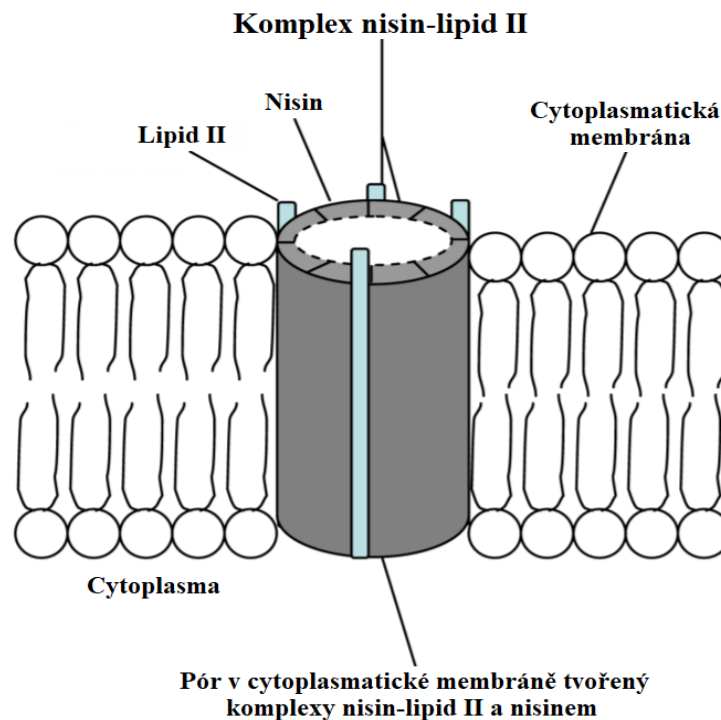
stěny. Funkcí lipidu II. je přenos peptidoglykanového monomeru z cytoplasmy bakteriální buňky a jeho začlenění do rostoucí sítě peptidoglykanů v buněčné stěně. Interakcí nisinu s lipidem II je zastavena jeho aktivita a dojde k inhibici syntézy peptidoglykanu buněčné stěny bakterií [45, 49].

6.1.2 Permeabilizace cytoplasmatické membrány

Druhý způsob je obdobný jako při inhibici syntézy buněčné stěny, kdy dojde k průniku nisinu skrz buněčnou stěnu. Následuje interakce N-konce bakteriocinu se sacharid-polyfosfátovou částí lipidu II. Po shromáždění několik komplexů nisin-lipid II dojde k proniknutí C-konce bakteriocinu do buněčné membrány a vytvoření pórů o průměru cca 2 nanometrů (Obr. 3). Některé zdroje uvádí, že tyto póry mohou být tvořeny čtyřmi komplexy nisin-lipid II. a čtyřmi molekulami nisinu (Obr. 4). Póry vytvořené v buněčné membráně zvýší její permeabilitu, které může vést k rozptýlení membránového potenciálu. Únikem malého množství cytoplasmatického obsahu, jako jsou AK, nukleotidy a ionty. Dochází rovněž k poškození životně důležitých funkcí, jako inhibice komplexu ATP-syntázy. V důsledku toho mikroorganismus není schopen produkce energie ve formě ATP, která je pro mikroorganismus důležitá. Dochází k takovému poškození bakteriální buňky, že nastane usmrcení bakteriální buňky [30, 45, 49]



Obrázek 3: Tvorba póru v cytoplasmatické membráně pomocí komplexu nisin-lipid II [49].



Obrázek 4: Tvorba póru v cytoplasmatické membráně pomocí komplexu nisin-lipid II a nisinu [49]

6.2 Mechanismus účinku nelantibiotik

Mechanismus bakteriocinů II. třídy je založen na depolarizaci buněčné membrány cílových bakteriálních buněk a následně tvorbou pórů v cytoplasmatické membráně [45]. Nelantibiotika se vážou prostřednictvím receptoru na povrch membrány bakteriální buňky [44]. Receptorem pro připojení bakteriocinu na membránu je komplex manosa-fosfotransferáza. Ten zodpovídá za přenos a fosforylaci sacharidu manosy. Působením bakteriocinu dochází k narušení jeho funkce [41]. Hydrofóbní fragmenty C-koncové části antimikrobního peptidu integrují s fosfolipidovými řetězci v cytoplasmatické membráně. Hydrofóbní interakce mezi C-terminální částí molekuly bakteriocinu a fosfolipidy membrány vedou k vytvoření pórů. Následně dochází k úniku malého obsahu cytoplasmy mimo bakteriální buňku. Narušení gradientu pH po obou stranách membrány nebo membránového potenciálu dochází k blokaci syntézy ATP. Antimikrobní účinek bakteriocinů třídy II, včetně pediocinu je tedy způsoben především iontovou nerovnováhou a ztrátou části cytoplasmatického obsahu [44].

Komplex manosa-fosfotransferáza je komplexní enzym zodpovědný za absorpci glukosy a její fosforylaci. Každý tento komplex je složen ze čtyř podjednotek: IIA, IIB, IIC a IID.

Podjednotky IIC a IID jsou umístěny na vnější straně cytoplasmatické membrány. Pro většinu bakteriocinů třídy II. je specifickým vazebným místem podjednotka IIC komplexu manosa-fosfotransferázy. Některé nelantibiotika jsou schopny integrace s oběma podjednotkami IIC a IID. Příkladem je laktokokcin podtřídy IIc [44]. U podtřídy IIb je podmínkou k dosažení účinné antimikrobiální aktivity synergický účinek dvou peptidů bakteriocinů, patřícího do této podtřídy [45].

7 VYUŽITÍ BAKTERIOCINŮ V POTRAVINÁŘSTVÍ

Bakteriociny mají obecně velké využití v různých odvětvích. V této kapitole je využití bakteriocinů představeno především v potravinářském průmyslu [45]. Obecně jsou bakterie mléčného kvašení producenty mocha látek s antimikrobními účinky vůči patogenním a znehodnocujícím mikroorganismům v potravinách. Ze všech metabolitů si ale antimikrobní peptidy získaly největší pozornost pro potencionální uplatnění jako přírodní konzervačních látek [3]. Jejich použití jako bioprezervačních látek přináší mnoho výhod [52]. Jednou z nich je dlouholetá tradice používání kmenů BMK v potravinářství a s tím spojená konzumace jejich metabolitů už po tisíciletí prostřednictvím fermentovaných potravin [53]. Velkou výhodou je to, že jsou považovány za bezpečné a mají status QPS (Kvalifikovaný předpoklad bezpečnosti), bezpečnosti deklarovaný Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA). Dále mají status GRAS (Všeobecně považovaný za bezpečný) přidělený Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Dalším benefitem působení na cílové buňky i v nanomolárních koncentracích. Mezi další výhody patří: prodloužení trvanlivosti potravin, ochrana před ekonomickou ztrátou v důsledku znehodnocení potravin a uchování živin, vitamínů, chuti a vůně potravin. Dále uspokojení požadavků spotřebitele na omezení chemicky syntetizovaných konzervačních látek a jejich stabilita vůči širokému rozmezí pH a teploty [45] a proteolytická inaktivace trávicími enzymy [3]. Výzkumy se proto čím dál tím více zaměřují na studie těchto bioaktivních peptidů a jejich aplikací v potravinářské sféře. Potenciál uplatnění mají zejména u mléčných (sýry, smetana), vaječných (majonézové pomazánky), zeleninových a masných výrobků [52, 54]. Také u ryb, alkoholických nápojů a fermentovaných výrobků [32].

Aplikace bakteriocinů do potravin je možná několika způsoby [41]. Jeden ze způsobů je přímá aplikace čisté nebo částečně purifikované formy bakteriocinu. Aktivita těchto bakteriocinů v potravinách je ovlivněná rozpustností a distribucí bakteriocinu v potravině, inaktivaci bakteriocinu některou ze složek potravin nebo jinými přidanými látkami [45, 50, 52]. Účinné je rovněž začlenění antimikrobních peptidů do potravin prostřednictvím inokulace kmene produkujícího bakteriocin. Lze je aplikovat použitím produktu, který byl dříve fermentován kmenem produkujícím bakteriocin [54]. Kultury produkující bakteriocin používané jako startovací kultury nebo jako doplňkové kultury slouží dvojímu účelu. Fermentačními procesy přispívají k chuti kysaných výrobků a současně zajišťují jejich bezpečnost. Celkově je tato metoda efektivní a nákladově příznivější, než použití čistého peptidu [53]. Dalšími možnými způsoby je aplikace bakteriocinů do obalových fólií, jedlých

filmů, nebo na povrch potraviny ponořením potraviny do roztoku bakteriocinů [41]. Všechny způsoby aplikace bakteriocinů lze použít samostatně, nebo v kombinaci s dalšími konzervačními látkami nebo metodami, což je známo jako překážková konzervace, díky které lze rozšířit antimikrobní spektrum působení [32, 41].

Aby bakteriocin mohl být použit ke konzervaci potravin, je zapotřebí aby splňoval kritéria, která tuto aplikaci umožňují. Nejdůležitějším parametrem je zdravotní nezávadnost pro spotřebitele a neškodnost pro jeho střevní mikrobiotu. Dalšími kritérii pro použití bakteriocinů je účinnost proti patogenním a znehodnocujícím mikroorganismům, odolnost vůči interakci antimikrobního peptidu se složkami přítomnými v potravine (enzymy, lipidy) a tepelná stabilita bakteriocinu a antimikrobiální aktivita v širokém rozmezí pH a koncentraci solí [50].

7.1 Přímá aplikace bakteriocinů do potravin

Přímá aplikace bakteriocinu do potravin je dalším způsobem, jak snížit riziko výskytu znehodnocujících bakterií a alimentárních onemocnění [56]. Tyto metabolity BMK lze přidat do potravin jako purifikované nebo semipurifikované bakteriociny nejčastěji ve formě prášku. Nevýhodou použití práškové formy představuje skutečnost, že se bakteriociny mohou vázat na lipidy nebo jiné proteinové částice obsažené v potravine. Aby tomu bylo zabráněno, lze některé bakteriociny použít ve formě peptidového roztoku [45]. Purifikace bakteriocinu ale může být finančně nákladnější. Kromě toho je Evropská legislativa přísná pro získání povolení na použití jako potravinové přídatné látky za účelem potravin [46]. Vědci se pomocí rozsáhlých studií antimikrobních peptidů mikroorganismů snaží tento problém překonat. Bioinženýrské výzkumy jsou zaměřeny na zkoumání nových bakteriocinů a jejich aplikace. Kromě toho se tyto studie zaměřují k překonání současných problémů používání bakteriocinů jako biokonzervačních látek. Snahou je zvýšení aktivity, rozšíření spektra mikrobiální aktivity bakteriocinů a zrychlení jejich uvolnění do potravin. Slibným přístupem v této oblasti je molekulární inženýrství zahrnující modifikace a manipulace s aminokyselinovými sekvencemi bakteriocinu [39]. Genetická manipulace bakteriocinů nebo produkčních kmenů musí projít přísnými bezpečnostními předpisy a normami stanovenými národními regulačními agenturami, jako je FDA, aby modifikované bakteriociny mohly být použity k lidské spotřebě [50].

Konvenční metody purifikace bakteriocinů zahrnují srážení síranem amonným, membránová filtrace a techniky zahrnující chromatografii (chromatografie na měničích iontů,

gelová nebo kapalinová chromatografie). Obecně jsou tyto konvenční metody pracné vzhledem k tomu, že sestávají z vícestupňových operací, které jsou nákladné, časově náročné, produkuje nízký výtěžek a nejsou účinné pro požadavky průmyslového měřítka. Navíc nízké úrovně výtěžnosti konvenčních metod vedou k významné ztrátě cílového produktu. Dnes jsou již známé alternativní metody, jejichž cílem je získání vysokého výtěžku bakteriocinů a s tím spojené i menší náklady [56]. Komerčně dostupné bakteriociny v purifikované formě, které lze použít za účelem konzervace potravin jsou pouze nisin a pediocin PA-1. Další slibné perspektivy v konzervaci potravin představuje enterocin AS-48 a lakticin 3147 [25, 32].

7.1.1 Nisin

Nisin je významný bakteriocin produkovaný kmeny bakterií mléčného kvašení *Lactococcus lactis* [4]. Nisin obsahuje z 34 AK a jeho molekulová hmotnost je 3,5 kDA. Existuje ve dvou variantách, které se liší obsahem jiných aminokyselin. Varianta A obsahuje AK histidin a varianta Z obsahuje asparagin [29, 56]. Identifikován byl v roce 1928 z fermentovaných mléčných kultur a v roce 1953 byl v Anglii poprvé prodán jako konzervační prostředek [40]. V roce 1988 dostal povolení americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro použití v syrové pomazánce. Schválen byl i Světovou zdravotnickou organizací (WHO) a nyní se jako konzervační látka používá ve více než 50 zemích ve variantě přírodního nisinu nebo ve formě biologicky upraven [40, 56]. Jako přírodní se označuje nisin, který byl extrahován z kmenů *Lactococcus* nebo *Streptococcus* bez modifikace genu, zatímco biologicky upravená nisinová varianta je odvozena od geneticky modifikovaných kmenů *Lactococcus* nebo *Streptococcus*, pro zvýšení jejich inhibičních účinků proti grampozitivním i gramnegativním mikroorganismům [40].

Antimikrobní účinky nisinu jsou zaměřeny vůči mnoha skupinám grampozitivních bakterií, jako je *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus* spp., *Clostridium botulinum*, *Pediococcus* spp., *S. aureus*, *Enterococcus* spp. atd. V kombinaci s jinými antimikrobními látkami působí i vůči mikroorganismům G⁻ [4, 40]. Purifikovaná forma nisinu je dostupná pod komerčním názvem Nisaplin®. Ten je rozpustný ve vodě a stabilní vůči kyselému pH a vysokým teplotám. Nisaplin® obsahuje 2,5 % nisinu a baktericidní účinek vykazuje proti mnoha důležitým grampozitivním patogenům, jako *Bacillus cereus* a *Listeria monocytogenes* [4, 29, 32, 39]. Používá se samostatně nebo v kombinaci s jinými antimikrobními látkami především do mléčných výrobků k potlačení růstu sporulujících mikroorganismů, jako je *Clostridium* a *Bacillus*. Ve víně a pivu zabraňuje výskytu bakterií

rodu *Lactobacillus* [4, 29]. Bezpečná dávka nisinu pro člověka je do 83,25 mg na 1kg váhy. [40].

Kromě potravinářství je nisin využíván v medicíně při léčení infekčních onemocnění způsobených bakteriemi. Aplikace nisinu při kožních infekcích způsobených *S. aureus* je zprostředkována pomocí obvazů na rány z nanovláken, obsahující tento bakteriocin. Další uplatnění antimikrobních vlastností nisinu je v medicíně využito při inhibici bakterií rodu *Clostridium*, způsobující průjem a zánět tlustého střeva nebo infekcích. Využíván je rovněž v zubním lékařství při inhibici patogenů způsobujících zubní kaz [40].

7.1.2 Pediocin

Pediociny AcH a PA-1 jsou bakteriocin produkovaný kmeny *Pediococcus acidilactici*. Pediocin PA-1 je schváleným bakteriocinem používaným v potravinářství pod komerčním názvem Alto®2341 [4]. Antimikrobní účinek pediocinu zahrnuje bakterie kazící potraviny i patogeny včetně *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* a *Clostridium perfringens* [4]. Využívá se v mlékárenském průmyslu díky stabilitě v širokém rozsahu pH a odolnosti vůči vysokým teplotám nebo mrazu, ke snížení výskytu listeriózy [32]. Aplikace pediocinu je možná rovněž u sušených a fermentovaných masných výrobků, rybích filé nebo kuřecího masa, kde rovněž působí proti bakteriím *L. monocytogenes*. Používá se jako ochrana před *Loigolactobacillus bif fermentans* v salátových dresincích [40].

7.2 Aplikace kmenu schopného produkce bakteriocinů

Pro bioprezervaci potravin představuje vhodnou metodou aplikace bakteriocinů inokulace kmenu schopného syntézy antimikrobních peptidů [57]. Produkující kmeny by měly splňovat podmínky bezpečnosti garantované uděleným statusem GRAS nebo QPS (Kvalifikovaný předpoklad bezpečnosti). Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) udělil status QPS většině rodů BMK, jako jsou *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a některé rody *Streptococcus*. Druhy rodu *Enterococcus* a některé *Streptococcus* tento status nemají [32]. Zaočkováním startérových kultur produkujících bakteriocin do produktu je docíleno fermentace produktu a zvýšení jeho mikrobiologické stability [12]. Jako příklady lze uvést Bactoferm™, který obsahuje kmeny produkující pediocin a sakacin. Tento startér je používán při výrobě fermentovaných klobás a sušeného masa [53]. Pro biologickou konzervaci sýrů se používá *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BS-10, který je producentem nisinu má ochrannou známku BioSafe™ [39]. Ochranné kultury HOLDBAC® obsahující směs kmenů používaných k ochraně

mořských plodů, masa a mléčných výrobků před bakterií *Listeria*, kvasinkami a plísněmi. Micocin® je speciálně navržená ochranná kultura s aktivitou proti patogenním mikroorganismům vyskytujících se v masných výrobcích připravených k přímé spotřebě. Tato kultura je schválena pro použití v USA (Spojené státy americké) a Kanadě. Obsahuje *Carnobacterium maltoaromaticum*, který je producentem carnocyclinu A, který je účinný proti *L. monocytogenes* [53]. Riziko, spojené s aplikací kultur produkujících bakteriociny může v některých případech představovat inhibici kmenů, požadovaných pro fermentaci. Výhodou je ale řízení výskytu náhodné mikroflóry nestarterových BMK ve výrobku a tím zvýšení kontroly nad fermentačním procesem [57].

7.3 Bioaktivní potravinové obaly

Bakteriociny lze rovněž aplikovat pomocí bioaktivních potravinových obalů [54]. Ty nejen chrání potraviny před vnějšími vlivy, ale obecně prodlouží dobu skladování a bezpečnost potravin omezením růstu mikroorganismů způsobujících kažení. [45]. Přispívají rovněž k potlačení patogenních bakterií, které jsou příčinou alimentárních onemocnění [32]. Existuje několik způsobů, jak připravit bioaktivní obaly obsahující tyto látky. Jedním z nich je přímé přenesení antimikrobního peptidu na obal potravin. [54]. Tento způsob využívá tepelné lisy, které bakteriocin zapracují do polymerových fólií splňujících požadavky na obalové materiály určených k potravinářským účelům. Ty jsou zpravidla vyrobené z polyethylenu, ethylenvinylacetátu, propylenu nebo polyesteru. Aplikace bioaktivních peptidů je možná i do jedlých filmů vyráběných z celulózy a jiných biopolymerů aplikovaných na povrch potravin. Dalším způsobem ochrany potravin pomocí bakteriocinů jsou antimikrobní povlaky obsahující bakteriocinové přípravky nebo produkční kmeny [39, 41, 45, 54].

Bioaktivní obaly přinášejí mikrobiologickou stabilitu produktu a minimální ošetření výrobku. Tím může být uspokojena poptávka spotřebitelů, kteří vyhledávají potraviny bez přidaných látek [45, 55]. U potravin, které jsou ve styku s bioaktivním obalem dochází k interakci potravin s antimikrobními peptidy obalových materiálů. Tím je dosaženo postupného uvolňování bakteriocinu na povrch potravin prostřednictvím difuzních jevů. To je považováno za výhodu oproti jiným metodám interakce potravin s bakteriociny jako antimikrobní postřiky aplikované na potraviny nebo máčení výrobku v roztoku obsahující bakteriociny. Při aplikaci bakteriocinů do obalů nedochází k ředění bakteriocinů a tím i snižování jeho aktivity [39].

7.4 Využití bakteriocinů při konzervaci potravin

7.4.1. Mlékárenský průmysl

V mlékárenském průmyslu velké riziko představuje *Listeria monocytogenes* a s tím spojené ohnisko výskytu listeriózy. Bakteriociny BMK, které inhibují *Listeria* jsou ideálním řešením pro potlačení výskytu tohoto patogenu v mléčných výrobcích [32]. Dalšími patogeny v mléčných produktech jsou *S. aureus*, *E. coli*, *Clostridium butyricum*, *Salmonella* spp. [58]. Nisin (v komerční formě Nisaplin) byl rozsáhle testován v mléčných potravinách [58]. Využití získal například jako antimikrobní peptid sýrových pomazánkách a tavených sýrech. V těchto výrobcích nisin inhiboval růst *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis* [32]. Nisin našel v mlékárenském průmyslu mnoho dalších aplikací, zejména v konzervaci tavených a měkkých sýrů, zahuštěných a ochucených mlék, tvarohu, pomazánek, omáček, salátových dipů apod. [58]. Jeho antimikrobní aktivita je rovněž oceňována v inhibici *C. tyrobutyricum* způsobující nežádoucí tvorbu plynů. Velkou výhodou ale představuje aktivita nisinu vůči potravinovým patogenům jako *C. botulinum*, *L. monocytogenes* a *Staphylococcus aureus* [32]. Několik studií ukázalo, že antimikrobiální aktivita nisinu v sýru může být ovlivněna proteolytickými reakcemi. Na druhou stranu jiné studie toto tvrzení vyvrátilo [32, 43]. Aplikace nisinu je u krájeného sýru vhodná v podobě polyethylenovém nebo polyamidovém obalu s přídavkem bakteriocinu [58].

Pediociny byly primárně testovány v masných výrobcích. Bylo však prokázáno jejich široké uplatnění v mlékárenském průmysle. Komerčně dostupný pediocin PA-1 je schopný inhibice *L. monocytogenes* v několika mléčných výrobcích. Příkladem je tvaroh, smetana nebo sýrová omáčka. Aplikace pediocinu prostřednictvím kmenu *Pediococcus* v mléčných potravinách byla původně omezená. Důvodem byla nedostatečná adaptace těchto kmenů na mléčný substrát a pro efektivní inhibici *L. monocytogenes* v mléce bylo zapotřebí vysoké koncentrace pediokoků ve výrobku. Z toho důvodu byly vyvinuty geneticky upravené BMK produkující pediocin, jako: *L. lactis* subsp. *lactis* nebo jogurtová startovací kultura *S. thermophilus* [58].

Studie aplikace antimikrobních peptidů v mlékárenském průmysle jsou zaměřeny i na bakteriociny, které nejsou zatím komerčně dostupné, ale vykazují slibný potenciál využití. Mezi tyto bakteriociny se řadí lakticin 3147. Výzkumy ukázaly, že purifikovaná forma lakticinu 3147 inhibuje růst *L. monocytogenes* a snižuje počet životaschopných buněk *S. aureus* v kojeneckém mléce. V přírodním jogurtu a v tvarohu s přídavkem prášku lakticinu 3147 se snížil počet životaschopných buněk *L. monocytogenes* během 2 hodin o 85 %.

Dalším bakteriocinem s vysokým potenciálem pro konzervaci mléčných potravin je Enterocin AS-48. Studie prokázaly, že tento bakteriocin přidaný do kojenecké výživy zcela inaktivoval *B. cereus*. Následně zabránil jeho růstu po dobu nejméně 15 dnů při 37 °C. Většina bakteriocinogenních enterokoků může růst a produkovat bakteriociny v mléce a v sýrech, což z nich činí dobré kandidáty jako doplňkové kultury pro ochranu proti potravinovým patogenům [58].

Termofilní streptokoky jsou důležité jako mléčné startéry používané ve velkém měřítku při výrobě jogurtu a některých druhů sýrů. Je známo, že produkují několik bakteriocinů [32]. Obecně použití startérových kultur, které jsou schopny produkce bakteriocinů, v mlékárenském průmyslu je vhodné pro ochranu především fermentovaných potravin před patogenními mikroorganismy [52]. Mnoho studií se zaměřilo na výběr a vývoj bakteriocinogenních kultur, které zlepšují zrání a chuti sýra. Kromě toho bylo navrženo použití produkčních kmenů k zabránění pozdního duření sýrů inhibicí růstu klostridií [32].

7.4.2 Masný průmysl

Aplikace bakteriocinů do masa a masných výrobků lze několika způsoby. Pro fermentované masné výrobky je praktická a ekonomicky přijatelná varianta inokulace produkčních kmenů. Protektivní kultury mohou pozitivně ovlivnit mikrobiální růst znehodnocujících a patogenních mikroorganismů. Příkladem jsou startérové kultury pro masné výrobky zahrnující *L. plantarum* jako producent plantaricinu, nebo *L. curvatus* jako výrobce curvacinu. Bakteriociny obou startovacích kultur účinně snižují výskyt bakterie *L. monocytogenes* [55]. Zejména mleté maso, používané k výrobě hamburgerů, má krátkou trvanlivost. Jednou z možností biologického prodloužení trvanlivosti je aplikace ochranných kultur. Studie Comi et al. [59] se zabývala aplikací protektivních kultur na maso určeného k výrobě hamburgerů. Používané kultury zahrnovaly BMK *L. sakei*, *L. sakei* subsp. *carneus*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Tyto kultury inhibovaly růst grampozitivního mikroorganismu *Brochothrix thermosphacta*, který je zodpovědný za znehodnocování chlazených masných výrobků. Bioprotektivní kultury hodnocené v této studii mohou potenciálně prodloužit dobu použitelnosti až na 12 dní a zlepšit sensorické vlastnosti masa určeného pro výrobu hamburgerů [59].

U masa a masných výrobků, které nejsou fermentovány záměrně může probíhat znehodnocení způsobené BMK. Ty jsou reprezentovány především laktobacily *Latilactobacillus sakei* a *Latilactobacillus curvatus* a dále rody *Leuconostoc* spp., *Weisella* spp. a *Carnobacterium* spp. Výše uvedené rody BMK mohou způsobit nakysnutí masa,

nepříjemnou vůni, změnu barvy nebo tvorbu plynu a slizu. Regulaci výskytu těchto mikroorganismů může zajistit přídavek bakteriocinu BMK [58]. K mikrobiální kontaminaci masa a masných dochází rovněž na povrchu. Vhodný způsob aplikace bakteriocinu zde představuje použití bioaktivního obalu [55].

Vhodný bakteriocin pro aplikaci v masném průmyslu je pediocin PA-1 produkovaný *Pediococcus acidilactici*. Studie tohoto bakteriocinu prokázaly jeho antimikrobiální působení vůči *L. monocytogenes* a *C. perfringens*, *Leuconostoc mesenteroides*. Prodloužení trvanlivosti pediocinem lze u sušených uzenin a fermentovaných masných výrobků. Dále bylo prokázáno, že pediocin PA-1 může pomáhat při ochraně rybího filé tím, že inhibuje růst *L. monocytogenes* [40].

7.4.3 Ovoce, zelenina a alkoholické nápoje

I když byly bakteriociny BMK studovány za účelem konzervace potravin především živočišného původu, využití mají i v konzervárenství ovoce a zeleniny nebo výrobků z nich. Potravinu rostlinného původu jsou velmi oblíbené pro konzumaci v syrovém stavu. Prochází tak minimálním zpracováním a bývají příčinou alimentárních onemocnění. Nejčastějšími patogeny vyskytujícími se v těchto potravinách jsou *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. a *Listeria monocytogenes*. Jedna z možností použití bakteriocinů pro konzervaci ovoce a zeleniny je jejich začlenění do aktivního obalu. Tento typ aplikace představuje skvělou alternativu pro uchování minimálně zpracovaných výrobků. Bioaktivní obaly zabraňují ztrátě vody z ovoce a zeleniny a zpomalují tak jejich mikrobiologické i fyziologické znehodnocení. Významnými bakteriociny, které se v tomto odvětví používají jsou purifikované varianty nisinu a pediocinu [60]. Některé studie zabývající se aplikací enterocinu AS-48 pro konzervaci ovoce a zeleniny prokázaly jeho účinnost při inhibici růstu *B. cereus* a *S. aureus*. U fermentované zeleniny jsou vhodnými adepty pro biokonzervaci kmeny produkující bakteriociny a podporující fermentaci [40].

Nežádoucí mikroorganismy mohou znehodnotit i alkoholické nápoje. Bakteriociny BMK snižují hladiny SO₂ ve víně. V pivovarnictví se mladina obohacuje látkou, která obsahuje kulturu bakterií produkujících nisin. Takto se zajišťuje vysoká stabilita při skladování piva [52].

ZÁVĚR

Bakteriociny jsou látky peptidické povahy s antimikrobními účinky vůči bakteriím, které jsou podobné produkčnímu kmenu. Schopnost produkce bakteriocinů mají jak bakterie gramnegativní, tak grampozitivní, kde významnými producenty těchto látek je skupina bakterií mléčného kvašení. Tyto bakterie mají kromě schopnosti produkce bakteriocinů také schopnost tvorby jiných organických a anorganických látek, díky kterým se využívají v potravinářském průmyslu ke zlepšení organoleptických vlastností produktu a jeho konzervaci. Bezpečnost používání bakterií mléčného kvašení potvrzují statusy GRAS (Všeobecně považovaný za bezpečný) a QPS (Kvalifikovaná předpoklad bezpečnosti) udělené příslušnými orgány pro kontrolu bezpečnosti potravin.

Bakteriociny bakterií mléčného kvašení jsou rozděleny do čtyř hlavních tříd. Lantibiotické bakteriociny, které jsou charakterizovány výskytem specifickým aminokyselin v peptidickém řetězci, které jsou výsledkem posttranslačních modifikací molekuly. Schopnost biosyntézy bakteriocinů využívají bakteriální buňky především jako obranný systém umožňující likvidaci buněk soupeřících o stejné podmínky jako producent bakteriocinů. Jejich antimikrobní aktivita je díky tomu zaměřená na mikroorganismy příbuzné produkčnímu kmenu. U bakteriocinů BMK se tedy jedná především o grampozitivní bakterie. Mechanismus účinku těchto antimikrobních peptidů spočívá v inhibici syntézy buněčné stěny cílových bakteriálních buněk nebo v permeabilizaci cytoplasmatické membrány a vypuštění cytoplasmatického obsahu mimo buňku. Produkční buňky jsou před účinkem antimikrobní aktivity vlastních bakteriocinů chráněny imunitním systémem zahrnující imunitní proteiny a transportní systém regulující tvorbu pórů v cytoplasmatické membráně a koncentraci bakteriocinů na povrchu buňky.

Významnými bakteriociny produkovanými BMK jsou nisin a pediocin PA-1. Tyto bakteriociny jsou dostupné jako konzervanty potravin díky schválení Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Uplatnění nacházejí tyto bakteriociny především v mléčném a masném průmysle, kde je potenciál jejich antimikrobní aktivity zaměřen na bakterie *Listeria monocytogenes* a kontrolu výskytu alimentárního onemocnění listeriózy. Studie bakteriocinů enterocinu AS-48 a lakticinu 3147, prokazují jejich antimikrobní vlastnosti proti patogenním a znehodnocujícím mikroorganismům. Budoucnost poukazuje na potenciální využití těchto antimikrobních peptidů v potravinářské sféře.

Aplikace bakteriocinů do potravin je možná několika způsoby, a to použitím purifikovaného bakteriocinu ve formě prášku nebo roztoku, inokulace bakteriálního kmenu syntetizujícího

bakteriociny do potravin, aplikací bakteriocinů do plastových potravinářských fólií nebo jedlých povlaků vyrobených z celulózy. Všechny metody mohou být použity samostatně nebo jako překážková konzervace.

Ačkoli používání bakteriocinů v potravinářském průmyslu se stává populární, jejich potenciál není doposud plně využit kvůli relativně úzkému antimikrobiálnímu spektru a ekonomicky náročnému zisku vysokého výtěžku jejich čištěné formy. Výzkumy se zaměřují, jak tyto nedostatky minimalizovat a zefektivnit tak jejich možnost aplikací. Jejich použití může představovat mnoho výhod. Kromě prodloužení trvanlivosti výrobku a snížením rizika výskytu alimentárních onemocnění znehodnocujícími a patogenními mikroorganismy je výhodou jejich nízká koncentrace účinku nebo stabilita v širokém rozmezí pH a teploty. Příznivá je rovněž citlivost na trávicí enzymy gastrointestinálního traktu člověka zaručující jejich zdravotní nezávadnost pro samotného konzumenta tak pro mikroorganismy jeho střevní mikrobioty. V poslední řadě přináší uspokojení požadavků spotřebitele na omezení chemicky syntetizovaných konzervačních látek používaných v potravinářském průmyslu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DAVIDSON, P. M., SOFOS, J. N., BRANNERN, A. L. *Antimicrobials in food. 3rd ed.* Boca Raton: CRC Press. 2005, ISBN 0-8247-4037-8.
- [2] RAJCHL, A., CEJPEK, K., *Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin: Současné Metody Konzervace Potravin Ve Světle Historického Vývoje.* Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze Technická 5, 166 28 Praha 6. 2017, č. 47, s. 11-13. ISSN 1802-1433.
- [3] NEGASH, A.W., TSEHAI, B.A. a J. FALKINHAM, *Current Applications of bacteriocin.* International Journal of Microbiology. 2020, ISSN 1687-9198.
- [4] LEE, N. K. a H.D. PAIK, *Status, Antimicrobial Mechanism, and Regulation of Natural Preservatives in Livestock Food Systems.* Korean Journal for Food Science of Animal Resources. Korean Society for Food Science of Animal Resources. 2016, roč. 36, č. 4, s. 547–557. ISSN: 2636-0780.
- [5] SALMINEN, S., VON WRIGHT, A. a A. OUWEHAND. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects.* 3rd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker. 2004, ISBN 08-247-5332-1.
- [6] SADIKU, M., ASHALOU, T. a S. MUSA, *Food Preservation: An Introduction.* International Journal of Trend in Scientific Research and Development. 2019, roč. 3 č. 5, s. 367-369 ISSN: 2456-6470.
- [7] MUSTAPHA, A. a J.H. LEE, *Food Preservation and Safety, Microbial Control and Food Preservation.* Food Microbiology and Food Safety. Springer, New York, NY. 2017, ISBN 978-1-4939-7556-3.
- [8] AMIT, S. K., UDDIN, M. M. a R. RAHMAN, *A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing.* Agriculture & Food Security. 2017, roč. 6, č. 51, ISSN 2048-7010.
- [9] KRZYSZTOFIK, B., DRÓZDŹ, T., SOBOL, Z., NAWARA, P. a P WRONA, *Metody zabezpieczania i utrwalania surowców oraz produktów żywnościowych.* Polskie Towarzystwo Inżynierii Rolniczej. 2015, ISBN 978-83-64377-14-3.

- [10] STEELE, R., *Understanding and measuring the shelf-life of food*. England: Woodhead Publishing Limited. 2004. ISBN 1 85573 732 9
- [11] SHARIF, Z., MUSTAPHA, F., JAI, J., MOHD YUSOF, N., *Review on methods for preservation and natural preservatives for extending the food longevity*. Chemical Engineering Research Bulletin. 2017, roč. 19, s. 145-153. ISSN 2072-9510.
- [12] BARBERIS, S., QUIROGA, H. G., BARCIA, C., TALIA, J. M., DEBATTISTA, N., *Natural Food Preservatives Against Microorganisms*. Food Safety and Preservation. London: Elsevier, 2018, s. 621-658. ISBN 9780128149560.
- [13] ŠTASTKOVÁ, Z., R. KARPÍŠKOVÁ a I. BORKOVCOVÁ, *Možnosti detekce stafylokokových enterotoxinů*. Chemické listy. 2012, roč. 106, č. 8, s. 745–749. ISSN 1213-7103
- [14] STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, *Infekce vyvolané Bacillus cereus*. Národní zdravotnický informační portál [online]. 2021 [cit. 2021-05-17]. ISSN 2695-0340. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/220-bacillus-cereus-infekce>
- [15] CHUKWU, E.E., NWAOKORIE, F.O., COKER, A.O., AVILA-COMPOS, M.J., SOLIS, R.L., LLANCO, L.A. a F.T. OGUNSOLA, *Detection of toxigenic Clostridium perfringens and Clostridium botulinum from food sold in Lagos*. Anaerobe. 2016, roč. 42, s. 176-181. ISSN 10759964.
- [16] LECUIT, M., *Listeria monocytogenes, a model in infection biology*. Cellular Microbiology. 2020, roč. 22, č. 4. ISSN 1462-5814.
- [17] MUGHINI-GRAS, L., PIJNACKER, R., COIPAN, C., MULDER, C.A., VELUDO, A.F., RIJK, S. et al., *Sources and transmission routes of campylobacteriosis: A combined analysis of genome and exposure data*. Journal of Infection. 2021, roč. 82, č. 2, s. 216-226. ISSN 01634453.
- [18] YANG, SC., LIN, CH., ALUFFALI, I.A. a JY. FANG, *Current pathogenic Escherichia coli foodborne outbreak cases and therapy development*. Archives of Microbiology. 2017, roč. 199, č. 6, s. 811–825. ISSN: 0302-8933.

- [19] WIBISONO, F.M., WIBISONO, F.J., EFFENDI, H.M., PLUMERIASTUTI, H., HIDAYATULLAH, A.R., HERTADI, E.B. a E.D. SOFIANA, *A Review of Salmonellosis on Poultry Farms, Public Health Importance: Systematic Reviews in Pharmacy*. 2020, roč. 11, č. 9, s. 481-486. ISSN 0975-8453.
- [20] AZIZ, M., YELAMANCHILI, V. S., 2020. *Yersinia Enterocolitica*. [online]. 2021 [cit. 2021-02-20] Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29763012/>
- [21] VAŇKOVÁ, I., ČUREČKOVÁ, V. a Š. BURSOVÁ, *Viry a bakteriofágy v potravinách* [online]. 2018 [cit. 2021-02-21] Dostupné z: <https://www.vfu.cz/cz/rok-2018-1>
- [22] VOLDŘICH, M., *Metody úchovy potravin* [online]. [cit. 2021-5-9]. Dostupné z: https://www.potravininfo.cz/33/metody-uchovy-potravin-uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUh4EtI668NLi3Lvd_Mb-Y6jv93VRYFLS2WAvA/
- [23] SAHU, M. a S. BALA, *Food Processing, Food Spoilage and their Prevention: An Overview*. International Journal of Life-Sciences Scientific Research. 2017, roč. 3, č. 1, s. 753-759, ISSN 24551716.
- [24] LUCERA, A., COSTA, C., CONTE, A. a M.S. DEL NOBILE, *Food applications of natural antimicrobial compounds*. Frontiers in Microbiology. 2012, roč. 3. ISSN 1664-302X.
- [25] ALVAREZ-SIEIRO, P., MONTALBÁN-LÓPEZ, M., MU, D. a O.P. KUPIERS, *Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2016, roč. 100, č. 7, s. 2939-2951. ISSN 0175-7598.
- [26] KUMARIYA, R., GARSHA, A. K., RAJPUT, Y. S., SOOD, S. K., AKHTAR, N. S. PATEL, *Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria*. Microbial Pathogenesis. 2019, roč 128, s. 171-177. ISSN 08824010.

- [27] ŠUSTKOVÁ, K. a L. KALHOTKA, *Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin: Využití protektivních kultur k prodloužení údržnosti potravin*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze Technická 5, 166 28 Praha 6. 2017, č. 47, s. 14-17. ISBN 978-80-86909-20-2.
- [28] Ayivi, R.D., GYAWALI, R., KRASTANOV, A., ALJALOU, O.S., WORKU. M., TAHERGORABI, R., SILVA, R.C. a S.A. IBRAHIM, *Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications*. Dairy, 2020, roč. 1, č. 3, s. 202–232. ISSN: 2624-862X
- [29] JURKOWSKI, M. a M. BIASZCZYK, *Charakterystyka fizjologiczno-biochemiczna bakterii fermentacji mlekowej*. Kosmos: Problemy nauk biologicznych, Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika. 2012, roč. 3, č. 61. ISSN 0023-4249.
- [30] SIMONS, A., ALHANOUT, K. a R. E. DUVAL, *Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact against Multidrug-Resistant Bacteria*. Microorganisms. 2020, roč. 8, č.5, ISSN 2076-2607.
- [31] TOMASZEWSKA, M., GRZESIŃSKA, W., BILSKA, B. a J. TRAFIAŁEK, *Charakterystyka bakteriocyn jako naturalnych konserwantów żywności. Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*. Wyższa Szkoła Menadżerska, 2014. ISSN 0867-793X.
- [32] SILVA, C. C. G., SILVA S. P. M. a S. C. RIBEIRO, *Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation*. Frontiers in Microbiology. 2018, roč. 9. ISSN 1664-302X.
- [33] HORÁČKOVÁ, Š., BIALASOVÁ, K. a M. PLOCKOVÁ, *Metabolismus a význam bakterii mléčného kvašení ve fermentovaných mléčných výrobcích*. Mlékařské Listy. 2018, roč. 29, č. 5, s. 22-24. ISSN 1212 – 950X
- [34] AMBROŽOVÁ, J., *Mikrobiologie v technologii vod*. Vysoká škola chemicko-technologická. Praha. 2004. ISBN 80-7080-534-x

- [35] PIETRASZEK, P., DYBKA, K., WALCZAK, P., OTLEWSKA, A., RYGAŁA, A. a E. OŁTUSZAK-WALCZAK, *Mikrobiologiczna produkcja kwasu mlekowego z surowców odnawialnych*, Polish Journal of Agronomy. 2014, roč.10 č. 16, s. 45-56. ISSN 2081-2787.
- [36] FENG, T. a J. WANG *Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review*. Gut Microbes. 2020, roč. 12, č. 1, ISSN 19490984
- [37] RATAJCZAK, K. a A. PIOTROWSKA-CYPLIK, *Metabolity bakterii kwasu mlekowego i ich zastosowanie w przemyśle, Postępy Mikrobiologii*, Polskie Towarzystwo Mikrobiologów. 2017, roč. 56 č. 4. ISSN 0079-4252
- [38] DESNIAR., RUSMANA, I., SUWANTO, A. a N.R. MUBARIK, *Organic acid produced by lactic acid bacteria from bekasam as food biopreservatives*. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2020. ISSN 1755-1315
- [39] DABA, G.M. a W.A. ELKHATEEB, *Bacteriocins of lactic acid bacteria as biotechnological tools in food and pharmaceuticals: Current applications and future prospects*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2020, roč. 28, ISSN 18788181.
- [40] NG, Z.J., ZARIN, M.A. a S. TAN, *Application of bacteriocins in food preservation and infectious disease treatment for humans and livestock: a review*. RSC Advances. 2020, roč. 10, č. 64. ISSN 2046-2069.
- [41] DA COSTA, R. J., VOLOSKI, F. L. S., MONDADORI, R. G., DUVAL, E. H a A. M. FIORENTINI, *Preservation of Meat Products with Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat*. Journal of Food Quality. 2019. ISSN 0146-9428.
- [42] NEBBIA, S., LAMBERTI, C., BIANCO, G.L., CIRRINCIONE, S., LAROUTE, V., COCAIGN-BOUSQUET, M., CAVALLARIN, L., GIUFFRIDA a M.G.AE. PESSIONE, *Antimicrobial Potential of Food Lactic Acid Bacteria: Bioactive Peptide Decrypting Caseins and Bacteriocin Production*. Microorganisms. 2021, roč. 9, č. 1. ISSN 2076-2607

- [43] CLEVELAND, J., MONTVILLE, T.J., NES, I.F. a M.L. CHIKINDAS, *Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation*. International Journal of Food Microbiology. 2001, roč.71, č. 1, s. 1-20, ISSN 01681605.
- [44] OŁDAK, A., ZIELIŃSKA, D., *Bakteriocyny bakterii fermentacji mlekowej jako alternatywa antybiotyków*. Postepy Higieny i Medycyny Doświadczalnej. 2017, č. 71, ISSN 1732-2693.
- [45] SIDHU, P. K. a K. NEHRA, *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria as Potent Antimicrobial Peptides against Food Pathogens*. [Online]. [cit. 2021-03-31] Dostupné z: <https://www.intechopen.com/online-first/bacteriocins-of-lactic-acid-bacteria-as-potent-antimicrobial-peptides-against-food-pathogens>
- [46] BILKOVÁ, A., KIŇOVÁ SEPOVÁ, H. a A. BALÁŽOVÁ, *Bakteriocíny produkované baktériami mliečneho kvasenia*. Česká a slovenská farmacie. Univerzita Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta, Katedra buňkovej a molekulárnej biológie liečiv. 2011, roč. 60, č. 2, s. 65-72. ISSN 1805-4439
- [47] MOKOENA, M. P. *Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens*. Molecules. 2017, roč. 22, č. 8, ISSN 1420-3049.
- [48] VAN DER DONK, W.A. a S.K. NAIR, *Structure and mechanism of lanthipeptide biosynthetic enzymes*. Current Opinion in Structural Biology. 2014, roč. 29, s. 58-66. ISSN 0959440X.
- [49] SUKRITA, P., PARICHAT. P. a R. PONGSAK, *Nisin: Production and mechanism of antimicrobial action*. International Journal of Current Research and Review. 2015, roč. 7, č. 2, s. 47-53. ISSN 352-885.
- [50] JOHNSON, E. M., JUNG, YG., JIN, YY., JAYABALAN, R., YANG, S.H. a J. WON SUH, *Bacteriocins as food preservatives: Challenges and emerging horizons*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2017, roč. 58, č. 16, s. 2743-2767. ISSN 1040-8398.

- [51] PORTO, M. C.KUNIYOSHI, T. M., AZEVEDO, P. O., VITOLO, M. a R. P. OLIVEIRA, *Pediococcus spp: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers*. Biotechnology Advances. 2017, roč. 35, č. 3, s. 361-374. ISSN 07349750.
- [52] ZIMINA, M., BABICH, O., PROSEKOV, A., SUKHIKH, S., IVANOVA, S., SHEVCHENKO, M. a S. NOSKOVA, *Overview of Global Trends in Classification, Methods of Preparation and Application of Bacteriocins*. Antibiotics. 2020, roč. 9, č. 9, ISSN 2079-6382.
- [53] O'CONNOR P. M., KUNIYOSHI, T., OLIVEIRA, R. P. S., HILL, C., ROSS, R. P. a P. D. COTTER, *Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective*, Current Opinion in Biotechnology. 2020, roč. 61, s. 160-167, ISSN 0958-1669.
- [54] ZACHAROF, M.P. a R.W. LOVITT, *Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article*. APCBEE Procedia. 2012, roč. 2, s. 50-56, ISSN 22126708.
- [55] WORAPRAYOTE, W., MALILA, Y., SORAPUKDEE, S., SWETWIWATHANA, A., BENJAKUL, S. a W. VISESSANGUAN, *Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products*. Meat Science. 2016, roč. 120, s. 118-132, ISSN 0309-1740.
- [56] JUTURU, V. a J. C. WU, *Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications*. Biotechnology Advances. 2018, roč. 36, č. 8, s. 2187-2200. ISSN 07349750.
- [57] DEEGAN, L.H., COTTER, P.D. a P. ROSS, *Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension*, International Dairy Journal. 2006, roč. 16, č. 9, s. 1058-1071. ISSN 0958-6946.
- [58] GALVEZ, A., LOPEZ, R.L., ABRIOUEL, H., VALDIVIA, E. a N.B. OMAR, *Application of Bacteriocins in the Control of Foodborne Pathogenic and Spoilage Bacteria*, Critical Reviews in Biotechnology. 2008, roč. 28, č. 2, s. 125-152, ISSN 1549-7801.

- [59] COMI, G., TIRLONI, E., ANDYANTO, D., MANZANO, M. a L. IACUMIN, *Use of bio-protective cultures to improve the shelf-life and the sensorial characteristics of commercial hamburgers*, Food Science and Technology. 2015, roč. 62, č. 2, s. 1198-1202. ISSN 0023-6438.
- [60] BARBOSA, A. A. T., MANTOVANI, H. C. a S. JAIN, *Bacteriocins from lactic acid bacteria and their potential in the preservation of fruit products*. Critical Reviews in Biotechnology. 2017, roč. 37, č. 7, s. 852-864. ISSN 0738-8551.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABC	Transportní protein (ATP Binding Cassette)
ABU	Kyselina 2-aminomáselná
AK	Aminokyselina
Ala	Alanin
ATP	Adenosintrifosfát
BMK	Bakterie mléčného kvašení
CO ₂	Oxid uhličitý
Cys	Cystein
Dha	Dehydroalanin
Dhb	Dehydrobutyrin
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority)
EMP	Emden-Meyerhof-Parnasonová dráha
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
G ⁻	Gramnegativní bakterie
G ⁺	Grampozitivní bakterie
GC	Guanino-cytosinové komplexy
GG	Glycin-glycin
GIT	Gastrointestinální trakt
GRAS	Všeobecně považovaný za bezpečný (Generally Recognized As Safe)
H ₂	Vodík
hPa	Hektopascal
kDA	Kilodalton
Lan	Lanthionin
MeLan	Methylanthionin

NaCl	Chlorid sodný
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)
PK	Fosfoketoláza
QPS	Kvalifikovaný předpoklad bezpečnosti (Qualified Presumption of Safety)
SE	Stafylokokový enterotoxin
Ser	Serin
SO ₂	Oxid siřičitý
Thr	Threonin
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
6-PG	6-fosfoglukonát

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Strukturní vzorce neobvyklých aminokyselin I. třídy bakteriocinů	31
Obrázek 2	Modifikace pre-nisinu.....	36
Obrázek 3	Tvorba pórů v cytopl. membr. pomocí komplexu nisin-lipid II.	39
Obrázek 4	Tvorba pórů v cytopl. membr. pomocí komplexů nisin-lipid II a nisinu	40

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Porovnání bakteriocinů s antibiotiky	28
--	----

