

Vliv monoacylglycerolů na bakterie s dekarboxylázovou aktivitou

Bc. Erika Čechová

Diplomová práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Erika Čechová**
Osobní číslo: **T16161**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Vliv monoacylglycerolů na bakterie s dekarboxylázovou aktivitou**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizace, vlastnosti a výroba monoacylglycerolů.
2. Inhibiční účinky monoacylglycerolů.
3. Biogenní aminy a možnosti jejich stanovení.

II. Praktická část

1. Příprava monoacylglycerolů.
2. Stanovení inhibičního účinku monoacylglycerolů na vybrané bakterie.
3. Stanovení produkce biogenních aminů pomocí HPLC.
4. Zpracování výsledků a formulace závěru.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] RŮŽIČKA, J., VELCOVÁ, K., JANIŠ, R., KREJČÍ, J. Antimicrobial effects of 1-monoacylglycerols prepared by catalytic reaction of glycidol with fatty acids. Eur. Food Res. Technol., 2003, 329-331.
- [2] JANIŠ, R., KREJČÍ, J. and KLÁSEK, A., Preparation of 1-monoacylglycerols from glycidol and fatty acids catalyzed by the chromium(III)-fatty acid system. 2000, Eur. J. Lipid Sci. Technol., 351354.
- [3] BOYLE, E., Monoacylglycerides in food systems: Current and future uses. Food technology, 1997, 52-59. ISSN: 00156639.
- [4] BERGSSON, G., ARNFINNSSON, J., STEINGRÍMSSON, . Ó. and THORMAR, H., Killing of Gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides., APMIS, 2001, 670678.
- [5] DAVIDSON, P.M., BRANEN, A.L.. Chapter 1: Food antimicrobials an introduction. Davidson, P.M., Sofos, J.N., Branen, A.L. (eds.) Antimicrobials in food, 2005, 327-360.
- [6] ÖZOGUL, F., KACAR, C., HAMED, I. Inhibition effects of carvacrol on biogenic amines formation by common food-borne pathogens in histidine decarboxylase broth. LWT Food Sci. Technol., 2015, 50-55.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

2. února 2018

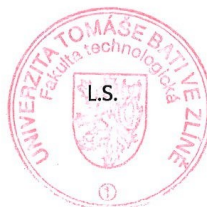
Termín odevzdání diplomové práce:

25. dubna 2018

Ve Zlíně dne 2. února 2018



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



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

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 2. 5. 2018

.....

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

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

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

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

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

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

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

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

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

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

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá stanovením vlivu monoacylglycerolů na bakterie s dekarboxylázovou aktivitou. Teoretická část obsahuje dvě kapitoly. První kapitola pojednává o charakteristice a vlastnostech monoacylglycerolů, jejich výrobě a antimikrobiálních vlastnostech. Součástí kapitoly je také popis využití monoacylglycerolů v potravinářství. Náplní druhé kapitoly teoretické části práce je popis biogenních aminů. Součástí kapitoly je charakteristika a vlastnosti biogenních aminů, jejich možný vznik a výskyt a také faktory, které vznik biogenních aminů ovlivňují. V poslední části druhé kapitoly je také popis mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou a možnosti stanovení biogenních aminů.

V praktické části diplomové práce je zahrnuta výroba monoacylglycerolů adicí mastné kyseliny na glycidol, stanovení inhibičního účinku monoacylglycerolů a mastných kyselin pomocí diskové difúzní metody na Petriho miskách a stanovení inhibičního účinků monoacylglycerolů a mastných kyselin a indexu růstu bakterií měřením změny optické denzity. Z výsledků je patrné, že monoacylglyceroly mají výrazný inhibiční efekt, a to především na grampozitivní bakterie. Nejvýraznější inhibiční efekt byl u monoacylglycerolů viděn po 48 hodinové kultivaci. U mastných kyselin nebyl prokázán tak výrazný inhibiční efekt. Dále bylo zjištěno, že koncentrace monoacylglycerolů 1000 mg/l a 1500 mg/l, působí na všechny sledované bakterie velmi vysokým inhibičním efektem. Tyto koncentrace monoacylglycerolů v některých případech dokonce způsobily úplné zastavení růstu bakterií.

Klíčová slova: monoacylglyceroly, biogenní aminy, dekarboxylázová aktivita, bakterie

ABSTRACT

The diploma thesis is about determination effect of monoacylglycerols on bacteria with decarboxylase activity. The theoretical part contains two chapters. The first chapter is about characterization and properties of monoacylglycerols, their production and antimicrobial properties. Part of this chapter is also a description of the use of monoacylglycerols in the food industry. The second chapter of the theoretical part thesis describes the biogenic amines. Part of the chapter is the characterization and properties of biogenic amines, their possible formation and occurrence and also factors that enable the formation of biogenic amines. In the last part of the second chapter is also a description of microorganisms with decarboxylase activity and possibility of determination biogenic amines.

The practical part of the thesis includes production of monoacylglycerols by addition of fatty acid to glycidol, determination of inhibitory effects of monoacylglycerols and fatty acids by disc method on Petri's dishes and determination of the inhibitory effects of monoacylglycerols and fatty acids and of the growth index of bacteria by measuring the change of optical density. The results show that monoacylglycerols have a significant inhibitory effect, especially on grampositive bacteria. The most significant inhibitory effect was observed for monoacylglycerols after of 48 hours cultivation. No significant inhibitory effect has been demonstrated for fatty acids. It was found, that the concentration of monoacylglycerols of 1000 mg/l and 1500 mg/l has been shown to have a very high inhibitory effect on all bacteria that we studied. These concentrations of monoacylglycerols in some cases even cause complete inhibition of bacterial growth.

Keywords: monoacylglycerols, biogenic amines, decarboxylase activity, bacteria

Největší poděkování patří vedoucí mé práce, paní doc. Leoně Buňkové, Ph.D. za vstřícnost, skvělé vedení a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat paní laborantce Bc. Veronice Kučabové za velkou pomoc v laboratoři. Další poděkování patří také mé rodině, blízkým přátelům za velkou podporu a motivaci.

Tato práce vznikla za podpory grantu č. 17-09594S financovaného z prostředků Grantové agentury České republiky.

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	13
1 MONOACYLGLYCEROLY	14
1.1 CHARAKTERISTIKA A VLASTNOSTI MONOACYLGLYCEROLŮ.....	14
1.2 VÝROBA MONOACYLGLYCEROLŮ.....	15
1.2.1 Esterifikace mastné kyseliny s glycerolem.....	16
1.2.2 Inesterifikace	16
1.2.2.1 Alkoholýza.....	16
1.2.2.2 Acidolýza	17
1.2.2.3 Transesterifikace.....	17
1.2.3 Parciální hydrolýza triacylglycerolů.....	18
1.2.4 Adice mastné kyseliny na glycidol.....	18
1.3 VYUŽITÍ MONOACYLGLYCEROLŮ V POTRAVINÁŘSTVÍ	19
1.4 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY MONOACYLGLYCEROLŮ.....	20
2 BIOGENNÍ AMINY	22
2.1 CHARAKTERISTIKA A VLASTNOSTI BIOGENNÍCH AMINŮ.....	22
2.2 VZNIK A VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ	23
2.3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ.....	26
2.3.1 Přítomnost zkvasitelných cukrů	27
2.3.2 pH.....	27
2.3.3 Teplota.....	27
2.3.4 Přítomnost kyslíku.....	27
2.4 MIKROORGANISMY S DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITOU	27
2.5 MOŽNOSTI STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	28
II PRAKTICKÁ ČÁST	29
3 CÍL PRÁCE	30
4 MATERIÁL A POUŽITÉ METODY	31
4.1 MATERIÁL	31
4.1.1 Použité mikroorganismy	31
4.1.2 Kultivační půdy	31
4.1.3 Zásobní roztoky.....	32
4.2 POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	34
4.3 METODY.....	35
4.3.1 Příprava suspenze bakterií a diskové metody.....	35
4.3.2 Příprava monoacylglycerolů.....	35
4.3.3 Sledování vlivu monoacylglycerolů/mastných kyselin na růst buněk.....	39
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	40

5.1	VLIV MONOACYLGLYCEROLŮ A MASTNÝCH KYSELIN NA RŮST BAKTERIÍ	40
5.1.1	Disková difuzní metoda	40
5.1.2	Mikrotitrační diluční metoda.....	43
5.1.2.1	Vliv monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48	43
5.1.2.2	Vliv monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141	45
5.1.2.3	Vliv monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004	47
5.1.2.4	Vliv monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824.....	49
5.1.2.5	Vliv monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946.....	51
5.1.2.6	Vliv monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst <i>Enterococcus durans</i> CCDM 53	53
5.1.2.7	Vliv monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 2665	55
5.1.2.8	Vliv monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	56
5.1.2.9	Vliv monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. <i>Enteritidis</i> CCM 4420	58
5.1.2.10	Vliv monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188.....	60
	ZÁVĚR	63
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	65
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	71
	SEZNAM OBRÁZKŮ	72
	SEZNAM TABULEK.....	74

ÚVOD

Monoacylglyceroly jsou významné sloučeniny, které mají široké využití. Díky své struktuře mají amfifilní charakter, obsahují jak polární část, tak i část nepochární. Tato vlastnost je základem jejich emulgačního účinku a je velmi důležitá při jejich aplikaci v mnoha odvětvích průmyslu. Jejich antimikrobiální účinky jsou známy již dlouhou dobu. Antimikrobiální účinky ovlivňuje řada faktorů. Vliv má struktura monoacylglycerolu, délka uhlovodíkového řetězce, přítomnost a množství nenasycených vazeb. Výrazný vliv na antimikrobiální účinek má také charakter dané bakterie, kterou má monoacylglycerol inhibovat. Rozdílnost v účinku je daná stavbou buněčné stěny bakterie. Grampozitivní bakterie jsou více náchylné vůči účinkům monoacylglycerolů.

Monoacylglyceroly je možné syntetizovat mnoha možnými způsoby, z nichž některé zaručují vysokou výtěžnost reakce. Problém při reakci spočívá především v použití vysokých teplot a v produkci určitého množství vedlejších produktů, především diacylglycerolů a triacylglycerolů. Metoda, která byla použita v této diplomové práci, byla adice příslušné mastné kyseliny na glycidol. Reakce proběhla s vysokým stupněm konverze.

Biogenní aminy jsou sloučeniny, obsahující heterocyklus. Vykazují vysokou biologickou aktivitu. Vznikají především dekarboxylací svých prekurzorů, což jsou aminokyseliny. Biogenní aminy jsou součástí přírodních složek, které bývají obsaženy v mnoha potravinách. Jejich přítomnost můžeme předpokládat u potravin, které obsahují bílkoviny, volné aminokyseliny. Pro vznik biogenních aminů v potravinách je také nutná přítomnost mikroflóry, která má dekarboxylační aktivitu. Mimo tato fakta musí být potraviny uchovávány za podmínek, které umožní přítomnému mikroorganismu využít jeho dekarboxylázovou aktivitu. Menší množství biogenních aminů organismu neškodí a nezpůsobí mu většinou nějaké zdravotní problémy, avšak při příjmu většího množství biogenních aminů hrozí zdravotní rizika, ať už bolesti hlavy, případně žaludeční problémy.

Díky možnosti stanovení biogenních aminů v potravinách je možné prokázat přítomnost biogenních aminů v potravine a tím i prokázat kažení potraviny. Stanovení je možné mnoha způsoby. Celkový proces je náročnější, cílová detekce bývá nejčastěji v rámci metod kapalinové chromatografie s s flourescenční nebo UV detekcí před nebo po derivatizaci aminů.

Tato práce je zaměřena na výrobu monoacylglycerolů a stanovení vlivu monoacylglycerolů na vybrané bakterie. Součástí práce mělo být i závěrečné chromatografické stanovení biogenních aminů, vyprodukovaných příslušnými bakteriemi. Z technických důvodů a velkého množství vzorků budou tyto výsledky součástí až následné disertační práce.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MONOACYLGLYCEROLY

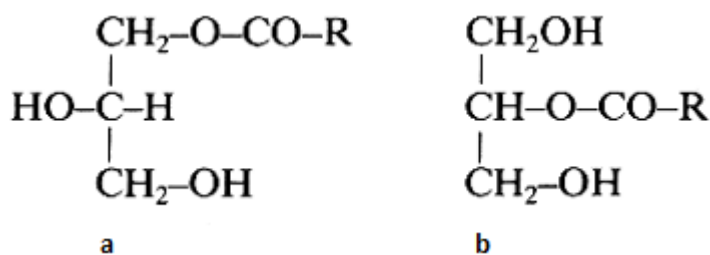
Syntéza prvních monoacylglycerolů (MAG) se uskutečnila v roce 1853, kdy syntézu provedl francouzský chemik Berthelot. Monoacylglyceroly jsou díky svým emulgačním účinkům využívány v mnoha odvětvích průmyslu, jejich využití je široké i v potravinářství. Významný průlom nastal ve využití MAG při výrobě margarínů. V roce 1936 byly MAGy patentovány pro využití při výrobě mražených krémů. [1]

MAG jsou hodnoceny jako nejdůležitější skupina emulgátorů. Produkce MAG je celosvětově velmi vysoká, zahrnuje 70% celosvětové produkce veškerých emulgátorů. [2]

1.1 Charakteristika a vlastnosti monoacylglycerolů

Monoacylglyceroly jsou estery glycerolu a příslušné mastné kyseliny. Glycerol je trojsytný alkohol. Vzhledem k této skutečnosti se vyskytují dvě izomerní formy MAGů, které se liší polohou acylového zbytku, a to 1-monoacylglyceroly nebo 2-monoacylglycerol (Obr. č. 1). [2]

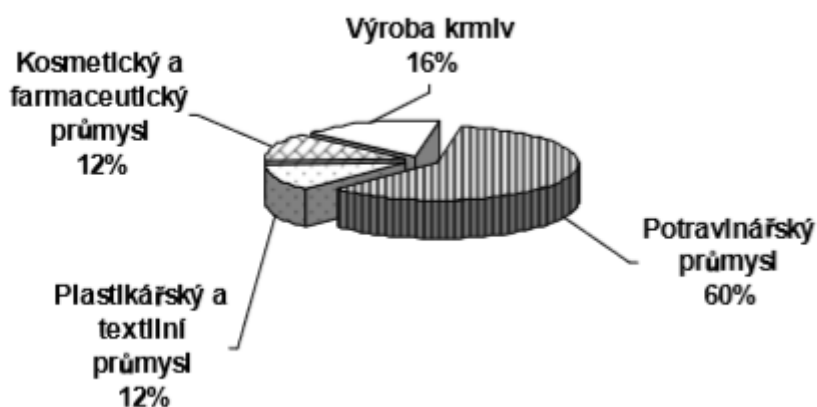
Molekula MAG je díky své struktuře amfifilní a tvoří ji polární a nepolární (především zbytek mastné kyseliny) část. V disperzích se molekuly MAG orientují na rozhraní mezi nepolární fází (olej nebo vzduch) a polární fází (voda). Nepolární konce molekul směřují do nepolární fáze, zatímco polární části molekul směřují do vodné fáze. Tyto vlastnosti jsou základem emulgačních účinků MAG. Monoacylglyceroly také dokážou zlepšit některé vlastnosti emulzí, například reologické vlastnosti těsta a tím je možné předejít tvrdnutí pečiva. [3]



Obrázek č. 1: Izomerní formy monoacylglycerolů – a) 1-monoacylglycerol, b) 2-monoacylglycerol [3]

Velké využití MAG je i kvůli tomu, že mají jednoduchou strukturu a jsou chemicky stálé. Také jsou biologicky rozložitelné a nemají dráždivý účinek na lidskou populaci. Jsou také přirozeným produktem metabolismu tuků. Jsou schváleny pro použití v potravinářském průmyslu, farmaceutickém průmyslu nebo je možná jejich aplikace v kosmetice. [4]

Charakteristickou vlastností MAG je jejich povrchová aktivita, což způsobí snižování povrchového napětí na rozhraní dvou nemísitelných kapalných fází o rozdílné polaritě. Díky tomu usnadňují rozptýlení jedné kapaliny ve druhé ve formě malých kapiček, čímž se zvyšuje stabilita emulze. Molekula MAG se skládá z hydrofobní a hydrofilní části. Emulgační schopnost MAG závisí na typu navázané mastné kyseliny (MK) a druhu disperzního prostředí. Vzhledem k těmto vlastnostem je využití MAG v mnoha odvětvích, zejména v potravinářském průmyslu (60 % MAG), také při výrobě krmiv (16 % MAG) nebo v textilním, plastikářském průmyslu (12 % MAG) a kosmetickém a farmaceutickém průmyslu (12 % MAG). (Obrázek č. 2). [6]



Obrázek č. 2: Aplikace MAG v průmyslu [7]

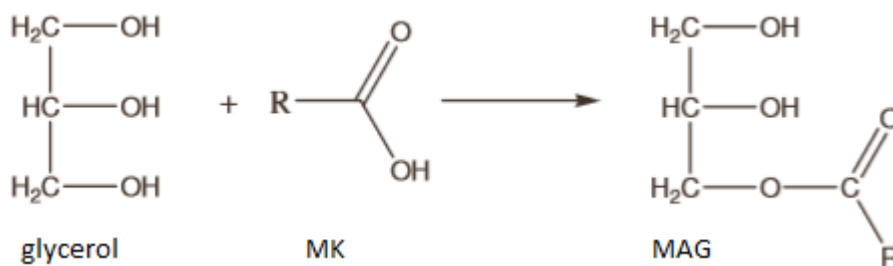
1.2 Výroba monoacylglycerolů

Monoacylglyceroly můžeme vyrobit několika způsoby:

- Esterifikací příslušné mastné kyseliny s glycerolem
- Inesterifikací
- Parciální hydrolýzou triacylglycerolů
- Adicí mastné kyseliny na glycidol [5]

1.2.1 Esterifikace mastné kyseliny s glycerolem

Při esterifikaci mastné kyseliny s glycerolem se vytvoří nejprve MAG (Obr. č. 3). Další esterifikací vznikají diacylglyceroly (DAG) a poté i triacylglyceroly (TAG). Jako katalyzátory se používají nejčastěji kyselina sírová, kyselina fosforečná nebo sulfonové kyseliny. Tento způsob výroby se moc nepoužívá, reakce probíhá pomalu a vzniká při ní více kombinací MAGů (1-monoacylglycerol, 2-monoacylglycerol). [6]



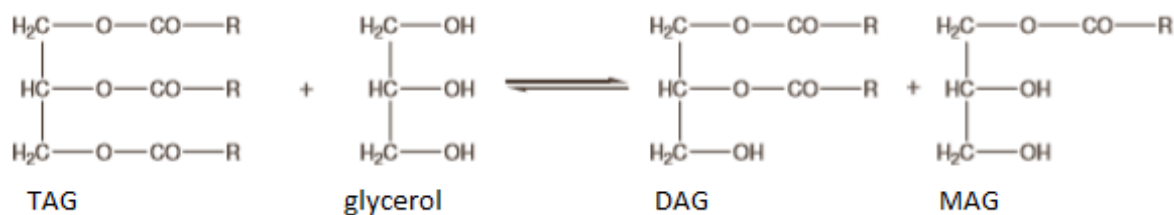
Obrázek č. 3: Schéma esterifikace mastné kyseliny glycerolem [2, 6]

1.2.2 Inesterifikace

Inesterifikaci lze provádět několika způsoby. Je možné provést alkoholýzu, kdy ester reaguje s alkoholem nebo acidolýzu, kdy ester reaguje s mastnou kyselinou. Poslední možností je transesterifikace. Při transesterifikaci reaguje ester s esterem. Mezi estery dochází ke vzájemné výměně acylových zbytků. [6, 7]

1.2.2.1 Alkoholýza

Nejčastěji využívanou metodou průmyslové přípravy MAG je kontinuální glycerolýza přírodních tuků a olejů (Obr. č. 4). TAG reaguje s glycerolem za velmi vysokých teplot (minimálně 170 °C) a to z důvodu nízké rozpustnosti TAG za nízkých teplot. TAG postupně přecházejí na DAG a poté i na MAG. Jako katalyzátory se můžou použít například hydroxid sodný, hydroxid draselný. V některých případech je možné také použít sodík nebo draslík v práškové formě. Reakce je energeticky náročná. Další nevýhodou je, že i výtěžnost reakce není vysoká, činí 50-55 %. Produkty reakce se přečišťují destilací. Touto metodou se nejčastěji vyrábí MAG pro tukový a potravinářský průmysl. [10, 11]



Obrázek č. 4: Schéma glycerolýzy [2, 6]

1.2.2.2 Acidolýza

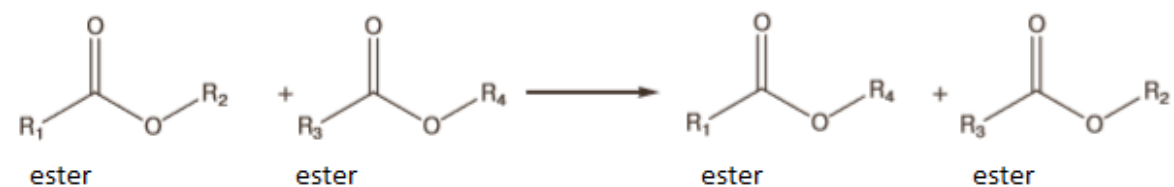
Při acidolýze reaguje karboxylová skupina volné kyseliny s daným esterem (Obr. č. 5). Při této reakci vzniká meziprodukt, ze kterého se uvolní kyselina, která byla předtím vázaná v esteru a vytvoří se nový ester. Acylový zbytek jedné MK se vymění za kyselinový zbytek jiné MK za vzniku TAG. Acidolýza probíhá samovolně při 250 °C, za katalýzy kyselinou sírovou. Po ukončení reakce probíhá hydrolyzáza, kdy z TAG vznikají MAG. [6, 21]



Obrázek č. 5: Schéma acidolýzy [2, 6]

1.2.2.3 Transesterifikace

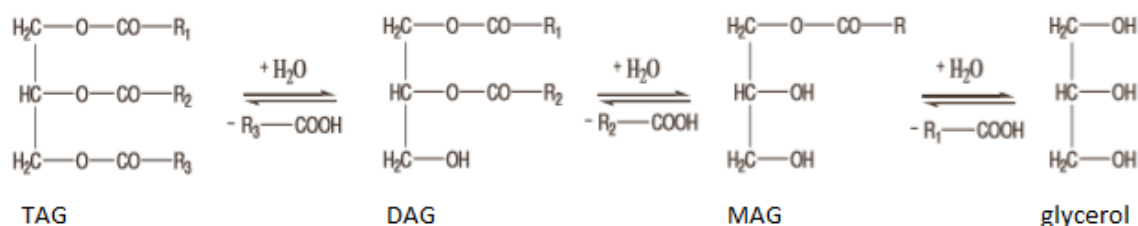
Při transesterifikaci se vymění kyselé nebo alkoholové části mezi dvěma molekulami esterů (Obr. č. 6). Esterová výměna mastných kyselin TAG je reakce, která výrazně ovlivní vlastnosti produktů. Velké využití této reakce je zejména při výrobě emulgovaných tuků. Reakce může probíhat způsobem nahodilým, tj. randomizací, nebo řízenou inesterifikací. [21]



Obrázek č. 6: Schéma transesterifikace [2, 6]

1.2.3 Parciální hydrolýza triacylglycerolů

Hydrolýza je obrácená esterifikace. Z výchozích TAG postupně vznikají DAG, poté MAG (Obr. č. 7). Reakce vede až ke vzniku mastných kyselin a glycerolu. Reakce probíhá za vysoké teploty a také podtlaku. Nutná je i přítomnost nejčastěji zásaditých katalyzátorů. V současnosti se tato reakce využívá spíše pro výrobu mastných kyselin, monoacylglyceroly jsou vedlejšími produkty. [6]



Obrázek č. 7: Schéma parciální hydrolýzy TAG [2, 6]

1.2.4 Adice mastné kyseliny na glycidol

Nejnovějším způsobem přípravy MAG je adice mastných kyselin na glycidol (Obr. č. 8) a to nukleofilním otevřením epoxidového kruhu. Jako katalyzátory reakce se používají terciární aminy, amoniové soli a komplexy tranzitních kovů (např. chrom, hliník, titan a jiné). Hlavní výhodou této reakce je její univerzálnost a vysoký stupeň konverze (více než 95 %). Jejich nevýhoda tkví v přítomnosti nežádoucích složek použitého chromitého katalyzátoru a glycidolu. Pro použití v potravinářství je nutné produkt přechistit, aby obsah nežádoucích složek vyhovoval daným normám pro použití v potravinářství. [7, 8, 9]

Výše zmíněný způsob výroby byl laboratorně využit při tvorbě této diplomové práce.



Obrázek č. 8: Schéma adice mastné kyseliny na glycidol [2, 6]

1.3 Využití monoacylglycerolů v potravinářství

MAGy patří mezi nejužívanější potravinářské emulgátory (E 471). Množství MAG, které lze do potravin přidat, je regulováno (Tabulka č. 1). [14]

Tabulka č. 1: Povolené přídavky monoacylglycerolů (E 471) v potravinách [14]

Název potraviny	Množství E 471
Piškoty, sušenky, suchary, obilné výrobky a ostatní druhy dětské výživy	5000 mg/kg
Neemulgované tuky a oleje (kromě olivového oleje)	10000 mg/kg
Chléb	nez. množství
Kakao	nez. množství
Mléčná výživa určená k výživě kojenců	4000 mg/kg

V pekárenství se aplikují jako součást pekařských tuků. MAG zvyšuje fermentační stabilitu těsta. Těsto je po vykynutí odolnější vůči mechanickým zásahům. MAG vyšších mastných kyselin (laurové, myristové, palmitové a stearové) tvoří s amylosou komplexy. Tyto komplexy s amylosou jsou nerozpustné ve vodě. Samotná amylosa je ve vodě rozpustná. Díky nerozpustnosti mají příznivý účinek na stárnutí pečiva. Mají schopnost zadržovat větší množství vody, díky čemuž se předejde ztrátě čerstvosti pečiva a jeho tvrdnutí. Díky interakcím MAG a bílkovin mouky dojde také ke zlepšení reologických parametrů kynutých těst. Těsta se lépe zpracovává, struktura zadržuje vytvořený oxid uhličitý, pečivo má vyšší objem a je křehčí. [6]

Velké využití MAG je také v mlékárenském průmyslu a to zejména při výrobě mražených krémů, zmrzlin a jogurtů. MAG usnadňují lepší zašlehání vzduchu, zjemňují strukturu výrobku a tím mu dávají i větší pevnost. Díky těmto vlastnostem je využití MAG také u šlehaných cukrářských výrobků. [12] Přídavek MAG je možný i při výrobě těstovin. Díky jejich vlastnostem nejsou těstoviny po vaření mazlavé, nelepí se a zachovávají si pevnost.

V cukrovinkářském průmyslu se používají ke snížení lepivosti bonbónů. [6]. V tukařském průmyslu se MAG využívají jako emulgátory při výrobě margarínů. Emulze typu olej ve vodě je stabilizována MAG. Přídavek MAG způsobí rovnoměrné rozložení kapiček vody v tuku a tím i hladkou konzistenci. [6, 13] MAG kyseliny palmitové a stearové se přidávají do čokolád a polev. Brání migraci tuků a jejich vykvétání na povrchu [6].

1.4 Antimikrobiální účinky monoacylglycerolů

Antimikrobiální aktivita mastných kyselin je známa již řadu let. Mýdla (soli mastných kyselin) se používají k čištění a dezinfekci dokonce ještě delší dobu. Přesto výzkum antimikrobiálních vlastností mastných kyselin začal až ve 30. letech 20. století. Až v 70. letech vědci přišli na to, že antimikrobiální vlastnosti mléčného tuku závisí na aktivitě lipáz, které uvolňují volné mastné kyseliny a jejich příslušné monoacylglyceroly [15, 16].

Antimikrobiální účinky mastných kyselin a monoacylglycerolů závisí především na struktuře molekuly. Důležitá je délka uhlíkového řetězce, pak také počet a poloha nenasycených vazeb. [17] Dle obecné charakteristiky lze říci, že MAG mastných kyselin s krátkým nebo středně dlouhým řetězcem, (12 uhlíků a méně) jsou účinnějšími antibakteriálními látkami než MAG mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Nižší antimikrobní účinek je pravděpodobně spojen se vzrůstajícím hydrofobním efektem a nižší rozpustností. [18] Účinek MAG na bakterie je také ovlivněn typem buněčné stěny. Rozdílnost stavby a složení buněčné stěny způsobuje, že grampozitivní bakterie jsou více citlivé na MAG než gramnegativní bakterie. Gramnegativní bakterie mají buněčnou stěnu bohatší na lipopolysacharidy, která bakterie chrání proti působení MAG. [17, 19]

Existuje řada studií zaměřených na antibakteriální působení MAG na grampozitivní i gramnegativní bakterie. Studie Růžičky a kol. porovnává účinky MAG C10:0 (monoacylglycerol kyseliny kaprinové) a MAG C12:0 (monoacylglycerol kyseliny laurové) na růst některých druhů bakterií, kvasinek a vláknitých hub. Výsledky stanovení prokázaly, že minimální inhibiční koncentrace (MIC) monoacylglycerolu kyseliny kaprinové se pohybuje v koncentraci 100 - 250 mg/l. Tato koncentrace je schopna zcela zastavit růst všech testovaných grampozitivních bakterií a kvasinek. Koncentrace 100 - 400 mg/l zastavuje růst většiny vláknitých hub. [20] Vysoká účinnost těchto dvou MAG byla zjištěna u mnoha

grampozitivních bakterií (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, bakterií rodu *Bacillus* a *Clostridium*). [21, 22, 23]

MAG C8:0 (monoacylglycerol kyseliny kaprinové) vykazuje nejvyšší aktivitu proti grampozitivním kokům. MAG způsobuje usmrcení bakterií narušením jejich cytoplazmatické membrány a štěpením lipidů. Tento mikrobicidní účinek se využívá k prevenci a léčbě infekčních onemocnění způsobených grampozitivními bakteriemi. [24, 25] Antimikrobní účinky se zvyšují kombinací MAG. [26]

Monoacylglycerol kyseliny laurové je nejvíce studovaný monoacylglycerol. Tento monoacylglycerol vykazuje silné antimykotické účinky. [27] Antifungální účinky byly prokázány u kvasinek (*Candida albicans*, *Sacharomyces cerevisiae*) a také u plísní rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. [28]

V neposlední řadě je využití monoacylglycerolů možné i v medicíně. Některé monoacylglyceroly vykazují cytotoxické účinky na nádorové buňky. [26, 29]

2 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy jsou organické heterocyklické sloučeniny, které mají vysokou biologickou aktivitu. Při jejich vzniku dochází k uvolnění oxidu uhličitého, kofaktorem je pyridoxalfosfát. [30]

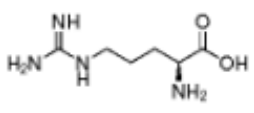
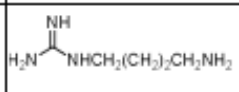
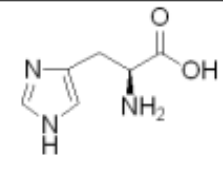
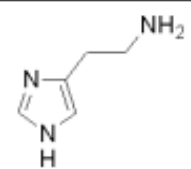
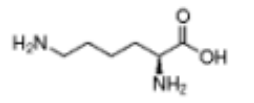

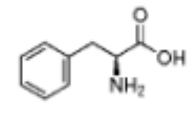
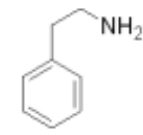
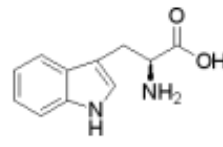
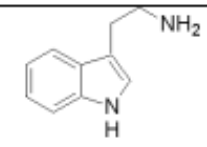
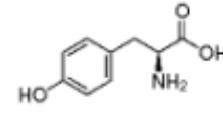
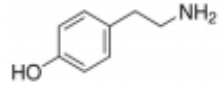
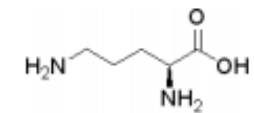

2.1 Charakteristika a vlastnosti biogenních aminů

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární dusíkaté látky, vznikající především dekarboxylací příslušných aminokyselin. Vznikají také aminací nebo transaminací aldehydů a ketonů. Jejich struktura je buď alifatická (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatická (tyramin, fenyletylamin), nebo heterocyklická (histamin, tryptamin). Biogenní aminy jsou syntetizovány jak mikrobiálním, tak i rostlinným nebo živočišným metabolismem. Biogenní aminy, které mohou způsobit otravy jídlem, jsou především agmatin, histamin, kadaverin, fenyletylamin, tryptamin, tyramin a putrescin. Prekurzory a samotné biogenní aminy jsou uvedeny v Tabulce č. 2. [31, 32, 33]

Biogenní aminy jsou součástí přírodních složek rozšířených v potravinách a nápojích. V potravinách vznikají biogenní aminy buď dekarboxylázovou aktivitou endogenních enzymů nebo je jejich vznik podmíněn přítomností dekarboxyláza-aktivních mikroorganismů za podmínek příznivých pro enzymatickou aktivitu těchto mikroorganismů. Vzhledem k produkci dekarboxyláz, může přítomnost biogenních aminů v potravinách sloužit jako detekce kažení potravin. [35]

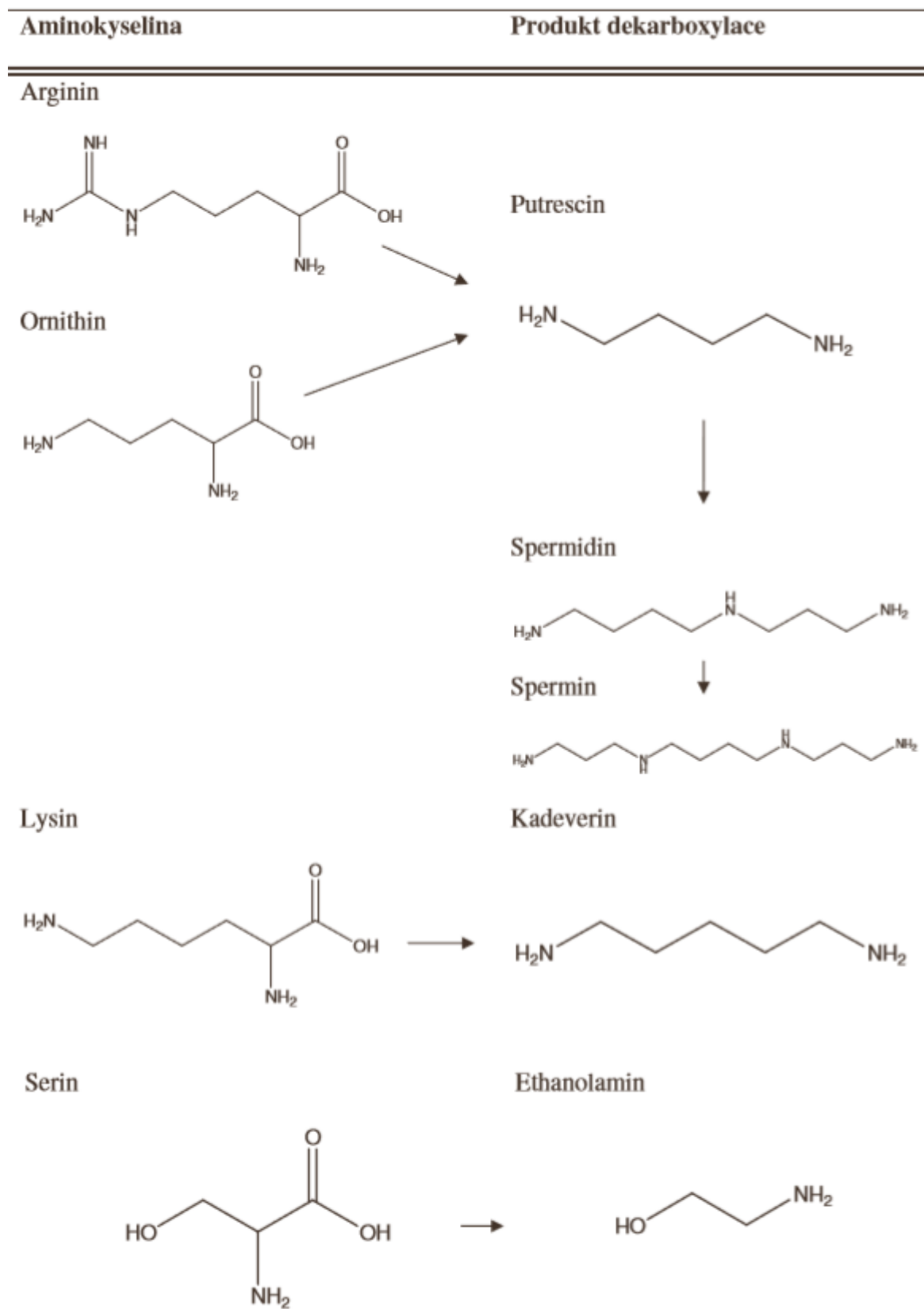
Menší množství biogenních aminů, které organismus přijme, nezpůsobí zpravidla žádné zdravotní komplikace, aminy jsou metabolizovány. Problém nastává, při příjmu vysokého množství biogenních aminů potravinami. Příjem vysokého množství biogenních aminů může způsobit řadu zdravotních problémů, jako například bolesti hlavy, zvýšení krevního tlaku, nauzea, pocit na zvracení a jiné. [31, 32]

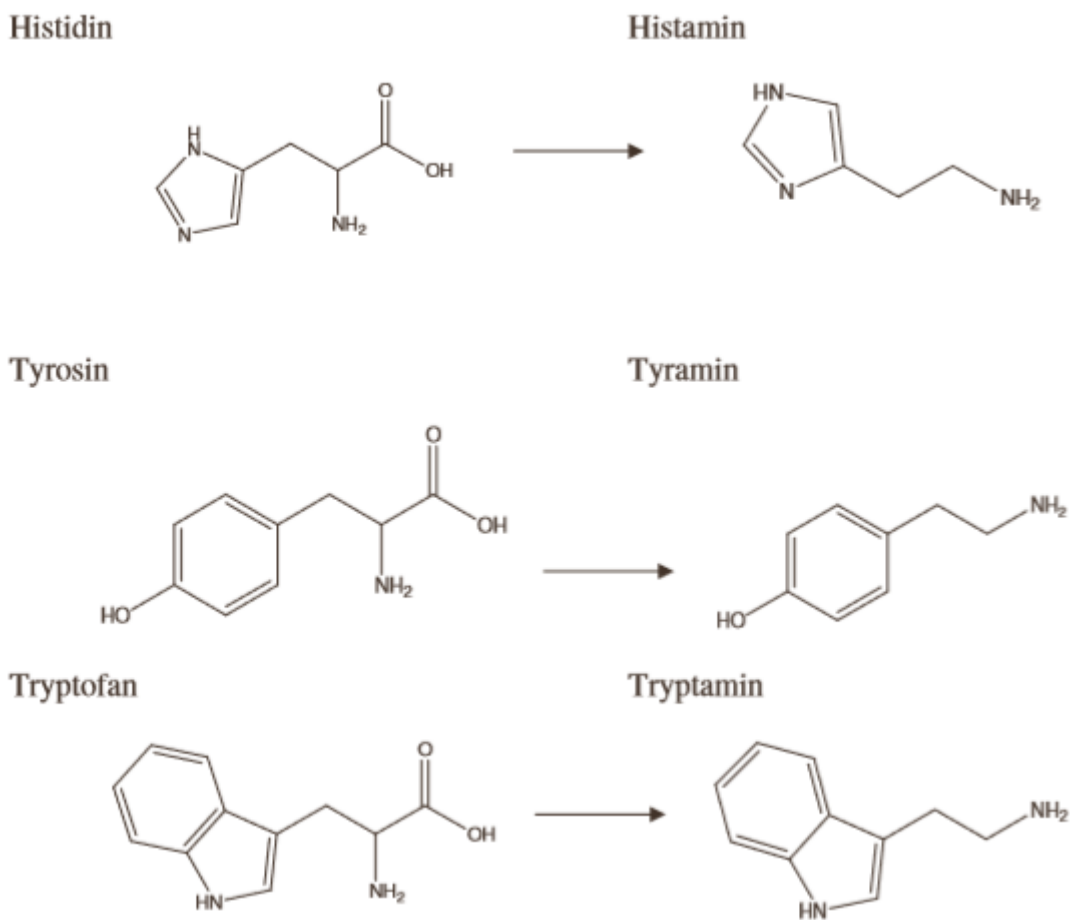
Tabulka č. 2: Přehled některých biogenních aminů [34]

Prekurzor		Biogenní amin	
Arginin		Agmatin	
Histidin		Histamin	
Lyzin		Kadaverin	
Fenylalanin		Fenyletylamin	
Tryptofan		Tryptamin	
Tyrozín		Tyramin	
Ornitiin		Putrescin	

2.2 Vznik a výskyt biogenních aminů

Syntéza biogenních aminů probíhá dekarboxylací původního prekurzoru (příslušné aminokyseliny). Pro vznik biogenních aminů v potravinách je nutná přítomnost mikroorganismů s dekarboxylační aktivitou. Tyto mikroorganismy se vyskytují v potravinách jako jejich součást, případně jsou do potravin vneseny jako kontaminanty během zpracování potravin. [36, 37] Schéma dekarboxylace některých biogenních aminů je uvedeno na Obr. č. 9.





Obrázek č. 9 : Schéma vzniku některých biogenních aminů [38]

Výskyt biogenních aminů lze předpokládat ve všech potravinách, které obsahují bílkoviny, volné aminokyseliny a jsou uchovávány za podmínek, které umožní aktivitu mikrobiálních dekarboxyláz. Celkové množství vzniklých biogenních aminů závisí na druhu potraviny a přítomnosti mikroorganismů. [31, 34, 39]

Výskyt a význam biogenních aminů a jejich účinky pro lidský organismus jsou uvedeny v *Tabulce č. 3.*

Tabulka č. 3: Biogenní aminy a jejich účinky na organismus [38]

Aminokyselina	Produkt dekarboxylace	Výskyt a význam
Arginin	Agmatin, ornitin	bakterie střevní mikroflóry
Cystein	Cysteamin	koenzym A
Fenylalanin	β -fenylethylenamin	alkaloidní hormon
Histidin	Histamin	krevní tlak, sekrece žaludečních šťáv
kyselina asparagová	α -alanin β -alanin	koenzym A, pantotenová kyselina
kyselina glutamová	kyselina α -aminomáselná kyselina γ -aminomáselná	mozek, blokuje ganglia
Lysin	Kadaverin	ribozomy, bakterie
Methionin	Spermidin » spermin	spermie, ribozomy
Ornitiin	Putrescin	ribozomy, bakterie
Serin	Ethanolamin	cholin, fosfolipidy
Threonin	Propanolamin	vitamín B ₁₂
Tryptofan	Triptamin	hormon
Tyrosin	Tyramin	kontrakce dělohy
3,4-dihydroxyfenylalanin	Dopamin	tkáňový hormon

2.3 Faktory ovlivňující vznik biogenních aminů

Tvorba biogenních aminů je závislá na více faktorech. Důležité faktory jsou především ty, co ovlivňují surovinu, což je složení potraviny, pH a zdroj substrátu (dostupnost aminokyselin) a další. Tyto faktory jsou spjaty s bakteriálním druhem daného dekarboxyláza-pozitivního mikroorganismu. Kombinace daných faktorů pak ovlivňuje výslednou koncentraci biogenních aminů. Faktory jsou na sobě závislé, ovlivňují je i například skladovací podmínky. [40]

2.3.1 Přítomnost zkvasitelných cukrů

Přítomnost zkvasitelných sacharidů, jako je třeba glukóza, může podpořit, ale také inhibovat růst i dekarboxylázovou aktivitu bakterií. Optimální koncentrace glukózy pro tvorbu dekarboxyláz je od 0,5 % do 2 %. Koncentrace nad 3 % však dekarboxylázovou aktivitu inhibuje. [41]

2.3.2 pH

Vodíkový exponent výrazně ovlivňuje množství přítomných mikroorganismů. Dekarboxylázová aktivita je vyšší v kyselějším prostředí, optimum pH 4 až 5. Nízké pH stimuluje produkci a má pozitivní vliv na aktivitu dekarboxylázových enzymů. [40]

2.3.3 Teplota

Tvorba biogenních aminů je také závislá na teplotě. Nízké teploty působí inhibičně, snižují aktivitu dekarboxylázových enzymů. Toto pravidlo však neplatí vždy. Některé bakterie produkují biogenní aminy i při teplotách nižších než je 5 °C. [42]

2.3.4 Přítomnost kyslíku

Vakuové balení nebo balení v ochranné atmosféře, kdy se upraví koncentrace kyslíku nebo se změní složení plynů, se běžně používá k prodloužení trvanlivosti potravin. Tím, že se sníží koncentrace kyslíku, ovlivní se tím růst některých mikroorganismů, které mohou mít vliv na produkci biogenních aminů. [40]

2.4 Mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou

Hlavní producenti biogenních aminů z potravinářského pohledu jsou především bakterie mléčného kvašení, které je mohou produkovat v průběhu fermentace. Mimo bakterie mléčného kvašení produkují biogenní aminy také některé druhy kvasinek, jako například *Saccharomyces cerevisiae* a také *Brettanomyces bruxellensis*. Tyto kvasinky jsou zodpovědné za tvorbu biogenních aminů ve víně. [43]

Enterobacteriaceae, gramnegativní tyčinky, mohou produkovat histamin, putrescin a kadaverin. Tyto bakterie bývají přítomny v mléce. Produkci biogenních aminů v sýrech zajiš-

řují převážně bakterie mléčného kvašení, a to rodu *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* a *Streptococcus*. Mimo bakterie mléčného kvašení, byla v sýrech zjištěna přítomnost dalších dekarboxyláza aktivních mikroorganismů, a to některých druhů kvasinek. Několik kmenů *Debaryomyces hansenii* a *Yarrowia lipolytica*, bylo schopno produkovat histamin a tyramin. [44]

Diskutovaným biogenním aminem z výživového hlediska v rybách je histamin. Nejvyšší dekarboxylázovou aktivitou bakterií produkujících histamin v rybím mase se vyznačují *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae* a *Morganella morganii*. Produkce histaminu je závislá na teplotě skladování. Produkce histaminu v rybím mase byla popsána také u mnoho dalších mikroorganismů – *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Photobacterium phosphoreum*, *Photobacterium damsela* a *Raoultella planticola*, *Serratia fonticola*, *Serratia liquefaciens*, *Vibrio alginolyticus*. [45]

2.5 Možnosti stanovení biogenních aminů

Stanovení biogenních aminů v potravinách je proces zahrnující více kroků. Proces může zahrnovat extrakci, přečištění, zakoncentrování, derivatizaci, separaci a kvantifikaci. Běžně používanou metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s fluorescenční nebo ultrafialovou detekcí před/po kolonové derivatizaci aminů. Lze také využít chromatografii na tenké vrstvě (TLC), kapilární elektroforézu (CE) případně plynovou chromatografii (GC) s detekčními systémy. [46, 47]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Hlavním cíl práce bylo:

- stanovení vlivu monoacylglycerolů a mastných kyselin na vybrané bakterie s dekarboxylázovou aktivitou

Dílčími cíli práce byla:

- výroba monoacylglycerolů
- porovnání inhibičního vlivu monoacylglycerolů a mastných kyselin na vybrané bakterie

4 MATERIÁL A POUŽITÉ METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Použité mikroorganismy

V diplomové práci bylo testováno celkem 10 bakterií, u kterých byla dříve prokázána schopnost produkce biogenních aminů. Bakterie byly získány ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora (CCDM) nebo z České sbírky mikroorganismů (CCM).

Lactococcus lactis subsp. *lactis* CCDM 48

Lactococcus lactis subsp. *lactis* CCDM 141

Lactococcus lactis subsp. *lactis* CCDM 1004

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* CCDM 824

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* CCDM 946

Enterococcus durans CCDM 53

Enterococcus faecalis CCM 2665

Enterococcus faecalis CCM 4224

Salmonella enterica subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

Proteus mirabilis CCM 7188

4.1.2 Kultivační půdy

Pro diskovou difúzní metodu byly vyrobeny kultivační půdy M17 a BHI (HiMedia, Indie) a to smícháním příslušného množství agaru s deionizovanou vodou. Přes rozlívání půd na Petriho misky byly půdy autoklávovány.

4.1.3 Zásobní roztoky

Monoacylglyceroly

Monoacylglyceroly byly vyrobeny adicí příslušné mastné kyseliny na glycidol za katalytického působení chromium III acetát hydroxid (vše Sigma-Aldrich), viz kapitola 4.3.2.

Zásobní roztoky monoacylglycerolů byly připraveny v koncentraci 5 % (w/v) a to tak že bylo rozpuštěno 1 g příslušného MAG ve 20 ml absolutního etanolu (LachNer).

Antibakteriální účinky byly sledovány pro následující monoacylglyceroly:

Monoacylglycerol kyseliny kaprylové – monokaprylin, MAG C8:0

kyseliny kaprinové – monokaprin, MAG C10:0

kyseliny laurové – monolaurin, MAG C12:0

Monoacylglyceroly byly naředěny masopeptonovým bujónem na koncentrace 25 mg/l, 50 mg/l, 100 mg/l, 250 mg/l, 500 mg/l, 1000 mg/l a 1500 mg/l a to dle Tabulky č. do objemu 4 ml.

Tabulka č. 4 Příprava koncentrací MAG

Koncentrace MAG (mg/l)	25	52	100	250	500	1000	1500
Objem zásobního roztoku (μl)	2	4	8	20	40	80	120

Mastné kyseliny

Zásobní roztoky mastných kyselin byly připraveny v koncentraci 5 % (w/v) a to tak že bylo rozpuštěno 1 g příslušného MAG ve 20 ml absolutního etanolu (LachNer).

Antibakteriální účinky byly sledovány pro následující mastné kyseliny:

Kyselina kaprylová - C8:0

kyselina kaprinová - C10:0

kyselina laurová - C12:0

Mastné kyseliny byly naředěny masopeptonovým bujónem na koncentrace 25 mg/l, 50 mg/l, 100 mg/l, 250 mg/l, 500 mg/l, 1000 mg/l a 1500 mg/l a to dle Tabulky č. do objemu 4 ml.

Tabulka č. 5 Příprava koncentrací mastných kyselin

Koncentrace MK (mg/l)	25	52	100	250	500	1000	1500
Objem zásobního roztoku (μl)	2	4	8	20	40	80	120

Fyziologický roztok

Fyziologický roztok byl připraven smícháním příslušného množství NaCl (LachNer) a deionizované vody. Roztok byl autoklávován.

4.2 Pomůcky a přístroje

- Dvouplášťový reaktor s možností temperance
- magnetické míchadlo MM4 s ohřevem
- automatická byreta – Bürette Digital 25 ml
- Analytické váhy Sartorius, BA 110S
- Autokláv Systec 2540EL
- Autokláv Varioklav H+P
- Automatické mikropipety Nichyrio, Biohit
- Biologický termostat Memmert INE 600
- Chladnička Electrolux
- Spektrofotometr LIBRA S6
- Fotometr TECAN Sunrise TW/TC
- Třepačka BIOSAN, Multi- Shaker PSU 20
- Zařízení pro deionizaci vody Aqua Osmotic, typ 02
- běžné laboratorní sklo a pomůcky

4.3 Metody

4.3.1 Příprava suspenze bakterií a disková difúzní metoda

Bakterie, uchovávané v mrazničce, byly oživeny a následující den po oživení z nich byly připraveny suspenze kultivací v příslušných bujónech při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. Suspenze bakterií byla naředěna fyziologickým roztokem na hodnotu cca 0,5 dle stupnice McFarlanda.

Zředěná kultura byla rozetřena hokejkou na Petriho misky s příslušnou půdou (laktokoky a enterokoky na M17, *Salmonella* a *Proteus* na BHI). Na misku byly poté za aseptických podmínek položeny rovnoměrně papírové disky, které byly poté jemně přitisknuty pinzetou k půdě. Na disky se dále pipetovalo 10 µl MAG/mastné kyseliny o příslušné koncentraci a na disku uprostřed misky bylo pipetováno 10 µl sterilní destilované vody jako kontrola. Po vsáknutí inhibiční látky byly misky kultivovány při 30 °C / 24 – 48 hodin. Po uplynutí kultivace byly změřeny průměry inhibiční zóny kolem jednotlivých disků a výsledky byly zaznamenány do tabulky, viz kapitola 5.1.1.

4.3.2 Příprava monoacylglycerolů

Příprava ethanolickeho 0,1M KOH

Byla spočítána navážka KOH ($M=56,1$ g/mol, $c=0,1$ M, $V=0,5$ l):

$$m = c \cdot V \cdot M = 0,1 \cdot 0,5 \cdot 56,1 = 2,805 \text{ g}$$

Navážka 2,805g byla dána do kádinky. Navážka byla rozpuštěna v malém množství vody a převedena kvantitativně do 500 ml odměrné baňky a doplněna po rysku ethanolom. KOH se uchovával v láhvi se zábrusem chráněné před světlem. [48]

Stanovení přesné koncentrace KOH

Standardem pro stanovení přesné koncentrace KOH byla 0,1M kyselina oktanová ($M=144,21$ g/mol, $c=0,1$ M, $V=0,025$ l) rozpuštěná v ethanolu (96 %):

$$m = c \cdot V \cdot M = 0,1 \cdot 0,025 \cdot 144,21 = 0,3605 \text{ g}$$

Navážené množství bylo rozpuštěno v ethanolu (96 %) a doplněno po rysku v 25ml odměrné baňce. 5ml 0,1M kyseliny bylo dáno do titrační baňky přidáno 3 kapek fenolftaleinu a titrováno 0,1M KOH. Dle spotřeb KOH byla vypočtena přesná koncentrace KOH. [48] Výsledky výpočtu jsou uvedeny v Tabulce č. 4.

$$c_{\text{KOH}} = \frac{5}{\bar{O}a.c} = 0,07833 \text{ g / mol}$$

a – průměrná spotřeba KOH při titraci (ml) – tři stanovení

5 – pipetované množství pro titraci (ml)

Tabulka č. 6 Spotřeby KOH při stanovení přesné koncentrace

	Spotřeba KOH (ml)	Průměrná spotřeba KOH (ml)	Skutečná koncentrace KOH (g/mol)
MAG 8	6,40	6,3833	0,07833
	6,37		
	6,38		
MAG 10	6,90	6,89	0,07257
	6,86		
	6,91		
MAG 12	6,64	6,58	0,07599
	6,57		
	6,54		

Příprava samotné směsi do reaktoru u MAG C 8:0

Reaktor byl zapnut předem na teplotu 90°C. Směs do reaktoru byla sestavena z mastné kyseliny a glycidolu (Sigma-Aldrich), v poměru 1:1,2 a katalyzátoru. [48] Vypočtené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce č. 5.

Výpočet množství katalyzátoru:

$$\begin{aligned}
 160,9708 \text{ g} & \dots\dots\dots 100 \% \\
 x & \dots\dots\dots 0,5 \% \\
 x = 0,5 \cdot 160,9708 / 100 & = \underline{0,8048 \text{ g katalyzátoru}}
 \end{aligned}$$

Výpočet množství glycidolu:

$$M_{\text{glycidol}} = 74,08 \text{ g/mol};$$

$$M_{\text{kyseliny oktanové}} = 144,21 \text{ g/mol}$$

$$\begin{aligned}
 144,21 \text{ g/mol} & \dots\dots 74,08 \text{ g/mol} \\
 99,582 \text{ g} & \dots\dots\dots x \text{ g} \\
 x = 99,582 \cdot 74,08 / 144,21 & \rightarrow 51,1548 \text{ g glycidolu}
 \end{aligned}$$

Dle poměru 1,2:1 \rightarrow 1,2 · 51,1548 \rightarrow 61,3888 g glycidolu

Přepočítáváme přes hustotu, glycidol = 1,116 g/cm³ na objem

$$V = m/\rho = \underline{55,00 \text{ ml glycidolu.}}$$

Kyselina byla postupně dávkována do reaktoru s míchadlem do jejího úplného rozpouštění. Po rozpuštění kyseliny byl do reaktoru přidáván 0,5% (w/w) katalyzátor chromium acetát hydroxid (Sigma-Aldrich). Reakce byla nechána 30 minut probíhat. [48]

Po uplynutí 30 minut byl přidán do reakční směsi glycidol. Následně byl na reaktor nasazen vzduchový chladič. Po uplynutí doby 120 min byl odebrány 3 kapky MAG, vzorek byl zvážen, bylo přidáno 5 ml směsi xylen/ethanol (1:1), 3 kapky fenolftaleinu a vzorek byl titrován 0,1M KOH. [48]

Ze spotřeby KOH, byl stanoven stupeň konverze:

$$\%C = \frac{a \cdot c_{KOH} \cdot M_{kyseliny}}{1000 \cdot m \cdot p} \cdot 100 = \frac{0,118 \cdot 0,07833 \cdot 144,21}{1000 \cdot 0,118 \cdot 0,6151} = 1,83\%$$

$$KONV = 100 - \%C = \underline{98,16\%}$$

a spotřeba 0.1 M ethanolického roztoku KOH [ml]

C_{KOH} přesná koncentrace ethanolického roztoku KOH [mol/l]

M_K molární hmotnost mastné kyseliny [g/mol]

m skutečná navážka vzorku MAG pro titraci [g]

p poměr skutečné navážky kyseliny do reakce k celkové hmotnosti všech reaktantů

$\% C$ hmotnostní % mastné kyseliny vztažená na její navážku do reakce

Tabulka č. 7 Vypočítané hodnoty množství glycidolu, katalyzátoru a stupně konverze

	Množství glycidolu (ml)	Množství katalyzátoru (g)	Průměrný stupeň konverze (%)
MAG 8	55,00	0,8048	98.37
MAG 10	53,70	0,7883	99.08
MAG 12	52,08	0,7592	99,19

Poté byl sundán chladič a reakce byla nechána ještě 30 min dobíhat, aby se odpařit glycidol. Po uplynutí této doby byl převeden horký MAG přes Büchnerovu nálevku do Erlenmayerovy baňky. Poté byl přelit do kádinky a byl přidán ethanol (96 %) v cca dvojnásobném množství. Kádinka byla opatřena parafilmem a do druhého dne byla nechána v mrazničce. Druhý den byl MAG rozpuštěn při laboratorní teplotě a byl přidán čistý líh a opět byl vložen do mrazničky. Další den se postup opakoval, MAG již však nebyl vložen do mrazničky, ale ethanol byl odpařen na vakuové odparce. Odpařený MAG byl přelit do kádinky,

bylo přidáno dvojnásobné množství ethanolu a opět byl nechán do druhého dne v mrazničce vykristalizovat. Následující den byl po rozmrazení při laboratorní teplotě zfiltrován přes Büchnerovu nálevku a nechán schnout při laboratorní teplotě. [48]

4.3.3 Sledování vlivu monoacylglycerolů/mastných kyselin na růst buněk diluční metodou

Vliv inhibičních účinků monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst bakterií byl sledován s použitím přístroje TECAN Sunrise TW/TC. Růst bakterií byl pozorován na mikrotitračních destičkách v čase 0, po dobu 24 a 48 hodin při teplotě 25 °C. Růst bakterií byl hodnocen jako změna optické hustoty (OD) suspenze buněk. Nárůst bakterií byl měřen při vlnové délce 600 nm ihned po přípravě, po 24 hodinách a po 48 hodinách. Před každým měřením byl vzorek protřepán po dobu 5 sekund. Přístroj byl řízen pomocí software Magellan. Do každé z jamek mikrotitrační destičky byl pipetován vzorek v celkovém objemu 205 µl, a to 200 µl příslušného kultivačního média (MPB a M17) s příslušnou koncentrací monoacylglycerolu/mastné kyseliny a 5 µl suspenze bakterií. Růst buněk byl u všech testovaných bakterií sledován při následujících koncentracích MAG/MK: 25 mg/l, 50 mg/l, 100 mg/l, 250 mg/l, 500 mg/l, 1000 mg/l a 1500 mg/l (w/v). Jako pozitivní kontrola byly použity jamky, do kterých bylo pipetováno 200 µl kultivačního média bez příslušného monoacylglycerolu/mastné kyseliny a 5 µl suspenze bakterií. V případě negativní kontroly bylo do jamek pipetováno 200 µl bujónu obsahujícího MAG v příslušné koncentraci bez buněčné suspenze. Z naměřených hodnot optické hustoty byl vypočítán index růstu a poté byly sestrojeny grafy. Změny růstu bakterií v prostředí s monoacylglyceroly byly hodnoceny jako index růstu (IR) [49]:

$$IR = \frac{(OD_{600} - NK)}{PK} \cdot 100$$

Kde IR je index růstu, OD_{600} optická hustota testované kultury v médiu s příslušnou koncentrací MAG/MK, NK optická hustota negativní kontroly pro příslušnou koncentraci MAG/MK a PK optická hustota pozitivní kontroly. [49]

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Vliv monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst bakterií

Pro sledování účinků monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst bakterií byly zvoleny tři mastné kyseliny a jejich monoacylglyceroly a to kyselina kaprylová (C 8:0) a její monoacylglycerol, kyselina kaprinová (C 10:0) a její monoacylglycerol a kyselina laurová (C 12:0) a její monoacylglycerol. Vliv MK a jejich MAG byl pozorováno u deseti mikroorganismů. Mikroorganismy byly jak grampozitivní, tak také gramnegativní. Mezi grampozitivní byly vybrány *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, *Enterococcus durans* CCDM 53, *Enterococcus faecalis* CCM 2665, *Enterococcus faecalis* CCM 4224. Gramnegativní *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420, *Proteus mirabilis* CCM 7188. Všechny testované bakterie disponují dekarboxylázovou aktivitou.

Bakterie byly oživeny a kultivovány v M17 a masopeptonovém bujónu při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. Poté byly aplikovány na Petriho misky a mikrotitrační destičku. U diskové difúzní metody byla měřena inhibiční zóna růstu okolo disku. U mikrotitrační metody byl nárůst bakterií měřen při vlnové délce 600 nm ihned, po 24 hodinách a po 48 hodinách. Z naměřených hodnot optické denzity byl vypočítán index růstu bakterií a hodnoty byly zaznamenány do grafů. Vztah pro výpočet indexů růstu zohledňuje i vznik případného zákalu po přidání MAG bujónu (odečet hodnoty optické denzity negativní kontroly - viz kapitola 4.3.3 metodika práce).

5.1.1 Disková difúzní metoda

Účinky zvolených monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst vybraných bakterií byly sledovány v rozmezí koncentrací MAG/MK 25 – 1500 mg/l. U všech mikroorganismů byla zaznamenána nulová inhibiční zóna při použití MK jako inhibičních látek. Ve všech použitých koncentracích mastných kyselin (25 – 1500 mg/l) se ne vytvořila žádná inhibiční zóna. Mastné kyseliny dle stanovení pomocí diskové difúzní metody nepůsobí inhibičně na růst vybraných mikroorganismů. V Tabulce č. 6 jsou uvedeny velikosti inhibiční zóny při použití MAG. U všech grampozitivních mikroorganismů byla zaznamenána inhibiční zóna nad 1000 mg/l, případně 1500 mg/l příslušného MAG.

U *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 byla zaznamenaná inhibiční zóna při koncentraci MAGů 1500 mg/l. U MAG C8:0 a C 10:0 měla zóna 20 mm a u MAG C12:0 16 mm. U *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 byla zaznamenaná inhibiční zóna při koncentraci MAG 1000 mg/l a 1500 mg/l. U všech MAG měla zóna při koncentraci 1000 mg/l 16 mm a při koncentraci 1500 mg/l 20 mm. U *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 byla zaznamenaná inhibiční zóna při koncentraci MAG 1000 mg/l a 1500 mg/l. U všech MAG měla zóna při koncentraci 1000 mg/l 18 mm a při koncentraci 1500 mg/l 22 mm. U *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 byla zaznamenaná inhibiční zóna při koncentraci MAG 1500 mg/l. U MAG C8:0 měla zóna 16 mm a u MAG C10:0 14 mm a u MAG C12:0 16 mm. U *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 byla zaznamenaná inhibiční zóna při koncentraci MAG 1500 mg/l. U MAG C8:0 měla zóna 20 mm a u MAG C10:0 18 mm a u MAG C12:0 16 mm.

U *Enterococcus durans* CCDM 53 byla zaznamenaná inhibiční zóna při koncentraci MAG 1000 mg/l a 1500 mg/l. U všech MAG měla zóna při koncentraci 1000 mg/l 14 mm a při koncentraci 1500 mg/l 18 mm. U *Enterococcus faecalis* CCM 2665 byla zaznamenaná inhibiční zóna při koncentraci MAG 1000 mg/l a 1500 mg/l. U všech MAG měla zóna při koncentraci 1000 mg/l 12 mm a při koncentraci 1500 mg/l 14 mm. U *Enterococcus faecalis* CCM 4224 byla zaznamenaná inhibiční zóna při koncentraci MAG 1000 mg/l a 1500 mg/l. U všech MAG měla zóna při koncentraci 1000 mg/l 16 mm a při koncentraci 1500 mg/l 20 mm.

U gramnegativních mikroorganismů *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420, *Proteus mirabilis* CCM 7188 nebyla zaznamenaná žádná inhibiční zóna. Monoacylglyceroly dle diskové difúzní metody neinhibují růst vybraných gramnegativních bakterií.

Tabulka č. 8 Účinky monoacylglycerolů na růst bakterií stanovených diskovou metodou

Mikroorganismus	Koncentrace MAG (mg/l)	Druh MAG	Velikost zóny (mm)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48	1500	MAG 8, MAG 10	20
		MAG 12	16
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141	1000	MAG 8, MAG 10, MAG12	16
	1500	MAG 8, MAG 10, MAG12	20
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004	1000	MAG 8, MAG 10, MAG 12	18
	1500	MAG 8, MAG 10, MAG12	22
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824	1500	MAG 8	16
		MAG 10	14
		MAG 12	16
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946	1500	MAG 8	20
		MAG 10	18
		MAG 12	16
<i>Enterococcus durans</i> CCDM 53	1000	MAG 8, MAG 10, MAG12	14
	1500	MAG 8, MAG 10, MAG12	18
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 2665	1000	MAG 8, MAG 10, MAG12	12
	1500	MAG 8, MAG 10, MAG12	14

<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	1000	MAG 8, MAG 10, MAG12	16
	1500	MAG 8, MAG 10, MAG12	20
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis CCM 4420	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188	-	-	-

5.1.2 Mikrotitrační diluční metoda

Účinky zvolených monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst vybraných bakterií byly sledovány v rozmezí koncentrací MAG/MK 25 – 1500 mg/l, jako u difúzní diskové metody.

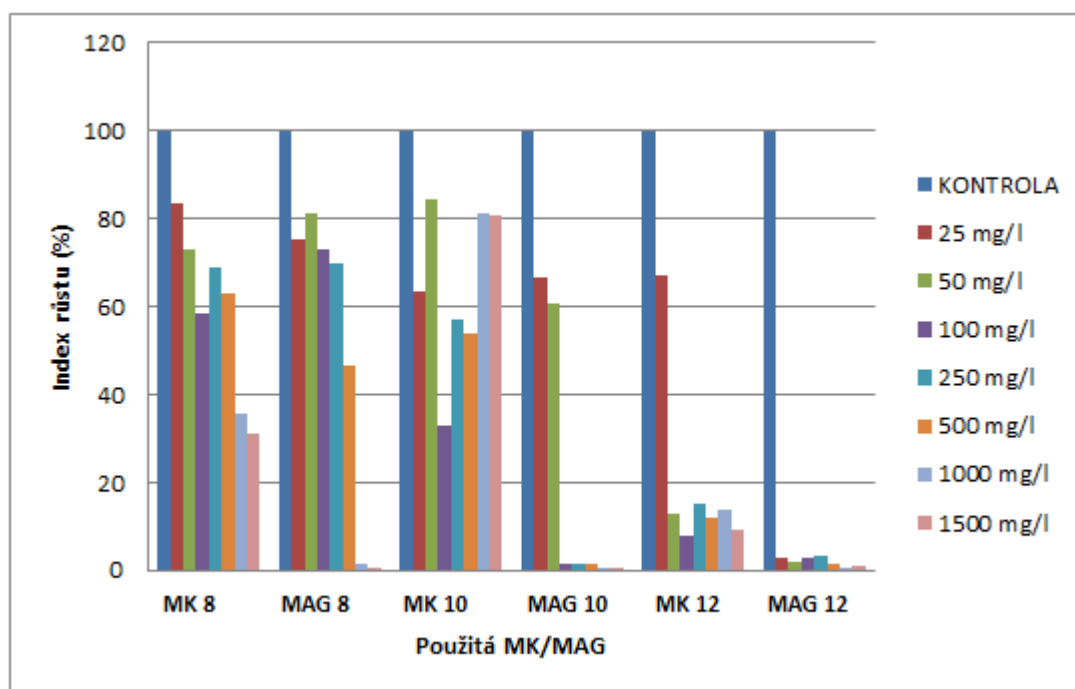
5.1.2.1 Vliv monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

U testovaných mikroorganismů lze pozorovat, že se zvyšující koncentrací jednotlivých MAG, dochází k postupnému snižování hustoty bakteriální suspenze (Obr. 10, 11, 12).

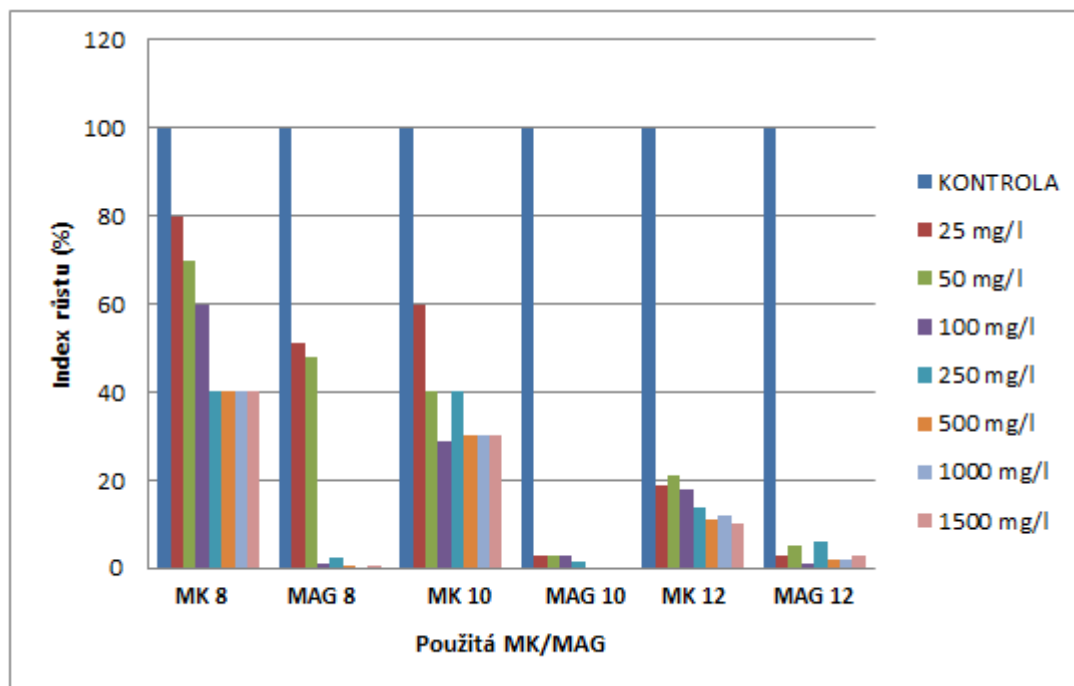
Po 24 hodinách kultivace (Obr. č. 10) vykazoval největší inhibiční účinek MAG C12:0. U MAG C12:0 byl index růstu pod 10 % již při nejnižší koncentraci, tj. 25 mg/l. U žádného z nich však po 24 hodinách nedošlo k úplné inhibici růstu. Velký inhibiční efekt byl zaznamenán také u MAG C10:0, kde byl u koncentrací nad 100 mg/l viděn pokles indexu růstu pod 5 %. MAG C8:0 vyvolal při koncentraci 1000 mg/l a 1500 mg/l snížení indexu růstu pod 5 %. Výrazné snížení indexu růstu bylo zaznamenáno i po působení některých mastných kyselin. U kyseliny laurové byl pozorován 20 % nárůst buněk od koncentrace 50 mg/l. Kyselina kaprylová snižovala index růstu méně a pouze při vysokých koncentracích. U koncentrací 1000 mg/l a 1500 mg/l byl zaznamenán index růstu nižší než 40 %.

Po 48 hodinách kultivace (Obr. č. 11) byla situace podobná. Nejúčinnější inhibiční účinek byl zaznamenán u MAG C12:0. Po 48 hodinách kultivace byl zaznamenán nárůst buněk

pod 10 % u všech koncentrací. Velmi účinný byl i MAG C10:0. U všech koncentrací byl index růstu nižší než 5 %. Při koncentraci 500 mg/l – 1500 mg/l byla zaznamenána úplná inhibice růstu bakterií. MAG C8:0 způsobil snížení indexu růstu pod 5 % u koncentrací 100 mg/l a výše. Mastné kyseliny nepůsobily na bakterie tak výrazným inhibičním efektem jako jejich monoacylglyceroly. Výjimkou byla kyselina laurová, byl kde po 48 hodinách kultivace zaznamenán nárůst buněk pod 25 % u všech koncentrací.



Obrázek č. 10: Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 48 po 24 hodinách



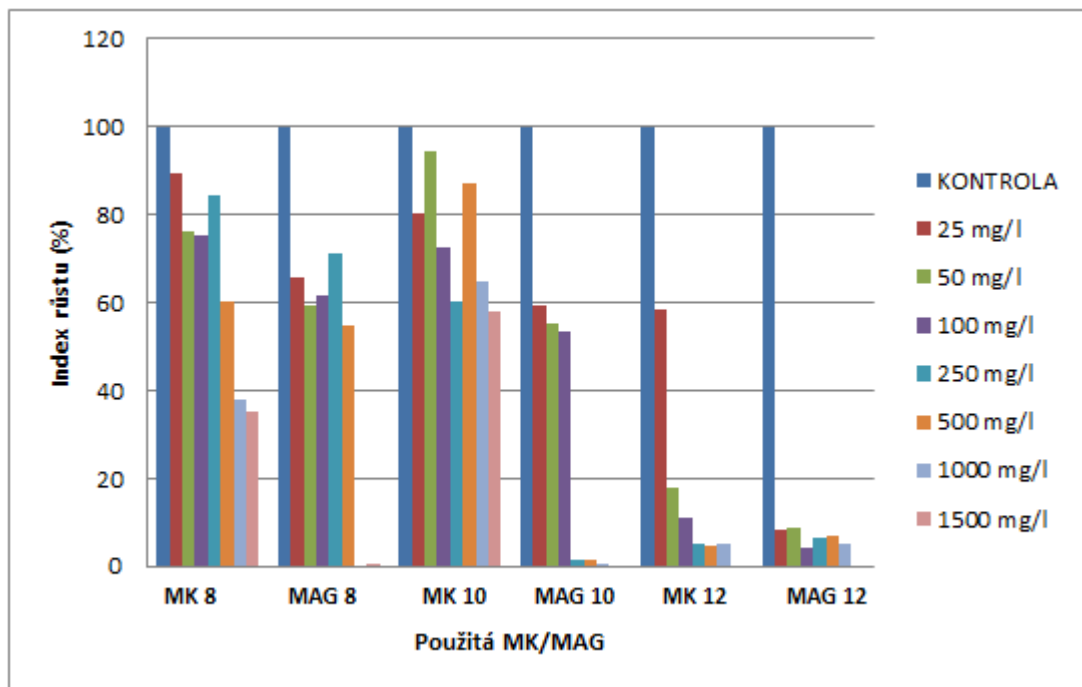
Obrázek č. 11: Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 48 po 48 hodinách

5.1.2.2 Vliv monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 141

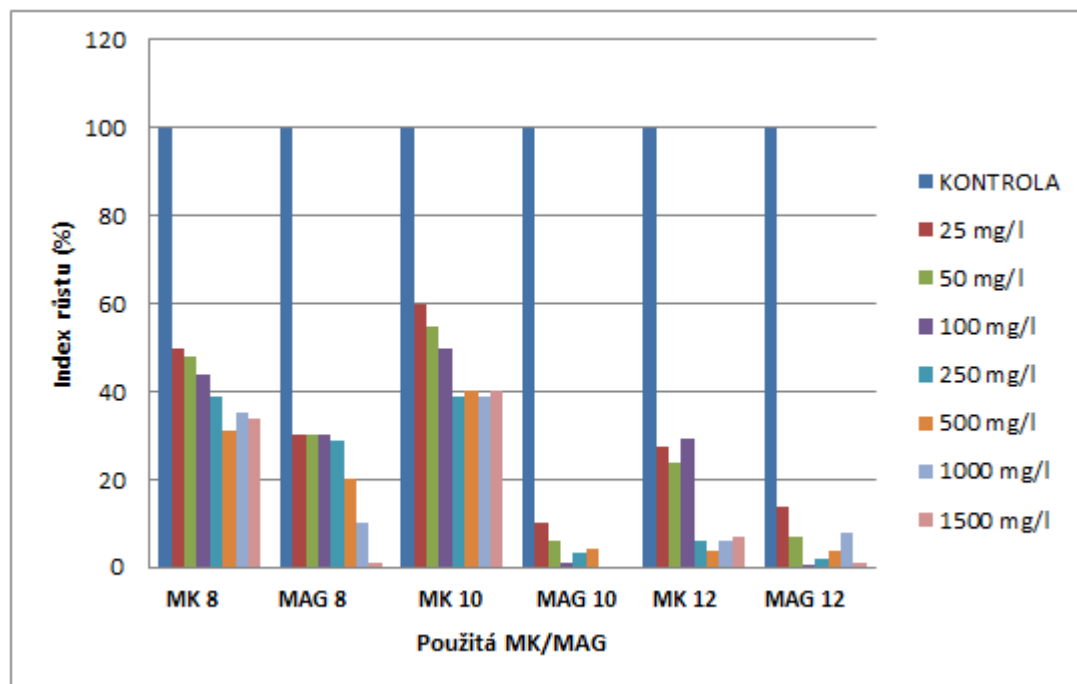
I u dalšího testovaného mikroorganismu *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 141 lze pozorovat, že se zvyšující koncentrací jednotlivých MAG dochází k postupnému snižování hustoty bakteriální suspenze (Obr. č. 12 a 13). Po 24 hodinách (Obr. č. 12) kultivace byla situace následující. Výrazné snížení nárůstu buněk bylo zaznamenáno u MAG C10:0 a MAG C12:0. U MAG C12:0 byl zaznamenán nárůst buněk pod 10 % u všech koncentrací. U MAG C10:0 byl viděn 5 % nárůst buněk při koncentraci 250 mg/l a výše. U koncentrace 1500 mg/l byla viděna úplná inhibice růstu buněk. MAG C8:0 způsobil snížení indexu růstu pod 5 % u koncentrace 1000 mg/l a 1500 mg/l. Mastné kyseliny nepůsobily výrazným inhibičním efektem, výjimkou byla opět kyselina laurová, kdy byl pozorován index růstu pod 20 % od koncentrace 50 mg/l.

Po 48 hodinách kultivace (Obr. č. 13) se prokázal výraznější pokles indexu růstu i u MAG C8:0. Index růstu byl při koncentraci 500 mg/l 20 %, u koncentrace 1000 mg/l byl index růstu nižší než 10 % a při koncentraci 1500 mg/l byl viděl pouze 1 % nárůst buněk. MAG

C10:0 způsobil výrazné snížení indexu růstu u všech koncentrací a to pod 10 %. U koncentraci 1000 mg/l a 1500 mg/l byla viděna úplná inhibice růstu buněk. Podobná situace nastala u MAG C12:0, kde všechny koncentrace tohoto MAG, způsobily snížení indexu růstu pod 10 %. U koncentraci 1500 mg/l byl viděn 1 % nárůst buněk. Mastné kyseliny nepůsobily výrazným inhibičním efektem na bakterie, jen kyselina laurová způsobila nárůst buněk nižší než 10 % u koncentrací 250 mg/l a výše.



Obrázek č. 12: Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 po 24 hodinách



Obrázek č. 13: Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 141 po 48 hodinách

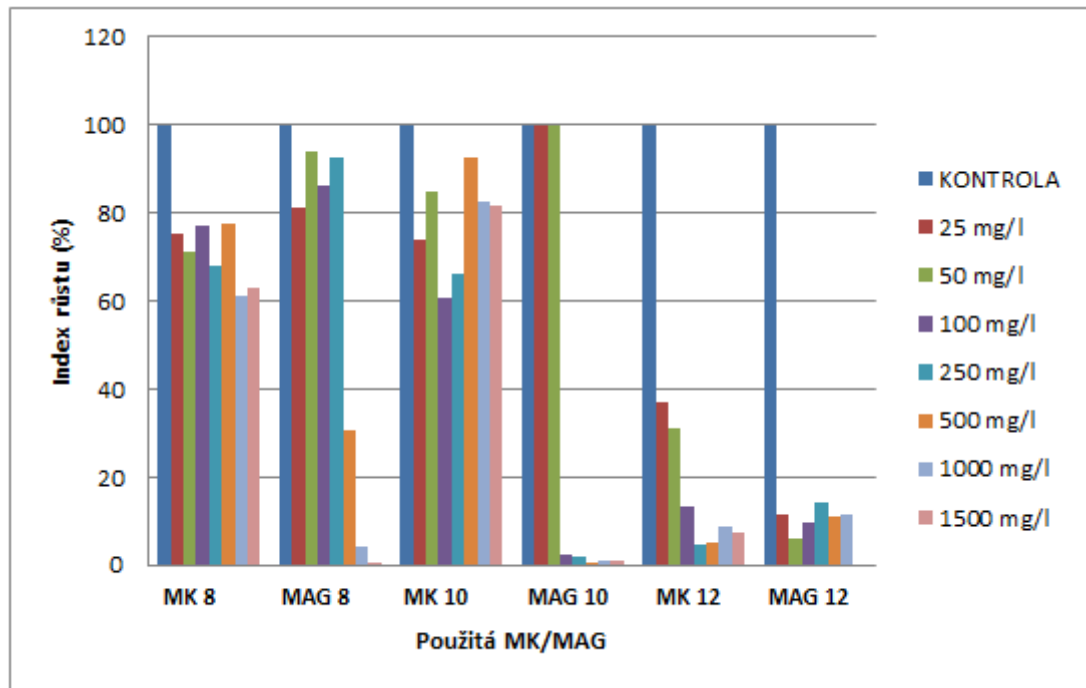
5.1.2.3 Vliv monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 1004

Dalším sledovaným laktokokem byl *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 1004. Inhibiční účinky monoacylglycerolů a mastných kyselin byly sledovány v rozmezí 25 – 1500 mg/l.

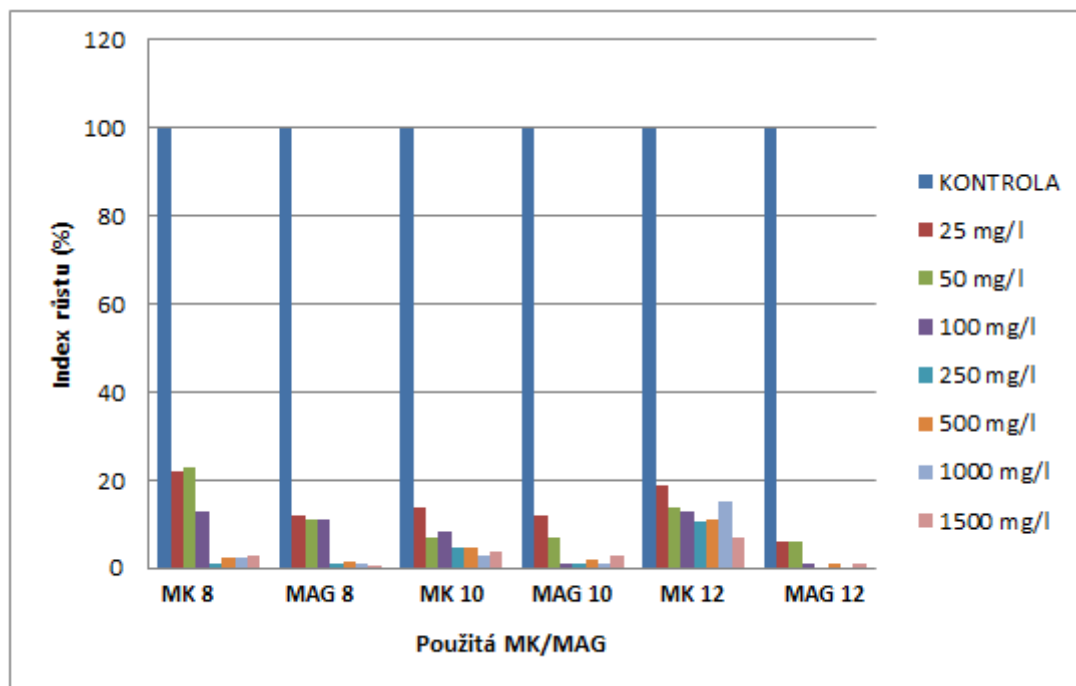
Po 24 hodinách kultivace (Obr. č. 14) se výraznější inhibiční účinky se projeví i u MAG C10:0 a MAG C12:0. MAG C10:0 způsobil snížení indexu růstu pod 10 % u koncentrace 100 mg/l a výše. U MAG C12:0 byl viděn nárůst buněk pod 20 % u všech použitých koncentracích. U MAG C8:0, u koncentrace 1000 mg/l a výše, byl nárůst buněk nižší než 10 %. Mastné kyseliny opět nezpůsobily výrazný pokles indexu růstu, pouze kyselina laurová. Kyselina laurová snižovala nárůst buněk na 20 % a méně od koncentrace 100 mg/l.

U 48 hodinové kultivace (Obr. č. 15) byly výsledky odlišné. Všechny MAG i mastné kyseliny výrazně inhibovaly buňky ve všech koncentracích. Nárůst buněk u všech koncentrací MAG byl pod 15 %. Stejný případ byl zaznamenán i u kyseliny kaprinové, u kyseliny laurové tomu bylo obdobně, avšak nárůst buněk byl u všech koncentrací pod 20 %. Kyselina

kaprylová také působila inhibičně, byl viděn 10 % nárůst buněk u koncentrací 250-1500 mg/l.



Obrázek č. 14: Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 po 24 hodinách



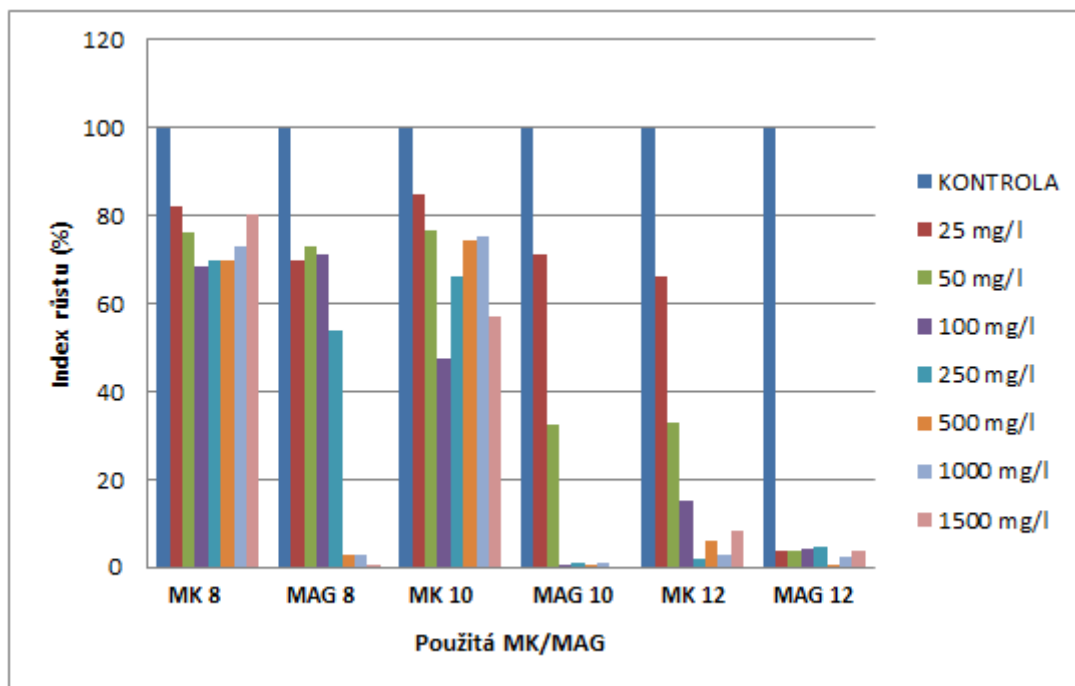
Obrázek č. 15: Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 1004 po 48 hodinách

5.1.2.4 Vliv monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 824

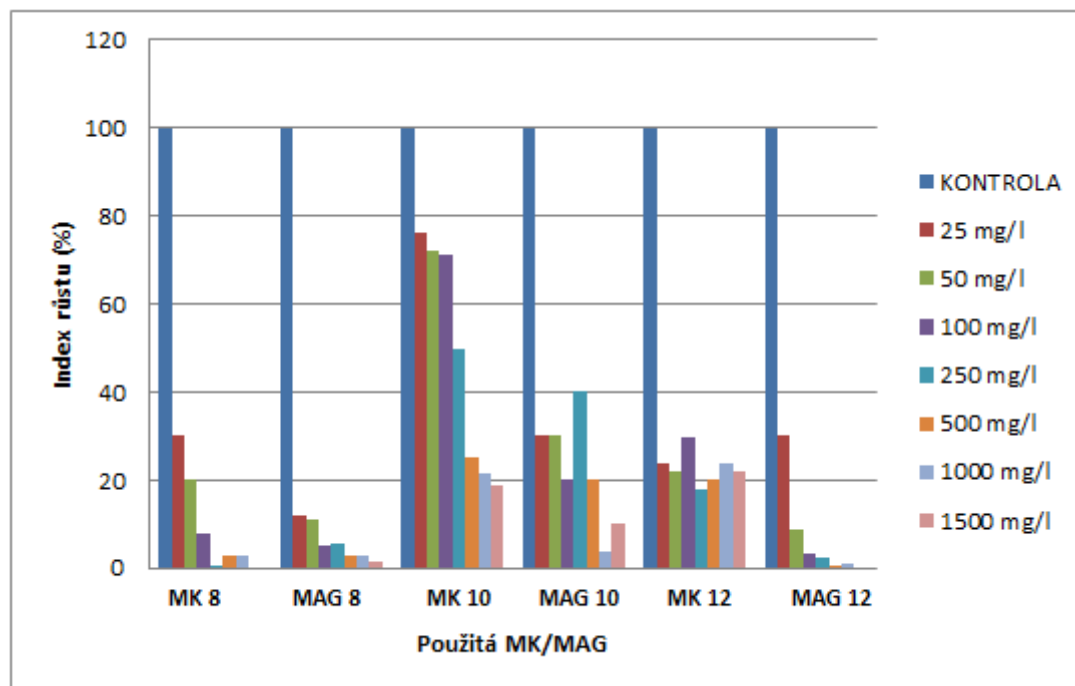
Dalším sledovaným laktokokem byl *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 824. Po 24 hodinové kultivaci (Obr. č. 16) bylo zjištěno, že všechny MAG působily inhibičně. U MAG C8:0 byl pozorován nárůst buněk pod 10 % u koncentrace 500 mg/l a výše. U MAG C10:0 byl tento nárůst pozorován již při koncentraci 100 mg/l. Největší inhibiční efekt byl zaznamenán u MAG C12:0, kde byl viděn nárůst pod 10 % u všech koncentrací MAG. Inhibiční efekt se projevil i u kyseliny laurové, kde byl viděn nárůst buněk pod 10 % u koncentrace 250 mg/l a vyšších.

I po 48 hodinové kultivaci (Obr. č. 17) byly výsledky podobného charakteru. MAG C8:0 způsobil nárůst buněk u všech koncentrací pod 15 %. U MAG C10:0 bylo viděno snížení indexu růstu na méně než 10 % u koncentrace 1000 mg/l. MAG C12:0 působil výrazným inhibičním efektem od koncentrace 50 mg/l, kde způsobil snížení indexu růstu pod 10 %. U MAG C12:0 byla zaznamenána i úplná inhibice buněk a to při koncentraci 1500 mg/l. U kyseliny laurové tak velký inhibiční efekt prokázán nebyl. Inhibiční efekt se naopak výraz-

něji projevil u kyseliny kaprylové, kde byl pozorován nárůst buněk nižší než 10 % u koncentrace 100 mg/l a vyšších.



Obrázek č. 16: Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 po 24 hodinách



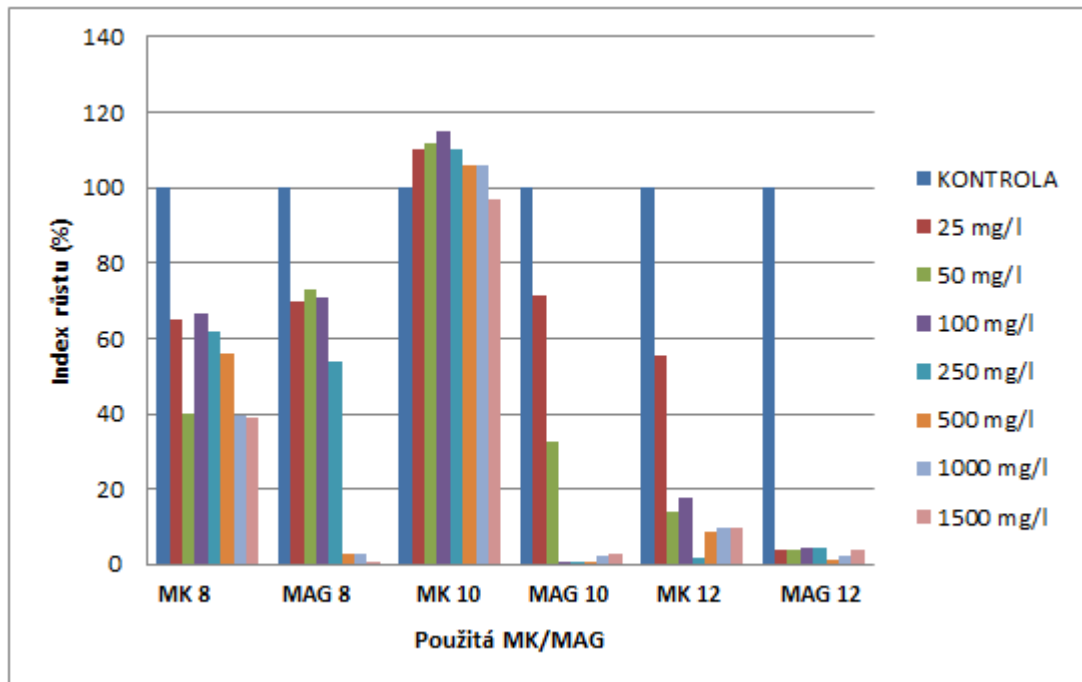
Obrázek č. 17: Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 po 48 hodinách

5.1.2.5 *Vliv monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst Lactococcus lactis subsp. cremoris CCDM 946*

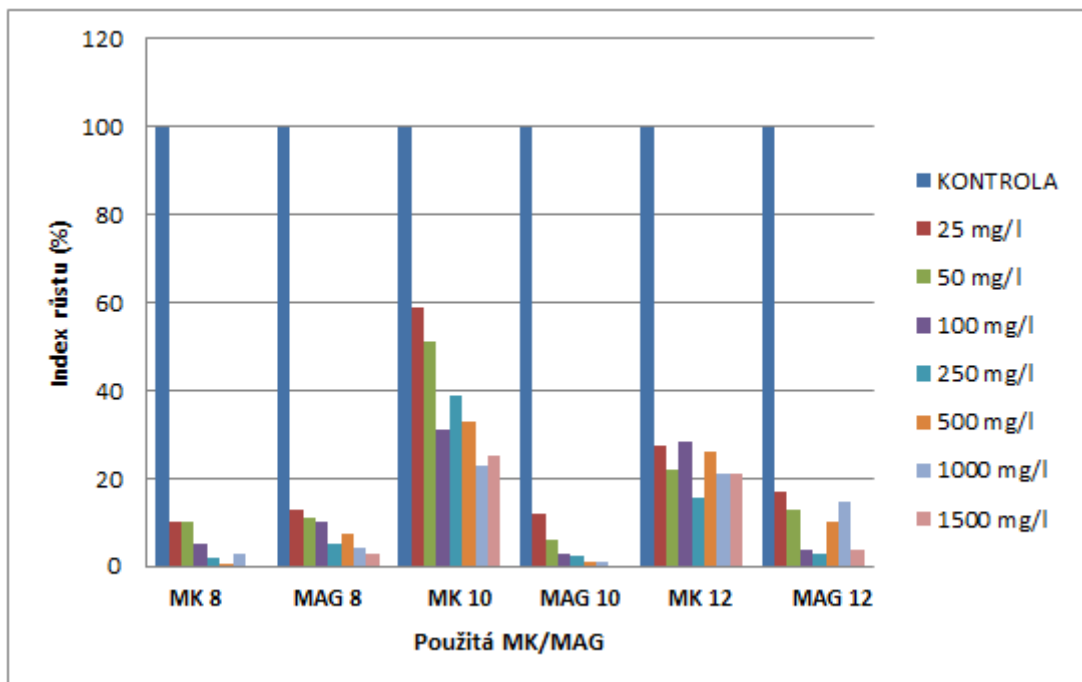
Posledním sledovaným laktokokem byl *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946. Opět se sledoval inhibiční účinek monoacylglycerolů a mastných kyselin v koncentracích 25-1500 mg/l.

Všechny MAG výrazně inhibovaly růst buněk po 24 hodinové kultivaci (Obr. č. 18). MAG C8:0, při koncentraci 250 mg/l a vyšších, snižoval index růstu buněk pod 15 %. MAG C10:0 působil inhibičně již při koncentraci 100 mg/l. Při koncentraci 100 mg/l byl zaznamenán nárůst buněk pod 5 %. Všechny koncentrace MAG C12:0 způsobily snížení indexu růstu pod 10 %. Mastné kyseliny nepůsobily výrazným inhibičním efektem, u kyseliny kaprinové byl dokonce viděn nárůst buněk přes 100 %. Pouze kyselina laurová vykazovala vyšší inhibiční efekt. U koncentrace 50 mg/l a výše byl viděn nárůst buněk nižší než 20 %.

Poněkud odlišných výsledků bylo dosaženo po 48 hodinové kultivaci (Obr. č. 19). Všechny MAG opět výrazně inhibovaly růst bakterií a to ve všech koncentracích. MAG C8:0 způsobil snížení indexu růstu pod 15 % a to u všech testovaných koncentrací. U MAG C10:0 byla viděna úplná inhibice růstu buněk a to u koncentrace 1500 mg/l. U MAG C12:0 byl viděn 5 % nárůst buněk a to u koncentrací 100 mg/l, 250 mg/l a 1500 mg/l. U mastných kyselin nebyl prokázán tak velký inhibiční efekt. Výjimkou byla kyselina kaprylová, u které byl viděn nárůst buněk pod 15 % u všech testovaných koncentrací.



Obrázek č. 18: Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 946 po 24 hodinách



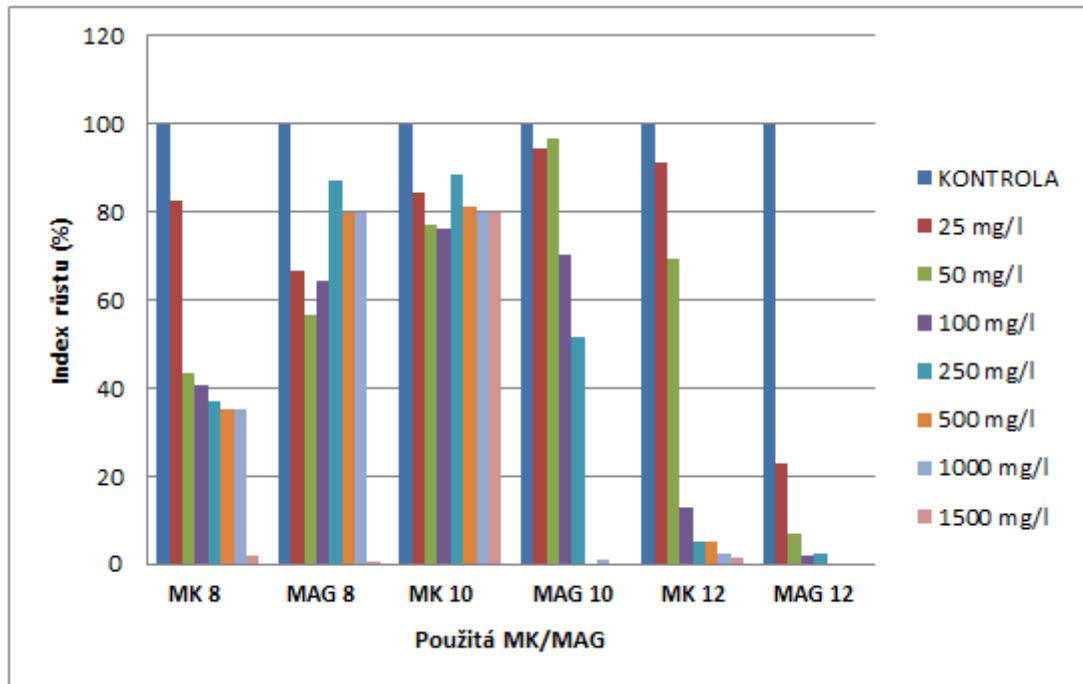
Obrázek č. 19: Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 946 po 48 hodinách

5.1.2.6 *Vliv monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst Enterococcus durans*

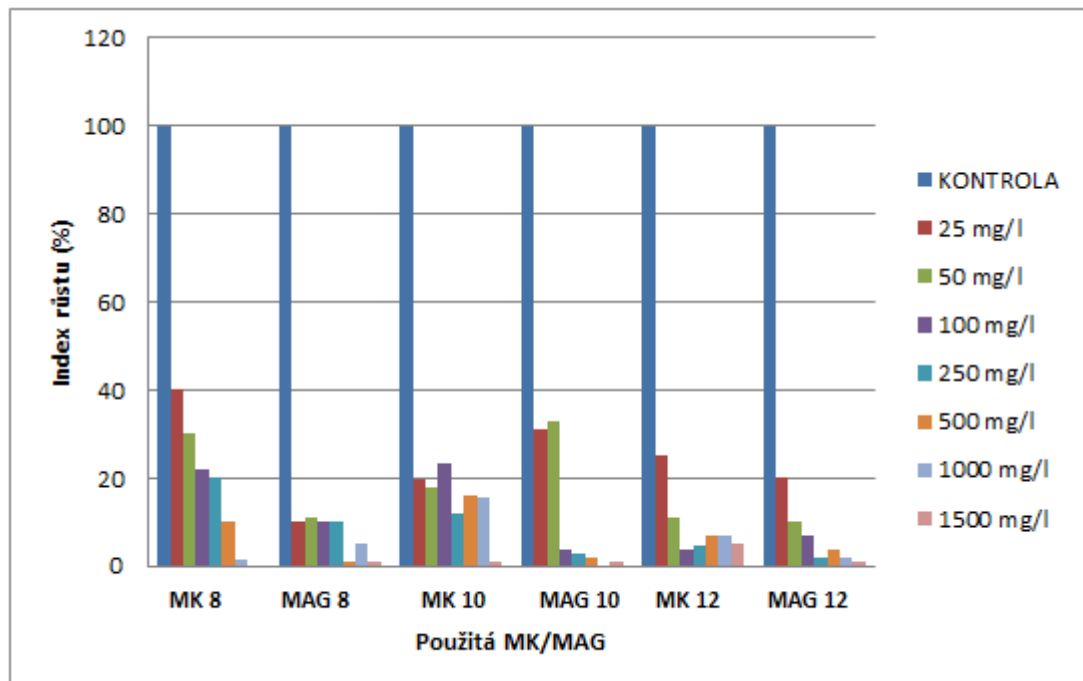
CCDM 53

Další sledovanou bakterií byl enterokok a to *Enterococcus durans* CCDM 53. Inhibiční účinky na tuto bakterii byly opět pozorovány u koncentrací MAG a kyseliny 25-1500 mg/l. Nejvýraznější inhibiční efekt byl viděn po 24 hodinové kultivaci (Obr. č. 20) viděn u MAG C12:0. Po 24 hodinách byl viděn u koncentrace 100 mg/l a výše nárůst buněk pod 10 %. U MAG C10:0 byl viděn úplný inhibiční efekt od koncentrace 500 mg/l, kdy byl viděn nárůst buněk nižší než 5 %. U MAG C8:0 byl viděn 5 % nárůst buněk u koncentrace 1500 mg/l. U mastných kyselin byl největší inhibiční efekt prokázán u kyseliny laurové, u koncentrace 250 mg/l a výše byl viděn nárůst buněk nižší než 15 %.

48 hodinová kultivace (Obr. č. 21) zintenzivnila inhibiční efekt a to jak mastných kyselin, tak i MAG. Všechny MAG působily výrazným inhibičním efektem. U MAG C8:0 byl zaznamenán index růstu pod 10 % u koncentrace 500 mg/l a výše. U MAG C10:0 a C12:0 byl 10 % index růstu zaznamenán již při koncentraci 100 mg/l. U MAG C12:0 byl u koncentrace 1000 mg/l a 1500 mg/l zaznamenán nižší než 5 % nárůst buněk. Z mastných kyselin byl viděn nejvýraznější inhibiční efekt u kyseliny laurové, kde byl u koncentrace 50 mg/l a výše zaznamenán nárůst buněk pod 10 %. U kyseliny kaprylové byl u koncentrace 1000 mg/l viděn 5 % nárůst buněk a u koncentrace 1500 mg/l byla viděna úplná inhibice růstu buněk.



Obrázek č. 20: Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Enterococcus durans* CCDM 53 po 24 hodinách



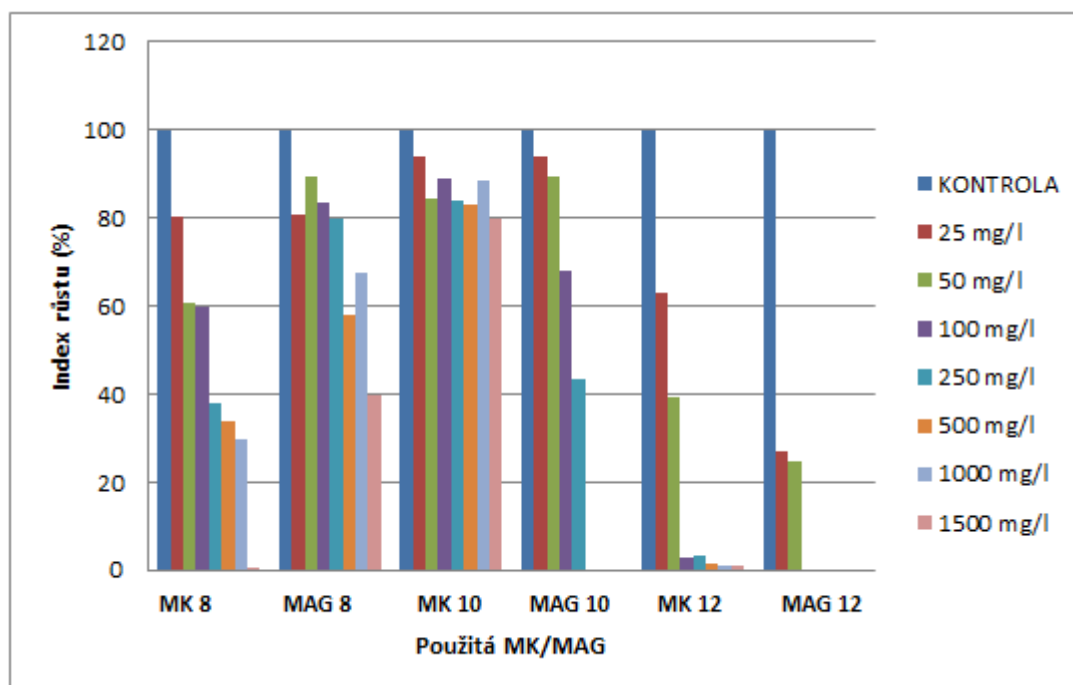
Obrázek č. 21: Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Enterococcus durans* CCDM 53 po 48 hodinách

5.1.2.7 Vliv monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Enterococcus faecalis* CCM 2665

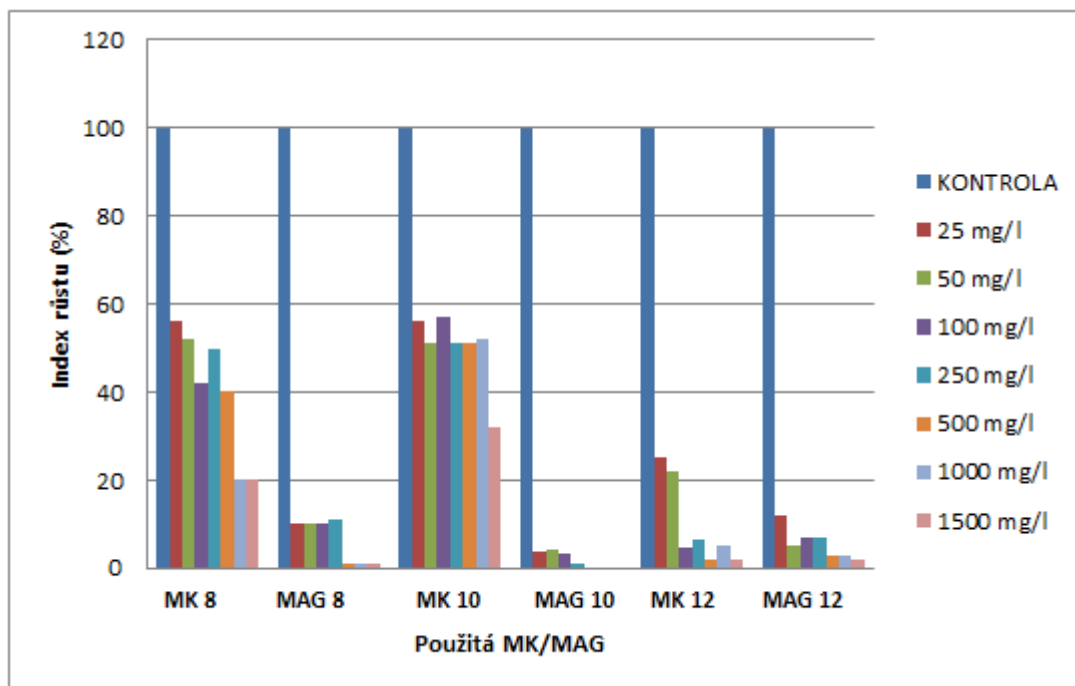
Podobných výsledků, jako u *Enterococcus durans* CCDM 53, bylo dosaženo i u *Enterococcus faecalis* CCM 2665.

Po 24 hodinové kultivaci (Obr. č. 22) bylo zaznamenáno výraznější snížení indexu růstu bakterií po působení kyseliny laurové a jejího MAG. U koncentrace 100 mg/l a vyšších byl u kyseliny laurové viděn nárůst buněk pod 10 % a u MAG C12:0 pod 5 %. U MAG C10:0 byl u koncentrace 500 mg/l viděn nárůst buněk pod 5 %.

Všechny MAG výrazně inhibovaly růst buněk po 48 hodinové kultivaci (Obr. č. 23). Všechny koncentrace MAG způsobily nárůst buněk pod 15 %. MAG C10:0 a MAG C12:0 způsobil snížení indexu růstu pod 5 % u koncentrace 500 mg/l a výše. U MAG C10:0 se projevila úplná inhibice růstu buněk a to u koncentrace 500 mg/l a výše. Z mastných kyselin se jevila jako nejvýrazněji inhibiční opět kyselina laurová. U koncentrace 100 mg/l a výše způsobila snížení indexu růstu pod 10 %.



Obrázek č. 22: Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Enterococcus faecalis* CCM 2665 po 24 hodinách



Obrázek č. 23: Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Enterococcus faecalis* CCM 2665 po 48 hodinách

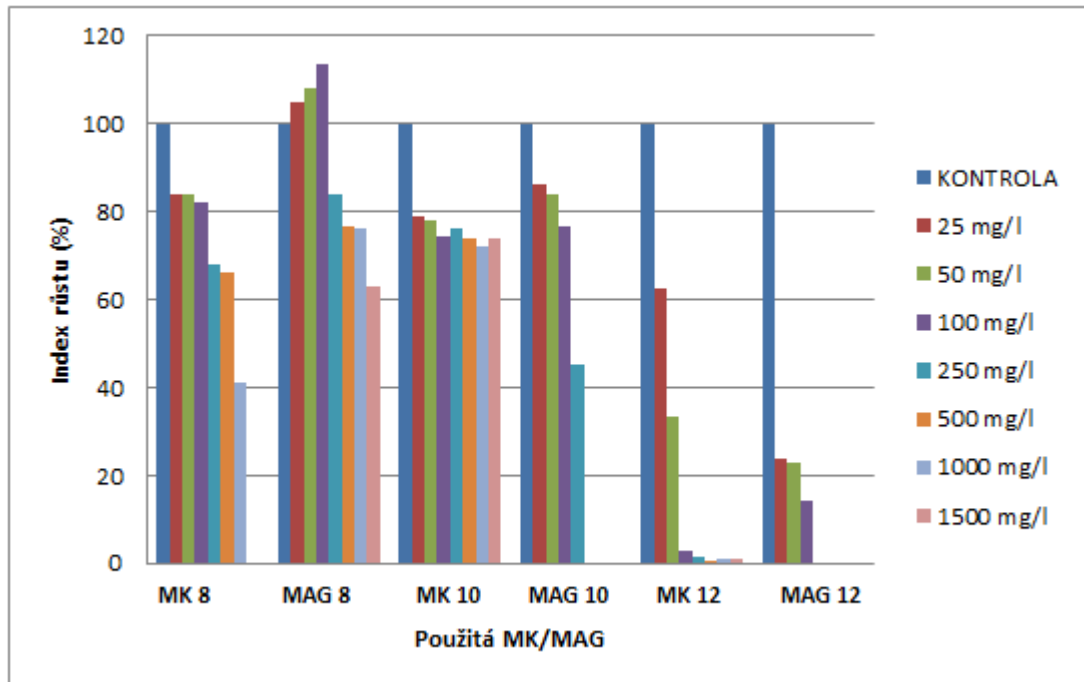
5.1.2.8 Vliv monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224

Posledním sledovaným enterokokem, u kterého byly sledovány inhibiční účinky MAG a mastných kyselin v koncentracích 25 – 1500 mg/l byl *Enterococcus faecalis* CCM 4224.

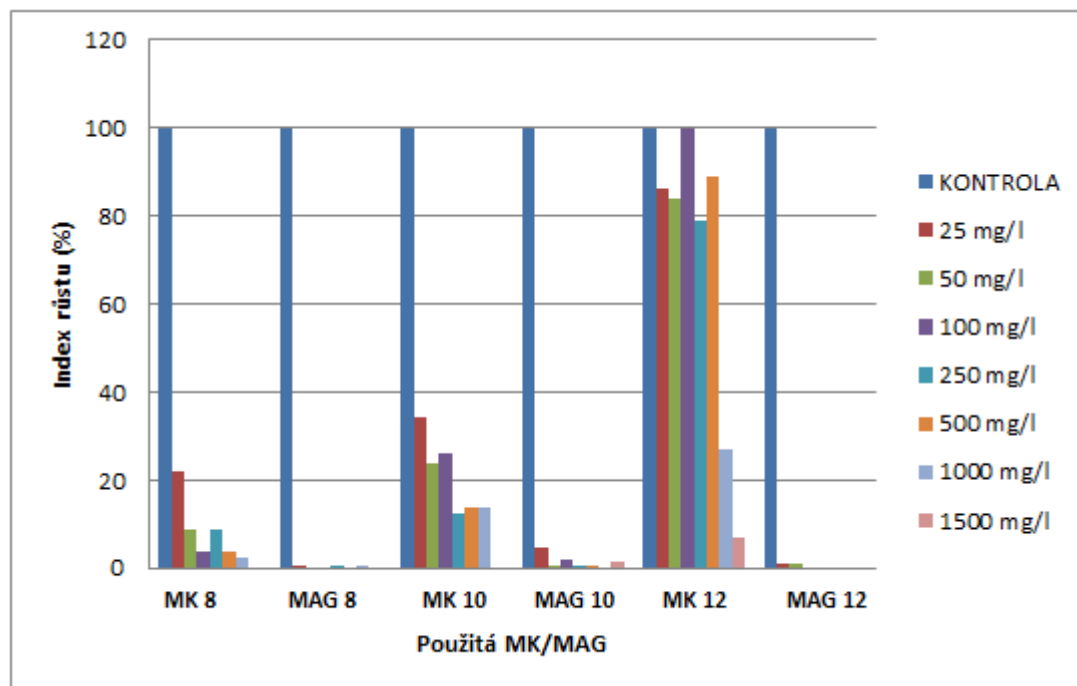
Výraznější inhibiční efekt se projevil po 24 hodinách kultivace (Obr. č. 24) opět u kyseliny laurové a jejího monoacylglycerolu. U kyseliny laurové byl u koncentrace 100 mg/l a výše zaznamenán nárůst buněk pod 10 %. U MAG C12:0 byl viděn úplný inhibiční efekt u koncentrace 250 mg/l a výše. MAG C10:0 působil výrazným inhibičním efektem u koncentrace 50 mg/l a výše, kde byla viděna úplná inhibice růstu buněk. U kyseliny kaprylové byla také viděna úplná inhibice růstu buněk a to u koncentrace 1500 mg/l.

Po 48 hodinové kultivaci (Obr. č. 25) byly viděny výraznější inhibiční vlivy a to především u MAG. Největší inhibiční efekt byl zaznamenán u MAG C8:0. U všech koncentrací byl viděn 1 % nárůst buněk. U koncentrace 50 mg/l, 100 mg/l, 500 mg/l a 1500 mg/l byla dokonce viděna úplná inhibice růstu buněk. MAG C10:0 působil na bakterie snížením indexu růstu pod 5 % ve všech testovaných koncentracích. MAG C12:0 způsobil 5 % nárůst buněk

u koncentrace 25 mg/l a 50 mg/l. Od koncentrace 100 mg/l způsobil úplnou inhibici buněk. Z mastných kyselin byl vyšší inhibiční efekt viděn u kyseliny kaprylové, kde byl u koncentrací 50 mg/l a výše, zaznamenán nárůst buněk nižší než 10 %.



Obrázek č. 24: Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224 po 24 hodinách



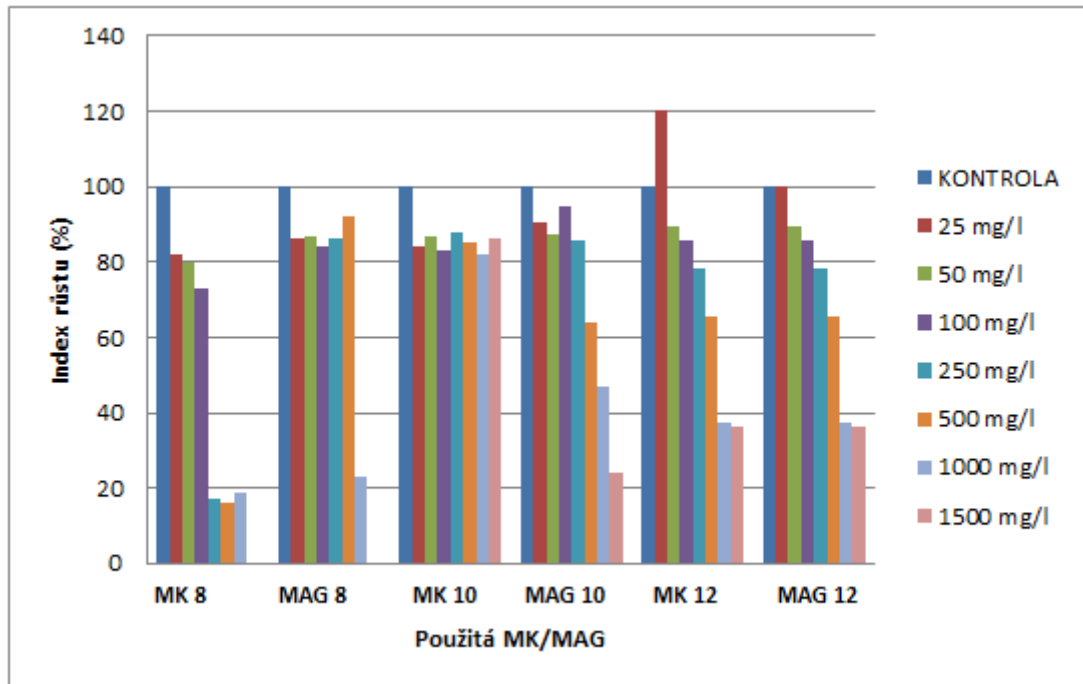
Obrázek č. 25: Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224 po 48 hodinách

5.1.2.9 Vliv monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *Enteritidis* CCM 4420

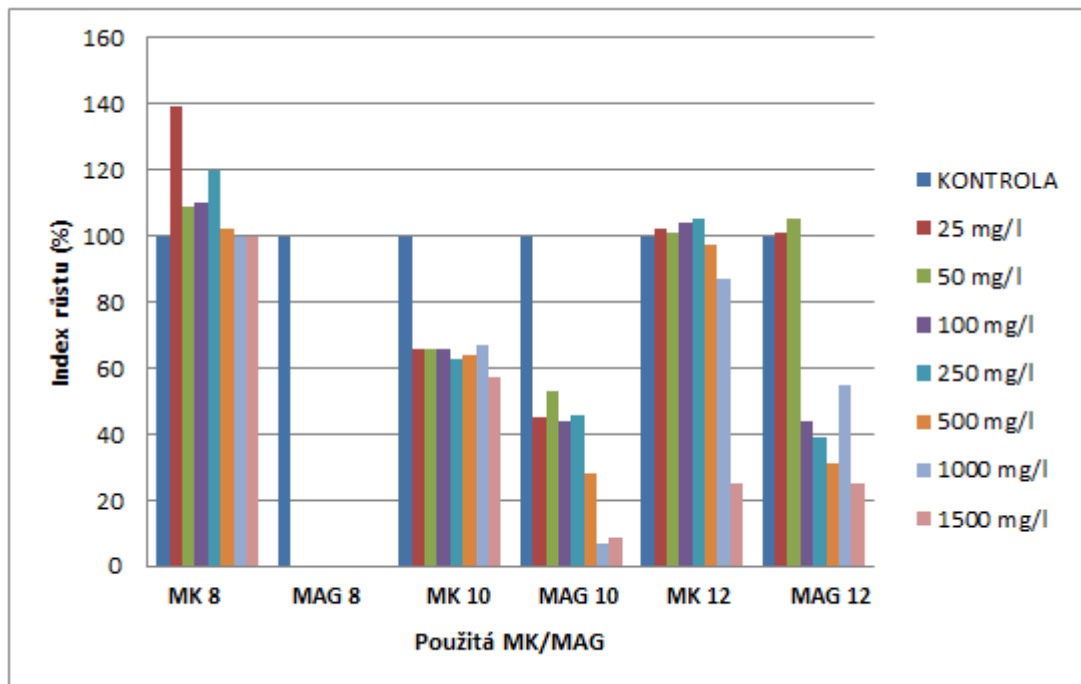
Další bakterie, tentokrát gramnegativní, na které byly testovány inhibiční účinky monoacylglycerolů a mastných kyselin v koncentracích 25 – 1500 mg/l, byla *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *Enteritidis* CCM 4420. U všech testovaných mastných kyselin nebyly v koncentracích 25 – 1500 mg/l zjištěny významné inhibiční účinky na růst bakterií po 24 hodinách (Obr. č. 26) tak ani po 48 hodinové kultivaci (Obr. č. 27). Pouze kyselina kaprylová vykazovala snížení nárůstu buněk pod 20% při koncentraci 100 mg/l. U kyseliny laurové byl viděn dokonce vyšší index růstu při koncentraci 25 mg/l oproti kontrole. Podobná situace jako u mastných kyselina byla zaznamenána u MAG, žádný výrazněji nesnižoval nárůst buněk.

Po 48 hodinové kultivaci byl u kyseliny kaprylové zaznamenán vyšší index růstu oproti kontrole a to u koncentrace 25 mg/l. V koncentracích 500-1500 mg/l byl zaznamenán nárůst buněk pod 30 % u MAG C10:0. V koncentraci 1500 mg/l byl zaznamenán nárůst bu-

něk pod 30 % i u MAG C12:0. U MAG C8:0 byla prokázána úplná inhibice a to ve všech koncentracích.



Obrázek č. 26: Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Salmonella enterica subsp. enterica ser. Enteritidis CCM 4420* po 24 hodinách



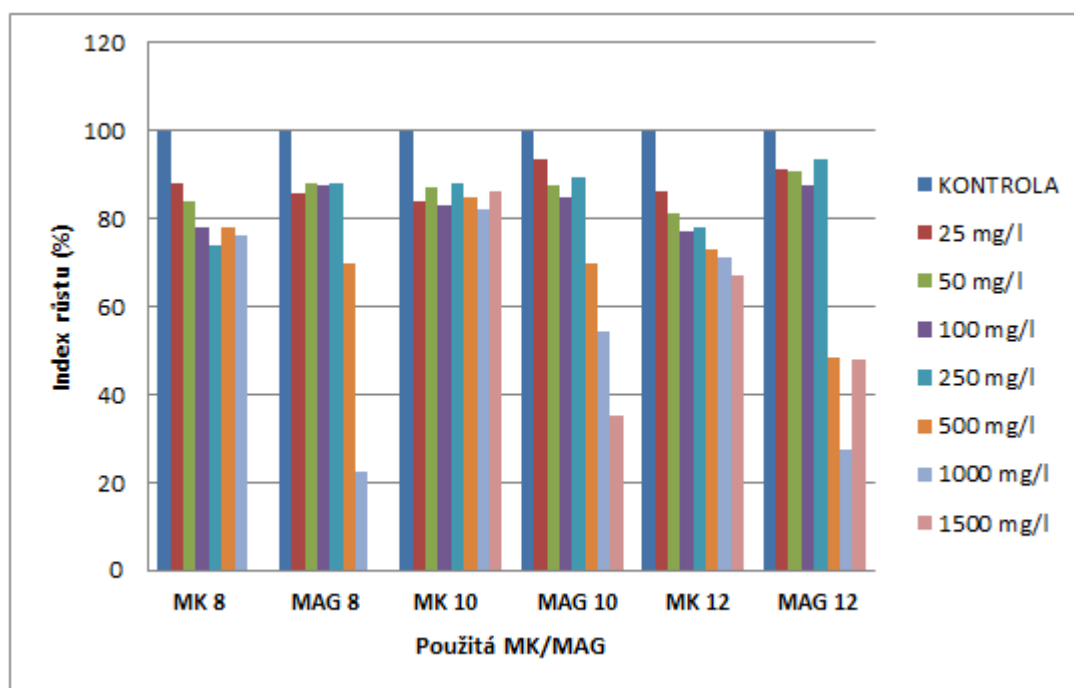
Obrázek č. 27: Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Salmonella enterica subsp. enterica ser. Enteritidis CCM 4420* po 48 hodinách

5.1.2.10 Vliv monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Proteus mirabilis* CCM

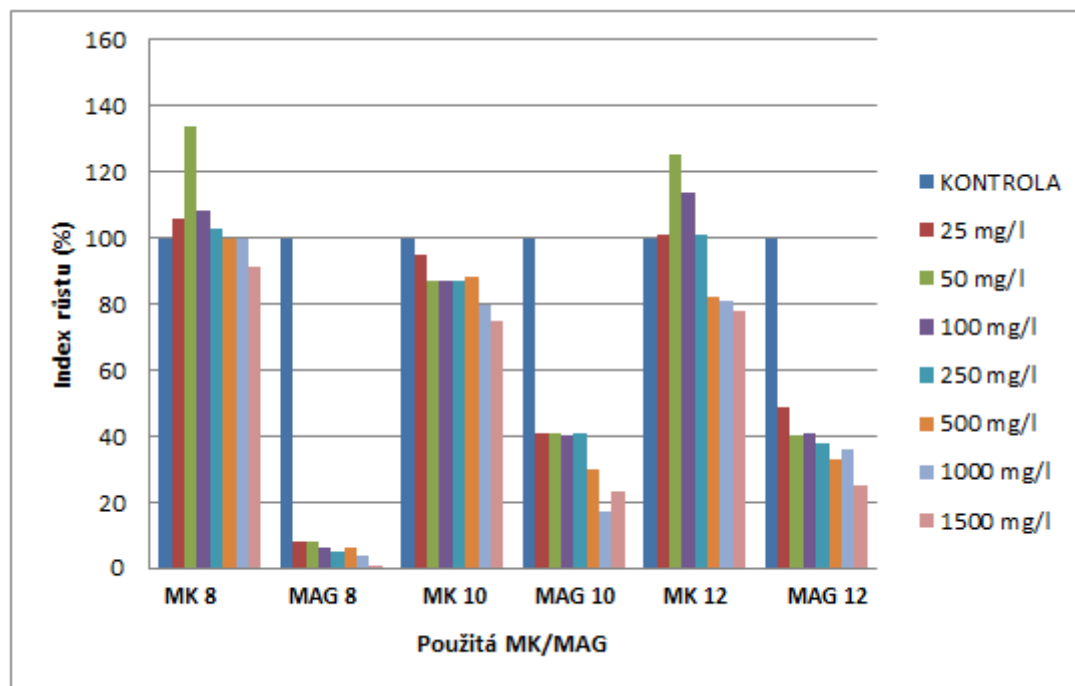
7188

Poslední bakterií, u které byly testovány inhibiční účinky zvolených monoacylglycerolů v koncentracích 25 – 1500 mg/l, byl *Proteus mirabilis* CCM 7188. Po 24 hodinové kultivaci (Obr. č. 28), bylo dosaženo podobných výsledků. MAG ani kyseliny nepůsobily výraznějším inhibičním efektem na růst bakterií. Výjimkou byl pouze MAG C8:0, kde byl u koncentrace 100 mg/l zaznamenán nárůst buněk pod 20 % a u koncentrace 1500 mg/l úplná inhibice růstu buněk. U kyseliny kaprylové byla také zaznamenána úplná inhibice růstu buněk a to u koncentrace 1500 mg/l.

Ještě výraznější inhibiční efekt se projevil u MAG C8:0 po 48 hodinové kultivaci (Obr. č. 29). Všechny koncentrace MAG způsobily nárůst buněk pod 10 %. MAG C10:0 způsobil snížení indexu růstu pod 20 % u koncentrace 1000 mg/l. Odlišnost byla zaznamenána u kyseliny kaprylové, kde nebyl zaznamenán inhibiční efekt a to ani u koncentrace 1500 mg/l.



Obrázek č. 28: Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Proteus mirabilis* CCM 7188 po 24 hodinách



Obrázek č. 29: Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst *Proteus mirabilis* CCM 7188 po 48 hodinách

Z publikovaných prací vyplývá, že gramnegativní bakterie, jsou relativně odolné vůči působením monoacylglycerolů. Dle studie Ružičky a kol. nebyl zjištěn výrazný inhibiční efekt MAG C12:0 vůči *E. coli* a *Klebsiella pneumoniae*. Jiné studie uvádí, že MAG C12:0 nepůsobí výrazným inhibičním efektem ani na bakterie rodů *Salmonella*, *Escherichia* a *Klebsiella*. Toto zjištění bylo potvrzeno i naší studií. Zvýšení inhibičního efektu MAG C12:0, bylo dle publikované literatury, možné zvýšit kombinací monoacylglycerolu s kyselinou etylendiaminotetraoctovou. U MAG C10:0 se dle studie Ružičky neprojevil výrazný inhibiční efekt vůči *Pseudomonas aeruginosa*. Účinky MAG C8:0 nejsou vůči gramnegativním bakteriím příliš popsány. Zajímavostí v naší studii bylo zjištění, že se u MAG C8:0 prokázal výrazný inhibiční efekt u *Salmonella enterica subsp. enterica ser. Enteritidis* CCM 4420, kde byla viděna úplná inhibice růstu po 48 hodinové kultivaci a to u všech koncentrací (25 mg/l - 1500 mg/l). Výrazný inhibiční efekt tohoto MAG byl shledán i u *Proteus mirabilis* CCM 7188 po 48 hodinách kultivace, nikoliv však tak vysoký jako u salmonely. Pro potvrzení tohoto zjištění by bylo potřeba provést další experiment. [16, 19, 20, 50, 51]

Studie uvádí, že grampozitivní bakterie jsou výrazně citlivější vůči působení monoacylglycerolů. Ve studiích je dále uvedeno, že jako nejúčinnější monoacylglyceroly, se jeví MAG C10:0, MAG C11:0 a MAG C12:0, což bylo potvrzeno i naší studií. Účinky MAG C8:0 nejsou ani vůči grampozitivním bakteriím příliš popsány. Studie Naira a kol. uvádí, že MAG C8:0, působil výrazným inhibičním efektem na stafylokoky a streptokoky a to již po 6 hodinách kultivace. Použité koncentrace MAG C8:0 byly velmi vysoké, a to 5450 – 10900 mg/l. Dle výsledků naší studie, byl prokázán nejvýraznější inhibiční efekt u *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946. [20, 52]

MAG C10:0 je více prostudovaným monoacylglycerolem. Studie prokazují inhibiční efekt tohoto monoacylglycerolu. Inhibiční účinky byly prokázány u studie Růžičky, kde byl sledován inhibiční efekt na *Enterococcus faecalis* a další. V naší studii byl prokázán inhibiční efekt u *Enterococcus faecalis* CCM 2665 a *Enterococcus faecalis* CCM 4224, kde byl viděn výrazný pokles indexu růstu buněk u všech koncentrací. Studie Bergssona a kol. také potvrzuje inhibiční účinky MAG C10:0. V této studii byly sledovány účinky tohoto MAG na stafylokoky a streptokoky. Bylo prokázáno, že streptokoky byly zcela inhibovány MAG C10:0 v koncentracích 308 – 1231,5 mg/l. Dále bylo ve studii Růžičky zjištěno, že MAG C10:0 může také inhibovat růst kvasinek a plísni. [20, 53]

Poměrně nejvíce studovaným monoacylglycerolem je MAG C12:0. Jeho výrazná inhibiční aktivita byla proti grampozitivním bakteriím prokázána v mnoha publikacích. Inhibiční účinek MAG C12:0 proti *Enterococcus faecalis* dokazuje ve své práci například Dufour a kol. V naší studii byl prokázán velmi vysoký inhibiční efekt u *Enterococcus faecalis* CCM 4224. Z publikované literatury jsou známy údaje o zvýšení inhibičního efektu MAG C12:0 na růst *Staphylococcus aureus*, pokud byly do kultivačního média přidány i další inhibiční látky. Možná je kombinace s dalším MAG nebo s jinou inhibiční látkou. Z literárních zdrojů dále vyplývá, že inhibiční koncentrace MAG C12:0, které způsobují zastavení růstu *Bacillus cereus* nebo *Bacillus anthracis*, je již při velmi nízkých koncentracích a to při 25 – 70 mg/l. [50, 51, 54, 55, 56]

ZÁVĚR

Z výsledků získaných v této diplomové práci lze vyvodit následující závěry:

- Disková difúzní metoda není příliš vhodná pro testování inhibičních účinků monoacylglycerolů a mastných kyselin sledovaných bakterií z důvodu většího počtu falešně negativních výsledků.
- Jako vhodnější se proto testování jeví mikrotitrační diluční metoda, pomocí které byly zjištěny reálnější výsledky.
- Všechny MAG jsou efektivní inhibiční látky, které potlačují růst mikroorganismů. Nejvýraznější inhibiční efekt byl prokázán po 48 hodinové kultivaci.
- Mastné kyseliny nedosahují tak výrazných inhibičních efektů jako příslušné MAG.
- U *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 byl prokázán nejvyšší inhibiční efekt u MAG C10:0. U všech koncentrací MAG byl viděn nárůst buněk po 48 hodinách kultivace pod 5 %.
- U *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 byly shledány jako nejúčinnější inhibiční látky, po 48 hodinové kultivaci, MAG C10:0 a MAG C12:0. Oba MAG působily inhibičně ve všech testovaných koncentracích. Způsobily snížení indexu růstu pod 15 %.
- U *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 byly po 48 hodinové kultivaci zaznamenány inhibiční efekty také u všech MAG. Z MAG byl shledán jako nejefektivnější MAG C12:0. Způsobil nárůst buněk pod 10 % u koncentrací 25-50 mg/l a u koncentrací 100-1500 mg/l pod 5 %.
- U *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 byl pozorován nejvýraznější inhibiční efekt u MAG C8:0 všechny koncentrace tohoto MAG způsobily snížení indexu růstu pod 15 %.
- U *Enterococcus faecalis* CCM 2665 bylo po 48 hodinové kultivaci prokázáno, že všechny MAG působí inhibičně na tuto bakterii. Nejvyšší inhibiční efekt byl viděn u MAG C10:0, kde všechny koncentrace tohoto MAG způsobily nárůst buněk pod 5 %. U *Enterococcus durans* CCDM 53 byl viděn výrazný inhibiční efekt u všech MAG.

- U *Enterococcus faecalis* CCM 4224 byl po 48 hodinové kultivaci prokázán výrazný inhibiční efekt u všech MAG, zejména u MAG C8:0 a MAG C12:0. MAG C8:0 způsobil i úplnou inhibici růstu buněk.
- U *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 a *Proteus mirabilis* CCM 7188 působil inhibičně po 48 hodinové kultivaci MAG C8:0.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KROG, N. Crystallization properties and lyotropic phase behavior of food emulsifiers, *Journal of Food Emulsifier*, 1997, 505-525.
- [2] GUNSTONE, F, Daniela KRAMÁŘOVÁ a Pavel BUDINSKÝ. The chemistry of oils and fats: sources, composition, properties, and uses. Vyd. 1. Boca Raton, FL: CRC Press, 2004, 288. ISBN 978-084-9323-737
- [3] *Monoacylglycerols* [online]. [cit. 2017-11-23]. Dostupný z <http://www.cyberlipid.org/glycer/glyc0002.html>
- [4] DOLEŽALOVÁ, M., JANIŠ, R., SVOBODOVÁ, H., KAŠPÁRKOVÁ, V., HUMPOLÍČEK, P., KREJČÍ, J. Antimicrobial properties of 1-monoacylglycerols prepared from undecanoic (C11: 0) and undecenoic (C11). *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2010, 1106-1114. ISSN 14387697.
- [5] FLACK, E. A., Monoglycerides and their derivatives – production and utilization, *Flavours Food Additives*, 1976, 104-109.
- [6] POKORNÝ, J. DUBSKÁ, L. Technologie tuků, Praha, SNTL, 1986.
- [7] MOULOUNGUI, Z., RAKOTONDRAZAFY, V., PEYROU, G., GACHEN C., EYCHENNE, V. Pure α -monoglycerides for industrial applications. *Agro Food Ind. Hi-Tech*, 1998, 9: 10-14.
- [8] LOK, C.M., MANK, A.P.J., WARD, J.P.: Synthesis of glycidol esters and mono/diacylglycerols from glycidol. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1956, 36: 329-334.
- [9] CARON, M., SHARPLESS, K.B. Ti(O-*i*-Pr)₄ – Mediated nucleophilic openings of 2,3- epoxy alcohols. A mild procedure for regioselective ring-opening. *J.Org.Chem.*, 1985, 50: 1557-1560
- [10] ULLRICH, L: Chémia a technológia jedlých tukov a olejov, SVTL, Bratislava, 1963, 140-164.
- [11] SONNTAG, N., O., V. Glycerolysis of Fats and Methyl Esters – Statut, *Review and Critique, J. Am. Oli Chem. Soc.*, 1982, 74: 795

- [12] HENRY, C. *Cereal Foods World*, 1995, 40: 734-738
- [13] WHITEHURST, J.R.: *Emulsifiers in food technology*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 2014, 73-90.
- [14] Vzdělávací portál [on-line]. [cit. 2017-12-10]. *Chemie a technologie tuků a detergentů*. Distanční text III. Dostupné z WWW: <http://utb.cepac.cz/Screens/Default.aspx>
- [15] SUN, C. Q., O'CONNOR, CH. J., ROBERTON, A. M. The antimicrobial properties of milk fat after partial hydrolysis by calf pregastric lipase. *Chemico-Biological Interactions*. 2002, 140: 185 - 198.
- [16] DAVIDSON, P. M., SOFOS, J. N., BRANEN, A. L. Food antimicrobials – an introduction. In: Davidson, P.M., Sofos, J.N., Branen, A.L. (eds.) *Antimicrobials in food*, 327-360. CRC Press, Boca Raton.
- [17] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., JANIŠ, R., KREJČÍ, J., DOLEŽALOVÁ, I., POSPÍŠIL, Z., RŮŽIČKA, J., TREMLOVÁ, B. Comparison of antibacterial effect of seven 1-monoglycerides on food-borne pathogens or spoilage bacteria. *Acta Veterinaria BRNO*. 2011, 80: 29-39.
- [18] WANG, L. L., JOHNSON, E. A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992, 58: 624-629.
- [19] SKŘIVANOVÁ, E., MAROUNEK, M., BENDA, V., BŘEZINA, P. Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin. *Veterinarni Medicina*. 2006, 51: 81 - 88.
- [20] RŮŽIČKA, J., VELCLOVÁ, K., JANIŠ, R., KREJČÍ, J. Antimicrobial effects of 1-monoacylglycerols prepared by catalytic reaction of glycidol with fatty acids. *Eur Food Res Technol*. 2003, 217: 329 - 331.
- [21] CONLEY, A. J., KABARA, J. J. Antimicrobial action of esters of polyhydric alcohols. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1973, 4: 501 - 506.
- [22] OH, D. H., MARSHALL, D. L. Antimicrobial activity of glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 1993, 20: 239 - 246.

- [23] CHAIBI, A., ABABOUC, L. H., BUSTA, F. F. Inhibition of bacterial spores and vegetative cells by glycerides. *Journal of Food Protection*. 1996, 59: 716-722.
- [24] THORMAR, H., BERGSSON, G. Antimicrobial effect of lipids, *Recent Devel Antiviral Research*, 2001, 1: 157-173.
- [25] THORMAR, H., BERGSSON, G., GUNNARSSON, E. Hydrogels containing monocaprin have potent microbial activities against sexually transmitted viruses and bacteria in vitro, *Sexually Transmitted Infections*, 1999, 75:181-185.
- [26] KABARA, J. J., OHKAWA, M., IKAWA, T., KATORI, T., NISHIKAWA, Y. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine*, 1985, 13: 263-272.
- [27] ŘÍHÁKOVÁ, Z., FILIP, V., PLOCKOVÁ, M., ŠMIDRKAL, J., ČERVENKOVÁ, R. Inhibice *Aspergillus niger* DMF 0801 monoacylglyceroly připravenými z kokosového oleje. *Czech Journal of Food Sciences*, 2002, 20: 8-52.
- [28] KABARA, J. J., VRABLE, R., LIE KEN JIE, M. S. F., Antimicrobial Lipids: Natural and Synthetic Fatty Acids and Monoglycerides, *Lipids*, 1977, 12: 753-759.
- [29] SHALABY, A. R., Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 1997, 29: 675-690.
- [30] MATOUŠ, Bohuslav, et al. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. vydání. Praha: Galén, 2010. 540. ISBN 978-80-7262-702-8.
- [31] SANTON, M. S. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, 29: 213-231.
- [32] ALVAREZ, M. A., MORENO-ARRIBAS M. V. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Food Science and Technology*. 2014, 146-155.
- [33] ÖNAL A., Current analytical methods for determination of biogenic amines in foods. *Food chemistry*. 2006, 103: 1475-1486.
- [34] VOET, D.; VOETOVÁ, J. G. *Biochemie*, 1. st ed.; Victoria Publishing: Praha, 1995. ISBN 80-85605-44-9.

- [35] HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., HOLZAPFEL, W. H. The biogenic amine content of beer; the effect of barley, malting and brewing on amine concentration. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*. 1999, 208: 418 - 423.
- [36] MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., RODWELL, V. W. *Harperova biochemie*. H & H. Praha : H a H, 2001. 872. ISBN: 80-7319-003-6.
- [37] HALÁSZ, A., BARÁTH, A., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms, *Trends Food Science Technology*, 1994, 5: 42-49.
- [38] DUCHOŇ, J. a kol. *Lékařská chemie a biochemie*. Praha, Avicenum, 1985, 715.
- [39] DOSTÁL, J.; KAPLAN, P.; et al. *Lékařská chemie II.*; Masarykova univerzita: Brno, 2003. 77 - 82. ISBN 80-210-2731-2
- [40] RESTUCCIA, Donatella et al. Accumulation of Biogenic Amines in Foods: Hazard Identification and Control Options. *Microbial Food Safety and Preservation Techniques*. CRC Press, 2015, 53.
- [41] SANTOS, M.H.Silla. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, 29: 213-231.
- [42] NAILA, Aishath et al. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science*. 2010, 75: 139-150.
- [43] ANLI, R. Ertan a Mustafa BAYRAM. Biogenic Amines in Wines. *Food Reviews International*. 2008, 25: 86-102.
- [44] LINARES, Daniel M. et al. Factors Influencing Biogenic Amines Accumulation in Dairy Products. *Frontiers in Microbiology*. 2012, 3: 1-10.
- [45] RUIZ-CAPILLAS, Claudia a Francisco JIMÉNEZ-COLMENERO. Biogenic Amines in Seafood Products. *Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis*. CRC Press, 2009, 833. ISBN 9781420046335.
- [46] BOBBA, Marco et al.. *Organic Bases*. Handbook of Food Analysis, Third Edition - Two Volume Set. CRC Press, 2015, 637. ISBN 978-1-4665-5654-6.

- [47] FERNANDES, Christian a Maria GLORIA. Bioactive Amines. Handbook of Food Analysis, Third Edition - Two Volume Set. CRC Press, , 2, 301, 2015. ISBN 978-1-4665-5654-6.
- [48] JANIŠ, R., KREJČÍ, J., KLÁSEK, A. Preparation of 1-monoacylglycerols from glycidol and fatty acids catalyzed by the chromium(III)-fatty acid system. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2000, 102: 351 – 354.
- [49] BLASZYK, M., HOLLEY, R.A. Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. *J. Food Microbiol.* 1998, 39: 175-183
- [50] SCHLIEVERT, P.M., DERINGER, J.R., KIM, M.H., PROJAN, S.J., NOVICK, R.P. Effect of glycerol monolaurate on bacterial growth and toxin production. Antimicrob. Agents. *Chemother.* 1992, 36: 626-631.
- [51] MCLAY, J.C., KENNEDY, M.J., O'ROURKE, A.-L., ELLIOT, R.M., SIMMONDS, R.S. Inhibition of bacterial foodborne pathogens by the lactoperoxidase system in combination with monolaurin. *Int. J. Food Microbiol.* 2002, 73: 1-9.
- [52] NAIR, M.K.M., JOY, J., VASUDEVAN, P., HINCKLEY, L., HOAGLAND, T.A., VENKITANARAYANAN, K.S. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 2005, 88: 3488-3495.
- [53] BERGSSON, G., AMFINNSSON, J., STEINGRÍMSSON, Ó., THORMAR, H. Killing of Grampositive cocci by fatty acids and monoglycerides. *APMIS.* 2001, 109: 670-678.
- [54] LEE, J.-Y., KIM, Y.-S., SHIN, D.-H. Antimicrobial synergistic effect of linolenic acid and monoglyceride against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50: 2193-2199.
- [55] DUFOUR, M., MANSON, J.M., BREMER, P.J., DUFOUR, J.-P., COOK, G.M., SIMMONDS, R.S. Characterization of monolaurin resistance in *Enterococcus faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73: 5507-5515.

- [56] PREUSS, H.G., ECHARD, B., ENIG, M., BROOK, I., ELLIOTT, B. Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for gram-positive and gram-negative bacteria. *Mol. Cell. Biochem.* 2005, 272: 29-34.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

MAG Monoacylglycerol

DAG Diacylglycerol

TAG Triacylglycerol

MK Mastná kyselina

MO Mikroorganismus

BA Biogenní amin

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. č. 1 Izomerní formy monoacylglycerolů – a) 1-monoacylglycerol, b) 2-monoacylglycerol</i>	14
<i>Obr. č. 2 Aplikace MAG v průmyslu</i>	15
<i>Obr. č. 3 Schéma esterifikace mastné kyseliny glycerolem</i>	16
<i>Obr. č. 4 Schéma glycerolýzy</i>	17
<i>Obr. č. 5 Schéma acidolýzy</i>	17
<i>Obr. č. 6 Schéma transesterifikace</i>	17
<i>Obr. č. 7 Schéma parciální hydrolyzy TAG</i>	18
<i>Obr. č. 8 Schéma adice mastné kyseliny na glycidol</i>	18
<i>Obr. č. 9 Schéma vzniku některých biogenních aminů</i>	24
<i>Obr. č. 10 Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst Lactococcus lactis subsp. lactis CCDM 48 po 24 hodinách</i>	44
<i>Obr. č. 11 Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst Lactococcus lactis subsp. lactis CCDM 48 po 48 hodinách</i>	45
<i>Obr. č. 12 Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst Lactococcus lactis subsp. lactis CCDM 141 po 24 hodinách</i>	46
<i>Obr. č. 13 Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst Lactococcus lactis subsp. lactis CCDM 141 po 48 hodinách</i>	47
<i>Obr. č. 14 Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst Lactococcus lactis subsp. lactis CCDM 1004 po 24 hodinách</i>	48
<i>Obr. č. 15 Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst Lactococcus lactis subsp. lactis CCDM 1004 po 48 hodinách</i>	49
<i>Obr. č. 16 Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst Lactococcus lactis subsp. cremoris CCDM 824 po 24 hodinách</i>	50
<i>Obr. č. 17 Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst Lactococcus lactis subsp. cremoris CCDM 824 po 48 hodinách</i>	50

Obr. č. 18 Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946 po 24 hodinách	52
Obr. č. 19 Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946 po 48 hodinách	52
Obr. č. 20 Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst <i>Enterococcus durans</i> CCDM 53 po 24 hodinách	54
Obr. č. 21 Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst <i>Enterococcus durans</i> CCDM 53 po 48 hodinách	54
Obr. č. 22 Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 26658 po 24 hodinách	55
Obr. č. 23 Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 2665 po 48 hodinách	56
Obr. č. 24 Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224 po 24 hodinách	57
Obr. č. 25 Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224 po 48 hodinách	58
Obr. č. 26 Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. <i>Enteritidis</i> CCM 4420 po 24 hodinách.....	59
Obr. č. 27 Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. <i>Enteritidis</i> CCM 4420 po 48 hodinách	59
Obr. č. 28 Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188 po 24 hodinách	60
Obr. č. 29 Účinky vybraných monoacylglycerolů a mastných kyselin na růst <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188 po 48 hodinách	61

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1 Povolené přídavky monoacylglycerolů (E 471) v potravinách	19
Tabulka č. 2 Přehled některých biogenních aminů	23
Tabulka č. 3 Biogenní aminy a jejich účinky na organismus	26
Tabulka č. 4 Příprava koncentrací MAG	32
Tabulka č. 5 Příprava koncentrací mastných kyselin.....	33
Tabulka č. 6 Spotřeby KOH při stanovení přesné koncentrace	36
Tabulka č. 7 Vypočítané hodnoty množství glycidolu, katalyzátoru a stupně konverze	38
Tabulka č. 8 Účinky monoacylglycerolů na růst bakterií stanovených diskovou meto- dou.....	42