

Inhibiční vliv monoacylglycerolů na bakterie rodu *Lactococcus*

Bc. Pavel Pleva

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Pavel PLEVA**
Osobní číslo: **T08880**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů a kosmetiky**

Téma práce: **Inhibiční vliv monoacylglycerolů na bakterie rodu Lactococcus**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Popište vlastnosti bakterií mléčného kvašení, zejména rodu *Lactococcus*.
2. Charakterizujte monoacylglyceroly, jejich využití v potravinářství a kosmetice a antimikrobní účinky.

II. Praktická část

1. Sledujte vliv různých monoacylglycerolů na růst bakterií rodu *Lactococcus*.
2. Popište vliv vybraných monoacylglycerolů na dekarboxylázovou aktivitu laktokoků.
3. Výsledky vyhodnoťte a formulujte závěry.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

WHITEHURST, R. J. Emulsifiers in food technology, Northampton: Blackwell Publishing, 2004, ISBN 1-4051-1802-4.

S. SADO KAMDEM, M.E. GUERZONI, J. BARANYI , C. PIN, Effect of capric, lauric and α -linolenic acids on the division time distributions of single cells of Staphylococcus aureus, International Journal of Food Microbiology 128 (2008) 122--128.

L. SAGALOWICZ, M.E. LESER, H.J. WATZKE, M. MICHEL Monoglyceride selfassembly structures as delivery vehicles, Trends in Food Science & Technology 17 (2006) 204--214.

CATHERINE TANOUS, EMILIE CHAMBELLON, DOMINIQUE LE BARS, GILBERT DELESPAUL, MIREILLE YVON, Glutamate Dehydrogenase Activity Can Be Transmitted Naturally to Lactococcus lactis Strains To Stimulate Amino Acid Conversion to Aroma Compounds, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Feb. 2006, p. 1402--1409.

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

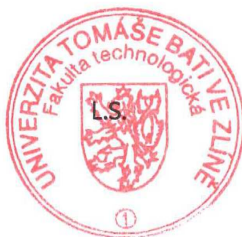
Datum zadání diplomové práce: **22. února 2010**

Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2010**

Ve Zlíně dne 22. února 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.
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 užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně

.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá možnostmi využití monoacylglycerolů jako antimikrobiálních látek proti bakteriím rodu *Lactococcus*. Teoretická část je zaměřena na charakteristiku, klasifikaci a fyzikálně chemické vlastnosti monoacylglycerolů, jejich výrobu a použití. Jsou charakterizovány biogenní aminy, jejich vznik, možnosti stanovení, jejich výskyt a účinky na organismus. Praktická část se pak zabývá vyhodnocením inhibičních účinků monoacylglycerolů a dekarboxylázovou aktivitou mikroorganismů rodu *Lactococcus*.

Klíčová slova:

1-monoacylglycerol, biogenní amin, dekarboxylázová aktivita, rod *Lactococcus*

ABSTRACT

The inhibitory effect of monoacylglycerols on bacteria of the genus *Lactococcus*. Presented master thesis deals with possible use of monoacylglycerols as antimicrobial substances against *Lactococcus* bacteria. Theoretical part is focused on characterisation, classification and physico-chemical properties of monoacylglycerols. Their production and use are mentioned. Biogenic amines are characterised; their origin, occurrence, possibilities of determination and their effect on organism are presented as well. Practical part deals with both the evaluation of inhibition effect of monoacylglycerols and the decarboxylase activity of the *Lactococcus* bacteria.

Keywords:

1-monoacylglycerols, Biogenic amines, decarboxylase activity, *Lactococcus* bacteria

.

Poděkování

Děkuji tímto RNDr. Leoně Buňkové Ph.D. za pomoc při vedení mé diplomové práce a za to, že mi umožnila pracovat v mikrobiologické laboratoři Technologické fakulty.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci Inhibiční vliv monoacylglycerolů na bakterie rodu *Lactococcus*, vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Leony Buňkové Ph.D., a uvedl v seznamu literatury všechny použité literární a odborné zdroje.

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

Pavel Pleva

.....

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 MONOACYLGLYCEROLY	12
1.1 CHARAKTERISTIKA MONOACYLGLYCEROLŮ	12
1.2 DRUHY A KLASIFIKACE MONOACYLGLYCEROLŮ	12
1.3 FYZIKÁLNĚ CHEMICKÉ VLASTNOSTI MONOACYLGLYCEROLŮ.....	13
1.4 PRODUKCE MONOACYLGLYCEROLŮ	15
1.4.1 Acidolýza	16
1.4.2 Alkoholýza (glycerolýza).....	17
1.4.3 Transesterifikace esterů vyšších MK	18
1.4.4 Esterifikace MK s glycerolem.....	18
1.4.5 Hydrolýza.....	19
1.4.6 Adice MK na glycidol nukleofilním otevřením epoxidového kruhu	21
1.5 VYUŽITÍ MONOACYLGLYCEROLŮ	21
1.6 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY MONOACYLGLYCEROLŮ	24
2 BIOGENNÍ AMINY	25
2.1 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ.....	25
2.2 CHEMICKÁ STRUKTURA BIOGENNÍCH AMINŮ.....	25
2.3 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ	26
2.4 ÚČINKY BIOGENNÍCH AMINŮ	29
2.4.1 Metabolismus vzniku aminů s účinky na organismus.....	30
2.5 DETEKCE VOLNÝCH AMINOKYSELIN A BIOGENNÍCH AMINŮ	30
2.5.1 Iontově-výměnná (ionexová) kapalinová chromatografie.	31
3 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	33
3.1 ROD <i>LACTOCOCCUS</i>	33
3.1.1 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	34
3.1.2 <i>Lacococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	35
4 RŮST MIKROORGANISMŮ A MOŽNOSTI DETEKCE	36
4.1 STANOVENÍ RŮSTU MIKROORGANISMŮ.....	36
4.1.1 Turbidimetrické stanovení počtu buněk.....	36
4.2 DYNAMIKA RŮSTU MIKROORGANISMŮ	36
Lag-fáze.....	37
Fáze zrychleného růstu.....	37
Exponenciální fáze růstu	37
Stacionární fáze růstu	38
Fáze odumírání	38
4.2.1 Turbidimetrické stanovení počtu buněk.....	38
II EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
5 CÍL PRÁCE	40
6 MATERIÁL A PŘÍSTROJE	41

6.1	POUŽITÉ MIKROORGANISMY	41
6.2	KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	41
6.3	CHEMIKÁLIE.....	42
6.4	ZÁSOBNÍ ROZTOKY	42
6.5	PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	44
6.6	POMŮCKY.....	45
7	METODIKA	46
7.1	STANOVENÍ DEKARBOXYLÁZOVÉ AKTIVITY RODU LACTOCOCCUS.....	46
7.2	CHROMATOGRAFICKÁ DETEKCE BIOGENNÍCH AMINŮ	46
7.3	STANOVENÍ MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE 1-MONOACYLGLYCEROLŮ	46
7.4	STANOVENÍ INHIBIČNÍCH ÚČINKŮ 1-MONOACYLGLYCEROLŮ	47
8	VÝSLEDKY A DISKUSE	48
8.1	STANOVENÍ INHIBIČNÍHO Vlivu 1-MONOACYLGLYCEROLŮ NA ROD LACTOCOCCUS	48
8.1.1	Stanovení minimální inhibiční koncentrace.....	48
8.1.2	Sledování vlivu přídavku aminokyseliny tyrozinu a inhibičních účinků monoacylglycerolů.....	49
8.2	STANOVENÍ INHIBIČNÍCH ÚČINKŮ 1-MONOACYLGLYCEROLŮ	52
8.3	STANOVENÍ PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ.	62
	ZÁVĚR	67
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	76
	SEZNAM OBRÁZKŮ	77
	SEZNAM TABULEK.....	79

ÚVOD

Bakterie mléčného kvašení jsou nenahraditelné v potravinářském průmyslu. Jsou využívány pro schopnost přeměny laktózy na kyselinu mléčnou, což napomáhá konzervaci potravin, a také zlepšují vlastnosti fermentovaných potravin. Některé kmeny mléčných bakterií mají i dieteticky léčebné účinky.

Monoacylglyceroly jsou látky využívané převážně v potravinářském a kosmetickém průmyslu jako emulgátory a stabilizátory. Monoacylglyceroly dokáží inhibovat některé mikroorganismy, zde se tedy nabízí možnost inhibovat nežádoucí mikroorganismy v potravinách a kosmetice. Možnosti využití monoacylglycerolů jsou široké, díky jejich emulgačním, antimikrobiálním a stabilizačním vlastnostem. V poslední době se monoacylglyceroly využívají i ve farmaceutickém, nebo také v obuvnickém a kožedělném průmyslu.

Biogenní aminy se vyskytují prakticky ve všech živých organismech. Vznikají dekarboxylací aminokyselin, jako je např. tyrozin, kterému odpovídá biogenní amin tyramin. Biogenní aminy mohou na lidský organismus působit toxicky. Jejich význam roste se zvýšenou konzumací těchto potravin. Biogenní aminy se nejčastěji vyskytují ve fermentovaných potravinách, jako jsou: sýry, maso, víno, pivo a ryby. Spousta těchto potravinářských produktů je náchylná ke kažení mléčnými bakteriemi pozitivními na dekarboxylázovou aktivitu.

Podstatnou roli v zabránění dekarboxylázové aktivity a zabránění nežádoucího růstu bakterií rodu *Lactococcus* mohou hrát antimikrobiální látky, mezi které monoacylglyceroly patří. Monoacylglyceroly mohou zabránit růstu bakterií, ale i jejich přežívání v prostředí, a tedy i zabránit vzniku biogenních aminů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MONOACYLGLYCEROLY

První monoacylglycerol (MAG) byl syntetizován v roce 1853 Frenchmanem Berthelotem. Hlavním průlomem se stala aplikace MAG při výrobě margarínů [1]. Při objevu vlastností a množství monoacylglycerolů v tukových částicích byly monoacylglyceroly patentovány roku 1936 pro výrobu mléčných mražených krémů. V těchto letech nastal počátek využívání monoacylglycerolů v pekárenském průmyslu [1].

Dnes se produkce MAG odhaduje v řádech 300 000 t ročně. Monoacylglyceroly, diacylglyceroly, a jejich deriváty zodpovídají za 70% světové produkce emulgátorů a jsou považovány za nejdůležitější skupinu emulgátorů. MAG se využívají především při výrobě chleba, pekárenských výrobků, margarínů, zmrzlin, žvýkacích gum. Funkcí MAG v potravinách, v kosmetice a dalších materiálech je především tvorba škrobových komplexů, provzdušňování, emulzifikace, deemulzifikace, mikrobicidní a lubrikační účinky. MAG se využívají také při úpravě ryb, drůbeže, čerstvého ovoce a zeleniny [1].

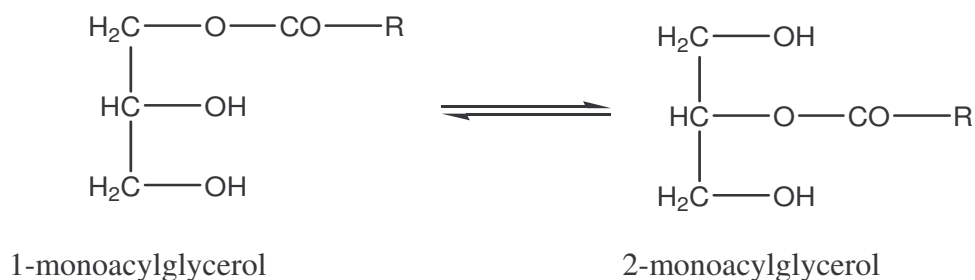
1.1 Charakteristika monoacylglycerolů

Monoacylglyceroly jsou obecně tvořeny mastnými kyselinami (MK), které jsou esterovou vazbou navázány ve formě acylu na glycerol. Takto vzniklá molekula MAG má polární a nepolární část a tyto části vykazují povrchově aktivní vlastnosti. MAG jsou schopny tvořit trojrozměrné struktury. Monoacylglyceroly jsou látky netoxické, biologicky snadno odbouratelné. Ve vodě jsou částečně rozpustné jen MK. Hustota monoacylglycerolů klesá s rostoucí délkou řetězce MK a s klesajícím stupněm nasycenosti, kyslíkaté funkční skupiny hustotu zvyšují [2].

Monoacylglyceroly jsou parciální estery glycerolu s vyššími mastnými kyselinami. Vznikají substitucí jednoho vodíku hydroxylové skupiny zbytkem (acylem) mastné kyseliny [3]. Pokud jsou v poloze 1 a 3 vázány různé mastné kyseliny (8 – 18 uhlíků), stává se uhlík v poloze 2 opticky aktivním [4].

1.2 Druhy a klasifikace monoacylglycerolů

Podle polohy acylu v glycerolu vznikají dva izomerní MAG, 1-monoacylglycerol a v poloze 2-(β), 2-monoacylglycerol, lišící se polohou navázání zbytku mastné kyseliny (Obr. 1) [3, 5].



Obr. 1 Isomerní formy monoacylglycerolů.

1.3 Fyzikálně chemické vlastnosti monoacylglycerolů

Monoacylglyceroly jsou tuhé látky ve formě vloček, prášku, anebo malých krystalů. Jsou nerozpustné ve vodě, ale mohou tvořit stabilní hydratovanou disperzi. Mají vyšší disperzibilitu, protože vytváří krystalický mesomerní efekt, zatímco nedestilované MAG a DAG ve většině případů vytváří emulzi (způsobeno hydrofilně lipofilní rovnováhou). MAG jsou polymorfní, mohou existovat v různých krystalických formách v závislosti na teplotě. Z taveniny vykrystalizují v metastabilní α formy a přemění se prostřednictvím β prvotní formy do nejstabilnější β -krystalické formy [6].

Monoacylglyceroly jsou rozpustné v polárních rozpouštědlech, hůře rozpustné v acetonu a nerozpustné v petroletheru. Triacylglyceroly (TAG) jsou naopak v alkoholu nepatrně rozpustné a v petroletheru se rozpouštějí dobře [2, 3].

Emulgační schopnost MAG závisí na druhu MK, jejíž zbytek je přítomen v esteru a na druhu kapaliny na dotykové ploše, jejíž povrchové napětí se má snížit [7].

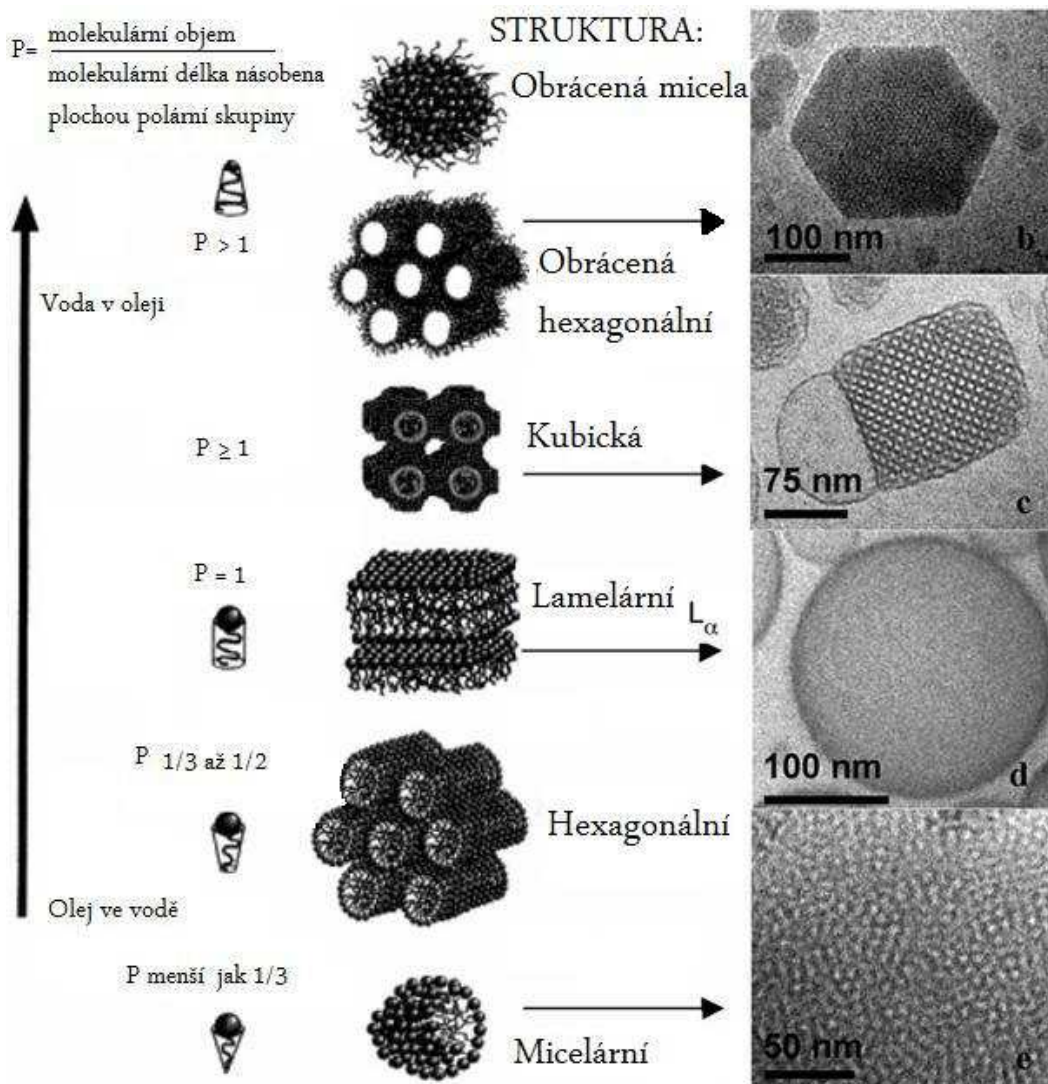
Povrchové vlastnosti MAG jsou ovlivněny polární a nepolární částí molekul a vyvážeností hydrofobní a hydrofilní vrstvy. Tato vrstva je charakterizována jako hydrofilně lipofilní rovnováha (HLB). Hodnota HLB se u MAG pohybuje v intervalu 4 – 7, díky těmto hodnotám MAG vytvářejí emulze typu voda v oleji (v/o) [2]. V disperzích se molekuly orientují na rozhraní polární (vodné) a nepolární (olejové) fáze tak, že hydrofobní konce molekul tvořené řetězcem MK směřují do hydrofobní fáze a hydrofilní část molekuly směřuje do vodné fáze. Takto vytvořený film stabilizuje disperzi a usnadňuje dispergaci [3, 8].

Protože jsou MAG poměrně málo polární, zvyšuje se jejich emulgační účinnost přidáním fosfolipidů nebo bílkovin. Méně polární emulgátory se hodí pro přípravu emulzí voda v oleji (v/o) a polárnější pro emulze olej ve vodě (o/v). Pro některé účely je

emulgační schopnost zlepšována esterifikací MAG různými kyselinami, např. kyselinou mléčnou, kyselinou vinnou, kyselinou citrónovou [3].

Biochemické a fyzikálně chemické reakce jsou závislé na poloze navázání acylového zbytku na hydroxylované skupině [8]. Teplota tání se zvyšuje s počtem uhlíkových atomů v řetězci a proporcionálně snižuje s nárůstem nenasycenosti. Monoacylglyceroly mají bod tání vyšší než jejich příslušná MK. Teplota tuhnutí stejného MAG leží mírně nad teplotou tání, rozdíl teplot je obvykle 5 – 15°C [9]. Se zvyšujícím se počtem násobných vazeb ve zbytku MK se také zvyšuje pravděpodobnost oxidačních změn MAG [2].

MAG tvoří prostorové útvary, pod teplotou tání vytváří kapalné krystaly hexagonálního, kubického nebo lamelárního tvaru. Tento mesomorfní efekt vzniká mezi krystalickým a kapalným stavem za předpokladu vysoké čistoty a dobře definované molekulární struktury. Tvorba kapalných krystalů závisí na teplotě a na vzájemném poměru vody a monoacylglycerolů [1]. Některé možné struktury jsou znázorněny (Obr.2).



Obr. 2 Zobrazení některých možných přirozených struktur a jejich odpovídající faktory zhuštění. Převzato od [10].

(b) dispergovaná reverzní hexagonální fáze, (c) dispergovaná reverzní spojitá kubická fáze, (d) dispergované lamelární kapalně krystalické fáze (tato fáze je získána ze směsi Dimodan U a $C_{21}H_{39}NaO_4$), (e) micelární disperze (Tato disperze je získána z polysorbate 80 solution) [11, 12, 13].

1.4 Produkce monoacylglycerolů

Monoacylglyceroly jsou v současné době vyráběny: interesterifikací (alkoholýzou, acidolýzou, transesterifikací), esterifikací volných mastných kyselin s glycerolem, parciální hydrolyzou triacylglycerolů (TAG) a nukleofilní adicí mastné kyseliny na oxiran-2-yl-methanol. Způsob výroby MAG ovlivňuje jejich kvalitu i kvantitu [14].

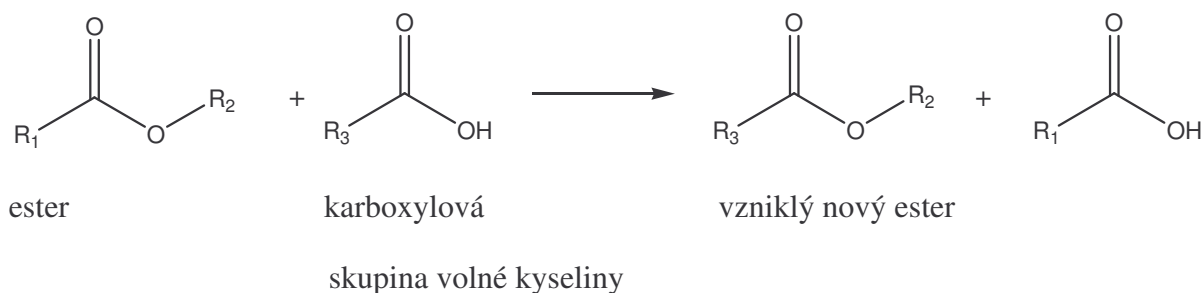
Nejčastěji jsou MAG vyráběny interesterifikací z TAG, kdy TAG a glycerol reagují za teplot 200 – 250 °C při alkalické katalýze a vzniká směs monoacylglycerolů, diacylglycerolů (DAG), triacylglycerolů a malý zlomek nezreagovaného glycerolu. Komerčně vyrobené emulgátory obvykle obsahují 45 – 55 % MAG, 38 – 44 % DAG, 8 – 12 % TAG a 1 – 7 % volného glycerolu [14].

Výroba MAG a DAG je kontinuální nebo diskontinuální [15, 16], na principu přímé esterifikace glycerolu a mastných kyselin, při teplotách 200 – 250 °C s přidavkem NaOH, například ze zmýdelněných tuků a olejů. MAG mohou být odděleny z DAG a TAG destilací [17]. Teplota této destilace je obvykle 140 – 170 °C za vakua, důležitá je doba, při které tyto teploty působí na směs [1]. Monoacylglyceroly vyrobeny touto cestou obsahují vyvážené množství 1-MAG, 2-MAG. Poměr těchto dvou izomerů je závislý na teplotě destilace [17].

Přestože jsou monoacylglyceroly chemicky syntetizovatelné, existují také jako meziproducty metabolismu lipidů a výměny látek v živém organismu [8].

1.4.1 Acidolýza

Acidolýza je reakce karboxylové skupiny volné kyseliny s esterem za vzniku meziproductu, z něhož se uvolní kyselina dříve vázaná na ester za vytvoření nového esteru (Obr. 2). V tomto esteru je na alkohol vázána kyselina, která byla na začátku reakce volná [4]. Při acidolýze se acylový zbytek jedné MK vymění za jiný kyselinový zbytek za vzniku TAG. Acidolýza samovolně probíhá při 250 °C, v přítomnosti kyseliny sírové jako katalyzátoru při 158 °C. Následně probíhá hydrolyza, která ze vzniklých TAG vytvoří MAG. Velkou nevýhodou acidolýzy je neselektivita reakce [2].

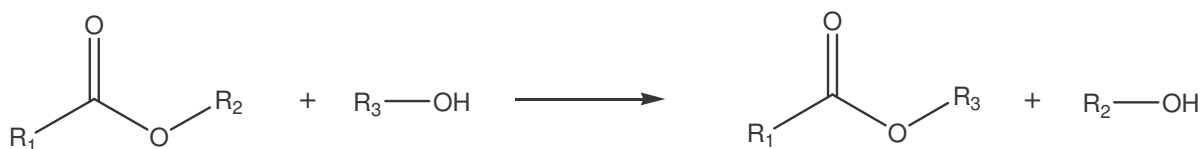


Obr. 3 Obecné reakční schéma acidolýzy.

Acidolýzou brutnákového oleje kyselinou γ -linolenovou a kaprylovou, kyselinou katalyzovanou imobilizovanými lipázami, která probíhá při 30 °C, lze vyrábět MAG pro kosmetický a potravinářský průmysl [18].

1.4.2 Alkoholýza (glycerolýza)

Alkoholýza je reakce esterů glycerolu s alkoholem, kdy dochází k výměně alkoholové složky esteru (Obr. 3). Probíhá jak s jednofunkčními tak i vícefunkčními alkoholy. Alkoholýza je společně s přímou esterifikací MK nejvíce používanou průmyslovou výrobou MAG. Nevýhodou jsou komplikované reakční podmínky jako vakuum, inertní atmosféra a vysoké reakční teploty [2]. Při dostatečném záhřevu probíhá reakce i v neutrálním prostředí.

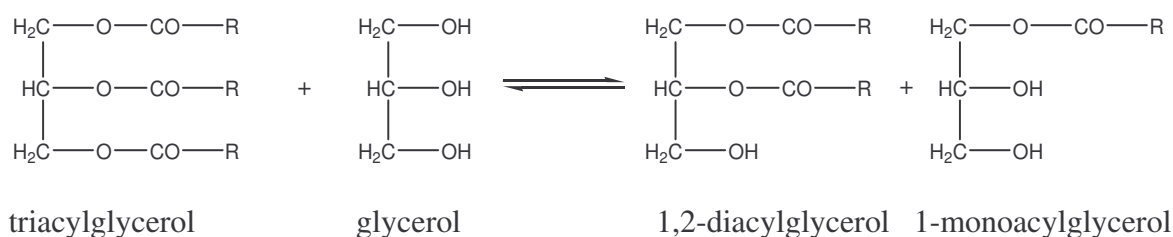


Výměna alkoholové složky esteru

Obr. 4 Obecné reakční schéma alkoholýzy.

Podle typu použitého alkoholu se dělí alkoholýza na methanolýzu, ethanolýzu, glycerolýzu apod.

Začátek reakce probíhá pomalu, acylglycerol je rozpuštěn v alkoholické fázi jen částečně. V další fázi se vytváří homogenní roztok a rychle se ustanoví rovnováha. Reakce může být katalyzována kyselými (kyselina sírová, bezvodý chlorovodík) nebo alkalickými (hydroxid či alkoholát draselný nebo sodný) katalyzátory. Bez použití katalyzátorů jsou nutné teploty okolo 250 °C. Nevýhodou alkalické katalýzy je možnost vytvoření mýdel při vysokém obsahu volných MK ve výchozí reakční směsi, které emulgují a komplikují reakci [2].



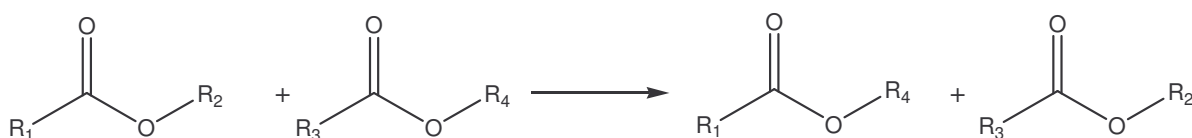
Obr. 5 Obecné reakční schéma glycerolýzy.

Kontinuální chemická glycerolýza (Obr. 5) je nejpoužívanější alkoholýzou tuků a olejů. Výroba probíhá jako reesterifikace glycerolu. Jedná se o reakce TAG s molekulou glycerolu, touto reakcí postupně přechází TAG na DAG a MAG. Kromě 1,2-diacylglycerolu může vznikat například i 1,3-diacylglycerol. Reakce probíhá při teplotách 200 – 240 °C v ochranné atmosféře dusíku nebo oxidu uhličitého, aby se zabránilo nežádoucí oxidaci nenasycených MAG [2, 19]. Pro katalýzu se nejčastěji používají alkalické katalyzátory (NaOH, KOH, methylát ethylát sodný [7], popř. sodík, draslík, selen [16] a méně obvyklé heterogenní hydrokalcity [20]). Molekulární destilace je nezbytná pro zvýšení výtěžnosti MAG [2].

Nastavení optimálních reakčních podmínek (teplota a množství vody) a druh enzymu má vliv na stupeň konverze. Při glycerolýze nenasycených produktů je nebezpečí inaktivace lipáz peroxidy obsaženými v tuku. Často dochází ke vzniku menšího množství 2-monoacylglycerolů [19]. Alkoholýzou může být i přesmyk esterové skupiny u esterů vícefunkčních alkoholů. Např. 2-monoacylglycerolu na 1-monoacylglycerol.

1.4.3 Transesterifikace esterů vyšších MK

Transesterifikací dochází k vzájemné mezimolekulární výměně acylové nebo alkoholové skupiny jednoho esteru za acylovou či alkoholickou skupinu jiného esteru (Obr. 6). Jde o iontovou reakci katalyzovanou vodíkovými nebo hydroxylovými ionty. Pokud dojde k výměně zbytku MK obsažených v různých molekulách TAG, hovoříme o autotransesterifikaci. Reakční rychlost závisí na struktuře alkoholu, rozvětvenosti MK a klesá s rostoucí molekulovou hmotností [21, 22, 23].



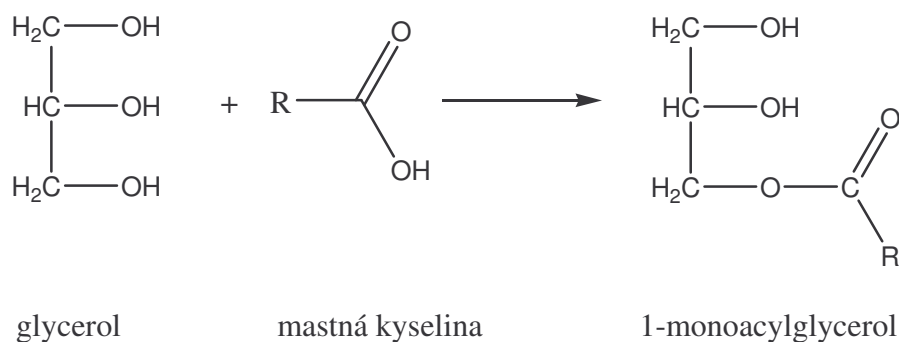
Obr. 6 Reakční schéma esterové výměny.

Poměr alkoholu k oleji je jedním z hlavních faktorů transesterifikace. Přebytek alkoholu podporuje tvorbu produktů, nadměrné množství však ztěžuje využití glycerolu, takže poměr se stanovuje empiricky [24].

1.4.4 Esterifikace MK s glycerolem

Přímým působením glycerolu na MK vznikají nejprve MAG (Obr. 7), z nich DAG a nakonec TAG. Jedná se o málo využívanou metodu výroby. Při výrobě může vznikat

více kombinací monoacylglycerolů (1-monoacylglyceroly, 2-monoacylglyceroly). Reakce probíhá při styku alkoholu s karboxylovou kyselinou až do dosažení rovnovážného stavu. Vzniká ester a voda. Jako katalyzátory se nejčastěji používají kyselina sírová, chlorovodíková, fosforečná, sulfonové kyseliny nebo boritany. Díky těmto katalyzátorům získáme vysoké výtěžnosti, ale reakce probíhají velice pomalu [2, 23, 25, 26, 27, 28].



Obr. 7 Reakční schéma esterifikace mastné kyseliny s glycerolem.

Využití enzymatických katalyzátorů umožňuje stabilita lipáz v organických rozpouštědlech. Typ a množství produktu ovlivňuje, za jakých podmínek je reakce prováděna, dále množství produktu ovlivňuje přidavek vody v počáteční fázi reakce a výběr enzymu. Katalyzátory také ovlivňují, zda nedojde ke zpětnému rozkladu na původní látky. Lipázy se získávají z *Candida cylindracea*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizomucor miehe* nebo *Brassica napus* [29, 30].

Esterifikace je iontová reakce, která vyžaduje přítomnost vodíkových i hydroxidových iontů. Vodíkové ionty jsou do reakce poskytovány minerálními kyselinami. Působením mastných kyselin a vodíkového iontu na glycerol může během esterifikace dojít k přesmyku vytvořením 2-monoacylglycerolu, který přechází na stabilnější 1-monoacylglycerol [31, 32].

1.4.5 Hydrolýza

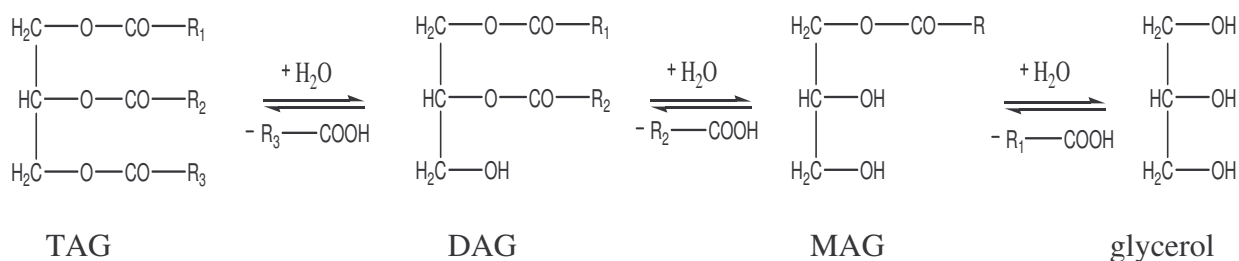
Hydrolýza je opakem esterifikace (Obr. 8). Reakce je stupňovitá, nejprve se odštěpí z TAG zbytek jedné MK za vzniku DAG, po odštěpení dalšího acylu je vytvořen MAG. Další hydrolýzou vzniká volný glycerol a MK (Obr. 10). Nevýhodou hydrolýzy je nízký stupeň konverze 2 mol MK na 1 mol MAG [7]. K hydrolýze (zmýdelnění) může docházet také s NaOH (Obr. 9).



Obr. 8 Reakční schéma hydrolýzy.



Obr. 9 Reakční schéma zmýdelnění.



Obr. 10 Reakční schéma hydrolýzy triacylglycerolu a vzniku glycerolu.

Tuky a oleje jsou estery, které se za určitých podmínek hydrolyzují (pomocí vody) na své původní složky. Hydrolýza je využívána pro štěpení tmavých tuků a olejů s vysokým číslem kyselosti, spíše při výrobě MK než MAG. Výroba probíhá kontinuálně, kdy jsou tuky hydrolyzovány v protiproudu páry při vysokých tlacích [16, 33].

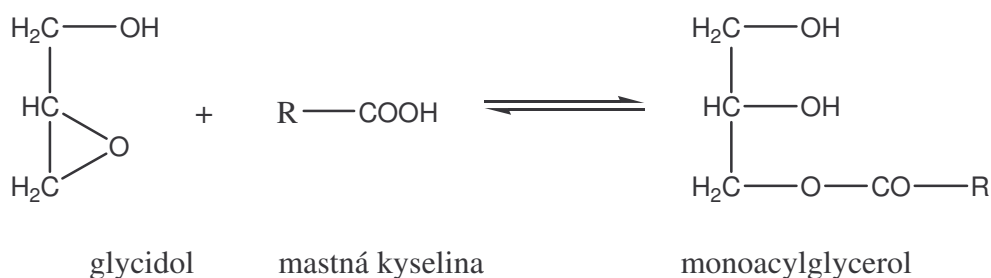
Reakce probíhá za přítomnosti kyselých nebo zásaditých katalyzátorů (oxidy nebo hydroxidy hořčíku, zinku, olova), vodní páry popřípadě enzymů. Tato reakce je homogenní, voda vstupuje rozpuštěna do tukové fáze. Při teplotě 300 °C je tato rozpustnost neomezená [2].

U enzymatické hydrolýzy je nutné kontrolovat reakci, aby se zabránilo dovršení hydrolýzy až na MK a alkohol. Výhodami enzymatické hydrolýzy jsou mírné reakční podmínky, dobrá selektivita a dosažení vysoké konverze. Výhodou použití enzymatických katalyzátorů jsou mírné reakční podmínky (22 – 70 °C), konverze až 96 %, dobrá selektivita a šetrnost k životnímu prostředí. Nevýhodou enzymatické hydrolýzy je vysoká náročnost výběru vhodného typu enzymu (dle typu acylu), striktní dodržování reakčních podmínek, dlouhé reakční časy a často nedostupnost enzymatických preparátů [2].

V parciálně hydrolyzovaném tuku jsou kromě volných MK a glycerolu i MAG a DAG. Jejich množství závisí na způsobu štěpení. Reakce je zajišťována hydroxidovými anionty z alkalického prostředí a vodíkovými kationty při hydrolýze vodou nebo kyselinami [7].

1.4.6 Adice MK na glycidol nukleofilním otevřením epoxidového kruhu

Tato reakce je nejmladší na poli syntézy MAG. Při přípravě MAG regioselektivním, nukleofilním otevřením epoxidového kruhu glycidolu (2,3-epoxy-1-propanol) nedochází k tvorbě vedlejších reakčních produktů a vzniká 1-(2) MAG (Obr. 11).



Obr. 11 Reakční schéma adice mastné kyseliny na glycidol.

Reakce bez přítomnosti katalyzátoru vede k vytvoření směsi MAG, DAG a TAG. Jako katalyzátory jsou využívány terciární aminy, amoniové soli, alkoxydy [34, 35, 36, 37], komplexy tranzitních kovů (chrom, kobalt, nikl) [38], lanthanoidů (europium, samarium) a komplexy tetraizopropoxitanátu. [35]. Mezi výhody této výroby patří univerzálnost a vysoká regioselektivita reakce, vysoká konverze, malé množství použitého katalyzátoru, snadná příprava katalyzátoru a především je použit bezrozpouštědlový systém. Nevýhodou výroby MAG adicí MK na glycidol je vysoké množství Cr^{3+} obsaženého ve vysokých koncentracích v MAG, často přesahující potravinářské a farmaceutické normy. Snížení Cr^{3+} lze například dosáhnout vykrystalizováním v alkalickém etanolu. Po výrobě jsou monoacylglyceroly nejčastěji děleny a identifikovány pomocí chromatografických metod [34, 36].

1.5 Využití monoacylglycerolů

Největším producentem a zároveň spotřebitelem MAG je potravinářský průmysl. Monoacylglyceroly se využívají jako emulgátory při výrobě potravin. Optimální emulgace je dosažena s tzv. koemulgátory. MAG patří do skupiny přídatných aditivních látek, označovaných pod kódem E472, přidávanými do potravin za účelem zlepšení nebo úpravy

chemického složení, fyzikálněchemických vlastností, nutričních nebo sensorických vlastností nebo ochranu potravin před nežádoucími změnami. MAG se nepoužívají samostatně jako potravina [1, 39].

Tab. 1 Výňatek z vyhlášky č.152/2005 Sb. v platném znění [39].

Číslo E	Látka	Použití
E472	Estery mono- a di- glyceridů mastných kyselin s kyselinou octovou, mléčnou, citrónovou, vinnou a acetylvinnou; estery mono a diglyceridů s kyselinou octovou a vinnou	Emulgátor, stabilizátor, sekvestrant

Důvodem používání monoacylglycerolů v potravinářském průmyslu jsou vlastnosti jako: Schopnost snižovat mezipovrchové napětí na rozhraní dvou nemísitelných kapalin o různé polaritě, což usnadňuje disperzi těchto kapalin v jemné kapky a zvyšuje stabilitu emulze i při změnách pH. Tyto emulze se používají při výrobě mražených krémů a jogurtů. MAG se využívají při zašlehání vzduchu a stabilizaci pěny (vlastnosti nášlehu) [40]. Další schopností je, že emulgátory složené ze směsi nasycených a nenasycených monoacylglycerolů v mléčném typu emulze ovlivňují obsah tukových kapiček a množství proteinu adsorbovaného v rozhraní (o/v) [41].

Dále jsou MAG důležité při výrobě cukrářských výrobků pro jejich schopnost stabilizovat a zpevňovat pěny nebo při výrobě těsta s použitím komplexní sypké směsi a rychlošlehacího přípravku (voda, cukr 35 %, emulgátory E471 a E470 20 %, líh kvasný jemný). Monoacylglyceroly na bázi kyseliny palmitové a stearové se přidávají do čokolád a polev v poměru 30/70. Monoacylglyceroly v čokoládách zabraňují migraci tuku na povrch [2, 42].

Monoacylglyceroly se využívají v pečárenském průmyslu. MAG společně s amylózou má schopnost zadržovat vodu v pečárenských produktech. MAG vyšších MK (laurové, myristové, palmitové, stearové) s amylózou (obsaženou ve škrobových zrnech) ovlivňuje reologické a chuťové vlastnosti chlebového těsta [43, 44]. MAG zpomalují retrogradaci pečiva, tj. ztrátu čerstvosti pečiva a jeho tvrdnutí. Těsto se zpracovává snadněji, pečivo je křehčí, má větší objem a rovnoměrnou pórovitost. Při výrobě těsta je používána směs monoacylglycerolu a esterů propylenglykolu [8, 45].

MAG se v tukařském průmyslu využívají jako emulgátory. MAG (kyseliny palmitové, stearové, olejové) jsou nejčastěji vmíchány jako emulgátory do margarínů v množství do 2% na hmotnost tukové násady [43, 42]. MAG kyseliny kaprinové snižuje mezipovrchové napětí v systému bavlníkový olej/voda více než MAG kyseliny stearové. Tedy MAG mastných kyselin s kratšími řetězci snižují mezipovrchové napětí více než MAG mastných kyselin s delšími acylovými konci. Ovšem MAG s delším acylem jsou účinnější v minerálních systémech olej/voda. Při stejně dlouhých substituentech jsou v systému rostlinný olej/voda účinnější MAG s nasyčeným, v systému minerální olej/voda MAG s nenasyčeným substituentem [7].

Komplexotvorných vlastností MAG s proteinovými biopolymery se využívá při výrobě těstovin, které nejsou po vaření mazlavé, nelepí se a mají požadovanou pevnost. MAG zlepšují jakost dehydratované bramborové kaše, která získává správnou strukturu a potlačuje lepivost. V cukrovinkářském průmyslu se MAG využívají ke snížení lepivosti bonbónů a zlepšení konzistence žvýkacích gum [2, 45]. MAG zadržují vlhkost v potravinách a pomáhají tak uchovávat tyto potraviny v čerstvém stavu.

U masných výrob se používají směsi monoacylglycerolů a diacylglycerolů kyseliny citrónové. Zajistí vysoce stabilní emulze u lahůdkových salámů, játrových paštik a tepelně opracovaných i neopracovaných výrobků. Tyto MAG a DAG jsou náhradou mouky nebo kaseinu. K zabránění vysychání salámů, zabraňování oddělení tuků v rozmělněných masných výrobcích a jejich provzdušnění se používají mono- a diacylglycerolové estery kyseliny octové [45].

MAG jsou využitelné při nitrožilní výživě, kde by z části mohly nahradit cukry a tuky. Pro organismus jsou výborně vstřebatelné. MAG usnadňují vstřebávání cholesterolu střevní stěnou a příznivě ovlivňují hladinu cholesterolu v krvi [46, 47].

MAG se v kosmetickém průmyslu využívají především pro jejich stabilitu, chemickou netečnost v přítomnosti bioaktivních látek, snášenlivost pokožkou a sliznicí, penetrační účinnost, indiferentní vůni a barvu [48]. MAG kyseliny laurové se používají u deodorantů a antiperspirantů k potlačení pocení, MAG kyseliny stearové je využíván při vlasové úpravě. Největší využití MAG v kosmetickém průmyslu je při výrobě masť a pleťových vod, kde se využívá schopnosti stabilizace vodné emulze. MAG kyseliny laurové se využívají také pro mikrobicidní účinky v pastách a ústních vodách [49, 50, 51, 52].

1.6 Antimikrobiální účinky monoacylglycerolů

Inhibiční účinky MAG a vyšších MK závisí na vlastnostech bakteriální buněčné stěny. Gram pozitivní bakterie (G^+) jsou více senzitivní na MAG, než gram negativní (G^-) bakterie, které mají cytoplazmatickou membránu bohatší na lipopolysacharidy, a tak chrání G^- bakterie proti účinkům povrchově aktivních látek (PAL) [53, 54]. Antibakteriální účinky také závisí na počtu atomů uhlíku a na přítomnosti dvojných vazeb v řetězci mastných kyselin a monoacylglycerolů [55].

Nejvyšší aktivitu proti G^+ kokům vykazuje MAG kyseliny kaprinové, bakterie jsou usmrceny díky narušení cytoplazmatické membrány a štěpením lipidů. Tento mikrobicidní účinek je použitelný pro prevenci a léčbu infekcí způsobených G^+ mikroorganismy [55, 56]. Monoacylglycerol kyseliny kaprylové (MAG $C_{8:0}$), vykazuje schopnost inhibovat *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* v koncentracích nad 10 %. Antimikrobiální účinnost se zvyšuje kombinacemi monoacylglycerolů, kdy jsou používány menší koncentrace 5 % (w/v) etanolickeho roztoku. Příkladem může být vysoká účinnost kombinací MAG $C_{8:0}$ a monoacylglycerol kyseliny laurové (MAG $C_{12:0}$) [57].

V poslední době se MAG využívají v medicíně, kdy vykazují mikrobicidní aktivitu a cytotoxický účinek na nádorové buňky [58]. MAG mohou být využity jako intravaginální mikrobicidy při ochraně proti sexuálně přenosným nemocem, jelikož napadají a ničí infekční činitele dříve, než jsou zasaženy buňky pohlavních orgánů. Experimentálně byly použity hydrogely obsahující MAG kyseliny kaprinové při účinku proti bakteriím a virům. Monoacylglyceroly C_8 až C_{12} mají silnější antivirový účinek než monoacylglyceroly s delšími řetězci. (*Herpes simplex* HSV-1, Respiratorní syncytiální virus RSV, *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus*) [56, 59].

MAG se mohou využívat ve formě gelů, umožňujících transport farmaceutických látek do organismu. Nahrazují polymerní matrice, protože nejsou kontaminovány zbytkovými monomerními látkami [60, 61].

MAG kyseliny laurové je nejvíce studovaným monoacylglycerolem, jehož účinky mají vysoký stupeň schopnosti potlačit výskyt mykotických infekcí [62]. Testování MAG s antifungicidním účinkem bylo provedeno na zástupcích kvasinek *Candida albicans*, *Sacharomyces cerevisiae* a vláknitých plísní rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. Stanovené minimální inhibiční koncentrace pro *Candida albicans* 200 mg/l a pro *Trichophyton mentagrophytes* 25mg/l [63].

2 BIOGENNÍ AMINY

2.1 Charakteristika biogenních aminů

Biogenní aminy vznikají dekarboxylázovou aktivitou mikroorganismů, nebo působením transamináz z aminokyselin. Dekarboxylace aminokyselin probíhá buď za účasti pyridoxalfosfátu jako koenzymu, nebo bez koenzymu. Biogenní aminy jsou nízkomolekulární alifatické, aromatické nebo heterocyklické bazické sloučeniny odvozené od aminokyselin [2, 64].

Aminy jsou základní dusíkaté sloučeniny. Jsou přírodní antinutriční látky schopny iniciovat různé farmakologické reakce, a tedy mohou být příčinou otrav jídlem. Patří mezi ně nikotin přítomný v tabáku, chinin používaný k léčbě malárie nebo kokain, který je nervovým stimulantem. Mezi deriváty aminů je možno zařadit i aminokyseliny (L-fenylalanin), které jsou stavební jednotkou bílkovin [65].

Aminy jsou karcinogenní látky, vyskytující se jako nitrosderiváty, nebo prekurzory pro látky, které mohou vytvořit karcinogenní N-nitrosaminy. Vznikající při solení a uzení potravin.

2.2 Chemická struktura biogenních aminů

Biogenní aminy jsou skupinou aminů, které mají významné fyziologické a farmaceutické účinky. Vznikají v buňkách enzymovou dekarboxylací aminokyselin. Aminy jsou deriváty amoniaku, kde je alkylovou nebo arylovou skupinou nahrazen atom vodíku [64, 66]. Dochází-li k náhradě jednoho, dvou nebo všech tří vodíkových atomů, rozeznáváme primární, sekundární a terciární aminy. Stejně jako v amoniaku je atom dusíku hybridizován do sp^3 . Aromatické aminy snadno podléhají aromatické elektrofilní substituci díky částečné konjugaci elektronového páru atomu dusíku a delokalizaci elektronové hustoty z atomu dusíku na aromatické jádro [67].

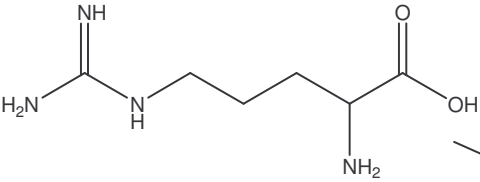
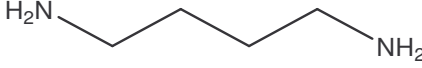
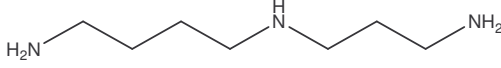
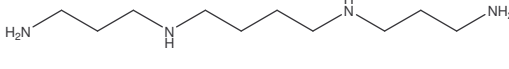
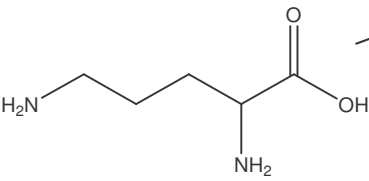
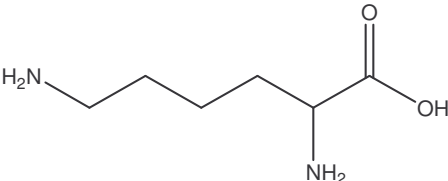
Aminy, které mají méně než sedm atomů uhlíku, jsou rozpustné ve vodě. Důvodem je přítomnost volného elektronového páru, který tvoří vodíkovou vazbu s molekulami vody. Bod varu aromatických aminů je vysoký (u anilinu 184 °C) a tyto aminy jsou omezeně rozpustné ve vodě. Přítomnost volného elektronového páru na atomu dusíku má za následek bazicitu aminů. To znamená, že aminy jsou schopny přijímat proton z vody za vzniku hydroxylového aniontu. Polarizace vazby N-H vede k tomu, že atomy vodíku jsou

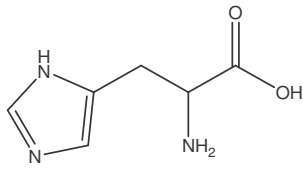
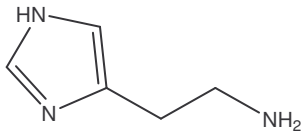
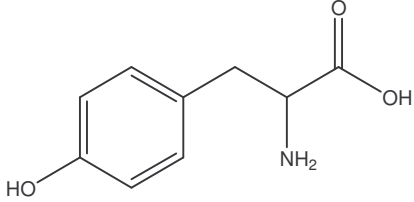
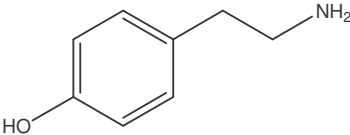
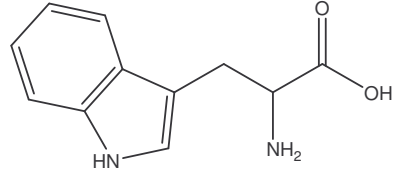
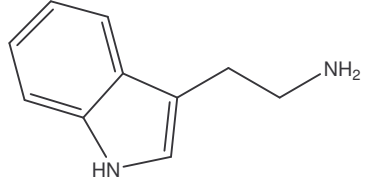
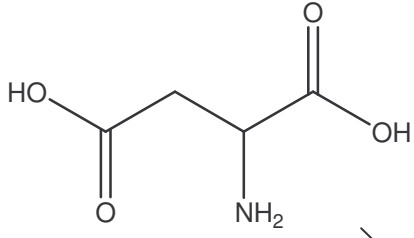
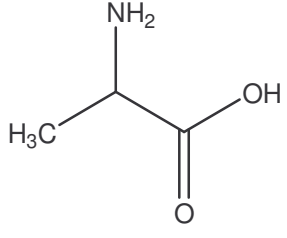
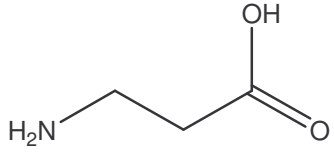
slabě kyselé, a proto primární a sekundární aminy jsou amfoterní, stejně jako hydroxy skupina v alkoholu [5, 68].

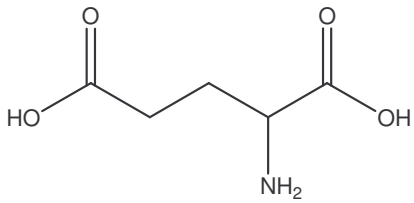
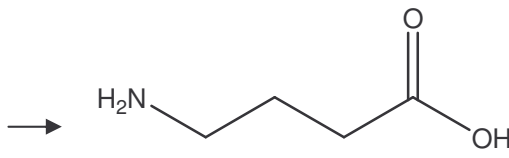
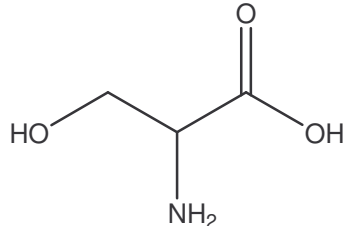
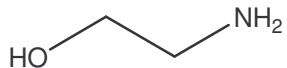
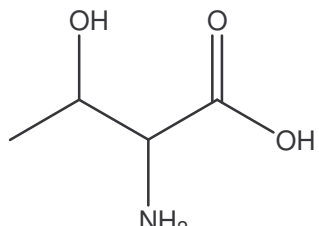
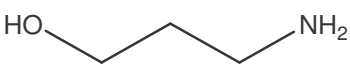
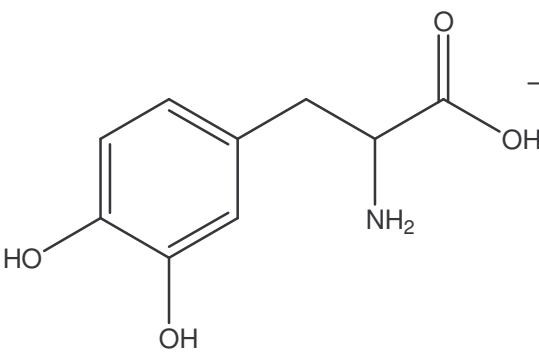
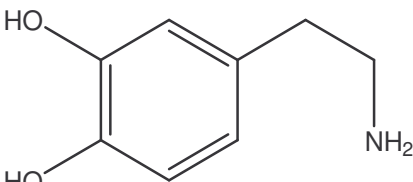
2.3 Výskyt biogenních aminů

Vznik biogenních aminů v potravinách vyžaduje přítomnost mikroorganismů produkujících dekarboxylázu. Mikroorganismy produkující dekarboxylázu se vyskytují jako součást mikroflóry potravin nebo jsou v potravině jako kontaminanty při zpracování [64, 69].

Tab. 2 Schéma vzniku a přeměny vybraných biogenních aminů, upraveno podle [70].

Aminokyselina	Produkt dekarboxylace
<p>Arginin</p> 	<p>Putrescin</p>  <p>Spermidin</p>  <p>Spermin</p> 
<p>Ornithin</p> 	
<p>Lysin</p> 	

Aminokyselina	Produkt dekarboxylace
Histidin	Histamin
	
Tyrosin	Tyramin
	
Tryptofan	Tryptamin
	
kyselina asparagová	α -alanin
	
	β -alanin
	

Aminokyselina	Produkt dekarboxylace
kyselina glutamová	kyselina γ -aminomáselná (GABA)
	
Serin	Ethanolamin
	
Threonin	Propanolamin
	
3,4-dihydroxyfenylalanin	dopamin
	

Postavení aminů vyplývá z dekarboxylace volné aminokyseliny mikrobiálními enzymy. Kyselina je dekarboxylována odstraněním karboxylové skupiny za vzniku odpovídajícího aminu.

Autolytická nebo bakteriální proteolýza hraje významnou roli při uvolňování volných aminokyselin z tkáňové bílkoviny, která nabízí substrát pro dekarboxylační reakce. Do reakce vstupuje pyridoxalfosfát, který tvoří s aminoskupinou aktivní místa enzymu [70].

Biogenní aminy jsou přítomny v mase, kde je jejich obsah spojen s nesprávnou hygienou při výrobě. Vysoké obsahy koncentrace biogenních aminů byly pozorovány u fermentovaných masných výrobků, v závislosti na druhu startovacích kultur mléčných bakterií a dodržování Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP) [71, 72]. Nejčastějšími kontaminanty jsou bakterie rodu *Pseudomonas* a čeledi *Enterobacteriaceae* (které jsou spojeny se značnou produkcí až 600 ppm biogenních aminů) [73].

Pokud dojde k činnosti mikroorganismů a tvorbě dekarboxylázy, je vznik biogenních aminů nevyhnutelný. Biogenní aminy mohou tvořit mikroorganismy zodpovědné za dužení sýrů (rod *Clostridium*, *Propionibacterium*) [74, 75].

Otrava histaminem, způsobena rodem *Proteus* [76], *Klebsiella pneumoniae* [77], *Hafnia alvei* [78], se vyskytuje při konzumaci ryb.

2.4 Účinky biogenních aminů

Biogenní aminy (tyramin, histamin, serotonin, tryptamin a β -fenylethylamin) hrají klíčovou roli fyziologických funkcí, avšak také působí na organismus toxicky, pokud jsou přijaty v přebytku. Mezi zesilujícími faktory při intoxikaci patří inhibitory oxidáz, jako jsou drogy a alkohol. Typickými příznaky otrav jsou: nevolnost, respirační problémy, návaly horkosti, bušení srdce, bolesti hlavy a hyper nebo hypotenze [79].

2.4.1 Metabolismus vzniku aminů s účinky na organismus

Biogenní aminy, které mají účinek na lidský organismus (Tab. 3).

Tab. 3 Vybrané biogenní aminy vyskytující se v organismu [70].

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
Ornitin	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

2.5 Detekce volných aminokyselin a biogenních aminů

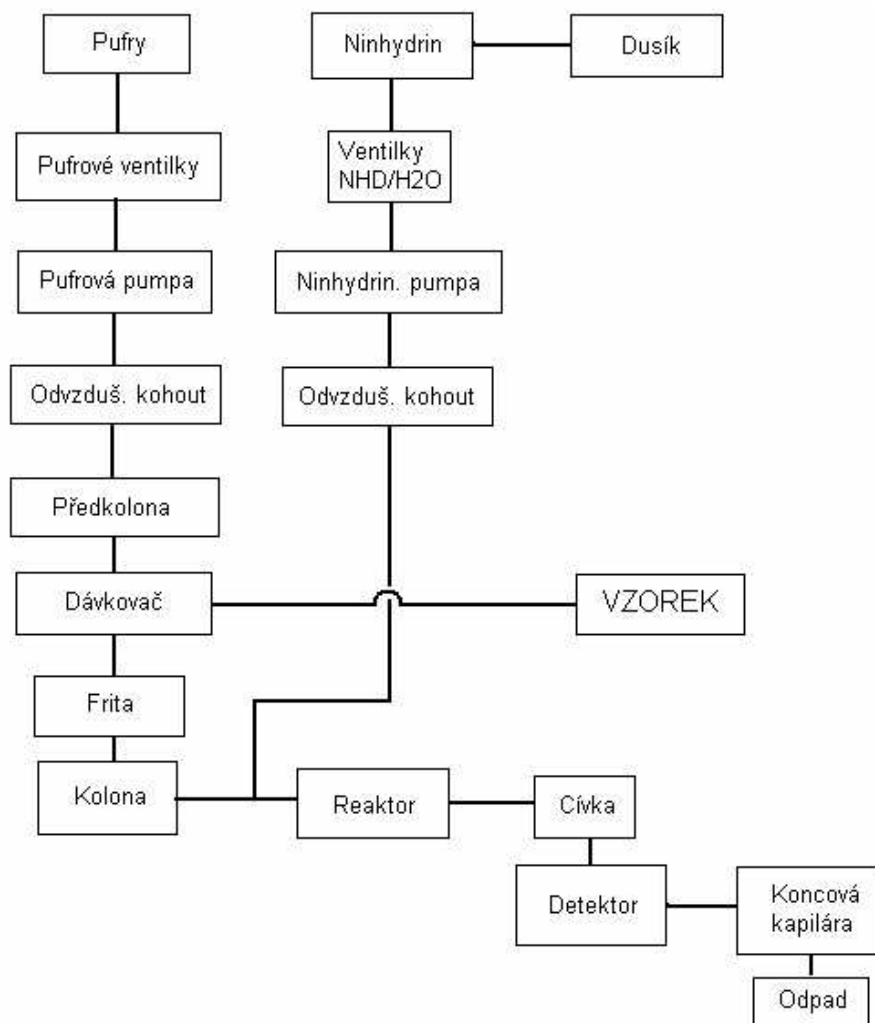
Mezi detekční metody biogenních aminů patří tenkovrstvá chromatografie, plynová chromatografie, kapilární elektroforéza PCR, kapalinová chromatografie, vysokoúčinná chromatografie s obrácenými fázemi RP-HPLC s UV nebo fluorescenční detekcí a iontově-výměnná kapalinová chromatografie [80]. V experimentální části byla použita pro stanovení biogenních aminů iontově-výměnná kapalinová chromatografie.

2.5.1 Iontově-výměnná (ionexová) kapalinová chromatografie.

Ionexová chromatografie separuje molekuly podle náboje. Je založena na coulombickém přitahování opačných nábojů. Stacionární fáze je tvořena iontoměničem s nabitými skupinami. Pokud jsou v protékající mobilní fázi přítomné ionty opačného náboje nebo molekuly silně dipólové, jsou elektrostatickými silami přitaženy a uchyceny na povrchu stacionární fáze. Při ionexové chromatografii jsou použity dva pufr [81].

První pufr nanese vzorek na kolonu, vzorek je navázán na nabité skupiny nosiče. Druhý pufr je použit pro vytěsnění nebo změnu náboje dělených iontů. Interakce iontu či dipólu s ionexem stoupá s jeho polaritou a klesá s jeho velikostí.

Materiály používané jako stacionární fáze se nazývají ionexy, které jsou děleny podle náboje na katexy a anexy. Nejčastějšími skupinami chemicky vázanými na povrchu anexů jsou (seřazeno podle vzrůstající síly): primární aminy $-NH_2$, sekundární aminy $-HR$, terciární aminy $-NR_2$ a kvartérní amoniové báze $-N^+R_3$. Na povrchu katexů se potom obvykle setkáváme se skupinami kyselými (opět podle vzrůstající síly): fenolická skupina $-OH$, karboxylová skupina $-COOH$, fosfátová skupina $-PO(OH)_2$ a sulfátová skupina $-SO_3H$. Mobilní fází je vodný roztok [81]. Princip analyzátoru znázorněn v blokovém schématu (Obr. 12).



Obr. 12 Blokové schéma stanovení volných aminokyselin
a biogenních aminů [82].

3 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Bakterie mléčného kvašení jsou grampozitivní nesporulující mikroaerofilní tyčinky a koky. Jsou schopny fermentovat sacharidy na kyselinu mléčnou jako hlavní výsledný produkt. Do této skupiny patří rody *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella* [83].

3.1 Rod *Lactococcus*

Lactococcus lactis je spojován s výrobou potravin a uchováváním potravin od starověku. V současné době má využití startovacích kultur druhu *Lactococcus lactis* velký hospodářský význam při výrobě sýrů, jako smetanové a sýrašské kultury. Autolytická činnost bakterií mléčného kvašení je důležitým faktorem při zrání sýrů kvůli uvolnění intracelulárních enzymů do sýrů a jejich vliv na chuť, vůni a texturu sýrů [84, 85].

V průmyslovém měřítku je důležité vybrat kmeny, které odolávají nepříznivým podmínkám během fermentace. Do spektra těchto podmínek patří extrémní teploty (například při výrobě vysokodohříváných sýrů 40 °C, při chlazení 8 °C), pH, osmotický tlak, lyofilizace nebo sprejové sušení startovacích kultur, oxidační stres [86].

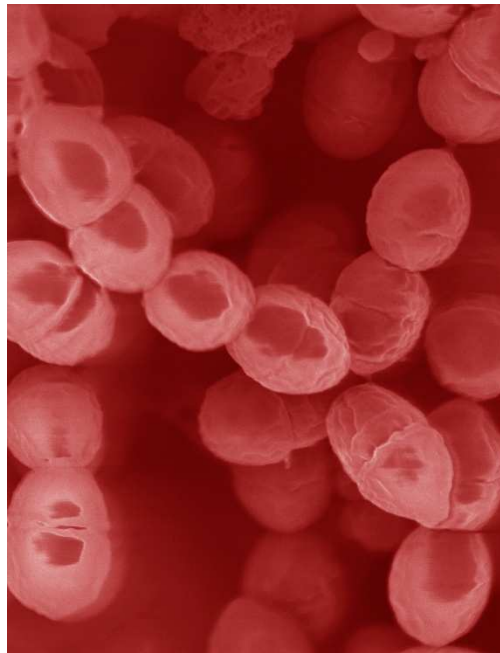
Lactococcus lactis se potravinářském průmyslu používá pro svoji odolnost vůči bakteriofágům a bakteriocínům.

Laktokoky jsou vedeny v čeledi *Streptococcaceae*. Zástupci rodu *Lactococcus* jsou, podobně jako zástupci rodu *Streptococcus* a *Enterococcus*, kataláza negativní, grampozitivní, fakultativně anaerobní koky tvořící řetízky. Z potravinářsko-mikrobiologického hlediska jsou v rodu *Lactococcus* významné druhy *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Lactococcus* je nalézán v přírodě tam, kde dochází ke spontánnímu kvašení biologických materiálů. V potravinářském průmyslu se rod *Lactococcus* využívá především v mlékárenství, jako čistá mezofilní startovací kultura. Jsou známy i *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus garvieae* a *Lactococcus piscium* [87].

Lactococcus lactis ssp. *lactis* je obecně odolnější než *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, a to vůči kyselému prostředí a žlučovým solím, i vůči zmrazování [88].

3.1.1 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*

Lactococcus lactis ssp. *lactis* patří do domény *Bacteria*, oddělení *Firmicutes* a čeledi *Streptococaceae*. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* jsou grampozitivní buňky, s relativně malým genomem (2,5 Mbp) [89]. Tyto bakterie tvoří ovoidní buňky o průměru (0,5 – 1,5) x (0,5 - 1,2) μm . *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* jsou nesporulující, nepohyblivé, fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní, kokovité nebo oválné buňky vyskytující se v párech nebo v různě dlouhých řetězcích.



Obr. 13 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* [90].

Na polotuhých médiích tvoří drobné kolonie. Patří do sérologické skupiny N. Optimální teplota kultivace *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* je 30 °C, rostou i při 10 °C a růst je zastaven při 45 °C.

Lactococcus lactis ssp. *lactis* má tyto diagnostické znaky: kataláza negativní, oxidáza negativní, fermentativní metabolismus, sacharidy štěpí na L(+)kyselinu mléčnou. Tvoří kyselinu mléčnou, rostou při 4% NaCl, nerostou při 6,5% NaCl. Růst je zastaven při pH 9,6. Optimální pH pro růst se pohybuje mezi 6,3 – 6,9. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* roste v mléku s obsahem 0,3% methylenové modře a v bujónu s přidavkem 40% žluče [91].

Lactococcus lactis ssp. *lactis* fermentuje glukózu, laktózu a maltózu, homofermentativním mléčným kvašením na kyselinu mléčnou. Sacharózu fermentují jen některé kmeny. Škrob a želatinu nehydrolyzuje, z argininu tvoří amoniak [87, 91].

Některé kmeny (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*) mají schopnost fermentovat citran za přítomnosti laktózy, tvorbou oxidu uhličitého, kyseliny octové, kyseliny mléčné, acetoinu (3-hydroxybutanon) a diacetylu (2,3-pentandion).

Některé kmeny *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* syntetizují polypeptidové antibiotikum (bakteriocín) nizin. Tato látka účinně inhibuje růst grampozitivních bakterií. Významné využití má při inhibici klíčících spór anaerobních sporotvorných bakterií rodu *Clostridium*, v tavených sýrech. Nisin je antagonistou druhu *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* [87, 92].

3.1.2 *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*

Tento kmen je většinou pozorován s kmenem *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Tyto kmeny mají podobné vlastnosti, liší se od sebe tvarem buňky. *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* je varieta táhlovitého kmenu. Fermentuje glukózu a laktózu, zředka maltózu a sacharózu. Z argininu netvoří amoniak [87, 92].

4 RŮST MIKROORGANISMŮ A MOŽNOSTI DETEKCE

4.1 Stanovení růstu mikroorganismů

Množení bakterií sledujeme zpravidla podle počtu bakteriálních buněk, který lze stanovit přímo pomocí upravené počítací komůrky, nebo nepřímo turbidimetricky [93, 94]. Růst mikroorganismů byl v experimentální části sledován turbidimetricky.

4.1.1 Turbidimetrické stanovení počtu buněk

Turbidimetrie je analytická metoda založena na sledování rozptylu světla částicemi suspendovanými v kapalině (sraženinami, koloidními částicemi). V turbidimetrii se měří intenzita záření prošlého roztokem, tedy záření nerozptýleného. Detektor záření je umístěn ve směru procházejícího záření. Tato metoda slouží k určování koncentrace suspendované látky ve vzorku. Rozptyl světla je ovlivňován množstvím, tvarem a velikostí částic.

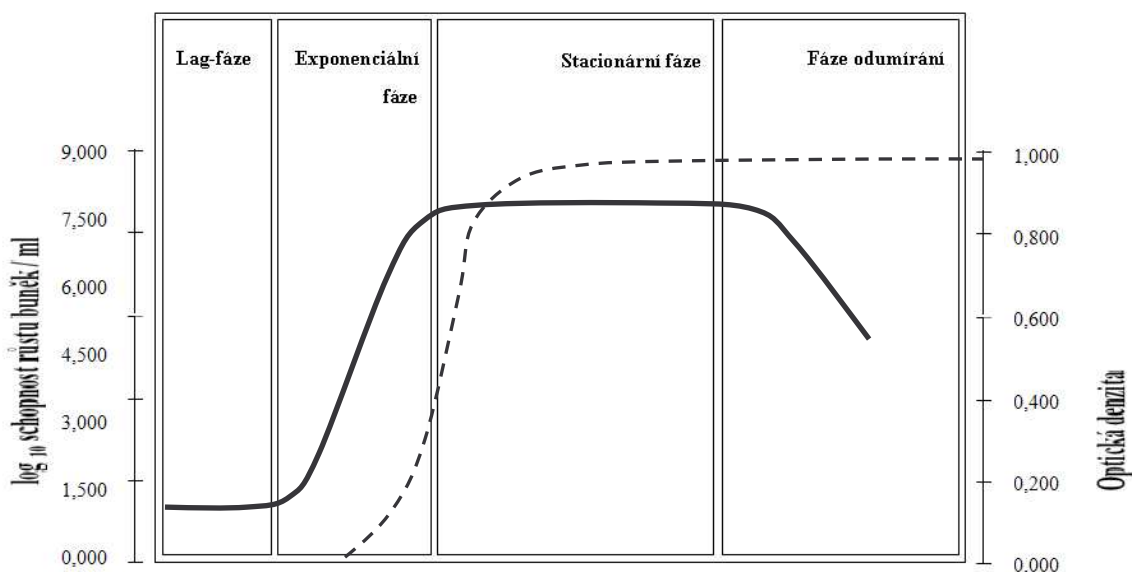
Turbidimetrickým stanovením srovnáváme intenzitu prošlého nebo rozptýleného záření vzorkem s intenzitou záření prošlého nebo rozptýleného čistým rozpouštědlem (živným médiem).

Turbidimetrie je vhodná především pro měření roztoků s velkým obsahem suspendovaných částic [95].

4.2 Dynamika růstu mikroorganismů

Mikrobiální buňka nacházející se v prostředí s vhodnými fyzikálními a chemickými vlastnostmi roste. Přijímá z okolí energii a živiny, vegetuje a zvětšuje svůj objem, hmotnost. Po dosažení určité velikosti nastává rozmnožování a nový růst dceřiných buněk. Při sledování antimikrobiálních účinků je zjišťována minimální inhibiční koncentrace (nejnižší koncentrace), při které se zabrání rozmnožování a růstu buněk [93, 94].

Mikroorganismy se rozmnožují za optimálních podmínek velmi rychle. Průměrná generační doba mnohých bakterií (doba za kterou se zdvojnásobí počet buněk v kultuře) je za optimálních podmínek asi 20 minut. Znázorníme-li graficky růst počtu živých buněk dostaneme tzv. růstovou křivku (Obr. 14) Růstová křivka je grafické znázornění nárůstu počtu živých buněk při jednorázové kultivaci. Celý systém je uzavřen před svým okolím, nejsou přidávány ani odebírány jednotlivé složky [94]. Růstová křivka má několik fází.



Obr. 14 Grafické znázornění růstové křivky, upraveno podle [94].

Měření optické denzity je vyznačeno čárkovaně, růstová křivka je vyznačena plnou čarou.

Lag-fáze

V této fázi se buňky nerozmnožují, ale zvětšují objem a aktivují svůj enzymový systém potřebný pro využití substrátu. Délka lag-fáze závisí na druhu mikroorganismu, složení substrátu, fyziologickém stavu buněk. Po převedení buněk do nového kultivačního média o stejném složení k lag-fázi nedochází. Pokud má růstové prostředí nevyhovující složení, trvá lag-fáze velmi dlouho. Buňky v pozdní fázi lag-fáze jsou velmi citlivé k nepříznivým podmínkám (teplota, osmotický tlak, antimikrobiální látky) [94].

Fáze zrychleného růstu

Přechodná fáze, ve které se buňky začínají množit zvyšující se rychlostí a zkracující se generační dobou. Populace buněk v této fázi přechází do fáze exponenciální [94].

Exponenciální fáze růstu

Exponenciální fáze je charakterizována nejkratší generační dobou buněk, která je během exponenciální fáze konstantní. Rychlost růstu mikroorganismů v této fázi má exponenciální charakter. Rychlost růstu klesá při vyčerpání živin. Po zpomalení růstu nebo jeho zastavení nastává stacionární fáze. Zastavení této fáze způsobuje nejčastěji vznik zplodin metabolismu a vyčerpání živin obsažených v nejnižší koncentraci [94].

Stacionární fáze růstu

Ve stacionární fázi růstu dochází k pomalému rozmnožování, které se kompenzuje počtem odumírajících buněk. Maximální délka stacionární fáze závisí na citlivosti k hladovění mikroorganismů. Během této fáze sporující mikroorganismy tvoří endospory [94].

Fáze odumírání

Tato fáze může trvat dle druhu mikroorganismu až několik měsíců. Buňky se již nerozmnožují, hynou a jejich koncentrace v čase klesá. Fyziologické vlastnosti buněk různých fází růstové křivky jsou značně odlišné [94].

4.2.1 Turbidimetrické stanovení počtu buněk

Turbidimetrie je analytická metoda založena na sledování rozptylu světla částicemi suspendovanými v kapalině (sraženinami, koloidními částicemi). V turbidimetrii se měří intenzita záření prošlého roztokem, tedy záření nerozptýleného. Detektor záření je umístěn ve směru procházejícího záření. Tato metoda slouží k určování koncentrace suspendované látky ve vzorku. Rozptyl světla je ovlivňován množstvím, tvarem a velikostí částic.

Turbidimetrickým stanovením srovnáváme intenzitu prošlého nebo rozptýleného záření vzorkem s intenzitou záření prošlého nebo rozptýleného čistým rozpouštědlem (živným médiem).

Turbidimetrie je vhodná především pro měření roztoků s velkým obsahem suspendovaných částic [95].

II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cíle práce byly vymezeny následovně:

- Stanovit inhibiční účinky sedmi 1-monoacylglycerolů v různých koncentracích na růst bakterií *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.
- Sledovat vliv vybraných monoacylglycerolů na dekarboxylázovou aktivitu bakterií *Lactococcus lactis*.

6 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

6.1 Použité mikroorganismy

Pro zpracování diplomové práce byly použity bakteriální kmeny rodu *Lactococcus*. Tyto mikroorganismy byly získány ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora® (CCDM – Culture Collection of Dairy Microorganisms):

Lactococcus lactis ssp. *lactis* CCDM 48

Lactococcus lactis ssp. *lactis* CCDM 53

Lactococcus lactis ssp. *lactis* CCDM 141

Lactococcus lactis ssp. *cremoris* CCDM 824

Lactococcus lactis ssp. *cremoris* CCDM 946

Lactococcus lactis ssp. *cremoris* CCDM 1004

6.2 Kultivační média

Kultury rodu *Lactococcus* se uchovávaly na tuhých živných půdách, a v tekutých médiích. Pro uchování kultur bylo použito živné médium M17 (agar) obohacený 0,5 % laktózy. Při stanovení inhibičního účinku MAG i dekarboxylázové aktivity mikroorganismů byla použita stejná média.

Bujón M17

M17 (Oxoid, Basingstoke, UK)	39,21g
laktóza (LachNer, Neratovice, ČR)	5,00 g
deionizovaná voda (Aqua Osmotic)	1000,00 ml

Agar M17

M17 (Oxoid, Basingstoke, UK)	39,21g
laktóza (LachNer, Neratovice, ČR)	5,00 g
agar (HiMedia, Bombai, Indie)	15,00g
deionizovaná voda (Aqua Osmotic)	1000,00 ml

Použitá živná média byla sterilizována v autoklávu při 121 °C 20 minut. Tekutý bujón M17 se používal pro přípravu inokula a čerstvé suspenze buněk. Tato suspenze byla

použita pro vlastní experimenty. Pro uchování kultur byly buňky kultivovány na plotnách s M17 agarem.

6.3 Chemikálie

Laktóza, (LachNer, Neratovice, ČR)

Tyrosin, (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Etanol denaturovaný (LachNer)

Chlorid sodný (NaCl), (LachNer)

Všechny použité chemikálie byly v čistotě p.a.

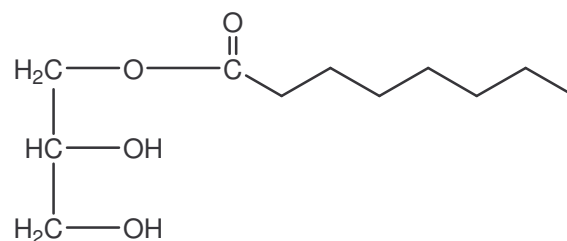
6.4 Zásobní roztoky

1-monoacylglyceroly

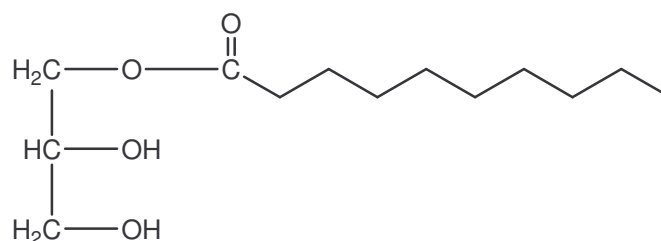
Monoacylglyceroly byly vyráběny adicí příslušné mastné kyseliny (Sigma-Aldrich) na glycidol (Sigma-Aldrich) katalytickým působením Cr^{3+} . Takto vyrobené MAG byly rozpuštěny v etanolu (LachNer) a zfiltrovány. Získané monoacylglyceroly byly vyrobeny na pracovišti Fakulty technologické, UTTTK s deklarovanou čistotou p.a. [96]

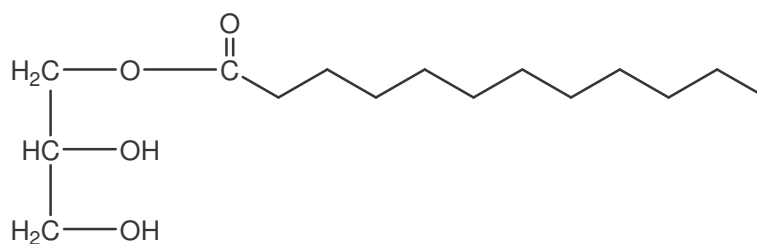
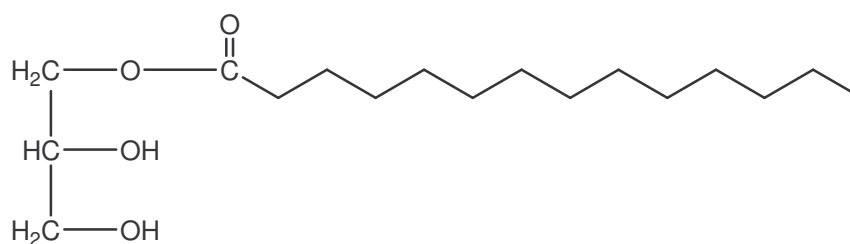
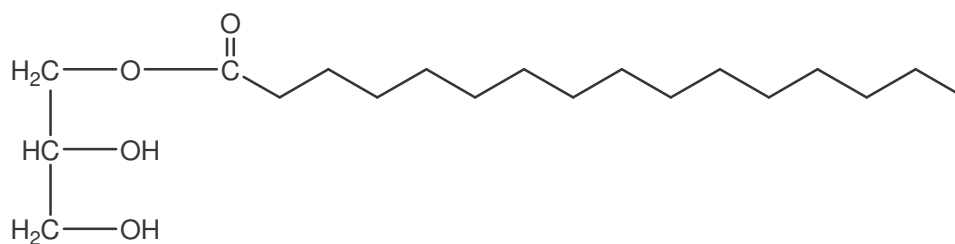
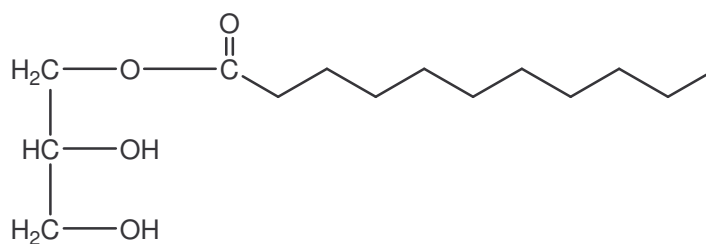
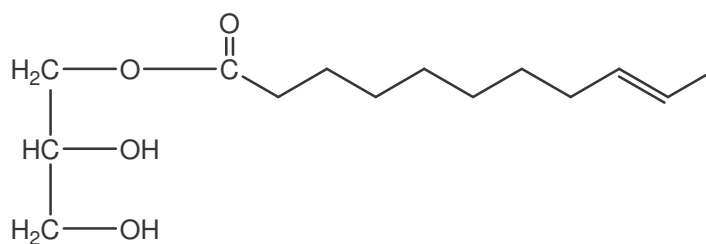
Monoacylglyceroly pro stanovení antimikrobiálních účinků:

MAG kyseliny kaprylové – MAG C_{8:0},



MAG kyseliny kaprinové – MAG C_{10:0},



MAG kyseliny laurové – MAG C_{12:0},MAG kyseliny myristové – MAG C_{14:0},MAG kyseliny palmitové – MAG C_{16:0},MAG kyseliny undekanové – MAG C_{11:0},MAG kyseliny undecenové – MAG C_{11:1},

Fyziologický roztok

Chlorid sodný (LachNer)	8,50g
Deionizovaná voda (Aqua Osmotic)	1000,00ml

Po rozpuštění chloridu sodného byl roztok sterilizován při 121 °C, 20 minut.

Roztoky pro AAA400

Použité roztoky pro AAA400 jsou uvedeny (Tab. 4). Složení jednotlivých pufrů a vlastní chromatografická analýza proběhly dle zavedené metodiky [97].

Tab. 4 Přehled roztoků pro ionexovou chromatografii [82].

Roztok	Funkce
Ředící pufr	Pufr, ve kterém rozpouštíme a jímž ředíme vzorky (pH 2,2).
Eluční pufr	Pufry, jejichž sekvence působí postupné dělení jednotlivých aminokyselin.
Regenerační roztok	Zásaditý roztok NaOH, který z kolony vyjme všechny zbytky vzorku a kolonu připraví ke stabilizaci.
Ninhydrin	Detekční činidlo

6.5 Přístroje a zařízení

Analytické váhy Sartorius BA 110S

Autokláv Systec 2540EL

Autokláv Varioklav H+P

Automatické mikropipety Biohit a Nichyrio

Automatický analyzátor aminokyselin AAA400

Aqua Osmotic, typ 02

Biologický termostat, Memert

Flow Box Clean Air

Fotometr TECAN Sunrise TW/TC

Horkovzdušná sušárna, Memmert

Chladnička, Elektrolux

Odstředivka, Hettich

Plynový kahan

Vortex Heidolph, Reax

6.6 Pomůcky

Laboratorní sklo (Simax)

Pro vypracování experimentální části diplomové práce bylo použito laboratorní sklo Simax, sterilizováno při 121 °C po dobu 20 minut nebo horkým vzduchem při 160 °C 240 minut.

Laboratorní plast

Špičky automatických pipet, ependorfové mikrozkušavky, plastové zkumavky, očkovací klíčky používané v experimentální části diplomové práce byly sterilizovány v autoklávu při teplotě 121 °C 20 minut nebo použity z originálního balení. Chemická sterilace probíhá pomocí kyseliny perchloroctové.

7 METODIKA

Experimentální část byla rozdělena dle zadání na dvě části:

Experiment 1, ve kterém byly sledovány inhibiční účinky 1-monoacylglycerolů na vybrané kultury mikroorganismů rodu *Lactococcus*.

Experiment 2, kde byla sledována dekarboxylázová aktivita rodu *Lactococcus* v závislosti na přidaných MAG.

7.1 Stanovení dekarboxylázové aktivity rodu *Lactococcus*

U mléčných bakterií rodu *Lactococcus* byla po kultivaci bakterií sledována produkce biogenních aminů v kultivačním médiu M17 obohaceném o prekurzor pro tvorbu biogenních aminů (aminokyselinu tyrozin) v koncentraci 0,2 % (w/v). Dekarboxylázová aktivita a tvorba biogenních aminů byla vyhodnocena pomocí analyzátoru aminokyselin. Do 5000 μ l média, bylo přidáno 25 μ l suspenze bakterií narostlých přes noc. Kultivace probíhala při 30 ± 1 °C, 24 hodin. Médium po kultivaci bylo porovnáno s čistým nenaočkovaným médiem. Kontrola a čistota kmenů laktokoků byla průběžně sledována na Petriho miskách s M17 agarem. Také byl sledován vliv různých koncentrací vybraných MAG (uvedených v kapitole 6.4).

Každá suspenze byla analyzována duplicitně.

7.2 Chromatografická detekce biogenních aminů

Suspenze mikroorganismů rodu *Lacococcus* s 0,2 % (w/v) tyrozinu byla po kultivaci odstředěna při 10000 ot/min a poté zfiltrována přes filtr o velikosti 0,45 μ m. Takto připravený vzorek byl analyzován pomocí AAA400 (Ingos, Praha, ČR). Detekce probíhala při 570 nm. Stanovení probíhalo dle zavedené metodiky [97].

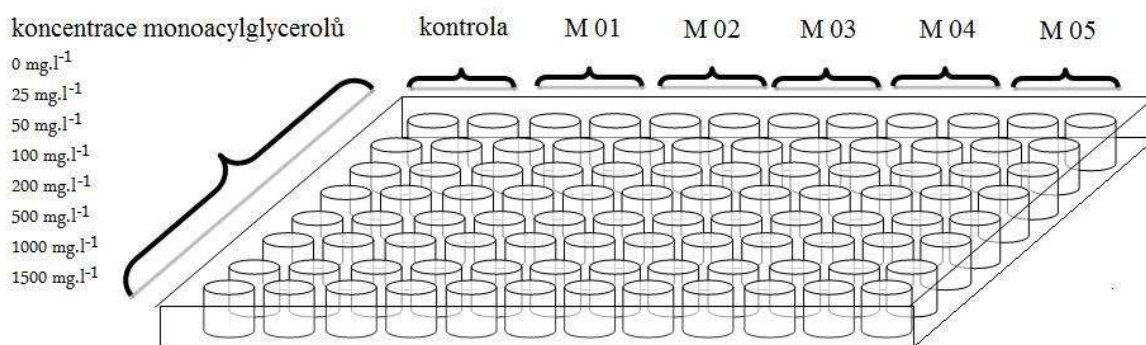
7.3 Stanovení minimální inhibiční koncentrace 1-monoacylglycerolů

Do jednotlivých zkumavek bylo pipetováno kultivační médium o objemu 4 ml a přidáno takové množství monoacylglycerolů aby výsledná koncentrace odpovídala hodnotám (Tab. 5). Následně bylo přidáno 25 μ l suspenze buněk. Kultivace probíhala při 30 ± 1 °C, 48 hodin. První vyhodnocení proběhlo po 24 hodinách. Jako pozitivní kontrola bylo použito médium bez 1-monoacylglycerolů.

7.4 Stanovení inhibičních účinků 1-monoacylglycerolů

Z lyofilizovaných kmenů rodu *Lactococcus* bylo připraveno inokulum. Takto připravené mikroorganismy byly očkovány do 4 ml tekuté živné půdy M17, za účelem přípravy suspenze. Množství naočkovaného inokula bylo 50 μl . Kultivace probíhala při 30 ± 1 °C po dobu 24 hodin. Takto vyrobené inokulum bylo použito pro stanovení inhibičních účinků. Nejprve byly stanoveny minimální inhibiční koncentrace ve zkumavkách. Toto stanovení umožňuje navrhnout koncentraci monoacylglycerolů pro sledování růstových křivek mikroorganismů.

Inhibiční vlivy na *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* byly sledovány v mikrotitračních destičkách při teplotě 25 °C po dobu 24 hodin. Vliv 1-monoacylglycerolů byl hodnocen jako změna optické denzity suspenze bakterií. Měření optické denzity probíhalo v 30-ti minutových intervalech. Každá jamka mikrotitrační destičky obsahovala: 250 μl kultivačního média M17 obohaceného o MAG v příslušné koncentraci a 5 μl 24-hodinové suspenze bakterií. Koncentrace všech přidávaných monoacylglycerolů byla následující: 25 mg.l^{-1} , 50 mg.l^{-1} , 100 mg.l^{-1} , 200 mg.l^{-1} , 500 mg.l^{-1} , 1000 mg.l^{-1} , 1500 mg.l^{-1} (w/v). Jako kontroly byly použity jamky bez daného monoacylglycerolu a bez suspenze bakterií. U všech koncentrací MAG, včetně kontrol, byl duplicitně sledován růst v mikrotitračních destičkách (Obr. 15). Vliv 1-monoacylglycerolů byl sledován minimálně na dvou destičkách.



Obr. 15 Znáznornění přípravy mikrotitrační destičky.

M 01 – M 05 testované kmeny mikroorganismů

8 VÝSLEDKY A DISKUSE

V této diplomové práci byl vliv inhibičního účinku 1-monoacylglycerolů, a tvorba biogenních aminů z aminokyseliny tyrozinu sledována u 6 kmenů rodu *Lactococcus* (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 48, CCDM 53, CCDM 141 a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCDM 824, CCDM 946, CCDM 1004). Pro studium účinků MAG na růst bakterií rodu *Lactococcus* byly zvoleny 1-monoacylglyceroly: monokaprylin (MAG C_{8:0}), monokaprin (MAG C_{10:0}), monoalurin (MAG C_{12:0}), monomyristin (MAG C_{14:0}), monopalmitin (MAG C_{16:0}), MAG kyseliny undekanové (MAG C_{11:0}) a undecenové (MAG C_{11:1}).

Aby byl vyloučen inhibiční účinek etanolu, který byl použit jako rozpouštědlo pro testované MAG, bylo do kultivačního média před začátkem kultivace všech použitých kmenů bakterií přidáno 7 % (v/v) etanolu bez MAG. Z výsledků bylo patrné, že tyto koncentrace etanolu nemají vliv na růst testovaných mikroorganismů.

8.1 Stanovení inhibičního vlivu 1-monoacylglycerolů na rod

Lactococcus

8.1.1 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

Minimální inhibiční koncentrace dané látky je koncentrace, která zabrání růstu mikroorganismů [94]. Sterilně byly do kultivačního média přidány různé koncentrace 1-monoacylglycerolů a byly sledovány jejich inhibiční vlivy na rod *Lactococcus*. (Tab. 5)

Tab. 5 Minimální inhibiční koncentrace MAG na testované kmeny *L. lactis* po 24 hodinách kultivace.

Testované kmeny po 24 hodinách	Koncentrace 1-monoacylglycerolů							BUŇKY
	MAG C _{8:0}	MAG C _{10:0}	MAG C _{11:0}	MAG C _{11:1}	MAG C _{12:0}	MAG C _{14:0}	MAG C _{16:0}	
	1000 mg.l ⁻¹	100 mg.l ⁻¹	50 mg.l ⁻¹	100mg.l ⁻¹	500 mg.l ⁻¹	100 mg.l ⁻¹	1000 mg.l ⁻¹	
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCDM 48	+	-	-	-	-	-	+	++
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCDM 53	+	++	++	++	++	+	+	++
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCDM 141	+	++	++	++	+	-	+	++
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CCDM 824	+	++	++	++	+	++	+	++
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CCDM 946	+	++	++	++	+	+	+	++
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CCDM 1004	+	-	-	-	-	-	+	++

- pozitivní reakce na inhibici mikroorganismů (tj. mikroorganismy nerostou), + zákal (negativní inhibiční účinek monoacylglycerolů), ++ zákal a sedlina (negativní inhibiční účinek monoacylglycerolů).

Tab. 6 Výsledek stanovení minimální inhibiční koncentrace po 48 hodinách.

Testované kmeny po 48 hodinách	Koncentrace 1-monoacylglycerolů							BUŇKY
	MAG C _{8:0}	MAG C _{10:0}	MAG C _{11:0}	MAG C _{11:1}	MAG C _{12:0}	MAG C _{14:0}	MAG C _{16:0}	
	1000 mg.l ⁻¹	100 mg.l ⁻¹	50 mg.l ⁻¹	100 mg.l ⁻¹	500 mg.l ⁻¹	100 mg.l ⁻¹	1000 mg.l ⁻¹	
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCDM 48	+	+	-	+	-	-	++	++
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCDM 53	+	++	++	++	++	+	++	++
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCDM 141	+	++	++	++	+	+	++	++
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CCDM 824	+	++	++	++	+	++	++	++
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CCDM 946	+	++	++	++	+	+	++	++
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CCDM 1004	+	+	-	+	-	-	++	++

- pozitivní reakce na inhibici mikroorganismů (tj. mikroorganismy nerostou), + zákal (negativní inhibiční účinek monoacylglycerolů), ++ zákal a sedlina (negativní inhibiční účinek monoacylglycerolů).

Inhibiční účinky a následná změna růstové aktivity v médiu M17 s přidavkem různých koncentrací 1-monoacylglycerolů (MAG C_{8:0}, MAG C_{10:0}, MAG C_{11:0}, MAG C_{11:1}, MAG C_{12:0}, MAG C_{14:0} a MAG C_{16:0}) byla pozorována především u kmene *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 48 a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCDM 1004. U kmene CCDM 48 i u CCDM 1004 byly inhibiční účinky pozorovány po 24 hodinách u média M17 s přidavkem MAG C_{10:0} v koncentraci 100 mg.l⁻¹, MAG C_{11:0} v koncentraci 50 mg.l⁻¹, MAG C_{11:1} v koncentraci 100 mg.l⁻¹, MAG C_{12:0} v koncentraci 500 mg.l⁻¹ a u média M17 s přidavkem MAG C_{14:0} v koncentraci 100 mg.l⁻¹. U kmene CCDM 141 byl inhibiční účinek zaznamenán u média M17 obsahujícího MAG C_{14:0} v koncentraci 100 mg.l⁻¹. U zbylých 3 kmenů inhibiční účinky daných koncentrací nebyly zaznamenány.

8.1.2 Sledování vlivu přidavku aminokyseliny tyrozinu a inhibičních účinků monoacylglycerolů.

Účinky zvolených 1-monoacylglycerolů na růst bakterií rodu *Lactococcus* (4 kmeny CCDM 53, CCDM 141, CCDM 824, CCDM 946) byly sledovány v rozmezí koncentrací MAG 12,5 – 1500 mg.l⁻¹. Koncentrace u jednotlivých kmenů byly stanoveny dle předpokládaného účinku podle Tabulky 5. Ke každému bujónu s příslušnou koncentrací MAG bylo přidáno 0,2 % tyrozinu (w/v). Toto stanovení bylo provedeno na plotnách s M17 (agar). Stanovení bylo prováděno vždy duplicitně. Po 24 hodinách kultivace byly spočítány kolonie vyrostlé na miskách. Z odečtených hodnot byly vypočteny průměry a stanoveny CFU (kolonie tvořící jednotku).

Celkové počty mikroorganismů na 1ml média (CFU/ml) byly vypočteny z následujícího vztahu:

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1n_2) \cdot d} \Rightarrow [CFU / ml]$$

c počet narostlých kolonií (součet)

n_1, n_2 počet misek příslušného ředění

d první ředění zvolené k počítání

Tab. 7 Inhibiční účinky monoacylglycerolů v různých koncentracích a vliv přídatku 0,2 % tyrozinu (w/v) na růst *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 53.

Mikroorganismus	Koncentrace (mg.l ⁻¹)	Monoacylglycerol					
		MAG C _{8:0}	MAG C _{10:0}	MAG C _{11:0}	MAG C _{12:0}	MAG C _{14:0}	MAG C _{16:0}
CCDM 53	0	3,60.10 ⁹	3,60.10 ⁹	3,60.10 ⁹	3,60.10 ⁹	3,60.10 ⁹	3,60.10 ⁹
	12,5			2,02.10 ⁹	2,00.10 ⁹		
	25			1,60.10 ⁹	8,00.10 ⁸		
	50				9,20.10 ⁷	1,47.10 ⁵	
	100		2,00.10 ¹			2,71.10 ⁵	
	500	6,60.10 ⁷	0				3,68.10 ²
	1000	0					0
	0 + T	3,60.10 ⁹	3,60.10 ⁹	3,60.10 ⁹	3,60.10 ⁹	3,60.10 ⁹	3,60.10 ⁹
	12,5 + T					1,86.10 ⁹	
	25 + T				2,40.10 ⁹	1,60.10 ⁸	
	50 + T				3,20.10 ⁸		1,61.10 ⁵
	100 + T		1,50.10 ⁸				2,70.10 ⁵
	500 + T	6,00.10 ⁷	3,00.10 ⁶				3,10.10 ⁵
	1000 + T	4,00.10 ⁷					2,16.10 ⁵

Výsledky jsou uvedeny v CFU/ml, koncentrace MAG uvedeny v mg.l⁻¹, T - přídatek tyrozinu ke kultivačnímu médiu, 0 – růst bakterií nebyl zaznamenán.

Tab. 8 Inhibiční účinky monoacylglycerolů v různých koncentracích a vliv přidavku 0,2 % tyrozinu (w/v) na růst *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 141.

Mikroorganismus	Koncentrace (mg.l ⁻¹)	Monoacylglycerol					
		MAG C _{8:0}	MAG C _{10:0}	MAG C _{11:0}	MAG C _{12:0}	MAG C _{14:0}	MAG C _{16:0}
CCDM 141	0	3,41.10 ⁹	3,41.10 ⁹	3,41.10 ⁹	3,41.10 ⁹	3,41.10 ⁹	3,41.10 ⁹
	12,5			8,30.10 ⁸	5,20.10 ⁸		
	25			8,00.10 ⁸	1,62.10 ⁹		
	50			7,80.10 ⁸	3,68.10 ⁴	3,28.10 ⁵	
	100		O			3,45.10 ⁴	
	500	O					3,40.10 ⁸
	1000	O					6,00.10 ⁶
	0 + T	3,20.10 ⁹	3,20.10 ⁹	3,20.10 ⁹	3,20.10 ⁹	3,20.10 ⁹	3,20.10 ⁹
	12,5 + T			7,40.10 ⁸	2,40.10 ⁹		
	25 + T			1,38.10 ⁹	8,30.10 ⁸		
	50 + T			1,12.10 ⁹	9,60.10 ³	7,68.10 ⁴	
	100 + T		O			1,84.10 ⁴	
	500 + T	4,40.10 ⁸					3,80.10 ⁸
	1000 + T	O					2,70.10 ⁶

Výsledky jsou uvedeny v CFU/ml, koncentrace MAG uvedeny v mg.l⁻¹, T - přidavek tyrozinu ke kultivačnímu médiu. 0 – růst bakterií nebyl zaznamenán.

Tab. 9 Inhibiční účinky monoacylglycerolů v různých koncentracích a vliv přidavku 0,2 % tyrozinu (w/v) na růst *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCDM 824.

Mikroorganismus	Koncentrace (mg.l ⁻¹)	Monoacylglycerol					
		MAG C _{8:0}	MAG C _{10:0}	MAG C _{11:0}	MAG C _{12:0}	MAG C _{14:0}	MAG C _{16:0}
CCDM 824	0	1,62.10 ⁹	1,62.10 ⁹	1,62.10 ⁹	1,62.10 ⁹	1,62.10 ⁹	1,62.10 ⁹
	12,5			1,16.10 ⁹	2,08.10 ⁹		
	25			2,10.10 ⁸	7,20.10 ⁸		
	50			5,60.10 ⁸	7,31.10 ⁷	2,70.10 ⁸	
	100		O			2,00.10 ⁸	
	500	6,00.10 ⁶	O				1,44.10 ⁹
	1000						3,00.10 ⁷
	0 + T	8,80.10 ⁸	8,80.10 ⁸	8,80.10 ⁸	8,80.10 ⁸	8,80.10 ⁸	8,80.10 ⁸
	12,5 + T			1,44.10 ⁹			
	25 + T			3,70.10 ⁹	1,04.10 ⁹		
	50 + T			1,52.10 ⁹	5,44.10 ⁷	1,01.10 ⁸	
	100 + T		3,00.10 ¹			8,40.10 ⁶	
	500 + T	2,00.10 ⁶	O				1,47.10 ⁹
	1000 + T	O					4,00.10 ⁸

Výsledky jsou uvedeny v CFU/ml, koncentrace MAG uvedeny v mg.l⁻¹, T - přidavek tyrozinu ke kultivačnímu médiu, 0 – růst bakterií nebyl zaznamenán.

Tab. 10 Inhibiční účinky monoacylglycerolů v různých koncentracích a vliv přídavku 0,2 % tyrozinu (w/v) na růst *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCDM 946.

Mikroorganismus	Koncentrace (mg.l ⁻¹)	Monoacylglycerol					
		MAG C _{8:0}	MAG C _{10:0}	MAG C _{11:0}	MAG C _{12:0}	MAG C _{14:0}	MAG C _{16:0}
CCDM 946	0	2,72.10 ⁹	2,72.10 ⁹	2,72.10 ⁹	2,72.10 ⁹	2,72.10 ⁹	2,72.10 ⁹
	12,5			4,88.10 ⁹	4,36.10 ⁹		
	25			4,16.10 ⁹	3,26.10 ⁹		
	50			2,00.10 ⁹	3,52.10 ⁸	5,28.10 ⁶	
	100		7,20.10 ³			2,40.10 ⁶	
	500	0	0				1,72.10 ⁵
	1000	0					2,08.10 ⁵
	0 + T	3,08.10 ⁹	3,08.10 ⁹	3,08.10 ⁹	3,08.10 ⁹	3,08.10 ⁹	3,08.10 ⁹
	12,5 + T			8,40.10 ⁸	1,57.10 ¹⁰		
	25 + T			4,32.10 ⁹	9,20.10 ⁸		
	50 + T			2,40.10 ⁹	2,53.10 ⁹	6,88.10 ⁶	
	100 + T		1,99.10 ⁷			4,16.10 ⁶	
	500 + T	2,60.10 ⁸	0				
	1000 + T	4,00.10 ⁶					2,11.10 ⁵

Výsledky jsou uvedeny v CFU/ml, koncentrace MAG uvedeny v mg.l⁻¹, T - přídavek tyrozinu ke kultivačnímu médiu. 0 – růst bakterií nebyl zaznamenán.

Znatelný inhibiční účinek 1-monoacylglycerolů na růst *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 53 byl pozorován u média M17 s přídavkem MAG C_{8:0}, MAG C_{10:0}, MAG C_{14:0} a MAG C_{16:0} v koncentracích 100 - 1000 mg.l⁻¹. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 141 výrazně inhibovaly monoacylglyceroly MAG C_{8:0}, MAG C_{10:0}, MAG C_{12:0} od 50 mg.l⁻¹, MAG C_{14:0} od 50 mg.l⁻¹ a MAG C_{16:0} od 1000 mg.l⁻¹. *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCDM 824 výrazně inhibovaly monoacylglyceroly MAG C_{10:0} a MAG C_{14:0} od 100 mg.l⁻¹. Růst *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCDM 946 výrazně zpomalovaly monoacylglyceroly MAG C_{8:0}, MAG C_{10:0} a MAG C_{16:0} od 1000 mg.l⁻¹. Lze říci že přídavek aminokyseliny tyrozinu v koncentraci 0,2 % (w/v) neměl vliv na inhibiční účinky monoacylglycerolů (viz. Tab. 7 – 10).

8.2 Stanovení inhibičních účinků 1-monoacylglycerolů

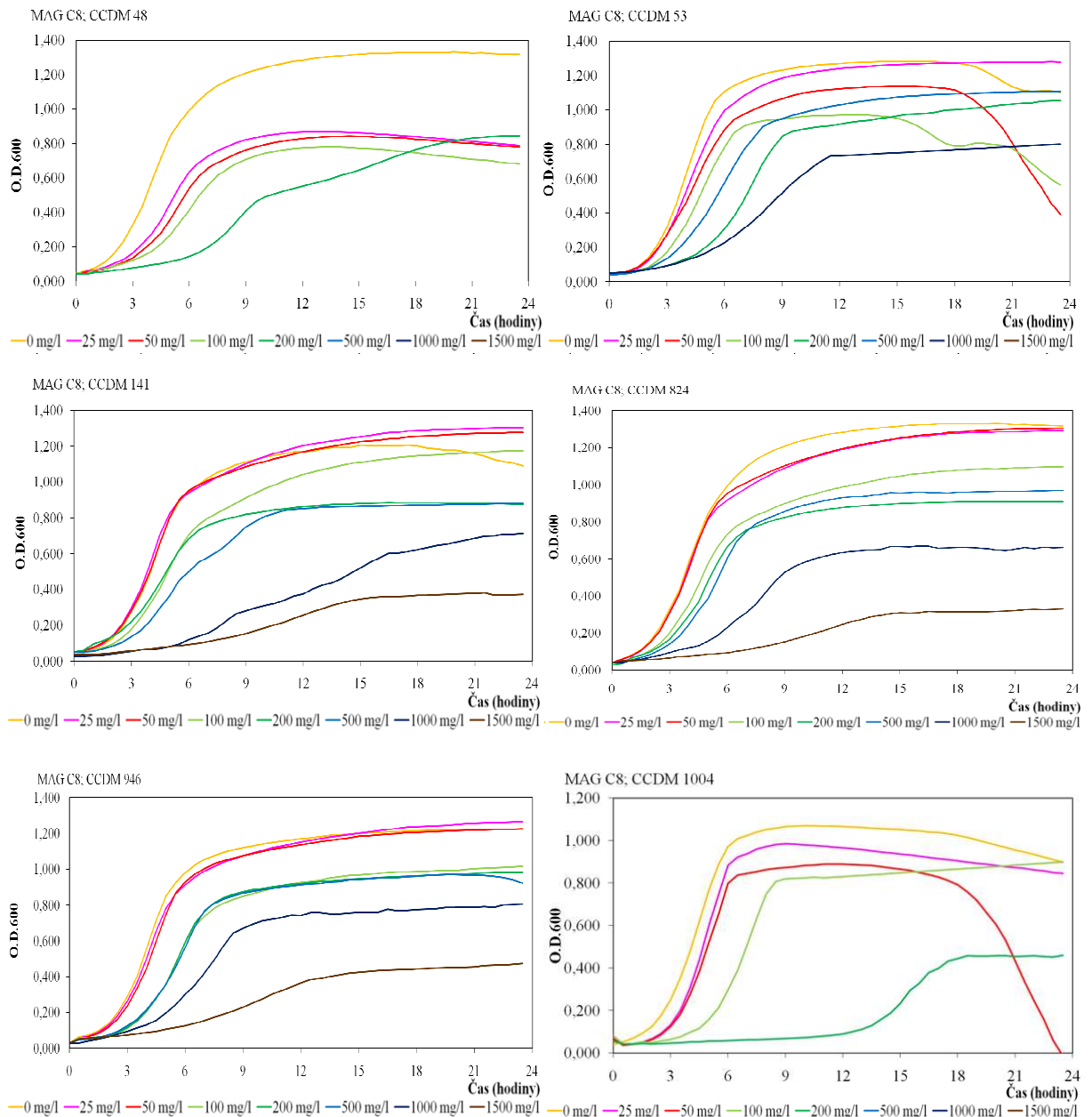
V této experimentální části byl sledován vliv přídatných látek (1-monoacylglycerolů) na růst potravinářsky významných bakterií rodu *Lactococcus*. Monoacylglyceroly jsou využívány jako emulgátory, stabilizátory a sekvestanty. Přidávají se do fermentovaných výrobků pro zlepšování jejich vlastností a také z technologických důvodů. Monoacylglyceroly jsou často součástí potravin. Cílem tohoto experimentu bylo srovnat

inhibiční účinky sedmi monoacylglycerolů na technologicky významné kmeny rodu *Lactococcus*.

Účinek daného 1-monoacylglycerolu v určité koncentraci byl hodnocen pomocí růstových křivek, a to od doby lag-fáze až po fázi stacionární, resp. fázi odumírání. Růst bakterií byl vyhodnocen jako optická denzita buněk při 600 nm (OD_{600}). Optická denzita byla měřena po dobu 24 hodin. Koncentrace jednotlivých 1-monoacylglycerolů byly stanoveny dle předběžných výsledků získaných plotnovou metodou (Tab. 7 – 10).

V grafech (Obr. 16 až 22), jsou znázorněny růstové křivky laktokoků rostoucích v přítomnosti různých koncentrací testovaných kmenů laktokoků. Pro názornost jsou v grafech zahrnuty pouze křivky u takových koncentrací 1-monoacylglycerolů, které na růst laktokoků nepůsobily zcela inhibičně (tj. byl zaznamenán alespoň znatelný nárůst). Kontrolou byl růst testovaných bakterií v kultivačním médiu bez přidaného monoacylglycerolu (žluté křivky). Intenzita růstu byla měřena proti negativní kontrole, která obsahovala pouze kultivační médium s příslušnou koncentrací testovaného MAG bez zaočkovaných mikroorganismů (viz Obr. 15 v kapitole 7.4).

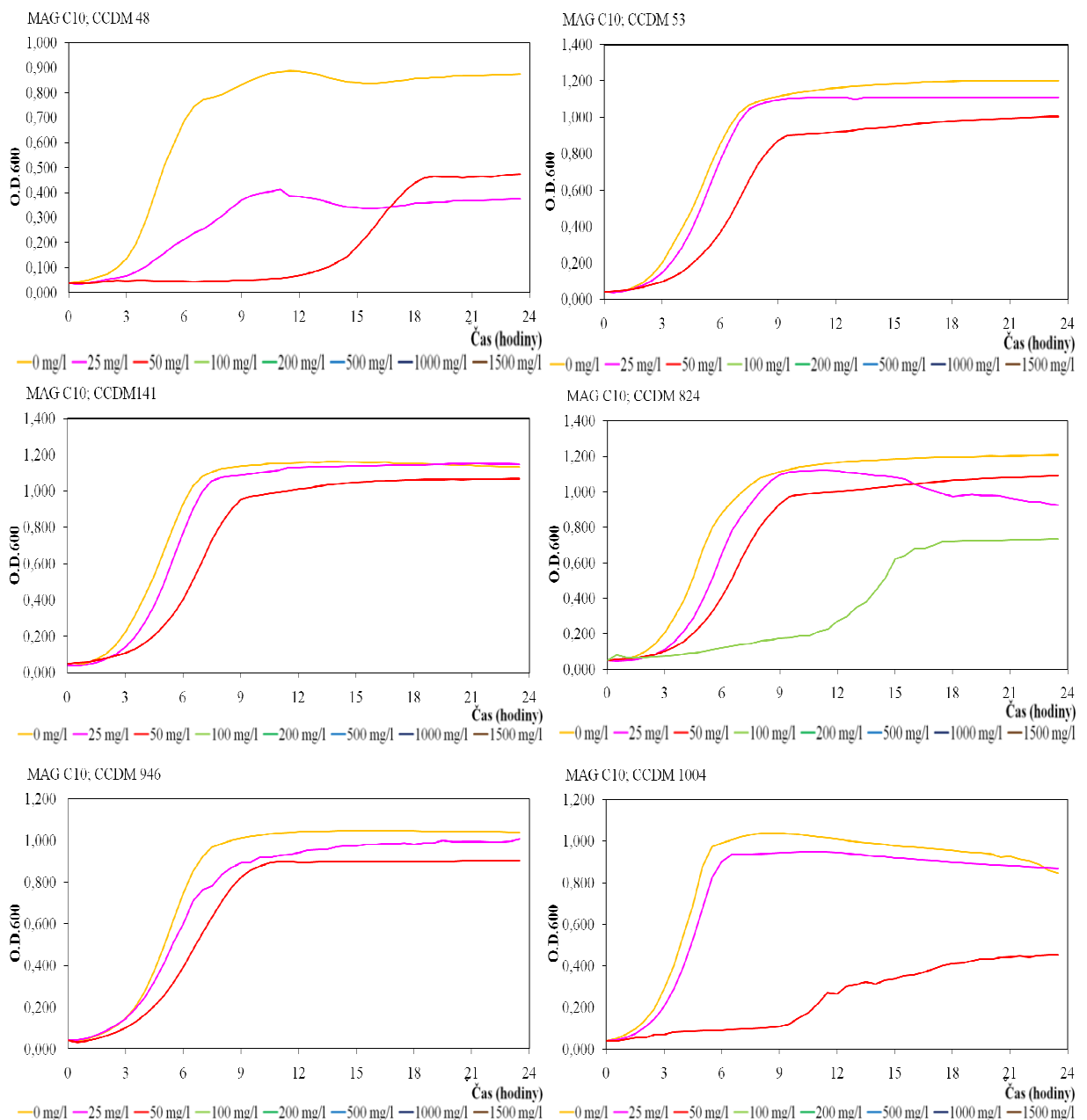
U MAG $C_{14:0}$ a MAG $C_{16:0}$ bylo měření optické denzity částečně komplikováno tvorbou zákalu při přípravě kultivačního média s MAG. Vyhodnocení inhibičních účinků těchto monoacylglycerolů tak určitým způsobem ovlivňovala intenzita a doba protřepání před každým měřením a rovněž chyba přístroje, a to i v případě, že součástí všech mikrotitračních destiček byla negativní kontrola.



Obr. 16 Inhibiční účinky MAG C_{8:0} na růst *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

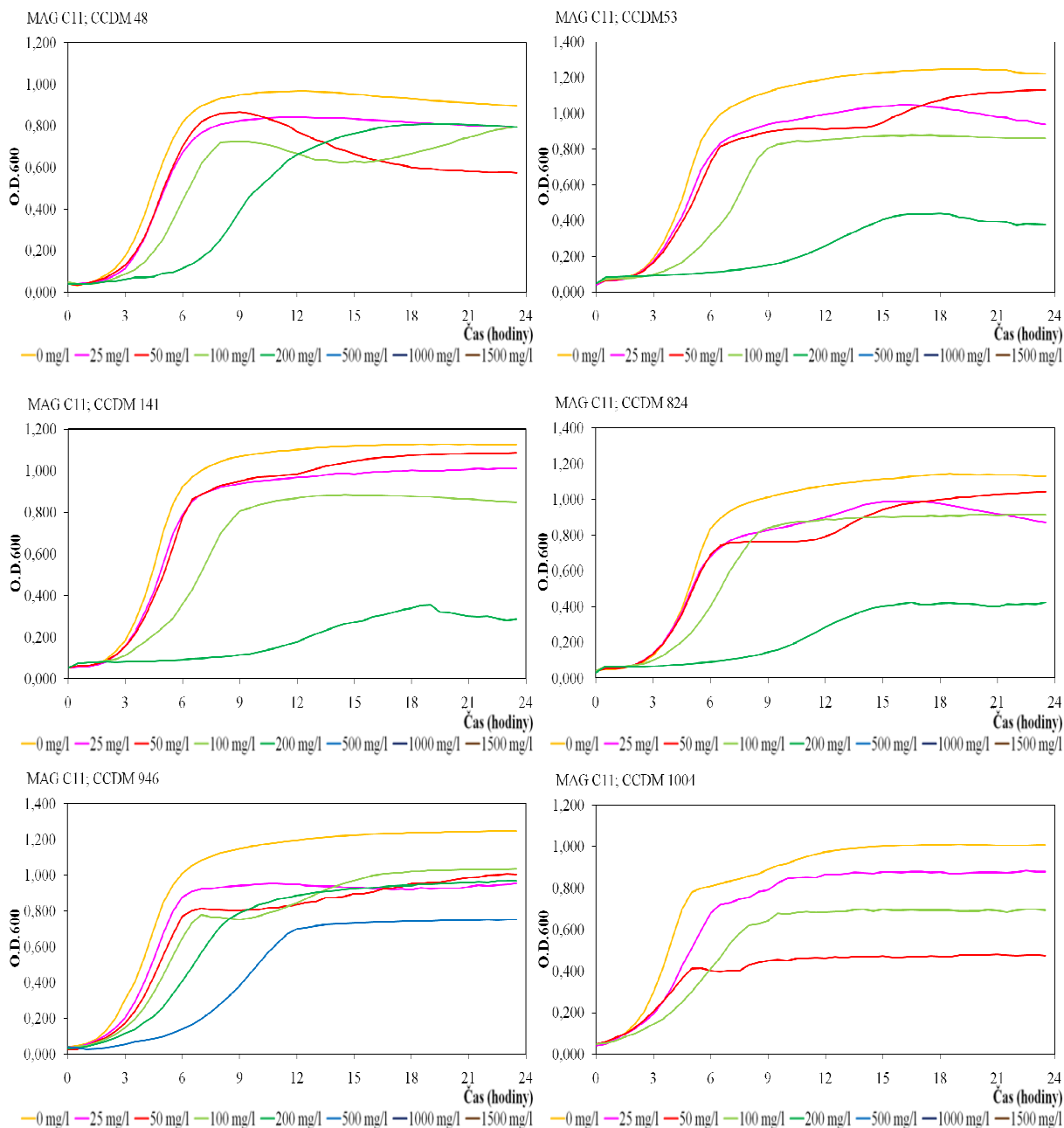
MAG C_{8:0} neměl příliš výrazné inhibiční účinky. Nejvíce působil na růst *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 48 a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCDM 1004. Úplný inhibiční účinek byl u těchto kmenů již u koncentrace MAG C_{8:0} 500 mg.l⁻¹, částečný inhibiční účinek tyto mikroorganismy vykazovaly u MAG C_{8:0} v koncentraci 200 mg.l⁻¹. MAG C_{8:0} o koncentracích od 25 - 100 mg.l⁻¹ u *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 48 měl vliv na prodloužení lag-fáze na 3 hodiny oproti necelé hodině v médiu bez MAG a na zkrácení exponenciální fáze růstu, která skončila po 9 hodinách růstu (Obr. 16). Z výsledné optické denzity vyplývá, že množství vzniklých buněk bylo zhruba poloviční

oproti kontrole. U sledované kultury *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCDM 1004 při koncentraci tohoto MAG v množství 200 mg.l^{-1} byla lag-fáze prodloužena až na 16 hodin. Inhibiční účinek této koncentrace byl tedy znatelný. U ostatních testovaných kmenů rodu *Lactococcus* byl výrazný inhibiční účinek MAG $\text{C}_{8:0}$ sledován od nejvyšších testovaných koncentrací, tj. od 1500 mg.l^{-1} . Výraznější pokles růstové aktivity byl zaznamenán i u koncentrací MAG $\text{C}_{8:0}$ 1000 mg.l^{-1} . Doba lag-fáze u takto vysokých koncentrací byla mezi 12 – 15 hodinou měření (Obr. 16). Inhibiční účinky MAG $\text{C}_{8:0}$ byly sledovány na G+ bakteriích (rodu *Bacillus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Salmonella*, *Staphylococcus*), jak uvádí [93, 98].



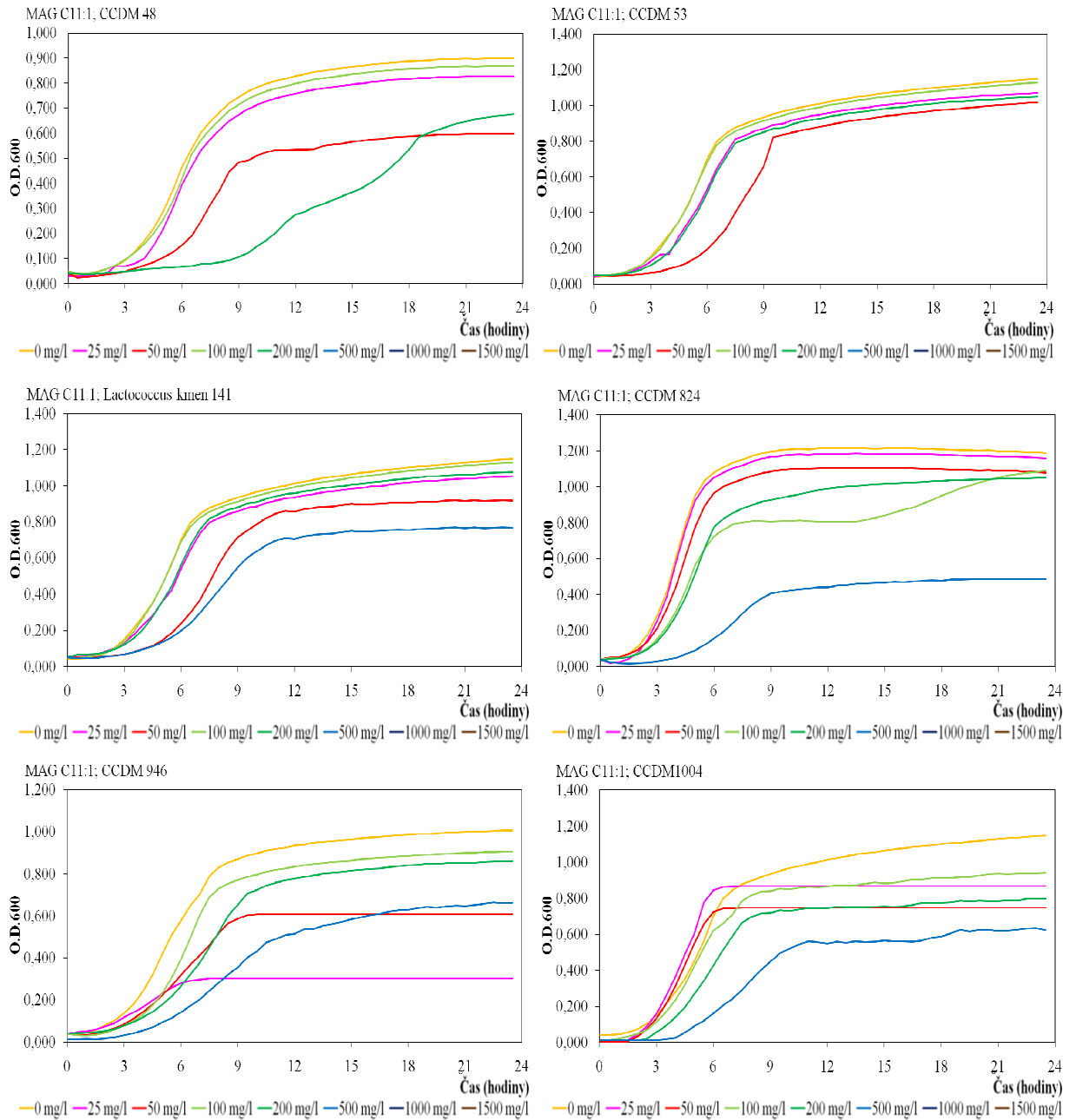
Obr. 17 Inhibiční účinky MAG C_{10:0} na růst *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

MAG C_{10:0} působil inhibičně na všechny 3 kmeny *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a 3 kmeny *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (Obr. 17). Částečný antimikrobiální efekt MAG C_{10:0} byl zaznamenán u kmene CCDM 824, a to v koncentraci 100 mg.l⁻¹. Úplný inhibiční účinek byl zaznamenán při použití MAG C_{10:0} v koncentraci 100 mg.l⁻¹ u všech 3 testovaných kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. U kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 48 a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCDM 1004 byl zaznamenán výraznější inhibiční účinek než u zbývajících testovaných bakterií, a to již od 50 mg.l⁻¹. Lag fáze byla v přítomnosti tohoto MAG prodloužena až na 15 hodin. Inhibiční účinky MAG C_{10:0} jsou tedy větší než u MAG C_{8:0}. Podobně jako v naší studii, byly inhibiční účinky tohoto monoacylglycerolu sledovány u mnohých dalších G⁺ mikroorganismů (*Staphylococcus aureus* aj.), kdy bylo zjištěno, že bez ohledu na pH kultivačního prostředí zpomalují lag-fázi [102]. MAG C_{10:0} může rovněž inhibovat i kvasinky a plísňe, a to od koncentrací 100 mg.l⁻¹, jak uvádí Růžička a kol. [104]. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. CCDM 48 reagoval již na MAG C_{10:0} v množství 25 mg.l⁻¹, tato inhibiční koncentrace byla nejnižší ze všech sledovaných monoacylglycerolů (Obr. 17).



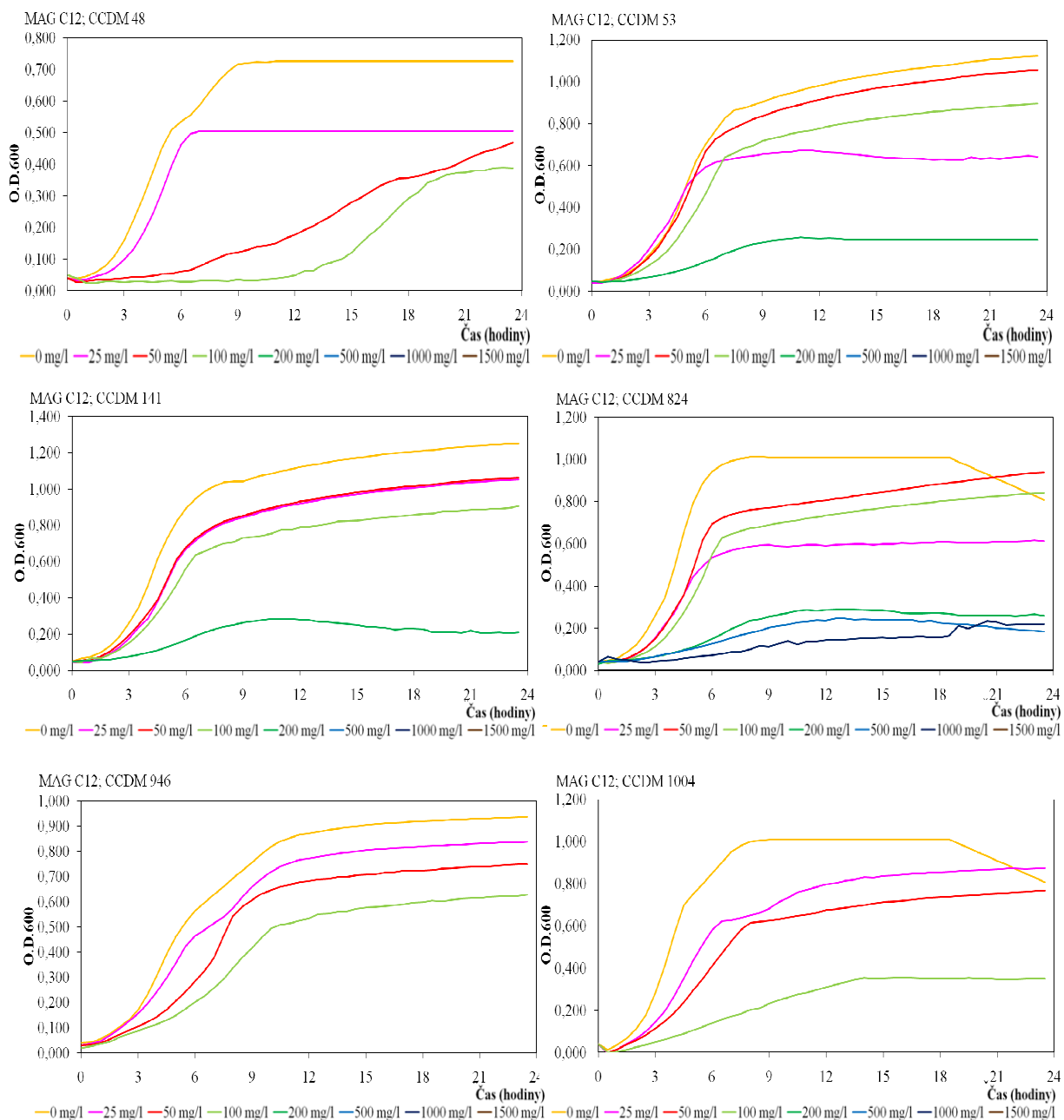
Obr. 18 Inhibiční účinky MAG C_{11:0} na růst *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

MAG C_{11:0} vykazoval inhibiční účinky na kmen *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 48 od koncentrací 500 mg.l⁻¹ a na *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCDM 946 jako nejméně citlivý mikroorganismus od koncentrací MAG C_{11:0} 1000 mg.l⁻¹. U ostatních testovaných kmenů rodu *Lactococcus* byla částečně opožděná lag-fáze oproti kontrole, a tedy inhibiční účinek u koncentrací MAG C_{11:0} 200 mg.l⁻¹ už je ztelně menší. začíná po 15 -ti hodinách. Lag-fáze byla prodloužena a exponenciální fáze byla tedy započata po 15 hodinách. Tyto mikroorganismy byly inhibovány při koncentracích MAG C_{11:0} od 500 mg.l⁻¹ (Obr. 18).



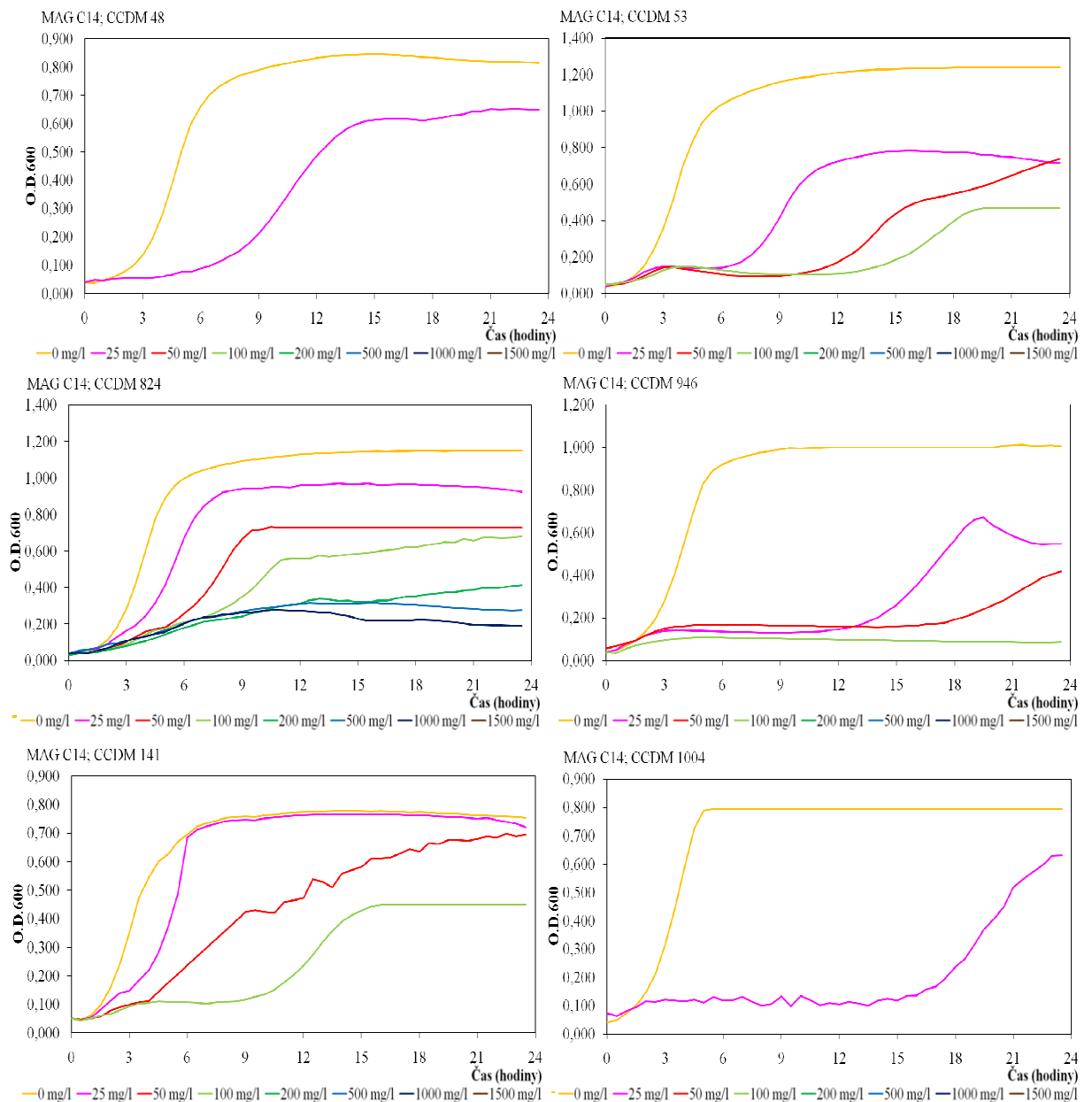
Obr. 19 Inhibiční účinky MAG C_{11:1} na růst *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

MAG C_{11:1} vykazoval inhibiční účinky na *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 48 od koncentrací 200 mg.l⁻¹, na všechny 3 testované kmeny *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* pak inhibiční účinek od koncentrací 500 mg.l⁻¹. Úplný inhibiční účinek MAG C_{11:1} byl viditelný od koncentrací 1000 mg.l⁻¹. Doba lag-fáze buněk laktokoků v případě kultivačního média s přidavkem MAG C_{11:1} v koncentraci 100 mg.l⁻¹ a nižšími byla téměř shodná jako u kontroly (bez použití MAG C_{11:1}, viz. Obr. 19).



Obr. 20 Inhibiční účinky MAG C_{12:0} na růst *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

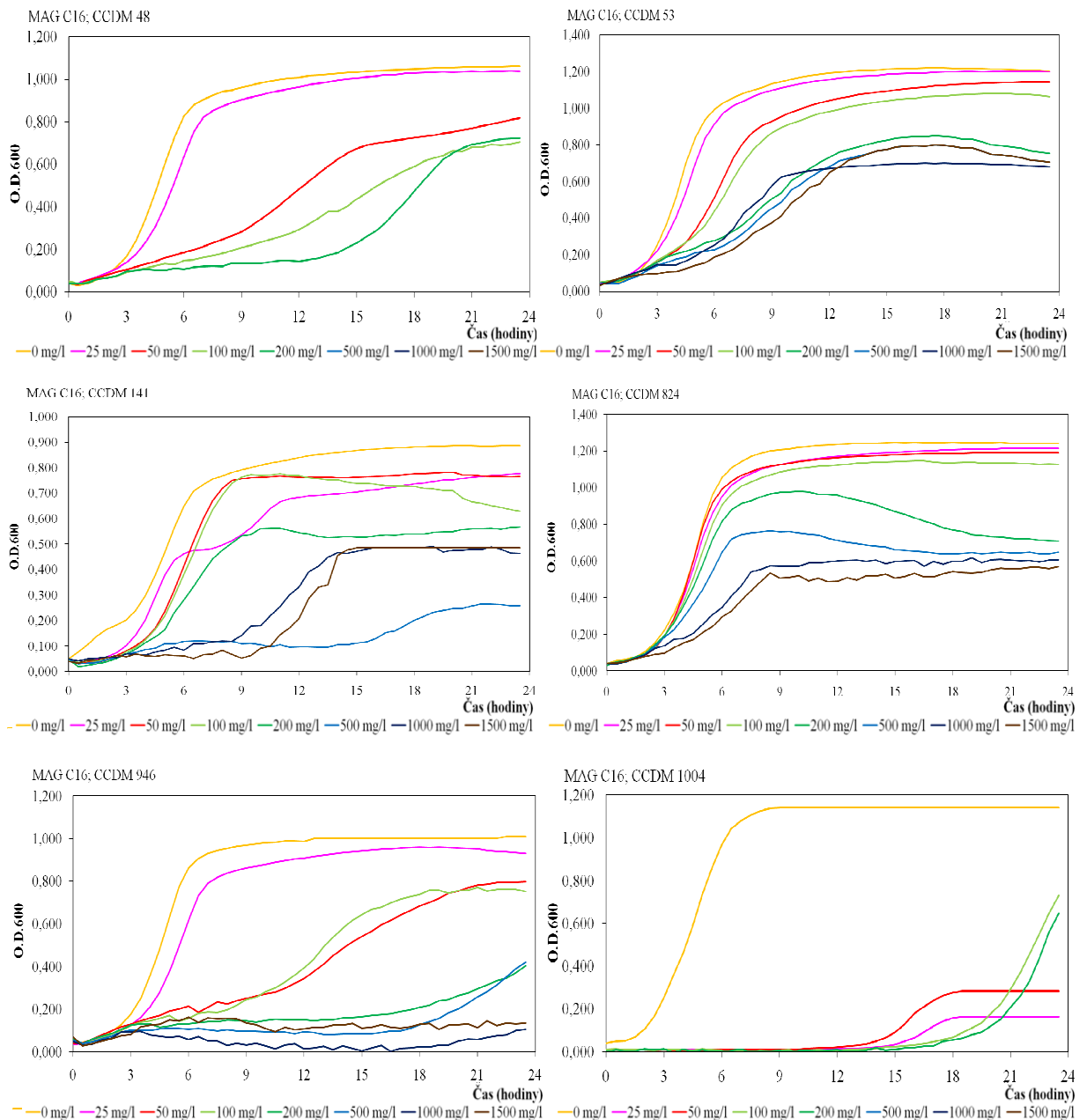
MAG C_{12:0} na všechny 3 kmeny *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a 3 kmeny *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* začal působit slabě inhibičně od koncentrací 100 mg.l⁻¹. U kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 53 a CCDM 141 a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCDM 824 byl pozorován slabší inhibiční účinek tohoto MAG od koncentrací 500 mg.l⁻¹. Úplný inhibiční účinek byl sledován u ostatních kmenů od koncentrací MAG C_{12:0} 200 mg.l⁻¹ (Obr. 20). Kromě námi testovaných laktokoků byly inhibiční účinky tohoto monoacylglycerolu sledovány u mnohých jiných G⁺ mikroorganismů (např. na *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* nebo *Bacillus subtilis*), [100].



Obr. 21 Inhibiční účinky MAG C_{14:0} na růst *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

MAG C_{14:0} částečně inhiboval růst *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 48 a CCDM 53 při koncentraci 25 mg.l⁻¹, kdy byla lag-fáze posunuta oproti kontrole o 6 hodin. Úplný inhibiční účinek na kmen CCDM 48 byl pozorován od koncentrace 50 mg.l⁻¹. Růst *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 53 byl tímto MAG zcela inhibován při koncentraci 200 mg.l⁻¹. U koncentrace 100 mg.l⁻¹ byla lag-fáze posunuta již o 15 hodin. Jako nejodolnější vůči MAG C_{14:0} se jevil kmen CCDM 824, který byl schopen slabého růstu i v prostředí s tímto MAG při koncentraci 1000 mg.l⁻¹. Dá se říci, že i přesto má tato koncentrace na CCDM 141 určitý inhibiční účinek. *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*

CCDM 946 a CCDM 1004 byly inhibovány při koncentracích od 50 mg.l⁻¹. Kmen CCDM 1004 měl při koncentraci MAG C_{14:0} 25 mg.l⁻¹ posunutou lag-fázi o 16 hodin (Obr. 21). Vůči působení MAG C_{14:0} byl nejvíce citlivý *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCDM 1004, u kterého již koncentrace 50 mg.l⁻¹ způsobila výrazné prodloužení lag fáze a zpomalení růstu.



Obr. 22 Inhibiční účinky MAG C_{16:0} na růst *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

MAG C_{16:0} vykazoval úplné inhibiční účinky pouze na *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 48 a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCDM 946 a CCDM 1004.

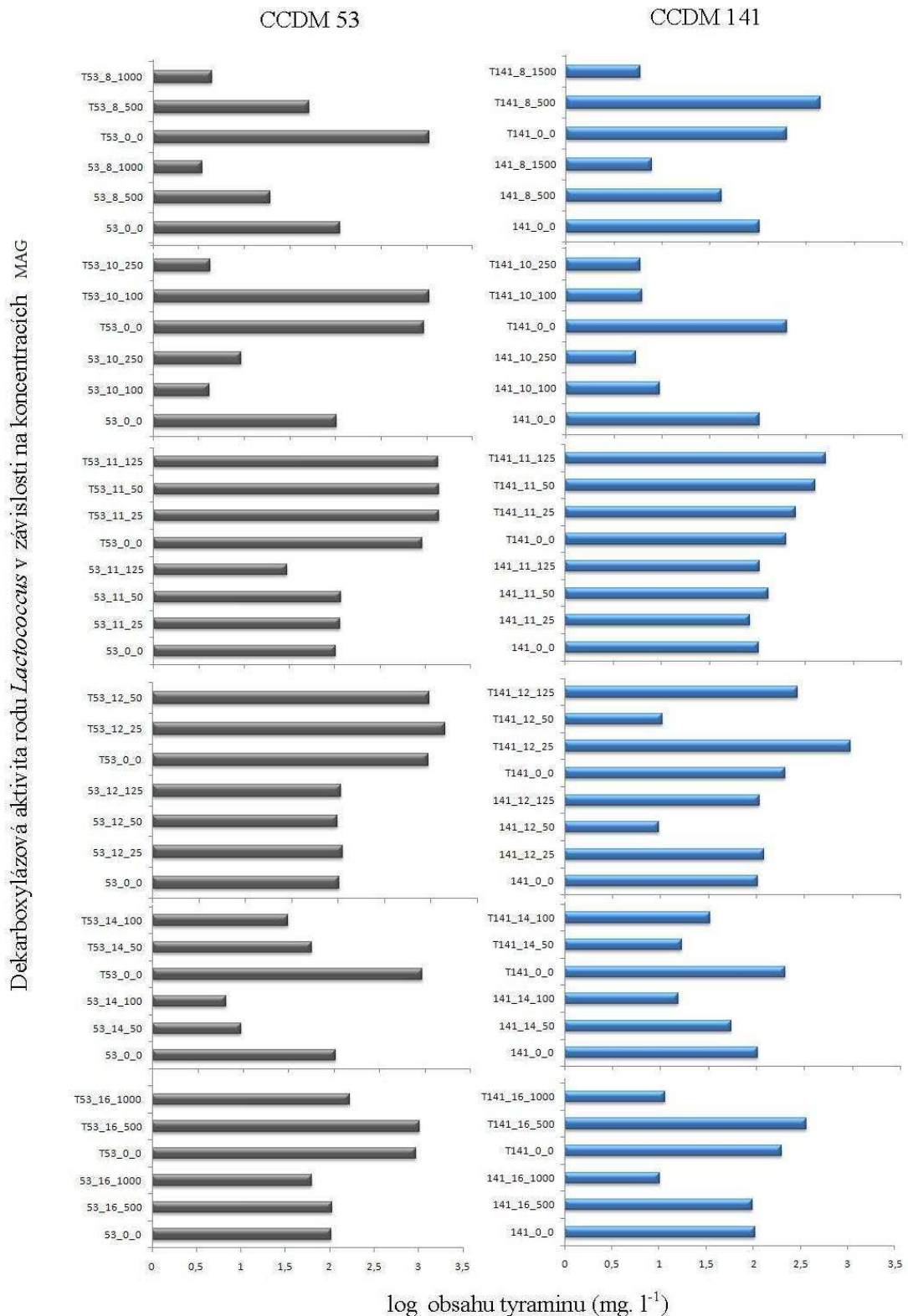
U ostatních kmenů byl i u nejvyšších testovaných koncentrací (1500 mg.l^{-1}) pozorován snížený, ale přesto pozorovatelný růst, kde lag-fáze byla zpožděna maximálně o 6 hodin. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 48 byl úplně inhibován při koncentracích MAG C_{16:0} 500 mg.l^{-1} , u koncentrací $50 - 200 \text{ mg.l}^{-1}$ byla lag-fáze opožděna o 10 hodin oproti kontrole bez MAG. U *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCDM 946 byl pozorován částečný inhibiční účinek od koncentrace 50 mg.l^{-1} , kdy oblast lag-fáze byla posunuta o 6 hodin. U kmene CCDM 1004 byl pozorován částečný inhibiční účinek od koncentrace 50 mg.l^{-1} , kdy lag-fáze byla posunuta o 13 hodin. Tento kmen byl na MAG C_{16:0} jako inhibiční látku nejcitlivější (Obr. 22). Všechny inhibiční koncentrace monoacylglycerolů jsou shrnuty v Tabulce 11.

Tab. 11 Minimální inhibiční účinky vybraných monoacylglycerolů na rod *Lactococcus*.

Kmeny mikroorganismů		Monoacylglyceroly						
		MAG C _{8:0}	MAG C _{10:0}	MAG C _{11:0}	MAG C _{11:1}	MAG C _{12:0}	MAG C _{14:0}	MAG C _{16:0}
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	CCDM 48	> 500 mg.l^{-1}	> 100 mg.l^{-1}	> 500 mg.l^{-1}	> 500 mg.l^{-1}	> 500 mg.l^{-1}	> 50 mg.l^{-1}	> 500 mg.l^{-1}
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	CCDM 53	> 1500 mg.l^{-1}	> 100 mg.l^{-1}	> 500 mg.l^{-1}	> 500 mg.l^{-1}	> 500 mg.l^{-1}	> 200 mg.l^{-1}	-
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	CCDM 141	-	> 100 mg.l^{-1}	> 500 mg.l^{-1}	> 1000 mg.l^{-1}	> 500 mg.l^{-1}	> 200 mg.l^{-1}	-
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	CCDM 824	-	> 200 mg.l^{-1}	> 500 mg.l^{-1}	> 1000 mg.l^{-1}	> 1000 mg.l^{-1}	> 1000 mg.l^{-1}	-
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	CCDM 946	-	> 100 mg.l^{-1}	> 1000 mg.l^{-1}	> 1000 mg.l^{-1}	> 200 mg.l^{-1}	> 200 mg.l^{-1}	> 1500 mg.l^{-1}
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	CCDM 1004	> 500 mg.l^{-1}	> 100 mg.l^{-1}	> 200 mg.l^{-1}	> 1000 mg.l^{-1}	> 200 mg.l^{-1}	> 50 mg.l^{-1}	> 500 mg.l^{-1}

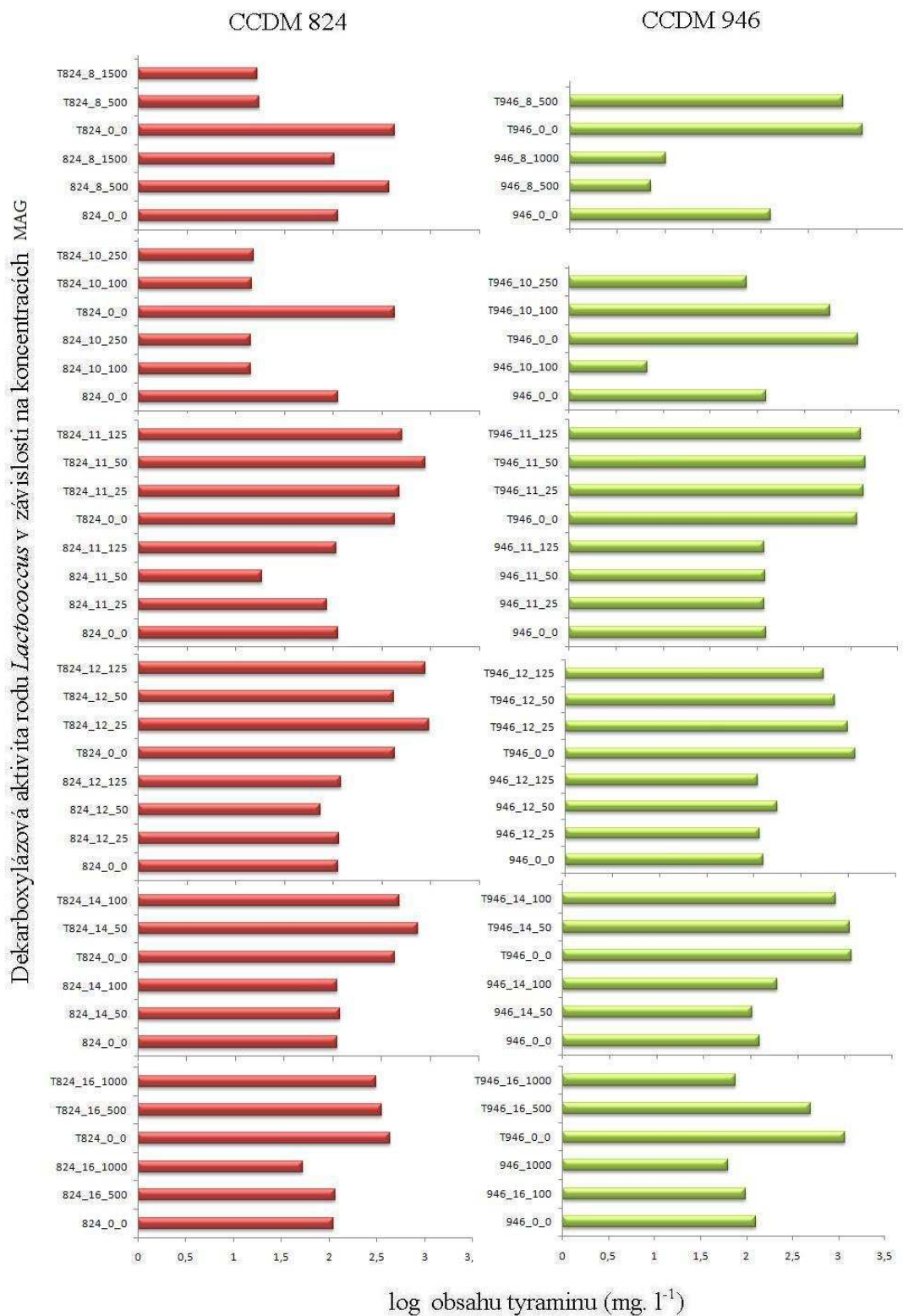
8.3 Stanovení produkce biogenních aminů.

Zjišťování tvorby biogenního aminu tyraminu bylo sledováno na 6 bakteriích rodu *Lactococcus* (Seznam kmenů uveden v kapitole 5.1), které byly již dříve označeny za producenty tyraminu [97]. Cílem tohoto experimentu bylo stanovit, zda monoacylglyceroly mají přímý vliv na tvorbu, respektive její potlačení, biogenních aminů. Tvorba biogenních aminů byla sledována pomocí iontově-výměnné chromatografie. Po kultivaci bakterií byla zjišťována tvorba tyraminu v médiu obohaceném o aminokyselinu tyrozin. Do kultivačních médií byla kromě prekursoru (tyrozinu) přidána různá koncentrace vybraných monoacylglycerolů (Metoda popsána v kapitole 6.1 a 6.2). Takto byl sledován vliv tvorby tyraminu v závislosti na typu a množství přidaného MAG. Produkce tyraminu byla zjištěna u všech testovaných kmenů rodu *Lactococcus*. Výsledky produkce tyraminu jsou uvedeny v grafech (Obr. 23 a Obr. 24).



Obr. 23 Dekarboxylázová aktivita testovaných kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 53 a CCDM 141 v závislosti na koncentracích monoacylglycerolů.

T před číslem kmene značí přidavek aminokyseliny tyrozinu, za číslem kmene je uveden počet uhlíků testovaného MAG a jeho koncentrace v mg.l⁻¹.



Obr. 24 Dekarboxylázová aktivita testovaných kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946 v závislosti na koncentracích monoacylglycerolů.

T před číslem kmene značí přidavek aminokyseliny tyrozinu, za číslem kmene je uveden počet uhlíků testovaného MAG a jeho koncentrace v mg.l⁻¹.

Produkcí biogenních aminů u tyrozindekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactococcus* ovlivňuje celá řada vlivů. Pro sledování vlivu MAG (v koncentracích 25 – 1500 mg.l⁻¹) byly vybrány 2 kmeny *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (CCDM 53 a CCDM 141) a 2 kmeny *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (CCDM 824 a CCDM 946). Sledování přítomnosti biogenních aminů v dekarboxylačním médiu s tyrozinem, bylo provedeno iontově-výměnnou chromatografií. V dekarboxylačním médiu s tyrozinem byla zjištěna produkce tyraminu u všech 4 sledovaných kmenů. U *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (CCDM 53, CCDM 141) byl tyramin detekován v rozmezí 3,40 – 1426,66 g.l⁻¹. Největší tvorbu tyraminu bez přídavku monoacylglycerolu vykazoval kmen *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCDM 946. U *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (CCDM 824, CCDM 946) byl tyramin detekován v rozmezí 6,80 – 1444,00 g.l⁻¹. Součástí živného média M17 byl i hydrolyzát bílkovin, který je bakteriemi dále rozkládán na aminokyseliny, a proto byla tvorba biogenního aminu tyraminu zaznamenána i v médiu bez přídavku aminokyseliny tyrozinu. Tvorba biogenního aminu v dekarboxylačním médiu obohaceném o tyrozin byla ve většině případů úměrná tvorbě biogenního aminu v dekarboxylačním médiu, které nebylo obohaceno o aminokyselinu tyrozin. Tvorba tyraminu z přidaných 0,2 % (w/v) tyrozinu byla většinou 10 krát větší než tvorba tyraminu pouze v dekarboxylačním médiu M17 bez aminokyseliny.

U *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 53 byla nejmenší produkce tyraminu u MAG C_{11:0} v koncentraci 125 mg.l⁻¹. V tomto případě byla tvorba tyraminu 4 krát menší než produkce bez použitého MAG. Inhibiční účinek tohoto MAG nebyl výrazný (viz Obr. 19). U ostatních koncentrací MAG C_{11:0} byla produkce tyraminu stejná, lze tedy říci, že zvolený MAG nesnižoval dekarboxylázovou aktivitu testovaného kmene. Velmi nízké hodnoty produkce tyraminu byly zjištěny u MAG C_{14:0}.

Lactococcus lactis ssp. *lactis* CCDM 141 měl nejmenší produkci tyraminu u koncentrací MAG C_{10:0} 250 mg.l⁻¹. Toto množství tyraminu bylo ovlivněno inhibičními účinky MAG, protože při této koncentraci byla zjištěna výraznější inhibice růstu *L. lactis* CCDM 141. Také MAG C_{8:0} ovlivňoval tvorbu tyraminu. Avšak jeho inhibiční účinky na *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 141 nebyly příliš výrazné., nicméně i tak se produkce tyraminu snižovala s rostoucí koncentrací MAG. U MAG C_{8:0} v koncentraci 500 mg.l⁻¹ byla produkce tyraminu dvojnásobná než u média M17 s tyrozinem bez MAG. Některé monoacylglyceroly mohou tedy produkci biogenních aminů zvyšovat. Takže podobně jako u předchozího kmene v přítomnosti MAG nedošlo k výraznějšímu omezení aktivity

tyrozindekarboxylázy, MAG měl pouze vliv na rychlost růstu. U MAG C_{11:0} s rostoucí koncentrací monoacylglycerolu také rostla koncentrace tyraminu. Tento MAG inhibiční účinky při sledování vlivu použitých koncentrací nevykazoval. Při přidavku MAG C_{12:0} do kultivačního média v koncentraci 50 mg.l⁻¹ došlo k nejnižší produkci tyraminu, a to asi 100 krát menší než u MAG C_{12:0} v koncentraci 25 mg.l⁻¹ a 101 krát menší než u MAG C_{12:0} v koncentraci 125 mg.l⁻¹. Inhibiční účinky u takto nízkých koncentrací monoacylglycerolů nebyly zjištěny. MAG C_{14:0} a MAG C_{16:0} ovlivňovaly tvorbu tyraminu v závislosti na inhibičních účincích na *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 141.

U kmene *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCDM 824 byla produkce tyraminu stejná v médiu obohaceném o 0,2 % (w/v) tyrozinu i v médiu bez tyrozinu. Tvorba tyraminu klesala po přidavku MAG C_{8:0} i MAG C_{14:0}, i když tyto monoacylglyceroly nevykazovaly příliš vysoké inhibiční účinky. MAG C_{10:0} vykazoval inhibiční účinky a produkce tyraminu v závislosti na inhibici buněk klesala. MAG C_{12:0} a MAG C_{16:0} neovlivňovaly tvorbu biogenních aminů buňkami *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCDM 824.

Produkcí biogenního aminu (tyraminu) u kmene *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCDM 946 neovlivňovalo množství přidané aminokyseliny tyrozinu (0,2 % (w/v)). Inhibiční účinky použitých monoacylglycerolů neměly vliv na produkci biogenních aminů. MAG C_{8:0} snižoval množství tyraminu cca 10 krát. Inhibiční účinky MAG C_{10:0} na *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCDM 946 byly výrazné, u použitých koncentrací monoacylglycerolu se množství vzniklého tyraminu snižovalo v závislosti na inhibičních účincích tohoto monoacylglycerolu. MAG C_{11:0} neměl výraznější inhibiční účinky na *Lactococcus* CCDM 946 při sledovaných koncentracích 50 – 125 mg.l⁻¹, rovněž tvorba tyraminu nebyla přidaným monoacylglycerolem ovlivněna. V přítomnosti MAG C_{14:0} a MAG C_{16:0} dekarboxylázová aktivita klesala úměrně s rostoucí koncentrací přidaných monoacylglycerolů. Nevětší množství biogenních aminů bez vlivu monoacylglycerolů, ze všech kmenů produkuje *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 946.

Celkově lze říci, že se nepodařilo prokázat možné účinky testovaných MAG na aktivitu tyrozindekarboxylázy. Pokud došlo ke snížení produkce tyraminu, tak to bylo ve většině případů způsobeno inhibicí růstu buněk.

ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na studium inhibičních vlivů monoacylglycerolů a možností monoacylglycerolů ovlivňovat vznik biogenních aminů u bakterií mléčného kvašení, konkrétně u technologicky významných kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. Biogenní aminy mají, ve vysokých koncentracích na lidský organizmus toxické účinky.

Vliv monoacylglycerolů na inhibici růstu byl pozorován u všech 6 testovaných kmenů laktokoků. Největší antimikrobiální účinky vykazoval MAG C_{10:0}, a to na všechny testované kmeny rodu *Lactococcus* (v koncentracích nad 100 mg.l⁻¹). Nejméně účinný monoacylglycerol vůči růstu testovaných bakterií rodu *Lactococcus* byl MAG C_{16:0}. Nejvíce citlivá bakterie vůči testovaným monoacylglycerolům byl *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 1004.

Na základě získaných výsledků lze všech 6 kmenů rodu *Lactococcus* zařadit mezi dekarboxyláza aktivní mikroorganismy, které tvoří biogenní amin tyramin, a to i v případě, pokud byly do kultivačního média přidány monoacylglyceroly, které zpomalují růst. Tento závěr byl ověřen pomocí iontově výměnné chromatografie. Největší množství biogenních aminů produkoval *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 946. Produkce tyraminu z tyrozinu byla zjištěna u všech sledovaných kmenů (CCDM 53, CCDM 141, CCDM 824 a CCDM 946).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KROG, N. Crystallization properties and lyotropic phase behavior of food emulsifiers, *Journal of Food Emulsions*, 1997, p. 505-526.
- [2] POKORNÝ, J., DUBSKÁ, L. *Technologie tuků*, Praha, SNTL, 1986.
- [3] DAVÍDEK J., JANÍČEK G., POKORNÝ J., *Chemie potravin*, 1. Vydání, 1983, str. 62 - 501.
- [4] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin II*, Tábor, OSSIS, 2002, 320 str., ISBN 80-86659-01-1.
- [5] SVOBODA, J. a kol. *Organická chemie I*, Praha, VŠCHT, 2007, 310 str., ISBN 80-7080-561-7.
- [6] FLACK, E.A. & KROG, N. *Food Trade Review*, 1982, 27-33.
- [7] ULLRICH, L. *Chémia a technológia jedlých tukov a olejov*, Bratislava, SVTL, 1990, 436 str.
- [8] BOYLE, E. Monoglycerides in food systems: Current and future uses, *Food technology*, 51, 1997, p. 52 – 59.
- [9] MOULOUNGUI, Z., ROKOTONDRAZAFI, V., PEYROU, G., GACHEN, CH., EYCHENE, V. Agro-food-Industry Hi-tech, *Journal of Surfactants and Detergents*, 12, 1998.
- [10] SAGALOWICZ L., LESER M. E., WATZKE H. J., MICHEL M. Monoglyceride selfassembly structures as delivery vehicles, *Trends in Food Science & Technology* 2006, 17, p. 204 - 214.
- [11] JÖNSSON, B., LINDMAN, B., HOLMBERG, K., & KRONBERG, B. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*, 2003, ISBN: 9780471498834.
- [12] YAGHMUR, A., DE CAMPO, L., SAGALOWICZ, L., LESER, M. E., GLATTER, O. Emulsified Microemulsions and Oil-Containing Liquid Crystalline Phases, *Langmuir*, 2004, 17, p. 569 - 577.
- [13] BORNE´ J. Lipid self-assembly and lipase action. *PhD dissertation*, Lund University, 2002.
- [14] FLACK, E.A. *Flavours*, 1976, p. 104 – 110.
- [15] BIRNBAUM, H. *Bakers Digest*, 1981, p. 6-18.

- [16] SONNTAG, N.O.V. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1982, 59, p. 795 – 802.
- [17] LAURIDSEN, J.B. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1976, 53, p. 400 – 407.
- [18] SHIMADA, Y., SUENCHA, M., SUGIHARA, A., NAKAI, S., TOMINAGA, Y. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2004, 76, p. 189 – 193.
- [19] BORNSCHEUER, U. T. *Enzyme and Microbial Technology*, 1995, 17, p. 578 – 584.
- [20] CORMA, A., IBORRA, S., MIQUEL, S., PRIMO, J. *Journal of Catalysis*, 173, 1998, p. 315 – 321.
- [21] WEISSERMEL, K., ARPE, H.-J. *Industrial Organic Chemistry*, VCH Verlagsgesellschaft, 1993, p. 396.
- [22] WRIGHT, H.J., SEGUR, J.B., CLARK, H.V., COBURN, S.K., LANGDON, E.E., DUPUIS, E.N. *Oil & Soap*, 1944, 145 p.
- [23] FREEDMAN, B., BUTTERFIELD, R.O., PRYDE, E.H. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63, 1986, 1375 p.
- [24] STOFFEL, W., CHU, F., AHRENS, E.H. *Analytical Chemistry*, 31, 1959, 307 p.
- [25] SCHUCHARDT, U., SERCHELI, R., VARGAS, R. M. Transesterification of Vegetables Oils, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 9, 1998, ISSN 0103-5053.
- [26] HARRINGTON, K.J., D'ARCY-EVANS, C. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research Development*, 24, 1985, p. 314.
- [27] GRAILLE, J. LOZANO, P., PIOCH, D., GENESTE, P. *Oléagineux*, 1986, 41, p. 457.
- [28] EYCHENNE, V. A MOULOUNGUI, Z. High concentration of 1-3-monoglycerides by direct partial esterification of fatty acids with glycerol *Fett-Lipid*, 101, 1999, p. 424 – 427.
- [29] WEISS, A., KGAA, H. Enzymatische Herstellung von festen Fettsäuremonoglycerides, *Fett Wissenschaft Technologie*, 92, 1990, p. 392 - 396.
- [30] JACHMANIÁN, I., SCHULTE, E., MUKHERJEE, D. K. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 5, 1996, p. 563 – 567.

- [31] ČERVINKA, D., DĚDEK, V., FERLES, M. *Organická chemie*, 1982, str. 628 - 629.
- [32] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*, Praha, ACADEMIA, 1999, 506 str. ISBN 80-200-0438-6.
- [33] POTTS, R. H., A MUCKERHEIDE, V. J. Acids and their industrial applications, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1968, p. 21 – 45.
- [34] CARON, M. SHARPLESS, K. B. *The Journal of Organic Chemistry*, 50, 1985, 1557 p.
- [35] CHONG, J., M. AND SHARPLESS, K. B. *The Journal of Organic Chemistry*. 50, 1985, p. 1560 – 1567.
- [36] LOK, C. M., MANK A. P., AND WARD, J. P. Synthesi sof glycidol esters and mono-/di- acylglycerols from glycidol, *Chemistry and Physics of Lipids* 1985, 36, p. 329.
- [37] AGULAR, L. M. G., AND VERGAS, R. M. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 5, 1998, 755 p.
- [38] KLÁSEK, A., KOMENDA, J. A HUBÁČEK, H. Katalyzátory pro síťování kapalných kaučuků, *Výzkumná práce FT VUT, Zlín* 1985.
- [39] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 152/2005 Sb. v platném znění, stanoví druhy a podmínky použití přídatných a pomocných látek při výrobě potravin.
- [40] HENRY, C. Monoglycerides: The universal emulsidier, *Cereal Foods World* 1995, 40, p. 734 - 738.
- [41] BEE, R., DAVIES, E., DICKINSON E. Orthokinetik destabilization of emulsions by saturated and unsaturated monoglycerides, *International Dairy Journal*, 11, 2001, p. 827-836.
- [42] HOKUZO, K. *Trends in Food Science And Technology*, 7, 1996, p. 205.
- [43] HARTUNIAN, S. M., WKITE, P. J., AMES, I. A., BATRES, L. V. Influence of monoglycerides of different chain lengths on texture and flavor of breads made with Waxy Cornstarch, *Starch – Stärke*, 1990, 42, p. 53 - 56.
- [44] DELFOOR, I., DE GEEST, C., MARTENS, M., DELCOUR, J. A. *Cer. Cem.* 68, 1991, p. 323 – 327.

- [45] MOONEN, H., BAS, H. Mono- and diglycerids, *Emulsifiers in Food Technology*, 2004, p. 40 – 57, ISBN 978-1-4051-1802-6.
- [46] BIRKHAHN, R. H., Mc COMBS, C. Potential of the Monoglyceride and Triglyceride of dl-3-Hydroxybutyrate for Parenteral Nutrition: Synthesis and Preliminary Biological Testing in the Rat, *Nutrition*, 3, 1997, p. 213 - 218.
- [47] BELL, J. S., BRADLEY, D., FORSE, R. A., BISTRAN, R. B. The New Dietary Fats in Health and Disease, *Journal of the American Dietetic Association*, 97, 1997, p. 280 – 286.
- [48] KABARA, J. J. *Cosmetic Science Technology Ser. 72*, 1991, p. 311 – 344.
- [49] Patenty DE 3 930 193, 1991.
- [50] Patenty JP 03 157 320, 1989.
- [51] RIEGER, M. *Cosmetics & Toiletries* 105, 1990, p. 51 – 57.
- [52] KABARA, J. J. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 69, 1985, p. 59.
- [53] CONLEY, A. J., KABARA, J. J. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 4, 1973, p. 501 - 506.
- [54] SHEU, A. A., FREESE, E. J. Lipopolysaccharide Layer Protection of Gram-Negative Bacteria Against Inhibition by Long-Chain Fatty Acids. *Journal of Bacteriology*, 115, 1973, p. 869 - 875.
- [55] THORMAR, H., BERGSSON, G. Antimicrobial effects of lipids, *Recent Devel Antiviral Research*, 1, 2001, p. 157-173.
- [56] THORMAR, H., BERGSSON., G., GUNNARSSON, E. Hydrogels containing monocaprin have potent microbicidal activities against sexually transmitted viruses and bacteria in vitro, *Sexually Transmitted Infections*, 75, 1999, p. 181 - 185.
- [57] VLTAVSKÁ, P., Antimikrobiální úpravy obuvnických materiálů, *Disertační práce*, 2008, FT UTB, Zlín.
- [58] KABARA, J. J., OHKAWA, M., IKAWA, T., KATORI, T., NISHIKAWA, Y. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine*, 13, 1985, p. 263 – 272.
- [59] ISAACS, CH. E., LITOV, R. E., THORMAR, H. Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovie milk, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 6, 1995, p. 362 – 366.

- [60] GERAGHTY, P. B., ATTWOOD, D., COLLETT, J. H., SHARMA, H., DANDIKER, Y. An investigation of the parameters influencing the bioadhesive properties of Myverol 18-99/water gels, *Biomaterials* 18, 1997, p. 63 - 67.
- [61] CHANG, CH., M., BODMEIER, R. Effect of Dissolution Media and Additives on the Drug Release from Cubic Phase Delivery Systems, *Journal of Controlled Release*, 1997, 46, 215 - 222
- [62] 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*, 20, 2002, p. 48 – 52.
- [63] KABARA, J. J., VRABLE, R., M.S.F. LIE KEN JIE. Antimicrobial Lipids: Natural and Synthetic Fatty Acids and Monoglycerides. *Lipids*, 12, 1977, p. 753-759.
- [64] MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., RODWELL, V. W. *Harperova biochemie*, 1998, 872 str., ISBN 80-85787-38-5
- [65] SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health, *Food Research International*, 29, 1997, p. 675-690.
- [66] KODÍČEK, M. *Biochemické pojmy, výkladový slovník*, VŠCHT Praha, 2007.
- [67] SMIT, A. Y., du TOIT, W.J., du TOIT, M., Biogenic Amines in Wine: Understanding the Headache, *South African Journal of Enology & Viticulture*, 2008, 29, p. 109 - 127.
- [68] Mc. MURRY, J. *Organická chemie*, Brno, VUTIUM, 2004, 1176, ISBN 978-80-214-3291-8.
- [69] HALÁSZ A, BARÁTH A, SIMON-SARKADI L, HOLZAPFEL W, Biogenic amines and their production by microorganisms, *Trends Food Sci Technl*, 1994, 5, p. 42-49.
- [70] DUCHOŇ, J. a kol. *Lékařská chemie a biochemie*. Praha, Avicenum: 1985, 716 str., ISBN 08-004-85.
- [71] HERNÁNDEZ-JOVER T., IZQUIERDO-PULIDO M., VECIANA-NOGUÉS MT., VIDAL-CAROU MC., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1996, p. 3097-3101.
- [72] BRINK BT., DAMINK, C., JOOSTEN, H. *International Journal of Food Microbiology*, 1990, 11, p. 73-84.

- [73] NOUT, M. J. R. Fermented foods and food safety. *Food Research International*. 1994, 27, 291 p.
- [74] BOVER-CID S, HUGAS M, IZQUIERDO-PILIDO M, VIDAL-CAROU MC 2001, *int Food Microbiol* 66:185 – 189.
- [75] STRATTON, J. E., HUTKINS, W. R. AND TAYLOR, S. L. Biogenicamines in cheese and other fermented foods, *Journal of Food Protection*. 1991, 54, 4604 p.
- [76] KIMATA, M. The histamine problem. *Fish as Food*, 1961, 1, p. 329 – 352.
- [77] LERKE, P. A., WERNER, S. B., TAYLOR, S. L., GUTHERTZ, L. S. Scombroid poisoning. *Western Journal of Medicine*, 1978, 129, p. 381.
- [78] FERENCIK, M. Formation of histamine during bacterial decarboxylation of histidine in the flesh of some marine fishes. *Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology*, 1970, 14, 52-60.
- [79] MARINÉ-FONT, A., VIDAL-CAROU Mc., IZQUIERDO-PULIDO, M., VECIANA-NOGUÉS M, T., HERNÁNDEZ-JOVER, T. Biogenic amines in foodstuffs: signification and analysis, *Annales des falsifications, de l'expertise chimique et toxicologique*, 1995, 88, p. 119 – 140.
- [80] ÖNAL, A. Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 103, 2007, p. 1475-1480.
- [81] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*, 2. vydání, 2003, 132 str. SBN 80-86369-07-2.
- [82] Automatický analyzátor aminokyselin AAA400, *Průručka uživatele*, 2007, 100 str.
- [83] ŠEVČÍKOVÁ, A., ŠVEC, P. Současná taxonomie bakterií mléčného kvašení, *15. evropský kongres klinické mikrobiologie*, Praha, 691-695, 2005.
- [84] BUIST, G., KOK, J., LEENHOUTS, K. J., DABROWSKA, M., VENEMA, G., HAANDRIKMAN, J. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis* a muramidase needed for cell separation. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177, p. 1554 - 1563.
- [85] TANOUS, C., CHAMBELLON, E., LE BARS, D., DELESPAUL, G., YVON, M. Glutamate Dehydrogenase Activity Can Be Transmitted Naturally to *Lactococcus lactis* Strains To Stimulate Amino Acid Conversion to Aroma Compounds, *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2006, p. 1402 - 1409.

- [86] SANDINE, W.E., RADICH, P.C. AND ELLIKER, P.R. Ecology of the lactic streptococci, *Journal Milk Food Technology*, 1972, 35, p. 176-184.
- [87] GÖRNER, F., VALÍK, Ľ. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*, Bratislava, 2004, 528 str., 1. Vydanie, ISBN 80-967664-9-7.
- [88] KIM, W.S., REN, J., DUNN, N.W. Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses, *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 171, p. 57-65.
- [89] Le BOURGEOIS, P., Lautier, M., van den Berghe, L., Gasson, M. J., Ritzenthaler, P. Physical and genetic map of the *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 chromosome comparison with that of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 reveals a large genome inversion, *Journal of Bacteriology*, 1995, 177, p. 2840 - 2850.
- [90] HEINTZ, J. A. *Lactococcus lactis*. UW Department of Bacteriology strain LcL325UW, Magnification 20000X, Scanning electron micrograph by, University of Wisconsin-Madison.
- [91] EVEN, S., LINDLEY N. D., COCAIGN-BOUSQUET M. Transcriptional, translational and metabolic regulation of glycolysis in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG 1363 grown in continuous acidic cultures. *Microbiology* 2003, 149, p. 1935 - 1944.
- [92] KLIJN, N., WEERKAMP, A. H., & de Vos, W. M. Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61, p. 788 - 792.
- [93] KAMDEM, S. S., GUERZONI, M. E., BARANYI, J., PIN, C. Effect of capric, lauric and α -linolenic acids on the division time distributions of single cells of *Staphylococcus aureus*, *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 128, p. 122 - 128.
- [94] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biology*, 1. vydání, 239-242, 361 str., ISBN 80-85605-71-6.
- [95] NĚMCOVÁ, I., ČERMÁKOVÁ, L., RYCHLOVSKÝ, P. *Spektrometrické analytické metody I.*, Univerzita Karlova, Karolinum 1999, 148 str.

- [96] JANIŠ, R., KREJČÍ, J., KLÁSEK, A. Preparation of 1-monoacylglycerols from glycidol and fatty acids catalyzed by the chromium(III)-fatty acid system, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2000,102, p. 351 – 354.
- [97] Buňková, L., Buňka, F., Hlobilová, M., Vaňátková, Z., Nováková, D., Dráb, V. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*, *European Food Research and Technology*, 2009, 229, p. 533 - 538.
- [98] NAVRÁTIL, J. Inhibice růstu vybraných bakterií vlivem monokaprylinu, *Bakalářská práce*, 2009, FT UTB, Zlín.
- [99] RŮŽIČKA, J., VELCLOVÁ, K., JANIŠ, R., KREJČÍ, J. Antimicrobial effects of 1-monoglycerols prepared by catalytic reaction of glycidol with fatty acids, *European Food Research and Technology*, 4, 2003, p. 329 – 331.
- [100] JANEČKOVÁ, K. Inhibiční vliv monoacylglycerolu kyseliny laurové na mikroorganismy, *Bakalářská práce*, 2009, FT UTB, Zlín.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

MAG	monoacylglycerol, monoglycerid
DAG	diacylglycerol
TAG	triacylglycerol
MK	mastná kyselina
(v/o)	voda v oleji
(o/v)	olej ve vodě
(w/v)	hmotnostní zlomek
HLB	hydrofilně lipofilní rovnováha
G ⁺	grampozitivní mikroorganismy
G ⁻	gramnegativní mikroorganismy
PAL	povrchově aktivní látky
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Points
CFU	„colony forming unit“, kolonii tvořící jednotka

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Isomerní formy monoacylglycerolů.	13
Obr. 2 Zobrazení některých možných přirozených struktur a jejich odpovídající faktory zhuštění. Převzato od [10].	15
Obr. 3 Obecné reakční schéma acidolýzy.	16
Obr. 4 Obecné reakční schéma alkoholýzy.	17
Obr. 5 Obecné reakční schéma glycerolýzy.	17
Obr. 6 Reakční schéma esterové výměny.	18
Obr. 7 Reakční schéma esterifikace mastné kyseliny s glycerolem.	19
Obr. 8 Reakční schéma hydrolýzy.	20
Obr. 9 Reakční schéma zmýdelnění.	20
Obr. 10 Reakční schéma hydrolýzy triacylglycerolu a vzniku glycerolu.	20
Obr. 11 Reakční schéma adice mastné kyseliny na glycidol.	21
Obr. 12 Blokové schéma stanovení volných aminokyselin.	32
Obr. 13 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> [90].	34
Obr. 14 Grafické znázornění růstové křivky, upraveno podle [94].	37
Obr. 15 Znázornění přípravy mikrotitrační destičky.	47
Obr. 16 Inhibiční účinky MAG C _{8:0} na růst <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis a</i> <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	54
Obr. 17 Inhibiční účinky MAG C _{10:0} na růst <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis a</i> <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	56
Obr. 18 Inhibiční účinky MAG C _{11:0} na růst <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis a</i> <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	57
Obr. 19 Inhibiční účinky MAG C _{11:1} na růst <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis a</i> <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	58
Obr. 20 Inhibiční účinky MAG C _{12:0} na růst <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis a</i> <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	59
Obr. 21 Inhibiční účinky MAG C _{14:0} na růst <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis a</i> <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	60
Obr. 22 Inhibiční účinky MAG C _{16:0} na růst <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis a</i> <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	61
Obr. 23 Dekarboxylázová aktivita testovaných kmenů <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCDM 53 a CCDM 141 v závislosti na koncentracích monoacylglycerolů.	63

Obr. 24 Dekarboxylázová aktivita testovaných kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946 v závislosti na koncentracích monoacylglycerolů. 64

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Výňatek z vyhlášky č.152/2005 Sb. v platném znění [39].	22
Tab. 2 Schéma vzniku a přeměny vybraných biogenních aminů, upraveno podle [70].	26
Tab. 3 Vybrané biogenní aminy vyskytující se v organismu [70].	30
Tab. 4 Přehled roztoků pro ionexovou chromatografii [82].	44
Tab. 5 Minimální inhibiční koncentrace MAG na testované kmeny <i>L. lactis</i> po 24 hodinách kultivace.	48
Tab. 6 Výsledek stanovení minimální inhibiční koncentrace po 48 hodinách.	49
Tab. 7 Inhibiční účinky monoacylglycerolů v různých koncentracích a vliv přídavku 0,2 % tyrozinu (w/v) na růst <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCDM 53.	50
Tab. 8 Inhibiční účinky monoacylglycerolů v různých koncentracích a vliv přídavku 0,2 % tyrozinu (w/v) na růst <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCDM 141.	51
Tab. 9 Inhibiční účinky monoacylglycerolů v různých koncentracích a vliv přídavku 0,2 % tyrozinu (w/v) na růst <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CCDM 824.	51
Tab. 10 Inhibiční účinky monoacylglycerolů v různých koncentracích a vliv přídavku 0,2 % tyrozinu (w/v) na růst <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CCDM 946.	52
Tab. 11 Minimální inhibiční účinky vybraných monoacylglycerolů na rod <i>Lactococcus</i> .	62