

Inhibiční působení protektivních kultur na bakterie rodu *Staphylococcus* produkující biogenní aminy

Adéla Žalková

Bakalářská práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Adéla Žalková**
Osobní číslo: **T12263**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Inhibiční působení protektivních kultur na bakterie rodu *Staphylococcus* produkující biogenní aminy**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Inhibiční látky produkované mikroorganismy.
2. Protektivní kultury.
3. Charakteristika rodu *Staphylococcus* .
4. Produkce biogenních aminů bakteriemi *Staphylococcus* .

II. Praktická část

1. Monitoring citlivosti dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Staphylococcus* vůči protektivním kulturám.
2. Zpracování výsledků.
3. Formulace závěrů.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] CLEVELAND, J., MONTVILLE, T. J., NES, I. F., CHIKINDAS M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, 71, 1-20.

[2] RODRÍGUEZ, J. M., MARTÍNEZ, M. I., HORN, N., DODD, H. M. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, 80, 101-116.

[3] EVEN, S., LEROY, S., CHARLIER, C., ZAKOUR, N. B., CHACORNAC, J. P., LEBERT, I., JAMET, E., DESMONTS, M. H., COTON, E., POCHET, S., DONNIO, P. Y., GAUTIER, M., TALON, R., LOIR, Y. L. Low occurrence of safety hazards in coagulase negative staphylococci isolated from fermented foodstuffs. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, 139, 87-95.

[4] RYAN, K. J., RAY, C. G., SHERRIS, J. C. *Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases (4th edition)*. New York: McGraw-Hill, 2004, 979 p. ISBN 08-385-8529-9.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

2. února 2015

Termín odevzdání bakalářské práce:

4. května 2015

Ve Zlíně dne 2. února 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




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

Příjmení a jméno:ŽÁLKOVÁ ADELA.....

Obor:CHTP.....

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 obhajoby¹⁾;
- 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. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ 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 § 60³⁾ 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 Zlíně4.5.2015.....

.....Žalková.....

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

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

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

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

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

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

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

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

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo 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

Cílem této bakalářské práce bylo monitorování citlivosti dekarboxyláza pozitivních stafylokoků vůči protektivním kulturám produkujícím bakteriociny. Teoretická část se zabývá popisem bakterií mléčného kvašení a jejich produkcí inhibičních látek - bakteriocinů, dále charakteristikou stafylokoků a biogenních aminů. V experimentální části byla zkoumána citlivost 28 kmenů rodu *Staphylococcus* izolovaných z potravin k nisinu a dalším bakteriocinům produkovaným celkem 22 kmeny bakterií mléčného kvašení pomocí jamkové difúzní metody. Bylo zjištěno, že dekarboxyláza pozitivní stafylokoky jsou většinou rezistentní vůči testovaným produkčním kmenům bakterií mléčného kvašení, pouze některé kmeny vykazovaly malou citlivost na nisin.

Klíčová slova: bakteriociny, bakterie mléčného kvašení, *Staphylococcus*, biogenní aminy, jamková difúzní metoda

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis is determination of activity bacteriocin-producing lactic acid bacteria against decarboxylase-positive staphylococci. The theoretical part deals with characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, staphylococci and biogenic amines. In the experimental part it was tested the susceptibility of 28 staphylococcal strains, isolated from foodstuffs, to nisin and other bacteriocins produced by 22 strains of lactic acid bacteria. Bacteriocin activity was measured by the agar well diffusion assay. Decarboxylase-positive staphylococci are mostly resistant to tested bacteriocin-producing lactic acid bacteria, only some strains are sensitive to nisin.

Keywords: bacteriocin, lactic acid bacteria, *Staphylococcus*, biogenic amines, agar well diffusion assay

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za cenné rady, připomínky, ochotu a čas, který mi věnovala při zpracování mé bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat Ing. Khatantuul Pudevдорj za ochotu a pomoc při praktické části a také laborantkám Bc. Veronice Kučabové a Lence Machálkové za užitečné rady v laboratoři.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 BAKTERIOCINY	12
1.1 BAKTERIOCINY TŘÍDY I (LANTIBIOTIKA)	13
1.1.1 Rozdělení lantibiotik	13
1.1.2 Mechanismus účinku	14
1.1.3 Nisin	14
1.2 BAKTERIOCINY TŘÍDY II.....	15
1.2.1 Podskupina IIa.....	15
1.3 BAKTERIOCINY TŘÍDY III	16
1.4 BAKTERIOCINY TŘÍDY IV	16
1.5 APLIKACE BAKTERIOCINŮ V POTRAVINÁŘSTVÍ.....	17
2 PROTEKTIVNÍ KULTURY.....	19
2.1 METABOLIZMUS BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	20
2.1.1 Průběh fermentace.....	20
2.1.2 Význam produktů metabolismu bakterií mléčného kvašení.....	21
2.1.2.1 Organické kyseliny	21
2.1.2.2 Peroxid vodíku.....	21
2.1.2.3 Oxid uhličitý	21
2.1.2.4 Diacetyl.....	21
2.2 CHARAKTERISTIKA JEDNOTLIVÝCH RODŮ	22
2.2.1 <i>Lactococcus</i>	22
2.2.2 <i>Streptococcus</i>	22
2.2.3 <i>Pediococcus</i>	22
2.2.4 <i>Lactobacillus</i>	22
2.2.5 <i>Enterococcus</i>	23
2.2.6 <i>Tetragenococcus</i>	23
2.2.7 <i>Oenococcus</i>	23
2.2.8 <i>Leuconostoc</i>	24
3 CHARAKTERISTIKA RODU <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	25
3.1 KOAGULÁZA POZITIVNÍ STAFYLOKOKY.....	25
3.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	25
3.2 KOAGULÁZA NEGATIVNÍ STAFYLOKOKY	26
4 BIOGENNÍ AMINY.....	27
4.1 FUNKCE BIOGENNÍCH AMINŮ.....	28
4.2 BIOGENNÍ AMINY V POTRAVINÁCH.....	28
4.2.1 Mikroorganismy produkující biogenní aminy	29
4.2.1.1 Biogenní aminy produkované stafylokoky	29
4.2.2 Možnosti snížení obsahu biogenních aminů v potravinách	30
II PRAKTICKÁ ČÁST	31
5 CÍL PRÁCE	32
6 MATERIÁL, POMŮCKY A METODY	33

6.1	POUŽITÉ MIKROORGANIZMY.....	33
6.2	KULTIVAČNÍ MÉDIA A ROZTOKY.....	35
6.2.1	Příprava tekutých půd	35
6.2.2	Příprava tuhých půd	36
6.2.3	Příprava fyziologického roztoku	36
6.3	KULTIVACE MIKROORGANISMŮ	36
6.4	OVĚŘENÍ ČISTOTY KULTUR.....	37
6.5	PŘÍPRAVA SUPERNATANTU	37
6.6	JAMKOVÁ DIFÚZNÍ METODA	38
6.7	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	38
7	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	39
7.1	VÝSLEDKY MONITORINGU.....	39
7.1.1	Experimenty s 1. sérií inhibičních kmenů.....	39
7.1.2	Experimenty se 2. sérií inhibičních kmenů	42
7.1.3	Experimenty se 3. a 4. sérií inhibičních kmenů	47
7.2	DISKUZE.....	47
	ZÁVĚR	51
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	52
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	57
	SEZNAM OBRÁZKŮ	58
	SEZNAM TABULEK.....	59

ÚVOD

V současné době mají spotřebitelé stále větší obavy z možných nepříznivých účinků na zdraví kvůli přítomnosti chemických přídatných látek v potravinách. Proto roste poptávka po minimálně zpracovaných potravinách bohatých na živiny a vitaminy. Výrobci ale musí zaručit zdravotní nezávadnost potravin. Řešením by mohly být bakteriociny produkované bakteriemi mléčného kvašení [1, 2].

Bakteriociny jsou antimikrobiální ribozomálně syntetizované bílkoviny a peptidy produkované bakteriemi. Inhibují růst jiných bakterií, většinou blízce příbuzných rodů. Bývají zaměňovány s antibiotiky, což jsou sekundární metabolity bakterií a mikroskopických hub. Liší se od sebe způsobem účinku, mechanismem rezistence a použitím. Prozatím jediným schváleným konzervantem je nisin produkovaný *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, který inhibuje mnoho gram pozitivních bakterií [3].

Bakterie mléčného kvašení tvoří heterogenní skupinu mikroorganismů, jejichž společným znakem je fermentace různých živin na kyselinu mléčnou. Toho se využívá při výrobě mnoha potravin, například mléčných a masných výrobků, kde přispívají k chuti a textuře. Protektivní kultury se považují za obecně bezpečné, proto slouží jako vhodný zdroj bakteriocinů v potravinářském průmyslu [4].

Biogenní aminy se vyskytují prakticky ve všech potravinách, které obsahují proteiny. Vznikají zejména činností dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů. Přítomnost biogenních aminů může sloužit jako indikátor znehodnocení potravin, a to hlavně u nefermentovaných. Obvykle nepředstavují zdravotní riziko pro konzumenta, pokud nepozře velké množství aminů, či nemá potlačen přirozený mechanismus pro katabolismus aminů. K typickým symptomům podobajícím se alergické reakci patří nevolnost, pocení, bolesti hlavy, hyper- a hypotenze, průjem, svědění nebo kopřivka [5, 6, 7].

K dekarboxyláza pozitivním mikroorganismům se řadí i koaguláza negativní stafylokoky, které mohou tvořit kadaverin, 2-fenylethylamin, putrescin, tryptamin a tyramin v mléčných a masných výrobcích [8, 9].

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BAKTERIOCINY

Bakteriociny jsou antimikrobiální látky produkované bakteriemi, které zabíjejí nebo inhibují růst jiných bakterií, většinou blízce příbuzných rodů. Tvoří velkou a různorodou skupinu ribozomálně syntetizovaných bílkovin a peptidů, z nichž některé podléhají posttranslačním modifikacím [3, 10, 11].

Grampozitivní, gramnegativní bakterie i archea mohou produkovat jeden nebo více bakteriocinů a metabolické vedlejší produkty jako organické kyseliny, peroxid vodíku, diacetyl. Stávají se tak konkurenceschopnější v přežití a proliferaci, protože mohou odstranit konkurenční mikroorganismus ze své ekologické niky. Účinnost bakteriocinů je dána faktory prostředí – pH, teplotou, složením a strukturou potravin a mikroflórou [1, 2].

V roce 1925 objevil A. Gratia první bakteriocin produkovaný bakterií *Escherichia coli* a nazval ho kolicin. Termín bakteriocin použil v roce 1953 Jacob jako obecný termín pro vysoce specifické antibakteriální proteiny [1].

Často bývají bakteriociny zaměňovány s antibiotiky, což jsou sekundární metabolity bakterií a mikroskopických hub. Mají variabilní spektrum účinku, hostitelská buňka nemusí být imunní. Liší se způsobem účinku, kdy antibiotika zasahují do funkce cytoplazmatické membrány nebo do syntézy buněčné stěny, ale i bílkovin a nukleových kyselin, kdežto bakteriociny působí na buněčnou stěnu (inhibují její syntézu) a buněčnou membránu bakterií (narušují ji tvorbou pórů). Další rozdíl spočívá v mechanismu rezistence. Buňky se adaptují na bakteriociny změnou složení buněčné membrány, zatímco tolerance na antibiotika je obvykle geneticky přenosná. Antibiotika se používají hlavně ve zdravotnictví, mohou mít více vedlejších účinků, proto je snaha omezit jejich použití v potravinářském průmyslu. Bakteriociny by měly být na rozdíl od nich bezpečné a daly by se efektivně využít k regulaci růstu cílových patogenů v potravinách. Byly zkoumány hlavně bakteriociny bakterií mléčného kvašení a zatím jediným schváleným konzervantem ve více než 40 zemích je nisin [3, 12].

Bakteriociny vylučované grampozitivními bakteriemi se dělí do 4 skupin podle velikosti [11]:

Třída I (< 5 kDa)

Třída II (< 10 kDa)

Třída III (> 30 kDa)

Třída IV

1.1 Bakteriociny třídy I (lantibiotika)

Lantibiotika jsou malé, tepelně stálé, membránově aktivní peptidy, které v důsledku rozsáhlých posttranslačních modifikací obsahují neobvyklé aminokyseliny s thioetherovou skupinou jako lanthionin (Lan) a 3-methyl-lanthionin (Melan), včetně dehydratovaných aminokyselin serinu (Dha) a threoninu (Dhb) [10, 11]. Modifikované aminokyseliny s elektrofilními centry reagují se sousedními nukleofily - thioether Lan je vytvořen, když dvojná vazba v Dha je atakována thiolovou skupinou sousedního cysteinového zbytku, Melan vzniká v případě reakčního partnera Dhb. Díky přítomnosti těchto intramolekulárních můstků tvoří lantibiotika polycyklické struktury (obr. 1), které jsou považovány za nezbytné pro udržení rigidity peptidu, necitlivosti k proteolytické degradaci a odolnosti vůči tepelné inaktivaci [13].

Produkce lantibiotik zahrnuje syntézu prekurzoru, modifikační reakce, odstranění vedoucího peptidu proteázami, translokace peptidů, regulaci a zajištění imunity proti vlastnímu bakteriocinu [13].

1.1.1 Rozdělení lantibiotik

Lantibiotika mohou být rozdělena do 2 skupin na základě jejich struktury a funkce [13]:

- Lantibiotika typu A jsou protáhlé, kationtové peptidy s až 34 zbytky aminokyselin, které vykazují podobnost v uspořádání jejich Lan můstků. Způsobují narušení integrity membrány cílových organismů. Patří sem nisin, subtilin, epidermin a další.
- Lantibiotika typu B, zahrnující mersacidin, actagardin a další, jsou kulovité peptidy s až 19 zbytky a jejich působení spočívá v narušení funkce enzymu, například inhibice biosyntézy buněčné stěny.

Existuje 6 různých forem nisinu (A, B, C, D, E, Z), z nichž nisin A je nejaktivnější a od jeho přírodní varianty, nisinu Z, se liší pouze substitucí kyseliny asparagové za histidin [1].

Nisin jako první bakteriocin získal v USA status GRAS (všeobecně považovaný za bezpečný) a může se používat jako potravinářské aditivum (E234). Inhibuje mnoho grampozitivních bakterií, včetně většiny druhů bakterií mléčného kvašení, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* i sporulující bakterie rodu *Clostridium* a *Bacillus*. Spóry jsou citlivější než vegetativní buňky, přestože nisin je pouze sporstatický a musí být trvale přítomen pro inhibici spór. Tepelné poškození spór však zvyšuje jejich citlivost, proto je nisin účinný ve slabě kyselých a tepelně opracovaných potravinách. Přidává se do tavených sýrů, mléčných výrobků a konzervovaných potravin. Komerčně dostupnou formou nisinu je NisaplinTM s aktivní přísadou 2,5 % nisinu A a s převládající kuchyňskou solí a odtučněným sušeným mlékem [1, 2, 11].

Purifikovaný nisin byl testován z hlediska toxikologického účinku a bylo zjištěno, že je neškodný nebo velmi málo toxický. Výbor FAO/WHO doporučil maximální denní příjem 60 mg nisinu pro 70-kg člověka [1].

1.2 Bakteriociny třídy II

Bakteriociny třídy II jsou malé, tepelně stálé, membránově aktivní peptidy neobsahující lanthionin. Nejsou podrobeny posttranslačním modifikacím [10, 11]. Dělí se do 3 podskupin [11, 14]:

- IIa: Pediocinové se silným antilisteriovým účinkem. Zástupci pediocin PA-1, sakacin A, sakacin P, leucocin A, curvacin A.
- IIb: Dvoupeptidové vyžadující oba proteiny plně aktivní. Zástupci lactococcin G, lactococcin M, lactacin F.
- IIc: Ostatní (thiol- aktivní) peptidy, zástupcem je lactococcin B.

1.2.1 Podskupina IIa

Do této podskupiny patří malé nemodifikované peptidy s 37 až 48 aminokyselinami s kladným nábojem. Skládají se z velmi konzervativní hydrofilní N-terminální části nesoucí sekvenci -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val- a cysteiny vytvářející v N-terminální polovině peptidu disulfidický můstek a z hydrofobní nebo amfifilní C-terminální části. N-konec má podobu

β -skládaného listu, kdežto C-konec jednoho nebo dvou α -helixů, často končící strukturálně prodlouženým C-terminálním ocasem [3, 14].

Všechny jsou produkovány bakteriemi mléčného kvašení, *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp. a *Carnobacterium* spp [15].

Nejdříve jsou ribozomálně nasyntetizovány prekurzory, které nejsou biologicky aktivní a na N-konci mají prodloužení. Tato presekvence je proteolyticky odštěpena při exportu [14].

Mechanismus účinku bakteriocinů třídy IIa se podobá lantibiotikům typu A. Vyvolávají permeabilizaci cytoplazmatické membrány pravděpodobně tím, že vytvoří iontoselektivní póry a tím naruší protonmotivní sílu, čímž dochází k vyčerpání intracelulárního ATP [14].

I přes svou strukturální podobnost se jednotlivé bakteriociny třídy IIa liší svou antimikrobiální aktivitou a mají užší inhibiční spektrum účinku než například nisin. Všechny jsou primárně zaměřeny na kmeny rodu *Listeria*, ale inhibují i některé další grampozitivní bakterie [14, 15].

Tyto bakteriociny by mohly být využity v potravinářství jako konzervační látky v mase, sýru a salátu, zatím je vše v experimentální fázi. Některé bakteriociny by mohly poskytovat ochranu proti mikroorganismům způsobujícím kažení potravin během jejich skladování [14, 15].

1.3 Bakteriociny třídy III

Bakteriociny třídy III jsou velké termolabilní bílkoviny například helveticin J, helveticin V-1829, acidophilucin A, lactaciny A, B produkové rodem *Lactobacillus* [11].

1.4 Bakteriociny třídy IV

Bakteriociny třídy IV tvoří komplexy složené z bílkovinné a nebílkovinné části (lipidy, sacharidy), důležité pro činnost bakteriocinu. Zástupci této třídy jsou plantaricin S, leucocin S, lactocin 27, pediocin SJ-1 a další [11]. V současnosti se vědci domnívají, že tento typ bakteriocinu je artefakt kvůli kationtovým a hydrofobním vazbám, díky kterým vytváří komplex s dalšími makromolekulami. Například plantaricin S byl purifikován jako malý peptid [3].

1.5 Aplikace bakteriocinů v potravinářství

V současné době spotřebitelé mají stále větší obavy z možných nepříznivých účinků na zdraví kvůli přítomnosti chemických přídatných látek v potravinách. Roste poptávka po minimálně zpracovaných potravinách s dlouhou dobou trvanlivosti a bohatých na živiny a vitaminy. Výrobci se snaží předejít ekonomickým ztrátám v důsledku kažení potravin snížením nákladů na zpracování potravin a omezením přenosu patogenů prostřednictvím potravinového řetězce. Řešením by mohly být bakteriociny produkované bakteriemi mléčného kvašení [1, 2].

Bakteriociny bakterií mléčného kvašení nabízejí několik žádoucích vlastností pro konzervaci potravin [2]:

- Obecně považované za bezpečné látky
- Neaktivní a netoxické na eukaryotické buňky
- Jsou inaktivovány trávicími proteázami, mají tedy malý vliv na střevní mikroflóru
- Obvykle tolerantní k pH a teplotě
- Poměrně široké antimikrobiální spektrum
- Jejich genetické determinanty jsou obvykle plazmid-kódující, což usnadňuje genetické manipulace

Studie ukazují, že použití bakteriocinů pro konzervaci potravin může přinést několik výhod [2]:

- Prodloužená trvanlivost potravin
- Zvýšená ochrana před tepelným poškozením
- Snížení rizika přenosu patogenů
- Snížení použití chemických aditiv
- Zlepšení ekonomických ztrát v důsledku kažení potravin
- Lepší uchování živin a vitaminů i organoleptických vlastností potravin díky menšímu tepelnému ošetření
- Uvedení na trh „nových“ potravin (třeba méně kyselých, s nižším obsahem soli)

Postupy používané v aplikaci bakteriocinů jako biokonzervantů [1]:

- Očkování potravin bakteriemi mléčného kvašení, které produkují dané bakteriociny
- Přídavek čistých nebo částečně čistých bakteriocinů jako konzervačních látek

- Použití produktu již dříve zkvašeného bakteriemi produkujícími bakteriociny jako přísady při zpracování potravin

Existuje ovšem mnoho faktorů ovlivňující činnost bakteriocinů [2]:

- Podmínky zpracování a skladování
- pH potraviny, její struktura a složení
- Inaktivace potravinářských enzymů
- Interakce s potravinářskými aditivy/ přísadami
- Malá rozpustnost a nerovnoměrné rozložení v potravine
- Omezená stabilita během doby trvanlivosti
- Koncentrace a rozmanitost mikroorganismů
- Citlivost na bakteriociny
- Fyziologická fáze patogenů a jejich vývoje rezistence/ adaptability
- Ochrana patogenů například pomocí biofilmu, slizu
- Mikrobiální interakce v reálném systému potraviny

Biokonzervace masa, mléčných výrobků a mořských plodů se provádí hlavně kvůli možné přítomnosti patogenu *Listeria monocytogenes*, který je původcem vážných onemocnění. Jedná se o grampozitivní fakultativně anaerobní tyčinku, která je relativně odolná proti vysychání, roste v prostředí o pH 4,1-9,6 a teplotách 0-45 °C, ale je schopna růstu i při chladírenských teplotách. Byly provedeny mnohé studie za účelem kontroly této bakterie. Například při biokonzervaci masa nisin inhiboval *L. monocytogenes* účinněji v kombinaci s balením v modifikované atmosféře nebo za přítomnosti NaCl [1].

Kombinace bakteriocinu s dalšími antimikrobiálními faktory (jako NaCl, organické kyseliny, dusitany, fenolické látky, teplo či tlak) zvyšuje jeho účinek a šance na přežití patogenů výrazně klesá. Tím se v potravinářství rozšířila takzvaná „hurdle technology“ neboli bariérová technologie [1, 2].

2 PROTEKTIVNÍ KULTURY

Bakterie mléčného kvašení (BMK) tvoří heterogenní skupinu mikroorganismů, které fermentují různé živiny primárně na kyselinu mléčnou. Jedná se zejména o grampozitivní, fakultativně anaerobní a nesporulující bakterie, tolerantní ke kyselému prostředí [4, 16]. Obecně jsou mezofilní, ale mohou růst i při nižších (5 °C), či vyšších (45 °C) teplotách a většinou při pH 4-4,5, ale některé jsou aktivní i při pH 9,6, jiné zase při pH 3,2. Tato skupina bakterií je nutričně náročná, roste na nutričně bohatých půdách za optimálních podmínek. Pro svůj růst vyžaduje přidavek aminokyselin, peptidů, mastných kyselin nebo vitaminů [17, 18].

BMK se přirozeně vyskytují v mléce a mléčných výrobcích, mase, zelenině, obilovinách a dalších potravinách, kde může dojít ke kvašení. Tradičně je mnoho těchto bakterií využito jako startovacích kultur řízené fermentace v potravinách, kde přispívají k chuti, textuře a výživě. Protektivní bakterie mají status GRAS (obecně považované za bezpečné) [4].

Určité bakterie mléčného kvašení (laktobacily, streptokoky) a bifidobakterie, které se ale neřadí mezi BMK, najdeme i v gastrointestinálním traktu, v ústní a vaginální dutině člověka a dalších obratlovců. Jsou považovány za důležitou součást střevní mikroflóry, kde přispívají ke střevní integritě, vývoji imunitního systému a zamezení růstu patogenů. Vybrané druhy *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, méně i zástupci dalších rodů, se využívají jako probiotika, jež jsou definována jako živé mikroorganismy, které při podávání v přiměřeném množství poskytují zdravotní přínos pro hostitele, zejména v mléčných výrobcích a potravinových doplňcích [4].

Hlavní konečný produkt fermentace protektivních kultur, laktát, se používá jako konzervační, okyselovací a aromatická přísada při zpracování potravin, jako meziprodukt ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu a ve výrobě biologicky rozložitelných polylaktátových polymerů [19].

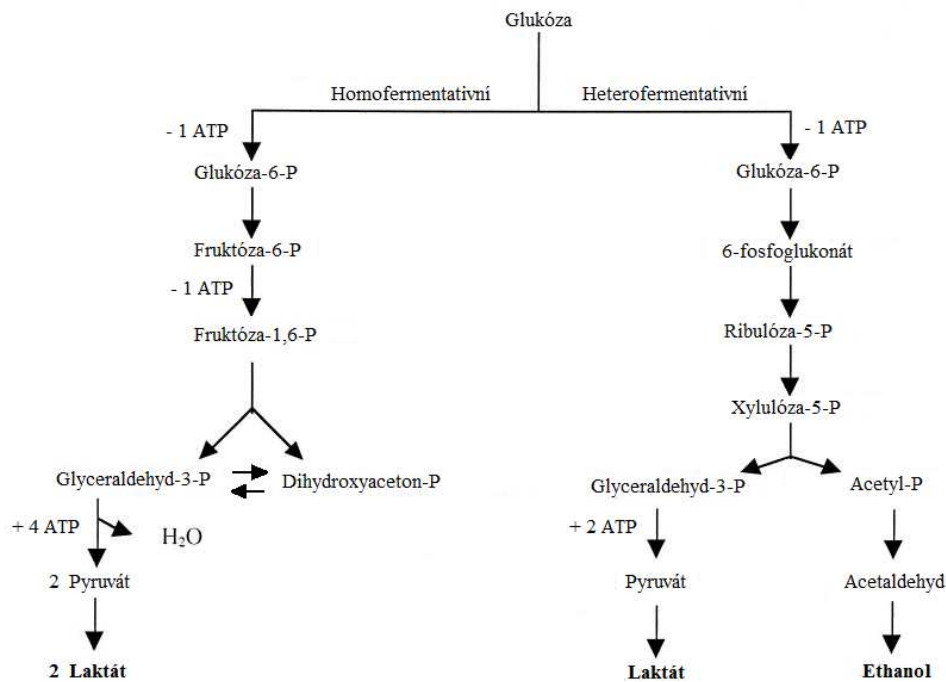
Mezi protektivní kultury patří hlavně rody *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella* a *Vagococcus* [19].

2.1 Metabolismus bakterií mléčného kvašení

2.1.1 Průběh fermentace

Fermentací se označuje anaerobní proces, při němž ze sacharidů a dalších látek vznikají zpravidla kyseliny, alkohol a oxid uhličitý. Transport cukrů do buněk je zprostředkován systémem permeáz či fosfoenolpyruvát-fosfotransferázami [17, 20].

Z hlediska biochemického se BMK dělí na homofermentativní a heterofermentativní. Homofermentativní bakterie produkují téměř výlučně kyselinu mléčnou, kdežto heterofermentativní navíc ještě ethanol, acetát, formiát, v závislosti na genetické výbavě druhu. Energetickým ziskem homofermentativních BMK jsou 2 moly ATP z jednoho molu glukózy, heterofermentativní získají jen 1 mol ATP (viz obr. 2) [21].



Obr. 2 Zjednodušené schéma fermentace glukózy [17, 21]

Mezi homofermentativní druhy, využívající Embden-Meyerhof-Parnasovu dráhu, se řadí *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* a některé laktobacily. Heterofermentativní *Leuconostoc*, *Oenococcus* a některé laktobacily katabolizují glukózu pomocí 6-fosfoglukonát/fosfoketolázové dráhy. Nicméně bakterie mléčného kvašení mají rozmanité metabolické schopnosti přizpůsobovat se různým podmínkám [17, 20].

2.1.2 Význam produktů metabolismu bakterií mléčného kvašení

Dalšími významnými metabolity bakterií mléčného kvašení, kromě laktátu a ostatních organických kyselin, jsou peroxid vodíku, oxid uhličitý, diacetyl, volné mastné kyseliny. Uplatňují se při biokonzervaci jako antimikrobiální látky [17, 22].

2.1.2.1 Organické kyseliny

Předpokládá se, že organické kyseliny působí na cytoplazmatickou membránu, kde zasahují do membránového potenciálu a inhibují aktivní transport. Octová kyselina inhibuje kvasinky, plísně a bakterie více než mléčná. Propionová kyselina se používá ke kontrole růstu plísní v siláži, obilí a potravinářských produktech, konkrétně v pekařských, kde při obsahu 0,1% chrání proti plísním při hodnotě pH nižší než 5 [17, 22].

2.1.2.2 Peroxid vodíku

Produkce bakteriálního peroxidu vodíku byla objevena Gunsalusem a Umbreithem v roce 1945 u bakterií *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *L. helveticus*. Laktobacily produkují více H_2O_2 než ostatní startovací kultury. Studie prokázaly, že *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* může inhibovat peroxidem vodíku *Pseudomonas fluorescens* při chladírenských teplotách. Peroxid vodíku působí svým silným oxidačním účinkem na membránové lipidy a proteiny. Nicméně z důvodu přítomnosti flavoproteinů a peroxidáz, které jej odbourávají, není jisté, zda se antibakteriální účinek H_2O_2 výrazněji nesnižuje [17, 22].

2.1.2.3 Oxid uhličitý

Produkt heterofermentativních bakterií, který tvorbou anaerobního prostředí může být toxický pro aerobní mikroorganismy. Je aktivní na buněčných membránách, kde snižuje vnější i vnitřní pH. V nižších koncentracích může být stimulantem růstu některých bakterií, zejména mikroaerofilních. Díky produkci CO_2 vznikají i typická oka v ementálu [17].

2.1.2.4 Diacetyl

Sloučenina spojená s charakteristickou chutí a vůní másla, která je účinnější proti gramnegativním bakteriím, kvasinkám a plísním [17]. Studie ukázaly, že antimikrobiální aktivitu diacetylu proti grampozitivním patogenům, jako *Staphylococcus aureus*, lze zvýšit tepelným opracováním. Rovněž v kombinaci s CO_2 v ochranné atmosféře může prodloužit dobu použitelnosti mletého hovězího masa [23].

2.2 Charakteristika jednotlivých rodů

2.2.1 *Lactococcus*

Nepohyblivé, obligátně homofermentační, fakultativně anaerobní koky se vyskytují nejčastěji v párech nebo krátkých řetězcích. Rostou při teplotách kolem 30 °C. Zejména *L. lactis* je jedna z nejdůležitějších bakterií mléčného kvašení používaná jako součást startovacích kultur ve většině tvrdých sýrů a v dalších mléčných výrobcích [18].

L. lactis je taky významným producentem bakteriocinů, nisinu, lacticinu 3147 a různých druhů lactococinů, aktivních proti mnoha grampozitivním bakteriím [1].

2.2.2 *Streptococcus*

Nepohyblivé, fakultativně anaerobní, obligátně homofermentativní koky tvoří rozmanitou skupinu, která obsahuje lidské a zvířecí patogeny, ústní a střevní symbionty a jediný druh, *S. thermophilus*, se využívá k výrobě fermentovaných potravin [18].

S. thermophilus se liší od laktokoků v mléčných výrobcích vyšším teplotním optimem (40-42 °C), roste i při teplotě 52 °C a toleruje teploty nad 60 °C. Ale je nutričně náročnější a méně tolerantní k soli a žluči. Produkuje bakteriocin thermophilin 13, který inhibuje růst některých grampozitivních bakterií [1, 18].

2.2.3 *Pediococcus*

Obligátně homofermentativní koky tvoří tetrády. Rostou při teplotách 25-40 °C. Některé kmeny dokážou růst i při 50 °C nebo v přítomnosti 6,5 % NaCl. Pediokoky lze nalézt v rostlinách, mléku, pivu. *Pediococcus acidilactici* a *P. pentosaceus* jsou přirozeně přítomné v syrové zelenině a za vhodných podmínek hrají klíčovou roli při výrobě kysaného zelí a ostatní fermentované zeleniny. Také se mohou přidávat jako startovací kultury do masa při výrobě fermentovaných masných výrobků [18].

P. acidilactici produkuje pediocin, který inhibuje patogeny spojené s potravinami, jako například *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* a *Clostridium botulinum*, a taky bakterie mléčného kvašení [1, 18].

2.2.4 *Lactobacillus*

Tento značně heterogenní rod je široce rozšířen v potravinách i v trávicím ústrojí člověka a živočichů. Většina druhů je mezofilních s optimem teplot 30-45 °C. Některé druhy jsou

tolerantní k přítomnosti soli, etanolu, žluči, k osmotickému tlaku nebo nízké vodní aktivitě [18].

Účastní se výroby různých fermentovaných produktů, například jogurtů *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou *L. helveticus*, masných výrobků *L. plantarum* nebo *L. sakei* subsp. *sakei* nebo fermentované zeleniny *L. plantarum* a *L. brevis*. *Lactobacillus casei* a *L. acidophilus* mají vlastnosti probiotik [18].

Mnoho kmenů produkuje bakteriociny, například *L. acidophilus* TK9201 acidocin A účinný proti *Listeria monocytogenes*, dále *L. plantarum* LL441 plantaricin C účinný proti *Staphylococcus carnosus*, *Bacillus* spp. a *Clostridium* spp. [1].

2.2.5 *Enterococcus*

Tyto koky rostou při 10 i 45 °C, do pH 9,6, i v přítomnosti 6,5 % NaCl. Jako non-startovací BMK mohou ovlivňovat chuť, vůni a texturu zrajících sýrů vyrobených ze syrového mléka. *E. faecalis* může být oportunním patogenem. Vyskytují se ve střevě člověka a zvířat a *E. faecium* a *E. faecalis* se používají jako probiotika nebo při konzervaci krmiv silážováním [18, 20].

Enterokoky jsou rovněž významnými producenty bakteriocinů. *E. faecium* produkuje enterocin A, patřící do třídy IIa, působící tedy proti *Listeria monocytogenes*, *L. innocua* a některým rodům BMK – laktobacilům, enterokokům a pediokokům. Mundticin, produkovaný *E. mundtii*, navíc zabraňuje vyklíčení spor a vegetativních buněk *Clostridium botulinum* [1].

2.2.6 *Tetragenococcus*

Homofermentativní koky jsou extrémně tolerantní k přítomnosti NaCl v prostředí (až 25 %). Rostou do pH 9,6 a k svému růstu přímo vyžadují přítomnost 3-10 % NaCl. Podobně jako pediokoky tvoří tetrády [18, 20].

2.2.7 *Oenococcus*

Obligátně heterofermentativní, mezofilní koky jsou tolerantní ke kyselému prostředí a etanolu (rostou i při přítomnosti 10 % etanolu). Díky těmto vlastnostem je *Oenococcus oeni* důležitý při výrobě vína při jablečno-mléčném kvašení, kdy dekarboxyluje kyselinu jablečnou na kyselinu mléčnou [18].

2.2.8 *Leuconostoc*

Obligátně heterofermentativní, mezofilní koky rostou nejlépe při teplotách 18-25 °C, někdy i pod 10 °C. Některé kmeny produkují exopolysacharidy ve formě slizu. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* a *L. lactis* se používají při výrobě mléčných výrobků, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. kimchii* a *L. fallax* při fermentaci rostlinných surovin [18].

L. mesenteroides Y105 produkuje mesentericin Y105, který je aktivní proti některým druhům enterokoků, laktobacilů, pediokoků, leukonostoků a listerií. Nepůsobí na laktokoky [1].

3 CHARAKTERISTIKA RODU *STAPHYLOCOCCUS*

Zástupci rodu *Staphylococcus* jsou fakultativně anaerobní grampozitivní koky, uspořádaný nejčastěji do tvarů podobajících se hroznům. Nepohybují se pomocí bičíků, nevytváří spory a jsou kataláza pozitivní [24].

Rostou v rozmezí teplot 10-45 °C a pH 4-9, optimálními hodnotami pro jejich růst jsou 30-37 °C při pH 7-7,5. Patří mezi halotolerantní bakterie, které mohou růst při nízké vodní aktivitě (přibližně 0,85). Všechny druhy rostou při 10 % NaCl, většina i při 15 % NaCl [25].

Stafylokoky se vyskytují všude v přírodě - ve vzduchu, prachu, vodě. Více než desítka druhů je součástí přirozené mikroflóry kůže a sliznic člověka a zvířat, některé z nich jsou patogenní, například u skotu mohou způsobovat mastitidu, u lidí jsou spojeny s bolestmi krku a nachlazením nebo mohou být příčinou hnisavých infekcí [24, 26].

Stafylokoky můžeme rozdělit do 2 skupin podle schopnosti produkovat koagulázu [24].

3.1 Koaguláza pozitivní stafylokoky

3.1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus se odlišuje od jiných, méně virulentních, kmenů právě schopností produkovat koagulázu, která se váže neenzymaticky na protrombin, a tvoří s ním komplex, který iniciuje polymerizaci fibrinu z rozpustného fibrinogenu. Proto při inkubaci tohoto stafylokoka v plazmě vznikají fibrinové sraženiny [24].

Obvykle zkvašuje manitol a v aerobním prostředí dokáže využívat širokou škálu hexóz, pentóz a cukerných alkoholů. Hlavními konečnými produkty metabolismu jsou kyselina mléčná a acetoin [27].

Oportunní patogen je celosvětově jednou z nejběžnějších příčin akutních hnisavých infekcí a dále otrav z jídla, tedy požitím vyprodukovaných enterotoxinů v potravině. První příznaky intoxikace (nevolnost, zvracení, křeče v břiše a průjem) se objevují obvykle po 2 až 4 hodinách po konzumaci kontaminovaného jídla. Enterotoxiny jsou poměrně stabilní proteiny, zachovávající si svou aktivitu po vaření, zmražení i působení žaludečních či střevních enzymů. Nejčastějšími zdroji nákazy jsou vepřové maso a masné výrobky, drůbež, lahůdkové saláty a krémové pekařské výrobky. Problém nastává hlavně v letních měsících, kdy výrobky nejsou dostatečně skladovány při chladírenských teplotách [24,26, 27].

3.2 Koaguláza negativní stafylokoky

Osídlují kůži a sliznice člověka, vyskytují se v potravinách, například fermentovaných masných výrobcích či v rybím mase. Jsou považovány za pozitivní mikroflóru ovlivňující organoleptické vlastnosti konečných produktů. *Staphylococcus carnosus* a *S. xylosus* se používají i jako startovací kultura v masném průmyslu. Podílí se na stabilizaci červené barvy tvorbou nitrosomyoglobinu a redukují dusičnany na dusitany, které mohou omezit oxidaci lipidů. Avšak jejich schopnost produkovat biogenní aminy je jistým rizikem, ve větším množství mohou vést k otravám [8, 24, 28, 29].

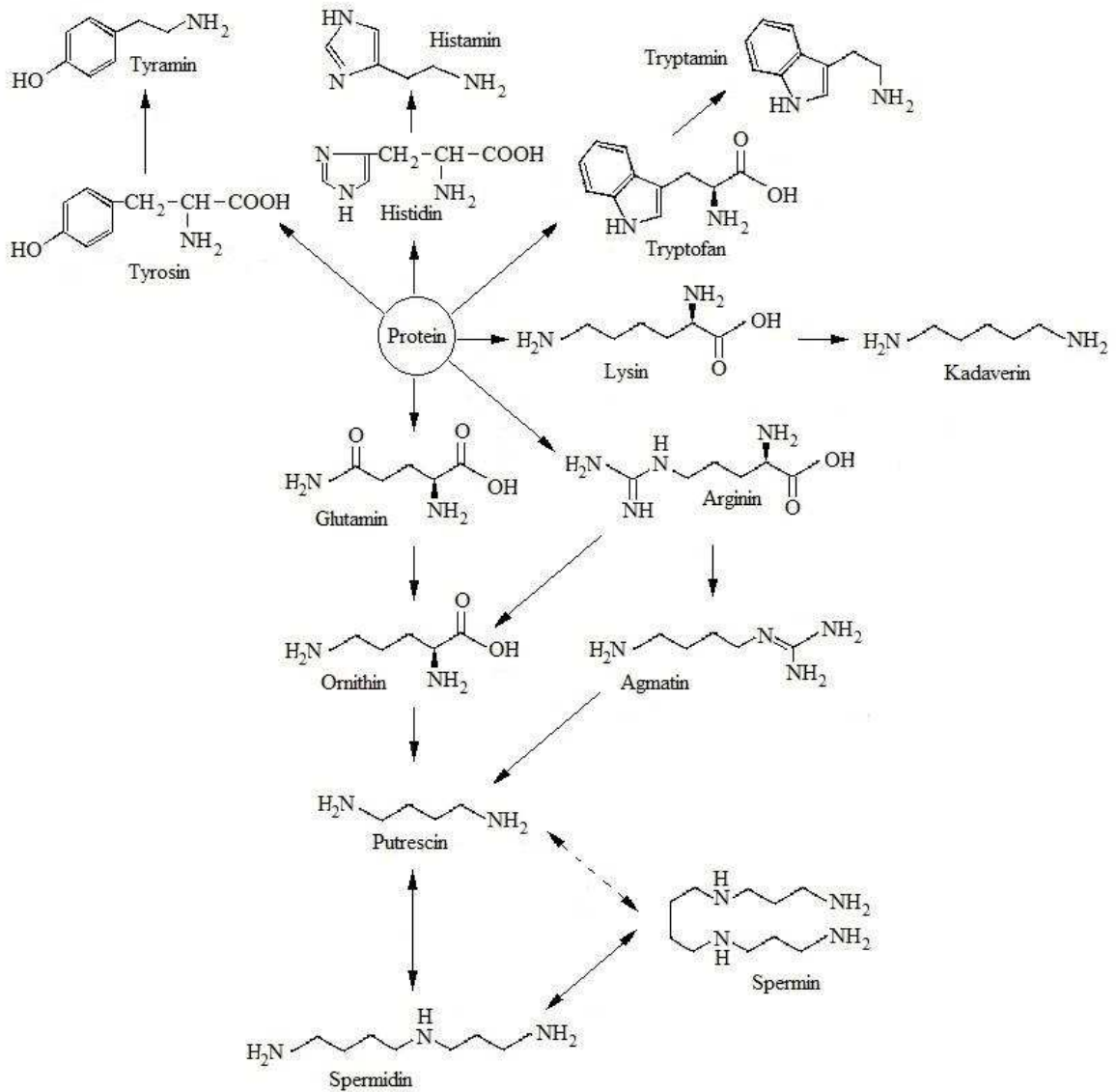
V poslední době kvůli jejich velkému počtu, všudypřítomnosti a rostoucímu využívání implantovaných katetrů a protetických pomůcek mohou také být koaguláza negativní stafylokoky významnými kontaminanty těchto umělých materiálů a příčinou infekcí. Dobře adherují na povrch, kde se množí, některé kmeny navíc produkují sliz, který zcela pokrývá bakterie a vytváří mechanickou ochranu proti obranným mechanismům hostitele a antimikrobiálním prostředkům. Infekce nejsou obecně vážné, pokud jsou kontrolovány, v opačném případě může dojít k poškození tkáně nebo až k úmrtí. Pro zvládnutí infekce bývá často nezbytné i odstranění infikovaného umělého materiálu [24].

Často jsou odolné vůči jednomu nebo více antibiotikům (hlavně vůči β -laktamovým antibiotikům, linkomycinu, tetracyklinu a erytromycinu) a mohou rozšiřovat rezistenci na antibiotika pomocí potravin [28, 30].

V klinických izolátech se běžně objevují *Staphylococcus epidermidis* a *S. saprophyticus*, dále *S. warneri* a *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. hominis*, přičemž první 4 druhy se řadí k oportunním patogenům. Ze sýrů a uzenin jsou nejčastěji izolovány *Staphylococcus carnosus*, *S. condimenti*, *S. equorum*, *S. piscifermentans*, *S. succinus* a *S. xylosus* [9, 28, 30].

4 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy jsou dusíkaté sloučeniny vznikající především dekarboxylací aminokyselin nebo transaminací a aminací aldehydů a ketonů. Tyto organické zásady o nízké molekulové hmotnosti jsou syntetizovány mikrobiálním, rostlinným i živočišným metabolismem. Obr. 3 znázorňuje vznik některých biogenních aminů [5, 6, 31].



Obr. 3 Metabolické dráhy pro tvorbu biogenních aminů [6]

Podle chemické struktury se mohou dělit na [31]:

- Alifatické: putrescin, kadaverin, spermin, spermidin
- Aromatické: tyramin, fenylethylamin

- Heterocyklické: histamin, tryptamin.

Někteří autoři řadí kadaverin, putrescin, spermin a spermidin mezi polyaminy [31].

4.1 Funkce biogenních aminů

Biogenní aminy jsou zdrojem dusíku a prekurzory pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů [31].

Několik biogenních aminů (serotonin, histamin a tyramin) hraje důležitou roli v mnoha lidských a živočišných fyziologických funkcích. V rostlinách se putrescin, spermidin a spermin podílejí na řadě fyziologických procesů, jako je buněčné dělení, vývoj květu a plodu, reakce na stres a stárnutí [6, 31].

Polyaminy jsou důležité pro růst, obnovu a metabolismus každého orgánu v těle. Podporují ale i růst nádorových buněk, a proto inhibice biosyntézy polyaminů u lidí s rakovinou je jedním z hlavních cílů výzkumu léčby rakoviny [31].

Biogenní aminy jsou potenciálními prekurzory karcinogenních N-nitrososloučenin, které vznikají reakcí aminů s nitrosačnými činidly (hlavně s dusitany) [31].

4.2 Biogenní aminy v potravinách

Biogenní aminy se vyskytují prakticky ve všech potravinách, které obsahují proteiny nebo volné aminokyseliny. Vznikají kvůli aktivitě endogenních dekarboxyláz v syrových potravinách nebo činností dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů. Vzhledem k tomu, že mikrobiální kažení potravin může být doprovázeno zvýšenou produkcí dekarboxyláz, přítomnost biogenních aminů může sloužit jako indikátor znehodnocení potravin, a to hlavně u nefermentovaných potravin [5, 6].

Biogenní aminy jsou přítomny ve fermentovaných potravinách (například v sýru převážně histamin, tyramin, kadaverin a putrescin, ve vínu převažuje histamin, tyramin, isofenylamin, β -fenylethylamin a putrescin, v kysaném zelí zejména putrescin) a v nesprávně uchovávaných surovinách, hlavně v makrelovitých a sled'ovitých rybách. Ty obsahují hodně volného histidinu, který může být mikroorganismy přeměněn na histamin, který není eliminován tepelným ošetřením, a proto se může vyskytovat i v konzervovaných produktech [6, 31].

Obvykle nepředstavují zdravotní riziko pro konzumenta, pokud nepožře velké množství aminů, či nemá potlačen přirozený mechanismus pro katabolismus aminů (nedostatečná

aktivita enzymů monoaminoxidáz a diaminoxidáz). K typickým symptomům podobajícím se alergické reakci patří nevolnost, pocení, bolesti hlavy, hyper- a hypotenze, průjem, svědění nebo kopřivka [6, 7].

Nejčastější intoxikace z potravin způsobené biogenními aminy zahrnují otravu histaminem, tzv. scombroid poisoning. Toto onemocnění je spojeno s konzumací makrelovitých ryb, jako jsou tuňák, makrela a sardinky. Dále je častý vysoký obsah tyraminu v sýrech [6].

4.2.1 Mikroorganismy produkující biogenní aminy

Tvorba velkého množství biogenních aminů závisí na několika faktorech [32]:

- na dostupnosti volných aminokyselin či krátkých peptidů, obsahujících tyto aminokyseliny, a kofaktorů (například pyridoxal-5'-fosfátu)
- na vhodných podmínkách prostředí (pH, teplota, atd.)
- na přítomnosti dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů.

Schopnost dekarboxylovat jednu nebo více aminokyselin má mnoho bakteriálních rodů, například *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Photobacterium* a z bakterií mléčného kvašení např. *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*. Aktivita dekarboxyláz je silnější v kyselém prostředí (pH 4-5,5), protože je součástí obranných mechanismů proti okyselení buňky [31].

4.2.1.1 Biogenní aminy produkované stafylokoky

Koaguláza negativní stafylokoky se často vyskytují v potravinách, hlavně ve fermentovaných masných a mléčných produktech, některé jsou i součástí startovacích kultur. Na druhou stranu mohou tvořit biogenní aminy. Zejména druhy *Staphylococcus carnosus*, *S. piscifermentans*, *S. equorum* a *S. xylosus* mohou tvořit kadaverin, 2-fenylethylamin, putrescin, tryptamin a tyramin. Touto sekundární metabolickou drahou si zajišťují dostatek metabolické energie a odolnost proti kyselému prostředí [8, 9].

Byly provedeny studie o produkci biogenních aminů stafylokoky v různých potravinách. Bylo zjištěno, že *S. carnosus* nebo *S. xylosus* tvoří biogenní aminy v uzeninách. V rybích produktech, jako jsou solené ančovičky, byly nalezeny biogenní aminy produkující druhy *S. epidermidis* a *S. capitis*, v tuňáku *S. hominis*. Z povrchu sýra byl izolován druh *S. epidermidis*, schopný produkovat biogenní aminy. Schopnost produkovat značné množství biogenních aminů se liší kmen od kmenu daného druhu [8].

4.2.2 Možnosti snížení obsahu biogenních aminů v potravinách

V posledních letech je pozornost zaměřena na možnosti zabránění tvorbě biogenních aminů v čerstvých a fermentovaných potravinách. Přítomnost dekarboxylujících mikroorganismů v surovinách může být snížena správnou výrobní praxí, nejúčinnější metodou je tepelné ošetření. Tuto technologii ale není možné vždy použít a také není zaručeno snížení obsahu biogenních aminů. Z toho vyplývá, že je důležité předcházet vzniku aminů a zavádět kontrolní opatření v dřívějších fázích zpracování potravin. Alternativou k tepelnému ošetření je použití ionizujícího záření nebo vysokého hydrostatického tlaku [32].

Použitím vhodných startovacích kultur s aminooxidázovou aktivitou se sníží obsah biogenních aminů ve fermentovaných produktech. *Kocuria varians* snižuje hladinu tyraminu v suchých salámech, *Brevibacterium linens* snižuje obsah histaminu a tyraminu během zrání sýrů, *Lactobacillus plantarum* je schopen potlačit růst bakterií *Leuconostoc mesenteroides* a *Pediococcus cerevisiae*, které jsou zodpovědné za tvorbu putrescinu a tyraminu během fermentace zelí. *Staphylococcus xylosus* degraduje histamin a tyramin například ve fermentovaných a solených ančovičkách a mohl by se používat jako startovací a ochranná kultura i v jiných fermentovaných rybích výrobcích [31, 33].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce je monitorování citlivosti dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Staphylococcus* vůči bakteriím mléčného kvašení, které produkují bakteriociny a další inhibiční látky.

Cílem teoretické části bylo:

- definovat bakteriociny a další inhibiční látky produkované mikroorganismy,
- popsat bakterie mléčného kvašení,
- charakterizovat rod *Staphylococcus* a jím produkované biogenní aminy v potravinách.

Cílem praktické části bylo:

- sledovat citlivost bakterií rodu *Staphylococcus* izolovaných z potravin a produkujících biogenní aminy vůči protektivním kulturám,
- zpracovat výsledky a na jejich základě formulovat závěry.

6 MATERIÁL, POMŮCKY A METODY

6.1 Použité mikroorganismy

V této práci byla sledována citlivost vybraných dekarboxyláza pozitivních kmenů stafylokoků vůči bakteriím mléčného kvašení produkujícím bakteriociny. Stafylokoky byly izolovány z potravin a jsou součástí sbírky mikroorganismů Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí FT UTB ve Zlíně, jejich přehled uvádí tabulka 1.

Tab. 1 Testované kmeny stafylokoků produkujících biogenní aminy

Označení kmene	rod	druh
B29	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>
B40	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>
B47	<i>Staphylococcus</i>	<i>succinus</i>
B77	<i>Staphylococcus</i>	<i>succinus</i>
B80	<i>Staphylococcus</i>	<i>succinus</i>
B81	<i>Staphylococcus</i>	<i>vitulinus</i>
B82	<i>Staphylococcus</i>	<i>vitulinus</i>
B89	<i>Staphylococcus</i>	<i>succinus</i>
B136	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>
B137	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>
B138	<i>Staphylococcus</i>	<i>hominis</i>
S1	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>
S2	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>
S3	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>
S4	<i>Staphylococcus</i>	<i>pasteuri</i>
S5	<i>Staphylococcus</i>	<i>hominis</i>
S6	<i>Staphylococcus</i>	<i>hominis</i>
S7	<i>Staphylococcus</i>	<i>hominis</i>
S8	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>
S9	<i>Staphylococcus</i>	<i>haemolyticus</i>
S10	<i>Staphylococcus</i>	<i>haemolyticus</i>
S11	<i>Staphylococcus</i>	<i>haemolyticus</i>
S12	<i>Staphylococcus</i>	<i>haemolyticus</i>
S13	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>
S14	<i>Staphylococcus</i>	<i>pasteuri</i>
S15	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>
S16	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>
S17	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>

Producenti inhibičních látek (bakterie mléčného kvašení) byly získány ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora® (CCDM). Jejich přehled uvádí tabulka 2, údaje uvedené v této tabulce byly získány od poskytovatele testovaných kmenů.

Tab. 2 Bakterie mléčného kvašení produkující inhibiční látky

Označení kmene	rod	druh	Produkce metabolitů
CCDM 945	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	
CCDM 79	<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	H ₂ O ₂ , acidocin D20079
CCDM 149	<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	Bakteriocin nebo bakteriocin podobné látky
CCDM 377	<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>	Protein s molekulovou hmotností >50kDa
CCDM 340	<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>	
CCDM 214	<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>	Bakteriocin nebo bakteriocin podobné látky
CCDM 215	<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>	Bakteriocin nebo bakteriocin podobné látky
CCDM 62	<i>Lactobacillus</i>	<i>helveticus</i>	
CCDM 82	<i>Lactobacillus</i>	<i>helveticus</i>	Bakteriocin nebo bakteriocin podobné látky
CCDM 125	<i>Lactobacillus</i>	<i>helveticus</i>	
CCDM 670	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	nisin
CCDM 686	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	nisin
CCDM 689	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	nisin
CCDM 695	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	nisin
CCDM 698	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	nisin
CCDM 731	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	nisin
CCDM 71	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	nisin
CCDM 414	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	nisin
CCDM 418	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	nisin
CCDM 416	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	nisin
CCDM 702	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	nisin
CCDM 671	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	nisin

Jako pozitivní kontrola byly použity kmeny laktobacilů, které produkují biogenní aminy a u kterých již dříve byla zjištěna citlivost k výše uvedeným kmenům s inhibičními účinky. Tyto kmeny byly získány z Výzkumného ústavu mlékárenského, pobočky v Táboře (kmeny označeny písmenem T) a ze Sbírký Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze (označeny písmenem P). Jejich přehled uvádí tabulka 3.

Tab. 3 Dekarboxyláza pozitivní laktobacily citlivé k bakteriím produkujícím inhibiční látky

Označení kmene	rod	druh
T2	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>
T3	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>
T8	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>
T15	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>
T37	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>
P16	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>
P20	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>
P33	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>
P89	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>
P94	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>
P96	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>
P98	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>

6.2 Kultivační média a roztoky

6.2.1 Příprava tekutých půd

Bylo naváženo dané množství média (HiMedia) a rozpuštěno v požadovaném objemu destilované vody. Následně bylo rozpuštěné médium nadávkováno po 5 ml do zkumavek, které byly poté sterilovány v autoklávu Varioklav při 121 °C po dobu 20 minut.

MPB (masopeptonový bujon)

Nutrient broth.....25 g

Destilovaná voda..... 1000 ml

M17 bujon

M17 broth42,5 g

Destilovaná voda..... 1000 ml

MRS (bujon dle de Man Rogosy a Sharpeho)

MRS broth.....52,2 g

Destilovaná voda..... 1000 ml

6.2.2 Příprava tuhých pŮd

Dané množství média a agaru bylo naváženo, rozpuštěno v určitém objemu destilované vody a sterilováno v autoklávu Varioklav při 121 °C po dobu 20 minut.

MHA (Müller-Hinton agar)

Müller-Hinton broth.....21 g

Živný agar č. 120 g

Destilovaná voda..... 1000 ml

MRS

MRS broth.....52,2 g

Živný agar č. 129 g

Destilovaná voda..... 1000 ml

6.2.3 Příprava fyziologického roztoku

Bylo naváženo 8,5 g NaCl a rozpuštěno v 1 litru destilované vody. Poté pomocí dávkovače byl fyziologický roztok rozplněn do zkumavek po 4,5 ml. Zkumavky s roztokem byly sterilovány v autoklávu Varioklav při 121 °C po dobu 20 minut.

6.3 Kultivace mikroorganismů

Testované bakterie byly kultivovány v příslušných pŮdách (viz Tab. 4) v termostatu Memmert.

Producenti inhibičních látek byli zaočkováni vždy 3 dny před samotným experimentem do příslušného tekutého média. Rod *Lactobacillus* byl kultivován v anaerobních podmínkách při 37 °C, kdežto rod *Lactococcus* aerobně při 30 °C a *Enterococcus* při 37 °C.

Dekarboxyláza pozitivní kmeny byly inokulovány 24 hodin před vlastním pokusem. Rod *Staphylococcus* byl kultivován aerobně v masopeptonovém bujonu při 37 °C, kontrolní laktobacily anaerobně při téže teplotě.

Všechny kultury byly uchovávány v lednici na Petriho miskách s vhodnými kultivačními půdami, dlouhodobě potom v mrazicím boxu při teplotě -18 °C v příslušných kultivačních půdách.

Tab. 4 Používaná živná média

Rod	Pipetovaný objem	Živná půda
<i>Lactobacillus</i>	150 µl	MRS (de Man, Rogosa and Sharpe, HiMedia, Indie)
<i>Lactococcus</i> , <i>Enterococcus</i>	150 µl	M17 (M17 Broth, HiMedia, Indie)
<i>Staphylococcus</i>	100 µl	MPB (Nutrient Broth, HiMedia, Indie) MHA (Müller Hinton Broth, HiMedia, Indie)

6.4 Ověření čistoty kultur

Čistota bakterií rodu *Staphylococcus* byla ověřena pomocí Gramova barvení.

Nejprve byly kultury inokulovány do zkumavek s masopeptonovým bujonem a kultivovány při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Poté byl proveden křížový roztěr na Petriho miskách s MPA (masopeptonový agar) či PCA (Plate count agar) a opět se nechaly kultivovat. Po dalších 24 hodinách byl asepticky připraven fixovaný preparát na podložním skle, který byl následně barven krystalovou violetí, Lugolovým roztokem, odbarvován acetonem a dobarven safraninem. Preparát byl mikroskopován pomocí imerzního objektivu. S kmeny, u nichž byly v preparátech nalezeny i jiné bakterie než grampozitivní koky, se dále nepracovalo.

6.5 Příprava supernatantu

Z narostlých protektivních kultur, produkujících bakteriociny, byl odstředěn supernatant při 10 000 otáčkách po dobu 15 minut při pokojové teplotě na centrifuze Rotanta 460R. Supernatant zbavený mikroorganizmů byl upraven na pH 6 pomocí 10% NaOH, aby se zamezilo vlivu kyselého prostředí na zkoumané stafylokoky a projevil se pouze účinek bakteriocinů [1].

6.6 Jamková difúzní metoda

Tato metoda využívá tuhých médií, ve kterých jsou zaočkovány zkoumané citlivé bakterie, a testované inhibiční látky, pipetované do jamek v agaru, difundují médiem a způsobují vznik inhibičních zón [34].

Nejprve byla připravena příslušná živná média, sterilizována v autoklávě Varioklav při 121 °C po dobu 20 minut. Mezitím byly nakultivované kultury stafylokoků a kontrolních laktobacilů naředěny pomocí automatické mikropipety ve zkumavkách desítkovým ředěním (4,5 ml sterilního fyziologického roztoku+ 0,5 ml kultury) na konečné hodnoty ředění 10^{-2} a 10^{-3} . Z takto připravených kultur bylo odpipetováno 1 ml suspenze buněk na Petriho misky, zalito vytemperovaným médiem (asi 40 °C) a opatrně krouživým pohybem zamícháno a necháno utuhnout [34]. Práce probíhala ve sterilním prostředí Biohazard boxu.

Po utužení agaru se na miskách vyhloubilo pomocí sterilního nástroje maximálně 7 jamek, do nichž bylo pipetováno 0,1 ml připraveného supernatantu (obsahujícího inhibiční látku/látky).

Stafylokoky na Petriho miskách na agaru Müller- Hinton byly kultivovány aerobně při 37 °C po dobu 24 hodin. Za anaerobních podmínek při téže teplotě byly rovněž kultivovány kontrolní laktobacily.

Po 24 hodinách inkubace byly odečteny výsledky. V případě vytvoření inhibiční zóny byl změřen její průměr [34].

6.7 Statistické vyhodnocení výsledků

Výsledky analýzy inhibičního působení protektivních (inhibičních) kultur na růst testovaných kmenů bakterií rodu *Staphylococcus* byly statisticky vyhodnoceny pomocí neparametrických testů, konkrétně Kruskal-Wallisova testu a Wilcoxonova testu na hladině významnosti 5 % ($P < 0,05$). Ke statistickému vyhodnocení výsledků byl použit software UNISTAT[®], verze 6.5.04 (Unistat, Ltd., Londýn, Velká Británie).

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem praktické části bylo sledování citlivosti dekarboxyláza pozitivních stafylokoků izolovaných z potravin vůči bakteriím mléčného kvašení, které produkují bakteriociny či jiné inhibiční látky (Tab. 2).

7.1 Výsledky monitoringu

Bylo pozorováno inhibiční působení celkem 22 kmenů bakterií mléčného kvašení na bakterie rodu *Staphylococcus* (28 kmenů) ve všech kombinacích, bylo tedy provedeno celkem 616 analýz. Zároveň byla vždy provedena pozitivní kontrola, která umožnila potvrdit, zda daný kmen, produkující bakteriocin, vykazuje inhibiční působení na testovaný dekarboxyláza pozitivní kmen rodu *Staphylococcus*. Kontrolními mikroorganismy byly kmeny z blízkce příbuzného rodu *Lactobacillus*, tedy rovněž bakterie mléčného kvašení, kde je větší pravděpodobnost inhibice než u ostatních grampozitivních bakterií [3]. Celkově bylo získáno 2076 hodnot pro statistické vyhodnocení.

Na jedné Petriho misce mohlo být testováno až 7 inhibičních kmenů najednou. Proto byly provedeny 4 série pokusů, kdy každá série byla opakována nejméně dvakrát.

Při vytvoření inhibiční zóny byl změřen její průměr, v němž byl zahrnut i průměr jamky, který činil 6,5 mm.

7.1.1 Experimenty s 1. sérií inhibičních kmenů

Jako první bylo zkoumáno inhibiční působení kmenů CCDM 670, CCDM 686, CCDM 689, CCDM 695, CCDM 698, CCDM 731 a CCDM 71, řadících se k druhu *Lactococcus lactis*, který produkuje nisin (Tab. 2). Jako kontrolní laktobacily byly použity T2, T3, T15, T37 (vše *L. curvatus*), P94, P96 (obojí *L. plantarum*) a P98 (*L. brevis*). V tabulce 5 jsou uvedeny průměry inhibičních zón u laktobacilů a některých stafylokoků z obou aplikovaných ředění.

Protože velikost zón nebyla výrazně odlišná u ředění 10^{-2} a 10^{-3} , byly statisticky vyhodnoceny pouze průměry zón u ředění 10^{-2} , kde byl hustší nárůst mikroorganismů, a proto se i zóny lépe odečítaly. Všechny výsledky z 1. série jsou shrnuty v tabulce 6. Různý počet výsledků u kontrolních laktobacilů je dán tím, že pro každý pokus nebyly použity všechny kmeny, ale byly obměňovány, a v některých případech byly špatně zaočkované a tím pádem nevyrostly.

Testované kmeny stafylokoků B29, B47, B77, B80, B81, B82, B89, B136, B137, S2, S3, S4, S5, S7, S9, S10, S11, S12, S13, S14, S15, S16 a S17 byly rezistentní vůči aplikovaným inhibičním kulturám. U ostatních kmenů stafylokoků byly zjištěny pouze velmi malé zóny, respektive náznaky zón (průměr inhibiční zóny pouze 7 mm, včetně 6,5 mm jamky), nelze tedy s jistotou tvrdit, že jsou citlivé na nisin produkovaný těmito bakteriemi mléčného kvašení.

Kompletní výsledky dokazují, že kontrolní laktobacily byly mnohem citlivější na nisin, produkovaný těmito 7 kmeny laktokoků, než zkoumané stafylokoky. Porovnáním kupříkladu inhibičního působení kmene CCDM 698 na kontrolní kmen T3 a stafylokoka S8, byly tyto rozdíly signifikantní ($P < 0,05$).

Tab. 5 Průměry inhibičních zón (v mm) u obou ředění výchozí kultury testované na citlivost k inhibičním látkám produkovaným první sérií protektivních kmenů

Inhibiční kmeny (CCDM)	Kmeny testované na citlivost k inhibičním látkám a jejich ředění											
	T2		T3		T15		T37		P94		P96	
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}
670	17	18	12	12	16	14	12	13	17	21	13	13
686	16	18	11	11	14	14	11	11	17	19	12	12
689	16	15	11	12	12	13	11	12	16	20	12	13
695	17	17	12	13	12	14	12	13	16	20	13	13
698	14	15	12	11	13	15	11	11	15	15	11	12
731	19	20	14	13	0	0	12	13	19	24	15	15
71	18	18	12	15	13	16	12	13	16	19	15	14
Inhibiční kmeny (CCDM)	Kmeny testované na citlivost k inhibičním látkám a jejich ředění											
	P98		S8		S6		S1		B40		B138	
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}
670	14	16	7	0	0	0	0	0	7	7	7	0
686	14	15	7	7	7	7	0	7	7	7	7	0
689	12	12	7	7	7	7	0	0	0	0	0	0
695	12	12	7	7	7	7	0	0	7	7	0	0
698	13	14	7	7	7	7	0	0	0	0	0	0
731	16	16	7	7	7	7	0	7	7	7	7	0
71	15	15	7	7	0	7	0	7	7	7	7	0

Tab. 6 Průměry inhibičních zón (v mm) při testování první série inhibičních kmenů

Testované kmeny ^a	Inhibiční kmeny (CCDM)						
	670	686	689	695	698	731	71
T2	16;14; 15;17 ^b	16;13; 15;16	14;14; 14;16	15;13; 14;17	15;13; 14;14	7;14; 16;19	17;16; 14;18
T3	15;12	14;11	14;11	15;12	15;12	10;14	19;12
T15	16	14	12	12	13	0	13
T37	22;16;12	19;16;11	18;15;11	18;15;12	17;15;11	17;12	22;16;12
P94	13;17	11;17	10;16	12;16	11;15	19;10	15;16
P96	15;18;13	13;17;12	11;15;12	11;15;13	11;15;11	14;18;15	17;17;15
P98	15;12;14	13;7;14	12;7;12	12;7;12	12;7;13	12;16;11	16;13;15
B29	0 ^c	0	0	0	0	0	0
B40	7 ^d	7	0	7	0	7	7
B47	0	0	0	0	0	0	0
B77	0	0	0	0	0	0	0
B80	0	0	0	0	0	0	0
B81	0	0	0	0	0	0	0
B82	0	0	0	0	0	0	0
B89	0	0	0	0	0	0	0
B136	0	0	0	0	0	0	0
B137	0	0	0	0	0	0	0
B138	7	7	0	0	0	7	7
S1	0	7	0	0	0	7	7
S2	0	0	0	0	0	0	0
S3	0	0	0	0	0	0	0
S4	0	0	0	0	0	0	0
S5	0	0	0	0	0	0	0
S6	0	7	7	7	7	7	0
S7	0	0	0	0	0	0	0
S8	7	7	7	7	7;7	7	7
S9	0	0	0	0	0	0	0
S10	0	0	0	0	0	0	0
S11	0	0	0	0	0	0	0
S12	0	0	0	0	0	0	0
S13	0	0	0	0	0	0	0
S14	0	0	0	0	0	0	0
S15	0	0	0	0	0	0	0
S16	0	0	0	0	0	0	0
S17	0	0	0	0	0	0	0

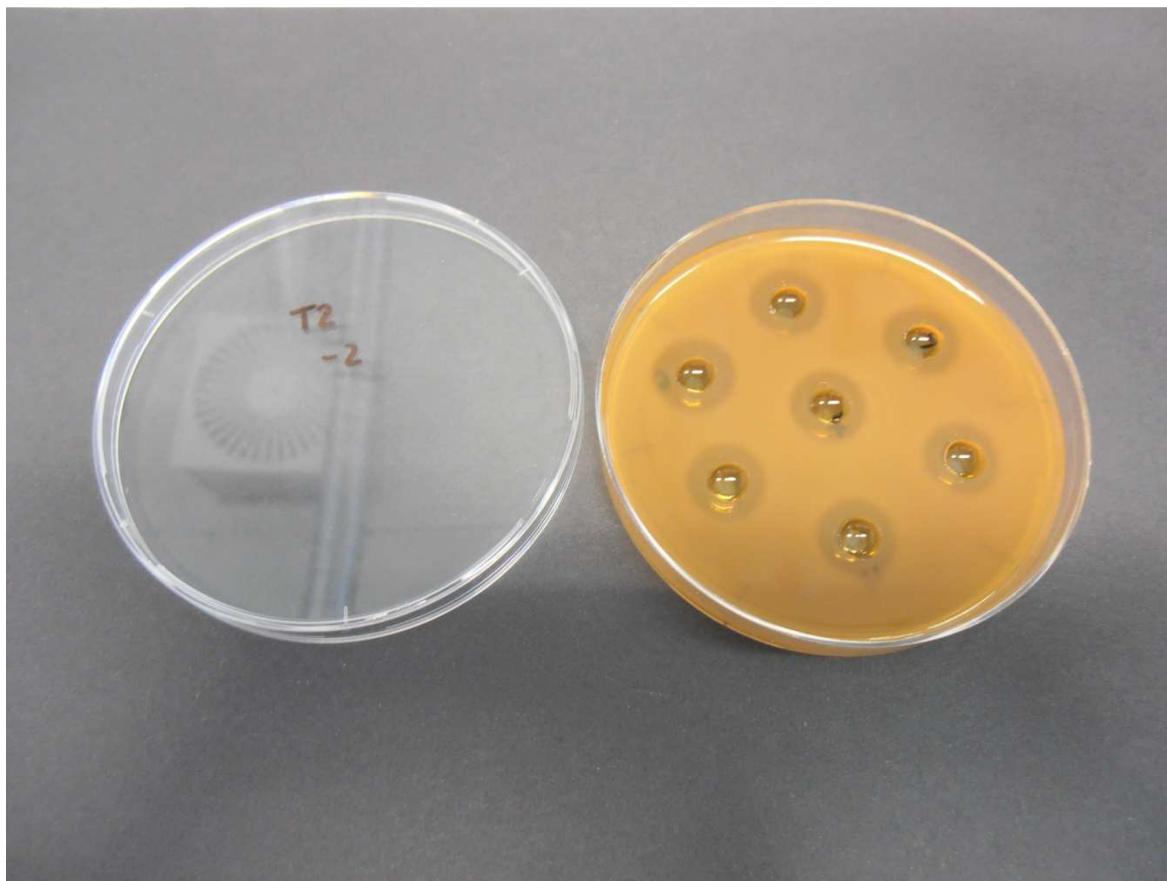
^aTestované kmeny označeny písmenem T a P jsou kontrolní laktobacily (Tab. 3), písmena B a S označují kmeny stafylokoků (Tab. 1).

^bPrůměry inhibičních zón jsou uvedeny včetně průměru jamky (6,5 mm).

^c0 – žádná inhibiční zóna

^d7 – minimální inhibiční účinky ve formě náznaků inhibičních zón

Na obrázku 4 lze vidět vytvoření inhibičních zón u všech testovaných supernatantů, obsahujících nisin, u kontrolního kmene *Lactobacillus curvatus* T2. Průměry vytvořených inhibičních zón u laktobacilů byly podobné. Například srovnáme-li inhibiční působení kmene CCDM 670 na kmeny T2 a T37, byly tyto rozdíly statisticky nevýznamné ($P \geq 0,05$). Ale v případě srovnání inhibičního působení kmene CCDM 71 na kmeny T15 a P94, byly rozdíly statisticky významné ($P < 0,05$).



Obr. 4 Inhibiční zóny u kontrolního kmene T2 (ředění 10^{-2})

7.1.2 Experimenty se 2. sérií inhibičních kmenů

V této sérii byla sledována citlivost dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů k inhibičním kmenům CCDM 414, CCDM 418, CCDM 416, CCDM 702, CCDM 671 (vše *Lactococcus lactis* produkující nisin), CCDM 945 (*Enterococcus faecium*) a CCDM 79 (*Lactobacillus acidophilus* produkující H_2O_2 a acidocin D20079). Jako pozitivní kontroly byly používány kmeny *Lactobacillus curvatus* T2, T3 a T8 a *Lactobacillus brevis* P16, P20 a P33 (Tab. 3).

Z kompletních výsledků uvedených v tabulce 8 lze vyčíst, že stafylokoky byly citlivější na tuto sérii inhibičních kmenů než na sérii předchozí. A to jak průměrem inhibičních zón (7-12 mm, v předchozí pouze 7 mm), tak i počtem citlivých kmenů (15 z celkových 28, v předešlé jen 5). Citlivost vykazovaly zejména na kmene CCDM 414 a CCDM 418 (Tab. 8).

V této sérii rovněž byly méně viditelné rozdíly mezi průměry inhibičních zón u laktobacilů (tj. kontrolních kmenů) a stafylokoků, než tomu bylo v sérii s předchozími inhibičními kmene. Například srovnáním inhibičního působení kmene CCDM 414 na kmene T2 a S9, které měly největší průměry zón ve své skupině, byly tyto rozdíly shledány jako statisticky nevýznamné ($P \geq 0,05$). Ovšem pokud bylo srovnáno inhibiční působení kmene CCDM 414 na kmene T2 a S7, byly rozdíly signifikantní ($P < 0,05$).

V tabulce 7 jsou uvedeny průměry inhibičních zón u laktobacilů a některých stafylokoků z obou aplikovaných ředění.

Kmen CCDM 416 nepůsobil inhibičně ani na kontrolní laktobacily. Ty vykazovaly rovněž velmi malou citlivost na působení kmenů CCDM 418 a CCDM 79. Rezistenci kontrolního mikroorganismu P20 ke kmenům CCDM 418 a CCDM 416 lze pozorovat i na obrázku 5.

Průměry inhibičních zón vytvořených v důsledku produkce inhibičních látek kmene CCDM 702, CCDM 671 a CCDM 945 u kontrolních laktobacilů byly celkem vyrovnané. Například srovnáním inhibičního působení CCDM 702 na kmen T2 s největším průměrem (12 a 22 mm) s kmenem P33 s nejmenším průměrem (10 a 13 mm) byly rozdíly zjištěny jako statisticky nevýznamné ($P \geq 0,05$). Kdežto u kmene CCDM 414 byly značné rozdíly v inhibičním působení. Porovnáním inhibičního působení tohoto kmene na kontrolní kmene P16 a P33 byly rozdíly statisticky významné ($P < 0,05$).

Kmene stafylokoků B29, B47, B77, B80, B81, B82, B89, B136, B137, S5, S10, S13 a S16 byly rezistentní vůči působení výše uvedených inhibičních kmenů. Z těchto výsledků lze vyvodit, že druh *S. succinus*, zastoupený kmene B47, B77, B80 a B89, byl zcela rezistentní k těmto 7 testovaným inhibičním kmenům BMK. To samé platilo i pro druh *S. vitulinus* (B81 a B82).

Naopak z výsledků lze vyčíst, že druh *S. pasteurii* (kmene S4 a S14) byl citlivý vůči působení inhibičních látek vyprodukovaných kmenem CCDM 414. Kmen *S. pasteurii* S4 vykazoval i náznak citlivosti k inhibičnímu kmenu CCDM 418. U ostatních druhů stafylokoků byly výsledky značně rozdílné. Například u druhu *S. haemolyticus* vykazovaly kmene S9 a

S12 citlivost ke kmenům CCDM 414, CCDM 418 a CCDM 945, kmen S11 byl citlivý pouze ke kmenům CCDM 414 a CCDM 418 a kmen S10 byl zcela rezistentní vůči testovaným protektivním kmenům (Tab. 8).



Obr. 5 Inhibiční působení kmenů CCDM 414, CCDM 702, CCDM 671 a CCDM 945 na kontrolní kmen P20 (ředění 10^{-2})

Tab. 8 Průměry inhibičních zón (v mm) při testování druhé série inhibičních kmenů

Testované kmeny ^a	Inhibiční kmeny (CCDM)						
	414	418	416	702	671	945	79
T2	15 ^b	0 ^c	0	12;22	14;21	11;12	10
T3	12	0	0	12;16	15;17	12;10	0
T8	11	0	0	10;15	13;14	11;10	0
P16	10;12;9	7 ^d	0	12;10;16	12;12;16	12;10;10	0
P20	10;10;10	0	0	13;10;15	13;12;16	12;10;10	0
P33	7	0	0	10;13	12;14	10	0
B29	0	0	0	0	0	0	0
B40	7;7	7;7	0	0	0	0	0
B47	0	0	0	0	0	0	0
B77	0	0	0	0	0	0	0
B80	0	0	0	0	0	0	0
B81	0	0	0	0	0	0	0
B82	0	0	0	0	0	0	0
B89	0	0	0	0	0	0	0
B136	0	0	0	0	0	0	0
B137	0	0	0	0	0	0	0
B138	7	7;7	0	0	0	0	0
S1	7	7	0	0	0	0	0
S2	0	7	0	0	0	0	0
S3	0	7	0	0	0	0	0
S4	7	7	0	0	0	0	0
S5	0	0	0	0	0	0	0
S6	7	7	0	0	0	0	0
S7	7;10	0	0	0	0	0	0
S8	7	7;7	0	0	0	0	0
S9	7;12	10	0	0	0	7	0
S10	0	0	0	0	0	0	0
S11	7	7	0	0	0	0	0
S12	7;11	10	0	0	0	7	0
S13	0	0	0	0	0	0	0
S14	7	0	0	0	0	0	0
S15	7	0	0	0	0	0	0
S16	0	0	0	0	0	0	0
S17	7;7	7	0	0	0	0	0

^aTestované kmeny označeny písmenem T a P jsou kontrolní laktobacily (Tab. 3), písmena B a S označují kmeny stafylokoků (Tab. 1).

^bPrůměry inhibičních zón jsou uvedeny včetně průměru jamky (6,5 mm).

^c0 – žádná inhibiční zóna

^d7 – minimální inhibiční účinky ve formě náznaků inhibičních zón

7.1.3 Experimenty se 3. a 4. sérií inhibičních kmenů

V těchto experimentech bylo testováno, zda posledních 8 inhibičních kmenů CCDM 149 (*Lactobacillus acidophilus*), CCDM 377, CCDM 340, CCDM 214, CCDM 215 (všechny 4 *L. gasseri*), CCDM 62, CCDM 82 a CCDM 125 (*L. helveticus*) působí negativně na dekarboxyláza pozitivní stafylokoky a kontrolní *Lactobacillus curvatus* T3 a *L. brevis* P89.

Produkty výše uvedených kmenů nepůsobily inhibičně na žádný z testovaných stafylokoků ani na kontrolní mikroorganismy.

7.2 Diskuze

V této bakalářské práci bylo analyzováno inhibiční působení 22 kmenů protektivních kultur na 28 kmenů stafylokoků produkujících biogenní aminy. Bylo provedeno 616 analýz pomocí jamkové difúzní metody. Rovněž bylo používáno dohromady 12 kmenů kontrolních laktobacilů k ověření účinnosti daného bakteriocinu a správnosti provedení analýzy. Celkově bylo získáno 2076 výsledků.

Bakterie mléčného kvašení by neměly mít nepříznivé účinky na zdraví konzumenta, proto slouží jako vhodný zdroj bakteriocinů v potravinářském průmyslu. Bakteriociny se obecně vyznačují úzkým specifickým účinkem proti kmenům stejných nebo blízce příbuzných druhů, proto byly použity laktobacily jako pozitivní kontrola, které se rovněž řadí mezi bakterie mléčného kvašení. Mnoho bakteriocinů je účinných i proti grampozitivním patogenům způsobující alimentární onemocnění, jako jsou například *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp. nebo *Clostridium* spp. [1].

Jak lze vyčíst z výsledků, na laktobacily působilo inhibičně 13 kmenů z 22, na některé stafylokoky až 10 inhibičních kmenů, ale ve většině případů se jednalo pouze o minimální inhibiční účinky ve formě náznaků inhibičních zón. Tudíž nelze jednoznačně říct, že testované koaguláza negativní dekarboxyláza pozitivní stafylokoky jsou citlivé na bakteriociny, resp. další inhibiční látky, produkované protektivními kulturami, a proto by tyto případné inhibiční účinky měly být více prozkoumány.

Dodnes bylo zveřejněno jen velmi málo studií týkajících se inhibice koaguláza negativních stafylokoků pomocí bakteriocinů produkovaných bakteriemi mléčného kvašení. Vědci se zaměřují zejména na inhibici významnějšího druhu, koaguláza pozitivního *Staphylococcus aureus*, způsobujícího alimentární intoxikaci a další onemocnění. Naopak byl však

zkoumán vliv bakteriocinů produkovaných stafylokoky, konkrétně druhy *S. epidermidis* a *S. aureus*, jak na koaguláza pozitivní, tak i negativní stafylokoky [35].

Protože mnohé stafylokoky mohou být multirezistentní na antibiotika a v důsledku toho se zvyšuje výskyt nosokomiálních infekcí, byla provedena studie, ve které bylo zkoumáno inhibiční působení 7 stafylokocinů na jiné stafylokoky. Bakteriociny epidermin, aureocin a Pep5 by se tak mohly stát možnou alternativou k léčbě meticilin rezistentních a dalších multirezistentních *Staphylococcus aureus* (MRSA). Koaguláza negativní stafylokoky, které jsou často původci nosokomiálních infekcí krve a implantovaných zdravotnických pomůcek, byly ve srovnání se *S. aureus* inhibovány v menší míře. Například 9 kmenů *S. haemolyticus* z celkových 17 vykazovalo odolnost proti všem zkoumaným bakteriocinům. Důvod této rezistence není znám. Bakteriocin Pep5 byl nejúčinnějším bakteriocinem proti koaguláza negativním stafylokokům (inhiboval 77% zkoumaných kmenů) [35].

Z výše uvedené studie vyplývá, že koaguláza pozitivní *Staphylococcus aureus* je citlivější na působení některých bakteriocinů než koaguláza negativní stafylokoky, kdy dokonce některé kmeny stejného druhu byly odolné proti všem testovaným bakteriocinům, jiné kmeny byly naopak citlivé. Mechanismus inhibičního působení dosud nebyl u těchto bakteriocinů spolehlivě popsán [35]. Ani v experimentech provedených v této bakalářské práci nebylo zjištěno, že by určitý druh koaguláza negativních stafylokoků byl výrazněji citlivý vůči testovaným bakteriocinům. Naopak, některé kmeny byly zcela rezistentní ke všem testovaným protektivním kmenům. Například *S. epidermidis* B40 a S8 byly citlivé vůči 7 až 9 bakteriocinům, kdežto kmeny B136 a B137 byly rezistentní ke všem testovaným bakteriocinům.

Inhibiční působení nisinu produkovaného *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* proti *Staphylococcus aureus* bylo zkoumáno mnohokrát. Například se ukázal účinný při výrobě tradičního sýra, kdy byl nisin přidán do syrového mléka před koagulací a následně inhiboval růst *S. aureus* v sýru. Navíc nisin nezpůsobil významné změny ve fyzikálně-chemických a mechanických vlastnostech sýra [36]. Dále byla pozorována redukce počtu *S. aureus* v mletém hovězím mase po aplikaci nisinu ve 2 rozdílných formách, přičemž roztok nisinu byl v tomto případě účinnější než enkapsulovaný nisin v alginátových kuličkách, díky kterým byl naopak chráněn před denaturací [37].

Byly provedeny i studie zkoumající vliv jiných bakteriocinů než nisinu na stafylokoky. Z čerstvého mléka byla izolována bakterie *Lactobacillus plantarum* ZJ008 produkující

bakteriocin plantaricin ZJ008, jehož inhibiční účinky byly testovány na grampozitivních i gramnegativních bakteriích jamkovou difúzní metodou, kdy hlavním předmětem zájmu studie bylo jeho působení na rod *Staphylococcus*. *Staphylococcus carnosus* a *S. citreus* vykazovaly největší citlivost vůči plantaricin ZJ008 (průměr inhibiční zóny 15-20 mm), *S. aureus* a *S. epidermidis* byly citlivé o něco méně (průměr inhibiční zóny 10-15 mm). Plantaricin ZJ008 byl účinný i proti gramnegativním bakteriím, zejména proti *Pseudomonas aeruginosa* [38].

Následující studie prověřovala účinky 3 bakteriocinů, nisinu A, lakticinu Q produkované *Lactococcus lactis* a nukacinu produkovaný *Staphylococcus warneri*, na kmeny meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* a kmeny *S. epidermidis*. Cílem bylo zjistit minimální inhibiční koncentraci. Na inhibici kmenů *S. aureus* byla potřeba 1,25 - 2,5 μM nisinu A, 5 μM lakticinu Q a 10-20 μM nukacinu, kdežto kmeny *S. epidermidis* byly citlivější na nisin A (1,25 μM), ale odolnější vůči lakticinu Q (více než 20 μM) a stejně k nukacinu (10-20 μM) [39].

Ve studii Hwanhlem a kol. [40] bylo izolováno 386 kmenů bakterií mléčného kvašení z mangovníkových lesů v jižním Thajsku. Pouze u 4 izolátů, identifikovaných jako *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Enterococcus faecalis*, byla zjištěna produkce bakteriocinům podobných inhibičních látek, jejichž účinky byly testovány pomocí jamkové difúzní metody. Všechny účinně inhibovaly růst bakterií *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lb. sakei* subsp. *sakei*, *Bacillus cereus*, *Brochothrix thermosphacta* a *Listeria monocytogenes*. Růst *Staphylococcus aureus* nebyl inhibován.

Mnohé studie se věnují inhibici podmíněně patogenní bakterie *Listeria monocytogenes*, pro kterou je charakteristický růst v chladírenských teplotách, v širokém rozsahu pH, při nízké vodní aktivitě i při vysokých koncentracích soli. Kontaminuje maso a masné výrobky a kvůli její odolnosti je složité ji kontrolovat v potravinách. A proto se vyvíjejí nové přístupy, jak kontrolovat patogeny v potravinách například pomocí bakteriocinů. Její odolnost vůči nízkému pH i vodní aktivitě byla potvrzena například studií Hampikyan a Ugur [41], v níž bylo zjištěno, že určité koncentrace nisinu (50 a 100 $\mu\text{g/g}$ fermentované uzeniny) výrazněji inhibují její růst.

Benkerroum a Sadine [42] zkoumali citlivost různých druhů listerií k nisinu a stanovovali minimální inhibiční koncentraci (MIC). Nejdříve pomocí jamkové difúzní metody zjistili, že všech 9 kmenů *Listeria* spp. je citlivých na nisin. Průměr inhibiční zóny 5 kmenů *Liste-*

ria monocytogenes byl 10-12 mm, kdežto kmen ATCC 7644 byl více citlivý (průměr zóny 18 mm). Podobně tomu bylo i u kmenů druhu *L. ivanovii*. I při stanovení MIC bylo potvrzeno, že kmen ATCC 7644 je nejcitlivější na nisin (740 UI/ml), naopak kmen V7 typ la byl nejvíce rezistentní (průměr zóny 10 mm) a MIC nisinu u něj byla stanovena až na $1,18 \cdot 10^5$ UI/ml.

Z uvedených studií vyplývá, že citlivost mikroorganismů k bakteriocinům je značně variabilní nejen v rámci rodu, ale i druhu. Kmeny téhož druhu bakterie reagují rozdílně na působení bakteriocinů. Rezistence může být způsobena změnou složení buněčné membrány, některé mutanty mohou produkovat enzym nisinázu, který degraduje nisin [3]. Účinnost bakteriocinů v potravinách je omezena úzkým spektrem aktivity, proto se používá tzv. bariérová technologie, kde se kombinuje antibakteriální účinek bakteriocinů s tepelným ošetřením, vysokým tlakem a jinými antimikrobiálními látkami [1]. Protože bakteriociny mohou hrát v budoucnu důležitou úlohu při zajištění zdravotní nezávadnosti potravin, měla by být tato problematika nadále zkoumána.

ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo monitorovat inhibiční působení 22 kmenů bakterií mléčného kvašení produkujících bakteriociny na 28 kmenů dekarboxyláza pozitivních stafylokoků.

Zjištěné výsledky lze shrnout do následujících bodů:

- 12 kmenů protektivních kultur (CCDM 416, CCDM 702, CCDM 671, CCDM 79, CCDM 149, CCDM 377, CCDM 340, CCDM 214, CCDM 215, CCDM 62, CCDM 82 a CCDM 125) neinhibovalo růst testovaných stafylokoků.
- Předchozí vyjmenované kmeny s výjimkou kmenů CCDM 702, CCDM 671 a CCDM 79 nepůsobily inhibičně ani na kontrolní laktobacily.
- Bylo testováno celkem 28 kmenů stafylokoků, z nichž 13 bylo rezistentních vůči všem testovaným bakteriím mléčného kvašení, a to přesně B29, B47, B77, B80, B81, B82, B89, B136, B137, S5, S10, S13 a S16.
- Dekarboxyláza pozitivní stafylokoky byly citlivé vůči působení 9 kmenů druhu *Lactococcus lactis*, produkujících nisin, a 1 kmene bakterie *Enterococcus faecium*.
- Testované stafylokoky (celkem 28 kmenů) se řadily k 7 druhům, z nichž druhy *S. succinus* a *S. vitulinus* byly zcela rezistentní, kdežto kmeny druhu *S. pasteurii* byly citlivé na působení kmene CCDM 414.
- Pouze kmen *S. hominis* S7 a kmeny *S. haemolyticus* S9 a S12 měly průměr inhibiční zóny větší než 7 mm a to při působení kmene CCDM 414 (10-12 mm) a kmene CCDM 418 (10 mm).

Obecně lze říct, že dekarboxyláza pozitivní stafylokoky byly spíše rezistentní vůči testovaným protektivním kulturám, protože u stafylokoků nebyly pozorovány tak významné inhibiční zóny jak u kontrolních laktobacilů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] CHEN, H. a D. G. HOOVER. Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2003, vol. 2, s. 82-100
- [2] GÁLVEZ, Antonio, Hikmate ABRIOUEL, Rosario Lucas LÓPEZ a Nabil Ben OMAR. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, vol. 120, issue 1-2, s. 51-70. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001.
- [3] CLEVELAND, Jennifer, Thomas J. MONTVILLE, Ingolf F. NES a Michael L. CHIKINDAS. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 71, s. 1-20.
- [4] KLAENHAMMER, T. R., R. BARRANGOU, B. L. BUCK, M. A. AZCARATE-PERIL a E. ALTERMANN. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, vol. 29, issue 3, s. 393-409. DOI: 10.1016/j.femsre.2005.04.007.
- [5] SANTOS, M. H. Silla. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, vol. 29, s. 213-231.
- [6] HALÁSZ, Anna, Agnes BARÁTH, Livia SIMON-SARKADI a Wilhelm HOLZAPFEL. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*. 1994, vol. 5, s. 42-49.
- [7] MAINTZ, Laura a Natalija NOVAK. Histamine a histamine intolerance. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2007, vol. 85, s. 1185-1196.
- [8] COTON, E., N. MULDER, M. COTON, S. POCHET, H. TRIP a J. S. LOLKEMA. Origin of the Putrescine-Producing Ability of the Coagulase-Negative Bacterium *Staphylococcus epidermidis* 2015B. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2010-08-04, vol. 76, issue 16, s. 5570-5576 [cit. 2015-01-30]. DOI: 10.1128/AEM.00441-10. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.00441-10>
- [9] SEITTER (NÉE RESCH), Marion, Bettina GENG a Christian HERTEL. Binding to extracellular matrix proteins and formation of biogenic amines by food-associated coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2011-02-28, vol. 145, 2-3, s. 483-487 [cit. 2015-02-04].

- DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.026. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816051100033X>
- [10] RODRÍGUEZ, J. M., M. I. MARTÍNEZ, N. HORN, H. M. DODD. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, vol. 80, s. 101-116.
- [11] KLAENHAMMER, Todd R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Federation of European Microbiological Societies*. 1993, vol. 12, s. 39-86
- [12] BUŇKOVÁ, Leona a Magda DOLEŽALOVÁ. *Obecná mikrobiologie*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007, 190 s. ISBN 978-80-7318-516-9
- [13] McAULIFFE, Olivia, R. Paul ROSS, Colin HILL. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *Federation of European Microbiological Societies*. 2001, vol. 25, s. 285-308
- [14] DRIDER, D., G. FIMLAND, Y. HECHARD, L. M. MCMULLEN a H. PREVOST. The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2006, vol. 70, issue 2, s. 564-582. DOI: 10.1128/MMBR.00016-05
- [15] ENNAHAR, Saïd, Toshihiro SASHIHARA, Kenji SONOMOTO, Ayaaki ISHIZAKI. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*. 2000, vol. 24, s. 85-106
- [16] SCHROETER, Joel a Todd KLAENHAMMER. Genomics of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2009, vol. 292, issue 1, s. 1-6. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01442.x.
- [17] CAPLICE, Elizabeth a Gerald F. FITZGERALD. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, vol. 50, s. 131-149
- [18] HUTKINS, Robert W. *Microbiology and technology of fermented foods*. 1st ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2006, xi, 473 p. ISBN 978-081-3800-189.
- [19] LIU, S.-Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 2003-06-15, vol. 83, issue 2, s. 115-131. DOI: 10.1016/S0168-1605(02)00366-5

- [20] SALMINEN, Seppo, Atte von WRIGHT a Arthur OUWEHAND. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. 3rd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, c2004, 633 p. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 139. ISBN 08-247-5332-1.
- [21] PESSIONE, Alessandro, Cristina LAMBERTI a Enrica PESSIONE. Proteomics as a tool for studying energy metabolism in lactic acid bacteria. *Molecular BioSystems*. 2010, vol. 6, issue 8, s. 1419-1430. DOI: 10.1039/c001948h
- [22] VANDENBERGH, Peter A. Lactic acid bacteria, their metabolite products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993, vol. 12, s. 221-238
- [23] LANCIOTTI, R., F. PATRIGNANI, F. BAGNOLINI, M. E. GUERZONI a F. GARDINI. Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology*. 2003, vol. 20, issue 5, s. 537-543. DOI: 10.1016/S0740-0020(02)00159-4.
- [24] RYAN, K. J., RAY, C. G., SHERRIS, J. C. *Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases* (4th edition). New York: McGraw-Hill, 2004, 979 p. ISBN 08-385-8529-9.
- [25] WILSON, Michael. *Bacteriology of humans: an ecological perspective*. Malden, MA: Blackwell Pub., 2008, x, 351 p. ISBN 14-051-6165-5.
- [26] RIEMANN, Hans. *Foodborne infections and intoxications*. 3rd ed. Boston, MA: Elsevier, 2006, p. cm. ISBN 978-012-5883-658.
- [27] LUND, Barbara M., Tony C. BAIRD-PARKER a G. GOULD. *The microbiological safety and quality of food*. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers, 2000, 2 v. ISBN 08-342-1323-0.
- [28] EVEN, Sergine, Sabine LEROY, Cathy CHARLIER, Nouri Ben ZAKOUR, Jean-Paul CHACORNAC, Isabelle LEBERT, Emmanuel JAMET, Marie-Hélène DESMONTS, Emmanuel COTON a Sylvie POCHET. Low occurrence of safety hazards in coagulase negative staphylococci isolated from fermented foodstuffs. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2010-04-30, vol. 139, 1-2, s. 87-95 [cit. 2015-01-30]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.019. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160510001005>

- [29] LANDETA, G., J. A. CURIEL, A. V. CARRASCOSA, R. MUÑOZ a B. DE LAS RIVAS. Characterization of coagulase- negative staphylococci isolated from Spanish dry cured meat products. *Meat Science* [online]. 2013, vol. 93, issue 3, s. 387-396 [cit. 2015-01-30]. DOI: 10.1016/j.meatsci.2012.09.019. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174012003397>
- [30] SEITTER (NEÉ RESCH), Marion, Christiane NERZ, Ralf ROSENSTEIN, Friedrich GÖTZ a Christian HERTEL. DNA microarray based detection of genes involved in safety and technologically relevant properties of food associated coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2011-02-28, vol. 145, 2-3, s. 449-458 [cit. 2015-02-05]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160511000286>
- [31] KAROVIČOVÁ, J. a Z. KOHAJDOVÁ. Biogenic Amines in Food. *Chem. Pap.* 2005, vol. 59, issue 1, s. 70-79.
- [32] ROIG-SAGUÉS, Artur X., Claudia RUIZ-CAPILLAS, Diana ESPINOSA a Manuela HERNÁNDEZ. *The decarboxylating bacteria present in foodstuffs and the effect of emerging technologies on their formation*. Transworld Research Network, 2009, s. 201-230. ISBN 978-81-7895-249-9.
- [33] MAH, Jae-Hyung a Han-Joon HWANG. Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosum* as a protective culture. *Food Control* [online]. 2009, vol. 20, issue 9, s. 796-801 [cit. 2015-02-06]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.10.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713508002843>
- [34] JANDOVÁ, Božena a Ludmila KOTOUČKOVÁ. *Praktikum z mikrobiologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 1996, 67 s. ISBN 8021013745.
- [35] NASCIMENTO, J. S., H. CEOTTO, S. B. NASCIMENTO, M. GIAMBIAGI-DEMARVAL, K. R. N. SANTOS a M. C. F. BASTOS. Bacteriocins as alternative agents for control of multiresistant staphylococcal strains. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2006, vol. 42, issue 3, s. 215-221 [cit. 2015-03-22]. DOI: 10.1111/j.1472-765x.2005.01832.x.
- [36] PINTO, Maximiliano Soares, Antônio Fernandes de CARVALHO, Ana Clarissa dos Santos PIRES, Ariana Aparecida Campos SOUZA, Paulo Henrique Fonseca

- da SILVA, Denise SOBRAL, Junio César Jacinto de PAULA a Adbeel de Lima SANTOS. The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physico-chemical properties of Traditional Minas Serro cheese. *International Dairy Journal* [online]. 2011, vol. 21, issue 2, s. 90-96 [cit. 2015-03-22]. DOI: 10.1016/j.idairyj.2010.08.001.
- [37] MILLETTE, M., C. Le TIEN, W. SMORAGIEWICZ a Monique LACROIX. Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. *Food Control* [online]. 2007, vol. 18, issue 7, s. 878-884 [cit. 2015-03-22]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2006.05.003.
- [38] ZHU, Xuan, Yizhen ZHAO, Yalian SUN a Qing GU. Purification and characterization of plantaricin ZJ008, a novel bacteriocin against *Staphylococcus* spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ008. *Food Chemistry* [online]. 2014, vol. 165, s. 216-223 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.05.034.
- [39] OKUDA, Ken-ichi, Takeshi ZENDO, Shinya SUGIMOTO, Tadayuki IWASE, Akiko TAJIMA, Satomi YAMADA, Kenji SONOMOTO a Yoshimitsu MIZUNOEA. Effects of Bacteriocins on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. [online]. 2013, vol. 57, s. 5572-5579 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1128/AAC.00888-13
- [40] HWANHLEM, Noraphat, Jean-Marc CHOBERT a Aran H-KITTIKUN. Bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from mangrove forests in southern Thailand as potential bio-control agents in food: Isolation, screening and optimization. *Food Control* [online]. 2014, vol. 41, s. 202-211 [cit. 2015-03-29]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.01.021.
- [41] HAMPKIYAN, Hamparsun a Muammer UGUR. The effect of nisin on *L. monocytogenes* in Turkish fermented sausages (sucuks). *Meat Science* [online]. 2007, vol. 76, issue 2, s. 327-332 [cit. 2015-04-07]. DOI: 10.1016/j.meatsci.2006.11.014.
- [42] BENKERROUM, Noredine a William E. SANDINE. Inhibitory Action of Nisin Against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science* [online]. 1988, vol. 71, issue 12, s. 3237-3245 [cit. 2015-04-07]. DOI: 10.3168/jds.s0022-0302(88)79929-4.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BMK	Bakterie mléčného kvašení
MPB	Masopeptonový bujón
MPA	Masopeptonový agar
MRS	De Man Rogosa Sharpe Agar
MHA	Müller-Hinton Agar
PCA	Plate Count Agar
M17	M17 Broth
Lan	Lanthionin
MeLan	3-methylanthionin
Dha	2,3-didehydroalanin
Dhb	2,3-didehydrobutyrin
GRAS	Generally Recognized As Safe (Všeobecně považované za bezpečné)
ATP	Adenozintrifosfát
CCDM	Czech Collection of Dairy Microorganisms (Sbírka mlékařských mikroorganismů)
FT	Fakulta technologická
UTB	Univerzita Tomáše Bati
MRSA	Meticilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MIC	Minimální inhibiční koncentrace

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1</i> Struktura lantibiotik typu A a B [13]	14
<i>Obr. 2</i> Zjednodušené schéma fermentace glukózy [17, 21]	20
<i>Obr. 3</i> Metabolické dráhy pro tvorbu biogenních aminů [6]	27
<i>Obr. 4</i> Inhibiční zóny u kontrolního kmene T2 (ředění 10^{-2})	42
<i>Obr. 5</i> Inhibiční působení kmenů CCDM 414, CCDM 702, CCDM 671 a CCDM 945 na kontrolní kmen P20 (ředění 10^{-2})	44

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1 Testované kmeny stafylokoků produkujících biogenní aminy.....</i>	<i>33</i>
<i>Tab. 2 Bakterie mléčného kvašení produkující inhibiční látky.....</i>	<i>34</i>
<i>Tab. 3 Dekarboxyláza pozitivní laktobacily citlivé k bakteriím produkujícím inhibiční látky</i>	<i>35</i>
<i>Tab. 4 Používaná živná média</i>	<i>37</i>
<i>Tab. 5 Průměry inhibičních zón (v mm) u obou ředění výchozí kultury testované na citlivost k inhibičním látkám produkovaným první sérií protektivních kmenů.....</i>	<i>40</i>
<i>Tab. 6 Průměry inhibičních zón (v mm) při testování první série inhibičních kmenů.....</i>	<i>41</i>
<i>Tab. 7 Průměry inhibičních zón (v mm) u obou ředění výchozí kultury testované na citlivost k inhibičním látkám produkovaným druhou sérií protektivních kmenů.....</i>	<i>45</i>
<i>Tab. 8 Průměry inhibičních zón (v mm) při testování druhé série inhibičních kmenů.....</i>	<i>46</i>