

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality zemědělských produktů**



**Možnosti využití ochranných kultur při zpracování masa**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Lucie Palová**

**Vedoucí práce: Ing. Ludmila Prokúpková, Ph.D.**

© 2013 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci na téma: ***Možnosti využití ochranných kultur při zpracování masa*** vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne: 9. 4. 2013

Podpis autora práce: \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Ludmile Prokůpkové, Ph.D., za vedení a odbornou spolupráci, za poskytnutou literaturu a vstřícný přístup v průběhu vypracování této bakalářské práce. Ráda bych tímto vyjádřila díky i své rodině za její podporu po dobu celého studia.

# **Možnosti využití ochranných kultur při zpracování masa**

---

## **Possibilities of using protective cultures for meat processing**

### **SOUHRN**

Tato bakalářská práce je literární rešerší zabývající se alternativními konzervárenskými přísadami do masa a masných výrobků. Zabývá se možnostmi využití ochranných kultur (buď přirozeně přítomných, anebo přidaných) jako zdroje antimikrobiálních látek. Práce popisuje jednotlivé interakce mezi žádoucími a nežádoucími bakteriemi, jejich vliv na prostředí - a to jak negativní, tak pozitivní. Dále je zde popsána vlastní syntéza antimikrobiálních látek, takzvaných bakteriocinů, v buňkách bakterií, mechanismus jejich působení na cílený organismus a výsledný projev působení těchto látek. Závěrem je zde uvedena legislativa, která se přímo týká používání přídatných konzervačních látek mikrobiálního původu a v neposlední řadě i poznatky, které souvisí s možným rozšířením řady těchto „přírodních“ konzervačních látek o další, prozatím neschválená aditiva.

**Klíčová slova:** Maso, antimikrobiální látky, bakteriociny, konzervace, fermentace

## **SUMMARY**

This literature review dealing with alternative protective ingredients in meat products and minimize chemical protective ingredients. These are discussed here on the use of protective cultures as a source of antimicrobial agents. They are in the flesh either naturally present or artificially added. The work describes the interaction between the desirable and undesirable bacteria, their impact on the environment, both negative and positive. The synthesis of antimicrobial compounds in bacterial cells, so-called bacteriocins and their mechanism of action on the target organism and the resulting manifestation of action of these substances are also described here. Finally, legislation is discussed here. It is directly related to the use of preservative additives of microbial origin. It is also knowledge here about the possible extension of the range of these "natural" preservatives for more, yet unapproved additives.

**Keywords:** Meat, antimicrobials, bacteriocins, preservation, fermentation

# 1 Obsah

1	Obsah .....	6
2	Úvod .....	7
3	Cíl práce.....	8
4	Literární rešerše .....	9
4.1	Mikrobiologie potravin.....	9
4.1.1	Kontaminující bakterie.....	9
4.2	Mikrobiologie masa.....	10
4.2.1	Bakterie mléčného kvašení .....	11
4.3	Bakteriociny.....	16
4.3.1	Klasifikace bakteriocinů produkovaných bakteriemi mléčného kvašení..	17
4.3.2	Mechanismus působení bakteriocinů.....	18
4.3.3	Syntéza bakteriocinů a jejich transport přes buněčnou membránu .....	19
4.3.4	Použití a účinek bakteriocinů ve výrobě .....	20
4.3.5	Příklady bakteriocinů a jejich účinky.....	21
4.3.6	Bakteriociny x antibiotika .....	26
4.3.7	Využití bakteriocinů jako součásti překážkového efektu .....	27
4.4	Nevýhody či komplikace využití ochranných kultur.....	29
4.5	Metody konzervace a s tím spojená mikrobiální činnost .....	29
4.5.1	Vakuově balené maso .....	29
4.5.2	Solené masné produkty .....	30
4.5.3	Fermentované masné produkty .....	30
4.6	Legislativa přídatných látek.....	35
4.6.1	Mezinárodní normy .....	35
4.6.2	Právní rámec EU a ČR.....	35
4.6.3	Podmínky použití přídatných látek .....	37
4.6.4	Označování přídatných látek .....	38
4.6.5	Požadavky na čistotu přídatných látek .....	38
5	Závěr.....	39
6	Seznam použité literatury .....	40

## 2 Úvod

Základním požadavkem na potraviny v EU i u nás je jejich zdravotní nezávadnost. Všechny potraviny, které přicházejí na trh, musí být bezpečné. S tím je neodmyslitelně spojené základní pravidlo, a to pravidlo správné hygieny. Maso ani masné výrobky nejsou výjimkou, ba naopak. Mikrobiální kontaminace těchto výrobků má potenciál být vysoká, a proto je dodržování správných postupů nezbytně důležité. Nejdůležitější kroky, kterými je možno zabránit zvýšené kontaminaci, jsou tři. Omezení vstupu zdraví poškozujících mikroorganismů do potraviny, odstranění mikroorganismů z potraviny vhodným způsobem (pasterace, sterilace) a nakonec omezení růstu mikroorganismů ve finálním výrobku.

Z hlediska údržnosti potravin a pro zajištění výše zmíněných pravidel se při konzervaci používá tzv. překážkový efekt. Jde o komplex „překážek“, které samy o sobě nejsou dostatečně účinné, aby zabránily růstu mikroorganismů, avšak vzájemným působením se jejich účinky doplňují a posilují. Studie ukazují, že využití ochranných kultur pro konzervaci výrobků má největší šanci na úspěch právě v kombinaci s překážkovým efektem.

I přesto, že jsou během výroby tato pravidla dodržena, je třeba počítat s tím, že kritickým bodem bude samotný spotřebitel, který mnohdy nemá dostatek povědomí o správném skladování. Je proto nutné posílit údržnost výrobku vhodným přídavkem, avšak takovým, který není v očích spotřebitele „chemický“. Tomuto kritériu, a to nejen z pohledu spotřebitele, odpovídají dvě skupiny přirozeně se vyskytujících látek: bakteriociny a kyselina mléčná, popřípadě její soli. Tyto látky vznikají v mase během posmrtných změn či během zrání fermentovaných masných výrobků činností ušlechtilé mikroflóry. Právě tyto látky, které vznikají z přirozeně se vyskytujících ochranných kultur, jsou budoucností konzervárenství bez chemických a tělu nepřírodných látek.

### **3 Cíl práce**

Cílem této bakalářské práce je literární rešerše zaměřená na shromáždění a vyhodnocení informací o možnostech použití ochranných kultur (přesné popsání jejich účinku v potravně) jako součásti tzv. bariérového efektu. Dále je cílem pojednat o možnosti úplného vypuštění chemických konzervačních látek a místo nich použít látky vyprodukované přítomnými mikroorganismy jako jejich dostačující náhrady. Jedná se zejména o zmapování oblasti použití těchto látek v kombinaci právě s bariérovým efektem, kde se jejich použití jeví jako nejúčinnější. Tím je možno docílit prodloužené trvanlivosti masa (pro použití jako vstupní suroviny pro výrobu), či finálního masného výrobku. Aby mohlo být aditivum schváleno, musí splňovat několik podmínek. S tímto se pojí legislativa, jejímž zpracováním se tato práce také zabývá.



## **4 Literární rešerše**

### **4.1 Mikrobiologie potravin**

Mikroorganismy, mikroflóra, mikrobiota. Všechny tyto pojmy představují skupinu buď jednobuněčných, nebo vícebuněčných mikroorganismů (bakterie, viry, prvoci, plísňe). Tyto organismy jsou neodmyslitelnou součástí přírody a vyskytují se prakticky všude – půda, ovzduší, voda, osidlují trávicí trakty živočichů. Mohou být užitečné, ale mohou být i původcem nemocí. Právě pro svoji všudypřítomnost tyto organismy snadno kontaminují potraviny a suroviny jejich výrobu. Vzhledem k potravinám mají největší význam heterotrofní mikroorganismy, které získávají potravu rozkladem organických sloučenin. Do této skupiny patří hlavně kvasinky, plísňe a bakterie, včetně patogenních (Steinhauser, 1995).

#### **4.1.1 Kontaminující bakterie**

Tvar těla bakterií je tyčinkovitý, méně kulovitý. Buněčná stěna umožňuje látkovou výměnu mezi buňkou a vnějším prostředím, tvoří a vylučuje biologicky aktivní látky, enzymy, štěpí složité organické látky na jednoduché výživové složky a zprostředkovává transport těchto látek dovnitř buňky. Stavba buněčné stěny je důležitým faktorem pro určení vhodného zásahu proti bakteriím, které jsou z mikrobiologického hlediska nežádoucí (Steinhauser, 1995). Podle složení buněčné stěny bakterie dělíme na gram - pozitivní a gram - negativní.

##### **4.1.1.1 Gram-pozitivní bakterie**

Gram-pozitivní ( $G^+$ ) bakterie mají buněčnou stěnu složenou z více vrstev. Je tenká 10 - 20 nm a má vnější dvojvrstevnou membránu, která je tvořena fosfolipidy, proteiny, lipopolysacharidy a lipoproteiny. Pod touto membránou se nachází periplazmatický prostor s lipoproteiny, periplazmatickými enzymy a s tenkou vrstvou peptidoglykanu (max. 20 % hmotnosti stěny). Právě lipidické látky jsou dominantní složkou buněčné stěny gram-pozitivních bakterií. Podle Grama se barví do červena.

#### 4.1.1.2 Gram-negativní bakterie

Gram-negativní bakterie mají buněčnou stěnu jednoduchou, o tloušťce 20 – 50 nm. Rozdíl oproti buněčným stěnám gram-pozitivních bakterií tvoří množství peptidoglykanu, které u gram-negativních bakterií dosahuje až 90 % hmotnosti buněčné stěny. Buněčná stěna gram-negativních bakterií je dále prostoupena kyselinou teichoovou. Podle Grama se barví fialově (Holt, 2005).

## 4.2 Mikrobiologie masa

*„Jako maso jsou definovány všechny části těl živočichů, včetně ryb a bezobratlých, v čerstvém nebo upraveném stavu, které se hodí k lidské výživě. Podle této definice patří mezi maso i živočišné tuky, krev, droby, kůže a kosti (pokud se konzumují), ale také masné výrobky. V užším slova smyslu se masem rozumí jen kosterní svalovina, a to buď samotná svalová tkáň, nebo svalová tkáň včetně vmezeřeného tuku, cév, nervů, vazivových a jiných částí. Někdy se tato definice omezuje jen na teplokrevné živočichy“ (Kadlec, 2002).*

Mikroorganismy v mase mohou působit buď prospěšně anebo mají nežádoucí vliv. Z hlediska použitelnosti v masné výrobě nás zajímají hlavně bakterie. Tabulka č. 1 představuje nejčastěji kontaminující mikroorganismy, které negativně ovlivňují hygienu masa a masných výrobků.

**Tab. č. 1.: Nejčastěji kontaminující mikroorganismy (Görner a Valík, 2004)**

Bakterie	Negativní účinek
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	mikrobiální povrchové kažení masa
<i>Pseudomonas fragi</i>	
<i>Acinetobacter – Moraxella</i>	
<i>Clostridium perfringens</i>	mikrobiální kažení masa v hmotě
<i>Clostridium sporogenes</i>	
<i>Enterobacteriaceae, př. Proteus</i>	
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	mikrobiální kažení vakuově baleného masa
<i>Alteromonas putrefaciens</i>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	původce listeriózy

## 4.2.1 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení jsou mezofilní mikroorganismy, některé druhy však mohou růst při nejnižší možné teplotě 5 °C a některé až při 45 °C. Většina bakterií mléčného kvašení je aktivní při pH 4 – 4,5, některé však mohou být aktivní i při pH 9,6 a některé druhy i při pH 3,2. Všechny kmeny jsou převážně proteolytické či lipolytické a pro svůj růst a aktivitu vyžadují dostatek aminokyselin, purinových a pyrimidinových bází a vitamínu B (Caplice and Fitzgerald, 1999). Z hlediska konzervace masných výrobků jsou bakterie mléčného kvašení nejdůležitější.

### 4.2.1.1 Klasifikace bakterií mléčného kvašení podle Vandamma a De Vuysta (1994)

- I. Obligátně homofermentativní laktobacily (*Lactobacillus delbruckei*, *L. bulgaricus*, *L. lactis*, *L. acidophilus*)
- II. Fakultativně heterofermentativní laktobacily (*Lactobacillus plantarium*, *L. casei*, *L. sake*, *L. curvatus*, *L. bavaricus*)
- III. Obligátně heterofermentativní, plyn tvořící laktobacily (*Lactobacillus bifermantans*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. reuteri*)<sup>1</sup>
- IV. Ostatní laktobacily
- V. *Carnobacterium*
- VI. *Streptococcus*
- VII. *Lactococcus*
- VIII. *Enterococcus* a *Vagococcus*
- IX. *Leuconostoc*
- X. *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Tetragenococcus*
- XI. *Bifidobacterium*

Hlavním produktem metabolismu bakterií mléčného kvašení je kyselina mléčná. Za aerobních podmínek může metabolismus vést až k oxidační disimilaci kyseliny mléčné do

---

<sup>1</sup> Homofermentativní = fermentovaný sacharid je přeměněn výlučně na kyselinu mléčnou  
Heterofermentativní = fermentovaný sacharid je přeměněn na kyselinu mléčnou (> 50 %), kyselinu octovou, CO<sub>2</sub>, a za určitých okolností i etanol (Görner a Valík, 2004).

vzniku CO<sub>2</sub> a kyseliny octové. Podobně může z kyseliny hypurové vzniknout kyselina benzoová – konzervační látka, která je do potravin většinou přidávána samostatně. Jako meziprodukt se mimo jiné tvoří peroxid vodíku, který je mikrobicidní (Görner a Valík, 2004).

Bakterie mléčného kvašení jsou schopny kromě kyseliny mléčné (popř. octové) tvořit a vylučovat ještě jiné inhibiční látky, které vykazují antagonistickou aktivitu proti širšímu spektru mikroorganismů (ne tedy jen proti těm, které nesnesou kyselé pH) a tím zesilují konzervační účinek. Jsou tvořeny v menším množství než kyselina mléčná. Mezi ně patří kyselina mravenčí, volné mastné kyseliny, amoniak, etanol, peroxid vodíku, diacetyl, 2,3-butandiol, acetaldehyd, bakteriolytické enzymy, bakteriociny a antibiotika (De Vuyst and Vandamme, 1994).

**Organické kyseliny** mají vliv zejména na cytoplasmatickou membránu buněk bakterií, kde narušují membránový potenciál a inhibují aktivní transport. **Oxid uhličitý** vzniká při heterolaktické fermentaci hexózy. Jeho přítomnost způsobuje anaerobní prostředí, které je pro některé bakterie toxické. Má vliv na buněčnou membránu a má schopnost snižovat či zvyšovat pH. Při nízké koncentraci může být oxid uhličitý stimulatorem růstu některých žádoucích bakterií. **Peroxid vodíku** je zodpovědný za silnou oxidaci lipidů bakteriální membrány a buněčných proteinů. **Diacetyl** je produkt citrátového cyklu a jeho přítomnost způsobuje vznik typické vůně a chuti. Zejména kvasinky, plísně a gram-negativní bakterie jsou na přítomnost diacetylu citlivé (Caplice and Fitzgerald, 1999).

Bakterie mléčného kvašení produkují velmi pestré škálu bakteriocinů. Ačkoli jsou tyto bakteriociny produkovány bakteriemi mléčného kvašení, které jsou přítomny v řadě jak fermentovaných, tak nefermentovaných masných výrobků, pouze nisin, bakteriocin produkováný kmenem *Lactococcus lactis spp. lactis*, je v současné době jediným široce používaným bakteriocinem, co se týče přímé aplikace jako konzervační látky (Cleveland et al., 2001).

Pro svou účinnost potřebují bakterie mléčného kvašení dostatek živin. Vzhledem k tomu, že požadované živiny v přírodě získávají již hotové, ztratily schopnost si některé látky samy syntetizovat (jedná se zejména o látky jako aminokyseliny, fermentovatelný sacharid, nukleové kyseliny a vitamíny skupiny B). Proto je nutné při pěstování bakterií mléčného kvašení na umělých živných půdách, anebo při fermentaci pro maximální konzervační efekt, přidávat tyto látky ve formě tzv. autolyzátu (= extraktu) (Görner a Valík, 2004).

#### 4.2.1.2 Bakterie mléčného kvašení a jejich ochranná funkce

Rod *Lactobacillus*, jako všechny bakterie mléčného kvašení níže uvedené, potřebuje růst v prostředí s optimálním množstvím fermentovatelných sacharidů, štěpných produktů bílkovin, nukleových kyselin a vitamínů skupiny B. Všeobecně jsou laktobacily acidotolerantní až acidofilní, s tím souvisí jejich schopnost rychlého snížení pH pod 4,0. Hlavního významu nabývají při nakládání a zrání masa v láku a při fermentaci uzenin s přidaným fermentovatelným sacharidem. *Lactobacillus plantarum* je součástí startovací kultury. Optimální teploty růstu jsou v rozmezí 15 - 40 °C (Görner a Valík, 2004).

Rod *Streptococcus* je typický tím, že fermentuje sacharidy na kyselinu mléčnou bez tvorby plynu. Některé druhy mohou tvořit i další organické kyseliny. Bakterie rodu *Streptococcus* neredukují dusičnany na dusitany. Optimální teplota růstu a výskytu je kolem 37 °C. Jsou součástí startovací kultury (Görner a Valík, 2004).

Rod *Enterococcus* intenzivně fermentuje sacharidy, dokáže snížit pH až na hodnoty 4,2 – 4,6, někdy se podílí na tvorbě aromatu a chuti. Bakterie tohoto rodu jsou schopné růst při koncentraci soli 6,5 %, při pH 9,6, přežívají teploty 60 °C, tedy teploty nízké pasterační a termizační. Jsou stálou součástí mikroflóry fermentovaných klobás a šunky. Jeho hlavní výhodou je, že dokáže fermentovat i při  $a_w = 0,97$  (mezní hodnota, při které ostatní mikroorganismy nejsou schopny růstu ani fermentace je  $a_w = 0,93$ ). Jsou používány jako synergisté užitečné mikroflóry pro svou schopnost rychlé proteolýzy, jejíž produkty jsou pro užitečnou mikroflóru rychlým zdrojem dusíku.

Pro rod *Leuconostoc* je růst podmíněn přítomností fermentovatelného sacharidu. Z něj tvoří kyselinu mléčnou, CO<sub>2</sub> a za příhodných podmínek i etanol; některé kmeny mohou pomocí oxidativního mechanismu místo etanolu tvořit kyselinu octovou. Optimální teplota růstu je 20 – 30 °C. Jsou součástí startovací kultury (Görner a Valík, 2004). Z vakuově baleného masa byly izolovány kmeny *Leuconostoc gelidum* a *Leuconostoc carnosum*. Oba produkují leucocin, který je degradován trypsinem, avšak ne tepelným působením. Leucocin je účinný proti *L. monocytogenes* a *Enterococcus*.

Rod *Pediococcus* patří mezi homofermentativní bakterie mléčného kvašení, tedy jejich hlavním finálním produktem fermentace sacharidů je racemická (DL), pravotočivá L(+)-kyselina mléčná. Jsou halotolerantní až halofilní, což se uplatňuje hlavně při výrobě a zrání salámů a klobás. Optimální teplota růstu je 30 °C a jsou součástí startovací kultury

(Görner a Valík, 2004). Pro masnou fermentaci se využívají zejména dva kmeny: *Pediococcus pentosaceus* a *Pediococcus acidilactici*.

Bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou striktně anaerobní, některé druhy snesou přítomnost kyslíku ale pouze za současné přítomnosti oxidu uhličitého. Optimální teploty růstu jsou v rozmezí od 37 °C do 41 °C. Jsou charakteristické tvořením většího množství kyseliny octové než mléčné, a to v poměru 3:2 (Görner a Valík, 2004).

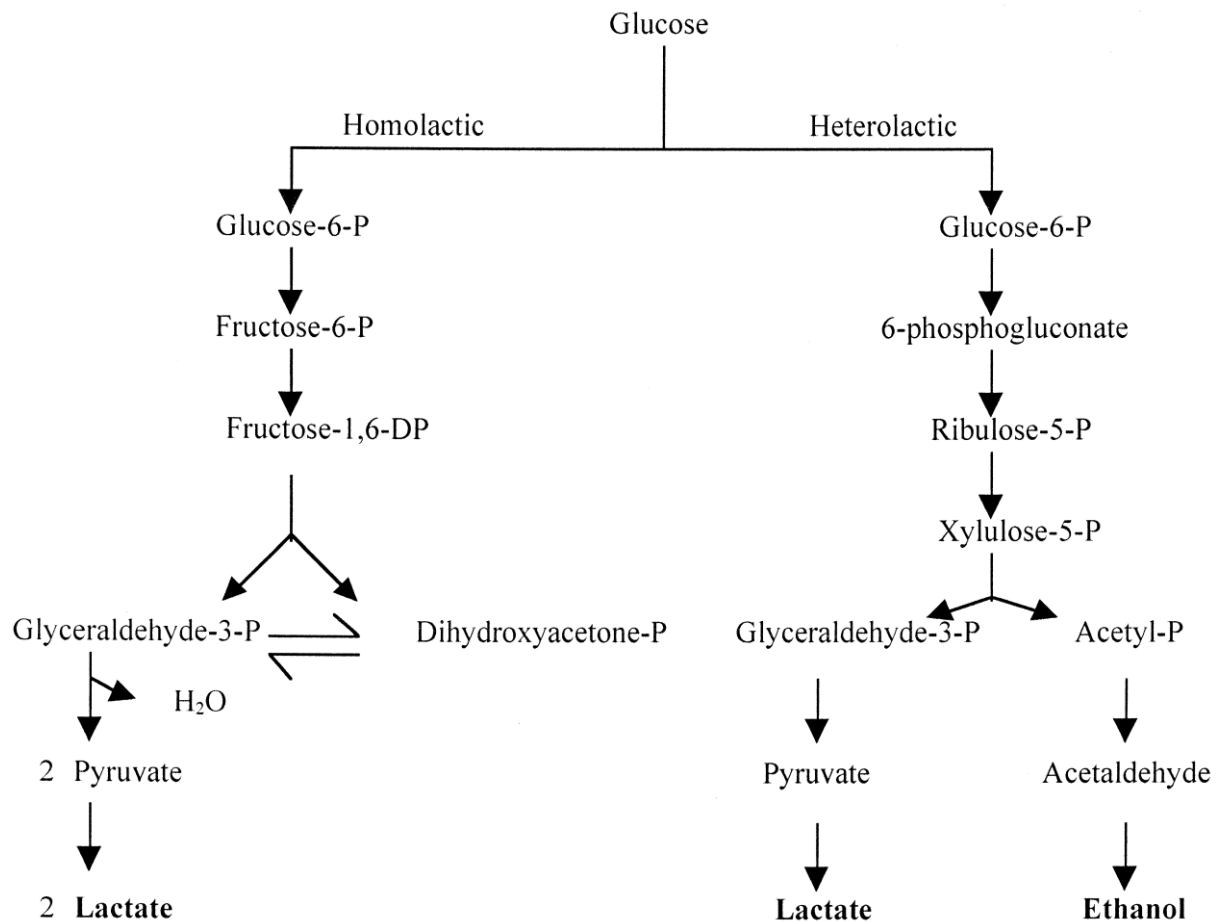
#### **4.2.1.3 Produkce kyseliny mléčné a mléčnanů**

Všechny bakterie mléčného kvašení produkují kyselinu mléčnou jako produkt konečný. Vzniklá kyselina mléčná může být buď L(+) nebo méně často D(-), popřípadě směs obou dvou. Kyselinu mléčnou D(-) člověk nedokáže metabolizovat, není proto doporučena pro novorozence a malé děti. Všechny bakterie mléčného kvašení produkují mléčnou kyselinu z hexóz. energii získávají prostřednictvím fosforylace na substrátové úrovni (Caplice and Fitzgerald, 1999).

Metabolické pochody fermentace probíhají podle Embden-Meyerhofových metabolických drah (homolaktická fermentace), mění 1 mol hexózy na 2 moly kyseliny mléčné, anebo podle 6-fosfoglukonátových drah (heterolaktická fermentace) dávajících 1 mol CO<sub>2</sub>, 1 mol etanolu a 1 mol kyseliny mléčné (Görner a Valík, 2004). Rozdíly a schéma obou fermentací představuje obrázek č. 1.

Kyselina mléčná, buď sama o sobě, nebo v kombinaci s jinými látkami, snižuje pH a tím ničí bakterie, které jsou na nízké pH citlivé. Její soli, tedy mléčnany, bakterie přímo neničí, ale inhibují jejich růst a produkci metabolitů (Houstma, 1996).

Obr. č. 1.: Schéma homolaktické a heterolaktické fermentace (Caplice and Fitzgerald, 1999)



#### 4.2.1.4 Mechanismus působení mléčnanů

Specifický je efekt mléčnanových iontů. Ty se v mase spojí v nedisociovanou kyselinu mléčnou, která jako elektroneutrální forma pronikne do bakteriální buňky. Uvnitř buňky se kyselina disociuje a sníží pH přímo uvnitř napadené buňky. Mléčnany jsou účinné proti širokému spektru bakterií, a to i hnilobných a gram-negativních (Houstma, 1996).

### 4.3 Bakteriociny

Bakteriociny jsou látky, které jsou produkovány bakteriemi a vyznačují se baktericidní nebo bakteriostatickou aktivitou. Jejich silnou a zároveň slabou stránkou je fakt, že spektrum účinnosti je většinou úzké a soustředěné jen na příbuzné druhy. Proto je lze nasadit jen cíleně proti úzkému okruhu mikroorganismů (Brychta a Pipek, 2003).

Jednotlivé skupiny těchto látek se od sebe liší molekulovou hmotností, spektrem účinnosti, genetickým původem a biochemickým účinkem. Přirozeně se bakteriociny vyskytují tam, kde jsou přítomni jejich producenti. Příkladem je tabulka č. 2, která ukazuje bakteriociny izolované z masa či masných výrobků. Z chemického hlediska jsou bakteriociny chuťově neutrální bílkoviny, které jsou lehce stravitelné trávicími enzymy, pro lidi jsou zdravotně nezávadné. Schopnost produkovat bakteriociny je geneticky zakódovaná (Pipek, 2008).

**Tab. č. 2.: Příklady producentů bakteriocinů izolovaných z masných výrobků a jejich antimikrobiální účinek (Cleveland et al., 2001)**

Zdroj	Izolovaný kmen + bakteriocin	Účinek proti
Sušené klobásy	<i>Lactobacillus plantarum</i> UG1	<i>Listeria monocytogenes</i>
Sušené fermentované klobásy	<i>Lactococcus lactis</i> (nisin A)	<i>L. monocytogenes</i>
Fermentované klobásy	<i>Lactobacillus plantarum</i> SA6	<i>Lactobacillus</i> spp.
Maso	<i>Leuconostoc carnosum</i> (leucocin A)	<i>L. monocytogenes</i>
Zkažená šunka	<i>Carnobacterium piscicola</i>	<i>L. monocytogenes</i>

Poprvé byly popsány bakteriociny gram-negativních bakterií. Kolicin je bakteriocin produkováný kmenem *Escherichia coli*. Koliciny představují antibakteriální proteiny, které ničí blíže příbuzné bakterie různými mechanismy. Příkladem mechanismů je inhibice syntézy buněčné stěny, prostup membránou buněčné stěny, či inhibice enzymů RNázy či DNázy napadené buňky. Mezi gram-pozitivními bakteriemi vynikají právě bakterie mléčného



kvašení, které jsou nepostradatelným zdrojem antimikrobiálních peptidů (=bakteriocinů), které jsou, nebo mají potenciál být, používány jako konzervační látky (Cleveland et al., 2001).

Bakteriociny gram-negativních bakterií se od bakteriocinů gram-pozitivních bakterií liší hmotností. Koliciny jsou proteiny těžší než 20 kDa, zatímco bakteriociny gram-pozitivních bakterií jsou ve většině případů lehčí než 6 kDa, avšak jsou zde výjimky. Bakteriociny jsou účinné už při aplikaci mikromolární či pikomolární koncentrace (Papagianni, 2003).

Abychom byli schopni chápat funkci bakteriocinů, je nutné znát jejich klasifikaci, mechanismus působení, princip jejich syntézy v buňkách bakterií a v neposlední řadě i jejich účinek a použití ve výrobě. Pro konzervaci a celkově výrobu v masném průmyslu se nejčastěji používají bakteriociny bakterií mléčného kvašení, které jsou dále podrobně popsány.

#### **4.3.1 Klasifikace bakteriocinů produkovaných bakteriemi mléčného kvašení (Claus, 2007)**

I. třída – lantibiotika, 2 – 5 kDa (nisin, mersacidin)

II. třída – nemodifikované, malé, tepelně odolné peptidy, <10 kDa

- IIa: pediocinové bakteriociny se silným účinkem proti listériím (pediocin PA – 1, sakacin A, leukocin, carnobacteriocin)
- IIb: dvoupeptidové bakteriociny<sup>2</sup> (laktococin, plantaricin, lactacin)

III. třída – velké, tepelně labilní bakteriociny, >30 kDa (helveticin, acidophilucin)

IV. třída – bakteriociny tvořící komplexy s ostatními makromolekulami jako jsou proteiny, lipidy, sacharidy.

Peptidy první třídy jsou tvořeny 19 – 50 aminokyselinami jako lanthionin, methyllanthionin, dehydrobutyrin (DHA) a dehydroalanin (DHB). Poslední dvě zmíněné aminokyseliny jsou tvořeny spojením cysteinu a DHA, respektive DHB, a to thioetherovými vazbami (Ray and Daeschel, 1994). Podle Clevelanda et al. (2001) je možno dále I. třídu rozdělit do dalších dvou skupin - Ia a Ib.

---

<sup>2</sup> Třídy I a II jsou nejbližší k použití v potravinářství (Claus, 2007).

Skupina Ia (mimo jiné zahrnuje nisin) se skládá z kationtových a hydrofobních peptidů, které vytvářejí póry v buněčné membráně napadené buňky, a to prostřednictvím její depolarizace. Na rozdíl od třídy Ib mají přízpusobivou strukturu a kladný náboj. Třídou Ib tvoří globulární peptidy kolem 2 kDa, které působí tak, že zasahují do buněčných enzymatických reakcí. Mají neutrální nebo záporný náboj (Papagianni, 2003).

Třída IIa zahrnuje peptidy se zachovaným pořadím Tyr – Gly – Asn – Gly – Val a peptidy, kde na N – konci peptidů jsou dva cysteiny, tvořící disulfidové můstky. Třída IIb se od IIa liší pořadím aminokyselin v prvním peptidu. Jde o komplex dvou různých peptidů, který je potřebný k tvorbě pórů v napadené buněčné membráně (Cleveland et al., 2001).

#### 4.3.2 Mechanismus působení bakteriocinů

Bakteriociny, zejména lantibiotika, ničí napadenou buňku vytvořením pórů v její buněčné membráně, snižují transmembránový potenciál ( $\Delta\psi$ ) a pH. Bakteriociny jsou pozitivně nabitě molekuly s hydrofobními částmi. Při kontaktu bakteriocinu s fosfátovými skupinami napadené buňky (respektive její buněčné membrány) dojde k elektrostatické interakci, která přispívá k vytvoření vazby bakteriocin – buněčná membrána. Právě hydrofobní části bakteriocinu začnou tvořit v buněčné membráně póry (Cleveland et al., 2001). Přesný popis adsorpce nisinu na receptory membrány napadené bakterie prozatím není objasněn.

Bakteriocin se ireversibilně naváže na bakteriální buňku a tím způsobí deformaci její buněčné stěny (vznik pórů, snížený  $\Delta\psi$  a pH). Důsledkem této reakce je výtok draselných iontů, ATP a dalších důležitých složek. Zasažené buňky po tomto zásahu ztrácí schopnost se rozmnožovat, nebo jsou úplně zničeny (Pipek a Březina, 1997). Podle Pipka a Březiny (1997) dělíme bakteriociny podle spektra účinnosti na dvě skupiny:

- Bakteriociny se širokým spektrem účinnosti na gram-pozitivní bakterie (např. nisin a pediocin ACh)
- Bakteriociny s úzkým spektrem účinnosti vůči blízkce příbuzným kmenům (např. sakacin A)

### 4.3.3 Syntéza bakteriocinů a jejich transport přes buněčnou membránu

Geny, které jsou zodpovědné za produkci lantibiotik (třídy Ia a Ib), jsou umístěny v tzv. operonech<sup>3</sup>. Geny kódující produkci bakteriocinů mohou být lokalizovány na chromosomech nebo kódovány v plasmidu či transposonu<sup>4</sup>. Typickou vlastností lantibiotik je fakt, že vlastní geny kódující stavební peptidy, dále obsahují proteiny, které pomáhají převádět bakteriociny do aktivních forem, transportovat je přes membránu a proteiny, které udělují hostitelské buňce imunitu.

Všechny bakteriociny jsou syntetizovány ribozomálně. Je nutné, aby vzniklé peptidy byly modifikovány na aktivní formy. Geny kódují i enzymy, které tuto modifikaci usnadňují. Největšími změnami procházejí právě lantibiotika (Cleveland et al., 2001).

Poté, co jsou bakteriociny ribozomálně syntetizovány, jde pouze o „shluk“ aminokyselin, které samy o sobě nevykazují antibakteriální účinek. Musí proto projít posttranslační úpravou. Dochází k posttranslačnímu enzymatickému procesu, který vyvolává dehydrataci serinu a threoninu (serin a threonin jsou dehydratovány v dehydroalanin a dehydrobutyryl). Tím dochází k vytvoření thioetherových vazeb a přesunu aminokyselinových segmentů z N – konce. Tímto se neaktivní bakteriocin stane aktivním a může být začít vylučován do prostředí (Ray and Daeschel, 1994). Tato posttranslační modifikace u lantibiotik zahrnuje i vznik „neobvyklých“ aminokyselin jako jsou lanthionin či methyllanthionin.

Objasněná je i genetika nelantibiotických bakteriocinů jako jsou plantaricin, pediocin, sakacin. Existuje podobnost s geny lantibiotik – struktura, transport, regulace těchto genů. Stejně jako lantibiotika musejí být ribozomálně vzniklé propeptidy nelantibiotik modifikovány a aktivovány. Přeměna na aktivní formu je nezbytná pro sekreci a transport bakteriocinů přes buněčnou membránu.

Většina bakteriocinů první a druhé třídy jsou přes membránu vylučovány specifickými ABC transportery. Bakteriociny závislé na přenosu pomocí ABC transporterů jsou rozděleny do dvou skupin:

---

<sup>3</sup> Operon = funkční jednotka DNA prokaryotických buněk obsahující několik genů, ale fungující jako jedna transkripční jednotka. Společná je také regulace transkripce všech genů z celého operonu.

<sup>4</sup> Transposon = přenositelný element, je to taková část DNA, která dokáže sama sebe přemístit do jiného místa v genomu.

- bakteriociny s dvojitým glycinovým nosičem
- bakteriociny s ostatními nosiči

Bakteriociny s dvojitým glycinovým nosičem jsou převážně bakteriociny druhé třídy, ale patří sem i některá lantibiotika. Jsou vylučovány speciální formou ABC transporterů, vykazující specifickou proteolytickou aktivitu, pomocí které štěpí dvojitý glycinový nosič. Tím jsou bakteriociny aktivovány. ABC transportery, které vylučují bakteriociny s ostatními nosiči, nevykazují proteolytickou aktivitu, a proto je nutné odštěpení nosiče pro aktivaci bakteriocinu. To je prováděno speciálními proteázami, příkladem je NisP proteáza pro aktivaci nisinu (Cleveland et al., 2001).

#### 4.3.4 Použití a účinek bakteriocinů ve výrobě

Využití bakteriocinů je známo již dlouho, a to hlavně v mlékárenském průmyslu, ale i v průmyslu konzervářském. Přímý přídavek bakteriocinů může být cestou k novému způsobu konzervace. Prozatím je účinek bakteriocinů zaměřen na gram-pozitivní bakterie. Bakteriociny se vyskytují ve všech fermentovaných potravinách, vznikají zde činností startovacích kultur (De Vuyst and Vandamme, 1994).

Od té doby, co jsou bakterie mléčného kvašení používány jako startovací kultury ve fermentovaných výrobcích, vědci zkoumají možnost použití jako startovacích kultur právě producenty bakteriocinů. Jde například o *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* a *Enterococcus faecalis*. Jejich účinnost dokládají následující pokusy: V roce 1997 se dělal pokus s Manchego sýrem. Po naočkování sýru kmenem *Enterococcus faecalis* poklesl počet *Listeria monocytogenes* šestkrát oproti sýru, do kterého *Enterococcus faecalis* přidán nebyl. Druhým příkladem je pokles počtu *Listeria monocytogenes* v mikrobiálně napadeném salámu poté, co byl tento salám naočkován *Lactobacillus plantarum* MSC1 (Cleveland et al., 2001).

Použití bakteriocinů spolu s přísnou sanitací a dobrou technologickou praxí efektivně vede k potlačení *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* (De Vuyst and Vandamme, 1994).

Existuje i několik patentů na aplikaci bakteriocinů v masné výrobě. Přehled udává tabulka č. 3.

Tab. č. 3.: Patenty týkající se aplikace bakteriocinů v masné výrobě (Cleveland et al., 2001)

Autor	Název patentu	Praktické užití
Vandenbergh et al.	metoda inhibice bakterií využitím laktokokálních bakteriocinů	inhibice gram-pozitivních bakterií účinkem bakteriocinů produkovaných kmenem <i>Lactococcus lactis</i>
	metoda inhibice <i>Listeria monocytogenes</i> využitím bakteriocinů	inhibice <i>L. monocytogenes</i> využitím bakteriocinu kmene <i>Pediococcus acidilactici</i>
Boudreaux et al.	složka pro prodloužení trvanlivosti zpracovaného masa	užití bakteriocinu kmene <i>Pediococcus acidilactici</i> k inhibici mikrobiálního růstu a prodloužení trvanlivost v syrovém a zpracovaném mase
Wilhoit	povrchová úprava potravin s antimikrobiálními složkami	použití bakteriocinů rodů <i>Streptococcus</i> a <i>Pediococcus</i> v kombinaci s cheláty proti rodu <i>Listeria</i>
Collison et al.	použití lantibiotik pro kontrolu kontaminace masa během výroby a po ní	snížené riziko kontaminace zpracovaných masných výrobků patogenními a alimentárními mikroorganismy povrchovou aplikací lantibiotik na maso

### 4.3.5 Příklady bakteriocinů a jejich účinky

#### 4.3.5.1 Nisin

Nisin je produkován kmenem *Lactococcus lactis ssp. lactis*, inhibuje růst rodů *Clostridium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Bacillus* a

v neposlední řadě inhibuje *Listeria monocytogenes* a *Brochothrix Thermosphacta* (Březina a Pipek, 1997).

V současné době je jediným běžně používaným bakteriocinem, a to již víc než padesát let. Pro efektivní účinek nisinu je nutná určitá koncentrace jeho dávky do potravin. Pro klobásu boloňského typu se používá koncentrace 1000 UI / ml<sup>5</sup> k úspěšné inhibici či zničení *Lactobacillus sake* a *Lactobacillus curvatus*. Pro libové hovězí je pak potřebná koncentrace 400 IU/ml k úspěšnému potlačení *Brochothrix thermosphacta*.

Studie se zabývaly i zkoumáním chronické, subchronické či akutní toxicity nisinu. Testy prokázaly, že nisin je pro lidi bezpečnou konzervační látkou, bezpečná denní dávka je 2,9 mg na osobu (Cleveland et al., 2001).

Díky tepelné stabilitě nisinu v kyselém prostředí je předpoklad, že by mohl být přidáván do konzerv už před tepelným ošetřením a tak inhibovat možný nárůst spor. Tím by se například mohla místo sterilace provést pouze pasterace a tímto snížením teploty snížit náklady na tepelné ošetření (De Vuyst and Vandamme, 1994).

Na účinek nisinu má podle Daviese et al. (1999) velký vliv obsah tuku. Bylo zjištěno, že čím méně je tuku v masném výrobku, tím větší je aktivita tohoto bakteriocinu.

Studie ukazují, že velmi dobrých výsledků vykazuje spolupráce nisinu a kyseliny mléčné a to dokonce takové, že je tato kombinace schopna inhibovat i gram-negativní mikroorganismy. Efektivní je i nisin jako článek chladícího řetězce v inhibici *Brochothrix thermosphacta*.

#### Nisin a syrové maso

Některé studie ukazují, že přímé využití nisinu na syrové maso není efektivní. Nisin je totiž inhibován glutathionem (ten je v syrovém mase přítomný) v reakci, která je katalyzována glutathion S – transferázou. Právě přítomnost glutathionu velmi snižuje působení nisinu (Cleveland et al., 2001).

#### **4.3.5.2 Pediocin**

Pediocin je produkován rodem *Pediococcus*, který se v masném průmyslu používá jako startovací kultura. Pediociny mají široké spektrum účinnosti proti gram-positivním mikroorganismům, jako jsou *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, rod

---

<sup>5</sup> IU = International Unit = mezinárodní jednotka (m. j.)

*Clostridium*, ale i bakterie mléčného kvašení (i ty mohou při vysokém počtu způsobovat přílišným okyselením zkázu masa). Účinnost pediocinu dokazuje pokus Březiny a Pipka, kteří testovali pediocin AcH ve vlastních masokombinátech. Bylo prokázáno, že přítomnost pediocinu AcH zpomaluje nárůst mikroorganismů (zejména omezení nárůstu laktobacilů) ve vakuově balených masných výrobcích – párky, plátkované měkké salámy. Kromě toho byl zjištěn i vliv na zlepšení barvy výrobku a zpomalení poklesu pH. Dále byl testován vliv koncentrace pediocinu na údržnost vakuově balených párků. V masokombinátu bylo nakutrováno dílo jemných párků (v dávkách 150 kg), kdy byly do receptury přidány zvyšující se koncentrace pediocinu. Párky byly tepelně opracovány a vakuově zabaleny. Z několika proběhlých pokusů vyšly najevo následující výsledky: přidavek pediocinu zmírnil nárůst mikroorganismů. Z pokusů je patrné, že bakteriociny tvoří další bariéru, která zpomaluje růst některých mikroorganismů, v daném případě laktobacilů. S rostoucí koncentrací bakteriocinu se jeho účinek proti nežádoucím mikroorganismům zvyšoval. Přídavky používané v pokusu však přesahovaly dávky, které by v praxi přicházely v úvahu (zejména z ekonomického hlediska). I tak lze ale z pokusu vyvodit závěr, že lze dosáhnout prodloužení doby úchovy potřebné k distribuci a tím získat záruku, že i při nevhodném zacházení s finálním výrobkem nedojde k jeho zkáze (Pipek a Březina, 1997).

#### **4.3.5.2.1 Pediocin PA – 1**

Cleveland et al. (2001) uvádí, že pediocin PA – 1 je dalším vážným kandidátem na schválení pro použití jako konzervační látky. Dále dodává, že testy provedené na myších a králících neukázaly žádnou imunologickou odpověď jejich organismu. Je proto více než pravděpodobné, že pediocin PA – 1 bude stejně bezpečný jako nisin.

#### **4.3.5.2.2 Pediocin AcH**

Ray a Daeschel (1994) uvádějí, že existují čtyři kmeny, které dokáží produkovat pediocin AcH. Jsou to *Pediococcus acidilactici* H, E, F, a M. Pediocin AcH je velmi termostabilní bakteriocin, dokáže účinkovat při mrazírenských, chladiřenských, ale i při vysokých teplotách. Bylo prokázáno, že antibakteriální účinek trvá i po vystavení výrobku vysoké teplotě. Nejčastěji a nejintenzivněji je produkován při pH 5,0 při 37 °C. Jeho aktivita je narušena až působením proteolytických enzymů jako je trypsin a chymotrypsin. Pediocin AcH má široké spektrum působení a to zejména proti gram-pozitivním kmenům bakterií z rodů *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*,

*Brochothrix*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Clostridium* (z rodu *Clostridium* je účinný proti *C. botulinum* typu E, avšak ne proti typům A a B). Je však účinný nejen proti bakteriím, ale i jejich sporám a to hlavně sporám některých kmenů z rodu *Bacillus* a *Clostridium*.

Pediocin AcH může být účinný i proti gram-negativním bakteriím jako *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Yersinia* a *Aeromonas*, avšak jen za těch podmínek, že buňky těchto bakterií jsou subletálně narušeny mrazírenskými teplotami, vysokým zahřátím či působením slabých kyselin.

Mechanismus působení pediocinu AcH spočívá v narušení funkce cytoplazmatické membrány napadené buňky. U některých kmenů může způsobit až lýzu buňky; samotná lýza však není způsobena pediocinem AcH, ale autolytickými enzymy napadené buňky, které se po napadení aktivují. Buněčné stěny obou druhů, jak rezistentních, tak senzitivních, obsahují receptory na adsorpci pediocinu AcH. Pouze u senzitivních bakterií dojde po navázání pediocinu AcH na receptory ke vstupu bakteriocinu přes buněčnou stěnu a ke kontaktu s membránou, která je poté narušena (Ray and Daeschel, 1994).

#### **4.3.5.2.3      Pediocin PA – 1**

Pediocin PA – 1 je produkován kmenem *Pediococcus Acidilactici* PAC 1.0 (tímto kmenem je produkován ve větším množství) a NRRL B-5627. Jde o velmi termostabilní bakteriocin, který zůstává aktivní i po vystavení teplotě 100 °C. Je odolný účinku lysozymu, DNázám, RNázám, či fosfolipázám. Inaktivován může být až působením proteáz, jako je  $\alpha$ -chymotrypsin a papain. Po vystavení teplotě vyšší než 121 °C ztrácí 90 % aktivity. Pediocin PA – 1 je účinný v rozmezí pH 4 – 7. Pediocin PA – 1 je účinným inhibitorem *Listeria monocytogenes* (Ray and Daeschel, 1994).

#### **Pediocin PA – 1 a syrové maso**

Pediocin PA – 1 (s pediocinem AcH má stejné pořadí aminokyselin) není zatím schváleným aditivem. Studie prokázaly, že pediocin PA – 1 má okamžitý účinek na snížení počtu nežádoucích mikroorganismů, a to konkrétně *L. monocytogenes* a *Lactobacillus curvatus* v syrovém mase. Studie byly prováděny zejména na kuřecím mase, kde se zjistilo, že aktivita pediocinu PA – 1 zůstává zachována i po uvaření masa. Vědci se domnívají, že využití pediocinu PA – 1 je dobrou náhradou za nisin, který je látkami syrového masa inhibován, a to i přesto, že ve srovnání s nisinem má pediocin PA – 1 menší účinek (Cleveland et al., 2001).



#### 4.3.5.3 Enterocin AS – 48

Enterocin AS – 48 je produkován kmenem *Enterococcus faecalis* subs. *Liquefaciens* S – 48. Tento enterocin je vysoce termostabilní, aktivní i při teplotách kolem 80 °C a při hodnotách pH 3 – 8. Již při nízké koncentraci (3 – 4 µg/ml) vykazuje rychlé bakteriolytické účinky proti všem kmenům rodu *Bacillus*, *Enterococcus* a *Streptococcus*. Je účinný i proti řadě gram-negativních bakterií jako jsou *Myxococcus*, *Rhizobium*, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* a *Pseudomonas*. Jako nejúčinnější se pak použití enterocinu AS – 48 jeví v kombinaci s dalšími zákroky bariérového efektu (Fallico et al., 2011). Z prováděných pokusů použití enterocinu AS – 48 spolu s vybranými zákroky bariérového efektu vyšlo, že efektivní se jeví použití enterocinu AS – 48 spolu s esenciálními oleji k potlačení *L. monocytogenes*. Spolu s tepelným ošetřením je účinný k potlačení *B. coagulans*, s vysokým hydrostatickým tlakem (400MPa) ke snížení počtu *Listeria* a *Salmonella* během skladování (týká se klobás) a v kombinaci s pulsním elektrickým polem k potlačení *Salmonella enterica* a *Pediococcus Parvulus* (Vignolo et al., 2012).

#### 4.3.5.4 Sakacin A

Sakacin A je produkován bakterií *Lactococcus sake*, podle níž je i pojmenován. Je to účinný inhibitor růstu *Listeria monocytogenes* na mase a masných výrobcích, dále působí proti *Carnobacterium pisciola*, *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sake* (Ray and Daeschel, 1994), avšak ne proti *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*. Se sakacinem byl dělán pokus v souvislosti s plátkovaným masem. Tento pokus ukázal, že záleží na daném kmeni *Listeria*. Na některé kmeny sakacin A působil více než na druhé. Během pokusu se neprokázal vliv sakacinu na gram-negativní bakterie. Ani ostatní gram-positivní bakterie jako *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* a *Brochotrix thermosphacta* neukázaly citlivost na sakacin A (De Vuyst and Vandamme, 1994).

#### 4.3.5.5 Carnobacteriocin

Bakteriociny rodu *Carnobacterium* byly izolované z drůbežího masa, ryb a vakuově baleného masa. Jsou dominantní na syrovém mase, které je chladírensky skladováno a baleno při vyšší koncentraci CO<sub>2</sub> (Pipek a Březina, 1997). Rod *Carnobacterium* zahrnuje nesporotvorné tyčinky vyskytující se jako párové nebo někdy jako krátké řetízky, které mohou být pohyblivé. Ukázalo se, že tento rod může být užitečný (právě pro svou přítomnost na syrovém a chladírensky skladovaném mase). Dokazují to studie zabývající se

vakuově baleným masem - přítomnost *Carnobacterium* účinně inhibuje růst mezofilních patogenních mikroorganismů (De Vuyst and Vandamme, 1994).

#### 4.3.5.6 Lacticin 481

Tento bakteriocin je produkován *Lactococcus lactis subsp. lactis* CNRZ 481. Nejúčinnější je při hodnotě pH 5,5 a bývá využíván proti bakteriím mléčného kvašení a *Clostridium*, způsobujících kažení potravin (Ray and Daeschel, 1994).

### 4.3.6 Bakteriociny x antibiotika

Neznalost rozdílů mezi bakteriocinem a antibiotikem může vést k možné komplikaci s legislativou. Hlavní rozdílů uvádí tabulka č. 4.

**Tab. č. 4.: Rozdíly mezi antibiotikem a bakteriocinem (Cleveland et al., 2001)**

Charakteristika	Bakteriociny	Antibiotika
<b>Aplikace</b>	potravinová	klinická
<b>Syntéza</b>	ribosomální	enzymová (sekundární metabolit)
<b>Spektrum účinnosti</b>	úzké	široké
<b>Tvoří imunitu buňky</b>	ano	ne
<b>Toxicita</b>	neobjevená	ano

Jediné schválené používané antibiotikum je natamycin, produkováný *Streptomyces natalensis*. (De Vuyst and Vandamme, 1994).

Je produkován při teplotě 26 – 30 °C při pH 6 – 8. Kvůli jeho nízké rozpustnosti se shlukuje v krystalech, které jsou následovně izolovány extrakcí po oddělení biomasy. Natamycin vykazuje antagonistické účinky proti kvasinkám a plísním, je proto používán jako prevence jejich růstu na povrchu jogurtů, sýrů a klobás. Proti bakteriím nevykazuje žádný účinek. Je nejstabilnější ve formě prášku, pokud je skladován při pokojové teplotě o nízké vlhkosti. Je málo rozpustný ve vodě, což je jeho výhodou při aplikaci na povrch potraviny – má tendence zůstat na povrchu výrobku, kde je ho potřeba a nedochází k jeho migraci dovnitř výrobku. Nejaktivnější je při pH 4,5 – 9, účinný je při koncentraci 1 – 10 µg/ml. Mechanismus působení natamycinu závisí na interakci s ergosterolem, nezbytnou látkou buněk plísní a

kvasinek. Dříve bylo uváděno, že působením natamycinu se zvyšuje permeabilita membrány buněk a dochází k vyplavování buněčného obsahu. Nejnovější studie však prokazují, že nejde ani tak o zvyšování permeability, ale že působením natamycinu dochází k zabránění růstu napadené buňky, klíčení spor a k inhibici enzymové aktivity membrán. Použití v potravinách znázorňuje tabulka č. 5 (Broughton-Delves and Weber, 2011).

**Tab. č. 5.: Aplikace natamycinu v potravinách (Broughton-Delves and Weber, 2011)**

Výrobek	Metoda aplikace	Použité množství (µg/g)
<b>Fermentované klobásy</b>	ošetření povrchu sprejováním nebo ponořením	1250 – 2000
<b>Jogurt</b>	přímá aplikace do hmoty	5 – 10
<b>Polotvrdý/tvrdý sýr</b>	ošetření povrchu sprejováním nebo ponořením, popř. přímá aplikace	1250 – 2000

#### 4.3.7 Využití bakteriocinů jako součásti překážkového efektu

Pro účinnost bakteriocinů jsou nutné vhodné podmínky. Příkladem je nisin, který je 228 krát rozpustnější při pH 2 než při pH 8. Bakteriociny mají možnost použití zejména ve spolupráci s bariérovým efektem, kdy se jednotlivé konzervační zákroky mezi sebou zesilují (Cleveland et al., 2001). Příklady použití bakteriocinů a jejich zesílený účinek v kombinaci se zákroky překážkového efektu uvádí tabulka č. 6.

Tab. č. 6.: Příklady použití bakteriocinů jako součásti překážkového efektu (Cleveland et al., 2001)

Bakteriocin	+ Ostatní faktory	Účinek
<b>Nisin</b>	CO <sub>2</sub>	účinek proti nisin – rezistentnímu kmeni <i>L. monocytogenes</i>
	PEF (pulsní elektrické pole)	PEF zvyšuje permeabilitu buněčné membrány, takže hydrofobní část nisinu může rychleji tvořit póry a rychleji způsobit výtok vnitrobuněčného obsahu napadené buňky. Nejúčinnější je tato kombinace proti <i>L. monocytogenes</i>
	EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová)	EDTA naruší vnější membrán a umožní tak penetraci nisinu. Kontrola růstu gram-negativních patogenů, jako <i>E. coli</i> , či <i>Salmonella</i>
	sacharóza, estery mastných kyselin	inhibice <i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Lactob. plantarum</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
	balení s modifikovanou atmosférou	prevence růstu <i>L. monocytogenes</i>
<b>Nisin A</b>	N <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , nízká teplota	inhibice růstu <i>L. monocytogenes</i>
	laktoperoxidáza, nízká teplota	redukce počtu <i>L. monocytogenes</i>
	vápenatý alginátový gel	v gelu imobilizovaný nisin je lépe dopravitelný na místo určení než nisin samotný, v této kombinaci má zvýšenou účinnost proti <i>B. thermosphacta</i>

Bakteriocin	+ Ostatní faktory	Účinek
Pediocin ACh	diacetát sodný	tato kombinace inhibuje růst <i>L. monocytogenes</i> za snížené, ale i pokojové teploty
	hydrostatický tlak (345 MPa), vysoká teplota (50 °C)	snížení životaschopnosti <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i>

#### 4.4 Nevýhody či komplikace využití ochranných kultur

Rod *Lactobacillus* za chladírenských teplot svou metabolickou činností brání proteolytickému rozkladu bílkovin nežádoucími mikroorganismy, avšak samy mohou způsobit sensorické chyby jako nakyslou chuť, tvorbu slizu, plynu nebo zezelenání (konkrétně zezelenání je výsledkem působení *L. Viridescens* (Görner a Valík, 2004).

Rod *Enterococcus* může dekarboxylovat tyrosin na biogenní amin tyramin (Görner a Valík, 2004).

V případě nově objevené a používané konzervační látky je kritickým bodem zajištění jejího dlouhodobého působení. V konkrétním případě bakteriocinů může být problém vznik bakteriocin – rezistentních bakteriálních forem. Je známa rezistence bakterií na antibiotika. Tato rezistence je genetická a může tak být předávána následujícím populacím. Vznik rezistence na bakteriociny však není genetický, ale souvisí s fyziologickou změnou buněčné membrány možné napadené buňky. Konkrétně dochází ke změnám ve složení buněčné stěny. Některé již modifikované formy také dokáží produkovat enzym nisinázu, který degraduje nisin. Existuje i rezistentní forma *L. monocytogenes*, která vykazuje určitou odolnost proti pediocinu PA – 1 (Cleveland et al., 2001).

#### 4.5 Metody konzervace a s tím spojená mikrobiální činnost

##### 4.5.1 Vakuově balené maso

Na povrchu masa, které je chladírensky skladováno, se přirozeně může vyskytovat psychrotrofní gram-negativní mikroflóra, především lipolytická a proteolytická bakterie rodu *Pseudomonas*. Z ostatních gram-negativních bakterií zde nalezneme rody *Citrobacter*,

*Serratia* či gram-pozitivní rody *Micrococcus*, *Staphylococcus* a *Bacillus* či *Brochothrix thermosphacta* (tato bakterie je mikroaerofilní, vyznačuje se lipolytickou aktivitou při +1 °C). Fenomémem dnešní doby je prodej nařezaných masných výrobků, vakuově balených. Zvětšení povrchu má obrovský vliv na možný vzrůst počtu nežádoucích mikroorganismů. Bakterie se rychleji množí a urychluje se kažení masa. Během řezání je časté riziko rekontaminace (Görner a Valík, 2004). Takto kontaminované maso, už vakuově zabalené, je pak chladírensky skladováno. V chladném anaerobním se vyskytuje psychrotrofní mikroflóra (gram-pozitivní bakterie mléčného kvašení jako *Lactobacily*, *Leukonostázy* a *Carnobakteria*), dále *Clostridium laramie*, zmíněná *Brochothrix thermosphacta*, avšak může zde růst i podmíněně patogenní *Listeria monocytogenes*, která je příbuzná právě bakteriím mléčného kvašení. Je pravda, že přítomnost bakterií mléčného kvašení do jisté míry prodlužuje údržnost výrobku ve vakuově baleném mase při chladírenských teplotách, je zde však riziko, že se maso postupně začne kazit v důsledku okyselení nebo vedlejších metabolitů právě bakterií mléčného kvašení. V masném průmyslu se ukazují jako účinné bakterie rodu *Pediococcus*. Jejich bakteriociny, pediociny, mají tendenci (pro svou širokospektrální účinnost) inhibovat růst vegetativních buněk a klíčení spor klostridií ve vakuově baleném mase, které je chladírensky skladováno (Březina a Pipek 1997).

#### **4.5.2 Solené masné produkty**

Pro konzervaci a výrobu většiny masných produktů typu šunka, fermentovaných uzenin, vařených nebo k vaření určených výrobků se jako solící médium používá dusitanová solící směs (směs NaCl + dusitan). Maso se solí buď suchou (vtírání), anebo mokrou cestou (naložení do láku, vstřikováním láku dutými jehlami do svaloviny). Co se účinku solení týká, očekává se výsledek stabilizace barvy, vytvoření typické chutnosti, tvorby aromatu, údržnost textury a celková údržnost výrobku před mikrobiální kontaminací. Toho se dá dosáhnout při společném působení NaCl, dusitanu, vlastními enzymy masa a mikroflórou v láku. Tu tvoří zejména rody *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*.

#### **4.5.3 Fermentované masné produkty**

Výroba fermentovaných výrobků se liší v závislosti na druhu výrobku. Obecně řečeno, na začátku je nejdůležitější kvalitní vyzrálé maso (do mělněných výrobků se většinou přidává

předem zmrazené nebo alespoň namrazené), které se namělní (za současného přidání fermentovatelných sacharidů, solící směsi, koření a startovacích kultur) tak, aby později na řezu vznikla požadovaná mozaika (Görner a Valík, 2004). Po promíchání se dílo plní do obalů (záleží na typu výrobku, obaly však musí být propustné pro vodu a plyny), výrobek se odvěsí a udí. Uzení probíhá zároveň s procesem zrání, po zrání se výrobek suší. Nejdůležitější fází celého procesu je zmiňované zrání neboli fermentace. Během zrání dochází k odbourávání a přeměňování jednotlivých složek díla (sacharidů, bílkovin a tuků), ale hlavně dochází k pomnožení ušlechtilé mikroflóry, která má vliv na technologické vlastnosti, organoleptické vlastnosti, ale i na zdraví konzumenta – ve formě probiotických účinků (Pipek, 2008).

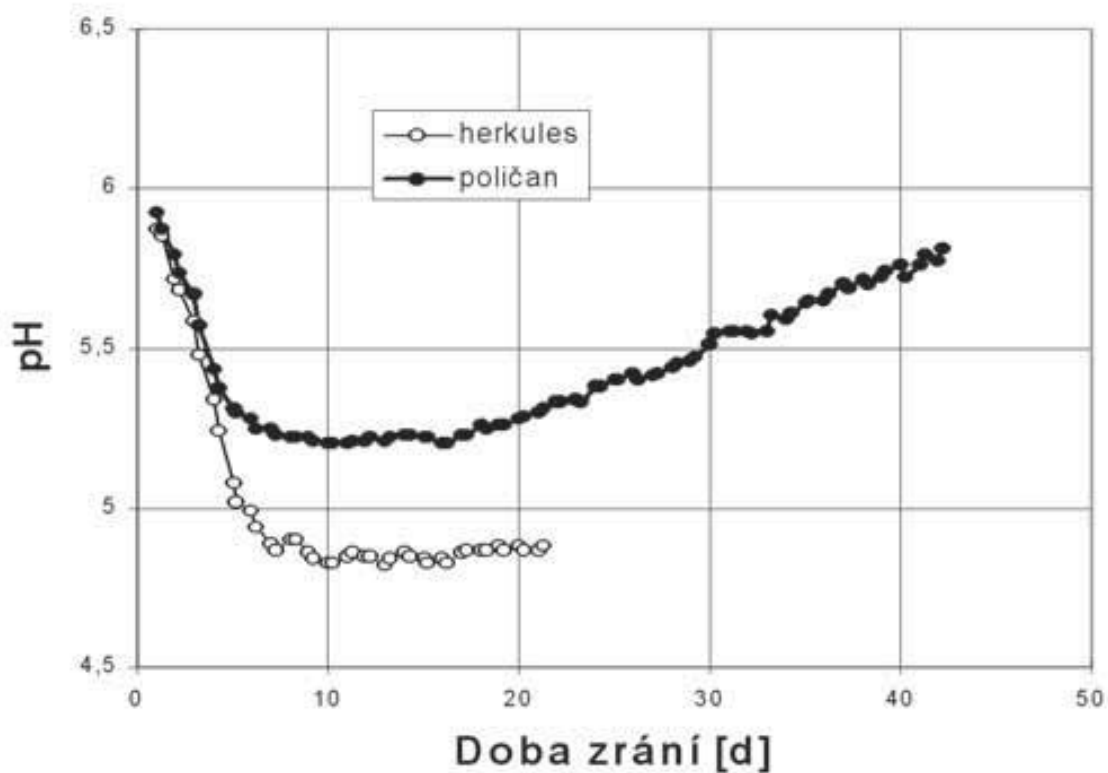
#### **4.5.3.1 Mikroflóra fermentovaných masných výrobků**

Zastoupení a četnost jednotlivých druhů mikroorganismů závisí na pH, aktivitě vody, množství sacharidů a teplotě. Krátce po namíchání díla salámu si konkurují hnilobné (proteolytické) bakterie a bakterie mléčného kvašení. Zpočátku jsou mikroorganismy rozptýleny velmi nepravidelně, v tzv. hnízdech. Dílem tedy neprostupují celé mikroorganismy, ale pouze jejich metabolity. Rozkladem sacharidů postupně dochází k tvorbě kyseliny mléčné a tím k poklesu pH. Snížení pH patří mezi rozhodující proces. Snížením pH dochází ke zvýšení údržnosti (i když někdy jen dočasněmu), stabilizaci barvy a vytvoření textury a vzniku typické chuti a aroma. Co se týče fermentovaných salámů, pokles pH již na 5,3 je dostatečné k potlačení *Salmonella typhimurium* a *Staphylococcus aureus*. K omezení jejich růstu dochází časem v průběhu sušení (zvyšuje se osmotický tlak, klesá aktivita vody). Poté v díle zůstávají již jen halotolerantní a lipolytické mikroorganismy. Tím dochází k omezení štěpení sacharidů a zvyšuje se rozklad lipidů a bílkovin, postupně se vytváří typické aroma. Aby se zajistil správný průběh zrání, přidávají se do díla tzv. startovací kultury. Jsou to mikroorganismy, které mají žádoucí fyziologické vlastnosti (tzv. kulturní mikroflóra), dokáží zajistit přeměnu sacharidů na organické kyseliny (srovnání rychlosti poklesu pH při zrání výrobku v závislosti na přítomnosti nebo nepřítomnosti startovacích kultur znázorňuje obrázek č. 2), redukci dusičnanů na dusitany a štěpení lipidů. Startovací kultury jsou do jisté míry antagonisté hnilobné mikroflóry, nesmějí být patogenní a musí mít příslušnou biochemickou aktivitu (Pipek, 2008).

Efektivní je využití *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0 jako součásti startovací kultury pro inhibici růstu *Listeria monocytogenes* během fermentace klobás. Pokusy dokazují, že

pediocin PA – 1 (produkovaný startovací kulturou) spolu s účinkem kyselin,  $\text{pH} < 4,9$  a sušením velmi ovlivňuje pokles *Listeria monocytogenes* ve finálním výrobku. Úroveň poklesu odpovídá úrovni produkce pediocinu PA – 1 (Ray and Daeschel, 1994).

**Obr. č. 2.: Průběh pH během zrání salámů poličan (bez startovacích kultur) a herkules (startovací kultury laktobacily) podle klasické technologie (Pipek, 2008)**





### 4.5.3.2 Startovací kultury

#### 4.5.3.2.1 Složení

- Bakterie mléčného kvašení
  - Laktobacily (*Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. fermenti*, *L. alimentarius*, *L. sake*, *L. curvatus*)
  - Streptokoky
  - Laktokoky
- Pediokoky (*Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceum*, *P. cerevisiae*)
- čeleď *Micrococcaceae*
  - Stafylokoky (*Staphylococcus carnosus*, *S. simulans*, *S. xylosus*)
  - Mikrokoky (*Micrococcus varians*, *M. aurantiacus*, *M. specialis*, *M. caseolyticus*) (Pipek, 2008)

#### 4.5.3.2.2 Rozvoj

Na počátku je počet bakterií mléčného kvašení nízký. Pro zajištění vhodných podmínek pro růst je nutný přídavek soli a nedostatek kyslíku. Mikrokoky jsou na rozdíl od laktobacilů halotolerantní, což znamená, že mohou růst i při nízké aktivitě vody a za přítomnosti soli, avšak ke svému růstu potřebují kyslík. Produkují katalázu. Ta odbourává peroxid vodíku, a tím chrání barvu salámu a tuk před oxidací vzdušným kyslíkem. Dále jsou důležité pro redukci dusičnanů na dusitany a přispívají tvorbě aromatu svou schopností lipolýzy.

#### 4.5.3.2.3 Změny v díle

Díky činnosti startovacích kultur dochází ke změně těchto složek díla:

Sacharidy: Jako substrát pro mikroorganismy se používají monosacharidy (glukóza), oligosacharidy (sacharóza, laktóza) i polysacharidy (modifikovaný škrob, dextriny). Jejich štěpením vzniká hlavně kyselina mléčná, avšak účinkem některých heterofermentativních bakterií i další organické kyseliny (jantarová, mravenčí, propionová) a alkohol. Přítomností kyselin dojde k poklesu pH, což má nepříznivý vliv na růst hnilobných bakterií, které nízké pH netolerují.

**Bílkoviny:** Během zrání jsou bílkoviny činností mikrobiálních proteáz štěpeny. Tím stoupá obsah oligopeptidů a volných aminokyselin, které tak mohou být dále přeměňovány na těkavé organické kyseliny a aldehydy, což přispívá k tvorbě aroma. Vznik amoniaku a aminů zajistí v dalších fázích výroby vzrůst pH v pozdějších fázích zrání a sušení. Vlivem mikroorganismů dochází i k denaturaci bílkovin, která je důležitá pro vytvoření správné textury výrobku (během denaturace bílkoviny změni orientaci funkčních skupin bílkovin a tím dojde k vytvoření intermolekulárních vazeb) (Pipek, 2008).

#### **4.5.3.2.4 Požadavky na startovací kultury**

Požadované vlastnosti pro startovací kultury využitelné v praxi v masné výrobě prvně popsal Deibel v roce 1974 a jsou doteď platné:

- Mikroorganismy musí být halotolerantní a nitritotolerantní (> 6 % NaCl, > 100 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/kg)
- Musí růst v teplotním rozmezí 27 – 43 °C (i nižších teplotách)
- Nesmí produkovat nežádoucí štěpné produkty rozkladu bílkovin, které by mohly negativně ovlivnit sensorické vlastnosti finálního výrobku
- Mikroorganismy nesmí být patogenní či jinak zdravotně závadné pro konzumenta, bakterie mléčného kvašení musí být homofermentativní, aby nedošlo k tvorbě plynu či jiných nežádoucích metabolitů
- Kultury by neměly být ani proteolytické, ani lipolytické, pokud to finální výrobek přímo nevyžaduje

Podle Vandamma a De Vuysta (1994) je aplikace odpovídajících startovacích kultur důležitá jak pro konzervaci potravin, tak pro střevní profylaxi. Pro použití *in situ* je důležité:

- Dostupnost kmenů, které vykazují antagonistickou antimikrobiální aktivitu
- Dostupnost kultur, které budou halotolerantní, geneticky stabilní, schopné rychlé produkce odpovídajících antimikrobiálních látek v takových environmentálních podmínkách, které jsou optimální pro průmyslovou výrobu nebo výrobu *in situ*
- Zvýšená produkce žádoucích antimikrobiálních látek

- Dostupnost komerčně použitelných rozsáhlých čistících metod<sup>6</sup>
- Provádění toxikologických studií produkovaných antimikrobiálních látek

## 4.6 Legislativa přídatných látek

Do průmyslově vyráběných potravin se z technologického důvodu běžně přidávají látky, které prodlužují trvanlivost potravin, zvýrazňují nebo obnovují barvu potravin, zvyšují či regulují kyselost a zahušťovací vlastnosti, případně dodávají potravinám sladkou chuť. Potravinářské přídatné látky jsou látky, které se běžně nekonzumují jako potraviny, ale záměrně se přidávají do potravin pro technologické účely jako je např. konzervace potravin (Burešová a Pavelková, 2011).

### 4.6.1 Mezinárodní normy

Codex Alimentarius a organizace WHO/FAO vypracovaly všeobecnou normu pro potravinová aditiva, tzv. General Standards on Food Additives (GSFA). Účelem této normy je vypracování a harmonizace mezinárodních pravidel týkajících se aditiv a použitelných v rámci světového obchodu s potravinami. V GSFA jsou zahrnuta pouze aditiva přezkoumaná JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Aditiva mají svůj Mezinárodní číselný systém INS (International Numbering System), který je analogický se systémem E-číselných kódů zavedených v zemích EU (Burešová a Pavelková, 2011).

### 4.6.2 Právní rámec EU a ČR

Při výrobě potravin lze používat pouze přídatné látky, které byly schváleny postupem podle nařízení (ES) č. 1331/2008 a které stanovuje jednotný postup pro posuzování a povolování potravinářských přídatných látek, potravinářských enzymů a potravinářských aromat a které jsou uvedeny na seznamech potravinářských přídatných látek Unie v příloze II a v příloze III nařízení (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách (Pavelková, 2012). To upravuje relevantní definice, obecná pravidla a konkrétní podmínky pro použití přídatných látek a požadavky na označování. Seznam přídatných látek povolených starými

---

<sup>6</sup> Pro nefermentované výrobky je výhodnější použití očištěného bakteriálního materiálu (purifikovaného) bez buněčných stěn z hlediska minimalizace změn textury, chuti nebo vůně.

směrnicemi byl převeden nařízením (EU) č. 1129/2011 a nařízením (EU) č. 1130/2011 do přílohy II a přílohy III nařízení (ES) č. 1333/2008 (Burešová a Pavelková, 2011).

#### **4.6.2.1 Nařízení (EU) č. 1129/2011**

Mění přílohu II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 vytvořením seznamu potravinářských přídatných látek Unie. Příloha II nařízení (ES) č. 1333/2008 ve znění nařízení (EU) č. 1129/2011 se použije od 1. června 2013. Potraviny, které byly uvedeny na trh před 1. červnem 2013 v souladu s dosavadními právními předpisy (tj. vyhláška č. 4/2008 Sb. kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin), ale které nejsou v souladu s nařízením (EU) č. 1129/2011, mohou být na trh nadále uváděny do konce doby minimální trvanlivosti nebo data spotřeby.

##### Kyselina mléčná

- Označení E 270
- Použitelné množství: *quantum satis*

##### Mléčnan sodný

- Označení E 325
- Použitelné množství: *quantum satis*
- Pouze balené polotovary z čerstvě mletého masa

##### Mléčnan draselný

- Označení E 326
- Použitelné množství: *quantum satis*
- Pouze balené polotovary z čerstvě mletého masa

##### Stearoyl-2-mléčnan sodný

- Označení E 481
- Maximální použitelné množství: 4000 mg/kg
- Pouze masové konzervy ze sekaného a krájeného masa

### Stearoyl-2mléčnan vápenatý

- Označení E 482
- Maximální použitelné množství: 4000 mg/kg
- Pouze masové konzervy ze sekaného a krájeného masa

### Natamycin

- Označení E 235
- Použitelné množství: 1mg/kg
- Pouze povrchové ošetření uzenin konzervovaných sušením

### Nisin

- Označení E 234
- Použitelné množství: 10 mg/kg u sýru mascarpone ((EU) č. 1129/2011)

#### **4.6.2.2 Nařízení (EU) č. 1130/2011**

Mění přílohu III nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách zavedením seznamu potravinářských přídatných látek Unie schválených pro použití v potravinářských přídatných látkách, potravinářských enzymech, potravinářských aromatech a živinách (Pavelková, 2012).

#### **4.6.3 Podmínky použití přídatných látek**

Použití přídatných látek při výrobě potravin je platnými právními předpisy velmi důkladně regulováno. Při výrobě potravin lze použít pouze přídatné látky, které byly pro použití v potravinách EU schváleny příslušnými právními předpisy. Zařazení přídatné látky na seznam povolených aditiv vždy předchází posouzení bezpečnosti.

Nařízením (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách rovněž stanovuje základní podmínky, které musí být splněny, aby bylo možné zahrnout potravinářskou přídatnou látku do seznamu látek povolených v EU. Použití přídatné látky může být povoleno pouze tehdy, pokud jsou splněny níže uvedené podmínky:

- použití přídatné látky nepředstavuje žádné zdravotní riziko pro spotřebitele,

- existuje odůvodněná technologická potřeba použití přídatné látky,
- použití potravinářské přídatné látky neuvádí spotřebitele v omyl (např. s ohledem na čerstvost, jakost použitých složek, přirozenosti produktu),
- přídatná látka musí poskytovat výhody a přínos pro spotřebitele (např. zachování výživové jakosti potraviny, zlepšení schopnosti potraviny zachovat si jakost nebo stabilitu, zlepšení organoleptických vlastností).

#### **4.6.4 Označování přídatných látek**

Přítomnost přídatných látek, které byly v potravině použity, musí být uvedena na obale. Přítomnost přídatné látky se na obale označuje tak, že se uvede název nebo číselný kód E, který se skládá z písmena E a trojmístného čísla. Číselný kód E je označení používané pro identifikaci přídatné látky v EU. Přidělení číselného kódu E znamená, že aditivní látka prošla posouzením bezpečnosti a byla povolena v EU.

#### **4.6.5 Požadavky na čistotu přídatných látek**

Požadavky na čistotu přídatných látek (tedy i včetně konzervačních) jsou upraveny níže uvedeným předpisem:

- směrnice 2008/84/ES, kterou se stanoví specifická kritéria pro čistotu potravinářských přídatných látek jiných než barviva a náhradní sladidla

## 5 Závěr

Mezi nejstarší metody konzervace potravin patří fermentace. Mikrobiální činnost, která je její podstatou, je již dlouho známa a výborně popsána. V současné době rostou nároky spotřebitele na kvalitu potravin a přírodní původ konzervačních látek. Bakteriociny se zdají být vhodným kandidátem, neboť vznikají přirozeným působením bakterií v průběhu fermentace. Efektivita bakteriocinů, použitých jako konzervantů, je již známa. Ačkoli je nisin jediným purifikovaným bakteriocinem, který je komerčně využíván, existují i jiné bakteriociny (př. pediocin, enterocin), které již mají své uplatnění v potravinářském průmyslu. Materiály uvedené v této práci dokazují, že všechny dosud testované a používané antimikrobiální látky jsou účinné a pro člověka bezpečné. Cesta ke schválení dalších bakteriocinů pro použití jako konzervační látky je dlouhá. Asi největší překážkou je samotná izolace bakteriocinu. Výrobce musí bakteriocin „purifikovat“, tzn. zbavit mikrobiálního materiálu, aby po přidání do potravin nepřesáhl povolené normy pro celkový počet mikroorganismů. Dále musí výrobce dokázat, že látka má ve výrobku technologické opodstatnění a že je zdravotně nezávadná. Současné studie ukazují, že dva nejdiskutovanější bakteriociny, pediocin PA – 1 a enterocin AS – 48 tyto podmínky splňují. Dá se tedy říci, že by se bakteriociny mohly v budoucnu uplatňovat v konzervářského průmyslu ve větší míře, než jsou užívány dnes.

## 6 Seznam použité literatury

Broughton-Delves, J., Weber G. 2011. Nisin, Natamycin and Other Commercial Fermentates Used in Food Biopreservation. In: Lacroix, C. (ed.). *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation*. Woodhead Publishing. UK. 63-100. ISBN: 978-184-5696-696.

Brychta, J., Pipek, P. 2003. Údržnost masa a masných výrobků. *Kvalita potravin*. 3 (1). 5-7.

Burešová, P., Pavelková, K. Přidatné látky (aditiva). *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]. 2011 [cit. 2013-03-11]. Dostupné z

<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1005724&docType=ART>

Caplice, E., Fitzgerald, G. F. 1999. Food Fermentations: Role of Microorganisms in Food Production and Preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 50 (1-2). 131-149. Dostupné také z <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160599000823>

Claus, H. 2007. Extrazelluläre Enzyme und Peptide von Milchsäurebakterien: relevanz für die Weinbereitung. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. 103 (11). 505-511.

Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., Chikindas, M. L. 2001. Bacteriocins: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 71 (1).

1-20. Dostupné také z

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160501005608>

Davies, E. A., Milne, C. F., Bevis, H. E., Potter, R. W., Harris, J. M., Williams, G. C., Thomas, L. V., Broughton - Delves, J. 1999. Effective Use of Nisin to Control Lactic Acid Bacterial Spoilage in Vacuum – packed Bologna – type Sausage. *J. Food Prot.* 62 (9). 1004 – 1010.

Dostupné také z

<http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/1999/00000062/00000009/art00006>



De Vuyst, L., Vandamme, E. J. 1994. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*. 1. ed. Blackwell Acad. London. 643. ISBN: 07-514-0174-9.

Fallico, V., McAuliffe, O., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Hill, C. 2011. The Potential of Lacticin 3147, Enterocin AS – 48, Lacticin 481, Variacin and Sakacin P for Food Biopreservation. In: Lacroix, C. (ed.). *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation*. Woodhead Publishing. UK. 63-100. ISBN: 978-184-5696-696.

Görner, F., Valík, Ľ. 2004. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami*. Malé centrum. Bratislava. 528. ISBN: 80-967-0649-7.

Holt, J. G. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. Springer. New York. 304. ISBN: 03-872-4143-4.

Houstma, P. C. 1996. *The Antimicrobial Activity of Sodium Lactate*. Selbstverl. Wageningen. 125. ISBN: 90-900-9768-6.

Kadlec, P. 2002. *Technologie potravin I*. Praha: VŠCHT. Praha. 300. ISBN: 80-708-0509-9.

Nařízení komise (EU) č. 1129/2011 ze dne 11. listopadu 2011, kterým se mění příloha 2 a II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 vytvořením seznamu potravinářských přídatných látek (Úř. věst. L 259, 12. 11. 2011, s. 177).

Papagianni, M. 2003. Ribosomally Synthesized Peptides with Antimicrobial Properties: Biosynthesis, Structure, Function, and Applications. *Biotechnology Advances*. 21 (6). 465-499. Dostupné také z <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975003000776>>

Pavelková, K. Přidatné látky povolené při výrobě potravin. *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]. 2012 [cit. 2013-03-11]. Dostupné z <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1000105&docType=ART&nid=11324>

Pipek, P. 2008. Fermentované salámy a probiotika. *Potravinářská revue: odborný časopis pro výživu, výrobu potravin a obchod.* 5 (3). 13-16.

Ray, B. Daeschel, M. A. 1994c. Bacteriocins of Starter Culture Bacteria. In: Dillon, V. M., Board R. G. (eds.). *Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation*. CAB International. Wallingford, UK. 133-166. ISBN: 08-519-8878-4.

Ray, B., Daeschel, M. A. 1992c. *Food Biopreservatives of Microbial Origin*. Boca Raton: CRC Press. Florida. 386. ISBN: 08-493-4943-5.

Steinhauser, L., Daeschel, M. 1995. *Hygiena a technologie masa*. 1. vyd. LAST. Brno. 643. ISBN: 80-900-2604-4.

Vignolo, G., Saavedra, L., Sesma, F., Raya, R. 2012. Food Bioprotection: Lactic Acid Bacteria as Natural Preservatives. In: Bhat, R., Alias, A. K., Palyath, G. (eds.). *Progress in Food Preservation*. Wiley. Ames, Iowa. 453-485. ISBN: 04-706-5585-2.