

Vliv zdrojů uhlíku na dekarboxylázovou aktivitu bakterií rodu *Lactococcus*

Tomáš Valenta, DiS.

Bakalářská práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie a mikrobiologie potravin
akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Tomáš VALENTA**
Osobní číslo: **T07103**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Vliv zdrojů uhlíku na dekarboxylázovou aktivitu bakterií rodu Lactococcus**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. V teoretické části zpracujte literární rešerši týkající se biogenních aminů a dekarboxylázové aktivity bakterií. Zaměřte se hlavně na princip enzymově katalyzované dekarboxylace za vzniku biogenních aminů a faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu bakterií.

II. Praktická část

1. V praktické části stanovte u bakterií rodu Lactococcus pomocí iontově-výměnné chromatografie kvantitativně množství produkovaných biogenních aminů v závislosti na zdrojích uhlíku.
2. Na základě teoretické části a výsledků praktické části formulujte o produkci biogenních aminů u testovaných bakterií mléčného kvašení.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1]Adams, M. R. (1999). Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 68, 171–178.

[2]Bover-Cid, S., Miguélez-Arrizado, M. J., Becker, B., Holzapfel, W. H., Vidal-Carou, M. C. (2008). Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiology*, 25, 269–277.

[3]Buňková, L., Buňka, F., Hlobilová, M., Vaňátková, Z., Nováková, D., Dráb, V. (2009). Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*, 229, 533–538.

[4]de Llano, G. D., Cuesta, P., Rodríguez, A. (1998). Biogenic amine production by wild lactococcal and leuconostoc strains. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 270–274.

[5]Görner, F., Valík, L. (2004). *Aplikovaná mikrobiologie požívatin*. Bratislava: Malé centrum.

[6]Greif, G., Greifová, M., Dvoran, J., Karovičová, J., Buchtová, V. (1998). Štúdium rastu a produkcie biogénnych amínov nektorými mikroorganizmami za modelových podmienok. *Czech Journal of Food Science*, 17, 15–21.

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce:

11. února 2010

Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2010

Ve Zlíně dne 15. dubna 2010

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Jan Hrabě, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 24.5.2020

Tomáš Valenta

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

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

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

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

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

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

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

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). 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 přihledne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá tvorbou biogenních aminů v závislosti na různých zdrojích uhlíku a podmínkách prostředí. V teoretické části je popsána charakteristika biogenních aminů, mechanismus dekarboxylace, jejich výskyt v potravinách, toxikologické hodnocení a metody stanovení těchto aminů. Také je stručně pojednáno o bakteriích mléčného kvašení.

Pro praktickou část bylo použito 6 kmenů bakterií rodu *Lactococcus*. Biogenní aminy byly stanoveny pomocí iontově výměnné chromatografie.

Klíčová slova: biogenní amin, tyrosin, dekarboxylace, bakterie mléčného kvašení, lactococcus, iontově výměnná chromatografie

ABSTRACT

This work deals with production biogenic amines depending on different sources of carbon and environmental conditions. The theoretical part is description of the biogenic amines, the mechanism of decarboxylation, its occurrence in foods and toxicological evaluation and methods for the determination of these amines. It is also briefly discussed the lactic acid bacteria.

For the practical part was used 6 strains of bacteria of the genus *Lactococcus*. Biogenic amines were determined by ion-exchanged chromatography.

Keywords: biogenic amin, tyrosine, decarboxylation, lactic acid bacteria, lactococcus, ion-exchange chromatography

Velké poděkování patří paní doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, připomínky a poskytnuté zdroje informací. Nemalé díky patří panu doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. a laborantce Ludmile Zálešákové za pomoc při přípravě vzorku pro měření.

Velké díky patří také mé rodině za morální a finanční podporu při studiu.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské/diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem citoval(a). V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uveden(a) jako spoluautor(ka).

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ	12
1.1 STRUKTURA A NÁZVOSLOVÍ	12
1.2 TVORBA A VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ	13
1.3 DEKARBOXYLACE	16
1.4 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH	17
1.4.1 Nefermentované potraviny	18
1.4.2 Fermentované potraviny.....	18
1.4.2.1 Sýry a mléčné výrobky.....	18
1.4.2.2 Fermentované masné výrobky	19
1.4.2.3 Víno a pivo.....	19
2 HYGIENICKO TOXIKOLOGICKÉ HODNOCENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	21
2.1 TYRAMIN.....	21
2.2 HISTAMIN	22
2.3 PUTRESCIN A KADAVERIN.....	22
2.4 BIOGENNÍ AMINY JAKO KARCINOGENNÍ LÁTKY	23
3 STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	24
3.1 TENKOVŘSTVÁ CHROMATOGRFIE (TLC)	24
3.2 VYSOCE ÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE (HPLC).....	25
3.3 KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA (CZE)	25
3.4 BLÍZKÁ INFRAČERVENÁ REFLEKTANČNÍ SPEKTROMETRIE	25
3.5 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)	26
4 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	27
4.1 HOMOFERMENTATIVNÍ MLÉČNÉ KVAŠENÍ	28
4.2 HETEROFERMENTATIVNÍ MLÉČNÉ KVAŠENÍ	28
II PRAKTICKÁ ČÁST	29
5 CÍLE PRÁCE	30
6 MATERIÁLY A METODY	31

6.1	POUŽITÉ MIKROORGANISMY	31
6.2	PŘÍPRAVA SUSPENZE BAKTERIÍ	31
6.3	PRŮBĚH EXPERIMENTU	32
6.4	CHROMATOGRAFICKÁ DETEKCE BIOGENNÍCH AMINŮ	32
6.5	STANOVENÍ pH KULTIVAČNÍHO MÉDIA	33
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	34
7.1	DETEKCE BIOGENNÍCH AMINŮ IONTOVĚ-VÝMĚNNOU CHROMATOGRAFIÍ	34
7.1.1	Produkce tyraminu kmenem CCDM 53	34
7.1.2	Produkce tyraminu kmenem CCDM 141	36
7.1.3	Produkce tyraminu kmenem CCDM 48	38
7.1.4	Produkce tyraminu kmenem CCDM 1004	40
7.1.5	Produkce tyraminu kmenem CCDM 824	42
7.1.6	Produkce tyraminu kmenem CCDM 946	44
7.2	SOUHRNNÁ DISKUZE	46
	ZÁVĚR	50
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	57
	SEZNAM OBRÁZKŮ	58
	SEZNAM TABULEK	59

ÚVOD

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární dusíkaté organické báze, které vykazují určitou biologickou aktivitu. V potravinách vznikají procesem dekarboxylace činností mnohých mikrobiálních enzymů, včetně bakterií mléčného kvašení. Substrátem pro jejich vznik jsou aminokyseliny. Nejčastěji se vyskytují ve fermentovaných potravinách a nápojích. Pro člověka bývají většinou nepostradatelné, avšak ve vyšších koncentracích mohou vyvolat nežádoucí toxikologické účinky. Z tohoto důvodu je jejich zvýšený výskyt v potravinách nežádoucí.

Bakterie mléčného kvašení tvoří skupinu mikroorganismů, která má schopnost fermentovat sacharidy na kyselinu mléčnou jako hlavní produkt. Z tohoto důvodu patří mezi technologicky významné mikroorganismy a často se využívají jako tzv. startérové kultury.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární organické dusíkaté báze tvořené hlavně dekarboxylací aminokyselin (AK) činností enzymů produkovaných mikroorganismy (MO) nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů [1,2,3,4,5,6]. BA jsou přírodní antinutriční faktory důležité z hygienického hlediska, a to vzhledem k jejich zapojení do mnoha otrav z potravin [7]. Jedná se o produkty běžné metabolické aktivity zvířat, rostlin a mikroorganismů [1,8]. BA vykazují různé biologické účinky v rostlinných pletivech a živočišných tkáních, např. některé BA jsou protoalkaloidy rostlin (hordein), stavebními látkami pro biosyntézu fytohormonů a dalších sekundárních metabolitů rostlin. V živočišných tkáních mohou mít funkci tkáňových hormonů (histamin) anebo mohou být stavebními látkami pro biosyntézu hormonů (fenylethylamin), koenzymů a vitaminů [9,10,11]. Mohou být klasifikovány jako polyaminy a biogenní aminy [12]. Polyaminy patřily dříve do skupiny BA, roku 1990 byly vzhledem ke své specifické biologické roli v buňkách eukaryot zařazeny do zvláštní skupiny [13].

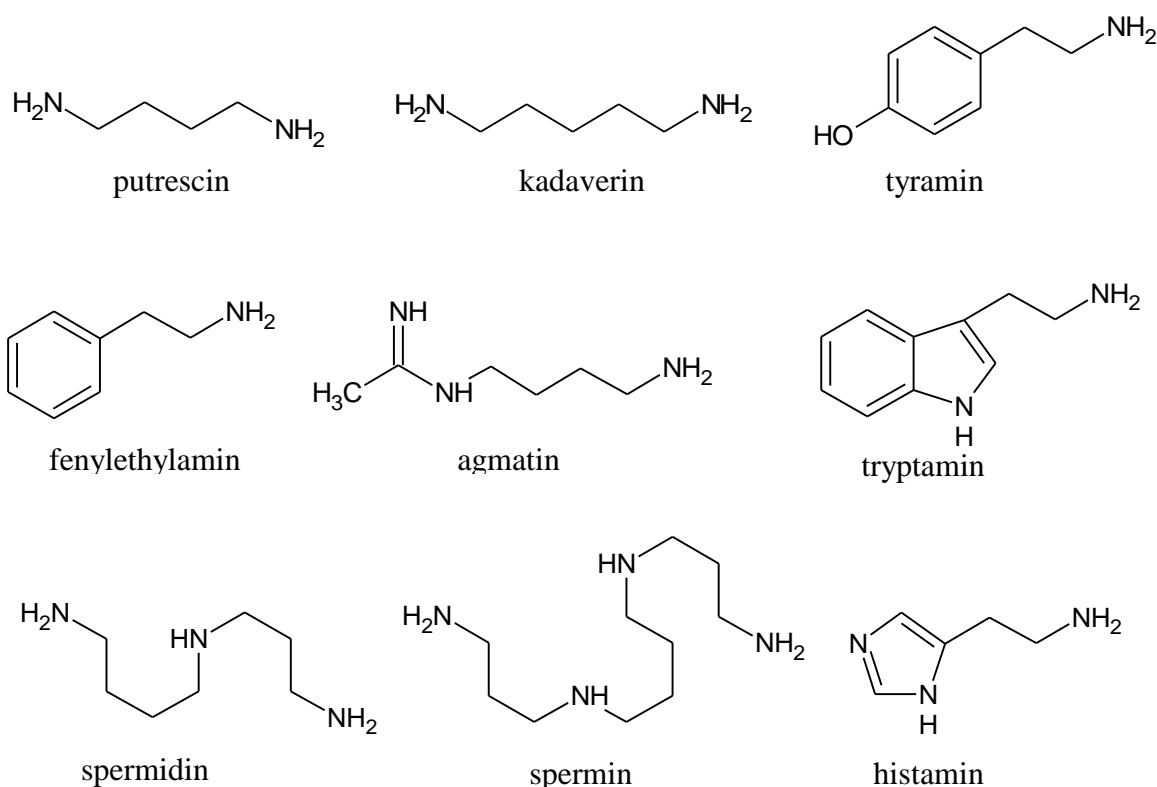
1.1 Struktura a názvosloví

Podle chemické struktury se BA můžou dělit na alifatické (putrescin, kadaverin), aromatické (tyramin, fenylethylamin), heterocyklické (histamin, tryptamin) nebo polyaminy (spermidin, spermin) [2,9,14,6]. Obrázek 1 ukazuje vzorce nejvýznamnějších biogenních aminů. Další možností je dělení podle počtu alkylových a arylových skupin vázaných místo vodíku na atom dusíku, a to na BA primární, sekundární a terciární [15,7].

Pro BA se nejčastěji používají triviální názvy namísto názvu systematických. Tabulka 1 ukazuje názvosloví BA.

Tabulka 1: Triviální a systematické názvy nejdůležitějších BA včetně enzymů [2,9,13,16]

Název AK	Triviální název BA	Systematický název BA	Enzym zodpovědný za tvorbu BA
histidin	histamin	2-(1H-imidazol-5-yl)etanamin	histidindekarboxylasa
tyrosin	tyramin	4-(2-aminoethyl)fenol	tyrosindekarboxylasa
tryptofan	tryptamin	2-(1H-indol-3-yl)etanamin	tryptofandekarboxylasa
lysin	kadaverin	pentan-1,5-diamin	lysindekarboxylasa
ornithin	putrescin	butan-1,4-diamin	ornithindekarboxylasa
arginin	agmatin	2-(4-aminobutyl)guanidin	arginindekarboxylasa
	spermidin	N-(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin	spermidinsynthasa
	spermin	N,N'-bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin	sperminsynthasa
fenylalanin	fenylethylamin	2-fenyletanamin	fenylalanindekarboxylasa



Obrázek 1: Přehled strukturních vzorců biogenních aminů [9]

1.2 Tvorba a vznik biogenních aminů

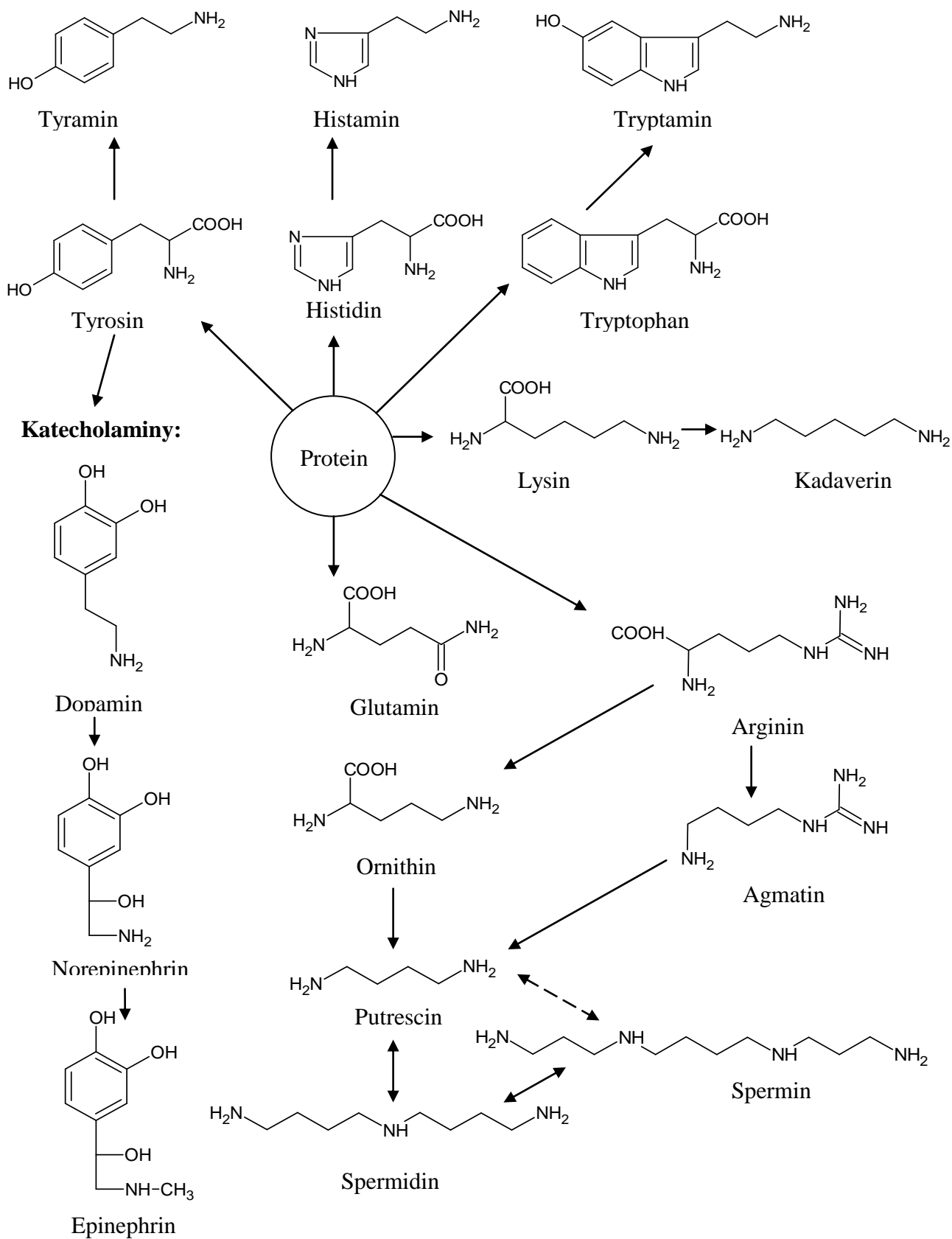
Biogenní aminy vznikají v potravinách bohatých na bílkoviny, ze kterých působením proteolytických enzymů vznikají AK. Dále se mohou vytvářet při výrobě, zrání, fermentaci a skladování potravin [12,13,17,18,19]. Proteolýza, buď autolytická nebo bakteriální, může

hrát významnou roli ve formaci volných AK z tkáňových proteinů, které poskytují substrát pro dekarboxylační reakce [7]. BA jsou produktem dekarboxylace volných AK působením dekarboxylas, kterými jsou vybaveny četné druhy bakterií. Mohou být také tvořeny jako výsledek endogenní aminokyselinové dekarboxylasové aktivity v syrových potravinách [1,20]. Dekarboxylace AK se uskutečňuje odstraněním α -karboxylové skupiny za vzniku příslušného aminu [7]. Obrázek 2 ukazuje metabolické dráhy vzniku jednotlivých biogenních aminů. Množství a typ vzniklých aminů jsou ovlivněny složením potravy, mikroflórou a dalšími faktory, které podporují růst bakterií [8]. V mase a rybách nejčastěji vznikají jako produkt bakteriální dekarboxylace (kontaminujícími bakteriemi), zatímco v potravinách fermentovaných (víno, kysané zelí) se tvoří činností příslušných mikroorganismů. U ovoce, zeleniny a hub vznikají při nevhodném skladování [3,10]. MO se mohou vyskytovat jako kontaminanty anebo mohou být součástí starterových kultur [5].

Tvorba BA v potravinách závisí na:[7,12,21,22]

- dostupnosti prekurzorů (hlavně volné AK),
- přítomnosti MO vlastních specifické aminokyselinové dekarboxylasy,
- příznivých podmínkách pro růst MO a produkci jejich enzymů.

Nejčastějšími mikrobiálními producenty aminů jsou zástupci rodů *Bacillus*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Proteus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Clostridium*, *Serratia*, *Sarcina*, *Morganella*, *Klebsiella* a některé bakterie mléčného kvašení *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Lactococcus* [7,12,21,23,24].



Obrázek 2: Metabolické dráhy vzniku biogenních aminů [25]

1.3 Dekarboxylace

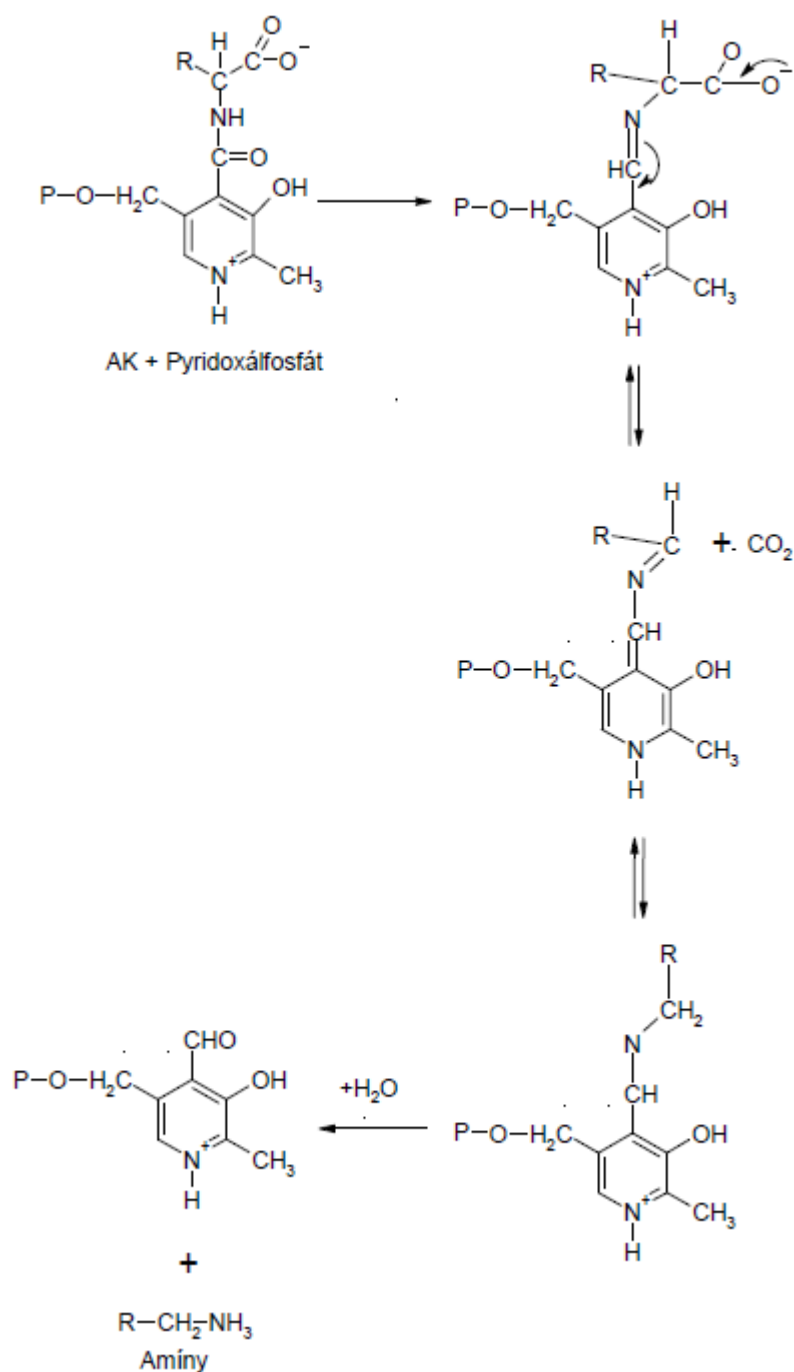
Dekarboxylace jsou reakce katalyzované působením specifických dekarboxylas, které spadají do třídy lyas, a které katalyzují uvolnění molekuly oxidu uhličitého [3,11,16]. Kofaktorem těchto enzymů je pyridoxalfosfát [9,11]. Dekarboxylasové enzymy mohou být vytvořeny bakteriemi k jejich přežití a růstu v kyselém prostředí. Ve skutečnosti jsou zpravidla inaktivní v neutrálním a zásaditém prostředí z čehož vyplývá, že pH hraje důležitou roli v produkci BA [14]. Tabulka 2 ukazuje faktory ovlivňující dekarboxylační aktivitu. Byly popsány dva mechanismy dekarboxylace AK: [7]

- Reakce závislé na pyridoxalfosfátu [6,7,16].
 - Vazba tohoto kofaktoru se uskutečňuje ve formě Schiffovy báze na aminoskupinu a tvoří tak aktivní část enzymu, karbonylová skupina pyridoxalfosfátu reaguje pohotově s aminoskupinou za vzniku meziproductů Schiffovy báze, které jsou následně dekarboxylovány s eliminací vody za vzniku korespondujících aminů. Tento proces je popsán na obrázku 3
- Reakce bez pyridoxalfosfátu [6,7]
 - Reakce dekarboxylované bez pyridoxalfosfátu se spojují s pyruvoylovými rezidui místo pyridoxal-5-fosfátu. Pyruvoylová skupina je kovalentně vázána na aminoskupinu zbytku fenylalaninu na enzymu. Takto aktivní proenzym se zbytkem pyruvoylu se chová jako pyridoxalfosfát v dekarboxylační reakci.

Tabulka 2: Faktory ovlivňující dekarboxylasovou aktivitu mikroorganismů [6]

Faktory	Vliv na dekarboxylázovou aktivitu
pH	dekarboxylasova aktivita je silnější v kyselém prostředí (pH 4 až 5,5)
Obsah glukosy	0,5 až 2 % optimální pro růst mikroorganismů vybavených dekarboxylasami, 3% inhibují syntézu dekarboxylas
Teplota	20 až 37°C je optimum pro růst většiny mikroorganismů vybavených dekarboxylasami, nízké teploty zastavují jejich růst
Přítomnost NaCl	aktivuje tyrosindekarboxylasu, inhibuje histidindekarboxylasu
Přítomnost NaNO ₂	aktivuje tyrosindekarboxylasu
Přítomnost O ₂	je potřebný pro růst mikroorganismů vybavených dekarboxylasami

Množství přítomných aminů	histidin, agmatin a putrescin inhibuje histidindekarboxylasu
---------------------------	--



Obrázek 3: Dekarboxylace aminokyselin [6]

1.4 Výskyt biogenních aminů v potravinách

Prakticky ve všech potravinách, které obsahují proteiny nebo volné AK, lze očekávat přítomnost BA [2,9]. Celkové množství biogenních aminů v různých potravinách a nápojích se značně liší, závisí na povaze potraviny a přítomnosti MO [2,26]. Často bývají

nacházeny ve fermentovaných potravinách, jako jsou sýry, ryby a rybí výrobky, maso a masné výrobky (suché salámy), fermentovaná zelenina, sójové produkty a alkoholické nápoje jako víno a pivo [4,21,26]. Při posuzování výskytu biogenních aminů se potraviny často dělí na nefermentované a fermentované [6]. Tabulka 2 ukazuje výskyt jednotlivých BA v různých potravinách.

1.4.1 Nefermentované potraviny

V nefermentovaných potravinách bývá přítomnost BA přesahující určitou úroveň považován jako indikátor nežádoucí mikrobiální aktivity, hlavně během skladování [2,18,21]. V čerstvém rybím mase je obsah BA malý, např. v čerstvém mase tuňáka bývá 0-10 mg.kg⁻¹ histaminu a 0-2 mg.kg⁻¹ tyraminu, při nevhodném skladování toto množství roste. Skladováním ryb při teplotách 0 °C a nižších vznikají BA v téměř zanedbatelném množství, naopak při teplotách vyšších mohou dosahovat hodnot až 3000 mg.kg⁻¹ (makrela) nebo dokonce až 8000 mg.kg⁻¹ histaminu (tuňák) [9]. Nicméně přítomnost BA v potravině bezprostředně nesouvisí s růstem hnilobné mikroflóry [2]. Bylo zjištěno, že schopnost produkce histaminu bakteriemi disponujícími histidindekarboxylasou klesá kvůli jejich poškození mrazem, dokonce i když jej přežijí. Ryby (tuňák a makrelovité ryby) bývají běžně zmrazovány během rybolovu a distribuce. Vedou se diskuze, že akumulace histaminu v rozmrazovaných rybách vzniká účinkem histidindekarboxylasy z autolýzy histidin produkujících bakterií [27]. BA aminy se rovněž vyskytují lidském mléce, zejména spermidin, spermin a putrescin. Dokonce se ukázala rozdílná koncentrace sperminu a spermidinu mezi levým a pravým prsem. V mléce kravském byla detekována nízká množství těchto aminů [2].

1.4.2 Fermentované potraviny

Při přípravě fermentovaných potravin můžeme očekávat přítomnost mnoha druhů MO, přičemž některé z nich jsou schopné produkovat BA [2]. Nárůst aminů je patrný hlavně v počátečních fázích fermentace [9].

1.4.2.1 Sýry a mléčné výrobky

Sýry jsou vedle ryb nejčastější surovinou spojovanou s výskytem toxických BA [2,21]. Hygienická kvalita mléka je pro tvorbu BA v sýrech velmi důležitá. Sýry vyráběné z mléka

se špatnou hygienickou kvalitou obsahují vyšší množství BA než sýry vyrobené z kvalitního mléka [12]. K tvorbě BA dochází rovněž v provozech se špatnou hygienou a kontaminujícími MO. Při dodržování správné hygieny je obsah BA i v dlouhodobě zrajících sýrech poměrně malý [9]. Obsah aminů v sýrech je závislý také na přítomnosti enzymů, dostupnosti volných AK, které vznikají proteolýzou kaseinu během zrání, hlavně starterovými kulturami, dále na přítomnosti vhodných kofaktorů a vhodných podmínek prostředí (pH, vlhkost, vyšší teplota, nižší obsah soli), ale také na typu sýra, zrání a délce skladování [28,29]. Produkce BA v sýrech bývá často spojována s nonstarterovými kulturami bakterií mléčného kvašení (BMK) [29,30]. Nejčastěji se vyskytujícími aminy v těchto výrobcích jsou histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, fenylethylamin, tryptamin, spermin a spermidin [2,12,7,29,30].

1.4.2.2 Fermentované masné výrobky

Hlavní kultury pro fermentaci masa jsou bakterie mléčného kvašení a grampozitivní, kataláza pozitivní koky, zahrnující mikrokoky a stafylokoky [20]. Polosuché salámy jsou fermentovány krátkou dobu, často kulturami mléčných bakterií, zatímco suché salámy je možno fermentovat přirozenou mikroflórou dlouhou dobu. Během tohoto zrání procesu se zvyšuje koncentrace histaminu minimálně na 10-ti násobek proti prvním třem dnům zrání [2].

1.4.2.3 Víno a pivo

Během alkoholového kvašení jsou ve vysokém množství produkovány agmatin, kadaverin, ethanolamin, histamin, putrescin a tyramin. Histamin a tyramin byl zjištěn v červeném víně. Rovněž byla detekována přítomnost tyraminu a histaminu v pivu [2]. Na snížení obsahu aminů ve víně se podílí svoji vazebnou schopností např. bentonit, který se používá jako čířící prostředek [6].

Tabulka 3: Obsah hlavních aminů a polyaminů v potravinách [9]

Potravina	Obsah v mg.kg ⁻¹ (nebo v mg.dm ⁻³) ^{c)}								
	histamin	kadaverin	putrescin	spermidin	spermin	agmatin	fenylethylamin	tyramin	tryptamin
maso									
vepřové	0-45	0-171	s-702	s-5	5-40			1-35	1-48
hovězí	0-217	0-27	s-26	s-5	5-40	2-112		s-61	
kuřecí	1	9	s-10	5-10	20-60		s	23	
masné výrobky									
šunka	1-271	s-97	s-20	s-8	20-60		s-215	s-618	8-67
slanina	15	s-1	s-8	2-42	1-212			1-3	4
uzeniny	s-550	s-787	1-396	s-10	10-60		0-696	0-1240	0-29
ryby									
tuňák	s-8000	s-447	s-200	1-10	2-35		s-45	s-1060	
makrela	s-3000	s-226	s-40	2-4	s-8		s-126	s-75	
sýry									
měkké sýry	0	0-1,5	0-3,1	0-0,8	0-1,1	0	0	0-0,6	0
tvrdé sýry ^{d)}	0-301	0-710	0-612	0-43	0-19	0-22	0-32	0-301	0-45
tvrdé sýry ^{b)}	0-609	0-389	0-670	0-40	0-22	0-27	0-30	0-609	0-34
Cheddar	0-1300	0-	1-996				0-303	0-1500	0-300
Emmental	s-2000	0-460	1-130				0-490	1-1000	0-210
Gouda	0-850	1-140	1-200				0-46	0-670	10-200
Eidam	0-88	s	s					s-320	
Roquefort	0-4100	42-905	44-830				10-25	s-1350	10-1100
sýry celkem				s-40	s-20				
ovoce									
banány			5	10	s			7-95	12-78
ananas	2-65							0-4	
pomeranč			95-150	s-10	s			1-10	s
grapefruit			20-90	2-15	s			0-1400	
zelenina									
špenát	60		s-120	1-15	s-4			0-680	
rajčata	s-1		10	s	s			0-1200	4 12
další									
potraviny									
kysané zelí	1-200	1-311	6-550	s-45	s		0-9	2-310	
sójová omáčka	0-274		s-500				s	s-882	s-100
pivo	0-22	0-40	2-15	0-7	0-4	1-41	0-8	1-68	0-5
slad	1-4		4-10			23-117		9-28	
červené víno	0-30	0-47	2-20	s	s		s	0-90	
bílé víno	0-20	3-108	1-11	s	s			s-212	
sherry	0-31	1	3-25				1	1-17	
čokoláda	0-10	0-8	0	1-2	s-11		0-27	0-2	s-1

a) Z pasterovaného kravího mléka. b) Ze syrového kravího a ovčího mléka. c) s = stopy

2 HYGIENICKO TOXIKOLOGICKÉ HODNOCENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ

Biogenní aminy jsou přírodní složky mnoha fermentovaných a nefermentovaných potravin rostlinného a živočišného původu. Proto mohou vyvolávat otravy z potravin, hlavně ve spojení s podpůrnými faktory jako je alkohol nebo monoaminoxidasové inhibitory (MAOI) [8,20]. Nízké koncentrace BA v potravině nejsou považovány za riziko, ale pokud je konzumované množství dostatečně vysoké, nebo jsou cesty katabolismu inhibovány, může být výsledkem propuknutí otravy [9,19,23]. BA vykazují psychoaktivní a vasoaktivní účinky [5,7,9,31]. Psychoaktivní aminy fungují jako přenašeče v centrálním nervovém systému, zatímco vasoaktivní působí přímo nebo nepřímo na kardiovaskulární systém [7,9].

Symptomy spojené s intoxikací zahrnují změny krevního tlaku, nevolnost, zvracení, bolesti břicha, průjem, rudnutí tváří, otoky rtů, edémy, svědění, bušení srdce, migrény, kopřivku, zvracení a ve výjimečných případech i smrt [4,12,14,19,29]. Toxický účinek BA se projeví tehdy, pokud se aminy dostanou do krevního řečiště [7].

Toxicita BA závisí silně na individuální schopnosti detoxikace. Během přijímání potravy jsou v lidských střevech nízká množství aminů enzymaticky metabolizována na fyziologicky méně aktivní degradační produkty [8,21,23]. Pokud jsou BA v potravinách v nadměrném množství, nemusí detoxikační kapacita tohoto systému stačit [8,21]. Proces intoxikace může být nižší u citlivějších jedinců, jež mají sníženou aktivitu enzymů monoaminoxidas (MAO) a diaminoxidas (DAO), které se běžně vyskytují u vyšších organismů [8,26,32]. V takovém případě mohou působit toxicky i potraviny obsahující nízká množství aminů [14]. Účinnost těchto enzymů snižují léky (monoaminoxidasové inhibitory), které se používají v psychiatrické praxi [23]. Nepříznivý účinek BA zvyšuje konzumace alkoholu [4,26]. Nejtoxičtější jsou tyramin a histamin. Jejich účinek je násoben putrescinem a kadaverinem [8,23].

2.1 Tyramin

Tyramin patří mezi vasoaktivní aminy, spolu s tryptaminem a fenylethylaminem [7]. Nejhojněji se vyskytuje v sýrech a vyvolává tzv. sýrovou reakci, která je charakteristická hypertenzí, horečkou, bušením srdce, migrénami, pocením, nevolností a

zvracením [8,12,14,26]. Největší riziko tyraminu spočívá v kombinaci s dalšími faktory, jako jsou léky inhibující MAO, alkohol a gastrointestinální nemoci [7,12]. V koncentraci vyšší než $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ může vyvolat hypertenzní krizi, hlavně u pacientů léčených léky inhibujícími MAO. Z tohoto důvodu byly sýry odstraněny z diet takovýchto pacientů [12]. Tyramin působí nepřímo uvolňováním noradrenalinu ze sympatického nervového systému. Rovněž způsobuje dilataci zornice, oční tkáň, způsobuje slzení a tvorbu slin, zrychluje dýchání a zvyšuje krevní cukr [7]. Pozitivní vlastností tyraminu je jeho antioxidační účinek, který se zvyšuje s jeho koncentrací a je podmíněn amino a hydroxy-skupinami. Je schopen zneškodňovat reaktivní kyslíkové druhy jako jsou např. superoxidový a hydroxylový radikál [6].

2.2 Histamin

Otrava histaminem souvisí hlavně se spotřebou ryb patřící do čeledi makrelovitých, ale rovněž mohou způsobovat intoxikace spojené s konzumací sýrů [8,12]. Histamin se uplatňuje svou vazbou na receptory buněčných membrán, které se nacházejí v kardiovaskulárním systému a na různých sekrečních žlázách. Histamin může okamžitě stimulovat srdce a výsledkem tohoto účinku je uvolňování adrenalinu a noradrenalinu z nadledvinek, dále dráždí svalstvo dělohy, střev a dýchacího traktu, stimuluje senzory a motorické nervové buňky a kontroluje sekreci žaludeční kyseliny [7]. Otrava histaminem má krátkou inkubační dobu, v řádu několika minut až hodin po konzumaci [8]. Otravy se často projevují kožními problémy jako vyrážky, kopřivka, otoky a lokální záněty, dále pocením, nevolností, zvracením a průjmem [7,8,12]. V těžkých případech byly pozorovány dýchací potíže, bronchospasmus a pálivé pocity [7].

2.3 Putrescin a kadaverin

Tyto aminy samy o sobě jsou považovány za zdravotně nezávadné, ale zvyšují nepříznivý účinek histaminu a tyraminu [9,26]. Jejich obsah v potravinách bývá značný [9]. Putrescin brání detoxikaci histaminu a tyraminu, další nepříznivou vlastností tohoto aminu je jeho schopnost reakce s dusitany za vzniku nitrosopyrrolidinu, heterocyklického karcinogenního nitrosaminu [26]. Mimo jiné mohou tyto aminy zneškodňovat volné radikály. Putrescin, spolu se sperminem a spermidinem inhibují oxidaci polyenových mastných kyselin, přičemž tento účinek souvisí s počtem amino skupin obsažených v polyaminu [6].

2.4 Biogenní aminy jako karcinogenní látky

Aminy byly také vyšetřovány jako možné mutagenní prekurzory, neboť mohou být nitrosovány za tvorby nitrosaminů [2,7,23]. Nitrosaminy jsou karcinogenní pro různé druhy zvířat a představují potencionální riziko pro zdraví člověka [7]. Jedná se hlavně o diaminy putrescin a kadaverin [1,29]. Putrescin a kadaverin jsou za tepla konvertovány na pyrrolidin a piperidin, respektive N-nitrosopyrrolidin a N-nitrosopiperidin. Proto tedy technologický proces výroby potravin, jako je solení a uzení, pravděpodobně indukuje tvorbu nitrosaminů, a vaření (pečení) zvyšuje jejich formaci. Syrové potraviny neobsahují nitrosaminy [7,33]. Lidé jsou vystaveni N-nitrosaminům skrz *in-vivo* nitrosaci přijímaných aminů, kde tyto mohou tvořit N-nitrosaminy působením dusitanů za podmínek podobných těm v žaludku. Reakční produkt tyraminu a dusitanu, 3-diazotyramin, vyvolává rakovinu ústní dutiny u potkanů. Tato mutagenní sloučenina může být tvořena v žaludku, kde inkubace tyraminu a dusitanu při 37 °C a pH 1-2 po dobu 60 minut vedla k významnému nárůstu

3-diazotyraminu [7]. Endogenní tvorba nitrososloučenin závisí hlavně na příjmu dusičnanů a dusitanů. Snížení tvorby nitrosaminů je možné přidavkem vitamínu C, jenž inhibuje jejich vznik [33].

3 STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ

Studium výskytu BA, stejně jako kontrola jejich limitů v potravinách by nebyla možná bez podpůrných analytických metod [7]. Existují dva důvody stanovení BA v potravinách. Prvním je jejich potencionální toxicita a s tím spojené zdravotní problémy a druhá je možnost jejich stanovení jako ukazatelů kvality potravin [8,19].

Byla publikována spousta metod pro stanovení BA, ale neexistuje žádná univerzální kvantitativní metoda pro stanovení všech BA ve všech potravinách. Typické problémy spojené se stanovením BA v potravinách jsou přítomnost potencionálně překážejících sloučenin a výskyt některých BA současně ve stejném poměru extraktu [7].

Pro stanovení BA byla vyvinuta řada metod. Patří mezi ně papírová chromatografie, tenkovrstvá chromatografie (TLC), vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC), chromatografie na iontoměničích (IEC), plynová chromatografie (GC), dále kapilární zónová elektroforéza, metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) a blízká infračervená reflektanční spektrometrie [1,7,8,13,17,34].

Před použitím některé z těchto metod musíme izolovat aminy ze vzorku. U vzorků tekutých stačí pouhá filtrace, u ostatních materiálů je nutno použít extrakční činidla [19,35]. Nejčastějšími extrakčními činidly jsou kyselina perchlorová, kyselina trichloroctová (TCA), chlorovodíková kyselina a různá organická rozpouštědla [19,7,8]. Po homogenizaci vzorku s extrakčním činidlem je nutné odstranit vysrážené části pomocí filtrace anebo na odstředivce [35].

3.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Jedná se o metodu plošné chromatografie, kde převládá adsorpční mechanismus dělení analyzované směsi látek. Vlastní stanovení se provádí na tenké vrstvě sorbentu. Vzorek se ve velmi malém množství nanáší na začátek vrstvy, tzv. start a vedle něj se nanesou standardy [36]. Po zaschnutí se vrstva vloží do vyvíjecí komory s vhodnou směsí rozpouštědel, v případě BA to jsou chloroform – diethyleter – triethylamin v poměru 6:4:1 a dále chloroform – triethylamin v poměru 6:1 [36,35]. Derivatizace se provede dansylchloridem s následnou denzitometrickou detekcí při 254 nm [35]. TLC metoda je rychlá a ekonomická. Nabízí odhad 8 BA v potravinách [7,8].

3.2 Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC je velmi důležitá metoda pro analýzu potravin [7]. Zkratka je odvozena od dvou názvů této techniky a to high performance liquid chromatography nebo high pressure liquid chromatography. Mobilní fázi tvoří kapalina a stacionární je film zakotvený na nosiči případně pevný adsorbent [37]. Stanovení biogenních aminů metodou HPLC zahrnuje dansylaci, benzoylaci nebo derivatizaci [1,8,37]. Tu je možno provést *o*-ftaldialdehydem (OPA), 9-fluorenyl-methyloxycarbonyl chloridem, ninhydridinem, dansylchloridem, merkptoethanolem nebo N-hydroxysuccinimidyl-6-chinolylyl karbamátem [1,38,8,19]. Následuje spektrofotometrická, fluorimetrická nebo UV detekce [1,35,19]. V poslední době se začíná používat vysoce citlivé chromatografické metody s elektrochemickou detekcí nebo detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie [37].

3.3 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Jedná se o elektromigrační metodu, u které je nutná derivatizace analyzovaných složek. Nejpoužívanější derivatizační činidla jsou OPA, fenyliothiokyanát, benzoylchlorid, 6-aminochinoyl-N-hydroxysuccinimidyl karbamát, a další. U aromatických a heterocyklických BA však nutná není z důvodů jejich základní absorpce UV světla. Stanovovaná látka může s činidlem reagovat před nebo až po rozdělení směsi v kapiláře. Může být také použita metoda derivatizace vzorku přímo v kapiláře, ve které se nachází základní elektrolyt spolu s derivatizačním činidlem [8,19,35].

3.4 Blízká infračervená reflektanční spektrometrie

Metoda blízké infračervené reflektanční spektrometrie s Fourierovou transformací (FT-NIR) se začíná prosazovat v posledních letech při analýze mléčných výrobků. Jedná se o rychlou a nedestruktivní metodu, u které odpadá úprava vzorků. Dračková a kolektiv použili tuto metodu pro stanovení polyaminů v tvarůžcích a nenašli statisticky žádné významné rozdíly mezi hodnotami zjištěnými pomocí FT-NIR a referenčními metodami. Nicméně se ukázalo, že NIR spektrometrie není vhodná pro stanovení minoritních složek [13].

3.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Aminokyselinová dekarboxylasova aktivita je vlastnost kmenově závislá. Aminogenní kmeny mohou být nalezeny u kontaminujících druhů, ale také jako součást spontánní fermentativní mikroflóry zahrnující BMK a stafylokoky [39]. PCR patří mezi molekulární metody pro včasnou a rychlou detekci produkujících bakterií a je vhodnou alternativou k tradičním metodám. PCR nabízí výhodu rychlosti, citlivosti, jednoduchosti a specifické detekci genů aminokyselinové dekarboxylace. Navíc, tato molekulární metoda je schopna detekovat potenciaální riziko tvorby BA v potravině před jejich produkcí [26].

Polymerázová řetězová reakce je jednoduchá metoda zmnožení neboli amplifikace DNA *in vitro* [40,41].

Cyklus amplifikace zahrnuje [40,41,42]:

- záhřev na 94°C – teplotní denaturace (rozvláknění DNA)
- snížení teploty na 50-60°C (vazba primerů)
- zvýšení teploty na 72°C – polymerace, za přítomnosti DNA polymerasy dochází k syntéze úseku vymezeného primery a zároveň k dosyntetizování vlákna (reakční teplota Taq-polymerasy).

Tímto způsobem lze zmnožit úsek o velikosti až dvou tisíc nukleotidů, a to i teoreticky z jediné molekuly DNA [42]. Pomocí PCR lze detekovat pouze ty mikroorganismy, u kterých je alespoň částečně známá jejich sekvence, čili těch, ke kterým lze zkonstruovat primery [40]. Následné vyhodnocení cílové nukleové kyseliny ve vyšetřovaném vzorku je prokazován např. elektroforesou s následnou vizualizací v UV světle [37].

4 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Potravinářský mikrobiolog si pod pojmem bakterie mléčného kvašení zpravidla představí skupinu kokovitých a tyčinkovitých bakterií zahrnující některé druhy rodů těchto bakterií: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Bifidobacterium* [43]. Rod *Bifidobacterium*, často považován za bakterii mléčného kvašení (BMK), má některé typické rysy avšak je fylogeneticky odlišný a má ojedinělý způsob fermentace cukru [44]. Klasická monografie Dána Orla-Jensena (1919) zabývající se bakteriemi mléčného kvašení definuje tyto jako „Pravé bakterie mléčného kvašení tvoří velkou přirozenou skupinu nepohyblivých, nesporulujících grampozitivních koků a tyčinek, které fermentují sacharidy za fakultativně anaerobních (mikroaerofilních) podmínek a tvoří přitom hlavně kyselinu mléčnou.“ Tato definice BMK je víceméně platná dodnes [43,44]. Historicky, druhy *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Streptococcus* tvořily hlavní skupinu BMK. Taxonomické změny těchto druhů a popis nových znamenaly, že BMK, v jejich široké fyziologické definici, obsahují kolem 20 druhů. Nicméně, z praktických a technologických důvodů jsou následující druhy považovány za BMK: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella* [44].

Pojem bakterie mléčného kvašení je často spojován s bakteriemi účastnících se fermentace potravin nebo krmiv [44]. Do mléka se dostávají hlavně až po nadojení, cca 90% je z vnějšku [45,46]. Množství mikroorganismů se mění v průběhu dojení, přičemž nejvíce jich je v prvních střících a nejméně na konci dojení [46].

Společným znakem bakterií mléčného kvašení je tvorba kyseliny mléčné z fermentovatelných sacharidů [43]. Bakterie mléčného kvašení lze třídit podle hlavních a vedlejších fermentačních produktů na homofermentativní, heterofermentativní a nečisté mléčné kvašení [43,45].

Vzhledem k tomu, že kyselina mléčná zastavuje rozmnožování hnilobných bakterií a stafylokoků, využívá lidstvo činnosti těchto bakterií pro konzervaci zeleniny, ale také některých krmiv [47,48]. V mlékárenském průmyslu se homofermentativní bakterie používají na výrobu sýrů, kvašeného mléka, jogurtu a tak dále [47].

4.1 Homofermentativní mléčné kvašení

Homofermentativní BMK fermentují hexosy téměř výlučně na kyselinu mléčnou podle Embden-Meyerhofovy metabolické dráhy neboli glykolýzy [43,45,47]. Biochemismus spočívá v přeměně pyruvátu, vzniklého glykolýzou, na laktát, redukcí za součinnosti redukovaného kofaktoru, čili anion kyseliny mléčné [44]. Tato skupina obsahuje např. bakterie rodu *Streptococcus* a *Lactococcus* a některé laktobacily.

4.2 Heterofermentativní mléčné kvašení

Heterofermentativní BMK fermentují hexosy na kyselinu mléčnou, propionovou, octovou, etanol, glycerol, také CO₂ a další látky [43,45,48]. Heterofermentativní bakterie neobsahují aldolasu, což je glykolytický enzym štěpící hexosa-1,6-bisfosfát na dva triosafosfáty. Z tohoto důvodu převádějí hexosy oxidačním mechanismem hexosafosfátového zkratu v pentosa-5-fosfát a CO₂. Za účasti anorganického fosfátu se pak enzymově štěpí pentosa-5-fosfát v acetylfosfát a glyceraldehyd-3-fosfát, který je pak glykolýzou přeměně v pyruvátu a laktát. Z acetylfosfátu vzniká za účasti redukovaného kofaktoru etanol [47]. Patří zde např. *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc dextranicum*, *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus fermentem* [49].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo stanovit bakteriální produkci biogenního aminu tyraminu v závislosti na složení kultivační půdy s přidavkem různých sacharidů (glukosa, laktosa, galaktosa) a na podmínkách prostředí (aerobní nebo anaerobní). Dále byla sledována produkce kyseliny mléčné. K této studii byly použity tři kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a tři kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

Pro úspěšné vypracování teoretické části bylo nutné zpracovat literární rešerši týkající se charakteristiky biogenních aminů, jejich důsledku na zdraví člověka a možnosti jejich stanovení použitím různých analytických metod. Dále pak byly stručně charakterizovány bakterie mléčného kvašení, které se technologicky podílí na výrobě fermentovaných produktů a které produkují tyto aminy.

Pro zvládnutí praktické části bylo nutné připravit živné půdy o různých koncentracích cukrů glukosy, galaktosy a laktosy. Tyto půdy byly po kultivaci měřeny na pH metru a následně po filtraci byly použity ke stanovení obsahu tyraminu iontově výměnnou chromatografií.

Srovnáním teoretické a praktické části bylo cílem najít kmen, který bude nejlépe vyhovovat průmyslovému použití jako kultura pro výrobu fermentovaných produktů a bude tvořit dostatek kyseliny mléčné, s pokud možno co nejmenším množstvím tyraminu.

6 MATERIÁLY A METODY

6.1 Použité mikroorganismy

V experimentální části byla sledována produkce biogenních aminů u následujících kmenů získaných ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora (Cultures Collection of Dairy Microorganisms – CCDM):

- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 53
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004

6.2 Příprava suspenze bakterií

Laktokoky byly kultivovány v M17 bujónu (Oxoid, Basingstoke, UK) obohaceném o 0,2 % (w/w) tyrosinu po dobu nutnou k dosažení potřebné hustoty suspenze bakterií (24 hodin) při 30 ± 1 °C.

Nejdříve bylo připraveno inokulum, ze kterého byla následně přichystána suspenze bakterií. Inokulum bylo připraveno zaočkováním 20 ml příslušného kultivačního média sledovanými bakteriemi ze šikmého agarů nebo Petriho misky. Buňky byly kultivovány při teplotě 30 ± 1 °C po dobu 24 hodin.

Suspenze bakterií byla připravena zaočkováním 4 ml příslušného kultivačního média s aminokyselinou tyrosinem připraveným jednodenním inokulem o objemu 25 µl. Bakterie byly následně kultivovány při teplotě 30 ± 1 °C po dobu 24 hodin. S takto připravenou suspenzí bakterií byly následně prováděny testy na dekarboxylázovou aktivitu bakterií.

6.3 Průběh experimentu

V experimentu byl sledován vliv zdrojů uhlíku (glukosa, laktosa, galaktosa) a přítomnost kyslíku (aerobní a anaerobní prostředí), které mohou ovlivnit produkci biogenních aminů.

V závislosti na sledovaných faktorech zdrojů uhlíku byl bujón obohacen o:

- glukosu v koncentracích 0,25; 0,5; 0,75 a 1 % (w/w)
- laktosu v koncentracích 0,25; 0,5; 0,75 a 1 % (w/w)
- galaktosu v koncentracích 0,25; 0,5; 0,75 a 1 % (w/w)

Příslušné médium bylo vždy zaočkováno 25 μ l a kultivováno 24 hodin při 30 ± 1 °C. Rovněž byl sledován vliv aerobního a anaerobního prostředí na produkci aminů. Anaerobního prostředí bylo dosaženo zakápnutím zkumavky parafinovým olejem. Následně bylo druhý den měřeno pH.

6.4 Chromatografická detekce biogenních aminů

Dekarboxylační medium bylo centrifugováno při 10000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Následně byla směs zfiltrována přes 0,45 μ m filtr 100 μ l takto připravené směsi bylo nastříknuto do analyzátoru aminokyselin AAA400 (Ingos, Praha, Česká republika), jehož součástí je kolona naplněná ionexem Ostion LG ANG (55x3,7 mm; Ingos, Praha, Česká republika). Detekce probíhala po postkolonové ninhydrinové derivatizaci spektrofotometrickým detektorem při 570 nm. Jako eluční pufrů byly použity roztoky, jejichž složení je uvedeno v tabulce 4. Postup přípravy ninhydrinového činidla a chemikálie (s výjimkou standardů) byly získány od výrobce AAA 400 (Ingos, Praha, ČR). Standardy biogenních aminů byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Každá směs byla analyzována minimálně dvakrát. Pokud byla koncentrace biogenních aminů ve směsi příliš vysoká, byl pro ředění použit dávkovací pufr I.

Biogenní aminy byly eluovány podle následujícího programu: pufr A po dobu 0 – 60 minut, pufr B po dobu 60 – 86 minut. Poté byla kolona regenerována 0,2 mol.l⁻¹ NaOH (15 minut) a stabilizována po dalších 19 minut pufr A. Průtoková rychlost pufru byla 0,3 ml.min⁻¹, ninhydrinového činidla 0,2 ml.min⁻¹. Eluce probíhala při teplotě 65 °C (0 – 41 minut a 111-120 minut) a 45 °C (41 – 111 minut).

Tabulka 4: Složení sodnocitrátových pufrů při detekci biogenních aminů (složení uvedeno v gramech na celkový objem pufru 1 l).

Reagencie	Pufr		
	A	B	Dávkovací pufr I
Kyselina citronová monohydrát	1,55	14,00	14,00
Citronan sodný dihydrát	21,00	–	–
Chlorid sodný	5,00	–	11,50
Chlorid draselný	–	171,50	–
Bromid draselný	41,65	–	–
Hydroxid draselný	–	10,00	–
Azid sodný	–	–	0,10
Izopropanol (ml)	250,00	–	–
Tiodiglykol (ml)	–	–	5,00

6.5 Stanovení pH kultivačního média

pH bylo měřeno v jednotlivých dnech po kultivaci, kdy se měnilo důsledkem produkce kyseliny mléčné bakteriemi mléčného kvašení. Kultivační médium bylo před měřením po odstranění parafinového oleje centrifugováno při 5000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. K měření byl využíván pH metr GRYF209S (GryfHB, Havlíčkův Brod, Česká republika) s kombinovanou skleněnou elektrodou pro biologické vzorky. Měření probíhalo po vytemperování vzorku na teplotu 22 ± 2 °C. Všechny vzorky byly měřeny nejméně trojným opakováním.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

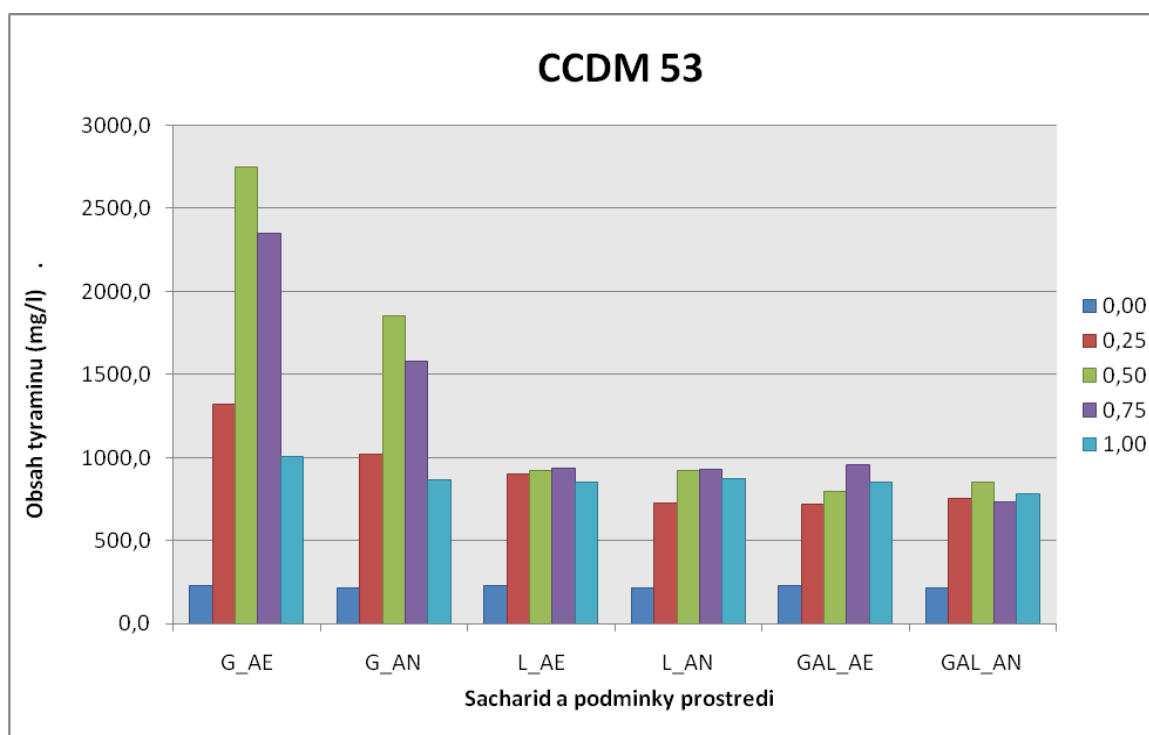
V této studii bylo testováno celkem 6 kmenů bakterií mléčného kvašení, konkrétně se jednalo o bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *L. lactis* subsp. *cremoris*. Testovány byly kmeny CCDM 53, CCDM 141, CCDM 48, CCDM 1004, CCDM 824 a CCDM 946. Tyto kmeny byly již dříve označeny za producenty biogenního aminu tyraminu [50,51].

7.1 Detekce biogenních aminů iontově-výměnnou chromatografií

Pomocí metody iontově-výměnné chromatografie byla zjišťována přítomnost biogenních aminů v médiu obohaceném o tyrosin. Téměř všechny kmeny produkovaly tyramin za některých z testovaných podmínek.

7.1.1 Produkce tyraminu kmenem CCDM 53

Kmen *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53 vykazoval největší produkci tyraminu v aerobním prostředí při koncentracích glukosy 0,50 %, kde vytvořil 2750 mg.l⁻¹ tyraminu a v koncentraci 0,75 %, kde bylo množství tyraminu 2347 mg.l⁻¹ (obr. 4). V ostatních koncentracích byla produkce podstatně nižší. Za anaerobních podmínek byl tyramin nejvíce produkován rovněž v přítomnosti glukosy o koncentracích 0,50 a 0,75 %. V přítomnosti ostatních sacharidů byla tvorba tyraminu téměř stejná za všech dalších podmínek. Jednoznačně nejmenší obsah tyraminu byl stanoven u půd bez přídavku cukru, kde se nakumulované množství tyraminu pohybovalo v rozpětí hodnot 218 až 228 mg.l⁻¹.



Obrázek 4: Produkce tyraminu kmenem CCDM 53

Čísla v legendě značí koncentrace sacharidů. G-glukosa, L-laktosa, Gal-galaktosa, AE-aerobní, AN-anaerobní prostředí.

Tabulka 5: Hodnoty pH kultivačního média s přidavkem cukrů pro kultivaci kmene CCDM 53

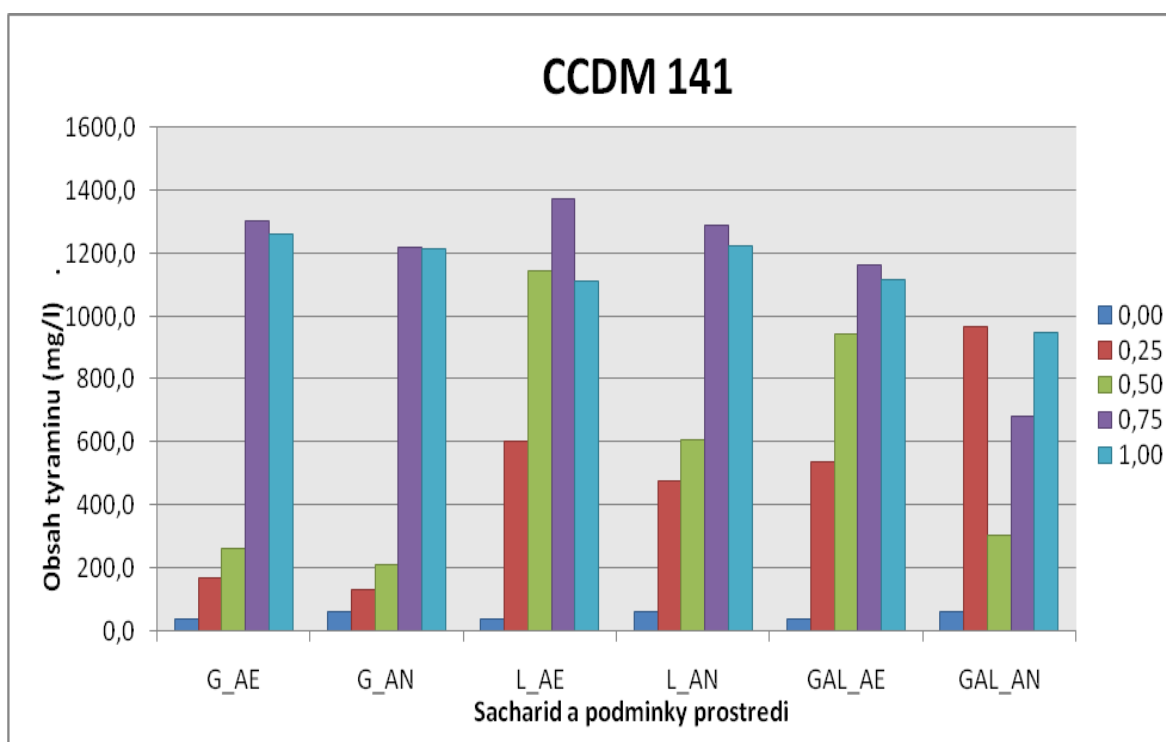
Cukr	koncentrace cukru	pH	
		aerobní	anaerobní
Glukosa	0,25	6,22	5,81
	0,5	5,38	4,73
	0,75	6,22	5,95
	1	5,36	4,71
Laktosa	0,25	6,29	6,08
	0,5	5,78	5,45
	0,75	6,41	6,09
	1	5,80	5,46
Galaktosa	0,25	6,29	5,92
	0,5	5,56	5,20
	0,75	6,04	5,84
	1	5,59	5,24
Kontrola přídavku cukru	0	6,73	6,68

Kromě detekce biogenních aminů v kultivačním médiu byla rovněž zjišťována hodnota pH kultivačního média po 24 hodinové kultivaci bakterií. Z tabulky 5 je patrné, že k největšímu poklesu pH docházelo u média s přídavkem glukosy, což koresponduje s obrázkem 4. Je patrné, že glukosa byla nejvhodnějším zdrojem uhlíku pro kmen CCDM 53. Hodnoty u dalších cukrů jsou si velmi podobné.

7.1.2 Produkce tyraminu kmenem CCDM 141

Kmen *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 produkoval největší množství tyraminu (1372 mg.l^{-1}) v přítomnosti sacharidu laktosy o koncentraci 0,75 % v aerobních podmínkách prostředí (obr. 5). V anaerobních podmínkách byla produkce nepatrně nižší. V případě 1% koncentrace laktosy a anaerobního prostředí byla produkce tyraminu téměř shodná jako v koncentraci 0,75 %. V aerobním prostředí byla při koncentraci laktosy 1 % produkce mnohem nižší než při koncentraci 0,75 %. Tvorba aminu při koncentraci sacharidu 0,50 % byla nejvyšší v přítomnosti laktosy za aerobních podmínek. O něco nižší byla produkce u galaktosy (v koncentraci 0,50 %), rovněž v aerobním prostředí. Vytvořilo se 1159 mg.l^{-1} tyraminu, zatímco za anaerobních podmínek bylo množství tyraminu poloviční.

Nejnižší obsah byl detekován v médiu o koncentraci 0,50 % u glukosy bez ohledu na dostupnost kyslíku. K téměř shodné produkci tyraminu jako u laktosy, v anaerobním prostředí při koncentracích 0,75 a 1 %, došlo u glukosy v aerobních podmínkách při těchto koncentracích. Formace tyraminu u glukosy za anaerobních podmínek v koncentracích 0,75 a 1 % byla téměř stejná, rozdíl byl nepatrný. V koncentraci glukosy 0,25 % došlo k asi třicetkrát menší produkci aminu než v koncentraci 0,75 %. K relativně nejnižší produkci došlo v přítomnosti galaktosy, hlavně v anaerobních podmínkách. Patrný byl však rozdíl v produkci u galaktosy 0,25 % za anaerobních podmínek, kdy byl zaznamenán mnohonásobně vyšší obsah tyraminu oproti ostatním cukrům v této koncentraci. Za aerobních podmínek byl při koncentraci 0,25 % obsah aminu podobný jako u laktosy v obou aerobních podmínkách. Jednoznačně nejnižší obsah byl při koncentraci 0,25 % glukosy v obou podmínkách prostředí a téměř zanedbatelný obsah tyraminu byl ve všech půdách bez přídavku cukru.



Obrázek 5: Produkce tyraminu kmenem CCDM 141

Čísla v legendě značí koncentrace sacharidů. G-glukosa, L-laktosa, Gal-galaktosa, AE-aerobní, AN-anaerobní prostředí.

Tabulka 6: Hodnoty pH kulturačního média s přidavkem cukrů pro kultivaci kmene CCDM 141

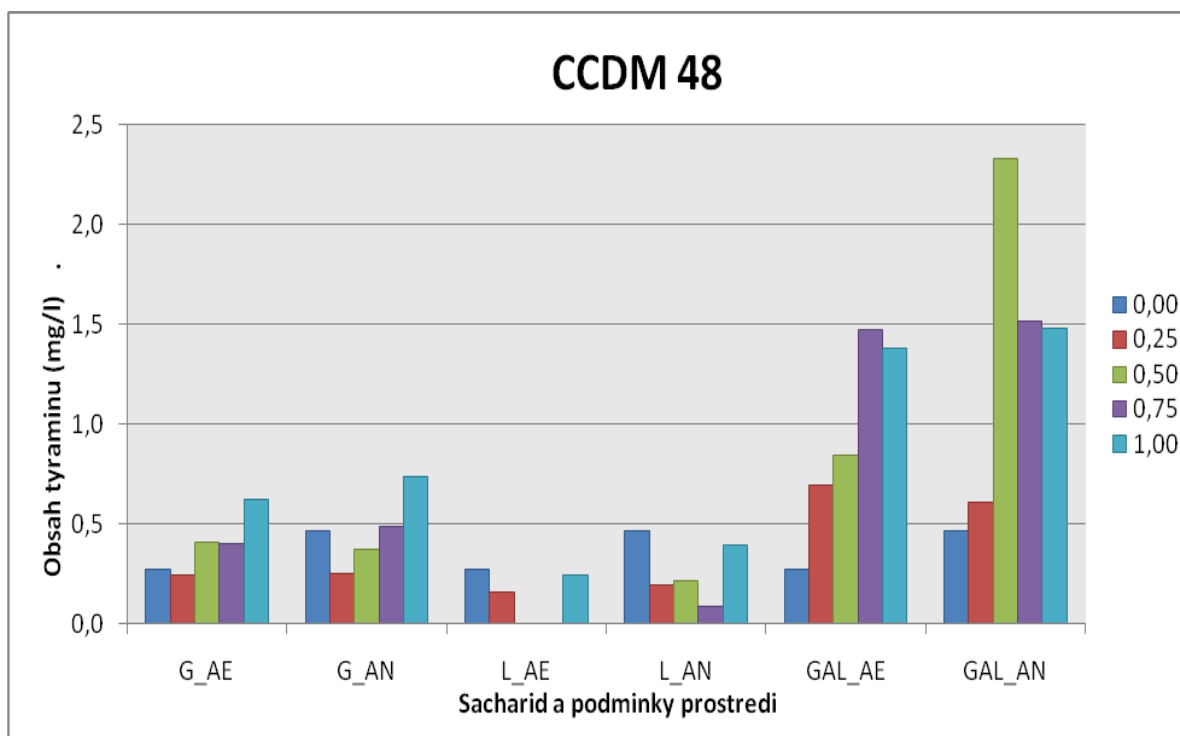
Cukr	koncentrace cukru	pH	
		aerobní	anaerobní
Glukosa	0,25	6,18	6,22
	0,5	5,84	5,84
	0,75	5,20	5,16
	1	4,63	4,60
Laktosa	0,25	6,22	6,20
	0,5	5,91	5,93
	0,75	5,67	5,62
	1	5,30	5,28
Galaktosa	0,25	6,21	6,19
	0,5	5,84	5,81
	0,75	5,52	5,49
	1	5,17	5,15
Kontrola přídavku cukru	0	6,63	6,74

Za aerobních podmínek bylo oproti ostatním testovaným cukrům vytvořeno nejvíce kyseliny z glukosy, a to ve všech koncentracích. Tabulka 6 ukazuje pokles hodnot pH v závislosti na tvorbě kyseliny mléčné. K největší produkci kyseliny došlo v médiu při 1% koncentraci glukosy. Glukosa se stejně jako u předcházejícího kmene jevila jako nejlepší substrát pro tvorbu kyselin u *Lactococcus* sp.. Zároveň u toho cukru došlo k nejmenší produkci tyraminu (u koncentrace cukru 0,50 % a nižší).

Za anaerobních podmínek se tvorba kyseliny lišila. Při koncentraci cukrů 0,25 a 0,50 % se jevila jako vhodný substrát pro produkci kyseliny galaktosa a pro koncentrace 0,75 a 1 % laktosa.

7.1.3 Produkce tyraminu kmenem CCDM 48

Tento kmen byl velmi slabým producentem tyraminu. K největší tvorbě tyraminu u kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 došlo v médiu obohaceném o galaktosu, a to v aerobním i anaerobním prostředí. V anaerobních podmínkách při koncentraci galaktosy 0,50 % byla produkce jednoznačně nejvyšší, přesahovala hodnotu 2 mg.l⁻¹, a mnohonásobně převyšovala produkci aminu v přítomnosti jiných cukrů (obr. 6). V aerobním prostředí u stejné koncentrace bylo vytvořeno 0,854 mg.l⁻¹, tedy zhruba poloviční množství. Galaktosa v médiu v koncentracích 0,75 a 1 % vykazovala zvýšenou tvorbu tyraminu za anaerobních podmínek. Za aerobních podmínek při koncentraci 0,75 a 1 % byla produkce podobná té za anaerobních. Glukosa byla druhým substrátem, v jehož přítomnosti došlo k vyšší produkci, kdy k největší tvorbě tyraminu došlo v přítomnosti cukru o koncentraci 1 %. V anaerobním prostředí bylo detekováno nepatrně vyšší množství tyraminu. Nejnižší produkce aminu byla v médiu s laktosou, kdy u koncentrace 0,50 % nebyl tento amin detekován vůbec. V anaerobních podmínkách bez přítomnosti sacharidu bylo vytvořeno více tyraminu než u ostatních cukrů s výjimkou glukosy a galaktosy v anaerobním prostředí, kdy byla koncentrace stejná.



Obrázek 6: Produkce tyraminu kmenem CCDM 48

Čísla v legendě značí koncentrace sacharidů. G-glukosa, L-laktosa, Gal-galaktosa, AE-aerobní, AN-anaerobní prostředí.

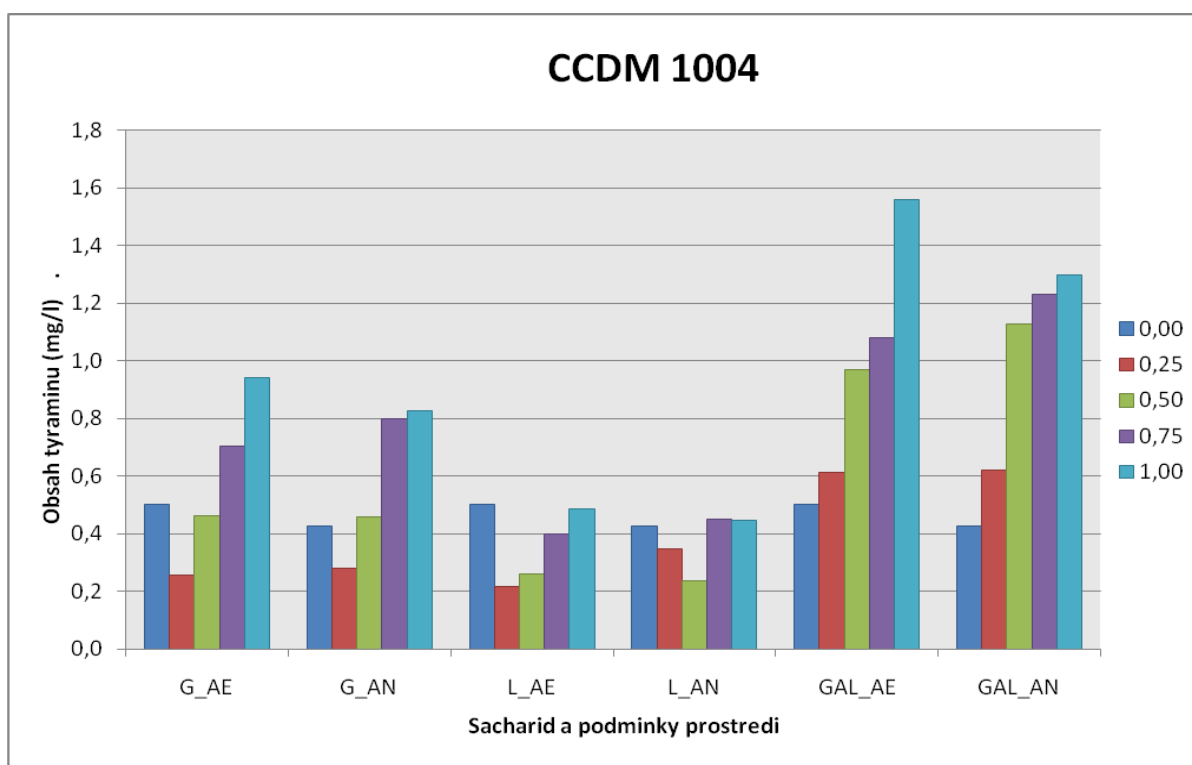
Tabulka 7: Hodnoty pH kultivačního média s přidavkem cukrů pro kultivaci kmene CCDM 48

Cukr	koncentrace cukru	pH	
		aerobní	anaerobní
Glukosa	0,25	6,15	6,15
	0,5	5,58	5,53
	0,75	4,87	4,86
	1	4,85	4,83
Laktosa	0,25	6,12	6,10
	0,5	5,55	5,52
	0,75	5,08	5,04
	1	4,88	4,90
Galaktosa	0,25	6,12	6,15
	0,5	5,66	5,61
	0,75	5,14	5,06
	1	4,96	4,97
Kontrola přídavku cukru	0	6,66	6,68

Kmen CCDM 48 produkoval největší množství kyseliny mléčné v přítomnosti laktosy, a to v koncentracích 0,25 a 0,50 % v aerobním tak i v anaerobním prostředí. U koncentrací 0,75 a 1 % došlo k největšímu poklesu pH u glukosy, rovněž v aerobním a anaerobním prostředí. Galaktosa se ukázala nejhůře utilizovaným cukrem, co se tvorby kyseliny mléčné týče. Ovšem produkce tyraminu v přítomnosti tohoto sacharidu byla největší.

7.1.4 Produkce tyraminu kmenem CCDM 1004

Tento kmen, podobně jako předcházející CCDM 48, produkoval jen velmi malé množství biogenního aminu. Galaktosa se u kmene *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004 ukázala z testovaných sacharidů jako nejvhodnější faktor ovlivňující tvorbu tyraminu, kdy došlo k trojnásobné tvorbě tyraminu ve srovnání s laktosou při stejné koncentraci (obr. 7). V přítomnosti galaktosy o koncentraci 1 % za aerobních podmínek došlo k největší kumulaci sledovaného aminu. Se snižující se koncentrací klesala za aerobních podmínek i produkce tyraminu. Za anaerobních podmínek byla u galaktosy produkce tyraminu nejvyšší u koncentrace 1 % a jen nepatrně nižší u 0,75 %. V přítomnosti glukosy produkovaly laktokoky tohoto kmene nejvíce tyraminu za aerobních podmínek v přítomnosti sacharidu o koncentraci 1 %, což bylo o cca jednu třetinu méně než u galaktosy. V anaerobních podmínkách byl tyramin produkován hlavně v koncentraci 0,75 a 1%, téměř ve stejném množství. V médiu s koncentrací glukosy 0,25 % byla produkce nejnižší (0,25 a 0,28 mg.l⁻¹). V živné půdě bez přítomnosti sacharidu byla detekována vyšší produkce aminu v aerobním a anaerobním prostředí než v případě glukosy o téže koncentraci. K nejnižší produkci tyraminu došlo v přítomnosti laktosy. U média s 1% koncentrací laktosy a půdy bez cukru došlo k nejvyšší, téměř stejné, produkci za aerobních podmínek. Při koncentraci laktosy 0,25 % byla tvorba nejnižší (0,22 mg.l⁻¹). V anaerobních podmínkách byla tvorba téměř stejná u koncentrace 0,75, 1 % a bez přítomnosti laktosy. Nejméně tyraminu bylo vytvořeno v koncentraci 0,50 %.



Obrázek 7: Produkce tyraminu kmenem CCDM 1004

Čísla v legendě značí koncentrace sacharidů. G-glukosa, L-laktosa, Gal-galaktosa, AE-aerobní, AN-anaerobní prostředí.

Tabulka 8: Hodnoty pH kulturačního média s přidavkem cukrů pro kultivaci kmene CCDM 1004

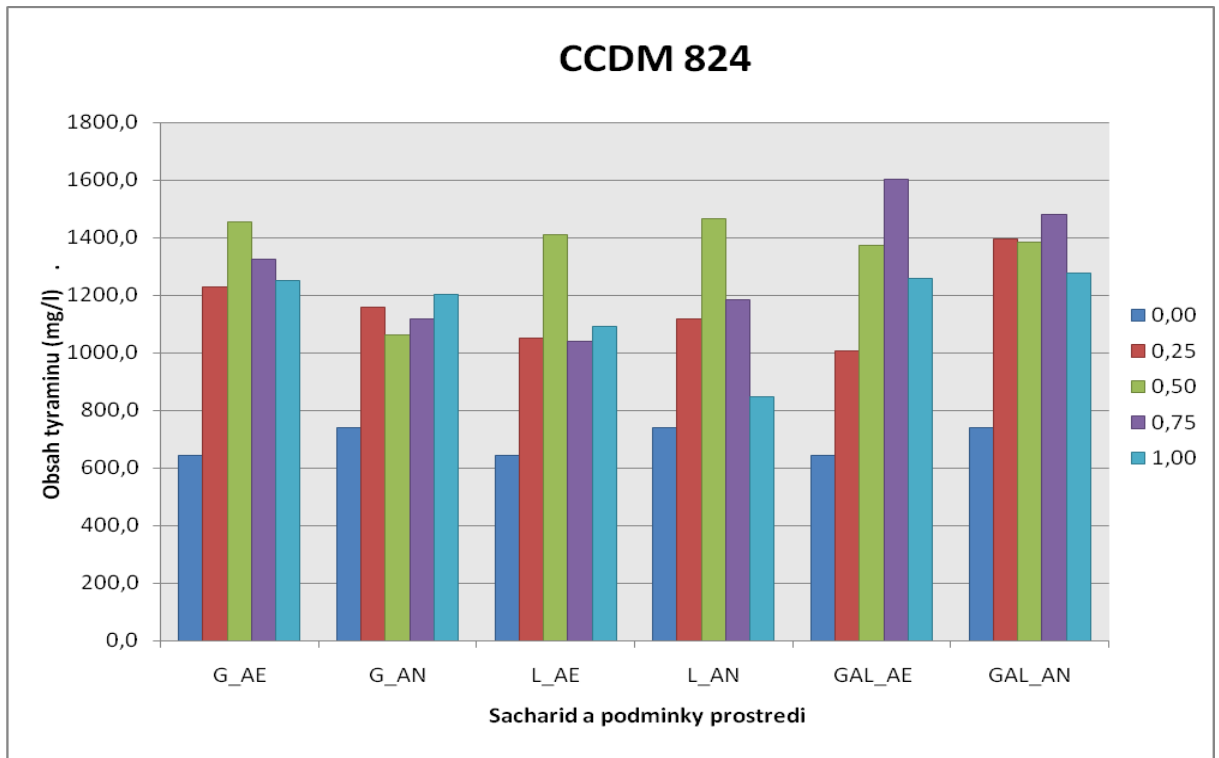
Cukr	koncentrace cukru	pH	
		aerobní	anaerobní
Glukosa	0,25	6,09	6,09
	0,5	5,56	5,52
	0,75	4,84	4,78
	1	4,41	4,39
Laktosa	0,25	6,08	6,08
	0,5	5,50	5,46
	0,75	4,98	4,95
	1	4,77	4,76
Galaktosa	0,25	6,04	6,07
	0,5	5,50	5,43
	0,75	4,96	4,93
	1	4,88	4,81
Kontrola přídavku cukru	0	6,51	6,67

V prostředí bohatém na kyslík docházelo k největší produkci kyseliny mléčné v médiu s galaktosou, a to v koncentracích 0,25 a 0,50 %. Při vyšších koncentracích sacharidů (0,75 a 1 %) byla nejvyšší tvorba kyseliny zaznamenána v přítomnosti glukosy. Laktosa se u tohoto kmene ukázala jako nejméně vhodný substrát pro fermentaci z hlediska tvorby kyseliny, na druhou stranu se jevila jako nejvhodnější cukr, který pozitivně ovlivňoval produkci tyraminu.

7.1.5 Produkce tyraminu kmenem CCDM 824

Tvorba tyraminu u *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 byla největší v přítomnosti galaktosy o koncentraci 0,75 % v aerobním prostředí, méně pak v anaerobním – 1605 a 1481 mg.l⁻¹ (obr. 8). V přítomnosti galaktosy o koncentraci 1 % byla produkce vyrovnaná stejně jako u koncentrace 0,50 %. V prostředí s galaktosou o koncentraci 0,25 % vykazovala tato bakterie v anaerobním prostředí o zhruba 300 mg.l⁻¹ vyšší produkci aminu než v přítomnosti kyslíku. Poměrně stejných produkcí tohoto aminu bylo dosaženo u glukosy a laktosy, kdy k nejvyšší produkci došlo v aerobním prostředí s glukosou o koncentraci 0,50 % a anaerobním prostředí s laktosou ve stejné koncentraci. V aerobním prostředí s laktosou o koncentraci 0,50 % byla produkce tyraminu nižší jen asi o 50 mg.l⁻¹ než v anaerobních podmínkách. Velmi málo se lišilo množství vyprodukovaného aminu v médiu s glukosou v koncentraci 0,25 % v aerobním a anaerobním prostředí.

V případě laktosy byla v koncentraci 0,25 % tvorba nižší než u glukosy, ale vyšší než u galaktosy. Nejvíce aminu v nepřítomnosti cukru bylo nahromaděno u glukosy a galaktosy v anaerobních podmínkách, 741 mg.l⁻¹.



Obrázek 8: Produkce tyraminu kmenem CCDM 824

Čísla v legendě značí koncentrace sacharidů. G-glukosa, L-laktosa, Gal-galaktosa, AE-aerobní, AN-anaerobní prostředí.

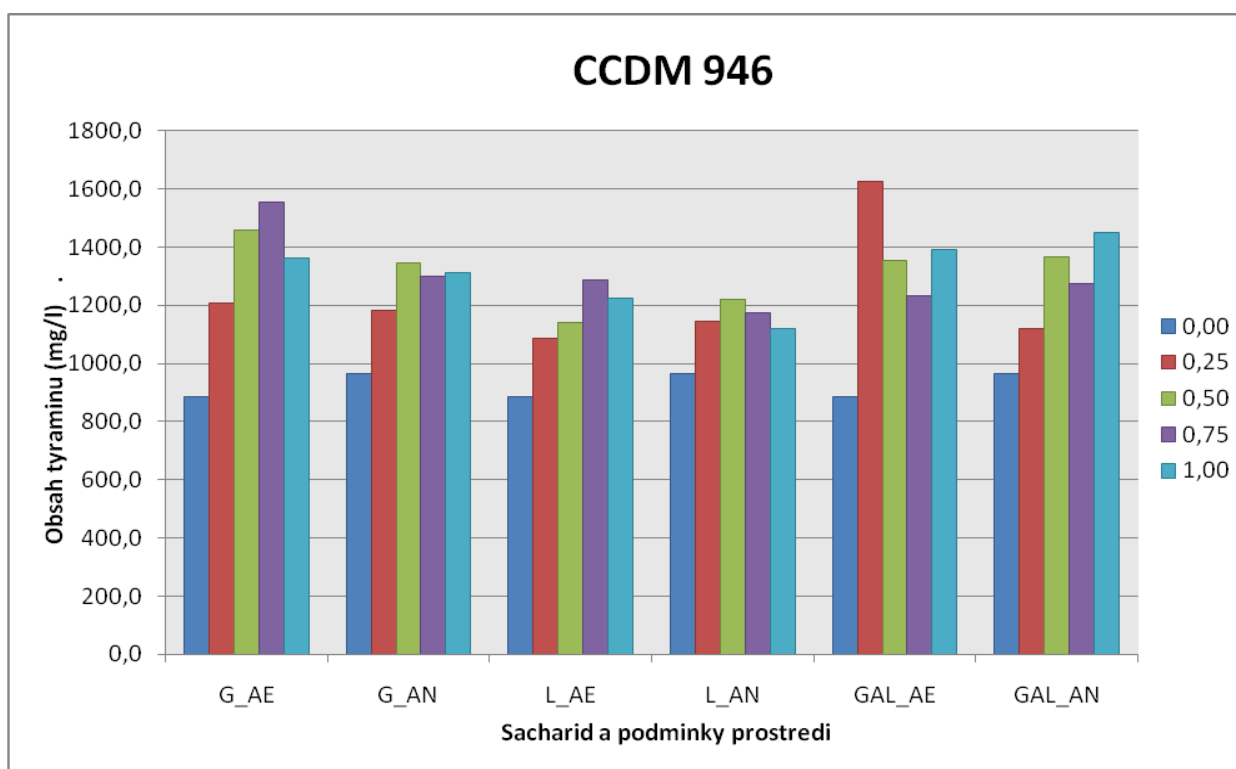
Tabulka 9: Hodnoty pH kulturačního média s přidavkem cukrů pro kultivaci kmene CCDM 824

Cukr	koncentrace cukru	pH	
		aerobní	anaerobní
Glukosa	0,25	6,20	6,22
	0,5	5,83	5,82
	0,75	5,14	5,13
	1	4,65	4,63
Laktosa	0,25	6,43	6,37
	0,5	6,04	5,99
	0,75	5,54	5,52
	1	5,30	5,22
Galaktosa	0,25	6,14	6,18
	0,5	5,95	5,88
	0,75	5,70	5,67
	1	5,40	5,32
Kontrola přídavku cukru	0	6,64	6,67

V případě kmene CCDM 824 se jako nejvhodnější substrát pro tvorbu kyseliny mléčné za aerobních podmínek ukázala galaktosa v koncentraci 0,25 %. U koncentrací sacharidů 0, 50; 0,75 a 1 % byla vhodnějším substrátem glukosa. Laktosa se v tomto případě jevila jako nejméně vhodný zdroj pro produkci kyseliny mléčné. V anaerobním prostředí bylo dosaženo stejných výsledků, čili v koncentraci 0,25 % galaktosy došlo k největšímu poklesu pH, zatímco u vyšších koncentrací byla vhodnějším cukrem glukosa.

7.1.6 Produkce tyraminu kmenem CCDM 946

Kmen *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 produkoval největší množství tyraminu v prostředí s galaktosou o koncentraci 0,25 % v přítomnosti kyslíku. Tato produkce až o třetinu převyšovala detekované množství tyraminu v kultivačním médiu s ostatními sacharidy (obr. 9). V anaerobním prostředí a při téže koncentraci sacharidu byl amin vytvořen v dosti menším množství. Při koncentraci 0,50 % tohoto cukru došlo téměř ke stejné tvorbě tyraminu jak v aerobních tak anaerobních podmínkách, stejně jako při dalších při dalších použitých koncentracích (0,75 a 1 %) s tím, že ne nepatrně vyšší produkce byla detekována v anaerobním prostředí. V půdě bez přítomnosti cukru docházelo k větší tvorbě tyraminu v anaerobních podmínkách. Glukosa vytvářela vhodnější prostředí pro formaci aminu než laktosa, avšak rozdíly v jeho produkci nejsou nikterak významné. Velký rozdíl byl u glukosy v koncentraci 0,75 % za přítomnosti kyslíku, kdy došlo k vysoké formaci tohoto aminu – 1552 mg.l⁻¹. Koncentrace glukosy 0,50 % a aerobní prostředí rovněž poskytovalo vhodné podmínky pro zvýšenou tvorbu tyraminu. Glukosa za anaerobních podmínek v koncentracích 0,75 a 1 % vykazovala téměř podobné podmínky tvorby aminu. U laktosy byl zaznamenán vyšší nárůst aminu v aerobním prostředí u koncentrace 0,75 % a 1 % než v anaerobním, zatímco u koncentrací 0,50; 0,25 % a bez přítomnosti cukru bylo množství tyraminu vyšší v anaerobním prostředí.



Obrázek 9: Produkce tyraminu kmenem CCDM 946

Čísla v legendě značí koncentrace sacharidů. G-glukosa, L-laktosa, Gal-galaktosa, AE-aerobní, AN-anaerobní prostředí.

Tabulka 10: Hodnoty pH kultivačního média s přidavkem cukrů pro kultivaci kmene CCDM 946

Cukr	koncentrace cukru	pH	
		aerobní	anaerobní
Glukosa	0,25	6,03	6,03
	0,5	5,71	5,66
	0,75	5,04	5,00
	1	4,63	4,56
Laktosa	0,25	5,92	5,92
	0,5	5,54	5,50
	0,75	5,25	5,19
	1	5,05	5,06
Galaktosa	0,25	5,86	5,92
	0,50	5,49	5,40
	0,75	5,36	5,32
	1	5,26	5,26
Kontrola přídavku cukru	0	6,27	6,33

Galaktosa se v aerobním prostředí a koncentracích 0,25 a 0,50 % ukázala jako vhodný substrát pro tvorbu kyseliny mléčné. Při koncentraci cukru 0,75 a 1 % se jako vhodnější zdroj fermentace jevila glukosa. Laktosa se ukázala jako méně vhodný zdroj pro tvorbu kyseliny mléčné.

7.2 Souhrnná diskuze

Tato práce si kladla za cíl sledovat dekarboxylasovou aktivitu 6 technologicky důležitých kmenů *Lactococcus* sp. Z důvodů absence studií vlivu podmínek prostředí na produkci biogenních aminů u laktokoků a také proto, že se jedná o technologicky významné bakterie hojně využívané v mlékárenství, jsme sledovali vliv vybraných sacharidů a aerobiózy/anaerobiózy na dekarboxylázovou aktivitu tyramin pozitivních bakterií rodu *Lactococcus*.

Produkty dekarboxylace aminokyselin jsou biogenní aminy, přičemž cílem práce bylo sledovat množství vzniklého tyraminu. Živné půdy byly kultivovány v různých podmínkách (aerobní x anaerobní) a s přísadkou sacharidů glukosy, laktosy a galaktosy v koncentracích 0,25; 0,50; 0,75; 1 % a bez přísadky sacharidu. Dalším sledovaným znakem byla produkce kyseliny mléčné, která se stanovovala jednoduchou metodou měřením pH.

Ze tří sledovaných kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (CCDM 53, CCDM 141, CCDM 48) byl nejproduktivnější kmen *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53, který za aerobních podmínek v přítomnosti glukosy o koncentraci 0,50 % vytvořil až 2750 mg.l⁻¹ tyraminu. Podle Buňkové *et al.* [51] byl nejproduktivnější kmen *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, u kterého byla zjištěna tvorba 790 mg.l⁻¹ tyraminu [51]. Rozdíl ve výsledku v produkci může být dán jiným složením půdy, kdy byl bujón M17 obohacen o 2 % NaCl, a teplotou kultivace, která byla 10 ± 1 °C.

Hlobilová [49] označila kmen CCDM 53 rovněž jako největšího producenta tyraminu. V obou studiích byla do kultivačního média M17 přidávána laktosa v koncentraci 0,5 %.

V přítomnosti ostatních sacharidů byla produkce aminu velmi podobná a nikterak významně se ani neprojevil vliv aerobního a anaerobního prostředí. Největší množství kyseliny mléčné bylo kmenem CCDM 53 tvořeno při 1% obsahu sacharidů. Jako vhodnější

prostředí pro tvorbu kyseliny bylo označeno anaerobní prostředí, kde byl oproti aerobnímu znatelný rozdíl v poklesu pH. Nejvhodnějším zdrojem uhlíku byla glukosa, která byla laktokoky nejlépe využita, avšak v její přítomnosti, pravděpodobně z důvodu rychlé utilizace tohoto sacharidu a rychlého růstu, tvořily testované bakterie nejvíce tyraminu, což je technologicky nevýhodné. Vhodnější se proto jeví přítomnost galaktosy jako utilizovatelného zdroje, protože v tomto případě byla zaznamenána nižší produkce aminu a zároveň poskytla více kyseliny než laktosa.

Druhým nejproduktivnějším kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* byl *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141. Tento kmen vytvořil až 1372 mg.l^{-1} tyraminu, což je o polovinu méně než u *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53. Na rozdíl od předchozího kmene tento vykazoval vyšší produkci i v přítomnosti ostatních cukrů v obou podmínkách, tzn. v přítomnosti kyslíku i bez jeho přístupu. K největší produkci docházelo při vyšších testovaných koncentracích sacharidů (0,75 a 1 %). V případě 0,25% galaktosy kultivované bez přítomnosti kyslíku byla formace aminu vyšší než v předchozích dvou koncentracích, ovšem jen bez přístupu kyslíku. Kontrolní půdy, bez přídavku cukru, vykazovali až 30 x menší obsah sledovaného aminu. Tvorba kyseliny mléčné byla největší za anaerobních podmínek. Rozdíly mezi aerobním a anaerobním prostředím nejsou příliš velké, a proto může být tento kmen vhodně použit pro fermentace v prostředí bohatém na kyslík i prostředí bez kyslíku. Jako nejvhodnější substrát pro tvorbu kyseliny mléčné se ukazuje glukosa, kde došlo k prokazatelně nejvyšší produkci kyseliny. V koncentracích sacharidu 0,25 a 0,50 % může být kmen CCDM 141 použit pro technologické účely bez rizika velké tvorby tyraminu.

Nejméně produktivním kmenem byl *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* byl *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, což potvrzuje i studie Hlobilové [49]. Maximální tvorba tyraminu nepřekročila hodnotu $2,3 \text{ mg.l}^{-1}$ a to v přítomnosti galaktosy o koncentraci 0,50 % a bez přístupu kyslíku. V přítomnosti ostatních cukrů byla zjištěna mnohonásobně menší produkce tyraminu, pokud byl tento kmen kultivován v médiu s přídavkem laktosy v koncentraci 0,75 % (za aerobních podmínek) nedošlo dokonce k žádné produkci tyraminu. Vhodným substrátem pro tvorbu kyseliny byla glukosa a laktosa, které okyselovaly prostředí zhruba stejným způsobem, a to bez rozdílu přístupnosti kyslíku

Kmen *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 se ukázal jako nejvhodnějším pro technologické použití. Jednak byl jednoznačně nejmenším producentem tyraminu a navíc utilizoval sacharidy za největší produkce kyseliny mléčné.

Další sledovanou skupinou byly kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (CCDM 1004, CCDM 824, CCDM 946). *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 vyprodukoval až 1626 mg.l^{-1} , což bylo největší množství tyraminu ze všech tří sledovaných kmenů poddruhu *cremoris*. Tato hodnota byla jen o 21 mg.l^{-1} vyšší než množství, které vytvořil *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824. Kmeny CCDM 946 a CCDM 824 byly velmi silnými producenty tyraminu a množství tyraminu se navzájem příliš nelišila. Patrný byl rozdíl zejména v médiích bez cukru, kdy kmen CCDM 946 tvořil cca o třetinu více tyraminu. Při koncentraci sacharidů 0,50 % docházelo k vyšší tvorbě u kmene CCDM 824. Výsledky se příliš nelišily oproti výsledkům Buňkové *et. al.* [51], která došla k závěru, že kmen CCDM 824 tvořil méně tyraminu než kmen CCDM 946, kultivace a složení živné půdy však byly jiné než v tomto experimentu. K jiným výsledkům došla Hlobilová [49], která označila kmen CCDM 824 za více produktivní než CCDM 946.

Vliv kyslíku nikterak významně neovlivnil produkci kyseliny mléčné u kmene CCDM 824. Rozdíly byly velmi nepatrné. Nejvhodnějším sacharidem pro produkci kyseliny mléčné se ukázala být jednoznačně glukosa, kdy došlo k největšímu poklesu pH. Galaktosa se ukázala jako méně vhodná než glukosa, ale vhodnější než laktosa.

Kmen CCDM 946 rovněž preferoval jako zdroj uhlíku pro fermentační procesy glukosu. Preferováno bylo anaerobní prostředí. Galaktosa se u tohoto kmene ukázala jako nejméně vhodný metabolizovatelný sacharid.

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* CCDM 1004 produkoval tyramin, podobně jako kmen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, ve velmi malém množství, ze sledované skupiny laktokoků byl nejméně tyramin produktivním kmenem. Nejvíce tyraminu, cca $1,6 \text{ mg.l}^{-1}$, vytvořil v prostředí s 1% koncentrací galaktosy a přítomnosti kyslíku. U laktosy stejné koncentrace bylo množství vyprodukovaného aminu až trojnásobně nižší a o jednu třetinu nižší bylo i v přítomnosti glukosy. Nejméně tyraminu bylo vytvořeno v bujónu M17 obohaceném o laktosu, která se tak jeví jako nejlepší sacharid pro použití v průmyslu s kombinací s touto kulturou. Nejvíce kyseliny mléčné vzniklo u glukosy v koncentraci 1

%, množství aminu při této koncentraci bylo však vyšší. CCDM 1004 vytvořil při této koncentraci z laktosy mnohem méně tyraminu a dostatek kyseliny mléčné.

Bover-Cid *et al.* [52] nezjistili výraznější vliv dostupnosti glukosy na produkci tyraminu u *Lb. curvatus*, přičemž mírně vyšší produkce byla zaznamenána v prostředí s vyšší koncentrací glukosy. Rovněž Connil *et al.* [53] poukazují na to, že zvyšující se koncentrace glukózy nemá výrazný vliv na produkci tyraminu u bakterií rodu *Carnobacterium*. Vliv různých koncentrací sacharidů na produkci biogenních aminů však nebyl u bakterií mléčného kvašení podle dostupné literatury popsán.

Syntéza a aktivita dekarboxyláz může být ovlivňována také prostřednictvím pH prostředí [52,54,56]. Aktivita dekarboxylas a tím i množství výsledného produktu, může být zvýšena tehdy, pokud dojde vlivem vyšší produkce kyseliny mléčné k okyselení kultivačního prostředí. Fernández *et al.* [57] sledovali produkci tyraminu u *Enterococcus durans* za různých podmínek pH, kteří došli k závěrům, že na produkci biogenních aminů má pouze malý vliv použitý zdroj uhlíku (glukosa, galaktosa, laktosa, sacharosa), přičemž rozdíly v produkci tyraminu byly pozorovány v závislosti na pH, pokud byly použity různé sacharidy. Gardini *et al.* [55] sledovali vliv arabinosy na produkci tyraminu u *Oenococcus oeni* a pozorovali trend, že do určité koncentrace sacharidu (do 1 %) dochází ke zvyšování produkce tyraminu a poté, co dojde k překročení určité koncentrace sacharidu, se již množství biogenního snižuje. Podobný jev zaznamenali i Arena *et al.* [58] u *Lactobacillus plantarum* s přidavkem glukosy a fruktosy. Lze tedy vyslovit hypotézu, že existuje optimální pH prostředí, ve kterém lze zaznamenat maximální tvorbu biogenních aminů.

Nejvhodnějšími kmeny pro průmyslové použití se ukázaly *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004. Oba kmeny produkovali mnohonásobně nižší množství sledovaného aminu, který při vyšších koncentracích může způsobovat zdravotní problémy.

ZÁVĚR

Cílem práce bylo sledovat tvorbu biogenního aminu tyraminu bakteriemi mléčného kvašení. Dále byla sledována tvorba kyseliny mléčné. K této studii bylo použito 6 kmenů bakterií mléčného kvašení, z toho 3 kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (CCDM 48, CCDM 53, CCDM 141) a 3 kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (CCDM 824, CCDM 946, CCDM 1004).

V potravinách rostlinného původu se aminy nejčastěji vyskytují v zelenině, ovoci, víně a pivu. U potravin živočišného původu je to nejčastěji maso, mléčné výrobky a ryby. Obecně se dá říct, že se vyskytují všude tam, kde proběhl proces fermentace.

Stanovení aminů v potravinách je důležité především z důvodů jejich toxicity na lidský organismus a také lze z jejich obsahu usuzovat kvalitu potravin. Pro jejich stanovení byla vyvinuta řada metod. V této práci byly aminy stanovovány pomocí iontově-výměnné chromatografie.

Všechny sledované kmeny produkoval tyramin, jehož množství bylo závislé na podmínkách prostředí (aerobní nebo anaerobní) a na koncentraci a přítomnosti sacharidů glukosy, galaktosy a laktosy.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SMĚLÁ, D., PECHOVÁ, P., KOMPRDA, T., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. *Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování*. Chem. Listy, 2004, vol. 98, p. 432–437.
- [2] SANTOS, S. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, vol. 29, p. 213–231.
- [3] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin I*. 3rd ed. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [4] MAIJALA, R.L. *Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar*. Lett. Appl. Microbiol., 1993, vol. 17, p. 40–43.
- [5] FERNÁNDEZ, M., LINARES, D., ALVAREZ, M. *Sequencing of the Tyrosine Decarboxylase Cluster of Lactococcus lactis IPLA 655 and the Development of a PCR Method for Detecting Tyrosine Decarboxylating Lactic Acid Bacteria*. J. Food Prot., 2004, vol. 67, no. 11, p. 2521–2529.
- [6] KOHAJDOVÁ, Z., KAROVIČOVÁ, J., GREIF, G. *Biogénne aminy v potravinách*. Potravinárstvo [online]. 2008, vol. 2, no. 1, p. 30–49. Available from http://www.potravinarstvo.com/dokumenty/potravinarstvo_no1_2008.pdf.
- [7] SHALABY, A. *Significance of biogenic amines to food safety and human health*. Food Res. Int., 1997, vol. 29, no. 7, p. 675–690.
- [8] DADÁKOVÁ, E., KŘÍŽEK, M., PELIKÁNOVÁ, T. *Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC)*. Food Chem., 2009, vol. 116, p. 365–370.
- [9] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin 2*. 3rd ed. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [10] *Bezpečnost potravin: Biogenní aminy* [online]. 2010 [cit. 2010-02-13]. Dostupné z WWW: <<http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=76472>>.
- [11] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ, P. *Potravinářská biochemie II*. 1st ed. 2007. ISBN 80-7318-395-1.

- [12] SANTOS, W., SOUZA, M., CERQUEIRA, M., GLO'RIA, M. *Bioactive amines formation in milk by Lactococcus in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C*. Food Chem., 2003, vol. 81, p. 595–606.
- [13] DRÁČKOVÁ, M., et al. *Determination of polyamine content in curd cheese by near-infrared reflectance spectrometry*. Acta fytotechnica et zootechnica, 2009, p. 121–126.
- [14] FERNÁNDEZ, M., LINARES, D., RODRÍGUEZ, A., ALVAREZ, M. *Factors affecting tyramine production in Enterococcus durans IPLA 655*. Applied microbial and cell physiology, 2007, vol. 73, p. 1400–1406.
- [15] ROGINSKI, H.; FUQUAY, J.W.; FOX, P.F. *Encyclopedia of dairy sciences*. London: Academic press, 2002. ISBN 0-12-227235-8.
- [16] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. *Chemie potravin*. 1st ed. Praha 1: Nakladatelství technické literatury, 1983.
- [17] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., HLOBILOVÁ, M., VAŇÁTKOVÁ, Z., NOVÁKOVÁ, D., DRÁB, V. *Tyramine production of technological important strains of Lactobacillus, Lactococcus and Streptococcus*. Eur Food Res Technol, 2009, vol. 229, p. 533–538
- [18] KORDIOVSKÁS, P., VORLOVÁ, P., KARPIŠKOVÁ, R., LUKÁŠOVÁ, J. *Potential risk of biogenic amine formation in carp muscle (Cyprinus carpio)*. 2004,
- [19] LANGE, J., THOMAS, K., WITTMANN, Ch. *Comparison of a capillary electrophoresis method with highperformance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples*. J. Chromatogr., B, 2002, vol. 779, p. 229–239.
- [20] FADDA, S., VIGNOLO, G., OLIVER, G. *Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and Kocuria strains*. Biotechnology Letters, 2001, vol. 23, p. 2015–2019.
- [21] STANDAROVÁ, E; BORKOVCOVÁ, I; VORLOVÁ, L. *Vetweb : Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě* [online]. 2008 [cit. 2010-02-13]. Dostupné z WWW: <<http://www.vetweb.cz/projekt/clanek.asp?pid=2&cid=5760>>.

- [22] LUCAS, P., LANDETE, J., COTON, M., COTON, E., LONVAUD-FUNEL, A. *The tyrosine decarboxylase operon of Lactobacillus brevis IOEB 9809: characterization and conservation in tyramine-producing bacteria*. FEMS Microbiol. Lett., 2003, vol. 229, p. 65–71.
- [23] EDWARDS, S., SANDINE, W. *Microbial metabolites of importance in dairy products*. J. Dairy Sci., 1981, vol. 64, no. 12, p. 2431–2438.
- [24] TAKAHASHI, H., KIMURA, B., YOSHIKAWA, M., FUJII, T. *Cloning and Sequencing of the Histidine Decarboxylase Genes of Gram-Negative, Histamine-Producing Bacteria and Their Application in Detection and Identification of These Organisms in Fish*. Appl. Environ. Microbiol., 2003, vol. 69, no. 5, p. 2568–2579.
- [25] HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W. *Biogenic amines and their production by microorganisms in food*. Trends Food Sci. Technol., 1994, vol. 5, p. 42–49.
- [26] LANDETE, J., RIVAS, B., MARCOBAL, A., MUÑOZ, R. *Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods*. Int. J. Food Microbiol., 2007, vol. 117, p. 258–269.
- [27] KANKI, M., YODA, T., TSUKAMOTO, T., BABA, E. *Histidine Decarboxylases and Their role in accumulation of histamine in tuna and dried saury*. Appl. Environ. Microbiol., 2007, vol. 73, no. 5, p. 1467–1473.
- [28] KEBARY, K., EL-SONBATY, A., BADAWI, R. *Effects of heating milk and accelerating ripening of low fat Ras cheese on biogenic amines and free amino acids development*. Food Chem., 1999, vol. 64, p. 67–75.
- [29] NOVELLA-RODRÍGUEZ, S., VECIANA-NOGUÉS, M.T., ROIG-SAGUÉS, A.X., TRUJILLO-MESA, A.J., VIDAL-CAROU, M.C. *Influence of starter and nonstarter on the formation of biogenic amine in goat cheese during ripening*. J. Dairy Sci., 2002, vol. 85, p. 2471–2478.
- [30] GONZÁLES DE LIANO, D., CUESTA, P., RODRÍGUES, A. *Biogenic amine production by wild lactococcal and leuconostoc strains*. Lett. Appl. Microbiol., 1998, vol. 26, p. 270–274.

- [31] COTON, E., COTON, M. *Evidence of horizontal transfer as origin of strain to strain variation of the tyramine production trait in Lactobacillus brevis*. Food Microbiol., 2009, vol. 26, p. 52–57.
- [32] LEUSCHNER, R.G., HEIDEL, M., HAMMES, W.P. *Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms*. Int. J. Food Microbiol., 1998, vol. 39, p. 1–10.
- [33] STRATIL, P., KUBÁŇ, V. *Exogenní karcinogeny v potravinách a karcinogeny vznikající při jejich technologickém zpracování*. Chem. Listy, 2005, vol. 99, p. 3–12.
- [34] SMĚLÁ, D., PECHOVÁ, P., KOMPRDA, T., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. *Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování*. Chem. Listy, 2004, vol. 98, p. 432–437.
- [35] FLASAROVÁ, R. *Vliv délky skladování na obsah biogenních aminů v plísňových sýrech*. Bakalářská práce, Univerzita Tomáš Bati ve Zlíně, 31.5.2009.
- [36] *Papírová a tenkovrstvá chromatografie* [online]. 2010 [cit. 2010-02-13]. Dostupné z WWW: <<http://fch.upol.cz/skripta/zfcm/chrom/chrom.pdf>>.
- [37] PODEŠVOVÁ, T. *Dekarboxylázová aktivita mikroorganismů*. Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 31.5.2008.
- [38] *Stanovení aminokyselin v krmivech* [online]. 2010 [cit. 2010-02-15]. Dostupné z WWW: <<http://hplc1.sweb.cz/Amk/amk.htm>>.
- [39] TORRIANI, S., GATTO, V., SEMBENI, S., TOFALO, R., SUZZI, G., BELLETTI, N., GARDINI, F., BOVER-CID, S. *Rapid detection and quantification of tyrosine decarboxylase gene (tdc) and its expression in gram-positive bacteria associated with fermented foods using PCR-based methods*. J. Food Prot., 2008, vol. 71, no. 1, p. 93–101.
- [40] HLOBILOVÁ, M. *Využití metod molekulární biologie při zkoumání kvality potravin*: Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 4.6.2007.
- [41] *Metody molekulární biologie* [online]. 2010 [cit. 2010-03-25]. Dostupné z WWW: <http://www.kbi.zcu.cz/studium/ftp/mobi10.pdf>

- [42] *Základy mikrobiologie* [online]. 2010 [cit. 2010-03-25]. Dostupné z WWW: <http://uiozp.ft.utb.cz/uiozp/studmat/2008218104649/Obecmikrowww3.pdf>
- [43] GORNER, F., VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. 1st ed. 2004. ISBN 80-967064-97.
- [44] SALMINEN, S., WRIGHT, A., OUWEHAND, A. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* [online]. New York, [cited 09 April 2010]. Available from: <http://books.google.com/books?id=-1UIyEbW3ccC&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>.
- [45] DOLEŽÁLEK, J. *Mikrobiologie mlékárenského a tukařského průmyslu*. 1st ed. Praha 1: Státní nakladatelství technické literatury, 1962
- [46] ŠROUBKOVÁ, E. *Technická mikrobiologie*. 1st ed. 1996. ISBN 80-7157-226-8. ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2nd ed. 1995. ISBN 80-85605-71-6.
- [47] *Konzervace a balení potravin* [online]. 2010 [cit. 2010-1-12]. Dostupné z WWW: <http://utb.cepac.cz/>
- [48] *Potravinářská mikrobiologie III – Mikrobiologie vybraných potravin* [online]. 2010 [cit. 2010-1-12]. Dostupné z WWW: <http://utb.cepac.cz/>
- [49] HLOBILOVÁ, M. *Srovnání metod pro detekci biogenních aminů u bakterií mléčného kvašení*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008
- [50] ONER, Z., SAGDIC, O., SIMSEK, B.: *Lactic acid bacteria profiles and tyramine and tryptamine contents of Turkish tulum cheeses*, European Food Research and Technology, 219, 455-459, 2004.
- [51] BUŇKOVÁ, L., et al. *Vliv aerobního/anaerobního prostředí na dekarboxylázovou aktivitu vybraných bakterií mléčného kvašení*. Potravinářství, 2010, vol. 4, p. 5–7.
- [52] BOVER-CID, S., MIGUÉLEZ-ARRIZADO, M. J., BECKER, B., HOLZAPFEL, W. H., VIDAL-CAROU, M. C. (2008). *Amino acid decarboxylation by Lactobacillus curvatus CTC273 affected by the pH and glucose availability*. Food Microbiology, 25, 269-277, 2008.

- [53] CONNIL, N., PLISSONEAU, L., ONNO, B., PILET, M. F., PREVOST, H., DOUSSET X. *Growth of Carnobacterium divergens V41 and production of biogenic amines and divercin V41 in sterile cold-smoked salmon extract at varying temperatures, NaCl levels and glucose concentrations*. Journal of Food Protection, 65, 333-338, 2002.
- [54] GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CARUSO, M. C., GALGANO, F., CRUDELA, M. A., FAVATI, F., GUERZONI, M. E., SUZZI, G. *Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of Enterococcus faecalis*. International Journal of Food Microbiology, 64, 105-117, 2001.
- [55] GARDINI, F., ZACCARELLI, A., BELLETTI, N., FAUSTINI, F., CAVAZZA, A., MARTUSCELLI, M., MASTROCOLA, D., SUZZI, G. *Factors influencing biogenic amine production by a strain of Oenococcus oeni in a model system*. Food Control, 16, 609-616, 2005.
- [56] GREIF, G., GREIFOVÁ, M., KAROVIČOVÁ, J. *Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by Enterobacter spp. bacteria in model conditions*. Journal of Food and Nutrition Research, 45, 21-29, 2006.
- [57] FERNÁNDEZ, M., LINARES, D. M., RODRÍGUEZ, A., ALVAREZ, M. A. *Factors affecting tyramine production in Enterococcus durans IPLA 655*. Applied Microbiology and Biotechnology, 73, 1400-1406, 2007.
- [58] ARENA, M. E., FIOCCO, D., MANCA DE NADRA, M.bC., PARDO, I., SPANO, G. (2007). *Characterization of a Lactobacillus plantarum strain able to produce tyramine and partial cloning of a putative tyrosine decarboxylase gene*. Current Microbiology, 55, 205-210, 2007.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BA	Biogenní aminy
AK	Amino kyseliny
MO	Mikroorganismy
BMK	Bakterie mléčného kvašení
MAOI	Monoaminoxidasové inhibitory
MAO	Monoaminoxidasa
DAO	Diaminoxidasa
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
IEC	Chromatografie na iontoměničích
GC	Plynová chromatografie
PCR	Polymerázová řetězová reakce
TCA	Kyselina trichloroctová
OPA	<i>o</i> -ftaldialdehyd
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
FT-NIR	Blízká infračervená reflektanční spektrometrie s Fourierovou detekcí
DNA	Deoxyribonukleová kyselina

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Přehled strukturních vzorců biogenních aminů.....	13
Obrázek 2: Metabolické dráhy vzniku biogenních aminů	15
Obrázek 3: Dekarboxylace aminokyselin	17
Obrázek 4: Produkce tyraminu kmenem CCDM 53	35
Obrázek 5: Produkce tyraminu kmenem CCDM 141	37
Obrázek 6: Produkce tyraminu kmenem CCDM 48.....	39
Obrázek 7: Produkce tyraminu kmenem CCDM 1004.....	41
Obrázek 8: Produkce tyraminu kmenem CCDM 824.....	43
Obrázek 9: Produkce tyraminu kmenem CCDM 946.....	45

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Triviální a systematické názvy nejdůležitějších BA včetně enzymů	13
Tabulka 2: Faktory ovlivňující dekarboxylasovou aktivitu mikroorganismů	16
Tabulka 3: Obsah hlavních aminů a polyaminů v potravinách	20
Tabulka 4: Složení sodnocitrátových pufrů při detekci biogenních aminů (složení uvedeno v gramech na celkový objem pufru 1 l).	33
Tabulka 5: Hodnoty pH kultivačního média s přidavkem cukrů pro kultivaci kmene CCDM 53	35
Tabulka 6: Hodnoty pH kultivačního média s přidavkem cukrů pro kultivaci kmene CCDM 141	37
Tabulka 7: Hodnoty pH kultivačního média s přidavkem cukrů pro kultivaci kmene CCDM 48	39
Tabulka 8: Hodnoty pH kultivačního média s přidavkem cukrů pro kultivaci kmene CCDM 1004	41
Tabulka 9: Hodnoty pH kultivačního média s přidavkem cukrů pro kultivaci kmene CCDM 824	43
Tabulka 10: Hodnoty pH kultivačního média s přidavkem cukrů pro kultivaci kmene CCDM 946	45