

# **Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů u bakterií s dieteticko-léčebnými účinky**

Bc. Khatantuul Purevdorj

---

Diplomová práce  
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie potravin  
akademický rok: 2012/2013

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Khatantuul PUREVDORJ  
Osobní číslo: T11130  
Studijní program: N2901 Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin  
Forma studia: prezenční

Téma práce: Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů u bakterií s dieteticko-léčebnými účinky

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Charakteristika bakterií s dieteticko-léčebnými účinky.
2. Produkce biogenních aminů bakteriemi s dieteticko-léčebnými účinky.
3. Metody stanovení biogenních aminů.

### II. Praktická část

1. Stanovení přítomnosti genů pro produkci biogenních aminů metodou PCR.
2. Chromatografické stanovení biogenních aminů.
3. Vyhodnocení výsledků PCR a chromatografického stanovení biogenních aminů.
4. Diskuze získaných výsledků a formulace závěru.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] ŠMARDA, J.; DOŠKAŘ, J.; PANTŮČEK, R.; RŮŽIČKOVÁ, V.; KOPTÍKOVÁ, J. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 194 s. ISBN 80-210-3841-1.
- [2] BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W.H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of food Microbiology*, roč. 53, 1999, s. 33-41. ISSN 0168-1605.
- [3] SILLA SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of food Microbiology*, roč. 29, 1996, s. 213-231. ISSN 0168-1605.
- [4] CONSTANTINI, A.; DORIA, F.; VAUDANO, E.; GARCIA-MORUNO, E. Chemical a molecular methods for the control of biogenic amine production by microorganisms. *Annals of Microbiology*, roč. 61, 2011, s. 173-178. ISSN 1590-4261.
- [5] KOČÁREK, E. *Molekulární biologie v medicíně*. 1. vyd. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2007. 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4.
- [6] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.

Vedoucí diplomové práce:

**doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

**16. ledna 2013**

Termín odevzdání diplomové práce:

**2. května 2013**

Ve Zlíně dne 4. února 2013

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



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

Příjmení a jméno: NUREV DORJ KHATANTUUL

Obor: THEVP

## 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<sup>1)</sup>;
- 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<sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> 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<sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 2.5.2013

Nurevdorj

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

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

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlášení 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.

<sup>2)</sup> 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).

<sup>3)</sup> 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 přihlíží k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## ABSTRAKT

Tato práce byla zaměřena na studium metabolických drah biosyntézy putrescinu u vybraných kmenů rodu *Lactobacillus* a na podmínky ovlivňující produkci biogenních aminů probiotickým kmenem *Lactobacillus rhamnosus*. Metodou PCR bylo zjištěno, že hlavní cestou syntézy putrescinu u kmenů *Lb. curvatus* je agmatideaminázová dráha. Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie byl sledován vliv pH, koncentrace NaCl a koncentrace laktózy na dekarboxylázovou aktivitu kmene *Lactobacillus rhamnosus*. Za daných kultivačních podmínek byl nejvíce produkován biogenním aminem spermin. Detekované množství sperminu se pohybovalo v rozmezí 17,9 – 24,3 mg/l kultivačního média. Vliv pH byl nejvýraznější u produkce spermidinu a putrescinu. Hodnota pH 5,0 působila inhibičně na produkci spermidinu a také se výrazně snížila produkce putrescinu. V kultivačních médiích obsahujících 2 % (w/v) NaCl bylo detekováno nejvyšší množství tyraminu (12,6 mg/l) a putrescinu (10,6 mg/l).

Klíčová slova: biogenní aminy, laktobacily, probiotika, polymerázová řetězová reakce, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

## ABSTRACT

This work was focused on the study of metabolic pathways of putrescine biosynthesis by selected strains of *Lactobacillus* and the effect of selected factors on the production of biogenic amines with probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus*. PCR detection showed that the major pathway of putrescine synthesis in strains *Lb. curvatus* is agmatideaminase pathway. Using high performance liquid chromatography, the influence of pH, concentration of NaCl and the concentration of lactose on decarboxylase activity *Lactobacillus rhamnosus* was tested. Under these conditions was the most produced biogenic amine spermine. The amount of spermine ranged from 17.9 to 24.3 mg/l culture medium. Effect of pH was most pronounced for the putrescine and spermidine production. PH 5.0 acted by inhibiting the production of spermidine and also significantly reduced the production of putrescine. The culture media containing 2% (w/v) NaCl were detected maximum amount of tyramine (12.6 mg/l) and putrescine (10.6 mg/l).

Keywords: biogenic amines, lactobacilli, probiotics, polymerase chain reaction, high performance liquid chromatography

Velice ráda bych tímto způsobem poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, čas a hlavně za trpělivost při zpracovávání této diplomové práce. Chtěla bych také poděkovat Mgr. Leoně Wunderlichové a laborantkám Lence Machálkové a Bc. Veronice Kučábové za ochotu a pomoc v laboratoři při měření praktické části diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat rodičům za neuvěřitelnou podporu a povzbuzování po celou dobu mého studia.

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

# OBSAH

ÚVOD.....	10
TEORETICKÁ ČÁST.....	11
<b>1 PROBIOTIKA .....</b>	<b>12</b>
1.1 HISTORIE PROBIOTIK.....	12
1.2 PODMÍNKY PRO ZAŘAZENÍ MEZI PROBIOTIKA.....	13
1.3 MECHANIZMUS PŮSOBENÍ PROBIOTIK .....	13
1.4 VYUŽITÍ PROBIOTIK .....	14
1.5 CHARAKTERIZACE BAKTERIÍ S PROBIOTICKÝMI ÚČINKY .....	15
1.5.1 Rod <i>Lactobacillus</i> .....	15
1.5.2 Rod <i>Bifidobacterium</i> .....	17
1.5.3 Rod <i>Enterococcus</i> .....	18
1.5.4 Rod <i>Lactococcus</i> .....	19
<b>2 PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ BAKTERIEMI MLÉČNÉHO KVAŠENÍ .....</b>	<b>20</b>
2.1 BIOGENNÍ AMINY .....	20
2.1.1 Fyziologické funkce biogenních aminů.....	21
2.1.2 Vznik biogenních aminů .....	21
2.1.3 Biogenní aminy v potravinách.....	22
2.1.4 Toxicita biogenních aminů .....	22
2.2 PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ BAKTERIEMI MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	23
2.2.1 Mikroorganismy produkující histamin a tyramin.....	24
2.2.2 Mikroorganismy produkující putrescin a kadaverin .....	24
2.3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITU MIKROORGANISMŮ .....	24
2.3.1 Vliv pH.....	25
2.3.2 Vliv teploty.....	25
2.3.3 Vliv koncentrace NaCl .....	25
2.3.4 Vliv dalších faktorů .....	26
<b>3 METODY STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ .....</b>	<b>27</b>
3.1 CHROMATOGRAFICKÉ METODY.....	27
3.1.1 VYSOCE ÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE .....	28
3.2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE.....	29
3.2.1 Princip metody PCR.....	29
3.2.2 Faktory ovlivňující PCR.....	31
3.2.3 Detekce produktu PCR.....	31
<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>33</b>
<b>4 CÍL PRÁCE .....</b>	<b>34</b>
<b>5 MATERIÁLY A METODY .....</b>	<b>35</b>
5.1 POUŽITÉ MIKROORGANIZMY .....	35
5.2 KULTIVAČNÍ MÉDIA A ROZTOKY .....	35



5.2.1	Kultivační média .....	35
5.2.2	Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů bakteriální kultury .....	36
5.2.3	Roztoky pro PCR a gelovou elektroforézu.....	36
5.2.4	Roztoky pro derivatizaci vzorků .....	36
5.3	PŘÍPRAVA HRUBÝCH LYZÁTŮ BAKTERIÁLNÍ KULTURY PRO PCR .....	37
5.3.1	Příprava hrubého lyzátu bakteriální kultury povařením a použitím proteinázy K .....	37
5.3.2	Příprava hrubého lyzátu bakteriální kultury povařením suspenze buněk.....	37
5.3.3	Příprava hrubého lyzátu bakteriální kultury alkalickou lyzí.....	38
5.3.4	Příprava hrubého lyzátu z bakteriální kolonie z Petriho misky.....	38
5.4	IZOLACE DNA .....	38
5.5	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE.....	39
5.5.1	Příprava reakční směsi.....	39
5.5.2	Provedení PCR .....	40
5.6	GELOVÁ ELEKTROFORÉZA .....	41
5.6.1	Příprava agarózového gelu .....	41
5.6.2	Nanášení vzorků na gel a provedení elektroforézy .....	41
5.7	PURIFIKACE A SEKVENACE PCR PRODUKTU .....	42
5.8	STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ POMOCÍ HPLC.....	42
5.8.1	PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍHO MÉDIA PRO ZJIŠTĚNÍ PRODUKCE BA .....	42
5.8.2	Příprava vzorků na derivatizaci.....	43
5.8.3	Předkolonová derivatizace dansylchloridem .....	43
5.8.4	Vlastní chromatografické stanovení.....	44
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>45</b>
6.1	SLEDOVÁNÍ GENŮ ZODPOVĚDNÝCH ZA PRODUKCI PUTRESCINU METODOU PCR .....	45
6.1.1	Sekvence PCR produktu .....	48
6.2	CHROMATOGRFICKÉ STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ .....	50
6.3	SOUHRNNÁ DISKUZE.....	54
	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>60</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>61</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>69</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>70</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>72</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>73</b>

## ÚVOD

Biogenní aminy představují skupinu nízkomolekulárních dusíkatých sloučenin, které mají významné fyziologické a toxické účinky. Tyto látky se tvoří a zase rozkládají během obvyklých metabolických procesů v živých buňkách. Mohou také vznikat z aminokyselin působením bakteriálních dekarboxyláz, takže mohou být obsaženy ve všech produktech, připravovaných fermentačními postupy nebo vystavených během výroby nebo skladování mikrobiální kontaminaci. Tvorba biogenních aminů bakteriemi může být ovlivněna mnohými vnějšími faktory. Mezi tyto faktory patří například teplota a pH prostředí, aero/anaerobióza, dostupnost zdrojů uhlíku (např. glukózy), přítomnost růstových faktorů, růstové fáze buněk a koncentrace NaCl.

V současné době jsou stále více používány při výrobě fermentovaných potravin startérové kultury s probiotickými účinky. Hlavním důvodem, proč se přidávají tyto mikroorganismy do potravin je, bezpochybně jejich pozitivní působení na lidské zdraví. Na druhé straně mnozí zástupci probiotických kultur patří mezi potenciální producenty biogenních aminů. Proto je nutné tyto mikroorganismy před technologickou aplikací prověřovat na schopnost produkce biogenních aminů.

Výzkum biogenních aminů započal zhruba před 120 lety identifikací sperminu, putrescinu a kadaverinu. Od té doby se touto problematikou zabývá řada vědeckých týmů, které svým výzkumem neustále prohlubují znalosti a přinášejí nové informace o biogenních aminech.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 PROBIOTIKA

Slovo „probiotikum“ je převzato z řečtiny a znamená „pro život“. V současné době si pod pojmem „probiotika“ představíme nepatogenní mikroorganismy, které jsou-li podávány v dostatečném množství, příznivě ovlivňují zdravotní stav hostitele. Dále je probiotikum také definováno jako preparát nebo produkt, který obsahuje živé přesně definované mikroorganismy [1], [2], [3].

### 1.1 Historie probiotik

V historii výzkumu blahodárně působících mikroorganismů hrálo důležitou roli několik významných jmen. Předně je třeba zmínit mikrobiologa a biochemika ruského původu Ilju Mečnikova. Tento ruský vědec v roce 1907 publikoval svoji práci tzv. „optimistickou studii o prodlužování věku“, ve které přisuzoval dlouhověkost lidí žijících v balkánských zemích pravidelné konzumaci kysaných mléčných výrobků obsahujících živé bakterie. Dále se o poznání probiotik významně zasloužil i Henry Tissier, který poprvé izoloval v roce 1900 bakterii ze stolice kojenců, u které byl prokázán vliv na prevenci průjmů u dětských pacientů. Označil ji jako *Bacillus bifidus communis*, která později byla přejmenována na *Bifidobacterium*. [4], [5].

Za dalšího průkopníka v oblasti probiotik je považován vojenský chirurg Dr. Alfred Nissle. V roce 1917 izoloval kmen *Escherichia coli* ze stolice vojáka, jenž neměl na frontě první světové války v prostředí probíhající salmonelové epidemie žádné gastrointestinální příznaky. Bakteriální kmen byl později pojmenován *Escherichia coli* Nissle 1917 a přípravek obsahující tuto bakterii je známý pod názvem Mutaflor [4].

Termín probiotikum byl do praxe zaveden v roce 1965, kdy ho poprvé použili Lilly a Stillwell. Tehdy bylo probiotikum definováno jako faktor pocházející z mikrobů, který stimuluje růst jiných bakterií. Současná definice probiotika pochází z roku 1989, kdy Roy Fuller definoval jako živý mikrobiální potravinový doplněk, který pozitivně ovlivňuje hostitele zlepšením jeho střevní mikrobiální bilance [1], [5].

## 1.2 Podmínky pro zařazení mezi probiotika

Za probiotikum je možné označit určitý mikroorganismus za předpokladu, že je prokázána účinnost a bezpečnost za doporučených podmínek použití pro definovanou zdravotní situaci, metodu aplikace a dávkování [2]. Dále musí mikroorganismus splňovat následující požadavky [6]:

- mikroorganismus by měl být izolován z gastrointestinálního traktu zdravého člověka a měl by být přesně taxonomicky určen,
- probiotický mikroorganismus nesmí vykazovat žádnou patogenitu,
- měl by být tolerantní k žaludečním kyselinám a žlučovým solím,
- mikroorganismus by měl mít schopnost adheze ke střevní stěně a schopnost přežívat v gastrointestinálním traktu člověka,
- mikroorganismus by neměl být přenašečem genů zodpovědných za přenos antibiotické rezistence,
- probiotický mikroorganismus by neměl produkovat biogenní aminy jako jsou histamin a tyramin vzhledem k jejich toxikologickým účinkům.

## 1.3 Mechanismus působení probiotik

V posledních letech se probiotika stávají stále více součástí běžné denní stravy a zároveň jsou zahrnována do léčebných postupů široké škály nejrůznějších onemocnění. Pro účinné působení probiotik je rozhodující jejich přežívání během průchodu trávicím traktem, kolonizace trávicího traktu, kompetitivní vytěsňování patogenů, vazba na střevní sliznici či indukce lokální a systémové imunitní odpovědi [4].

Adheze k mukóze střeva je nutná pro kolonizaci trávicího traktu a také pro dosažení imunomodulačních změn navozených přítomností probiotik [4]. Bakteriální adherence k intestinálnímu povrchu je často zprostředkována pomocí specifických vazeb mezi proteiny bakteriálního povrchu (lektiny) ke komplementárním oligosacharidům na povrchu tkání. Avšak bakterie mohou také adherovat nespecificky pomocí hydrofobních interakcí s intestinálním povrchem. Kmeny s nejvyšší schopností adherence mají největší vliv na zdraví hostitele [7].

Probiotické mikroorganismy působí svoji vlastní přítomností tak, že produkují substance, které mohou inhibičně působit na bakterie patogenní nebo potenciálně patogenní. Mezi tyto substance lze zařadit organické kyseliny, peroxid vodíku a bakteriociny, které snižují nejen počet živých buněk, ale ovlivňují i metabolismus bakterií a produkci toxinů. Dále blokují kompetitivní inhibiční adhezní místa pro potenciálně patogenní bakterie a mohou také využívat živiny, které by jinak byly spotřebovány těmito mikroorganismy. Některá probiotika mají také schopnost degradovat receptory pro toxiny na střevní sliznici [3], [8], [9].

Další možností jejich prospěšného působení spolu se střevními bakteriemi je tvorba vitaminů, zejména vitaminů řady B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, niacin, kyselina listová a kyselina pantotemová) a tvorba vitamínu K. Probiotika tvoří i další látky prospěšné pro hostitele, jako jsou například SCFA (mastné kyseliny s krátkým řetězcem), které slouží jako substrát pro buňky tlustého střeva (kolonocyty) [8].

Příznivý účinek probiotik na zdravotní stav hostitele může být způsoben též regulací hladiny cholesterolu. Probiotické bakterie přeměňují v tenkém střevě cholesterol na neúčinný koprostanol, tím pomáhají snížit hladinu sérového cholesterolu [8].

Pro preventivní a terapeutické použití probiotik je důležitá jejich schopnost stimulovat specifickou i nespecifickou imunitu. Kontakt buněk střevního imunitního systému s živými probiotiky aktivuje nespecifické i specifické imunitní mechanismy ve střevním lymfatickém systému i v systémové imunitě [4], [9].

#### 1.4 Využití probiotik

Všechny výše zmíněné účinky prokazatelně ovlivňují nejrozličnější onemocnění. Mezi nejčastěji uváděné příznivé účinky probiotik patří antimikrobiální aktivita v souvislosti s nejrozličnějšími druhy gastrointestinálních infekcí (akutní průjemové onemocnění, průjemové onemocnění spojené s užíváním antibiotik a ozařováním, prevence tzv. cestovatelských průjmů), spolu s antibiotiky potlačení infekce *Helicobacter pylori*, dále pak zmírnění průběhu nespecifických střevních zánětů (ulcerózní kolitida, Crohnova choroba), prevence atopického ekzému, zlepšení trávení laktózy, redukce hladiny sérového cholesterolu, antikarcinogenní účinky, stimulace imunitního systému a léčení urovaginálních infekcí [6].

## 1.5 Charakterizace bakterií s probiotickými účinky

Mezi často používané probiotické mikroorganismy patří bakterie mléčného kvašení, a to hlavně rody *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* a *Enterococcus*. Výčet probiotických mikroorganismů je však daleko pestřejší a zahrnuje další bakteriální rody a druhy (*Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Clostridium butyricum*), ale také kvasinky (*Saccharomyces boulardi*) [5].

**Nejčastěji používaná probiotika jsou:**

- **Bifidobakterie:** *Bifidobacterium bifidum*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. thermophilum* [3].
- **Laktobacily:** *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, spec. *ramnosus* (GG), *Lb. casei* Shirota, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. reuterii*, *Lb. brevis*, *Lb. cellobiosus*, *Lb. curvatus*, *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum* 299v [3].
- **Grampozitivní koky:** *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Streptococcus intermedius* a *Enterococcus faecium* [3].
- **Grampozitivní tyčinky:** *Escherichia coli* (sérotyp O83:K24:H1) [3].
- **Kvasinky:** *Saccharomyces boulardi* [3].

### 1.5.1 Rod *Lactobacillus*

Mezi často zkoumané mikroorganismy s probiotickými vlastnostmi patří zástupci rodu *Lactobacillus*. Tento rod zahrnuje grampozitivní, fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní nepohyblivé bakterie. Tyto bakterie mají tvar pravidelných tyčinek, někdy také kokotyčinek, uspořádaných v krátkých řetízcích. Hlavním metabolitem fermentace sacharidů je kyselina mléčná, ale také kyselina octová, etanol a CO<sub>2</sub>. Laktobacily jsou chemoorganotrofní mikroorganismy, dobře rostoucí v médiích s dostatkem zkvasitelných sacharidů, štěpných produktů bílkovin, nukleových kyselin a vitaminů skupiny B. Upřednostňují mezofilní a mírně termofilní teploty s horní hranicí asi 40 °C. Laktobacily jsou acidotolerantní až acidofilní [1], [10], [11].

Bakterie patřící do tohoto rodu lze podle konečných produktů fermentace sacharidů rozdělit do tří skupin [10]:

- A. Obligátně homofermentativní laktobacily.
- B. Fakultativně heterofermentativní laktobacily.
- C. Obligátně heterofermentativní laktobacily.

Zástupci obligátně homofermentativních laktobacilů zkvašují hexózy na kyselinu mléčnou. Optimum růstu těchto bakterií se pohybuje při teplotě od 30 °C do 45 °C a při pH od 5,5 do 6,2. Do této skupiny se řadí *Lb. salivarius*, *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* a *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*. Tyto homofermentativní laktobacily se uplatňují jako čisté zákysové kultury (jogurty, acidofilní mléko, tvaroh, sýr) [10].

Fakultativně heterofermentativní laktobacily fermentují hexózy většinou na kyselinu mléčnou. Při nedostatku glukózy produkují kyselinu octovou, etanol a kyselinu mravenčí. Optimální teplota růstu těchto mikroaerofilních laktobacilů je 28 – 32 °C. Uplatňují se v mlékárenském a konzervářenském průmyslu. Jsou také součástí mikroflóry dutiny ústní a gastrointestinálního traktu. Do této skupiny patří například *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum*, *Lb. alimentarius*, *Lb. sake*, *Lb. plantarum* [10].

Zástupci obligátně heterofermentativních laktobacilů fermentují hexózy na kyselinu mléčnou, octovou, etanol a CO<sub>2</sub>. Tyto bakterie mají většinou kokoidní tvar buněk a jejich optimum růstu je při 28 – 32 °C. Jsou součástí mikroflóry dutiny ústní a gastrointestinálního traktu. Někteří zástupci způsobují i kažení potravin. Jedná se o *Lactobacillus buchneri*, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. candleri*, *Lb. kefir* a další [10].

V současné době je již popsáno přes 120 druhů rodu *Lactobacillus*, ovšem pouze některé z nich jsou v klinické praxi využívány pro své probiotické vlastnosti [1]. *Lactobacillus rhamnosus* GG je první bakterie tohoto rodu, který byl na základě svých pozitivních vlastností vybrán jako probiotikum. Tento laktobacil exprimuje adhezivní faktory, které umožňují interakci s lidskými enterocyty. Dále vytváří peroxid vodíku, snižuje intraluminální pH, redoxní potenciál a produkuje bakteriociny, které inhibují růst patogenních mikroorganismů [3]. Zaznamenané pozitivní účinky některých bakteriálních druhů rodu *Lactobacillus* na zdravotní stav hostitele jsou uvedeny v Tabulce I.



Tab. I – Klinické efekty některých bakteriálních druhů rodu *Lactobacillus* [3]

Druh	Klinický efekt
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG STCC 53103	adheze k lidským enterocytům, prevence postantibiotických průjmů, léčba a prevence průjmů způsobených rotaviry, prevence akutních průjmů, stimulace imunitního systému
<i>Lactobacillus johnsonii</i> LJ-1 (LA-1)	prevence cestovatelských průjmů, modulace intestinální flóry, zmírnění příznaků laktózové intolerance, léčba zácpy, posílení imunity, adjuvantní léčba infekcí <i>Helicobacter pylori</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55730	osídlení intestinálního traktu, zkrácení rotavirových průjmů, léčba akutních průjmů
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	modulace intestinální flóry, pozitivní efekt na superficiální rakovinu močového měchýře
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 9843	adheze k lidským enterocytům, modulace intestinální flóry

### 1.5.2 Rod *Bifidobacterium*

Rod *Bifidobacterium* zahrnuje nesporulující, nepohyblivé, grampozitivní tyčinky nepravidelného tvaru, často se větvící. Bifidobakterie jsou striktně anaerobní, ale některé druhy tolerují O<sub>2</sub> v prostředí s CO<sub>2</sub> nebo za přítomnosti bifidogenních faktorů (laktulóza, oligosacharidy, N-acetyl-D-glukózamin) nebo v mléce společně při růstu s *Lb. acidophilus*. Teplotní optimum bifidobakterií se pohybuje v rozmezí 37 – 41 °C a optimálně rostou při pH 6,5 až 7 [1], [10].

Bakterie patřící do tohoto rodu specificky metabolizují hexózy s využitím enzymu fruktóza-6-fosfát-fosfoketolázy. Výslednými produkty této metabolické cesty je kyselina mléčná a octová v poměru 2:3. Touto vlastností se odlišují od ostatních bakterií mléčného kvašení [12].

Bifidobakterie poprvé izoloval Henry Tissier ze stolice kojených dětí. Zjistil, že bifidobakterie jsou dominantní bakteriální populací v trávicím traktu kojených dětí, a proto doporučoval jejich podávání dětem, které trpěly průjmem [3]. V současné době je popsáno 30 bakteriálních druhů rodu *Bifidobacterium*, přičemž probiotické účinky jsou popsány u *Bifidobacterium bifidum*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. infantis*, *B. longum* (Obr. 1), *B. thermophilus*, *B. breve* a *B. lactis* [1], [13].



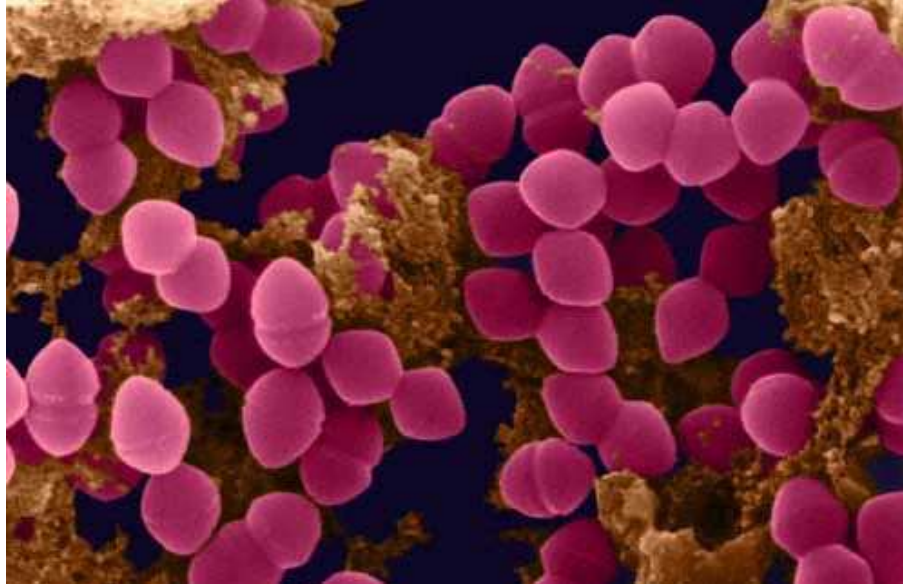
Obr. 1 – *Bifidobacterium longum* [1]

### 1.5.3 Rod *Enterococcus*

Enterokoky jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní, kataláza negativní, oválné až lehce protáhlé koky uspořádané ve dvojicích nebo řetězcích [13]. Patří mezi bakterie mléčného kvašení a mají význam jak ve fermentaci, tak při kažení potravin [14]. Jsou také součástí normální střevní mikroflóry lidí a zvířat a patří mezi závažné podmíněné patogeny [15].

Tyto bakterie jsou hlavně původci infekcí močových cest, ale jsou spojovány i s infekcemi ran, nitrobřišními záněty, bakteriemií, meningitidou, infekcí žlučových cest a gynekologických zánětů [15].

Pro své probiotické účinky se v současnosti využívají kmeny *Enterococcus faecium* SF68 a *Enterococcus faecalis* Symbioflor 1 ve formě komerčně dostupných přípravků [14].



Obr. 2 – *Enterococcus faecium* [16]

#### 1.5.4 Rod *Lactococcus*

Bakterie rodu *Lactococcus* jsou grampozitivní fakultativně anaerobní koky s homofermentativním typem metabolismu sacharidů [10]. Výsledným produktem fermentace glukózy, laktózy a maltózy je převážně kyselina mléčná.

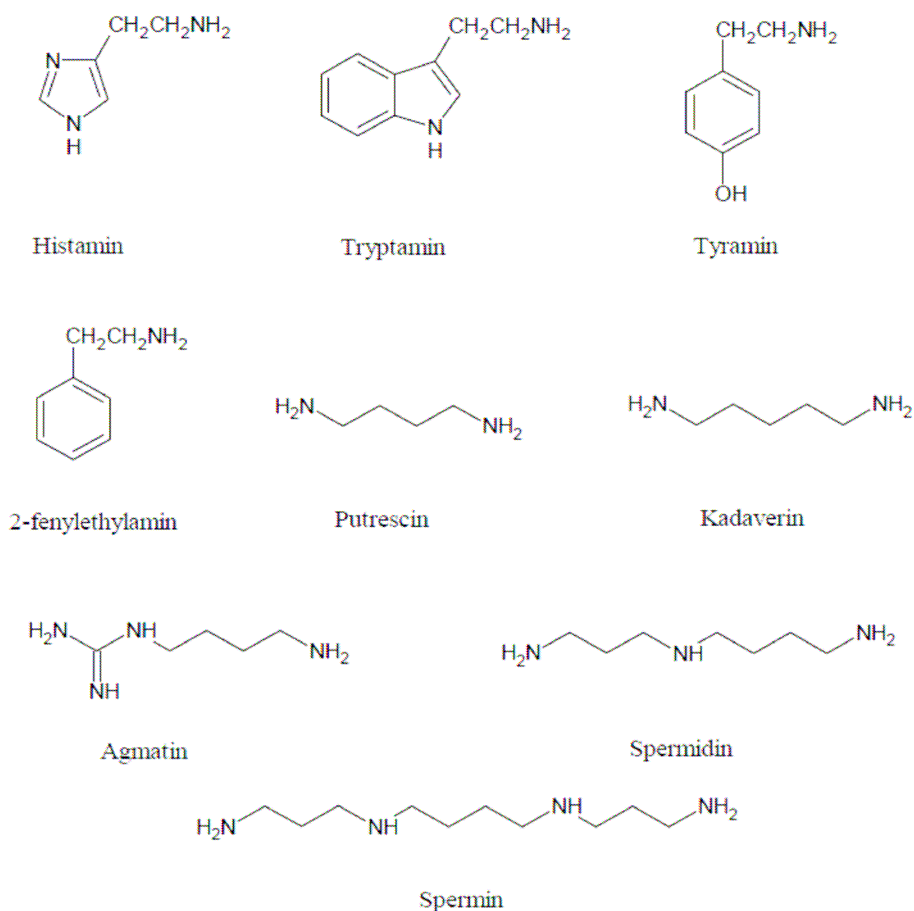
Potravinářsky nejvýznamnějším druhem je *Lactococcus lactis* a jeho poddruhy *lactis* a *cremoris*. Tyto laktokoky jsou hojně využívány při výrobě kysaných mléčných výrobků a jsou také předmětem studie pro své probiotické vlastnosti [3], [17].

## 2 PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ BAKTERIEMI MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

### 2.1 Biogenní aminy

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární organické báze, které mají v živých systémech charakteristické fyziologické účinky. Jsou to produkty běžné metabolické aktivity zvířat, rostlin i mikroorganismů. Biogenní aminy mohou mít alifatickou (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatickou (tyramin, fenyletylalanin) a heterocyklickou strukturu (histamin, tryptamin) [18]. Strukturální vzorce nejdůležitějších biogenních aminů jsou zobrazeny na Obrázku 3.

Podle počtu aminoskupin lze BA klasifikovat také jako monoaminy (tyramin, fenyletylamin) nebo diaminy (histamin, putrescin, kadaverin) [19]. Někteří autoři uvádějí spermin, spermidin, agmatin a diaminy putrescin, kadaverin za polyaminy [20], [21].



Obr. 3 – Strukturální vzorce nejdůležitějších biogenních aminů [22]

### 2.1.1 Fyziologické funkce biogenních aminů

V lidském organismu se biogenní aminy zúčastňují mnoha fyziologických procesů. Například psychoaktivní aminy dopamin a serotonin působí jako neurotransmitery v centrální nervové soustavě, histamin a tryptamin ovlivňují krevní tlak a regulují trávení [22], [23]. Polyaminy zase hrají důležitou roli při růstu a diferenciaci buněk. Také inhibují oxidaci polyenových mastných kyselin. Hormony dopamin a noradrenalin mají schopnost zneškodňovat reaktivní kyslíkaté radikály, jakými jsou superoxidový a hydroxylový radikál. Biogenní aminy také slouží jako prekurzory hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů [18], [22], [24].

### 2.1.2 Vznik biogenních aminů

Biogenní aminy vznikají především dekarboxylací volných aminokyselin. Tyto reakce jsou katalyzovány příslušnými substrátově specifickými dekarboxylázami [18], [25], [26]. Existují dvě odlišné skupiny dekarboxyláz. První skupinu tvoří dekarboxylázy, jejichž aktivní centrum tvoří pyridoxal-5-fosfát a které se nacházejí většinou u gramnegativních mikroorganismů. Druhou skupinou jsou dekarboxylázy s kovalentně vázaným pyruviem. Tyto dekarboxylázy se většinou vyskytují u grampozitivních mikroorganismů [18].

Histidindekarboxyláza je enzym katalyzující dekarboxylaci histidinu na histamin. Působením tyrozindekarboxylázy vzniká z tyrozinu tyramin. Působením tohoto enzymu může také vznikat z fenylalaninu 2-fenyletylamin. Dekarboxylací ornitinu působením ornitindekarboxylázy vzniká putrescin. Putrescin může také vznikat deaminací z agmatinu. Agmatin vzniká dekarboxylací argininu, kadaverin dekarboxylací lyzinu a tryptamin dekarboxylací tryptofanu. Z putrescinu vzniká metylací S-adenosylmetioninem spermidin a dále spermin. Z prekurzoru L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanin) vzniká působením dihydroxyfenylalanindekarboxylázy dopamin. Další možnou cestou vzniku BA je aminace a transaminace aldehydů a ketonů [18], [25], [27].

### 2.1.3 Biogenní aminy v potravinách

Tvorba biogenních aminů v potravinách je závislá na přítomnosti volných aminokyselin, na dekarboxylázové aktivitě přítomných mikroorganismů a na podmínkách, které umožňují biochemickou aktivitu přítomných mikroorganismů [22]. Mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou se mohou do potravin dostat spontánně nebo mohou být součástí startérových kultur, které jsou do potravin přidávány záměrně [28].

Biogenní aminy se vyskytují v řadě potravin, jako jsou maso a masné výrobky, mléko a mléčné výrobky, ryby a výrobky z nich a fermentovaná zelenina. Mohou se také vyskytovat v alkoholických nápojích, jako jsou víno a pivo [18]. Ve fermentovaných potravinách jsou BA pravidelnou a často i přirozenou součástí. Naopak jejich výskyt v nefermentovaných potravinách svědčí o nežádoucí mikrobiální činnosti [29].

V současné době se však BA dostávají do popředí zájmu i v souvislosti s hygienou potravin, jelikož relativně vysoké hodnoty obsahu některých biogenních aminů mohou sloužit i jako indikátor zhoršení výrobního nebo skladovacího procesu či nedodržení předepsaného technologického postupu výroby [30].

### 2.1.4 Toxicita biogenních aminů

Z kapitoly 2.1.1 je patrné, že jsou biogenní aminy pro člověka nepostradatelné, avšak při konzumaci potravin s vyšším obsahem BA mohou způsobovat nejrůznější zdravotní komplikace. Zejména pokud je překročena kapacita detoxikačního systému, založeného na aktivitě enzymů monoaminoxidázy (MAO), diaminoxidázy (DAO) a histidinmetyltransferázy (HMT). Normální příjem BA z potravy je totiž metabolizován ve střevním taktu tímto účinným detoxikačním systémem. Míra schopnosti takto zneškodňovat BA je však velmi individuální, takže někteří jedinci mohou citlivěji reagovat již na nižší obsah aminů v potravě. Na tento střevní systém mají také inhibiční účinky některé léky (inhibitory – IMAO, antidepresiva) a alkohol. Dojde-li k selhání detoxikačního systému ve střevech, ať už vlivem nadměrného množství aminů v potravě, nebo jeho oslabením vlivem IMAO, dostávají se BA do krevního oběhu a mohou způsobovat mnohé nežádoucí účinky na organizmus. Riziková je hlavně současná konzumace více rizikových potravin najednou (fermentované výrobky, pivo a víno). Za toxikologicky nejvýznamnější BA se považují histamin, tyramin, kadaverin a putrescin [18], [22], [28].

Tyramin je významným vazoaktivním biogenním aminem, který zvyšuje krevní tlak s možným důsledkem hypertenzní krize, migrenózních bolestí hlavy, v krajních případech až krvácení do mozku, resp. selhání srdce. Otravy tyraminem jsou často spojovány s konzumací různých druhů sýrů [22], [31].

Negativní účinky histaminu na organismus člověka jsou poměrně různorodé. Vazba histaminu na příslušné receptory cévní stěny vyvolává dilataci hladké svaloviny periferních krevních cév s důsledkem poklesu tlaku, což může mít za následek silné bolesti hlavy. Naopak interakce histaminu s receptory střešní stěny vyvolá kontrakce hladké svaloviny střeva s klinickými projevy břišních křečí, průjmů a zvracení [31]. Toxicita histaminu a tyraminu může být také zesílena přítomností dalších biogenních aminů, zejména diamů a polyaminů. Jejich negativní působení spočívá v odčerpání detoxikační kapacity enzymů monoaminooxidázy, diaminooxidázy a histidinmetyltransferázy. Následně dochází k zesílení účinků toxičtějších BA [22].

Diaminy putrescin a kadaverin jsou považovány za potenciální karcinogeny. Zahříváním putrescinu může vznikat pyrolidin a z kadaverinu piperidin. Z nich se působením tepla vytvářejí N-nitrozopyrolidin a N-nitrozopiperidin [24].

Toxické dávky biogenních aminů je obtížné stanovit. Závisí na individuálních rozdílech mezi lidmi, na přítomnosti různých biogenních aminů v potravě, na množství konzumované potravě a na přítomnosti jiných látek jako jsou alkohol nebo léky. U některých citlivých jedinců může příjem histaminu již v množství 5 – 10 mg vyvolat zdravotní poruchy. Příjem 100 mg histaminu může vyvolávat mírnou toxicitu a 1000 mg je již vysoce toxických [23], [24].

## 2.2 Produkce biogenních aminů bakteriemi mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou častými producenty biogenních aminů zejména ve fermentovaných potravinách, kde jsou BMK přidávány obvykle ve formě startérových kultur. Dekarboxylázová aktivita byla prokázána především u rodu *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus* a *Bifidobacterium* [28], [31], [32].

Tvorba biogenních aminů není záležitostí rodů či druhů, ale spíše kmenů v rámci druhu [33]. Například gen pro produkci tyraminu se u *Lb. brevis* pravděpodobně šíří horizontálním přenosem prostřednictvím mobilního elementu (genomic island) [34], zatímco u *Ente-*

*roccus faecalis*, *E. faecium* a *E. durans* se pravděpodobně jedna o druhovou charakteristiku [35].

### 2.2.1 Mikroorganismy produkující histamin a tyramin

Výskyt histaminu byl pozorován v různých potravinách a to hlavně v sýrech, ve fermentovaných masných výrobcích, v syrovém rybím mase a výrobcích z ryb. Zatímco hlavními producenty histaminu ve výrobcích z ryb jsou gramnegativní bakterie, řada grampozitivních bakterií, zvláště BMK, jsou schopné dekarboxylace histidinu ve fermentovaných výrobcích [33]. Tato schopnost byla zjištěna například u *Oenococcus oeni*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus damnosus*, *Tetragenococcus* spp. *Leuconostoc* spp, *Lactobacillus hilgardii*, *Lb. buchneri*, *Lb. curvatus*, *Lb. parabuchneri* a *Lb. rossiae* [19].

Schopnost dekarboxylace tyrozinu byla doposud popsána pouze u grampozitivních bakterií [36]. Bylo zjištěno, že hlavními producenty tyraminu v sýrech a ve fermentovaných klobásách jsou zástupci rodu *Enterococcus* (*E. faecalis* a *E. faecium*), *Lactobacillus* (*Lb. curvatus* a *Lb. brevis*), *Leuconostoc* a *Lactococcus* [19], [36].

Také u probiotických mikroorganismů byla pozorována schopnost tvorby histaminu a tyraminu. Jedná se o bakteriální druhy *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus* a *Lb. plantarum* [32], [37]. Schopnost dekarboxylace tyrozinu mají i mléčné laktokoky (*Lc. lactis* subsp. *lactis* a *Lc. lactis* subsp. *cremoris*) [38].

### 2.2.2 Mikroorganismy produkující putrescin a kadaverin

Produkce putrescinu a kadaverinu je hlavně spojována s gramnegativními bakteriemi a to z čeledí *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* a *Shewanellaceae*. Avšak putrescin se běžně vyskytuje i ve fermentovaných potravinách, kde může vznikat dekarboxylázovou činností bakterií mléčného kvašení zejména laktobacilů a stafylokoků. *Lactobacillus hilgardii* a *Lb. plantarum* jsou hlavními producenty putrescinu při malolaktické fermentaci ve víně [19].

## 2.3 Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů

Dekarboxylázová aktivita mikroorganismů je ovlivňována zejména kultivačními podmínkami. Jedním z důležitých faktorů ovlivňujících aktivitu mikrobiálních dekarboxylačních



enzymů je dostupnost substrátu. Význam má nejen přítomnost volných aminokyselin, ale také přítomnost využitelných sacharidů. Dalšími významnými faktory, které ovlivňují produkci biogenních aminů, jsou teplota, pH, přítomnost soli, přítomnost kyslíku, doba zrání, skladování a hygienické podmínky výroby [18], [28]

### 2.3.1 Vliv pH

Hodnota pH je jedním z důležitých faktorů ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu. Existují dva protichůdné mechanismy působení pH. Na jedné straně zvýšením kyselosti prostředí dochází k inhibici růstu mikroorganismů. Na druhé straně nízké pH stimuluje bakterie k vyšší produkci zásaditých biogenních aminů jako jejich obranného mechanismu proti kyselému intracelulárnímu prostředí. Proto je velmi důležité najít rovnovážný stav mezi těmito mechanismy [11], [19].

### 2.3.2 Vliv teploty

Dalším důležitým faktorem je teplota. Optimální teplota pro růst většiny bakterií s dekarboxylázovou aktivitou se pohybuje v rozmezí od 20 °C do 37 °C. Proto se tvorba biogenních aminů snižuje při teplotě pod 5 °C nebo nad 40 °C, kdy dochází k inhibici růstu těchto bakterií [19]. Zejména pak teplota během skladování sehrává důležitou roli při tvorbě BA. Například ryby skladované při 10 °C obsahovaly 2 až 20krát vyšší koncentraci BA než ryby skladované při 2 °C [24].

### 2.3.3 Vliv koncentrace NaCl

Koncentrace chloridu sodného také může mít vliv na dekarboxylázovou aktivitu. Obecně je známo, že vyšší koncentrace NaCl může přispívat ke snížení schopnosti mikroorganismů produkovat BA. Stratton et al. [38] zjistili, že při koncentraci NaCl 3,5 % je částečně inhibována schopnost *Lactobacillus buchneri* tvořit histamin a při koncentraci 5 % se tvorba histaminu zastavuje. Také Chander et al. [39] zjistili, že dekarboxylázová aktivita *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se snížila při zvýšení koncentrace NaCl v médiu z 0 % na 6 %. Naopak u některých halotolerantních bakterií izolovaných ze solených ančoviček bylo pozorováno, že zvýšení koncentrace NaCl mělo na dekarboxylázovou aktivitu opačný efekt [19].

#### 2.3.4 Vliv dalších faktorů

Z dalších faktorů ovlivňujících produkci BA je významná přítomnost kyslíku. Vliv aerobního a anaerobního prostředí na dekarboxylázovou aktivitu bakterií rodu *Lactococcus* zkoumali například Buňková et al. [40]. Zjistili, že testované kmeny *Lc. lactis* produkovaly vyšší množství tyraminu v prostředí bez přístupu kyslíku a zároveň v přítomnosti 2 % NaCl [40]. Potenciální vliv na produkci biogenních aminů může mít i koncentrace využitelných sacharidů. Jako optimální koncentrace sacharidů pro dekarboxylační činnost bakterií se uvádí 0,5 až 2 %. Vyšší koncentrace sacharidů mohou dekarboxylační aktivitu potlačovat [19].

### 3 METODY STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ

Rostoucí zájem o stanovení koncentrací a zastoupení jednotlivých biogenních aminů v potravinách vyplývá z prohlubujících se poznatků o jejich biologickém působení na zdraví člověka [20]. Jak již bylo popsáno v předchozích kapitolách, biogenní aminy jsou látky pro člověka nepostradatelné, avšak ve vysokých koncentracích se mohou projevit jejich toxický účinek na lidský organizmus [18], [19], [22].

Na kvalitativní a kvantitativní stanovení biogenních aminů lze využít řadu analytických metod. V praxi nejpoužívanější jsou metody chromatografické (tenkovrstvá chromatografie – TLC, plynová chromatografie – GC, iontově-výměnná chromatografie – IEC, vysoce účinná kapalinová chromatografie – HPLC). Mezi další používané separační metody patří kapilární zónová elektroforéza nebo metoda blízké infračervené reflektanční spektroskopie [22], [36], [20]. Neméně požívané jsou také metody mikrobiologické založené na použití dekarboxylačního media obsahujícího pH indikátor a molekulárně biologické (PCR) [36]. Moderní metody molekulární biologie umožňují včasné odhalení potenciálních producentů biogenních aminů detekcí specifické DNA sekvence kódující příslušný mikrobiální enzym účastnící se jejich tvorby [41].

#### 3.1 Chromatografické metody

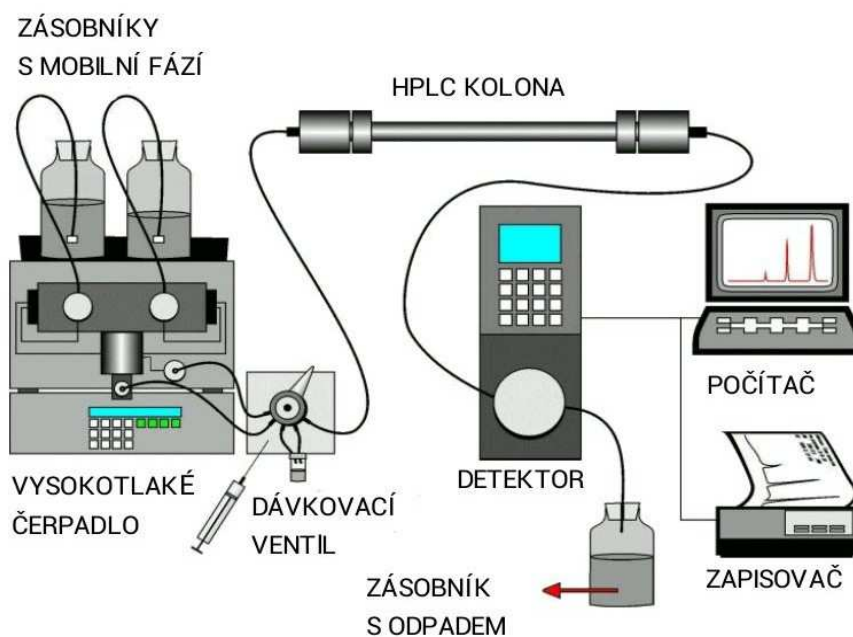
První chromatografický způsob dělení použil, popsal a také pojmenoval na počátku 20. století ruský botanik Cvět, který rozdělil chloroplastové pigmenty z rostlinných extraktů na sloupci uhličitanu vápenatého. Chromatografické metody dosáhly v posledních letech neobyčejného rozšíření a přinesly řadu nových možností. Prostřednictvím chromatografických technik je možno získat kvalitativní i kvantitativní informace, tzn. kromě určení složení směsi lze stanovit i koncentrace jednotlivých složek. Pro úplnou identifikaci je však nezbytné propojení s dalšími metodami analytické chemie např. hmotnostní spektrometrie, UV-VIS spektrometrie [42], [43].

Podstatou chromatografického procesu je rozdělování složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi. Mobilní fáze se v chromatografickém systému pohybuje, zatímco stacionární fáze nikoliv. Mobilní fázi může být kapalina (kapalinová chromatografie) nebo plyn (plynová chromatografie). Stacionární fázi může být pevná látka nebo film kapaliny zakotvený na pevné látce [43].

### 3.1.1 Vysoce účinná kapalinová chromatografie

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) je separační technika často využívaná na stanovení biogenních aminů [22]. Na počátku 70. let zavedli chemici Horvath, Guiochon a další do kapalinové chromatografie stacionární fáze založené na porézní silici (oxidu křemičitém). Tyto materiály, již tehdy stabilní do tlaků převyšujících 30 MPa, pak stály u kolébky této techniky [44].

Základní instrumentace HPLC je zobrazena na Obrázku 4. Vysokoúčinný kapalinový chromatograf pracuje tak, že jsou vzorky (řádově několik  $\mu\text{l}$ ) dávkovány dávkovacím ventilem do mobilní fáze. Ta unáší jednotlivé složky vzorku na kolonu, kde dochází k opakovanému ustanovení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází a k separaci analytů dle fyzikálně-chemických vlastností. Po průchodu separační kolonou jsou analyty v mobilní fázi detekovány v průtokové cele detektoru. Často používaným detektorem je detektor spektrofotometrický (UV-VIS) a fluorescenční. Podmínkou použití těchto detektorů je, aby daný analyt absorboval záření určité vlnové délky (UV-VIS detekce) anebo aby emitoval fluorescenční záření (fluorescenční detekce). Pokud analyt sám o sobě neabsorbuje záření v oblasti UV-VIS nebo neemituje fluorescenční záření, je použití těchto detektorů podmíněno derivatizací vzorku. Výstupem z detektoru je grafický záznam závislosti odezvy detektoru na retenčním čase, tj. chromatogram, na němž se hodnotí plocha nebo výška píku [43], [44], [45].



Obr. 4 – Schéma HPLC [46]

## 3.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce neboli (PCR) je molekulárně biologická metoda sloužící ke zmnožení neboli amplifikaci specifických úseků DNA. Tuto techniku zavedli a poprvé využili pracovníci kalifornské biotechnologické firmy Cetus Corporation pod vedení Karyho Mullise, jemuž byla za objev PCR udělena roku 1993 Nobelova cena [47].

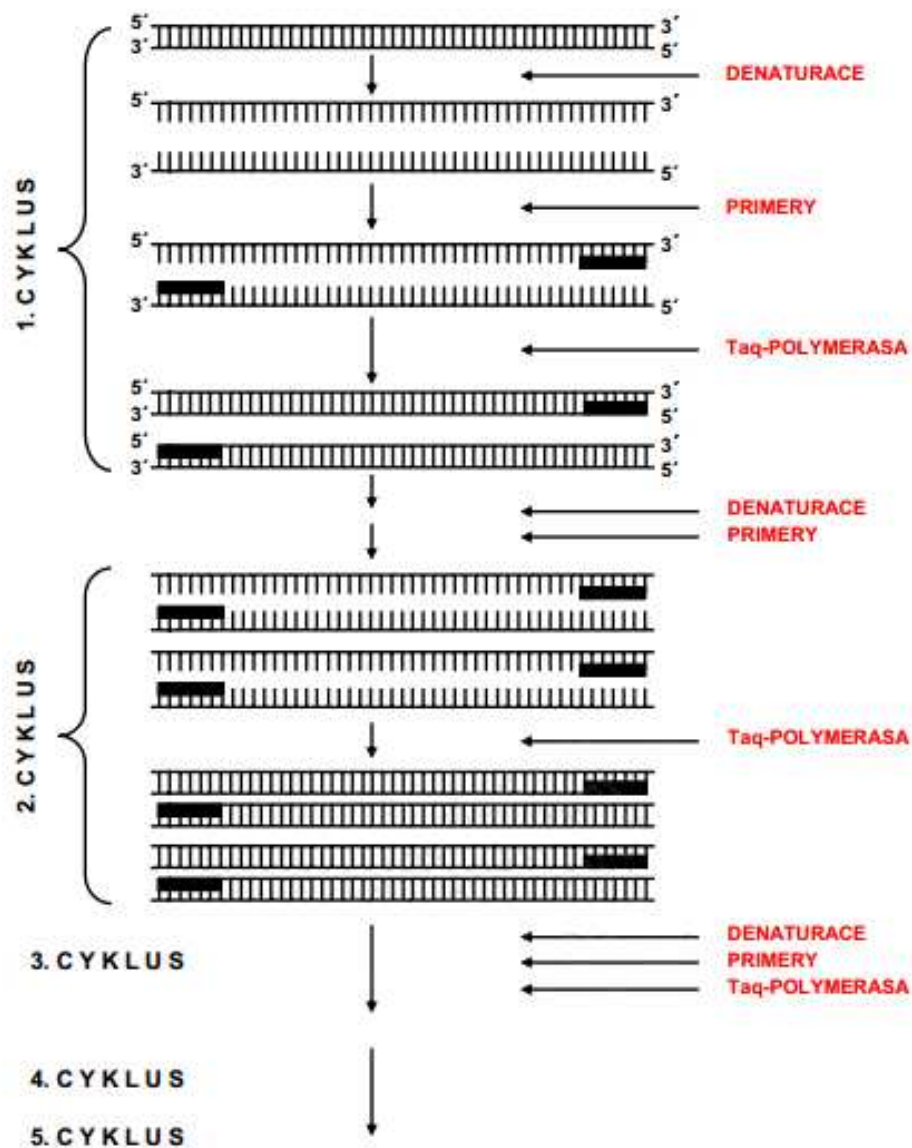
### 3.2.1 Princip metody PCR

Princip amplifikace DNA touto metodou *in vitro* je podobný replikaci DNA *in vivo*. Kopie úseku DNA jsou syntetizovány podle templátu (jednořetězcová DNA) ve směru 5'→ 3' pomocí enzymu DNA-polymerázy. Studovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'-konce směřují proti sobě. Jako primery se obvykle používají uměle připravené krátké oligonukleotidy o délce zhruba 18 – 30 bází, odvozené z koncových sekvencí DNA určené k amplifikaci. Po přidání DNA-polymerázy a deoxyribonukleotidtrifosfátů (dNTP) pak probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně. K syntéze DNA se používají termostabilní polymerázy izolované z termofilních mikroorganismů, např. Taq-DNA-polymeráza z *Thermus aquaticus* odolávající teplotám, při nichž DNA denaturuje. To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně formou cyklů. Jeden cyklus PCR sestává ze tří základních kroků (Obr. 5) [47], [48]:

1. Denaturace vyšetřované DNA (92 – 96 °C).
2. Hybridizace neboli tzv. annealing primerů (40 – 65 °C).
3. Prodlužování neboli elongace nukleotidových řetězců působením DNA-polymerázy při teplotě 70 – 74 °C.

Po prvním cyklu je replikovaný úsek DNA zdvojnásoben. Postupným opakováním výše uvedených kroků se exponenciálně ( $2^n$ ;  $n$  = počet cyklů) syntetizuje až  $10^9$  kopií amplifikovaného úseku DNA. Optimální počet cyklů je závislý na výchozí koncentraci templátové DNA a zpravidla se pohybuje v rozmezí od 25 do 35 cyklů [48].

PCR reakce se provádějí v zařízení nazývaném termocykler, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech. Přesné hodnoty teploty a dobu trvání jednotlivých kroků je třeba optimalizovat podle délky amplifikovaného úseku DNA a konkrétní sekvence primerů [49].



Obr. 5 – Schéma polymerázové řetězové reakce [50]

Výsledným produktem reakce PCR jsou fragmenty DNA definované délkou analogické restrikčním fragmentům, jejichž přítomnost v reakční směsi se prokazuje [49]:

- stanovením jejich velikosti elektroforézou v polyakrylamidovém nebo agarózovém gelu,
- Southernovou hybridizací se značenou sondou komplementární k části sekvence amplifikovaného úseku,
- stanovením sekvence DNA.

### 3.2.2 Faktory ovlivňující PCR

PCR je plně automatizovaný proces, který využívá termostabilní DNA-polymerázu. Avšak i termostabilní DNA-polymeráza katalyzuje prodlužování primerů při laboratorní teplotě, což může být příčinou chyb a vzniku nespecifických produktů, především při nízkých koncentracích templátové DNA [51].

Významnými látkami, které ovlivňují průběh PCR, jsou inhibitory přítomné ve vzorku. Inhibitory PCR lze podle jejich původu rozdělit na intracelulární a extracelulární. Intracelulární inhibitory jsou součástí buněk detekovaných mikroorganismů a mohou se proto uvolnit spolu s DNA. Mezi extracelulární inhibitory patří především kontaminanty komponent PCR a používaného materiálu. Tyto inhibitory ovlivňují průběh PCR několika mechanismy [52]:

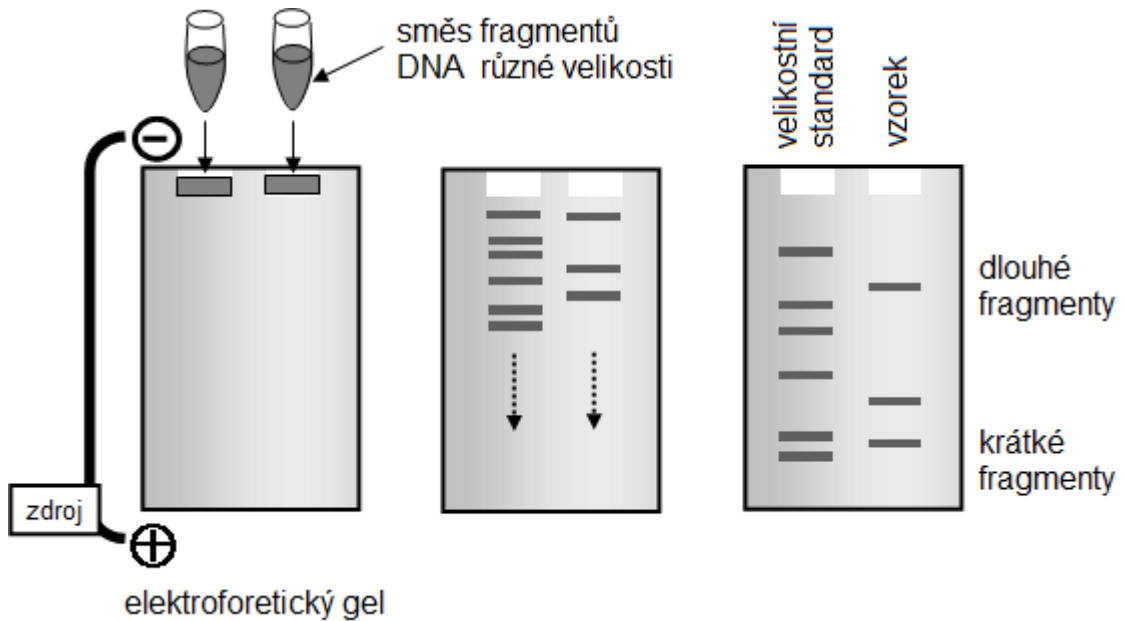
- mohou vyvazovat hořčnaté kationty nezbytné pro činnost DNA-polymerázy v PCR,
- mohou degradovat cílové nukleové kyseliny nebo primery,
- mohou přímo inhibovat DNA-polymerázu, která může být degradována proteínázami, denaturována fenolem, detergenty a nebo je inhibitorem blokováno její aktivní místo.

### 3.2.3 Detekce produktu PCR

Po skončení polymerázové řetězové reakce je nezbytné detekovat výsledný produkt této reakce. Jednou z nejvíce používaných metod je gelová elektroforéza. Principem této metody je pohyb záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli směrem anodě. Tuto migraci způsobují záporně nabitě fosfátové skupiny nukleových kyselin [48], [51].

Elektroforéza se provádí ve vhodném nosiči, nejčastěji v gelu tvořeném agarózou či polyakrylamidem. Tyto polymery vytvářejí složitou síťovou strukturu s póry, jejichž velikost lze ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru. Agarózové gely jsou vhodné pro separaci molekul nukleových kyselin o velikosti od 100 bp až po zhruba 50 kbp. Polyakrylamidové gely se používají k separaci menších molekul o velikosti zhruba 10 až 1000 bp. Elektrická pohyblivost neboli rychlost pohybu molekul DNA v gelu je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti. Tudíž větší molekuly DNA migrují pomaleji než menší molekuly [48].

Po skončení elektroforézy je nutné identifikovat polohu separovaných molekul. Fragmenty DNA lze snadno zviditelnit přidáním fluorescenčního barviva etidiumbromidu, který se vmezeřuje mezi sousední páry bází v DNA a vytváří s ní komplex. Po osvětlení ultrafialovým světlem tento komplex jasně září. Fragmenty DNA o stejné velikosti jsou pak na gelu patrné jako proužky, jejichž intenzita je úměrná koncentraci DNA [48], [51].



Obr. 6 – Princip gelové elektroforézy [53]



## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 CÍL PRÁCE

V současné době je trendem používat mikroorganismy s probiotickými účinky jako startérové nebo přídatné kultury při výrobě fermentovaných potravin. Hlavním důvodem, proč se přidávají tyto mikroorganismy do potravin je, bezpochybně jejich pozitivní působení na lidské zdraví. Na druhé straně mnozí zástupci probiotických kultur patří mezi potenciální producenty biogenních aminů. Proto je také důležité tyto mikroorganismy prověřovat na schopnost tvorby biogenních aminů. Cílem této diplomové práce bylo studium tvorby biogenních aminů u některých zástupců rodu *Lactobacillus* používaných jako startérové či probiotické kultury.

Pro dosažení cílů bylo třeba:

- zpracovat literární rešerši týkající se charakteristiky a dekarboxylázové aktivity bakterií s dieteticko-léčebnými účinky.
- popsat metody stanovení biogenních aminů.

Pro zpracování experimentální části diplomové práce bylo nutné naplnit tyto dílčí části:

- otestovat metodou PCR sledované mikroorganismy na přítomnost genů kódujících příslušné enzymy účastnících se tvorby biogenních aminů.
- zjistit vliv pH, koncentrace NaCl a laktózy na produkci biogenních aminů u testovaného mikroorganismu (*Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289) pomocí techniky HPLC.
- vyhodnotit výsledky získané z obou metod.
- na základě získaných výsledků zformulovat závěry.

## 5 MATERIÁLY A METODY

### 5.1 Použité mikroorganismy

Schopnost produkce putrescinu byla zjišťována metodou PCR u následujících izolátů ze sýrů: *Lactobacillus curvatus* DEPE 15, *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* DEPE 8, *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* DEPE 39, *Lb. curvatus* AI-2, *Lb. curvatus* AI-3 a *Lactobacillus brevis* č. 24. Tyto kmeny byly získány ze školní sbírky Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí (DEPE). Dále byly testovány i sbírkové kmeny (Česká sbírka mikroorganismů – CCM) *Lb. curvatus* CCM 7271 a *Lb. curvatus* CCM 7558.

Dekarboxylázová aktivita byla také zkoumána u kmene s dieteticko-léčebnými účinky ze Sbírký mlékarenských kultur Laktoflora (Culture Collection of Dairy Microorganisms – CCDM) *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289.

### 5.2 Kultivační média a roztoky

#### 5.2.1 Kultivační média

##### MRS bujón

MRS Broth (HiMedia).....55,15 g  
destilovaná voda.....1000 ml

Bylo naváženo 55,15 g půdy MRS Broth a rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Takto připravená půda byla sterilována v autoklávu (121 °C, 15 minut).

##### MRS agar

MRS agar (Bio-Rad).....68,00 g  
destilovaná voda.....1000 ml

Bylo naváženo 68 g půdy MRS agar a rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Takto připravená půda byla rozlita na Petriho misky.

### 5.2.2 Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů bakteriální kultury

#### Lyzační roztok s NaOH a SDS (0,05 M NaOH, 0,25 % SDS)

Lyzační roztok byl připraven tak, že k 99 ml 0,05 M NaOH (Ing. Petr Lukeš) bylo přidáno 1 ml 20% SDS (Serva).

#### Fyziologický roztok (0,9% NaCl)

NaCl (Lach-Ner).....9 g  
destilovaná voda.....1000 ml

Příslušné množství NaCl bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Poté byl roztok rozplněn do alikvotů a sterilizován v autoklávu (121 °C, 15 minut).

### 5.2.3 Roztoky pro PCR a gelovou elektroforézu

#### Nanášecí pufr

Použitý nanášecí pufr byl připraven zředěním Gel Loading Dye 6x (New England Biolabs) PCR vodou v poměru 1:1 (v/v).

#### 100 bp DNA marker

DNA marker byl připraven smícháním 180 µl PCR vody, 50 µl nanášecího pufru a 20 µl 100 bp DNA markeru o koncentraci 500 µg/ml (New England Biolabs).

#### 1x TBE pufr

1x TBE pufr byl připraven ze zásobního roztoku 10x TBE pufru (Lonza) tak, že ze 100 ml zásobního roztoku bylo doplněno sterilní destilovanou vodou na objem 1000 ml.

### 5.2.4 Roztoky pro derivatizaci vzorků

#### Karbonátový pufr (pH 11,0 – 11,1)

- pufr A (0,5 M NaHCO<sub>3</sub>):  
NaHCO<sub>3</sub> (Merck).....21 g  
destilovaná voda.....500 ml

Pufr A byl připraven rozpuštěním příslušného množství hydrogenuhličitanu sodného v 500 ml destilované vody.

- pufr B (0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>):

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck).....13,25 g

destilovaná voda.....250 ml

Pufr B byl připraven rozpuštěním příslušného množství hydrogenuhličitanu sodného v 250 ml destilované vody.

Karbonátový pufr byl připraven tak, že k 50 ml pufru A bylo přidáno takové množství pufru B, aby výsledná směs pufru měla hodnotu pH 9,2. Poté k tomuto roztoku bylo přidáno 16,65 g uhličitanu draselného (0,333 g/ml pufru, Merck), aby výsledný pufr měl hodnotu pH 11,0 – 11,1.

### **5.3 Příprava hrubých lyzátů bakteriální kultury pro PCR**

Hrubé lyzáty bakteriálních kultur byly připraveny podle práce Prodělalové Jany [52] a práce Španová a Rittich [54].

#### **5.3.1 Příprava hrubého lyzátu bakteriální kultury povařením a použitím proteinázy K**

Z kultury narostlé přes noc v MRS médiu bylo odpipetováno 1 ml do eppendorfkových zkumavek a zcentrifugováno 5 minut při 14 000 otáčkách při teplotě 4 °C. Supernatant byl opatrně slit a pelet byl promyt sterilní destilovanou vodou. K promytému sedimentu bylo přidáno 400 µl sterilní destilované vody a směs byla inkubována 5 minut při 100 °C. Po inkubaci bylo přidáno 0,6 µl proteinázy K (Roche Diagnostic) a vzorek byl dán na 10 minut inkubovat při 55 °C. Poté byl vzorek znovu inkubován 5 minut při 100 °C. Takto připravený lyzát byl uchováván při teplotách pod –18 °C do doby analýzy.

#### **5.3.2 Příprava hrubého lyzátu bakteriální kultury povařením suspenze buněk**

Z kultury narostlé přes noc v MRS médiu bylo odpipetováno 1 ml do eppendorfkových zkumavek a zcentrifugováno 5 minut při 14 000 otáčkách. Supernatant byl opatrně slit a pelet byl dvakrát promyt fyziologickým roztokem. Poté bylo přidáno 600 µl sterilní desti-

lované vody a vzorek byl dán na 15 minut inkubovat při 100 °C. Připravený lyzát byl uchováván při teplotách pod –18 °C do doby analýzy.

### 5.3.3 Příprava hrubého lyzátu bakteriální kultury alkalickou lyzí

Z kultury narostlé přes noc v MRS médiu bylo odpipetováno 1 ml do eppendorfkových zkumavek a zcentrifugováno 5 minut při 14 000 otáčkách při teplotě 4 °C. Supernatant byl opatrně slit a pelet byl promyt dvakrát fyziologickým roztokem. K promytému sedimentu bylo přidáno 60 µl lyzačního roztoku s NaOH a SDS a vzorek byl dán na 15 minut inkubovat při 100 °C. Po inkubaci bylo přidáno 540 µl sterilní destilované vody a vzorek byl uchováván při teplotách pod –18 °C do doby analýzy.

### 5.3.4 Příprava hrubého lyzátu z bakteriální kolonie z Petriho misky

Z kultury narostlé přes noc v MRS bylo odpipetováno 0,1 ml a přeneseno na povrch plotny s MRS médiem. Inokulum bylo rovnoměrně rozetřeno sterilní hokejkou. Petriho miska byla dána kultivovat při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin. Následně byly kolonie narostlé na Petriho misce sterilní kličkou resuspendovány v eppendorfkové zkumavce obsahující 90 µl sterilní destilované vody a 10 µl reakčního pufru pro PCR (Tab. III). Směs byla jemně promíchána na vortexu a dána inkubovat na 20 minut při 95 °C. Po inkubaci byla směs zcentrifugována 1 minutu při 14 500 otáčkách. Následně byl supernatant přenesen do nové sterilní eppendorfkové zkumavky a byl uchováván při teplotách pod –18 °C do doby analýzy.

## 5.4 Izolace DNA

Testované laktobacily byly kultivovány v bujónu MRS 24 hodin při teplotě 37 °C. K izolaci bakteriální DNA byly použity tyto izolační kity:

- UltraClean<sup>TM</sup> Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories),
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostic).

Při izolaci bakteriální DNA pomocí uvedených kitů se vždy postupovalo podle návodu výrobce.

## 5.5 Polymerázová řetězová reakce

Metodou PCR byl u sledovaných kmenů laktobacilů zjišťován přítomnost genů kódujících příslušné enzymy účastnících se tvorby putrescinu. Přehled o použitých primerů, jejich cílových genů a velikosti očekávaných PCR produktů podává Tabulka II.

Tab. II – Primery použité pro detekci genů zodpovědných za produkci vybraných biogenních aminů

Set primerů	Cílový gen	Velikost očekávaného ampliconu	Zdroj
3' + 16'	speF	1446 bp	Marcobal et al., 2005 [55]
PUT1-F + PUT1-R	speF	1440 bp	Fardhlaoui-Zud et al., 2012 [56]
AgD1 + AgD2	aguA	600 bp	Coton et al., 2010 [57]
Agdif + agdir	aguA	90 bp	Nannelli et al., 2008 [58]
AguA-F + aguA-R	aguA	830 bp	Landete et al., 2010 [59]

### 5.5.1 Příprava reakční směsi

Při přípravě PCR reakční směs byl zvolen postup namíchání master mixů. Master mix byl připraven smícháním příslušného množství všech komponent (Tab. III) kromě DNA a primerů v 1,5 ml eppendorfkové zkumavce. Po promíchání byl master mix rozpipetován do 200 µl eppendorfkových zkumavek a k master mixu bylo následně přidáno příslušné množství DNA a primerů. Jako negativní kontrola PCR byly použity komponenty PCR bez DNA. Mikrozukumavky s takto připravenou reakční směsí o objemu 15,05 µl byly krátce promíchány a zcentrifugovány. Následně byly mikrozukumavky umístěny do termocykleru.

Tab. III – Základní složení PCR reakční směsi

Komponenta	Objem [ $\mu$ l]
PCR voda (Top-Bio)	11,2
Reakční pufr kompletní (10x koncentrovaný – Roche)	1,5
dNTP směs (10 mM – Jena Bioscience)	0,6
DNA primer 1	0,3
DNA primer 2	0,3
Taq-DNA-polymeráza (5 U/ $\mu$ l – Roche)	0,15
DNA matrice	1

### 5.5.2 Provedení PCR

Syntéza amplifikovaného PCR fragmentu probíhala v termocykleru PTC 100 MJ Research (Bio-Rad), který má vyhřívané víko. Pro minimalizaci výskytu nespecifických PCR produktů byla zvolena touchdown PCR, jenž probíhala podle programu LW+TD.

#### Program LW+TD:

Počáteční denaturační teplota	94 °C / 10 minut
1. Denaturace	94 °C/ 30 sekund
2. Annealing primerů	62 – 47 °C/ 1 minuta
3. Extenze	72 °C/ 1 minuta
Závěrečná extenze	72 °C/ 5 minut

Program LW+TD probíhal tak, že vzorky DNA byly nejprve kompletně denaturovány 10 minut inkubací při 94 °C. DNA byla amplifikována v 17 různých cyklech, přičemž první 2 cykly se teploty u kroků 1 – 3 se neměnily (annealing 62 °C) a od následujícího cyklu annealingová teplota vždy klesala o 1 °C až do teploty 47 °C (61 °C – 47 °C). Cyklus s každou anealingovou teplotou byl následně ještě jednou opakován. Závěrečná extenze probíhala 5 minut při 72 °C.



## 5.6 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je jednou z nejpoužívanějších technik pro detekci amplifikovaného PCR fragmentu nebo k ověření přítomnosti a kvality izolované DNA. Pro ověření kvality izolované DNA byl použit 0,8% agarózový gel, k detekci amplifikovaného PCR fragmentu byl použit 1,5% gel.

### 5.6.1 Příprava agarózového gelu

Příslušné množství agarózy (Lonza Biotec) bylo přidáno k danému objemu 1x koncentrovaného TBE pufru. Směs byla za občasného promíchání zahřívána v mikrovlnné troubě do doby varu (do vzniku čirého roztoku). Po ochladnutí roztoku na přibližně 50 °C bylo přidáno 5 µl etidiumbromidu (Top-Bio). Směs byla pozvolna promíchána a nalita do elektroforetické vaničky (Scie-Plas) s připraveným hřebínkem a nechána tuhnout při laboratorní teplotě asi 30 minut. Po ztuhnutí agarózy byl vyjmut hřeben a na takto připravený gel byly nanášeny vzorky DNA nebo PCR produktu.

### 5.6.2 Nanášení vzorků na gel a provedení elektroforézy

V případě ověření kvality DNA byl vzorek připraven smícháním 5 µl DNA, 5 µl destilované vody a 3 µl nanášecího pufru. Při detekci PCR produktu byl vzorek připraven přidáním 3 µl nanášecího pufru k amplifikovanému PCR fragmentu. Z takto připravených vzorků bylo odpipetováno 12 µl a naneseno do komůrek na gelu vždy ve směru zprava doleva. K určení velikostí izolované DNA nebo PCR produktu byl použit 100 bp DNA marker s fragmenty DNA o velikosti (bp): 1517, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100. Marker byl nanášen vždy v objemu 12 µl.

Gel byl poté zalit 1x koncentrovaným TBE pufrem do výšky zhruba 2 mm nad agarózový gel. Elektroforéza byla spuštěna zapnutím zdroje na 90 V/ 1 hodinu. Separace probíhala tak dlouho, dokud bromfenolová modř obsažená v nanášecím pufru nedoputovala do 2/3 gelu. Gel byl poté vyfocen na UV transluminátoru (Syngene).

## 5.7 Purifikace a sekvenace PCR produktu

K přečištění neboli purifikaci vybraných PCR amplikonů byl použit purifikační kit QIA PCR Purification Kit (QIAGEN). Purifikace byla provedena podle návodu výrobce a přečištěné PCR produkty byly následně zaslány na sekvenační analýzu (Ústav molekulární biologie rostlin, Akademie věd České Republiky, České Budějovice). Získané výsledky ze sekvenační analýzy byly porovnány s dostupnými veřejnými databázemi za použití nástroje Blast (National Centre for Biotechnology Information – NCBI).

## 5.8 Stanovení biogenních aminů pomocí HPLC

### 5.8.1 Příprava kultivačního média pro zjištění produkce BA

Dekarboxylázová aktivita probiotického kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 byla zjišťována pomocí kultivace v tekutém MRS médiu obsahující jednotlivé aminokyseliny (arginin, ornitin, tyrozin a lyzin) jako prekurzory příslušných biogenních aminů a to v koncentraci 0,3 % (w/v). Základní složení kultivačního média je uvedena v Tabulce IV. Do tohoto modifikovaného MRS bujónu byl ještě přidán chlorid sodný (0,0; 1,0 a 2,0 %) a laktóza (0,0; 0,25; 0,50 a 1,0 %) pro zjištění vlivu koncentrace NaCl a sacharidu na produkci BA sledovaným laktobacilem. Byl také zkoumán vliv pH, a proto bylo před inokulací bakteriální kultury upraveno pH kultivačního média na hodnotu 4,5 a 5,0. Všechny uvedené faktory byly testovány ve vzájemných 24 kombinacích.

Do 8 ml takto připraveného kultivačního média bylo pro snížení redoxního potenciálu přidáno 70 µl roztoku cysteinu (Sigma-Aldrich) a zaočkováno 25 µl bakteriální suspenze kultivované 48 hodin. Takto připravené vzorky byly kultivovány při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin.

Tab. IV – Složení kultivačního média pro zjištění produkce BA

Složka	Množství [g/l]
MRS Broth (HiMedia)	55,15
Pepton (HiMedia)	10,0
Beef extrakt (HiMedia)	10,0
Yeast extract (HiMedia)	5,0
Dextróza/ glukóza (Lach-Ner)	20,0
Tween 80 (Lach-Ner)	1,0
Hydrogencitronan amonný (Ing. Petr Lukeš)	2,0
Octan sodný (Ing. Petr Lukeš)	5,0
Síran hořečnatý (Ing. Petr Lukeš)	0,1
Síran manganatý (Lach-Ner)	0,005
Hydrogenfoforečnan didraselný (PENTA)	2,0
Arginin, ornitin, tyrozin, lyzin (Sigma-Aldrich)	0,3

### 5.8.2 Příprava vzorků na derivatizaci

Modifikovaný bujón MRS po kultivaci testovaného bakteriálního druhu byl zcentrifugován při otáčkách 4600 po dobu 10 minut. Získaný supernatant byl rozdělen do tří eppendorfkových zkumavek a zředěn v poměru 1:1 (v/v) kyselinou chloristou ( $c = 1,2 \text{ mol/l}$ , Merck).

### 5.8.3 Předkolonová derivatizace dansylchloridem

Výše uvedeným způsobem upravené vzorky byly podrobeny derivatizaci dansylchloridem (Sigma-Aldrich) podle návodu dostupném v laboratoři Ústavu technologie potravin:

1. K upraveným vzorkům bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  1,7-heptandiamin (Sigma-Aldrich) v koncentraci 500 mg/l jako vnitřního standardu. Z této směsi bylo odpipetováno 1 ml do derivatizační nádoby.
2. Do vzorků v derivatizačních nádobkách bylo přidáno 1,5 ml karbonátového pufru s pH 11,0 – 11,1 a 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu o koncentraci 5 g/l v acetonu (Merck). Derivatizační nádoby byly dobře uzavřeny a dány třepat 20 hodin v temnu.

3. Následně bylo do každého vzorku přidáno 200  $\mu$ l roztoku prolinu (Merck) a vzorky se třepaly další hodinu. K takto upravené směsi bylo přidáno 3 ml heptanu (Sigma-Aldrich) a vzorky se opět třepaly 3 minuty ručně.
4. Poté bylo z derivatizačních nádobek odpipetováno 1 ml heptanové vrstvy do vialek.
5. Vialky byly dány odpařit do sucha při teplotě 60 °C pod proudem dusíku.
6. Suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich) a vzorky se uchovávaly do doby analýzy v mrazícím zařízení při teplotách pod -18 °C.

#### 5.8.4 Vlastní chromatografické stanovení

Bezprostředně před analýzou byly derivatizované vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22  $\mu$ m a naneseny na kolonu (Agilent Eclipse Plus C18 RRHD, 50 x 3,0 mm, velikost částic 1,8  $\mu$ m) chromatografického systému (termostat kolon Agilent 1260 Infinity; autosampler LabAlliance, USA; binární pumpa LabAlliance, USA; UV/VIS DAD detektor Agilent Technologies).

Separace dansylderivátu biogenních aminů probíhala gradientovou elucí (Tab. V) a jejich detekce probíhala spektrofotometricky UV zářením o vlnové délce 254 nm. Podmínky separace a detekce sledovaných biogenních aminů byly nastaveny podle práce Smělá et al. [20].

Tab. V – Lineární gradientový eluční program HPLC

Čas [min]	10% Acetonitril [%]	100% Acetonitril [%]
0,0	39	61
0,1	39	61
1,4	30	70
3,5	17	83
4,0	0	100
9,5	0	100
11,5	39	61
15,5	39	61

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Sledování genů zodpovědných za produkci putrescinu metodou

#### PCR

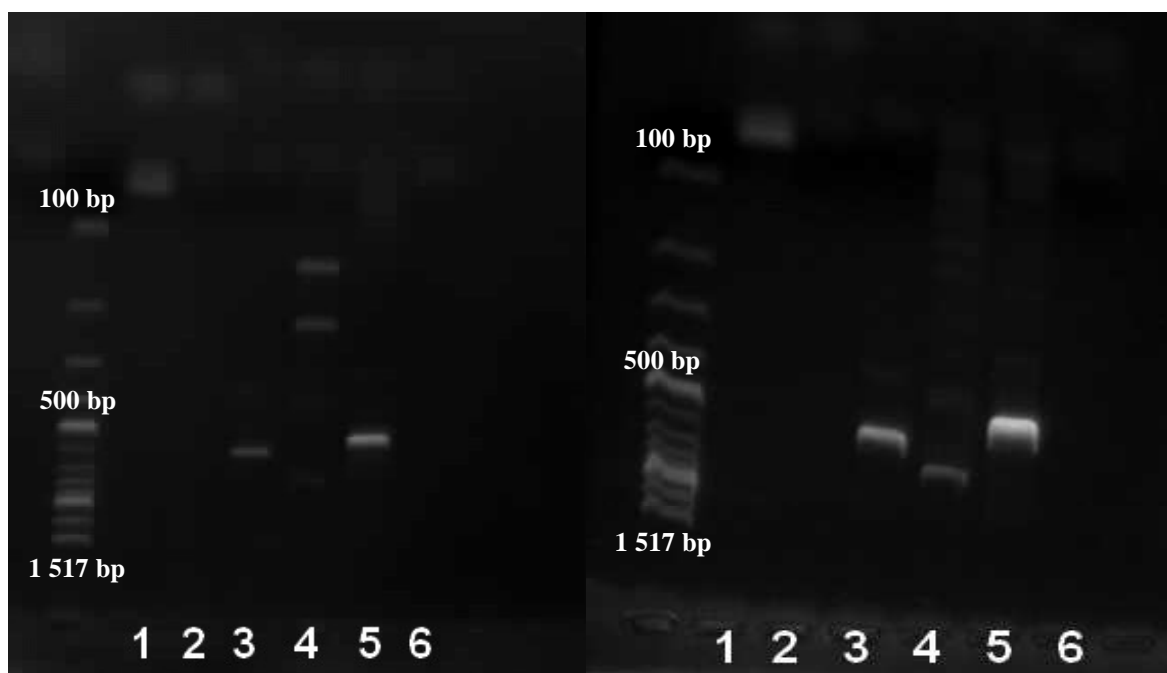
Metodou polymerázové řetězové reakce byl proveden skrínig produkce genů zodpovědných za produkci putrescinu u následujících laktobacilů izolovaných ze sýrů: *Lactobacillus curvatus* DEPE 15, *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* DEPE 8, *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* DEPE 39, *Lb. curvatus* AI-2, *Lb. curvatus* AI-3 a *Lactobacillus brevis* DEPE 24 na potenciální produkci putrescinu. Dále byly testovány i sbírkové kmeny (Česká sbírka mikroorganizmů – CCM) *Lb. curvatus* CCM 7271 a *Lb. curvatus* CCM 7558. *Salmonella enterica* CAPM 6324 byla použita jako pozitivní kontrola.

Všeobecně mohou grampozitivní mikroorganismy metabolizovat putrescin dvěma různými dráhami: ornitindekarboxylázovou (ODC) a agmatindeaminázovou (AgDI). Při ornitindekarboxylázové dráze je ornitin přeměněn ornitindekarboxylázou (kódovaná genem *speF*) na putrescin [57]. Při agmatindeaminázové dráze hrají důležitou roli dva enzymy: agmatindeamináza a N-karbomoylputrescinaminohydroláza. Agmatindeamináza (kódovaná genem *aguA*) přeměňuje agmatin na N-karbomoylputrescin a amoniak. Následně N-karbomoylputrescinaminohydroláza (kódovaná genem *aguB*) konvertuje N-karbomoylputrescin na putrescin, oxid uhličitý a amoniak [59], [60].

Cílem této experimentální části bylo prověřit sledované laktobacily právě na přítomnost genů *speF* a *aguA*. Pro detekci genu *speF* u testovaných laktobacilů byly použity primery 3′/16′ a PUT1-F/ PUT1-R, pro detekci genu *aguA* byly použity primery AgD1/AgD2, Agdif/Agdir a aguA-F/ aguA-R. Tyto sady primerů byly nejprve testovány u DNA izolovaných z *Lb. curvatus* AI-2 a *Lb. curvatus* AI-3. K izolaci DNA byl použit izolační kit UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories).

U sad primerů 3′/16′ a PUT1-F/ PUT1-R použitých pro detekci genu *speF* nebyly obdrženy očekávané amplikony. Ze sad primerů použitých na detekci genu *aguA* očekávaný produkt byl detekován u primerů AgD1/AgD2 a aguA-F/ aguA-R (Obr. 7 a 8). Avšak nejlepšího výsledku bylo dosaženo s primery AgD1/AgD2, kdy byl obdržen pouze očekávaný amplikon o velikosti 600 bp, a proto byla tato sada dále testována u následujících kmenů: *Lactobacillus curvatus* DEPE 15, *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* DEPE 8, *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* DEPE 39, *Lb. brevis* DEPE 24, *Lb. curvatus* CCM 7271 a *Lb. curvatus*

CCM 7558. V rámci optimalizace metody byly zkoušeny různé techniky izolace DNA a vliv různých koncentrací  $Mg^{2+}$  iontů na průběh amplifikace.

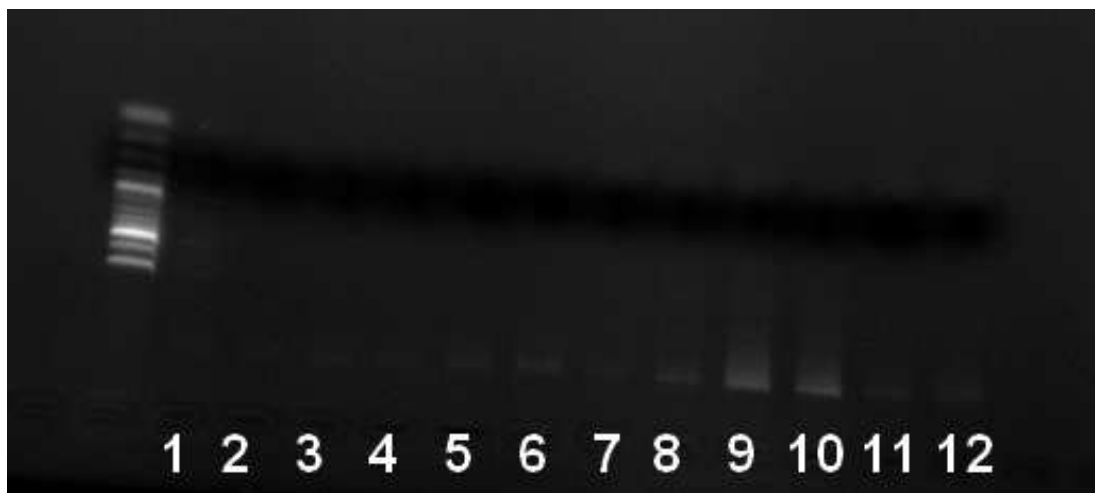


Obr. 7 – PCR amplikony s využitím testovaných primerů u *Lb. curvatus* AI-2, primery: 3′/16′ (1), PUT1-F/PUT1-R (2), AgD1/AgD2 (3), aguA-F/ aguA-R (4), pozitivní kontrola: adiA3-F/adiA3-R (5), negativní kontrola (6)

Obr. 8 – PCR amplikony s využitím testovaných primerů u *Lb. curvatus* AI-3, primery: 3′/16′ (1), PUT1-F/PUT1-R (2), AgD1/AgD2 (3), aguA-F/ aguA-R (4), pozitivní kontrola: adiA3-F/adiA3-R (5), negativní kontrola (6)

Pro testovanou sadu primerů (AgD1/AgD2) byly nejprve použity jako templátová DNA hrubé lyzáty výše uvedených mikroorganismů. Hrubé lyzáty byly připraveny podle postupů uvedených v kapitolách 5.3.1. až 5.3.4. Nejprve však byly 10x naředěny PCR vodou a následně v objemu 1  $\mu$ l byly použity do PCR reakční směsi. Avšak v důsledku vysoké citlivosti PCR na čistotu templátové DNA se PCR amplifikace nezdařila. Důvodem mohly být látky organické a anorganické povahy, které se uvolní spolu s DNA při lyzi buněk a mohou tak působit jako intracelulární inhibitory PCR. Proto byl zvolen další způsob izolace DNA pomocí izolačního kitu. K izolaci DNA byl použit izolační kit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics). Tato technika sice umožňuje získat DNA o vysoké čistotě a kvalitě, avšak v případě testovaných laktobacilů se nepodařilo vyzolovat DNA v dostatečné kvalitě. Z Obrázku 9 je patrné, že se nejlépe podařilo

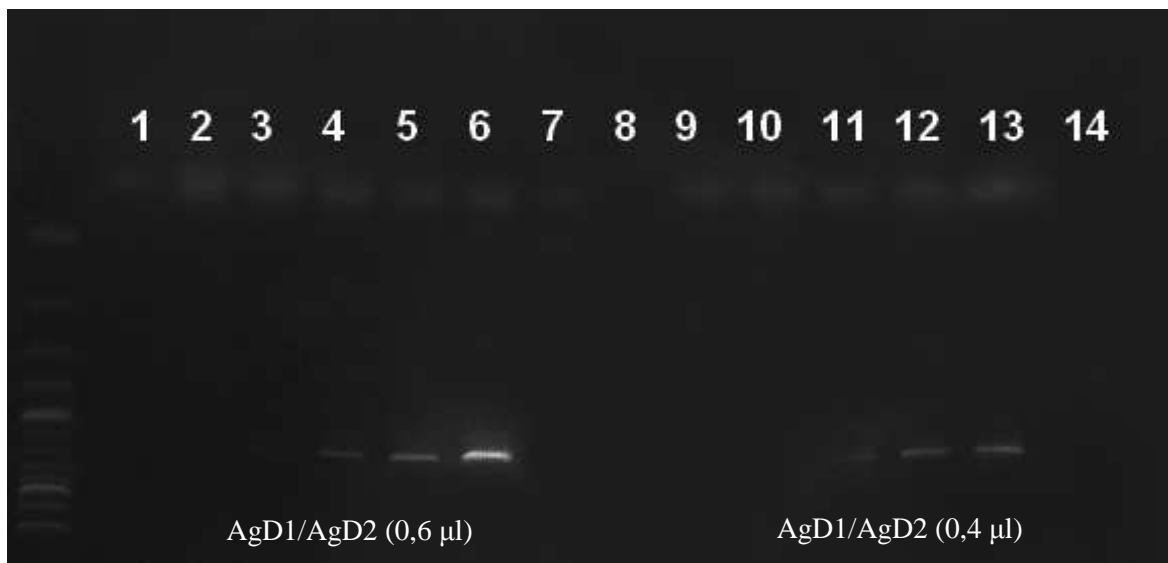
izolovat DNA z kmene *Lactobacillus brevis* DEPE 24, proto byla tato DNA použita k další analýze.



Obr. 9 – Čistota a kvalita vyizolované DNA: *Lb. curvatus* DEPE 15 (1, 2), *Lb. curvatus* CCM 7271 (3, 4), *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* DEPE 39 (5, 6), *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* DEPE 8 (7, 8), *Lb. brevis* DEPE 24 (9, 10) a *Lb. curvatus* CCM 7558 (11, 12)

S DNA izolovanou z *Lb. brevis* DEPE 24 byla provedena PCR amplifikace s testovanými primery AgD1/AgD2 a byl zkoušen vliv různých koncentrací  $Mg^{2+}$  iontů na průběh PCR. Jelikož příliš vysoké koncentrace hořečnatých iontů vedou ke vzniku nescifických produktů, je nutné vždy stanovit optimální koncentraci těchto iontů empiricky. Do PCR reakčních směsí byla použita DNA testovaného kmene naředěná na koncentraci  $10^{-2}$  vždy v objemu 1  $\mu$ l. Hořečnaté ionty byly přidávány v objemu 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 a 0,7  $\mu$ l. Do reakčních směsí s těmito koncentracemi  $Mg^{2+}$  iontů byla přidávána testovaná sada primerů v celkovém objemu 0,6  $\mu$ l a 0,4  $\mu$ l.

Z Obrázku 10 je patrné, že k amplifikaci očekávaného produktu o velikosti 600 bp nastala v případě použití testované sady primerů v objemu 0,6  $\mu$ l u  $Mg^{2+}$  iontů přidaných v objemu 0,4; 0,5 a 0,7  $\mu$ l. V druhém případě, při použití testované sady primerů v celkovém objemu 0,4  $\mu$ l, očekávaný produkt byl detekován u  $Mg^{2+}$  iontů přidaných v objemu 0,3; 0,4 a 0,5  $\mu$ l. Avšak nejlepšího výsledku bylo dosaženo při použití primerů AgD1/AgD2 v celkovém objemu 0,6  $\mu$ l a  $Mg^{2+}$  iontů v objemu 0,7  $\mu$ l.

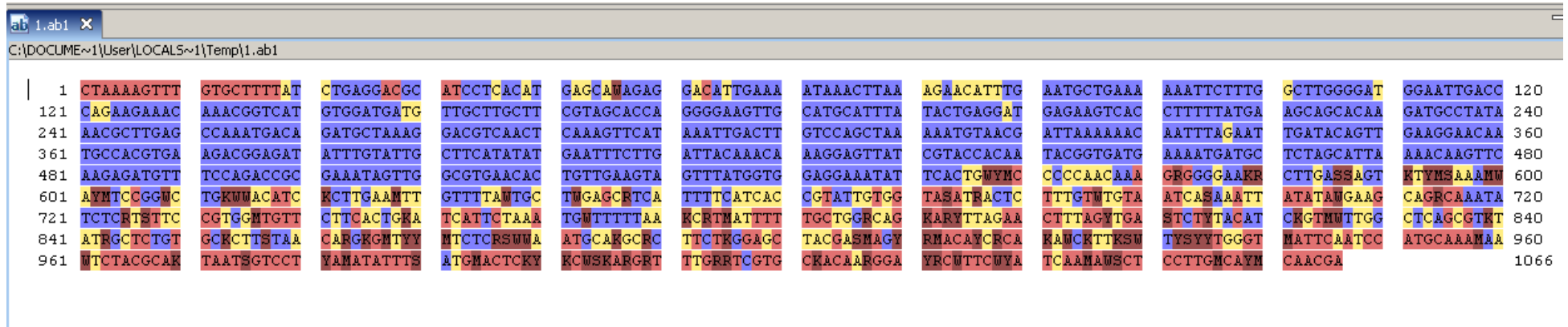


Obr. 10 – Vliv přidavku  $Mg^{2+}$  iontů na PCR amplifikaci v objemu: 0,1 µl (1, 9); 0,2 µl (2, 10); 0,3 µl (3, 11); 0,4 µl (4, 12); 0,5 µl (5, 13); 0,7 µl (6,14) a negativní kontrola (7, 15)

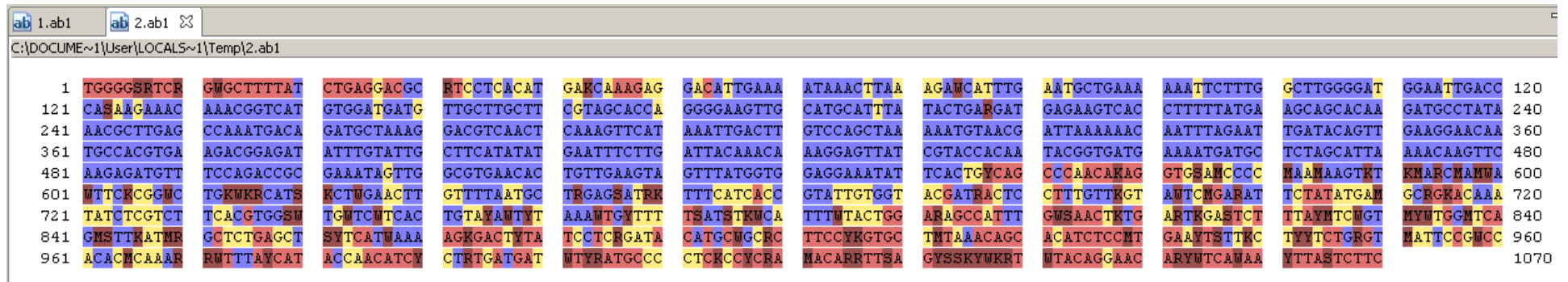
### 6.1.1 Sekvence PCR produktu

Pro ověření správnosti metody byly vybrány amplikony genu *aguA* z *Lactobacillus curvatus* AI-2 a *Lb. curvatus* AI-3 pro sekvenční analýzu. Výsledky získané ze sekvenční analýzy byly porovnány s dostupnými veřejnými databázemi za použití nástroje Blast (National Centre for Biotechnology Information – NCBI). Získané sekvence obou PCR amplikonů (Příloha I a II) se z 99 % shodovaly se sekvencí genu *aguA* u kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147. Ukázky sekvencí obou amplikonů jsou zobrazeny na Obrázku 11 a 12.





Obr. 11 – Ukázka sekvence amplikonu 1 – zjištěná sekvence vizualizovaná v programu (SEQUENCE SCANNER SOFTWARE v 1.0.)



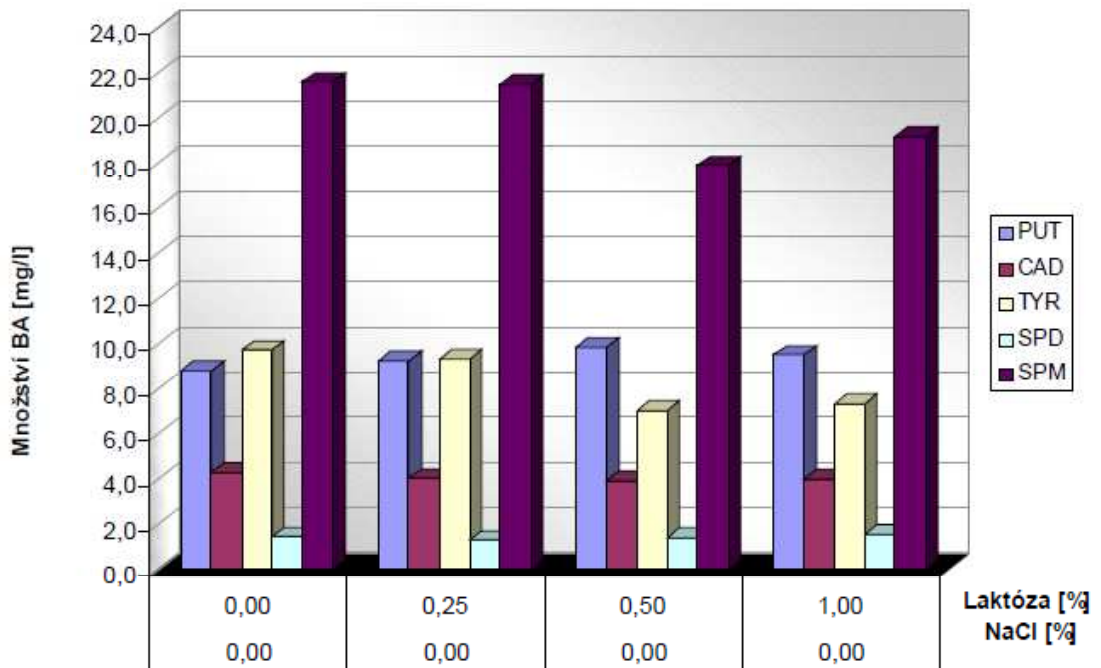
Obr. 12 – Ukázka sekvence amplikonu 2 – zjištěná sekvence vizualizovaná v programu (SEQUENCE SCANNER SOFTWARE v 1.0.)

## 6.2 Chromatografické stanovení biogenních aminů

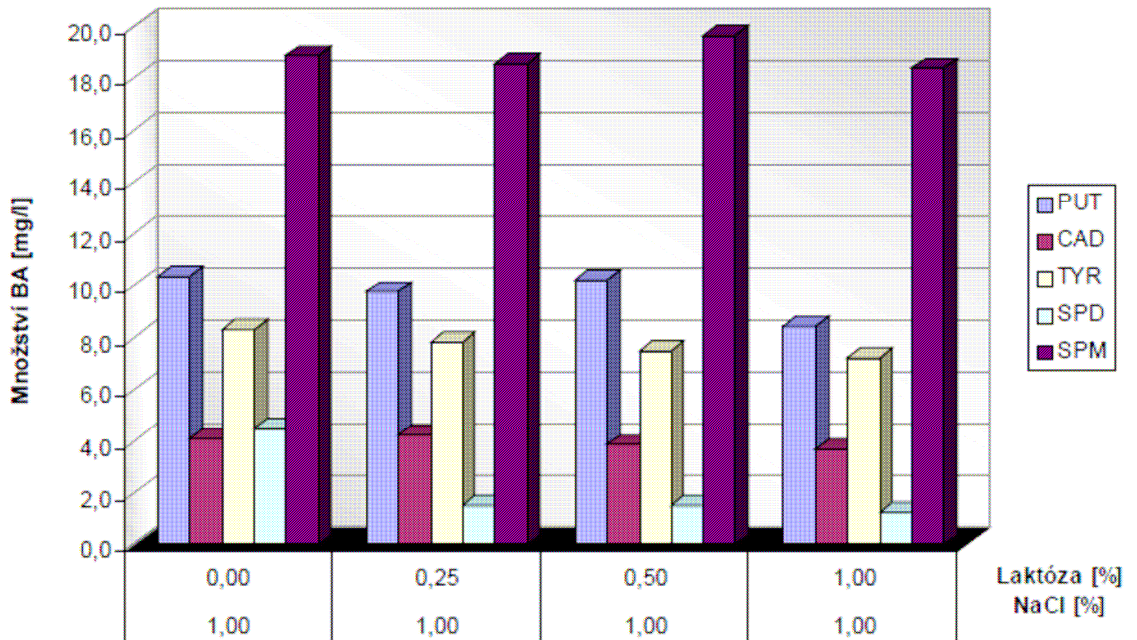
Schopnost produkce 5 biogenních aminů (putrescinu, kadaverinu, tyraminu, spermidinu a sperminu) za různých kultivačních podmínek byla zjišťována u probiotického kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Touto metodou byl zkoumán zejména vliv pH, koncentrace NaCl a koncentrace laktózy na dekarboxylázovou aktivitu tohoto kmene. Výsledky z analýzy jsou uvedeny v tabulkách v Příloze III.

Na Obrázcích 13 – 15 lze sledovat vývoj produkce jednotlivých BA v kultivačních médiích s přidavkem NaCl v koncentraci 0,0; 1,0 a 2,0 % (w/v), s přidavkem laktózy v koncentraci 0,0; 0,25; 0,50; a 1,0 % (w/v) a s počáteční hodnotou pH 4,5. Za těchto kultivačních podmínek byla detekována produkce všech stanovovaných BA. Nejvíce však byl produkován spermin. Detekované množství tohoto BA se pohybovalo v rozmezí 17,9 - 23,6 mg/l. Nejvyšší množství sperminu (23,6 mg/l) bylo zjištěno v kultivačním médiu s 2 % (w/v) NaCl a s 1 % (w/v) laktózy. Kromě sperminu bylo v tomto médiu ještě detekováno nejvyšší množství tyraminu, kdy byl produkován v množství 10,9 mg/l. Naopak za těchto kultivačních podmínek byla úplně inhibována produkce spermidinu a také došlo k výraznému snížení produkce putrescinu. V kultivačním médiu s 0,50 % (w/v) laktózy a 2 % NaCl (w/v) byl putrescin detekován v množství 10,6 mg/l, avšak při zvýšení koncentrace laktózy na 1,0 % (w/v) se množství putrescinu snížilo na 4,9 mg/l.

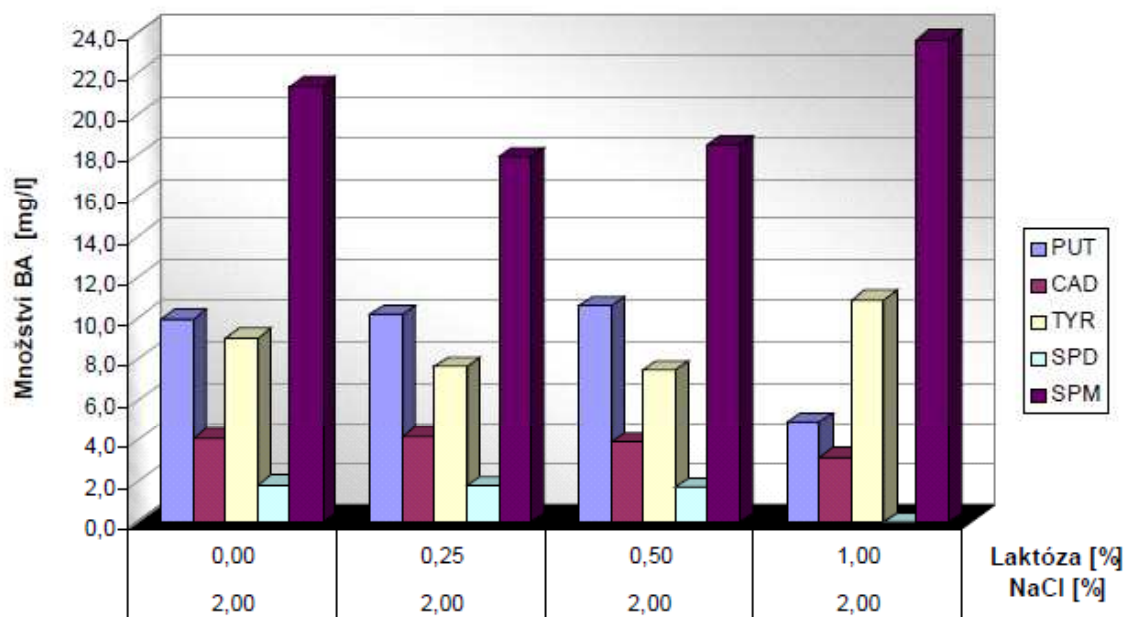
V produkci kadaverinu v kultivačních médiích s 0,0 % (w/v) NaCl a se zvyšující se koncentrací laktózy sice nedošlo k výrazné změně ve vyprodukovaném množství. Avšak v kultivačních médiích s přidavkem NaCl v koncentraci 1,0 a 2,0 % (w/v) a se zvyšující se koncentrací laktózy byla zaznamenána tendence k mírnému poklesu produkce tohoto BA.



Obr. 13 – Produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při pH 4,5 při různé koncentraci laktózy (PUT – putrescin, CAD – kadaverin, TYR – tyramin, SPD – spermidin, SPM – spermin)

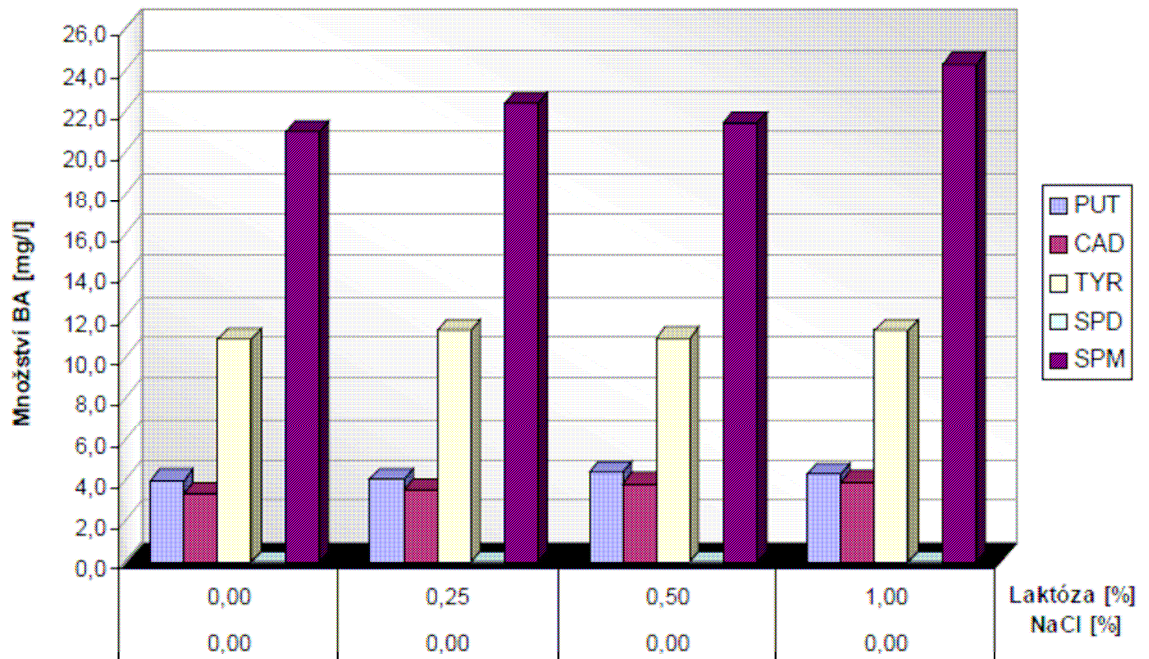


Obr. 14 – Produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při pH 4,5 v prostředí s 1% NaCl při různé koncentraci laktózy (PUT – putrescin, CAD – kadaverin, TYR – tyramin, SPD – spermidin, SPM – spermin)

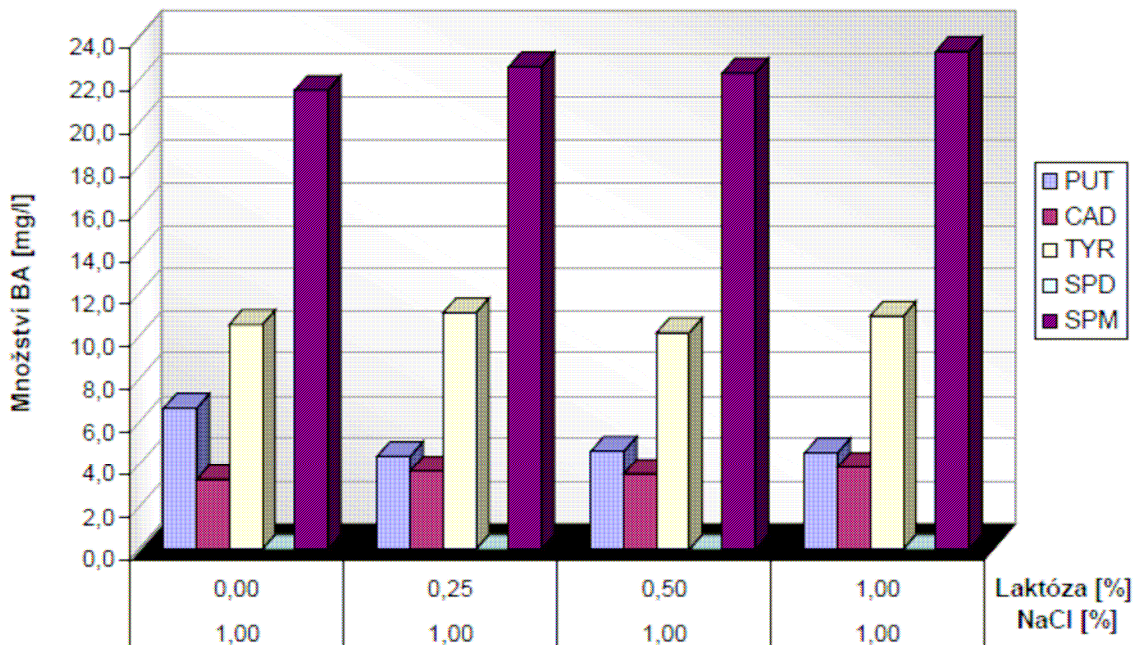


Obr. 15 – Produkce bienních aminů kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při pH 4,5 v prostředí s 2% NaCl při různé koncentraci laktózy (PUT – putrescin, CAD – kadaverin, TYR – tyramin, SPD – spermidin, SPM – spermin)

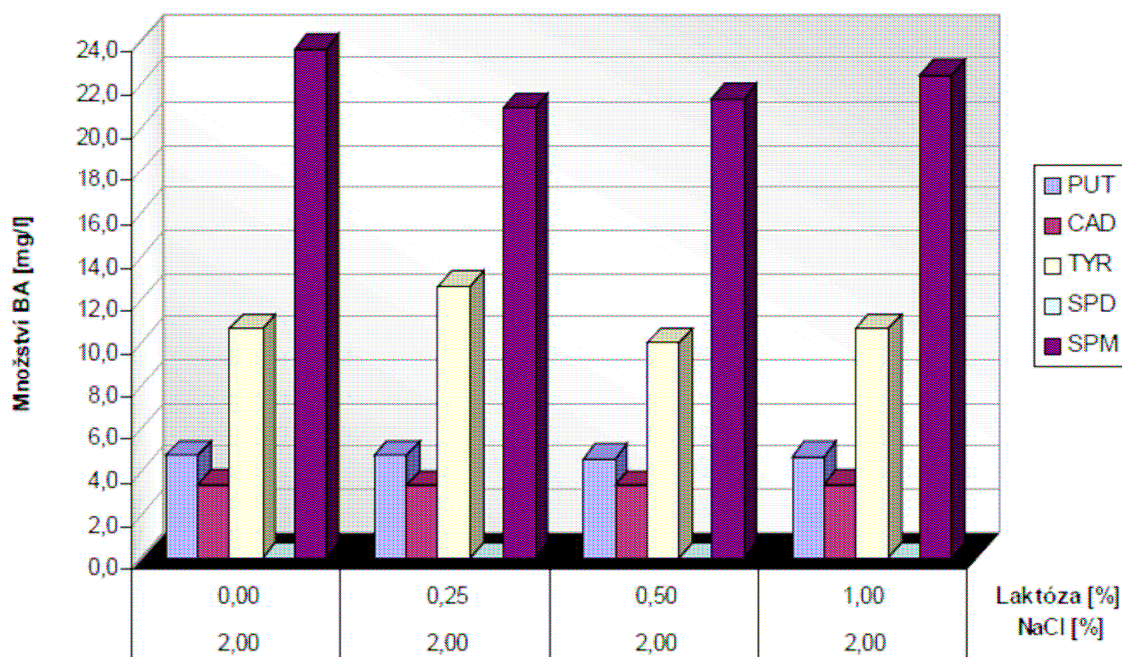
Vývoj produkce jednotlivých BA v kultivačních médiích s přidavkem NaCl v koncentraci 0,0; 1,0 a 2,0 % (w/v), s přidavkem laktózy v koncentraci 0,0; 0,25; 0,50; a 1,0 % (w/v) a s počáteční hodnotou pH 5,0 lze sledovat na Obrázcích 16 – 18. Je patrné, že za daných kultivačních podmínek už nedochází k produkci spermidinu. Se změnou pH prostředí došlo také ke snížení produkce putrescinu oproti kultivaci při pH 4,5. Zjištěná množství putrescinu ve vzorcích nepřesáhla 5,0 mg/l s jedinou výjimkou, kdy v kultivačním médiu bez přidavku laktózy a obsahující 1 % (w/v) NaCl byl detekován tento BA v množství 6,6 mg/l. Za daných kultivačních podmínek naopak došlo ke zvýšení produkce tyraminu a sperminu. Zjištěná množství se pohybovala v případě tyraminu v rozmezí 10,0 – 12,6 mg/l a v případě sperminu v rozmezí 20,9 – 24,3 mg/l. Nejvyšší množství sperminu bylo stanoveno v kultivačním médiu, které obsahovalo pouze laktózu v koncentraci 0,25 %. Naopak nejvyšší množství tyraminu bylo detekováno v kultivačním médiu obsahující 2,0 % (w/v) NaCl a 0,25 % (w/v) laktózy. V případě produkce kadaverinu nebyla zaznamenána výrazná změna.



Obr. 16 – Produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při pH 5,0 při různé koncentraci laktózy (PUT – putrescin, CAD – kadaverin, TYR – tyramin, SPD – spermidin, SPM – spermin)



Obr. 17 – Produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při pH 5,0 v prostředí s 1% NaCl při různé koncentraci laktózy (PUT – putrescin, CAD – kadaverin, TYR – tyramin, SPD – spermidin, SPM – spermin)



Obr. 18 – Produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při pH 5,0 v prostředí s 2% NaCl při různé koncentraci laktózy (PUT – putrescin, CAD – kadaverin, TYR – tyramin, SPD – spermidin, SPM – spermin)

### 6.3 Souhrnná diskuze

Experimentální část diplomové práce se zabývala dekarboxylázovou aktivitou některých druhů rodu *Lactobacillus* využívaných jako startérové kultury nebo jako probiotika. První část experimentu se věnovala detekcí genů kódujících enzymy ornitindekarboxylázu (*speF*) a agmatindeaminázu (*aguA*) účastnících se biosyntézy putrescinu. Pouze u dvou izolátů ze sýru eidamského typu (*Lb. curvatus* AI-2 a *Lb. curvatus* AI-3), které byly označeny za producenty putrescinu, se podařilo detekovat gen *aguA* za použití dříve publikovaných primerů AgD1 a AgD2 [57]. Následně sekvenční analýzou byla potvrzena správnost získaného ampliconu. Lze proto usoudit, že tyto izoláty ze sýru jsou schopny syntetizovat putrescin přes agmatindeaminázovou (AgDI) dráhu.

Ladero et al. [61] ve své studii uvádí, že právě u bakterií izolovaných z mléčných výrobků je dominantní cesta syntézy putrescinu AgDI dráha. Tato schopnost byla zjištěna např. u *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lactococcus lactis* a *Enterococcus faecalis*. Dalším studiem bylo zjištěno, že syntéza putrescinu přes AgDI dráhu u *Lactococcus lactis* je vlastností specifické

kou pro tento druh a nebyla získaná horizontálním přenosem v poslední době, avšak u některých kmenů tato vlastnost byla ztracena v důsledku adaptace na prostředí, kde působí jako zákysové kultury [62].

Coton et al. [57] se ve své studii zabývali detekcí genů kódujících enzymy histidindekarboxylázu (*hdc*), tyrozindekarboxylázu (*tdc*), ornitindekarboxylázu a agmatindeaminázu u bakterií mléčného kvašení (BMK) izolovaných z vín a moštů. Z celkového počtu 810 testovaných kmenů BMK byl u 112 kmenů (14 %) zjištěn gen pro AgDI dráhu a pouze u 4 kmenů (0,5 %) byl detekován gen kódující enzym ornitindekarboxylázu. Schopnost syntetizovat putrescin přes AgDI dráhu zjistili u 32 kmenů *Lb. hilgardii*, u 31 kmenů *Lb. collinoides*, u 26 kmenů *Lb. brevis*, u 7 kmenů *Lb. mali*, u 2 kmenů *Lb. fructivorans*, u 1 kmene *Lb. plantarum*, u 10 kmenů *Oenococcus oeni*, u 1 kmene *Leuconostoc mesenteroides*, u 1 kmene *Pediococcus pentosaceus* a u 1 kmene *Pediococcus parvulus*. Gen kódující ornitindekarboxylázu byl detekován pouze u 2 kmenů *Lb. mali* a u 2 kmenů *Oenococcus oeni*. Také Constantini et al. [63] zjišťovali přítomnost těchto genů u 133 kmenů BMK izolovaných z vín. Žádný z testovaných kmenů nebyl pozitivní na ornitindekarboxylázu. Naproti tomu Nanneli et al. [58] zjistili, že putrescin je ve víně produkován bakteriemi mléčného kvašení dominantně přes ornitindekarboxylázovou (ODC) dráhou.

Výše uvedené a diskutované výsledky jsou tak v souladu s tvrzením, tvorba biogenních aminů není záležitostí rodů či druhů, ale spíše kmenů v rámci druhu [33]. Proto je vhodné pomocí metody PCR prověřovat mikroorganismy používané jako startérové kultury na potenciální schopnost produkce BA a tím zabránit jejich akumulaci v potravinách. Mnoho autorů se proto zabývalo vývojem spolehlivých PCR metod pro detekci mikroorganismů produkujících biogenní aminy [55], [57], [61], [63], [64], [65]. Například Marcobal et al. [55] vyvinuli multiplex PCR pro simultánní detekci genů kódujících enzymy histidindekarboxylázu (*hdc*), tyrozindekarboxylázu (*tdc*), ornitindekarboxylázu (*odc*) u bakterií mléčného kvašení. K detekci těchto genů použili jak dříve publikované, tak nově navržené primery. Detekci stejných genů u bakterií mléčného kvašení se zabývali i de las Rivas et al. [64], do svého multiplex PCR zahrnuli navíc i gramnegativní bakterie.

Biosyntéza putrescinu u gramnegativních bakterií může probíhat až třemi různými metabolickými dráhami pomocí až 8 různých enzymů. De las Rivas et al. [64] však ve svém multiplex PCR zahrnuli pouze ornitindekarboxylázu účastnící se jedné z metabolických drah. Naproti tomu Wunderlichová et al. [65] navrhli a optimalizovali metodu PCR schopnou detekovat všechny důležité enzymy podílejících se na biosyntéze putrescinu gramnegativními bakteriemi. Vyvinuli sedm nových sad konsensuálních primerů (*adc5F/R*, *agm4F/R*, *adi5F/R*, *AgDI4F/R*, *adiA3F/R*, *odc1F/R* a *speF1F/R*) pro detekci genů *speA*, *speB*, *adi*, *aguA*, *adiA*, *speC* a *speF* účastnících se všech metabolických drah u gramnegativních bakterií.

Další experiment zahrnutý do této diplomové práce byl zaměřen na sledování vlivu pH, koncentrace soli a laktózy na schopnost produkce BA probiotickým kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289. Tento kmen byl vybrán na základě předcházejícího skríningu, který prokázal dekarboxylační schopnost tohoto kmene [32]. Jeden z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících dekarboxylázovou aktivitu bakterií je pH. Existují protichůdné názory na mechanismus působení pH. Na jedné straně existuje názor, že zvýšením kyselosti prostředí dochází k inhibici růstu mikroorganismů a tím i k nižší produkci BA. Na druhé straně nízké pH stimuluje bakterie k vyšší produkci zásaditých biogenních aminů jako jejich obranného mechanismu proti kyselému intracelulárnímu prostředí [11], [19]. V tomto experimentu byl vliv pH nejvýraznější u produkce spermidinu testovaným kmenem, kdy v kultivačních médiích s hodnotou pH 5,0 nebyl vůbec detekován. Avšak v kultivačních médiích s hodnotou pH 4,5 byl zjištěn v množství nepřesahujících 4,5 mg/l. Také detekované množství putrescinu bylo vyšší při pH 4,5 (do 10,6 mg/l) než při pH 5,0. Naopak množství dalších BA tyraminu a sperminu bylo mírně nižší než při pH 5,0. V případě kadaverinu nebyla zaznamenána výrazná změna.

Arena et al. [66] ve své studii uvádějí, že právě při pH 4,5 nastává největší produkce putrescinu u *Lactobacillus hilgardii* X<sub>1</sub>B izolovaného z argetinského vína. Na produkci putrescinu tímto laktobacilem měly výrazný vliv i vyšší koncentrace etanolu a sacharidů (glukózy a fruktózy). Množství putrescinu se v prostředí s 15% etanolem snížilo o 82 % a v prostředí s 2 g/l glukózy a laktózy se množství putrescinu snížilo o 93 % a 99 %. V této práci byl rovněž zaznamenán inhibiční účinek vyšší koncentrace laktózy na produkci putrescinu a spermidinu, avšak pouze v prostředí s pH 4,5. V kultivačním médiu s 2,0 % (w/v) NaCl a 0,5 % (w/v) laktózy bylo detekované množství v případě putrescinu 10,6 mg/l a



v případě spermidinu 1,7 mg/l. Avšak při zvýšení koncentrace laktózy na 1,0 % (w/v) došlo ke snížení množství putrescinu o 54 % a spermidin nebyl detekován vůbec.

Obdobné výsledky přinesla studie González-Fernández et al. [67], která zkoumala vliv různých koncentrací sacharidů (glukózy, laktózy a sacharózy) a přídavku dekarboxyláza negativních startérových kultur na produkci BA u fermentovaných klobás „chorizo“. Nejvíce zastoupenými BA byly putrescin a tyramin, následovaly kadaverin a tryptamin. Na konci zračního procesu byly nejvyšší koncentrace BA zjištěny v kontrolním vzorku bez přídavku startérových kultur. Použité koncentrace sacharidů v tomto případě neměly vliv na produkci BA. Avšak ve vzorcích s přídavkem startovacích kultur (*Lb. sakei* K29, *Pediococcus* sp. P22 a *Pediococcus* sp. P208) a s koncentrací sacharidů 0,5 nebo 1 % (w/v) bylo zjištěno výrazně nižší množství BA oproti vzorkům s 0,1 % (w/v) sacharidů. Z použitých startérových kultur největší redukční schopnosti prokázal *Lactobacillus sakei* K29.

V tomto experimentu byl dále sledován vliv koncentrace NaCl a laktózy na dekarboxylázovou aktivitu testovaného kmene. Tato dekarboxylační schopnost byla sledována v kultivačním médiu obohaceném chloridem sodným v koncentraci 0,0; 0,1 a 2,0 % (w/v) a laktózou v koncentraci 0,0; 0,25; 0,50 a 1,0 % (w/v). Při pH 4,5 bylo zjištěno nejvyšší množství sperminu (23,6 mg/l) v kultivačním médiu s 2,0 % (w/v) NaCl a s 1,0 % (w/v) laktózy. Kromě sperminu bylo v tomto médiu ještě detekováno nejvyšší množství tyraminu, kdy byl produkován v množství 10,9 mg/l. Vůbec nejvyšší množství tyraminu (12,6 mg/l) bylo zjištěno v kultivačním médiu obsahujícím 2,0 % (w/v) NaCl, 0,25 % (w/v) laktózy a s hodnotou pH 5,0. Obdobná zjištění ve své studii uvádí i Buňková et al. [40], kteří se zabývali studiem vlivu koncentrace laktózy (0 – 1 % w/v), NaCl (0 – 2 % w/v) a aero/anaerobiózy na růst a produkci tyraminu u 3 kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a 2 kmenů *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. Schopnost dekarboxylace tyrozinu byla u všech testovaných kmenů nejvíce ovlivněna koncentrací NaCl. Rovněž nejvyšší množství tyraminu bylo zjištěno v prostředí s 2,0 % (w/v) NaCl. Dva ze tří testovaných kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* produkovaly tyramin pouze v prostředí s nejvyšší koncentrací soli. Zbylé 3 kmeny (*Lc. lactis* subsp. *lactis* a 2 *Lc. lactis* subsp. *cremoris*) produkovaly tyramin za všech použitých kultivačních podmínek. Použitá koncentrace laktózy a aero/anaerobiózy měly na dekarboxylaci tyraminu menší vliv. Zároveň však bylo zjištěno, že v případě stejných podmínek koncentrace NaCl a laktózy bylo detekováno větší množství tyraminu za anaerobních podmínek.

K podobnému závěru dospěli i Pleva et al. [68], kteří se zabývali studiem vybraných faktorů, které by mohly ovlivnit tvorbu BA u kmene *Enterococcus faecium* M2C. Zjistili, že koncentrace NaCl do 3,0 % (w/v) působí na produkci tyraminu jako akcelerator, zatímco koncentrace NaCl nad 6,0 % (w/v) působí na tyramin inhibičně. Rovněž Buňková et al. [69] studovali kinetiku produkce tyraminu u kmene *Enterococcus durans* CCDM 53 v prostředí s různou koncentrací laktózy a NaCl. Rovněž zkoumali vliv přístupu kyslíku na produkci tohoto biogenního aminu. Nejvyšší produkce tyraminu byla u testovaného kmene zjištěna během kultivace s nejvyšší (2% w/v) aplikovanou koncentrací soli a s 0.5% (w/v) laktózy. V případě stejných podmínek koncentrace NaCl a laktózy bylo detekováno větší množství tyraminu za anaerobních podmínek.

Vliv doby zrání a koncentrace soli na produkci biogenních aminů zkoumali v tradičním portugalském salámu „Painho de Portalegre“ Roseiro et al. [70]. Zjistili, že ve vzorcích, které zrály jeden měsíc a obsahovaly 3 % (w/v) NaCl, bylo signifikantně vyšší množství kadaverinu, putrescinu, tyraminu a 2-fenyletylaminu oproti vzorkům obsahujícím 6 % (w/v) NaCl. V prostředí s 6 % (w/v) NaCl došlo k redukci množství kadaverinu o 83 %, putrescinu o 43 %, tyraminu o 28 % a 2-fenyletylaminu o 98 %. Obdobně Greif et al. [71] zjistili, že koncentrace NaCl má značný vliv na produkci BA u bakterií *Enterobacter aerogenes* a *E. cloacae*. Schopnost produkce kadaverinu a histaminu u *E. aerogenes* byla nejvyšší právě v prostředí s 3 % (w/v) NaCl. Tato schopnost se postupně snižovala se zvyšující se koncentrací NaCl (4,5 a 6,8 % w/v). V případě *E. cloacae* bylo detekováno nejvyšší množství putrescinu v médiu s 0,5 % (w/v) NaCl. Pokud byla koncentrace soli dále zvýšena, došlo i u tohoto kmene ke snížení produkce putrescinu. Stratton et al. [38] rovněž zjistili, že při koncentraci NaCl 3,5 % (w/v) je částečně inhibována schopnost *Lactobacillus buchneri* tvořit histamin a při koncentraci 5 % se tvorba histaminu zastavuje. Také Chander et al. [39] ve své studii uvádí, že dekarboxylázová aktivita *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se výrazně snížila při zvýšení koncentrace NaCl v médiu z 0 % na 6 %. Rovněž zjistili, že pH 5,0 je optimální pro produkci histaminu, tyraminu a tryptaminu testovaným kmenem. I v této studii byla zaznamenána v prostředí s pH 5,0 mírně vyšší produkce tyraminu a sperminu oproti prostředí s pH 4,5.

Z výše získaných výsledků lze vyvodit závěr, že mechanismus působení zvolených faktorů se odlišuje u jednotlivých biogenních aminů. Některé z testovaných faktorů (koncentrace laktózy) měly malý vliv na produkci biogenních aminů, jiné (koncentrace NaCl a hodnota pH) naopak výrazněji ovlivňovaly produkci biogenních aminů sledovaným kmenem. Proto znalost těchto mechanismů, které regulují produkci BA a metabolických pochodů zúčastněných v produkci BA, může vést k vývoji strategií, které zabraňují syntéze a akumulaci těchto toxických látek v potravinách.

## ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na studium metabolických drah biosyntézy putrescinu u vybraných kmenů rodu *Lactobacillus* a na podmínky ovlivňující produkci biogenních aminů probiotickým kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289. Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie byl sledován vliv pH, koncentrace NaCl a koncentrace laktózy na dekarboxylázovou aktivitu tohoto kmene.

Zjištěné výsledky lze shrnout do následujících bodů:

- Pomocí dříve publikovaných primerů AgD1 a AgD2 byl u dvou kmenů *Lb. curvatus* AI-2 a *Lb. curvatus* AI-3 detekován gen *aguA* kódující enzym agmatin-deaminázu.
- Získané sekvence obou PCR amplikonů se na 99 % shodovala se sekvencí genu *aguA* u kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147 a tím se podařilo ověřit správnost metody.
- Metodou HPLC byla zjištěna u testovaného kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 schopnost produkce putrescinu, kadaverinu, tyraminu, spermidinu a sperminu.
- Za daných kultivačních podmínek byl nejvíce produkovaným BA spermin. Detekované množství sperminu se pohybovala v rozmezí 17,9 – 24,3 mg/l kultivačního média.
- Vliv pH byl nejvýraznější u produkce spermidinu a putrescinu. Hodnota pH 5,0 působila inhibičně na produkci spermidinu a také se výrazně snížila produkce putrescinu.
- V kultivačních médiích obsahující 2 % (w/v) NaCl bylo detekováno nejvyšší množství tyraminu (12,6 mg/l) a putrescinu (10,6 mg/l).
- Při pH 4,5 působila laktóza v koncentraci 1,0 % (w/v) inhibičně na produkci putrescinu a spermidinu. Tento inhibiční účinek laktózy však při pH 5,0 nebyl zaznamenán.
- Testované faktory neměly výrazný vliv na produkci kadaverinu.
- Ze získaných výsledků se dá konstatovat, že vhodnou kombinací fyzikálně chemických faktorů lze ovlivnit produkci BA kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] LEE, Y. K. a S. SALMINEN. *Handbook of Prebiotics and probiotics*. 2. vyd. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. 596 s. ISBN 978-0-470-13544-0. Part I, Probiotics. s. 3-533.
- [2] FRÍČ, P. Probiotika v terapii chorob trávicího ústrojí. *Interní medicína pro praxi*. 2005, roč. 7, č. 10, s. 434-437. ISSN 1212-7299.
- [3] RADA, V. Využití probiotik, prebiotik a symbiotik. *Interní medicína pro praxi*. 2010, roč. 12, č. 2, s. 92-97. ISSN 1212-7299.
- [4] STIBŮREK, O., V. PŘÍBRAMSKÁ a J. LATA. Místo probiotik v léčbě (nejen) gastrointestinálních chorob. *Interní medicína pro praxi*. 2009, roč. 11, č. 1, s. 25-29. ISSN 1212-7299.
- [5] MAZÁNKOVÁ, D. a S. KOTÁSKOVÁ. Probiotika z pohledu praktického lékaře - kmeny bakterií požívané jako probiotika, jejich účinek, bezpečnost a dávkování. *Praktický lékař*. 2011, roč. 91, č. 10, s. 586-589. ISSN 0032-6739.
- [6] HORÁČKOVÁ, Š. a E. ŠVIRÁKOVÁ. Probiotické mikroorganismy v mlékárenském průmyslu. *Mlékařské listy*. 2009, č. 113/114, s. 12-14. ISSN 1212-950x.
- [7] KADLEC, R., L. KRÍŽOVÁ a D. HALOVÁ. In vitro modely adherence probiotik - přehled. *Mlékařské listy*. 2011, č. 124, s. 1-3. ISSN 1212-950x.
- [8] KOHOUT, P. Probiotika v rukou praktického lékaře. *Medicína pro praxi*. 2009, roč. 6, č. 3, s. 135-139. ISSN 1214-8687.
- [9] NEVORAL, J. Prebiotika, probiotika a synbiotika. *Pediatric pro praxi*. 2005, roč. 6, č. 2, s. 59-65. ISSN 1213-0494.
- [10] ANONYM. *Potravinářská mikrobiologie I: Mikroorganismy v potravinářství* [online]. UTB ve Zlíně, Technologická fakulta. [cit. 2013-04-10]. Dostupné z: [http://utb.files.cepac.cz/modules/M0010\\_potravinarska\\_mikrobiologie/distančni\\_text/M0010\\_potravinarska\\_mikrobiologie\\_distančni\\_text.pdf](http://utb.files.cepac.cz/modules/M0010_potravinarska_mikrobiologie/distančni_text/M0010_potravinarska_mikrobiologie_distančni_text.pdf)
- [11] KONIG, H., G. UNDEN a J. FRÖHLICH. *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. Berlin: Springer, 2009. 522 s. ISBN 978-3-540-85462-3. Chapter 1, Lactic Acid Bacteria, s. 3-29.

- [12] JARDINE, S. *Prebiotics and probiotics*. 2. vyd. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. 152 s. ISBN 978-190-5224-524. Chapter 2, Probiotics. s. 79-91.
- [13] LIONG, M. *Probiotics: biology, genetics and health aspects*. 2. vyd. New York: Springer, 2011. 321 s. ISBN 978-3-642-20837-9.
- [14] FRANZ, CH., M. HUCH, H. ABRIOUEL a W. HOLZAPFEL. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, č. 151, s. 125-140. ISSN 0168-1605.
- [15] VOTAVA, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80-902-8966-5.
- [16] *Obrázek: Enterococcus faecium* [online]. [cit. 2013-04-10]. Dostupné z: [http://www.ciriscience.org/ph\\_119\\_Enterococcus\\_faecium\\_Copyright\\_Dennis\\_Kunkel\\_Microscopy](http://www.ciriscience.org/ph_119_Enterococcus_faecium_Copyright_Dennis_Kunkel_Microscopy)
- [17] HLADÍKOVÁ, Z., J. SMENTÁNKOVÁ, G. GREIF a M. GREIFOVÁ. Charakterization of *Lactococcus* strains and their using in dairy technology. *Potravinářstvo*. 2012, roč. 6, č. 1, s. 21-29. ISSN 1337-0960.
- [18] SILLA SANTOS, H. M. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, roč. 29, s. 213-231. ISSN 0168-1605.
- [19] EFSA. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* [online]. 2011, roč. 9, č. 10, 93 s. [cit. 2013-04-10]. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2393.pdf>
- [20] SMĚLÁ, D., P. PECHOVÁ, T. KOMPRDA, B. KLEJDUS a V. KUBÁŇ. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy*. 2004, roč. 98, s. 432-437. ISSN 1213-7103.
- [21] KALÁČ, P. a M. KRŮŽEK. Formation of biogenic amines in four edible mushroom species stored under different conditions. *Food Chemistry*. 1997, roč. 58, s. 233-236. ISSN 0308-8146.
- [22] STADLER, R. H. a D. R. LINEBACK. *Process-induced food toxicants: occurrence, formation, mitigation, and health risks*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009, 723 s. ISBN 978-047-0074-756. Chapter 3.2, Biogenic amines, s. 321-361.

- [23] DOLATOWSKI, J. Z. a J. STADNIK. Biogenic amines in meat and fermented meat products. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. 2010, roč. 9, s. 251-263. ISSN 1889-9594.
- [24] GREIF, G., J. KAROVIČOVÁ a Z. KOHAJDOVÁ. Biogénne amíny v potravinách. *Potravinárstvo*. 2008, roč. 2, s. 30-49. ISSN 1337-0960.
- [25] PUREVDORJ, K. *Produkce biogenních aminů bakteriemi izolovanými z masných výrobků a produktů studené kuchyně*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati. Technologická fakulta. Ústav technologie a mikrobiologie potravin, 2011. 59 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.
- [26] TREHAN, K. *Biochemistry*. 2 vyd. Indie: New Age International (P) Limited, 1990. 540 s. ISBN 81-224-0248-8.
- [27] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin* 3. 1. vyd. Tábor: Osis, 1999. 368 s. ISBN 80-902391-5-3.
- [28] BUŇKOVÁ, L., G. ADAMCOVÁ, K. HUDCOVÁ, H. VELICHOVÁ, V. PACHLOVÁ, E. LORENCOVÁ a F. BUŇKA. Monitoring of biogenic amines in cheeses manufactured at small-scale farms in fermented dairy products in the Czech Republic. *Food Chemistry* [online]. 2013. [cit. 2013-04-11]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.036>
- [29] BORKOVCOVÁ, I., E. STANDAROVÁ a L. VORLOVÁ. *Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě* [online]. [cit. 2013-04-11]. Dostupné z: <http://web.vetweb.cz/projekt/clanek.asp?pid=2&cid=5760>
- [30] ČERNÝ, V., E. KVASNIČKOVÁ, Š. HAVLÍKOVÁ a L. KALHOTKA. Výskyt mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou v sýrech. *Mlékařské listy*. 2009, č. 116, s. 16-18. ISSN 1212-950x.
- [31] SLÁDKOVÁ, P., T. KOMPRDA a R. BURDYCHOVÁ. *Skríning startovacích a probiotických kultur určených pro výrobu fermentovaných masných výrobků na schopnost tvorby biogenních aminů*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita [online]. [cit. 2013-04-11]. Dostupné z: <http://mnet.mendelu.cz/mendelnet07agro/articles/tp/sladkova.pdf>

- [32] LORENCOVÁ, E., L. BUŇKOVÁ, D. MATOULKOVÁ, V. DRÁB, P. PLEVA, V. KUBÁŇ a F. BUŇKA. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bi-didobacteria isolated from dairy products and beer *International Journal of Food Science and Technology*. 2012, roč. 47, s. 2086-2091. ISSN 1365-2621.
- [33] LANDETE, J.M., B. DE LAS RIVAS, A. MARCOBAL a R. MUÑOZ. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, roč. 117, s. 258-269. ISSN 0168-1605.
- [34] COTON, E. a M. COTON. Evidence of horizontal transfer as origin of strain to strain variation of the tyramine production trait in *Lactobacillus brevis*. *Food Microbiology*. 2009, roč. 26, s. 52-57. ISSN 1095-9998.
- [35] LADERO, V., M. FERNANDEZ, M. CALLES-ENRÍQUEZ, E. SÁNCHEZ-LJANA, E. CAÑEDO, M. C. MARTÍN a M. A. ALVAREZ. Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci? *Food Microbiology*. 2012, roč. 30, s. 132-138. ISSN 1095-9998.
- [36] PEREIRA, C. I., M. T. BARRETO CRESPO a M. V. SAN ROMÃO. Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homochiochii*. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, roč. 68, s. 211-216. ISSN 0168-1605.
- [37] PRIYADARSHANI, W. M. D. a S. K. RAKSHIT. Sreening selected strains of probiotic lactid acid bacteria for their ability to produce biogenic amines (histamine and tyramine). *International Journal of Food Science and Technology*. 2011, roč. 46, s. 2062-2069. ISSN 1365-2621.
- [38] STRATTON, J. E., R. W. HUTKINS a S. L. TAYLOR. Histamine production in low – salt Chedddar cheese. *Journal of Food Protection*. 1991, roč. 54, s. 852 - 867.
- [39] CHANDER, H., V. H. BATISH, S. BABU a R. S. SINGH. Factors affecting amine production by a selected strain of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Food Science*. 1989. roč. 54, s. 940–942. ISSN 1750-3841.



- [40] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, E. POLLAKOVÁ, T. PODEŠVOVÁ a V. DRÁB. The effect of lactose, NaCl and an aero/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, roč. 147, s. 112-119. ISSN: 0168-1605.
- [41] BURDYCHOVÁ, R. a T. KOMPRDA. Skrining vybraných startovacích kultur na přítomnost DNA sekvencí kódujících dekarboxylázy účastnící se tvorby biogenních aminů. Praha: VŠCHT. *Mléko a sýry: sborník příspěvků* [online]. [cit. 2013-04-11]. Dostupné z: [http://tresen.vscht.cz/tmt/prehliidky/2007/souhrn\\_MaS\\_2007.pdf](http://tresen.vscht.cz/tmt/prehliidky/2007/souhrn_MaS_2007.pdf)
- [42] ŠVEC, F. Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií?. *Chemické listy*. 2009, roč. 103, s. 466-270. ISSN 1213-7103.
- [43] KÁŠ, J., M. KODÍČEK a O. VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-708-0586-2.
- [44] PRYDE, A. a M. T. GILBERT. *Applications of high performance liquid chromatography*. USA: Chapman and Hall, 1980, 255 s ISBN 0-412-14220-1.
- [45] CHURÁČEK, Jaroslav a Pavel JANDERA. *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1984. 192 s. ISBN 04-607-85.
- [46] *Obrázek: Scheme of a HPLC system* [online]. [cit. 2013-04-10]. Dostupné z: <http://chem.uft.uni-bremen.de/Chromatography/chrom065.htm>
- [47] KOČÁREK, E.: *Molekulární biologie v medicíně*. 1. vyd. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2007. 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4.
- [48] ŠMARDA, J., J. DOŠKAŘ, R. PANTŮČEK a V. RŮŽIČKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [49] ROSYPAL, S. a J. DOŠKAŘ. *Úvod do molekulární biologie: díl třetí*. 2. rozš. vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 1997. 839 s.
- [50] *Obrázek: Princip PCR* [online]. [cit. 2013-04-10]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/kot/resources/studijni-materialy/bc-skripta/kapitola10.pdf>

- [51] KOČÁREK, E. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 1. vyd. Praha: Scientia, 2004, 211 s. ISBN 80-718-3326-6.
- [52] PRODĚLALOVÁ, J. *Molekulární diagnostika potravinářsky významných mikroorganismu*. Disertační práce. Brno: Masarykova univerzita. Přírodovědecká fakulta. Katedra mikrobiologie, 2004. 90 s.
- [53] *Obrázek: Princip gelové elektroforézy* [online]. [cit. 2013-04-10]. Dostupné z: [http://opvk2011.ptacisvet.cz/?title=popis\\_metod-gelova\\_elektroforeza&lang=cz](http://opvk2011.ptacisvet.cz/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz)
- [54] ŠPANOVÁ, A. a B. RITTICH. *Analýzy vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 90 s. ISSN 978-80-214-4004-3.
- [55] MARCOBAL, Á., B. DE LAS RIVAS, M.V. MORENO-ARRIBAS a R. MUÑOZ. Multiplex PCR method for the simultaneous detection of histamine-, tyramine-, and putrescine producing lactic acid bacteria in foods. *Journal of Food Protection*. 2005, roč. 68, s. 874-878. ISSN 0362-028X.
- [56] FADHLAOUI-ZUD, K., J. A. CUIEL, G. LANDETA, S. FATTOUCH, I. REVERÓN, B. DE LAS RIVAS, S. SADOK a R. MUÑOZ. Biogenic amine production by bacteria isolated from ice-preseved sardine and mackerel. *Food Control*. 2012, roč. 25, s. 89-95. ISSN 0956-7135.
- [57] COTON, M., A. ROMANO, G. SPANO, K. ZIEGLER, C. VETRANA, C. DESMARAIS, A. LONVAUD-FUNEL, P. LUCAS a E. COTON. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiology*. 2010, roč. 27, s. 1078-1085. ISSN 1095-9998.
- [58] NANNELLI, F., O. CLAISSE, E. GINDREAU, G. DE REVEL, A. LONVAUD-FUNEL a P. M. LUCAS. Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. *Letters in Applied Microbiology*. 2008, roč. 47, s. 594-599. ISSN 0266-8254.
- [59] LANDETE, M. J., M. E. ARENA, I. PARDO, M. C. MANCA DE NADRA a S. FERRER. The role of two families of bacterial enzymes in putrescine synthesis from agmatine via agmatine deaminase. *International Microbiology*. 2010, roč. 13, s. 169-177. ISSN 1139-6709.

- [60] ALBERTO, R. M., M. E. ARENA a M. C. MANCA DE NADRA. Putrescine production from agmatine by *Lactobacillus hilgardii*: Effect of phenolic compounds. *Food Control*. 2007, roč. 18, s. 898-903. ISSN 0956-7135.
- [61] LADERO, V., E. CAÑEDO, M. PÉREZ, M. C. MARTÍN, M. FERNÁNDEZ a M. A. ALVAREZ. Multiplex qPCR for the detection and quantification of putrescine-producing lactic acid bacteria in dairy products. *Food Control*. 2012, roč. 27, s. 307-313. ISSN 0956-7135.
- [62] LADERO, V., F. P. RATTRAY, B. MAYO, M. C. MARTIN, M. FERNÁNDEZ a M. A. ALVAREZ. Sequencing and Transcriptional Analysis of the Biosynthesis Gene Cluster of putrescine-producing *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, roč. 77, s. 6409-6418. ISSN 1098-5336.
- [63] CONSTANTINI, A., M. CERSOSIMO, V. DEL PRETE a E. GARCIA-MORUNO. Production of biogenic amine by lactic acid bacteria, screening by PCR, thin layer chromatography, and high-performance liquid chromatography of strains isolated from wine and must. *Journal of Food Protection*. 2006, roč. 69, s. 391-396. ISSN 0362-028X.
- [64] DE LAS RIVAS, B., A. MARCOBAL a R. MUÑOZ. Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines. *FEMS Microbiology Letters*. 2005, roč. 244, s. 367-372. ISSN 1574-6968.
- [65] WUNDERLICHOVÁ, L., L. BUŇKOVÁ, M. KOUTNÝ, T. VALENTA a F. BUŇKA. Novel touchdown-PCR method for the detection of putrescine producing Gram-negative bacteria in food products. *Food Microbiology*. 2013, roč. 34, s. 268-276. ISSN 1095-9998.
- [66] ARENA, M. E., J. M. LANDETE, M. C. MANCA DE NADRA, I. PADRO a S. FERRER. Factors affecting the production of putrescine from agmatine by *Lactobacillus hilgardii* X<sub>1</sub>B isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*. 2008, roč. 105, s. 158-165. ISSN 1364-5072.
- [67] GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C., E. M. SANTOS, I. JAIME a J. ROVIRA. Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in chorizo dry sausage. *Food Microbiology*. 2003, roč. 20, s. 275-284. ISSN 1095-9998.

- [68] PLEVA, P., L. BUŇKOVÁ, A. LAUKOVÁ, E. LORENCOVÁ, V. KUBÁŇ a F. BUŇKA. Factors affected decarboxylation activity of *Enterococcus faecium* isolated from rabbit. *Potravinářstvo*. 2012, roč. 6, s. 46-49. ISSN 1337-0960.
- [69] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, V. DRÁB a S. KRÁČMAR. Effects of NaCl, lactose and availability of oxygen on tyraamine production by the *Enterococcus durans* CCDM 53. *European Food Research and Technology*. 2012, roč. 234, s. 973-979. ISSN 1438-2385.
- [70] ROSEIRO, C., C. SANTOS, M. SOL, L. SILVA a I. FERNANDES. Prevalence of biogenic amines during ripening of a traditional dry fermented pork sausage and its relation to the amount of sodium chloride added. *Meat science*. 2006, roč. 74, s. 557-563. ISSN 0309-1740.
- [71] GREIF, G., M. GREIFOVÁ a J. KAROVIČOVÁ. 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*. 2006, roč. 45, s. 21-29. ISSN 1336-8672.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

BA	Biogenní aminy
BMK	Bakterie mléčného kvašení
bp	Páry bází (base pare)
CCDM	Česká sbírka mlékárenských mikroorganismů (Czech Collection of Dairy Microorganisms)
CCM	Česká sbírka mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms)
CO <sub>2</sub>	Oxid uhličitý
DAO	Diaminooxidáza
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
GC	Plynová chromatografie
HMT	Histidinmetyltransferázy
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
IEC	Iontově-výměnná chromatografie
IMAO	Inhibitory monoaminoxidáz
MAO	Monoaminoxidáza
MRS	Mangův, Rogosův a Sharpův agar
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Uhličitan sodný
NaCl	Chlorid sodný
NaHCO <sub>3</sub>	Hydrogenuhličitan sodný
O <sub>2</sub>	Kyslík
PCR	Polymerázová řetězová reakce
SDS	dodecylsírán sodný
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
(w/v)	Hmotnostní zlomek

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 – <i>Bifidobacterium longum</i> [1].....	18
Obr. 2 – <i>Enterococcus faecium</i> [16] .....	19
Obr. 3 – Strukturní vzorce nejdůležitějších biogenních aminů [22] .....	20
Obr. 4 – Schéma HPLC [46].....	28
Obr. 5 – Schéma polymerázové řetězové reakce [50] .....	30
Obr. 6 – Princip gelové elektroforézy [53] .....	32
Obr. 7 – PCR amplikony s využitím testovaných primerů u <i>Lb. curvatus</i> AI-2, primery: 3′/16′ (1), PUT1-F/PUT1-R (2), AgD1/AgD2 (3), aguA-F/ aguA-R (4), pozitivní kontrola: adiA3-F/adiA3-R (5), negativní kontrola (6).....	47
Obr. 8 – PCR amplikony s využitím testovaných primerů u <i>Lb. curvatus</i> AI-3, primery: 3′/16′ (1), PUT1-F/PUT1-R (2), AgD1/AgD2 (3), aguA-F/ aguA-R (4), pozitivní kontrola: adiA3-F/adiA3-R (5), negativní kontrola (6).....	47
Obr. 9 – Čistota a kvalita vyizolované DNA: <i>Lb. curvatus</i> DEPE 15 (1, 2), <i>Lb.</i> <i>curvatus</i> CCM 7271 (3, 4), <i>Lb. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> DEPE 39 (5, 6), <i>Lb.</i> <i>curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> DEPE 8 (7, 8), <i>Lb. brevis</i> DEPE 24 (9, 10) a <i>Lb.</i> <i>curvatus</i> CCM 7558 (11, 12).....	47
Obr. 10 – Vliv přídavku Mg <sup>2+</sup> iontů na PCR amplifikaci v objemu: 0,1 μl (1, 9); 0,2 μl (2, 10); 0,3 μl (3, 11); 0,4 μl (4, 12); 0,5 μl (5, 13); 0,7 μl (6,14) a negativní kontrola (7, 15).....	48
Obr. 11 – Ukázka sekvence amplikonu 1 – zjištěná sekvence vizualizovaná v programu (SEQUENCE SCANNER SOFTWARE v 1.0.).....	49
Obr. 12 – Ukázka sekvence amplikonu 2 – zjištěná sekvence vizualizovaná v programu (SEQUENCE SCANNER SOFTWARE v 1.0. ....	49
Obr. 13 – Produkce biogenních aminů kmenem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289 při pH 4,5 při různé koncentraci laktózy (PUT – putrescin, CAD – kadaverin, TYR – tyramin, SPD – spermidin, SPM – spermin).....	51
Obr. 14 – Produkce biogenních aminů kmenem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289 při pH 4,5 v prostředí s 1% NaCl při různé koncentraci laktózy (PUT – putrescin, CAD – kadaverin, TYR – tyramin, SPD – spermidin, SPM – spermin) .....	51

- Obr. 15 – Produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při pH 4,5 v prostředí s 2% NaCl při různé koncentraci laktózy (PUT – putrescin, CAD – kadaverin, TYR – tyramin, SPD – spermidin, SPM – spermin) ..... 52
- Obr. 16 – Produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při pH 5,0 při různé koncentraci laktózy (PUT – putrescin, CAD – kadaverin, TYR – tyramin, SPD – spermidin, SPM – spermin)..... 53
- Obr. 17 – Produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při pH 5,0 v prostředí s 1% NaCl při různé koncentraci laktózy (PUT – putrescin, CAD – kadaverin, TYR – tyramin, SPD – spermidin, SPM – spermin) ..... 53
- Obr. 18 – Produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při pH 5,0 v prostředí s 2% NaCl při různé koncentraci laktózy (PUT – putrescin, CAD – kadaverin, TYR – tyramin, SPD – spermidin, SPM – spermin) ..... 54

**SEZNAM TABULEK**

Tab. I – Klinické efekty některých bakteriálních druhů rodu <i>Lactobacillus</i> [3].....	17
Tab. II – Primery a jejich cílové geny .....	39
Tab. III – Základní složení PCR reakční směsi.....	40
Tab. IV – Složení kultivačního média pro zjištění produkce BA.....	43
Tab. V – Lineární gradientový eluční program HPLC.....	44



## SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA I: Sekvence amplikonu 1 (*Lactobacillus curvatus* AI-2)

PŘÍLOHA II: Sekvence amplikonu 2 (*Lactobacillus curvatus* AI-3)

PŘÍLOHA III: Produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při různých kultivačních podmínkách

# PRÍLOHA I: SEKVENCE AMPLIKONU 1 (*LACTOBACILLUS CURVATUS* AI-2)

Query 1 TCTG-AGGACGC-  
ATCCTCACATGAGCAWAGAGGACATTGAAAATAAACTTAAAGAACAT 58  
|||||  
Sbjct 1925742  
TCTGAAGGACGCAATCCTCACATGAGCAAAGAGGACATTGAAAATAAACTTAAAGAACAT 1925683

Query 59  
TTGAATGCTGAAAAAATTCTTTGGCTTGGGGATGGAATTGACCCAGAAGAAACAAACGGT 118  
|||||  
Sbjct 1925682  
TTGAGTGCTGAAAAAATTCTTTGGCTTGGGGATGGAATTGACCCAGAAGAAACAAACGGT 1925623

Query 119  
CATGTGGATGATGTTGCTTGCTTCGTAGCACCAGGGGAAGTTGCATGCATTTATACTGAG 178  
|||||  
Sbjct 1925622  
CACGTGGATGATGTTGCTTGCTTCGTAGCACCAGGGGAAGTTGCATGCATTTATACTGAG 1925563

Query 179  
GATGAGAAGTCACCTTTTTATGAAGCAGCACAAGATGCCTATAAACGCTTGAGCCAAATG 238  
|||||  
Sbjct 1925562  
GATGAGAAGTCACCTTTTTATGAAGCAGCACAAGATGCCTATAAACGCTTGAGCCAAATG 1925503

Query 239  
ACAGATGCTAAAGGACGTCAACTCAAAGTTCATAAATTGACTTGTCCAGCTAAAAATGTA 298  
|||||  
Sbjct 1925502  
ACAGATGCTAAAGGACGTCAACTCAAAGTTCATAAATTGACTTGTCCAGCTAAAAATGTA 1925443

Query 299  
ACGATTAATAAACAATTTAGAATTGATACAGTTGAAGGAACAATGCCACGTGAAGACGGA 358  
|||||  
Sbjct 1925442  
ACGATTAATAAACAATTTAGAATTGATACAGTTGAAGGAACAATGCCACGTGAAGATGGA 1925383

Query 359  
GATATTTGTATTGCTTCATATATGAATTTCTTGATTACAAACAAAGGAGTTATCGTACCA 418  
|||||  
Sbjct 1925382  
GATATTTGTATTGCTTCATATATGAATTTCTTGATTACAAACAAAGGAGTTATCGTACCA 1925323

Query 419  
CAATACGGTGATGAAAATGATGCTCTAGCATTAAAACAAGTTCAAGAGATGTTTCCAGAC 478  
|||||  
Sbjct 1925322  
CAATACGGTGATGAAAATGATGCTCTAGCATTAAAACAAGTTCAAGAGATGTTTCCAGAC 1925263

Query 479 CGCGAAATAGTTGGCGTGAACACTGTTGAAGTAGTTTATGGTGGAGGAAATAT  
531  
|||||  
Sbjct 1925262 CGCGAAATAGTTGGCGTGAACACTGTTGAAGTAGTTTATGGTGGAGGAAATAT  
1925210

## PRÍLOHA II: SEKVENCE AMPLIKONU 2 (*LACTOBACILLUS CURVATUS* AI-3)

Query 1  
TGAAAATAAACTTAAAGAWCATTGGAATGCTGAAAAAATTCTTTGGCTTGGGGATGGAAT 60  
|||||  
Sbjct 1925704  
TGAAAATAAACTTAAAGAACATTGAGTGCTGAAAAAATTCTTTGGCTTGGGGATGGAAT 1925645

Query 61  
TGACCCASAAGAAACAAACGGTCATGTGGATGATGTTGCTTTCGTAGCACCAGGGGA 120  
|||||  
Sbjct 1925644  
TGACCCAGAAGAAACAAACGGTCACGTGGATGATGTTGCTTTCGTAGCACCAGGGGA 1925585

Query 121  
AGTTGCATGCATTTATACTGARGATGAGAAGTCACCTTTTTATGAAGCAGCACAAGATGC 180  
|||||  
Sbjct 1925584  
AGTTGCATGCATTTATACTGAGGATGAGAAGTCACCTTTTTATGAAGCAGCACAAGATGC 1925525

Query 181  
CTATAAACGCTTGAGCCAAATGACAGATGCTAAAGGACGTCAACTCAAAGTTCATAAATT 240  
|||||  
Sbjct 1925524  
CTATAAACGCTTGAGCCAAATGACAGATGCTAAAGGACGTCAACTCAAAGTTCATAAATT 1925465

Query 241  
GACTTGTCCAGCTAAAAATGTAACGATTAATAAACAATTTAGAATTGATACAGTTGAAGG 300  
|||||  
Sbjct 1925464  
GACTTGTCCAGCTAAAAATGTAACGATTAATAAACAATTTAGAATTGATACAGTTGAAGG 1925405

Query 301  
AACAAATGCCACGTGAAGACGGAGATATTTGTATTGCTTCATATATGAATTTCTTGATTAC 360  
|||||  
Sbjct 1925404  
AACAAATGCCACGTGAAGATGGAGATATTTGTATTGCTTCATATATGAATTTCTTGATTAC 1925345

Query 361  
AAACAAAGGAGTTATCGTACCACAATACGGTGATGAAAATGATGCTCTAGCATTAAAACA 420  
|||||  
Sbjct 1925344  
AAACAAAGGAGTTATCGTACCACAATACGGTGATGAAAATGATGCTCTAGCATTAAAACA 1925285

Query 421  
AGTTCAAGAGATGTTTCCAGACCGCGAAATAGTTGGCGTGAACACTGTTGAAGTAGTTTA 480  
|||||  
Sbjct 1925284  
AGTTCAAGAGATGTTTCCAGACCGCGAAATAGTTGGCGTGAACACTGTTGAAGTAGTTTA 1925225

Query 481 TGGTGGAGGAAATAT 495  
|||||  
Sbjct 1925224 TGGTGGAGGAAATAT 1925210

**PŘÍLOHA III: PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ KMENEM *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* CCDM 289 PŘI RŮZNÝCH KULTIVAČNÍCH PODMÍNEK**

Č. vzorku	pH 4,5		Analyzované biogenní aminy v mg/l				
	NaCl [%]	Laktóza [%]	PUT	CAD	TYR	SPD	SPM
1	0	0	8,75 ± 0,75	4,36 ± 0,37	9,89 ± 0,16	1,48 ± 0,08	22,13 ± 1,81
2			8,64 ± 0,38	4,37 ± 0,08	10,36 ± 0,54	1,36 ± 0,09	22,95 ± 1,21
3			9,04 ± 0,45	4,08 ± 0,31	8,99 ± 0,66	1,48 ± 0,07	19,68 ± 1,83
4	1,0	0	10,40 ± 0,52	4,16 ± 0,31	8,60 ± 0,65	1,54 ± 0,05	19,78 ± 0,85
5			10,55 ± 0,91	4,24 ± 0,11	8,21 ± 0,07	1,54 ± 0,14	18,91 ± 0,65
6			10,04 ± 0,33	3,95 ± 0,15	8,12 ± 0,54	1,44 ± 0,06	17,89 ± 0,99
7	2,0	0	9,93 ± 0,69	3,83 ± 0,24	8,63 ± 0,67	2,00 ± 0,09	19,02 ± 0,79
8			9,92 ± 0,93	4,22 ± 0,37	9,26 ± 0,58	1,62 ± 0,10	22,95 ± 1,59
9			9,96 ± 0,72	4,29 ± 0,28	9,23 ± 0,78	1,85 ± 0,10	22,00 ± 0,95
10	0	0,25	9,35 ± 0,66	4,26 ± 0,20	9,11 ± 0,23	1,27 ± 0,09	22,47 ± 1,30
11			9,15 ± 0,63	3,72 ± 0,27	9,59 ± 0,63	1,28 ± 0,09	21,60 ± 1,10
12			9,34 ± 0,41	4,14 ± 0,34	9,35 ± 0,66	1,35 ± 0,10	20,42 ± 1,10
13	1,0	0,25	9,96 ± 0,55	4,24 ± 0,39	7,98 ± 0,62	1,55 ± 0,13	19,67 ± 1,25
14			9,67 ± 0,33	4,18 ± 0,31	7,74 ± 0,53	1,49 ± 0,10	17,99 ± 0,85
15			9,65 ± 0,89	4,24 ± 0,11	7,82 ± 0,68	1,55 ± 0,14	17,92 ± 1,16
16	2,0	0,25	9,89 ± 0,59	4,37 ± 0,35	8,10 ± 0,72	1,71 ± 0,10	19,66 ± 0,80
17			10,06 ± 0,64	3,98 ± 0,26	7,11 ± 0,44	1,81 ± 0,07	16,85 ± 0,54
18			10,56 ± 0,59	4,19 ± 0,22	7,66 ± 0,39	1,77 ± 0,08	17,15 ± 1,25
19	0	0,5	9,85 ± 0,63	4,10 ± 0,25	6,90 ± 0,45	1,36 ± 0,09	17,95 ± 1,35
20			9,93 ± 0,75	3,72 ± 0,13	6,83 ± 0,49	1,36 ± 0,11	16,63 ± 0,71
21			9,82 ± 0,42	3,90 ± 0,27	7,41 ± 0,36	1,45 ± 0,09	19,12 ± 0,79
22	1,0	0,5	9,93 ± 0,62	3,69 ± 0,26	7,81 ± 0,73	1,39 ± 0,09	19,78 ± 1,80
23			10,61 ± 0,91	3,99 ± 0,22	7,33 ± 0,16	1,50 ± 0,07	19,38 ± 1,35
24			10,02 ± 0,79	3,94 ± 0,20	7,32 ± 0,55	1,70 ± 0,12	19,81 ± 0,80
25	2,0	0,5	10,70 ± 0,93	3,76 ± 0,30	7,34 ± 0,12	1,64 ± 0,12	18,23 ± 1,29
26			10,77 ± 0,27	3,99 ± 0,35	7,46 ± 0,68	1,81 ± 0,07	18,06 ± 0,94
27			10,33 ± 0,92	3,99 ± 0,23	7,55 ± 0,37	1,61 ± 0,12	19,19 ± 1,49
28	0	1,0	9,54 ± 0,45	4,13 ± 0,32	7,81 ± 0,45	1,33 ± 0,07	20,20 ± 1,83
29			9,61 ± 0,16	3,90 ± 0,28	6,92 ± 0,47	1,83 ± 0,03	18,66 ± 1,56
30			9,41 ± 0,89	4,02 ± 0,20	7,20 ± 0,32	1,54 ± 0,11	18,76 ± 1,61
31	1,0	1,0	10,30 ± 0,45	3,93 ± 0,29	5,48 ± 0,33	1,92 ± 0,08	15,54 ± 0,84
32			10,39 ± 0,88	3,93 ± 0,14	6,02 ± 0,15	1,82 ± 0,11	16,87 ± 1,35
33			4,70 ± 0,35	3,26 ± 0,13	10,18 ± 0,94	ND	22,71 ± 1,19
34	2,0	1,0	4,86 ± 0,39	3,27 ± 0,28	10,91 ± 0,26	ND	23,46 ± 1,58
35			4,85 ± 0,29	3,18 ± 0,19	10,53 ± 0,28	ND	23,05 ± 1,47
36			5,03 ± 0,17	3,09 ± 0,22	11,28 ± 0,51	ND	24,38 ± 2,30

Č. vzorku	pH 5,0		Analyzované biogenní aminy v mg/l				
	NaCl [%]	Laktóza [%]	PUT	CAD	TYR	SPD	SPM
1	0	0	4,30 ± 0,26	3,38 ± 0,19	11,22 ± 0,39	ND	21,52 ± 1,71
2			3,84 ± 0,25	3,26 ± 0,17	10,82 ± 0,99	ND	20,55 ± 0,81
3			3,74 ± 0,30	3,31 ± 0,21	10,52 ± 0,81	ND	20,86 ± 0,92
4	1,0	0	4,74 ± 0,25	3,11 ± 0,10	10,08 ± 0,73	ND	20,26 ± 0,51
5			4,55 ± 0,28	3,21 ± 0,07	10,55 ± 0,92	ND	20,24 ± 1,04
6			4,62 ± 0,27	3,52 ± 0,15	10,99 ± 0,60	ND	24,02 ± 1,86
7	2,0	0	5,22 ± 0,32	3,19 ± 0,23	10,42 ± 0,28	ND	21,08 ± 0,92
8			4,50 ± 0,38	3,61 ± 0,18	10,85 ± 0,46	ND	21,43 ± 1,40
9			4,59 ± 0,27	3,51 ± 0,19	10,70 ± 0,82	ND	28,32 ± 1,43
10	0	0,25	3,95 ± 0,30	3,64 ± 0,21	10,95 ± 0,49	ND	20,60 ± 0,72
11			3,90 ± 0,12	3,60 ± 0,18	12,23 ± 0,56	ND	21,36 ± 1,18
12			4,23 ± 0,33	3,19 ± 0,11	6,19 ± 0,21	ND	10,74 ± 0,59
13	1,0	0,25	4,51 ± 0,20	3,36 ± 0,18	10,62 ± 0,27	ND	20,79 ± 1,05
14			4,36 ± 0,37	3,87 ± 0,31	11,24 ± 0,50	ND	21,34 ± 1,85
15			4,32 ± 0,35	3,76 ± 0,29	11,43 ± 0,53	ND	25,68 ± 0,99
16	2,0	0,25	5,06 ± 0,43	3,60 ± 0,27	10,67 ± 0,41	ND	20,37 ± 1,05
17			4,84 ± 0,25	3,67 ± 0,27	16,73 ± 0,42	ND	20,32 ± 1,59
18			4,41 ± 0,27	3,75 ± 0,18	10,45 ± 0,62	ND	22,08 ± 2,08
19	0	0,5	4,18 ± 0,35	4,10 ± 0,33	10,67 ± 0,47	ND	20,61 ± 0,76
20			4,32 ± 0,22	3,59 ± 0,12	10,68 ± 0,54	ND	20,73 ± 1,65
21			4,62 ± 0,33	3,68 ± 0,24	11,33 ± 0,77	ND	22,92 ± 1,75
22	1,0	0,5	4,76 ± 0,29	3,46 ± 0,28	9,66 ± 0,59	ND	19,77 ± 1,39
23			4,75 ± 0,38	3,70 ± 0,29	10,58 ± 0,62	ND	23,75 ± 2,15
24			4,38 ± 0,29	3,47 ± 0,21	10,23 ± 0,22	ND	23,42 ± 0,63
25	2,0	0,5	4,96 ± 0,36	3,36 ± 0,25	8,74 ± 0,51	ND	19,87 ± 0,93
26			4,28 ± 0,41	3,22 ± 0,11	9,83 ± 0,68	ND	19,90 ± 1,02
27			4,68 ± 0,13	3,53 ± 0,12	11,50 ± 0,53	ND	24,22 ± 1,97
28	0	1,0	4,20 ± 0,34	3,82 ± 0,19	11,58 ± 0,47	ND	24,30 ± 2,16
29			4,17 ± 0,18	4,02 ± 0,27	10,81 ± 0,39	ND	23,89 ± 1,79
30			4,40 ± 0,22	3,74 ± 0,24	11,46 ± 0,47	ND	24,67 ± 2,03
31	1,0	1,0	4,61 ± 0,12	4,03 ± 0,26	11,40 ± 0,77	ND	34,12 ± 1,04
32			4,42 ± 0,25	3,75 ± 0,26	10,88 ± 0,85	ND	23,01 ± 1,55
33			4,62 ± 0,22	3,82 ± 0,20	10,52 ± 0,60	ND	22,83 ± 1,17
34	2,0	1,0	4,65 ± 0,20	3,56 ± 0,17	10,26 ± 0,35	ND	21,91 ± 1,80
35			4,70 ± 0,42	3,25 ± 0,04	10,66 ± 0,49	ND	22,88 ± 1,98
36			4,80 ± 0,40	3,41 ± 0,17	11,05 ± 0,67	ND	22,48 ± 1,84