

# **Vliv vnějších faktorů na produkci biogenních aminů u *Lactobacillus brevis* v mléce a *in vitro***

Bc. Monika Svačinová

---

Diplomová práce  
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2013/2014

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika Svačinová**  
Osobní číslo: **T12396**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Vliv vnějších faktorů na produkci biogenních aminů u Lactobacillus brevis v mléce a in vitro**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Charakteristika a vznik biogenních aminů.
2. Vnější faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů.
3. Metody stanovení biogenních aminů.
4. Taxonomické zařazení, charakteristika, význam a využití bakterie *Lactobacillus brevis* v potravinářství.

### II. Praktická část

1. Sledování vybraných faktorů (teploty, pH, přídavku NaCl, aminokyselin a laktózy) na produkci biogenních aminů u *Lactobacillus brevis* v podmínkách in vitro a v mléce.
2. Stanovení biogenních aminů kapalinovou chromatografií.
3. Zpracování výsledků.
4. Formulace závěrů na základě získaných výsledků.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] PRIYADARSHANI, W.M.D., RAKSHIT, S.K., 2011. Screening selected strains of probiotic lactic acid bacteria for their ability to produce biogenic amines (histamine and tyramine), *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 2062–2069.
- [2] MARCOBAL, Á., MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J., MORENO-ARRIBAS, M.V., MUNOZ, R. 2006. A multifactorial design for studying factors influencing growth and tyramine production of the lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* CECT 4669 and *Enterococcus faecium* BIFI-58. *Research in Microbiology*, 157, 417–424.
- [3] LINARES, D.M., MARTÍN, M., LADERO, V., AIVAREZ, M. A., FERNÁNDEZ, M., 2011. Biogenic amines in dairy products, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 691–703.
- [4] LORENCOVÁ, E., BUŇKOVÁ, L., MATOULKOVÁ, D., DRÁB, V., PLEVA, P., KUBÁŇ, V., BUŇKA, F., 2012. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 2086–2091.
- [5] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., POLLAKOVÁ, E., PODEŠVOVÁ, T., DRÁB, V. 2011. 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*, 147, 112–119.

Vedoucí diplomové práce:

**doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

**10. ledna 2014**

Termín odevzdání diplomové práce:

**25. dubna 2014**

Ve Zlíně dne 3. února 2014

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



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

Příjmení a jméno: ...SVAČINOVÁ MONIKA.....

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 22.4.2014

Svačinová

---

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

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

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

<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 vzdělávacího 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 přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## ABSTRAKT

Tato práce se zabývá sledováním produkce biogenních aminů bakterií *Lactobacillus brevis*. Teoretická část popisuje strukturu a vznik biogenních aminů, jejich výskyt v potravinách, toxicitu a legislativní limity. Dále jsou popsány bakterie rodu *Lactobacillus* a nakonec některé metody používané ke stanovení biogenních aminů.

V praktické části této práce byl sledován vliv vybraných faktorů (přídavek laktózy, NaCl, vliv teploty a pH) působících na dekarboxylázovou aktivitu *Lactobacillus brevis*. Vzniklé biogenní aminy byly stanoveny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s pre-kolonovou derivatizací danzylchloridem (DCI) a UV/VIS detekcí. Na základě naměřených výsledků byla stanovena produkce biogenních aminů tyraminu a sperminu. Nejvyšší naměřené množství tyraminu bylo zjištěno v podmínkách *in vitro* při počátečním pH 5,0 v médiu s přídavkem 0,25 % (w/v) laktózy a bez přídavku soli. Produkce sperminu byla v průběhu kultivace kolísavá a nejvyšší naměřené množství bylo stanoveno v mléce při kulturační teplotě 37 °C. Naopak nejnižší množství bylo stanoveno *in vitro* při 10 °C.

Klíčová slova: biogenní aminy, dekarboxylace, *Lactobacillus brevis*, HPLC

## ABSTRACT

This thesis deals with monitoring of biogenic amines production by *Lactobacillus brevis*. The theoretical part describes the structure and formation of biogenic amines, their occurrence in foods, toxicity and legislative limits. In order are described bacteria of the genus *Lactobacillus* and finally some of the methods used for the determination of biogenic amines.

In the practical part of this work was observed the influence of selected factors (lactose and NaCl concentration and the effect of temperature and pH) effect on the decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis*. The formed biogenic amines were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with pre-column derivatization by dansylchloride (DCI) and UV/VIS detection. The production of biogenic amines tyramine and spermine was determined by the base of measured results. Highest measured amount of tyramine were found at 37° C *in vitro* at an initial pH of 5,0 in medium supplemented with 0,25 % (w/v) lactose and without added salt. Production of spermine was very fluctuating during the cultivation and the highest quantity of spermin was determined during cultivation in milk at 37° C. The lowest amount of spermine was determined *in vitro* at 10° C

Keywords: biogenic amines, decarboxylation, *Lactobacillus brevis*, HPLC



Děkuji doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. a Ing. Evě Lorencové, za odborné vedení, velkou trpělivost, podnětné připomínky a cenné rady, které mi poskytly při zpracování mé diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat svým prarodičům za podporu v průběhu celého studia.

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



# OBSAH

|   |           |
|---|-----------|
| ÚVOD .....  | 12        |
| <b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>                                      | <b>13</b> |
| <b>1 BIOGENNÍ AMINY.....</b>  | <b>14</b> |
| 1.1 STRUKTURA A VZNIK.....  | 14        |
| 1.2 TOXICITA BIOGENNÍCH AMINŮ .....                                 | 17        |
| 1.3 VÝSKYT A FUNKCE.....  | 17        |
| 1.3.1 Biogenní aminy v rostlinných materiálech .....                | 18        |
| 1.3.2 Biogenní aminy v živočišných materiálech a tkáních .....      | 19        |
| 1.4 LEGISLATIVNÍ LIMITY .....                                       | 20        |
| <b>2 VNĚJŠÍ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU BIOGENNÍCH AMINŮ.....</b>    | <b>21</b> |
| 2.1 TEPLOTA.....  | 21        |
| 2.2 PH .....  | 22        |
| 2.3 OBSAH NaCl.....   | 22        |
| 2.4 OSTATNÍ FAKTORY .....   | 22        |
| <b>3 BAKTERIE RODU <i>LACTOBACILLUS</i>.....</b>                    | <b>23</b> |
| 3.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA .....                                    | 23        |
| 3.2 TAXONOMIE A MORFOLOGIE BAKTERIÍ RODU <i>LACTOBACILLUS</i> ..... | 23        |
| 3.3 VÝSKYT A VÝZNAM.....  | 23        |
| 3.4 METABOLIZMUS .....  | 24        |
| 3.5 <i>LACTOBACILLUS BREVIS</i> .....                               | 28        |
| 3.5.1 Význam a použití v potravinářství .....                       | 28        |
| <b>4 METODY STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ.....</b>                     | <b>29</b> |
| 4.1 CHROMATOGRAFICKÉ METODY.....                                    | 29        |
| 4.1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....           | 29        |
| 4.1.2 Plynová chromatografie (GC).....                              | 30        |
| 4.1.3 Ionově-výměnná chromatografie (IEC) .....                     | 31        |
| 4.2 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA .....                                   | 32        |
| 4.3 DALŠÍ METODY .....  | 34        |
| <b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>                                      | <b>35</b> |
| <b>5 CÍL PRÁCE.....</b>   | <b>36</b> |
| <b>6 MATERIÁL A METODIKA.....</b>                                   | <b>37</b> |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 6.1      | BAKTERIÁLNÍ KULTURA.....   | 37        |
| 6.2      | PŘÍPRAVA KULTURY .....   | 37        |
| 6.3      | KULTIVAČNÍ MÉDIA.....  | 37        |
| 6.4      | TEPLOTY KULTIVACE A ODBĚROVÝ ČAS .....   | 39        |
| 6.5      | MĚŘENÍ OPTICKÉ HUSTOTY BUNĚK, CPM A pH.....  | 39        |
| 6.6      | PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO DERIVATIZACI .....   | 39        |
| 6.7      | DERIVATIZACE VZORKŮ .....  | 40        |
| 6.8      | VLASTNÍ CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ.....  | 40        |
| <b>7</b> | <b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>  | <b>42</b> |
| 7.1      | Vliv vnějších faktorů na produkci biogenních aminů u <i>LACTOBACILLUS BREVIS</i> 10185-3 <i>IN VITRO</i> při 37 °C ..... | 42        |
| 7.1.1    | Vliv pH.....   | 42        |
| 7.1.2    | Vliv NaCl.....   | 43        |
| 7.1.3    | Vliv laktózy .....   | 45        |
| 7.1.4    | Vliv kombinace faktorů.....  | 46        |
| 7.1.5    | Měření nárůstu buněk.....  | 48        |
| 7.1.6    | Stanovení pH kultivačního média .....  | 51        |
| 7.2      | Vliv vnějších faktorů na produkci biogenních aminů u <i>LACTOBACILLUS BREVIS</i> 10185-3 <i>IN VITRO</i> při 10 °C ..... | 51        |
| 7.2.1    | Vliv pH.....   | 51        |
| 7.2.2    | Vliv NaCl.....   | 52        |
| 7.2.3    | Vliv laktózy .....   | 53        |
| 7.2.4    | Vliv kombinace faktorů.....  | 55        |
| 7.2.5    | Měření nárůstu buněk.....  | 57        |
| 7.2.6    | Stanovení pH kultivačního média .....  | 60        |
| 7.3      | Vliv vnějších faktorů na produkci biogenních aminů u <i>LACTOBACILLUS BREVIS</i> 10185-3 v mléce při 37 °C .....         | 60        |
| 7.3.1    | Vliv pH.....   | 60        |
| 7.3.2    | Vliv NaCl.....   | 61        |
| 7.3.3    | Vliv přídavku aminokyselin .....   | 62        |
| 7.3.4    | Stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM).....  | 63        |
| 7.3.5    | Stanovení pH kultivačního média .....  | 63        |
| 7.4      | Vliv vnějších faktorů na produkci biogenních aminů u <i>LACTOBACILLUS BREVIS</i> 10185-3 v mléce při 10 °C .....         | 63        |
| 7.4.1    | Vliv pH.....   | 63        |
| 7.4.2    | Vliv NaCl.....   | 64        |
| 7.4.3    | Vliv přídavku aminokyselin .....   | 66        |
| 7.4.4    | Stanovení celkového počtu mikroorganismů .....   | 66        |
| 7.4.5    | Stanovení pH kultivačního média .....  | 66        |

|  |   |           |
|--|---|-----------|
| 7.5  | PRODUKCE OSTATNÍCH BIOGENNÍCH AMINŮ KMENEM <i>LACTOBACILLUS BREVIS</i><br>10185-3 ..... | 67        |
| 7.6  | SOUHRNNÁ DISKUZE .....  | 67        |
| <b>ZÁVĚR .....</b>                             |   | <b>71</b> |
| <b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>         |   | <b>72</b> |
| <b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b> |   | <b>80</b> |
| <b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>                    |   | <b>82</b> |
| <b>SEZNAM TABULEK .....</b>                    |   | <b>85</b> |
| <b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>                     |   | <b>86</b> |

## ÚVOD

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární bazické sloučeniny, které jsou nezbytné pro řadu fyziologických funkcí, avšak při vyšších dávkách jsou pro lidské zdraví nebezpečné. Skupinou lidí, pro kterou jsou tyto látky nebezpečné, jsou pacienti užívající psychofarmaka. Následkem užití vyššího množství biogenních aminů v potravinách mohou u těchto lidí vyvolat migrény, zvracení, bušení srdce, dýchací potíže, atd. (Santos, 1996).

Výskyt biogenních aminů může ohrožovat bezpečnost potravin téměř ve všech odvětvích potravinářského průmyslu. Riziko, které představují, je možné snížit všude tam, kde je výskyt biogenních aminů důsledkem exogenní mikroflóry. Kritické body, u kterých je pravděpodobnost projevení aktivity mikrobiálních dekarboxyláz, představuje skladování surovin, fermentační proces a skladování hotových výrobků. (Kohajdová a kol., 2008).

Přítomnost biogenních aminů v potravinách bývá často důsledkem kažení potravin. Ve fermentovaných potravinách však mohou být produkovány starterovými nebo probiotickými bakteriemi, které mají často vysokou dekarboxylázovou aktivitu. Je proto důležité zjistit, jak jednotlivé vnější faktory ovlivňují produkci biogenních aminů (Santos, 1996).

V této práci je sledován vliv vnějších faktorů, jako je přídavek laktózy a chloridu sodného, teplota kultivace a pH, na produkci biogenních aminů v podmínkách *in vitro* a v mléce.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 BIOGENNÍ AMINY

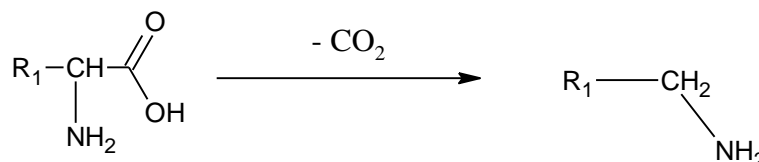
Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární sloučeniny, jejichž výskyt v potravinách může souviset s kažením potravy nebo s fermentačními procesy a je závislý především na dekarboxylázové aktivitě mikroorganismů (Buňková a kol., 2009; Santos, 1996). Tyto důležité dusíkaté sloučeniny mají biologický význam v zelenině, mikrobiálních a živočišných buňkách. Lepší znalosti jejich vzniku při různých vnějších podmínkách jsou nezbytné pro zlepšení kvality a bezpečnosti potravin (Santos, 1996). V nízkých koncentracích jsou nezbytné pro mnoho fyziologických funkcí (Önal a kol., 2013).

### 1.1 Struktura a vznik

Biogenní aminy se mohou dělit podle své chemické struktury, a to na alifatické (putrescin, kadaverin, spermin a spermidin), aromatické (tyramin a fenyletylamin) anebo heterocyklické (histamin a tryptamin) viz tabulka 1 (Spano, 2010; Santos, 1996). Podle jejich počtu aminoskupin mohou být rozděleny na monoaminy (tyramin a fenyletylamin), diaminy (putrescin a kadaverin) nebo polyaminy (spermin a spermidin) (Spano, 2010).

Vznikají především v prostředí, kde je větší výskyt prekurzorů (proteinů nebo volných aminokyselin) viz obrázek 2 (Buňková a kol., 2009). Dalším nezbytným předpokladem kromě výskytu proteinů v potravinách je přítomnost mikroorganismů s dekarboxylační aktivitou a vhodné podmínky pro jejich růst a množení.

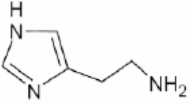
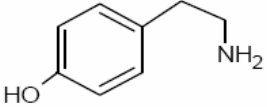
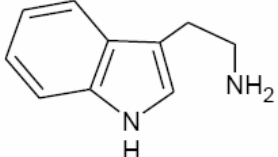
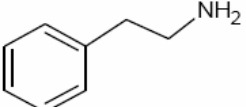
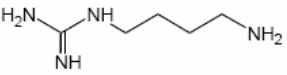
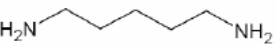
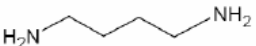
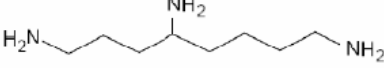
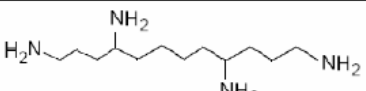
Biogenní aminy v potravinách vznikají především dekarboxylací z aminokyselin. Obecné schéma vzniku je uvedeno na obrázku 1 (Önal a kol., 2013).



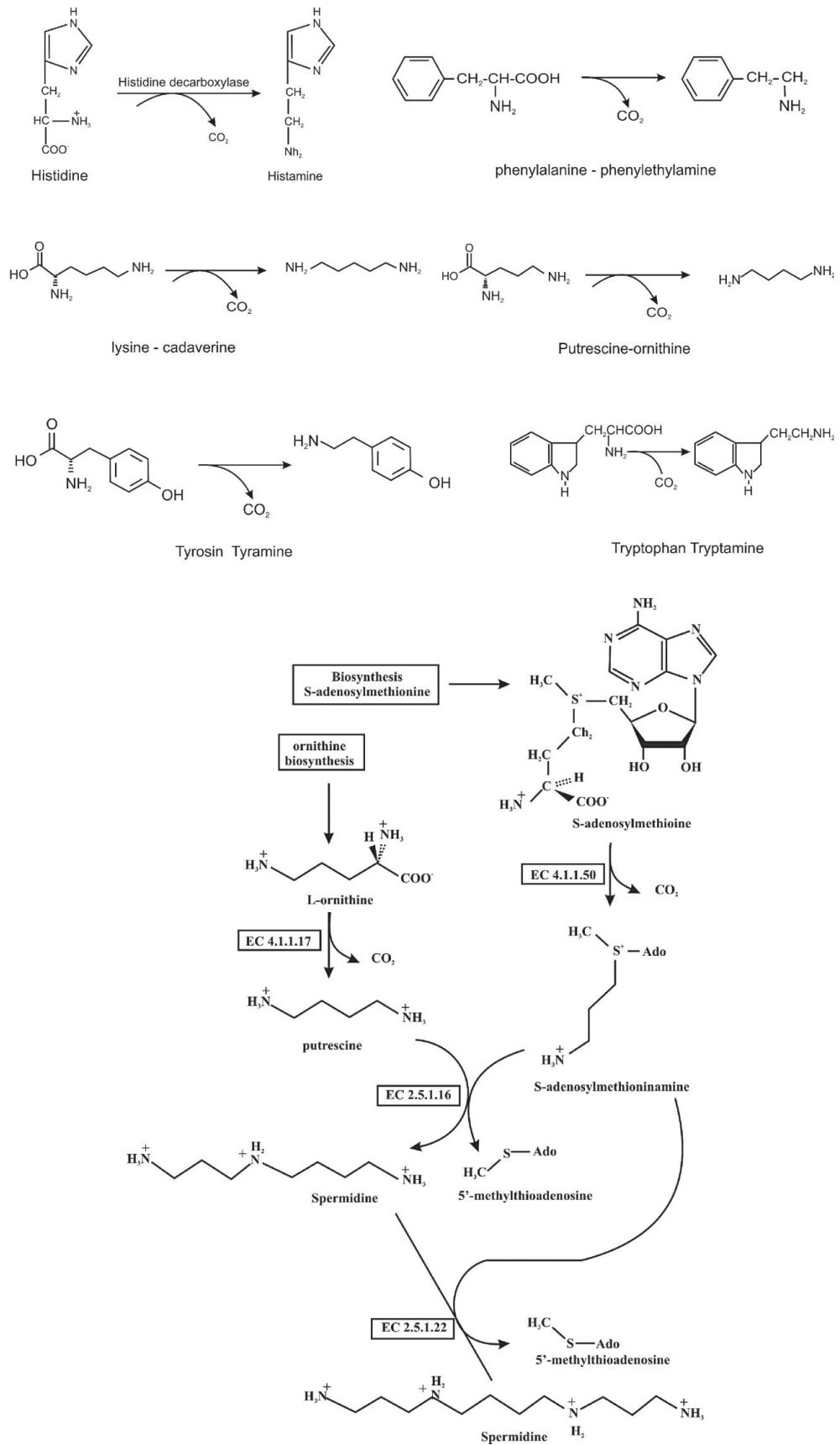
Obrázek 1: Obecná rovnice dekarboxylace aminokyselin

Mikroorganismy, které produkují dekarboxylázy, mohou být přirozeně přítomné v produktech, anebo se tam mohou dostat před technologickým zpracováním, v průběhu nebo po skončení výroby (Greif a kol., 1999).

Tabulka 1: Názvy a vzorce jednotlivých biogenních aminů a polyaminů (Hudcová, 2012)

| TRIVIÁLNÍ NÁZEV | SYSTEMATICKÝ NÁZEV                              | VZOREC  |
|-----------------|---|---|
| histamin        | 2-(1H-imidazol-5-yl)etanamin                    |    |
| tyramin         | 4-(2-aminoethyl)fenol                           |    |
| tryptamin       | 2-(1H-indol-3-yl)etanamin                       |    |
| fenylethylamin  | 2-fenyletanamin                                 |    |
| agmatin         | 2-(4-aminobutyl)guanidin                        |   |
| kadaverin       | pentan-1,5-diamin                               |  |
| putrescin       | butan-1,4-diamin                                |  |
| spermidin       | <i>N</i> -(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin       |  |
| spermin         | <i>N,N'</i> -bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin |  |





Obrázek 2: Biogenní aminy a jejich prekurzory a syntéza spermidinu (Anli a kol., 2008)

## 1.2 Toxicita biogenních aminů

Konzumace potravin, obsahujících velké množství biogenních aminů, může mít toxikologické důsledky (Spano, 2010). Tyto problémy jsou vážnější u spotřebitelů s méně efektivními detoxikačními schopnostmi (Spano, 2010; Standarová a kol., 2009).

Histamin, tryptamin,  $\beta$ -fenyletylamin a tyramin jsou biologicky aktivní aminy, které mají významný fyziologický účinek na člověka, obvykle buď psychoaktivní nebo vazoaktivní. Psychoaktivní aminy ovlivňují nervový systém působením na nervové transmitery, zatímco vazoaktivní aminy působí na cévní systém (Shalaby, 1996).

K nejznámějším otravám z potravin způsobené BA patří otravy histaminem a tyraminem a to v souvislosti s konzumací ryb, popřípadě sýrů. Vysoké dávky tyraminu způsobují například hypertenzi, bušení srdce, nevolnost nebo migrény (Standarová a kol., 2009).

## 1.3 Výskyt a funkce

Biogenní aminy se vyskytují prakticky ve všech potravinách. Jsou to běžné produkty metabolismu (SZPI, 2003; Velíšek, 1999). Ve vyšším množství se nachází ve fermentovaných výrobcích (např. sýrech, pivu, vínu), kde vznikají enzymatickou činností přítomných mikroorganismů (SZPI, 2003).

V eukaryotických buňkách je biosyntéza biogenních aminů nezbytná, protože tyto sloučeniny slouží jako prekurzory pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů (Spano, 2010). Některé BA se uplatňují jako neurotransmitery, zatímco jiné, např. putrescin a kadaverin jsou potřebné pro různé biologické funkce, jak uvádí tabulka 2 (Spano, 2010).

V prokaryotických buňkách slouží syntéza BA hlavně jako obranný mechanismus bakterií, pro které je pak snazší vydržet kyselé prostředí (Spano, 2010). Některé z nich hrají důležitou roli v mnoha lidských a zvířecích fyziologických funkcích, jako je například regulace tělesné teploty, pH v žaludku a činnosti mozku (Standarová a kol., 2009).

Tabulka 2: Přehled vybraných biogenních aminů a jejich biologický význam (Velíšek, 1999)

| Biogenní amin | Biologický význam  |
|---------------|--|
| Histamin      | Lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak, sekreci žaludeční šťávy, účast při anafylaktickém šoku a alergických reakcích |
| Kadaverin     | Stabilizace nukleových kyselin, ribozomů, stimulace diferenciacie buněk, rostlinný hormon                                  |
| Putrescin     | Stabilizace nukleových kyselin, ribozomů, stimulace diferenciacie buněk, rostlinný hormon                                  |
| Tyramin       | Prekurzor dopaminu, lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak a kontrakce hladkého svalstva                              |

### 1.3.1 Biogenní aminy v rostlinných materiálech

Biogenní aminy se přirozeně vyskytují v potravinách rostlinného původu jako běžné produkty metabolismu (Velíšek, 1999)

Hlavním BA v potravinách rostlinného původu bývá tyramin (Velíšek, 1999). V některých rostlinách se nachází ve významném množství různé deriváty biogenních aminů, které se řadí mezi protoalkaloidy (Velíšek, 1999).

Guerrini a kol. (2002) uvádí, že u vína se koncentrace biogenních aminů zvyšuje po jablečno-mléčném kvašení a červená vína bývají obvykle bohatší na aminy než vína bílá. Dále zjistili, že *Oenococcus oeni* v různých vzorcích vína tvořil především histamin a u vybraných vzorků vína i vyšší koncentrace putrescinu. Některé aminy se již nacházejí v hroznech a to histamin a tyramin. Putrescin a kadaverin bývají obvykle spojovány se špatnými hygienickými podmínkami při výrobě vína (Beneduce a kol., 2010).

V lahvovém pivu byla zjištěna produkce zejména tyraminu, která se zvyšovala s dobou skladování (Kalač a kol., 2002).

V kečupu bylo zjištěno (Kalač a kol., 2002) vyšší množství tyraminu, kadaverinu a putrescinu. Histamin ve špenátu byl pod detekčním limitem, oproti starším výsledkům (Häberle, 1987; Smith, 1981), kde byl stanoven ve špenátu v koncentraci až 400 mg/kg. Tyto rozdíly mohou být důsledkem rozdílného zpracování, skladování nebo hygieny při výrobě.

Kvašená zelenina představuje další třídu potravin, ze které byly izolovány biogenní aminy. Hlavní biogenní aminy v zelí jsou histamin, tyramin, putrescin a kadaverin (Shalaby, 1996).

### 1.3.2 Biogenní aminy v živočišných materiálech a tkáních

V živočišných materiálech se mohou biogenní aminy vyskytovat v mase, masných výrobcích, sýrech a dalších živočišných produktech a zkoumáním těchto potravin na přítomnost biogenních aminů se zabývá mnoho studií. Výskyt mikroorganismů a příklady biogenních aminů v živočišných materiálech uvádí tabulka 3.

Při skladování masa dochází vlivem aktivity enzymů k růstu biogenních aminů. Tohoto lze využít při stanovení čerstvosti masa. Vinci a Antonelli (2002) stanovili, že obsah celkových biogenních aminů v červeném a bílém mase po 30 dnech skladování při 4 °C je zhruba u obou mas stejný, a to u červeného 238,1 mg/kg a u bílého 248,7 mg/kg, přičemž u červeného byl nejvyšší obsah tyraminu a u bílého masa kadaverinu.

Růst BA lze pozorovat i při výrobě fermentovaných salámů. V klobásách byla zjištěna vyšší produkce tyraminu po 20 dnech skladování při 19 °C než při 4 °C, kdy byla produkce zhruba poloviční (Bover-Cid a kol., 2001). Na tvorbu biogenních aminů v masných výrobcích se zaměřili i Smělá a kol. (2003) a zjistili, že při zrání salámu Herkules docházelo hlavně k tvorbě putrescinu a tyraminu, ostatní aminy byly detekovány v nízkém množství. Po 14 dnech zrání bylo zjištěno až 820 mg/kg putrescinu.

Sýry představují ideální prostředí pro tvorbu biogenních aminů a mohou obsahovat i významná množství těchto látek (Rejchrtová a kol., 2010). Tvorba BA v sýrech je závislá na koncentraci volných aminokyselin nebo peptidů, na přítomnosti bakterií schopných dekarboxylovat aminokyseliny a dalších faktorech, jako je pH, koncentrace solí a vodní aktivita (Rejchrtová a kol., 2010).

U sýru feta byla stanovena nejvyšší produkce tyraminu a putrescinu a to po 120 dnech zrání (Valsamaki a kol., 2000). V sýrech hrozí převážně vznik tyraminu a histaminu, což potvrzuje mnoho studií.

Při rozkladu ryb, zejména při špatném skladování za vyšších teplot nad 8 °C, dochází k tvorbě různých biogenních aminů. Nejčastěji se vyskytující biogenní aminy spojené s kažením ryb jsou histamin, tyramin, putrescin a kadaverin (Nehasilová, 2011). Histamin se využívá jako indikátor kvality ryb bohatých na histidin (ryby s tmavým masem) a putrescin a kadaverin bývají indikátorem kvality ryb chudých na histidin (ryby s bílým masem) (Nehasilová, 2011).

Tabulka 3: Výskyt mikroorganismů a biogenních aminů ve vybraných živočišných produktech (Velíšek)

| Potravina            | Mikroorganizmy   | Produkované aminy  |
|----------------------|--|--|
| Ryby                 | <i>Morganella morganii</i> ,<br><i>Klebsiella pneumoniae</i> ,<br><i>Proteus vulgaris</i> ,<br><i>Clostridium perfringens</i> ,<br><i>Enterobacter aerogenes</i> ,<br><i>Bacillus</i> sp.,   | Histamin, tyramin, kadaverin,<br>putrescin, spermin, spermidin |
| Sýry                 | <i>Lactobacillus buchneri</i> ,<br><i>Lactobacillus delbrueckii</i><br><i>subsp. bulgaricus</i> ,<br><i>Lactobacillus plantarum</i> ,<br><i>Lactobacillus casei</i> ,<br><i>Lactobacillus acidophilus</i> ,<br><br><i>Enterococcus faecium</i> ,<br><i>Propionibacterium</i> sp. | Histamin, kadaverin,<br>putrescin, tyramin, tryptamin          |
| Maso a masné výrobky | <i>Pediococcus</i> sp., <i>Lactobacillus</i><br>sp., <i>Pseudomonas</i> sp.,<br><i>Streptococcus</i> sp.,<br><i>Micrococcus</i> sp., čeled'<br><i>Enterobacteriaceae</i>   | Histamin, kadaverin,<br>putrescin, tyramin                     |

#### 1.4 Legislativní limity

V ČR je stanoven limit jen pro histamin. Jeho maximální přípustné množství v produktech rybolovu stanovuje Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 (Nařízení ES). Povoleno limit je 100 – 200 mg/kg. Pro produkty rybolovu, které byly ošetřeny enzymatickým zráním v láku vyrobených z ryb s vysokým obsahem histidinu je povolený limit 200 - 400 mg/kg.

## 2 VNĚJŠÍ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU BIOGENNÍCH AMINŮ

Tvorba biogenních aminů v potravinách hodně závisí na vhodných podmínkách pro mikroorganismy s dekarboxylační aktivitou. Mezi nejvýznamnější faktory ovlivňující tuto aktivitu patří teplota, pH a obsah NaCl. Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů (Kohajdová, 2008)

| Faktory                            | Vliv na dekarboxylázovou aktivitu  |
|------------------------------------|--|
| <b>pH</b>                          | dekarboxylázová aktivita je silnější v kyselém prostředí (pH 4 až 5,5)   |
| <b>obsah glukózy</b>               | 0,5 až 2 % optimální pro růst mikroorganismů vybavených dekarboxylázami, 3 % inhibuje syntézu dekarboxyláz               |
| <b>teplota</b>                     | 20 až 37 °C je optimální pro růst většiny mikroorganismů vybavených dekarboxylázami, nízké teploty zastavují jejich růst |
| <b>přítomnost NaCl</b>             | aktivuje tyrozindekarboxylázu, inhibuje histidindekarboxylázu  |
| <b>přítomnost NaNO<sub>2</sub></b> | aktivuje tyrozindekarboxylázu  |
| <b>přítomnost O<sub>2</sub></b>    | potřebný pro růst mikroorganismů vybavených dekarboxylázami  |
| <b>množství biogenních aminů</b>   | histamin, agmatin a putrescin inhibují histidindekarboxylázu   |

### 2.1 Teplota

Teplota má významný vliv na tvorbu biogenních aminů i na jejich růst a aktivitu. Je schopna zpomalit buněčný růst, prodloužit generační dobu a úměrně tomu i tvorbu biogenních aminů (Pleva a kol., 2012). Při správném dodržování chladírenských teplot lze tvorbě biogenních aminů zabránit. Čím je pro mikroorganismy teplota optimálnější, tím je aktivnější i jejich dekarboxylázová aktivita. Mnoho studií uvádí, že s teplotou a dobou skladování roste produkce biogenních aminů (Kalhotka, 2011; Smělá, 2003). Vyšší teplota podporuje i proteolýzu a tedy i přístupnost volných aminokyselin. Při nízké teplotě je naopak růst mikroorga-

nízmů a tvorba biogenních aminů potlačena (Karovičová, 2003; Doseděl, 2009). Optimální teplota pro dekarboxylázovou aktivitu mezofilních bakterií je 20 až 37 °C, naopak teploty pod 5 °C a nad 40 °C působí inhibičně (Doseděl, 2009; EFSA 2011).

## 2.2 pH

Dalším faktorem, který výrazně ovlivňuje tvorbu BA je pH. Pro většinu mikroorganismů je kyselé prostředí nevyhovující a tvorbou zásaditých biogenních aminů se proti těmto podmínkám brání (Buňková a kol., 2011). Bakteriální dekarboxylázy mají pravděpodobně optimum v rozmezí pH 4,0 až 5,0 (Santos, 1996). Při výrobě uzenin se přidává do výrobků glukono- $\delta$ -lakton, který způsobuje snížení pH, což může mít také za následek zvýšení tvorby biogenních aminů (Karovičová, 2003).

## 2.3 Obsah NaCl

Chlorid sodný je jednou z látek snižující vodní aktivitu prostředí. Tím brání růstu mikroorganismů i tvorbě biogenních aminů. Avšak nízké hladiny NaCl mohou působit na produkci BA stimulačně. Uvádí se, že koncentrace 0,5 – 2,0 % podporuje činnost dekarboxyláz (Greif a kol., 2006). Ve většině případů vysoké koncentrace soli v prostředí potlačují tvorbu biogenních aminů a to zejména 3,0 až 5,5 % (Greif a kol., 2006; Gardini a kol., 2001).

## 2.4 Ostatní faktory

Dalším z faktorů ovlivňující tvorbu BA je přítomnost kyslíku. V anaerobním prostředí je pro anaerobní mikroorganismy vhodné prostředí pro růst a jejich činnost. Vyšší produkce tyraminu byla dokázána u *Lactococcus lactis* po kultivaci bez přístupu kyslíku (Buňková a kol., 2010).

Obsah glukózy v rozmezí 0,5 až 2,0 % podporuje růst bakterií s dekarboxylázovou aktivitou. Glukóza je bakteriemi zkvašována na kyselinu mléčnou a tím je docíleno i snížení pH. Tyto dva faktory působí pozitivně na tvorbu biogenních aminů (Kohajdová, 2001).

Optimální koncentrace substrátu (např. aminokyselin) pro produkci biogenních aminů je 0,5 - 2,0 %. Vyšší koncentrace mohou dekarboxylační aktivitu potlačovat (Santos, 1996).



### 3 BAKTERIE RODU *LACTOBACILLUS*

#### 3.1 Obecná charakteristika

Rod *Lactobacillus* se skládá z více než osmdesáti druhů (Salminen a kol., 2004). Bakterie rodu *Lactobacillus* patří mezi bakterie mléčného kvašení, kam se řadí i další rody, např. *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* a další (Buňková a kol., 2009).

Většina druhů jsou mezofilní, ale najdou se mezi nimi i psychrotrofní, termofilní nebo termotolerantní. Teplotní optima se velmi liší, od 30 °C do 45 °C. Některé druhy vykazují vysokou odolnost vůči soli, osmotickému tlaku nebo nízké vodní aktivitě. Společný rys laktobacilů je acidotolerance. Většina druhů je aerotolerantní, zatímco jiné vyžadují striktní anaerobní podmínky (Salminen a kol., 2004).

#### 3.2 Taxonomie a morfologie bakterií rodu *Lactobacillus*

Laktobacily jsou grampozitivní nepohyblivé tyčinky (Obrázek 3). Bývají rovné, občas spíše jako kokobacily. Zpravidla tvoří řetízky, nejsou pro ně typické (Robinson a kol., 2000).

Doména: *Bacteria*

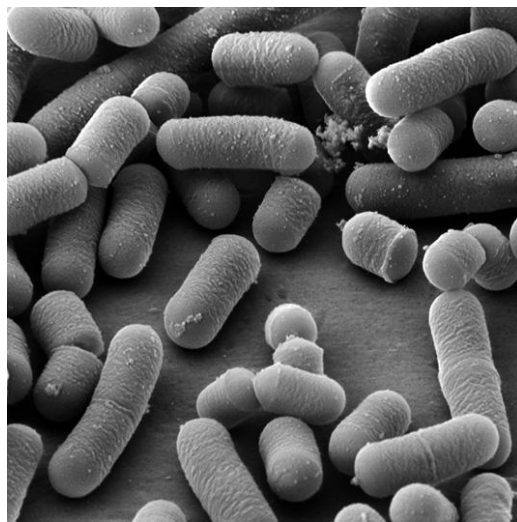
Kmen: *Firmicutes*

Třída: *Bacilli*

Řád: *Lactobacillales*

Čeleď: *Lactobacillaceae*

Rod: *Lactobacillus*



Obrázek 3: *Lactobacillus plantarum* (REM galerie)

#### 3.3 Výskyt a význam

V přírodě jsou laktobacily všudypřítomné s výjimkou extrémních podmínek. Nacházejí se na rostlinách a rostlinných materiálech, v mléce, masných výrobcích, v ovocných šťávách i kvašených nápojích, v obilí a obilných výrobcích. Kvůli jejich přítomnosti v gastrointestinálním traktu lidí a zvířat jsou řazeny mezi probiotické bakterie. *L. acidophilus* má příznivý účinek

na činnost trávicího traktu, používá se při výrobě acidofilního mléka nebo farmaceutických preparátů pro obnovení normálního složení střevní mikroflóry po aplikaci antibiotik (např. *L. acidophilus* a *L. casei*). Používají se pro výrobu fermentovaných potravin, ale mohou způsobovat i kažení fermentovaných i nefermentovaných potravin (Hutkins, 2006).

Laktobacily mají i významnou úlohu při nakládání a zrání masa v láku a při fermentaci tepelně neupravených uzenin. Spolu se streptokoky, pediokoky, mikrokoky a specifickými stafylokoky jsou součástí starterů v masných kulturách. Zrající syrové uzeniny obsahují *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. alimentarius* a další. Na marinovaných rybách mohou tvořit dekarboxylaci aminokyselin histamin a další biogenní aminy (Hutkins, 2006).

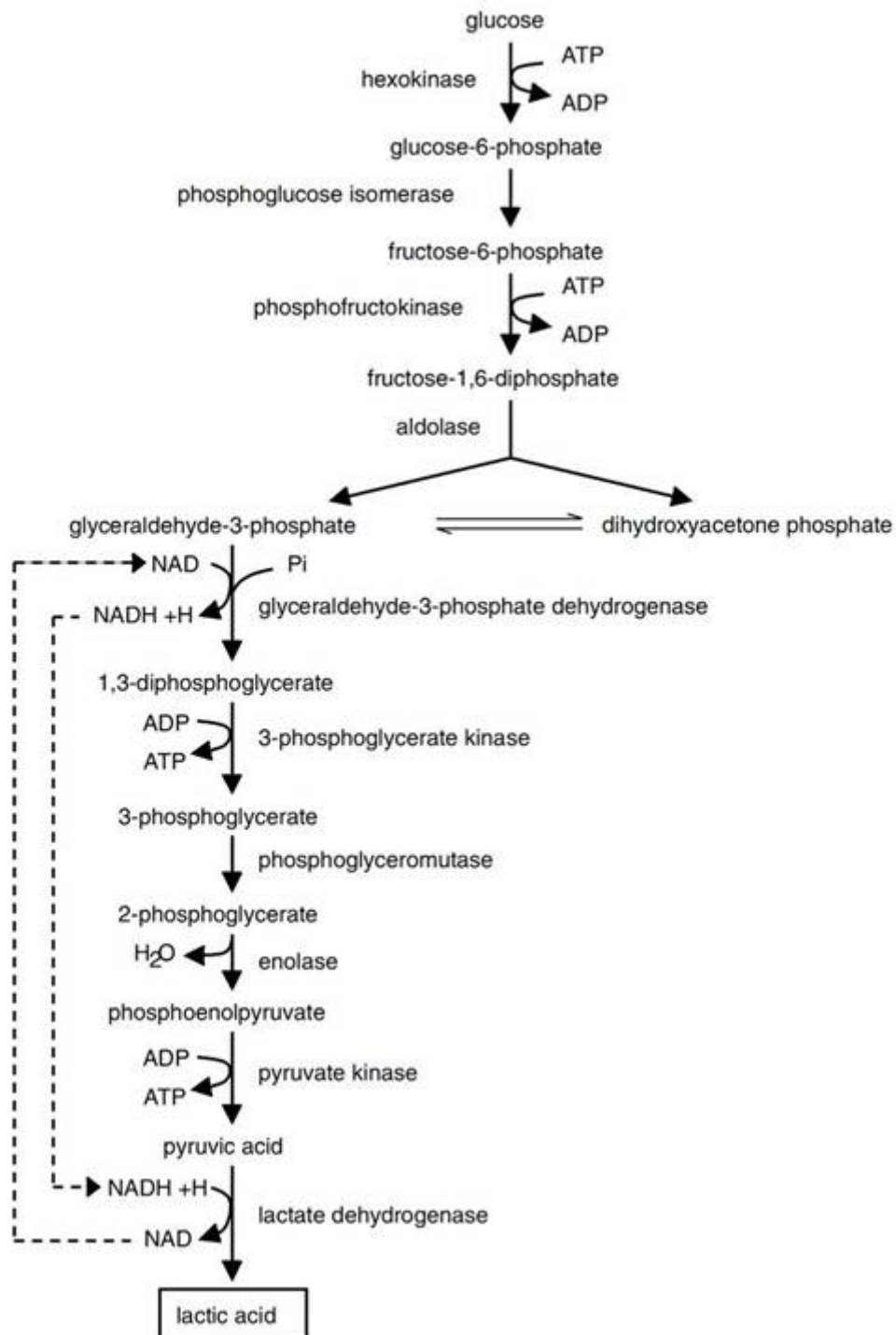
Ve velkém množství se používají při výrobě rostlinných fermentovaných produktů – kvašeného zelí a okurek, kvašené zeleninové směsi, siláží, piva, vína, ovocných šťáv (*L. plantarum*, *L. brevis*, *L. sake*, *L. fermentum*, *L. curvatus*). Při kažení piva se uplatňuje *L. brevis*. V mlékárenství se používají dva hlavní druhy jako startovací kultury (*L. helveticus* a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) (Hutkins, 2006; Šilhánková, 2008).

### 3.4 Metabolismus

Hlavním metabolitem fermentace sacharidů je kyselina mléčná, ale také kyselina octová, etanol a oxid uhličitý. Některé kmeny vykazují slabou lipolytickou aktivitu a některé druhy mohou produkovat bakteriociny.

Laktobacily se dělí do 3 tříd (Hutkins, 2006; Salminen a kol., 2004):

- 1) Obligátně homofermentativní
  - hexózy jsou metabolizovány prostřednictvím Embden-Meyerhoffovy dráhy viz obrázek 4, pentózy nezvašují
  - více než 90 % substrátu je přeměněno na laktát
  - *Lactobacillus helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*



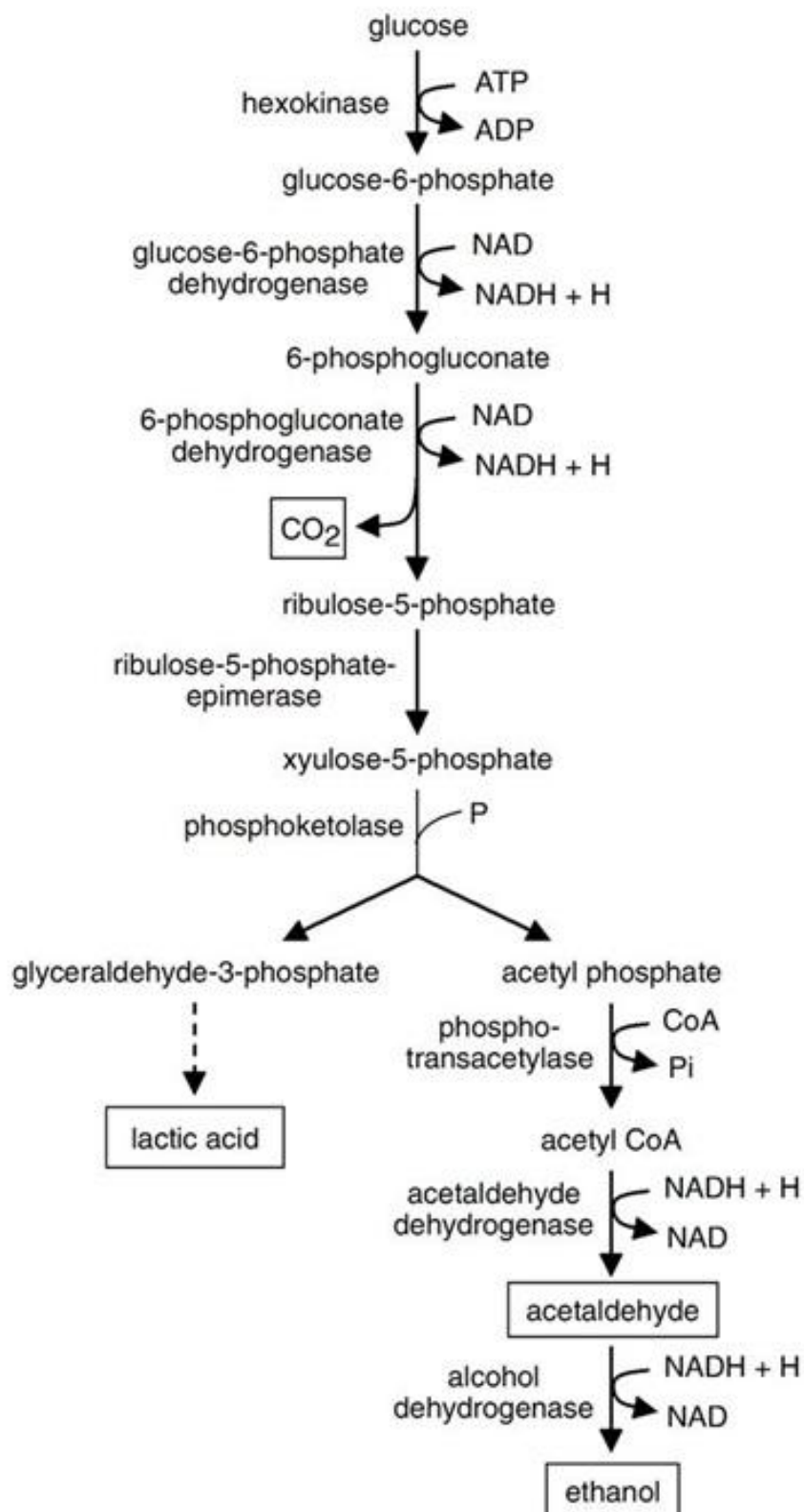
Obrázek 4: EMP dráha využívaná homofermentativními bakteriemi mléčného kvašení (Hutkins, 2006)

## 2) Fakultativně heterofermentativní

- metabolismus sacharidů probíhá prostřednictvím obou drah, EMP dráhou jsou metabolizovány hexózy a fosfoketolázovou dráhou pentózy
- *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*

## 3) Obligátně heterofermentativní

- hexózy i pentózy jsou metabolizovány prostřednictvím fosfoketolázové dráhy viz obrázek 5
- přítomnost fosfoketoláz a absence aldoláz
- vzniká přibližně ekvimolární množství laktátu, acetátu, etanolu a CO<sub>2</sub>
- *Lactobacillus sanfranciscencis*, *Lactobacillus buchneri*



Obrázek 5: Fosfoketolázová dráha využívaná heterofermentativními bakteriemi mléčného kvašení (Hutkins, 2006)

### 3.5 *Lactobacillus brevis*

*Lactobacillus brevis* je druh bakterií mléčného kvašení, z nichž jsou všechny gram-pozitivní, nesporulující, mikroaerofilní mikroorganismy, jejichž hlavní metabolická dráha zahrnuje fermentaci hexózu za vzniku kyseliny mléčné. *Lactobacillus brevis* je obligátně heterofermentativní bakterie, přeměňuje hexózu na kyselinu mléčnou, CO<sub>2</sub> a etanol nebo kyselinu octovou v ekvimolárním množství.

Buňky mají tvar tyčinek se zaoblenými

konci, většinou krátké a rovné. Význam všech bakterií mléčného kvašení v průběhu historie až do dnešního dne spočívá v jejich metabolismu, který se používá pro konzervování potravin a nápojů. Spolu s dalšími bakteriemi produkujícími kyselinu mléčnou hraje *L. brevis* zásadní roli při fermentaci některých potravin jako je zelí a okurky a je také nejčastější příčinou kažení piva. *L. brevis* je možno izolovat například z kimchi (Robinson a kol., 2000; Magonova, 2011).

*Lactobacillus brevis* se vyskytuje převážně v potravinách. V přírodě je možné nalézt jej na mléčných farmách v syrovém mléce a výkalech skotu. Jen zřídka jej lze najít v symbiotickém vztahu s eukaryotními mikroorganismy. Většinou se nachází v různých potravinách s ostatními bakteriemi mléčného kvašení. *L. brevis* se řadí mezi probiotika a zlepšuje imunitní systém (Robinson a kol., 2000; Magonova, 2011).

#### 3.5.1 Význam a použití v potravinářství

*L. brevis* se konkrétně používá v průmyslové výrobě jako startovací kultura. Může být izolován z různých prostředí a často se používá při fermentaci siláží a při výrobě různých druhů pív. V nápojích získaných alkoholovým kvašením mohou laktobacily přispět ke kvalitě výrobku, ale mohou také naopak způsobit jeho znehodnocení (Robinson a kol., 2000).

Některé kmeny *L. brevis* jsou odolné proti hořkým látkám, jako je např. isohumulon a jsou schopny růst v pivu. Jejich růst ovlivňuje zákal, chuť a vůni piva. Kmeny *L. brevis* podílející se na kvašení vína mohou produkovat biogenní aminy (Joint Genome Institution).



Obrázek 6: *Lactobacillus brevis* v elektronovém mikroskopu (Corkins, 2006)

## 4 METODY STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ

Pro stanovení biogenních aminů se běžně používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), kapilární elektroforéza (CE) a plynová chromatografie (GC). Tyto metody používají především spektrofotometrickou nebo fluorometrickou detekci nebo se používají společně s hmotnostní spektrometrií (MS) (Anli a kol., 2008).

Další možností stanovení BA je využití rychlých, přímočarých a miniaturizovaných analytických metod jako jsou imunoenzymatické metody a polymerázová řetězová reakce (PCR) (Anli a kol., 2008).

Vzhledem k zásaditému charakteru se pro jejich extrakci používá kyselina chloristá nebo trichloroctová (Kohajdová, 2001).

### 4.1 Chromatografické metody

Chromatografie je metoda založená na separaci složek obsažených ve vzorku. Vzorek se vnaší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze – stacionární a mobilní. Stacionární fáze je nepohyblivá a mobilní pohyblivá (Klouda, 2003).

Podle polaritě obou fází je možné dělit kapalinovou chromatografii na:

- normální fázi - stacionární fáze je polárnější než mobilní,
- reverzní fázi - stacionární fáze je méně polární.

Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek unášen a jednotlivé složky vzorku se mohou zachycovat na stacionární fázi a zdržují se v ní. Více se zdržují ty, které jsou poutány silněji a tímto dochází k separaci. Na konci kolony je umístěn detektor, který postupně detekuje jednotlivé složky v čase, kdy opouští kolonu (Klouda, 2003).

#### 4.1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

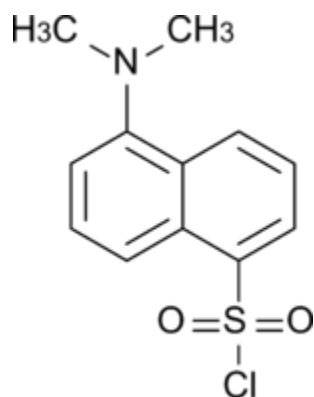
V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina a o separaci složek rozhodují nejen jejich interakce se stacionární fází, ale velmi výrazně i použitá mobilní fáze. Čas složky strávený v jedné nebo v druhé fázi závisí na afinitě analytu ke každé z nich (Klouda, 2003).

Mezi výhody HPLC patří zejména široká oblast použitelnosti. Lze analyzovat ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární (Štulík, 2004).

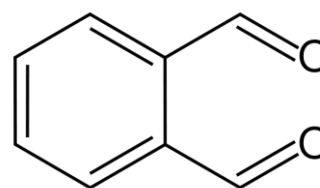


V kapalinové chromatografii je při adsorpci z roztoků povrch adsorbentu obsazen vrstvou molekul mobilní fáze a molekuly analytu s nimi soutěží o aktivní místa na povrchu adsorbentu. Adsorpční rovnováhu lze proto ovlivnit složením mobilní fáze. Nejběžnějším adsorbentem je silikagel. Je dostupný s různě velkými částicemi (Štulík, 2004).

Biogenní aminy nelze stanovit přímo v UV/VIS oblasti ani fluorimetricky, protože neobsahují chromofor nebo fluorofor. Z tohoto důvodu se využívá pre-kolonové nebo post-kolonové derivatizace. Nejčastější derivatizační činidla pro pre-kolonovou derivatizaci jsou danzylchlorid, benzoylchlorid, isotiokyanát, fluorescein nebo dabzylchlorid a pro post-kolonovou derivatizaci ninhydrin, *o*-ftalaldehyd (OPA) v prostředí 2-merkaptoetanolu (Kohajdová, 2001). K detekci se nejvíce používají fluorescenční, UV a elektrochemické detektory (EFSA, 2011).



Obrázek 8: Danzylchlorid



Obrázek 7: *o*-ftalaldehyd

Další možností stanovení biogenních aminů je ultraúčinná kapalinová chromatografie (UPLC). Tato varianta kapalinové chromatografie je účinnější než standardní HPLC díky vyššímu tlaku (až 100 MPa). Separace je mnohem rychlejší a efektivnější a doba se zkracuje z 20 až 30 minut na cca 6 minut (Dadáková, 2009).

#### 4.1.2 Plynová chromatografie (GC)

V případě plynové chromatografie je mobilní fází nosný plyn. Vzorek se musí nejprve převést na plyn. V koloně se složky vzorku oddělují na základě adsorpce a rozpouštění, přičemž se předpokládá, že toto rozdělení je rovnovážné. Signál z detektoru se vyhodnotí na konci kolony a z časového průběhu intenzity signálu se určí druh a kvantitativní zastoupení složek (Klouda, 2003; Štulík, 2004). Jako detektory v plynové chromatografii se používají např. (Štulík, 2004):

- Detektor tepelné vodivosti (TCD) – měřící změny tepelné vodivosti mobilní fáze způsobené přítomností eluované látky
- Detektor elektronového záchytu (ECD) – využívá schopnost eluovaných látek vytvořit negativní ion zachycením nízkoenergetického elektronu
- Plamenově ionizační detektor (FID) – měří se změny ionizačního proudu vodíko-vzduchového plamene způsobené přítomností eluovaného analytu
- Plamenově fotometrický detektor (FPD) – měří intenzitu emise heteroatomů přítomných v molekule analytu
- Hmotnostně spektrometrický detektor (MS) – nejčastěji využívaný detektor v kombinaci s plynovou chromatografií pro stanovení biogenních aminů

Kolony při analýze jsou buď kapilární, nebo náplňové. Separace na náplňových kolonách nedává uspokojivé výsledky z důvodu nepravidelných píků. Kapilární kolony se používají v kombinaci hmotnostním detektorem. Tato varianta se vyznačuje vysokou citlivostí a selektivitou, avšak zařízení jsou značně nákladné (Kohajdová, 2001).

Almeida a kol. (2012) použili ke stanovení biogenních aminů v pivech plynovou chromatografií v kombinaci s hmotnostním detektorem (GC – MS). Jako derivatizační činidlo byl použit izobutyl chloroformát (IBCF), acetonitril jako rozpouštědlo a toluen jako extrakční činidlo. Plynová chromatografie s hmotnostním detektorem byla použita u více studií zabývajících se stanovením biogenních aminů (Fernandez, 2001; Hong, 2013).

#### 4.1.3 Iontově-výměnná chromatografie (IEC)

Stacionární fází v iontově-výměnné chromatografii je měnič iontů. Měnič iontů je makromolekulární matrice s vhodnými funkčními skupinami kyselého nebo zásaditého charakteru. Každá funkční skupina je pevně vázaným iontem, na který je iontovou vazbou připojen protiion s opačným nábojem. Ten je vyměňován iontem obsaženým v mobilní fázi (Štulík, 2004; Klouda, 2003).

Podstatou iontové výměny jsou elektrostatické interakce, při nichž rozhodující úlohu má velikost a náboj iontu, jeho koncentrace, relativní permitivita prostředí, iontová síla, disociační konstanta ionogenních skupin měniče a analytu, a tím i pH mobilní fáze. Kromě toho se uplatňuje i difúze měničem iontů, mohou se uplatňovat i adsorpční síly, případně i hydro-

fobní interakce. Jako mobilní fáze se používají vhodné tlumivé roztoky, jejichž ionty (protiionty) jsou v dynamické rovnováze s ionty měniče (Štulík, 2004).

Iontoměniče mohou být:

- Anexy – mají zásadité funkční skupiny, které slouží k výměně aniontů (aminoskupiny, kvartérní amoniové báze)
  - Aminoskupina – slabý měnič aniontů ( $-\text{NH}_2$ )
  - Tetraalkylamoniová skupina – silný měnič aniontů ( $-\text{N}^+(\text{R})_3$ )
- Katexy – mají kyselé funkční skupiny sloužící k výměně kationtů (sulfoskupiny, karboxylové skupiny)
  - Karboxylová skupina - slabý měnič kationtů ( $-\text{COOH}$ )
  - Sulfoskupina – silný měnič kationtů ( $-\text{SO}_3\text{H}$ )

Iontově-výměnná chromatografie je oblíbená metoda pro separaci léčiv, nukleových kyselin, aminokyselin, biogenních aminů, atd. (Štulík, 2004).

Metoda iontově-výměnné chromatografie s konduktometrickou detekcí byla vyvinuta pro stanovení čtyř biogenních aminů v rybách (putrescin, kadaverin, histamin a spermidin) (Cinquina a kol., 2004).

Saccani a kol. (2005) použili při analýze biogenních aminů v čerstvém a zpracovaném mase iontově-výměnnou chromatografii s hmotnostní detekcí. Kolona obsahovala karboxylové funkční skupiny (slabý měnič kationtů) a jako eluent byla použita kyselina metansulfonová (MSA). Pomocí jednostupňového kvadrupólového detektoru byla provedena detekce.

Další varianta je analýza biogenních aminů na analyzátoru aminokyselin (AAA 400) s iontoměničovou kolonou, post-kolonovou derivatizací ninhydrinem a spektrofotometrickou detekcí při vlnové délce 570 nm. (Csomós a kol., 2002, Rabie a kol., 2011).

## 4.2 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) je metoda založená na elektroforetické migraci iontů v elektrickém poli. Kapilára je naplněna základním elektrolytem, který vede proud a její konce jsou ponořeny do zásobníků s elektrolytem a elektrodami. Ionty se rozdělí podle své pohyblivosti v elektrickém poli a jsou zachyceny detektorem (Klouda, 2003; Štulík, 2004).

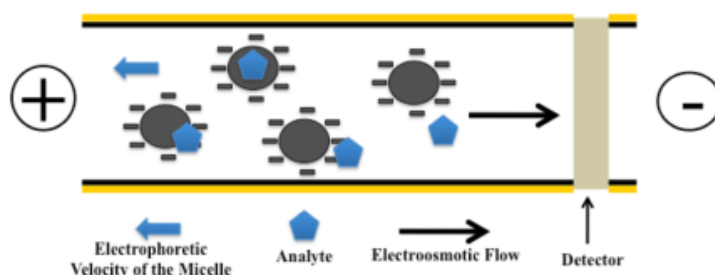
Detekce biogenních aminů při kapilární zónové elektroforéze se provádí amperometricky, konduktometricky, bezkontaktní konduktometrií, elektrochemiluminiscencí, chemoluminiscencí, nebo hmotnostními detektory (Li a kol., 2014, Chiu a kol., 2006). Nepřímá UV-VIS absorpční detekce a nepřímá LIF detekce jsou dvě nejběžnější nepřímé metody detekce v CE (Chiu a kol., 2006).

Kapilární elektromigrační metody vynikají především malou spotřebou vzorku a činidel potřebných k separaci, velkou účinností separace, velkou rychlostí analýzy a krátkou dobou potřebnou na optimalizaci separačních podmínek. Nevýhodou je menší reprodukovatelnost a trochu nižší citlivost (Štulík, 2004).

Kapilární elektroforéza se často používá pro stanovení biogenních aminů v rybách (Kohajdová, 2001). Některé z těchto metod lze použít pro separaci iontů (kapilární zónová elektroforéza - CZE) nebo pro neutrální molekuly i ionty (micelární elektrokinetická chromatografie - MEKC) (Štulík, 2004).

Separace biogenních aminů pomocí CZE bývá někdy neúspěšná, a to zejména proto, že biogenní aminy mají nízkou hydrofilitu, podobné hodnoty disociačních konstant ( $K_a$ ) a sklon k adsorpci na stěnu kapiláry. Proto se spíše používá metoda MEKC (Chiu a kol., 2006).

Micelární elektrokinetická chromatografie se používá pro stanovení nenabitých i nabitých sloučenin. Jako povrchově aktivní látka pro tvorbu micel se používá dodecylsírán sodný (SDS) (Bedia Erim a kol., 2013). Micely mohou mít hydrofilní nebo hydrofobní dutinu (Klouda, 2003).

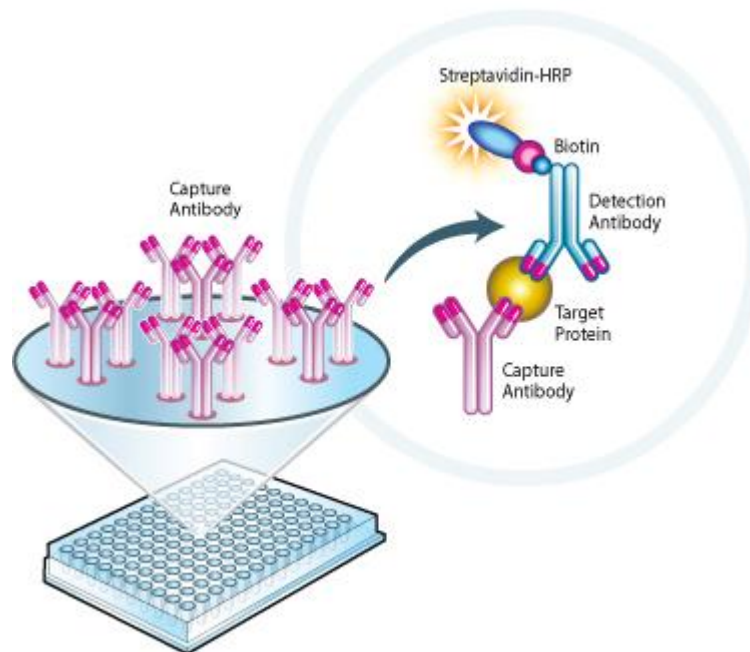


Obrázek 9: Princip micelární elektrokinetické chromatografie (Rizvi a kol., 2011)

Pro kvantitativní stanovení biogenních aminů byla navržena metoda MEKC v kombinaci s laserově indukovanou fluorescenční detekcí (LIF) (Bedia Erim a kol., 2013).

### 4.3 Další metody

K dalším metodám patří například imunoenzymatické metody, tzv. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) (Obrázek 10). Principem metody je imunochemická reakce antigenu s protilátkou. Tyto metody jsou kvalitativní a v praxi se používají ke stanovení histaminu. Detekce se provádí vizuálně srovnáním s referenční barevnou škálou (McMeeken, 2003).



Obrázek 10: Sendvičová ELISA (MitoSciences)

Metoda PCR slouží pro rychlý skrining bakterií produkujících biogenní aminy. Touto metodou polymerázové řetězové reakce lze pomocí specifických primerů identifikovat sekvenci genů pro dekarboxylázy mikroorganismů (např. tyrozindekarboxylázy, histidindekarboxylázy) (Buňková, 2010).

Při stanovení biogenních aminů elektrochemickými biosenzory se využívají enzymy aminooxidázy, které jsou imobilizované do polymerních membrán. Působením těchto enzymů na biogenní aminy dochází k produkci peroxidu vodíku, který je potom možný stanovit. Vznikající peroxid vodíku se detekuje platinovou elektrodou a argentochloridová elektroda je použita jako porovnávací (Kohajdová, 2001).

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo zmapování kinetiky biogenních aminů u kmene *Lactobacillus brevis* 10185-3 při různých podmínkách kultivace a s různými faktory:

- vliv NaCl v koncentracích 0; 1,0; 2,0 % (w/v)
- vliv laktózy v koncentracích 0; 0,25; 0,50; 1,00 % (w/v)
- vliv pH – 5; 6; 7
- vliv teploty – 10 °C a 37 °C

Tato produkce biogenních aminů byla sledována v podmínkách *in vitro* a v mléce.

Biogenní aminy byly stanoveny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s pre-kolonovou derivatizací danzylchloridem a UV/VIS detekcí.

Na základě získaných výsledků z měření byly zformulovány závěry, které popisují tvorbu biogenních aminů za sledovaných podmínek.



## 6 MATERIÁL A METODIKA

### 6.1 Bakteriální kultura

V experimentální části byl použit kmen *Lactobacillus brevis* 10185-3 (izolát ze sýrů holandského typu získaného z Výzkumného ústavu mlékárenského, pobočky v Táboře).

### 6.2 Příprava kultury

Kultura narostlá na Petriho misce byla nejprve pomnožena v modifikovaném MRS bujónu. Do zkumavek po 7 ml bujónu bylo naočkováno 100  $\mu$ l inokula. Naočkovaný bujón byl kultivován při 37 °C 48 hodin. Následně bylo 250  $\mu$ l z kultivovaného bujónu naočkováno do 7 ml čerstvého bujónu a následně kultivováno při 37 °C 48 hodin. Takto pomnoženou kulturou byly v objemu 50  $\mu$ l naočkovány všechny zkumavky, které byly použity v níže uvedených experimentech.

### 6.3 Kultivační média

Veškeré použité chemikálie a složky živných půd byly od výrobce Sigma-Aldrich, Merck a Lach-Ner

#### *Modifikovaný MRS bujón*

Dekarboxylázová aktivita byla u *Lactobacillus brevis* 10185-3 zjišťována pomocí kultivace v tekuté živné půdě MRS, která obsahovala 4 aminokyseliny (lyzin, tyrozin, ornitin, arginin) jako prekurzory příslušných biogenních aminů. Tyto aminokyseliny byly přidány v koncentraci 0,3 % (w/v) (každá aminokyselina). Složení použitého MRS bujónu je uvedeno v tabulce 5. Následně bylo provedeno 36 kombinací složení média: byl přidán chlorid sodný (0; 1,0 a 2,0 % (w/v)), laktóza (0; 0,25; 0,50 a 1,00 % (w/v)) a upraveno pH (5; 6 a 7).

Po úpravě byl bujón rozpipetován do zkumavek po 5 ml a sterilován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut a uložen v chladničce. Celkový počet analyzovaných vzorků (zkumavek) s upraveným bujónem byl 2016.

Tabulka 5: Složení kultivačního média MRS

| Složka                         | Množství [g/l] |
|--------------------------------|----------------|
| Pepton                         | 10,00          |
| Beef extrakt                   | 10,00          |
| Yeast extrakt                  | 5,00           |
| Tween 80                       | 1,00           |
| Hydrogencitronan amonný        | 2,00           |
| Octan sodný                    | 5,00           |
| Síran hořečnatý                | 0,10           |
| Síran manganatý                | 0,05           |
| Hydrogenfosforečnan didraselný | 2,00           |
| Arginin                        | 3,00           |
| Ornitin                        | 3,00           |
| Tyrozín                        | 3,00           |
| Lyzin                          | 3,00           |

***MRS agar***

Pro stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM) v mléce byl použit MRS agar. Jeho složení je uvedeno v tabulce 6. Připravená živná půda byla sterilována při 121 °C po dobu 15 minut a rozlita do Petriho misek.

Tabulka 6: Složení kultivačního média MRS agar

| Složka    | Množství [g/l] |
|-----------|----------------|
| MRS Broth | 52,2           |
| Agar      | 15,0           |

Z celkového počtu mikroorganismů v jednotlivých ředěních byly vytvořeny růstové křivky.

***Fyziologický roztok***

Fyziologický roztok byl připraven pro desítkové ředění zaočkovaného mléka po kultivaci. Na přípravu byl použit chlorid sodný v množství 0,9 g/l. Připravený roztok byl sterilován při 121 °C po dobu 15 minut.

### *Mléko*

Na přípravu 1000 ml mléka bylo potřeba 50,0 g sušeného odstředěného mléka (Moravia Lacto a.s., Jihlava, Česká republika). Do připraveného mléka byly přidány v koncentraci 0,3 % (w/v) 4 aminokyseliny (lyzin, tyrozin, ornitin, arginin) jako prekurzory příslušných biogenních aminů. Následně bylo provedeno 9 kombinací média: byl přidán chlorid sodný (0; 1,0 a 2,0 % (w/v)) a upraveno pH (5; 6 a 7).

Po úpravě bylo mléko rozpipetováno do zkumavek po 5 ml a sterilováno v autoklávu při 110 °C po dobu 10 minut a uloženo v chladničce. Celkový počet analyzovaných vzorků (zkumavek) s upraveným mlékem byl 440.

## **6.4 Teploty kultivace a odběrový čas**

Všechny kombinace médií (MRS broth i mléko) se zaočkovanou kulturou byly kultivovány při teplotě 37 °C a 10 °C. Při teplotě 37 °C byly vzorky odebírány po 2; 4; 6; 8; 10; 12; 24 a 48 hodinách a při teplotě 10 °C byly odebírány po 1; 2; 3; 6; 8; 10; 13 a 15 dnech.

## **6.5 Měření optické hustoty buněk, CPM a pH**

Pro stanovení růstové křivky bakterií v bujónu bylo z kultivovaných zkumavek odpipetováno 200 µl do příslušné jamky mikrotitrační destičky a byla změřena optická hustota při vlnové délce 655 nm na přístroji Benchmark.

U mléka byla pro tvorbu růstových křivek testovaného kmene použita plotnová metoda stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM) na živné půdě MRS agar. Živná půda byla kultivována při 37 °C po dobu 48 hodin.

Po kultivaci a odstředění vzorků byly v supernatantu měřeny změny pH.

## **6.6 Příprava vzorků pro derivatizaci**

MRS bujón po kultivaci testované bakterie byl zcentrifugován při 4500 ot./min po dobu 15 minut. Získaný supernatant byl rozdělen do tří eppendorfkových zkumavek po 750 µl a zředěn v poměru 1:1 (v/v) kyselinou chloristou ( $c = 1,2 \text{ mol/l}$ , Merck).

## 6.7 Derivatizace vzorků

Derivatizace upravených vzorků byla provedena dle návodu dostupného v laboratoři Ústavu technologie potravin:

K upraveným vzorkům bylo přidáno 100  $\mu$ l 1,7-heptadiaminu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) v koncentraci 500 mg/l jako interního standardu. Z této směsi byl odpipetován 1 ml do derivatizační nádoby. Do vzorků v derivatizačních nádobkách bylo přidáno 1,5 ml uhlíčanového pufru s pH 11,0 – 11,1 a 2 ml čerstvě připraveného roztoku danzylchloridu o koncentraci 5 g/l v acetonu (Merck). Derivatizační nádoby byly dobře uzavřeny a dány třepat 20 hodin v temnu. Následně bylo do každého vzorku přidáno 200  $\mu$ l roztoku prolinu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) čímž se zastavila derivatizační reakce. Směs s prolinem se třepala další hodinu. Danzylderiváty byly extrahovány ručním vytřepáním (3 minuty) do 3 ml heptanu (Sigma-Aldrich). Poté byl z derivatizačních nádobek do vialek odpipetován 1 ml heptanové vrstvy a odpařen do sucha při teplotě  $60 \pm 2$  °C pod proudem dusíku. Suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a vzorky se uchovávaly do doby analýzy v mrazicím zařízení při teplotách pod -18 °C.

## 6.8 Vlastní chromatografické stanovení

Před vlastní analýzou byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22  $\mu$ m a nanесeny na kolonu (Zorbax ECLIPSE Plus C18, 50 mm x 3 mm, pórovitost 1,8  $\mu$ m, průtok 0,45 ml/min) s chromatografickým systémem (binární pumpa a autosampler Agilent Technologies 1260 Infinity, USA) s degaserem, s UV/VIS-DAD detektorem ( $\lambda = 254$  nm) a termostatem (Agilent Technologies, USA) a promývány gradientově mobilní fází uvedenou v tabulce 7.

Tabulka 7: Lineární gradientový eluční program HPLC

| čas [min] | 10% acetonitril [%] | 100% acetonitril [%] |
|-----------|---------------------|----------------------|
| 0,0       | 41                  | 59                   |
| 0,1       | 41                  | 59                   |
| 1,9       | 37                  | 63                   |
| 3,5       | 18                  | 82                   |
| 4,0       | 0                   | 100                  |
| 9,5       | 0                   | 100                  |
| 11,5      | 41                  | 59                   |
| 15,5      | 41                  | 59                   |

Výsledky byly hodnoceny pomocí softwaru CLARITY. Byla stanovena produkce tryptaminu, fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu.

## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pomocí kapalinové chromatografie na reverzních fázích byla po kultivaci zjišťována dekarboxylázová aktivita bakterií *Lactobacillus brevis* v médiu obohaceném o příslušné aminokyseliny v koncentraci 0,3 % (w/v). Kmen *Lactobacillus brevis* 10185-3 byl testován na produkci biogenních aminů při vnějších podmínkách, jako je přidavek chloridu sodného v koncentracích 0; 1,0 a 2,0 % (w/v), přidavek laktózy 0; 0,25, 0, 50 a 1,00 % (w/v) a pH 5,0, 6,0 a 7,0 ± 0,2. Tvorba biogenních aminů byla sledována při dvou kultivačních teplotách (37 ± 1 °C a 10 ± 1 °C). Byla měřena i změna pH a optická hustota.

Tento kmen byl testován i v mléce za působení těchto vnějších faktorů: pH 5,0; 6,0 a 7,0 ± 0,2 a koncentrace NaCl 0; 1,0; 2,0 % (w/v). Byla sledována produkce výše uvedených biogenních aminů, změna pH a celkový počet mikroorganismů (CPM).

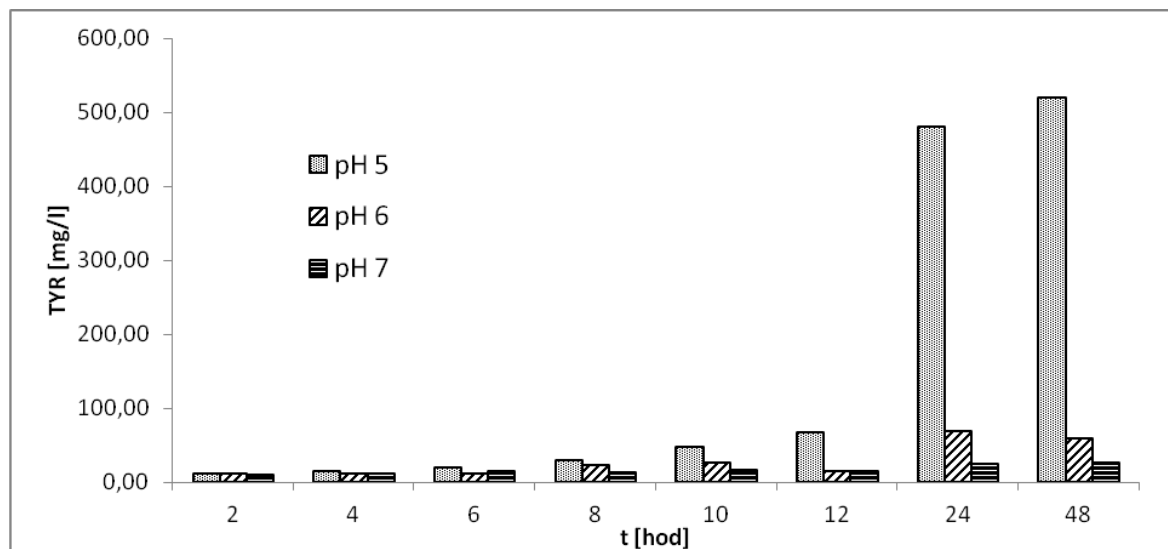
Testovány byly všechny kombinace uvedených faktorů ve třech opakováních. Získané hodnoty produkce biogenních aminů byly zprůměrovány a vyhodnoceny ve formě grafů. Celkem bylo zpracováno 2456 vzorků.

### 7.1 Vliv vnějších faktorů na produkci biogenních aminů u *Lactobacillus brevis* 10185-3 *in vitro* při 37 °C

U sledovaného kmene *Lactobacillus brevis* 10185-3 byla při kultivační teplotě 37 ± 1 °C detekována vyšší dekarboxylázová aktivita než při teplotě 10 ± 1 °C.

#### 7.1.1 Vliv pH

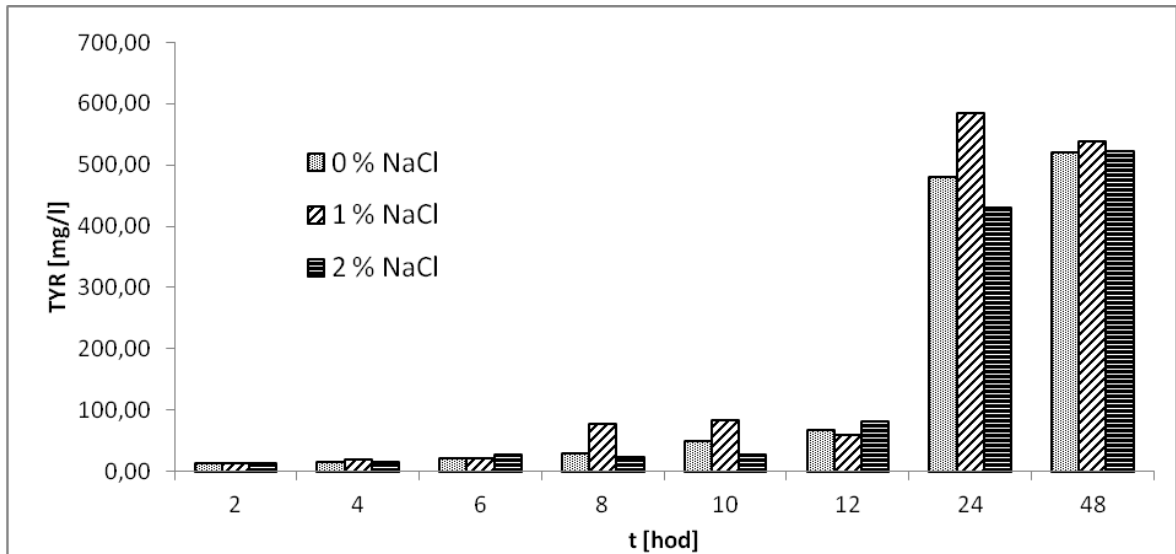
U všech testovaných pH byla vyšší produkce tyraminu (TYR) v podmínkách *in vitro* dosažena při iniciačním pH 5,0 ± 0,2. Tato produkce byla asi 4x vyšší než u pH 6,0 ± 0,2 a 17x vyšší než u pH 7,0 ± 0,2. Vyšší produkce byla zaznamenána až po 24 hodinách kultivace. Nejvíce tyraminu bylo vyprodukováno při iniciačním pH 5,0 ± 0,2 po 48 hodinách kultivace a to (519,0 ± 33,3 mg/l) (Obrázek 11).



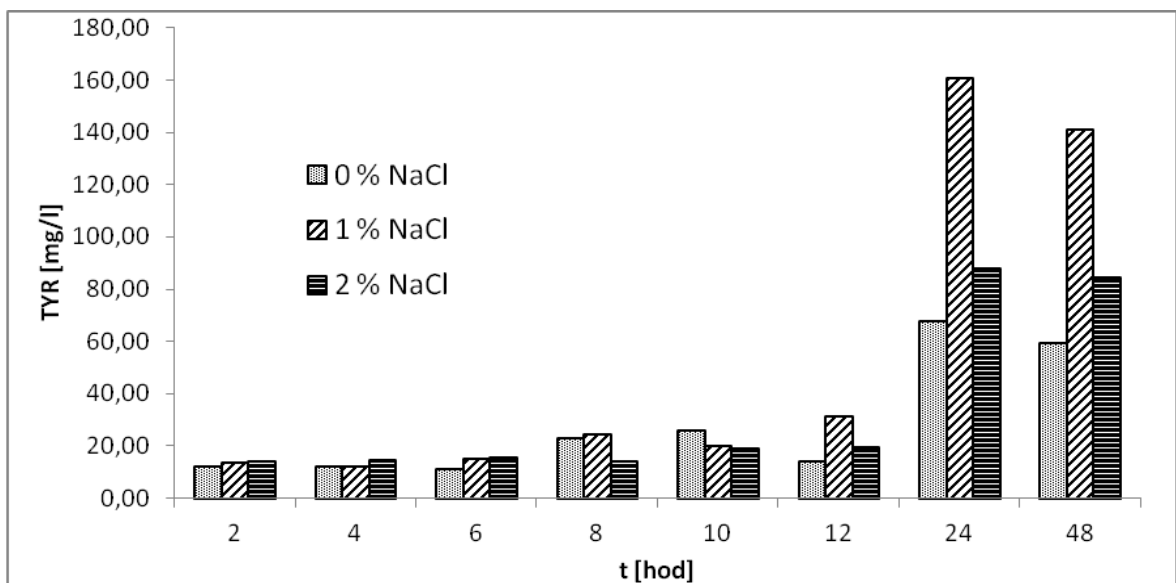
Obrázek 11: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 *in vitro* – vliv pH (37 °C)

### 7.1.2 Vliv NaCl

Sůl může ve vyšších koncentracích potlačovat růst bakterií a produkci biogenních aminů, avšak na produkci tyraminu u testovaného kmene *Lactobacillus brevis* 10185-3 působil pozitivně přídavek 1,0 % (w/v) soli. Během kultivace došlo po 48 hodinách u všech testovaných pH k nejvyšší produkci tyraminu při přídavku 1,0 % (w/v) soli. V kultivačních médiích s iniciačním pH  $5,0 \pm 0,2$  a  $6,0 \pm 0,2$  se produkce tyraminu začala zvyšovat po 6. hodině kultivace, kdy převážně převažující nárůst nastal u již zmíněného přídavku 1,0 % (w/v) NaCl (Obrázek 12 a 13). Kdežto u  $7,0 \pm 0,2$  byla sledována kolísavá produkce a po 12. hodině kultivace se ve vzorcích s 2,0 % (w/v) NaCl produkce zvýšila na hodnotu  $27,2 \pm 2,9$  mg/l a v posledním odběrovém čase klesla na  $21,4 \pm 2,3$  mg/l, zatímco u vzorků s přídavkem 1,0 % (w/v) NaCl se v posledním odběrovém čase zvýšila na  $27,7 \pm 0,8$  mg/l (Obrázek 14).

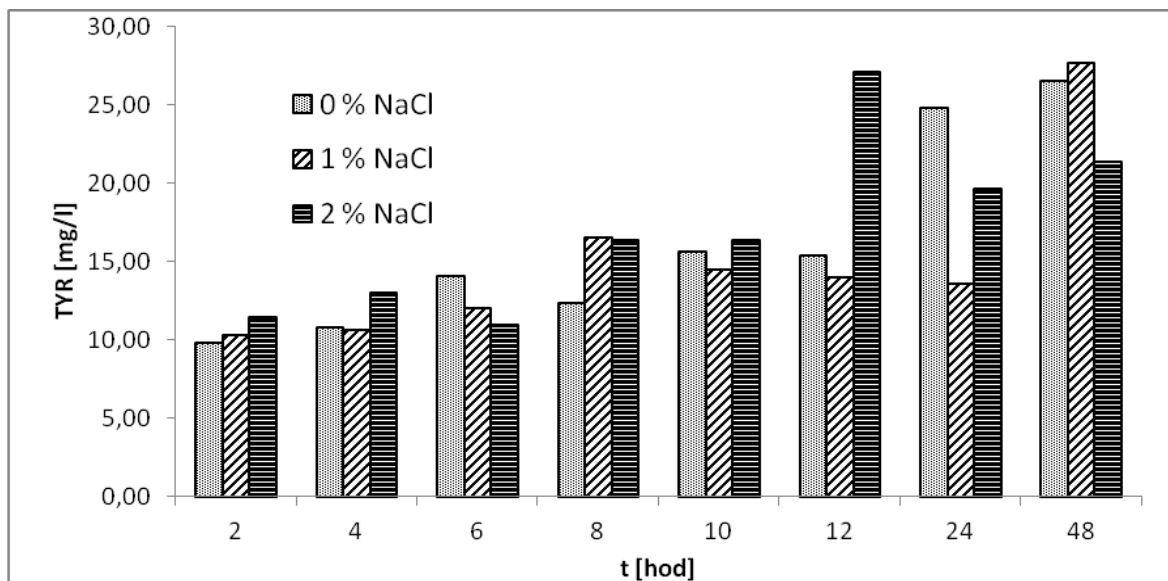


Obrázek 12: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 při iniciačním pH 5,0 (37 °C) s přidavkem různé koncentrace soli.



Obrázek 13: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 při iniciačním pH 6,0 (37 °C) s přidavkem různé koncentrace soli.

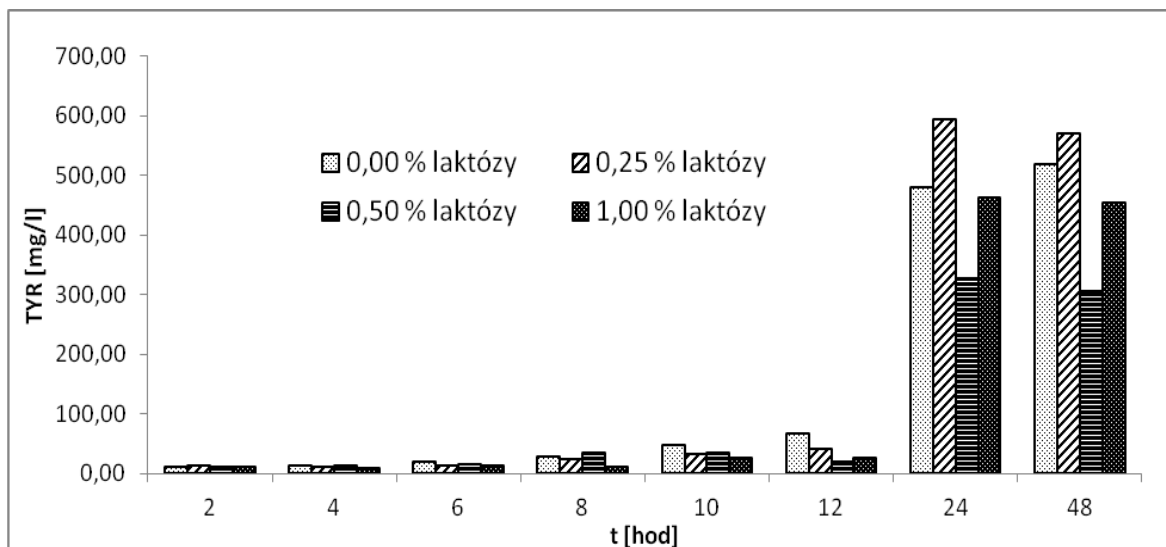




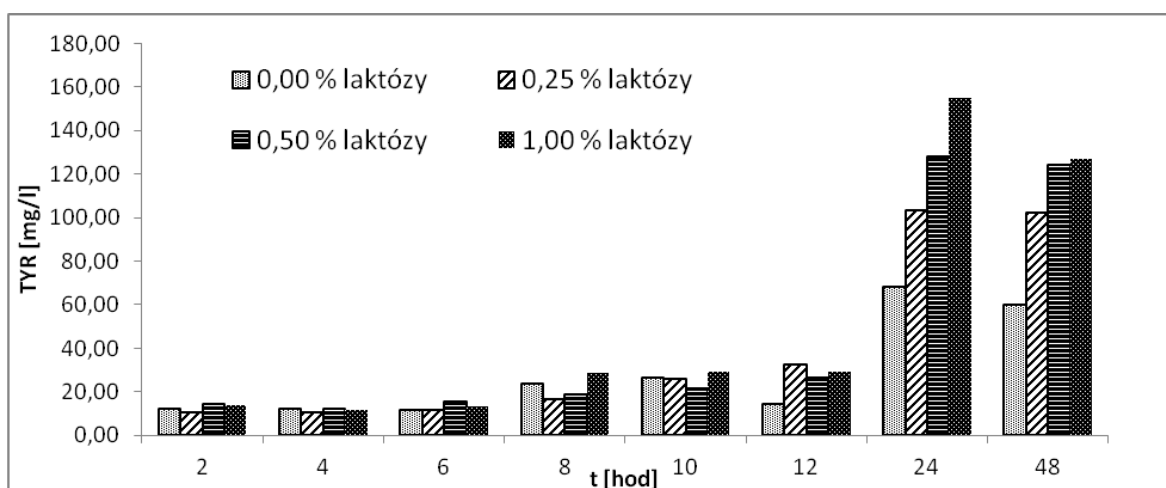
Obrázek 14: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 při iniciačním pH 7,0 (37 °C) s přidavkem různé koncentrace soli.

### 7.1.3 Vliv laktózy

Množství vyprodukovaného tyraminu bylo také ovlivněno různou koncentrací laktózy, kdy největší tvorba byla zaznamenána při iniciačním pH  $5,0 \pm 0,2$  a přidavku 0,25 % (w/v) laktózy ( $594,6 \pm 17,1$  mg/l) a to po 24 hodinách kultivace (Obrázek 15). Při iniciačním pH  $6,0 \pm 0,2$  byla zaznamenána nejvyšší produkce tyraminu při nejvyšší aplikované koncentraci laktózy (1,00 % (w/v)) a naopak nejnižší produkce v kultivačním médiu bez přidavku laktózy (Obrázek 16). Vyššího nárůstu tyraminu bylo dosaženo při pH  $5,0 \pm 0,2$  a pH  $6,0 \pm 0,2$  až po 24 hodinách kultivace. V médiu s iniciačním pH  $7,0 \pm 0,2$  byla dekarboxylační aktivita výrazně slabší než v předchozích dvou případech a vliv laktózy nebyl příliš výrazný. Po 24 a 48 hodinách kultivace byla produkce tyraminu jen mírně vyšší v médiu s přidavkem soli 0,50 a 1,00 % (w/v) laktózy.



Obrázek 15: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 při iniciačním pH 5,0 – vliv laktózy (37 °C)



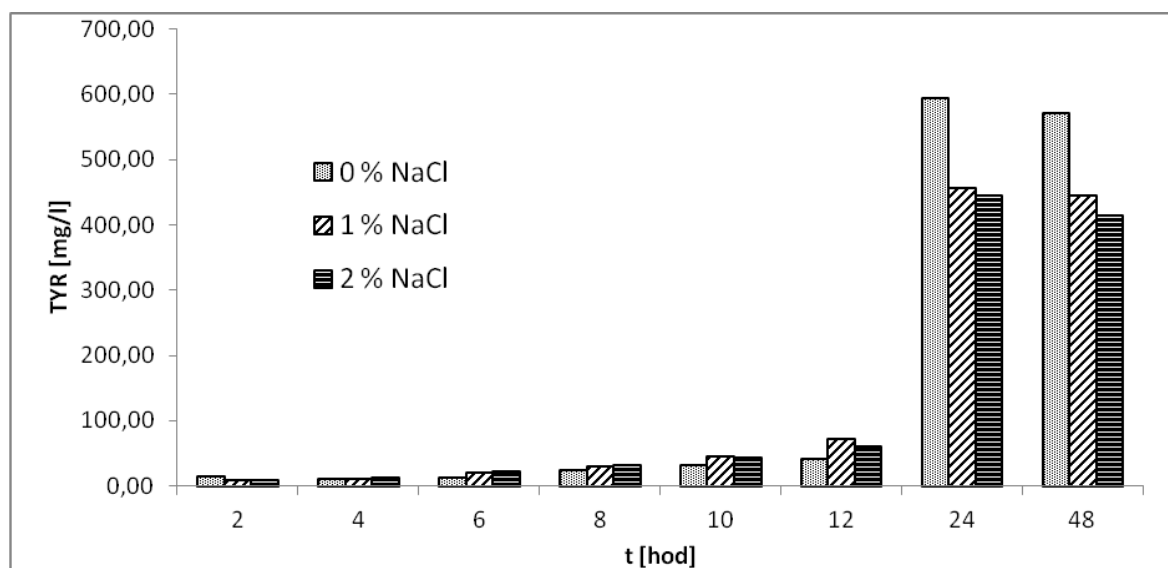
Obrázek 16: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 při iniciačním pH 6,0 – vliv laktózy (37 °C)

#### 7.1.4 Vliv kombinace faktorů

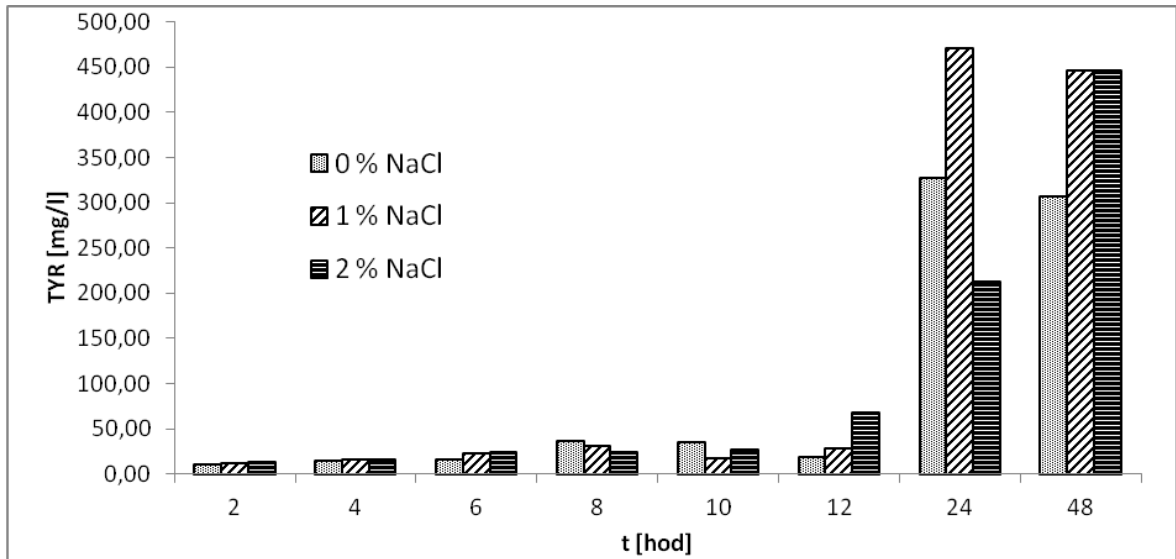
V prostředí s iniciačním pH  $5,0 \pm 0,2$  a přidavkem 0,50 % laktózy (w/v) bylo dosaženo nejvyšší produkce tyraminu ( $470,9 \pm 27,1$  mg/l) po 24 hodinách kultivace, kdy nejvyšší hodnoty byly stanoveny v prostředí s 1,0 % (w/v) chloridu sodného. Za následujících 24 hodin kultivace výrazně vzrostla produkce tyraminu i ve vzorcích s přidavkem 2,0 (w/v) NaCl

a kultivační média s přidavkem chloridu sodného (Obrázek 18). Z obrázku 17 je patrné, že od 12. hodiny kultivace produkce tyraminu výrazně stoupla a tato změna byla nejlépe pozorovatelná v kultivačním médiu bez přidavku NaCl. V tomto médiu s 0,25 % (w/v) laktózy bylo stanoveno při  $37 \pm 1$  °C maximální množství tyraminu ( $594,6 \pm 17,1$  mg/l) u *Lactobacillus brevis* 10185-3.

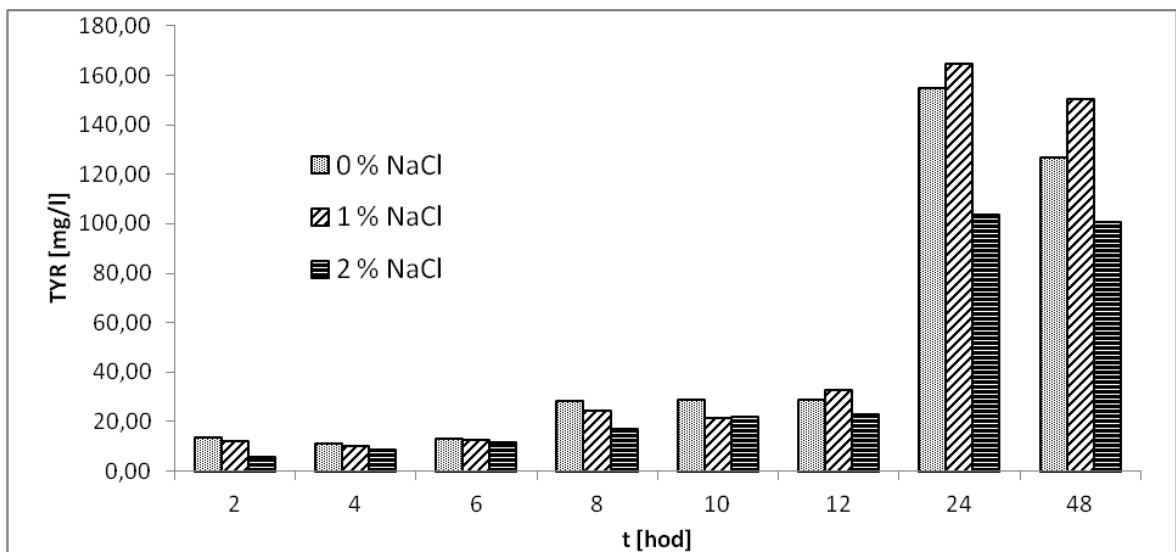
Při iniciačním pH  $6,0 \pm 0,2$  byl patrný vliv NaCl na produkci tyraminu. Bylo zde zjištěno, že největší vliv na produkci měla 1,0% (w/v) použitá koncentrace a to při všech aplikovaných koncentracích laktózy. Naopak nejnižší vliv byl pozorován u přidavku 2,0 % (w/v) chloridu sodného (Obrázek 19).



Obrázek 17: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 při iniciačním pH 5,0 s přidavkem 0,25 % (w/v) laktózy (37 °C)



Obrázek 18: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 při iniciačním pH 5,0 s přidavkem 0,50 % (w/v) laktózy (37 °C)



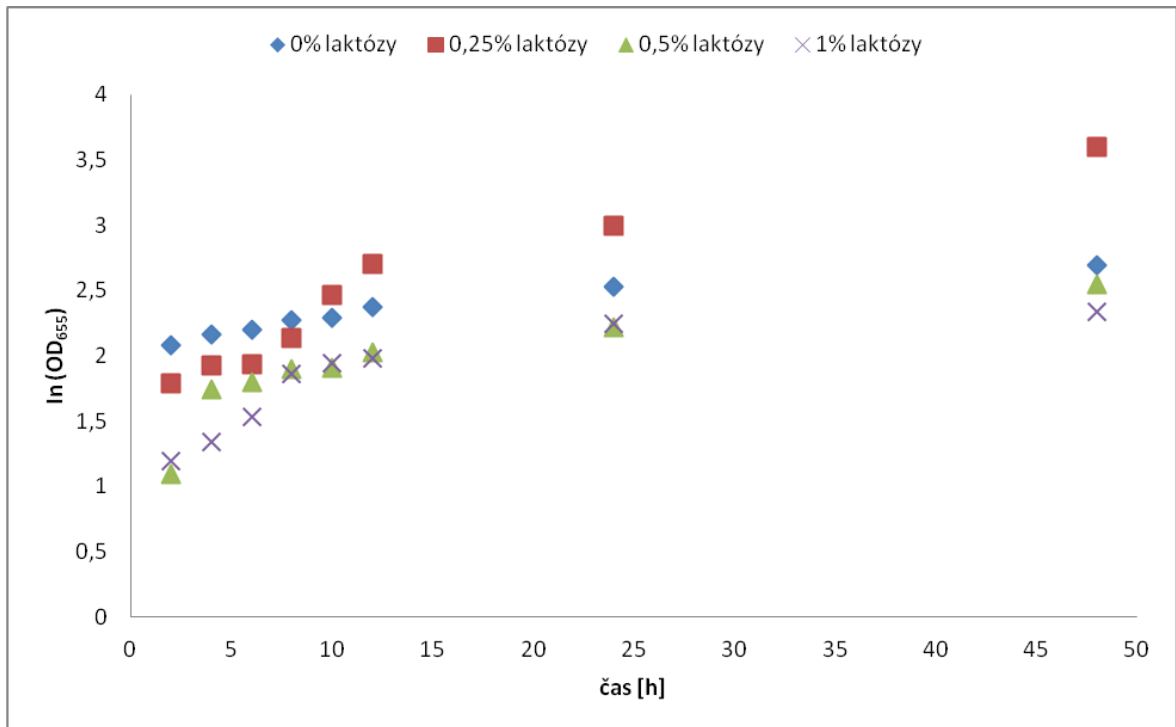
Obrázek 19: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 *in vitro* při iniciačním pH 6,0 s přidavkem 1,00 % (w/v) laktózy (37 °C)

### 7.1.5 Měření nárůstu buněk

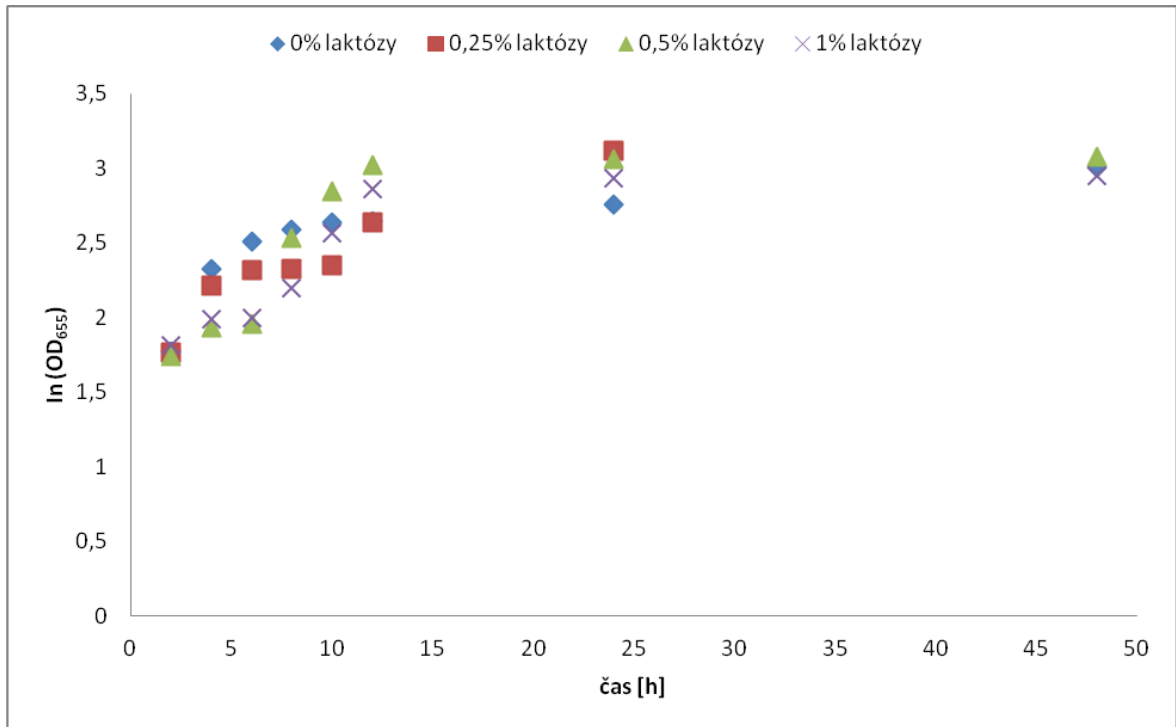
Měřením optické hustoty získané bakteriální biomasy byl zjišťován vliv vybraných faktorů na růst testovaného kmene. V průběhu kultivace byl zaznamenán postupný nárůst bakteriál-

ní biomasy. Největší nárůst při  $37 \pm 1$  °C byl stanoven po kultivaci bakterií v prostředí s přidavkem 0,25 % (w/v) laktózy (Obrázky 20 – 22).

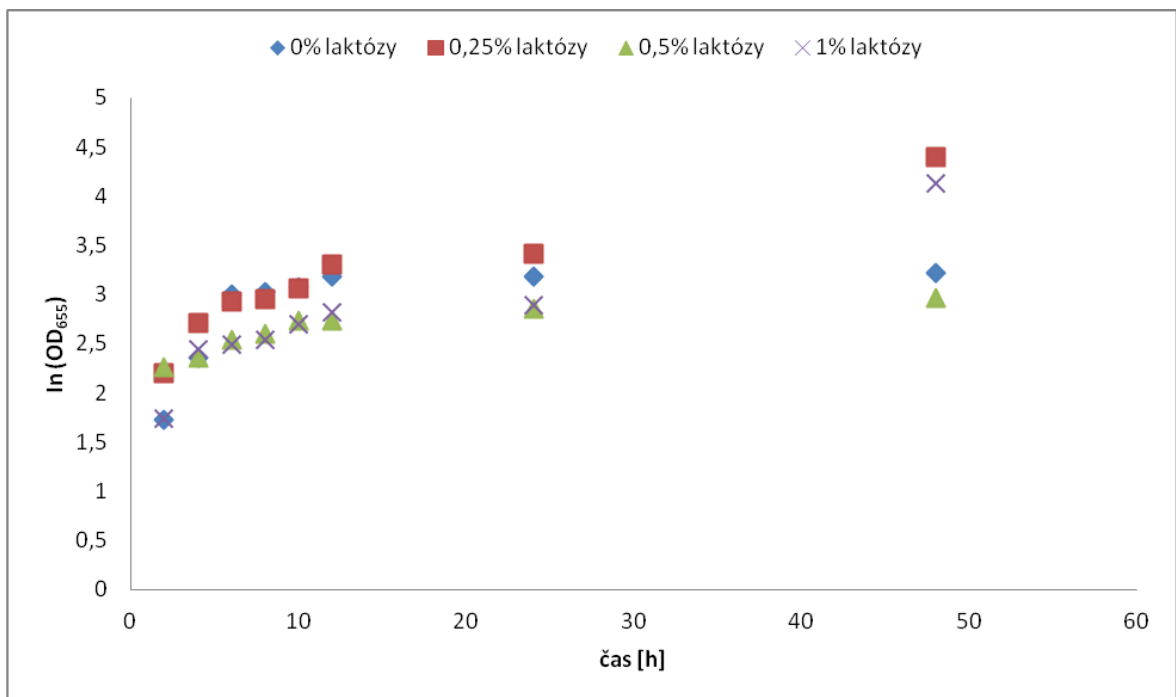
Ze tří testovaných hodnot pH bylo nejvyšších hodnot dosaženo při iniciačním pH  $6,0 \pm 0,2$  v kulturačním médiu s přidavkem 0,25 % (w/v) laktózy a 2,0 % (w/v) NaCl, kde bylo dosaženo hodnoty 4,393. Nejmenších hodnot optické hustoty (2,147 – 2,491) bylo při všech pH dosaženo vždy v médiu bez přidavku soli a s přidavkem 1,00 % (w/v) laktózy.



Obrázek 20: Vliv přidavku laktózy na růst *Lactobacillus brevis* 10185-3 bez přidavku NaCl a pH 6,0 – 37 °C



Obrázek 21: Vliv přidavku laktózy na růst *Lactobacillus brevis* 10185-3 při přidavku 1,0 % (w/v) NaCl a pH 6,0 – 37 °C



Obrázek 22: Vliv přidavku laktózy na růst *Lactobacillus brevis* 10185-3 při přidavku 2,0 % (w/v) NaCl a pH 6,0 – 37 °C

### 7.1.6 Stanovení pH kultivačního média

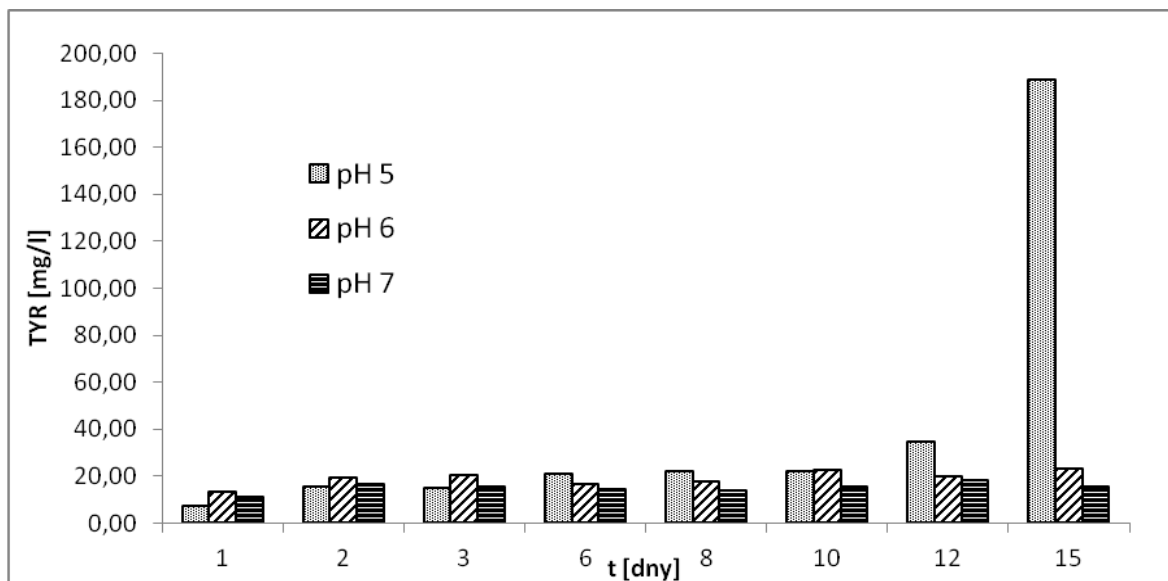
Dalším sledovaným parametrem byly změny pH kultivačních médií po kultivaci testovaného kmene. Během kultivace došlo vlivem pomnožení testovaného kmene k výraznějším změnám pH a to především v nárůstu pH (příloha I).

Nárůst pH při  $37 \pm 1$  °C byl nejvýraznější u pH 5,0 v prostředí bez laktózy a s 0,25 % (w/v) laktózy. Přídavek 0,50 a 1,00 % (w/v) koncentrace laktózy žádnou výraznou změnu nevyvolal, až na výjimku, a to kultivační médium s přídavkem 1,00 % (w/v) laktózy a 2,0 % (w/v) NaCl, kdy pH po 24 hodinách kultivace vzrostlo na 5,92 a za dalších 24 hodin kultivace opět kleslo na hodnotu 5,00. Při iniciačním pH  $6,0 \pm 0,2$  byl nárůst nejvýraznější po 24 hodinách kultivace a rozdíl se pohybovaly v rozmezí 0,5 až 0,8 pH. Při kultivaci testovaného kmene se iniciační pH  $7,0 \pm 0,2$  výrazněji neměnilo a případný menší pokles nebo nárůst mohl být způsoben výkyvem pH média.

## 7.2 Vliv vnějších faktorů na produkci biogenních aminů u *Lactobacillus brevis* 10185-3 *in vitro* při 10 °C

### 7.2.1 Vliv pH

Při  $10 \pm 1$  °C mělo pH na produkci tyraminu výrazný vliv. Vyšší produkce tyraminu byla detekována po 15 dnech kultivace při iniciačním pH  $5,0 \pm 0,2$ , kdy bylo vyprodukováno  $189,0 \pm 2,5$  mg/l tyraminu. Při iniciačním pH  $6,0 \pm 0,2$  a pH  $7,0 \pm 0,2$  byla dosažena výrazně nižší produkce, která se pohybovala v rozmezí 15,6 až 23,7 mg/l (Obrázek 23).

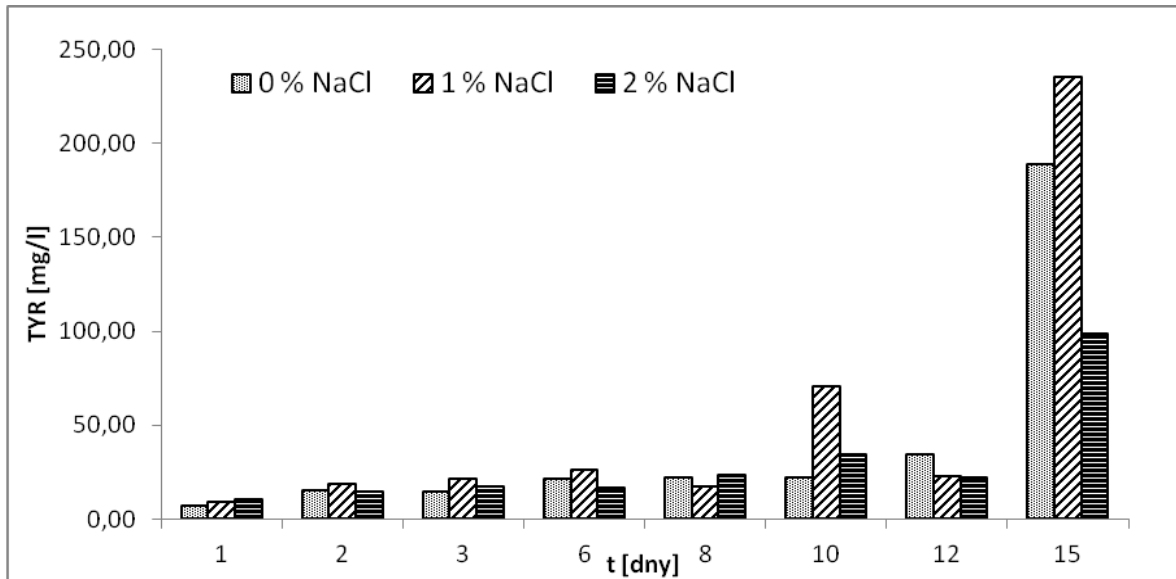


Obrázek 23: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 *in vitro* – vliv pH (10 °C)

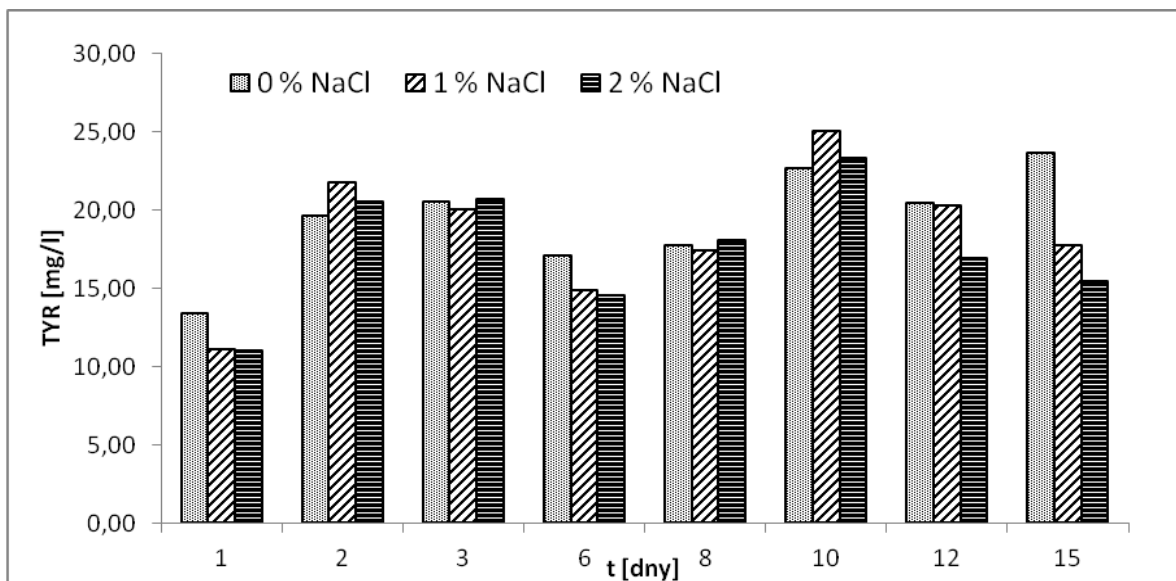
### 7.2.2 Vliv NaCl

Vliv chloridu sodného na produkci biogenních aminů byl hodnocen v kultivačním médiu bez přídavku laktózy, kde byla nejvyšší produkce tyraminu ( $235,8 \pm 28,2$  mg/l) při iniciačním pH  $5,0 \pm 0,2$  s přídavkem 1,0 % (w/v) NaCl. Naopak nejnižší množství tyraminu bylo detekováno u vzorků s přídavkem 2,0 % (w/v) NaCl (Obr. 24). Obrázek 24 ukazuje vývoj produkce při iniciačním pH  $5,0 \pm 0,2$ , kde je zřejmé, že vyšší produkce tyraminu je viditelná až po 15 dnech kultivace. Při pH  $6,0 \pm 0,2$  a pH  $7,0 \pm 0,2$  měla produkce tyraminu kolísavý charakter a maximální množství tyraminu nepřesáhlo 25,0 mg/l (Obrázek 25).





Obrázek 24: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 *in vitro* při iniciačním pH 5,0 – vliv NaCl (10 °C)

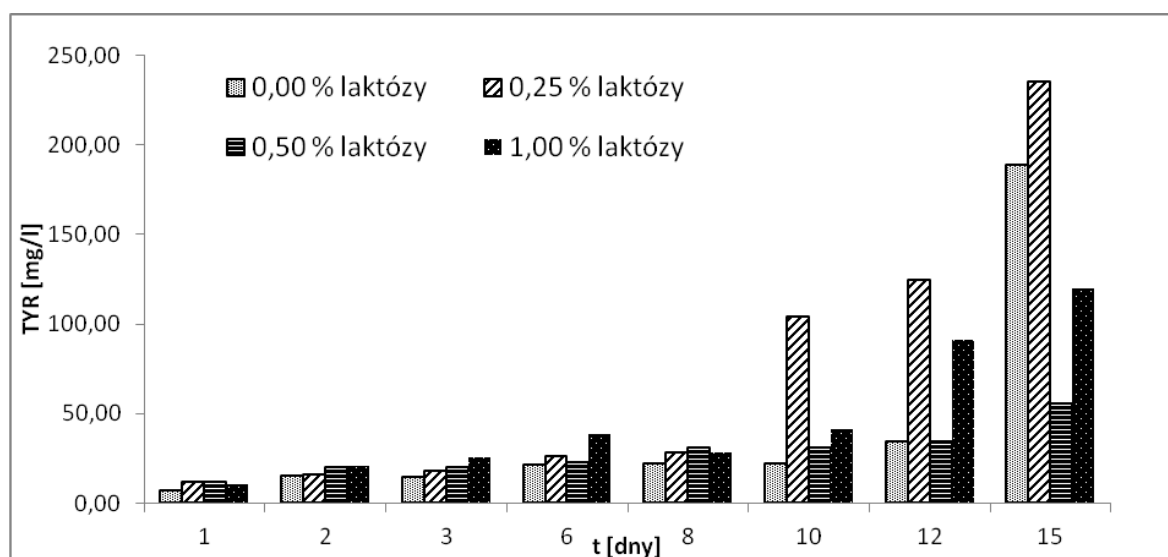


Obrázek 25: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 *in vitro* při iniciačním pH 6,0 – vliv NaCl (10 °C)

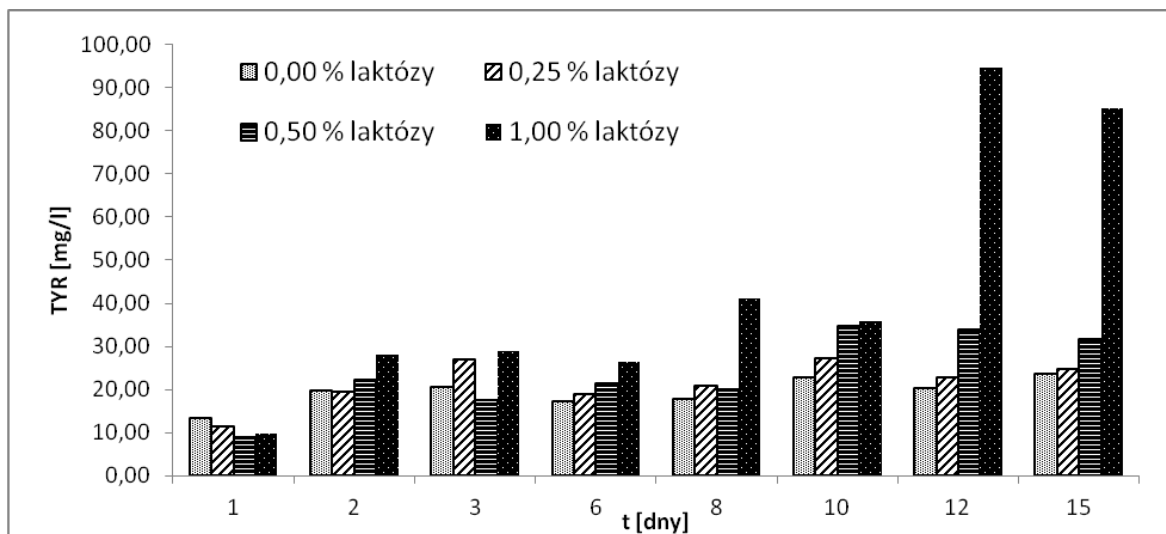
### 7.2.3 Vliv laktózy

Po kultivaci testovaného kmene při nižší teplotě  $10 \pm 1$  °C byla stanovena nejvyšší produkce tyraminu při iniciačním pH  $5,0 \pm 0,2$  za podmínek, kdy bylo do kultivačního prostředí při-

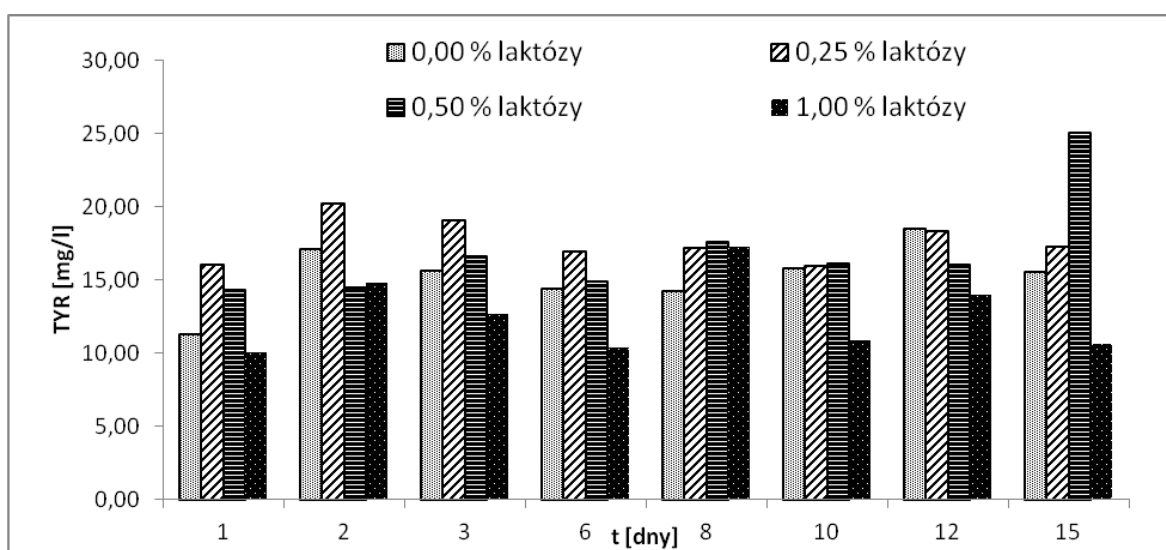
dáno 0,25 % (w/v) laktózy ( $235,5 \pm 6,8$  mg/l). Nejnižší množství tyraminu ( $55,9 \pm 13,6$  mg/l) bylo při iniciačním pH  $5,0 \pm 0,2$  detekováno v kultivačním prostředí s přidavkem 0,50 % (w/v) laktózy po 15 dnech kultivace, kdy se toto množství po celou dobu kultivace oproti ostatním koncentracím laktózy výrazněji neměnilo (Obrázek 26). Při pH  $6,0 \pm 0,2$  mělo na produkci tyraminu od 2. dne kultivace významnější vliv prostředí s přidavkem 1,00 % (w/v) laktózy, kdy po 13 dnech kultivace tato hodnota vzrostla až na  $94,9 \pm 2,6$  mg/l (obr. 27). Při iniciačním pH  $7,0 \pm 0,2$  byla nejvyšší produkce zaznamenána od prvního odběru až po 6. den kultivace v kultivačním médiu s přidavkem 0,25 % (w/v) laktózy, avšak po 15 dnech bylo detekováno nejvíce tyraminu ve vzorcích s přidavkem 0,50 % (w/v) laktózy (Obrázek 28).



Obrázek 26: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 *in vitro* při iniciačním pH 5,0 – vliv laktózy (10 °C)



Obrázek 27: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 *in vitro* při iniciačním pH 6,0 – vliv laktózy (10 °C)



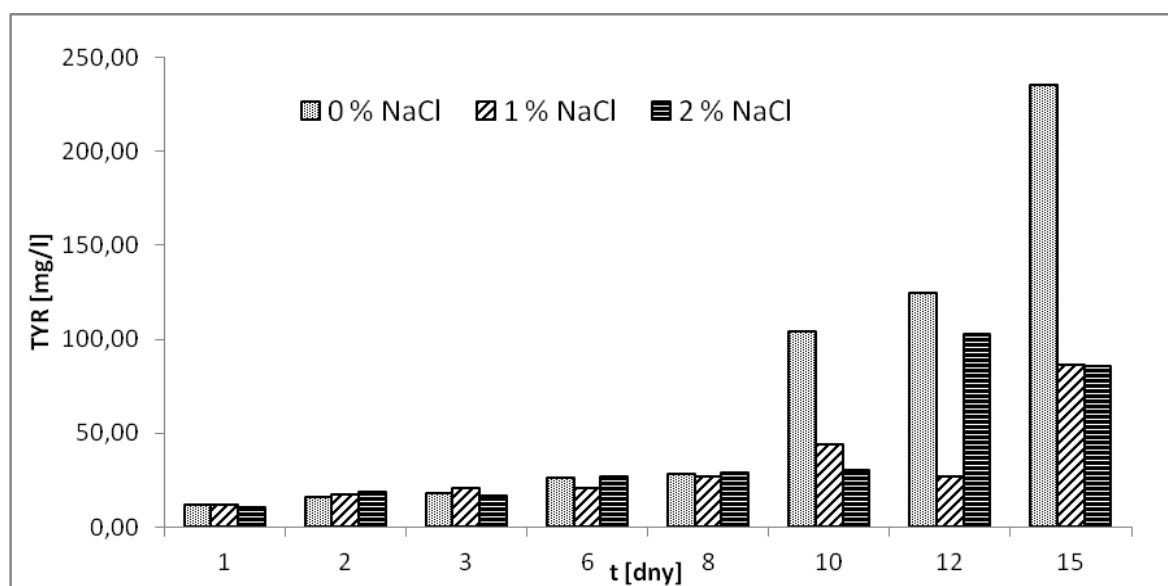
Obrázek 28: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 *in vitro* při iniciačním pH 7,0 – vliv laktózy (10 °C)

#### 7.2.4 Vliv kombinace faktorů

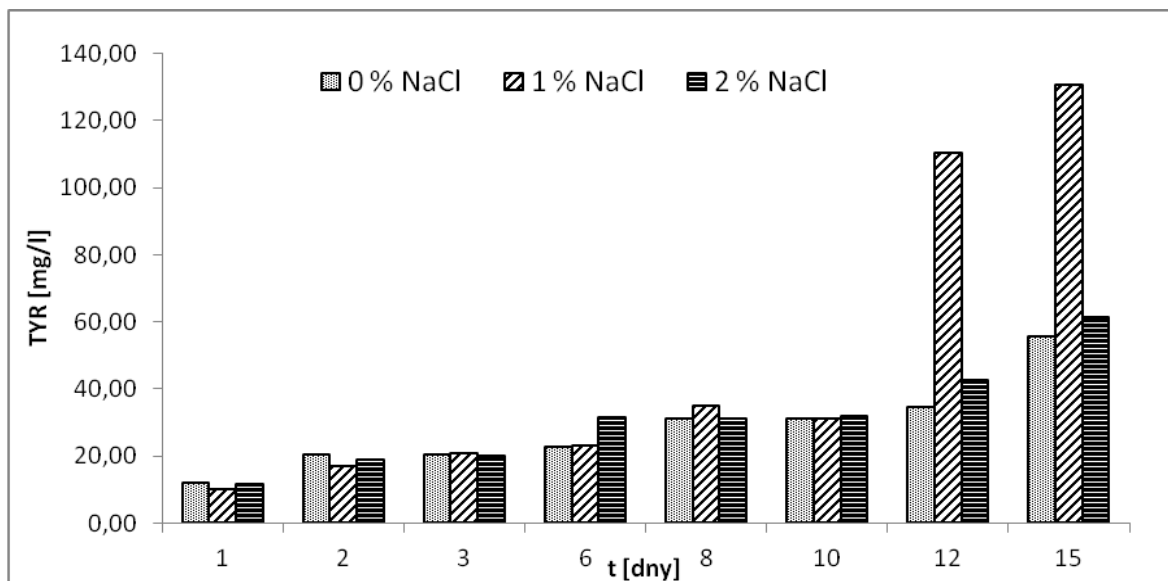
Nejvýraznější dekarboxylázová aktivita kmene *Lactobacillus brevis* 10185-3 byla detekována ( $235,8 \pm 28,2$ ) v kultivačním médiu s iniciačním pH  $5,0 \pm 0,2$  bez přídavku laktózy a 1,0 % (w/v) NaCl v médiu (Obrázek 24) a rovněž i v médiu bez přídavku NaCl

a 0,25 % (w/v) laktózy ( $235,5 \pm 6,8$  mg/l) (Obrázek 29). Za povšimnutí stojí i produkce tyraminu při iniciačním pH  $6,0 \pm 0,2$  a to v prostředí s 0,50 až 1,00 % (w/v) laktózy, kde oproti nižší koncentraci přidané laktózy (množství TYR cca do 30 mg/l) byl detekován tyramin ve vyšším množství (75,1 – 94,9 mg/l) a to v převážně v kultivačním médiu bez přídavku NaCl a s přídavkem 1,0 % (w/v) NaCl (Obrázek 31).

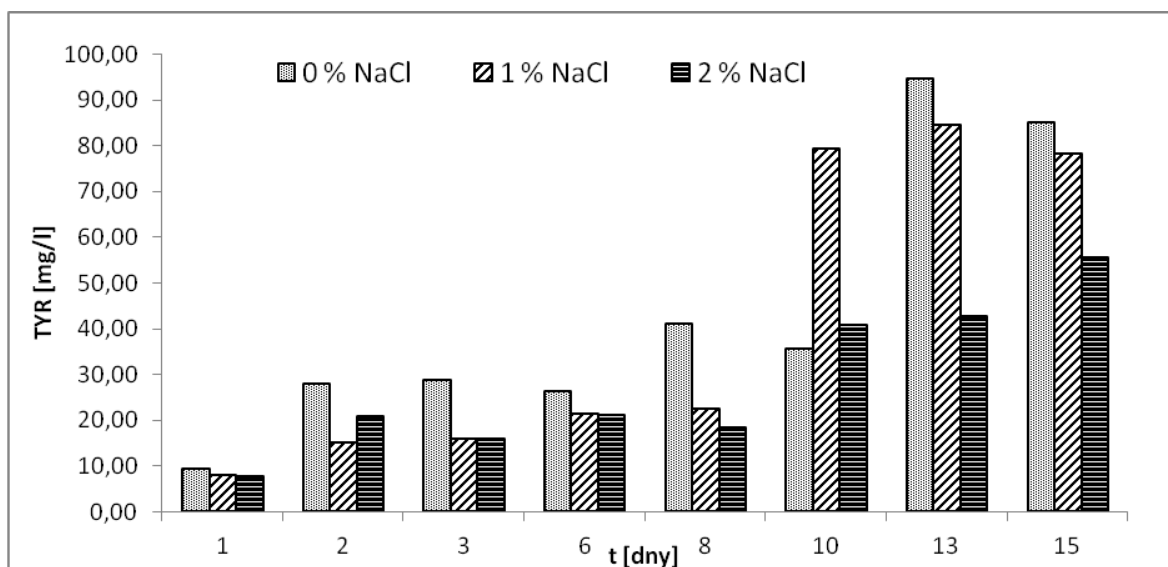
Vliv kombinace různých koncentrací laktózy a NaCl je vidět na obrázcích 29 – 31, kde bylo při nižší aplikované koncentraci laktózy (0,25 % (w/v)) vyprodukováno více tyraminu ve vzorcích bez obsahu chloridu sodného a naproti tomu při vyšší aplikované koncentraci laktózy (0,50 % (w/v)) je daleko více tyraminu ve vzorcích s přídavkem 1,0 % (w/v) chloridu sodného.



Obrázek 29: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 *in vitro* při iniciačním pH 5,0 s přídavkem 0,25 % (w/v) laktózy (10 °C)



Obrázek 30: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 *in vitro* při iniciačním pH 5,0 s přidavkem 0,50 % (w/v) laktózy (10 °C)

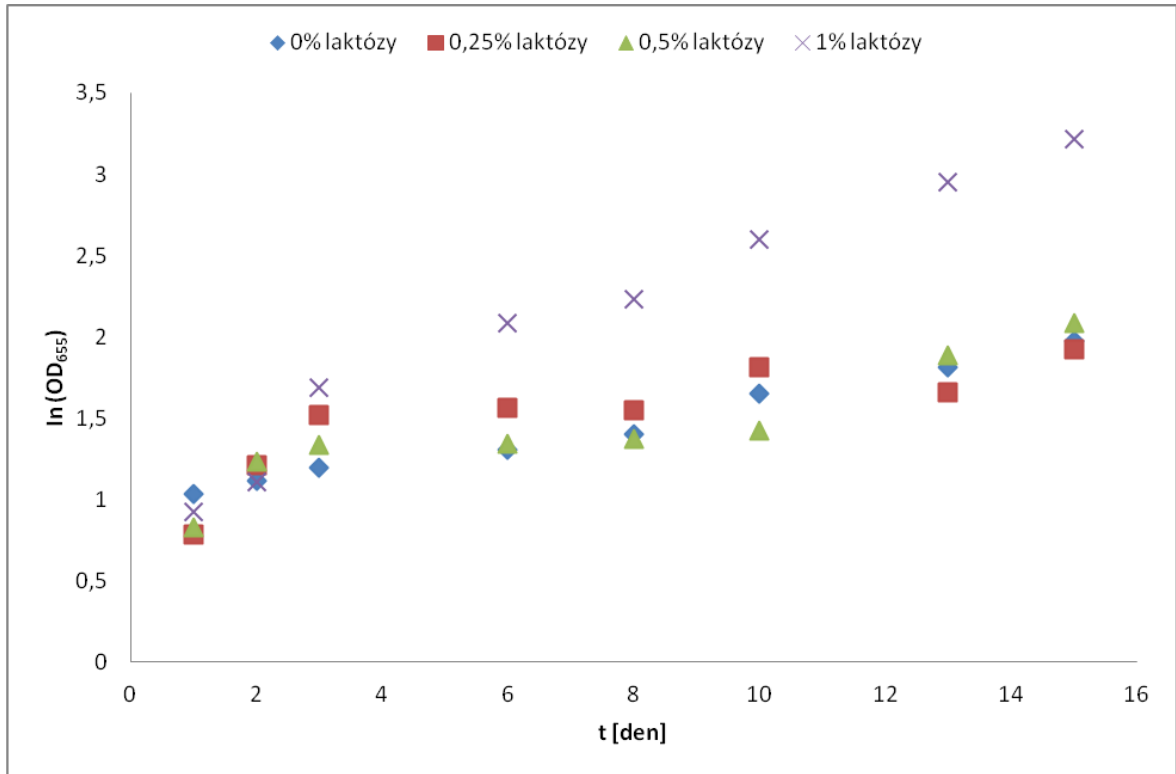


Obrázek 31: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 *in vitro* při iniciačním pH 6,0 s přidavkem 1,00 % (w/v) laktózy (10 °C)

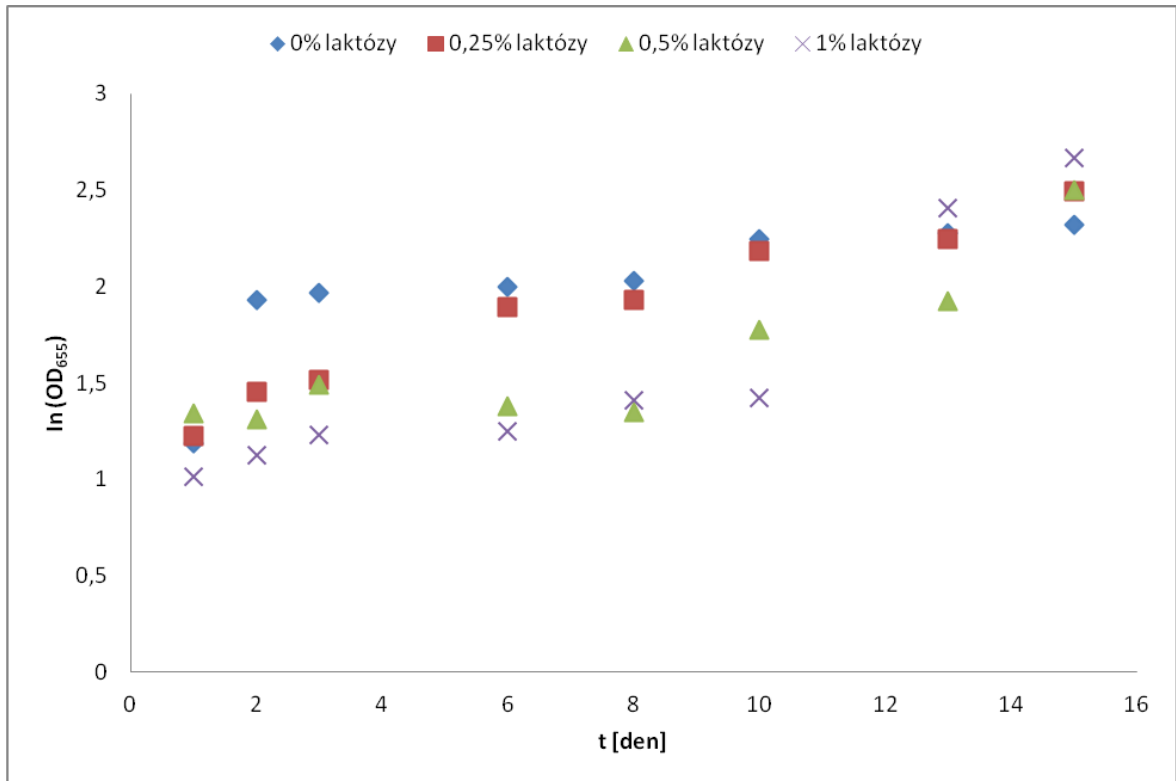
### 7.2.5 Měření nárůstu buněk

Největší nárůst při  $10 \pm 1$  °C byl při iniciačním pH 5,0 stanoven po kultivaci bakterií v prostředí s přidavkem 1,00 % (w/v) laktózy (Obrázky 32 - 34).

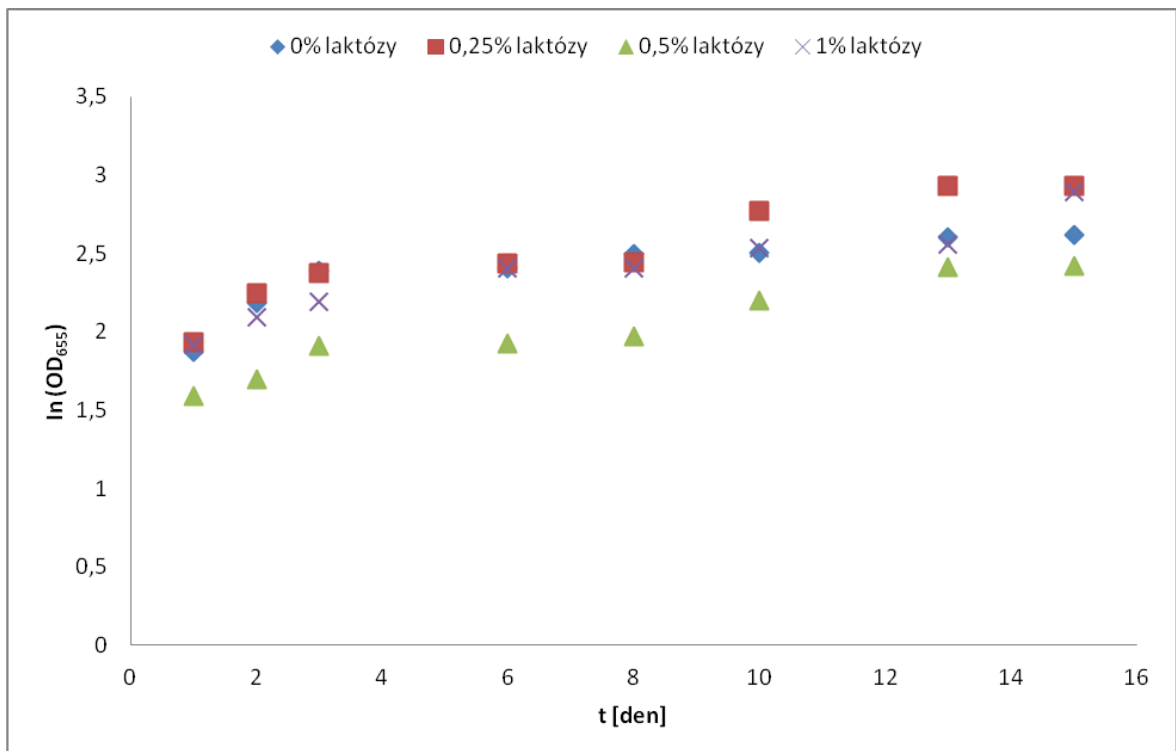
Ze tří testovaných hodnot pH bylo nejvyšších hodnot dosaženo při iniciačním pH  $7,0 \pm 0,2$  v kulturačním médiu s přidavkem 1,00 % (w/v) laktózy a 2,0 % (w/v) NaCl, kde bylo dosaženo hodnoty 3,240. Nejmenších hodnot optické hustoty (1,753 – 2,186) bylo při všech pH dosaženo vždy v médiu bez přidavku soli a s přidavkem 0,25 a 0,50 % (w/v) laktózy.



Obrázek 32: Vliv přidavku laktózy na růst *Lactobacillus brevis* 10185-3 bez přidavku NaCl a pH 5,0 (10 °C)



Obrázek 33: Vliv přidavku laktózy na růst *Lactobacillus brevis* 10185-3 při přidavku 1,0 % (w/v) NaCl a pH 5,0 (10 °C)



Obrázek 34: Vliv přidavku laktózy na růst *Lactobacillus brevis* 10185-3 při přidavku 2,0 % (w/v) NaCl a pH 5,0 (10 °C)

### 7.2.6 Stanovení pH kultivačního média

Nejvyšší změna (nárůst pH) při  $10 \pm 1$  °C nastala u pH  $5,0 \pm 0,2$  v prostředí bez obsahu laktózy. Tento fakt může být odůvodněn tím, že testovaný kmen neměl k dispozici zkváslitelnou laktózu a nemohlo tedy dojít ke snížení pH a vlivem zásaditých biogenních aminů docházelo pouze k nárůstu pH. Ve vzorcích bez obsahu NaCl i laktózy došlo ke zvýšení původní hodnoty pH 5,01 až na pH 6,17 po 15 dnech kultivace. Při pH  $6,0 \pm 0,2$  došlo k výraznějšímu nárůstu pH vždy v 10. dni kultivace. Ke zvýšení pH došlo např. v kultivačním médiu bez přídavku laktózy a 1,0 % (w/v) NaCl, kdy počáteční hodnota pH byla 6,13 a po 10. dni kultivace se zvýšila na pH 6,80. V kultivačních médiích s iniciačním pH  $7,0 \pm 0,2$  k výrazným změnám nedošlo.

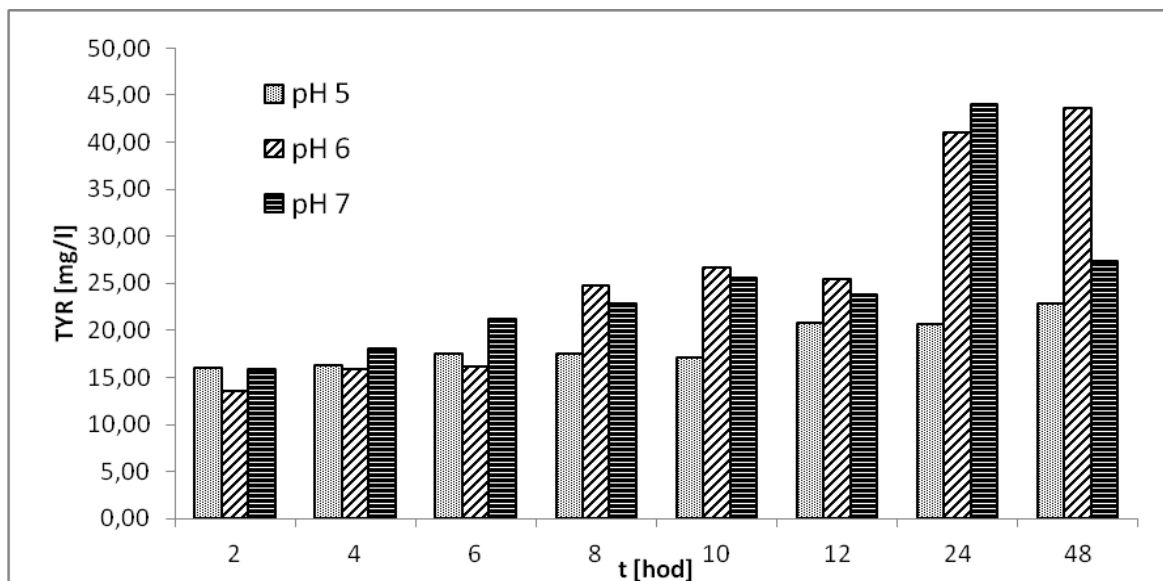
## 7.3 Vliv vnějších faktorů na produkci biogenních aminů u *Lactobacillus brevis* 10185-3 v mléce při 37 °C

*Lactobacillus brevis* 10185-3 produkoval ve vzorcích mléka nejvíce tyramin. Jeho produkce však byla v mléce oproti MRS bujónu řádově nižší. Nejvíce tyraminu vznikalo u všech vzorků mléka po 48 hodinách kultivace.

### 7.3.1 Vliv pH

Z obrázku 35 je patrné, že překvapivě více tyraminu bylo v mléce detekováno při iniciačním pH  $6,0 \pm 0,2$  a  $7,0 \pm 0,2$  a to po 24 a 48 hodinách kultivace. V kultivačním médiu s iniciačním pH 7,0 vyprodukované množství tyraminu stouplo na  $44,0 \pm 1,8$  mg/l. Při iniciačním pH  $5,0 \pm 0,2$  se produkce tyraminu po celou dobu kultivace pohybovala pod hodnotou 25 mg/l bez výrazného nárůstu.

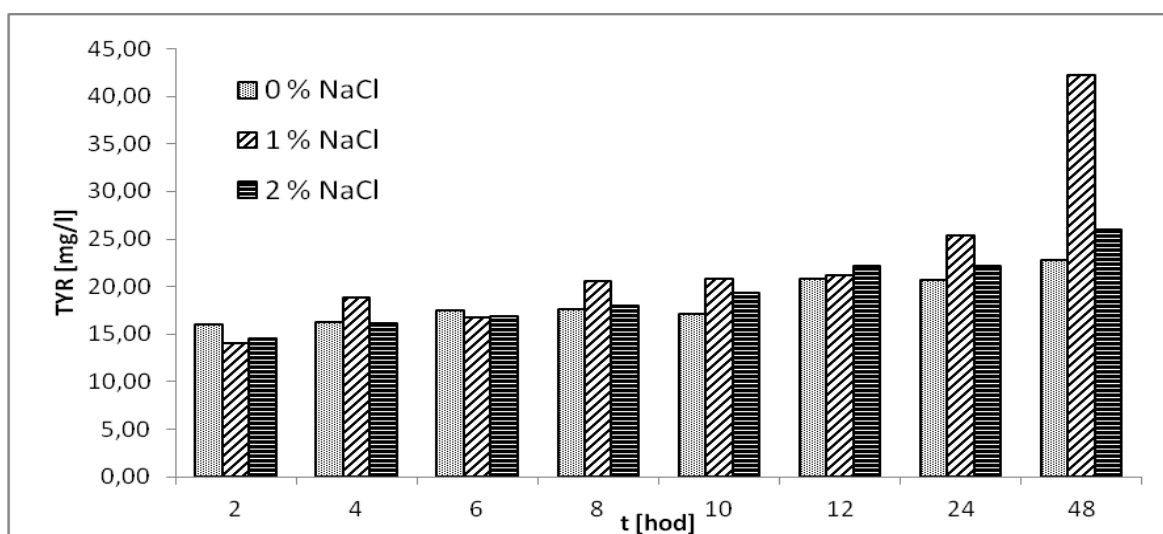




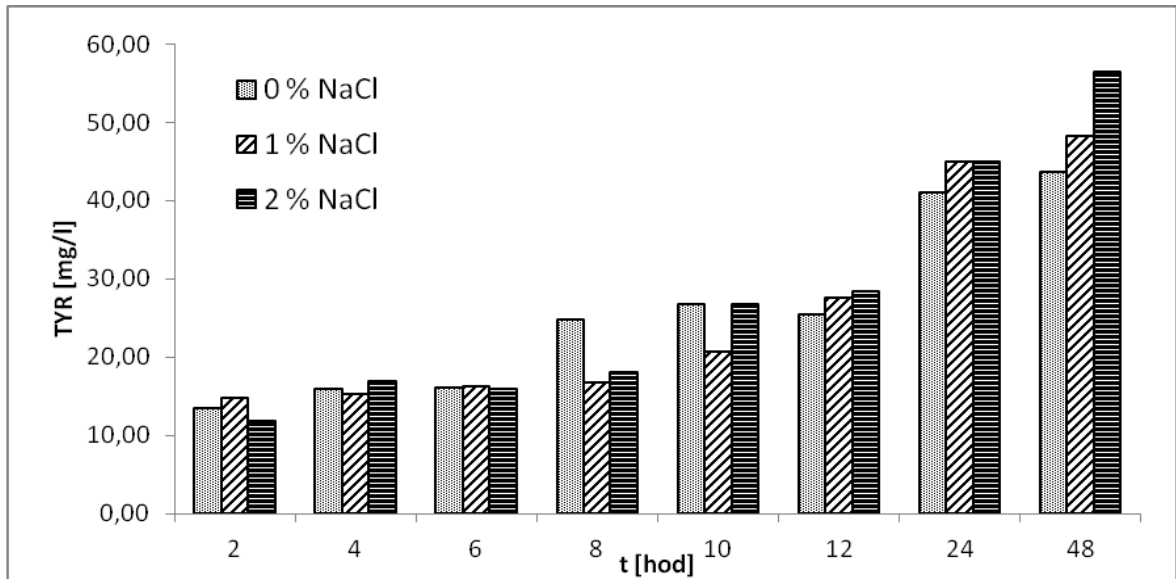
Obrázek 35: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 v mléce – vliv pH (37 °C)

### 7.3.2 Vliv NaCl

Přídavek chloridu sodného měl u iniciačního pH  $5,0 \pm 0,2$  pozitivní vliv na tvorbu tyraminu, což se projevilo vyšší tvorbou ( $42,2 \pm 0,4$  mg/l) ve vzorcích s přidavkem 1,0 % (w/v) NaCl u pH  $5,0 \pm 0,2$  a v médiu s přidavkem 2,0 % (w/v) NaCl u pH  $6,0 \pm 0,2$  ( $56,4 \pm 1,2$  mg/l) (Obrázek 36 a 37).



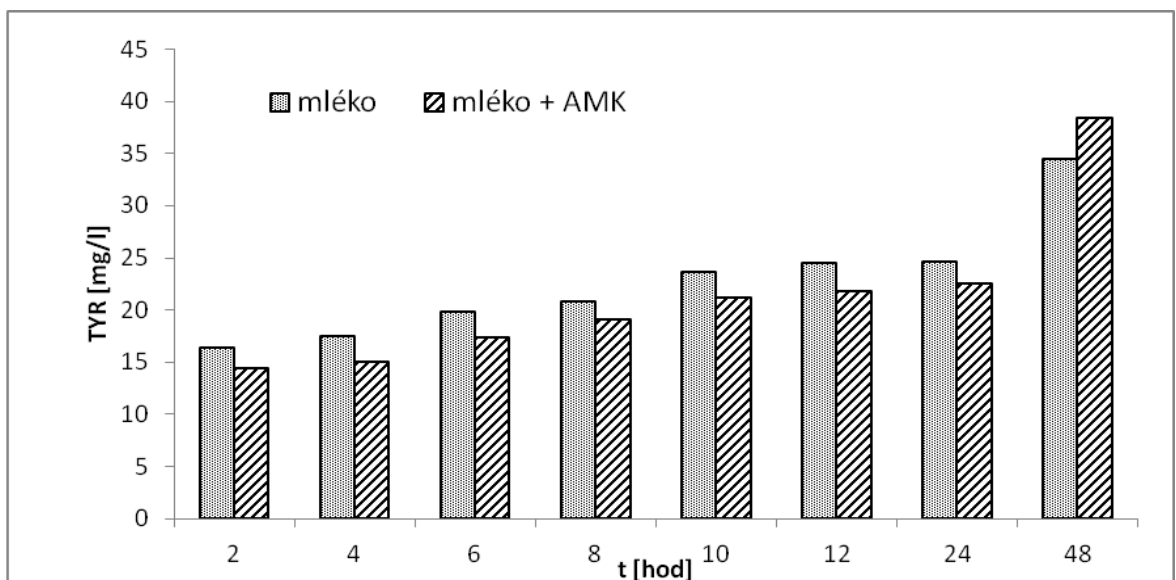
Obrázek 36: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 v mléce při iniciačním pH 5,0 – vliv NaCl (37 °C)



Obrázek 37: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 v mléce při iniciačním pH 6,0 – vliv NaCl (37 °C)

### 7.3.3 Vliv přidavku aminokyselin

Přídavek 0,3 % (w/v) tyrozinu do mléka neměl na produkci tyraminu významný vliv (Obrázek 38).



Obrázek 38: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 v mléce a v mléce s přidavkem AMK (37 °C)

### 7.3.4 Stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM)

Stanovením CPM byl zjišťován vliv vybraných faktorů na růst sledovaného kmene v mléce. V případě mléka nebylo vhodné použití optické hustoty pro tvorbu růstových křivek testovaného kmene, kvůli přítomnosti mnoha chromoforických skupin a vysokému zákalu, proto byla použita plotnová metoda stanovení CPM na živné půdě MRS. CPM byl stanoven pouze v neupraveném mléce, mléce s přídavkem 0,3 % (w/v) aminokyselin a mléce s přídavkem 1,0 % (w/v) NaCl. Nejvyšší nárůst bakterií byl zaznamenán po 12 hodinách kultivace v mléce s přídavkem 1,0 % (w/v) NaCl a nejnižší naopak srovnatelně ve vzorcích neupraveného mléka a mléka s přídavkem AMK.

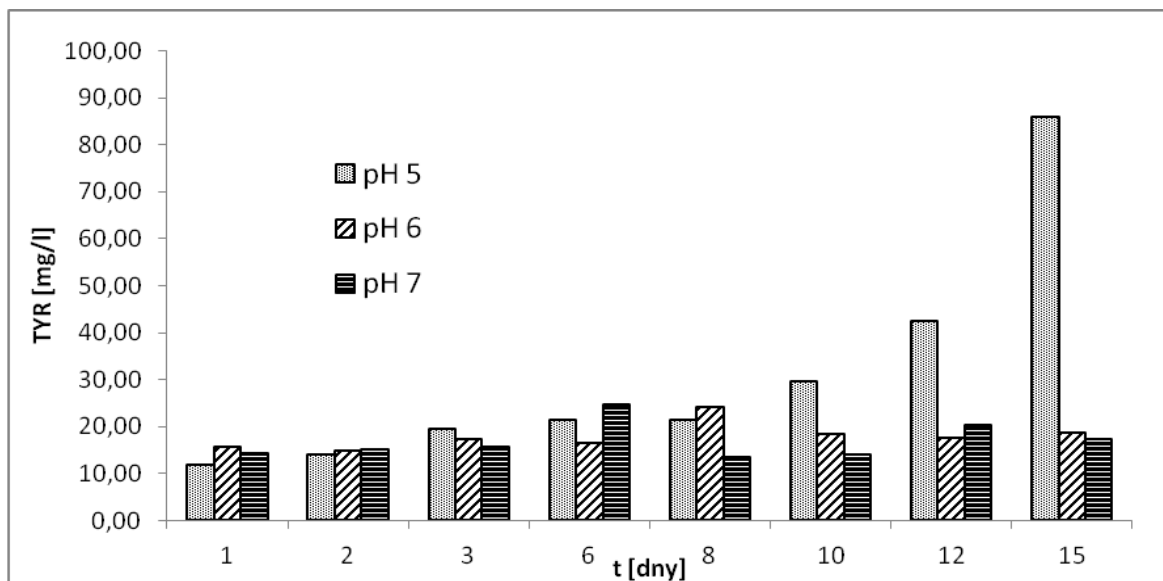
### 7.3.5 Stanovení pH kultivačního média

Spolu s produkcí biogenních aminů bylo stanoveno i pH supernatantu ve všech odběrových časech (Příloha II). Ve vzorcích mléka při kultivační teplotě  $37 \pm 1$  °C docházelo po celou dobu kultivace k poklesům zhruba do 8. hodiny kultivace, následně k nárůstům pH a opětovnému poklesu pH média. Tyto výkyvy mohou být zapříčiněny prvotním zkvašováním laktózy a tedy podporou bakteriálních dekarboxyláz a tím i zvýšení produkce zásaditých biogenních aminů, což následně vedlo k opětovnému nárůstu pH.

## 7.4 Vliv vnějších faktorů na produkci biogenních aminů u *Lactobacillus brevis* 10185-3 v mléce při 10 °C

### 7.4.1 Vliv pH

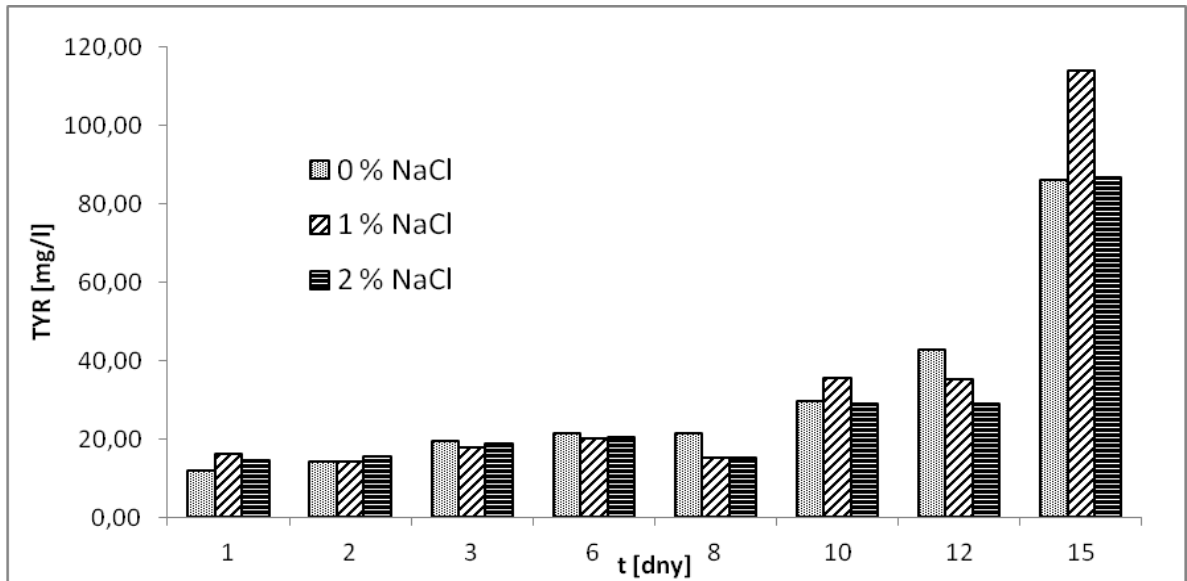
Při  $10 \pm 1$  °C mělo pH na produkci tyraminu také významný vliv. Vyšší produkce tyraminu byla detekována od 10. dne kultivace při iniciačním pH  $5,0 \pm 0,2$ . Maximální množství tyraminu po 15 dnech kultivace bylo  $85,8 \pm 0,9$  mg/l. Při iniciačním pH  $6,0 \pm 0,2$  a pH  $7,0 \pm 0,2$  bylo dosaženo zhruba čtvrtinové množství (17,1 – 18,6 mg/l) (Obrázek 39).



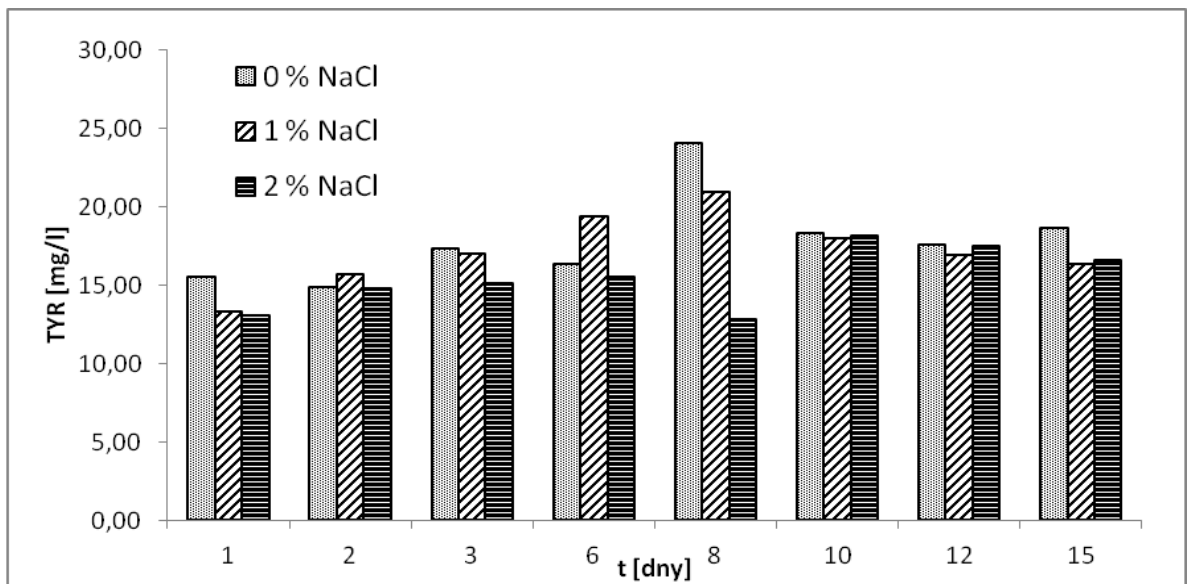
Obrázek 39: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 v mléce – vliv pH (10 °C)

#### 7.4.2 Vliv NaCl

Obrázky 40 – 41 ukazují, že nejvyšší produkce tyraminu v mléce ( $113,8 \pm 5,0$  mg/l) byla zaznamenána při počátečním pH  $5,0 \pm 0,2$  v kultivačním médiu s přidavkem 1,0 % (w/v) NaCl. Při pH  $6,0 \pm 0,2$  bylo po 15 dnech kultivace stanoveno nejvíce tyraminu ( $24,0 \pm 1,3$  mg/l) v kultivačním médiu bez přidavku NaCl a při pH  $7,0 \pm 0,2$  rovněž v kultivačním médiu bez přidavku NaCl ( $24,6 \pm 0,2$  mg/l).



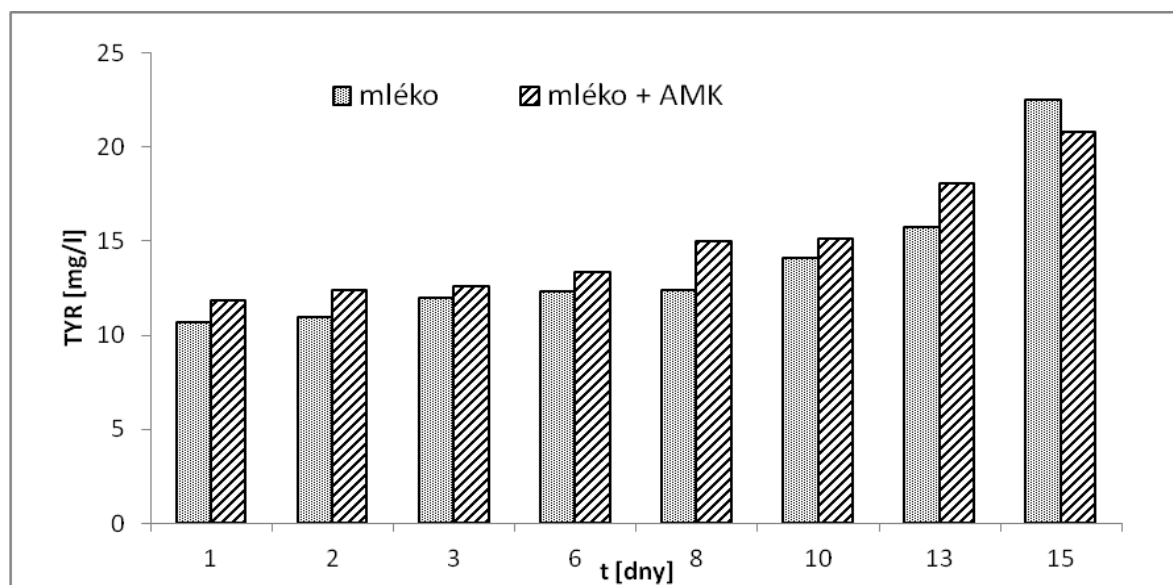
Obrázek 40: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 v mléce při iniciačním pH 5,0 – vliv NaCl (10 °C)



Obrázek 41: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 v mléce při iniciačním pH 6,0 – vliv NaCl (10 °C)

### 7.4.3 Vliv přidavku aminokyselin

Ani v případě kultivační teploty  $10 \pm 1$  °C neměl přidavek 0,3 % (w/v) tyrozinu do mléka na produkci tyraminu významný vliv (Obrázek 42). Množství tyraminu v mléce s přidavkem aminokyselin bylo zhruba jen o 1 mg/l vyšší než v neupraveném mléce.



Obrázek 42: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace *Lactobacillus brevis* 10185-3 v mléce a v mléce s přidavkem AMK (10 °C)

### 7.4.4 Stanovení celkového počtu mikroorganismů

Nejvyšší nárůst bakterií při  $10 \pm 1$  °C byl stanoven po 15 dnech kultivace ve vzorcích neupraveného mléka a mléka s přidavkem AMK. Nepatrně nižší nárůst testovaného kmene byl pozorován ve vzorcích mléka s přidavkem 1,0 % (w/v) NaCl.

### 7.4.5 Stanovení pH kultivačního média

K nárůstu pH došlo v průběhu kultivace prakticky u všech vzorků mléka (Příloha II). Nejvyšší nárůst pH při  $10 \pm 1$  °C byl zaznamenán u iniciačního pH  $5,0 \pm 0,2$  bez přidavku NaCl, kdy pH stoupl až na 6,52. Nejnižší nárůst byl zaznamenán u iniciačního pH  $7,0 \pm 0,2$  s přidavkem 2,0 % (w/v) NaCl, kde pH stoupl pouze na 7,13. Dá se tedy říci, že se snižujícím se počátečním pH byl nárůst vyšší. Vliv NaCl na změnu pH byl taktéž patrný. S vyšším přidavkem NaCl došlo k nižšímu nárůstu pH. Jedinou výjimkou, kdy došlo k poklesu pH je

vzorek mléka bez přídavku AMK. V tomto případě kleslo pH po 15 dnech kultivace z počátečních 6,77 na hodnotu 6,00.

### 7.5 Produkce ostatních biogenních aminů kmenem *Lactobacillus brevis* 10185-3

Kromě tyraminu byly v supernatantech kultivačních médií zjištěny i ostatní biogenní aminy. Ty však byly detekovány v zanedbatelném množství, nebo nebyly detekovány vůbec (Tabulka 8). Nejvíce bylo vyprodukováno sperminu a to při  $37 \pm 1$  °C v mléce v množství  $86,9 \pm 11,6$  mg/l.

Tabulka 8: Nejvyšší naměřené množství biogenních aminů v mléce a v bujónu v posledním odběrovém čase

| biogenní amin | nejvyšší naměřené množství<br>[mg/l] v bujónu |               | nejvyšší naměřené množství<br>[mg/l] v mléce |                |
|---------------|---|---------------|--|----------------|
|               | 37 °C   | 10 °C         | 37 °C  | 10 °C          |
| tryptamin     | *ND   | *ND           | *ND  | *ND            |
| fenyletylamin | *ND   | *ND           | *ND  | *ND            |
| putrescin     | *ND   | *ND           | $0,5 \pm 0,1$                                | *ND            |
| kadaverin     | $0,4 \pm 0,1$                                 | $3,4 \pm 0,4$ | *ND  | *ND            |
| histamin      | $0,8 \pm 0,2$                                 | $1,2 \pm 0,2$ | *ND  | *ND            |
| spermidin     | *ND   | $0,9 \pm 0,1$ | *ND  | *ND            |
| spermin       | $20,0 \pm 1,9$                                | $3,5 \pm 0,5$ | $86,9 \pm 11,6$                              | $21,1 \pm 3,5$ |

\*ND – nebyl detekován

### 7.6 Souhrnná diskuze

Tato práce byla zaměřena na sledování růstu a kinetiku produkce BA ovlivněné faktory vnějšího prostředí (přídavek laktózy, přídavek NaCl, různé iniciační pH a teploty kultivace) u bakterií kmene *Lactobacillus brevis* 10185-3. Problematice biogenních aminů je v dnešní době věnována značná pozornost a problematika vlivu faktorů není stále ještě prozkoumána, zvláště vliv laktózy. Pro účely tohoto experimentu byl vybrán kmen *Lactobacillus brevis* 10185-3, který byl izolován přímo z výroby sýrů holandského typu.

Faktory a jejich úrovně byly zvoleny tak, aby se co nejvíce přiblížily podmínkám technologického procesu výroby přírodních sýrů a napomohly tak předvídat tvorbu biogenních aminů při delším procesu zrání sýrů. Z tohoto důvodu byl testovaný kmen *Lactobacillus brevis* 10185-3 kultivován po dobu 15 dní při teplotě 10 °C. Tato teplota odpovídá technologickému procesu zrání přírodních sýrů. Druhá vybraná kultivační teplota 37 °C je analogická s teplotou gastrointestinálního traktu člověka a zároveň se přibližuje optimální teplotě růstu daného kmene.

Ve fermentovaných mléčných výrobcích, zejména v sýrech, bývají biogenní aminy zastoupeny více než v nefermentovaných mléčných výrobcích (Santos, 1996). Používané bakterie mléčného kvašení (*Lactococcus*, *Lactobacillus* a *Enterococcus*) mají mnohdy vysokou dekarboxylázovou aktivitu. U nefermentovaných potravin je výskyt biogenních aminů obvykle spojen a přítomností kontaminující mikroflóry (Santos, 1996).

Produkce biogenních aminů je omezena dostupnými aminokyselinami v prostředí, proto bylo kultivační médium obohaceno přísadkou 0,3 % aminokyselin (tyrozin, lyzin, arginin, ornitin). Pro podporu růstu bakterií a případnou produkci biogenních aminů bylo do kultivačního média přidáno množství laktózy v koncentracích 0,25; 0,50 a 1,00 % (w/v).

Prvním zkoumaným faktorem ovlivňujícím dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů bylo pH. Optimální aktivita bakteriálních dekarboxyláz se pohybuje v kyselém prostředí a slouží jako mechanismus neutralizace prostředí před nadměrným poklesem pH, které je nevhodné pro růst bakterií (Marcobal a kol., 2006). Růst bakterií v kyselém prostředí stimuluje tvorbu dekarboxyláz a následně i biosyntézu biogenních aminů z aminokyselin a chrání je tak před kyselým prostředím (Marcobal a kol., 2006). V této práci byla nejvyšší produkce zaznamenána v nejnižším testovaném pH 5, a to jak v mléce, tak *in vitro*. Jedinou výjimkou bylo mléko kultivované při 37 °C, kde bylo více tyraminu zjištěno při pH 6,0 a 7,0. Moreno-Arribas a kol. (1999) ve své studii uvádí, že nejvyšší dekarboxylázová aktivita u *Lactobacillus brevis* je při pH 5,0. Santos (1996) rovněž uvádí, že pro bakteriální dekarboxylázy je optimální pH v rozmezí 4,0 – 5,0.

Dalším sledovaným faktorem této práce byl vliv přísadky laktózy. Laktóza byla do kultivačního média přidána jako zdroj energie pro přítomné bakterie i jako případná podpora produkce biogenních aminů. Nejvyšší produkce tyraminu *in vitro* byla u obou kultivačních teplot zaznamenána při přísadce 0,25 % (w/v) laktózy v kultivačním médiu s počátečním



pH 5,0. Dalším zvyšováním laktózy v médiu došlo ke snížení produkce tyraminu, avšak k zastavení produkce nedošlo. Lorencová a kol. (2013) také sledovali vliv laktózy na produkci biogenních aminů a zjistili, že v kultivačním médiu s přídatkem laktózy je produkce BA vyšší než bez přídatku. Obdobný výsledek zjistili i Buňková a kol. (2011). V této studii bylo rovněž zjištěno, že bez přídatku laktózy byl nárůst buněk nižší, stejně tak i produkce biogenních aminů. Vůbec nejvyšší produkce tyraminu bylo dosaženo při kombinaci 0,25 % (w/v) laktózy a 1,0 % (w/v) NaCl. Stejný výsledek uvádí ve své studii i Lorencová a kol. (2013), ve které byl sledován vliv vnějších faktorů na produkci biogenních aminů u bakterií rodu *Bifidobacterium*.

Nejvyšší nárůst buněk i pH byl zaznamenán rovněž v kultivačním médiu s přídatkem 0,25 % (w/v) laktózy. Tento výsledek potvrzuje nejvyšší produkci tyraminu v prostředí s 0,25 % (w/v) laktózy a pH 5,0.

V této práci byl dále sledován vliv koncentrace NaCl na dekarboxylázovou aktivitu testovaného kmene. Kultivační médium bylo obohaceno chloridem sodným o koncentracích 0 – 2 % (w/v). Nejvyšší použitá koncentrace NaCl odpovídá obsahu NaCl v sýrech holandského typu, které mají střední obsah soli 1,5 až 3,0 % (Kolektiv Cepac, 2007). Při obou sledovaných kultivačních teplotách byl největší vliv NaCl zjištěn v médiu s počátečním pH 5,0. Nejvíce tyraminu bylo stanoveno při tomto pH ve vzorcích, které obsahovaly 1,0 % (w/v) chloridu sodného. Lze tudíž konstatovat, že přídatvek 1,0 % (w/v) NaCl nejvíce působí na dekarboxylázovou aktivitu u *Lactobacillus brevis* 10185-3. Rovněž Buňková a kol. (2011) zkoumali vliv přídatku soli na produkci tyraminu u *Enterococcus durans* CCDM 53. Nejvyšší produkce tyraminu byla zjištěna ve vzorcích s nejvyšší aplikovanou koncentrací soli (2,0 % w/v). Pereira a kol. (2009) přišli s hypotézou, že Na<sup>+</sup> ionty podílející se na regulaci intracelulárního pH mají zásadní roli v tyrozindekarboxylázové dráze. Na<sup>+</sup> ionty jsou důležité pro Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportový systém, protože se vymění za H<sup>+</sup> ionty, které jsou odstraněny z buněk. Tímto jevem lze vysvětlit zvýšenou produkci tyraminu v prostředí s přídatkem chloridu sodného.

V případě mléka byl vliv NaCl téměř stejný. Při obou kultivačních teplotách bylo nejvyšší produkce dosaženo při počátečním pH 5,0 ve vzorcích s přídatkem 1,0 % (w/v) NaCl. Při kultivační teplotě 10 °C působil na produkci tyraminu obsažený NaCl při iniciačním pH 6,0 a 7,0 inhibičně. Gardini a kol. (2001) zkoumali vliv vnějších faktorů na produkci BA u *En-*

*terococcus faecalis* v odstředěném mléce a zjistili, že více BA vznikalo v prostředí s nízkou koncentrací NaCl.

Dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů významně ovlivňuje i teplota a délka kultivace. Při vyšší teplotě kultivace byla prokázána vyšší dekarboxylázová aktivita (Kim a kol., 2011; Pinho a kol., 2001). Kalhotka a kol. (2011) se zaměřili na vliv teploty a doby kultivace na produkci biogenních aminů u *Bacillus licheniformis* a zjistili, že všechny testované kmeny vykazovaly silnou dekarboxylázovou aktivitu vůči ornitinu, fenylalaninu a tyrozinu při všech použitých teplotách, kromě 6 °C. Optimální dekarboxylázová aktivita u tohoto kmene se pohybovala mezi 30 a 37 °C. Obdobný výsledek uvádí i Pleva a kol. (2012), kde byly zkoumány rovněž faktory ovlivňující produkci BA. Bylo zjištěno, že produkci tyraminu podpořila kultivační teplota 30 °C oproti teplotě 6 °C. Teplota je schopna zpomalit buněčný růst, prodloužit generační dobu a úměrně tomu i produkci biogenních aminů.

Rozdíl v produkci tyraminu je znatelný při různých kultivačních teplotách. Nejvyšších hodnot bylo v diplomové práci dosaženo při kultivační teplotě 37 °C. Produkce tyraminu v mléce byla rovněž vyšší při kultivační teplotě 37 °C.

Obecně lze shrnout, že výše popsané vnější faktory mají vliv na produkci biogenních aminů. Množství vyprodukovaných biogenních aminů kmenem *Lactobacillus brevis* 10185-3 bylo stanoveno ve stovkách mg/l (až 600 mg/l). Santos (1996) a Halász (1994) udávají, že hodnoty tyraminu v množství 100 až 800 mg/kg byly hlášeny jako toxické dávky v potravinách. Nařízení komise (ES) 2073/2005 stanovuje pouze maximální přípustné množství histaminu v rybách a produktech z ryb.

Biogenní aminy mohou být ve fermentovaných potravinách produkovány starterovými i non-starterovými mikroorganismy, které byly použity při výrobě nebo které se do nich dostaly během jejich technologického zpracování. Je proto důležité dodržovat při výrobě potravin pravidla správné hygienické praxe a zamezit případné kontaminaci surovin a výrobků.

Přítomnost vyššího množství biogenních aminů v potravinách je z hlediska nepříznivých účinků na lidské zdraví nežádoucí. Proto je důležité nadále zkoumat nová řešení eliminující jejich produkci. Jedním ze způsobů je potlačení růstu dekarboxyláza pozitivních kmenů nebo identifikace mikroorganismů s vysokou dekarboxylázovou aktivitou, které jsou nahrazeny vhodnějšími kmeny.

## ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na vliv vnějších faktorů ovlivňujících tvorbu biogenních aminů bakteriálním kmenem *Lactobacillus brevis* 10185-3 izolovaného ze sýra holandského typu. Byl sledován vliv NaCl, laktózy, teploty a pH. Použité kultivační médium bylo obohaceno o 0,3 % (w/v) aminokyselin, které slouží jako prekurzory biogenních aminů.

- Na základě naměřených výsledků pomocí kapalinové chromatografie byla stanovena produkce biogenních aminů tyraminu a sperminu.
- Ostatní biogenní aminy byly detekovány v zanedbatelném množství nebo vůbec.
- Nejvyšší naměřené množství tyraminu ( $594,6 \pm 17,1$  mg/l) bylo zjištěno v podmínkách *in vitro* při počátečním pH 5,0 v médiu s přídatkem 0,25 % (w/v) laktózy a bez přídatku soli.
- Kultivační teplota 37 °C působila na produkci tyraminu akceleračně a teplota 10 °C brzdila růst kultury i produkci biogenních aminů.
- Počáteční pH média mělo na produkci tyraminu velmi výrazný vliv a produkci tyraminu nejvíce podpořilo pH 5,0.
- Přítomnost NaCl v kultivačním médiu také podpořila produkci tyraminu, kdy ve většině případů byla nejvyšší produkce pozorována při přídatku 1,0 % NaCl.
- Laktóza, jakožto zdroj energie pro přítomné bakterie, měla vliv na růst testovaného kmene i produkci tyraminu v prostředí s pH 5,0 a 6,0. V případě pH 7,0 významný vliv na produkci tyraminu neměla.
- Produkce sperminu byla v průběhu kultivace kolísavá a nejvyšší naměřené množství ( $86,9 \pm 11,6$  mg/l) bylo stanoveno v mléce při kultivační teplotě 37 °C. Naopak nejnížší množství ( $3,5 \pm 0,5$  mg/l) bylo stanoveno *in vitro* při 10 °C.

Koncentrace biogenních aminů je důležitým ukazatelem kvality potravin a proto je snahou sledovat jejich obsah i faktory, které by mohly jejich vznik ovlivnit.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

ALMEIDA, C., J.O. FERNANDES a S.C. CUNHA. A novel dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) gas chromatography-mass spectrometry (GC–MS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer. *Food Control*. 2012, vol. 25, issue 1, s. 380-388. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.10.052.

ANLI, R. Ertan a Mustafa BAYRAM. Biogenic Amines in Wines. *Food Reviews International*. 2008-12-22, vol. 25, issue 1, s. 86-102. DOI: 10.1080/87559120802458552.(8)

BEDIA ERIM, F. Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2013, vol. 52, s. 239-247. DOI: 10.1016/j.trac.2013.05.018.

BENEDUCE, L., A. ROMANO, V. CAPOZZI, P. LUCAS, L. BARNAVON, B. BACH, P. VUCHOT, F. GRIECO a G. SPANO. Biogenic amine in wines. *Annals of Microbiology*. 2010, vol. 60, issue 4, s. 573-578. DOI: 10.1007/s13213-010-0094-4.(54)

Biogenní aminy. In: *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]. 2003 [cit. 2014-03-10]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/>

BOVER-CID, Sara, Maria IZQUIERDO-PULIDO a M.Carmen VIDAL-CAROU. Effect of the interaction between a low tyramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic staphylococci on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 65, 1-2, s. 113-123. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00525-0.

BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Eva POLLAKOVÁ, Tereza PODEŠVOVÁ, Vladimír DRÁB a Stanislav KRÁČMAR. Vliv aerobního/anaerobního prostředí na dekarboxylázovou aktivitu vybraných bakterií mléčného kvašení. *Potravinářstvo*. 2010, roč. 4, č. 2, 5 - 7.

BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Michaela HLOBILOVÁ, Vladimír DRÁB a KRÁČMAR. Komparace různých metod detekce dekarboxylázové aktivity u bakterií mléčného kvašení. *Potravinářstvo*. 2010, roč. 4, mimoriadne číslo, 372 - 380.

BUŇKOVÁ, Leona; BUŇKA, František; HLOBILOVÁ, Michaela; VAŇÁTKOVÁ, Zuzana; NOVÁKOVÁ, Dana; DRÁB, Vladimír. Tyramine Production of Technological Impor-

tant Strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*. 2009, vol. 229, no. 3 s. 533-538. ISSN:1438-2385.

BUŇKOVÁ, Leona; BUŇKA, František; POLLAKOVÁ, Eva; PODEŠVOVÁ, Tereza; DRÁB, Vladimír. 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. ISSN:0168-1605.

CINQUINA, A.L, A CALÌ, F LONGO, L.De SANTIS, A SEVERONI a F ABBALLE. Determination of biogenic amines in fish tissues by ion-exchange chromatography with conductivity detection. *Journal of Chromatography A*. 2004, vol. 1032, 1-2, s. 73-77. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.01.013.

CORKINS, Mark R. Probiotics: Nature Becomes Therapy. In: *The Oley Foundation* [online]. 2006 [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: <http://www.oley.org/lifeline/Probiotics.html>

CSOMÓS, E. a L. SIMON-SARKADI. Characterisation of Tokaj wines based on free amino acids and biogenic amines using ion-exchange chromatography. *Chromatographia*. 2002, vol. 56, issue 1, S185-S188. DOI: 10.1007/BF02494136.

DADÁKOVÁ, Eva, Martin KŘÍŽEK a Tamara PELIKÁNOVÁ. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. 2009, vol. 116, issue 1. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.02.018.

DOSEDĚL, L., L. KALHOTKA, M. VYLETĚLOVÁ a M. NĚMCOVÁ. Vliv teploty a času na dekarboxylázovou aktivitu *Bacillus licheniformis* z drůbežích brojlerů. In: *Sborník příspěvků z II. Konference studentské vědecké a odborné činnosti*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2009, s. 9.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* 2011;9(10):2393. [93 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2393.

EU. Nařízení komise (ES) 2073/2005. In *Úřední věstník Evropské unie*. 2005, L 338, s. 1-26.

FERNANDES, J. O., I. C. JUDAS, M. B. OLIVEIRA, I. M. P. L. V. O FERREIRA a M. A. FERREIRA. A GC-MS method for quantitation of histamine and other biogenic amines in beer. *Chromatographia*. 2001, vol. 53, S1, S327-S331. DOI: 10.1007/BF02490351.

GARDINI, Fausto, Maria MARTUSCELLI, Marisa Carmela CARUSO, Fernanda GALGANO, Maria Antonietta CRUDELE, Fabio FAVATI, Maria Elisabetta GUERZONI a Giovanna SUZZI. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 64, 1-2, s. 105-117. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00445-1.

GREIF, G., GREIFOVÁ, J. DVORAN, J. KAROVIČOVÁ a V. BUCHTOVÁ. Štúdium rastu a produkcie biogénnych aminov niektorými mikroorganizmami za modelových podmienok. *Czech Journal of Food Sciences*. 1999, vol. 17, No. 1.(65)

GREIF, G., M. GREIFOVÁ, 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*. Vol. 45, No. 1, 2006, s. 21-29.

GUERRINI, Simona; MANGANI, Silvia; GRANCHI, Lisa; VINCENZINI, Massimo. Biogenic Amine Production by *Oenococcus Oeni*. *Current Microbiology*. 2002, vol. 44, no. 5 s. 374-378. ISSN:0343-8651.

HÄBERLE, M. (1987). [Salicylates and biogenic amines—natural constituents of foods causing pseudo-allergic reactions.]. *Ernährungs-Umschau*, 34, 287–296 (in German)

HALÁSZ, Anna, Ágnes BARÁTH, Livia SIMON-SARKADI a Wilhelm HOLZAPFEL. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science*. 1994, vol. 5, issue 2, s. 42-49. DOI: 10.1016/0924-2244(94)90070-1.

HONG, Joo Yeon, Na Hyun PARK, Myung Sook OH, Hye Suk LEE, Heesoo PYO a Jongki HONG. Profiling analysis of biogenic amines and their acidic metabolites in mouse brain tissue using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2013, vol. 940. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.09.026.

HUDCOVÁ, Kateřina. *Stanovení biogenních aminů v produktech živočišného původu z farmářské produkce*. UTB Zlín, 2012. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.

HUTKINS, Robert W. *Microbiology and technology of fermented foods*. 1st ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2006. ISBN 978-081-3800-189.

CHIU, Tai-Chia, Yang-Wei LIN, Yu-Fen HUANG a Huan-Tsung CHANG. Analysis of biologically active amines by CE.*ELECTROPHORESIS*. 2006, vol. 27, issue 23. DOI: 10.1002/elps.200600126.

KALAČ, Pavel, Jan ŠAVEL, Martin KŘÍŽEK, Tamara PELIKÁNOVÁ a Marie PROKOPOVÁ. Biogenic amine formation in bottled beer. *Food Chemistry*. 2002, vol. 79, issue 4, s. 431-434. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00193-0.

KALAČ, Pavel, Stanislava ŠVECOVÁ a PELIKÁNOVÁ. Levels of biogenic amines in typical vegetable products. *Food Chemistry*. 2002, vol. 77, issue 3, s. 349-351. DOI: 10.1016/S0308-8146(01)00360-0.(47)

KALHOTKA, Libor, Michaela NĚMCOVÁ, Marcela VYLETĚLOVÁ a Šárka HAVLÍKOVÁ. Dekarboxylázová aktivita *Bacillus licheniformis* a její ovlivnění teplotou a dobou kultivace. *Mlékařské listy*. 2011, č. 124.

KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. 2003. Biogenic amines in food. In *Chemical Papers*, vol. 59, 2003, no. 1, p. 70-79.

KIM, Jae Young, Donghee KIM, Pojeong PARK, Hye-In KANG, Eun Kyung RYU a Soon Mi KIM. Effects of storage temperature and time on the biogenic amine content and microflora in Korean turbid rice wine, Makgeolli. *Food Chemistry*. 2011, vol. 128, issue 1, s. 87-92. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.02.081.

KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.

KOHAJDOVÁ, Z., J. KAROVIČOVÁ a G. GREIF. Biogénne amíny v potravinách. *Potravinárstvo*. 2008, roč. 2, č. 1, 30 - 49.

KOHAJDOVÁ, Zlatica a Jolana KAROVIČOVÁ. Biogénne amíny - vznik, metódy stanovenia a výskyt v potravinách. *Bulletin of Food Research*. 2001, Roč. 40, č. 2.

*Lactobacillus brevis* ATCC 367. In: *Joint Genome Institute* [online]. © 1997-2014 [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: <http://genome.jgi-psf.org/lacbr/lacbr.home.html>

LI, Wenli, Yali PAN, Yan LIU, Xiaoli ZHANG, Jiannong YE a Qingcui CHU. Simultaneous Determination of Eight Typical Biogenic Amines by CZE with Capacitively Coupled

Contactless Conductivity Detection. *Chromatographia*. 2014, vol. 77, 3-4, s. 287-292. DOI: 10.1007/s10337-013-2595-3.

LORENCOVÁ, Eva, Leona BUŇKOVÁ, Pavel PLEVA, Vladimír DRÁB, Vlastimil KUBÁŇ a František BUŇKA. Selected factors influencing the ability of *Bifidobacterium* to form biogenic amines. *International Journal of Food Science*. 2013. DOI: 10.1111/ijfs.12427.

MAGONOVA, Ekaterina. *Lactobacillus brevis*. In: *MicrobeWiki* [online]. 2011 [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: [http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Lactobacillus\\_brevis](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Lactobacillus_brevis)

MARCOBAL, Ángela, Pedro Jesús MARTÍN-ÁLVAREZ, María Victoria MORENO-ARRIBAS a Rosario MUÑOZ. A multifactorial design for studying factors influencing growth and tyramine production of the lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* CECT 4669 and *Enterococcus faecium* BIFI-58. *Research in Microbiology*. 2006, vol. 157, issue 5, s. 417-424. DOI: 10.1016/j.resmic.2005.11.006.

MCMEEKIN, T. *Detecting pathogens in food*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2003, 370 s. ISBN 08-493-1756-8.

MORENO-ARRIBAS, V; LONVAUD-FUNEL, A. Tyrosine Decarboxylase Activity of *Lactobacillus Brevis* IOEB 9809 Isolated from Wine and *L. Brevis* ATCC 367. *FEMS Microbiology Letters*. 1999, vol. 180, no. 1 s. 55-60. ISSN:0378-1097.

NEHASILOVÁ, D. Biogenní aminy v rybách, rybích produktech a korýších. In: *Informační centrum bezpečnosti potravin* [online]. 2011 [cit. 2014-03-10]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/biogenni-aminy-v-rybach-rybich-produktech-a-korysich.aspx>

ÖNAL, Armağan, TEKKELI a Cem ÖNAL. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. 2013, vol. 138, issue 1, s. 509-515. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.10.056.

PEREIRA, C I; MATOS, D; SAN ROMÃO, M V; CRESPO, M T Barreto. Dual Role for the Tyrosine Decarboxylation Pathway in *Enterococcus Faecium* E17: Response to an Acid Challenge and Generation of a Proton Motive Force. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, vol. 75, no. 2 s. 345-352. ISSN:1098-5336.



PINHO, Olívia, Isabel M.P.L.V.O FERREIRA, Eulália MENDES, Bruno M OLIVEIRA a Margarida FERREIRA. Effect of temperature on evolution of free amino acid and biogenic amine contents during storage of Azeitão cheese. *Food Chemistry*. 2001, vol. 75, issue 3, s. 287-291. DOI: 10.1016/S0308-8146(01)00109-1.

PLEVA, Pavel, Leona BUŇKOVÁ, Andrea LAUKOVÁ, Eva LORENCOVÁ, Vlastimil KUBÁŇ a František BUŇKA. Factors affected decarboxylation activity of *Enterococcus faecium* isolated from rabbit. *Potravinarstvo*. 2012-04-01, vol. 6, issue 2, s. 46 - 49. DOI: 10.5219/182.

RABIE, M. A., ELSAIDY, S., EL-BADAWY, A., SILIHA, H., & MALCATA, F. X. (2011). Biogenic amine contents in selected egyptian fermented foods as determined by ion-exchange chromatography. *Journal of Food Protection*, 74(4), 681-5.

REJCHRTOVÁ, E., L. ZEMÁNEK, P. SLÁDKOVÁ a T. KOMPRDA. The Biogenic Amines Content of Cheese Ripening Under the Smear During Production. *MENDELNET*. 2010.(510)

REM Galerie. In: *Botanik - Ultrastrukturforschung* [online]. [cit. 2014-03-22]. Dostupné z: [http://ultrastruktur.bio.lmu.de/de/forschung/rem1/re\\_galerie/lactobacillus.html](http://ultrastruktur.bio.lmu.de/de/forschung/rem1/re_galerie/lactobacillus.html)

RIZVI, Syed Asad Ali, Duc Phuc DO a Ayman Mahmoud SALEH. Fundamentals of micellar electrokinetic chromatography (MEKC). *European Journal of Chemistry*. 2011-06-30, vol. 2, issue 2, s. 276-281. DOI: 10.5155/eurjchem.2.2.276-281.401.

ROBINSON, R, Carl A BATT a P PATEL. *Encyclopedia of food microbiology*. San Diego: Academic Press, c2000, 3 v. ISBN 01222707383.

SACCANI, G., E. TANZI, P. PASTORE, S. CAVALLI a M. REY. Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by suppressed ion chromatography-mass spectrometry using a cation-exchange column. *Journal of Chromatography A*. 2005, vol. 1082, issue 1, s. 43-50. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.05.030.

SALMINEN, Seppo, Atte von WRIGHT a Arthur OUWEHAND. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. 3rd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, c2004, 633 p. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.). ISBN 08-247-5332-1.

Sandwich ELISA Technology Overview. *MitoSciences* [online]. [cit. 2014-03-22]. Dostupné z: [https://www.mitosciences.com/sandwich\\_elisa\\_assay\\_overview.html](https://www.mitosciences.com/sandwich_elisa_assay_overview.html)

SANTOS, M.H.Silla. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, vol. 29, 2-3. DOI: 10.1016/0168-1605(95)00032-1.

SHALABY, Ali R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 1996, vol. 29, issue 7, s. 675-690. DOI: 10.1016/S0963-9969(96)00066-X.(27)

SMĚLÁ, D., P. PECHOVÁ, T. KOMPRDA, B. KLEJDUS a V. KUBÁŇ. Liquid Chromatographic Determination of Biogenic Amines in a Meat Product during Fermentation and Long-term Storage. *Czech J. Food Sci.* 2003, Vol. 21, No. 5, 167 - 175.(202)

SMITH, T.A. Amines in food. *Food Chemistry*. 1981, vol. 6, issue 3, s. 169-200. DOI: 10.1016/0308-8146(81)90008-X.

SPANO, G, P RUSSO, A LONVAUD-FUNEL, P LUCAS, H ALEXANDRE, C GRANDVALET, E COTON, M COTON, L BARNAVON, B BACH, F RATTRAY, A BUNTE, C MAGNI, V LADERO, M ALVAREZ, M FERNÁNDEZ, P LOPEZ, P F DE PALENCIA, A CORBI, H TRIP a LOLKEMA. Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2010, vol. 64, S95-S100. DOI: 10.1038/ejcn.2010.218.

STANDAROVÁ, EVA, IVANA BORKOVCOVÁ, MARTA DUŠKOVÁ a LENKA VORLOVÁ. Production of tyramine and histamine by bacteria isolated from Czech blue-veined cheese Niva. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2009, Vol. 48, No. 4, 189 - 194.(20)

ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008, 363 s. ISBN 978-80-200-1703-1.

ŠTULÍK, Karel a kol. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 264 s. ISBN 80-246-0852-9.

VALSAMAKI, Konstantina, Alexandra MICHAELIDOU a Anna POLYCHRONIADOU. Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chemistry*. 2000, vol. 71, issue 2. DOI: 10.1016/S0308-8146(00)00168-0.(218)

VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin* 3. Vyd. 2., upr. Tábor: OSSIS, 2002, 343 s. ISBN 80-86659-02-x.

VINCI, G a M.L ANTONELLI. Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat. *Food Control*. 2002, vol. 13, issue 8, s. 519-524. DOI: 10.1016/S0956-7135(02)00031-2.(189)

VINCI, G a M.L ANTONELLI. Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat. *Food Control*. 2002, vol. 13, issue 8, s. 519-524. DOI: 10.1016/S0956-7135(02)00031-2.(189)

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

|                   |   |
|-------------------|---|
| BA                | biogenní aminy                            |
| ES                | Evropské společenství                     |
| NaCl              | chlorid sodný                             |
| NaNO <sub>2</sub> | dusitan sodný                             |
| O <sub>2</sub>    | kyslík                                    |
| CO <sub>2</sub>   | oxid uhličitý                             |
| AMK               | aminokyseliny                             |
| MS                | hmotnostní detektor                       |
| GC                | plynová chromatografie                    |
| CE                | kapilární elektroforéza                   |
| HPLC              | vysokoúčinná kapalinová chromatografie    |
| PCR               | polymerázová řetězová reakce              |
| UV/VIS            | spektrofotometrický detektor              |
| OPA               | <i>o</i> – ftalaldehyd                    |
| UPLC              | ultra účinná kapalinová chromatografie    |
| MPa               | mega Pascal                               |
| TCD               | detektor tepelné vodivosti                |
| ECD               | detektor elektronového záchytu            |
| FID               | plamenově ionizační detektor              |
| FPD               | plamenově fotometrický detektor           |
| IBCF              | izobutyl chloroformát                     |
| AAA               | analyzátor aminokyselin                   |
| MSA               | metansulfonová kyselina                   |
| LIF               | laserově indukovaná fluorescenční detekce |

---

|         |   |
|---------|---|
| CZE     | kapilární zónová elektroforéza                              |
| MEKC    | micelární elektrokinetická chromatografie                   |
| SDS     | dodecylsírán sodný  |
| ELISA   | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay                           |
| DNS-Cl  | danzylchlorid   |
| RP-HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích |
| MRS     | Mangův, Rogosův a Sharpův agar                              |
| DAD     | detektor diodového pole                                     |
| CPM     | celkový počet mikroorganismů                                |
| TYR     | tyramin   |
| USA     | spojené státy americké                                      |

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

|   |    |
|---|----|
| Obrázek 1: Obecná rovnice dekarboxylace aminokyselin .....  | 14 |
| Obrázek 2: Biogenní aminy a jejich prekurzory a syntéza spermidinu (Anli a kol., 2008).....   | 16 |
| Obrázek 3: <i>Lactobacillus plantarum</i> (REM galerie).....  | 23 |
| Obrázek 4: EMP dráha využívaná homofermentativními bakteriemi mléčného kvašení (Hutkins, 2006) .....  | 25 |
| Obrázek 5: Fosfoketolázová dráha využívaná heterofermentativními bakteriemi mléčného kvašení (Hutkins, 2006) .....  | 27 |
| Obrázek 6: <i>Lactobacillus brevis</i> v elektronovém mikroskopu (Corkins, 2006) .....  | 28 |
| Obrázek 7: <i>o</i> -ftalaldehyd.....   | 30 |
| Obrázek 8: Danzylchlorid .....  | 30 |
| Obrázek 9: Princip micelární elektrokinetické chromatografie (Rizvi a kol., 2011).....  | 33 |
| Obrázek 10: Sendvičová ELISA (MitoSciences) .....   | 34 |
| Obrázek 11: Kinetika produkce TYR během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 <i>in vitro</i> – vliv pH (37 °C).....  | 43 |
| Obrázek 12: Kinetika produkce TYR během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 při iniciačním pH 5,0 (37 °C) s přidavkem různé koncentrace soli. ....            | 44 |
| Obrázek 13: Kinetika produkce TYR během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 při iniciačním pH 6,0 (37 °C) s přidavkem různé koncentrace soli. ....            | 44 |
| Obrázek 14: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 při iniciačním pH 7,0 (37 °C) s přidavkem různé koncentrace soli. .... | 45 |
| Obrázek 15: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 při iniciačním pH 5,0 – vliv laktózy (37 °C).....                      | 46 |
| Obrázek 16: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 při iniciačním pH 6,0 – vliv laktózy (37 °C).....                      | 46 |
| Obrázek 17: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 při iniciačním pH 5,0 s přidavkem 0,25 % (w/v) laktózy (37 °C) .....   | 47 |
| Obrázek 18: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 při iniciačním pH 5,0 s přidavkem 0,50 % (w/v) laktózy (37 °C) .....   | 48 |

|   |    |
|---|----|
| Obrázek 19: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 <i>in vitro</i> při iniciačním pH 6,0 s přidavkem 1,00 % (w/v) laktózy (37 °C) ..... | 48 |
| Obrázek 20: Vliv přidavku laktózy na růst <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 bez přidavku NaCl a pH 6,0 – 37 °C.....   | 49 |
| Obrázek 21: Vliv přidavku laktózy na růst <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 při přidavku 1,0 % (w/v) NaCl a pH 6,0 – 37 °C .....  | 50 |
| Obrázek 22: Vliv přidavku laktózy na růst <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 při přidavku 2,0 % (w/v) NaCl a pH 6,0 – 37 °C .....  | 50 |
| Obrázek 23: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 <i>in vitro</i> – vliv pH (10 °C).....   | 52 |
| Obrázek 24: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 <i>in vitro</i> při iniciačním pH 5,0 – vliv NaCl (10 °C).....                       | 53 |
| Obrázek 25: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 <i>in vitro</i> při iniciačním pH 6,0 – vliv NaCl (10 °C).....                       | 53 |
| Obrázek 26: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 <i>in vitro</i> při iniciačním pH 5,0 – vliv laktózy (10 °C) .....                   | 54 |
| Obrázek 27: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 <i>in vitro</i> při iniciačním pH 6,0 – vliv laktózy (10 °C) .....                   | 55 |
| Obrázek 28: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 <i>in vitro</i> při iniciačním pH 7,0 – vliv laktózy (10 °C) .....                   | 55 |
| Obrázek 29: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 <i>in vitro</i> při iniciačním pH 5,0 s přidavkem 0,25 % (w/v) laktózy (10 °C) ..... | 56 |
| Obrázek 30: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 <i>in vitro</i> při iniciačním pH 5,0 s přidavkem 0,50 % (w/v) laktózy (10 °C) ..... | 57 |
| Obrázek 31: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 <i>in vitro</i> při iniciačním pH 6,0 s přidavkem 1,00 % (w/v) laktózy (10 °C) ..... | 57 |
| Obrázek 32: Vliv přidavku laktózy na růst <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 bez přidavku NaCl a pH 5,0 (10 °C) .....  | 58 |

|  |    |
|--|----|
| Obrázek 33: Vliv přidavku laktózy na růst <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 při přidavku 1,0 % (w/v) NaCl a pH 5,0 (10 °C).....                        | 59 |
| Obrázek 34: Vliv přidavku laktózy na růst <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 při přidavku 2,0 % (w/v) NaCl a pH 5,0 (10 °C).....                        | 59 |
| Obrázek 35: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 v mléce – vliv pH (37 °C) .....                         | 61 |
| Obrázek 36: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 v mléce při iniciačním pH 5,0 – vliv NaCl (37 °C) ..... | 61 |
| Obrázek 37: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 v mléce při iniciačním pH 6,0 – vliv NaCl (37 °C) ..... | 62 |
| Obrázek 38: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 v mléce a v mléce s přidavkem AMK (37 °C).....          | 62 |
| Obrázek 39: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 v mléce – vliv pH (10 °C) .....                         | 64 |
| Obrázek 40: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 v mléce při iniciačním pH 5,0 – vliv NaCl (10 °C) ..... | 65 |
| Obrázek 41: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 v mléce při iniciačním pH 6,0 – vliv NaCl (10 °C) ..... | 65 |
| Obrázek 42: Kinetika produkce tyraminu (TYR) během kultivace <i>Lactobacillus brevis</i> 10185-3 v mléce a v mléce s přidavkem AMK (10 °C).....          | 66 |



**SEZNAM TABULEK**

|  |    |
|--|----|
| Tabulka 1: Názvy a vzorce jednotlivých biogenních aminů a polyaminů (Hudcová, 2012).....                   | 15 |
| Tabulka 2: Přehled vybraných biogenních aminů a jejich biologický význam (Velíšek, 1999).....              | 18 |
| Tabulka 3: Výskyt mikroorganismů a biogenních aminů ve vybraných živočišných produktech (Velíšek) .....    | 20 |
| Tabulka 4: Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů (Kohajdová, 2008).....             | 21 |
| Tabulka 5: Složení kultivačního média MRS .....  | 38 |
| Tabulka 6: Složení kultivačního média MRS agar.....  | 38 |
| Tabulka 7: Lineární gradientový eluční program HPLC .....  | 41 |
| Tabulka 8: Nejvyšší naměřené množství biogenních aminů v mléce a v bujónu v posledním odběrovém čase ..... | 67 |
| Tabulka 9: Hodnoty pH v podmínkách in vitro při 37 °C a pH 5,0. ....                                       | 87 |
| Tabulka 10: Hodnoty pH v podmínkách in vitro při 37 °C a pH 6,0.....                                       | 87 |
| Tabulka 11: Hodnoty pH v podmínkách in vitro při 37 °C a pH 7,0.....                                       | 88 |
| Tabulka 12: Hodnoty pH v podmínkách in vitro při 10 °C a pH 5,0.....                                       | 88 |
| Tabulka 13: Hodnoty pH v podmínkách in vitro při 10 °C a pH 6,0.....                                       | 89 |
| Tabulka 14: Hodnoty pH v podmínkách in vitro při 10 °C a pH 7,0.....                                       | 89 |
| Tabulka 15: Hodnoty pH v mléce při 37 °C.....  | 90 |
| Tabulka 16: Hodnoty pH v mléce při 10 °C.....  | 90 |

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: Naměřené hodnoty pH *in vitro*

Příloha II: Naměřené hodnoty pH v mléce

## PŘÍLOHA I: NAMĚŘENÉ HODNOTY pH *IN VITRO*

Tabulka 9: Hodnoty pH v podmínkách in vitro při 37 °C a pH 5,0.

| čas [hod] | 0/0/5 | 0/1/5 | 0/2/5 | 0,25/0/5 | 0,25/1/5 | 0,25/2/5 | 0,5/0/5 | 0,5/1/5 | 0,5/2/5 | 1/0/5 | 1/1/5 | 1/2/5 |
|-----------|-------|-------|-------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|-------|-------|-------|
| 2         | 5,01  | 5,05  | 5,00  | 5,13     | 5,06     | 5,06     | 5,02    | 5,04    | 5,06    | 5,03  | 5,01  | 5,01  |
| 4         | 5,06  | 5,04  | 4,98  | 5,12     | 5,04     | 5,04     | 5,02    | 5,01    | 5,02    | 5,04  | 5,03  | 5,00  |
| 6         | 5,19  | 5,04  | 5,01  | 5,17     | 5,06     | 5,07     | 5,09    | 5,07    | 5,04    | 5,11  | 5,05  | 5,03  |
| 8         | 5,20  | 5,10  | 5,04  | 5,15     | 5,06     | 5,06     | 5,14    | 5,06    | 5,07    | 5,12  | 5,05  | 5,05  |
| 10        | 5,18  | 5,08  | 5,04  | 5,15     | 5,06     | 5,07     | 5,14    | 5,06    | 5,04    | 5,12  | 5,04  | 5,01  |
| 12        | 5,18  | 5,07  | 5,02  | 5,15     | 5,06     | 5,06     | 5,14    | 5,06    | 5,04    | 5,11  | 5,04  | 5,01  |
| 24        | 5,52  | 6,33  | 6,32  | 5,99     | 5,14     | 5,35     | 5,17    | 5,07    | 5,17    | 5,13  | 5,04  | 5,92  |
| 48        | 5,54  | 6,32  | 5,55  | 5,23     | 5,19     | 6,20     | 5,19    | 5,08    | 5,33    | 5,11  | 5,03  | 5,00  |
| kontrola  | 5,01  | 5,01  | 5,00  | 5,02     | 5,02     | 5,02     | 5,02    | 5,02    | 5,02    | 5,02  | 5,03  | 5,01  |

Tabulka 10: Hodnoty pH v podmínkách in vitro při 37 °C a pH 6,0.

| čas [hod] | 0/0/6 | 0/1/6 | 0/2/6 | 0,25/0/6 | 0,25/1/6 | 0,25/2/6 | 0,5/0/6 | 0,5/1/6 | 0,5/2/6 | 1/0/6 | 1/1/6 | 1/2/6 |
|-----------|-------|-------|-------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|-------|-------|-------|
| 2         | 6,05  | 6,05  | 6,03  | 6,01     | 6,07     | 6,01     | 5,96    | 5,94    | 5,98    | 5,92  | 5,84  | 5,84  |
| 4         | 6,08  | 6,05  | 6,05  | 6,01     | 6,06     | 6,00     | 5,98    | 5,93    | 5,93    | 5,86  | 5,83  | 5,85  |
| 6         | 6,10  | 6,07  | 6,07  | 6,06     | 6,06     | 6,02     | 6,01    | 5,93    | 5,92    | 5,87  | 5,83  | 5,83  |
| 8         | 6,14  | 6,09  | 6,11  | 6,06     | 6,10     | 6,02     | 6,01    | 5,97    | 5,97    | 5,90  | 5,86  | 5,88  |
| 10        | 6,11  | 6,05  | 6,06  | 6,03     | 6,09     | 6,00     | 6,00    | 5,96    | 5,97    | 5,85  | 5,86  | 5,85  |
| 12        | 6,11  | 6,06  | 6,05  | 6,02     | 6,28     | 6,00     | 5,99    | 5,94    | 5,95    | 5,87  | 5,83  | 5,84  |
| 24        | 6,14  | 6,06  | 6,60  | 6,47     | 6,68     | 6,43     | 6,52    | 6,74    | 6,48    | 6,48  | 6,63  | 6,37  |
| 48        | 6,13  | 6,05  | 6,05  | 6,02     | 6,43     | 5,99     | 5,99    | 5,93    | 5,94    | 5,85  | 5,84  | 5,85  |
| kontrola  | 5,99  | 5,99  | 5,99  | 6,01     | 6,04     | 5,99     | 5,98    | 5,98    | 5,98    | 6,00  | 6,02  | 6,01  |

Tabulka 11: Hodnoty pH v podmínkách in vitro při 37 °C a pH 7,0.

| čas [hod] | 0/0/7 | 0/1/7 | 0/2/7 | 0,25/0/7 | 0,25/1/7 | 0,25/2/7 | 0,5/0/7 | 0,5/1/7 | 0,5/2/7 | 1/0/7 | 1/1/7 | 1/2/7 |
|-----------|-------|-------|-------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|-------|-------|-------|
| 2         | 7,02  | 6,98  | 6,99  | 6,92     | 7,02     | 7,02     | 6,99    | 7,02    | 6,99    | 7,01  | 6,99  | 7,01  |
| 4         | 7,06  | 6,97  | 6,98  | 6,88     | 7,04     | 7,06     | 7,06    | 6,84    | 6,98    | 7,02  | 7,01  | 7,01  |
| 6         | 7,09  | 6,98  | 6,99  | 6,93     | 7,06     | 7,10     | 7,17    | 6,95    | 7,00    | 7,02  | 7,02  | 7,01  |
| 8         | 7,05  | 6,98  | 6,99  | 6,87     | 7,09     | 7,04     | 7,09    | 6,84    | 7,01    | 7,04  | 7,02  | 7,01  |
| 10        | 7,00  | 6,98  | 6,99  | 6,85     | 6,88     | 7,03     | 7,10    | 6,85    | 7,02    | 7,05  | 7,14  | 7,09  |
| 12        | 7,04  | 6,98  | 6,98  | 6,86     | 6,84     | 7,01     | 7,03    | 6,80    | 6,96    | 7,05  | 7,24  | 7,08  |
| 24        | 7,04  | 6,97  | 6,97  | 6,87     | 6,93     | 7,06     | 7,06    | 6,84    | 6,94    | 7,06  | 7,28  | 7,19  |
| 48        | 6,99  | 6,97  | 6,99  | 6,85     | 6,99     | 7,03     | 7,26    | 6,99    | 6,90    | 7,10  | 7,32  | 7,20  |
| kontrola  | 7,03  | 6,98  | 6,99  | 7,01     | 7,02     | 7,00     | 6,99    | 7,00    | 7,01    | 6,99  | 7,00  | 7,00  |

Tabulka 12: Hodnoty pH v podmínkách in vitro při 10 °C a pH 5,0.

| čas [den] | 0/0/5 | 0/1/5 | 0/2/5 | 0,25/0/5 | 0,25/1/5 | 0,25/2/5 | 0,5/0/5 | 0,5/1/5 | 0,5/2/5 | 1/0/5 | 1/1/5 | 1/2/5 |
|-----------|-------|-------|-------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|-------|-------|-------|
| 1         | 5,01  | 5,05  | 5,01  | 5,06     | 5,07     | 5,05     | 5,08    | 5,05    | 5,05    | 5,05  | 5,09  | 5,09  |
| 2         | 5,04  | 5,07  | 5,03  | 5,06     | 5,09     | 5,07     | 5,10    | 5,07    | 5,07    | 5,08  | 5,12  | 5,11  |
| 3         | 5,05  | 5,08  | 5,03  | 5,08     | 5,07     | 5,06     | 5,09    | 5,04    | 5,07    | 5,08  | 5,10  | 5,11  |
| 6         | 5,02  | 5,09  | 5,02  | 5,05     | 5,05     | 5,06     | 5,06    | 5,03    | 5,03    | 5,03  | 5,06  | 5,09  |
| 8         | 4,97  | 5,01  | 4,97  | 5,03     | 5,04     | 5,02     | 5,04    | 5,02    | 5,04    | 5,03  | 5,07  | 5,09  |
| 10        | 5,11  | 5,35  | 5,16  | 5,21     | 5,12     | 5,35     | 5,10    | 5,23    | 5,13    | 5,22  | 5,21  | 5,47  |
| 13        | 5,10  | 5,20  | 5,17  | 5,08     | 5,11     | 5,15     | 5,09    | 5,17    | 5,08    | 5,06  | 5,10  | 5,14  |
| 15        | 6,17  | 6,05  | 5,80  | 5,37     | 5,28     | 5,33     | 5,13    | 5,20    | 5,21    | 5,12  | 5,22  | 5,29  |
| kontrola  | 5,01  | 5,05  | 5,00  | 5,05     | 5,04     | 5,02     | 5,07    | 5,03    | 5,03    | 5,04  | 5,06  | 5,05  |

Tabulka 13: Hodnoty pH v podmínkách in vitro při 10 °C a pH 6,0.

| čas [den] | 0/0/6 | 0/1/6 | 0/2/6 | 0,25/0/6 | 0,25/1/6 | 0,25/2/6 | 0,5/0/6 | 0,5/1/6 | 0,5/2/6 | 1/0/6 | 1/1/6 | 1/2/6 |
|-----------|-------|-------|-------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|-------|-------|-------|
| 1         | 6,16  | 6,13  | 6,13  | 6,14     | 6,09     | 6,11     | 6,05    | 6,05    | 6,05    | 5,96  | 5,95  | 5,96  |
| 2         | 6,20  | 6,16  | 6,15  | 6,16     | 6,06     | 6,13     | 6,10    | 6,09    | 6,08    | 6,00  | 6,00  | 5,99  |
| 3         | 6,21  | 6,20  | 6,17  | 6,17     | 6,13     | 6,15     | 6,09    | 6,07    | 6,09    | 6,02  | 6,07  | 6,04  |
| 6         | 6,16  | 6,16  | 6,12  | 6,16     | 6,09     | 6,12     | 6,13    | 6,03    | 6,02    | 5,96  | 5,94  | 5,99  |
| 8         | 6,27  | 6,22  | 6,26  | 6,26     | 6,25     | 6,21     | 6,26    | 6,36    | 6,27    | 6,32  | 6,36  | 6,30  |
| 10        | 6,51  | 6,80  | 6,44  | 6,77     | 6,47     | 6,69     | 6,46    | 6,78    | 6,50    | 6,68  | 6,51  | 6,65  |
| 13        | 6,21  | 6,31  | 6,19  | 6,33     | 6,15     | 6,23     | 6,11    | 6,20    | 6,08    | 6,21  | 6,00  | 6,20  |
| 15        | 6,53  | 6,60  | 6,38  | 6,46     | 6,27     | 6,37     | 6,20    | 6,25    | 6,19    | 6,14  | 6,09  | 6,17  |
| kontrola  | 6,13  | 6,10  | 6,07  | 6,11     | 6,06     | 6,07     | 6,06    | 6,03    | 6,00    | 5,95  | 5,93  | 5,91  |

Tabulka 14: Hodnoty pH v podmínkách in vitro při 10 °C a pH 7,0.

| čas [den] | 0/0/7 | 0/1/7 | 0/2/7 | 0,25/0/7 | 0,25/1/7 | 0,25/2/7 | 0,5/0/7 | 0,5/1/7 | 0,5/2/7 | 1/0/7 | 1/1/7 | 1/2/7 |
|-----------|-------|-------|-------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|-------|-------|-------|
| 1         | 7,05  | 7,02  | 7,04  | 7,01     | 7,02     | 7,03     | 7,03    | 7,02    | 7,01    | 7,01  | 7,04  | 7,09  |
| 2         | 7,06  | 7,02  | 7,04  | 7,03     | 7,03     | 7,04     | 7,04    | 7,02    | 7,04    | 7,02  | 7,05  | 7,10  |
| 3         | 7,05  | 7,01  | 7,01  | 7,03     | 7,02     | 7,02     | 7,04    | 7,02    | 7,05    | 7,06  | 7,06  | 7,07  |
| 6         | 6,99  | 6,95  | 6,96  | 6,98     | 6,96     | 6,97     | 6,99    | 6,96    | 6,97    | 7,01  | 7,01  | 7,06  |
| 8         | 6,98  | 6,94  | 6,96  | 6,99     | 6,98     | 6,97     | 7,03    | 6,98    | 6,99    | 7,04  | 7,03  | 7,04  |
| 10        | 6,99  | 6,95  | 6,96  | 6,99     | 6,98     | 6,98     | 7,03    | 7,00    | 7,02    | 7,04  | 7,12  | 7,10  |
| 13        | 7,01  | 6,97  | 6,98  | 7,00     | 7,02     | 6,99     | 7,10    | 7,02    | 7,06    | 7,01  | 7,17  | 7,06  |
| 15        | 7,05  | 7,06  | 7,03  | 7,13     | 7,08     | 7,07     | 7,14    | 7,13    | 7,13    | 7,29  | 7,33  | 7,33  |
| kontrola  | 7,00  | 7,00  | 7,02  | 7,01     | 7,00     | 7,00     | 7,02    | 7,00    | 7,01    | 7,01  | 7,00  | 7,01  |

## PŘÍLOHA II: NAMĚŘENÉ HODNOTY pH V MLÉCE

Tabulka 15: Hodnoty pH v mléce při 37 °C

| čas [hod] | 0/5  | 1/5  | 2/5  | 0/6  | 1/6  | 2/6  | 0/7  | 1/7  | 2/7  | A    | M    |
|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 2         | 5,07 | 5,03 | 5,11 | 6,03 | 6,01 | 6,04 | 6,91 | 7,05 | 6,96 | 6,66 | 6,46 |
| 4         | 4,99 | 5,04 | 5,12 | 6,08 | 6,00 | 6,02 | 6,78 | 6,92 | 6,85 | 6,44 | 6,70 |
| 6         | 5,04 | 4,95 | 5,11 | 5,97 | 5,95 | 6,00 | 6,56 | 6,69 | 6,75 | 6,47 | 6,63 |
| 8         | 4,93 | 4,72 | 5,07 | 5,25 | 6,07 | 6,09 | 6,54 | 6,42 | 6,78 | 6,61 | 6,47 |
| 10        | 4,96 | 4,96 | 5,05 | 6,12 | 5,93 | 5,04 | 5,93 | 6,50 | 6,84 | 6,45 | 6,61 |
| 12        | 4,88 | 5,04 | 5,09 | 6,17 | 6,01 | 5,29 | 6,46 | 6,72 | 6,31 | 6,46 | 6,55 |
| 24        | 4,76 | 5,05 | 5,21 | 6,25 | 4,98 | 5,52 | 5,66 | 6,92 | 5,68 | 6,51 | 6,57 |
| 48        | 4,79 | 4,79 | 4,93 | 4,45 | 5,73 | 5,22 | 5,82 | 6,88 | 6,89 | 6,40 | 6,67 |
| kontrola  | 5,10 | 5,09 | 5,11 | 6,02 | 6,02 | 6,05 | 7,02 | 7,02 | 7,03 | 6,48 | 6,43 |

Tabulka 16: Hodnoty pH v mléce při 10 °C

| čas [den] | 0/5  | 1/5  | 2/5  | 0/6  | 1/6  | 2/6  | 0/7  | 1/7  | 2/7  | A    | M    |
|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1         | 5,37 | 5,21 | 5,24 | 6,27 | 6,24 | 6,31 | 6,96 | 6,95 | 6,98 | 6,58 | 6,77 |
| 2         | 5,40 | 5,25 | 5,26 | 6,26 | 6,26 | 6,31 | 6,98 | 7,04 | 7,08 | 6,60 | 6,75 |
| 3         | 5,46 | 5,23 | 5,22 | 6,27 | 6,22 | 6,27 | 6,98 | 6,91 | 6,94 | 6,57 | 6,71 |
| 6         | 5,53 | 5,39 | 5,39 | 6,37 | 6,29 | 6,31 | 6,99 | 6,91 | 6,93 | 6,59 | 6,68 |
| 8         | 5,53 | 5,34 | 5,32 | 6,27 | 6,22 | 6,27 | 6,94 | 6,89 | 6,89 | 6,59 | 6,73 |
| 10        | 5,81 | 5,76 | 5,82 | 6,69 | 6,60 | 6,60 | 7,01 | 6,94 | 6,94 | 6,86 | 6,46 |
| 13        | 6,19 | 6,15 | 6,04 | 6,96 | 6,71 | 6,75 | 7,18 | 7,07 | 7,04 | 6,73 | 6,66 |
| 15        | 6,52 | 6,47 | 6,46 | 7,32 | 7,19 | 7,20 | 7,31 | 7,18 | 7,13 | 7,60 | 6,00 |
| kontrola  | 5,35 | 5,19 | 5,20 | 6,28 | 6,27 | 6,31 | 6,97 | 7,04 | 7,04 | 6,56 | 6,79 |