

DIZERTAČNÍ PRÁCE

**FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ
DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITU
BAKTERIÍ RODU *LACTOBACILLUS*
A *BIFIDOBACTERIUM***

**FACTORS INFLUENCING DECARBOXYLASE ACTIVITY
OF GENERA *LACTOBACILLUS* AND *BIFIDOBACTERIUM***

Autor: **Ing. Eva Lorencová**

Studijní program: P2901 Chemie a technologie potravin

Studijní obor: 2901V013 Technologie potravin

Školitel: doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Konzultant: doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

Zlín, 2015

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis**.

Publikace byla vydána v roce 2015

Klíčová slova: dekarboxylázová aktivita, biogenní aminy, kultivační podmínky, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, HPLC

Keywords: decarboxylase activity, biogenic amines, cultivation conditions, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, HPLC

„Nejkrásnější a nejhlubší pocit, jaký může člověk zažít, je poznat tajemno. To je základním principem náboženství, stejně tak jako veškerého seriózního úsilí v umění a ve vědě.“

Albert Einstein

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala mé školitelce, doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. a konzultantovi doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a svůj čas, který mi věnovali během celého doktorského studia. Mé další poděkování patří laborantkám Ing. et Ing. Ludmile Zálešákové, Lence Machákové a Bc. Veronice Kučabové za pomoc a vytvoření příznivého pracovního prostředí v chemických a mikrobiologických laboratořích. Mé díky patří rovněž kolegům z Ústavu technologie potravin a Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí FT UTB ve Zlíně za podporu a motivaci k sepsování této práce. V neposlední řadě bych ráda vyjádřila svůj velký dík mým blízkým za trpělivost a důvěru, kterou do mne po celou dobu studia vkládali.

Děkuji všem, kteří se jakýmkoliv způsobem přičinili na vzniku této dizertační práce.

Tato práce vznikla za podpory grantu Grantové agentury České republiky GAČR 503/11/1417 a interních grantů Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně (IGA/12/FT/11/D, IGAFT/2012/027 a IGA/FT/2013/013).

OBSAH

OBSAH	4
ABSTRAKT	6
ABSTRACT	8
SEZNAM TABULEK	14
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	16
1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	17
1.1 Charakterizace biogenních aminů, polyaminů a jejich vzniku	18
1.2 Fyziologické působení biogenních aminů na lidský organizmus	20
1.3 Tvorba biogenních aminů potravinářsky významnými bakteriemi	22
1.4 Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu bakterií	23
1.4.1 Vliv pH.....	24
1.4.2 Dostupnost prekurzorů biogenních aminů a pyridoxalfosfátu	25
1.4.3 Vliv teploty	26
1.4.4 Vliv zkvasitelných cukrů	27
1.4.5 Vliv NaCl	27
1.4.6 Vliv přístupu kyslíku a redox-potenciál růstového prostředí	28
1.4.7 Vliv etanolu.....	29
1.5 Biogenní aminy ve fermentovaných potravinách a nápojích	30
1.5.1 Obsah biogenních aminů ve fermentovaných mléčných výrobcích a sýrech	31
1.5.2 Obsah biogenních aminů ve fermentovaných alkoholických nápojích	33
1.5.3 Obsah biogenních aminů v ostatních fermentovaných výrobcích	36
1.6 Bakterie mléčného kvašení a bifidobakterie	38
1.6.2 Rod <i>Lactobacillus</i>	40
1.6.2 Rod <i>Bifidobacterium</i>	41
1.7 Obecný přehled způsobů detekce biogenních aminů	44
1.7.1 Chromatografické a elektroforetické metody stanovení obsahu biogenních aminů ve vzorku.....	44
1.7.2 Molekulárně genetické metody stanovení potenciální dekarboxylázové aktivity	45
1.7.3 Mikrobiologická kultivační metoda stanovení dekarboxylázové aktivity	45
1.7.4 Imuno-enzymatické stanovení biogenních aminů ve vzorku.....	45
2 CÍL PRÁCE	47
3 ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ	48
3.1 Popis experimentů	48
3.1.1 Charakteristika Experimentu I	48
3.1.2 Charakteristika Experimentu II	51
3.1.3 Charakteristika Experimentu III.....	61
3.3 Stanovení obsahu biogenních aminů v Experimentu I-III	63
3.4 Kultivace a odečet počtu mikroorganismů v rámci Experimentu II a III	64
3.5 Měření pH kultivačního média v rámci Experimentu II a III	65

3.6 Stanovení aminokyselinového profilu kultivačních médií Experimentu I-III.....	65
3.7 Statistické hodnocení naměřených dat Experimentů I-III.....	65
4 HLAVNÍ VÝSLEDKY PRÁCE	67
4.1 Výsledky Experimentu I.....	67
4.2 Výsledky Experimentu II.....	73
4.2.1 Kinetika produkce biogenních aminů <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> CCDM 239	76
4.2.2 Kinetika produkce biogenních aminů kmenem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289	82
4.2.3 Kinetika produkce biogenních aminů <i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-69 z procesu výroby piva.....	88
4.2.4 Kinetika produkce biogenních aminů <i>Lactobacillus brevis</i> T01.....	94
4.2.5 Kinetika produkce biogenních aminů <i>Lactobacillus curvatus</i> T02.....	105
4.3 Výsledky Experimentu III.....	113
4.3.1 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Lactobacillus brevis</i> T01 v mléce.....	113
4.3.2 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Lactobacillus curvatus</i> T02 v mléce..	122
5 SOUHRNNÁ DISKUZE.....	128
6 PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI	138
7 ZÁVĚR	140
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	142
9 SEZNAM PUBLIKACÍ.....	165
10 CURRICULUM VITAE	167

ABSTRAKT

Cílem dizertační práce bylo studium vlivu vnějších faktorů na množství vyprodukovaných biogenních aminů u vybraných kmenů bakterií rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Kultury zmíněných bakterií jsou běžně využívány při výrobě fermentovaných potravin. Z těchto důvodů je jejich případná aminogenní aktivita nežádoucím znakem, který je třeba sledovat a zkoumat. V rámci provedených experimentů byl realizován skrínig produkce biogenních aminů u sbírkových kultur (Česká sbírka mlékárenských mikroorganismů Laktoflora[®], CCDM; Sbíрка mikroorganismů Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze, RIBM) a izolátů bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií, včetně probiotických kmenů (izoláty z procesu výroby sýrů Milcom a.s., Tábor, T0; sbírka humánních izolátů České zemědělské univerzity v Praze, B). S vybranými dekarboxyláza pozitivními kmeny, které byly schopné tvorby významnějších množství biogenních aminů, byly založeny další experimenty, v nichž byl sledován vliv faktorů na jejich dekarboxylázovou aktivitu (pH, teplota, přídavek chloridu sodného, přídavky sacharidů či jejich derivátů, nebo etanolu). Kinetika produkce biogenních aminů byla pozorována jak v podmínkách *in vitro*, tak v reálné potravinové matici (v obnoveném mléce). Po derivatizaci dansylchloridem byly vzorky analyzovány RP-HPLC s UV detekcí. Kromě produkce biogenních aminů bylo hodnoceno i růstové chování kultur, a to pomocí zjišťování celkového počtu mikroorganismů a vývoje pH kultivačního média v každém odběrovém čase.

Výsledky experimentů nelze generalizovat. Bylo zjištěno, že zástupci kontaminující nebo non-startérové mikroflóry obecně vynikali vyšší produkcí biogenních aminů než kmeny startérové. I mezi probiotickými kmeny bylo možné nalézt producenty detekovatelných množství biogenních aminů (Σ biogenních aminů <100 mg/l). Vybrané kmeny rodu *Lactobacillus* (*Lb.*) a *Bifidobacterium* (*B.*) byly schopné produkovat hlavně tyramin a některé polyaminy (nejčastěji putrescin nebo spermin).

Žádný z testovaných faktorů ve zkoušených koncentracích nezpůsobil významnou inhibici růstu. Nízké pH (pH 4 a 5) a přídavek NaCl (0-2 % (w/v)) neomezily dekarboxylázovou aktivitu většiny kmenů. Naopak byla v některých případech sledována podpora produkce biogenních aminů. Nízká teplota (10±2 °C) způsobovala u všech testovaných kmenů stejný trend omezení růstu a většinou i celkové produkce biogenních aminů. Zvláště kmeny *Lb. brevis* RIBM 2-69 a *Lb. brevis* T01 byly schopné produkovat vysoké koncentrace tyraminu i během působení sledovaných faktorů (>200 mg/l; během kultivace při 30/37±2 °C). Tyto

koncentrace by mohly představovat reálné riziko orožení zdraví spotřebitelů. Během testování kmenů *Lb. curvatus* T01 and *Lb. brevis* T02 byla aminogenní aktivita potvrzena jak v laboratorním médiu, tak v mléce. Avšak skutečná potravinová matrice poskytovala méně přívětivé prostředí pro proces tvorby biogenních aminů.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to study the factors influencing biogenic amine production by selected bacterial strains of genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. Mentioned bacterial cultures are commonly used in the manufacture of fermented products. Therefore, the ability of biogenic amine formation is considered to be a negative feature that requires the monitoring. In the frame of the performed measurements the screening of biogenic amine production by cultures (Culture Collection of Dairy Microorganisms Laktoflora[®], CCDM; Research Institute of Brewing and Malting, RIMB) and isolates of microorganisms (cheese production isolates Milcom a.s., Tábor, T0; Human Isolates Collection of Czech University of Life Sciences in Prague, B) including probiotic bacteria was realized. With selected decarboxylase positive strains, able to form detectable amounts of biogenic amines, the experiments by the testing of the factors (pH, temperature, the addition of sodium chloride, carbohydrates or their derivatives, ethanol) were established. The kinetics of aminogenic activity were observed in the growth media and real food matrix. After the derivatization technique by dansyl chloride the samples were measured by the means of RP-HPLC and UV detection.

The experimental results can not be generalized. According to the obtained data, it was observed that contaminant and non-starter culture of lactobacilli were able to produce more abundant concentrations of biogenic amines than starter cultures. Moreover, even between the probiotic strains were found producers of detectable amounts of biogenic amines (Σ biogenic amines <100 mg/l). Selected strains of *Lactobacillus* (*Lb.*) and *Bifidobacterium* (*B.*) were able to form especially tyramine and some polyamines (most often putrescine and spermine). In the frame of above mentioned factors and their concentrations any of them did not cause significant inhibition of the growth. Surprisingly, low pH (4 a 5) and the NaCl addition (0-2 %) did not cause the decrease of biogenic amine concentrations. On the contrary, there was found the support of biogenic amine production. Low cultivation temperature (10 ± 2 °C) shared for every tested strain a clear influence on the suppression of growth and most of cases on the decarboxylase activity.

It should be also highlighted that especially strains *Lb. brevis* RIBM 2-69 and *Lb. brevis* T01 can produce high concentrations of tyramine (>200 mg/l) during the cultivation at $30/37\pm 2$ °C and under other observed conditions. The latter tyramine concentrations can present serious potential health risk for consumers. Testing the strains *Lb. curvatus* T01 and

Lb. brevis T02, aminogenic capacity was confirmed in both, inculture media and in milk. However, the real food matrix probably provided less convenient environment for biogenic amine formation process.

SEZNAM ILUSTRACÍ

<i>Obr. 1: Vznik biogenních aminů z aminokyselin; TDC tyrozindekarboxyláza, HDC histidindekarboxyláza, LDC lyzindekarboxyláza, ADC arginindekarboxyláza, ODC ornitindekarboxyláza, PheDC fenylalanindekarboxyláza, AgUH agmatinureohydroláza, SpdS spermidinsyntáza, SpmS sperminsyntáza (upraveno podle Halász et al., 1994, s. 43; Ancín-Azpilicueta et al., 2008, s. 258; Komprda et al., 2008, s. 30).....</i>	19
<i>Obr. 2: Zjednodušené schéma metabolismu laktózy v buňkách bakterií mléčného kvašení (upraveno dle Foxe et al., 2000 a Papagianni, 2012); P...fosfát, CoA...koenzym A, glu...glukóza, fru...fruktóza, PTS...fosfotransferázový systém.....</i>	39
<i>Obr. 3: Metabolismus glukózy v buňce bifidobakterií (MetaCyc Metabolic Pathway Database, ©2014a)</i>	42
<i>Obr. 4: Schéma experimentu I; skríníng dekarboxylázové aktivity in vitro; *přídavek čtyřkombinace aminokyselin argininu, ornitinu, lyzinu a tyraminu v koncentraci 0,2 % (w/v)</i>	49
<i>Obr. 5: Schéma předběžného pokusu, testování probiotických kmenů <i>Lb. rhamnosus</i> CCDM 289 a <i>B. lactis</i> CCDM 239; přídavek aminokyselin kombinace a...lyzin, tyrozin, fenylalanin, b...arginin, ornitin, tyrozin, lyzin, fenylalanin, histamin</i>	52
<i>Obr. 6: Schéma subexperimentu s <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289; *přídavek čtyřkombinace aminokyselin argininu, ornitinu, lyzinu a tyraminu v koncentraci 0,3 % (w/v)</i>	54
<i>Obr. 7: Schéma druhého předběžného testování vlivu faktorů na dekarboxylázovou aktivitu <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> CCDM 239; *přídavek čtyřkombinace aminokyselin argininu, ornitinu, lyzinu a tyraminu v koncentraci 0,3 % (w/v).....</i>	55
<i>Obr. 8: Schéma subexperimentu s <i>Bifidobacterium lactis</i> CCDM 239; *přídavek čtyřkombinace aminokyselin argininu, ornitinu, lyzinu a tyraminu v koncentraci 0,3 % (w/v)</i>	56
<i>Obr. 9: Schéma subexperimentu s <i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-69; *přídavek čtyřkombinace aminokyselin argininu, ornitinu, lyzinu a tyraminu v koncentraci 0,3 % (w/v).....</i>	57
<i>Obr. 10: Schéma subexperimentů s <i>Lb. brevis</i> T01 a <i>Lb. curvatus</i> T02; *přídavek čtyřkombinace aminokyselin argininu, ornitinu, lyzinu a tyraminu v koncentraci 0,3 % (w/v)</i>	58
<i>Obr. 11: Schéma Experimentu III s <i>Lb. brevis</i> T01 a <i>Lb. curvatus</i> T02; *přídavek čtyřkombinace aminokyselin argininu, ornitinu, lyzinu a tyraminu v koncentraci 0,3 % (w/v)</i>	62
<i>Obr. 12: Maximální produkce (A) tyraminu <i>Bifidobacterium lactis</i> při 37 °C v MRS s přísadky laktózy, soli a pH 4,5; Např.0/2...0% přídavek laktózy (w/v) a 2% přídavek NaCl (w/v)</i>	80

Obr. 13: Růstová rychlost produkce (μ_m) tyraminu <i>Bifidobacterium lactis</i> při 37 °C v MRS s přídavky laktózy, soli a pH 4,5; např. 0/2...0% přídavek laktózy (w/v) a 2% přídavek NaCl (w/v).....	80
Obr. 14: Délka lag fáze produkce (λ) tyraminu <i>Bifidobacterium lactis</i> při 37 °C v MRS s přídavky laktózy, soli a pH 4,5; např.0/2...0% přídavek laktózy (w/v) a 2% přídavek NaCl (w/v).....	81
Obr. 15: Maximální produkce (A) tyraminu kmenem <i>Lb. rhamnosus</i> CCDM 289 při 37 °C v MRS s přídavky glycerolu (0-5 %, v/v) a úpravou pH; Např. 5/6...5% přídavek glycerolu (v/v), pH 6.....	84
Obr. 16: Maximální produkce (A) tyraminu při 10 °C kmenem <i>Lb. rhamnosus</i> CCDM 289 v MRS s přídavky glycerolu a úpravou pH; Např. 5/6...5% přídavek glycerolu (v/v), pH 6.....	84
Obr. 17: Maximální produkce putrescinu (A) kmenem <i>Lb. rhamnosus</i> CCDM 289 při 37 °C v MRS s přídavky glycerolu a úpravou pH; Např. 5/6...5% přídavek glycerolu (v/v), pH 6.....	85
Obr. 18: Maximální produkce putrescinu (A) při 10 °C kmenem <i>Lb. rhamnosus</i> CCDM 289 v MRS s přídavky glycerolu a úpravou pH; Např. 5/6...5% přídavek glycerolu (v/v), pH 6.....	86
Obr. 19: Maximálně dosažená hodnota (A) produkce tyraminu kmenem <i>Lb. brevis</i> RIBM 2-69 při 30 °C po 72 hodinách při testovaných koncentracích etanolu (0-6 %, (v/v))	90
Obr. 20: Rychlost produkce tyraminu (μ_m) kmenem <i>Lb. brevis</i> RIBM 2-69 při 30 °C po dobu 72 hodin při testovaných koncentracích etanolu (0-6 %, (v/v)).....	91
Obr. 21: Délka lag fáze produkce (λ) tyraminu kmenem <i>Lb. brevis</i> RIBM 2-69 při 30 °C po dobu 72 hodin při testovaných koncentracích etanolu (0-6 %, (v/v)).....	91
Obr. 22: Maximálně dosažená hodnota produkce (A) tyraminu kmenem <i>Lb. brevis</i> T01 při 10 °C při různých koncentracích laktózy 0,00 a 0,25 % (w/v), 0-2 % NaCl (w/v) a hodnotách pH 5-7 po 15-ti dnech kultivace; př. 0,25/1/6...0,25 % laktózy (w/v), 1 % NaCl (w/v), pH 6.99	99
Obr. 23: Maximálně dosažená hodnota produkce (A) tyraminu kmenem <i>Lb. brevis</i> T01 při 10 °C při různých koncentracích laktózy 0,50 a 1,00 % (w/v), 0-2 % NaCl (w/v) a hodnotách pH 5-7 po 15-ti dnech kultivace; př. 0,25/1/6...0,25 % laktózy (w/v), 1 % NaCl (w/v), pH 6.99	99
Obr. 24: Maximálně dosažená hodnota produkce (A) tyraminu <i>Lb. brevis</i> T01 při 37 °C při různých koncentracích laktózy 0,00 a 0,25 % (w/v), 0-2 % NaCl (w/v) a hodnotách pH 5-7 po 48 hodinách kultivace; 0,25/1/6...0,25 % laktózy (w/v), 1 % NaCl (w/v), pH 6.....	100
Obr. 25: Maximálně dosažená hodnota produkce (A) tyraminu kmenem <i>Lb. brevis</i> T01 při 37 °C při různých koncentracích laktózy 0,50 a 1,00 % (w/v), 0-2 % NaCl (w/v) a hodnotách pH 5-7 po 48 hodinách kultivace; 0,50/1/6...0,50 % laktózy (w/v), 1 % NaCl (w/v), pH 6...100	100
Obr. 26: Maximálně dosažená hodnota produkce tyraminu (A) kmenem <i>Lb. brevis</i> T01 při 4,8% koncentraci laktózy (w/v), 0-2% koncentraci NaCl (w/v), pH 6,8 a teplotách 10 a 37 °C,0/10...0 % NaCl (w/v), 10 °C	101
Obr. 27: Maximálně dosažená hodnota produkce (A) tyraminu kmenem <i>Lb. curvatus</i> T02 při 37 °C při různých koncentracích laktózy 0,00 a 0,25 % (w/v), 0-2 % (w/v) NaCl a hodnotách	

<i>pH 5-7 po 48 hodinách kultivace; př. 0,25/1/6...0,25 % (w/v) laktózy, 1 % (w/v) NaCl, pH 6</i>	107
<i>Obr. 28: Maximálně dosažená hodnota produkce (A) tyraminu kmenem Lb. curvatus T02 při 37 °C při různých koncentracích laktózy 0,50 a 1,00 % (w/v), 0-2 % (w/v) NaCl a hodnotách pH 5-7 po 48 hodinách kultivace; př. 0,50/1/6...0,50 % (w/v) laktózy, 1 % (w/v) NaCl, pH.....</i>	107
<i>Obr. 29: Maximálně dosažená hodnota produkce (A) tyraminu kmenem Lb. curvatus T02 při 10 °C při různých koncentracích laktózy 0,00 a 0,25 % (w/v), 0-2 % (w/v) NaCl a hodnotách pH 5-7 po 48 hodinách kultivace; př. 0,25/1/6...0,25 % (w/v) laktózy, 1 % (w/v) NaCl, pH 6</i>	108
<i>Obr. 30: Maximálně dosažená hodnota produkce (A) tyraminu kmenem Lb. curvatus T02 při 10 °C při různých koncentracích laktózy 0,50 a 1,00 % (w/v), 0-2 % (w/v) NaCl a hodnotách pH 5-7 po 48 hodinách kultivace; př. 0,50/1/6...0,50 % (w/v) laktózy, 1 % (w/v) NaCl, pH 6</i>	108
<i>Obr. 31: Maximálně dosažená hodnota produkce tyraminu Lb. curvatus T02 při 37 °C v médiu s iniciačním pH 6,8, s přídavky 4,8 % (w/v) laktózy a koncentracemi NaCl 0-2%(w/v)</i>	109
<i>Obr. 32: Růst Lactobacillus brevis T01 v mléce při pH 5-7, t=10 °C s přídavkem různých koncentrací soli 0-2 % (w/v); M...mléko bez aminokyselin a přídavku NaCl, MA... mléko s aminokyselinami bez přídavku NaCl; př. 1/6...1 % (w/v) NaCl, pH 6</i>	115
<i>Obr. 33: Růst Lactobacillus brevis T01 v mléce při pH 5-7, t=37 °C s přídavkem různých koncentrací soli 0-2 % (w/v); M...mléko bez aminokyselin a přídavku NaCl, MA... mléko s aminokyselinami bez přídavku NaCl; př. 2/6...2 % (w/v) NaCl a pH 6</i>	116
<i>Obr. 34: Maximální hodnota produkce (A) tyraminu kmenem Lb. brevis T01 v mléce při 37 °C, přídavku NaCl (0, 1 a 2 %) a úpravě iniciačního pH (pH 5, 6 a 7); př. 0/5...0 % (w/v) NaCl, pH 5; M...mléko bez aminokyselin, MA...mléko s aminokyselinami</i>	118
<i>Obr. 35: Maximální hodnota produkce (A) tyraminu kmenem Lb. brevis T01 v mléce při 10 °C, přídavku NaCl (0, 1 a 2 %) a úpravě iniciačního pH (pH 5, 6 a 7); př. 0/5...0 % (w/v) NaCl, pH 5; M...mléko bez aminokyselin, MA...mléko s aminokyselinami</i>	118
<i>Obr. 36: Rychlost produkce (μm) tyraminu kmenem Lb. brevis T01 v mléce při 37 °C, přídavku NaCl (0, 1 a 2 %) a úpravě iniciačního pH (pH 5, 6 a 7); př. 0/5...0 % (w/v) NaCl, pH 5; M...mléko bez aminokyselin, MA...mléko s aminokyselinami</i>	119
<i>Obr. 37: Rychlost produkce (μm) tyraminu kmenem Lb. brevis T01 v mléce při 10 °C, přídavku NaCl (0, 1 a 2 %) a úpravě iniciačního pH (pH 5, 6 a 7); př. 0/5...0 % (w/v) NaCl, pH 5; M...mléko bez aminokyselin, MA...mléko s aminokyselinami</i>	119
<i>Obr. 38: Růst Lactobacillus curvatus T02 v mléce při pH 5-7, t=37 °C s přídavkem různých koncentrací soli 0-2 % (w/v); M...mléko bez aminokyselin a přídavku NaCl, MA... mléko s aminokyselinami bez přídavku NaCl; 2/6...2 % (w/v) NaCl, pH 6</i>	123

Obr. 39: Růst Lactobacillus curvatus T02 v mléce při pH 5-7, t=10 °C s přidavkem různých koncentrací soli 0-2 % (w/v); M...mléko bez aminokyselin a přidavku NaCl, MA... mléko s aminokyselinami bez přidavku NaCl; 0/7...0 % (w/v) NaCl, pH 7 124

Obr. 40: Maximální vyprodukované množství tyraminu kmenem Lactobacillus curvatus T02 v mléce při pH 5-7, t=37 °C s přidavkem různých koncentrací soli 0-2 % (w/v); M...mléko bez aminokyselin a přidavku NaCl, MA... mléko s aminokyselinami bez přidavku NaCl..... 126

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Složení modifikovaného bujónu MRS.....	59
Tab. 2: Eluční program separace biogenních aminů.....	64
Tab. 3: Produkční kmeny laktobacilů ze sbírky CCDM a izoláty z procesu výroby sýrů (T0)	68
Tab. 4: Kmeny izolátů z procesu výroby piva produkující tyramin v množství vyšším než 1,5 g/l	69
Tab. 5: Vliv vnějších faktorů na produkci biogenních aminů (mg/l) u kmenů <i>Bifidobacterium lactis</i> CCDM 239 a <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289	74
Tab. 6: Vliv přídavku směsi aminokyselin a pyridoxalfosfátu na produkci biogenních aminů (mg/l) u kmenů <i>Bifidobacterium lactis</i> CCDM 239 a <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289	75
Tab. 7: Produkce tyraminu (mg/l) kmenem <i>B. lactis</i> CCDM 239 ovlivněná testovanými faktory (počáteční pH, přídavek glukózy a laktózy v % (w/v)).....	77
Tab. 8: Množství tyraminu (TYR) a putrescinu (PUT) vyprodukované jednou buňkou kmene <i>Lb. rhamnosus</i> CCDM 289 při 10 a 37 °C.....	87
Tab. 9: Produkce biogenních aminů <i>Lb. brevis</i> RIBM 2-69 ovlivněná testovanými koncentracemi etanolu; průměrné nejvyšší koncentrace v mg/l média	92
Tab. 10: Produkce tyraminu jednou buňkou <i>L. brevis</i> RIBM 2-69 při 30 °C.....	93
Tab. 11: Maximální hodnoty produkce tyraminu (mg/l) kmenem <i>Lb. brevis</i> T01 při 37 °C ovlivněná přídavkem laktózy (% (w/v)) a úpravou pH po 48 hodinách kultivace	97
Tab. 12: Maximální hodnoty produkce tyraminu (mg/l) kmenem <i>Lb. brevis</i> T01 při 37 °C ovlivněná přídavkem NaCl (% (w/v)) a úpravou pH po 48 hodinách kultivace.....	98
Tab. 13: Produkce tyraminu (mg/CFU) jednou buňkou kmene <i>Lb. brevis</i> T01 při 10 °C (YF ₁₀) při různých koncentracích laktózy a soli v růstovém prostředí	103
Tab. 14: Produkce tyraminu (mg/CFU) jednou buňkou kmene <i>Lb. brevis</i> T01 při 37 °C (YF ₃₇) při různých koncentracích laktózy a soli v růstovém prostředí	103
Tab. 15: Produkce sperminu <i>Lactobacillus brevis</i> T01 v dekarboxylačním médiu s přídavkem laktózy a soli při 37 °C.....	104
Tab. 16: Produkce tyraminu (mg/CFU) jednou buňkou kmene <i>Lb. curvatus</i> T02 při 10 °C	110
Tab. 17: Produkce tyraminu (mg/CFU) jednou buňkou kmene <i>Lb. curvatus</i> T02 při 37 °C	111
Tab. 18: Nejvyšší vyprodukovaná množství sperminu (mg/l) <i>Lb. curvatus</i> T02	112
Tab. 19: Produkce sperminu (mg/l) <i>Lb. brevis</i> T01 v mléce	121

Tab. 20: Nejvyšší detekované koncentrace sperminu (mg/l) v mléce po kultivaci <i>Lb. curvatus</i> T02.....	127
Tab. 21: Zastoupení vybraných aminokyselin v komerčním médiu MRS broth, jeho komponentách použitých pro modifikované složené médium v g/l média	130
Tab. 22: Zastoupení vybraných aminokyselin v obnoveném mléce	131
Tab. 23: Zastoupení vybraných aminokyselin v bujónu Willkins-Chalgren s přídavkem soya peptonu v g/l média	131

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

TDC	tyrozindekarboxyláza
HDC	histidindekarboxyláza
LDC	lyzindekarboxyláza
ADC	arginindekarboxyláza
ODC	ornitindekarboxyláza
PheDC	fenylalanindekarboxyláza
AgUH	agmatinureohydroláza
SpdS	spermidinsyntáza
SpmS	spermínsyntáza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
PCR	polymerázová řetězová reakce
ELISA	imunoenzymatické stanovení
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích
Lys	lyzin
Tyr	tyrozin
Phe	fenylalanin
TYR	tyramin
PUT	putrescin
PHE	fenyletylamin
YF	produkční faktor
QPS	status kvalifikovaného předpokladu bezpečnosti

1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Nadřazeným zájmem společnosti je nepochybně bezpečnost potravin. Látky v potravinách, které by mohly být zdraví škodlivé, jsou monitorovány a povolené limity obsahu těchto látek jsou většinou legislativně upraveny. Biogenní aminy náleží rovněž mezi substance, kterým je věnována pozornost v souvislosti s možnou toxicitou. V aktuální legislativě České republiky však povolený obsah biogenních aminů v jednotlivých skupinách potravin uveden není.

Původní česká legislativa (vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 298/1997 Sb.) upravovala limity nejčastěji se vyskytujícími biogenních aminů ve vybraných potravinářských výrobcích do roku 2002. Předmětem zájmu byl obsah histaminu a tyraminu ve fermentovaných (víno, pivo, sýry) i nefermentovaných produktech (ryby, maso, kojenecká výživa aj) (Česko, 1997). Tato vyhláška byla zrušena vyhláškou č. 53/2002 Sb.

Dříve platné limity již nejsou součástí legislativních předpisů. Aktuální evropská legislativa sice jasně udává, že potraviny nesmějí obsahovat mikroorganismy, jejich toxiny či metabolity v množstvích, která představují nepřijatelné riziko pro lidské zdraví, ale povolený obsah biogenních aminů definován není, až na výjimku, legislativně stanoven. Zmíněnou výjimkou jsou akceptovatelné hygienické limity histaminu v rybách, které stanovuje Nařízení komise (ES) č. 2073/2005. Tento limit je 100 mg/kg a může být ve dvou vzorcích z devíti v rámci jedné šarže překročen až do 200 mg/kg. Pro produkty rybolovu, které byly ošetřeny enzymatickým zráním v láku a jsou spojovány s vysokým obsahem histidinu je povolený limit posunut na 200 mg/kg, přičemž může být u dvou vzorků z devíti překročen až do hodnoty 400 mg/kg (Evropská unie, 2005).

Objektivní stanovení toxických dávek biogenních aminů ve specifických skupinách potravin je skutečně problematické (Halász et al., 1994, s. 42). Ve vědeckých pracích jsou uváděny různé hodnoty toxicity pro jednotlivé biogenní aminy. Obecně lze uvést široký rozptyl, kdy za toxická jsou označována množství 100-800 mg sumy biogenních aminů na kilogram potravin (Buňková et al., 2013, s. 551; Halász et al., 1994, s. 43). Reakce organismu na příjem biogenních aminů je ovlivněna mnohými faktory a je značně individuální (Linares et al., 2011, s. 692). Neméně důležitou roli v problematice stanovení této meze hraje kolísavost koncentrací vzniklých biogenních aminů v závislosti na rozdílných technologických postupech a měnících se výrobních trendech v procesu výroby potravin. S inovacemi výrobních zařízení, modernizací výrobních schémat a zavedením nových výrobků se mění i výrobní podmínky, které mohou obsah biogenních aminů v potravinách

a nápojích ovlivnit. Z výše uvedených důvodů vyplývá nutnost pravidelného posuzování bezpečnosti potravin. Vyhodnocení rizik by však mělo vycházet z aktuálních poznatků a dat, aby tak mohla být minimalizována potenciaální zdravotní rizika konzumentů (*European Food Safety Authority*, 2011, s. 8). Zvláštní pozornost by při tom měla být věnována potravinám, jejichž výroba zahrnuje fermentační proces. Ve fermentovaných potravinách je totiž výskyt těchto látek obecně častější a vyšší (Linares et al., 2011, s. 700; *European Food Safety Authority*, 2011, s. 8).

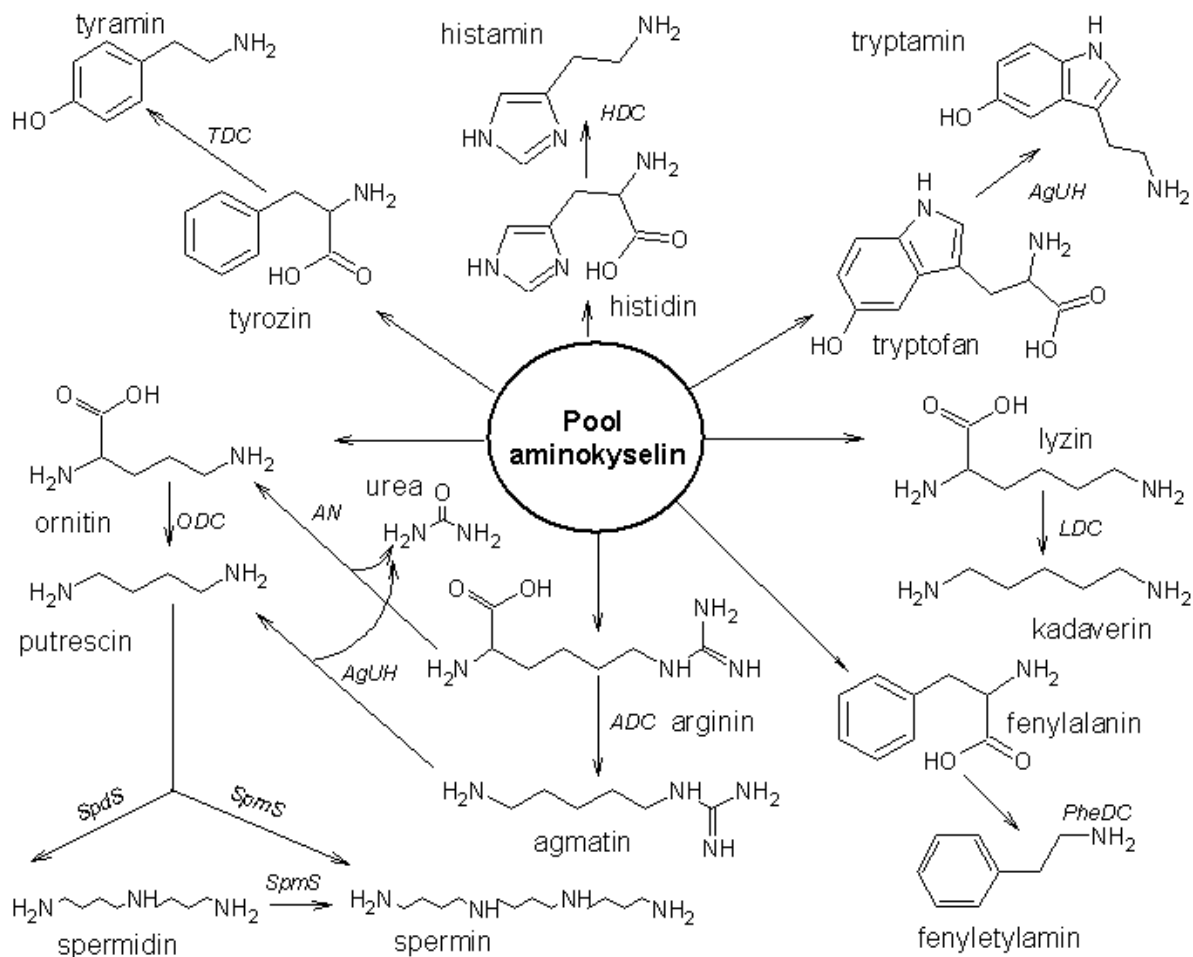
Původcem zvýšené koncentrace biogenních aminů v potravinách může být nejen kontaminující mikroflóra, ale také zákysové (startérové) kultury bakterií mléčného kvašení s proteolytickými enzymy, dekarboxylázami a dalšími enzymy (např. transaminázami, oxygenázami nebo metyltrasferázami), které se tvorby biogenních aminů účastní (Silla-Santos, 1996, s. 216, 218; Halász et al., 1994, s. 42 a 44; Burdychová a Komprda, 2007, s. 271; Gennaro et al., 2003, s. 545-551; Schneller et al., 1997, s. 265). Pro bezpečnost potravin má tedy velký význam testovat dekarboxylázovou aktivitu zákysových kultur a zjišťovat, jestli, a za jakých podmínek, mohou zvyšovat obsah biogenních aminů ve výrobcích (Hassaïne et al., 2009, s. 381). Mikroorganismy, které za podmínek obdobných chemickému složení a technologickému procesu daného výrobku, produkují signifikantní množství biogenních aminů, by měly být preventivně vyřazeny z používání jako zákysové kultury (Suzzi a Gardini, 2003, s. 4; Buňková et al., 2009, s. 534). Stejně tak by pro technologické účely bylo vhodné znát kinetiku tvorby biogenních aminů za podobných podmínek prostředí, které mohou nastat během technologického procesu výroby fermentovaných mléčných výrobků.

1.1 Charakterizace biogenních aminů, polyaminů a jejich vzniku

Biogenní aminy jsou organické nízkomolekulární báze mající alifatickou, aromatickou či heterocyklickou strukturu (Obr. 1). Jejich kumulace v potravinách je výsledkem dekarboxylace aminokyselin (*European Food Safety Authority*, 2011, s. 8; Halász et al., 1994, s. 43).

Této přeměny se účastní zvláště enzymy bakteriálního původu (Suzzi a Gardini, 2003, s. 41; Silla-Santos, 1996, s. 219, Özdestan a Üren, 2010, s. 101). Jedná se převážně o skupinu hydroláz (enzymů ze skupiny EC 4.1.1.x), kdy jsou tyto enzymy rozdílné pro různé druhy mikroorganismů (Černý et al., 2009, s. 16). Dekarboxylázy, katalyzující přeměnu

aminokyselin v odpovídající biogenní aminy, využívají jako kofaktor pyridoxal-5-fosfát, který se reakce přímo účastní. Obdobnou funkci může zastat i pyruvoylový zbytek proenzymu (Shalaby, 1996, s. 675-690).



Obr. 1: Vznik biogenních aminů z aminokyselin; TDC tyrozindekarboxyláza, HDC histidindekarboxyláza, LDC lyzindekarboxyláza, ADC arginindekarboxyláza, ODC ornitindekarboxyláza, PheDC fenylylalanindekarboxyláza, AgUH agmatinureohydroláza, SpdS spermidinsyntáza, SpmS sperminsyntáza (upraveno podle Halász et al., 1994, s. 43; Ancín-Azpilicueta et al., 2008, s. 258; Komprda et al., 2008, s. 30)

1.2 Fyziologické působení biogenních aminů na lidský organizmus

Biogenní aminy jsou pro lidský organizmus v určitých koncentracích nepostradatelné. Mají vliv na růst a proliferaci buněk (regulace nukleových kyselin, stabilizace membrán, syntéza bílkovin), slouží jako zdroj dusíku v biochemických reakcích, jako prekurzory některých hormonů nebo plní funkci neurotransmiterů v centrálním nervovém systému (Linares et al., 2011, s. 692; Silla-Santos, 1996, s. 221; Halász et al., 1994, s. 43).

Menší množství biogenních aminů přijatá v potravě jsou metabolizována zpravidla bez negativních následků na zdraví. Důvodem je existence detoxikačního systému monoaminoxidáz, diaminoxidáz a histidinmetyltransferáz (Silla-Santos, 1996, s. 221; Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71; Stadler a Linenback, 2009, s. 342). Množství přijatých biogenních aminů do 100 mg/kg (mg/l) potravin (při absenci interferujících složek) jsou považována pro zdravé osoby za bezpečná (Silla-Santos, 1996, s. 221). Avšak vyšší koncentrace biogenních aminů mohou mít vážný dopad na zdravotní stav spotřebitele (Linares et al., 2011, s. 692; Landete et al., 2007, s. 259; Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71).

Biogenní aminy jsou zodpovědné za vazoaktivní a psychoaktivní účinky (Stadler a Linenback, 2009, s. 342). Nadbytek biogenních aminů v organismu se projevuje například bolestí hlavy, potížemi s dýcháním, bronchiálním astmatem, průjmem, hypotenzí, srdeční palpitací a urtikariálním exantémem (Silla-Santos, 1996, s. 223 a 224; Stadler a Linenback, 2009, s. 342).

Citlivost jedince na biogenní aminy se může lišit v závislosti na mnoha faktorech, které ovlivňují činnost detoxikačního systému. Jedná se zvláště o věk, zdravotní stav, užívání farmak, konzumace alkoholu, celková přijatá množství biogenních aminů, nebo jejich vzájemné spolupůsobení apod. (Silla-Santos, 1996; s. 223 a 224; Stadler a Linenback, 2009, s. 341).

Biogenní aminy histamin a tyramin jsou považovány za nejtoxičtější a jejich obsah je pro bezpečnost potravin skutečně relevantní (*European Food Safety Authority*, 2011, s. 66).

Na základě publikovaných informací nebyly u zdravých osob sledovány negativní účinky biogenních aminů po požití stravy obsahující 600 mg tyraminu. Pro jedince s klasickou medikací psychofarmaky s inhibitory monoaminoxidáz nebyly sledovány nežádoucí účinky na zdraví, pokud hodnota tyraminu ve zkonsumované potravíně nepřesáhla 6 mg. Toto

množství však může být snadno překročeno. Pro pacienty léčené psychofarmaky třetí generace je hodnota rizikové koncentrace vyšší než 50 mg tyraminu. Při zvýšené konzumaci fermentovaných potravin je však snadné překročit i toto množství (*European Food Safety Authority*, 2011, s. 67).

Kromě psychofarmak zesiluje toxický účinek biogenních aminů současná konzumace alkoholu. Jako akceptovatelná a zdravotně bezpečná byla v alkoholických nápojích navržena hodnota tyraminu 10 mg/l (Pryiadarshani a Rakshit, 2011, s. 2063).

Fyziologická funkce polyaminů (putrescinu a z něj metylací vzniklých biogenních aminů sperminu a spermidinu) je spojena s jejich chemickou strukturou, kdy molekuly polyaminů při fyziologickém pH nesou na svých primárních i sekundárních aminoskupinách pozitivní náboj. Mohou pak zastávat role vícelaterárních ligandů, které se vážou na deoxyribonukleovou kyselinu (DNA) a ribonukleovou kyselinu (RNA), na proteiny, fosfolipidy, nebo nukleotid trifosfáty. Mají následně vliv na regulaci exprese genů tím, že mění jejich strukturu a modulují signální dráhy (Linsalata a Ruso, 2008, s. 382-389).

Optimální fungování buňky vyžaduje přísnou regulaci intracelulárního obsahu polyaminů na úrovni biosyntézy, katabolizmu, příjmu a exkrece (Linsalata a Ruso, 2008, s. 382-389). Malá množství orálně podaná stimulují buněčný růst, vyšší koncentrace však růst podpořit nemusí, nebo dokonce může způsobit inhibici (Deloyer et al., 2001, s. 1027-1032). Denní příjem polyaminů se u dospělého člověka pohybuje mezi 350-550 μmol (Bardócz et al., 1995, s. 819). Zvláště starší lidé by měli zvýšit příjem polyaminů v potravě, protože s přibývajícím věkem klesá aktivita jednoho z enzymů, který se účastní jejich vzniku, ornitindekarboxylázy (Larqué, Sabater-Molina a Zamora, 2007, s. 91). Exogenní příjem polyaminů ze stravy probíhá ve střevech, odkud jsou dopravovány do jiných tkání, kde plní své funkce (Larqué, Sabater-Molina a Zamora, 2007, s. 88). Důležité je udržovat optimální koncentrace polyaminů ve všech orgánech. Ty nesmí být příliš nízké ani příliš vysoké. Akutní toxicita polyaminů byla pozorována při pokusech na krysách až v následujících koncentracích: pro putrescin 2000 mg na kilogram tělesné hmotnosti, pro spermin a spermidin 600 mg/kg (Larqué, Sabater-Molina a Zamora, 2007, s. 92).

Putrescin a ostatní polyaminy mohou mít ale také nepřímý toxický efekt, právě díky jejich podílu na růstu, proliferaci buněk a změnám v gastrointestinálním traktu (Dufour et al., 1988, s. 112-116; Seiler et al., 1998, s. 1004). Výrazněji zvýšený výskyt polyaminů (zvláště putrescinu) v enterocytech je spojen s rozvojem maligních kolorektálních karcinomů.

Exogenní přísun polyaminů musí být tedy v případě onkologických onemocnění omezován. Pro zdravou střevní tkáň je však určitá koncentrace polyaminů nutná kvůli regeneraci střevní sliznice a má spíše pozitivní účinky (Seiler et al., 1998, s. 1004; Gerner a Meyskens, 2004, s. 781-792).

Existuje také další pohled na příjem polyaminů, kdy jsou označovány za prekuzory vzniku nitrosaminů, které jsou považovány za karcinogenní látky (Adams a Nout, 2001, s. 126).

1.3 Tvorba biogenních aminů potravinářsky významnými bakteriemi

Tvorba biogenních aminů v potravinách vyžaduje přítomnost dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů, které mohou představovat přirozenou, záměrně přidanou (zákysovou/startérovou) nebo kontaminující mikroflóru (Suzzi a Gardini, 2003, s. 45-47; Silla-Santos, 1996, s. 218; Gennaro et al., 2002, s. 546). Nezákysová/non-startérová mikroflóra pak představuje podskupinu specifických „kontaminantů“, které svojí účastí ve výrobním procesu významněji neohrozí jakost ani zdravotní nezávadnost potraviny. Nicméně i mezi nimi můžeme nalézt zástupce schopné produkce biogenních aminů (Moreno-Arribas et al., 2003, s. 120).

Mezi velmi aktivní producenty těchto substancí náleží zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* (např. rodu *Citrobacter*, *Hafnia*, *Escherichia*, *Morganella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*), představitelé typicky proteolytických a lipolytických bakterií rodu *Pseudomonas* a grampozitivní bakterie rodů *Clostridium*, *Bacillus* a *Staphylococcus* (Halász et al., 1994, s. 44; Silla-Santos, 1996, s. 218; Bover-Cid et al., 2001, s. 186-188; Takadashi et al., 2003, s. 2573; Özogul a Özogul, 2010, s. 385).

Výše uvedená kontaminující mikroflóra, proteolytická aktivita a vyšší obsah biogenních aminů mohou indikovat kažení potravin (Baixas-Nogueras et al., 2003, s. 164; Halász et al., 1994, s. 42; Juneja a Sofos, 2010, s. 248-252).

Schopnost dekarboxylovat aminokyseliny byla pozorována také u mnoha zástupců bakterií mléčného kvašení pocházejících z rodů *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* a *Oenococcus* (Halász et al., 1994, s. 44; Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71; Burdychová a Komprda, 2007, s. 149; Buňková, 2009, s. 533). Řada kmenů ze jmenovaných bakteriálních rodů je využívána jako zákysová kultura v mlékárenském, případně v masném průmyslu nebo při výrobě vína v rámci malolaktické fermentace (jablečno-mléčného kvašení).

Probiotické bakterie jsou přidávány do potravin díky jejich příznivému, dieteticko-léčebnému působení (Marteau et al., 2002, s. 51-57; Gill a Guarner, 2004, s. 516; Burdychová, 2007, s. 15-17; Gomes et al., 2011, s. 4777, Kneifel a Salmien, 2011, s. 2). V literatuře však existují strohé zmínky, že i druhy bakterií mléčného kvašení, jejichž kmeny jsou považovány za probiotické, mohou produkovat detekovatelná množství biogenních aminů (Burdychová, 2007, s. 15-17; Sládková, 2007, s. 96). K takovým mikroorganismům náleží např. *Lactobacillus acidophilus* nebo *Lactobacillus rhamnosus* (Priyadarshani a Rakshit, 2011, s. 2062–2069). Potenciál tvořit biogenní aminy mají i typicky probiotické bakterie rodu *Bifidobacterium* (Burdychová, 2007, s. 15-17, Sládková, 2007, s. 96).

Schopnost produkce biogenních aminů bakteriemi závisí na kultivačních podmínkách a zpravidla není rodově a ani druhově podmíněná. Diverzitu v tvorbě biogenních aminů lze pozorovat i v rámci jednoho druhu, kdy se jedná spíše o charakteristiku daného kmene (Bover-Cid et al., 2001, s. 188; Priyadarshani a Rakshit, 2009, s. 2067; Linares et al., 2011, s. 693).

Většina studií se zabývá hlavně dekarboxylázovou aktivitou non-startérů a kontaminantů (Burdychová a Komprda, 2007, s. 149-155; Özogul a Özogul, 2007, s. 385-394), jen málo z nich řeší startérové kultury (Bover-Cid, 2008, s. 269–277; Komprda et al., 2008, s. 29-36) a kinetiku produkce biogenních aminů těmito mikroorganismy ovlivněnou faktory vnějšího prostředí (Moreno-Arribas a Lonvaud-Funel, 1999, s. 55-60; Ancín-Azpilicueta et al., 2008, s. 257-275).

Tato dizertační práce je zacílena na komplexní zjišťování aminogenní aktivity vybraných kmenů laktobacilů a bifidobakterií, kdy je pozornost věnována nejen skríningu, ale také kinetice produkce biogenních aminů ovlivněné změnami kultivačními podmínkami. Znalost těchto pochodů a mechanismů, které regulují produkci, může vést k vývoji strategií, které zabrání zvýšené syntéze a kumulaci těchto potenciálně nebezpečných látek v potravinách.

1.4 Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu bakterií

Teoreticky lze očekávat, že všechny potraviny, které obsahují volné aminokyseliny a disponují vhodnými podmínkami pro enzymatickou aktivitu, představují riziko zvýšeného výskytu biogenních aminů (Silla-Santos, 1996, s. 214; Juneja a Sofos, 2010, s. 248-252). Z dostupných souhrnných publikací lze odvodit, že ideální prostředí pro tvorbu

biogenních aminů představují fermentované výrobky, jejichž pH, obsah prekurzorů i mikroflóra (startérová, non-startérová, případně kontaminující) mohou společně vytvářet vhodné podmínky pro aminogenní aktivitu (Halász et al., 1994, s. 46; Silla-Santos, 1996, s. 218; Linares et al., 2011, s. 692 a 693; Linares et al., 2012, s. 2-3). Tu mohou ovlivnit různé faktory vnějšího prostředí, jako jsou např. dostupnost aminokyselin, hodnoty pH, koncentrace chloridu sodného, vodní aktivita, přístup kyslíku, teplota, technologie (zařazení pasterace), doba zrání a skladování, množství mikroorganismů, přítomnost kofaktoru pyridoxalfosfátu apod. (Silla-Santos, 1996, s. 218-221; Gardini et al., 2001, s. 105-117; Suková, 2006, on-line; Linares et al., 2012, s. 5 a 6).

Produkce biogenních aminů bakteriemi mléčného kvašení může být tedy kontrolována v několika úrovních: v rámci průběhu fermentace a také v rámci faktorů, které fermentační proces ovlivňují (Spano et al., 2010, s. 96).

1.4.1 Vliv pH

Produkce alkalických biogenních aminů je chápána některými autory jako obranný mechanismus proti překyselení a nástroj udržení homeostaze bakteriální buňky (Molenaar et al., 1993, s. 2864–2870).

Důvodem podpory produkce biogenních aminů v kyselém prostředí je také zřejmě skutečnost, že je v přítomnosti prekurzorů, aminokyselin, činnost dekarboxyláz podporována (Halász et al., 1994, s. 44; Marcobal et al., 2006, s. 423 a 424; Bover Cid et al., 2006, s. 276). Optimum pro dekarboxylační enzymy se pohybuje okolo pH 5,0 (v rozmezí pH 4,0-5,5) (Silla-Santos, 1996, s. 219 a 220).

Výsledky některých studií nárůst produkce biogenních aminů v kyselém prostředí dokládají (např. Masson et al., 1997, s. 36-42; Greif, Greifová a Karovičová, 2006, s. 21-29; Tláškal et al., 2014, s. 116-120). Indukci tvorby biogenních aminů vlivem kyselého prostředí u bakterií mléčného kvašení uvádí studie Marcobal et al. (2006, s. 417-427), Buňkové et al. (2011, s. 117) a upozorňuje na ni i práce Priyadarshani a Rakshit (2014, s. 69-79).

Okyselení růstového prostředí z iniciačního pH 6 na pH 4 však vedlo ve studii Bover-Cid et al. (2008, s. 272, 274 a 275) ke snížení produkce tyraminu, fenyletylaminu a putrescinu i zástupcem rodu *Lactobacillus*, kmenem *Lactobacillus curvatus* CTC273.

Laktobacily obecně rostou nejlépe ve slabě kyselém prostředí při pH 5,4-6,4, růst při nižším pH 3,6-4,0 je spíše kmenovou záležitostí (Vos et al., 2009, s. 470).

Pro kultivaci bifidobakterií je optimální pH 6,5-7,0 (Biavati et al., 2000, s. 122). Tyto bakterie, zvláště jejich probiotické druhy, které jsou schopny odolávat velmi nízkému pH žaludečních šťáv (~pH 3), jsou také považovány za acidotolerantní (Mayo a Sinderen, 2010, s. 79).

Prudkou acidifikací může být celkové vyprodukované množství biogenních aminů významně sníženo, a to prostřednictvím potlačení rozvoje dekarboxyláza pozitivní mikroflóry (Silla-Santos et al., 1996, s. 219; Gardini et al., 2001, s. 112; Linares et al., 2011, s. 694).

Vliv pH na produkci biogenních aminů je totiž třeba chápat z pohledu absolutní produkce a produkce jednou buňkou, jak vyplývá z výsledků studie Buňkové et al. (2011, s. 117).

Na základě výše zmíněných faktů, lze totiž nesourodost vlivu pH na produkci biogenních aminů rozdělit na dva, již v dostupné literatuře, uvedené jevy. První jev představuje omezení absolutní produkce biogenních aminů, jestliže pH prostředí klesne pod optimum působení dekarboxylačních enzymů, případně, když je zároveň nízkým pH inhibována dekarboxyláza pozitivní mikroflóra (Bover-Cid, 2008, s. 272-276; Buňková et al., 2011, s. 117 a 118). Druhým, protichůdným jevem, však může být indukce dekarboxylázové aktivity, kdy pokles pH vyvolá snahu buňky ubránit se acidifikaci (Buňková et al., 2011, s. 118). Tento jev pak může následně vést k podpoře produkce biogenních aminů i přes redukci počtu mikroorganismů (zvýší se produkce biogenních aminů jednou buňkou).

1.4.2 Dostupnost prekurzorů biogenních aminů a pyridoxalfosfátu

Dostupnost substrátů (aminokyselin) je limitujícím faktorem při produkci biogenních aminů (Silla-Santos, 1996, s. 219).

Tvorba biogenních aminů je přímo podmíněna proteolýzou. Zjevným příkladem je zrání sýrů, kdy dlouhozrající sýry často obsahují vysoké koncentrace biogenních aminů právě v důsledku probíhajícího rozkladu kaseinu až na volné aminokyseliny, které pak slouží jako prekurzory (Komprda et al., 2008, s. 222; Linares et al., 2012, s. 2; Novella-Rodríguez et al., 2004, s. 250).

Pyridoxalfosfát je fosforylovaná aldehydická forma vitamínu B6 (pyridoxinu), která hraje velmi důležitou roli v metabolismu aminokyselin. Pyridoxalfosfát je kofaktorem

dekarboxyláz (Linares et al., 2011, s. 694). To znamená, že pokud se vyskytuje v kultivačním prostředí, bývá podpořena i produkce biogenních aminů (Arena a Manca de Nadra, 2001, s. 161; Gardini et al., 2005, s. 612; Marcobal et al., 2006, s. 421).

Vzrůst však může také aktivita dalších enzymů, které daný kofaktor používají. Mezi zmíněné enzymy náleží např. transaminázy (Ambrožová, 2004, s. 109). Transaminázy mohou katalyzovat přenos aminoskupiny na jinou molekulu, např. na aldehydy a ketony, za vzniku biogenních aminů (Percudani a Peracchi, 2009, s. 273). Je obecně známo, že druhý zmíněný způsob vzniku bakteriální buňky nepreferují (Mehta et al., 2012, s. 240).

Laktobacily i bifidobakterie disponují genetickými sekvencemi kódujícími vznik různých specifických transamináz (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, ©1995-2015a; *UniProt Consortium*, ©2002-2015a).

Transaminázy se však mohou také účastnit jiných biochemických procesů než jen syntézy biogenních aminů. Naopak mohou katalyzovat jejich anaerobní degradace (Drauz et al., 2012, s. 813). Danou problematikou se zabývá např. studie Roeder a Schink (2009, s. 4821-4828), kde jsou předmětem zájmu vybrané putrescin-degradující bakterie.

1.4.3 Vliv teploty

Tvorba biogenních aminů je závislá na teplotě, kdy s klesající teplotou klesá i samotná produkce. Při nízkých teplotách dochází k inhibici mikrobiálního růstu a redukci enzymatické aktivity (Naila et al., 2010, s. 140 a 145).

Regulace teploty může být považována za nástroj udržení podmínek, které budou zajišťovat prevenci vzniku biogenních aminů (Silla-Santos, 1996, s. 220; Linares et al., 2011, s. 694). Bylo pozorováno, že sýry vyráběné při nižší teplotě 20 °C, namísto 32 °C, obsahovaly významně nižší množství biogenních aminů (Linares et al., 2011, s. 694). Avšak ani nízká teplota nemůže zajistit to, aby nedocházelo k produkci. Některé bakterie jsou totiž schopny růst a tvořit biogenní aminy i při teplotách nižších, pohybujících se okolo 5 °C. Z těchto důvodů je vhodné využít synergie více faktorů, které společně spolehlivě růst a dekarboxylázovou aktivitu nežádoucích mikroorganismů omezí (vakuové balení, přídavek látek s konzervačním účinkem, tepelné ošetření, snížení pH apod.) (Silla-Santos, 1996, s. 220; Naila et al., 2010, s. 148).

1.4.4 Vliv zkvasitelných cukrů

Přítomnost zkvasitelných sacharidů, jako je glukóza, podporuje růst i dekarboxylázovou aktivitu bakterií. Koncentrace glukózy v rozsahu 0,5-2,0 % (w/v) je považována za optimální pro produkci biogenních aminů, zatímco hodnoty dosahující 3,0 % (w/v) už produkci inhibují (Silla-Santos, 1996, s. 219).

Vliv koncentrace laktózy na produkci biogenních aminů není u bakterií mléčného kvašení v dostupné literatuře detailněji popsán (stejně tak přídavky jiných zkvasitelných cukrů). Jen u bakterií rodu *Lactococcus* Buňková et al. (2011, s. 115) uvedla, že přídavky v rozsahu 0,25-1,00 % (w/v) neměly výraznější vliv na produkci. Při kultivaci laktokoků v prostředí bez laktózy byla ovšem tvorba biogenních aminů výrazně omezena. Dále Buňková et al. (2011, s. 115) ve své studii uvádí hypotézu, že vyšší koncentrace laktózy poskytují více substrátu, který může být přeměněn na kyselé produkty snižující pH kultivačního prostředí. Obdobné tvrzení, avšak v souvislosti s fermentací glukózy, uvádí Bover Cid et al. (2008, s. 272), kdy sledoval výraznější okyselení v médiích s vyšším přídavkem glukózy 1,5 % (w/v), než v médiu s její 0,5% koncentrací.

V souvislosti se schopností bakterií mléčného kvašení okyselovat růstové prostředí fermentací sacharidických substrátů lze zmínit, že prudší pokles pH můžeme sledovat po kultivaci homofermentativních kmenů s převážující produkcí kyseliny mléčné, než těch heterofermentativních, produkujících směs kyselin a etanolu (Mark et al., 1961, s. 259). Je také prokázáno, že například fermentaci kysaného zelí zahajují a během prvních dní kysání provádí heterofermentativní bakterie mléčného kvašení, které jsou následně vystřídány více acidotolerantními homofermentativními bakteriemi (Plengvidhya et al., 2007, s. 7697).

1.4.5 Vliv NaCl

Přídavek NaCl může představovat rovněž účinnou cestu, jak minimalizovat obsah biogenních aminů ve výsledném výrobku. Nelze však výrazně změnit recepturu vysokým přídavkem, aniž by se následně neodrazil na výsledné textuře, chuti a kvalitě výrobku (Linares et al., 2011, s. 694).

Přídavek 1-2 % (w/v) NaCl může růst bakterií mléčného kvašení podpořit, zatímco vyšší koncentrace (>3 %) mohou vést k inhibici růstu (Korkeala, Alanko a Tiusanen, 1992, s. 28) a hypoteticky i k omezení tvorby biogenních aminů.

Buňková et al. (2011, s. 116) zaznamenala u bakterií rodu *Lactococcus* tendence tvorby vyšších koncentrací biogenních aminů v prostředí obsahujícím 2 % (w/v) NaCl než v kultivačním médiu bez přídavku NaCl. Přídavek soli do kultivačního prostředí může být prospěšný i z důvodů dodání sodných iontů, které se podílejí na regulaci intracelulárního pH a hrají esenciální roli v tyrozindekarboxylázové aktivitě. Jsou důležité pro antiportový systém, kdy jsou vyměňovány s vodíkovými ionty (Na^+ dovnitř a H^+ ven z buňky) (Pereira, 2009, s. 348).

Nonstartérové laktobacily, které se účastnily výroby sýra zrajícího v solném nálevu – feta v rámci studie Valsamaki, Michaelidou a Polychroniadou (2000, s. 259-266), byly na základě výsledků označeny za hlavní původce zvýšeného obsahu biogenních aminů. Sýry díky vysoké koncentrací NaCl, nízké teplotě zrání (5 °C po dobu 15 dní) a nízkému pH však nepředstavují vhodné prostředí pro tvorbu těchto substancí.

Chander et al. (1989, s. 941) zjistili, že množství vyprodukovaných biogenních aminů testovaným kmenem *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* výrazně kleslo, když byla zvýšena koncentrace soli v kultivačním médiu z 0 na 6 % (w/v). Tento účinek může být spojován jednak s redukcí počtu vitálních buněk v přítomnosti soli nebo následkem porušení mikrobiálních dekarboxyláz, které jsou lokalizovány v bakteriální membráně (Gardini et al., 2001, s. 115).

1.4.6 Vliv přístupu kyslíku a redox-potenciál růstového prostředí

Přístup kyslíku má vliv na produkci biogenních aminů (Adams a Nout, 2001, s. 121). Opět se jedná o faktor, který nepůsobí na dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů jednoznačně, a to ať už se jedná o určité kmeny nebo o produkci jistých biogenních aminů v rámci daných kmenů.

Dle Adamse a Nouta (2001, s. 121) lze obecně předpokládat, že fakultativně anaerobní mikroorganismy produkují méně biogenních aminů v anaerobním prostředí, než je tomu v prostředí aerobním. Např. fakultativně anaerobní druh bakterií *Enterobacter cloacae*, produkuje poloviční množství putrescinu za anaerobních než za aerobních podmínek (Silla-Santos, 1996, s. 221).

U vybraného kmene *Lactobacillus curvatus* neměly rozdílné podmínky kultivace (aerobní/anaerobní) příliš významný vliv na produkci tyraminu, fenyletylaminu a putrescinu (Bover Cid et al., 2006, s. 271). Produkce putrescinu kmene *Lactobacillus*

hilgardii a *Lactobacillus plantarum* nebyla rozdílná v mikroaerofilních (bez převrstvení parafinem) nebo anaerobních podmínkách (s převrstvením parafinem) (Arena a Manca de Nadra, 2001, s. 158). V rámci výzkumu Buňková et al. (2012, s. 116 a 118) byl však u zkoušených kmenů *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* sledován mírný nárůst produkce tyraminu během anaerobní kultivace.

1.4.7 Vliv etanolu

Je obecně známo, že etanol patří mezi látky, které ovlivňují rychlost růstu a celkový počet mikroorganismů. Míru účinnosti etanolu, resp. jeho schopnost inhibovat růst mikroorganismů, ovlivňují i další faktory, jako je např. teplota a pH (García-Alegría et al., 2004, s. 59).

V dostupné literatuře není mnoho zdrojů, které by rozebíraly samotný vliv koncentrací etanolu na produkci biogenních aminů dekarboxyláza-pozitivními kmeny bakterií. Jedním z hlavních důvodů je zřejmě právě to, že je etanol obecně chápán jako látka, která inhibuje růst mikroorganismů a tedy jako substance výrazně omezující celkovou produkci biogenních aminů.

Mazzoli et al. (2009, s. 81-89) se ve své studii zabýval kmenem *Lactobacillus hilgardii* ISE 5211, izolátem z procesu výroby vín, kdy sledoval vliv etanolu (0, 9, 10 a 13 % (v/v)) a dalších faktorů na produkci histaminu za podmínek *in vitro*. Devítiprocentní koncentrace etanolu způsobila jen mírnou inhibici, avšak koncentrace 10 a 13 % (v/v) výrazně omezily kumulaci histaminu z 30 mmol/l (0 % etanolu) na < 10 mmol/l (Mazzoli et al., 2009, s. 86 a 87). Z těchto výsledků vyplývá, že etanol do koncentrace 10 % (v/v) nebyl schopen inhibovat růst a kumulaci histaminu zmíněným kmenem (Mazzoli et al., 2009, s. 88). Produkce tyraminu izoláty *Lactobacillus brevis* z vína rovněž nebyla výrazně ovlivněna přidávkem etanolu 0-10 % (v/v), avšak vyšší přídavek (12 %) vyvolal mírnou inhibici (Moreno-Arribas a Lonvaud-Funel, 1999, s. 59). Z těchto výsledků jasně vyplývá, že právě proto se mnoho studií zabývá vlivem etanolu na produkci biogenních aminů zkoumanou v matrici, kterou představují fermentované, mírně alkoholické nápoje – např. víno (Moreno-Arribas a Lonvaud-Funel, 1999, s. 55-60; Moreno-Arribas, 2000, s. 584-593; Garai et al., 2007, s. 473–478; Landete et al., 2007, s. 1569-1574; Mazzoli et al., 2009, s. 81-89) a pivo (Kalač et al., 2002, s. 431). Tato problematika je rozebírána v kapitole 1.5.2.

1.5 Biogenní aminy ve fermentovaných potravinách a nápojích

Nadměrná konzumace fermentovaných potravin může zvýšit riziko vzniku zdravotních komplikací, které plynou z vyššího příjmu biogenních aminů. Potenciální riziko představuje hlavně současná konzumace více fermentovaných výrobků najednou (např. sýry v kombinaci s vínem nebo pivem) (Spano et al., 2010, s. 96 a 97).

Z těchto důvodů je nutné mít všeobecné povědomí o tom, jaký obsah biogenních aminů lze ve fermentovaných potravinách a nápojích očekávat.

Jak již bylo zmíněno v předešlém textu této dizertační práce (kapitola 1.3), mezi mikroorganismy schopné produkce biogenních aminů náleží i bakterie mléčného kvašení. Přičemž s tvorbou biogenních aminů se můžeme setkat jak u čistých, záměrně využívaných kultur, tak u těch non-startérových nebo kontaminujících (Halász et al., 1994, s. 44).

Procesu výroby fermentovaných potravin se samozřejmě účastní i jiné skupiny mikroorganismů, nejen bakterie mléčného kvašení a bifidobakterie. V rámci kultur záměrně používaných, např. při výrobě fermentovaných mléčných výrobků a sýrů, to jsou mazové, kefirové nebo plísňové kultury. Jedná se například o zástupce bakteriálních rodů *Micrococcus*, *Kocuria* nebo *Brevibacterium*, kvasinky *Torulopsis*, *Kluyveromyces* a *Candida*, nebo také plísně (např. *Penicillium*). Výroby masných výrobků, trvanlivých fermentovaných klobás a salámů se mohou dále účastnit startérové a non-startérové kultury stafylokoků (*Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus*) a mikrokoků (Di Maria et al., 2002, s. 159 a 161). Zástupci čeledi *Micrococcaceae* jsou dle dostupných studií schopni tvořit putrescin, kadaverin, tyramin, fenyletylamin a další biogenní aminy. Například *Micrococcus luteus* byl označen za producenta kadaverinu (Hilbert a Busse, 2009, s. 223).

Někteří zástupci z výše vyjmenovaných druhů jsou označováni naopak za mikroorganismy schopné množství vytvořených biogenních aminů snižovat. Leuschner a Hammes (1998, s. 874-878) se ve své studii zabývali schopností *Brevibacterium linens* degradovat histamin a tyramin. V další studii zmíněných autorů byla předmětem zájmu aminooxidázová aktivita mikrokoků a jejich schopnost odbourávat tyramin při zrání fermentovaných trvanlivých salámů (Leuschner a Hammes, 1998, s. 289-296).

Kvasinky *Candida versatilis* a *Zygosaccharomyces rouxii* byly ve studii Qi et al. (2014, s. 1537-1542) označeny za producenty tyraminu. Stejně tak některé kmeny *Kocuria varians* byly schopny tvořit tyramin a histamin ve studii Fadda, Vignolo a Oliver (2001, s. 2017), kdy

autoři zároveň sledovali schopnost jiných čtyř kmenů *Kocuria varians* tyto biogenní aminy degradovat.

Typickými představiteli dekarboxyláza pozitivní mikroflóry, která může kontaminovat v procesu výroby mléčně fermentované výrobky, jsou pak zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* (Halász et al., 1994, s. 44). U izolátů rodů *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* získaných z fermentovaných klobás byla detekována produkce kadaverinu a putrescinu (Bover-Cid et al., 2001, s. 187). U izolátů (*Hafnia*, *Serratia*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*) z masa, fermentovaných masných výrobků a sýrů byla detekována hojná produkce obou již zmíněných biogenních aminů. Kromě putrescinu a kadaverinu byl v růstovém prostředí detekován i histamin a tyramin v množstvích 10-100 mg/l (Pircher, Fridrich a Paulsen, 2007, s. 229). Tyto skupiny mikroorganismů a jejich možné zapojení ve fermentačních procesech však nebudou v následující části rešerše rozebírány. Pozornost bude nadále věnována pouze aminogenní kapacitě bakterií mléčného kvašení (zvláště zástupcům laktobacilů) a potenciálu tvorby biogenních aminů kmeny bifidobakterií.

1.5.1 Obsah biogenních aminů ve fermentovaných mléčných výrobcích a sýrech

Mléčné výrobky jsou důležitou komponentou lidské stravy. Tento fakt podporuje skutečnost, že byla světová výroba všech sýrů podle FAO/WHO odhadována na něco málo přes 20 milionů tun ročně (Kopáček, 2012, s. 21). Společně s rybami a vínem jsou mléčné výrobky, zvláště pak sýry, považovány za potraviny s vysokým obsahem biogenních aminů (Somner et al., 1985, s. 1094 a 1095; Spano et al., 2010, s. 97).

V samotné výchozí surovině, v mléce, není obsah biogenních aminů významný (Linares et al., 2011, s. 693). Po fermentačním procesu však lze v některých případech sledovat nárůst koncentrace biogenních aminů ve výrobku v souvislosti s dekarboxylázovou aktivitou přítomné mikroflóry a zvolených technologických podmínkách výroby (Linares et al., 2011, s. 693).

Nejvíce zastoupenými biogenními aminy v mléčných výrobcích jsou histamin, tyramin (vzniklé dekarboxylací histidinu a tyrozinu), putrescin (syntetizovaný pomocí dekarboxylace ornitinu nebo deaminací agmatinu vzniklého z argininu) a v malém množství kadaverin, vzniklý dekarboxylací lyzinu (Linares et al., 2012, s. 1 a 2).

Studii, které by se zabývaly zmapováním obsahu biogenních aminů v jogurtech, zakysaných smetanách a zakysaných nebo acidofilních mléčích, mnoho není. Ve fermentovaných mléčných výrobcích byly dle skrínungu Buňkové et al. (2013, s. 548–551) u vybraných českých výrobků detekovány relativně nízké koncentrace biogenních aminů. Jogurty s obsahem tuku v sušině 3-10 % (w/w) mohou podle studie dosahovat hodnot tyraminu 6,3 mg/kg a u putrescinu 25,1 mg/kg. Někteří autoři uvádějí i různý obsah histaminu < 13 mg/kg (Linares et al., 2011, s. 693).

Ve vzorcích zakysané smetany se obsah tyraminu pohyboval v rozsahu 5,5-15,4 mg/kg a obsah putrescinu okolo 9 mg/kg (Buňková et al., 2013, s. 549). Nejvyšší naměřená koncentrace v acidofilním mléce byla v případě tyraminu 7,5 mg/kg, u putrescinu pak 4,4 mg/kg. V kefiru byly v rámci tohoto výzkumu detekovány nejvyšší hodnoty zhruba dvojnásobné, tj. tyraminu 15,3 mg/kg a putrescinu 14,3 mg/kg (Buňková et al., 2013, s. 549).

V sýrech je situace o poznání složitější. Bývají zde detekovány všechny v potravinách nejběžnější biogenní aminy (tyramin, histamin, putrescin, kadaverin, fenyletylamin, tryptamin) (Silla-Santos, 1996, s. 216; Linares et al., 2011, s. 693).

Množství jednotlivých aminů, konkrétně histaminu, tyraminu, kadaverinu a putrescinu, může v sýrech přesáhnout 400 mg/kg. U sýrů s plísní v těstě vyrobených z nepasterovaného mléka tyto hodnoty v některých případech přesahují 1 g/kg (Linares et al., 2011, s. 693).

Zastoupení a celkový obsah biogenních aminů se v rámci druhů sýra velmi liší. Rozdílnosti můžeme pozorovat ale také u jednoho druhu či jeho jednotlivých částí (Novella-Rodríguez et al., 2003, s. 750; Novella-Rodríguez et al., 2004, s. 247; Standarová, Borkovcová a Vorlová, 2008, s. 735-739).

Relativně vysoké koncentrace biogenních aminů mohou být sledovány zvláště v sýrech, které byly vyrobeny ze syrového (nepasterovaného) mléka a v sýrech s delším zráním (Linares et al., 2011, s. 693). Stejně závěry uvedla ve své studii i Buňková et al. (2013, s. 548–551), kdy sýry, u kterých proběhlo zrání, byly na biogenní aminy a polyaminy výrazně bohatší než sýry čerstvé. Daná skutečnost může být vysvětlena tím, že v případě déle zrajících sýrů má mikroflóra dostatek času vyprodukovat větší množství těchto substancí (Buňková et al., 2010, s. 887). Na druhou stranu některé sýry z farem s kratší periodou zrání prokazovaly vyšší obsah biogenních aminů (>200 mg/kg). Vyšší obsah byl způsoben pravděpodobně aktivitou non-startérové nebo kontaminující mikroflóry (Buňková et al., 2013, s. 550).

U sýrů z nepasterovaného mléka se nejvýznamněji uplatňují non-startérové kultury, kdy je obsah biogenních aminů podstatně vyšší než u sýrů, jejichž výchozí surovina byla ošetřena tepelným záhřevem (Fernández et al., 2007, 1401; Linares et al., 2011, s. 693).

Velmi často jsou s produkcí biogenních aminů (nejen v sýrech) spojovány právě kontaminující bakterie, zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* (Joosten a Norholt, 1987, s. 260; Ruiz-Capillas a Jiménez-Colmenero, 2004, s. 241; Kalač, 2006, s. 4 a 8). Avšak proteolytický profil kyselých kultur, a tím pádem i tendence zvyšovat obsah volných aminokyselin, nese také podíl na vzniku biogenních aminů (Halász et al., 1994, s. 44; Novella-Rodríguez et al., 2002, s. 2474; Linares et al., 2012, s. 2 a 5). Jako hlavní producenti biogenních aminů z bakterií mléčného kvašení jsou v sýrech označováni zástupci rodů *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* a *Streptococcus* (Linares et al., 2012, s. 3-5).

V poslední době je věnována pozornost vývoji funkčních probiotických výrobků. Sýry mají dobrý potenciál k tomu, aby mohly fungovat jako zdroj probiotických kultur některých druhů bifidobakterií a laktobacilů (Ong a Shah, 2009, s. 142-146). Z hlediska proteolytického profilu jsou bakterie rodu *Bifidobacterium* méně aktivní než bakterie rodu *Lactobacillus*. Množství uvolněných aminokyselin bylo u kmenů *Lb. delbrunckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus* vyšší než u kmenů *Bifidobacterium* (Shihata a Shah, 2000, s. 401-408).

Avšak uvědomíme-li si, že i v rámci těchto bakteriálních probiotických kultur lze najít dekarboxyláza-pozitivní kmeny (Sládková et al., 2007, s. 6; Priyadarshani a Rakshit, 2011, s. 2067; Priyadarshani a Rakshit, 2014, s. 73 a 74), mohou být i funkční výrobky potenciálním zdrojem biogenních aminů. Přičemž doba přežívání těchto kultur ve zrajících sýrech není až tak krátká, jak by se předpokládalo. Dokážou přežít pěti až třiceti týdenní zrační periodu, aniž by jejich koncentrace klesla pod $5 \cdot 10^6$ CFU/g (Suková, 2004, on-line).

1.5.2 Obsah biogenních aminů ve fermentovaných alkoholických nápojích

Množství biogenních aminů obsažených v pivu a vínu můžeme obecně označit za nižší, než lze najít v mase některých ryb nebo v sýrech. Avšak vzhledem k přítomnosti etanolu, zejména při množství běžně zkonsumovaného piva (0,33-0,50 l), mohou i tyto koncentrace představovat závažný problém. Hodnoty biogenních aminů se pravidelně v těchto nápojích pohybují do 100 mg/l (viz následující text). Jak již bylo zmíněno, je však nutné uvážit účinky etanolu na detoxikační systém. Etanol je totiž jedním z významných inhibitorů

monoaminoxidáz, které se podílejí na procesu odbourávání biogenních aminů v lidském těle. Množství biogenních aminů, které může zapříčinit i vážné zdravotní komplikace, je v případě spolupůsobení etanolu a biogenních aminů významnou měrou sníženo (Spano et al., 2010, s. 95-100; Buňková et al., 2013, s. 551).

Biogenní aminy v pivu

Mezi biogenní aminy, které mohou být přítomny v pivu, náleží putrescin, spermidin, spermin, agmatin, histamin a tyramin (Kalač a Křížek, 2003, s. 124).

V rámci výzkumu Halász et al. (1999, s. 418–423) bylo poukázáno na poměrně široký rozptyl obsahu biogenních aminů v náhodně vybraných vzorcích piv různého původu a kvality (Σbiogenních aminů 30-250 mg/l). V souhrnném review uvedl Kalač a Křížek (2003, s. 124) obecný přehled výskytu biogenních aminů v pivech z celého světa, kdy byly ve vzorcích přítomny většinou nižší koncentrace histaminu (do 21,0 mg/l), polyaminů (kadaverinu do 30,7 mg/l, sperminu do 15,2 mg/l, spermidinu do 6,8 mg/l) a vyšší koncentrace tyraminu (do 67,5 mg/l).

Biogenní aminy se do piva dostávají již v surovinách, kdy největší podíl biogenních aminů vnáší slad (Kalač a Křížek, 2003, s. 124 a 125). Vliv na obsah biogenních aminů má také odrůda ječmene, jak prokázali ve své studii Halász et al. (1999, s. 421).

U sladů vyrobených z různých odrůd se vyskytovaly odlišné koncentrace biogenních aminů. Například tyramin byl detekován v rozsahu 8,1-18,9 mg/100 g, putrescin v rozptylu 7,6-21,0 mg/100 g, obsah spermidinu byl 1,6-27,4 mg/100 g a sperminu 6,3-19,6 mg/100 g. Podle studie měl na množství biogenních aminů v pivu vliv způsob sladování a vedení fermentačního procesu (přítomnost aminogenních mikroorganismů) (Halász et al., 1999, s. 420-423).

Kromě surovin, které se využívají k výrobě piva, kumulaci biogenních aminů v pivu mohou mít na svědomí mikroorganismy, které se účastní fermentačního procesu (kvasinky) nebo jsou považovány za kontaminanty (bakterie mléčného kvašení) (Kalač a Křížek, 2003, s. 125 a 126). Za obsah biogenních aminů podle mnohých autorů odborných studií právě odpovídají bakterie mléčného kvašení, především kmeny rodu *Pediococcus* a *Lactobacillus* (Isquierdo-Pulido et al., 1996, 175-180; Kalač a Křížek, 2003, s. 126).

Původ biogenních aminů lze také shrnout následovně: Zdrojem agmatinu, putrescinu, spermidinu a sperminu je slad, zatímco tyramin, histamin a kadaverin jsou tvořeny během hlavní fáze fermentace bakteriemi mléčného kvašení (Kalač et al., 2002, s. 431).

Biogenní aminy a polyaminy ve víně

Víno, stejně jako pivo, vzniká fermentačním procesem a může být zdrojem biogenních aminů.

Důvody výskytu biogenních aminů ve víně, stejně jako v pivu, jsou různé. Mohou být přítomny již ve rmutu (Moreno-Arribas et al. 2003, s. 121), mohou je tvořit kvasinky během alkoholové fermentace (Caruso et al., 2002, s. 160) nebo jsou produkovány až v rámci malolaktické fermentace bakteriemi mléčného kvašení (Moreno-Arribas et al., 2000, s. 592).

Výskyt biogenních aminů ve víně je však převážně připisován bakteriím mléčného kvašení. Této problematice je věnováno mnoho studií (Moreno-Arribas a Lonvaud-Funel, 1999, s. 55-60; Moreno-Arribas, 2000, s. 584-593; Garai et al., 2007, s. 473-478; Landete et al., 2007, s. 1569-1574; Mazzoli et al., 2009, s. 81-89). Kromě pH, přítomnosti zkvasitelných cukrů a dalších faktorů, které mohou v tomto prostředí ovlivnit aminogenní aktivitu, bez pochyby náleží již zmíněná přítomnost etanolu (pokapitola 1.4.7).

Autoři Gerbaux a Monamy (2000, s. 25) uvedli, že je histamin, tyramin a putrescin kumulován v burgundském víně zvláště během malolaktické fermentace. Souhlasně Soufleros et al. (1998, s. 266-278) ve své studii uvádí, že po hlavním etanolovém kvašení vína je obsah jmenovaných biogenních aminů nižší a narůstá až během jablečno-mléčného kvašení.

Ve víně je histamin a tyramin prokazatelně tvořen bakteriemi mléčného kvašení. Za producenty histaminu jsou označovány bakterie rodu *Pediococcus* a zástupci druhu *Oenococcus oeni* (Lonvaud-Funel, 2001, s. 11). *Oenococcus oeni*, resp. některé jeho kmeny, produkují také putrescin (Guerrini et al., 2002, s. 376).

U kmene *O. oeni* T56 byla navíc prokázána schopnost produkce polyaminů sperminu a spermidinu *in vitro*, kdy celkové vytvořené množství těchto polyaminů významně ovlivňovaly různé kultivační podmínky (pH, SO₂, přídavek arabinózy, etanolu a pyridoxalfosfátu). V některých případech produkce dosahovala nemalých koncentrací (spermin 168,8 mg/l, spermidin 24,4 mg/l) (Gardini et al., 2005, s. 612).

Za produkci tyraminu ve víně pak byly ve studii Landete, Pardo a Ferrer (2007, s. 367) zodpovědné kmeny laktobacilů *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus hilgardii*.

Ve vzorcích španělských červených vín byl v experimentu Marcobal et al. (2005, s. 387–394) pozorován celkový obsah biogenních aminů, kdy nejvyšší souhrnnou naměřenou hodnotou bylo 43,8 mg/l. Mezi nejčastěji a nejvíce zastoupenými biogenními aminy byl histamin (nejvyšší detekované množství 10,8 mg/l), putrescin (nejvyšší detekované množství 26,5 mg/l) a tyramin (11,3 mg/l) (Marcobal et al., 2005, s. 391).

1.5.3 Obsah biogenních aminů v ostatních fermentovaných výrobcích

Nejen mléčné výrobky, sýry a slabě alkoholické nápoje jsou potvrzenými zdroji biogenních aminů ve výživě člověka. Biogenní aminy jsou produkovány i v jiných skupinách potravin. Některé z nich jsou zmíněny v této kapitole. Pozornost je opět zaměřena na bakterie mléčného kvašení, jako na možné původce biogenních aminů v daných výrobcích.

Rostlinné fermentované výrobky

Fermentované zelí (sauerkraut) je velmi oblíbeným výrobkem v mnoha evropských zemích díky své nutriční hodnotě a senzorickým vlastnostem (Karovičová a Kohajdová, 2003, s. 152).

Kmeny *Lactobacillus plantarum* (CCM 3769), *Lactobacillus casei* (CCM 3775), *Pediococcus pentosaceus* (CCM 3770) a *Enterococcus faecium* (CCM 6226) z České sbírky mikroorganismů byly samostatně očkované do prostředí raného krouhaného zelí pro výrobu kysaného zelí ve výzkumu Kalač et al. (2000, s. 357). Kmeny v dané matici po čtrnácti dnech fermentace (při 22 °C) a šesti měsících zrání (při 5-6 °C) prokázaly schopnost poměrně významné produkce tyraminu (až 116 mg/l, *Pediococcus pentosaceus*), putrescinu (až 391 mg/l, *Lb. casei*) a kadaverinu (až 79,6 mg/l, *P. pentosaceus*). V jiné publikaci Špičky et al. (2002, s. 509-514) byla testována aplikace startérových kultur bakterií mléčného kvašení z opačného pohledu, tedy v souvislosti se snižováním obsahu biogenních aminů v kysaném zelí. Na základě tohoto výzkumu je doporučeno používat inokulátu čistých kultur, např. *Lactobacillus plantarum* (CCM 3769), který účinně snižuje obsah putrescinu, kadaverinu a tyraminu v zelí v porovnání se spontánně fermentovaným.

Korejská fermentovaná zelenina kimchi (převážně fermentované zelí) je také zdrojem biogenních aminů, kdy za původce histaminu v ní byly označeny i bakterie mléčného kvašení *Lactobacillus paracasei* a *Lactobacillus brevis* (Tsai et al., 2005, s. 635-641).

Studie na obsah biogenních aminů v mléčně fermentovaných okurkách („pickled cucumbers“), co se týče dekarboxylázové aktivity bakterií mléčného kvašení, nejsou v aktuální literatuře dostupné.

Dalšími zdroji biogenních aminů mohou být například potraviny na bázi fermentovaných hydrolyzátů sojových bílkovin. Studie Yongmei et al. (2009, s. 593-597) poukázala na relativně vysoké obsahy histaminu a tyraminu v čínských sójových omáčkách, z nichž některé překračovaly 300 mg/l (Yongmei et al., 2009, s. 594). V japonské sójové pastě Miso nebo korejské pastě Doenjang jsou biogenní aminy produkovány za účasti bakterií mléčného kvašení (Kung, Tsai a Wei, 2007, s. 352; Shukla et al., 2010, s. 1194). Jako produkční kmeny byly v souvislosti s vyššími koncentracemi histaminu v sójové pastě označeny konkrétně zástupci rodu *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Pediococcus* (Kung, Tsai a Wei, 2007, s. 352).

Živočišné výrobky

Růst bakterií mléčného kvašení a změny spojené s fermentačními procesy v baleném mase nejsou žádoucí. Laktobacily a leukonostoky, které kontaminují čerstvé maso, jsou označovány za jednu z příčin jeho kažení. Mezi projevy kažení náleží tvorba kyselých látek i produkce biogenních aminů (Štegnarová et al., 2007, s. 39-42).

Ve výzkumu Min et al. (2004, s. 1474-1476) byla sledována dekarboxylázová aktivita vybraných bakteriálních inokulátů v mletém hovězím, vepřovém a kuřecím mase. Mezi bakterie produkující putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermin a spermidin náležely i kmeny bakterií mléčného kvašení, zástupci druhů *Lb. curvatus*, *Lb. alimentarius* a *Leuconostoc mesenteroides*. Produkce polyaminů sperminu a spermidinu byla mnohdy vyšší než 50 mg/kg, pro kadaverin a putrescin dokonce v některých případech přesahovala 1,5 g/kg.

Pro výrobu trvanlivých masných výrobků mohou být kultury bakterií mléčného kvašení používány cíleně. Zvláště uplatnění při výrobě trvanlivých fermentovaných salámů nachází bakterie *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* a *Lb. sakei*, a to nejčastěji v kombinaci se stafylokoky (*S. carnosus*, *S. xylosus*) (Kameník, 2012, s. 33). Bover-Cid et al. (2000, s. 237-243) ve studii, kde byly používány kmeny zmíněných druhů stafylokoků jako startérové kultury masných výrobků, uvádí, že tyto kultury snižovaly poměrně významně obsah putrescinu ve vzorcích fermentovaných masných výrobků, v porovnání se spontánně fermentovanými vzorky bez jejich přídavku.

Isoláty laktobacilů a leukonostoků z fermentovaných výrobků a masa však byly schopné produkce tyraminu a histaminu v experimentu Pircher et al. (2007, s. 227). U některých

kmenů *Lb. sakei* a *Lb. curvatus* izolovaných z vepřových masných výrobků byla potvrzena schopnost produkce biogenních aminů (tyramin u *Lb. curvatus* až 2,9 g/l, *Lb. sakei* až 2,1 g/l) (Bover-Cid et al., 2001, s. 187).

Souhrnně lze konstatovat, že startérové kultury mohou ovlivnit množství biogenních aminů ve fermentovaných masných výrobcích dvojitým způsobem. Mohou způsobit inhibici růstu jiné významnější aminogenní mikroflóry, anebo samy způsobí nárůst celkového obsahu biogenních aminů ve výrobku (Komprda et al., 2001, s. 275).

1.6 Bakterie mléčného kvašení a bifidobakterie

Bakterie mléčného kvašení jsou souhrnným označením pro heterogenní skupinu grampozitivních bakterií, které mají společné některé morfologické, metabolické a fyziologické znaky. Obecnou charakteristikou této taxonomicky nesourodé skupiny je, že se jedná o nesporeující, nepohyblivé, fakultativně anaerobní/aerotolerantní tyčinky a koky, které produkují kyselinu mléčnou fermentací sacharidů (Walstra a Wouters, 2006, s. 357). Historicky jádro této skupiny tvoří jen rody *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, avšak taxonomické revize odhalily, že je tato skupina mnohem početnější (Salmien, Wright a Owehand, 2004, s. 8). Z hlediska praktických aplikací těchto bakterií v potravinářských technologiích mají význam hlavně následující: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, a *Weissella* (Hutkins, 2006, s. 23).

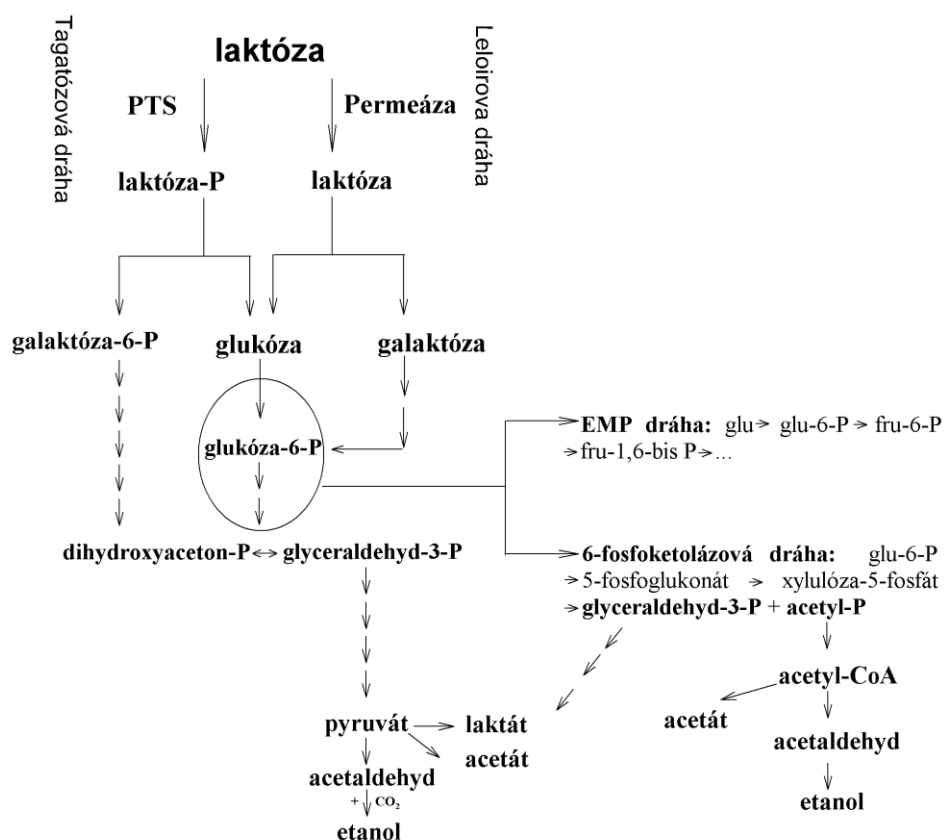
Některé kmeny *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* jsou aplikovány jako probiotické kultury (Gomes et al., 2011, s. 4777).

Rod *Bifidobacterium* je často považován za bakterie mléčného kvašení, protože disponuje mnohými společnými znaky, avšak fylogeneticky se liší zvláště svým unikátním způsobem fermentace cukrů, tzv. dráhou „bifid shunt“ nebo také fruktóza-6-fosfátovou dráhou (Whitman et al., 2012, s. 214; Salmien, Wright a Owehand, 2004., 2004, s. 147, s. 150 a 152; Ventura et al., 2004, s. 215; Jay, Loessner a Golden, 2005, s. 485; Walstra a Wouters, 2005, s. 555; Hutkins, 2006, s. 20).

Bakterie mléčného kvašení jsou chemotrofní organizmy a energii získávají degradací sacharidických substrátů (Papagianni, 2012, s. 1). V prostředí mléka je tímto substrátem laktóza. Transport mléčného cukru do buňky se může dít dvěma způsoby. Rychlá fermentace

laktózy je spojována s účastí fosfoenolpyruvátdependentního fosfotransferázového systému (PTS). Většina startérových kultur disponuje PTS, a tak může laktóza vstupovat do buňky v podobě laktózafosfátu, který je následně hydrolyzován fosfo- β -galaktozidázou na glukózu a galaktózu-6-fosfát (Obr. 2). Glukóza je pak fosforylována za účasti glukokinázy a metabolizována pomocí Embden-Meyerhof homofermentativní glykolízy přes pyruvát na laktát. Galaktóza-6-fosfát vstupuje do glykolízy přes tagatóza-6-fosfátovou dráhu. (Fox et al., 2000, s. 587)

Druhý zmíněný mechanismus příjmu laktózy buňkou bakterií mléčného kvašení se pak děje pomocí laktózapermeáz, kdy je uvnitř buňky následně laktóza štěpena na glukózu a galaktózu (Leloirova dráha, Obr. 2). Mnoho zástupců bakterií mléčného kvašení disponuje oběma mechanismy. V buňce se lze setkat s PTS i laktózapermeázovým systémem transportu (Axelson, 1998, s. 69-71).



Obr. 2: Zjednodušené schéma metabolismu laktózy v buňkách bakterií mléčného kvašení (upraveno dle Foxe et al., 2000 a Papagianni, 2012); P...fosfát, CoA...koenzym A, glu...glukóza, fru...fruktóza, PTS...fosfotransferázový systém

Samotný zisk adenosintrifosfátu (ATP) se v těchto bakteriích děje dvěma základními drahami: glykolýzou, kdy je konečným převažujícím produktem kyselina mléčná, nebo fosfoketolázovou dráhou za vzniku kyseliny octové, propionové, etanolu a CO₂ (Axelson, 1998, s. 69-71).

1.6.2 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* je nejpočetnější skupinou mezi zástupci bakterií mléčného kvašení. Tento rod zahrnuje druhy s širokou škálou fenotypových, biochemických a fyziologických vlastností (Salmien, Wright a Ouwehand, 2004, s. 78; Hutkins, 2006, s. 33-35). Rod *Lactobacillus* taxonomicky náleží do kmene bakterií *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales*, čeledi *Lactobacillaceae* (Hutkins, 2006, s. 22 a 23, Felis a Dellaglio, 2007, s. 46).

Laktobacily jsou poměrně náročné na růstové podmínky, vyžadují bohatá média, a jsou mikroaerofilní, kataláza negativní. Z hlediska výskytu jsou tyto tyčinkovité bakterie ubikvitní. Setkáme se s nimi prakticky všude, kde jsou přítomny zdroje uhlíku v podobě zkvasitelných sacharidů (např. mléčné výrobky, fermentované masné produkty, zelenina, ovoce, nápoje, dýchací ústrojí, gastrointestinální trakt lidí a zvířat, kaly a rostlinné materiály). Vyžadují nutričně bohatá média. Nejsou významně proteo- a lipolytické, avšak aminokyseliny, peptidy, mastné kyseliny pro růst potřebují (Hutkins, 2006, s. 33; Felis a Dellaglio, 2007, s. 46).

Některé kmeny jsou náročné na růstové prostředí a vyžadují vitaminy, nukleotidy a jiné nutrienty. Jsou schopny fermentovat velkou škálu sacharidů, např. glukózu, laktózu, fruktózu, dokonce celobiózu, trehalózu, nebo mohou využít jako zdroj uhlíku kyanogenní glykosid. Některé druhy laktobacilů jsou schopny fermentace škrobu (Hutkins, 2006, s. 35).

Nejtradičnější členění zástupců rodu *Lactobacillus* je uskutečňováno právě na základě způsobu fermentace sacharidů, ale také dle konfigurace vyprodukované kyseliny mléčné a optimální teploty růstu (Salmien et al., 2004, s. 6; Caelsson et al., 2007, s. 22). Z hlediska zkvašování rozlišujeme laktobacily: obligátně homofermentativní, které využívají výhradně Embden-Meyerhof-Parnasovu (EMP) dráhu (např. *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*); fakultativně heterofermentativní, které využívají nejen EMP, ale také fosfoketolázovou dráhu (např. *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei* atd.); obligátně heterofermentativní s 6-fosfoketolázovou dráhou (např. *Lb. fermentum*, *Lb. brevis*, *Lb.*

reuteri, *Lb. sanfranciscensis*) (Jay et al., 2005, s. 116; Caelsson et al., 2007, s. 23; Sedláček, 2007, s. 244-245, Felis a Dellaglio, 2007, s. 48).

Podle optimální teploty kultivace pak dělíme tyto bakterie na mezofilní (30 °C; např. *Lb. casei*, *Lb. plantarum*) a termofilní (40 °C; např. *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) (Jay et al., 2005, s. 117; Hutkins, 2006, s. 33). Laktobacily jsou schopny fermentací okyselit kultivační prostředí na pH 4, ale rostou i při pH kolem 7 (optimální pH se pohybuje většinou mezi 5,4 - 6,4) (Ljungh a Wadstöm, 2009, s. 103; Hutkins, 2006, s. 33, Sedláček, 2007, s. 244).

Jak již bylo zmíněno, i mezi laktobacily můžeme najít dekarboxyláza pozitivní zástupce, které v potravinách a fermentovaných nápojích mohou produkovat biogenní aminy a tím ohrožovat jejich zdravotní nezávadnost. Tato problematika byla rozebírána v kapitole 1.5.

1.6.2 Rod *Bifidobacterium*

Kvůli morfologickým a fyziologickým vlastnostem a kvůli tomu, že jsou bifidobakterie do značné míry podobné laktobacilům, byly řazeny k rodu *Lactobacillus* po převážnou část dvacátého století (Mayo a Sinderen, 2010, s. 31). Bifidobakterie, na rozdíl od bakterií rodu *Lactobacillus*, disponují vysokým obsahem guaninových a cytozinových bazí v genomu (většinou nad 50 %; 42-67 %) (Felis a Dellaglio, 2007, s. 53; Mayo a Sinderen, 2010, s. 20 a 21; Chandan a Kilara, 2013, s. 455). Taxonomické zařazení *Bifidobacterium* je následující: náleží do kmene *Actinobacteriea*, třídy *Actinobacteria*, řádu *Bifidobacteriales*, čeledi *Bifidobacteriaceae* (Sedláček, 2007, s. 218). Čleď *Bifidobacteriaceae* se pak skládá z následujících šesti rodů: *Aeriscardovia*, *Alloiscardovia*, *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Parascardovia* a *Scardovia* (Sedláček, 2007, s. 218; Felis a Dellaglio, 2007, s. 53).

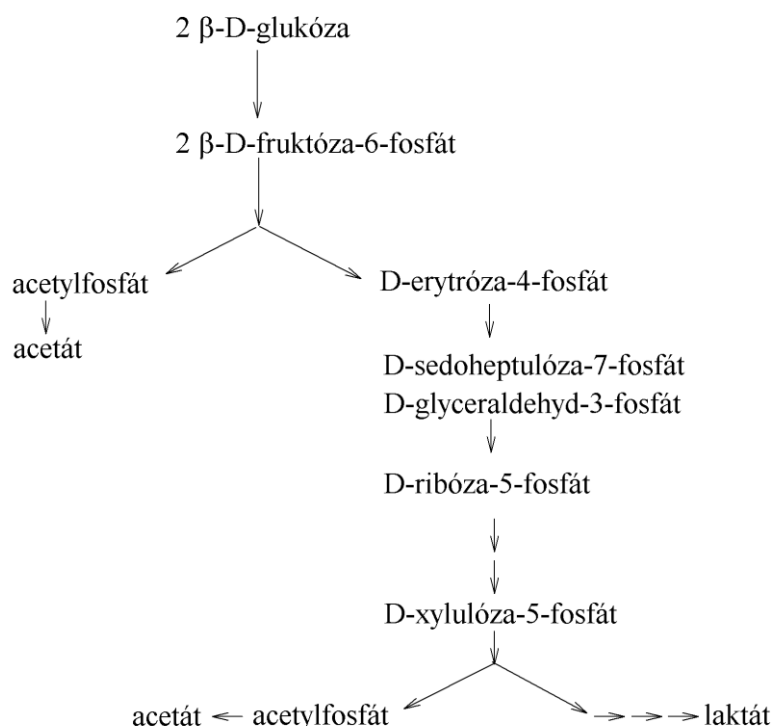
Bifidobakterie jsou anaerobní, někdy větvené pleomorfní tyčinky (Šilhánková, 2002, s. 278), které se mohou vyskytovat samostatně, v řetězcích nebo ve shlucích (Ventura et al., 2004, s. 205; Sedláček, 2007, s. 218). Za nepříznivých podmínek růstu je jejich tvar velmi různorodý a je ovlivněn přítomností *N*-acetylglukózáminu, alaninu, kyseliny asparagové, kyseliny glutamové, serinu a Ca²⁺ iontů v kultivačním médiu (Ventura et al., 2004, s. 205).

Bakterie tohoto rodu mají fermentativní typ metabolismu (Sedláček, 2007, s. 218). Výjimky tvoří *Bifidobacterium indicum* a *Bifidobacterium asteroides*, které jsou schopny růst i za přístupu vzduchu (jsou kataláza negativní). Degradací sacharidů produkují kyselinu, nikoli však plyn (pouze malá množství CO₂, jako vedlejší produkt). Vyskytují se ve zvířecích

i lidských gastrointestinálních traktách. Izolovány jsou např. většinou z fekálií, z bachoru skotu, z odpadních vod, zubního kazu a střev včel (Felis a Dellaglio, 2007, s. 53).

Optimální teplota kultivace se pak pohybuje od 37 °C do 41 °C. Optimální pH pro růst leží mezi hodnotami 6,5 a 7,0 (Whitman et al., 2012, s. 172; Chandan a Kilara, 2013, s. 456).

Podle databáze LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature) k tomuto datu rod *Bifidobacterium* zahrnuje 43 druhů.



Obr. 3: Metabolismus glukózy v buňce bifidobakterií (MetaCyc Metabolic Pathway Database, ©2014a)

K odbourávání sacharidů využívají výše zmíněnou fruktóza-6-fosfátovou dráhu (Obr. 3), kdy konečnými produkty jsou kyselina mléčná a octová (z 2 molů glukózy vzniknou 3 moly acetátu + 2 moly laktátu + 5 molů ATP), potom mohou být generovány další kyseliny na úkor uvedených (kyselina mravenčí a jantarová) a etanol (Whitman et al., 2012, s. 172; Sedláček, 2007, s. 218, Chandan a Kilara, 2013, s. 455). Namísto glukózy mohou jako substráty bifidobakteriím posloužit i jiné sacharidy, např. galaktóza, nebo oligosacharidy rafinóza, sacharóza či laktóza (Zhu, Li a Xiuzhu, 2003, s. 1619-1623; Whitman et al., 2012,

s. 181). Jen některé druhy bifidobakterií pak dokážou degradovat i cukerné alkoholy manitol a sorbitol nebo disponují extracelulárními enzymy, kterými jsou schopny hydrolyzovat polysacharidy, jako je např. amylopektin a amylóza škrobu, inulin nebo xylan (Whitman et al., 2012, s. 180). Fruktooligosacharidy a inulin jsou bifidobakteriemi metabolizovány přednostně v porovnání s jinými oligosacharidy. Většina bakterií osidlujících gastrointestinální trakt tyto substráty nevyužívá (Whitman et al., 2012, s. 180).

Nárůst bifidobakterií v mléku je často pomalejší než v syntetickém médiu. Tento projev je přisuzován nízké proteolytické aktivitě bifidobakterií nebo také nízké aktivitě galaktozidázy, enzymu štěpícího mléčný cukr. Řešením nízké proteolytické aktivity může být přidavek vybraných kmenů vysoce proteolytických bakterií mléčného kvašení, které by však neměly přerůst bifidobakteriální kulturu (Charalampopoulos a Rastall, 2009, s. 735). Existuje spousta studií zabývajících se problematikou proteolytických schopností bifidobakteriálních kultur (Cheng a Nagasava, 1984, s. 339-349; El-Soda et al., 1992, s. 87-90; Abu-Taraboush et al., 1998, s. 354-361) a ne všechny hovoří souhlasně.

Bifidobakterie potřebují přidavek růstových faktorů, aby dosáhly požadovaného počtu. Někdy jsou tyto zvýšené požadavky na růstové prostředí označovány jako „bifidus faktor“. Růst bifidobakterií podporuje například κ -kasein, α -laktalbumin, β -laktoglobulin, kvasničný extrakt, treonin, cystein, pepton, dextrin, maltóza, laktulóza a hydrolyzáty kaseinu, D-glukózamin, α -etyl-N-acetyl-D-glukózamin, N-karboetoxy-D-glukózamin, N-acetylglukózamin, N-acetyllaktoamin, N-N-diacetylchitobióza a N-acetylneuraminová kyselina (Maxa a Rada, 2002, s. 40).

Pomocí různých druhů deamináz a dehydratáz mohou tyto bakterie fermentovat aminokyseliny (Schell et al., 2002, s. 14424). Také jsou bifidobakterie schopny dekarboxylovat volné aminokyseliny za vzniku biogenních aminů (Lorencová et al., 2012, s. 2086-2091). To, že disponují potenciálem produkovat biogenní aminy, uvedla již studie autorů Sládkové et al. (2007, s. 6) a potvrzuje to i genetická predispozice tvorby enzymů katalyzujících jejich vznik (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, ©1995-2015b).

Velmi málo studií se zabývá dekarboxylázovou aktivitou probiotických kultur, zvláště těch záměrně používaných. Samotná schopnost produkovat biogenní aminy a polyaminy, nebo vliv vnějších faktorů na rozsah této produkce, je pak další málo prozkoumanou oblastí v rámci metabolismu probiotických mikroorganismů. Stejně tak kinetika tvorby biogenních aminů u bifidobakterií nebyla doposud předmětem výzkumů.

1.7 Obecný přehled způsobů detekce biogenních aminů

Pro detekci biogenních aminů vyprodukovaných bakteriemi jsou používány různé metody, které mají své výhody i nevýhody. Tyto techniky můžeme rozdělit do tří následujících skupin:

1. Analytické separační metody: tenkovrstvá chromatografie (TLC), plynová chromatografie (GC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC), ultraúčinná kapalinová chromatografie (UPLC) a elektroforetické metody (kapilární zónová elektroforéza, CZE) (Oguri, 2000, s. 2, 5-7; Smělá et al., 2004, s. 432; Veseli et al., 2013, s. 350).

2. Molekulárně-genetické: polymerázová řetězová reakce (PCR), kdy jde spíše o detekci potenciálu tvorby biogenních aminů z hlediska přítomnosti genů kódujících vznik dekarboxylačních enzymů (Buňková et al., 2009, s. 538).

3. Mikrobiologická kultivační metoda (Buňková et al., 2009, s. 533-538; Bover-Cid a Mah-Jae et al., 2001, s. 491-496; Holzapfel, 1999, s. 33-41).

4. Imuno-enzymatické stanovení (Enzyme-Linked Imuno Sorbent Assay; ELISA) (Nollet a Toldra, 2010, s. 414).

1.7.1 Chromatografické a elektroforetické metody stanovení obsahu biogenních aminů ve vzorku

Pro stanovení biogenních aminů ve vzorku se nejčastěji používají vysoce citlivé chromatografické metody na reverzních fázích s fluorescenční nebo UV detekcí po dansylaci, benzoylaci nebo derivatizaci reakcí s fluorenyl-9-methyl-chloroformiátem (FMOC), N-hydroxysuccinimidyl-6-chinolyl karbamátem (AQC) nebo o-ftal-dialdehydem (OPA). RP-HPLC nebo iontově výměnnou chromatografií lze stanovit aminy po postkolonové derivatizaci OPA nebo ninhydrinem (Smělá et al., 2004, s. 432). Například pro deriváty OPA lze použít fluorimetrickou detekci při vlnových excitačních délkách 330-340 nm a emisních vlnových délkách 440-445 nm, pro detekci dansylderivátů je pak např. typické použití spektrofotometrie v UV oblasti při vlnové délce 254 nm (Mehmeti a Vasjari, 2013, s. 351).

Dále je možné pro separaci nejen derivatizovaných biogenních aminů aplikovat CZE, která využívá odlišné elektroforetické pohyblivosti molekul a elektro-osmotického toku. K derivatizacím se pro tyto účely používá např. dansylchlorid, OPA, fluoreskamin, fluoresceinizothiokyanát, FMOC (Oguri, 2000, s. 8).

Kapilární elektroforéza může být však u aromatických a heterocyklických biogenních aminů provedena i bez derivatizace díky přirozené přítomnosti chromoforických skupin (Mehmeti a Vasjari, 2013, s. 351).

1.7.2 Molekulárně genetické metody stanovení potenciální dekarboxylázové aktivity

Další často využívanou metodou pro skrínig kultur na produkci biogenních aminů je PCR. Pomocí specifických primerů a procesu PCR je zmnožen úsek DNA nesoucí příslušné geny. Určená sekvence je namnožena do takové míry, že ji pak lze po separaci gelovou elektroforézou a po obarvení snadno detekovat. Tímto způsobem lze označit bakterie, které jsou schopny s největší pravděpodobností produkovat biogenní aminy nebo resp. ty, které k tomu mohou mít enzymové vybavení (Buňková et al., 2009, s. 538; De Las Rivas et al., 2005, s. 371).

Spojení metod popisovaných v kapitolách 1.7.2 a 1.7.1 je výhodné. Pro zjištění potenciálu tvorby biogenních aminů poslouží metoda molekulárně genetická a pro jeho kvantifikaci pak metody separační chromatografické.

1.7.3 Mikrobiologická kultivační metoda stanovení dekarboxylázové aktivity

Kultivační metoda je založená na kultivaci bakterií v médiu s pH indikátorem (např. bromkresolová violet) a s obsahem prekurzorů biogenních aminů. Biogenní aminy zvyšují pH, takže pokud jsou produkovány, dojde k barevné změně pH indikátoru (u bromkresolové violeti na fialovou). Stejně tak bakterie produkující kyseliny poskytují reakci s indikátorem, avšak odlišné barvy (žlutá v případě bromkresolové violeti). Pokud jsou zkoušené bakterie na produkci biogenních aminů negativní, tak se výsledek projeví nezměněnou barvou média (Mah-Jae et al., 2001, s. 491 a 492; Bover-Cid a Holzapfel, 1999, s. 36 a 37).

Výše zmíněný způsob detekce je však jen orientační. Může poskytovat falešně pozitivní i falešně negativní výsledky (Buňková et al., 2009, s. 536). Je tedy vhodné ho použít spíše pro prvotní skrínig a pro přesnější stanovení použít jiné metody, které umožňují současně kvantifikaci.

1.7.4 Imuno-enzymatické stanovení biogenních aminů ve vzorku

ELISA test je stanovení založené na kvantifikaci změny absorbance, kterou ve vzorku způsobí produkt určité enzymové reakce. ELISA je využívána hlavně pro stanovení

histaminu, ale lze ji aplikovat i na detekci ostatních biogenních aminů např. tyraminu (Nollet a Toldra, 2010, s. 414).

V případě histaminu se jedná o reakci diaminooxidázy, která v přítomnosti kyslíku způsobí jeho deaminaci. Při tomto procesu vzniká hydrogenperoxid, který oxiduje v reakčním roztoku přítomné barvivo (leukokrystalovou violet' na krystalovou violet'). Doprovodná barevná změna dovolí kolorimetrickou kvantifikaci. Metoda je modifikována i na stanovení tyraminu, kdy namísto diaminooxidázy účinkuje monoaminooxidáza (Nollet a Toldra, 2010, s. 414).

2 CÍL PRÁCE

Cílem dizertační práce je studium vlivů vnějších faktorů na množství vyprodukovaných biogenních aminů u vybraných kmenů bakterií rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, jež se účastní, nebo se mohou účastnit, řízených biotechnologických procesů. Dílčí cíle jsou stanoveny takto:

1. Skríníng aminogenní aktivity vybraných sbírkových kultur a izolátů bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií.

2. Selekcce kmenů rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, které jsou schopné za optimálních podmínek vyprodukovat detekovatelná množství biogenních aminů, přičemž zvláštní pozornost bude v rámci experimentů také zaměřena na probiotika s dieteticko-léčebnými účinky.

3. S kmeny vybranými v rámci naplňování dílčího cíle 2 založit experimenty, ve kterých budou sledovány vlivy vnějších faktorů na množství vytvořených biogenních aminů. Studovány budou faktory, které mohou dekarboxylázovou aktivitu zmíněných bakterií výrazně ovlivnit, ať již jako akcelerátory nebo inhibitory (např. přidavek NaCl a sacharidů, vliv pH a teploty apod.).

4. Sledovat kinetiku tvorby biogenních aminů v jednotlivých růstových fázích testovaných kmenů a růstové chování kmenů ovlivněné změnou vnějších faktorů v podmínkách *in vitro* a v potravinové matrici.

5. Získané výsledky podrobit statistické analýze.

6. Vyvodit doporučení v oblasti technologické praxe výroby fermentovaných potravin a nápojů, které jsou připraveny za přímé účasti/přítomnosti laktobacilů a/nebo bifidobakterií. Zhodnotit bezpečnost vybraných kmenů z hlediska fyziologických účinků vyprodukovaných množství biogenních aminů.

3 ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ

3.1 Popis experimentů

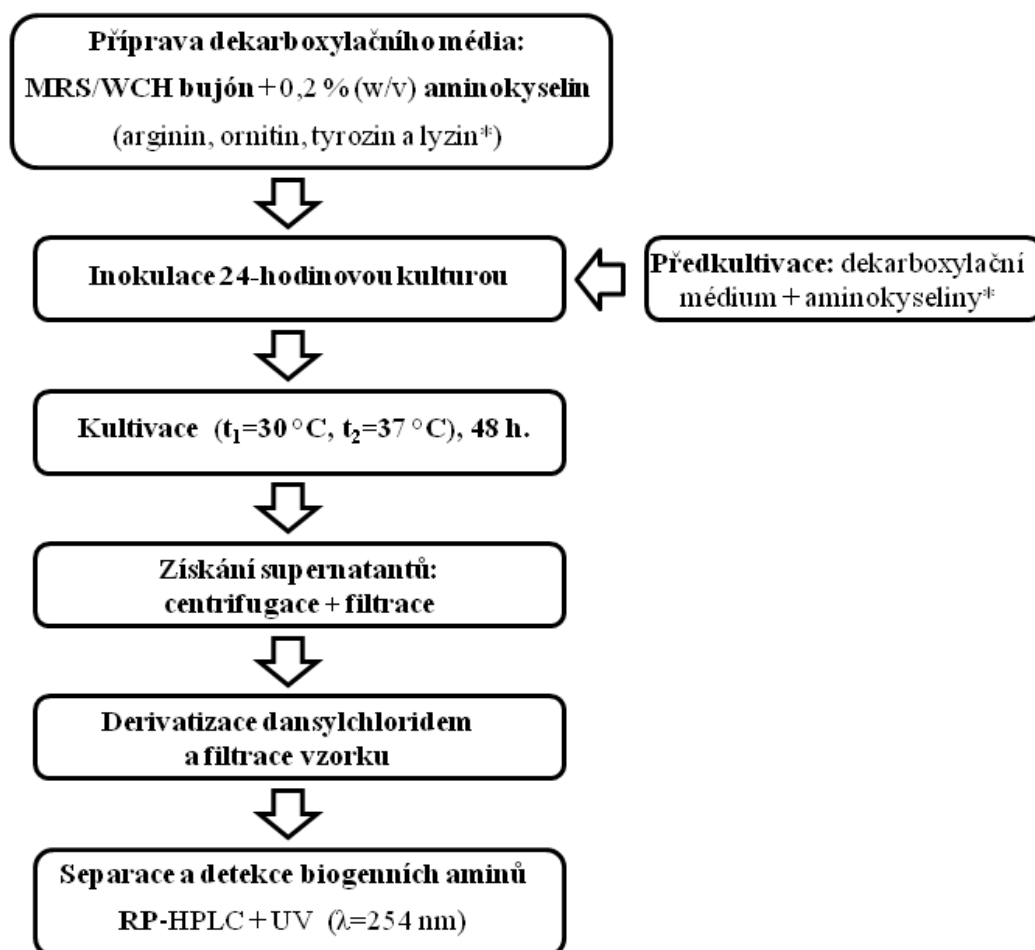
Vytýčené cíle práce byly naplňovány ve třech hlavních experimentech. Úkolem Experimentu I bylo provést obecný skrínig dekarboxylázové aktivity sbírkových bakteriálních kultur, které jsou běžně užívány v mlékárenském průmyslu, případně izolátů z procesu výroby daných produktů či kontaminant. Zahrnuty do skrínigu byly i kmeny bakterií mléčného kvašení izolovaných z procesu výroby piva a humánní izoláty bifidobakterií. Záměrem Experimentu II bylo sledovat kinetiku produkce biogenních aminů vybranými kmeny *in vitro* v závislosti na změněných kultivačních podmínkách. Třetím experimentem byla reálná aplikace vybraných kultur do potravinové matrice (mléka), kde byl simulován proces výroby a skladování fermentovaných mléčných výrobků a byla monitorována dekarboxylázová aktivita vybraných kmenů.

3.1.1 Charakteristika Experimentu I

V rámci Experimentu I byl proveden prvotní skrínig dekarboxylázové aktivity u vybraných kmenů bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií, z nichž jsou některé v praxi užívány jako zákysové kultury při výrobě fermentovaných mléčných výrobků (zakysaných mléčných výrobků a sýrů). Ve skrínigu jsou zahrnuty i kultury s prokazatelným dieteticko-léčebným působením, non-startérové kultury, kontaminanty a humánní izoláty.

Prvotní skrínig produkce biogenních aminů byl proveden *in vitro*, a to celkem u 123 kmenů laktobacilů a bifidobakterií (Příloha A, Tab. A1-A4). Aminogenní aktivita byla zkoumána u 36 kmenů získaných ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů Laktoflora[®] (Cultures Collection of Dairy Microorganisms; CCDM; Příloha A, Tab. A1), dvou non-startérových kultur laktobacilů z procesu výroby sýrů, které byly poskytnuty Výzkumným ústavem mlékárenským z Tábora (Příloha A, Tab. A1, *Lactobacillus brevis* T01 a *Lactobacillus curvatus* T02). Zkoušení dále proběhlo u 30 kmenů mléčných bakterií izolovaných jako kontaminanty procesu výroby piva ze sbírky mikroorganismů Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze (Research Institute of Brewing and Malting Culture Collection; RIBM; Příloha A, Tab. A2) a v neposlední řadě u 55 humánních izolátů bifidobakterií a laktobacilů získaných ze sbírky mikroorganismů České zemědělské univerzity v Praze (Příloha A, Tab. A3 a A4).

Seznamy všech zkoušených kmenů jsou uvedeny v příloze této dizertační práce. Ke stanovení biogenních aminů v supernatantech získaných po kultivaci zmíněných bakterií byla použita kapalinová chromatografie na reverzních fázích s předkolonovou derivatizací dansylchloridem, kdy byly separované dansylderiváty biogenních aminů detekovány a kvantifikovány UV detekcí. Zjednodušené schéma postupů v rámci experimentu jsou znázorněny na Obr. 4.



Obr. 4: Schéma experimentu I; skrining dekarboxylázové aktivity in vitro; *přídavek čtyřkombinace aminokyselin argininu, ornitinu, lyzinu a tyraminu v koncentraci 0,2 % (w/v)

Experiment I lze pro přehlednost rozdělit do dvou subexperimentů, kdy byly biogenní aminy primárně detekovány v supernatantu po kultivaci náhodně vybraných 60 kmenů laktobacilů (28 kmenů z České sbírky mlékářenských mikroorganismů; 2 kmeny ze sbírky Výzkumného ústavu mlékářského z Tábora; 30 kmenů ze sbírky Výzkumného ústavu

pivovarského a sladařského v Praze; Příloha A, Tab. 1A a 2A) a bifidobakterií (8 kmenů z České sbírky mlékárenských mikroorganismů; Příloha A, Tab. 1A) v médiu MRS s přídavkem 0,2 % (w/v) vybraných volných aminokyselin. Podle předběžných pokusů provedených před samotným experimentem byla zvolena čtyřkombinace aminokyselin: tyrozinu, argininu, ornitinu a lyzinu, při jejichž přídavku do média byla předpokládána podpora produkce již prvotně detekovaných biogenních aminů.

Zařazeny do souboru testovaných mikroorganismů byly i kmeny s dieteticko-léčebným potenciálem nebo izoláty z procesu výroby sýrů.

Na základě výsledků byl zvolen další soubor mikroorganismů, převážně bifidobakterií (Příloha A, Tab. A3 a A4), jejichž zástupci prokázali schopnost dekarboxylovat přítomné volné aminokyseliny. Kmeny bifidobakterií byly inokulovány do prostředí dvou médií různého složení (médiu MRS a médiu Wilkins-Chalgren) z důvodů zvýšení pravděpodobnosti detekce dekarboxylázové aktivity a pozorování rozdílného růstového chování bifidobakterií (Příloha A, Tab. A3 a A4).

Kultivační metody

Zkoušené kmeny byly kultivovány v MRS bujónu (Oxoid, Basingstoke, UK) za optimálních teplot dle informací poskytovatele kultur. Humání izoláty byly kultivovány nejen v médiu MRS, ale také v médiu Willkins-Chalgren s přídavkem sojového peptonu (Hi-Media, Mumbai, Indie), které bylo pro růst bifidobakterií doporučeno poskytovatelem kultur.

U všech kmenů byla před pokusem kontrolována čistota, kdy byl proveden křížový roztěr a mikroskopické ověření (fixovaný preparát, Gramovo barvení).

Pro kmeny CCDM 422, 393, 394, 834, 741, 832, 818, 579, 821, 59, 398, 396, 381 a pro kmeny ze sbírky RIBM byla optimální teplotou kultivace 30 ± 1 °C. Ostatní kmeny byly kultivovány při 37 ± 1 °C.

Do bujónu pro růst testovaných bakterií byly přidány aminokyseliny (arginin, ornitin, tyrozin, lyzin; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) v koncentraci 0,2 % (w/v). Pro snížení redox potenciálu byl do médií pro kultivaci bifidobakterií přidán sterilní roztok cysteinu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ve výsledné koncentraci 0,1 % (w/v). Ten byl připraven filtrací přes injekční filtr s porozitou 0,22 μ m. Sterilita připraveného roztoku byla testována kultivační zkouškou. Modifikované médium o objemu 5 ml bylo zaočkováno pro zjištění

dekarboxylázové aktivity kmenů 25 µl suspenze bakterií narostených přes noc. U bifidobakteriálních izolátů bylo nutné navýšit množství inokula, jelikož vykazovaly výrazně pomalejší růst (100 µl). Zvýšen však byl také objem dekarboxylačního média na 7 ml (vysoký sloupec hladiny vhodný pro nárůst striktně anaerobních kmenů).

Kultivace kmenů pak probíhala za optimálních teplot po dobu 48 hodin. Každá kultura byla očkovaná v pěti opakováních. Následně byl z bakteriální suspenze centrifugací (3 421 x g, 20 min.) získán supernatant, který byl upraven pro analýzu. Kvalitativní a kvantitativní stanovení biogenních aminů bylo provedeno i u nezaočkovaných médií, kdy byly zjištěné hodnoty odečteny od hodnot supernatantů po kultivaci vybraných kmenů.

Metody stanovení

Ke stanovení biogenních aminů v supernatantech získaných po kultivaci zmíněných bakterií byla použita kapalinová chromatografie na reverzních fázích s předkolonovou derivatizací dansylchloridem, kdy byly separované dansylderiváty biogenních aminů monitorovány UV detekcí. Metody analýzy supernatantů jsou podrobněji popsány v kapitole 3.3.

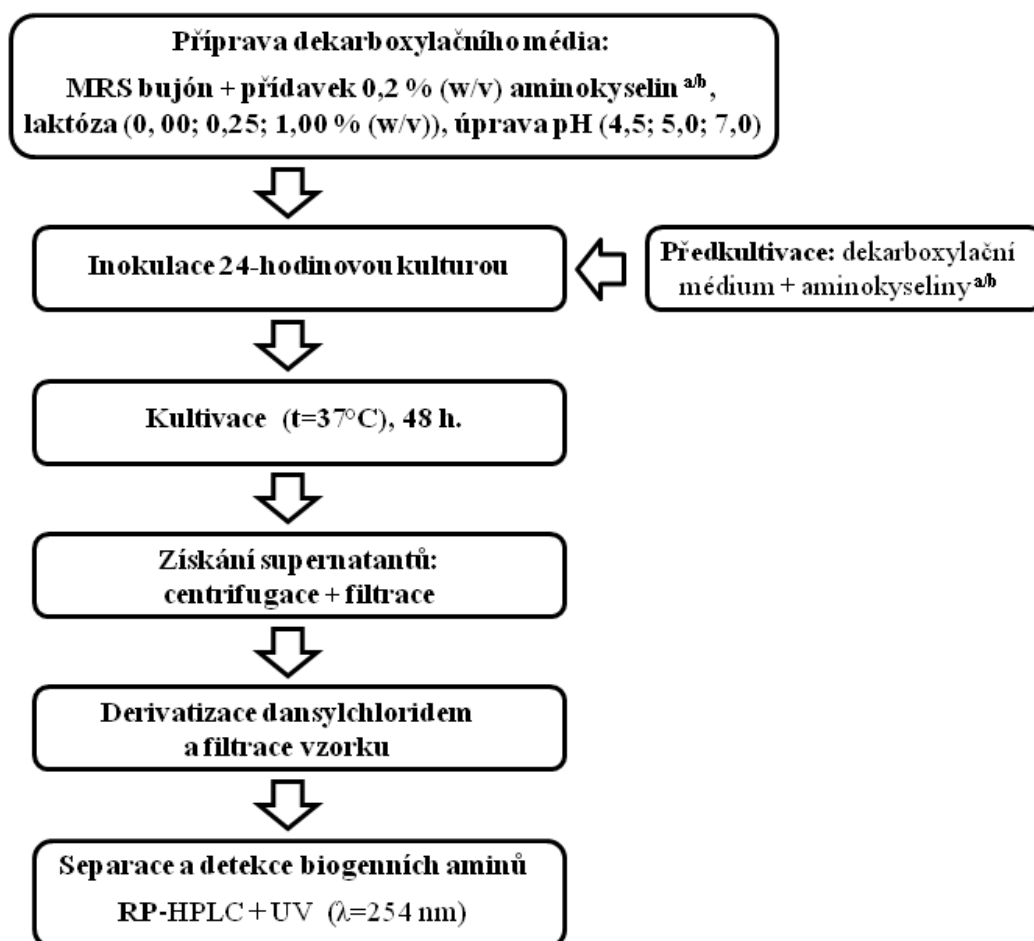
3.1.2 Charakteristika Experimentu II

Na základě Experimentu I byla provedena selekce aminogenních kmenů pro Experiment II. Pozornost byla dále věnována i relativně nízkoproduktivním probiotickým kulturám, jejichž cílená aplikace ve výrobě fermentovaných výrobků je hlavně dána pozitivními účinky na lidské zdraví. Záměrem bylo posoudit, zda za různých kultivačních podmínek (simulujících reálné prostředí potravin) neprodukují tyto probiotické kmeny významná množství biogenních aminů, která by zdravotní benefity použití těchto kultur redukovala. Kromě jiného byly testovány izoláty laktobacilů z procesu výroby piva a mléčných výrobků.

U vybraných kmenů byly studovány vlivy vnějších faktorů, jež by mohly v rámci technologického procesu významněji ovlivnit množství vytvořených biogenních aminů ve výrobku. Testovaný rozsah hodnot zkoušených faktorů byl volen tak, aby mohly být výsledky aplikovány na technologickou praxi fermentovaných výrobků.

Experiment II lze rozdělit do pěti subexperimentů. Každý z těchto subexperimentů byl zaměřen na jiný kmen. Kmeny byly vybrány na základě prvotního skríningu, kdy prokázaly

schopnost produkovat toxikologicky významnější množství tyraminu (> 50 mg/l). Výběr zahrnuje čisté startérové kultury, které mají probiotický potenciál a jsou cíleně přidávány do mléčných výrobků: *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 a *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 239. Zařazen byl jeden kmen izolovaný z procesu výroby piva *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69 a dva izoláty z procesu výroby sýrů (*Lactobacillus brevis* T01, *Lactobacillus curvatus* T02). Izoláty byly do experimentů zahrnuty proto, že právě non-startéry a kontaminanty jsou častými původci zvýšených koncentrací biogenních aminů v potravinách, které byly vyrobeny řízeným fermentačním procesem (Linares et al. 2012, s. 1).



Obr. 5: Schéma předběžného pokusu, testování probiotických kmenů *Lb. rhamnosus* CCDM 289 a *B. lactis* CCDM 239; přídavek aminokyselin kombinace a...lyzin, tyrozin, fenylalanin, b...arginin, ornitin, tyrozin, lyzin, fenylalanin, histamin

Před samotným zahájením pokusů, zabývajících se kinetikou produkce biogenních aminů probiotických kmenů (*Lb. rhamnosus* CCDM 289 a *B. animalis* ssp. *lactis* CCDM 239) bylo provedeno zkušební testování podmínek, za kterých by dané kultury byly schopny vyprodukovat co nejvyšší množství biogenních aminů (Obr. 5). Na základě výsledků Experimentu I tyto kmeny nevynikaly vysokou produkcí a bylo nutné zjistit, které podmínky budou pro jejich dekarboxylázovou aktivitu v médiu MRS vhodné a naopak.

Do růstového prostředí byly přidány i další aminokyseliny v koncentraci 0,2 % (w/v). Nejednalo se jen o arginin, ornitin, tyrozin a lyzin, ale také histidin a fenylalanin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Byla však testována i verze vzorků s obsahem lyzinu, tyrozinu a fenylalaninu v koncentraci 0,2 a 0,3 % (w/v). Jako další faktory byly zvoleny přídavky laktózy v koncentracích 0; 0,5; a 1,0 % (w/v) a pH bujónu před inokulací ($4,5 \pm 0,2$; $5,0 \pm 0,2$; $7,0 \pm 0,2$). Všechny výše uvedené faktory byly testovány ve vzájemných kombinacích (Obr. 5). Dále byl zjišťován vliv přídavku 0,005 % (w/v) pyridoxalfosfátu. Kofaktor dekarboxyláz byl přidáván do růstového média obsahujícího dvě různé kombinace aminokyselin. Kmeny byly kultivovány v pěti opakováních. Kultivace probíhala při 37 °C a vzorky byly pro analýzu obsahu biogenních aminů odebírány po 48 hodinách (Obr. 5).

Dále byla pozorována kinetika produkce biogenních aminů u kmenů *Lb. rhamnosus* CCDM 289 a *B. animalis* ssp. *lactis* CCDM 239 (Obr. 6 a Obr. 8) ovlivněná vybranými faktory.

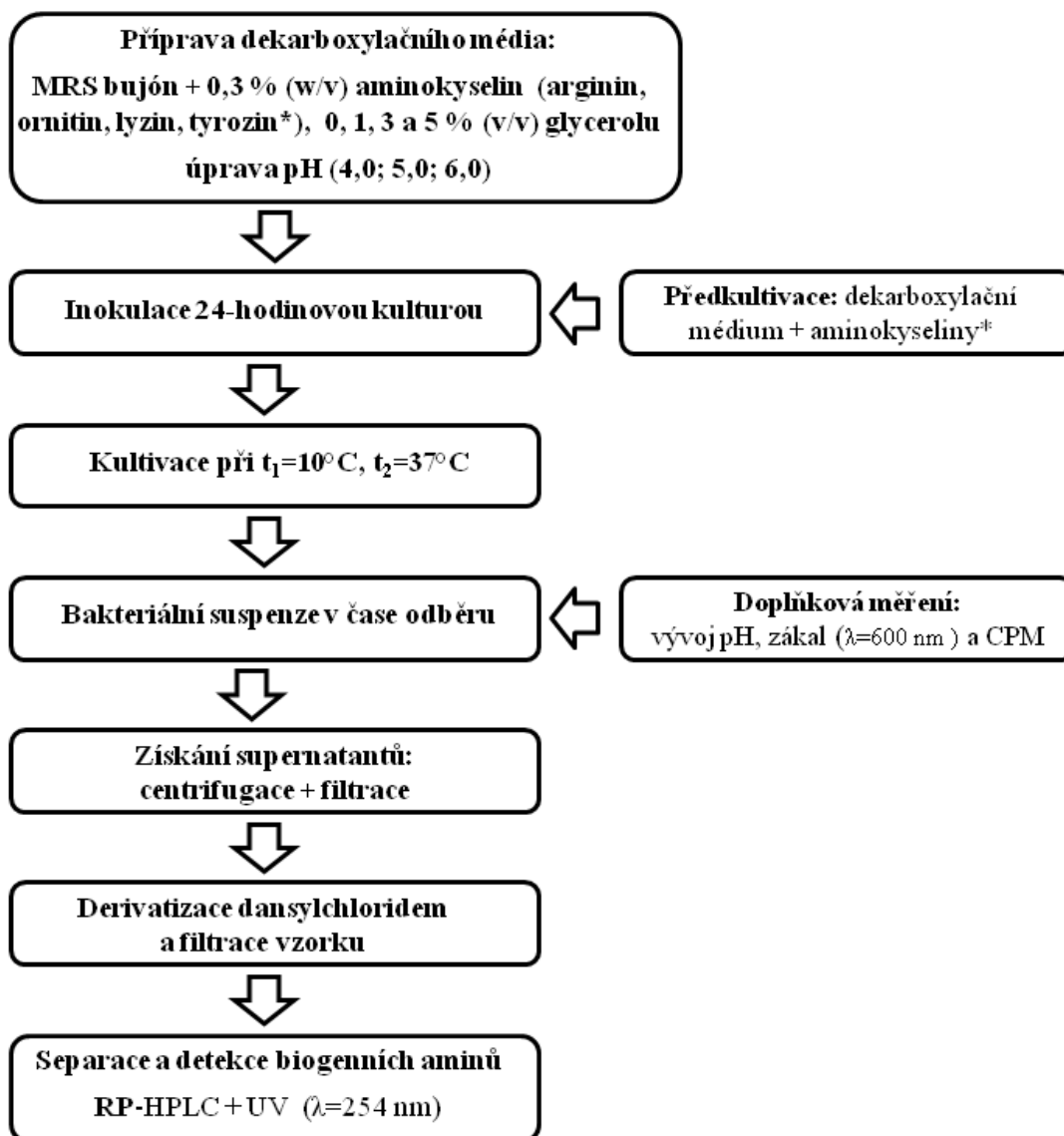
U probiotického kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 byla kinetika produkce biogenních aminů sledována v médiu MRS, které bylo upraveno těmito proměnnými:

- pH ($4,0 \pm 0,2$, $5,0 \pm 0,2$ a $6,0 \pm 0,2$),
- přídavky glycerolu (0, 1, 3, 5 % (v/v)).

Byl sledován také vliv dvou různých teplot kultivace $10 \pm 0,2$ °C a $37 \pm 0,2$ °C.

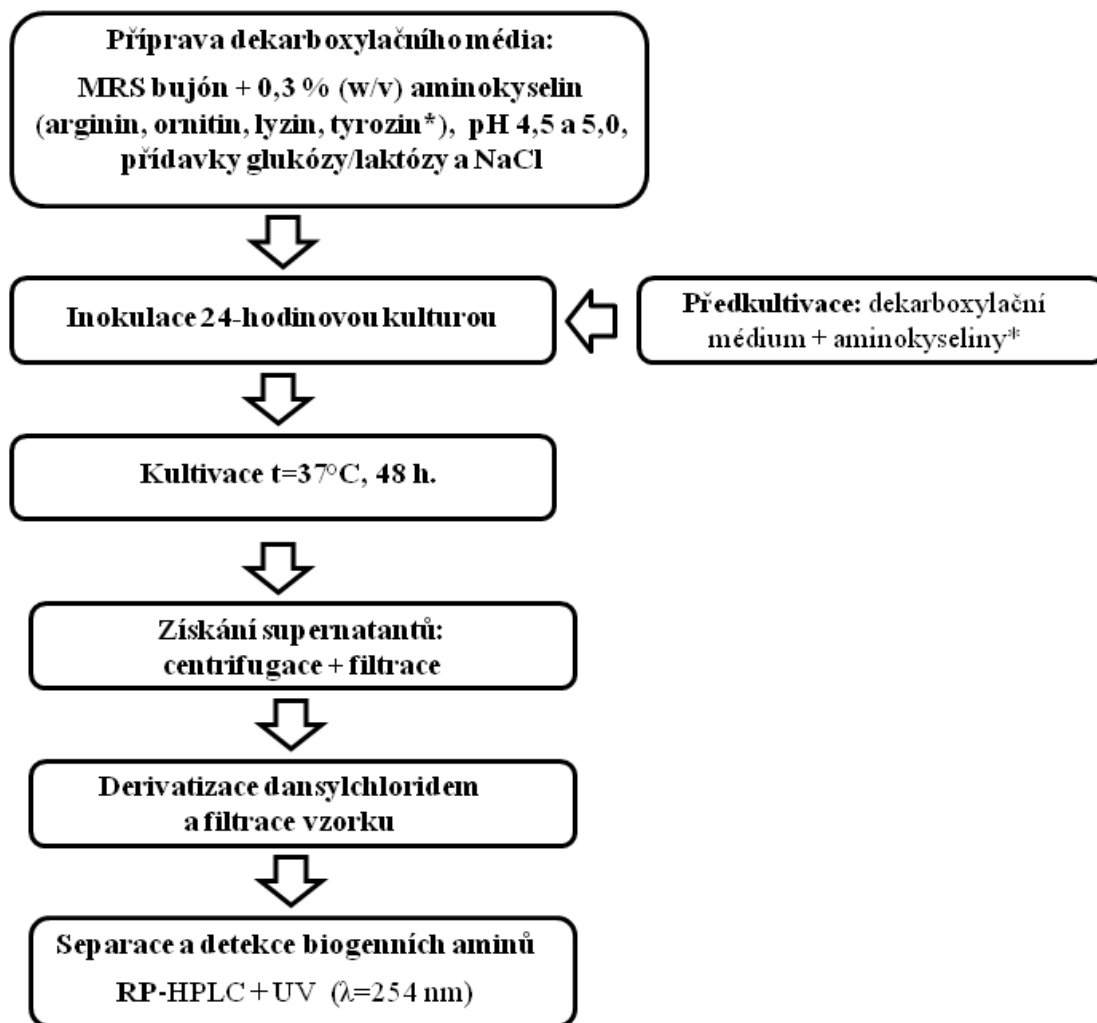
Přídavek glycerolu, místo laktózy, byl uskutečněn proto, že výsledky předběžných pokusů nenaznačovaly výraznou indukci dekarboxylázové aktivity při žádné z testovaných koncentrací zmíněného cukru (viz kapitola 4.2). Také byla navýšena koncentrace prekurzorů, aminokyselin (z původní koncentrace 0,2 na 0,3 % (w/v)) s cílem podpořit produkci biogenních aminů.

Přípravy dekarboxylačních médií, kultivace kmene, odběry vzorků a detekce biogenních aminů probíhala dle schématu Obr. 6.



Obr. 6: Schéma subexperimentu s *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289; *přídavek čtyřkombinace aminokyselin argininu, ornitinu, lyzinu a tyraminu v koncentraci 0,3 % (w/v)

Subexperimentu s *Bifidobacterium lactis* CCDM 239, kdy byla sledována kinetika produkce biogenních aminů, předcházelo ještě jedno testování podmínek, při kterých by mohla být podpořena produkce biogenních aminů (Obr. 7). Byl testován přídavek nejen laktózy, ale také glukózy v různých koncentracích (0,00; 0,25; 0,50; 1,00 % (w/v)) jako snadněji asimilovatelného zdroje uhlíku. Dalším sledovaným faktorem byla koncentrace soli a úprava pH (4,5±0,2; 5,0±0,2).

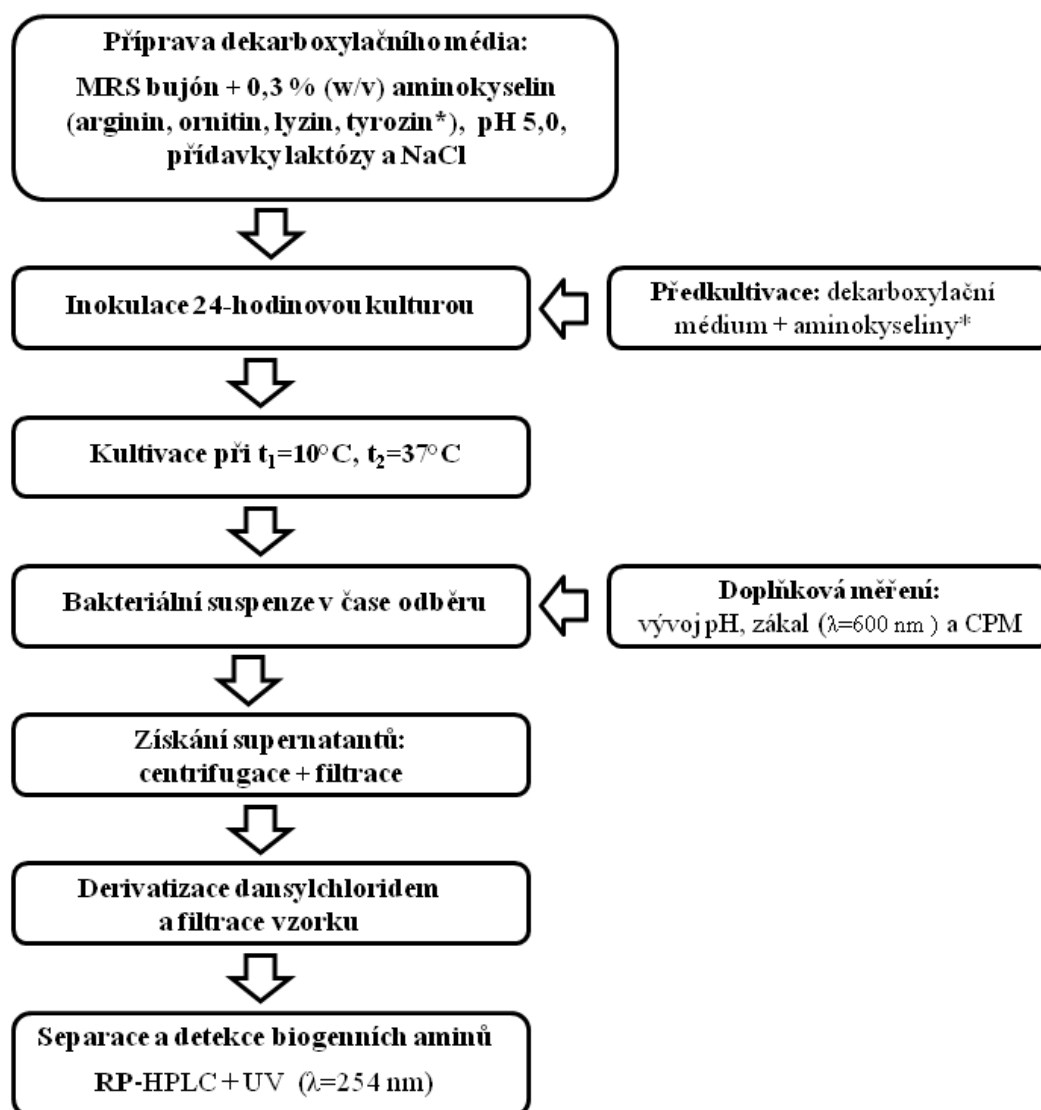


Obr. 7: Schéma druhého předběžného testování vlivu faktorů na dekarboxylázovou aktivitu *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* CCDM 239; *přídavek čtyřkombinace aminokyselin argininu, ornitinu, lyzinu a tyraminu v koncentraci 0,3 % (w/v)

Po dalším předběžném testování druhého zkoušeného probiotického kmene, *B. animalis* ssp. *lactis* CCDM 239, následoval samotný subexperiment (Obr. 8), ve kterém bylo uskutečněno pozorování kinetiky produkce biogenních aminů.

Testovány byly faktory:

- pH 5,0±0,2,
- teplota (10±0,2 °C, 37±0,2 °C),
- přídavky laktózy (0,00; 0,25; 0,50; 1,00 % (w/v)),
- přídavky NaCl (0,0; 1,0; 2,0 % (w/v)).

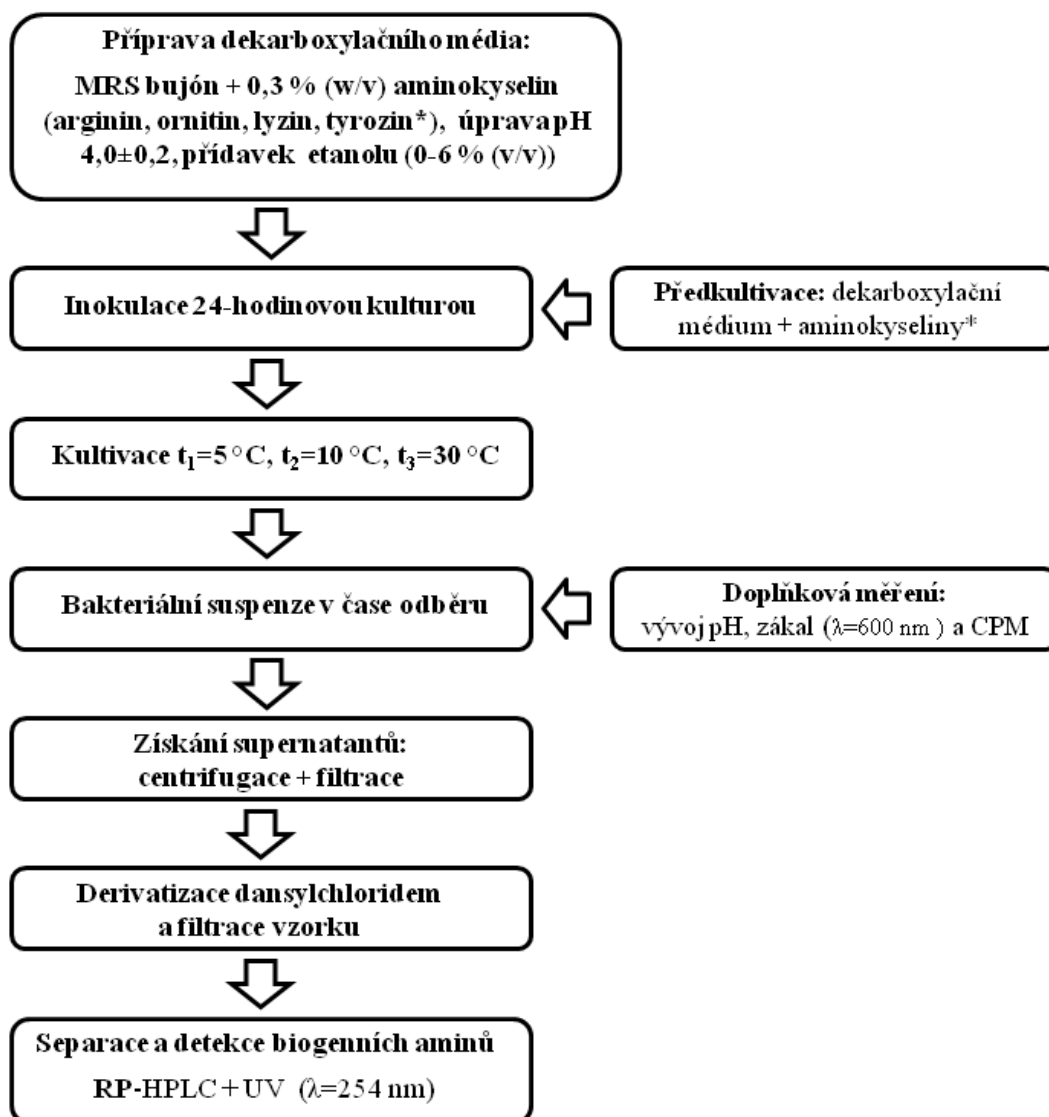


Obr. 8: Schéma subexperimentu s *Bifidobacterium lactis* CCDM 239; *přídavek čtyřkombinace aminokyselin argininu, ornitinu, lyzinu a tyraminu v koncentraci 0,3 % (w/v)

Lactobacillus brevis RIBM 2-69, jako izolát z procesu výroby piva, byl sledován za odlišných podmínek než tomu bylo u předešlých kmenů (Obr. 9). MRS médium bylo upraveno faktory:

- pH $4,0 \pm 0,2$,
- etanol (0, 2, 3, 5, 6 % (v/v)).

Testován byl také vliv tří různých teplot kultivace ($5 \pm 0,2$ °C, $10 \pm 0,2$ °C, $30 \pm 0,2$ °C).



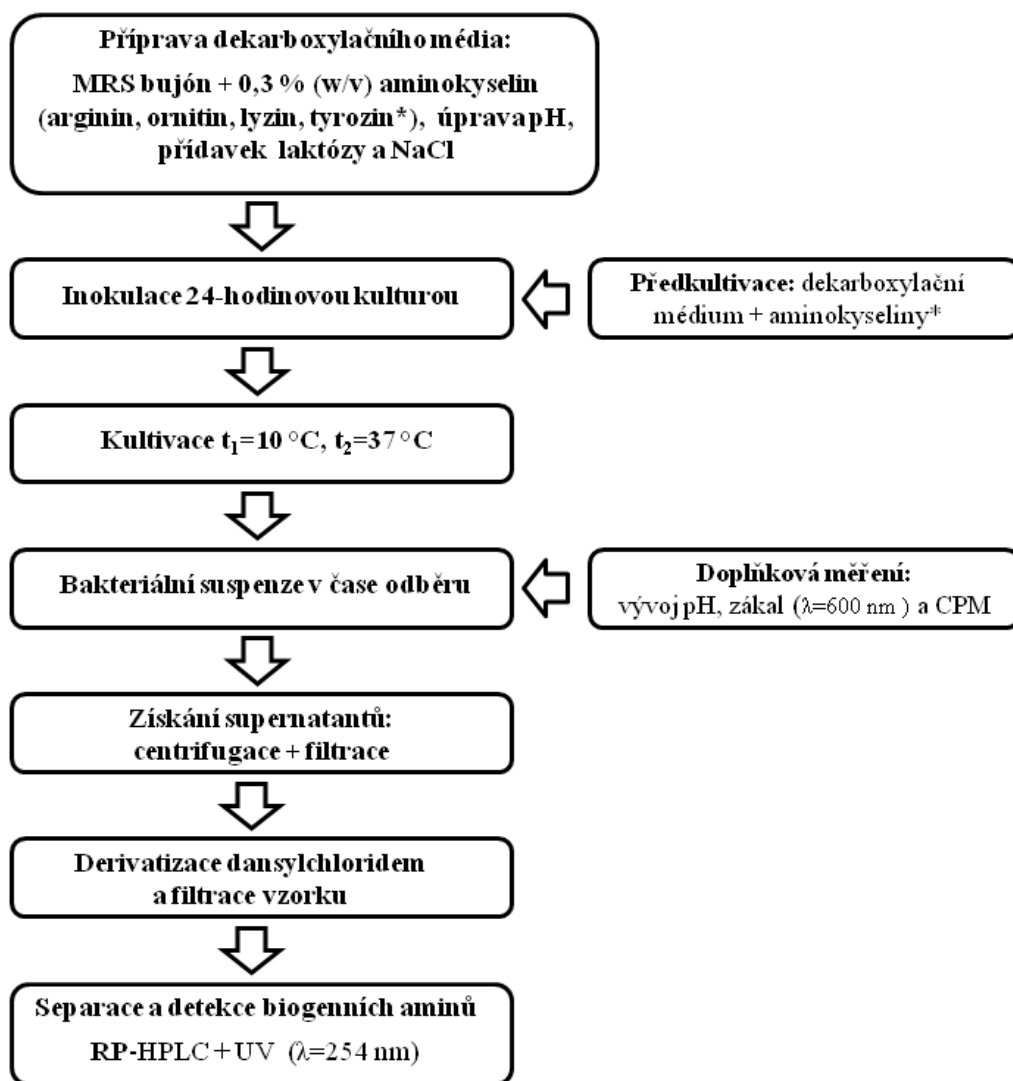
Obr. 9: Schéma subexperimentu s *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69; *přídavek čtyřkombinace aminokyselin argininu, ornitinu, lyzinu a tyraminu v koncentraci 0,3 % (w/v)

Aminogenní aktivita izolátů z procesu výroby sýra, *Lactobacillus brevis* T01 a *Lactobacillus curvatus* T02, byla rovněž sledována v upraveném dekarboxylačním médiu (Obr. 10).

Předmětem zájmu byl v rámci subexperimentů s non-startéry vliv:

- pH ($5,0 \pm 0,2$; $6,0 \pm 0,2$; $7,0 \pm 0,2$),
- teploty ($10 \pm 0,2$ °C a $30 \pm 0,2$ °C),
- přídavek laktózy (0,00; 0,25; 0,5; 1,00 % (w/v)),
- přídavek NaCl (0,0; 1,0; 2,0 % (w/v)).

Navíc byla testována kombinace 4,8 % (w/v) laktózy a soli (0,0; 1,0; 2,0 % (w/v)) při pH 6,8, jako pokus o přiblížení se podmínkám mléka ve smyslu koncentrace laktózy a horní hranice pH syrového mléka.



Obr. 10: Schéma subexperimentů s *Lb. brevis* T01 a *Lb. curvatus* T02; *přídavek čtyřkombinace aminokyselin argininu, ornitinu, lyzinu a tyraminu v koncentraci 0,3 % (w/v)

Všechny faktory v rámci subexperimentů Experimentu II byly testovány samostatně a ve vzájemných kombinacích.

Kultivační metody Experimentu II

V Experimentu II probíhaly kultivace vybraných kmenů laktobacilů a bifidobakterií v bujónu MRS (viz Tab. 1) o jednotném objemu 7 ml, který byl obohacen o sacharidy (zvláště laktózu) nebo jejich možné metabolity (glycerol), NaCl nebo etanol. Tyto faktory byly přidávány ve specifických vzájemných kombinacích pro jednotlivé kmeny s ohledem na to, odkud byly izolovány, nebo jaké je jejich předpokládané využití v technologii.

Pro zohlednění obsahu sacharidů bylo v tomto experimentu použito složené dekarboxylační médium kopírující obsahy jednotlivých složek MRS totožných s Experimentem I, až na zmíněnou sacharidickou složku (dextróza, glukóza; běžný obsah 20 g/l), která byla zastoupena pouze v testovaných koncentracích v rámci daného faktoru.

Tab. 1: Složení modifikovaného bujónu MRS

složka	množství [g/l]
Proteózo-Pepton	10,0
Beef extrakt	10,0
Yeast extrakt	5,0
Glukóza*	20,0
Tween 80	1,0
Citran amonný	2,0
Octan sodný	5,0
Síran hořečnatý	0,1
Síran manganatý	0,005
Hydrogenfosforečnan didraselný	2,0
Pyridoxal-5-fosfát**	0,005
Arginin, ornitin, tyrozin, lyzin***	0,3
Cystein	0,1

* Pro prvotní skrínig (Experiment I), dále (v Experimentu II) nahrazena laktózou/glycerolem jako zdroj uhlíku; ** Pro prvotní pokusy s probiotickými kmeny CCDM 239 a 289; ***Prvotní skrínig 0,2 % (w/v) aminokyselin, jinak 0,3 % (w/v)

Příslušné kultivační médium bylo zaočkováno 100 µl suspenze probiotických bakterií narostených přes noc (*Lb. rhamnosus* CCDM 289, *B. animalis* ssp. *lactis* CCDM 239). U non-startérové mikroflóry z procesu výroby sýrů byl zvolen nižší objem inokulátu – 50 µl (*Lb. brevis* T01 a *Lb. curvatus* T02) a u kontaminující mikroflóry z procesu výroby piva 25 µl (*Lb. brevis* RIBM 2-69). Objem inokula byl volen dle růstových schopností kultury a rozsahu produkce biogenních aminů, které byla daná kultura v prvotním skrínungu schopna uvolnit do dekarboxylačního média. Rychlost růstu v dekarboxylačních médiích byla ověřena před započítáním daných subexperimentů.

Všechna inokulovaná média (kombinace faktorů) byla kultivována ve třech opakováních s jedním kontrolním vzorkem pro každý z odběrových časů.

Odběr vzorků pro analýzy obsahu biogenních aminů probíhal pro nižší zvolené teploty po 1., 2., 3., 4., 5./6., 7./8., 9./10., 13. a 15. dnu kultivace. Pro teplotu 30/37 °C byly odběry uskutečňovány intenzivněji avšak po kratší dobu (2., 4., 6., 8, 10., 12., 30., 34. a 48. hodinu). U některých kmenů byly počty odběrů redukovány z důvodu kvantity vzorků (velký počet kombinací faktorů) nebo byly odběry vzorků kmenů kultivovaných při nižší zkoušené teplotě provedeny s mírným časovým posunem. Ve všech experimentech se však celkový počet odběrů pohyboval v rozsahu 8-10 odběrů.

Pro kmen *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 239 i druhý probiotický kmen *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 239 byly odběry při 37 °C uskutečňovány: 2., 4., 6., 8., 10., 12., 24., 30., 34. a 48. hodinu kultivace, při 10 °C 1., 2., 3., 4., 5., 7., 9., 13., 15. den kultivace. Vzorkování supernatantů kmene *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69 probíhalo při 5 °C a 10 °C 1., 2., 3., 4., 5., 7., 9., 11., 12., 15. den kultivace a při 30 °C 2., 4., 6., 8., 10., 12., 24., 30., 34., 48. hodinu kultivace. Vzorky po kultivaci kmenů *Lactobacillus brevis* T01 a *Lactobacillus curvatus* T02 byly odebrány při teplotě 10 °C po 1, 2, 3, 6, 8, 10, 13 a 15-ti dnech kultivace, při vyšší zkoušené teplotě po 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 a 48 hodinách kultivace.

Po zaočkování médií byly ihned odebrány vzorky určené k analýzám (pro čas kultivace 0 h.), aby byly posléze zjištěny iniciační hodnoty obsahu biogenních aminů a počtu mikroorganismů (CFU/ml). Zvláště počet testovaných mikroorganismů byl důležitý pro výpočet produkce jednou buňkou (kapitola 3.7). Obsah biogenních aminů po zaočkování byl často pod mezí detekce, nebo po odečtení hodnot kontrol minimální (<0,1 mg/l), proto nebude ve výsledkové části komentována.

Vzhledem k pravidelnosti odběrů byla monitorována kinetika produkce biogenních aminů v upravených dekarboxylačních médiích s přísávkou sledovaných faktorů, tedy nárůst koncentrace biogenních aminů v čase. Do všech subexperimentů byly zahrnuty kontrolní vzorky médií, které nebyly zaočkovány, ale jejich inkubace a odběr probíhal při stejných teplotách a časech jako u bakteriální suspenze. Všechny analýzy byly kontrolně prováděny i u těchto vzorků (obsah biogenních aminů, pH a nárůst kontaminace).

Metody stanovení

Kromě produkce biogenních aminů metodou HPLC byl ve všech odběrových časech a dnech sledován také nárůst mikroorganismů a vývoj pH kultivačního média (metody popsány níže v kapitolách 3.3, 3.4 a 3.5).

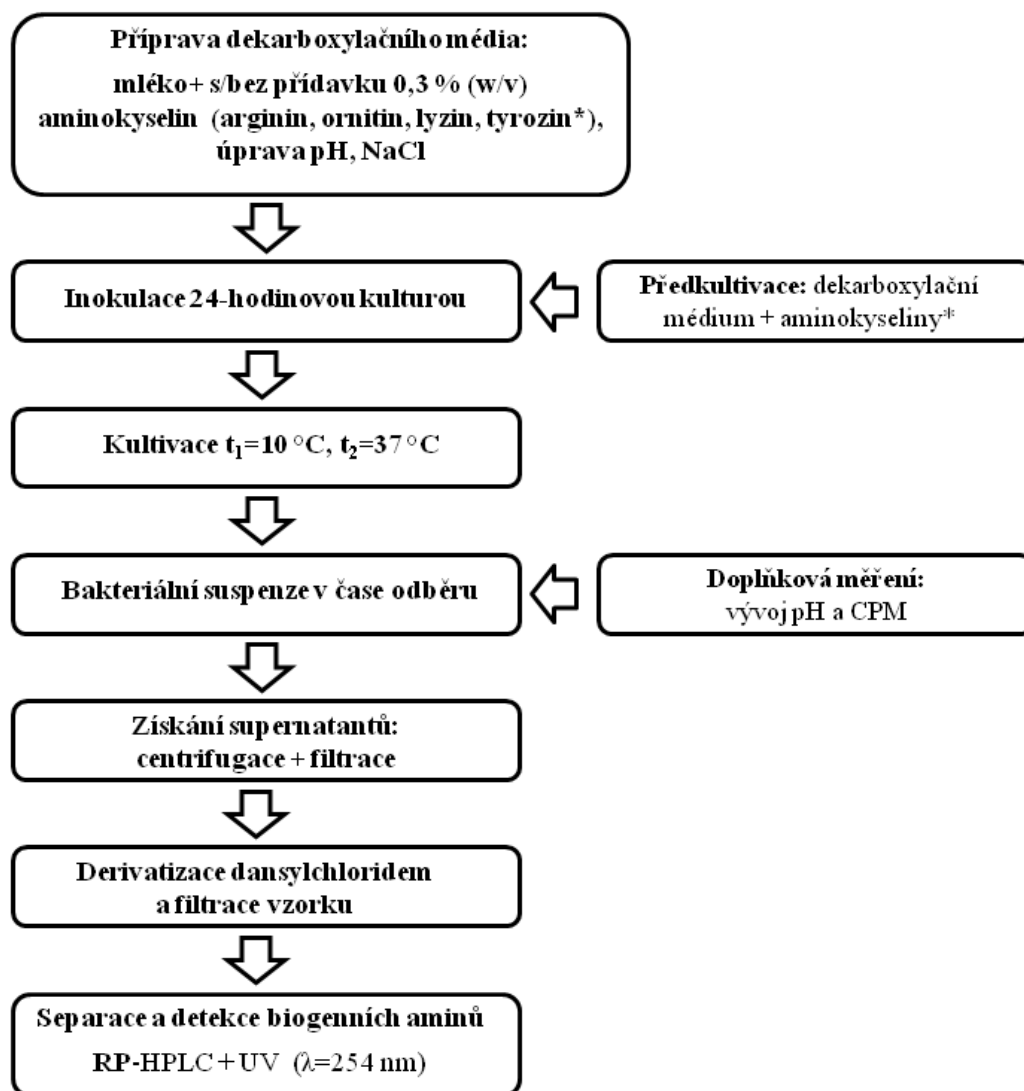
3.1.3 Charakteristika Experimentu III

Byla sledována dekarboxylázová aktivita a růstové chování dvou vybraných kmenů laktobacilů (non-startérové kultury z Experimentu II) v reálném systému potravinové matrice (Obr. 11). Tu představovalo rekonstituované mléko, které bylo připraveno rozpuštěním 50 g sušeného mléka v 1000 ml destilované vody. Stejně jako v Experimentu II bylo médium modifikováno faktory a vysterilizováno v autoklávu. Produkce biogenních aminů však byla sledována i v mléce bez úprav (bez přísávkou aminokyselin, s iniciačním pH $6,62 \pm 0,12$).

Mezi faktory, které byly v rekonstituovaném mléce zkoušeny, náleží:

- přísávek 0,3 % (w/v) aminokyselin (lyzinu, tyrozinu, ornitinu a argininu),
- koncentrace soli 0, 1 a 2 % (w/v),
- pH ($5,0 \pm 0,2$; $6,0 \pm 0,2$; $7,0 \pm 0,2$),
- teplota ($10 \pm 0,2$ °C a $30 \pm 0,2$ °C).

Vliv faktorů byl sledován samostatně i ve vzájemných kombinacích. Odběry vzorků byly realizovány pro každou kombinaci faktorů v devíti časech kultivace.



Obr. 11: Schéma Experimentu III s *Lb. brevis* T01 a *Lb. curvatus* T02; *přídavek čtyřkombinace aminokyselin argininu, ornitinu, lyzinu a tyraminu v koncentraci 0,3 % (w/v)

Kultivační metody

Bylo připraveno sterilní kultivační médium. Kultivačním médiem bylo obnovené odtučněné sušené mléko (Moravia Lacto a.s., Jihlava, Česká republika), které bylo ve většině případů upraveno přídavkem sledovaných faktorů (koncentrace soli, aminokyselin) a nastavením pH. Mléko bylo zaočkováno 50 μ l 24-hodinové kultury. Kultivace vybraných kmenů probíhala ve zkumavkách se 7 ml ne/upraveného mléka při dvou výše zmíněných teplotách a ve třech opakováních pro každý odběrový čas. Jako kontrola posloužilo mléko bez inokulace, které bylo odebíráno společně se vzorky v daných odběrových časech.

Metody stanovení

V odebraných vzorcích bylo stanoveno zastoupení biogenních aminů a jejich kvantita (metoda v kapitole 3.3). Dále bylo uskutečněno sledování vývoje pH ve všech odběrových časech. Stejně jako v Experimentu II byly stanovovány počty testovaných mikroorganismů v čase odběru.

3.3 Stanovení obsahu biogenních aminů v Experimentu I-III

Produkce osmi biogenních aminů (tryptaminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, sperminu a spermidinu) byla stanovena pomocí kapalinové chromatografie s předkolumnovou derivatizací dalzylchloridem a UV detekcí ($\lambda = 254$ nm).

Postup přípravy vzorku k analýze probíhal následujícím způsobem. Bujón po kultivaci testovaných bakterií byl centrifugován (3 421x g; 22 ± 1 °C; 20 minut) a získaný supernatant byl zředěn v poměru 1:1 (v/v) kyselinou chloristou ($c = 1,2$ mol/l; Merck, Darmstadt, Německo). V rámci Experimentu III byl dodržen stejný způsob odběru vzorků, kdy byly vzorky fermentovaných mlék také ředěny zmíněnou kyselinou. Okyselená směs byla podrobena derivatizaci podle Dadákové, Křížka a Pelikánové (2009, s. 365-370).

Jeden mililitr okyseleného vzorku byl derivatizován dansylchloridem (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) v koncentraci 5 mg/ml acetonu a 1,5 ml čerstvě připraveného uhličitanového pufru (uhličitanu sodné i draselné, Merck, Darmstadt, Německo). Pufry o pH 9,2 byly přichystány smícháním 50 ml roztoku A (0,5 mol/l NaHCO_3) a 12 ml roztoku B (0,5 mol/l Na_2CO_3). Následně bylo v pufru rozpuštěno 16,65 g K_2CO_3 , kdy bylo výsledné pH upraveno na 11,0-11,1. Směs byla třepána za laboratorní teploty po dobu 20 hodin. Reakce byla zakončena přidáním 200 μl prolinu (Merck, Darmstadt, Německo; 200 mg v 2 ml H_2O) a vzorky byly třepány další hodinu. Deriváty biogenních aminů byly extrahovány vytřepáním do 3 ml heptanu. Heptan byl následně odpařen pod dusíkem při 60 °C a odparek byl rozpuštěn v acetonitrilu (obě rozpouštědla Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Jako interní standard bylo použito 100 μl 1,7-heptandiaminu v koncentraci 500 mg/l (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Derivatizované vzorky byly filtrovány (filtr o porozitě 0,22 μm) a nanášeny na kolonu. Podmínky separace a detekce sledovaných biogenních aminů byly popsány ve studii Smělé et al. (2004, s. 432-437). Separace byla provedena gradientovou elucí (eluční program pro mobilní fázi; Tab. 2).

Všechny vzorky získaných supernatantů, včetně kontroly, byly derivatizovány dvakrát a každá derivatizovaná směs nanášena na kolonu ve dvojnásobném opakování. Všechny separace byly provedeny na koloně Agilent Zorbax Eclipse C18 s parametry 50 x 3,0 mm, 1,8 μm (Agilent, Paolo Alto, USA). Chromatografický systém byl dále tvořen binární pumpou, odplynovací jednotkou, UV/VIS-DAD detektorem a termostatem kolon (Agilent Technologies, Paolo Alto, USA) a autosamplerem LabAlliance SHLA84000 (Paolo Alto, USA). Detekční limit pro biogenní aminy se při použití dané metody pro jednotlivé biogenní aminy pohybuje v intervalu 0,14-1,09 mg/l.

Tab. 2: Eluční program separace biogenních aminů

čas [min.]	10% ACN* [%]	100% ACN* [%]
0,0	39	61
0,1	39	61
1,4	30	70
3,5	17	83
4,0	0	100
9,5	0	100
11,5	39	61
15,5	39	61

*kde ACN...acetonitril

3.4 Kultivace a odečet počtu mikroorganismů v rámci Experimentu II a III

V každém odběrovém čase (včetně času zaočkování) byly zjišťovány celkové počty mikroorganismů (CFU/ml). Pravidelně byly na pevné médium vynášeny vzorky (100 μl) z tří posledních ředění ve dvojnásobném opakování. Bylo použito médium MRS agar (Oxoid, Basingstoke, UK). Jen pro doplňkový experiment s bifidobakteriálním humáním izolátem bylo zvoleno médium Willkins-Chalgren broth s přidavkem agaru a sojového peptonu (Willkins-Chalgren Anaerobic Broth Base a Soya Peptone, Hi-Media, Mumbai, Indie).

Ředění vyočkované na plotny bylo operativně voleno na základě zákalu bakteriální suspenze v čase odběru.

Zákal byl měřen pomocí Benchmark Microplate Reader (Bio-Rad, Philadelphia, USA) při vlnové délce 655 nm. Měření probíhalo v mikrotitračních destičkách, kdy byly promíchané bakteriální suspenze v čase odběru dávkovány v množství 200 μ l do každé jamky destičky. Před analýzou byly suspenze automaticky protřepávány (10 s).

Z výsledků nárůstu na MRS agaru byly sestrojeny růstové křivky, které ukazovaly chování dané kultury v médiu jako závislost log (CFU/ml) na čase.

3.5 Měření pH kultivačního média v rámci Experimentu II a III

Měření pH kultivačního média bylo realizováno v Experimentech II a III, kdy byly v jednotlivých odběrových časech sledovány změny pH kultivačního média v důsledku produkce kyseliny mléčné a jiných kyselých produktů metabolismu, nebo případné změny zapříčiněné tvorbou alkalických biogenních aminů. Všechny vzorky byly měřeny nejméně ve trojím opakování. Vývoj kyselosti kultivačního prostředí byl monitorován pH-metrem Spear Eutech (Eutech Instruments, Singapore, Malaysia).

3.6 Stanovení aminokyselinového profilu kultivačních médií Experimentu I-III

Zároveň byl stanoven aminokyselinový profil použitých médií a jejich komponent, které by mohly představovat zdroj aminokyselin k dekarboxylačním reakcím. Analýza byla uskutečněna po kyselé i oxidativní hydrolýze dle Lazárkové et al. (2010, s. 1865) na aminokyselinovém analyzátoru AAA 400 (Ingos, Praha, ČR) po postkolonové derivatizaci ninhydrinem. Pro účely srovnání byly zjištěné koncentrace vyjádřeny v konkrétním množství, které je přítomno v 1 l tekutého média (g/l).

3.7 Statistické hodnocení naměřených dat Experimentů I-III

Výsledky analýzy produkce biogenních aminů v rámci prvotních skríníngů byly vyhodnoceny pomocí Mann-Whitney testu, který slouží k porovnávání mediánů dvou nezávislých proměnných. Předpokladem je pouze skutečnost, že obě proměnné pocházejí ze

dvou různých souborů. Nemusí splňovat homogenitu a normalitu dat (Sheskin, 2007, s. 513-526).

Pro vyhodnocení kinetiky produkce biogenních aminů byl aplikován Gompertzův model Zwieteringa et al. (1990, s. 1876; vzorec 1, upraveno).

Závislost obsahu sledovaného biogenního aminu (y) [mg.l^{-1}] na čase (t) byla vyjádřena jako:

$$y = A_{BA} \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_{BA} \cdot e}{A_{BA}} (\lambda_{BA} - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

kde:

μ_{BA}je maximální rychlost produkce biogenního aminu [h^{-1}];

λ_{BA}je doba prodlení [h];

A_{BA}je asymptota definovaná jako maximální produkce biogenního aminu.

Příklad obvyklého průběhu křivek produkce biogenního aminu po Gompertzově modulaci je znázorněn v Příloze D, Obr. D1.

Pro výpočet parametrů μ_{BA} , λ_{BA} a A_{BA} byla rovněž použita nelineární regresní analýza (Marquardt-Levenburgova metoda) pro následující podmínky $\mu_{BA} > 0$, $\lambda_{BA} > 0$ a $A_{BA} > 0$. Absolutní rychlost produkce biogenních aminů může mít vzájemnou souvislost s absolutní rychlostí růstu přes tzv. produkční faktor (yield faktor, $Y_{BA/CFU}$). Z tohoto vztahu (2) bylo možné vyvodit vyprodukované množství biogenních aminů jednou buňkou.

Yield faktor lze vypočítat z následujícího vzorce:

$$BA_t = BA_0 + Y_{BA/CFU} \cdot (N_t - N_0) \cdot 1000 \quad (2)$$

kde: BA_t a BA_0 (mg.l^{-1}) jsou koncentrace biogenních aminů v čase t a v čase 0; N_t a N_0 jsou celkové počty CFU/ml v čase t a v čase 0. Marquardt-Levenburgova metoda byla aplikována pro $Y_{BA/CFU} > 0$ (Emborg a Dalgaard, 2008, s. 226-233).

Vypočítané parametry Gompertzových modelů (lag fáze, maximální vyprodukované množství a lag fáze produkce biogenního aminu) v Experimentu II a III byly podrobeny statistickému testování.

Nejdříve byla data podrobená testování normality. Z důvodů nenormálního rozdělení dat byl zvolen neparametrický test dle Mann-Whitney. V celé práci bude využívána hladina významnosti $P < 0,05$.

4 HLAVNÍ VÝSLEDKY PRÁCE

4.1 Výsledky Experimentu I

V rámci experimentu byl proveden skrínig tvorby biogenních aminů u celkového počtu 123 kmenů bakterií rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (Příloha A). V subexperimentu I bylo testováno 68 kmenů a v subexperimentu II 55 kmenů.

4.1.1 Výsledky subexperimentu I

U žádného z 68 testovaných kmenů rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, získaných ze sbírek CCDM, včetně kmenů izolátů z procesu výroby sýrů (T0), a RIBM, nebyla detekována produkce histaminu, tryptaminu, fenyletylaminu a sperminu. V supernatantech po kultivaci některých kmenů bylo možné pozorovat velmi malá množství putrescinu a sperminu (do 0,5 mg/l), která měla kolísavý charakter a nebyla mnohdy ve všech pěti opakováních přítomna. Ve výsledkových tabulkách (Příloha A, A1 a A2; Tab. 3 a Tab. 4) jsou proto uváděna jen množství biogenních aminů, která dosahovala v médiích minimální koncentrace 2 mg/l a to ve všech pěti opakováních vzorků. Třicetjedna kmenů bylo schopných produkovat detekovatelná množství kadaverinu (3,0-10,2 mg/l) a dvacetsedm kmenů produkovalo tyramin (2,1-3084,0 mg/l).

Produkce biogenních aminů bifidobakteriemi a bakteriemi mléčného kvašení ze sbírky CCDM

Z 29 testovaných kmenů laktobacilů (Příloha A, Tab. A1) šest tvořilo tyramin (Tab. 3). Schopnost produkce nižších koncentrací kadaverinu prokázalo 16 kmenů laktobacilů (viz Příloha A, Tab. A1). Většina kmenů tohoto souboru produkovala méně než 10 mg/l tyraminu ($P < 0,05$). Vyšší množství tohoto biogenního aminu vyprodukovaly do kultivačního prostředí tři kmeny: *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289, *Lactobacillus curvatus* T01 a *Lactobacillus brevis* T02. Dva poslední zmíněné kmeny (izoláty z procesu výroby sýrů; non-startérové kultury) projevovaly silnou aminogenní aktivitu, kdy byly schopné v rámci prvního skrínigu vyprodukovat až 1 g tyraminu na litr média (Tab. 3).

Tab. 3: Produkční kmeny laktobacilů ze sbírky CCDM a izoláty z procesu výroby sýrů (T0)

Kmen	Produkce tyraminu [mg/l]
<i>Bifidobacterium lactis</i> CCDM 241	5,4±0,7
<i>Bifidobacterium lactis</i> CCDM 239	66,6±13,2
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCDM 79	2,1±0,6
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCDM 109	2,4±0,3
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289	55,8±5,0
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCDM 382	8,0±2,3
<i>Lactobacillus curvatus</i> T01	1077,5±1,2
<i>Lactobacillus brevis</i> T02	959,8±2,8

V supernatantech po kultivaci většiny testovaných kmenů bifidobakterií (Příloha A, Tab. A1) byla detekována malá množství kadaverinu a dva kmeny produkovaly také tyramin. Kmen *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 239 byl navíc schopen v rámci prvotního skríningu vytvořit více než 50 mg/l tyraminu (Tab. 3). Na možnost tvorby tyraminu bifidobakteriemi upozornila již Sládková et al. (2007, s. 6). Fakt, že probiotické kultury mohou produkovat biogenní aminy, zdůrazňuje nutnost testování dekarboxylázové aktivity i u probiotických bakterií.

Produkce biogenních aminů bakteriemi mléčného kvašení ze sbírky RIBM

Ze 17 kmenů *Lactobacillus brevis* 15 zástupců tvořilo tyramin v koncentracích vyšších 20 mg/l (37-3084 mg/l; Příloha A, Tab. A2). Některé kmeny byly schopné v dekarboxylačním médiu vyprodukovat více než 1500 mg/l tyraminu (Tab. 4). U dvou izolátů *Lb. brevis* RIBM 2-4 a 2-56 však nebyl detekován tyramin vůbec. Sedm kmenů *Lb. brevis* (RIBM 2-20, 2-33, 2-67, 2-68, 2-69, 2-93, 2-98) produkovalo kromě tyraminu také malá množství kadaverinu (<10 mg/l). U ostatních kmenů laktobacilů (*Lactobacillus plantarum* RIBM 2-29, 2-89, 2-92, 2-94, 2-96; *Lactobacillus casei/paracasei* RIBM 2-61, 2-71, 2-74, 2-76, 2-77, 2-79, 2-95, 2-113) nebyla schopnost produkce kadaverinu prokázána.

Tyramin v koncentracích vyšších než 10 mg/l byl detekován v supernatantech po kultivaci dvou ze sedmi kmenů *Lb. casei/paracasei* (RIBM 2-74, 2-113) a u tří z pěti kmenů

Lactobacillus plantarum (RIBM 2-89, 2-94, 2-96). *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-94 vyprodukoval do kultivačního prostředí více než 100 mg/l tohoto biogenního aminu. U kmene *Lactobacillus plantarum* RIBM 2-89 byla produkce výrazně vyšší, bezmála 530 mg/l. Schopnost některých kmenů *Lb. plantarum* produkovat tyramin byla již dříve zmíněna autory studií, které se danou problematikou zabývaly (Mason et al., 1996, s. 204; Arena et al., 2007, s. 209).

Nejvyšší množství tyraminu vytvořily v rámci zástupců druhů *Lb. casei/paracasei* a *Lb. plantarum* kmeny: *Lb. casei/paracasei* RIBM 2-113 (470,9±38,6 mg/l) a *Lb. plantarum* RIBM 2-89 (525,9±17,9 mg/l; P< 0,05).

Na základě níže uvedených výsledků skrínungu (Tab. 4) je patrné, že testované laktobacily, izoláty z procesu výroby piva, disponovaly mnohdy významnou aminogenní aktivitou. Jednalo se zvláště o kmeny *Lb. brevis* (P<0,05). Toto zjištění souhlasí s předešlými studiemi autorů Moreno-Arribas a Lonvaud-Funel (1999, s. 55-60), a Marcobal et al. (2006, s. 417-424), kteří zjistili výskyt genových sekvencí kódujících vznik tyrozindekarboxylázy u *Lb. brevis*.

Tab. 4: Kmeny izolátů z procesu výroby piva produkující tyramin v množství vyšším než 1,5 g/l

Kmen	Produkce tyraminu [mg/l]
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-50	1840,8±101,1
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-67	2485,2±168,2
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-68	1361,9±101,6
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-69	1626,4±149,2
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-70	2928,7±184,3
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-72	1675,2±126,9
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-93	3084,0±111,9
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-98	2231,1±211,4
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-111	2977,6±163,1

Pircher et al. (2007, s. 225-231) označila ve své studii laktobacily jako producenty kadaverinu. Uvedené zjištění souhlasí s výsledky této dizertační práce (Příloha A, Tab. A1-A2).

Dispozice laktobacilů tvořit kadaverin je však podle Mozzi et al. (2010, s. 19) nemožná, protože v jejich genomu není sekvence kódující vznik lyzindekarboxylázy (EC 4.1.1.18),

katalyzující konverzi lyzinu na kadaverin. Existuje ale možnost vysvětlení, kterým je komplexní arginin-, lyzin- a ornitindekarboxyláza (EC 4.1.1.x). Dle Národního centra pro biotechnologické informace (*National Centre for Biotechnology information*, ©2011) může být sekvence tohoto enzymu zakódována v genomu některých laktobacilů.

Situace u bifidobakterií, schopných tvořit kadaverin, je však odlišná. Gen pro enzym lyzindekarboxylázu (EC 4.1.1.18) je přímo zakódován v jejich genomu (např. *Bifidobacterium bifidum* PRL2010) a tudíž se tímto způsobem může účastnit metabolismu aminokyselin (*European Bioinformatics Institute*, ©2011). Bifidobakterie také prokazatelně disponují tyrozindekarboxylázami, jak uvedla ve své studii Sládková et al. (2007, s. 6).

Pro další testování dekarboxylázové aktivity zástupců rodu *Bifidobacterium* byl zvolen nový soubor kmenů, jehož výsledky jsou popsány níže, v kapitole 4.1.2.

4.1.2 Výsledky subexperimentu II

V rámci skrínungu bifidobakteriálních humáních izolátů bylo testováno 50 kmenů, které byly získány ze sbírky České zemědělské univerzity v Praze (Příloha A, Tab. 3 a 4). Mezi druhy, které byly zahrnuty do prvotního skrínungu, byly: *Bifidobacterium longum* (10 kmenů), *B. longum* ssp. *suís* (2 kmeny), *B. bifidum* (7 kmenů), *B. animalis* ssp. *lactis* (11 kmenů), *B. animalis* ssp. *animalis* (11 kmenů), *B. breve* (2 kmeny), *B. choerinum* (2 kmeny), *B. pseudolongum* ssp. *globosum* (1 kmen), *B. pseudolongum* (1 kmen), *B. thermophilum* (2 kmeny), *B. ruminantium* (1 kmen). Také bylo získáno pět humáních izolátů laktobacilů: *Lb. bombi* (2 kmeny), *Lb. rodentium* sp. (2 kmeny) a *Lb. reuteri* (1 kmen).

Aminogenní aktivita byla pozorována jak v tekutém médiu MRS (Oxoid, Basingstoke, UK) za stejných podmínek jako u bakterií mléčného kvašení, tak v dalším médiu WCH (HiMedia, Mumbai, Indie), které bylo pro kultivaci izolátů doporučeno poskytovatelem kultur. Výsledky produkce sperminu a tyraminu v prostředí dvou různých kultivačních médií byly značně odlišné ve všech případech testovaných kmenů ($P < 0,05$). Na základě tohoto zjištění byla provedena analýza obsahu aminokyselin dehydratovaných médií a jejich komponent, aby bylo možné rozdílnosti v produkci odůvodnit.

Obecně lze konstatovat, že byly syntetizovány dva biogenní aminy v množství ≥ 2 mg/l – tyramin a spermin.

Po odečtení detekovaných koncentrací biogenních aminů kontrolních vzorků od hodnot vzorků po kultivaci kmenů, žádný z ostatních šesti biogenních aminů nedosahoval hodnot vyšších než 1,0 mg/l.

Z 50 kmenů bifidobakterií 29 nebylo schopno vytvořit v kultivačním médiu MRS detekovatelná množství tyraminu. Většina dekarboxyláza pozitivních kmenů bifidobakterií však produkovala zanedbatelná množství tyraminu (< 2 mg/l). O významnější produkci lze hovořit u pěti kmenů (> 2 mg/l). Nejvyšší dosažené množství tyraminu však v médiu MRS bylo 5,2±0,2 mg/l (*B. animalis* ssp. *animalis* B35). Spermin byl v médiu MRS tvořen hojněji (> 20 mg/l). Jen 14 kmenů bifidobakterií neprokázalo schopnost jeho produkce.

V médiu WCH byla více podpořena produkce tyraminu, kdy i kmeny, které v MRS tyramin neprodukovaly, vytvořily množství vyšší 10 mg/l (např. *B. longum* B8; *B. bifidum* B16, B17, B18; *B. animalis* ssp. *lactis* B21, B22 a B25; *B. animalis* B33 a B34). Nejvyšší množství tyraminu detekované v supernatantech u těchto izolátů činilo 13,4±0,1 mg/l (*B. animalis* ssp. *lactis* B25). Syntéza sperminu však v médiu WCH byla ve většině případů zeslabena. Pouze 17 kmenů bylo schopných produkce sperminu, a to většinou do 10 mg/l média. Vyšší množství vytvořily do růstového prostředí čtyři kmeny *B. longum* ssp. *suis* B12, *B. thermophilum* B46, *B. ruminantium* B47 a *B. pseudolongum* B48.

Dle zdroje MetaCyc, Metabolic Pathway Database (©2014b) lze putrescin a spermidin najít ve všech formách života, avšak spermin se nalézá hlavně v eukaryotických buňkách (MetaCyc, Metabolic Pathway Database, ©2014b). Konkrétní dráha, kterou vzniká spermin, byla experimentálně (molekulárně-genetickými metodami) prokázána u *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* a *Geobacillus stearothermophilus*. Zdroj MetaCyc, Metabolic Pathway Database (©2014b) však dále upozorňuje, že neuvádí všechny mikroorganismy, které jsou syntézy sperminu schopny. U naprosté většiny totiž nebyla syntéza sperminu vůbec zkoumána (MetaCyc, Metabolic Pathway Database, ©2014b). Tvorbu polyaminů včetně sperminu, dokonce zástupci rodů *Lactobacillus* a *Lactococcus*, dokládají např. studie autorů Kuley et al. (2012, s. 653) a Mangia et al (2013, s. 564). Tyto studie nebyly zaměřeny na potenciál tvorby, ale na samotnou detekci vyprodukovaných množství.

Dle Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* ADO11 může mít ve svém enzymovém vybavení adenozylnmetionindekarboxylázu (E: 4.1.1.50) a spermin syntázu (E: 2.5.1.22), které jsou v bakteriální buňce zapojeny ve vzniku sperminu (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, ©1995-2015c).

Již dlouhou dobu jsou bifidobakterie označovány za pozitivní mikroflóru osidlující gastrointestinální trakt. Pozitivní účinek byl probiotikům připisován kvůli úpravě mikrobiální rovnováhy ve střevech. Hlavním principem jejich působení proti nepříznivé mikroflóře bylo snížení pH prostředí, kdy nízké pH omezuje růst patogenní mikroflóry. Za další možný způsob byla označena schopnost některých kmenů produkovat antibakteriální látky, např. bakteriociny (Gill a Guarner, 2004, s. 516; Ljungh a Wandström, 2009, s. 103; Marteau et al., 2002, s. 51-57).

Matsumoto a Benno (2004, s. 147-153) ve své studii uvedli, že *Bifidobacterium lactis* LKM512 je schopné omezit mutagenitu enterocytů prostřednictvím zvýšení koncentrace exogenních polyaminů ve střevech. Polyaminy jsou důležité pro správnou metabolickou aktivitu střeva, kdy se spermin a spermidin podílí na vývoji střevní tkáně. Všechny polyaminy stravou přijaté nesetrvávají ve střevě, ale jsou transportovány do jiných orgánů, kde plní své funkce (Silla-Santos, 1996, s. 222).

Na základě výsledků této dizertační práce a studie Matsumoto a Benno (2004) je možné uvažovat nad tím, že kmeny rodu *Bifidobacterium* samy mohou přispívat svými metabolity (polyaminy) ke zvyšování koncentrace polyaminů ve střevě.

V rámci této experimentální části bylo také testováno pět humánních izolátů laktobacilů. Dva z pěti testovaných kmenů byly schopny vytvořit více než 2 mg/l tyraminu v prostředí MRS. Kmen *Lb. rodentium* B53 dokonce více než 10 mg/l ($14,5 \pm 0,8$ mg/l). V podmínkách WCH bylo nejvyšší dosažené množství tyraminu $11,8 \pm 0,4$ mg/l (*Lb. bombi* sp. B50). Kmen *Lactobacillus reuterii* B52 netvořil tyramin ani v jednom z médií. Spermin v růstovém prostředí WCH nebyl detekován.

Pro další účely sledování kinetiky produkce biogenních aminů v rámci Experimentu II bylo zvoleno jednotné médium MRS. Toto médium vyhovuje laktobacilům i bifidobakteriím.

4.2 Výsledky Experimentu II

Před samotným zahájením pokusů zabývajících se kinetikou produkce biogenních aminů kmenů s probiotickým potenciálem (*Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 a *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 239) bylo provedeno zkušební testování podmínek, za kterých by dané kultury byly schopny vyprodukovat co nejvyšší množství biogenních aminů (Tab. 5 a 6). Na základě výsledků Experimentu I tyto kmeny nevykázaly vysokou produkci a bylo nutné zjistit, které podmínky budou pro jejich dekarboxylázovou aktivitu v médiu MRS vhodné a naopak.

Do růstového prostředí byly přidány i další aminokyseliny, nejen arginin, ornitin, tyrozin a lyzin, ale také histidin a fenylalanin v množství 0,2 % (w/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Byla však testována i verze vzorků s obsahem lyzinu, tyrozinu a fenylalaninu v koncentracích 0,2 a 0,3 % (w/v) (Tab. 6). Do takto suplementovaného MRS bujónu bylo ještě v rámci předběžného testování přidáno 0,005 % (w/v) pyridoxalfosfátu.

Jako další faktory byly zvoleny přísady laktózy v koncentracích 0; 0,5; a 1,0 % (w/v) a pH bujónu před inokulací (4,5; 5,0; 7,0). Všechny výše uvedené faktory byly testovány ve vzájemných kombinacích. U kmenů *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 a *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 239 byla zjištěna schopnost produkce tyraminu, putrescinu a nepatrná tvorba fenyletylaminu. Nejdříve byly kultivovány v modifikovaných médiích bez přísady kofaktoru dekarboxyláz, pyridoxalfosfátu.

Sledován byl vliv přísady laktózy, různých kombinací aminokyselin a iniciačního pH bujónu (Tab. 1). Z testovaných kmenů byl jako produktivnější označen *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 (dále jen *Lb. rhamnosus* CCDM 289). V porovnání s *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 239 (dále jen *B. lactis* CCDM 239) se zkoušený *Lactobacillus* jevil jako produktivnější, co se týče schopnosti tvorby a kumulace putrescinu a tyraminu v růstovém prostředí. Zvyšování přísady laktózy v rozsahu 0-0,5 % (w/v) nemělo výraznější vliv na produkci tyraminu oběma kmeny (Tab. 5). Ve většině případů došlo pouze k mírnému zvýšení produkce (Tab. 5). Suplementace dekarboxylačních médií různými kombinacemi aminokyselin pro produkci tyraminu neměla jednotný trend a ani výraznější vliv na dekarboxylázovou aktivitu (Tab. 5).

V rámci zkoušených faktorů byla pro podporu tvorby tyraminu kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 nejvhodnější kombinace 1,0% (w/v) obsahu laktózy při pH 7,0 (Tab. 5), a to nezávisle na tom, jestli byla přidána redukovaná nebo kompletní kombinace aminokyselin. Pro produkci putrescinu při stejném složení média již byl zaznamenán rozdíl

mezi vzorky s přidavky všech šesti prekurzorů nebo jen tří ($P < 0,05$). Tento kmen *Lactobacilla* pak produkoval velmi podobné koncentrace biogenních aminů při pH 4,5.

Tab. 5: Vliv vnějších faktorů na produkci biogenních aminů (mg/l) u kmenů *Bifidobacterium lactis* CCDM 239 a *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289

Sledovaný faktor			kmen			
			CCDM 239		CCDM 289	
laktóza [%]	pH	AMK	TYR	PUT	TYR	PUT
1,0	7,0	A	7,7±0,8	ND	10,0±2,1	12,7±2,2
1,0	7,0	Lys, Tyr, Phe	5,6±0,3	ND	10,1±1,1	30,7±3,1
1,0	5,0	A	8,3±1,5	ND	8,9±0,7	ND
1,0	5,0	Lys, Tyr, Phe	6,8±1,0	ND	9,1±0,1	9,1±0,6
1,0	4,5	A	9,2±1,2	2,7±0,4	9,9±0,9	ND
1,0	4,5	Lys, Tyr, Phe	8,6±0,8	12,2±0,2	9,4±0,7	14,8±1,5
0,5	7,0	A	6,8±0,9	ND	8,1±1,2	11,9±1,1
0,5	7,0	Lys, Tyr, Phe	5,6±0,9	ND	7,9±0,9	12,1±1,2
0,5	5,0	A	7,8±0,8	ND	8,1±1,2	11,2±1,1
0,5	5,0	Lys, Tyr, Phe	8,3±0,3	ND	8,5±1,2	5,9±0,1
0,5	4,5	A	10,6±1,2	ND	8,1±0,1	15,1±2,9
0,5	4,5	Lys, Tyr, Phe	5,9±0,9	ND	8,7±1,3	9,3±1,1
0,0	7,0	A	4,5±0,6	ND	8,9±0,9	8,6±1,3
0,0	7,0	Lys, Tyr, Phe	6,2±1,2	ND	7,4±1,0	8,7±1,9
0,0	5,0	A	5,0±1,4	ND	8,6±0,1	5,8±0,9
0,0	5,0	Lys, Tyr, Phe	6,9±0,9	ND	7,4±0,6	10,3±0,2
0,0	4,5	A	5,7±0,8	ND	9,3±1,2	10,4±1,5
0,0	4,5	Lys, Tyr, Phe	5,8±1,0	ND	8,9±0,4	7,6±1,7

Kde: A...přídavek aminokyselin v koncentraci 0,2 % (w/v), arginin, fenylalanin, histidin, lyzin, ornitin, tyrozin; Lys...lyzin, Tyr...tyrozin, Phe...fenylalanin, přídavek aminokyselin v koncentraci 0,2 % (w/v); ND...pod limitem detekce, TYR...tyramin, PUT...putrescin.

K nejvyšší produkci tyraminu kmenem *Bifidobacterium lactis* CCDM 239 došlo při kultivaci za podmínek v prostředí s 0,5% a 1,0% (w/v) přidavkem laktózy při pH 4,5 (Tab. 5). Na druhou stranu putrescin byl bifidobakteriemi lépe vytvářen v přítomnosti redukovaného počtu prekurzorů biogenních aminů (jen za podmínek 1,0% (w/v) koncentrace laktózy, pH 4,5). Putrescin totiž vzniká konverzí ornitinu za účasti enzymu

ornitindekarboxylázy nebo nepřímo z argininu pomocí arginindekarboxylázy a aminopropyltransferáz (Halász-Baráth et al., 1994, s. 43; Ancín-Azpilicueta et al., 2008, s. 258; Komprda et al., 2008, s. 30), a tak další aminokyseliny jeho produkci neovlivňují. Je zjevné, že přítomnost laktózy mírně ovlivnila dekarboxylázovou aktivitu zkoumaných bakterií. Halász et al. (1994, s. 44), Bover-Cid a Holzapfel (1999, s. 38) uvádí, že dostupnost zkvasitelných cukrů (zvláště glukózy) zvyšuje růst bakterií a produkci biogenních aminů, kdy podpurný efekt lze zvláště sledovat v koncentracích od 0,5-2,0 % (w/v). Výsledky této dizertační práce jsou spíše v souladu s informacemi studie Buňkové et al. (2011, s. 112-119), která prokazuje, že přídavek laktózy na produkci biogenních aminů u mléčných bakterií neměl až tak výrazný vliv jako jiné testované faktory.

Produkce tyraminu byla sledována u obou kmenů za všech testovaných podmínek, avšak detekovaná množství se většinou pohybovala jen do hranice 10,0 mg/l (Tab. 5).

Tab. 6: Vliv přídavku směsí aminokyselin a pyridoxalfosfátu na produkci biogenních aminů (mg/l) u kmenů *Bifidobacterium lactis* CCDM 239 a *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289

kmen	testovaná varianta	produkovaný biogenní amin		
		TYR	PUT	PHE
239	1	2,9±0,3	ND	3,2±0,1
	2	1,0±0,1	ND	ND
	3	3,7±0,2	ND	ND
289	1	466,7±34,6	3,6±0,3	5,8±0,9
	2	6,4±0,6	3,0±0,2	ND
	3	7,0±0,3	3,0±0,3	ND

Kde: varianta 1...přídavek 0,2 % (w/v) aminokyselin, 0,005 % (w/v) pyridoxalfosfátu; varianta 2...přídavek 0,2 % (w/v) aminokyselin, bez pyridoxalfosfátu; varianta 3...přídavek 0,3 % (w/v) aminokyselin; ND...pod limitem detekce; TYR...tyramin, PUT...putrescin, PHE...fenyletylamin.

S přídavkem pyridoxalfosfátu do růstového média byla množství tyraminu vytvořená kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 mnohonásobně vyšší (Tab. 6). Jednalo se o přirozený efekt, uvážíme-li fakt, že byl do kultivačního prostředí přidán kofaktor

dekarboxyláz. Nabuzení produkce biogenních aminů tímto způsobem bylo využito již v předešlých studiích (Buňková et al., 2009, s. 533-538; Priyadarshani a Rakshit, 2011, s. 2062-2069). Avšak pro *Bifidobacterium* se hodnoty produkovaných biogenních aminů po přidavku pyridoxalfosfátu příliš nezměnily. Zdá se ale, že tento přídatek podpořil produkci fenyletylaminu, který nebyl dříve ve vzorcích média po kultivaci *Bifidobacterium lactis* CCDM 239 detekován. Vyšší koncentrace aminokyselin (0,3 % w/v) oproti původní 0,2% (w/v) nezpůsobila výraznější nárůst produkce biogenních aminů (Tab. 5 a 6).

Pro další a širší skríníng vlivu vnějších faktorů na produkci biogenních aminů byly přidány do kultivačního prostředí další faktory, jako např. glycerol, nebo NaCl. Pro účely sledování kinetiky produkce biogenních aminů nebyl na základě informací z tohoto předběžného skríníngu nadále přidáván pyridoxalfosfát a ani rozšířená/redukovaná kombinace aminokyselin. V dalších pokusech byla přidávána původní čtyřkombinace aminokyselin – tyrozin, lyzin, arginin a ornitin. Množství prekurzorů však bylo navýšeno na 0,3 % (w/v).

4.2.1 Kinetika produkce biogenních aminů *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 239

Aminogenní aktivita typicky probiotické kultury *B. lactis* CCDM 239, resp. její schopnost produkovat detekovatelná množství některých biogenních aminů, může být chápána jako negativní projev, který je opačný k pozitivnímu probiotickému působení kmene v lidském organismu.

Tato část dizertační práce může přispět k celkovému objasnění dekarboxylázové aktivity bifidobakterií, procesů v rámci jejich metabolismu a růstového chování v prostředí ovlivněném přidavky testovaných faktorů.

Subexperiment lze rozdělit do dvou částí. V rámci předběžného testování, byly zkoušeny vybrané faktory formou skríníngu v dekarboxylačním médiu (koncentrace sacharidů glukózy a laktózy, přídatek NaCl a pH 4,5 a 5,0; kultivace při 37 °C po dobu 48 h.). Kmen produkoval hlavně tyramin (Tab. 5 a 7), ostatní biogenní aminy buď nebyly detekovány, nebo jejich množství po dvoudenní kultivaci za optimální teploty nedosahovalo ani 2 mg/l.

Tab. 7: Produkce tyraminu (mg/l) kmenem *B. lactis* CCDM 239 ovlivněná testovanými faktory (počáteční pH, přídavek glukózy a laktózy v % (w/v))

pH	Koncentrace sacharidů [%]	Přídavek glukózy			Přídavek laktózy		
		0 % NaCl	1 % NaCl	2% NaCl	0 % NaCl	1 % NaCl	2 % NaCl
4,5	0,00	11,5±0,3	12,7±1,3	10,8±1,0	10,5±0,4	11,5±1,0	8,5±0,4
	0,25	11,8±1,0	6,1±0,2	6,9±0,1	12,8±1,6	12,7±1,7	10,8±0,7
	0,50	6,6±0,1	7,1±0,2	5,4±0,1	10,6±0,7	10,9±0,4	12,4±1,1
	1,00	5,1±0,1	5,4±0,1	5,5±0,1	10,2±2,9	10,5±0,1	10,1±0,5
5,0	0,00	6,8±0,2	5,8±0,7	6,8±0,1	6,9±0,1	7,4±0,1	8,8±0,8
	0,25	9,6±1,2	12,8±1,1	10,8±1,4	9,4±1,2	9,8±0,3	10,7±1,5
	0,50	5,8±0,1	7,0±0,2	5,4±1,1	6,6±0,1	7,7±0,1	12,6±1,1
	1,00	6,7±0,2	5,3±0,4	5,4±0,8	4,4±0,1	5,5±0,1	10,3±1,2

Na základě výsledků předběžných testů, kdy byla pozorována vyšší tvorba tyraminu, byla zvolena pro účely sledování kinetiky produkce (pro vlastní subexperiment) fixní hodnota pH (pH 4,5). Dané pH se nejvíce přibližuje pH mléčných fermentovaných výrobků, při jejichž výrobě právě testovaný kmen nalézá uplatnění. Aktivní kyselost fermentovaných mléčných výrobků se pohybuje v rozmezí pH 4,5-4,8 (Tamime, 2006, s. 66 a 139). Tamime (2005, s. 66) také uvedl, že pH fermentovaných mléčných výrobků na konci fermentace, které může být nižší než pH 4,4, je základním faktorem ovlivňujícím životaschopnost probiotických kultur. Mírně zvýšená produkce biogenních aminů může být i v tomto subexperimentu chápána jako obranný mechanismus bakteriální buňky proti překyselení (Molenaar et al., 1993, s. 2864-2870).

Pro účely popisu kinetiky byl zvolen přídavek laktózy, nikoliv glukózy. Důvod, proč bylo médium suplementované laktózou více vhodné pro růst a celkovou produkci biogenních aminů, může spočívat ve skutečnosti, že byla laktóza částečně konvertována na laktulózu v procesu tepelné sterilizace dekarboxylačního bujónu. Na možnost konverze upozornil Kurmann et al. (1992, s. 194). Laktulóza je považována za „bifidus faktor“ (Cho a Finocchiaro, 2010, s. 98). Bifidus faktor je složkou kultivačního prostředí, která podporuje růst bifidobakterií (Matijević et al., 2009, s. 21).

Bylo tedy připraveno dekarboxylační médium dle Tab. 1 bez glukózy/dextrózy. Do média byly přidány pouze testované koncentrace laktózy (0,0; 0,25; 0,50 a 1,0 % (w/v)) jako zdroj sacharidu. Dále byl sledován vliv vybraných koncentrací soli (0, 1 a 2 %) a teploty (10 a 37 °C) při stálém iniciačním pH 4,5.

Růstové chování a vývoj pH kultivačního prostředí *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 239

Za většiny testovaných kombinací faktorů nebylo růstové chování kmene *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* významně ovlivněno (výrazná inhibice nebo naopak podpora růstu; Příloha B, Obr. B2). Rychlejší rozvoj mikroflóry byl sledován po 34. hodině kultivace ($P < 0,05$). Rozdíl koncentrace biomasy mezi 34. a 48. hodinou nebyl statisticky významný ($P > 0,05$), tudíž by se dalo tvrdit, že mezi 34. a 48. hodinou kultivace nastala také stacionární fáze. V těchto odběrových časech byl pozorován nejrychlejší nárůst koncentrace tyraminu (data nejsou uvedena). Indukované bakteriální aminodekarboxylázy jsou, podle studie Biase et al. (1999, s. 1198), tvořeny zvláště na konci aktivního buněčného dělení, aby působily proti okyselení extracelulárního prostředí v průběhu fermentačního růstu u zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*. Dekarboxylázová aktivita testovaného bifidobakteriálního kmene však rostla už během exponenciální fáze, což souhlasí se studií Landete et al. (2006, s. 85). Přidávky laktózy viditelně podporovaly růst kultury (Příloha B, Obr. B2).

Pro pokus bylo zvoleno nízké pH, které přesto bylo fermentatorním metabolizmem testovaného mikroorganismu dále snižováno. Tento růst kyselosti nebyl markantní. Jednalo se o rozdíl iniciační a konečné kyselosti (po 48 hodinách) nedosahující $\Delta\text{pH} < 1$. Zkvašováním laktózy se pH kultivačních médií ve většině případů snižovalo na hodnoty v rozsahu 3,67-3,79 (např. Příloha B, Obr. B1A). Výjimkou byla 0,5% koncentrace mléčného cukru, kdy největší zaznamenaný pokles z iniciačního pH 4,50 byl na pH 4,36 (Příloha B, Obr. B1). Důvod tohoto jevu je obtížně vysvětlitelný, stejně tak nižší produkce tyraminu v rámci těchto testovaných podmínek (viz níže).

Produkce biogenních aminů kmenem *B. animalis* ssp. *lactis* CCDM 239

Kinetika produkce byla vyhodnocena jen u tyraminu, jelikož tvorba ostatních biogenních aminů byla nízká nebo také příliš kolísavá; např. produkce polyaminů sperminu a putrescinu.

Tvorba tyraminu testovaným kmenem byla při 10 °C rovněž zanedbatelná (množství <2 mg/l), přičemž ostatní biogenní aminy nebyly detekovány.

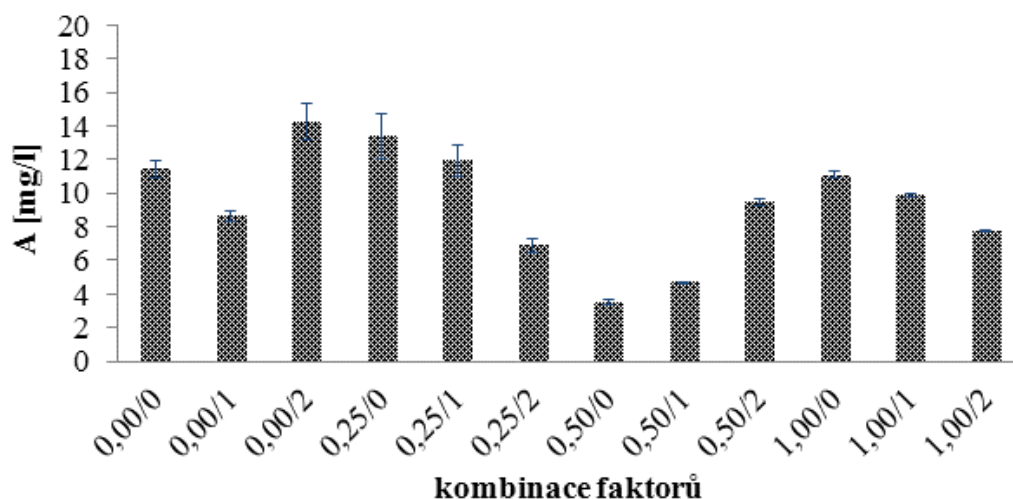
Během 48 hodinové kultivace byl sledován významný vzestup obsahu tyraminu v analyzovaných supernatantech, a to u všech kombinací koncentrací laktózy a NaCl ($P < 0,05$). Ve většině případů během prvních 6 hodin nedocházelo k statisticky významným změnám obsahu tohoto biogenního aminu ($P > 0,05$). K signifikantním nárůstům obsahu tyraminu docházelo až po 24 hodinách, či v některých případech až po 48 hodinách kultivace ($P < 0,05$, data nejsou uvedena).

Jak je vidět z grafů na obrázcích č. 12-14, samostatný přídavek soli nezpůsobil potlačení maximální produkce tyraminu. Naopak v některých případech (2% přídavek NaCl bez laktózy) způsobil podporu produkce tyraminu.

Jev, kdy sodné ionty hrají esenciální roli v tyrozindekarboxylázové aktivitě a v zapojení do regulace intracelulárního pH, byl již uveden ve studii Pereira et al. (2009, s. 345-352). Tento efekt může vysvětlovat princip podpory produkce tyraminu, jak uvedla ve své studii Buňková et al. (2011, s. 112-119). Cheung et al. (2009, s. 1-6) ve své práci navíc zmínil, že přídavek NaCl indukuje osmotický stres a podporuje činnost β -galaktozidázy u *Escherichia coli*. Můžeme se jen domnívat, jestli k obdobnému jevu může docházet i u bifidobakterií. Nicméně je logické, že by vyšší tvorba daného enzymu v kombinaci se snadnější dostupností substrátu mohla podpořit produkci tyraminu.

Až současný přídavek laktózy a soli snížil celkovou produkci tyraminu. Tento efekt však nebylo možné pozorovat při 0,5% koncentraci laktózy v prostředí (Obr. 12). Obdobný účinek prokazoval i samostatný přídavek 0,5 % (w/v) laktózy. Nejméně příhodné podmínky pro tyrozindekarboxylázovou aktivitu pak zjevně vytvořila 0,5% koncentrace laktózy (w/v) s 2 % NaCl (w/v) v dekarboxylačním médiu. Nejvíce tyraminu bylo detekováno v médiích se samostatným přídavkem soli nebo v bujónu s 0,25 % laktózy (w/v) bez přídavku soli, či obecně v médiích, které obsahovaly pouze laktózu (Obr. 12).

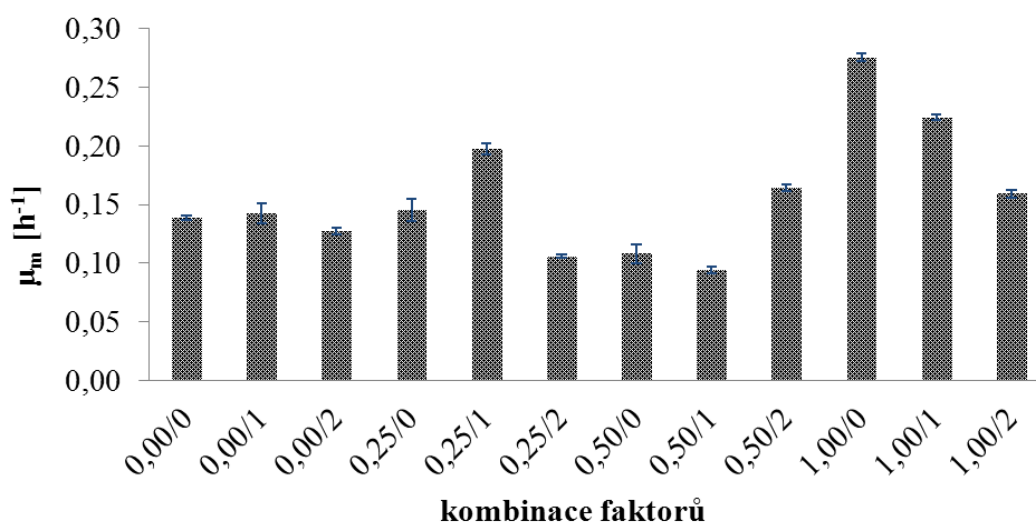
Maximální hodnoty produkce ovšem ani po 48 hodinách nedosahovaly 20 mg/l (Obr. 12).



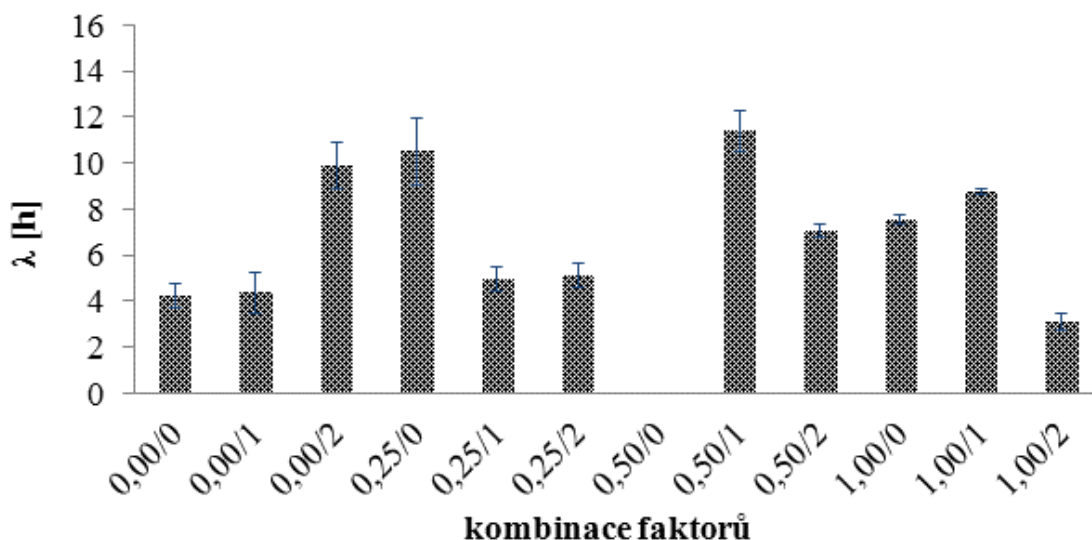
Obr. 12: Maximální produkce (A) tyraminu *Bifidobacterium lactis* při 37 °C v MRS s přidavky laktózy, soli a pH 4,5; Např.0/2...0% přidavek laktózy (w/v) a 2% přidavek NaCl (w/v)

Rychlost produkce byla také viditelně ovlivněna faktory, kdy byl nejpomaleji tvořen tyramin za podmínek 0,5% koncentrace laktózy bez ohledu na koncentraci soli (Obr. 13).

K nárůstu rychlosti celkové produkce tyraminu docházelo při nejvyšší testované koncentraci laktózy, kdy ani délka lag fáze nebyla významně prodlužována přidavkem soli (Obr. 14).



Obr. 13: Růstová rychlost produkce (μ_m) tyraminu *Bifidobacterium lactis* při 37 °C v MRS s přidavky laktózy, soli a pH 4,5; např. 0/2...0% přidavek laktózy (w/v) a 2% přidavek NaCl (w/v)



Obr. 14: Délka lag fáze produkce (λ) tyraminu *Bifidobacterium lactis* při 37 °C v MRS s přidavky laktózy, soli a pH 4,5; např. 0/2...0% přidavek laktózy (w/v) a 2% přidavek NaCl (w/v)

Obecně lze říci, že produkce biogenních aminů měla délku lag fáze ve většině případů dlouhou max. 10 hodin (Obr. 14). Nejkratší dobu lag fáze produkce tyraminu vykazoval paradoxně vzorek supernatantu s 0,5 % laktózy bez přidavku soli, avšak maximální vyprodukované množství bylo u této kombinace faktorů nejnižší. To nejspíš souviselo s hodnotou pH růstového prostředí, které se, v porovnání s ostatními médii, výrazněji neměnilo (Příloha B, Obr. B1).

Produkcí tyraminu jednou buňkou nebylo možné objektivně zhodnotit, jelikož byla ve většině případů nižší než $1 \cdot 10^{-11}$ mg/CFU.

Testovaný kmen sice nevykazoval výraznější produkci žádného z biogenních aminů, avšak i samotný potenciál produkovat detekovatelná množství tyraminu při teplotě 37 °C, představuje zajímavé zjištění. Zvláště pro účelnou implementaci této kultury do výroby jogurtových mlék a jogurtů, které fermentují při vyšší teplotě. Tato skutečnost představuje riziko, že by i „funkční“ mléčné výrobky mohly být zdroji, byť malých koncentrací, tyraminu.

Koncentrace tyraminu (<16 mg/l), které by mohl být kmen *B. lactis* CCDM 239 schopen vyprodukovat za optimálních podmínek (přítomnost prekurzorů, prebiotik, výhodných nutričních dispozic) i v reálném systému, by mohly ohrozit pouze citlivé jedince, osoby farmakologicky léčené nebo při současném požití většího množství alkoholu.

Neméně zajímavou hypotézou, nebo spíše úvahou, může být další působení kmene v gastrointestinálním traktu člověka (teplota těla ~ 37 °C), kdy by jako probiotikum mohl pokračovat v aminogenní aktivitě. Zvláště v případě produkce tyraminu by se jednalo o nežádoucí jev, který by byl opakem k jinak blahodárnému působení probiotik na lidské zdraví.

4.2.2 Kinetika produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289

Bylo sestaveno dekarboxylační médium dle Tab. 1 (str. 59). Jak již bylo uvedeno v metodické části, místo glukózy byl do kultivačního prostředí přidán meziprodukt metabolických drah, vícesytný alkohol, glycerol. Volba glycerolu byla založena na publikaci autorů, kteří glycerol označili za možný substrát, jehož *Lactobacillus rhamnosus* dokáže asimilovat a využít jako zdroj uhlíku (Alvarez et al., 2004, s. 177). Dle zdroje MetaCYC (*MetaCyc Metabolic Pathway Database*, ©2014c) představitelé bakteriálního druhu *Lactobacillus rhamnosus* mohou mít schopnost odbourat glycerol na dihydroxyacetonfosfát, který se dále účastní EMP dráhy a může tak představovat zdroj energie. Vliv přídavků glycerolu (1, 2, 3 a 5 % (v/v)) byl sledován při dvou různých teplotách (10 ± 2 a 37 ± 2 °C) a třech hodnotách pH ($4,0 \pm 0,2$, $5,0 \pm 0,2$ a $6,0 \pm 0,2$). Vybraný kmen *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 byl rovněž schopen glycerol využít jako zdroj uhlíku a za těchto podmínek produkovat biogenní aminy v detekovatelných koncentracích (Obr. 14-17; Tab. 8).

Byla sledována nejen produkce biogenních aminů, ale i růstové chování kultury (růstové křivky, vývoj pH kultivačního prostředí).

Vliv vybraných faktorů na růst kultury a vývoj pH prostředí Lactobacillus rhamnosus CCDM 289

Při všech zkoušených kultivačních podmínkách ovlivněných testovanými úrovněmi sledovaných faktorů kmen *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 rostl. Žádná kombinace faktorů nezpůsobila výraznou inhibici nebo zastavení růstu kultury, přičemž při všech iniciačních pH přídavek glycerolu zkracoval délku lag fáze (Příloha C, Obr. C7 a C8). Vyšší zkoušená teplota podpořila nárůst kultury více než teplota chladírenská. Ani po patnácti dnech kultivace při 10 ± 2 °C celkové počty nedosahovaly počtů mikroorganismů v bakteriálních suspenzích inkubovaných při 37 °C po dobu 48 hodin ($P < 0,05$).

Nízké teploty nejsou optimální pro růst bakterií mléčného kvašení. Optimální teploty pro růst laktobacilů se pohybují v rozmezí 30-40 °C (Jay, Loessner a Golden, 2005, s. 117; Hutkins, 2006, s. 33).

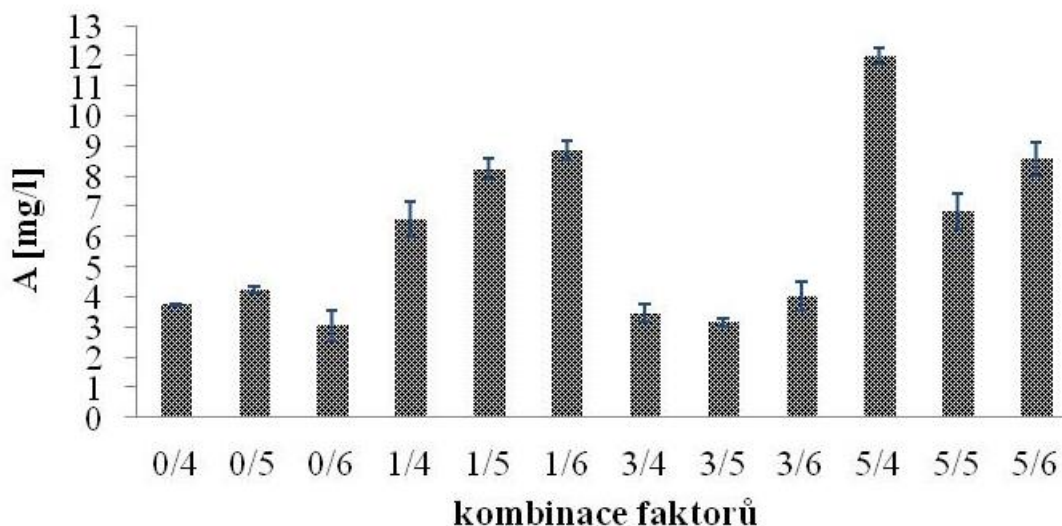
Při kultivační teplotě 37±2 °C nejvíce růst kmene podporovalo iniciační pH kultivačního média 5 a 6 (Příloha C, Obr. C7). Při nižší zkoušené teplotě pak vliv pH nebyl tak výrazný. Jako nejvíce vyhovující pro rozvoj testovaného kmene se při všech teplotách a pH projevil přídavek 1 % (v/v) glycerolu (Příloha C, Obr. C7 a C8), podobně jako 3% (v/v) koncentrace. Pětiprocentní koncentrace glycerolu v dekarboxylačním médiu spíše růst kultury omezovala ($P < 0,05$). V médiích s rostoucí koncentrací glycerolu při desetistupňové teplotě nedocházelo k významnější podpoře růstu ($P < 0,05$). Významnější vliv na růst kultury měly zřejmě teplota a kyselost prostředí.

Hodnoty pH v médiu s přídavkem glycerolu se při 37 °C během prvních dvanácti hodin kultivace významně neměnily, a to ani v médiích s vyšším iniciačním pH (pH 5 a 6). Kyselé produkty vznikající fermentací byly zřejmě vyvažovány produkcí látek s alkalickou reakcí, například biogenních aminů. Po 24 hodinách docházelo k viditelně rychlejšímu poklesu pH kultivačního prostředí. Nejvyššího okyselení bylo dosaženo v médiích s iniciačním pH 5 (pH 3,82-4,02) nezávisle na koncentraci přidaného glycerolu (Příloha C, Obr. C5). Při teplotě 10 °C došlo během kultivace kmene k mírnému okyselení. Nejmenší změny pH, resp. pokles, byl sledován během kultivace kmene v médiích bez přídavku glycerolu při všech testovaných pH. Okyselení probíhalo v médiích s iniciačním pH 6 až v posledních odběrových časech.

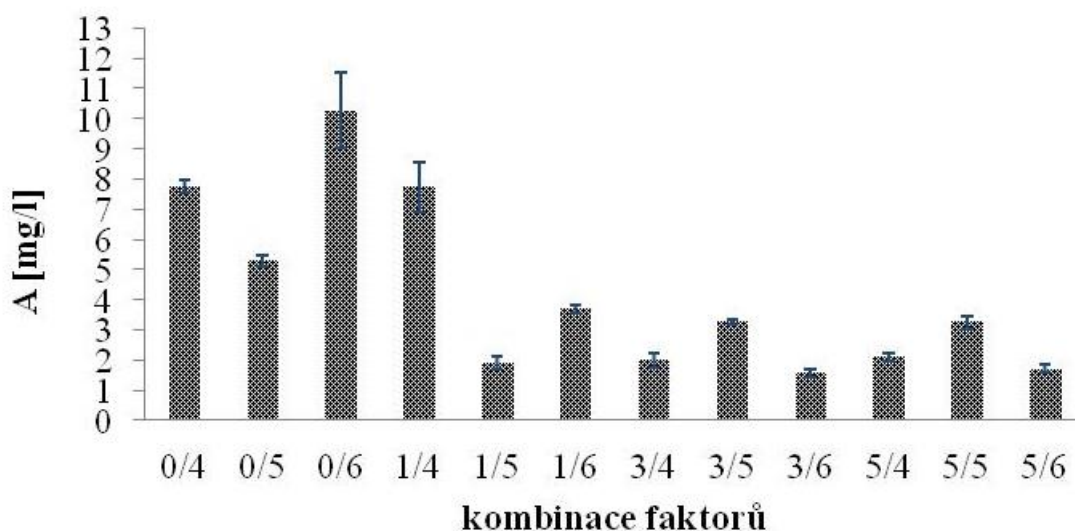
Obecně lze říci, že hodnoty pH měly, stejně jako teplota, vliv na růstové chování, kdy vyšší iniciační pH podpořilo růst kultury. Optimální pH růstu u laktobacilů se pohybuje většinou mezi pH 5,5-6,2 (Ljungh a Wadstöm, 2009, s. 103; Hutkins, 2006, s. 33, Sedláček, 2007, s. 244), kdy je zároveň přirozeně podporována i aktivita dekarboxylázových enzymů. Zároveň je nutné poukázat na schopnost kultury růst a mírně okyselovat prostředí při iniciačním pH 4. Během kultivace při nižší testované teplotě nebyly změny pH tak významné, i nárůst kultury byl výrazně slabější než u teploty 37 °C.

Produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289

V supernatantu po kultivaci *Lb. rhamnosus* bylo možné v průběhu času pozorovat nárůst obsahu tyraminu a putrescinu. Maximální vyprodukovaná množství nepřesáhla ani u jednoho ze jmenovaných biogenních aminů 15 mg/l (bez ohledu na kombinaci úrovní sledovaných faktorů). Vliv na produkci biogenních aminů (zvláště tyraminu, Obr. 15 a 16), stejně jako na růst kultury, měla teplota, kdy nižší teplota způsobila pokles v produkci ($P < 0,05$). U putrescinu nebyly změny v závislosti na teplotě tak výrazné (Obr. 17 a 18).

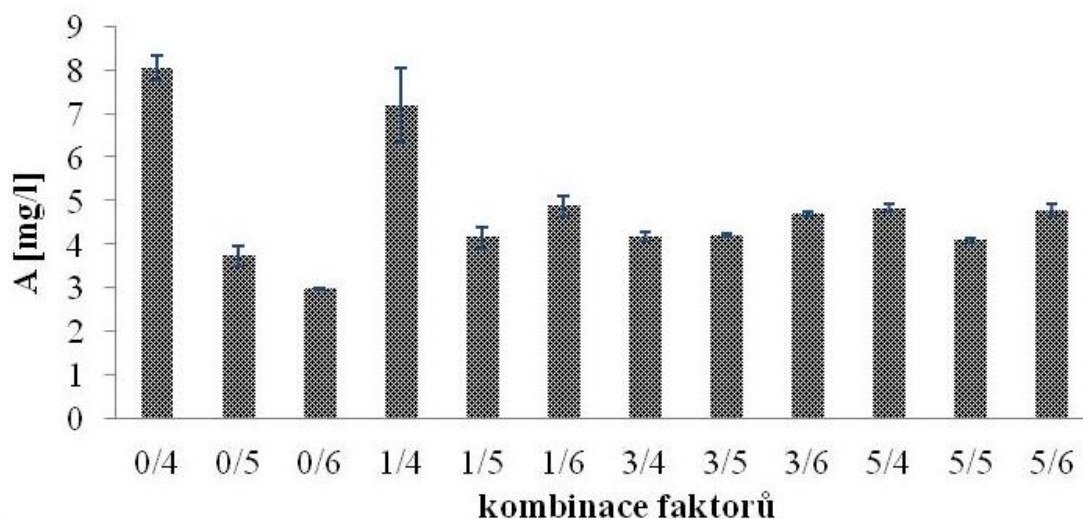


Obr. 15: Maximální produkce (A) tyraminu kmenem *Lb. rhamnosus* CCDM 289 při 37 °C v MRS s přísávkou glycerolu (0-5 %, v/v) a úpravou pH; Např. 5/6...5% přísávek glycerolu (v/v), pH 6



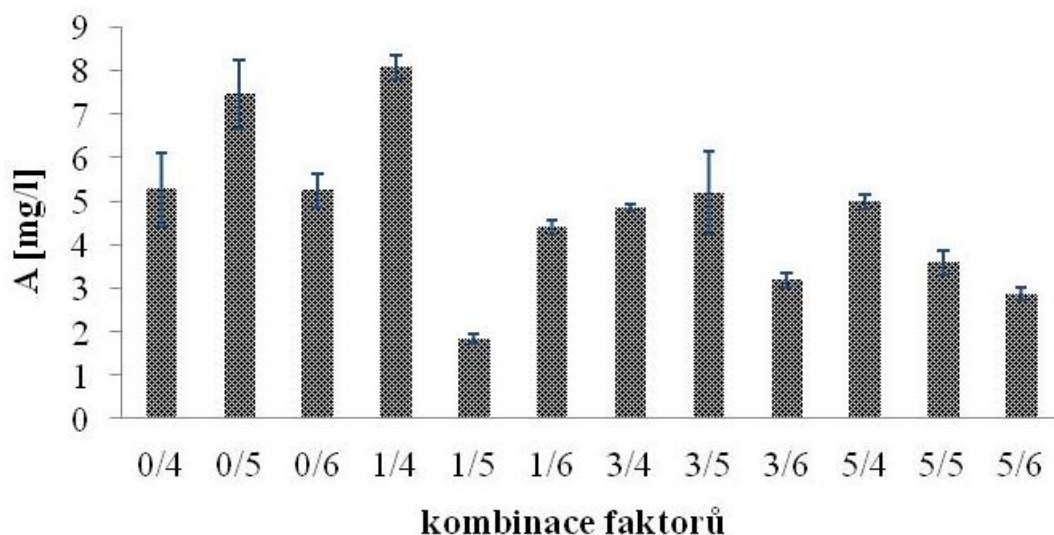
Obr. 16: Maximální produkce (A) tyraminu při 10 °C kmenem *Lb. rhamnosus* CCDM 289 v MRS s přísávkou glycerolu a úpravou pH; Např. 5/6...5% přísávek glycerolu (v/v), pH 6

S přidavky glycerolu při 37 °C byl kmen *Lb. rhamnosus* schopen tvořit více tyraminu (Obr. 15), ale méně produkoval putrescin (Obr. 17). Celkovou produkci tyraminu podpořilo nejčastěji pH 5 a pH 6 ($P < 0,05$; Obr. 14), nejvyšší vyprodukované množství ale bylo detekováno v médiu s iniciačním pH 4 (5% (v/v) přidavek glycerolu, 37 °C, produkce $12,0 \pm 0,3$ mg/l). Putrescin byl v médiu produkován do maximální výše $8,0 \pm 0,3$ mg/l ($t = 37$ °C, bez přidavku glycerolu, pH 4; Obr. 17). U tvorby putrescinu nelze hovořit o jednoznačném trendu v rámci působení iniciačních pH. Velmi často ale byla produkce putrescinu podpořena při nejnižším zkoušeném pH ($P < 0,05$). Zřejmě se jednalo o obranu před acidifikací buňky. Tuto teorii uvedl ve své studii Molenaar et al. (1993, s. 2864–2870). Z grafu vývoje pH kultivačního prostředí (Příloha B, Obr. B5) je totiž patrné, že se u většiny vzorků s iniciační hodnotou pH 4 hodnota pH prostředí dále snižovala, což i přes probiotickou charakteristiku tohoto mikroorganismu mohlo snížit vitalitu buněk.



Obr. 17: Maximální produkce putrescinu (A) kmenem *Lb. rhamnosus* CCDM 289 při 37 °C v MRS s přidavky glycerolu a úpravou pH; Např. 5/6...5% přidavek glycerolu (v/v), pH 6

Bez ohledu na teplotu kultivace byla doba lag fáze tvorby tyraminu nejdelší při pH 4 ($P < 0,05$; Příloha C, Tab. C5), i když při stejném pH byla detekována nejvyšší produkce. Délka lag fáze produkce putrescinu při vyšší zkoušené teplotě se zkracovala přidavkem glycerolu. Bez přidavků glycerolu dosahovala téměř 30 hodin (pH=4, 0% (v/v) koncentrace glycerolu), zatímco např. v prostředí s 3 % (v/v) glycerolu netrvala ani 0,1 h (Příloha C, Tab. C6). Rychlost produkce tyraminu byla nejvíce podpořena přidavkem 1 a 3 % (v/v) glycerolu v médiích s iniciačním pH 5 a 6 ($P < 0,05$) při obou testovaných teplotách (Příloha C, Obr. C1 a C2).



Obr. 18: Maximální produkce putrescinu (A) při 10 °C kmenem *Lb. rhamnosus* CCDM 289 v MRS s přísadkou glycerolu a úpravou pH; Např. 5/6...5% přísadka glycerolu (v/v), pH 6

Při nižších teplotách testování by bylo velmi obtížné objektivně parametry růstových křivek putrescinu (rychlost a lag fáze produkce) vyhodnotit, jelikož významnější produkce začínala až devátý den kultivace a poté prudce rostla. Ani produkce jednou buňkou tedy nebyla pro putrescin vypočtena (absence YF₁₀ v Tab. 8).

Množství tyraminu vyprodukované jednou buňkou bylo vyšší při 10 °C za všech testovaných kombinací faktorů. I když teplota 10 °C inhibovala růst kultury (snižovala počet CFU/ml), koncentrace vyprodukovaného tyraminu, připadající na jednu kolonii tvořící jednotku, nebyly výrazně ovlivněny ($P \geq 0,05$).

Nejvyšší koncentrace tyraminu vyprodukovaná jednou buňkou byla detekována v médiu s pH 4 a 5% (v/v) koncentrací glycerolu při obou testovaných teplotách. Při 37 °C byla v daném médiu zaznamenána také nejvyšší produkce putrescinu (Tab. 8). Nejnižší množství tyraminu vytvořené jednou buňkou (YF₃₇) kultury bylo zaznamenáno v supernatantu s iniciačním pH 6 (bez ohledu na koncentraci glycerolu) po kultivaci při 37°C. Jak již bylo uvedeno výše v textu, pH 5,5-6,0 je optimální pro rozvoj laktobacilů. Došlo tedy k intenzivnímu množení kultury na úkor produkce biogenních aminů. U polyaminu putrescinu bylo možné pozorovat stejný trend (Tab. 8). Putrescin by se dal do jisté míry chápat jako prekurzor pro tvorbu dalších polyaminů (Ancín-Azpilicueta et al., 2008, s. 258), které se účastní syntézy DNA a RNA, sperminu a spermidinu (Linsalata a Ruso, 2008, s. 383 a 384). Jeho přítomnost tedy nemusela pouze spočívat v obraně před acidifikací buňky, ale mohla

představovat „meziprodukt“, nedokončenou přeměnu ve vyšší polyaminy, které mají význam pro rychle rostoucí buňky.

Tab. 8: Množství tyraminu (TYR) a putrescinu (PUT) vyprodukované jednou buňkou kmene *Lb. rhamnosus* CCDM 289 při 10 a 37 °C

kombinace faktorů*	TYR [mg/CFU]		PUT [mg/CFU]
	YF ₁₀	YF ₃₇	YF ₃₇
0/4	$2,7 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$3,2 \cdot 10^{-6}$
1/4	$3,8 \cdot 10^{-5}$	$5,9 \cdot 10^{-6}$	$1,7 \cdot 10^{-6}$
3/4	$2,9 \cdot 10^{-5}$	$6,5 \cdot 10^{-6}$	$1,3 \cdot 10^{-6}$
5/4	$9,8 \cdot 10^{-4}$	$1,9 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$
0/5	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^{-6}$
1/5	$7,2 \cdot 10^{-5}$	$3,1 \cdot 10^{-6}$	$3,1 \cdot 10^{-6}$
3/5	$9,8 \cdot 10^{-5}$	$2,4 \cdot 10^{-6}$	$5,4 \cdot 10^{-7}$
5/5	$8,8 \cdot 10^{-5}$	$2,6 \cdot 10^{-6}$	$2,1 \cdot 10^{-6}$
0/6	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$7,3 \cdot 10^{-7}$	$5,8 \cdot 10^{-7}$
1/6	$2,4 \cdot 10^{-5}$	$3,3 \cdot 10^{-7}$	$1,9 \cdot 10^{-6}$
3/6	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$3,6 \cdot 10^{-7}$	$1,9 \cdot 10^{-6}$
5/6	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$1,9 \cdot 10^{-7}$	$1,1 \cdot 10^{-7}$

* YF₁₀ yield faktor při 10 °C, YF₃₇ yield faktor při 37 °C; kombinace faktorů 0-5 % (v/v) glycerolu a pH 4-6; př. 3/6... 3% přídavek glycerolu, pH 6

Dále byly v médiích detekovány nízké nebo kolísavé hodnoty sperminu, které se pohybovaly kolem 1-10 mg/l média (data nejsou uvedena). Z těchto důvodů zde nebylo možné vyvodit jednoznačný závěr o kinetice produkce. Jak již bylo uvedeno v kapitole 1.2, polyaminy jsou nepostradatelné pro buněčný růst a kultury je využívají při syntézách DNA a RNA (Moat, Foster a Spector, 2002, s. 510). Možná právě z důvodů nárůstu kultury v médiu, který nebyl za testovaných podmínek markantní, byl detekován spíše putrescin a ne jeho metabolit spermin.

Na základě relativně nízké produkce biogenních aminů za podmínek *in vitro* lze konstatovat, že testovaný kmen *Lb. rhamnosus* nelze označit za kmen představující riziko pro spotřebitele, co se týče fyziologického významu vyprodukovaného množství biogenních aminů, které je schopen za testovaných podmínek uvolnit do kultivačního prostředí.

Význam této kultury naopak spočívá v okyselení a toleranci vůči nízkému pH prostředí. Toto pH je pak nevhodné pro růst většiny mikroorganismů, které způsobují alimentární onemocnění (Kneifel a Salmien, 2011, s. 199), nebo jsou, kromě zmíněného, schopny produkce toxikologicky významného množství biogenních aminů, např. zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* (Silla-Santos, 1996, s. 218).

4.2.3 Kinetika produkce biogenních aminů *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69 z procesu výroby piva

Pivo jako takové nevytváří příznivé prostředí pro rozvoj většiny non-startérových a kontaminujících mikroorganismů. Skýtá nízké pH, nízký obsah kyslíku, přítomnost CO₂ a hořkých látek (s prokazatelně antimikrobiálním účinkem), obsah alkoholu a postupně klesající obsah zkvasitelných sacharidů. I přes tyto podmínky je výskyt a rozvoj dekarboxyláza pozitivní kontaminující mikroflóry možný, jak dokládají některé studie (Isquierdo-Pulido et al., 1996; Kalač a Křížek, 2003, s. 126).

Základní startérovou kulturou jsou kvasinky (Kopecká, Matoulková a Němec, 2012, s. 336-337). Ty samy o sobě by také mohly po autolýze poskytovat nutričně bohaté substráty pro rozvoj jiné mikroflóry, která se do piva dostává prostřednictvím surovin nebo z prostředí (Kalač a Křížek, 2003, s. 125).

Zástupci rodů *Lactobacillus* a *Pediococcus* jsou obecně považováni za kontaminanty nejčastěji narušující mikrobiální jakost piva. Tyto mikroorganismy vynikají rezistencí k chmelovým hořkým látkám, a proto jsou schopné růst a množit se v daném prostředí (Kalač a Křížek, 2003, s. 126; Matoulková, Kubizniaková a Sigler, 2012, s. 336 a 337).

Původci biogenních aminů v pivech jsou zvláště laktobacily, které mohou provázet celou výrobu piva a dostávat se i do piva baleného, pokud přežijí nedostatečnou pasteraci piva (Kalač a Křížek, 2003, s. 126; Kalač et al., 2002, s. 434), případně jiné zákroky jako filtraci nebo mikrofiltraci.

V této části dizertační práce bude pozornost věnována *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69 (dále jen *L. brevis*). Kmen izolovaný z procesu výroby piva byl testován za odlišných podmínek, než probiotické kultury (kapitola 4.2.1 a 4.2.2). Nebyly zkoušeny koncentrace soli a laktózy, které z praktického hlediska v prostředí piva nemají význam, ale byl testován přídavek etanolu, jako možného inhibitoru produkce biogenních aminů, a to za podmínek tří kultivačních teplot (5±2, 10±2 a 30±2 °C). Běžná alkoholovitost piva se pohybuje mezi

3-6 % (v/v) (Basařová et al., 2010, s. 561 a 562). Teploty kultivace byly voleny tak, aby se přibližovaly teplotám, kterými pivo v procesu výroby (kvašení a zrání) prochází. Jedná se o teploty fermentace pro některá svrchně kvašená piva (≥ 25 °C), pro spodně kvašené ležáky (≤ 10 °C) a teplotu zrání piva (~ 3 °C) (Basařová et al., 2010, s. 364, s. 369 a s. 382). Nejvyšší zkoušená teplota (30 ± 2 °C) pak byla deklarována dodavatelem kmene jako optimální pro kultivaci daného kmene. Kyselost médií byla nastavena na hodnotu pH 4, které se blíží hodnotě hotového piva (Basařová et al., 2010, s. 665). Toto pH bylo zvoleno také na základě obecného předpokladu, že bude indukována aminogenní aktivita, jako obranný mechanismus proti překyselení (Molenaar et al., 1993, s. 2864–2870) a výsledky tak poskytnou představu o nejvyšších hodnotách maximální produkce, kterou by bylo možné v daném prostředí, při výrobě piva, očekávat.

Růstové chování a vývoj pH kultivačního prostředí *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69

Ani 6% (v/v) přídavek etanolu nezpůsobil při 30 °C totální inhibici růstu (Příloha D, Obr. D2). Výsledky médií s koncentracemi 0, 2 a 3 % (v/v) etanolu se celkovým počtem mikroorganismů takřka nelišily (Příloha D, Obr. D2, $P \geq 0,05$). U pěti a šestiprocentní koncentrace etanolu v dekarboxylačním médiu byl patrný pokles a mírná inhibice růstu, která se projevila prodloužením lag fáze. Tolerance vůči vyšším koncentracím etanolu byla pravděpodobně způsobena tím, že se jedná o izolát z procesu výroby piva, kdy je daný kmen adaptován na přítomnost této jinak inhibiční látky. Tím že jsou laktobacily schopny růstu i při vyšších koncentracích etanolu, ve své podstatě představuje jisté riziko vzniku nežádoucích sensoricky aktivních látek zvláště ve svrchně kvašeném pivu, které mohou vzniknout prostřednictvím jejich fermentačního metabolismu.

Nízké teploty (5 a 10 °C) v kombinaci s etanolem potlačily množení zkoušené kultury na minimum (data nejsou uvedena). V odběrových časech byly sledovány kolísavé počty mikroorganismů, ze kterých ve většině případů (výjma 0 a 2% (v/v) koncentrace etanolu) nemohly být sestaveny růstové křivky, které by vykazovaly trend růstového chování kultury.

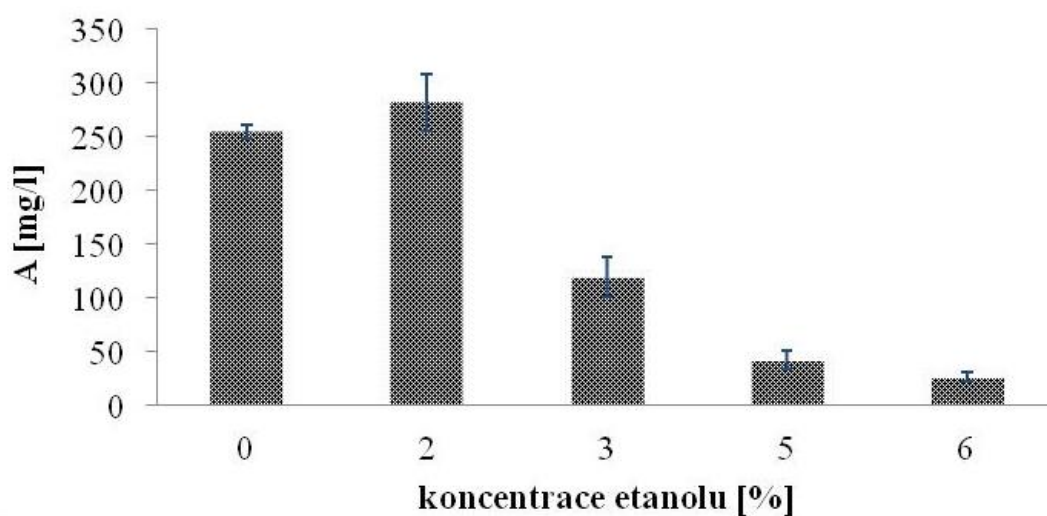
Produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69

Zkoušený kmen byl schopen produkovat *in vitro* detekovatelná množství tyraminu, sperminu, spermidinu a putrescinu. Koncentrace biogenních aminů, s výjimkou tyraminu a sperminu, však ve většině případů nepřesahovala 1 mg/l.

Při teplotách 5 a 10 °C byl produkován hlavně tyramin a spermin (Tab. 9). Nejvyšší detekované koncentrace těchto biogenních aminů však za daných podmínek nepřesáhly 10 mg/l (Příloha D, Tab. D1). U tyraminu byla nejvyšší detekovaná hodnota $2,8 \pm 0,2$ mg/l, pro spermin $8,7 \pm 0,1$ mg/l (5 °C). Rostoucí přídavek etanolu viditelně způsoboval celkovou inhibici tvorby všech biogenních aminů (Tab. 9). Při nejvyšší testované teplotě byla produkce mnohonásobně vyšší.

Nejhojněji produkováným biogenním aminem, u kterého byla vyhodnocena i kinetika, byl tyramin. Pouze pro nejvyšší teplotu bylo možné pomocí Gompertzovy modulace vyhodnotit průběh tvorby tyraminu (Příloha D, Obr. D1). Maximální hodnota tyraminu detekovaná v médiu bez přídavku etanolu byla $254,9 \pm 6,3$ mg/l. Produkci nepotlačila 2% (v/v) koncentrace etanolu, kdy byla maximální hodnota $282,0 \pm 26,5$ mg/l (Obr. 19). Nejvyšší detekovaná koncentrace sperminu byla v supernatantu stanovena při nulové koncentraci etanolu $7,9 \pm 0,1$ mg/l (Tab. 9). Dalo by se konstatovat, že s rostoucí koncentrací etanolu detekované množství tohoto biogenního aminu klesalo.

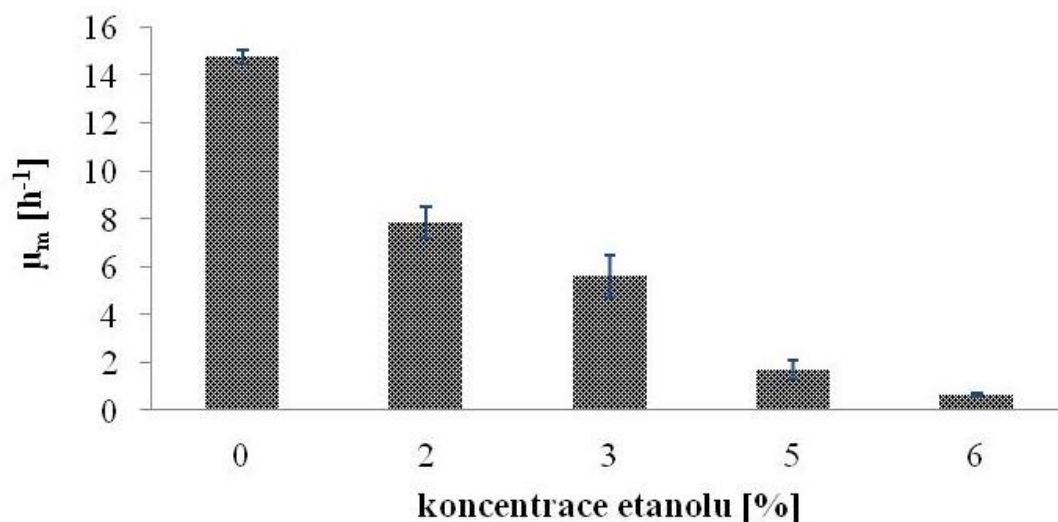
Tyrozindekarboxylázová aktivita byla rovněž potlačována rostoucí koncentrací přidaného alkoholu, bez ohledu na další faktor teplotu (Obr. 19, Tab. 9).



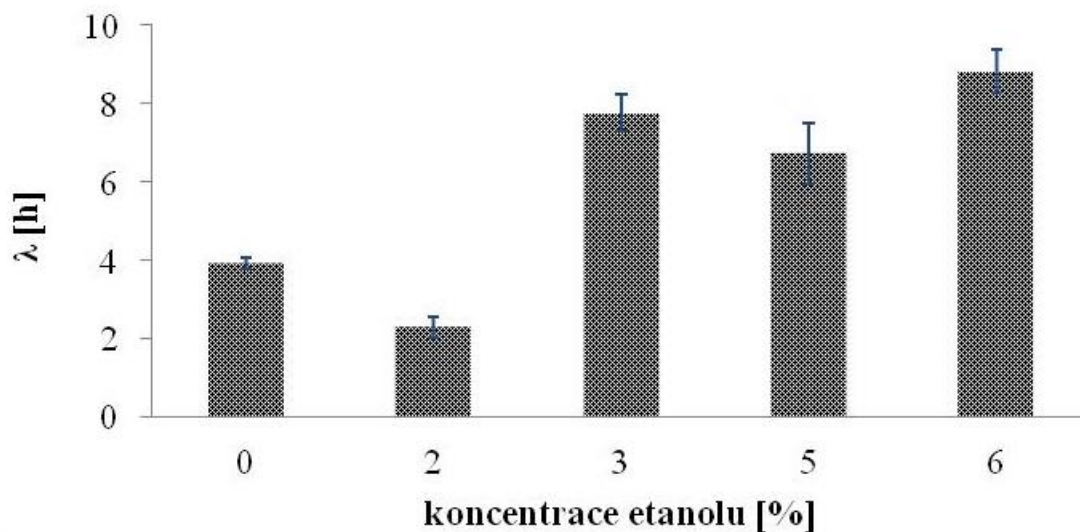
Obr. 19: Maximálně dosažená hodnota (A) produkce tyraminu kmenem *Lb. brevis* RIBM 2-69 při 30 °C po 72 hodinách při testovaných koncentracích etanolu (0-6 %, (v/v))

Rychlost produkce tyraminu klesala s rostoucí koncentrací etanolu (Obr. 20). Stejně tak délka lag fáze byla viditelně ovlivněna přídavkem etanolu (Obr. 21). Lag fáze produkce

tyraminu byla překvapivě kratší při 2% (v/v) přídavku etanolu, než v médiu bez jeho přídavku. Naopak 3% (v/v) koncentrace etanolu způsobila výraznější prodloužení doby lag fáze než 5% (v/v). Obecně lze však konstatovat, že vyšší koncentrace etanolu v růstovém prostředí potlačily viditelně celkovou produkci tyraminu, zpomalily rychlost jeho tvorby a prodloužily délku lag fáze.



Obr. 20: Rychlost produkce tyraminu (μ_m) kmenem *Lb. brevis* RIBM 2-69 při 30 °C po dobu 72 hodin při testovaných koncentracích etanolu (0-6 %, (v/v))



Obr. 21: Délka lag fáze produkce (λ) tyraminu kmenem *Lb. brevis* RIBM 2-69 při 30 °C po dobu 72 hodin při testovaných koncentracích etanolu (0-6 %, (v/v))

Tab. 9: Produkce biogenních aminů *Lb. brevis* RIBM 2-69 ovlivněná testovanými koncentracemi etanolu; průměrné nejvyšší koncentrace v mg/l média

5 °C	etanol* [%]	TYR**	SPM**	PUT**	SPD**
	0	2,1±0,1	4,1±0,2	0,3±0,1	ND
	2	2,8±0,1	8,7±0,3	0,9±0,1	ND
	3	2,5±0,1	4,3±0,3	0,7±0,1	0,5±0,1
	5	1,2±0,1	1,6±0,1	0,8±0,1	0,5±0,1
	6	1,2±0,1	0,8±0,1	0,7±0,1	ND
10 °C	etanol [%]	TYR**	SPM**	PUT**	SPD**
	0	1,5±0,1	1,5±0,2	ND	0,3±0,1
	2	1,7±0,1	1,8±0,1	0,2±0,1	0,4±0,2
	3	1,5±0,1	2,3±0,3	0,6±0,1	0,3±0,1
	5	1,8±0,1	ND	ND	ND
	6	3,5±0,3	0,3±0,1	0,2±0,1	0,4±0,1
30 °C	etanol [%]	TYR**	SPM**	PUT**	SPD**
	0	254,9±6,3	8,0±0,8	0,6±0,1	0,7±0,2
	2	282,4±26,6	3,8±0,9	0,2±0,1	ND
	3	119,4±18,2	4,2±0,6	0,2±0,1	ND
	5	42,5±8,5	2,8±0,6	ND	ND
	6	26,8±4,1	1,9±0,1	0,4±0,2	ND

* koncentrace etanolu % (v/v), **TYR tyramin, SPM spermin, PUT putrescin, SPD spermidin

Produkční faktor (YF) bylo možné vyhodnotit pouze při kultivační teplotě 30°C. Při teplotách 5 a 10 °C bylo sice možné monitorovat změny celkového počtu mikroorganismů, nikoliv však vyhodnotit kinetiku produkce. Produkce biogenních aminů byla příliš nízká (Tab. 9)

Dle získaných výsledků lze tvrdit, že produkční faktor tyraminu při 30 °C, resp. produkce tyraminu jednou buňkou (pro zjednodušení byl přijat předpoklad, že z jedné buňky vyroste jedna CFU), klesala s rostoucí koncentrací etanolu (Tab. 10; $P < 0,05$). Bez přídavku etanolu byla schopna jedna buňka testovaného kmene vyprodukovat $1,0 \cdot 10^{-8}$ mg/CFU tyraminu. Při tříprocentní koncentraci etanolu bylo toto množství takřka poloviční ($4,6 \cdot 10^{-9}$ mg/CFU). Při 6% (v/v) zkoušené koncentraci etanolu byl detekovaný celkový obsah tyraminu i tyraminu vytvořeného jednou buňkou desetkrát nižší, než v supernatantu bez etanolu (Tab. 9 a 10;

P<0,05). Růst kultury nebyl významně potlačen, ale byla snížena produkce tyraminu jednou buňkou.

Tab. 10: Produkce tyraminu jednou buňkou

L. brevis RIBM 2-69 při 30 °C

Koncentrace etanolu [%]	YF ₃₀ [mg/CFU]
0	1,0.10 ⁻⁸
2	8,5.10 ⁻⁹
3	4,6.10 ⁻⁹
5	2,1.10 ⁻⁹
6	1,5.10 ⁻⁹

Výsledky tohoto experimentu napovídají, že pokud by bylo pivo vyráběno při nízkých teplotách a při nízkých teplotách skladováno, testovaný kmen, respektive jím vyprodukovaný tyramin, by nemusel nutně představovat pro zdravé jedince významnou hrozbu. Může ale znamenat potenciální riziko pro citlivé a psychofarmaky léčené osoby. Navíc, pokud by daný kmen kontaminoval sladinu, mohlo by následně dojít k významné kumulaci tyraminu a to i při zvyšující se koncentraci etanolu při kvašení mladiny.

Mezi faktory, které by mohly produkci tyraminu významně ovlivnit, nepatří jen etanol, ale náleží zde samozřejmě přítomnost ostatní mikroflóry (hlavně kvasinek), kdy může dojít ke kompetici o prekurzory biogenních aminů. Dále by pak rozvoj mikroflóry a produkci biogenních aminů mohla ovlivnit přítomnost hořkých látek, které kromě sensorické aktivity mají i prokazatelný antimikrobiální účinek a jejich působení spočívá ve změnách propustnosti buněčných stěn bakterií, v úniku látek z cytoplazmy a způsobují následně inhibici respirace, syntézy proteinů, DNA a RNA (Behr a Vogel, 2010, s. 142). Avšak zvláště mezi bakteriemi mléčného kvašení existují rezistentní laktobacily, které jsou adaptovány na přítomnost hořkých kyselin (Behr, Gänzle a Vogel, 2006, s. 6489). Ve studii Behr, Gänzle a Vogel (2006, s. 6483-6492) se autoři věnují právě vysoce rezistentnímu a adaptovanému kmenu na hořké látky *Lb. brevis* TMW 1.465, u kterého bylo navíc zjištěno snížení etanolového stresu právě v souvislosti s přítomností hořkých látek.

4.2.4 Kinetika produkce biogenních aminů *Lactobacillus brevis* T01

Tento subexperiment a subexperiment kapitoly 4.2.5 byl realizován u izolátů laktobacilů z procesu výroby sýrů. Již na základě prvotního skrínungu (Tab. 3) bylo zřejmé, že mají vybrané kmeny potenciál tvorby vysokých množství biogenních aminů *in vitro*. Faktory, které byly u těchto dvou kmenů sledovány, byly totožné (kapitola 4.2.4 a 4.2.5). Bylo testováno pH, teplota, přídavek laktózy a NaCl, kdy byly koncentrace zkoušených faktorů opět voleny na základě technologické praxe:

- pH 5,0±0,2; 6,0±0,2; 7,0±0,2,
- teploty 10±0,2 °C a 30±0,2 °C,
- přídavek laktózy 0,00; 0,25; 0,50; 1,00 % (w/v),
- přídavek NaCl 0,0; 1,0; 2,0 % (w/v).

Zvlášť byla testována kombinace 4,8 % (w/v) laktózy a soli (0,0; 1,0; 2,0 % (w/v)) při pH 6,8, jako pokus o přiblížení se prostředí mléka.

Aktivní kyselost mléka se pohybuje mezi 6,6-6,8, při jeho fermentaci však dochází k poklesu až pod pH 5,0 (Walstra, Wouters a Geurts, 2006, s. 162, s. 562-563). U sýrů se pH po prokysání obecně pohybuje rovněž v podobném rozsahu, pH 4,7-5,0 (Walstra, Wouters a Geurts, 2006, s. 620). Byly tedy zvoleny rozsahy pH, které pokrývají celou tuto oblast.

Teplota výroby mléčně kysaných výrobků při fermentaci mezofilní kulturou může dosahovat 30 °C, přičemž zrání/uskladnění výrobků probíhá při chladírenských teplotách. Sýry pak převážně zrají při nízkých teplotách. Zvýšení teploty v technologiích je uskutečňováno zvláště při inokulaci mikroorganismů a v procesu dohřívání sýrů (Fox, 1999, s. 11 a 12, s. 245). Některé druhy sýrů navíc mohou zrát i v teplých sklepech (např. výroba sýrů s oky v těstě), kdy se používá teplot 20-27 °C (Fox, 1999, s. 541).

Obsah laktózy v mléce se průměrně pohybuje okolo 4,5-5,0 % (w/v), ale při procesu fermentace a zrání mléčných výrobků její obsah logicky klesá (Scrimshaw a Murray, 1988, s. 1099). Průměrný obsah laktózy v jogurtu je 1,9-4,0 % a v sýru eidamského typu 0-1,4 % (w/w) (Scrimshaw a Murray, 1988, s. 1102 a 1103). Obsah soli v mléčných výrobcích a v sýrech má velký rozptyl. Přírodní sýry obvykle obsahují 0,7-4,0 % (w/w) NaCl. Sýry zrající/skladované v solných nálevech mají obsah NaCl ještě vyšší, až 7 % (w/w) (El-Bakry, 2012, s. 2 a 3). Do jogurtů a zakysaných smetan pak NaCl obvykle exogenně přidáván není.

Růstové chování a vývoj pH kultivačního prostředí *Lactobacillus brevis* T01

Nízká kultivační teplota omezovala rozvoj kultury (Příloha E, Obr. E6-E8). V porovnání s 37 °C při všech kombinacích faktorů došlo při 10 °C k poklesu celkového počtu mikroorganismů a viditelnému prodloužení lag fáze ($P < 0,05$; Příloha E, Obr. E6-E8). Největší podpora růstu kultury byla pozorována při pH 6 a 37 °C ($P < 0,05$; Příloha E, Obr. E7B-C). Při 10 °C pak pH 7 ve většině případů podpořilo růst více než pH 6 (Příloha E, Obr. E7E-F a Obr. E8E-F).

Samotný přídavek soli v rozsahu testovaných koncentrací nepůsobil inhibičně. Ani dvouprocentní koncentrace nezapříčinila inhibici růstu při vyšší zkoušené teplotě a všech zkoušených pH (Příloha E, Obr. E6A-E8A). Při 10 °C pak přídavek 1 % (w/v) NaCl rozvoj kultury podpořil. Tento jev bylo možné pozorovat zvláště při pH 5 a 6 ($P < 0,05$; Příloha E, E6A a E7A).

Médium s 0,25% (w/v) koncentrací laktózy (0 % NaCl) podpořilo při 37 °C růst a zkrátilo délku lag fáze (Příloha E, Obr. E6A-E8A). Vyšší přídavky laktózy do kultivačního prostředí pak působily spíše inhibičně, s výjimkou pH 7 (Příloha E, Obr. E6A-E8A). Při kultivační teplotě 10 °C sice vyšší přídavky laktózy způsobily prodloužení doby nutné na přizpůsobení kmene růstovému prostředí, konečný CPM byl však na konci kultivace vyšší při všech testovaných pH (Příloha E, Obr. E6D-8D).

Vliv 1% (w/v) přídavku NaCl v kombinaci s laktózou pak měl při 37 °C zcela opačný trend, než samotný přídavek laktózy při všech testovaných pH. I vyšší koncentrace laktózy ($> 0,25$ % (w/v)) podporovaly při dané teplotě růst kultury, zvyšovaly CPM a zkracovaly dobu lag fáze. Při 10 °C, zvláště při pH 7, byl podpořen rozvoj kultury při kombinovaném přídavku NaCl a laktózy při všech zkoušených koncentracích (laktóza 0,25-1,00 % (w/v); NaCl 1 a 2 %). Při pH 5 a 6 pak opět převažoval podpůrný efekt 0,25% koncentrace laktózy v prostředí s přídavky 1 a 2 % (w/v) NaCl.

V médiu s 4,8% koncentrací laktózy a iniciačním pH $6,8 \pm 0,2$ byl růst kmene mírně potlačován přídavkem soli, což úplně nekoresponduje s předchozími zjištěními, kdy společný přídavek laktózy a NaCl mnohdy růst mikroflóry podpořil. Lze předpokládat, že vyšší koncentrace laktózy vyvolala vzhledem k přítomnosti ostatních rozpustných látek příliš vysoký osmotický tlak, který rozvoji kmene v dekarboxylačním médiu neprospíval (Příloha E, Obr. E15).

Vývoj pH kultivačního prostředí neměl jednoznačný trend při žádné testované koncentraci a kombinaci faktorů (Příloha E, Obr. E9-E11). Tento výsledek byl zřejmě podpořen skutečností, že se jednalo o heterofermentatorní kulturu, která navíc vynikala relativně vysokou produkcí biogenních aminů. Vytvořená množství biogenních aminů byla možným důvodem vyvážení produktů s kyselou reakcí. Kyselost prostředí v médiích s iniciačními pH 5 a 6 se během kultivace při 37 °C významně neměnila (Příloha E, Obr. E9, 10; $P > 0,05$). V některých případech bylo možné pozorovat mírnou alkalizaci prostředí v posledních dvou odběrových časech (24 a 48 h.). V médiích s iniciačním pH 7 došlo ke snížení pH nepřímo, přidavkem laktózy, který logicky fungoval jako prekurzor pro vznik organických kyselin (Příloha E, Obr. E11). Pokles pH však nebyl tak významný, aby bylo dosaženo optimálního pH pro dekarboxylázovou aktivitu (většinou nedošlo k poklesu pod pH 6,8). Kultivace při teplotě 10 °C poskytovala podobné výsledky, kdy se pH měnilo výrazněji až 10. den kultivace (Příloha E, Obr. E12-E14). Iniciační pH 5 a 6 se pak v rámci posledních tří odběrů zvyšovalo, přičemž platilo, že s vyšším přidavkem laktózy byla alkalizace prostředí potlačována. Při počátečním pH 7 nebyla zaznamenána výraznější změna pH při většině testovaných kombinací faktorů. Dalo by se hovořit o mírném okyselení z počátku kultivace, kdy se pH v rámci posledních odběrů opět zvýšilo na zhruba iniciační hodnotu (Příloha E, Obr. E12-E14).

Při monitoringu změn pH média s iniciačním pH napodobujícím aktivní kyselost mléka byly zjištěny podobné závěry (Příloha E, Obr. E16-E17). Při teplotě 37 °C bylo v médiu bez přidavku soli patrné okyselení ihned ze začátku kultivace na pH optimální pro činnost dekarboxyláz. To se v konečném důsledku projevilo i podporou produkce tyraminu. Při teplotě 10 °C byl pokles pH ze začátku kultivace pozvolnější. Po šesti dnech kultivace došlo k opětovnému zvýšení pH, zřejmě díky produkci biogenních aminů či jiných alkalických produktů. Maximální produkce tyraminu pak byla za podmínek 0 % soli pro obě kultivační teploty přibližně stejná.

Produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus brevis* T01

Lactobacillus brevis T01 produkoval hlavně tyramin. Kinetiku produkce tohoto biogenního aminu bylo možné vyhodnotit i při nízké kultivační teplotě (10 °C) na rozdíl od jiných, sledovaných kultur (4.2.1, 4.2.2, 4.2.3). Z grafu (Obr. 22) je zřejmé, že nejvhodnější pH pro tvorbu tyraminu bylo pH 5, kdy byla produkce maximálně podpořena při přidavku laktózy a nižší koncentraci NaCl.

Nejvyšší vytvořené množství dosahovalo $475,0 \pm 15,8$ mg/l (kombinace 1% přídavku laktózy a soli při pH 5, Obr. 22). Iniciační hodnoty aktivních kyselostí dekarboxylačních médií významně ovlivnily celková vyprodukovaná množství. Konečná množství tyraminu v růstovém prostředí se významně lišila, resp. při pH 5 a ostatních iniciačních pH ($P < 0,05$). Nejnižší koncentrace tyraminu byly při teplotě $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ detekovány v médiích s iniciačním pH 7 a poté při pH 6 bez ohledu na koncentrace soli a laktózy (v porovnání s pH 5). Naopak lze konstatovat, že přídavkem laktózy byla při pH 5 produkce tyraminu většinou podpořena ($P < 0,05$). Zmíněný trend ale nebyl jednoznačný. Výjimkou byla 0,5% (w/v) koncentrace laktózy, kdy tento efekt nebyl pozorován. Přídavek soli nezpůsobil inhibici celkové produkce ani při nejvyšších testovaných koncentracích, kdy mohl být, v některých případech, naopak sledován podpurný účinek (kombinace faktorů 0,25% (w/v) přídavek laktózy s 2% (w/v) přídavkem soli v médiu s iniciačním pH 5, Obr. 22). Samostatný přídavek laktózy měl pozitivní vliv na produkci tyraminu i v rámci ostatních pH (v rámci pH 6 a 7; Obr. 22 a 23; $P < 0,05$).

Při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ byla celková produkce tyraminu viditelně podpořena (Obr. 24 a 25). I zde byla nejvyšší vytvořená množství detekována v dekarboxylačních médiích s iniciačním pH 5 ($P > 0,05$). V porovnání s ostatními zkoušenými pH bylo celkové množství tyraminu až pětinasobné (Obr. 25 a 26).

Samostatný přídavek laktózy měl při pH 5 spíše inhibiční účinky na celkovou produkci. Naopak tomu bylo u dekarboxylačního média s iniciačním pH 6 (podpora produkce) nebo u pH 7, kde nedošlo vlivem přídavku laktózy k signifikantním změnám v množství vyprodukovaného tyraminu (Tab. 11; $P > 0,05$).

Tab. 11: Maximální hodnoty produkce tyraminu (mg/l) kmenem *Lb. brevis* T01 při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ovlivněná přídavkem laktózy (% (w/v)) a úpravou pH po 48 hodinách kultivace

Obsah laktózy [%]	Iniciační pH dekarboxylačního média		
	5	6	7
0,00	$507,9 \pm 21,9$	$68,9 \pm 1,1$	$26,1 \pm 0,9$
0,25	$465,9 \pm 47,6$	$87,9 \pm 5,1$	$25,1 \pm 2,0$
0,50	$182,2 \pm 0,3$	$132,4 \pm 0,5$	$27,1 \pm 2,1$
1,00	$34,7 \pm 0,5$	$163,7 \pm 17,3$	$27,7 \pm 2,3$

Důvod podpory tyrozindekarboxylázové aktivity může spočívat opět v pH, kdy při pH 5 nebylo nutné další okyselení prostředí, aby došlo ke snížení na hodnotu optimální pro činnost enzymu. U vyšších pH pak přídavek laktózy představoval prekurzor pro vznik kyselých produktů fermentačního metabolismu a možnost okyselení prostředí vedoucí k zvýšení celkové produkce tyraminu.

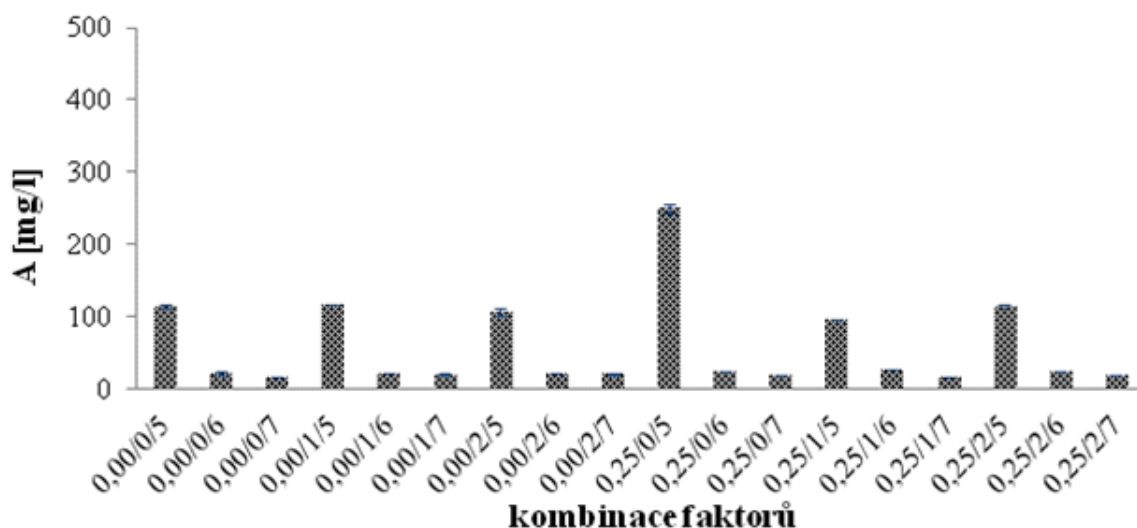
Samotný přídavek NaCl při pH 5 a 7 neměl inhibiční ani podporující účinek na celkovou produkci. Při pH 6 byla však celková produkce tyraminu v médiích s přidavky soli jednoznačně podpořena. Zvláště přídavek 1 % NaCl zvýšil produkci tyraminu na více než dvojnásobné množství (Tab. 12). Jak již bylo nejdříve zmíněno, sodné ionty mohou mít podpurný efekt na činnost enzymů a regulaci intracelulárního pH dekarboxylujících bakterií (Pereira et al., 2009, s. 348).

Tab. 12: Maximální hodnoty produkce tyraminu (mg/l) kmenem *Lb. brevis* T01 při 37 °C ovlivněná přidavkem NaCl (% (w/v)) a úpravou pH po 48 hodinách kultivace

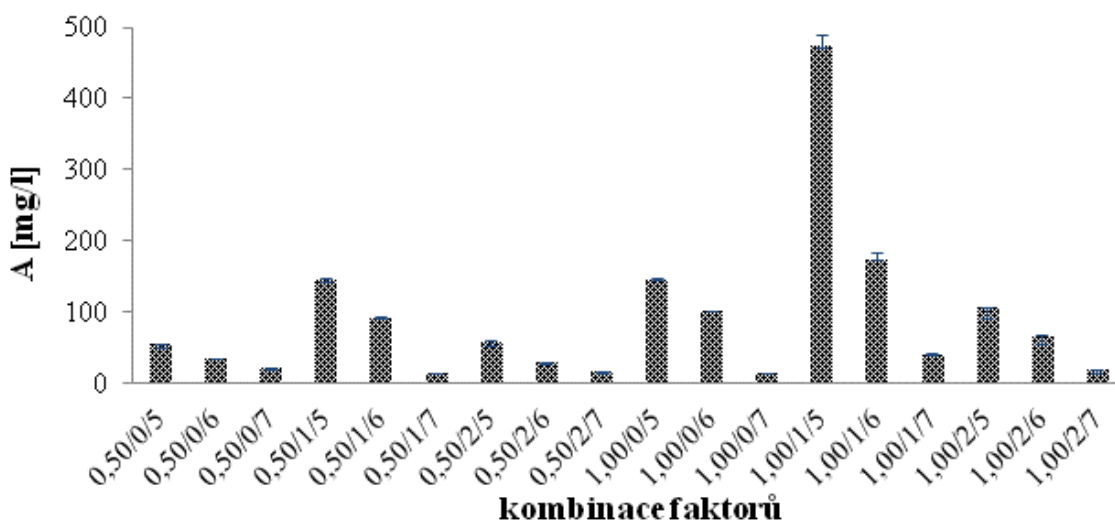
Obsah NaCl [%]	Iniciační pH dekarboxylačního média		
	5	6	7
0,0	507,9±21,9	68,9±1,1	26,1±0,9
1,0	465,9±47,7	171,8±2,9	24,7±0,2
2,0	26,1±0,9	87,9±5,1	25,1±2,0

Významně rozdílné výsledky způsobil při vyšší testované teplotě přídavek laktózy společně s NaCl v různých koncentracích (Obr. 24 a 25). Ve většině případů (v porovnání s nulovými přidavky testovaných faktorů) došlo k podpoře tvorby tyraminu v rámci všech testovaných hodnot iniciačních pH dekarboxylačního média. Při pH 6 byl podpurný efekt společného přídavku nejzřetelnější. Rychlost celkové produkce tyraminu byla výrazně potlačena při teplotě 10 °C ($P < 0,05$). Nejvyšších hodnot rychlosti produkce v rámci nižší testované teploty bylo dosaženo při kombinaci 1/1/5 (1% přídavek soli i NaCl při pH 5). Rychlost celkové produkce při 37 °C byla mnohonásobně vyšší (Příloha E, Obr.E1 a E2). Nejvíce rychlost produkce podpořilo pH 5 ($P < 0,05$). Opačných výsledků bylo dosaženo při pH 7. Při pH 6 bylo pak možné v některých případech sledovat nárůst rychlosti produkce v závislosti na přidavku soli (přídavek 1 a 2 % (w/v) NaCl do média bez laktózy nebo s nižšími koncentracemi laktózy $\leq 0,5$ % (w/v)). Výsledky rychlosti celkové produkce

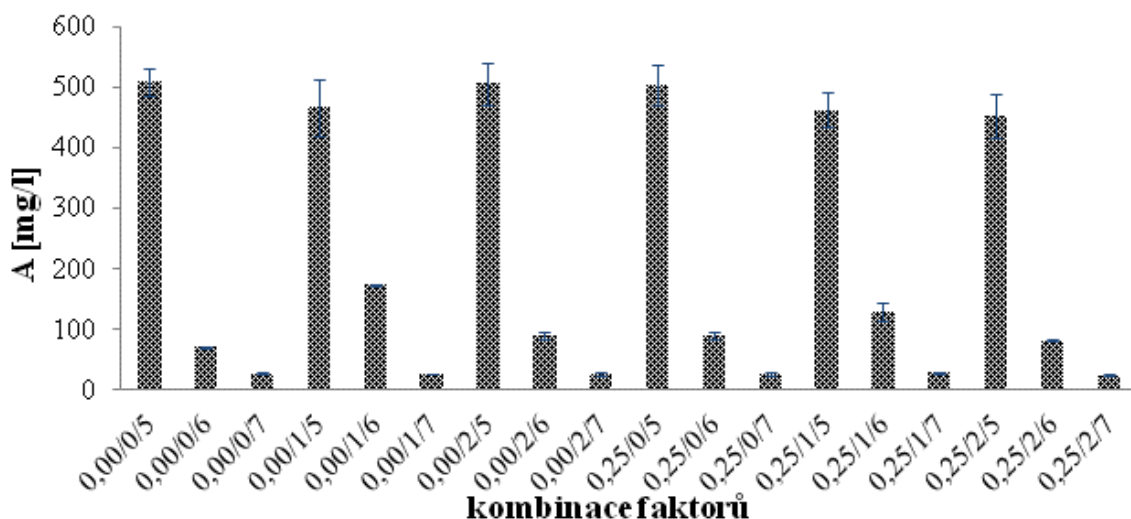
souhlasí s maximálním konečným vyprodukovaným množstvím a zkrácením/prodloužením délky lag fáze tvorby tyraminu (Příloha E, Obr. E1-4). V dekarboxylačních médiích při kultivační teplotě 10 °C a pH 7 byla délka lag fáze produkce tyraminu nejkratší (Příloha E, Obr. E3). Maximální celková vyprodukovaná množství však nebyla vysoká, přesněji patřila k nejnižším (Obr. 23 a 24). Při pH 6 byla situace podobná. Při 37 °C by mohl být konstatován obdobný trend zkrácení doby lag fáze. S rostoucí koncentrací laktózy pak při pH 5 a 6 její délka rostla (Obr. 25-26).



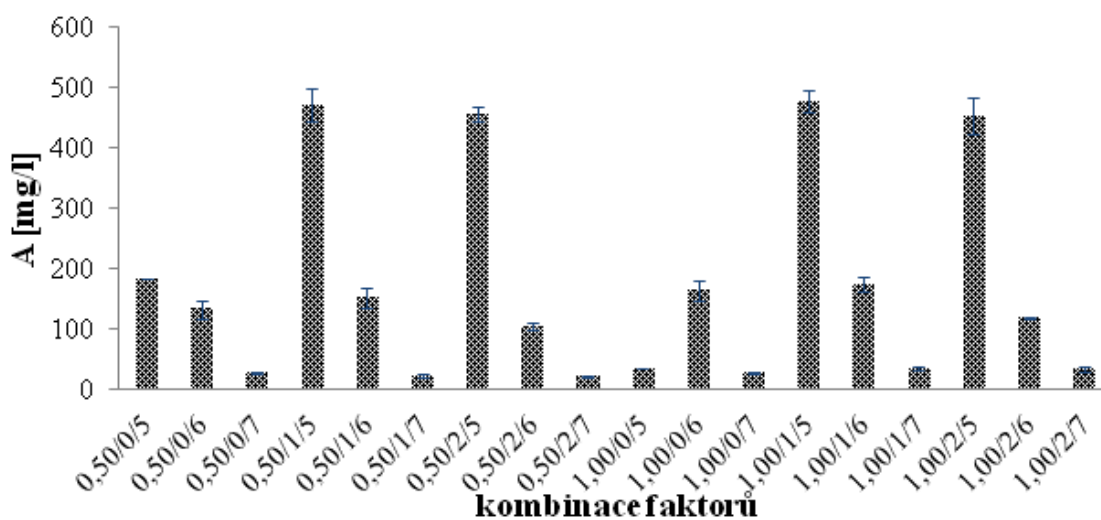
Obr. 22: Maximálně dosažená hodnota produkce (A) tyraminu kmenem *Lb. brevis* T01 při 10 °C při různých koncentracích laktózy 0,00 a 0,25 % (w/v), 0-2 % NaCl (w/v) a hodnotách pH 5-7 po 15-ti dnech kultivace; př. 0,25/1/6...0,25 % laktózy (w/v), 1 % NaCl (w/v), pH 6



Obr. 23: Maximálně dosažená hodnota produkce (A) tyraminu kmenem *Lb. brevis* T01 při 10 °C při různých koncentracích laktózy 0,50 a 1,00 % (w/v), 0-2 % NaCl (w/v) a hodnotách pH 5-7 po 15-ti dnech kultivace; př. 0,25/1/6...0,25 % laktózy (w/v), 1 % NaCl (w/v), pH 6



Obr. 24: Maximálně dosažená hodnota produkce (A) tyraminu *Lb. brevis* T01 při 37 °C při různých koncentracích laktózy 0,00 a 0,25 % (w/v), 0-2 % NaCl (w/v) a hodnotách pH 5-7 po 48 hodinách kultivace; 0,25/1/6...0,25 % laktózy (w/v), 1 % NaCl (w/v), pH 6

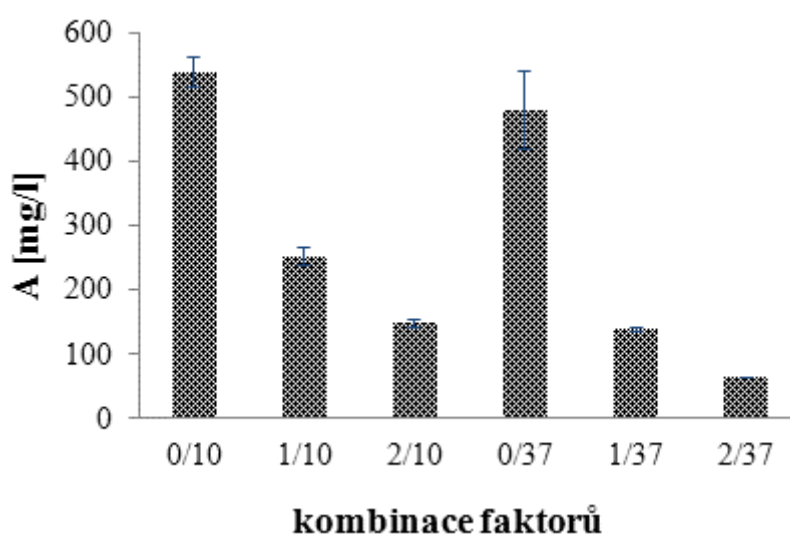


Obr. 25: Maximálně dosažená hodnota produkce (A) tyraminu kmenem *Lb. brevis* T01 při 37 °C při různých koncentracích laktózy 0,50 a 1,00 % (w/v), 0-2 % NaCl (w/v) a hodnotách pH 5-7 po 48 hodinách kultivace; 0,50/1/6...0,50 % laktózy (w/v), 1 % NaCl (w/v), pH 6

Kromě výše zmíněného, byly dále faktory zkušeny v konkrétních koncentracích, které by měly, za podmínek *in vitro*, imitovat koncentrace laktózy a hodnoty pH nezfermentovaného mléka (obsah laktózy 4,8 % (w/v), pH 6,6-6,8). Opět byla celková produkce sledována při dvou různých kultivačních teplotách. Při obou teplotách byl jasně viditelný inhibiční účinek koncentrací soli. Ke stejnému jevu však nedošlo v médiích bez přídavku laktózy (Obr. 22-25). Důvodem byl nejspíš vysoký osmotický tlak na buňku způsobený rozpuštěnými látkami

(laktózou a soli). Nízká teplota pak při vysoké koncentraci laktózy prakticky neovlivnila maximální hodnotu vytvořeného tyraminu (Obr. 26). Samotná kombinace pH 6,8 s 4,8 % (w/v) koncentrací laktózy zvýšila konečné množství tyraminu při 10 °C po 15 dnech kultivace (Obr. 22 a 23, Obr. 26). Při teplotě 37 °C nebyl podpůrný účinek laktózy v porovnání s nižšími koncentracemi patrný (Obr. 24-26). Přídavek laktózy však nezpůsobil ani potlačení celkové produkce tyraminu.

Rychlost celkové produkce a délka lag fáze (Příloha E, Obr. E4) se v závislosti na kultivačních teplotách výrazně lišily ($P < 0,05$). Délka lag fáze produkce tyraminu byla při 10 °C viditelně delší. Při této teplotě přídavek soli délku lag fáze mírně zkrátil, avšak maximální vyprodukované množství tyraminu nezaznamenalo nárůst.



Obr. 26: Maximálně dosažená hodnota produkce tyraminu (A) kmenem *Lb. brevis* T01 při 4,8% koncentraci laktózy (w/v), 0-2% koncentraci NaCl (w/v), pH 6,8 a teplotách 10 a 37 °C; př. 0/10...0 % NaCl (w/v), 10 °C

Rychlost produkce tyraminu při nižší teplotě v médiu s přísadkou NaCl nebyla také výrazněji podpořena (Příloha E, Obr. E4).

Kromě celkového vyprodukovaného množství byla také stanovena produkce tyraminu jednou buňkou testovaného kmene *Lb. brevis* T01 (Tab. 13 a 14).

Nejvyšší vyprodukované množství tyraminu jednou buňkou (při obou testovaných teplotách) bylo detekováno v supernatantech s iniciačními pH 5 a pH 6. Nejméně produkci tyraminu jednou buňkou podporovalo pH 7 (Tab. 13 a 14). Při dvou různých teplotách však byly pozorovány mírné rozdíly v produkci v rámci testovaných hodnot pH, soli a laktózy.

V médiích s iniciačním pH 5 při 10 °C byly nejvyšší hodnoty detekovány ve vzorcích bez přídavku NaCl (Tab. 13). Při teplotě 37 °C za daného pH pak koncentrace soli neměla pravděpodobně inhibiční účinky na produkci tyraminu jednou buňkou, ale i tak bylo nejvyšší množství detekováno v médiu s 0 % NaCl a 0,50 % laktózy (Tab. 14). V supernatantech s iniciačním pH 6 po kultivaci kmene při 37 °C opět nejvyšší výtěžky vykazovaly vzorky bez přídavku NaCl (Tab. 14). Při nižší testované teplotě tomu však bylo naopak (Tab. 13), kdy vyšší výtěžky tyraminu poskytovala média s 1 % NaCl. Obdobný jev bylo možné sledovat v případě média, které mělo rozsahem testovaných faktorů imitovat prostředí mléka.

Nejvyšší koncentrace byla sledována v médiu s 1% (w/v) přídavkem NaCl (Tab. 13). Při 37 °C však tento trend nemohl být zcela potvrzen. Nejvyšší zkoušená koncentrace NaCl mírně produkci tyraminu jednou buňkou snížila.

Velmi zajímavým zjištěním je, že nižší teplota nezpůsobila razantní pokles produkce tyraminu jednou buňkou *Lb. brevis* T01 (Tab. 13 a Tab. 14). Celkově nejvyšší koncentrace tyraminu byl kmen schopen vytvořit v médiích, která obsahovala 4,8% (w/v) koncentraci laktózy při pH 6,8. Tato kombinace faktorů působila na produkci tyraminu jednou buňkou nejpriznivěji při obou testovaných teplotách (Tab. 13 a 14). Důvodem bude zřejmě již několikrát zmíněný vliv příznivého průběhu okyselení média zkvašováním většího množství laktózy. I když se produkce jednou buňkou od celkové produkce tyraminu lišila, společnými rysy je jednoznačně vliv nízké hodnoty iniciačního pH 5, která růst daného kmene nepodporovala a v konečném důsledku podpořila produkci tyraminu jednou buňkou zkoušeného kmene.

Tab. 13: Produkce tyraminu (mg/CFU) jednou buňkou kmene *Lb. brevis* T01 při 10 °C (YF₁₀) při různých koncentracích laktózy a soli v růstovém prostředí

faktory	YF ₁₀ [mg/CFU]	faktory	YF ₁₀ [mg/CFU]	faktory	YF ₁₀ [mg/CFU]
0,00/0/5	4,9.10 ⁻⁸	0,00/0/6	7,5.10 ⁻⁸	0,00/0/7	3,2.10 ⁻⁸
0,00/1/5	4,3.10 ⁻⁸	0,00/1/6	5,4.10 ⁻⁸	0,00/1/7	2,1.10 ⁻⁸
0,00/2/5	4,6.10 ⁻⁸	0,00/2/6	2,3.10 ⁻⁸	0,00/2/7	1,1.10 ⁻⁸
0,25/0/5	1,2.10 ⁻⁷	0,25/0/6	8,1.10 ⁻⁸	0,25/0/7	3,9.10 ⁻⁸
0,25/1/5	4,9.10 ⁻⁸	0,25/1/6	8,6.10 ⁻⁸	0,25/1/7	1,3.10 ⁻⁸
0,25/2/5	4,2.10 ⁻⁸	0,25/2/6	1,5.10 ⁻⁸	0,25/2/7	7,5.10 ⁻⁹
0,50/0/5	1,7.10 ⁻⁷	0,50/0/6	7,7.10 ⁻⁸	0,50/0/7	2,0.10 ⁻⁸
0,50/1/5	3,7.10 ⁻⁸	0,50/1/6	1,6.10 ⁻⁷	0,50/1/7	9,4.10 ⁻⁹
0,50/2/5	3,4.10 ⁻⁸	0,50/2/6	3,4.10 ⁻⁸	0,50/2/7	8,7.10 ⁻⁹
1,00/0/5	1,2.10 ⁻⁷	1,00/0/6	2,2.10 ⁻⁸	1,00/0/7	1,8.10 ⁻⁸
1,00/1/5	8,3.10 ⁻⁸	1,00/1/6	3,9.10 ⁻⁸	1,00/1/7	3,2.10 ⁻⁸
1,00/2/5	5,2.10 ⁻⁸	1,00/2/6	8,1.10 ⁻⁹	1,00/2/7	2,4.10 ⁻⁸
4,80/0/6,8	3,3.10 ⁻⁵	4,80/1/6,8	1,2.10 ⁻⁴	4,80/2/6,8	2,4.10 ⁻⁵

Př. 0,00/0/5...0 % laktózy, 0 % NaCl, pH 5; platí i pro následující tabulky (Tab. 14-15)

Tab. 14: Produkce tyraminu (mg/CFU) jednou buňkou kmene *Lb. brevis* T01 při 37 °C (YF₃₇) při různých koncentracích laktózy a soli v růstovém prostředí

faktory	YF ₃₇ [mg/CFU]	faktory	YF ₃₇ [mg/CFU]	faktory	YF ₃₇ [mg/CFU]
0,00/0/5	1,5.10 ⁻⁷	0,00/0/6	5,6.10 ⁻⁸	0,00/0/7	1,3.10 ⁻⁸
0,00/1/5	4,9.10 ⁻⁸	0,00/1/6	1,4.10 ⁻⁸	0,00/1/7	1,3.10 ⁻⁸
0,00/2/5	7,1.10 ⁻⁸	0,00/2/6	2,2.10 ⁻⁸	0,00/2/7	1,2.10 ⁻⁸
0,25/0/5	9,3.10 ⁻⁸	0,25/0/6	1,6.10 ⁻⁸	0,25/0/7	4,4.10 ⁻⁸
0,25/1/5	1,6.10 ⁻⁷	0,25/1/6	3,6.10 ⁻⁸	0,25/1/7	1,5.10 ⁻⁸
0,25/2/5	4,9.10 ⁻⁸	0,25/2/6	1,4.10 ⁻⁸	0,25/2/7	1,3.10 ⁻⁸
0,50/0/5	1,1.10 ⁻⁷	0,50/0/6	9,1.10 ⁻⁸	0,50/0/7	3,4.10 ⁻⁸
0,50/1/5	6,9.10 ⁻⁸	0,50/1/6	2,7.10 ⁻⁸	0,50/1/7	1,9.10 ⁻⁸
0,50/2/5	9,9.10 ⁻⁸	0,50/2/6	3,6.10 ⁻⁸	0,50/2/7	1,4.10 ⁻⁸
1,00/0/5	3,2.10 ⁻⁸	1,00/0/6	1,8.10 ⁻⁷	1,00/0/7	2,3.10 ⁻⁸
1,00/1/5	8,3.10 ⁻⁸	1,00/1/6	3,9.10 ⁻⁸	1,00/1/7	3,2.10 ⁻⁸
1,00/2/5	5,2.10 ⁻⁸	1,00/2/6	1,1.10 ⁻⁷	1,00/2/7	2,4.10 ⁻⁸
4,80/0/6,8	1,2.10 ⁻⁵	4,80/1/6,8	1,0.10 ⁻⁵	4,80/2/6,8	3,0.10 ⁻⁶

Tab. 15: Produkce sperminu *Lactobacillus brevis* T01 v dekarboxylačním médiu s přídavkem laktózy a soli při 37 °C

faktory	SPN [mg/l]	faktory	SPN [mg/l]	faktory	SPN [mg/l]
0,00/0/5	7,8±1,3	0,00/0/6	13,8±1,6	0,00/0/7	12,1±0,5
0,00/1/5	6,2±0,5	0,00/1/6	15,1±0,7	0,00/1/7	10,4±0,9
0,00/2/5	6,0±0,3	0,00/2/6	18,6±1,1	0,00/2/7	15,9±1,3
0,25/0/5	10,3±0,7	0,25/0/6	18,7±1,1	0,25/0/7	2,3±0,6
0,25/1/5	6,4±0,5	0,25/1/6	9,7±1,4	0,25/1/7	7,1±0,4
0,25/2/5	10,7±0,4	0,25/2/6	15,3±0,4	0,25/2/7	6,4±0,2
0,50/0/5	4,9±0,2	0,50/0/6	8,4±1,3	0,50/0/7	8,1±0,2
0,50/1/5	6,0±0,4	0,50/1/6	16,5±0,4	0,50/1/7	7,1±0,8
0,50/2/5	11,6±0,6	0,50/2/6	13,7±2,3	0,50/2/7	10,1±0,9
1,00/0/5	10,3±0,8	1,00/0/6	19,1±0,9	1,00/0/7	8,7±0,6
1,00/1/5	7,6±0,2	1,00/1/6	6,0±0,9	1,00/1/7	3,7±0,5
1,00/2/5	16,5±2,5	1,00/2/6	13,3±1,1	1,00/2/7	7,3±0,4
4,80/0/6,8	15,4±3,5	4,8/1/6,8	19,1±2,3	4,8/2/6,8	10,2±1,5

Na celkovou produkci tyraminu i na růst kmene měla vliv teplota. Pro produkci tyraminu jednou buňkou to však ve výsledku znamenalo, že se zjištěné hodnoty výrazně nelišily (Obr. 22-25, Tab. 13 a Tab. 14).

Dále byl v supernatantech po kultivaci stanoven spermin (Tab. 15). Produkce tohoto polyaminu neměla jednoznačný trend. Detekované koncentrace měly výrazně kolísavý charakter. Nebylo tedy možné vyhodnotit kinetiku produkce. Navíc vyšší koncentrace bylo možné detekovat jen v supernatantech po kultivaci kmene při teplotě 37 °C. Nízká kultivační teplota způsobila výrazný pokles produkce sperminu (maximální detekovaná většinou dosahovala <10 mg/l, Příloha E, E18). Nejvyšší vyprodukovaná množství sperminu jsou uvedena v tabulce č. 15. Nejvhodnější pro tvorbu tohoto polyaminu bylo pH 6 v porovnání s ostatními iniciačními pH ($P < 0,05$). Nelze jednoznačně konstatovat, že by přídavek NaCl a laktózy měl klíčový vliv na produkci sperminu. Nejvyšší vytvořené množství sperminu nicméně bylo detekováno v médiu bez přídavku soli, s 1% koncentrací laktózy a iniciačním pH 6 (19,1±0,9 mg/l). V médiu s výchozím pH 6,8 a 4,8 % laktózy se maximální vytvořená množství sperminu podobala těm, která byla vytvořena za přídavku laktózy a pH 6 za obou testovaných teplot (Tab. 15). U kolísavých hodnot produkce sperminu nebylo možné vyhodnotit YF při žádné z testovaných teplot.

Kromě tyraminu a sperminu byly v médiích detekovány i jiné biogenní aminy. Jednalo se ale o zanedbatelná množství kadaverinu a histaminu (<1 mg/l), která navíc nebyla detekována ve všech supernatantech a časech odběru.

4.2.5 Kinetika produkce biogenních aminů *Lactobacillus curvatus* T02

Druhým kmenem izolovaným z procesu výroby sýrů eidamského typu, který byl podroben testování vlivu faktorů na dekarboxylázovou aktivitu, byl *Lactobacillus curvatus* T02 (dále jen *Lb. curvatus*). Vybrané izoláty se lišily nejen produkcí biogenních aminů, resp. jejím rozsahem, ale i růstovým chováním v médiích ovlivněných přidavky různých koncentrací sledovaných faktorů a hodnot pH. Rozsah faktorů, kultivačních podmínek i časy odběrů byly pro oba kmeny totožné (4.2.4).

Růstové chování a vývoj pH kultivačního prostředí *Lactobacillus curvatus* T02

Dle růstových křivek lze vyvodit, že na růst testovaného kmene *Lactobacillus curvatus* neměla pouhá úprava pH kultivačního prostředí významnější vliv. Mnohem větší důsledky měla odlišná teplota kultivace a přidavek soli, či jiné kombinace faktorů. O podpoře růstu díky vyšší koncentraci laktózy v prostředí nelze jednoznačně hovořit. Samotný přidavek laktózy podpořil rozvoj mikroflóry zvláště při kultivaci za chladírenských teplot (Příloha F, Obr. F4 D-F; F7 D-F a F10 D-F). Při 37 °C rostla kultura lépe při kombinovaném přidavku laktózy a NaCl (Příloha F, Obr. F4 A-C, F7, A-C, F10 A-C).

Dvouprocentní koncentrace NaCl projevila svůj inhibiční účinek v kombinaci s nízkou teplotou zvláště při pH 5 a pH 6 (Příloha F, Obr. F4). Při pH 7, zřejmě kvůli omezené disociaci soli, nebyl inhibiční účinek pozorován.

Okyselení bylo při nejnižší testované hodnotě pH spíše pozvolné, zatímco iniciační pH 6 a 7 společně s vyššími přidavky laktózy způsobily rapidní pokles hned v prvních deseti hodinách (pro 37 °C; Příloha F, Obr. F7 a F9), nebo po třetím dni kultivace (pro 10°C; Příloha F, Obr. F5 a F8). Buněčné suspenze posledních odběrů, jejichž původní médium obsahovalo 1 % (w/v) laktózy, vykazovaly přibližně shodné hodnoty pH 4,5±0,2. Nulový přidavek laktózy, případně její nejnižší zkoušené množství, 0,25 % (w/v), vyvolalo minimální změny kyselosti růstového prostředí (Příloha F, Obr. F7, F10 a F12). Výše zmíněné jevy probíhaly bez ohledu na různé koncentrace NaCl a měly společný trend vývoje.

Média s koncentrací laktózy 4,8 % (w/v) nezaznamenala stejný průběh okyselujících procesů. Kmen v médiích kultivovaných při 37 °C nesnížil pH tak výrazně, jako u nižší testované teploty.

K alkalizaci došlo zřejmě díky pomnožení dekarboxyláza pozitivní mikroflóry a kumulaci biogenních aminů (Příloha F, Obr. F11).

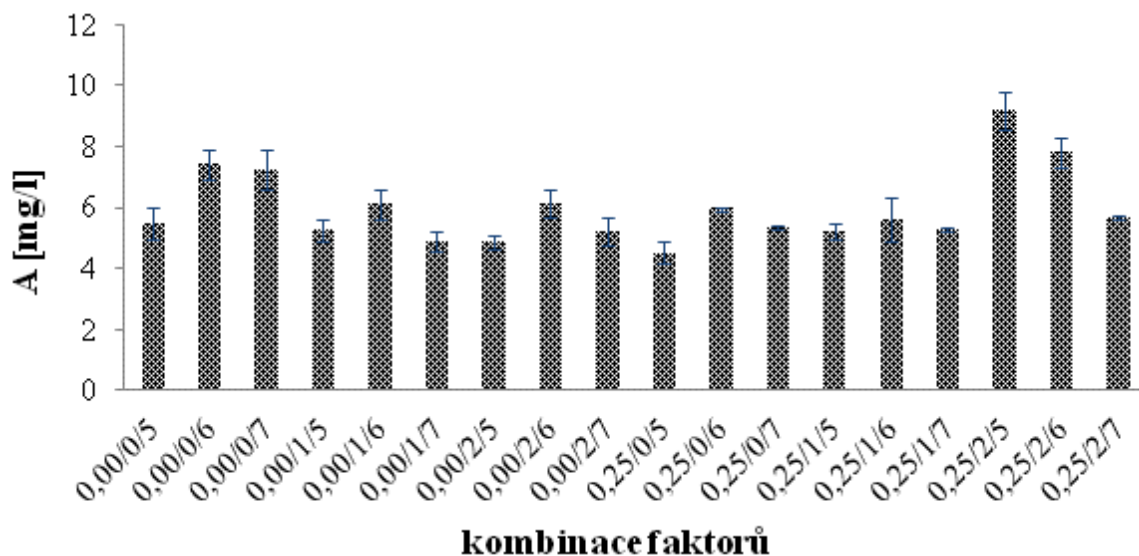
Produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus curvatus* T02

V supernatantech po kultivaci kmene *Lb. curvatus* byl detekován stejný profil biogenních aminů jako v supernatantech kmene *Lb. brevis* T01. Byla prokázána přítomnost tyraminu a sperminu. Ostatní biogenní aminy byly pod mezí detekce. Celková produkce tyraminu kmenem *Lb. curvatus* T02 však, na rozdíl od kmene *Lb. brevis* T01, nedosahovala při žádné ze zkoušených kombinací faktorů (shodné se subexperimentem 4.2.4) ani přibližných hodnot ($P > 0,05$). *Lb. curvatus* byl produkčně slabší. Vykazoval výrazně nižší koncentrace tyraminu, a to i při teplotě 37 °C. Maximální vyprodukované množství tyraminu ve většině případů nepřesáhlo 10 mg/l.

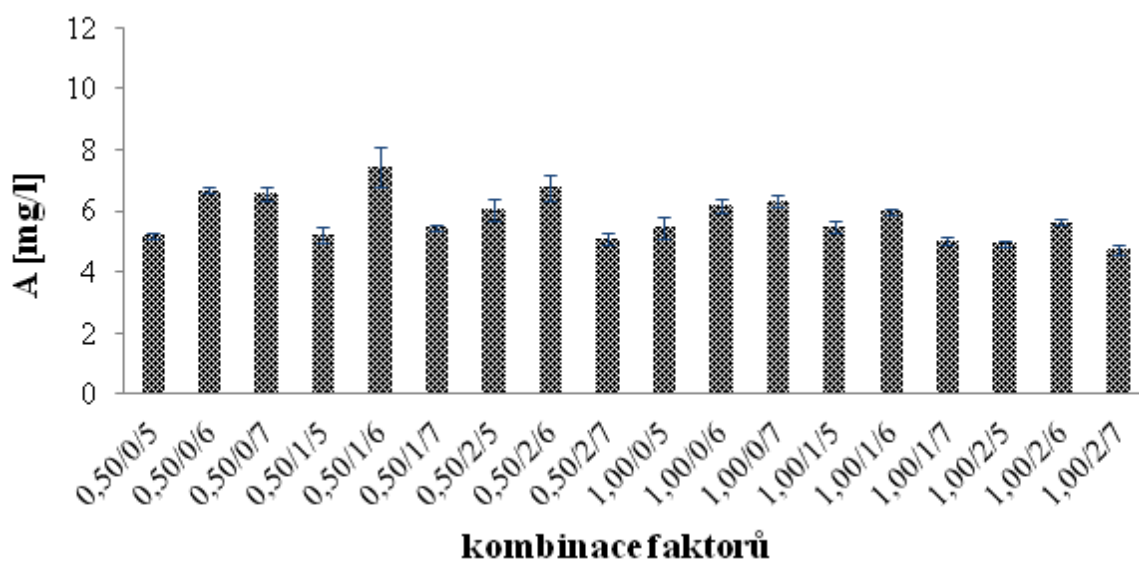
Z Obr. 27 a 28 je možné vypožorovat určité trendy v produkci tyraminu. Nejvyšší celková vyprodukovaná množství byla detekována v médiích s iniciačním pH 6 ($P < 0,05$). Výjimkou byla 0,25% (w/v) koncentrace laktózy s 1% (w/v) přidavkem NaCl, kdy při pH 5 (Obr. 27), v porovnání s ostatními iniciačními hodnotami, došlo k nárůstu celkové produkce tyraminu.

Zřejmě šlo o kombinaci optimálních koncentrací zkvasitelného cukru a sodných iontů, které podpořily tyrozindekarboxylázovou aktivitu při nejnižším zkoušeném pH. Nízký přídavek laktózy nezpůsobil další významnější okyselení růstového prostředí natolik, aby se pH půdy vzdálilo od optimálního pro činnost dekarboxylačních enzymů. Vyšší pH 6 a 7 pak logicky s přidavkem laktózy nesly potenciál vhodného okyselení a podpory dekarboxylázové aktivity.

Rychlost produkce tyraminu korespondovala s maximálními dosaženými hodnotami tyraminu (Příloha F, Obr. F1-F4). Délka lag fáze byla minimální u všech testovaných kombinací faktorů. Žádná kombinace nezpůsobila významnější prodloužení lag fáze, nebo dokonce inhibici (data nejsou uvedena).

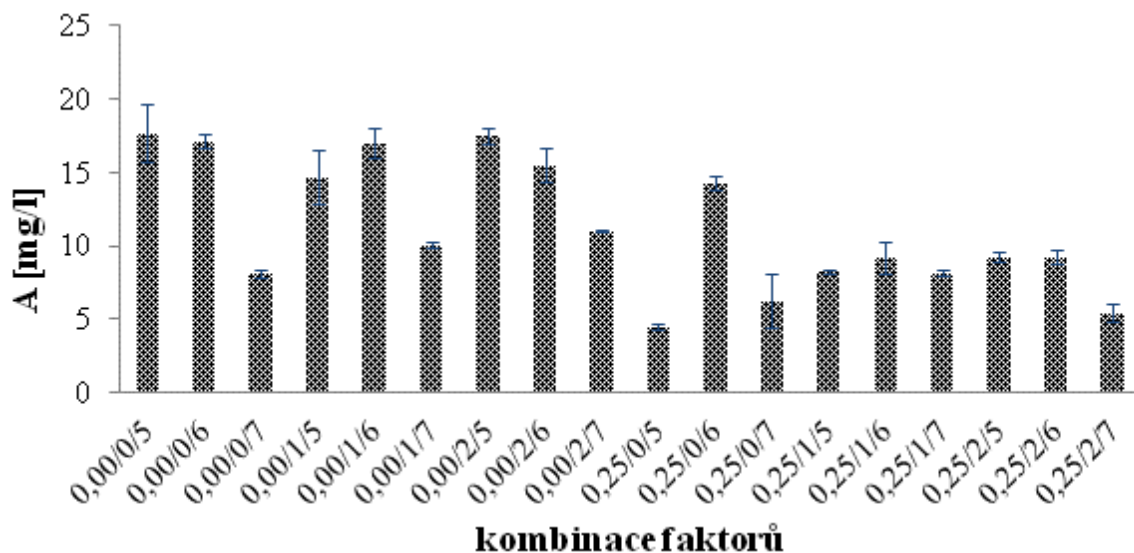


Obr. 27: Maximálně dosažená hodnota produkce (A) tyraminu kmenem *Lb. curvatus* T02 při 37 °C při různých koncentracích laktózy 0,00 a 0,25 % (w/v), 0-2 % (w/v) NaCl a hodnotách pH 5-7 po 48 hodinách kultivace; př. 0,25/1/6...0,25 % (w/v) laktózy, 1 % (w/v) NaCl, pH 6

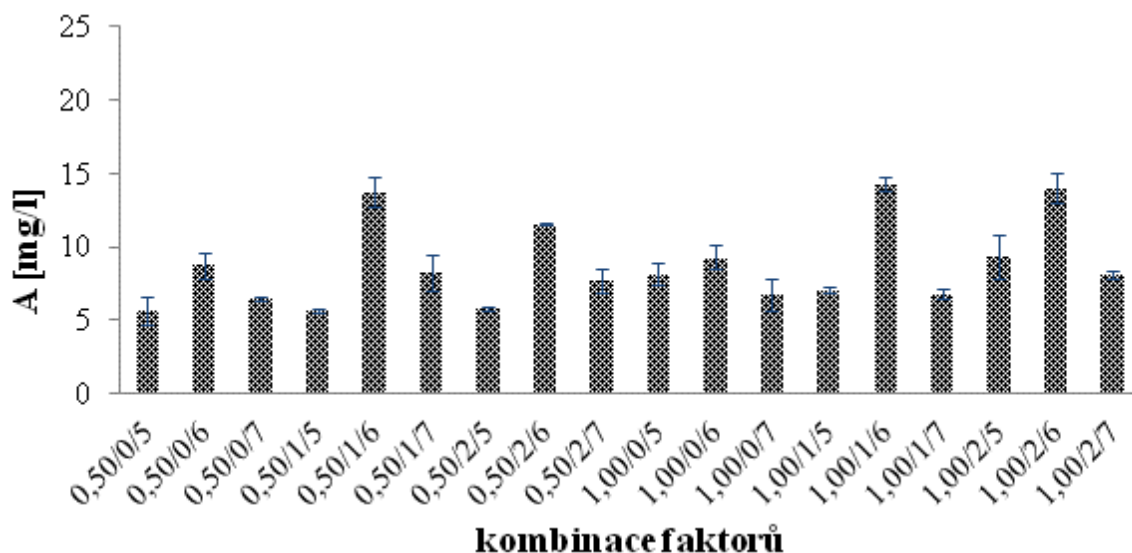


Obr. 28: Maximálně dosažená hodnota produkce (A) tyraminu kmenem *Lb. curvatus* T02 při 37 °C při různých koncentracích laktózy 0,50 a 1,00 % (w/v), 0-2 % (w/v) NaCl a hodnotách pH 5-7 po 48 hodinách kultivace; př. 0,50/1/6...0,50 % (w/v) laktózy, 1 % (w/v) NaCl, pH 6

Při desetistupňové kultivační teplotě byla celková produkce tyraminu překvapivě vyšší, nicméně doba nutná k vytvoření tohoto množství za daných podmínek byla mnohonásobně delší (360 h.). V některých případech koncentrace tyraminu převyšovala 15 mg/l. Jednalo se o média bez přídavku laktózy a soli při iniciačních pH 5 a 6, o média s přídavkem soli 1% (w/v) při pH 5 a 6 a vzorky s 2 % soli (w/v) při pH 6 (Obr. 29).



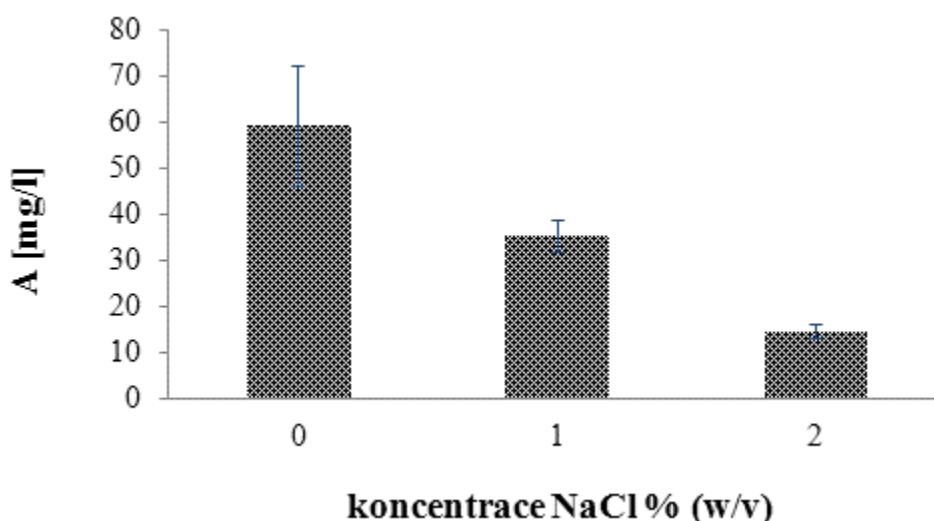
Obr. 29: Maximálně dosažená hodnota produkce (A) tyraminu kmenem *Lb. curvatus* T02 při 10 °C při různých koncentracích laktózy 0,00 a 0,25 % (w/v), 0-2 % (w/v) NaCl a hodnotách pH 5-7 po 48 hodinách kultivace; př. 0,25/1/6...0,25 % (w/v) laktózy, 1 % (w/v) NaCl, pH 6



Obr. 30: Maximálně dosažená hodnota produkce (A) tyraminu kmenem *Lb. curvatus* T02 při 10 °C při různých koncentracích laktózy 0,50 a 1,00 % (w/v), 0-2 % (w/v) NaCl a hodnotách pH 5-7 po 48 hodinách kultivace; př. 0,50/1/6...0,50 % (w/v) laktózy, 1 % (w/v) NaCl, pH 6

Opět je možné pozorovat z grafů (Obr. 29 a 30) největší kumulaci tyraminu v dekarboxylačním médiu s iniciačním pH 6 ($P < 0,05$). Podpora produkce byla zvláště zřetelná v médiích s přidávkou laktózy. Dále bylo možné pozorovat zvýšenou produkci v médiích s iniciačním pH 5 v případě, že nebyla do růstového prostředí přidána laktóza. Ta zde zřejmě opět zafungovala jako prekurzor pro vznik kyselých produktů fermentačního metabolismu a okyselila příliš kultivační prostředí.

Rychlost produkce při 10 °C byla výrazně nižší než při teplotě 37 °C (Příloha F, Obr. F1-F4; $P < 0,05$). Došlo také k prodloužení lag fáze produkce tyraminu v médiích s nulovou koncentrací zkvasitelného cukru. Z výsledků tedy souhrnně vyplývá, že pokud jsou kultury nastaveny přívětivější podmínky pro růst, tak i produkce tyraminu nastává bez významnější doby, nutné na přizpůsobení kultury a plné aktivace jejího enzymového systému.



Obr. 31: Maximálně dosažená hodnota produkce tyraminu *Lb. curvatus* T02 při 37 °C v médiu s iniciačním pH 6,8, s přidávkou 4,8 % (w/v) laktózy a koncentracemi NaCl 0-2%(w/v)

Stejně jako v případě *Lb. brevis* T01 byly testovány i další specifické koncentrace sledovaných faktorů (4,8% (w/v) přidavek laktózy, pH 6,8 a přidavky NaCl 0-2 % (w/v)). Kinetiku celkové produkce tyraminu bylo možné vyhodnotit pouze pro vyšší testovanou teplotu (Obr. 31).

Při 10 °C pak nejvyšší vyprodukovaná množství na konci kultivace (15. den) dosahovala bez přidavku NaCl $5,4 \pm 1,2$ mg/l, při 1% koncentraci $6,7 \pm 0,3$ mg/l a při 2% přidavku $1,9 \pm 0,2$ mg/l.

Jak je patrné z Obr. 31, produkce tyraminu byla při vyšší testované teplotě potlačena přidavkem NaCl, kdy 2% (w/v) koncentrace způsobila až trojnásobný pokles v produkci (z $58,9 \pm 12,9$ na $14,6 \pm 1,6$ mg/l). Nejen maximální dosažená hodnota tyraminu, ale i rychlost produkce, byla potlačena přidavky soli do kultivačního prostředí (Příloha F, Obr. F5). Délka lag fáze však byla kratší v případě 1% koncentrace soli (Příloha F, Obr. F5).

Na základě výsledků (Tab. 16 a 17) se zdá, že teplota kultivace produkci tyraminu jednou buňkou výrazně neovlivňovala. Výjimkou byly výsledky médií s iniciačním pH 7, kdy při 10 °C byla produkce tyraminu v médiích bez přidavku laktózy viditelně vyšší, než při teplotě 37 °C (Tab. 17). Iniciační pH růstového prostředí mělo obecně vliv na kumulaci tyraminu jednou buňkou kmene *Lb. curvatus* T02 (při obou testovaných teplotách). Nejvyšší koncentrace v rámci testovaných pH byly detekovány při iniciačním pH 5 a 6 při 37 °C. Při 10°C pak byla vyšší produkce tyraminu stanovena ve vzorcích, které byly získány po kultivaci kmene při pH 6 a 7 (Tab. 17).

Tab. 16: Produkce tyraminu (mg/CFU) jednou buňkou kmene *Lb. curvatus* T02 při 10 °C

faktory	YF ₁₀ [mg/CFU]	faktory	YF ₁₀ [mg/CFU]	faktory	YF ₁₀ [mg/CFU]
0,00/0/5	$1,8 \cdot 10^{-8}$	0,00/0/6	$2,0 \cdot 10^{-8}$	0,00/0/7	$2,1 \cdot 10^{-8}$
0,00/1/5	$3,7 \cdot 10^{-8}$	0,00/1/6	$2,4 \cdot 10^{-8}$	0,00/1/7	$1,9 \cdot 10^{-8}$
0,00/2/5	$1,7 \cdot 10^{-9}$	0,00/2/6	$1,9 \cdot 10^{-9}$	0,00/2/7	$2,7 \cdot 10^{-9}$
0,25/0/5	$2,7 \cdot 10^{-9}$	0,25/0/6	$3,9 \cdot 10^{-9}$	0,25/0/7	$4,6 \cdot 10^{-9}$
0,25/1/5	$8,3 \cdot 10^{-9}$	0,25/1/6	$2,1 \cdot 10^{-9}$	0,25/1/7	$3,1 \cdot 10^{-9}$
0,25/2/5	$3,9 \cdot 10^{-9}$	0,25/2/6	$3,7 \cdot 10^{-9}$	0,25/2/7	$2,5 \cdot 10^{-9}$
0,50/0/5	$4,4 \cdot 10^{-9}$	0,50/0/6	$2,6 \cdot 10^{-9}$	0,50/0/7	$2,3 \cdot 10^{-9}$
0,50/1/5	$2,4 \cdot 10^{-9}$	0,50/1/6	$2,3 \cdot 10^{-9}$	0,50/1/7	$3,4 \cdot 10^{-9}$
0,50/2/5	$3,4 \cdot 10^{-9}$	0,50/2/6	$5,2 \cdot 10^{-9}$	0,50/2/7	$3,6 \cdot 10^{-9}$
1,00/0/5	$5,5 \cdot 10^{-9}$	1,00/0/6	$1,7 \cdot 10^{-9}$	1,00/0/7	$1,9 \cdot 10^{-9}$
1,00/1/5	$2,5 \cdot 10^{-9}$	1,00/1/6	$2,4 \cdot 10^{-9}$	1,00/1/7	$2,4 \cdot 10^{-9}$
1,00/2/5	$4,4 \cdot 10^{-9}$	1,00/2/6	$3,7 \cdot 10^{-9}$	1,00/2/7	$2,9 \cdot 10^{-9}$
4,80/0/6,8	$7,4 \cdot 10^{-10}$	4,80/1/6,8	$5,8 \cdot 10^{-9}$	4,80/2/6,8	$1,3 \cdot 10^{-9}$

Př. 0,00/0/5...0 % laktózy, 0 % NaCl, pH 5; platí i pro Tab. 17

Nelze jednoznačně tvrdit, že přidavek laktózy zvýšil produkci tyraminu jednou buňkou ($P > 0,05$). Při 10 °C byly nejvyšší hodnoty detekovány v prostředí bez přidavku mléčného cukru (Tab. 16). Při vyšší kultivační teplotě pak přidavky laktózy podporovaly produkci

tyraminu jednou buňkou (Tab. 17). Samostatný přídavek soli při 37 °C způsobil inhibici (Tab. 17), zatímco kmen při 10 °C vyprodukoval v médiích s přidavky soli větší množství tyraminu (Tab. 16). Ve vzorcích, které měly rozsahem faktorů imitovat prostředí mléka (4,8 % laktózy a pH 6,8), byla produkce tyraminu při obou zkoušených teplotách vyšší, pokud byl do prostředí přidán NaCl ($P < 0,05$). Nejvíce produkci jednou buňkou podpořila 1% koncentrace (Tab. 16 a 17).

Tab. 17: Produkce tyraminu (mg/CFU) jednou buňkou kmene *Lb. curvatus* T02 při 37 °C

faktory	YF ₃₇ [mg/CFU]	faktory	YF ₃₇ [mg/CFU]	faktory	YF ₃₇ [mg/CFU]
0,00/0/5	$5,9 \cdot 10^{-9}$	0,00/0/6	$6,7 \cdot 10^{-9}$	0,00/0/7	$2,8 \cdot 10^{-9}$
0,00/1/5	$3,1 \cdot 10^{-9}$	0,00/1/6	$3,5 \cdot 10^{-9}$	0,00/1/7	$2,2 \cdot 10^{-9}$
0,00/2/5	$1,7 \cdot 10^{-9}$	0,00/2/6	$1,9 \cdot 10^{-9}$	0,00/2/7	$2,7 \cdot 10^{-9}$
0,25/0/5	$1,6 \cdot 10^{-9}$	0,25/0/6	$1,9 \cdot 10^{-9}$	0,25/0/7	$2,8 \cdot 10^{-9}$
0,25/1/5	$1,3 \cdot 10^{-9}$	0,25/1/6	$1,4 \cdot 10^{-9}$	0,25/1/7	$5,2 \cdot 10^{-9}$
0,25/2/5	$4,3 \cdot 10^{-9}$	0,25/2/6	$2,7 \cdot 10^{-9}$	0,25/2/7	$2,5 \cdot 10^{-9}$
0,50/0/5	$3,9 \cdot 10^{-9}$	0,50/0/6	$9,8 \cdot 10^{-9}$	0,50/0/7	$3,9 \cdot 10^{-9}$
0,50/1/5	$2,2 \cdot 10^{-9}$	0,50/1/6	$2,9 \cdot 10^{-9}$	0,50/1/7	$3,6 \cdot 10^{-9}$
0,50/2/5	$3,4 \cdot 10^{-9}$	0,50/2/6	$3,8 \cdot 10^{-9}$	0,50/2/7	$2,6 \cdot 10^{-9}$
1,00/0/5	$8,1 \cdot 10^{-9}$	1,00/0/6	$1,0 \cdot 10^{-8}$	1,00/0/7	$1,1 \cdot 10^{-8}$
1,00/1/5	$3,1 \cdot 10^{-9}$	1,00/1/6	$3,3 \cdot 10^{-9}$	1,00/1/7	$5,9 \cdot 10^{-9}$
1,00/2/5	$1,8 \cdot 10^{-9}$	1,00/2/6	$6,5 \cdot 10^{-10}$	1,00/2/7	$3,5 \cdot 10^{-9}$
4,80/0/6,8	$3,2 \cdot 10^{-9}$	4,80/1/6,8	$2,5 \cdot 10^{-8}$	4,80/2/6,8	$7,1 \cdot 10^{-9}$

Kromě tyraminu byl kmen schopen tvořit relativně vysoká množství sperminu. Stejně jako v případě ostatních kultur byl tento polyamin zřejmě produkován a kulturou využíván při syntéze DNA a RNA. Jeho koncentrace v čase kultivace opět velmi kolísala a vyhodnotit u něj parametry produkce nebylo možné. Nejvyšší vytvořená množství za obou zkoušených teplot jsou uvedena v Tab. 18.

Z výsledků v Tab. 18 je jasně patrné, že při nízké teplotě kultivace byla produkce sperminu podporována více než při 37 °C. Nejvyšší vyprodukované množství ($55,7 \pm 5,7$ mg/l) bylo stanoveno v médiu bez přidavku laktózy a soli při pH 5 po kultivaci kmene při 10 °C. Nejvyšší detekovaná koncentrace sperminu při 37 °C byla $19,7 \pm 1,8$ mg/l, za stejných koncentrací laktózy a NaCl, ale pH 7. Jinak většina vyprodukovaných koncentrací stěží přesahovala 10 mg/l média.

V médiu napodobujícím podmínky mléka pak bylo nejvyšší množství sperminu detekováno v médiích bez přídavku NaCl, kde při 10 °C dosahovalo hodnot 14,7±2,8 mg/l a při 37 °C bylo 3,4±2,8 mg/l.

Tab. 18: Nejvyšší vyprodukovaná množství sperminu (mg/l) *Lb. curvatus* T02

faktory	pH 5	pH 6	pH 7	faktory	pH5	pH6	pH7
0,00/0/10	55,7±5,7	37,3±2,9	43,4±5,1	0,00/0/37	1,6±0,4	11,9±1,5	19,7±1,8
0,00/1/10	35,0±4,5	35,2±2,5	27,2±4,8	0,00/1/37	ND*	7,8±0,7	7,3±0,4
0,00/2/10	12,8±1,9	32,5±4,1	24,9±2,0	0,00/2/37	2,4±0,4	11,7±1,8	13,9±1,2
0,25/0/10	1,7±0,2	12,4±2,4	12,4±1,8	0,25/0/37	ND*	9,4±1,5	7,0±0,5
0,25/1/10	7,1±0,5	7,2±0,7	23,1±2,1	0,25/1/37	ND*	5,2±1,9	4,5±0,2
0,25/2/10	13,4±1,7	4,6±0,3	24,0±1,3	0,25/2/37	5,4±0,1	11,8±0,6	5,7±0,7
0,50/0/10	4,7±1,0	10,8±1,1	39,1±2,6	0,50/0/37	ND*	9,5±0,1	10,5±2,2
0,50/1/10	2,9±0,5	3,6±0,4	32,9±3,9	0,50/1/37	ND*	4,2±0,7	2,0±0,5
0,50/2/10	ND*	ND*	22,1±1,0	0,50/2/37	2,6±0,7	5,8±0,8	ND*
1,00/0/10	6,4±0,3	8,0±0,3	50,2±1,2	1,00/0/37	ND*	9,5±0,5	10,0±1,1
1,00/1/10	11,4±1,0	3,0±0,1	12,5±1,6	1,00/1/37	6,2±1,6	5,6±1,0	8,5±0,6
1,00/2/10	9,1±1,6	10,3±0,5	36,4±3,0	1,00/2/37	7,8±1,1	11,2±0,7	10,2±0,7

* kde ND...spermin nebyl detekován v žádném z odběrových časů; Př. 1,00/2/10...1% přídavek laktózy (w/v), 2% přídavek NaCl (w/v), kultivační teplota 10 °C

V prvotním skríníngu kultur (Experiment I) byla produkce tyraminu tímto kmenem signifikantně vyšší, 1077,5±1,2 mg/l (P<0,05). Jedním z možných důvodů, proč došlo k omezení tvorby tyraminu *Lb. curvatus* T02, mohla být odlišná koncentrace zkvasitelných cukrů v prostředí, kdy byl zdroj zkvasitelných cukrů výrazně omezen z původních 20 g/l (viz Tab. 1) na méně než poloviční koncentraci (nejvyšší testovaná koncentrace 10 g/l a méně) a potom také kombinace ostatních faktorů, které mohly působit inhibičně jak na růst kultury, tak na dekarboxylázovou aktivitu. Příkladem může být pH média, které se v původním nemodifikovaném složení pohybovalo okolo hodnoty 6,2±0,2. Stejně jako celková produkce i produkce tyraminu jednou buňkou byla u kmene *Lb. curvatus* T02 řádově nižší, než u kmene *Lb. brevis* T01 (kapitola 4.2.4).

Významnou roli sehrálo pH, respektive schopnost dané kultury efektivně okyselovat růstové médium. Pokud proběhl pokles pH pod optimum činnosti dekarboxyláz, byla tvorba biogenních aminů (zvláště tyraminu) potlačena.

V supernatantech po kultivaci obou kmenů byla detekována přítomnost sperminu, a to v nemalém množství. Zvláště u *Lb. curvatus* T02 tyto hodnoty převyšovaly nejvyšší detekované koncentrace tyraminu. Studií, které by se zabývaly produkcí tohoto polyaminu u laktobacilů mnoho není. Spermin byl ale v nižších koncentracích stanoven u zástupců rodu *Lactobacillus* a *Lactococcus* již ve studiích autorů Kuley et al. (2012, s. 653) a Mangia et al (2013, s. 564).

4.3 Výsledky Experimentu III

V rámci tohoto experimentu byla sledována kinetika produkce a růstové chování dvou vybraných kultur, *Lactobacillus brevis* T01 a *Lactobacillus curvatus* T02, ve sterilním odtučněném mléce, které bylo modifikováno úrovní sledovaných faktorů.

Faktory, které byly zkoušeny:

- 0,3 % (w/v) přídavek aminokyselin (lyzinu, tyrozinu, ornitinu a argininu),
- koncentrace NaCl (0, 1 a 2 % (w/v)),
- úprava pH (5,0±0,2, 6,0±0,2 a 7,0±0,2),
- teplota 10±2 a 37±2 °C.

Produkce biogenních aminů však byla sledována i v obnoveném sterilním mléce bez jakýchkoliv dalších úprav (pH 6,6±0,1, bez přídavku aminokyselin).

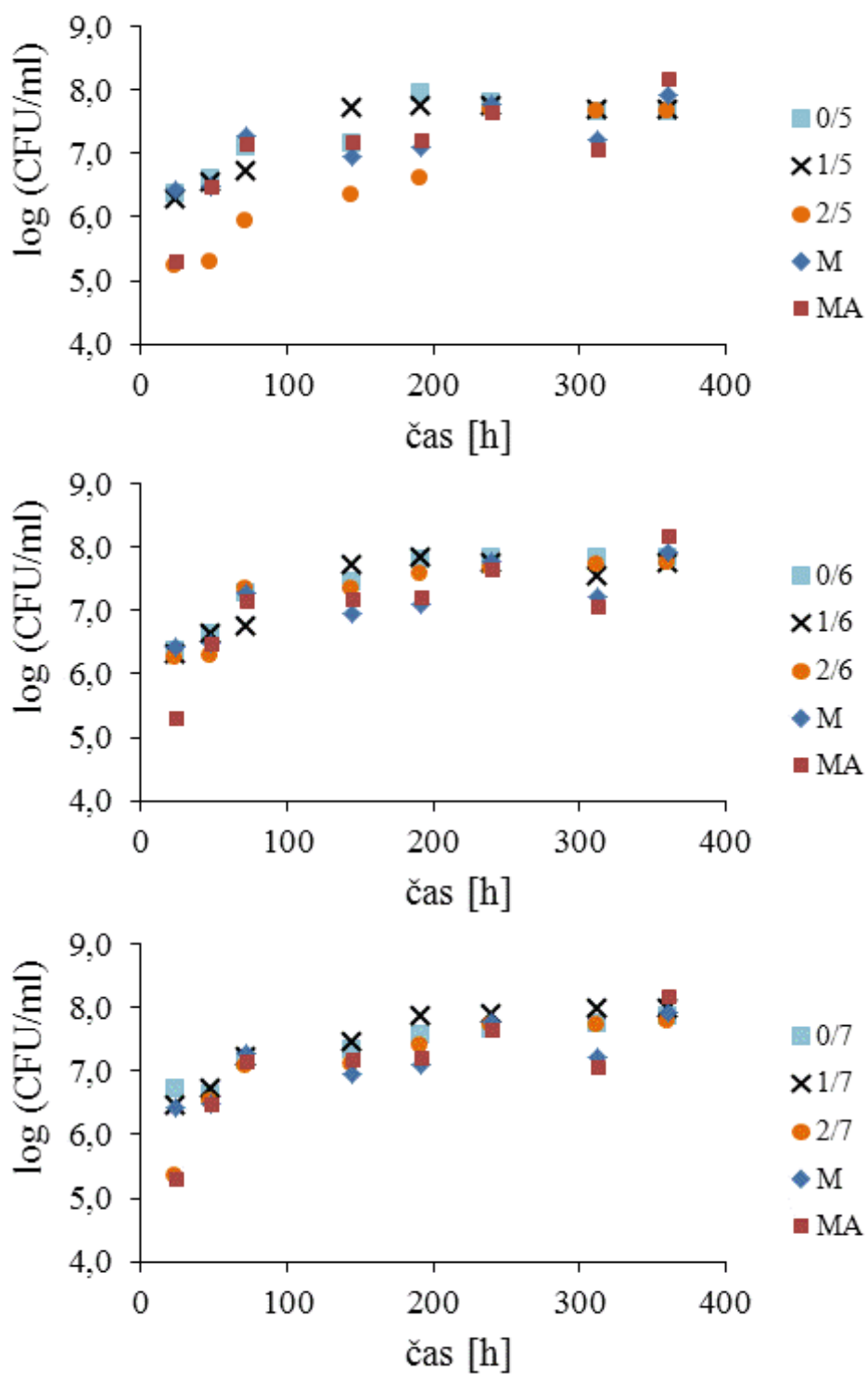
4.3.1 Produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus brevis* T01 v mléce

Kmen *Lb. brevis* T01 vykazoval v laboratorním médiu schopnost produkce poměrně vysoké koncentrace tyraminu a sperminu (kapitola 4.2.4). Rozsah produkce *in vitro* se však od produkce v reálném systému potravinové matrice může lišit. Důvodem tohoto předpokladu je odlišné chemické složení laboratorního média MRS bujónu a složení mléka. Jak lze také predikovat, kromě dekarboxylázové aktivity, použité médium ovlivní i růstové chování testovaného kmene. Z těchto důvodů bylo nutné ověřit aminogenní potenciál kmene v mléce,

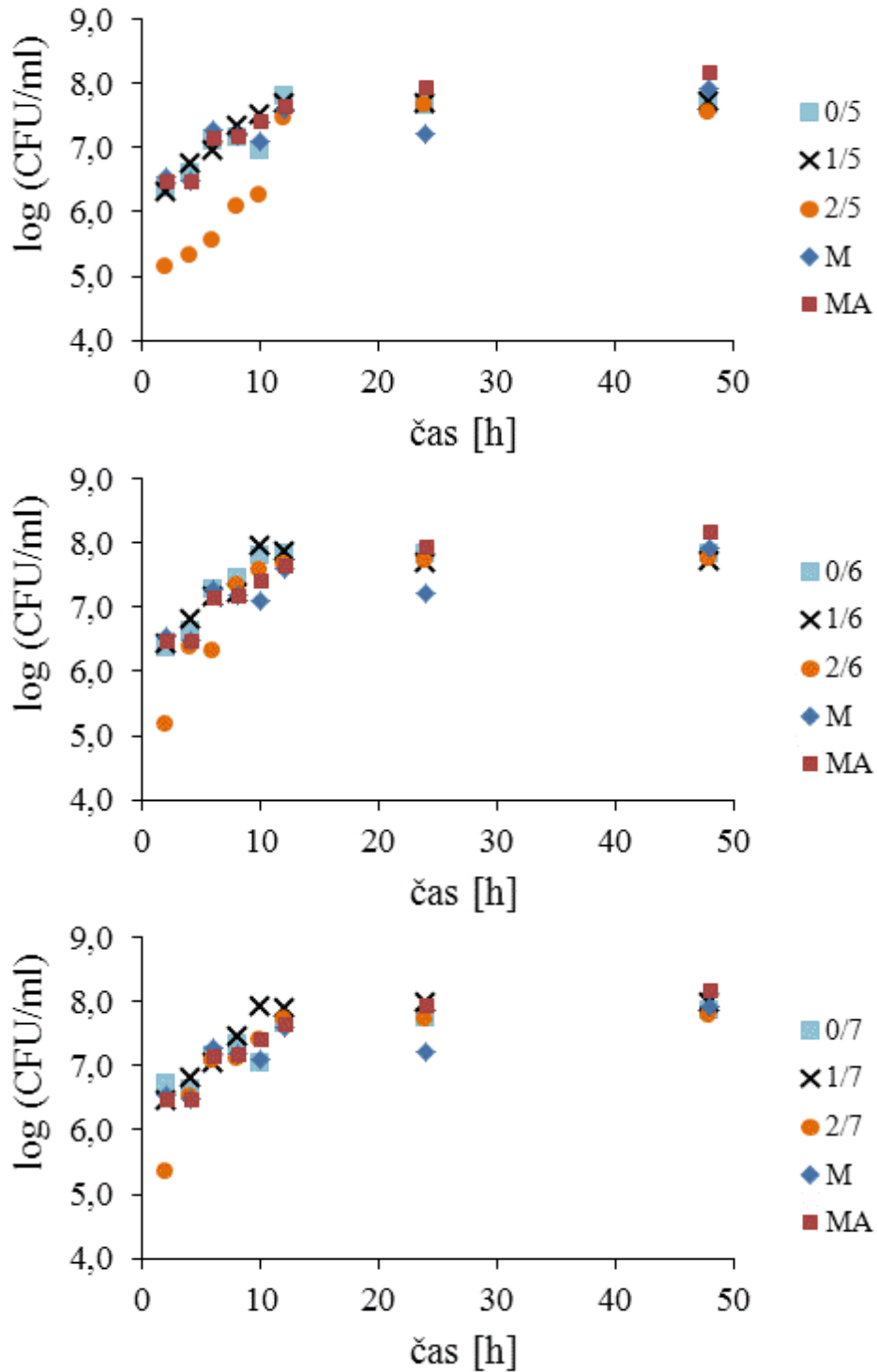
aby se potvrdila, nebo vyvrátila reálná hrozba, kterou by tento kmen mohl případně představovat v kysaných mléčných výrobcích a sýrech.

Růstové chování a vývoj pH kultivačního prostředí *Lactobacillus brevis* T01

Nejméně příhodné podmínky pro rozvoj kmene skýtalo prostředí mléka s 2% (w/v) koncentrací NaCl a iniciačním pH 5 (při obou teplotách; Obr. 32 a 33). Kmen naopak hojně rostl v prostředí s pH 6 a 7, kdy jednocentní přídavek NaCl podpořil rozvoj kmene v obnoveném sterilním mléce. Dvouprocentní přídavek soli nepůsobil při iniciačním pH 5 a 6 inhibičně, kmen ve většině případů vykazoval podobné chování, jako v mléce bez úprav. Výjimečně docházelo k prodloužení lag fáze. Výše zmíněné chování bylo pozorováno při obou testovaných teplotách. Celkově větší nárůst kultury *Lb. brevis* T01 probíhal v mléce, které bylo inkubováno při teplotě 37 °C. Růst kmene nebyl překvapivě ve sterilním mléce nižší než v laboratorním médiu, které je koncipováno tak, aby disponovalo všemi potřebnými nutrienty pro vybranou skupinu mikroorganismů (kapitoly 4.2.4, 4.3.1).



Obr. 32: Růst *Lactobacillus brevis* T01 v mléce při pH 5-7, $t=10$ °C s přidavkem různých koncentrací soli 0-2 % (w/v); M...mléko bez aminokyselin a přidavku NaCl, MA... mléko s aminokyselinami bez přidavku NaCl; př. 1/6...1 % (w/v) NaCl, pH 6



Obr. 33: Růst *Lactobacillus brevis* T01 v mléce při pH 5-7, $t=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ s přidavkem různých koncentrací soli 0-2 % (w/v); M...mléko bez aminokyselin a přidavku NaCl, MA... mléko s aminokyselinami bez přidavku NaCl; př. 2/6...2 % (w/v) NaCl a pH 6

Největší pokles pH během kultivace *Lb. brevis* T01 při 37 °C bylo možné sledovat ve vzorcích mlék s iniciační kyselostí pH 6 a 7 (Příloha G, Obr. G1). Velmi často bylo možné pozorovat vliv NaCl na průběh okyselování, kdy mléka s 2% (w/v) přídavkem vykazovala nejnižší pokles pH (s výjimkou iniciačního pH 6, Příloha G, Obr. G1). Souhrně lze konstatovat, že při 37 °C nebyl pozorován jednotný trend snižování pH, ale ve většině vzorků (různých kombinací faktorů) bylo ke konci kultivace prostředí alkalizováno (Příloha G, Obr. G1).

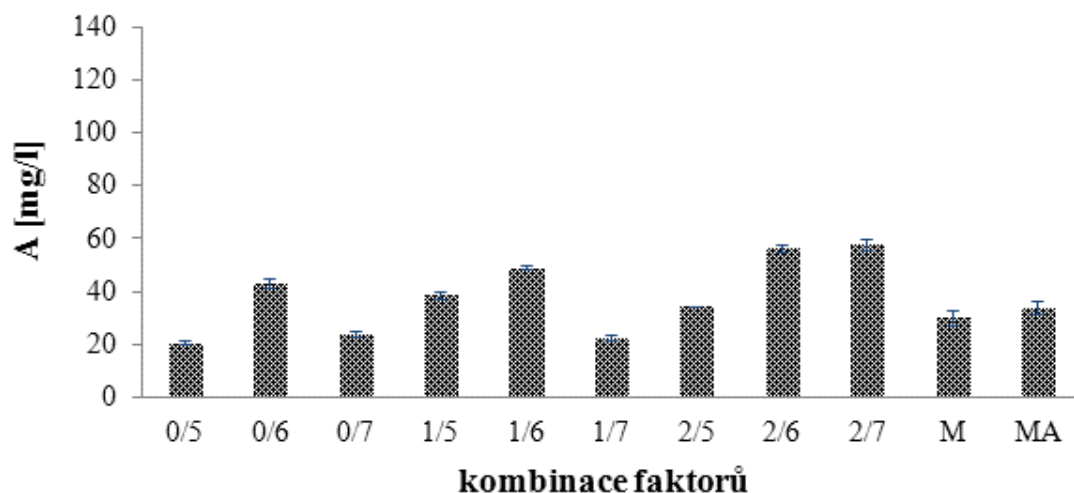
Při 10 °C byl ve všech vzorcích mlék sledován postupný nárůst iniciačních hodnot pH, kdy nejvýraznější rozdíly byly zjištěny při pH 5 a 6 (Příloha G, Obr. G3). Mléko s přídavkem aminokyselin bez další úpravy pH vykazovalo při teplotě 10 °C alkalizaci, zatímco při vyšší kultivační teplotě bylo možné pozorovat spíše pokles nebo minimální změny iniciačního pH (Příloha G, Obr. G2). Důvodem může být menší nárůst kultury. Došlo tak k nižší spotřebě substrátu, který by byl přeměněn na kyselé produkty.

Produkce biogenních aminů kmenem Lactobacillus brevis T01 v mléce

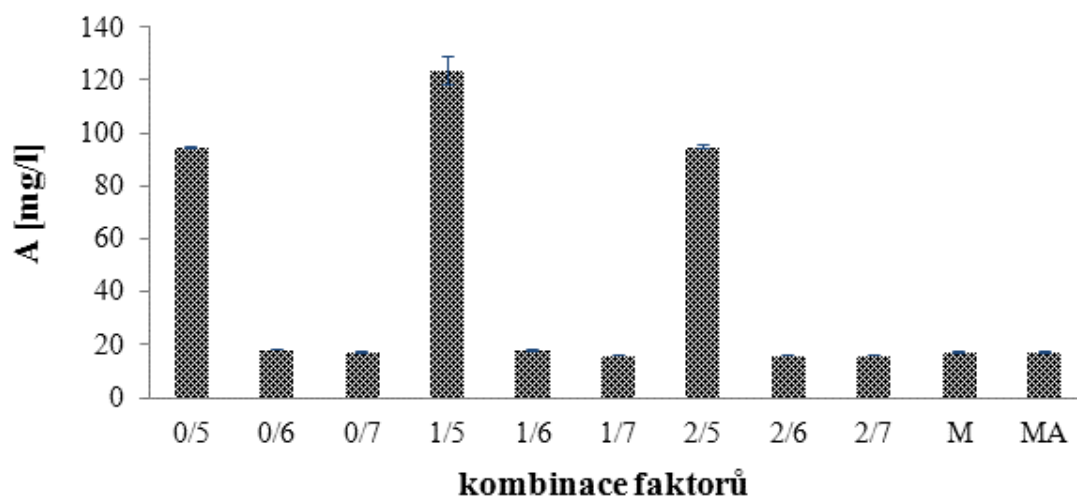
Kmen *Lb. brevis* T01 se sice v reálném systému choval odlišně, než za podmínek *in vitro*, ale opět byl z výsledků patrný významný vliv teploty a pH.

Při 37 °C se jako nejvhodnější pro činnost dekarboxyláz jevílo iniciační pH 6 ($P < 0,05$). Nejnižší celková produkce pak byla stanovena v médiích s pH 5 (Obr. 34; $P < 0,05$). Iniciační pH 7 podpořilo významněji celkovou produkci tyraminu pouze v jednom případě, a to v kombinaci s 2% (w/v) koncentrací NaCl v růstovém prostředí. Sůl v testovaném rozsahu koncentrací nepůsobila inhibičně (Obr. 34). Naopak došlo k nárůstu celkové produkce. Mléko bez úprav (přídavku aminokyselin a nastavení pH) pak bylo na obsah tyraminu nejchudší ($P < 0,05$).

Při 10 °C (Obr. 35) však byla produkce tyraminu nejvyšší v médiích s iniciačním pH 5 bez ohledu na přídavek soli ($P < 0,05$). Důvodem mohlo být pomalejší prokvašování a tudíž i růst kyselosti mléka, která se několik dní pohybovala v okolí hodnoty vyhovující produkci biogenních aminů.

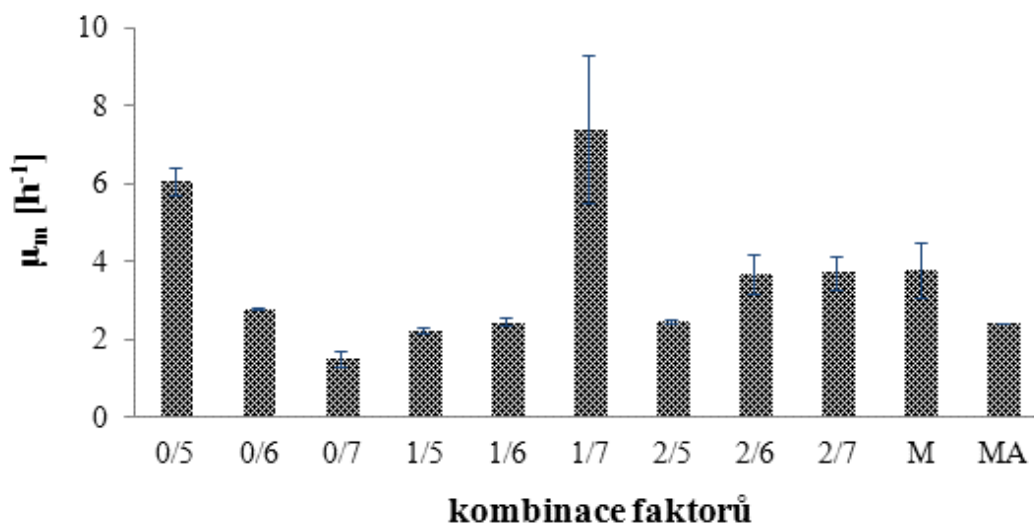


Obr. 34: Maximální hodnota produkce (A) tyraminu kmenem *Lb. brevis* T01 v mléce při 37 °C, přidavku NaCl (0, 1 a 2 %) a úpravě iniciačního pH (pH 5, 6 a 7); př. 0/5...0 % (w/v) NaCl, pH 5; M...mléko bez aminokyselin, MA...mléko s aminokyselinami

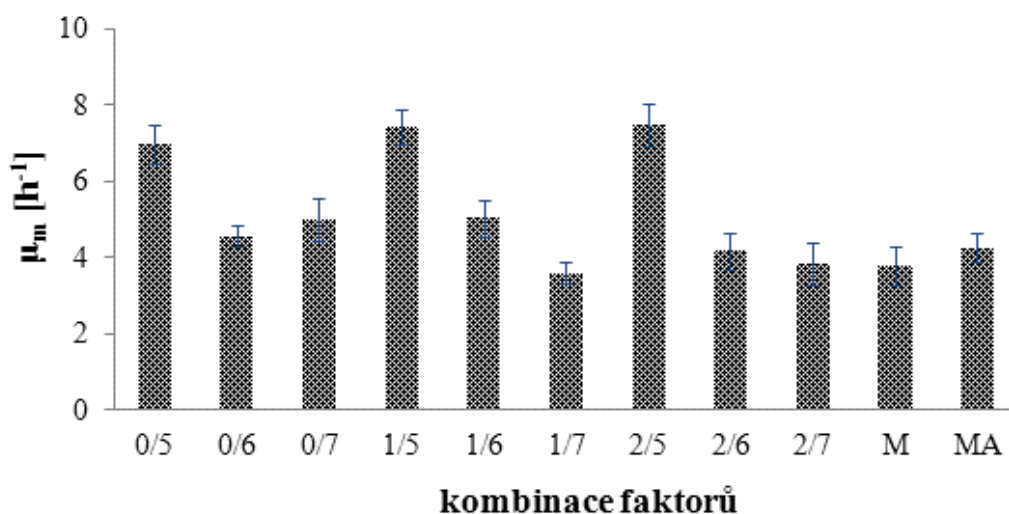


Obr. 35: Maximální hodnota produkce (A) tyraminu kmenem *Lb. brevis* T01 v mléce při 10 °C, přidavku NaCl (0, 1 a 2 %) a úpravě iniciačního pH (pH 5, 6 a 7); př. 0/5...0 % (w/v) NaCl, pH 5; M...mléko bez aminokyselin, MA...mléko s aminokyselinami

Délka lag fáze produkce tyraminu byla pro vyšší zkoušenou teplotu minimální (< 1 h.). Ani při kultivační teplotě 10 °C, nebylo, až na výjimky (pH 5), zaznamenáno významnější prodloužení délky lag fáze (data nejsou uvedena).



Obr. 36: Rychlost produkce (μ_m) tyraminu kmenem *Lb. brevis* T01 v mléce při 37 °C, přidavku NaCl (0, 1 a 2 %) a úpravě iniciačního pH (pH 5, 6 a 7); př. 0/5...0 % (w/v) NaCl, pH 5; M...mléko bez aminokyselin, MA...mléko s aminokyselinami



Obr. 37: Rychlost produkce (μ_m) tyraminu kmenem *Lb. brevis* T01 v mléce při 10 °C, přidavku NaCl (0, 1 a 2 %) a úpravě iniciačního pH (pH 5, 6 a 7); př. 0/5...0 % (w/v) NaCl, pH 5; M...mléko bez aminokyselin, MA...mléko s aminokyselinami

Rychlost produkce tyraminu byla až na výjimky vyšší při 37 °C (Obr. 36 a 37). Při téže teplotě byla nejvyšší hodnota rychlosti produkce tyraminu pozorována při pH 5, bez ohledu na koncentraci soli (Obr. 36). Při 10 °C pak nebylo možné vysledovat pravidelný trend vlivu testovaných faktorů (Obr. 37).

Při 10 °C nebylo možné vyhodnotit produkci tyraminu jednou buňkou z důvodu velkého nárůstu kultury, ale velmi malé produkce tyraminu (pH 6 a 7). Jen v supernatantech po kultivaci kmene v médiích s 0-2% (w/v) přidavkem NaCl při pH 5 a obou kultivačních teplotách bylo možné tuto produkci vyhodnotit. Produkce tyraminu jednou buňkou byla i tak nižší než $1 \cdot 10^{-8}$ mg/CFU. Sůl ani v tomto případě nezpůsobovala inhibici produkce. Ani při 37 °C nepřesahovala produkce jednou buňkou výše zmíněnou hodnotu. Většinou se pohybovala od $0,5 \cdot 10^{-9}$ do $0,9 \cdot 10^{-9}$ mg/CFU a to bez ohledu na koncentraci soli či pH.

Celková produkce sperminu v mléce projevovала stejně kolísavý vývoj, jako v laboratorním růstovém médiu. Nejvyšší detekovaná množství v rámci testovaných koncentrací faktorů jsou uvedeny v Tab. 19.

Nejvyšších hodnot sperminu bylo celkově dosahováno v mléce při 10 °C. Výjimkou bylo mléko s přidavkem aminokyselin, kdy při 37 °C bylo ve vzorku detekováno až $86,9 \pm 7,4$ mg/l (Tab. 18, mléko s aminokyselinami, MA). Mléko bez aminokyselin nevykazovalo ani zdánlivě podobné koncentrace sperminu, resp. množství byla pod mezí detekce. Důvodem mohla být absence dodaných prekurzorů vzniku (argininu, ornitinu), kterými bylo mléko s přidavky soli a úpravou pH fortifikováno. Množství prekurzorů je jedním z důležitých faktorů, které ovlivňuje množství vyprodukovaných biogenních aminů (Linares et al., 2012, s. 2).

Jak je vidět z tabulky (Tab. 19), maximální vyprodukované množství sperminu bylo detekováno hlavně v mléce, které mělo iniciační pH 6 a vyšší. Pokud porovnáme výsledky produkce sperminu *in vitro* s výsledky nejvyšších detekovaných množství v mléce při 10 °C, je zřejmé, že daný biogenní amin dosahoval vyšších hodnot v prostředí mléka ($P < 0,05$). Nejvyšší detekovaná hodnota sperminu v MRS bujónu byla $14,1 \pm 2,7$ mg/l, zatímco v mléce, při téže teplotě dosahovala hodnot >40 mg/l (Tab. 19, Příloha G, Tab. G1). Ani v laboratorním médiu, které bylo obohaceno aminokyselinami při teplotě 37 °C, nebyly stanoveny takto vysoké hodnoty sperminu v žádném z odběrových časů (Tab. 15).

Porovnáme-li obsah sperminu v supernatantech získaných po kultivaci kmene při 37 °C se vzorky mléka, můžeme konstatovat, že laboratorní médium se projevilo naopak jako prostředí s vyšším obsahem sperminu (Tab. 15 a Tab. 19). Tato zjištění mohou souviset s hojnějším nárůstem kultury v mléce, než v samotném médiu MRS, a tedy mohou být spojeny s využitím polyaminu (pokles nejvyšších detekovaných hodnot) při syntéze nukleových kyselin, které jsou nedílnou součástí projevů intenzivního množení kultury.

Tab. 19: Produkce sperminu (mg/l) *Lb. brevis* T01 v mléce

faktory	SPN [mg/l]	faktory	SPN [mg/l]
0/5/10	4,5±0,7	0/5/37	0,6±0,1
1/5/10	24,1±4,9	1/5/37	1,2±0,1
2/5/10	27,8±7,4	2/5/37	0,6±0,1
0/6/10	42,8±2,7	0/6/37	2,4±0,9
1/6/10	47,1±7,8	1/6/37	2,3±0,9
2/6/10	47,8±7,8	2/6/37	1,9±0,1
0/7/10	26,2±0,3	0/7/37	3,9±0,4
1/7/10	39,3±9,0	1/7/37	5,9±0,4
2/7/10	44,7±4,4	2/7/37	1,7±0,1
M/10	0,5±0,1	M/37	7,3±0,1
MA/10	20,2±2,1	MA/37	86,9±7,4

kde 0/5/10...0 % NaCl, pH 5 a t=10 °C; MA/10...mléko s aminokyselinami při t=10 °C, M/10...mléko bez přídavku aminokyselin při t=10 °C

Kmen *Lb. brevis* T01 na základě výše zmíněných výsledků může, zvláště z důvodů vysoké produkce tyraminu při desetistupňové teplotě, představovat riziko kumulace biogenních aminů v mléčných výrobcích. Tato kultura nebyla inhibována ani přídavkem soli. Produkce sperminu sice byla vyšší, ale detekovaná množství výrazně kolísala (v tabulce jsou uvedeny nejvyšší hodnoty), kdy na konci kultivace byla jeho koncentrace pod mezí detekce nebo maximálně dosahovala množství 20 mg/kg. Vliv přítomnosti a produkce polyaminů byl rozebírán v kapitolách 1.2 a v experimentální části u probiotických kmenů (4.2.1 a 4.2.2).

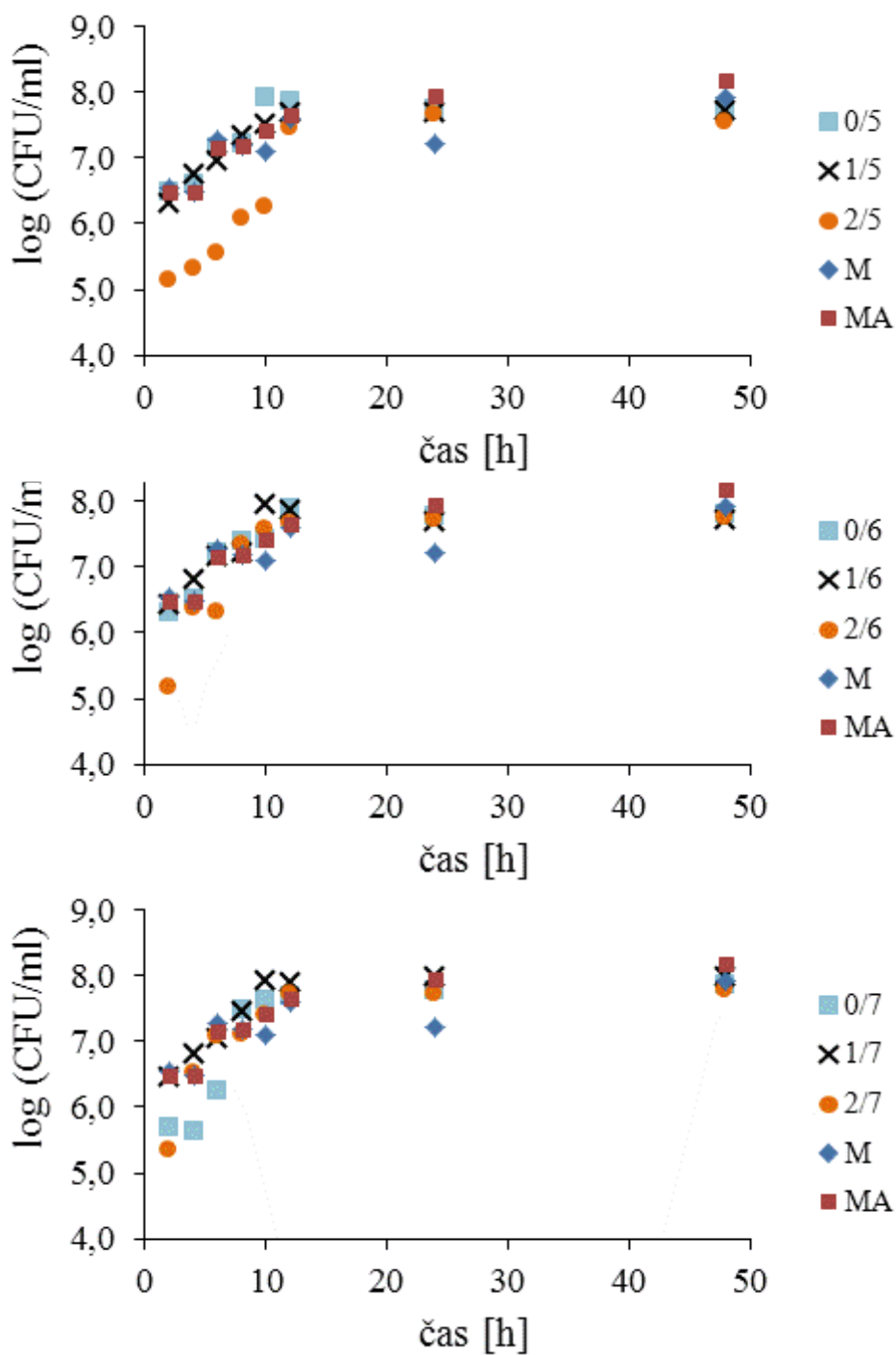
4.3.2 Produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus curvatus* T02 v mléce

Kmen *Lb. curvatus* T02 vynikal výrazně nižší aminogenní aktivitou než kmen *Lb. brevis* T01. Pro porovnání s vysoceproduktivním kmenem byl uskutečněn pokus v mléce. Volba tohoto kmene pro implementaci do reálného systému mléka také souvisela s původní predispozicí tvořit hojná množství tyraminu v rámci prvotního skríningu (Experiment I), která v zápětí nebyla během Experimentu II potvrzena.

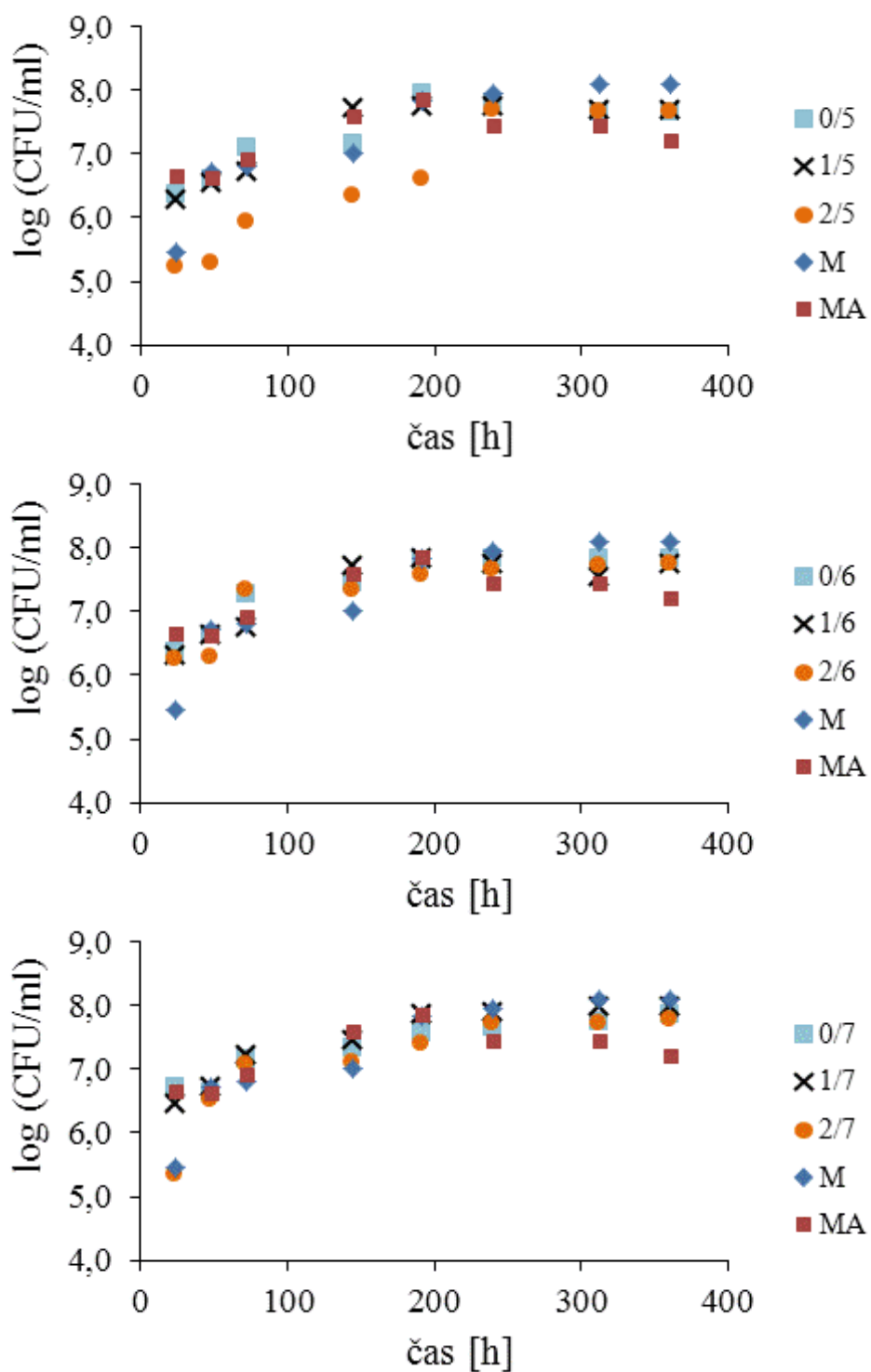
Cílem tohoto subexperimentu bylo tedy zjistit, jak se daný kmen bude chovat v mléce (zda nedojde k opětovné podpoře produkce) a jakou schopnost produkce biogenních aminů bude mít v potravinové matrici v porovnání s další výše zmíněnou non-startérovou kulturou izolovanou z procesu výroby sýrů (4.3.1). Dalším neméně důležitým výstupem subexperimentu, bude pozorování růstového chování a schopnost okyselovat růstové prostředí mléka.

Růstové chování a vývoj pH kultivačního prostředí *Lactobacillus curvatus* T02

Stejně jako u kmene *Lb. brevis* T01 byl nárůst kultury v mléce poměrně vysoký při obou teplotách. Při 10 °C (Obr. 38) byl patrný synergický inhibiční účinek kombinace faktorů. Nízké pH 5 v kombinaci s 2% (w/v) koncentrací NaCl způsobilo omezení růstu *Lb. curvatus* T02 v takto upravených vzorcích mléka (Obr. 39). Jiné kombinace faktorů neprojevily významný vliv na rozvoj tohoto kmene v mléce. Během kultivace za vyšší teploty, při 37 °C, nelze tuto kombinaci faktorů a jejich úrovní označit za kultivačně nepříznivou (Obr. 38). Žádná z testovaných koncentrací NaCl, a ani iniciačních hodnot pH mléka, nezpůsobila striktní inhibici nebo významnější podporu růstu (Obr. 38 a 39). To v konečném důsledku znamená, že tato fakultativně heterofermentativní bakterie se může rozvíjet během celé výroby mléčně kysaných výrobků a to i v případě přídavku NaCl.



Obr. 38: Růst *Lactobacillus curvatus* T02 v mléce při pH 5-7, $t=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ s přidavkem různých koncentrací soli 0-2 % (w/v); M...mléko bez aminokyselin a přidavku NaCl, MA... mléko s aminokyselinami bez přidavku NaCl; 2/6...2 % (w/v) NaCl, pH 6



Obr. 39: Růst *Lactobacillus curvatus* T02 v mléce při pH 5-7, $t=10\text{ }^{\circ}\text{C}$ s přidavkem různých koncentrací soli 0-2 % (w/v); M...mléko bez aminokyselin a přidavku NaCl, MA... mléko s aminokyselinami bez přidavku NaCl; 0/7...0 % (w/v) NaCl, pH 7

Ve všech vzorcích mléka s úpravou pH a přidavkem soli docházelo k postupnému okyselování během kultivace. Při teplotě 10 °C byl nejnižší pokles pH pozorován v médiu bez NaCl (zvláště při iniciačním pH 7; Příloha H, Obr. H1). Významný pokles pH mohl být ve většině případů pozorován v médiích s 2% (w/v) koncentrací soli za obou inkubačních teplot (Příloha H, Obr. H1 a H3). Zvláště při 37 °C totiž nedošlo ani při nejvyšších testovaných koncentracích soli k omezení růstu fermentující kultury. Výjimku představoval vývoj pH kultivačního prostředí *Lb. curvatus* T02 v médiu s iniciačním pH 5 (při 10 °C), kdy byly změny iniciačního pH minimální (Příloha H, Obr. H1).

V mléce a v mléce fortifikovaném aminokyselinami byl při nižší testované teplotě vývoj pH podobný. Docházelo k okyselování, kdy vzorky z 15. dne kultivace vykazovaly velmi podobné hodnoty kultivačního prostředí (pH 6,6±0,3). Při vyšší kultivační teplotě však byl vývoj v obou médiích velmi odlišný (Příloha H, Obr. H3). Mléko s aminokyselinami bylo růstem a metabolity kultury spíše alkalizováno, zatímco mléko bez navýšení prekurzorů biogenních aminů vykazovalo naopak snižování pH (Příloha H, Obr. H2). Důvodem může být vliv kumulace alkalických látek, biogenních aminů.

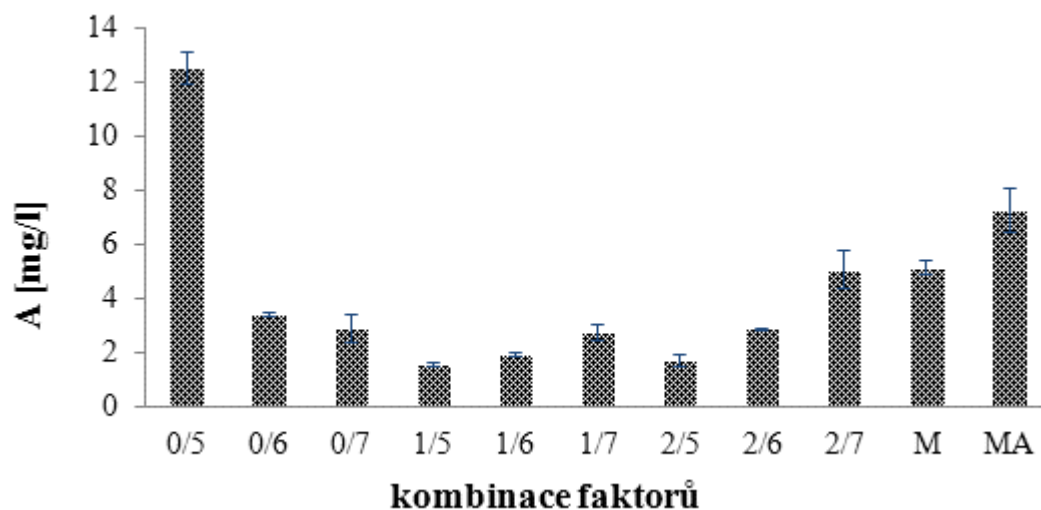
Produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus curvatus* T02 v mléce

Jak již bylo zmíněno výše, kmen *Lb. curvatus* T02 nevykazoval v rámci Experimentu II významnou aminogenní aktivitu. Ani v reálném systému tato kultura nebyla schopna vyprodukovat koncentrace biogenních aminů, které by měly toxikologický význam (>100 mg/l). Rozsáhlejší produkce nebyla stanovena ani ve vzorcích mléka při 37 °C. Detekována byla přítomnost tyraminu, která většinou nedosahovala 15 mg/l a sperminu, jehož kumulace projevovala opět kolísavý charakter. Kinetika tvorby tyraminu mohla být vyhodnocena pouze pro vyšší zkoušenou teplotu. Při 10 °C byly ve vzorcích mléka po inkubaci detekovány maximální hodnoty tyraminu do výše 3 mg/l.

Z Obr. 40 je patrné, že maximální vyprodukované množství tyraminu při 37 °C bylo 12,5±0,6 mg/l. Tato hodnota byla zjištěna ve vzorcích mléka bez přidavku soli a při iniciačním pH 5. Zkoušené koncentrace soli pak produkci tyraminu při daném pH výrazně snížily ($P < 0,05$). Ve vzorcích mléka s původním pH 6 nebyl inhibiční účinek soli pozorován a v případě nejvyššího zkoušeného pH 7, dokonce produkci tyraminu přidavek soli podporoval ($P < 0,05$; Obr. 40). Při pH 5 zřejmě došlo k působení kombinace faktorů, které ve výsledku vedly k omezení produkce. Růst kultury totiž při nich nebyl výrazněji potlačen

a kultura pak prostředí mléka dále okyselovala pod hodnoty optima činnosti dekarboxylačních enzymů (Příloha H, Obr. H3).

Úpravy mléka ve většině případů viditelně snížily tvorbu tyraminu (Obr. 40). Výjimkami byly dva případy – již zmíněná úprava pH na iniciační pH 5 bez přidání NaCl a mléko, které bylo fortifikováno aminokyselinami. V podmínkách obohaceného mléka bylo dosaženo maximální hodnoty tyraminu $7,2 \pm 0,8$ mg/l (Obr. 40).



Obr. 40: Maximální vyprodukované množství tyraminu kmenem *Lactobacillus curvatus* T02 v mléce při pH 5-7, $t=37$ °C s přidavkem různých koncentrací soli 0-2 % (w/v); M...mléko bez aminokyselin a přidavku NaCl, MA... mléko s aminokyselinami bez přidavku NaCl

Produkce tyraminu jednou buňkou kmene *Lb. curvatus* T02 nebylo možné zhodnotit ani při jedné ze zkoušených teplot. Produkce byla řádově nižší než $1 \cdot 10^{-12}$ mg/CFU mléka.

Maximální detekované koncentrace sperminu byly o poznání vyšší, než obsah tyraminu a to při obou zkoušených teplotách. Rozsah produkce nicméně kolísal od hodnot pod mezí detekce k hodnotám > 40 mg/l (Tab. 20). Stejně jako v případě *Lb. brevis* T01 byl polyamin využit kmenem při pomnožování. Růst kultury i pokles pH prostředí byl jasně patrný. V rámci testovaných faktorů a jejich rozsahů nebylo možné stanovit společný trend působení (Tab. 20). Žádná kombinace faktorů v prostředí mléka inkubovaného při 37 °C nezpůsobila výrazné omezení nebo podporu růstu kultury. Z grafů pH pak vliv polyaminů nebyl zřetelný, což by mohlo být přičítáno rychlému využití kulturou, ale také kompenzací fermentatorním metabolismem *Lb. curvatus* T02.

Tab. 20: Nejvyšší detekované koncentrace sperminu (mg/l) v mléce po kultivaci *Lb. curvatus* T02

faktory	SPN [mg/l]	faktory	SPN [mg/l]
0/5/10	25,6±4,3	0/5/37	18,8±0,5
1/5/10	2,4±0,4	1/5/37	28,9±0,2
2/5/10	13,0±0,9	2/5/37	17,4±2,9
0/6/10	11,4±1,1	0/6/37	ND
1/6/10	10,5±3,7	1/6/37	ND
2/6/10	9,8±0,9	2/6/37	19,9±0,6
0/7/10	24,4±7,2	0/7/37	12,9±0,1
1/7/10	11,5±2,2	1/7/37	18,8±5,7
2/7/10	ND	2/7/37	12,6±1,2
M/10	ND	M/37	ND
MA/10	55,2±15,7	MA/37	39,0±0,7

kde 0/5/10...0 % NaCl, pH 5 a t=10 °C; MA/10...mléko s aminokyselinami při t=10 °C, M/10...mléko bez přídavku aminokyselin při t=10 °C

Zhodnotíme-li aminogenní aktivitu non-startérů (*Lb. brevis* T01 a *Lb. curvatus* T02), kmen *Lb. curvatus* T02 s jeho nižší produkcí biogenních aminů, v porovnání s *Lb. brevis* T01, nelze považovat za kmen, který by byl schopen ohrozit zdravotní nezávadnost výrobku. V reálném systému mléka nedocházelo ve většině případů ke kumulaci tyraminu v rizikových množstvích. Tento kmen kromě nízké produkce prokázal schopnost snižovat pH prostředí svými kyselými metabolity a tím by hypoteticky mohl přispět k omezení rozvoje jiné, více produkční kultury.

5 SOUHRNNÁ DISKUZE

Experimentální část této dizertační práce, kromě skrínungu dekarboxylázové aktivity vybraných kmenů rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, zahrnuje i sledování kinetiky produkce biogenních aminů u pěti kmenů (za podmínek *in vitro*), které mají praktický význam při výrobě fermentovaných výrobků. Do testování byly zahrnuty kmeny probiotické (*Lb. rhamnosus* CCDM 289, *B. lactis* CCDM 239), non-startéry z výroby sýrů (*Lb. brevis* T01 a *Lb. curvatus* T02) a jeden zástupce kontaminant procesu výroby piva (*Lb. brevis* RIBM 2-69). Sledován byl vliv širokého spektra specifických faktorů v různých koncentracích/hodnotách (přidavky laktózy, glycerolu, etanolu, NaCl; pH, kultivační teplota) a jejich vzájemných kombinací. Aktuálnost řešené problematiky a její přínos pro vědu a praxi potvrzuje skutečnost, že v dostupné literatuře není počet studií, které by se zabývaly kinetikou produkce biogenních aminů, ovlivněnou faktory vnějšího prostředí, vůbec vysoký (Moreno-Arribas a Lonvaud-Funel, 1999, s. 55-60; Ancín-Azpilicueta et al., 2008, s. 257-275, Buňková et al. 2011, s. 112-119). Velmi málo studií se také zabývá samotnou dekarboxylázovou aktivitou probiotických kultur (Priyadarshani a Rakshit, 2012, s. 2062-2069 a 2014, s. 69-79). Absence poznatků o dekarboxylázové aktivitě, popisujících vliv vnějších faktorů na rozsah a průběh produkce biogenních aminů, je patrná zvláště u této skupiny pro zdraví jinak prospěšných bakterií. Doposud žádné studie se touto problematikou podrobněji nezabývaly. Dizertační práce se snaží přispět k osvětlení této oblasti.

Z výsledků studií kinetiky produkce *in vitro*, které jsou součástí Experimentu II, byla potvrzena nutnost vnímání tvorby biogenních aminů vybranými kulturami ze dvou pohledů – z hlediska vývoje celkového množství (kinetika produkce; včetně parametrů růstu produkce, λ a μ_m) a z hlediska produkce jednou kolonií tvořící jednotkou (YF).

V rámci této dizertační práce byl také sledován vliv faktorů (NaCl, laktózy, teplota kultivace, přídavek aminokyselin) na kinetiku produkce biogenních aminů vybraných produkčních kmenů (*Lb. brevis* T01 a *Lb. curvatus* T02) v mléce. Produkce *in vitro* a v reálné matici tedy mohly být porovnány, aby došlo k objektivnějšímu posouzení rizika testovaných kmenů v souvislosti se schopností tvořit toxikologicky významná množství biogenních aminů. Rozdíly produkce biogenních aminů zástupců rodu *Lactobacillus* za laboratorních podmínek a v reálné matici nebyly doposud uspokojivě popsány v žádné rozsáhlejší a obecně dostupné práci.

V rámci skrínungu dekarboxylázové aktivity 123 kmenů rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* za podmínek *in vitro* (Experiment I) byla pozorována velká variabilita v zastoupení i rozsahu produkce biogenních aminů. Skrínung navíc potvrdil skutečnost, že je dekarboxylázová aktivita kmenovou specifitou, jako uvádějí studie jiných autorů (Bover-Cid a Holzapfel, 1999, s. 33-41; Bover-Cid et al., 2001, s. 185-189; Buňková et al., 2009, s. 533-538 a 2011, s. 112-119).

Viditelně také v aminogenní aktivitě sehrál roli původ testovaných kmenů. U izolátů non-startérů z procesu výroby sýrů byla produkce tyraminu a ostatních biogenních aminů významnější ($P < 0,05$), než u kultur startérových. Autoři mnohých studií tento fakt nepřímo dokládají. Jako původci vysokých koncentrací biogenních aminů ve fermentovaných výrobcích jsou často označovány non-startérové nebo kontaminující mikroorganismy (Bover-Cid et al., 2003, s. 477-482 a 2006, s. 62-68; Coton et al., 2010, s. 1078-1085). Kmeny bakterií mléčného kvašení, které byly izolovány jako kontaminanty z procesu výroby piva, vykazovaly nejvyšší produkci ze všech testovaných kmenů.

Záměrně by v potravinářských technologiích měly být používány hlavně kmeny, které nemají tendence tvořit vyšší koncentrace biogenních aminů, a to za žádných okolností (Linares et al., 2012, s. 4 a 5). Pro zajištění zdravotní nezávadnosti výsledného výrobku by měl být hodnocen i samotný potenciál aminogenní aktivity daného kmene, tzn. výskyt genů v genomu, které jsou zodpovědné za syntézu biogenních aminů (*European Food Safety Authority*, 2011).

Evropský úřad pro bezpečnost potravin udělil v roce 2007 vybraným druhům rodu *Lactobacillus*, které jsou spojeny s potravinami (*Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. hilgardii*), status QPS (Qualified Presumption of Safety; status kvalifikovaného předpokladu bezpečnosti (Spano et al., 2010, s. 97). Zjednodušeně řečeno, jedná se o status bezpečného používání, který vyplývá z historické zkušenosti a může ho získat jen takový kmen, který svými metabolity neohrozí zdraví konzumenta. Stejně tak jsou na bezpečnost posuzovány i probiotické kultury (*European Food Safety Authority*, 2007, s. 9). I mezi zástupci druhů, kterým byl status QPS udělen, však můžeme najít kmeny, které mají schopnost tvořit biogenní aminy. Tato nepříjemná skutečnost vyvolává otázku, jestli do schvalovací procedury nezahrnout podmínku absence dekarboxylázové aktivity (Spano et al., 2010, s. 97; Linares et al., 2012, s. 4 a 5).

Na základě výsledků této dizertační práce by totiž bylo vhodné ověřovat schopnost produkce biogenních aminů dokonce i u typicky probiotických kultur bifidobakterií (*B. animalis*) a probiotických zástupců laktobacilů (*Lb. rhamnosus*).

Priyadarshani a Rakshit (2011, s. 2062–2069) ve své studii již upozornili na to, že i probiotické kultury laktobacilů mohou produkovat biogenní aminy.

S rostoucím zájmem o funkční probiotické potraviny, by z těchto důvodů měl růst i zájem o kontrolu použitých mikrobiálních kultur. Kromě toho vyvstává také potřeba kontroly faktorů, které mohou významnou měrou ovlivnit kumulaci biogenních aminů v potravinách, jimž je přisuzován dieteticko-léčebný účinek právě díky použitým kulturám. Z výše zmíněných důvodů je vhodné testování dekarboxylázové aktivity bifidobakterií věnovat náležitou pozornost, a to i přesto, že celková množství biogenních aminů vytvořená vybraným kmenem nepřesahují 100 mg/l (Příloha A, Tab. A1).

Během prvotního testování bifidobakterií byl doplňkově sledován vliv dvou různých médií na produkci biogenních aminů. Jak bylo možné očekávat, volba kultivačního prostředí měla velkou relevanci.

Tab. 21: Zastoupení vybraných aminokyselin v komerčním médiu MRS broth, jeho komponentách použitých pro modifikované složené médium v g/l média

	MRS*	beef extract	pepton	yeast extract	suma
tyrozin	0,33±0,02	0,12±0,01	0,15±0,02	0,05±0,00	0,32
cystein	0,15±0,01	0,05±0,00	0,05±0,00	0,10±0,01	0,20
arginin	0,71±0,03	0,45±0,01	0,29±0,01	0,04±0,00	0,78

*MRS...MRS broth; koncentrace, které jsou uvedeny v tabulce, jsou přepočteny z hodnot získaných analýzou suchého média a jeho komponent (g/kg) na jeden litr média, kdy bylo zohledněno dávkování pro přípravu média a zastoupení jednotlivých komponent; suma značí součet množství aminokyselin, který je obsažen v médiu složeném z použitých komponent

Tab. 22: Zastoupení vybraných aminokyselin v obnoveném mléce

	[g/l]
tyrozin	0,51±0,03
cystein	0,04±0,00
arginin	0,41±0,01

Tab. 23: Zastoupení vybraných aminokyselin v bujónu Willkins-Chalgren s přidavkem soya peptonu v g/l média

	WCH *	Soya peptone	suma
tyrozin	0,35±0,05	0,08±0,00	0,43
cystein	1,24±0,02	0,15±0,01	1,39
arginin	0,09±0,00	0,06±0,00	0,15

*WCH...WCH anaerobic broth base; koncentrace, které jsou uvedeny v tabulce, jsou přepočteny z hodnot získaných analýzou suchého média a jeho komponent (g/kg) na jeden litr média, kdy bylo zohledněno dávkování pro přípravu média a zastoupení jednotlivých komponent; suma značí součet množství aminokyselin, který je obsažen v médiu složeném z použitých komponent

Důvodem, proč byly v médiu MRS broth po kultivaci bifidobakterií detekovány nižší koncentrace tyraminu než v médiu WCH, mohou být rozdílné koncentrace prekurzorů konkrétních biogenních aminů. Bujón WCH má o cca 34 % vyšší obsah tyrozinu (Tab. 21-23), prekurzoru tyraminu, než médium MRS broth. Navíc byl ve vzorku tekuté půdy WCH indikován téměř sedmkrát vyšší obsah cysteinu. Ten podpořil snížení oxidoredukčního potenciálu a vytvoření anaerobního prostředí, což je pro bifidobakterie a dekarboxylační

reakce optimální. Spermin byl pak hojněji produkován v médiu MRS broth. Tento rozdíl mohl být opět způsoben aminokyselinovým profilem, kdy výrazně chudší na obsah argininu je médium WCH (6x nižší obsah, Tab. 21, 23). Dále měly také jistě vliv proteolytické schopnosti testovaných kmenů.

Během všech pokusů *in vitro* byl uskutečněn přídavek vybraných aminokyselin do použitých médií. Kromě přidaných volných aminokyselin však již byly v samotném médiu přítomny aminokyseliny, které pocházely z bílkovinných hydrolyzátů (beef extract, pepton aj., Tab. 1), z komponent použitých médií (Tab. 21-23). V tabulkách 21-23 jsou uvedeny obsahy vybraných aminokyselin a jejich množstevní zastoupení. Dané aminokyseliny představují prekurzory dvou nejhojněji produkováných biogenních aminů u zkoušených kmenů, sperminu (arginin > putrescin > spermin) a tyraminu (tyrozin > tyramin).

Předběžné testování vlivu faktorů na produkci biogenních aminů probiotickými kmeny zahrnovalo omezené testování přídavku 0,005 % (w/v) pyridoxalfosfátu. Ten však projevil své podpůrné účinky pouze u *Lb. rhamnosus* CCDM 289 a ne u *B. lactis* CCDM 239. Probiotické bakterie mléčného kvašení a bifidobakterie jsou, dle dostupné literatury, schopny syntézy vitaminů, mezi které náleží i vitamin B6 (Beitane a Ciprovica, 2011, s. 95; Rudolfová a Čudra, 2005, s. 168). Tato schopnost je řazena k benefitům, které lidskému organismu probiotika přináší. Je tedy možné, že pyridoxalfosfát zužitkovaný na tvorbu vitaminu B6 bude v případě probiotických mikroorganismů důvodem, proč produkce biogenních aminů zástupci těchto kultur nedosahuje vysokých hodnot. Schéma metabolismu vitaminu B6, který se vyskytuje u některých kmenů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, je dostupné v databázi Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, ©1995-2015d). Mnohem pravděpodobnější se však zdá možnost, že byl pyridoxalfosfát využit pro syntézu jiných pyridoxalfosfát-dependentních enzymů. Například kmen *Bifidobacterium breve* ACS-071-V-Sch8b dle databáze Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, ©1995-2015e) a databáze UniProt (*UniProt Consortium*, ©2002-2015b) je schopen tvorby enzymu, který bychom mohli zařadit mezi cystationin beta-lyázy (EC 4.4.1.8). Zmíněný enzym se účastní metabolismu cysteinu a metioninu. Právě cystein byl v kultivačním prostředí MRS a WCH zastoupen v nemalém množství, kdy byla jeho přítomnost kvitována kvůli snížení redoxpotenciálu růstového prostředí anaerobních bifidobakterií.

Z výsledků studie kinetiky produkce *in vitro*, které byly součástí Experimentu II, byla potvrzena nutnost vnímání tvorby biogenních aminů vybranými kulturami ze dvou pohledů – z hlediska vývoje celkového množství a z hlediska faktoru produkce jednou buňkou.

V některých případech testované faktory modifikovaly růstové prostředí natolik, že výrazně ovlivnily růst (CFU/ml) testovaných kmenů. Jednalo se zvláště o nižší teploty kultivace. Tento jev bylo možné již před pokusy predikovat. Co ale nebylo možné jednoznačně předpokládat, že vliv kombinací faktorů na produkci jednou buňkou a celkové množství biogenních aminů nemusí korespondovat. Nelze totiž jednoznačně tvrdit, že např. nízké pH (<5) sníží dekarboxylázovou aktivitu. Nízké pH sice může omezit růst a v konečném důsledku celkovou produkci biogenních aminů, avšak z pohledu produkce jednou buňkou, jako součást obranného mechanismu proti překyselení (Molenaar et al., 1993, s. 2864–2870), může indukovat zvýšenou syntézu dekarboxyláz a podpořit tak aminogenní aktivitu kmenů. Konkrétním příkladem takového výsledku byla produkce tyraminu u *Lb. rhamnosus* CCDM 289, kdy byla nejvyšší produkce jednou buňkou sledována v médiu s pH 4. Dále pak stejný jev vlivu nízkého pH mohl být pozorován při některých kombinacích faktorů u *Lb. brevis* T01, *Lb. curvatus* T02.

Vliv nízké teploty na produkci biogenních aminů lze ve většině případů generalizovat (snížení celkové produkce i produkce jednou buňkou). Výjimkou byl ale např. kmen *Lb. curvatus* T02, kdy vyšší testovaná teplota sice podpořila celkovou produkci, ale při nižší testované teplotě pak bylo možné pozorovat srovnatelnou nebo vyšší produkci tyraminu jednou buňkou v rámci širokého spektra kombinace faktorů.

Z výsledků Experimentu II pro *Lb. brevis* T01 a *Lb. curvatus* T02 lze dále vyvodit, že stěžejní vliv na produkci biogenních aminů (zvláště tyraminu) měly spíše ostatní testované faktory (pH, teplota, koncentrace soli), než samotný přídavek laktózy. I v médiích, kde nebyl přídavek laktózy uskutečněn, byly detekovány produkty dekarboxylačních reakcí mnohdy v nemalém množství. Vliv přídavku laktózy pro dekarboxylázovou aktivitu testovaných kmenů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* spočíval hlavně v tom, že díky fermentatornímu metabolismu kmenů, sloužil k okyselení růstového prostředí. Pokles pH na hodnotu optimální pro činnost dekarboxyláz pak podporuje jejich činnost a tím pádem i kumulaci biogenních aminů. Tyto výsledky souhlasí s výsledky studie Buňkové et al. (2011, s. 112-119).

Přidávky laktózy mohou podpořit růst kultury, ale pokud je růstové prostředí nutričně bohaté, nemusí být její přítomnost v konečném důsledku stěžejní ani pro celkovou produkci biogenních aminů. Tuto skutečnost zmínila ve své studii již Buňková et al. (2011, s. 117). V médiích, která byla nastavena na vyšší iniciační pH (pH 6 a 7), měl přídavek laktózy významnější vliv na produkci tyraminu, než v médiích s nižším iniciačním pH (pH 5). Obdobná situace mohla být sledována při testování probiotického kmene *Lb. rhamnosus*

CCDM 289, kdy byl místo laktózy přidáván glycerol. Princip působení byl ale totožný. Dle studie Molenaar et al. (1993, s. 2864-2870) mohou dekarboxylační reakce poskytovat buňkám potřebnou energii. Díky tomu suboptimální kultivační podmínky, myšleno bez zkvasitelného sacharidu jako zdroje energie, mohou v konečném důsledku podpořit produkci biogenních aminů (Buňková et al., 2011, s. 117).

Na základě výsledků této dizertační práce lze tvrdit, že vyšší přídavek zkvasitelného cukru v kombinaci s ostatními příznivými podmínkami pro rozvoj kultury (optimální iniciační pH, teplota kultivace) naopak může mít za následek zrychlený počáteční nárůst mikroflóry, který je za anaerobních podmínek spojený se zvýšením intenzity fermentační aktivity. Fermentační aktivita pak vede k příliš prudkému poklesu pH kultivačního prostředí, jež ovlivňuje rozvoj kultury (snižování CPM), ale také k omezení aktivity enzymů, pro jejichž činnost nemá prostředí vhodné pH. V rámci zkoušených koncentrací sacharidů a jejich derivátů totiž není vhodné uvažovat o inhibičním působení koncentrací z důvodů osmotické aktivity.

V médiu, které mělo koncentrací laktózy připomínat prostředí mléka, byla podpořena celková produkce tyraminu (kmeny *Lb. brevis* T01, *Lb. curvatus* T02) a stejně tak jeho produkce jednou buňkou (*Lb. brevis* T01; *Lb. curvatus* T02 minimální vliv). Koncentrace laktózy byla v těchto médiích 4,8 %, avšak iniciační pH bylo téměř 7,00. Díky kyselým produktům došlo ke snížení pH na hodnotu optimální pro činnost dekarboxyláz. Na tomto příkladu je jasně patrný význam současného působení faktorů.

Přídavek NaCl v rámci testovaných koncentrací (≤ 2 % (w/v)) způsobil u *Lb. brevis* T01, *Lb. rhamnosus* T02 a *B. lactis* CCDM 239 podporu produkce tyraminu. Jak již bylo v rámci výsledkové části uvedeno, tento jev souvisí s fyziologickým významem sodných iontů. Závěr, že má přídavek soli v přiměřených koncentracích pozitivní vliv na dekarboxylázovou aktivitu bakterií, je v souladu se zjištěními studií Buňkové et al. (2011, s. 112-119), Emborg a Dalgaard (2008, s. 226-233), Santos et al. (2003) a Greif et al. (2006, s. 21-29). Pokud však byla do prostředí přidána i laktóza ($>0,5$ % (w/v)), tento efekt nebyl vždy pozorován. Důvodem mohlo být okyselení kultivačních médií prostřednictvím fermentace laktózy a současné působení NaCl, který je v konzervačních technologiích používán jako faktor sloužící ke zvyšování odolnosti prostředí.

Jestliže srovnáme růstové křivky zkoušených mikroorganismů (Přílohy A-I) s křivkami produkce tyraminu (Experiment II a III), můžeme souhrnně konstatovat, že ve většině případů (testovaných faktorů a kmenů) produkce začala v exponenciální fázi růstu. Toto zjištění souhlasí se závěry studií Buňkové et al. (2011, s. 112-119) a Bover-Cid et al. (2008, s. 269-

277). Při méně příznivých kombinacích faktorů pak byla zvýšená produkce sledována ve fázi stacionární. Kumulace tyraminu byla pozorována s časovým zpožděním, které převyšovalo lag fázi růstu mikroorganismu.

Kromě mnohokrát zmiňovaného tyraminu byly v prostředí po kultivaci většiny kmenů detekovány polyaminy, nejčastěji spermin. V rámci odběrových časů vzorky vykazovaly vždy kolísavý obsah tohoto polyaminu. Navíc nebyl pozorován stejný trend působení faktorů na produkci sperminu. Opačné působení pH, přítomnosti zkvasitelných cukrů a teploty mohlo být zapříčiněno odlišným fyziologickým významem polyaminů. Mnohokrát byla v této dizertační práci připomínána důležitost polyaminů pro buněčné dělení. Vliv však může mít i samotná metabolická dráha a meziproducty vzniku polyaminů. Spermin totiž není výsledkem jednoduché dekarboxylace aminokyselin, ale jeho syntéza závisí na činnosti dekarboxyláz a ostatních enzymů. Jeho vznik je závislý na komplexu biosyntetických reakcí (Bardócz, 1995, s. 341).

Decarboxylázová aktivita kmenů *Lb. brevis* T01 a *Lb. curvatus* T02 byla, kromě pokusů v laboratorním médiu, pozorována v mléce s/bez přidavku NaCl, aminokyselin a úpravou pH. Za podmínek prostředí mléka byla sledována nižší produkce tyraminu než v laboratorním médiu. Vyšší koncentrace tyrozinu než v laboratorním médiu však byla detekována v mléce. Naopak tomu bylo u argininu (Tab. 20 a 21). Produkce sperminu ale byla srovnatelná. Produkce tyraminu/tyrozindecarboxylázová aktivita očividně nezávisela jen na koncentraci prekurzoru. Významně se podílel obsah jiných komponent růstového prostředí.

Výše uvedené non-startérové kultury byly schopné růst a produkovat biogenní aminy (tyramin a spermin) i za podmínek, které jim poskytovalo mléko. Sůl ani nejnižší zkoušené pH nemělo výrazný vliv na celkovou produkci tyraminu. Dokonce v některých případech produkci změna pH a přidavek soli podpořily. Reálné riziko, které by spočívalo v ohrožení zdraví spotřebitele, by hypoteticky mohlo způsobit v mléčných výrobcích zvláště pomnožení *Lb. brevis* T02. *Lb. curvatus* T01 by mohl, při své nízké aminogenní aktivitě, nepříznivě ovlivnit zdraví citlivých jedinců, nebo osob léčených psychofarmaky.

Otázkou také zůstává, jestli by producenti biogenních aminů, kteří jsou přítomni ve fermentovaných potravinách a nápojích, byli schopni přežít podmínky v lidském gastrointestinálním traktu, kdy během trávení může hodnota pH prostředí poklesnout až na hodnotu pH 2.

Zástupci druhu *Lb. brevis* byli v mnohých studiích označeni za producenty biogenních aminů (Moreno-Arribas a Lonvaud-Funel, 1999, s. 55-60; Kim a Ji, 2014, on-line; Sebastian et al., 2011, s. 300-309; Araque et al., 2013, s. 107-113; Petri et al., 2013, s. 48-54).

Russo et al. (2012, s. 247-257) ve své studii, která se zabývala vybraným kmenem *Lb. brevis* a jeho aminogenní aktivitou v prostředí simulujícím podmínky v zažívacím traktu člověka, uvedl, že byl schopen i za těchto podmínek produkovat tyramin. Podmínky simulovaly nejen vývoj pH, ale také působení travičích enzymů. Výsledky studie naznačily, že kmen produkuje biogenní aminy, aby se bránil gastrickému stresu. Nízké pH (<4,1) viditelně snížilo viabilitu kmene, ale indukovalo produkci tyraminu, kdy významné koncentrace tohoto biogenního aminu byly pozorovány ve vzorcích, které byly vystaveny pH 1,8 (Russo et al., 2012, s. 2). Na základě sledovaných faktorů pak autoři studie uvádí, že by kmen mohl osídlit duodenum, tenké i tlusté střevo díky svým adhezivním schopnostem (Russo et al., 2012, s. 7). Pokud by i námi testovaný kmen *Lb. brevis* T02 podmínky v travičí soustavě přežil, existovala by pravděpodobnost produkce biogenních aminů a případné nepříznivé účinky na lidské zdraví.

V souvislosti s testováním probiotických kultur lze konstatovat, že i když jsou schopné tvorby detekovatelných koncentrací biogenních aminů, jimi vytvořená množství nejsou tak vysoká, aby ohrozila zdravé jedince. Problém by mohla hypoteticky způsobit oslabeným, nebo psychofarmaky léčeným osobám. Je totiž známo, že již 6 mg tyraminu může způsobit hypertenzi (Horwitz et al., 1964, s. 1108-1110). Tato skutečnost podtrhuje nutnost, podpořit výše uvedený návrh parametru nulové aminogenní aktivity pro udělování statusu QPS i probiotickým kulturám.

V souvislosti s interferencí psychofarmak na detoxikační systém lidského organismu je třeba zmínit i vliv etanolu.

Pivo náleží mezi nápoje, které mohou u některých spotřebitelů způsobovat zdravotní komplikace zvláště z důvodů současné přítomnosti biogenních aminů a etanolu. U některých pacientů, kteří užívají léky inhibující detoxikační enzym monoaminoxidázu, může dojít k náhlému zvýšení krevního tlaku, dokonce i po konzumaci nealkoholického piva. Problémy způsobuje právě přítomnost tyraminu. Bylo dokázáno, že příjem tyraminu >6 mg/l v rámci čtyř hodin může způsobit osobě léčené psychofarmaky zdravotní komplikace. Zdravotní potíže může tedy způsobit například v daném časovém intervalu konzumace 1 litru piva s celkovým obsahem tyraminu 10 mg/l (Tailor et al., 1994, s. 5-14).

Testovaný kmen *Lb. brevis* RIBM 2-69 byl schopen vyprodukovat i mnohonásobně vyšší množství tyraminu v přítomnosti etanolu, včetně nejvyšší zkoušené koncentrace etanolu.

Moreno-Arribas a Lonvaud-Funel (1999, s. 59) ve své studii uvádí, že produkce tyraminu izoláty *Lb. brevis* z vína nebyla inhibována ani při 10% (v/v) koncentraci etanolu. Subexperiment založený s *Lb. brevis* RIBM 2-69, který byl izolován z piva, poskytuje však odlišné výsledky. V rámci zkoušení vlivu etanolu na produkci biogenních aminů bylo možné pozorovat mírné potlačení dekarboxylázové aktivity již při přidavku 3 % (v/v). Víno disponuje mnohem vyšším obsahem etanolu (8-13 % (v/v) než má např. běžný ležák (4,6-5,0 % (v/v)). Z těchto důvodů lze předpokládat, že právě původ kmene a adaptace na prostředí s vyšším obsahem etanolu, sehrály důležitou roli.

Dalším důležitým faktorem, který by mohl nárůst kmene a celkovou produkci biogenních aminů ovlivnit, je přítomnost hořkých látek chmele. Zvláště vliv přísadků různých koncentrací izohumulonů, které v pivu převažují, bude zkoumán v dalších experimentech navazujících na tuto dizertační práci.

Vzhledem ke složitosti systému potravinových matic a na základě výše zjištěných dat vlivu testovaných faktorů, nelze se stoprocentní jistotou doporučit jednotné rozsahy hodnot, které by způsobily výrazné omezení aminogenní aktivity všech kmenů laktobacilů a bifidobakterií, aniž by došlo k ovlivnění technologických postupů a sensorické jakosti výrobků. Výstupy experimentů této dizertační práce však poskytují cenné informace, které mohou posloužit k objasnění produkce biogenních aminů v určitých fázích výroby u zástupců vybraných druhů. Poukazují také na význam spolupůsobení faktorů na celkovou produkci a produkci jednou buňkou.

6 PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI

Fermentované potraviny a nápoje jsou běžnou součástí stravy člověka. Obsah biogenních aminů může ohrozit zdraví spotřebitelů, proto je nutné minimalizovat kumulaci biogenních aminů v těchto výrobcích. V poslední době navíc roste obliba probiotických funkčních výrobků, které mají pozitivní vliv na lidské zdraví. Obsah biogenních aminů v těchto výrobcích pak může znamenat ohrožení jejich ryze kladného působení.

V oblasti vědního oboru lze vidět přínos dizertační práce zejména v následujících aspektech:

- rozsáhlý skríníng dekarboxylázové aktivity kmenů rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* zahrnující 123 kmenů;
- zjištění produkce detekovatelných koncentrací biogenních aminů probiotickými kmeny;
- výsledky vlivu širokého spektra faktorů na produkci biogenních aminů probiotickými, non-startérovými a kontaminujícími kulturami;
- zhodnocení vlivu specifických hodnot a koncentrací faktorů na celkovou produkci biogenních aminů a produkci jednou buňkou u pěti kmenů, které mají technologický význam při výrobě fermentovaných potravin a nápojů;
- vyhodnocení souvislostí mezi vývojem pH prostředí, růstového chování kultur a dekarboxylázovou aktivitou *in vitro* i v reálné potravinové matici;
- studie kinetiky produkce biogenních aminů u pěti kmenů *in vitro* zahrnující zhodnocení parametrů růstu produkce (λ , μ_m) a zhodnocení produkce jednou kolonií tvořící jednotkou (YF);
- zhodnocení rozdílů produkce biogenních aminů zástupců rodu *Lactobacillus* za laboratorních podmínek a v reálné matici;
- zjištění schopnosti vybraných kmenů laktobacilů a bifidobakterií produkovat spermin.

V oblasti praktického použití lze vidět přínos dizertační práce zejména v následujících aspektech:

- ověření bezpečnosti vybraných kmenů laktobacilů a bifidobakterií, které jsou nebo by mohly být používány v technologické praxi, nebo se jí mohou nechtěně účastnit;
- zdůraznění nutnosti testování probiotických kultur na schopnost produkovat biogenní aminy;

- přehled vlivů relevantních faktorů ve specifických koncentracích, které ovlivňují dekarboxylázovou aktivitu technologicky významných kmenů rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* za modelových podmínek;
- zdůraznění komplexnosti vlivů a individuálních reakcí kmenů na změnu růstových podmínek (nejen množství samotných prekurzorů, nebo samotné koncentrace zkvasitelného cukru ovlivňuje vyprodukované množství biogenních aminů);
- zdůraznění reálného rizika přežití testovaných dekarboxyláza-pozitivních kmenů non-startérových laktobacilů a pivních kontaminant v gastrointestinálním traktu člověka;
- výsledky tvorby biogenních aminů u dvou kmenů non-startérů, které byly izolovány z procesu výroby sýrů za podmínek *in vitro* a v mléku; výstupy subexperimentů poukazují na potenciální kritické body výroby fermentovaných výrobků, ve kterých by mohlo dojít ke kumulaci biogenních aminů.

7 ZÁVĚR

Na základě výsledků z experimentální části lze vyvodit následující:

- rozsah dekarboxylázové aktivity je u bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií kmenovou záležitostí; v rámci skríningu produkce biogenních aminů u vybraných kmenů mléčného kvašení a bifidobakterií byla sledována schopnost tvorby těchto substancí v rámci jednoho druhu;

- mezi probiotickými kmeny lze nalézt dekarboxyláza pozitivní kmeny schopné produkce biogenních aminů, proto by měly být kontrolovány před použitím ve výrobě funkčních potravin;

- vybrané kmeny laktobacilů i bifidobakterií měly tendenci tvořit zvláště tyramin a dále vybrané polyaminy (putrescin a převážně spermin), přičemž zejména tyramin je spolu s histaminem považován z biogenních aminů za nejtoxičtější a jeho obsah v potravinách by tedy měl být přísně sledován a omezován;

- většina zahrnutých kmenů nebyla schopna vyprodukovat takový objem tyraminu, který by mohl ohrozit zdraví spotřebitele (zdravé osoby s aktivním detoxikačním systémem bez interference s farmaky a alkoholem);

- faktory (přídavek NaCl a laktózy, přítomnost etanolu, úprava pH a teploty kultivace) nemusí na dekarboxylázovou aktivitu působit jednoznačně, kdy mohou zvyšovat/snižovat celkovou produkci a naopak snižovat/zvyšovat produkci biogenních aminů jednou buňkou v závislosti na přívětivosti kultivačních podmínek;

- probiotické kultury nevynikaly rozsáhlou aminogenní aktivitou, což lze chápat jako velmi pozitivní zjištění;

- testované kmeny laktobacilů i bifidobakterií byly často schopny produkce sperminu. Tvorba sperminu příslušníky zmíněných rodů není v současnosti dostatečně prozkoumána. Dizertace tak může přispět k rozšíření této oblasti vědění.

- non-startérová kultura *Lb. brevis* T01 byla schopna vyprodukovat v rámci sledovaných faktorů za podmínek *in vitro* množství tyraminu (>100 mg), které by mohlo ohrozit lidské zdraví;

- etanol neomezil produkci tyraminu kmenem *Lb. brevis* RIBM 2-69 natolik, aby vyprodukované množství nedosahovalo koncentrací, které by mohly společně interferovat s detoxikačním systémem a způsobit zdravotní komplikace zvláště citlivějším jedincům;

- nízké pH v mnohých případech (např. u *Lb. brevis* T01, *Lb. curvatus* T02) způsobilo omezení rozvoje kultur, ale podpořilo dekarboxylázovou aktivitu testovaných kmenů;
- významný vliv na celkovou produkci měla teplota, kdy vyšší kultivační teplota podpořila růst aminogenních kultur; nízká teplota pak v některých případech způsobila nárůst produkce tyraminu jednou buňkou;
- přidavek NaCl do růstového prostředí v rámci testovaných koncentrací (0-2 % (w/v)) nepůsobil výraznou inhibicí na růst ani na produkci tyraminu non-startéry *Lb. brevis* T01 a *Lb. curvatus* T02;
- v reálném systému mléka byla pozorována nižší produkce tyraminu kmeny *Lb. brevis* T01, *Lb. curvatus* T02, než v modelových podmínkách laboratorního média, což je pro praktickou aplikaci kmenů a bezpečnost fermentovaných výrobků přívětivým zjištěním.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABU-TARABOUSH H.M., H.M. AL-DAGAL a M.A. AL-ROYLI. Growth, Viability and Proteolytic Activity of Bifidobacteria in Whole Camel Milk. *Journal of Dairy Science*. 1998, roč. 81, s. 354-361. ISSN: 1525-3198

ADAMS Martin a M.J.R. NOUT. Fermentation and Food safety. New York: Aspen Publishers, ©2001, s. 121 a 126. ISBN 0-8342-1843-7

ALVAREZ, F., R. MEDINA, S.E. PASTERIS, A.M. STRASSER DE SAAD a F. SESMA. Glycerol metabolism of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469: cloning and expression of two glycerol kinase genes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2004, roč. 7 vyd., s. 170-181. ISSN: 1464-1801

AMBROŽOVÁ, Jana. Mikrobiologie v technologii vod, 1. vydání. Praha: Vysoká škola chemicko technologická v Praze. ©2004, s. 109. ISBN 80-7080-534

ANCÍN-AZPILICUETA, C., A. GONZÁLES-MARCO a N. JIMÉNEZ-MORENO. Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008, roč. 48, s. 257-275. ISSN: 0975-8402

ARAQUE, I., A. BORDONS a C. REGUANT. Effect of Ethanol and Low pH on Citrulline and Ornithine Excretion and arc Gene Expression by Strains of *Lactobacillus brevis* and *Pediococcus pentosaceus*. *Food Microbiology*. 2013, roč. 33, s. 107-113. ISSN:0740-0020. Dostupné také z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.005>

ARENA, Mario E. a Maria C. MANCA DE NADRA. Biogenic amine production by *Lactobacillus*, *Journal of Applied Microbiology*. 2001, roč. 90, s. 158-162. 158-162. ISSN: 1364-5072

ARENA, M.E., D. FIOCCO, M.C., MANCA DE NADRA, I. PARDO a G. SPANO. Characterization of a *Lactobacillus plantarum* strain able to produce tyramine and partial cloning of a putative tyrosine decarboxylase gene. *Current Microbiology*. 2007, roč. 55, s. 205-210. ISSN:0343-8651

AXELSON, Lars. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: S. Salmien, A. von Wright ed. Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects, New York: Marcel Dekker. ©1998, s. 1-72. ISBN: 9781439836774

BAIXAS-NOGUERAS, S., S. BOVER-CID, M. T. VECIANA-NOGUÉS a M.C. VIDAL-CARROU. Amino acid-decarboxylase activity in bacteria associated with Mediterranean hake spoilage. *European Food Research and Technology*. 2003, roč. 217, s. 164-167. ISSN: 1438-2385

BARDÓCZ, Susan. Polyamine in foods and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science and Technology*. 1995, roč. 6, s. 341–346. ISSN: 0924-2244

BARDÓCZ, S., T.J. DUGUID, D.S. BROWN, G. GRANT, A.PUSZTAI, A. WHITE a A. RALPH. The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. *British Journal of Nutrition*. 1995, roč. 73, s. 819-829. ISSN: 1475-2662

BASAŘOVÁ, G., J. ŠAVEL, P. BASAŘ a T. LEJSEK. Pivovarství: Teorie a praxe výroby piva. Praha:Vydavatelství VŠCHT. ©2010, s. 561 a 562. ISBN: 978-80-7080-734-7

BEHR, J., M.G. GÄNZLE a R.F. VOGEL. Characterization of a highly hop-resistant *Lactobacillus brevis* strain lacking hop transport. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, roč. 72, s. 6483-92. ISSN: 1462-2920

BEHR, Jürgen a Rudi F. VOGEL. Mechanisms of Hop Inhibition Include the Transmembrane Redox Reaction. *Applied an Environmental Microbiology*. 2010, roč. 76, s. 142-149. ISSN: 1462-2920

BEITANE, Ilze a Inga CIPROVICA. The study of added prebiotics on b group vitamins concentration during milk fermentation. *Romanian Biotechnological Letters*. 2011, roč. 16, s. 92-96. ISSN: 1224-5984. Dostupné také z: www.rombio.eu/rbl6vol16Supplement/13%20Beitane.pdf

BIAVATI, B., M. VESCOVO, S. TORRIANI a V. BOTTAZZI. *Bifidobacteria: History, Ecology, Physiology and Applications*. *Annals of Microbiology*. 2000, roč. 50, s. 117-131. ISSN: 1590-4261

BIASE, D., A. TRAMONTI, F. BOSSA a P. VISCA. The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. *Molecular Microbiology*. 1999, roč. 32, s. 1198-1211. ISSN: 0026-8933

BOVER-CID S, T. HERNÁNDEZ-JOVER , M.J. MIGUELÉZ-ARRIZADO. a M.C.VIDAL CAROU. Contribution of contaminant enterobacteria and lactic acid bacteria to biogenic amine accumulation in spontaneous fermentation of pork sausages. *European Food Research and Technology*. 2003, roč.. 216, s. 477-482. ISSN:1438-2377

BOVER-CID, Sara a Wilhelm Heinrich HOLZAPFEL. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, roč. 53, s. 33-41. ISSN: 0168-1605

BOVER-CID, S., M. HUGAS, M. IZQUIERDO-PULIDO a C. VIDAL-CAROU. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, roč. 15, s. 185-189. ISSN: 0168-1605

BOVER-CID, S., M. HUGAS, M. IZQUIERDO-PULIDO a C. VIDAL-CAROU. Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid-decarboxylase starter culture for fermentation of fuet sausages. *Journal of Food Protection*. 2000, roč. 63, s. 237–243. ISSN: 1944-9097

BOVER-CID, S., M. HUGAS, M. IZQUIERDO-PULIDO a C. VIDAL-CAROU. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, roč. 66, s. 185-189. ISSN: 0168-1605

BOVER CID, S., M.J. MIGUÉLEZ-ARRIZADO, B. BECKER, W.H. HOLZAPEL a VIDAL-CAROU MC. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiology*. 2006, roč. 25, s. 269-277. ISSN: 0740-0020

BUŇKOVÁ, L., G. ADAMCOVÁ, K. HUDCOVÁ, H. VELICHOVÁ, V. PACHLOVÁ, E. LORENCOVÁ a F. BUŇKA. Monitoring of biogenic amines in cheeses manufactured at small-scale farms and in fermented dairy products in the Czech Republic. *Food Chemistry*. 2013, roč. 141, s. 548–551. ISSN: 0308-8146

BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, M. HLOBILOVÁ, Z. VAŇÁTKOVÁ, D. NOVÁKOVÁ, V. DRÁB. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*. 2009, roč. 229, s. 533-538. ISSN: 1438-2377

BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, G. MANTLOVÁ, A. ČABLOVÁ, I. SEDLÁČEK, P. ŠVEC, V. PACHLOVÁ a S. KRÁČMAR. The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. *Food Microbiology*. 2010, roč. 27, s. 880–888. ISSN: 0740-0020

BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, E. POLLAKOVÁ, T. PODEŠVOVÁ a V. DRÁB. The effect of lactose, NaCl and an aero/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase activity of

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, roč. 147, s. 112–119. ISSN: 0168-1605

BURDYCHOVÁ, Radka. Mikrobiologická detekce probiotických mikroorganismů ve fermentovaných mléčných výrobcích. *Acta Universitatis, Acta univ. Agric. Et silvic. Mendel. Brun., LIV*. 2007, vyd. 2, s. 15-17. ISSN: 1211-8516

BURDYCHOVÁ, Radka a Tomáš KOMPRDA. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiology Letters*. 2007, roč. 276, s. 149-155. ISSN: 1574-6968. Dostupné také z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.2007.00922.x/pdf>

CARUSO, M., C. FIORE, M. CONTURSI, G. SALZANO, A. PAPARELLA a P. ROMANO. Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2002, roč. 18, s. 159-163. ISSN: 1573-0972. Dostupné také z: <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1014451728868>

COTON M, A. ROMANO , G. SPANO, K. ZIEGLER, C. VETRANO, C. DESMARIAS, A. LONVAUD-FUNEL, P. LUCAS a E. COTON. Prevalence and biodiversity of biogenic amine forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiology*. 2010, roč. 27, s. 1078 -1085. ISBN: 0740-0020.

CLAESSON, M., D. VAN SINDEREN a P. O'TOOLE. The genus *Lactobacillus* a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiology Letters*. 2007, roč. 269, s. 22–28. ISSN: 1574-6968

ČERNÝ, V., E. KVASNIČKOVÁ, Š. HAVLÍKOVÁ a L. KALHOTKA. Výskyt mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou v sýrech. *Mlékařské listy*. 2009, roč. 116, s. 16-18. ISSN 1212-950X

ČESKO. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 298/1997 ze dne 28. listopadu 1997, zrušeno dne 1. března 2002

DADÁKOVÁ, E., P. KŘÍŽEK a T. PELIKÁNOVÁ. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. 2009, roč. 116, s. 365-370. ISSN: 0308-8146

DE LAS RIVAS, B., A. MARCOBAL a R. MUÑOZ. Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines. *FEMS Microbiology Letters*. 2005, roč. 244, s. 367-372. ISSN: 1574-6968

DELOYER, P., O. PEULEN a P. DANDRIFOSSE. Dietary polyamines and non-neoplastic growth and disease. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2001, roč. 13, s. 1027-1032. ISSN:1473-5687

DI MARIA, S., A.L. BASSO, E. SANTORO, L. GRAZIA a R. COPPOLA. Monitoring of *Staphylococcus xylosum* DSM 20266 added as starter during fermentation and ripening of soppressata molisana, a typical Italian sausage. *Journal of Applied Microbiology*. 2002, roč. 92, s. 158-164. ISSN: 1365-2672.

DRAUZ, K., H. GRÖGER a O. MAY, ed. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, 3. vyd. New York: Willey-VCH, ©2012. ISBN: 978-3-527-32547-4

EL-BAKRY, Mamdouh. Salt in Cheese: A Review. *Current Research in Dairy Sciences*. 2012, roč. 4, s. 1-5. ISSN: 1994-5434

EL-SODA, M., A. MACEDO a N.F. OLSON. The peptide hydrolase system of *Bifidobacterium* species. *Milchwissenschaft*. 1992, roč. 47, s. 87-90. ISSN: 0026-3788

EMBORG, Jette a Paw DALGAARD. Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation on *Morganella morganii*. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, roč. 128, s. 226-233. ISSN: 0168-1605

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 2011, s. 9. [on-line]. [cit. 10. dubna 2014]. Dostupné z: www.efsa.europa.eu/de/scdocs/doc/587.pdf

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods, *European Food Safety Authority Journal* z října 2011; 9(10):2393. [on-line]. [cit. 10. dubna 2014]. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2393.pdf>

EUZÉBY, Jean P.. *Bifidobacterium*. In: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature [on-line]. [cit. 15. července 2012]. Dostupné z: <http://www.bacterio.cict.fr/b/bifidobacterium.html>

EUROPEAN BIOINFORMATICS Institute, European Molecular Biology Laboratory: IPR011193 Ornithine/lysine/arginine decarboxylase [on-line], [cit. 1. září 2011]. Dostupné z: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/DisplayproEntry?ac=IPR011193>. Citováno: 01/09/2011

EVROPSKÁ UNIE. NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny [on-line]. [cit. 5. července 2012]. Dostupné

[z:http://eur-](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:CS:PDF)

[lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:CS:PDF](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:CS:PDF).

FADDA, S., G. VIGNOLO a G. OLIVER. Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and Kocuria strains. *Biotechnology Letters*. 2001, roč. 23, s. 2015-2019. ISSN:014-5492

FELIS, Giovanna E. a Franco DELLAGIO. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues Intestinal Microbiology*. 2007, roč. 5, s. 44-61. ISSN: 1466-531X

FERNÁNDEZ, M., A.B. FLÓREZ, D.M. LINARES, B. MAYO a M.A. ALVAREZ. Early PCR detection of tyramine-producing bacteria during cheese production. *Journal of Dairy Research*. 2006, roč. 73, s. 318-321. ISSN: 1469-7629

FERNÁNDEZ DE PALENCIA, P, M. FERNÁNDEZ, M.L., MOHEDANO, V. LADERO, C. QUEVEDO, M.A. ALVAREZ a P. LÓPEZ. The role of tyramine synthesis by food-borne *Enterococcus durans* in the adaptation to the gastrointestinal tract environment. *Applied Environmental Microbiology*. 2011, roč. 77, s. 699–702. ISSN: 1098-5336

FERNÁNDEZ, M., D.M. LINARES, A. RODRÍGUEZ a M.A., ALVAREZ. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, roč. 73, s. 1400-1406. ISSN: 1432-0614

FOX, PATRIC. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Second Edition, New York: An Aspen Publication, ©1999, s. 245. ISBN: 0412 53 500

GARAI, G., M.T. DUEÑAS, A. IRASTORZA a M.V. Moreno-Arribas. Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. *Letters in Applied Microbiology*. 2007, roč. 45, s. 473–478. ISSN: 1472-765X

GARCÍA-ALEGRÍA, E., I. LÓPEZ, J. I. RUIZ, J. SÁENZ, E. FERNÁNDEZ, M. ZARAZAGA, M. DIZY, C. TORRES a F. RUIZ-LARREA. High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiology Letters*. 2004, roč. 230, s. 53-61. ISSN: 1574-6968

GARDINI, F., M. MARTUSCELLI, M.C. CARUSO, F. GALGANO, M.A. CRUDELE, F. FAVATI, M.E. GUERZONI a G. 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, roč. 64, s. 105-117. ISSN: 0168-1605

GARDINI, F., A. ZACCARELLI, N. BELLETI, F. FAUSTINI, A. CAVAZZA, M. MARTUSCELLI, D. MASTROCOLA a G. SUZZI. Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model systém. *Food Control*, 2005, roč. 16, s. 609-616. ISSN: 0956-7135

GERBAUX, Vincent a Christine MONAMY. Les amines biogenes dans les vins de Bourgogne – 1. část: Teneurs origine et maitrise dans les vins. *Revue Francaise d'Oenologie* [on-line]. 2000, roč. 183, s. 23-26 [cit. 2014-02-09]. ISSN: 0395-899X. Dostupné z: http://www.oenologuesdefrance.fr/gestion/fichiers_publications/Gerbaux_Mo.pdf

GERNER, Eugene W. A Frank L. MEYSKENS. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nature Reviews Cancer*. 2004, roč. 4, s. 781-792. ISSN:1474-175X

GENNARO, M.C., V. GIANOTTIA, E. MARENCO, D. PATTONO a M.R. TURI. A chemometric investigation of the effect of the cheese-making process on contents of biogenic amines in a semi-hard Italian cheese (Toma). *Food Chemistry*. 2003, roč. 82, s. 545-551. ISSN: 0308-8146

GILL, Harsharnjit S. a Francisco GUARNER. Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgradual Medical Journal*. 2004, roč. 80, s. 516–526. ISSN: 1469-0756

GOMES, A. A., S. P. BRAGA, A. G. CRUZ, R. S. CADENA, P. C. B. LOLLO, C. CARVALHO, J. AMAYA-FARFÁN, J. A. F. FARIA a H. M. A. BOLINI. Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance towards commercial cheeses. *Journal of Dairy Science*. 2011, roč. 94, s. 4777-4786. ISSN: 1525-3198

GÖRNER, Fridrich a Lubomír VALÍK. Aplikovaná mikrobiológia požívatin. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, ©2004, s. 528. ISBN 80-967064-9-7

GREENE, J.D. a Todd R. KLAENHAMMER. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Applied Environmental Microbiology*. 1994, roč. 60, s. 4487–4494. ISSN: 1098-5336

GREIF, G., M. GREIFOVÁ a J. KAROVIČOVÁ. Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter* spp. bacteria in model

conditions. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2006, roč. 45, s. 21-29. ISSN: 0963-9969

GUERRINI, S., S. MANGANI, L. GRANCHI a M. VINCENZINI. Biogenic Amine Production by *Oenococcus oeni*. *Current Microbiology*. 2002, roč. 44, s. 374-378. ISSN: 1432-0991

HALÁSZ, A., A. BARÁTH a H. HOLZAPFEL. The biogenic amine content of beer: the effect of barley, malting and brewing on amine concentration. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und – Forschung A*. 1999, roč. 208, s. 418-423. ISSN: 1436-6207

HALÁSZ, A., A. BARÁTH, L. SIMON-SAKARDI a W. HOLZAPFEL. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*. 1994, roč. 5, s. 42-49. ISSN: 0924-2244

HASSAÏNE, O., H. ZADI-KARAM a N. KARAM. Evaluation of biogenic amines formation by proteolytic enterococci strains isolated from raw dromedary milks from Southern Algeria. *Journal of Food Safety*. 2009, roč. 29, s. 381–393. ISSN: 1745-4565

HORWITZ, D., W. LOVENBERG, K. ENGELMAN a A. SJOERDSMA. Monoamine oxidase inhibitors, tyramine, and cheese. *Journal of American Medical Association*. 1964, roč. 188, s. 1108–1110. ISSN: 1538-3598

HUTKINS, Robert W. *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, ©2006, s. 20-23, 33-35. ISBN 9780470277515

HIBERT, Friederike a Hans-Jurgen BUSSE. *Micrococcus*. In: *Molecular Detection of Foodborne Pathogens*. New York: CRC Press, ©2009, s. 223. ISBN:978-1-4200-7643-1

CHARALAMPOPOULOS, Dimitris a Robert A. RASTALL. *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. New York: Springer, ©2009. ISBN: 978-0-387-79057-2

CHANDAN, Ramesh a Arun KILARA. *Manufacturing yogurt and fermented milk*. Druhé vydání. Oxford: Wiley-Blackwell, ©2013, s. 455-456. ISBN: 978-1-1199-6708-8

CHANDER, H., V.H. BATISH, S. BABU a R.S. SINGH. Factors affecting amine production by a selected strain of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Food Science*. 1989, roč. 54, s. 940-942. ISSN:1750-3841

CHENG, Vincent C.C. a Toru NAGASAVA. Effect of peptides and amino acids produced by *Lactobacillus casei* in milk on the acid production of bifidobacteria. *Japanese Journal of Zootechnical Science*. 1984, roč. 55, s. 339–349. ISSN: 1880-8255

CHEUNG, Ch., J. LEE a O. SHEVCHUK. The Effect of Ionic (NaCl) and Non-ionic (Sucrose) Osmotic Stress on the Expression of β -galactosidase in Wild Type *E.coli* BW25993 and in the Isogenic BW25993 Δ lacI Mutant. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology* [on-line]. 2009, roč. 13, s. 1-6 [cit. 2014-10-10]. Dostupné on-line z: https://www.microbiology.ubc.ca/sites/default/files/roles/drupal_ungrad/JEMI/13/13-1.pdf

CHO, Susan S. a Terry E. FINOCCHIARO. Handbook of prebiotics and probiotics ingredients, health benefits and food applications. ©2010, New York: Tayllor and Francis. ISBN:978-1-4200-6213-7

DUFOUR, C., G. DANDRIFOSSE, P.P. FORGET, F. VERMESSE, N. ROMAIN a P. LEPOINT. Spermine and spermidine induce intestinal maturation in rat. *Gastroenterology*. 1988, roč. 95, s. 112-116. ISSN:0016-5085

IZQUIERDO-PULIDO, M., J. FOND-FABRÉGAS, J.P. CARCELLER-ROSA, A. MARINÉ-FONT a C. VIDAL-CAROU. Biogenic amine changes realted to lactic acid bacteria during brewing. *Journal of food Protection*. 1996, roč. 59, s. 175-180. ISSN: 0022-1155

JAY, J.M., M.J. LOESSNER. a D.A. GOLDEN. Modern Food Microbiology. New York: Springer. ©2005, s. 116, 117, 485. ISBN 0-387-23413-6

JOOSTEN, Han M. L. J. a Martin D. NORHOLT. Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 2. Decarboxylative properties of some non-starter bacteria. *Netherlands Milk and Dairy Journal*. 1987, roč. 41, s. 259-280. ISSN: 0028-209X

JUNEJA, Vijay K. a John N. SOFOS. Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions. Washington: ASM Press. ©2010, s. 248-252. ISBN 155581459X

KALACĚ, Pavel. Biologically active polyamines in beef, pork and meat products: A review. *Meat Science*. 2006, roč. 73, s. 1-11. ISSN: 0309-1740

KALACĚ, Pavel a Martin Křížek. A review of biogenic amines and polyamines in beer. *Journal of the institute of Brewing*. 2003, roč. 109, s. 123-128. ISSN: 2050-0416

KALACĚ, P., V. HLAVATÁ a M. KŘÍŽEK. Concentrations of five biogenic amines in Czech beers and factors affecting their formation. *Food Chemistry*. 1997, roč. 58, s. 209–214. ISSN: 0308-8146

- KALAČ, P., J. ŠAVEL, M. KRÍŽEK, T. PELIKÁNOVÁ a M. PROKOPOVÁ. Biogenic amine formation in bottled beer. *Food Chemistry*. 2002, roč. 79, s. 431-434. ISSN: 0308-8146
- KALAČ P., J. ŠPIČKA, M. KRÍŽEK a T. PELIKÁNOVÁ. The effects of lactic acid bacteria inoculants on biogenic amine formation in sauerkraut. *Food Chemistry*. 2000, roč. 70, s. 355-359. ISSN:0308-8146
- KAMENÍK, Josef. Trvanlivé masné výrobky [elektronická skripta]. ©2012 [2014-12-05]. Veterinární farmaceutická univerzita Brno. s. 33. Text dostupný z: <http://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/kamenik-skripta-web.pdf>
- KAROVÍČOVÁ, Jolana a Zlatica KOHAJDOVÁ. Lactic acid fermented vegetable juices. *Horticulture Science (Prague)* [on-line]. 2003, roč. 30 vyd. 4, s. 152-158 [cit. 2014-11-1]. ISSN: 0862-867X. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/51936.pdf>
- KAROVÍČOVÁ, Jolana a Zlatica KOHAJDOVÁ. Biogenic amines in food. *Chemical Papers*. 2005, roč. 59, vyd. 1, s. 70-79. ISBN: 1336-9075
- KARRIS, Steven T. An Mathematics for Business, Science and Technology: With MATLAB and Spreadsheet Applications. Fremont: Orchard Publications. ©2004, s. 193-219. ISBN 0-9744239-0-4
- KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, ©1995-2015a. KEGG T0819:BLA_1362. www.genome.jp/kegg/kegg2.html [on-line]. [cit. 2015-01-01]. Dostupné z: www.genome.jp/dbget?bla:BLA_1362
- KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, ©1995-2015b. KEGG t01477:Lbuc_0707, www.genome.jp/kegg/kegg2.html [on-line]. [cit. 2013-04-22]. Dostupné z: www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?lbh:Lbuc_0707+lbh:Lbuc_0708
- KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, ©1995-2015c, Enzymes – *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ADO11, www.genome.jp [on-line]. [cit. 2015-01-06]. Dostupné z: www.genome.jp/kegg-bin/get_htext?bla010000+BLA_0060
- KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, ©1995-2015d, Vitamin B6 metabolism – *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ADO11, www.genome.jp [on-line]. [cit. 2015-01-06]. Dostupné z: www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=bla&mapno=0075&mapscale=&show_description=hide.
- KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, ©1995-2015e, *Bifidobacterium breve* ACS-071-V-Sch8b: HMPREF9228_1357, www.genome.jp [on-line]. [cit. 2015-01-06]. Dostupné z: http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?bbv:HMPREF9228_1357

KIM, N.Y. a G. E. JI. Characterization of the production of biogenic amines and gamma-aminobutyric acid in the soybean pastes fermented by *Aspergillus oryzae* and *Lactobacillus brevis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014. DOI: 10-4014/jmb.1409.09081.

Dostupné z: <http://www.jmb.or.kr/journal/viewJournal.html?doi=10.4014/jmb.1409.09081>. ISSN:1738-8872

KOMPRDA, T., R. BURDYCHOVÁ, V. DOHNAL, O. CWIKOVÁ, P. SLÁDKOVÁ a H. DVOŘÁČKOVÁ. Tyramine production in Dutch-type semi-hard cheese from two different producers. *Food Microbiology*. 2008, roč. 25, s. 219–227. ISSN: 0740-0020

KOMPRDA, T., J. NEZNALOVÁ, S. STANDARA a S. BOVER-CID. Effect of starter culture and storage temperature on the content of biogenic amines in dry fermented sausage poličan. *Meat Science*. 2001, roč. 59, s. 267–276. ISSN: 0309-1740

KOPÁČEK, Jiří, 2012. Současný stav sýrařství ve světě a České republice. In: Sborník přednášek konference: Mléko a sýry 2012 [on-line]. Vysoká škola chemicko technologická v Praze, 2012 [cit. 2013-01-01]. Dostupné z: <http://tresen.vscht.cz/tmt/prehliidky/2012/sbornikCPS2012.pdf>

KORKEALA, H., T. ALANKO a T. TIUSANEN. Effect of Sodium Nitrite and Sodium Chloride on Growth of Lactic Acid Bacteria. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1992, roč. 33, s. 27-32. ISSN: 1751-0147

KŘÍŽEK, Martin a Pavel KALÁČ. Biogenní aminy v potravinách a jejich role ve výživě. *Czech Journal of Food Science*. 1998, roč. 16, s. 151-159. ISSN: 1212-1800

KNEIFEL, Wolfgang a Seppo SALMIEN. Probiotics and Health Claims. Iowa: Wiley-Blackwell. ©2011, s. 2. ISBN: 978-1-405-19491-4

KULEY, E., E. BALIKCI, İ. ÖZOĞUL, S. GÖKDOĞAN a F. ÖZOĞUL. Stimulation of Cadaverine Production by Foodborne Pathogens in the Presence of *Lactobacillus*, *Lactococcus*, and *Streptococcus* spp. *Journal of Food Science*. 2012, roč. 77, vyd. 12, M650-M658. ISSN: 1750-3841

KUNG, H.F., Y.H. TSAI a CH. WEI. Histamine and other biogenic amines and histamine-forming bacteria in miso products. *Food Chemistry*. 2007, roč. 101, s. 351-356

KURMANN, J. A., J.L. RASIC a M. KROGER. Encyclopedia of Fermented Fresh Milk Products: An International Inventory of Fermented Milk, Cream, Buttermilk, Whey and Realated Products.©1992, New-York:Van Nostrand Reinhold. ISBN: 2-442-00869-4

LANDETE, J.M., B. DE LAS RIVAS, B. MARCOBAL, R. MUÑOZ. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, roč. 117, s. 258-269. ISSN: 0168-1605

LANDETE, J.M., S. FERRER a I. PARDO. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteriaand yeast isolated from wine. *Food Control*. 2007, roč. 18, s. 1569–1574. ISSN: 0956-7135

LANDETE, J. M., I. PARDO a S. FERRER. Histamine, histidine, and growth-phase mediated regulation of the histidine decarboxylase gene in lactic acid bacteria isolated from wine. *FEMS Microbiology Letters*. 2006, roč. 260, s. 84-90. ISSN: 1574-6968

LANDETE, J. M., I. PARDO a S. FERRE. Tyramine and phenylethylamine production among lactic acid bacteria isolated from wine. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, roč. 115, s. 364–368. ISSN: 0168-1605

LARQUÉ, E., M. SABATER-MOLINA a S. ZAMORA. Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition*. 2007, roč. 23, s. 87-95. ISSN: 0899-9007.

LAZÁRKOVÁ, Z., F. BUŇKA, L. BUŇKOVÁ, F. HOLÁŇ, S. KRÁČMAR a J. HRABĚ. The effect of different heat sterilization regimes on the quality of canned processed cheese. *Journal of Food Proces Engineering*. 2010, roč. 34, s. 1860-1878. ISSN: 1745-4530

LE JEUNE, C., A. LONVAUD-FUNEL, B. TEN BRINK, H. HOFSTRA a J.M.B.M. VAN DER VOSSSEN. Development of a detection system for histamine decarboxylating lactic acid bacteria based on DNA probes, PCR and activity test. *Journal of Applied Bacteriology*. 1995, roč. 78, s. 316-326. ISSN: 1365-2672

LEUSCHNER, Renata G.K. a Walter P. HAMMES. Degradation of histamine and tyramine by *Brevibacterium linens* during surface ripening of Munster cheese. *Journal of Food Protection*. 1998, roč. 61, s. 874-878. ISSN: 1944-9097

LEUSCHNER, RENATA G.K. a Walter P. HAMMES. Tyramine degradation by micrococci during ripening of fermented sausage. *Meat Science*. 1998, roč. 49, s. 289-296. ISSN:0309-1740

LINARES, D.M., M. MARTÍN, V. LADERO, M. A. ALVAREZ a M. FERNÁNDEZ. Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011, roč. 51, s. 691–703. ISSN 1040-8398

LINARES, D. M., B. DEL RIO, V. LADERO, N. MARTÍNEZ, M. FERNÁNDEZ, M.C. MARTÍN a M.A., ÁLVAREZ. Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy product. *Frontiers in Microbiology* [on-line]. 2012, roč. 180, s. 1-10 [2014-2-12]. ISSN: 1664-302X. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3390585/pdf/fmicb-03-00180.pdf>

LINSALATA, Michele a Francesco RUSSO. Nutritional factors and polyamine metabolism in colorectal cancer nutrition. *Nutrition*. 2008, roč. 24, s. 382-389. ISSN:0899-9007

LJUNGH, Åsa a Torkel WANDSTRÖM. *Lactobacillus* Molecular biology: From Genomics to Probiotics. Norfolk: Caister Academic press. ©2009, s. 103. ISBN: 978-1-904455-41-7

LONVAUD-FUNEL, Aline. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2001, roč. 199, s. 9-13. ISSN:1574-6968

LORENCOVÁ, E., L. BUŇKOVÁ, D. MATOULKOVÁ, P. DRÁB, V. KUBÁŇ a F. BUŇKA. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *International Journal of Food Science and Technology*. 2012, roč. 47, s. 2086-2091. ISSN: 1365-2621

MAH-JAE, H., S. SOON-YOUNG, L. HEUSGUSHICK, CH. HONG-YON a H. HAN-JOON. Improvement of Decarboxylating Agar Medium for Screening Biogenic Amine Producing Bacteria in Kimchi. *Journal of Microbiological Technology*. 2011, roč. 11, s. 491-496. ISSN: 1547-173X

MANGIA, N. P., A. TRANI, A. DI LUCCIA, M. FACCIA, G. GAMBACORTA a F. FANCELLO. Effect of the use of autochthonous *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus xylosus* strains on microbiological and biochemical properties of the Sardinian fermented sausage. *European Food Research and Technology*. 2013, roč. 236, s. 557-566. ISSN: 1438-2377

MARCOBAL, A., M.C. POLO, P.J. MARTÍN-ÁLVAREZ a M.V. MORENO-ARRIBAS. Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines. *Food Research International*. 2005, roč. 38, s. 387-394. ISSN: 0963-9969

- MARCOBAL, A., P.J. MARTIN-ALVAREZ, M.V. MORENO-ARRIBAS a R. 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, roč. 157, vyd. 5, s. 417–424. ISSN: 0923-2508
- MASSON, F., A. LEBERT, R. TALON a M.C. MONTEL. Effects of physicochemical factors influencing tyramine production by *Carnobacterium divergens*. *Journal of Applied Microbiology*. 1997, roč. 83, s. 36-42. ISSN: 1365-2672
- MASSON, F., R. TALON a M.C. MONTEL. Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, roč. 32, s. 199-207. ISSN:0168-1605
- MATIJEVIĆ, Bojan, Rajka BOŽANIĆ a Ljubica TRATNIK. The influence of lactulose on growth and survival of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 in reconstituted sweet whey. *Mljekarstvo*, roč. 59, s. 20-27
- MATSUMOTO, Mitsuharu a Benno YOSHIMI. Consumption of *Bifidobacterium lactis* LKM512 yogurt reduces gut mutagenicity by increasing gut polyamine contents in healthy adult subjects. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2004, roč. 558, vyd. 2, s. 147-153. ISSN: 0027-5107
- MAXA, Věroslav a Vojtěch RADA. Význam bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení pro výživu a zdraví, 2. vydání. Praha: ÚZPI. ©2002, 40 s. ISBN 80-85120-57-7
- MAYO, Baltasar a Douwe VAN SINDEREN. *Bifidobacteria: Genomics and Molecular Aspects*, Norfolk: Caister Academic Press. 2010, s. 78-79. ISBN: 978-1-904455-68-4
- MAZZOLI, R., C. LAMBERTI, J. D. COISSON, M. PURROTTI, M. ARLORIO, M. G. GIUFFRIDA, C. GIUNTA a E. PESSIONE. Influence of ethanol, malate and arginine on histamine production of *Lactobacillus hilgardii* isolated from an Italian red wine. *Amino Acids*. 2009, roč. 36, s. 81–89. ISSN: 0939-4451
- MARK, E.M., G.F. STEWART a C.O. CHICHESTER. *Advances in Food Research*, Svazek 10, New York: Academic Press. ©1961, s. 259. ISSN: 48-7808
- MARTEAU, P., P. SEKSIK a R. JIAN. Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective. *British Journal of Nutrition*. 2002, roč. 88, s. 51-57. ISSN: 0007-1145

MIN J., S. Lee, A. JANG, M. LEE a Y. KIM. Quantitative Analysis of Biogenic Amines in Raw and Processed Foods of Animal Origin on Korean Domestic Market. *Asian-Australian Journal of Animal Science*. 2004, roč. 17, vyd. 12, s. 1764-1768. ISSN: 1011-2367

MEHTA, B.M., A. KAMAL-ELDIN a R.Z. IWANSKI. Fermentation: Effects on Food Properties. New York: CRC Press. ©2012. ISBN:978-1-4398-5335-1

MetaCyc Metabolic Pathway Database, ©2014a, MetaCyc Pathway: *Bifidobacterium* shunt, metacyc.org [on-line]. [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: metacyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&OBJECT=p124-PWY

MetaCyc Metabolic Pathway Database, ©2014b, MetaCyc Pathway: Spermine biosynthesis, metacyc.org [on-line]. [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://metacyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=ARGSPECAT-PWY>

MetaCyc Metabolic Pathway Database, ©2014d, MetaCyc Pathway: glycerol, metacyc.org [on-line]. [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://metacyc.org/META/NEW-IMAGE?type=ORGANISM&object=TAX-1578>

MIN, J., S. LEE, A. JANG, M. LEE a Y. KIM. Production of Biogenic Amines by Microflora Inoculated in Meats. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2004, roč. 17, s. 1472-1478. ISSN:1976-5517

MOAT A., J. FOSTER a M. SPECTOR. Microbial Physiology, chapter 15. New York: John Wiley and Sons, ©2002. ISBN:0-471-39483-1

MOLENAAR, D., J.S. BOSSCHER, B.T. BRINK, A.J.M. DRIESSEN, W.N. KONINGS. Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Bacteriology*. 1993, roč. 175, vyd.10, s. 2864–2870. ISSN: 0021-9193

MORENO-ARRIBAS, Mária Victoria a Aline LONVAUD-FUNEL. Tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. brevis* ATCC 367. *FEMS Microbiology Letters*. 1999, roč. 180, s. 55-60. ISSN: 1574-6968

MORENO-ARRIBAS, Victoria a Aline LONVAUD-FUNEL. Purification and characterization of tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis*. *FEMS Microbiology Letters*. 2001, roč. 195, s. 103–107. ISSN: 1574-6968

MORENO-ARRIBAS, V., M.C. POLO, F. JORGANES a R. MUÑOZ. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, roč. 84, vyd. 1, s. 117-123. ISSN: 0168-1605

MORENO-ARRIBAS, V., S. TORLOIS, A. JOYEUX, A. BERTRAND a A. LONVAUD-FUNEL. Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. *Journal of Applied Microbiology*. 2000, roč. 88, s. 584-593. ISSN: 1365-2672

MOZZI, F, R.R. RAYA a G.M. VIGNOLO. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications. 2010, © Iowa:Blackwell-Publishing, s. 19. ISBN: 978-0-8138-1583-1

NAILA, A., S. FLINT, G. FLETCHER, P. BREMER a G. MEERDINK. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches [on-line]. *Journal of Food Science*. 2010, roč. 75, s. 139-150 [2013-01-01]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2995314/pdf/jfds0075-R139.pdf>

NCBI: National Centre for Biotechnology Information, U.S., ©2011-2015. National Library of Medicine: Lysine decarboxylase *Lactobacillus* Gene result NCBI [on-line]. [2011-01-09]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=lysine%20decarboxylase%20lactobacillus>

NOLLET, Leo a Fidel TOLDRA. Safety Analysis of Foods of Animal Origin. Boca Raton: CRC Press, ©2011, s. 414. ISBN: 978-1-4398-4817-3

NOVELLA-RODRÍGUEZ, S., M.T. VECIANA-NOGUÉS, A.X. ROIG-SAGUÉS, A.J. TRUJILLO-Mesa a M.C. VIDAL-CAROU. Influence of Starter and Nonstarter on the Formation of Biogenic Amine in Goat Cheese During Ripening, *Journal of Dairy Science*. 2002, roč. 85, s. 2471-2478. ISSN: 1525-3198

NOVELLA-RODRÍGUEZ, S., M.T. VECIANA-NOGUÉS, M. IZQUIERDO-PULIDO a M.C. VIDAL-CAROU. Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. *Journal of Food Science*. 2003, roč. 68, s. 750-755. ISSN: 1750-3841

NOVELLA-RODRÍGUEZ, S., M.T. VECIANA-NOGUÉS, A. ROIG-SAGUÉS, A. TRUJILLO-MESA a M.C. VIDAL-CAROU. Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat cheeses from pasteurized and raw milk, *Journal of Dairy Research*. 2004, roč. 71, s. 245-252. ISSN: 1469-7629

OGURI, Shigeyuki. Electromigration methods for amino acids, biogenic amines and aromatic amines. *Journal of Chromatography B*. 2000, roč. 747, s. 1–19. ISSN: 1570-0232

- ONG, Lydia a Nagendra Prasad SHAH. Probiotic Cheddar cheese: Influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. *LWT - Food Science and Technology*. 2009, roč. 42, s. 1260–1268. ISSN: 0023-6438
- ÖNAL, Armağan. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in food. *Food Chemistry*. 2006, roč. 103, s. 1475-1486. ISSN: 0308-8146
- ÖZDESTAN, Özgül a Ali ÜREN. Biogenic amine content of kefir: a fermented dairy product. *European Food Research and Technology*. 2010, roč. 231, s. 101-107. ISBN: 1438-2377
- ÖZOGUL, Fatih a Yesim ÖZOGUL. The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures. *European Food Research and Technology*. 2007, roč. 225, s. 385-394. ISSN: 1438-2377
- PAPAGIANNI, Maria. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2012, roč. 3, s. 1-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.5936/csbj.201210003>
- PEREIRA, C.I., D. MATOS, M.V. SAN ROMÃO a M.T.B. CRESPO. 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, roč. 75, s. 345–352
- PERCUDANI, Riccardo a Alessio PERACCHI. The B6 database: a tool for the description and classification of vitamin B6-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families. *BMC Bioinformatics*. 2009, roč. 10, s. 273-281. ISSN: 1471-2105
- PETRI, A., J. PFANNEBECKER, J. FRÖHLICH a H. KÖNIG. Fast Identification of Wine Related Lactic Acid Bacteria by Multiplex PCR. *Food Microbiology*. 2013, roč. 33, s. 48-54. ISSN:0740-0020. Dostupné take z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.08.011>
- PIRCHER, A., B. FRIEDRICH a P. PAULSEN. Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *European Food Research and Technology*. 2007, roč. 226, s. 225–231. ISSN: 1438-2377
- PLENGVIDHYA, V., F. BREIDT, Z. LU a H. FLEMING. DANN Fingerprinting of Lactic Acid Bacteria in Sauerkraut Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, roč. 73, s. 7697-7702. ISSN: 1098-5336

PRIYADARSHANI, Deepika a Sudip Kumar RAKSHIT. 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*. 2011, roč. 46, s. 2062-2069. ISSN: 1365-2621

PRIYADARSHANI, Deepika a Sudip Kumar RAKSHIT. Growth and Biogenic Amine (Histamine and Tyramine) Potential of Probiotic *Lactobacillus casei* in Skim Milk. *American Journal of Food Technology*. 2014, roč. 9, s. 69-79. ISSN: 1557-4571

QI, W., L.H. HOU, H.L. GUO, C.L. WANG, Z.C. FAN, J.F. LIU a X.H. CAO. Effect of salt-tolerant yeast of *Candida versatilis* and *Zygosaccharomyces rouxii* on the production of biogenic amines during soy sauce fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014, roč. 94, s. 1537-1542. ISSN: 1097-0010

ROSSI, M., C. CORRADINI, A. AMARETTI, M. NICOLINI, A. POMPEI, S. ZANONI a D. MATTEUZZI. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Apply Environmental Microbiology*. 2005, roč. 71, s. 6150-6158. ISSN: 1098-5336

RUDOLFOVÁ, Jana a Ladislav ČURDA. Prebiotický účinek galaktooligosacharidů a využití laktózy pro jejich produkci. *Chemické listy*, 2005, roč. 99, s. 168-174. Dostupné také z: www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_03_168-174.pdf

RUIZ-CAPILLAS, Claudia a Francisco JIMÉNEZ-COLMENERO. Biogenic amine content in Spanish retail market meat products treated with protective atmosphere and high pressure. *European Food Science and Technology*. 2004, roč. 218, s. 237-241. ISSN: 1438-2377

RUSSO, P., P.F. PALENCIA, A. ROMANO, M. FERNÁNDEZ, P. LUCAS, G. SPANO a P. LÓPEZ. Biogenic amine production by the wine *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 in systems that partially mimic the gastrointestinal tract stress. *BMC Microbiology*. 2012, roč. 12, s. 247-257. ISSN: 1471-2180. Dostupné také z: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2180-12-247.pdf>

SALMIEN, S., A. VON WRIGHT a A. OUWEHAND. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 3rd. Edition. New York: Marcel Dekker Inc. ©2004, s. 2, 5-16, 78. ISBN 978-1-9398-36-77-4

- SANTOS, W.C., M.R. SOUZA, M.M.O.P. CERQUEIRA a M.B.A. GLÓRIA. Bioactive amine formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. *Food Chemistry*. 2003. roč. 81, s. 595–606. ISSN:0308-8146
- SCRIMSHAW, Nevin a Erik MURRAY. Lactose Tolerance and Milk Consumption, Chapter 3: Lactose content of milk and milk products. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1988, roč. 48, s. 1099-1104. ISSN: 0002-9165
- SEBASTIAN, P., P. HERR, U. FISCHER a H. KÖNIG. Molecular Identification of Lactic Bacteria Occurring in Must and Wine. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 2011, roč. 32, s. 300-309. ISSN: 0253-939X.
- SEILER, N., C.L. ATANSSOV a F. RAUL. Polyamine metabolism as target for cancer chemoprevention. *International Journal of Oncology*. 1998, roč. 13, s. 993-1006. ISSN:1791-2423.
- SEDLÁČEK, Ivo. Taxonomie prokaryot. Brno: Muni Press, ©2007, s. 218, 244, 245. ISBN 8021042079
- SHALABY, Ali R.. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 1996, roč. 29, s. 675-690. ISSN 0963-9969
- SHEKIN, David J. Handbook of Parametric and Nonparametric Statistical Procedures, 4th edition, Boca Raton: CRC Press, ©2007. ISBN: 1584888148
- SHIHATA, Amal a Nagendra Prasad SHAH. Proteolytic Profiles of Yogurt and Probiotic Bacteria. *International Dairy Journal*. 2000, roč. 10, s. 401-408. ISSN: 0958-6946.
- SHUKLA, S., H.K. PARK, J.K. KIM a M. KIM. Determination of biogenic amines in Korean traditional fermented soybean paste (Doenjang). *Food and Chemical Toxicology*, 2010, roč. 48, s. 1191-1195. ISSN:0278-6915.
- SHELL, M. A., M. KARMIRANTZOU, B. SNEL, D. VILANOVA, B. BERGER, G. PESSI, M.C. ZWAHLEN, F. DESIERE, P. BORK, M DELLEY, R.D. PRIDMORE a F. ARIGONI. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academic of Sciences*. 2002, roč. 99, s. 14422-14427. ISSN: 1091-6490
- SCHNELLER, R., P. GOOD a M. JENNY. Influence of pasteurised milk, raw milk and different ripening cultures on biogenic amine concentrations in semi-soft cheeses during

ripening. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*. 1997, roč. 204, s. 265-272. ISSN: 1436-6207

SILLA-SANTOS, Hortensia S.M. Biogenic amines: their importance in foods. *Food Microbiology*. 1996, roč. 29, s. 213-231. ISSN: 0740-0020

SLÁDKOVÁ, P., T. KOMPRDA a R. BURDYCHOVÁ, 2007. Skrining startovacích a probiotických kultur určených pro výrobu fermentovaných masných výrobků na schopnost tvorby biogenních aminů [on-line]. [cit. 12-12-2013] *MendelNet'07 Agro*. 1. vyd. MZLU v Brně. Dostupné z: <http://mnet.mendelu.cz/mendelnet07agro/articles/tp/sladkova.pdf>

SMĚLÁ, D., P. PECHOVÁ, T. KOMPRDA, B. KLEJDUS a V. KUBÁŇ. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy*. 2004, roč. 98, s. 432-437. ISSN 1213-7103

SOMNER, S.S., H.W. SPECKHARD, E.B. SOMERS a S.L. TAYLOR. Isolation of histamine-producing *Lactobacillus buchneri* from Swisscheese implicated in a food poisoning outbreak. *Apply Environmental Microbiology*. 1985, roč. 50, s. 1094-1096. ISSN:1098-5336

SOUFLEROS, E., M.L. BARRIOS a A. BERTRAND. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1998, roč. 49, s. 266-278. ISSN: 0002-9254

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 J.S. LOLKEMA. Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2010, roč. 64, s. 95-100. ISSN: 0954-3007

ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. 3. vyd. Praha: Academia, ©2002. ISBN 80-200-1024-6

ŠPIČKA, J., P. KALÁČ, S. BOVER-CID a M. KŘÍŽEK. Application of lactic acid bacteria starter cultures for decreasing the biogenic amine levels in sauerkraut. *European Food Research and Technology*. 2002, roč. 215, s. 509-514. ISSN: 1438-2385

STANDAROVÁ, E., I. BORKOVCOVÁ a L. VORLOVÁ. Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě. *Veterinářství*. 2008, roč. 58, s. 735-739. ISSN: 0506-8231

STADLER, Richard H. a David R. LINENBACK. Process-induced food toxicants: occurrence, formation, mitigation and health risks, New York: John Wiley and sons. ©2009, s. 341 a 342. ISBN 978-0-470-07475-6

SUKOVÁ, Irena. *Probiotické sýry* [on-line]. 2004 [cit. 15. července 2012]. Dostupné z:<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=13&typ=1&val=22463&ids=161&cmo=5&cye=2012>

SUKOVÁ, Irena. Biogenní aminy v mléčných výrobcích [on-line]. 2006 [cit. 15. července 2012]. Dostupné z:

<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=13&typ=1&val=50116&ids=314>

SUZZI, Giovanna a Fausto GARDINI. Biogenic amines in dry fermented sausages: A review. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, roč. 88, s. 41-54. ISSN: 0168-1605

ŠTENGEROVÁ, H., NÁPRAVNÍKOVÁ E., STEINHAUSEROVÁ I. a P. ŠVEC. Identifikace bakterií mléčného kvašení v mase baleném v podmínkách ochranné atmosféry. *Veterinářství*. 2007, roč. 57, s. 39-42. ISSN: 0506-8231

TAKADASHI, H., B. KIMURA, M. YOSHIKAWA a T. FUJII. Cloning and sequencing of the histidine decarboxylase genes of gram-negative, histamine producing bacteria and their application in detection and identification of these organisms in fish. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, roč. 69, s. 2568-2578. ISSN: 1098-5336

TAILOR, S.A.N., K.I. SHULMAN, S.E. WALKER, J.A. MOSS a D., GARDNER. Hypertensive episode associated with phenelzine and tap beer- a reanalysis of the role of pressor amines in beer. *Journal of clinical Psychopharmacology*. 1994, roč. 14, s. 5-14, ISSN:0271-0749

TAMIME, A.Y., (ed.). Fermented Milks. Probiotic Dairy Products. ©2005, Oxford:Blackwell Publishing Ltd., s. 66. ISBN:9782-4051-2124-8

TEN BRINK, B., C. DAMNIK, H.M.L.J. JOOSTEN a J.H.J. HUIST IN'T VELD. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1990, roč. 11, s. 73–84. ISSN: 0168-1605

TSAI, Y., H. KUNG, Q. LIN, J. HWANG, S. CHENG., CH. WEI a D. HWANG. Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in kimchi products in Taiwan. *Food Chemistry*. 2005, roč. 90, s. 635-641. ISSN: 0308-8146

Uni Prot Consortium, ©2002-2015a, UniProt databases, BALAC2494_00704, G0H5V1. www.uniprot.org [on-line]. [cit. 2015-01-01]. Dostupné z: www.uniprot.org/uniprot/G0H5V1

Uni Prot Consortium, ©2002-2015b, UniProt databases, F6C5U3 - F6C5U3_BIFBA, Cys/Met metabolism PLP-dependent enzyme. www.uniprot.org [on-line]. [cit. 2015-01-02]. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/uniprot/F6C5U3>

VALSAMAKI, K., A. MICHAELIDOU a A. POLYCHRONIADOU. Biogenic Amine Production in Feta Cheese. *Food Chemistry*. 2000, roč. 71, vyd. 2, s. 259-266. ISSN: 0308-8146

VESELI, A., E. MEHMETI a M. VASJARI. Current methods and the ones in perspective for the determination of biogenic amines in food. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*. 2013, roč. 41, s. 347-356. ISSN: 1303-5002

VENTURA, M., D. SINDEREN, G.F. FITZGERALD a R. ZINK. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2004, roč. 86, s. 205-223. ISSN: 1572-9699

VON BEUTLING, Detlef. Studies on the formation of tyramine by microbes with food hygienic relevance. *Archiv für Lebensmittel Hygiene*. 1993, roč. 44, s. 83-87. ISSN: 0003-925X

VOS P., G. GARRITY, D. JONES, N. R. KRIEG, W. LUDWIG, F.A. RAINEY, K.H. SCHLEIFER a W.B. WHITMAN. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Svazek 3, ©2009, s. 470. ISBN: 978-0-387-68489-5

WALSTRA, P., J.T.M. WOUTERS a T.J. GEURTS. *Dairy Science and Technology*, 2nd. Edition, Boca Raton: RC Taylor & Francis Group. ©2006, s. 357, 555. ISBN: 0-8247-2763-0

WHITMAN, W., A. PARTE, M. GOODFELLOW, P. KÄMFER, H.J. BUSSE, M. TRUJILLO, W. LUDWIG a K. SUZUKI. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: volume 5: The Actinobacteria, Part A*. Druhá edice. Philadelphia: Springer, ©2012, ISBN 978-0-387-95043-3

YONGMEI, L., CH. XIAOHONG, J. MEI, L. XIN, N. RAHMAN, D. MINGSHENG a G. YAN. Biogenic amines in Chinese soy sauce. *Food Control*. 2009, roč. 20, s. 593-597. ISSN: 0956-7135

ZHU, L., W. LI a D. XIUZHU. Species identification of genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences and proposal of *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp.

porcinum subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003, 53, s. 1619–1623. ISSN: 1466-5026

ZWIETERING, M., I. JOGENBURGER, F. ROMBOUTS a K. VAN 'T RIET. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Enviromental Microbiology*. 1990, roč. 6, s. 1875-1881. ISSN: 1098-5336

9 SEZNAM PUBLIKACÍ

Příspěvky v mezinárodních časopisech s impakt faktorem

LORENCOVÁ E., L. BUŇKOVÁ, D. MATOULKOVÁ, V. DRÁB, P. PLEVA, V. KUBÁŇ a F. BUŇKA. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *International Journal of Food Science and Technology*. 2012, roč. 47, s. 2086-2091. ISSN: 1365-2621

LORENCOVÁ E., P. VLTAVSKÁ, P. BUDINSKÝ a M. KOUTNÝ. Antibacterial effect of phosphates and polyphosphates with different chain length. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 2012, roč. 47, s. 2241-2245. ISSN: 1093-4529

LORENCOVÁ E., L. BUŇKOVÁ, P. PLEVA, V. DRÁB, V. KUBÁŇ a F. BUŇKA. Selected factors influencing the ability of *Bifidobacterium* to form biogenic amines. *International Journal of Food Science and Technology*. 2014, roč. 49, s. 1302-1307. ISSN: 1365-2621

PLEVA P., L. BUŇKOVÁ, A. LAUKOVÁ, **E. LORENCOVÁ**, V. KUBÁŇ a F. BUŇKA. Decarboxylation activity of enterococci isolated from rabbit meat and staphylococci isolated from trout intestines. *Veterinary Microbiology*. 2012, roč. 159, s. 438-442. ISSN: 0378-1135

HAUERLANDOVÁ I., **E. LORENCOVÁ**, F. BUŇKA, J. NAVRÁTIL, K. JANEČKOVÁ a L. BUŇKOVÁ. The influence of fat and monoacylglycerols on growth of spore-forming bacteria in processed cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2014, roč. 182–183, s. 44–50. ISSN: 0168-1605

BUŇKOVÁ, L., G. ADAMCOVÁ, K. HUDCOVÁ, H. VELICHOVÁ, V. PACHLOVÁ, **E. LORENCOVÁ** a F. BUŇKA. Monitoring of biogenic amines in cheeses manufactured at small-scale farms and in fermented dairy products in the Czech Republic. *Food Chemistry*. 2013, roč. 141, s. 548–551. ISSN: 0308-8146

Příspěvky v recenzovaných časopisech

BUŇKOVÁ, L., **E. LORENCOVÁ**, D. JURČOVÁ, F. BUŇKA a S. KRÁČMAR. Effect of sodium phosphates on selected food grade bacteria. *Potravinářstvo*. 2011, roč. 5 vyd. 2, s. 9-12. ISSN: 1337-0960

PLEVA, P., L. BUŇKOVÁ, A. LAUKOVÁ, **E. LORENCOVÁ**, V. KUBÁŇ a F. BUŇKA. Factors affected decarboxylation activity of *Enterococcus faecium* isolated from rabbit. *Potravinárstvo*. 2012, roč. 6, vyd. 2, s. 46-49. ISSN: 1337-0960

PLEVA, P., Z. LAZÁRKOVÁ, A. ANDRESOVÁ, **E. LORENCOVÁ**, F. BUŇKA a L. BUŇKOVÁ. Effect of selected monosaccharide on growth and putrescine production of *Serratia marcescens*. *Plasty a kaučuk*. 2012, roč. 49 (Speciál), s. 30-32. ISSN: 0322-7340

BUŇKOVÁ, L., K. HUDCOVÁ, P. BUDINSKÝ, **E. LORENCOVÁ**, H. VELICHOVÁ a F. BUŇKA. Sledování kvality farmářských sýrů. *Mlékařské listy*. 2012, roč. 133, s. 1-4. ISSN: 1212-950X

Příspěvky ve sbornících z konferencí

LORENCOVÁ, E., L. BUŇKOVÁ, P. PLEVA, F. BUŇKA. In vitro produkce biogenních aminů technologicky významnými bakteriemi mléčného kvašení. Konference *Proteiny 2011*. 2011, Zlín (3.-4.5. 2011). ISBN: 978-80-7454-022-6

PLEVA, P., L. BUŇKOVÁ, A. LAUKOVÁ a **E. LORENCOVÁ**. Produkce biogenních aminů u enterokoků izolovaných z masa králíků a stafylokoků získaných z vnitřního obsahu střev pstruhů. Konference *Proteiny 2011*. 2011, Zlín (3.-4.5. 2011). ISBN: 978-80-7454-022-6

LORENCOVÁ, E., L. BUŇKOVÁ, F. BUŇKA, N. ŽOUŽELKOVÁ, V. DRÁB a V. KUBÁŇ. Produkce biogenních aminů vybranými bakteriemi mléčného kvašení. Konference *Mléko a sýry* pořádané VŠCHT. 2012, Praha (23.-24.1. 2012). ISBN 978-80-7080-838-2

LORENCOVÁ, E., L. BUŇKOVÁ, P. PLEVA, V. DRÁB, V. KUBÁŇ a F. BUŇKA. Selected factors influencing the ability of *Bifidobacterium* to form biogenic amines. Konference *Chemical Reactions in Foods*. 2012 (14.-16.11. 2012). ISBN 978-80-7080-836-8

10 CURRICULUM VITAE

OSOBNÍ ÚDAJE

Jméno a příjmení: Ing. Eva Lorencová

Datum narození: 17.10. 1984

Adresa: Štípská 373, 763 16 Fryšták

E-mail: lorencova@ft.utb.cz

VZDĚLÁNÍ

2000 – 2004 **Střední průmyslová škola Zlín**

2004 – 2008 **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická**

bakalářské studium; obor Chemie a technologie potravin

2008 – 2010 **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická**

navazující magisterské studium; obor Technologie, hygiena

a ekonomika výroby potravin

2010 – doposud **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická**

doktorské studium; obor Technologie potravin

PRAXE

2013 – doposud **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie potravin**

pozice asistenta; výuka předmětů zaměřených na výrobu potravin rostlinného původu

PROJEKTY ŘEŠENÉ V RÁMCI INTERNÍ GRANTOVÉ AGENTURY

UTB

2011 IGA/12/FT/11/D, Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu vybraných bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* (hlavní řešitelství)

2012 IGA/FT/2012/027, Monitoring výskytu biogenních aminů ve vybraných potravinách a dekarboxylázové aktivity potravinářsky významných bakterií (hlavní řešitelství)

2013 IGA/FT/2013/013, Nepříznivé látky a faktory v životním prostředí a v potravinách (spoluřešitelství)

JAZYKOVÉ ZNALOSTI

Anglický jazyk: Pokročilá znalost - aktivně

Německý jazyk: Pasivní znalost

OSTATNÍ DOVEDNOSTI

Práce s PC: OS Windows, MS Office (Excel, Word, PowerPoint - pokročilý), ChemSketch

Řidičský průkaz: Skupina A, B

Příloha A

Tab. 1: Produkce biogenních aminů kmeny z České sbírky mlékárenských mikroorganismů

Kmen	Produkce biogenních aminů		
	CAD*	TYR*	SPD*
<i>Bifidobacterium</i> sp. CCDM 94	ND	ND	ND
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CCDM 223	5,8±1,5	ND	ND
<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> CCDM 239	9,3±3,6	66,6±13,2	ND
<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> CCDM 240	4,4±2,0	ND	ND
<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> CCDM 241	10,1±3,8	5,4±0,7	ND
<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> CCDM 374	10,2±0,6	ND	ND
<i>Bifidobacterium bifidum</i> CCDM 559	5,3±0,9	ND	ND
<i>Bifidobacterium longum</i> CCDM 569	9,8±0,2	ND	ND
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCDM 79	ND	2,1±0,6	ND
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCDM 109	ND	2,4±0,3	2,0±0,3
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCDM 193	4,9±0,6	ND	ND
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCDM 197	5,3±0,4	ND	ND
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCDM 217	5,2±2,4	ND	ND
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCDM 382	ND	8,0±2,3	ND
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCDM 406	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCDM 476	6,1±1,4	ND	ND
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> CCDM 364	5,7±1,3	ND	ND
<i>Lactobacillus curvatus</i> CCDM 393	5,2±0,9	ND	ND
<i>Lactobacillus curvatus</i> CCDM 394	5,5±0,6	ND	ND
<i>Lactobacillus curvatus</i> CCDM 834	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus helveticus</i> CCDM 807	5,8±0,2	ND	ND
<i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 183	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 818	7,1±0,8	ND	ND
<i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 375	8,2±1,6	ND	ND
<i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 381	5,7±0,4	ND	ND
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 148	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 157	ND	ND	2,6±0,4
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289	18,1±1,7	55,8±5,0	ND
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 579	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 821	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 963A	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 963B	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus casei</i> CCDM 422	5,7±0,5	ND	ND
<i>Lactobacillus paracasei</i> CCDM 741	6,2±0,4	ND	ND
<i>Lactobacillus paracasei</i> CCDM 832	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus curvatus</i> ssp. <i>curvatus</i> T01	ND	1077,5±1,2	ND
<i>Lactobacillus brevis</i> T02	ND	959,8±2,8	ND

*CAD kadaverin, TYR tyramin, SPD spermidin; ND obsah biogenních aminů nebyl detekován

Tab. 2: Produkce biogenních aminů izoláty pivních kontaminant ze sbírky Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze

Kmen	Produkce biogenních aminů	
	CAD*	TYR*
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-4	ND	ND
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-16	3,9±0,9	794,7±74,8
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-20	5,3±1,5	182,1±29,6
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-33	7,3±3,6	13,0±1,3
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-50	ND	1840,8±511,1
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-56	ND	ND
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-62	ND	866,8±130,0
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-67	6,1±2,2	2485,2±168,2
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-68	5,2±2,4	1361,9±101,6
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-69	7,9±2,1	1626,4±149,2
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-70	ND	2928,7±184,3
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-72	6,3±1,9	1675,3±126,9
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-78	ND	382,6±25,9
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-93	5,3±1,3	3084,0±111,9
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-98	4,2±1,9	2231,1±211,4
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-101	ND	37,0±6,5
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-111	3,0±1,2	2977,6±163,1
<i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-29	ND	ND
<i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89	ND	525,9±17,9
<i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-92	ND	ND
<i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-94	3,4±1,6	172,7±23,3
<i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-96	4,8±1,7	10,0±3,6
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i> RIBM 2-61	ND	ND
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i> RIBM 2-71	ND	ND
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i> RIBM 2-74	ND	10,1±4,1
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i> RIBM 2-76	ND	ND
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i> RIBM 2-77	ND	ND
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i> RIBM 2-79	ND	ND
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i> RIBM 2-95	4,4±1,8	ND
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i> RIBM 2-113	ND	470,9±130,6
<i>Tetragenococcus halophilus</i> RIBM 2-80	ND	ND
<i>Pediococcus</i> sp. RIBM 2-57	6,9±3,1	ND

* CAD kadaverin, TYR tyramin; ND biogenní aminy nebyly detekovány

Tab. 3: Produkce biogenních aminů izoláty bifidobakterií a laktobacilů ze sbírky České zemědělské univerzity v Praze

Kmeny	WCH		MRS	
	TYR [mg.l ⁻¹]*	SPN [mg.l ⁻¹]*	TYR [mg.l ⁻¹]*	SPN [mg.l ⁻¹]*
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> B1	12,3±0,3	ND	2,3±0,1	22,3±0,1
<i>B. longum</i> B2	10,6±0,3	ND	1,5±0,1	22,6±0,3
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> B3	10,0±0,3	ND	1,7±0,0	25,4±0,3
<i>B. longum</i> B4	11,3±0,2	0,8±0,1	0,6±0,1	13,8±0,2
<i>B. longum</i> B5	11,8±0,2	3,0±0,1	1,0±0,0	16,6±0,3
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> B6	11,1±0,1	ND	1,6±0,2	16,6±0,3
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> B7	10,4±0,3	ND	0,7±0,1	14,5±0,2
<i>B. longum</i> B8	10,0±0,3	3,7±0,2	ND	11,3±0,5
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> B9	10,8±0,3	ND	ND	7,8±0,3
<i>B. longum</i> B10	7,7±0,1	ND	1,0±0,0	ND
<i>B. longum</i> ssp. <i>suis</i> B11	0,8±0,1	4,5±0,2	1,2±0,0	ND
<i>B. longum</i> ssp. <i>suis</i> B12	11,1±0,4	18,6±0,1	1,4±0,1	2,2±0,1
<i>B. bifidum</i> B13	14,2±0,3	ND	2,6±0,1	14,3±0,2
<i>B. bifidum</i> B14	10,5±0,1	ND	2,8±0,2	18,8±0,2
<i>B. bifidum</i> B15	11,1±0,2	ND	1,2±0,1	21,4±0,3
<i>B. bifidum</i> B16	10,1±0,3	ND	ND	4,6±0,1
<i>B. bifidum</i> B17	10,4±0,2	ND	ND	3,2±0,1
<i>B. bifidum</i> B18	12,3±0,3	ND	ND	8,1±0,2
<i>B. bifidum</i> JOV	10,5±0,3	ND	1,5±0,0	3,7±0,1
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B19	ND	ND	1,2±0,1	ND
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B20	ND	ND	1,3±0,1	ND
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B21	11,6±0,5	ND	ND	0,7±0,1
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B22	11,1±0,4	ND	ND	10,1±0,4
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B23	11,5±0,3	ND	1,3±0,1	13,7±0,4
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B24	3,7±0,0	ND	ND	ND
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B25	13,4±0,1	ND	1,1±0,1	13,9±0,4
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B26	10,5±0,1	ND	1,5±0,1	16,4±0,4
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B27	9,6±0,2	ND	1,7±0,1	4,7±0,1
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B28	9,1±0,1	ND	1,6±0,1	9,7±0,3
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B29	ND	5,9±0,1	ND	ND
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B30	10,5±0,3	ND	ND	9,3±0,4
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B31	ND	ND	1,2±0,1	ND
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B32	11,2±0,5	ND	0,7±0,0	9,4±0,3
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B33	10,7±0,5	ND	ND	9,2±0,1
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B34	11,9±0,3	ND	ND	15,6±0,1
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B35	10,8±0,4	3,3±0,2	5,2±0,2	17,7±0,3
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B36	9,6±0,3	6,4±0,1	ND	10,3±0,3
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B37	1,1±0,1	4,3±0,1	1,4±0,0	ND
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B38	1,6±0,0	9,8±0,1	ND	ND
<i>B. breve</i> B39	11,2±0,4	ND	1,9±0,0	24,3±0,6
<i>B. breve</i> B40	11,9±0,1	2,3±0,1	ND	10,0±0,2
<i>B. choerinum</i> B41	ND	3,3±0,1	ND	ND

* TYR tyramin, SPN spermin; ND nebyly detekovány žádné biogenní aminy

Tab. 4: Produkce biogenních aminů izoláty bifidobakterií ze sbírky České zemědělské univerzity v Praze

Kmeny	WCH		MRS	
	TYR [mg.l ⁻¹]*	SPN [mg.l ⁻¹]*	TYR [mg.l ⁻¹]*	SPN [mg.l ⁻¹]*
<i>B. choerinum</i> B43	ND	4,6±0,1	0,9±0,0	ND
<i>Lb. bombi</i> sp. B50	11,8±0,4	3,9±0,1	3,3±0,2	17,0±0,2
<i>Lb. bombi</i> sp. B51	10,4±0,2	ND	1,7±0,1	1,6±0,1
<i>Lb. reuteri</i> B52	ND	ND	ND	1,3±0,0
<i>Lb. rodentium</i> sp. B53	3,6±0,2	ND	14,5±0,8	8,9±0,4
<i>Lb. rodentium</i> sp. B54	ND	ND	ND	ND
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B44	1,3±0,4	ND	1,4±0,2	14,5±0,9
<i>B. thermophilum</i> B45	ND	ND	ND	5,5±0,2
<i>B. thermophilum</i> B46	11,8±0,1	ND	ND	13,6±0,3
<i>B. ruminantium</i> B47	11,2±0,2	18,6±0,1		
<i>B. pseudolongum</i> B48	1,7±0,1	12,4±0,3	ND	ND
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B49	3,3±0,1	11,9±0,2	3,5±0,1	12,2±0,2
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B44	ND	ND	1,2±0,1	ND

** TYR tyramin, SPN spermin; ND nebyly detekovány žádné biogenní aminy

Tab. 5: Převodní tabulka názvů humánních izolátů bifidobakterií a laktobacilů I

Původní název kmene	Značení kmene
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> A23	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> B1
<i>B. longum</i> A24	<i>B. longum</i> B2
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> 6	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> B3
<i>B. longum</i> 8	<i>B. longum</i> B4
<i>B. longum</i> E21	<i>B. longum</i> B5
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> F8	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> B6
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> H3	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> B7
<i>B. longum</i> BV	<i>B. longum</i> B8
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> TP1	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> B9
<i>B. longum</i> SZU 14V	<i>B. longum</i> B10
<i>B. longum</i> ssp. <i>suis</i> 022II	<i>B. longum</i> ssp. <i>suis</i> B11
<i>B. longum</i> ssp. <i>suis</i> 5/9	<i>B. longum</i> ssp. <i>suis</i> B12
<i>B. bifidum</i> 3	<i>B. bifidum</i> B13
<i>B. bifidum</i> A19	<i>B. bifidum</i> B14
<i>B. bifidum</i> F1	<i>B. bifidum</i> B15
<i>B. bifidum</i> JKM	<i>B. bifidum</i> B16
<i>B. bifidum</i> BM	<i>B. bifidum</i> B17
<i>B. bifidum</i> EVA 2	<i>B. bifidum</i> B18
<i>B. bifidum</i> JOV	<i>B. bifidum</i> JOV
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> E5	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B19
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> F7	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B20
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> 22	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B21
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> 15	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B22
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> 13 1L	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B23
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> 12 2 L	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B24
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> I3	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B25
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> H4	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B26
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> P2N/1 ag+	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B27
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> P2/5	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B28
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> 1/11	<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B29
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> 2VI	<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B30
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> 3II	<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B31
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> 5VB	<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B32
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> 6II	<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B33
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> 7VIA	<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B34
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> 012II1	<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B35
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> 023II	<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B36
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> 805III2	<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B37
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> 813P2	<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B38
<i>B. breve</i> 20213T A4	<i>B. breve</i> B39
<i>B. breve</i> H14	<i>B. breve</i> B40
<i>B. choerinum</i> 5IIA	<i>B. choerinum</i> B41
<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i> 13V5	<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i> B42

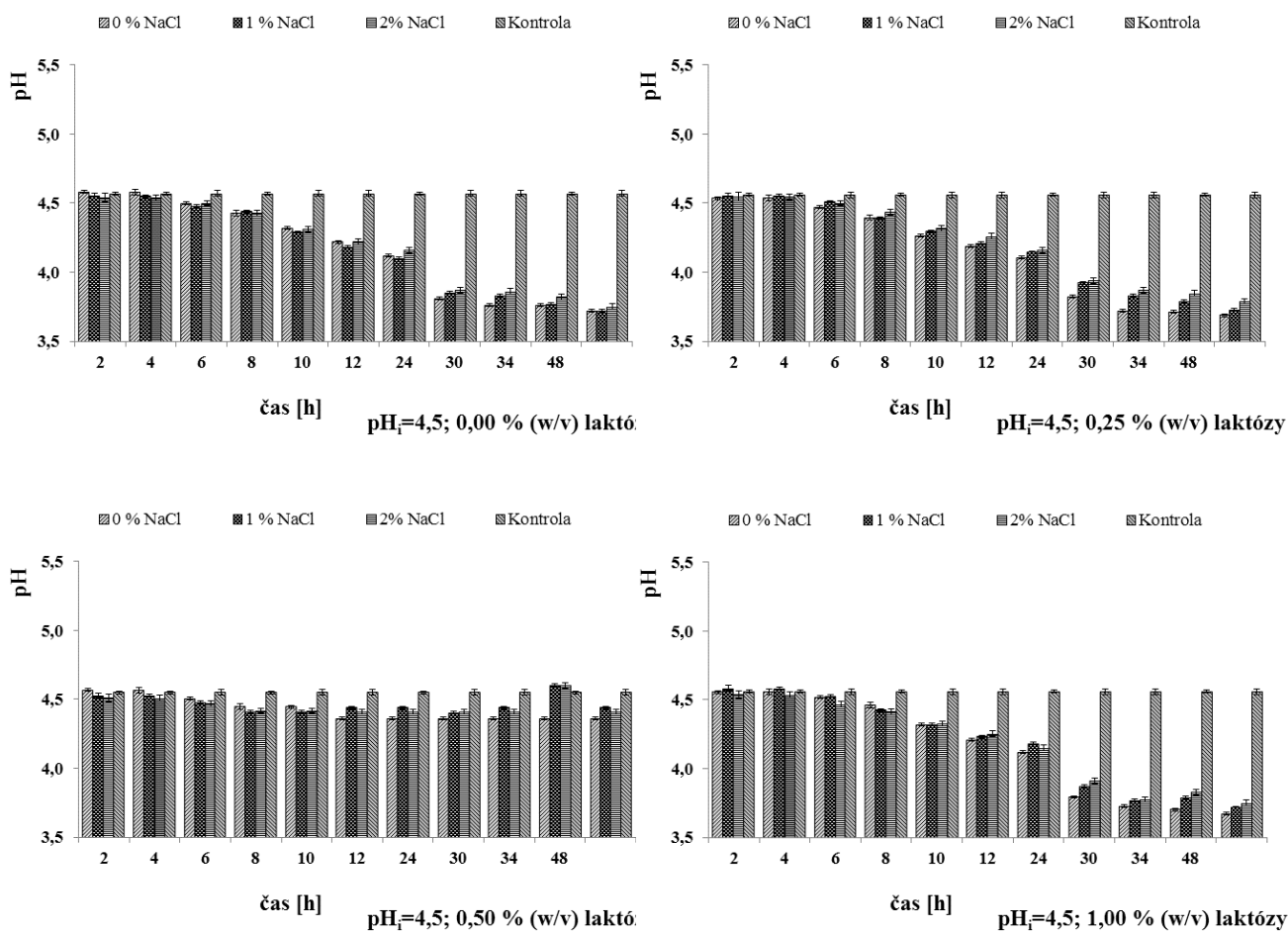
Tab. 6: Převodní tabulka názvů humánních izolátů bifidobakterií a laktobacilů II

Původní název kmene	Značení kmene
<i>B. choerinum</i> 023I2	<i>B. choerinum</i> B43
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> 805P4	<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> B44
<i>B. thermophilum</i> 017III	<i>B. thermophilum</i> B45
<i>B. thermophilum</i> 025II	<i>B. thermophilum</i> B46
<i>B. ruminantium</i> 10IV	<i>B. ruminantium</i> B47
<i>B. pseudolongum</i> 9VIB	<i>B. pseudolongum</i> B48
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> E5	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> B49
<i>Lb. bombi</i> sp. nov. M1/2	<i>Lb. bombi</i> sp. B50
<i>Lb. bombi</i> sp. nov. M3/2	<i>Lb. bombi</i> sp. B51
<i>Lb. reuteri</i> 3Lb ag+	<i>Lb. reuteri</i> B52
<i>Lb. rodentium</i> sp. nov. TLU 1	<i>Lb. rodentium</i> sp. B53
<i>Lb. rodentium</i> sp. nov. HRROT 1	<i>Lb. rodentium</i> sp. B54

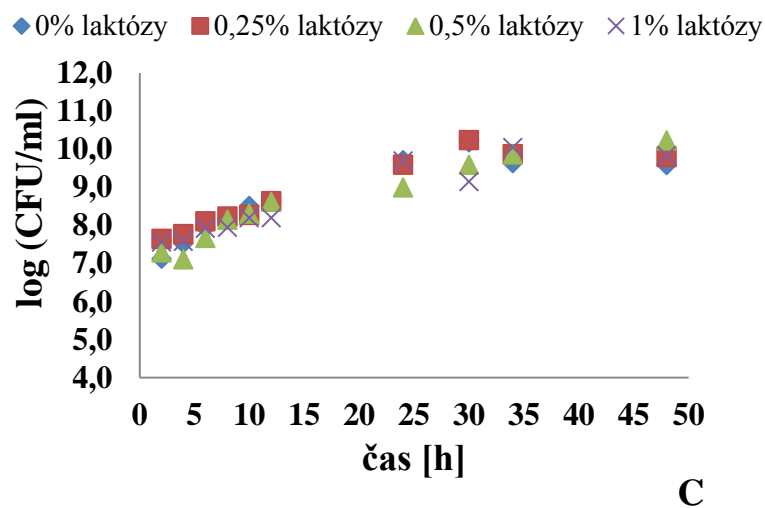
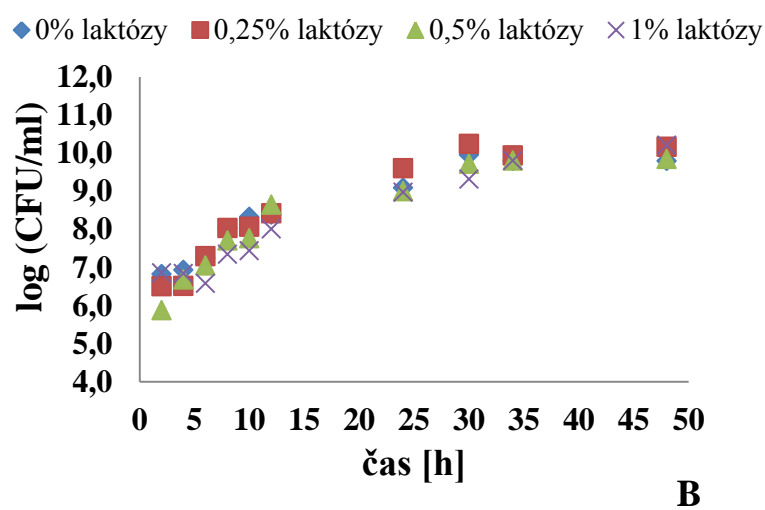
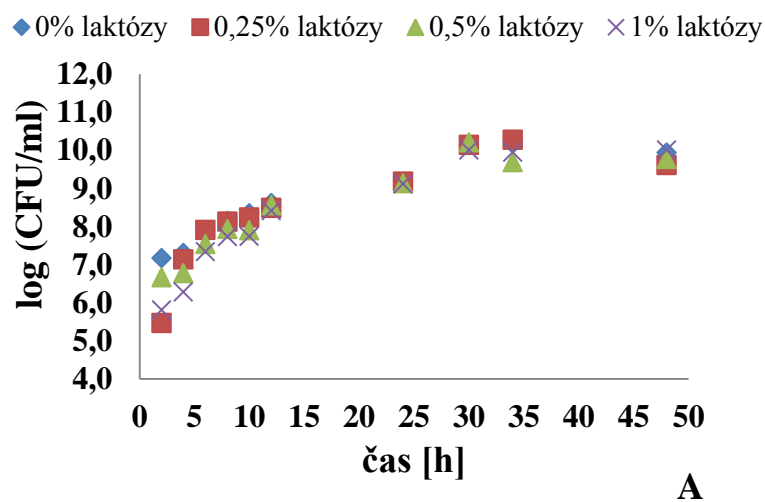
Tab. 7: Převodní tabulka názvů izolátů laktobacilů z procesu výroby sýrů

Původní název kmene	Značení kmene
<i>Lb. brevis</i> 10185-3	<i>Lb. brevis</i> T01
<i>Lb. curvatus</i> ssp. <i>curvatus</i> 10127-9	<i>Lb. curvatus</i> T02

Příloha B

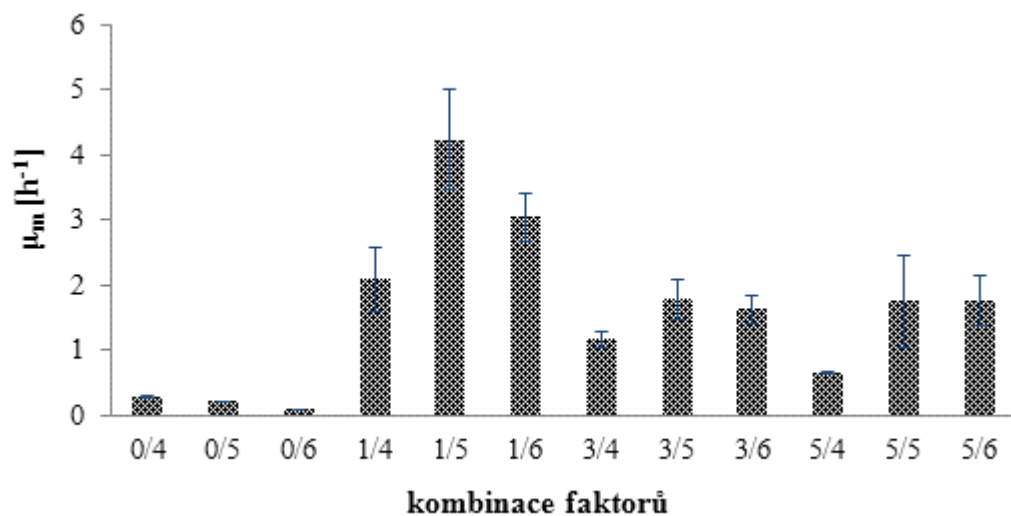


Obr. 1: Vývoj pH kultivačního média při kultivaci u *B. lactis* CCDM 239 v MRS s přidavkem laktózy a soli při 37 °C; A...0 % (w/v) laktózy, B...0,25 % (w/v) laktózy, C...0,5 % laktózy (w/v), D...1,0 % (w/v) laktózy

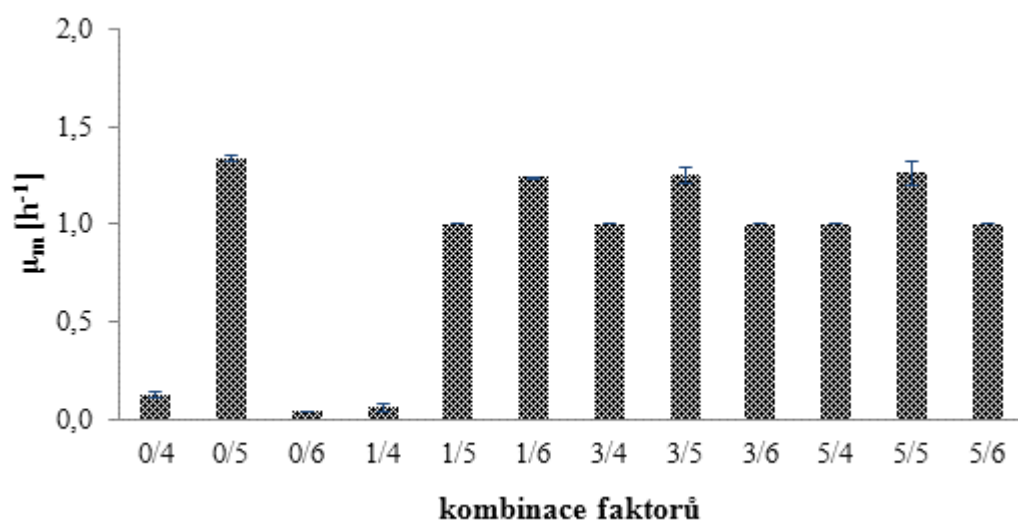


Obr. 2: Růstové křivky *B. lactis* CCDM 239 v médiu s přidavkem laktózy (% w/v) a soli při 37 °C; A... 0 % NaCl, B...1 % NaCl, C...2 % NaCl

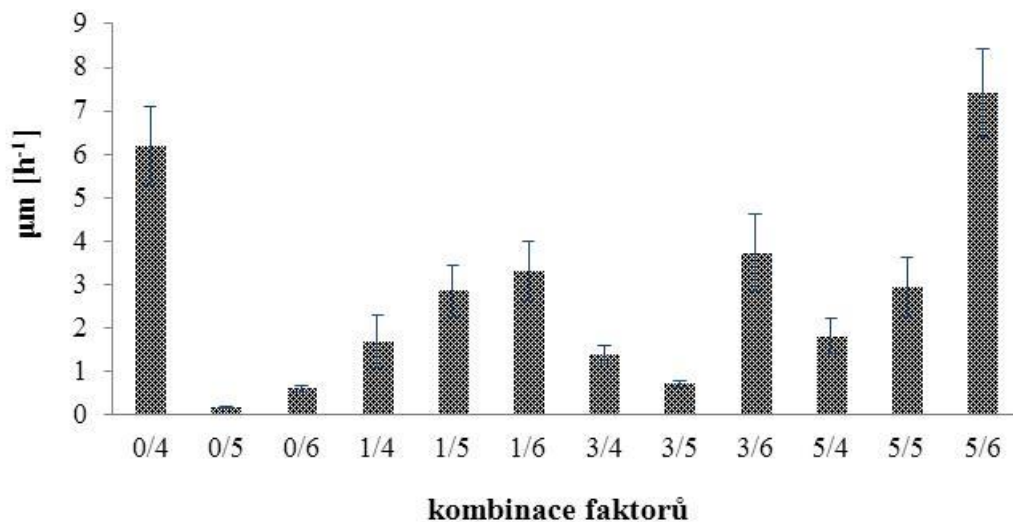
Příloha C



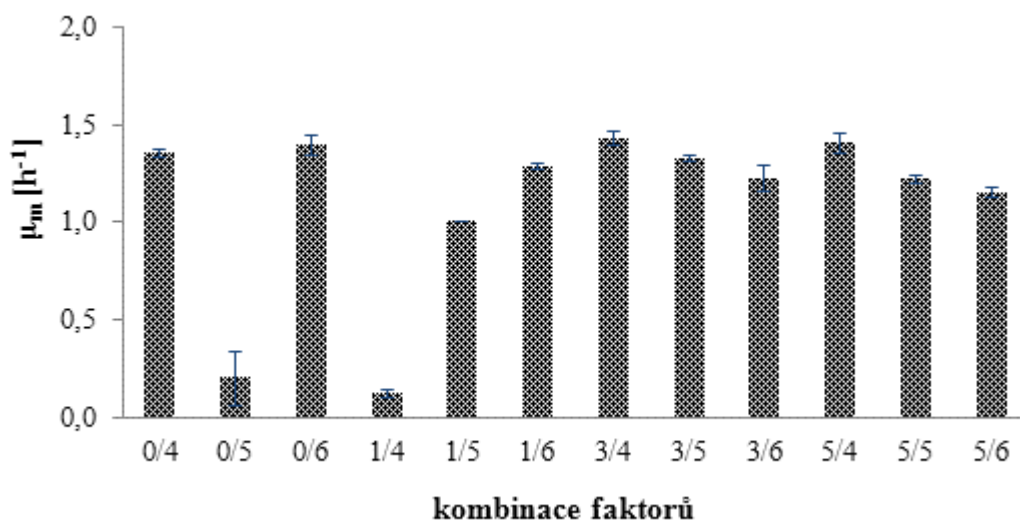
Obr. 1: Rychlost produkce tyraminu při 37 °C v MRS s přidavky glycerolu a úpravou pH u *Lb. rhamnosus* CCDM 289; Např. 5/6...5% (v/v) přidavek glycerolu, pH 6.



Obr. 2: Rychlost produkce tyraminu při 10 °C v MRS s přidavky glycerolu a úpravou pH u *Lb. rhamnosus* CCDM 289; Např. 5/6...5% (v/v) přidavek glycerolu, pH 6



Obr. 3: Rychlost produkce putrescinu při 37 °C v MRS s přidavky glycerolu a úpravou pH u *Lb. rhamnosus* CCDM 289; Např. 5/6...5% přidavek glycerolu (v/v), pH 6



Obr. 4: Rychlost produkce putrescinu při 10 °C v MRS s přidavky glycerolu a úpravou pH u *Lb. rhamnosus* CCDM 289; Např. 5/6...5% přidavek glycerolu (v/v), pH 6

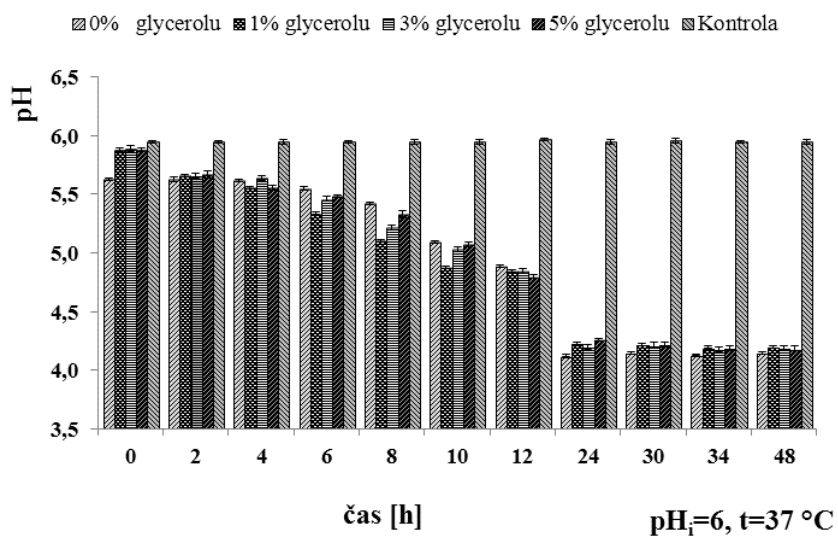
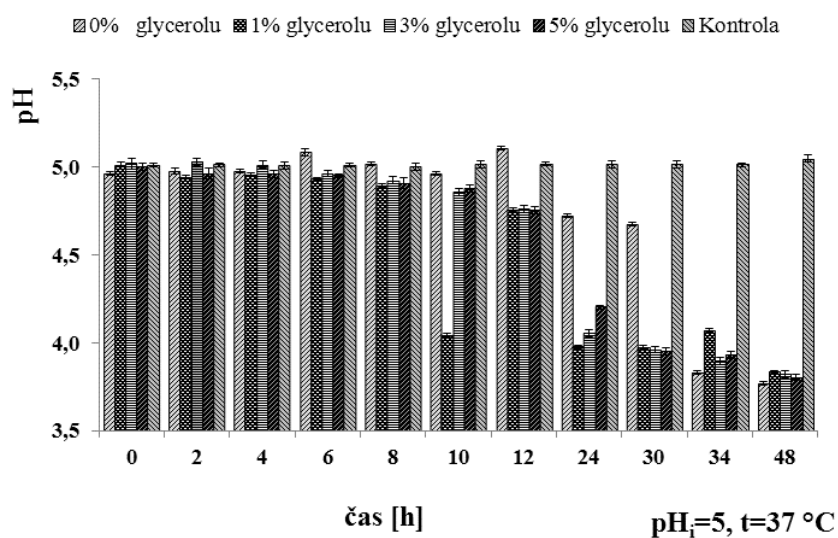
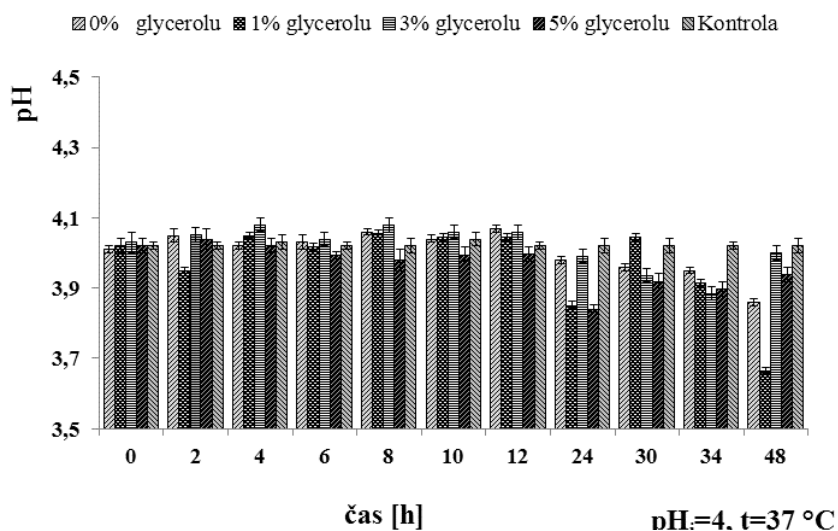
Tab. 5: Lag fáze produkce **tyraminu** při 10 a 37 °C v MRS s přidavkem glycerolu (v/v) a úpravou pH u *Lb. rhamnosus* CCDM 289

	testované faktory					
10 °C*	0/4	0/5	0/6	1/4	1/5	1/6
délka lag fáze [d]	N	1,54	N	N	1,05	1,24
směrodatná odchylka	N	0,03	N	N	0,01	0,01
	3/4	3/5	3/6	5/4	5/5	5/6
délka lag fáze [d]	1,11	1,26	1,24	1,82	1,27	1,09
směrodatná odchylka	0,00	0,04	0,00	0,11	0,07	0,00
37 °C*	0/4	0/5	0/6	1/4	1/5	1/6
délka lag fáze [h]	1,93	N	N	0,22	0,29	0,09
směrodatná odchylka	0,22	N	N	0,06	0,05	0,07
	3/4	3/5	3/6	5/4	5/5	5/6
délka lag fáze [h]	0,10	0,60	0,15	N	N	N
směrodatná odchylka	0,02	0,04	0,02	N	N	N

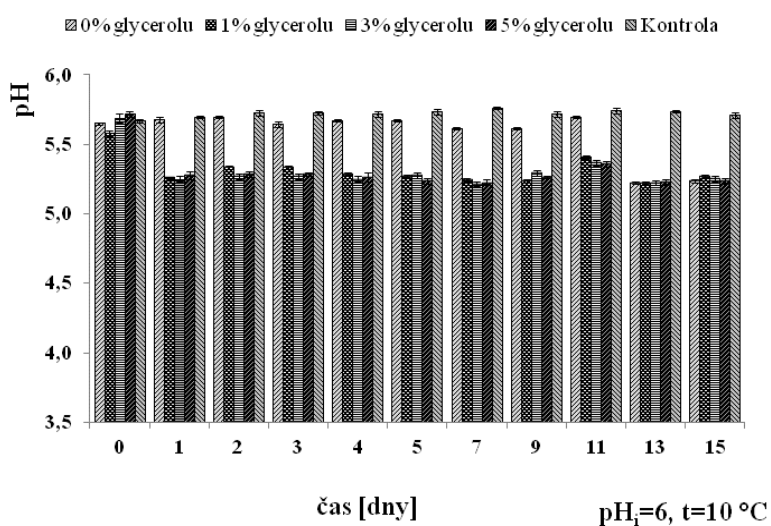
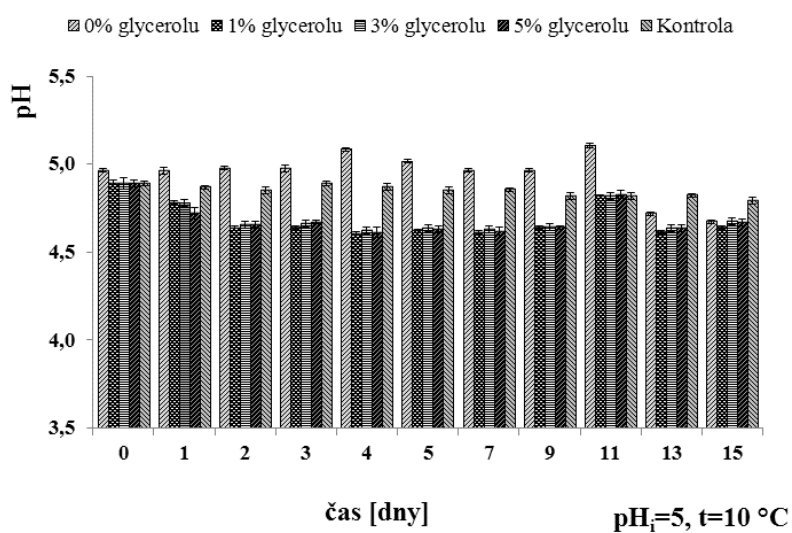
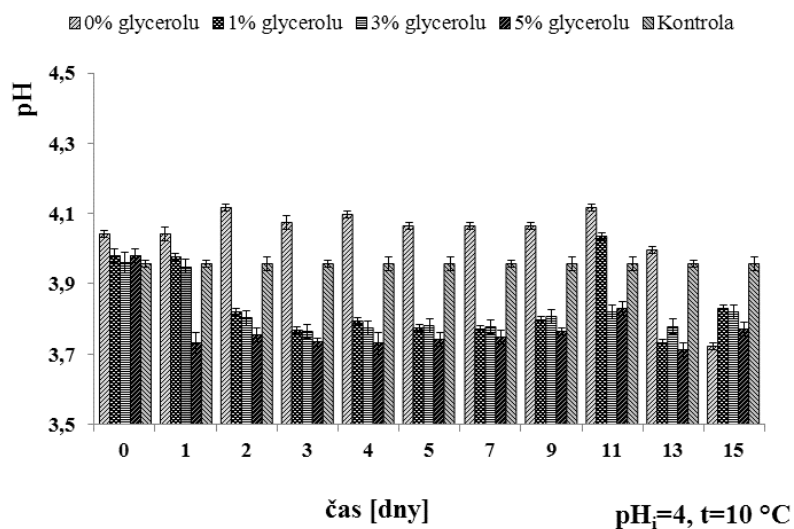
* Testované intervaly faktorů: přidavek glycerolu v koncentracích pH 4-6, N...nebylo možné vyhodnotit

Tab. 6: Lag fáze produkce **putrescinu** při 10 a 37 °C v MRS s přidavkem glycerolu (v/v) a úpravou pH u *Lb. rhamnosus* CCDM 289

	testované faktory					
10 °C	0/4	0/5	0/6	1/4	1/5	1/6
délka lag fáze [h]	N	N	N	N	1,01	1,34
směrodatná odchylka	N	N	N	N	0,03	0,02
	3/4	3/5	3/6	5/4	5/5	5/6
délka lag fáze [h]	1,01	1,26	N	N	1,27	N
směrodatná odchylka	0,01	0,04	N	N	0,07	N
37 °C	0/4	0/5	0/6	1/4	1/5	1/6
délka lag fáze [h]	29,73	12,45	21,92	N	0,35	0,31
směrodatná odchylka	0,05	0,08	0,31	N	0,06	0,03
	3/4	3/5	3/6	5/4	5/5	5/6
délka lag fáze [h]	N	N	0,34	0,13	0,36	0,34
směrodatná odchylka	N	N	0,04	0,02	0,05	0,03

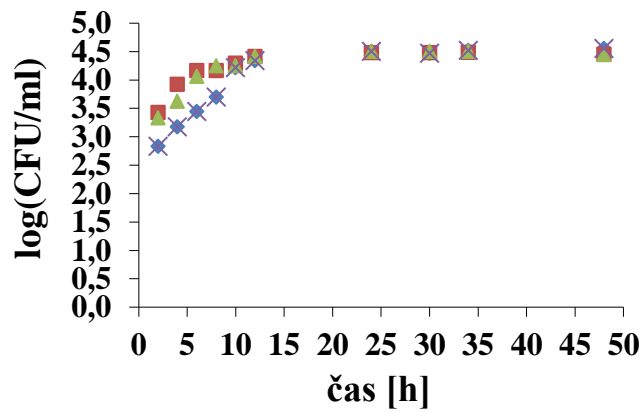


Obr. 5: Vývoj pH kultivačního média při kultivaci u *Lb. rhamnosus* CCDM 289 v MRS s přidavkem glycerolu (% v/v); pH_i ...iniciační pH, t ...teplota



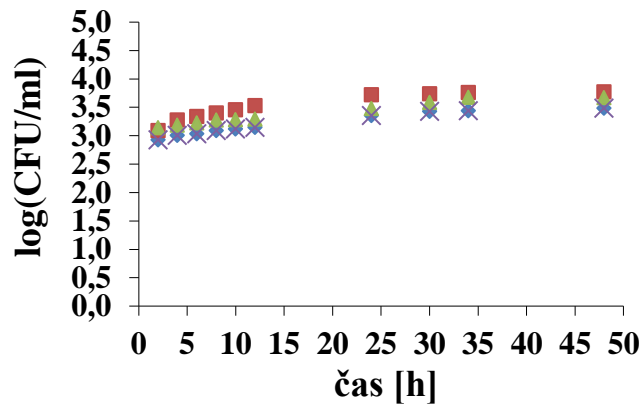
Obr. 6: Vývoj pH kultivačního média při kultivaci u *Lb. rhamnosus* CCDM 289 v MRS s přidavkem glycerolu (% v/v); pH_i ...iniciační pH, t ...teplota

◆ 0 % glycerolu ■ 1 % glycerolu ▲ 3 % glycerolu ✕ 5 % glycerolu



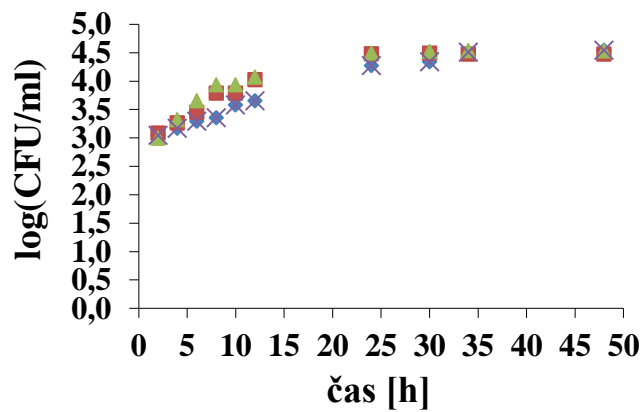
A

◆ 0 % glycerolu ■ 1 % glycerolu ▲ 3 % glycerolu ✕ 5 % glycerolu



B

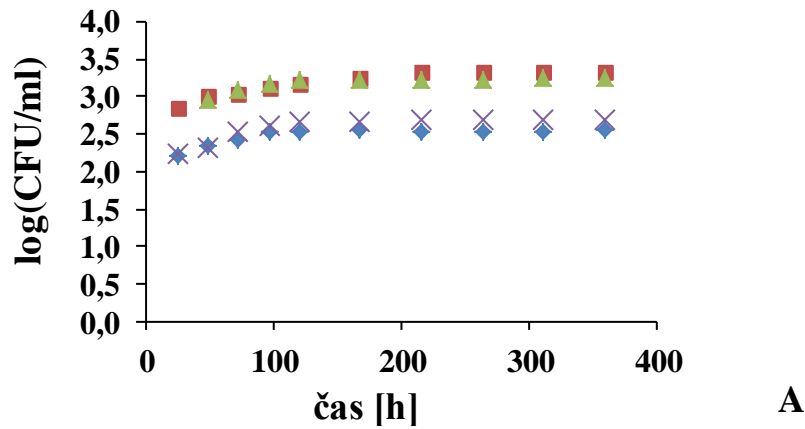
◆ 0 % glycerolu ■ 1 % glycerolu ▲ 3 % glycerolu ✕ 5 % glycerolu



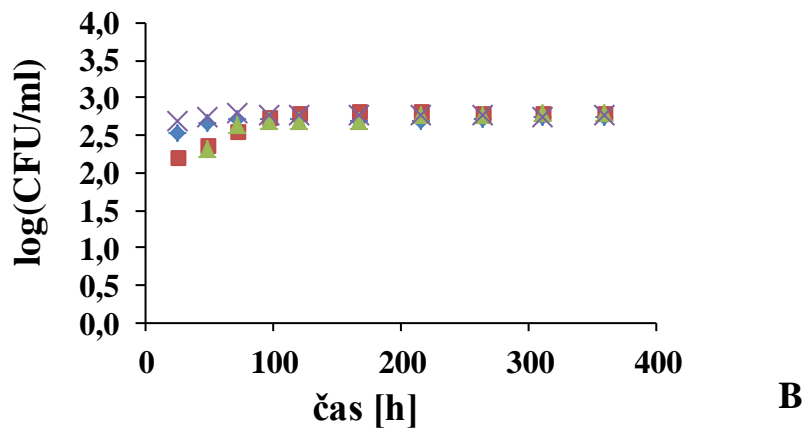
C

Obr. 7: Růstové křivky *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 239 v médiu s přidavkem glycerolu (% v/v) při 37 °C; A... pH 4, B...pH 5, C...pH 6

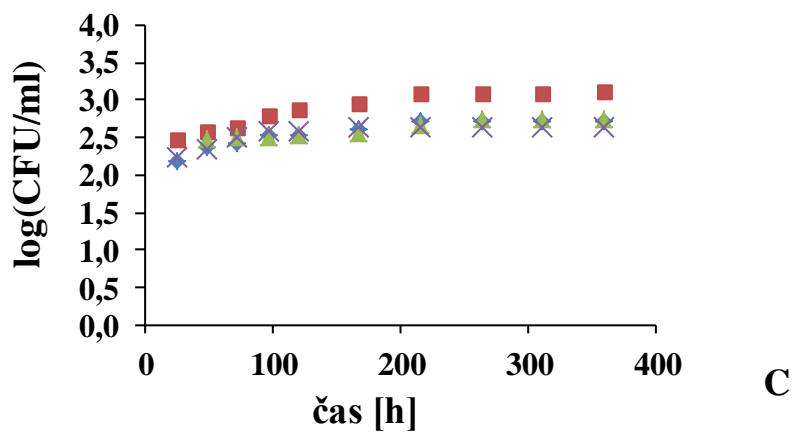
◆ 0 % glycerolu ■ 1 % glycerolu ▲ 3 % glycerolu ✕ 5 % glycerolu



◆ 0 % glycerolu ■ 1 % glycerolu ▲ 3 % glycerolu ✕ 5 % glycerolu

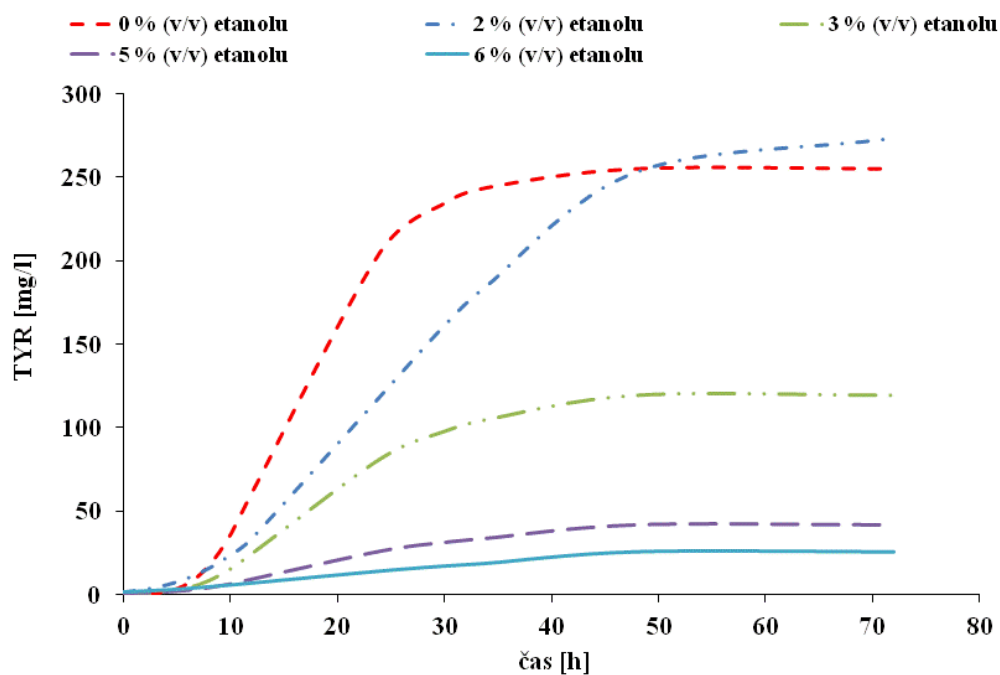


◆ 0 % glycerolu ■ 1 % glycerolu ▲ 3 % glycerolu ✕ 5 % glycerolu

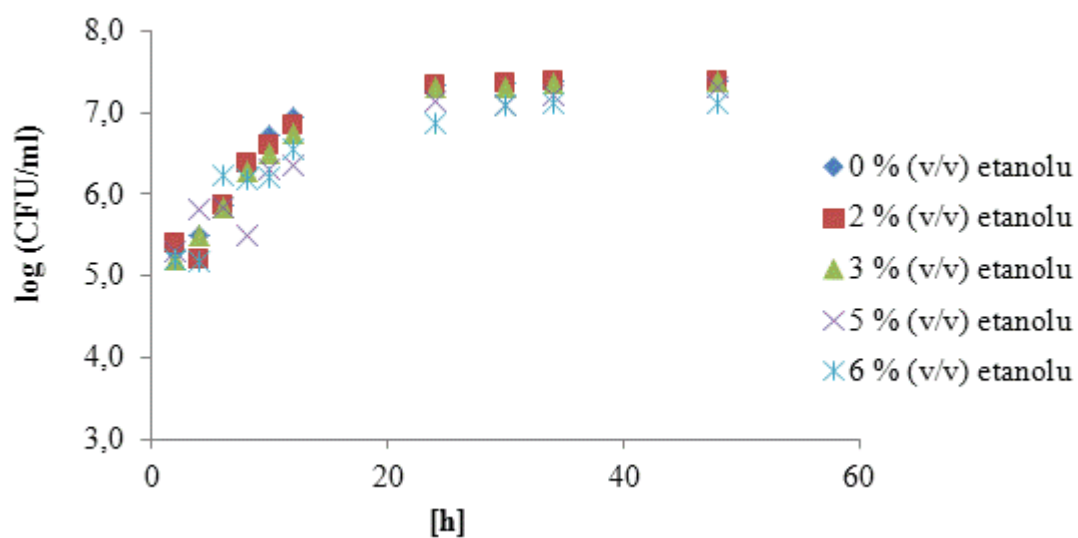


Obr. 8: Růstové křivky *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 239 v médiu s přidavkem glycerolu (% v/v) při 10 °C; A... pH 4, B...pH 5, C...pH 6

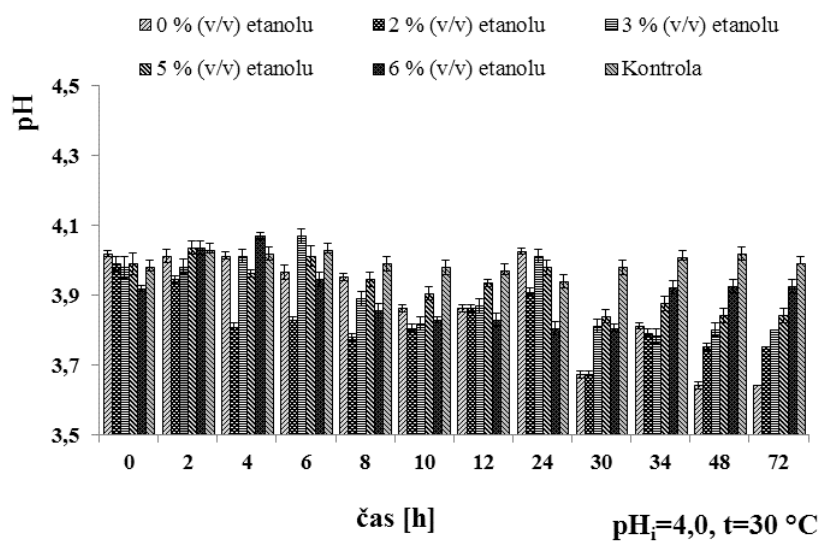
Příloha D



Obr. 1: Kinetika produkce TYR *Lb. brevis* RIBM 2-69 při 30 °C a vybraných koncentrací etanolu

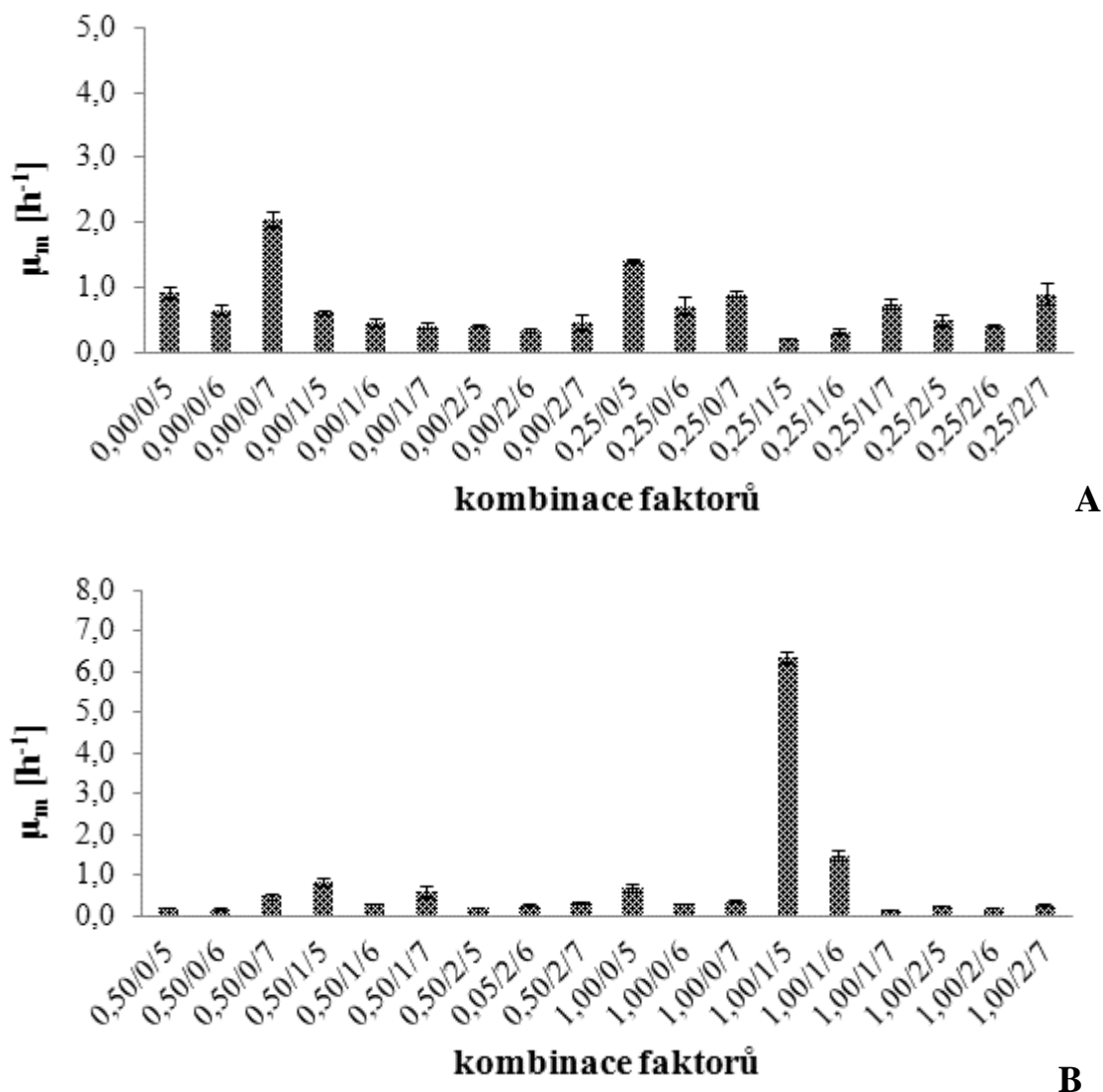


Obr. 2: Růstové křivky *Lb. brevis* RIBM 2-69 ovlivněné přidávkem etanolu (0-6 % (v/v)) při teplotě 30 °C

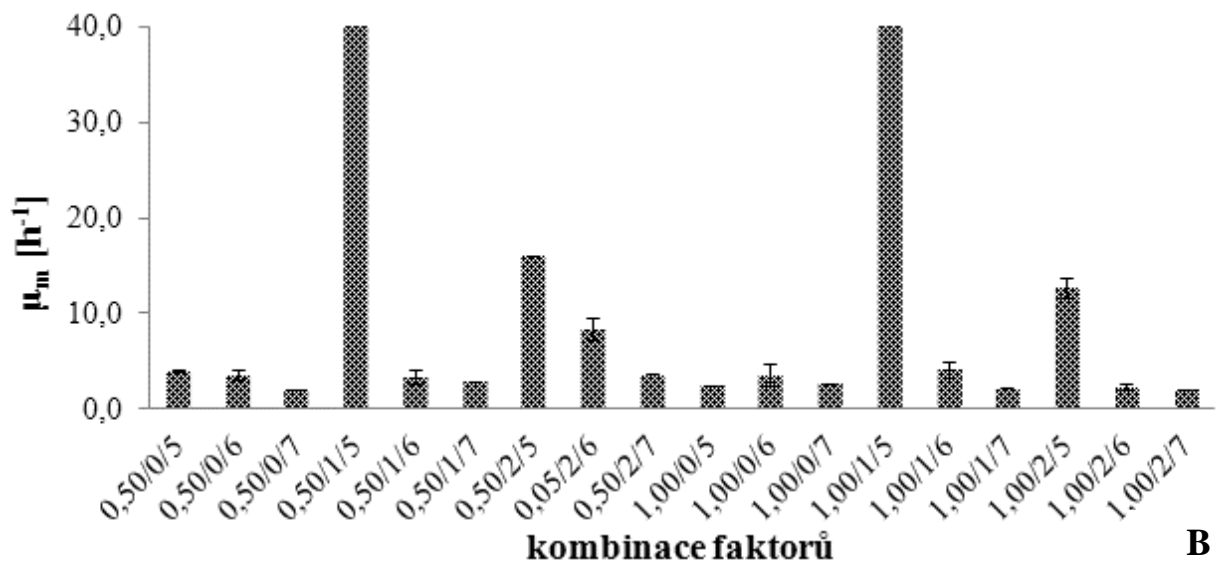
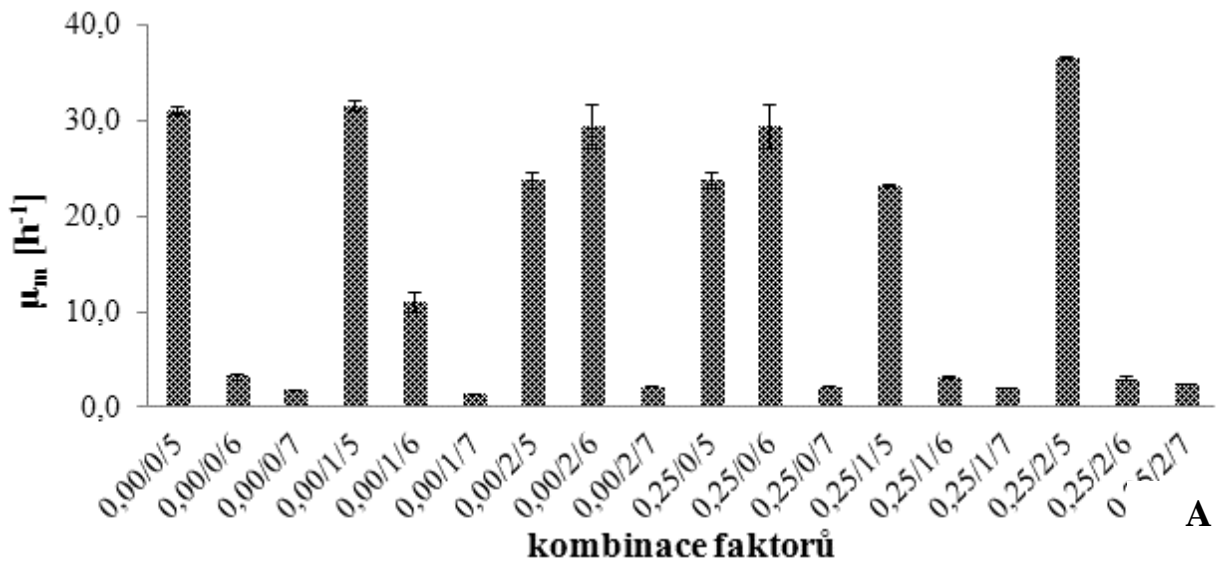


Obr. 3: Vývoj pH kultivačního prostředí při kultivaci *Lb. brevis* RIBM 2-69, pH_i ...iniciační pH 4, t ...teplota kultivace při 30 °C

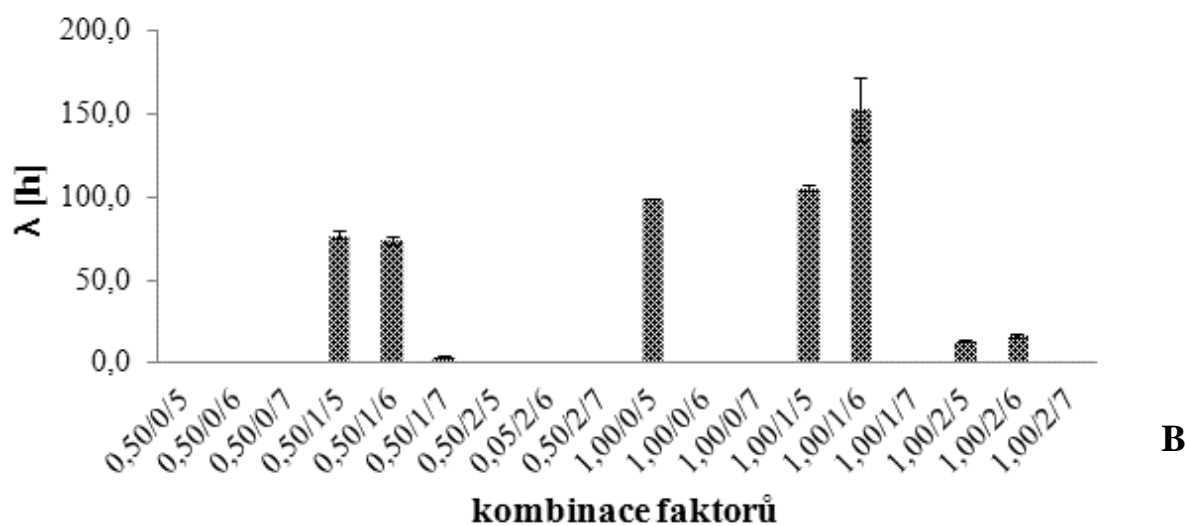
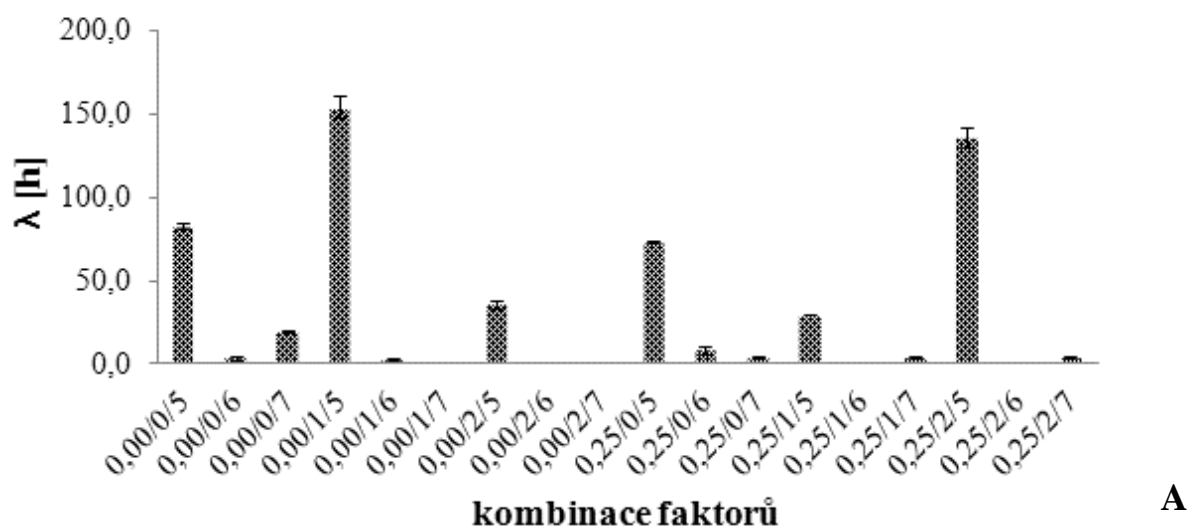
Příloha E



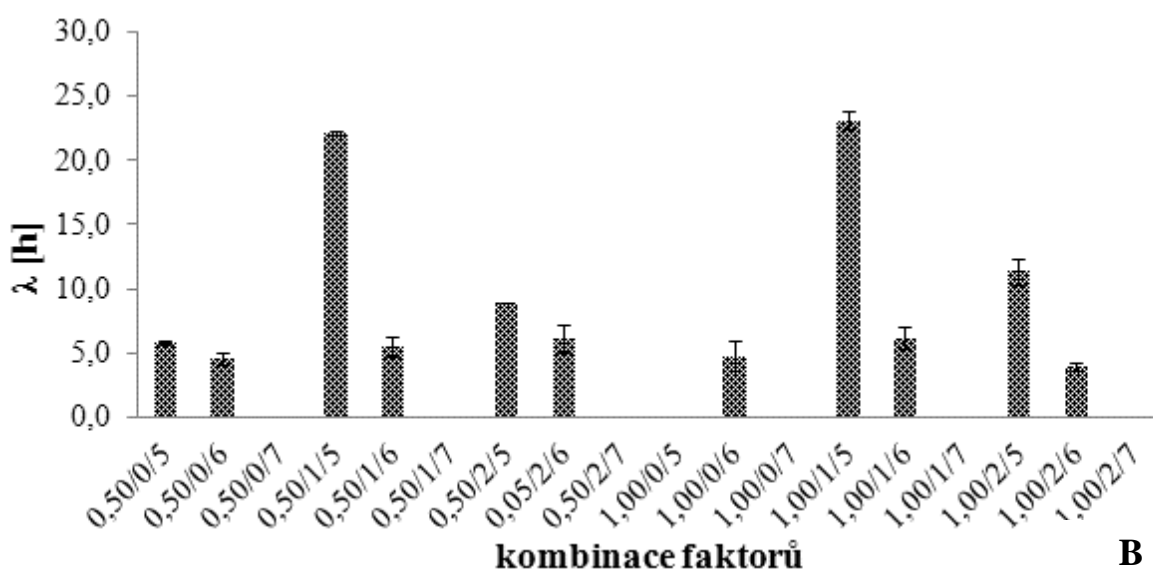
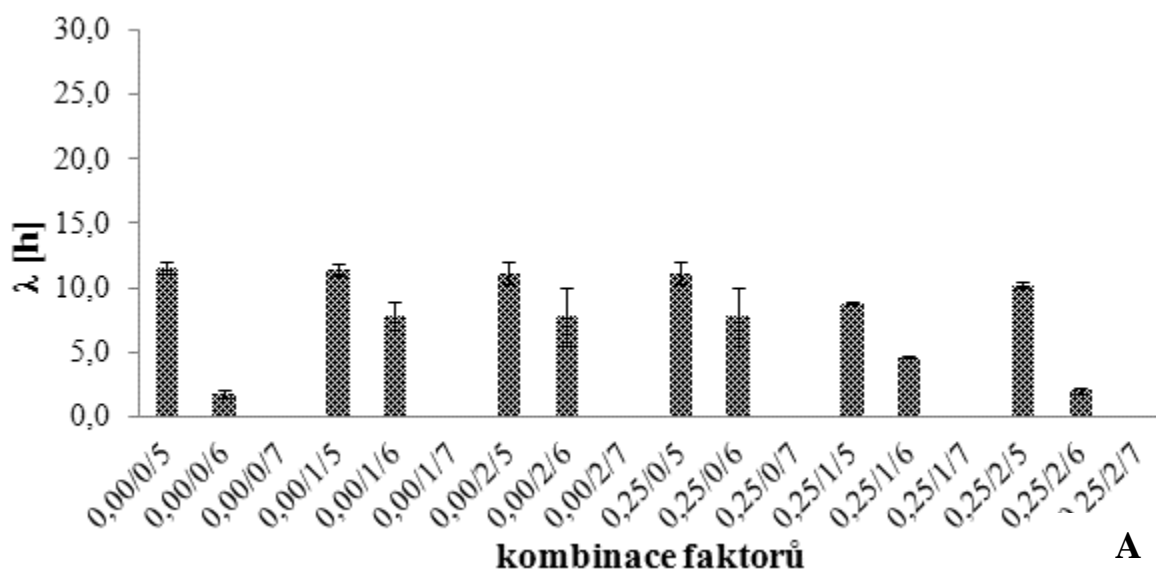
Obr. 1: Rychlost produkce (μ_m) tyraminu kmenem *Lb. brevis* T01 ovlivněná testovanými faktory při teplotě 10 °C; A...přídavek laktózy 0,00 a 0,25 % (w/v), B...přídavek laktózy 0,50 a 1,00 % (w/v), 0-2 % NaCl a pH 5-7; např. 0/1/6...0% laktózy, 1 % NaCl, pH 6



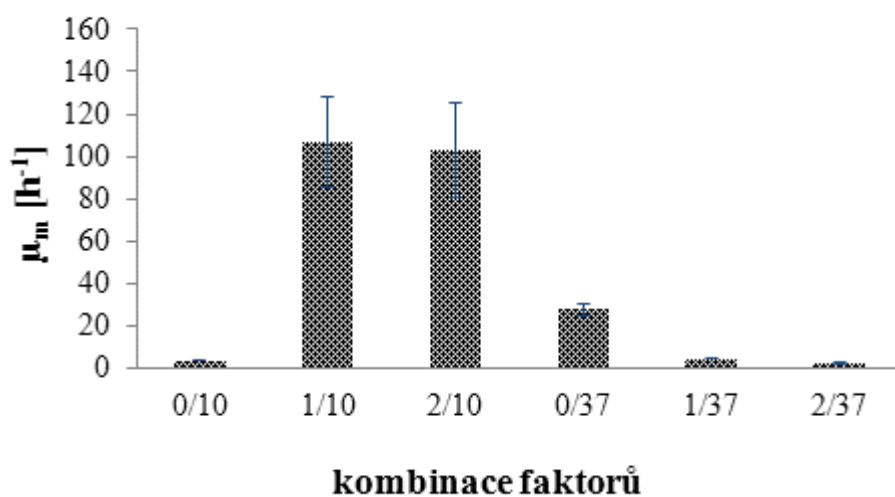
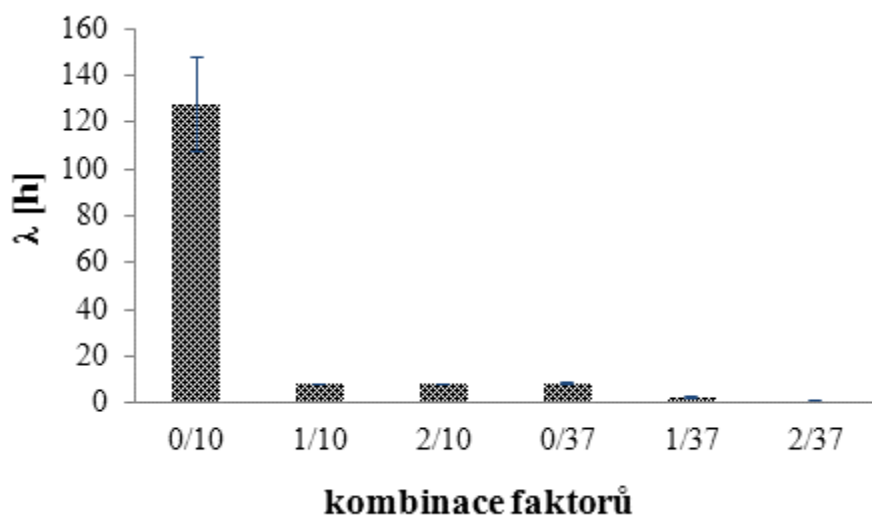
Obr. 2: Rychlost produkce (μ_m) tyraminu kmenem *Lb. brevis* T01 ovlivněná testovanými faktory při teplotě 37 °C; A...přídavek laktózy 0,00 a 0,25 % (w/v), B...přídavek laktózy 0,50 a 1,00 % (w/v), 0-2 % NaCl a pH 5-7; např. 0/1/6...0% laktózy, 1 % NaCl, pH 6 0/1/6...0 % laktózy, 1 % NaCl, pH 6



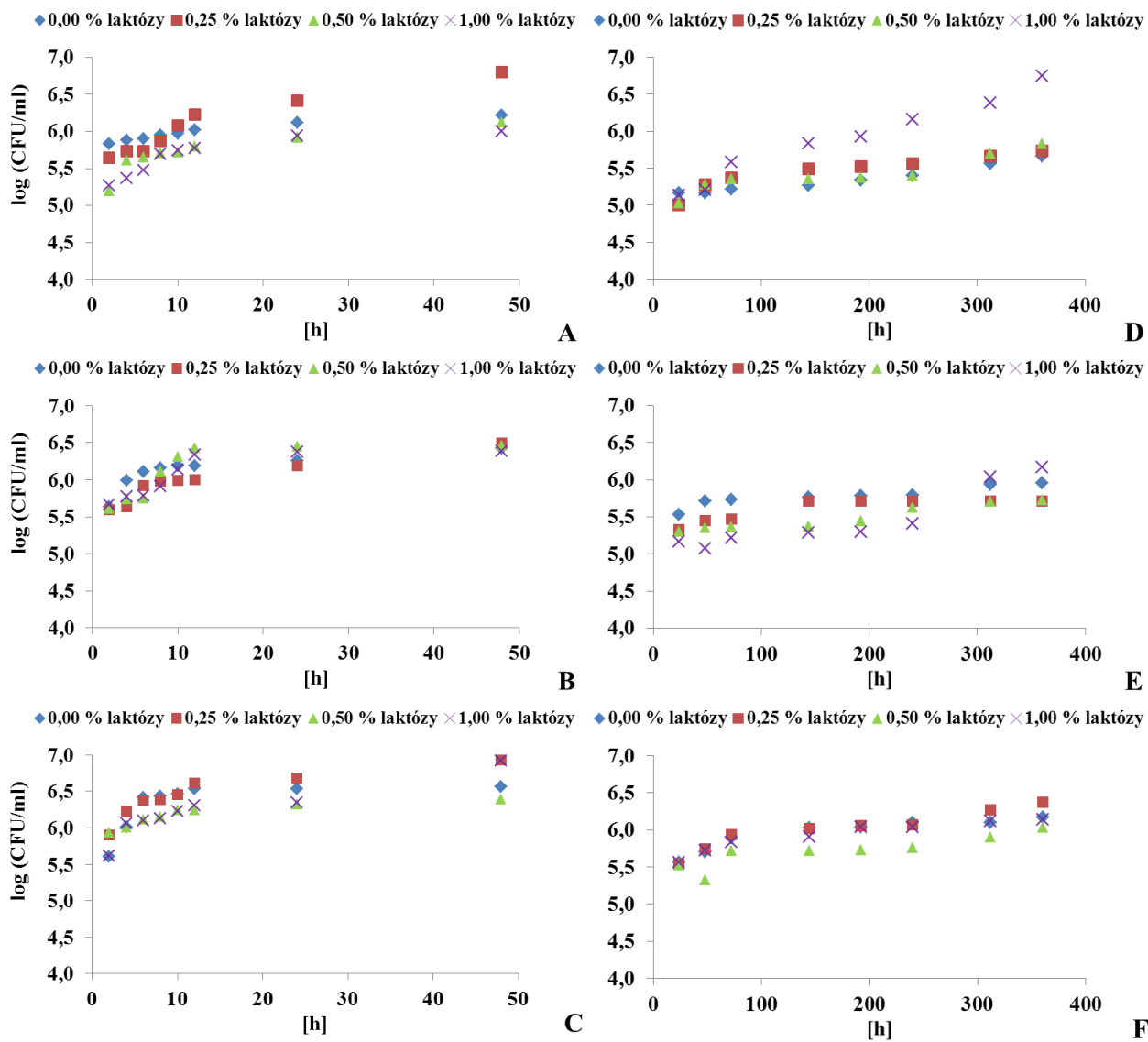
Obr. 3: Délka lag-fáze produkce (λ) tyraminu kmenem *Lb. brevis* T01 ovlivněná testovanými faktory při teplotě 10 °C; A...přídavek laktózy 0,00 a 0,25 % (w/v), B...přídavek laktózy 0,50 a 1,00 % (w/v), 0-2 % NaCl a pH 5-7; např. 0/1/6...0% laktózy, 1 % NaCl, pH 6 0/1/6...0% laktózy, 1 % NaCl, pH 6



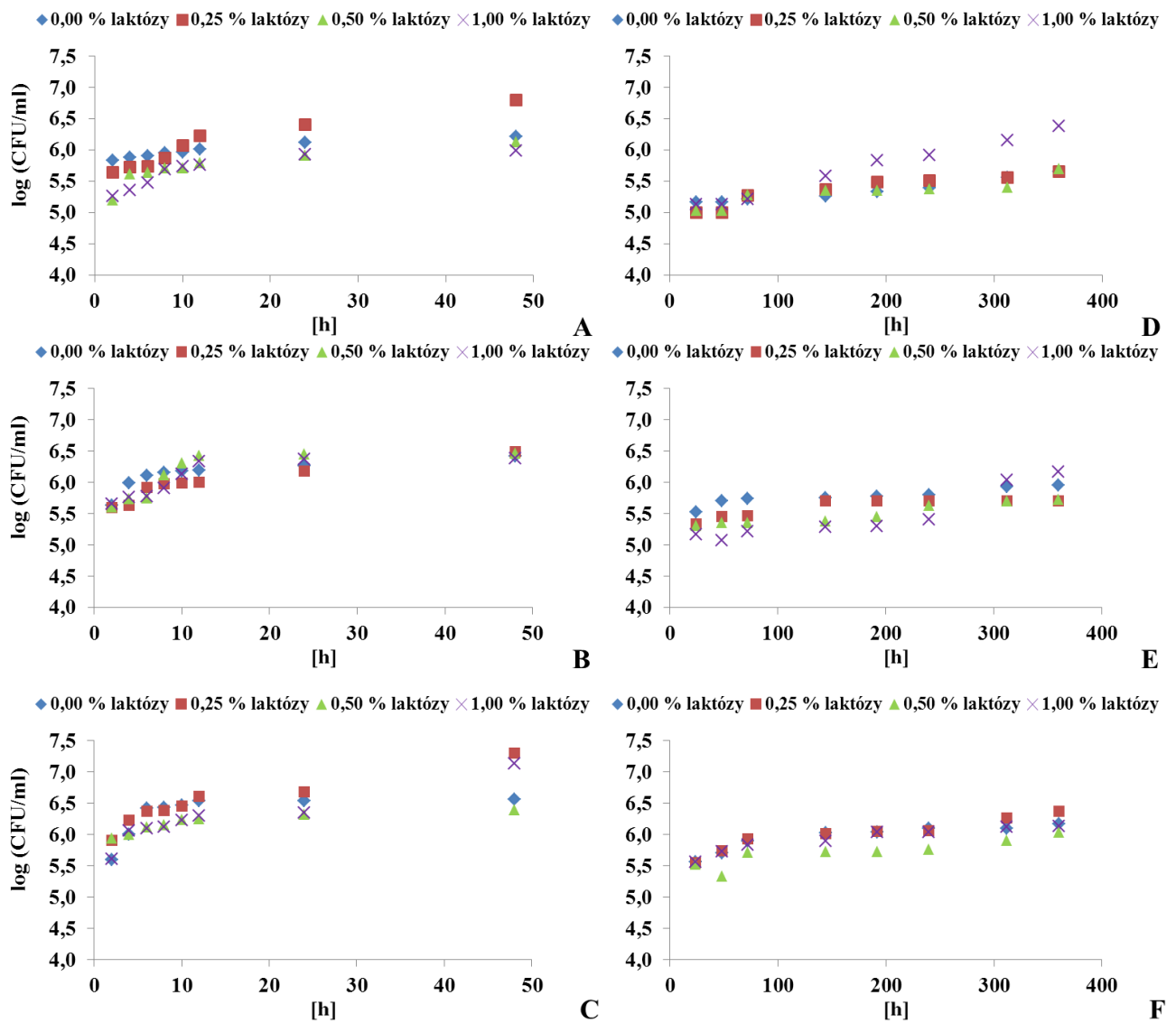
Obr. 4: Délka lag-fáze produkce (λ) tyraminu kmenem *Lb. brevis* T01 ovlivněná testovanými faktory při teplotě 37 °C; A...přídavek laktózy 0,00 a 0,25 % (w/v), B...přídavek laktózy 0,50 a 1,00 % (w/v), 0-2 % NaCl a pH 5-7; např. 0/1/6...0% laktózy, 1 % NaCl, pH 6 0/1/6...0% laktózy, 1 % NaCl, pH 6



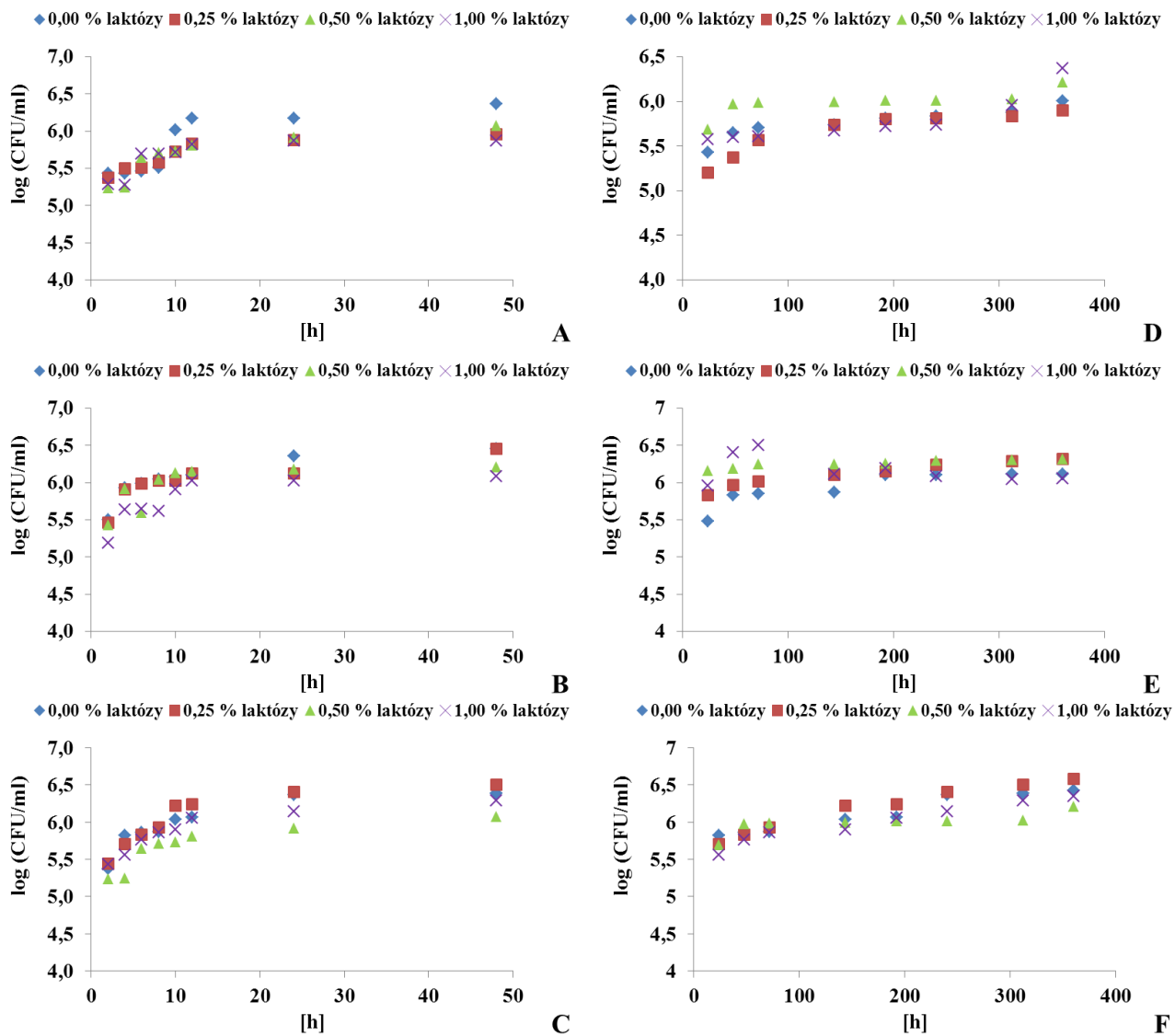
Obr. 5: Rychlost produkce (μ_m) a lag fáze produkce (λ) tyraminu kmenem *Lb. brevis* T01 *in vitro* za podmínek imitujících mléko při teplotě 37 °C; 4,80 % (w/v) laktóza, 0-2 % (w/v) NaCl, iniciační pH 6,8±0,2



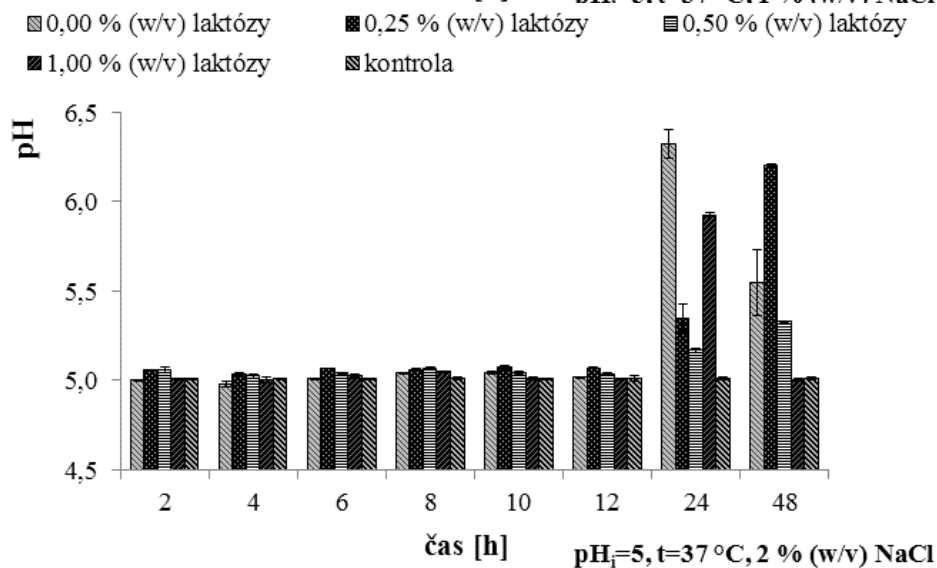
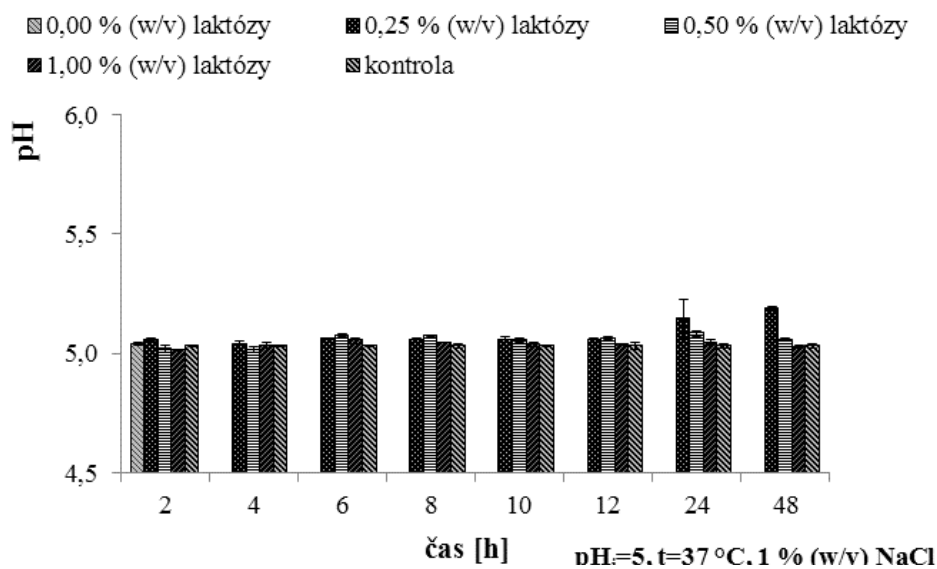
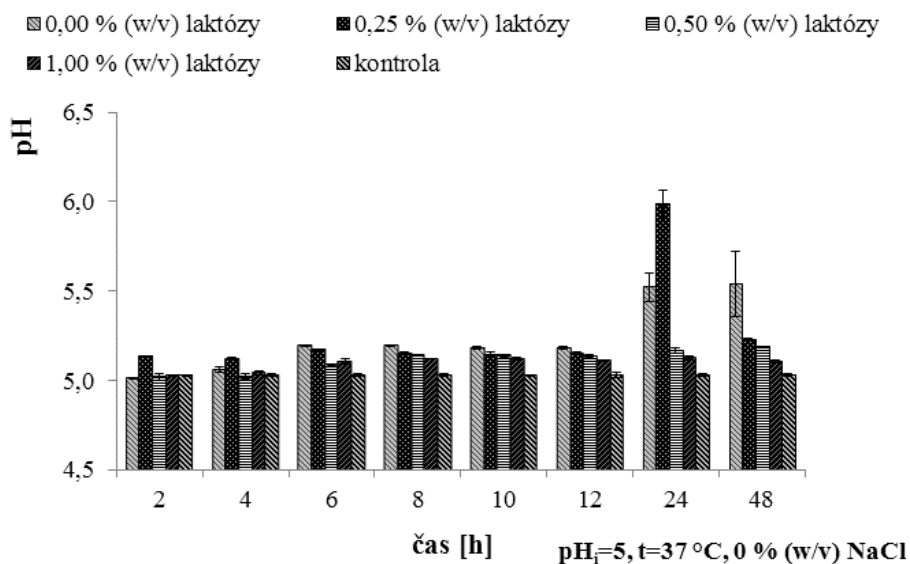
Obr. 6: Růst *Lactobacillus brevis* T01 za podmínek kultivace *in vitro* při pH 5, $t=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (A-C), $t=10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (D-F) s přidavkem různých koncentrací soli a laktózy (w/v); A, D 0 % (w/v) NaCl; B, E 1 % (w/v) NaCl; C, F 2 % (w/v) NaCl.



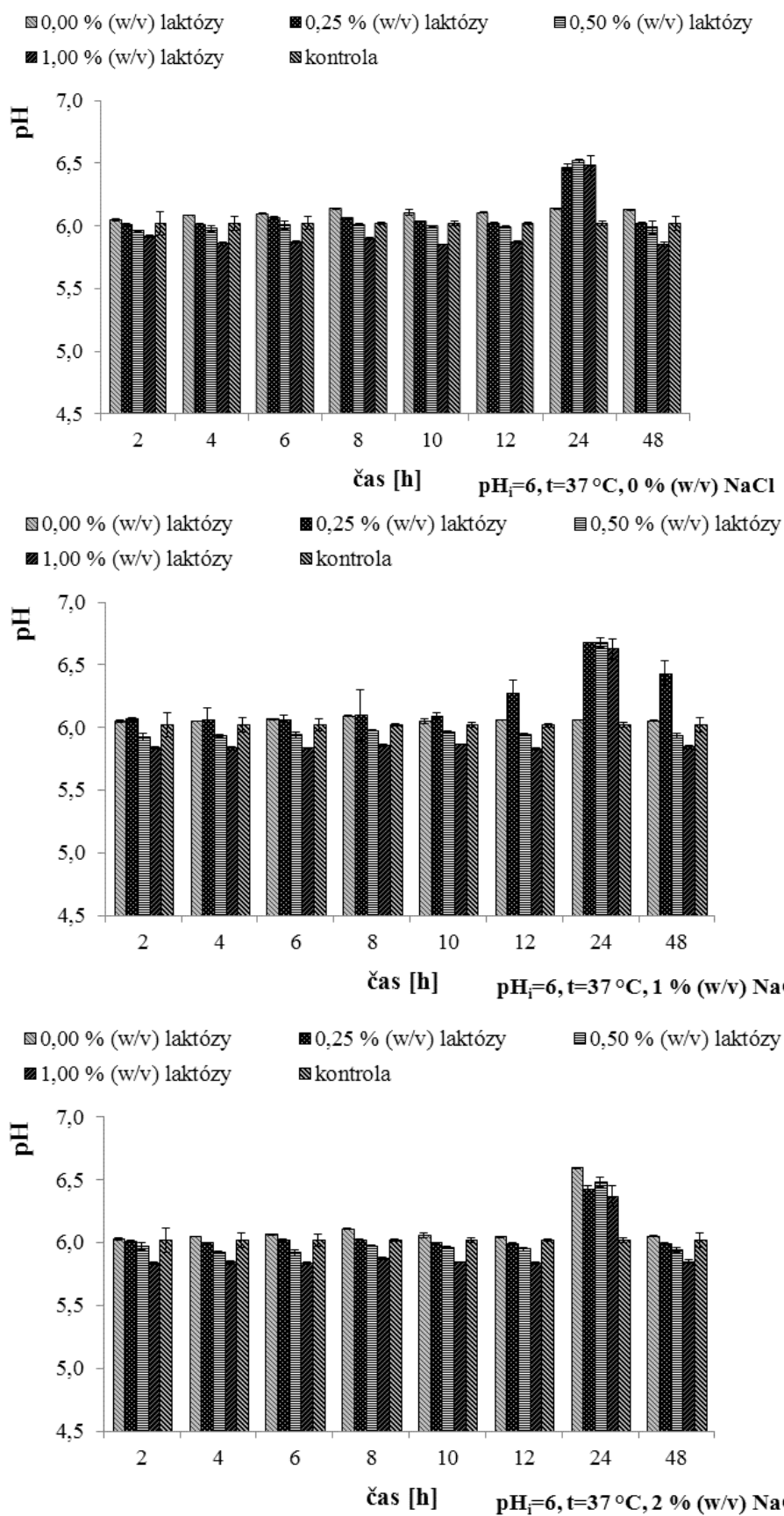
Obr. 7: Růst *Lactobacillus brevis* T01 za podmínek kultivace *in vitro* při pH 6, $t=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (A-C), $t=10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (D-F) s přidavkem různých koncentrací soli a laktózy (w/v); A, D 0 % (w/v) NaCl; B, E 1 % (w/v) NaCl; C, F 2 % (w/v) NaCl



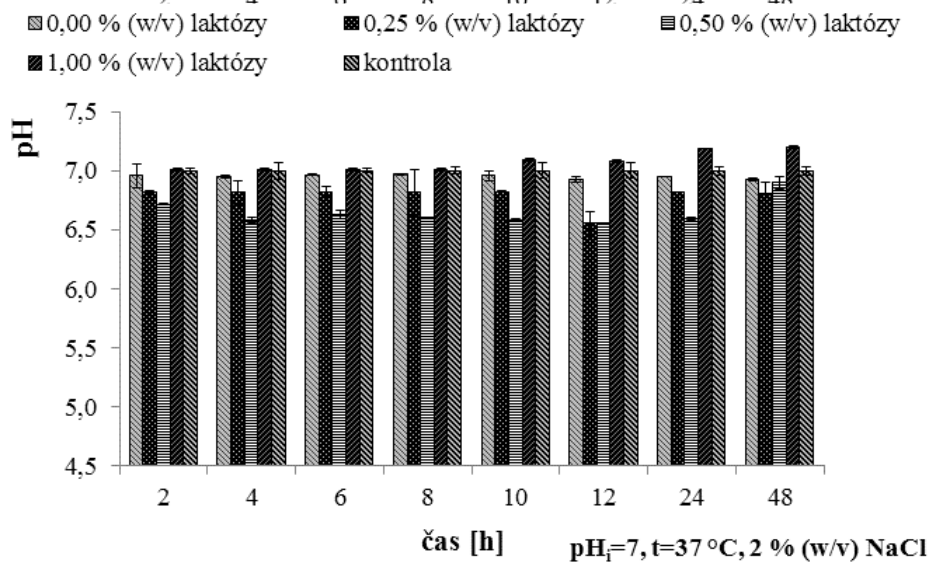
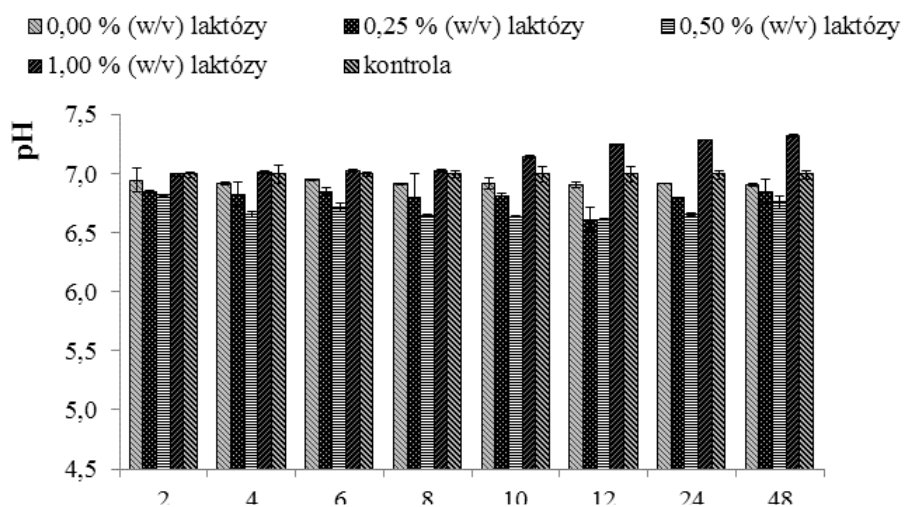
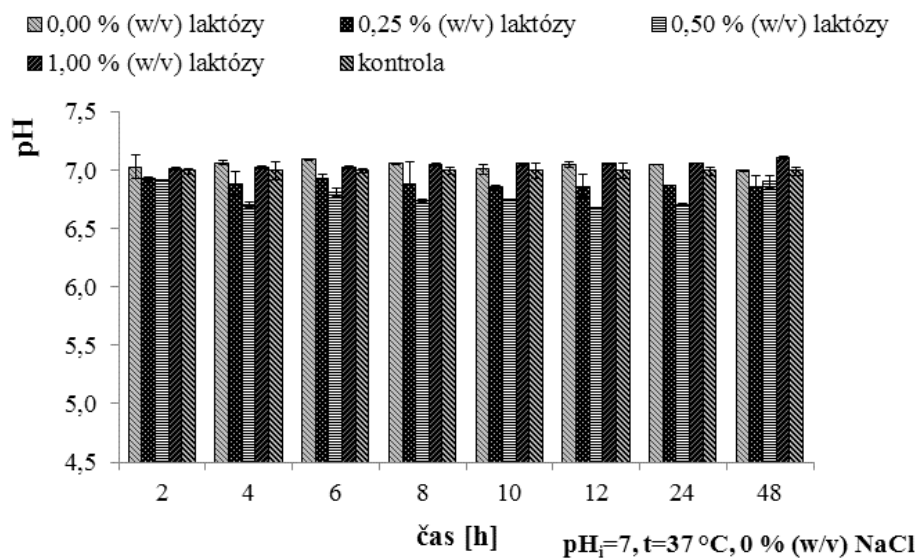
Obr. 8: Růst *Lactobacillus brevis* T01 za podmínek kultivace *in vitro* při pH 7, $t=37$ °C (A-C), $t=10$ °C (D-F) s přidavkem různých koncentrací soli a laktózy (w/v); A, D 0 % (w/v) NaCl; B, E 1 % (w/v) NaCl; C, F 2 % (w/v) NaCl



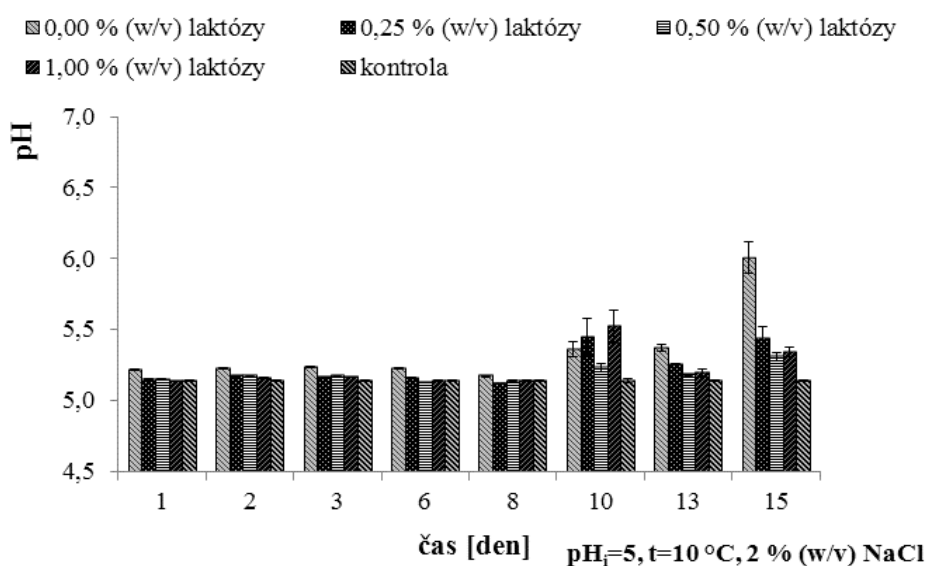
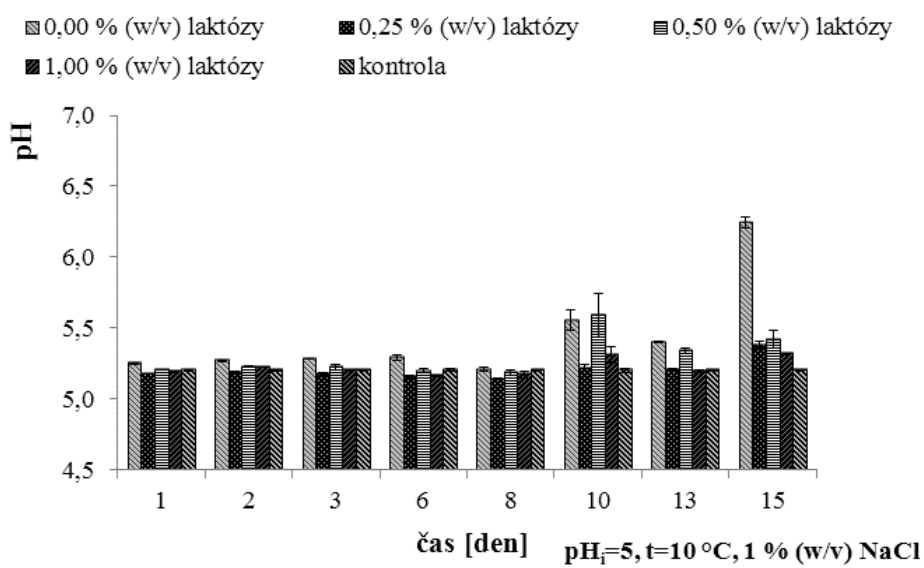
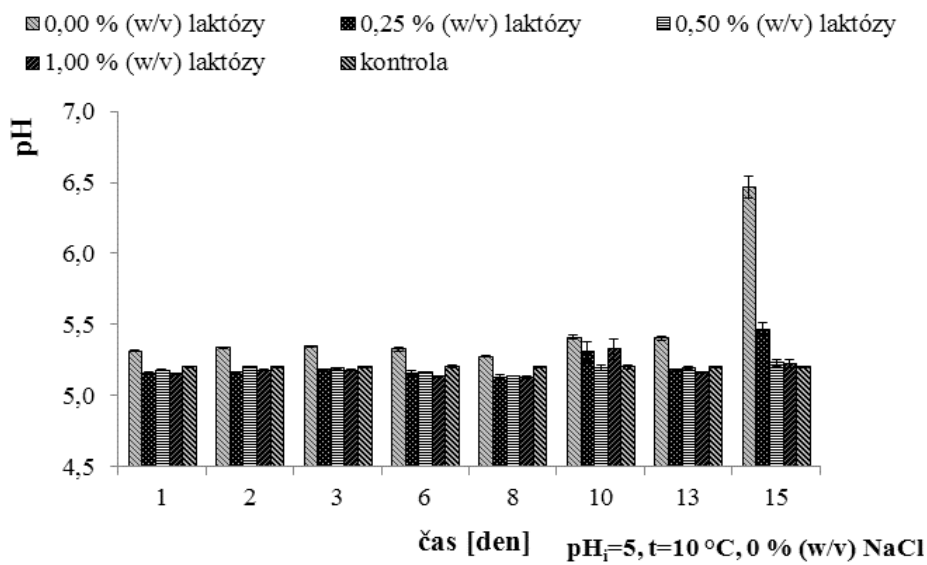
Obr. 9: Vývoj iniciačního pH (pH_i) $5 \pm 0,2$ kultivačního prostředí *Lactobacillus brevis* T01 v MRS bujónu při 37 °C a přidavku testovaných koncentrací laktózy (0,00-1,00 % (w/v)) a soli (0-2 % (w/v))



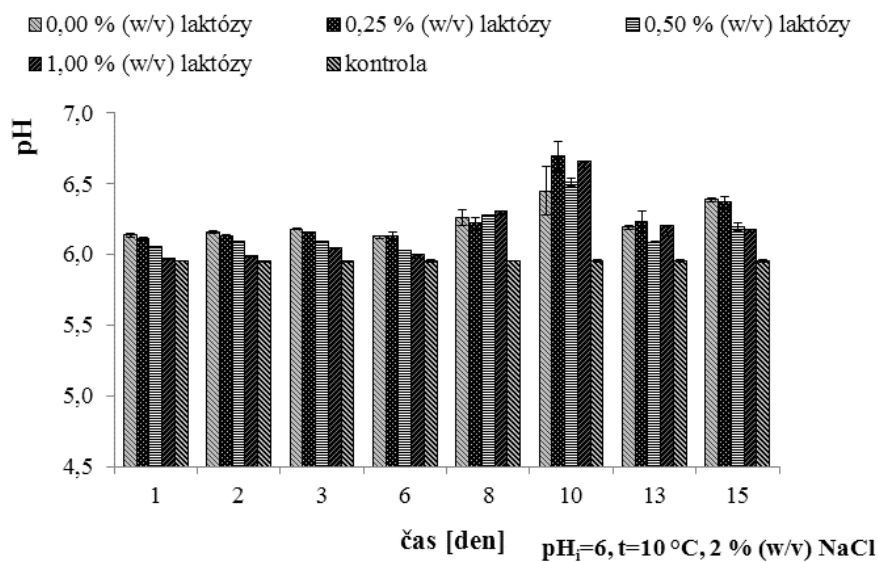
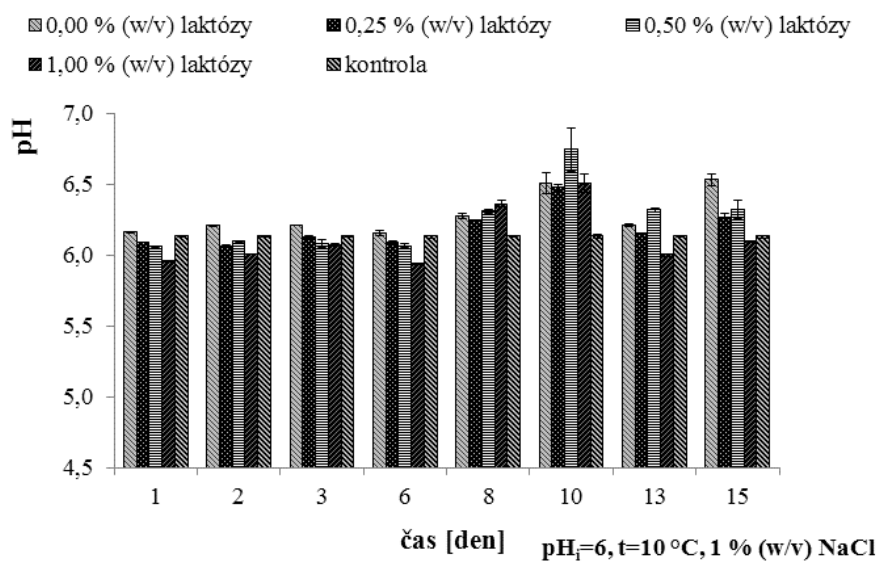
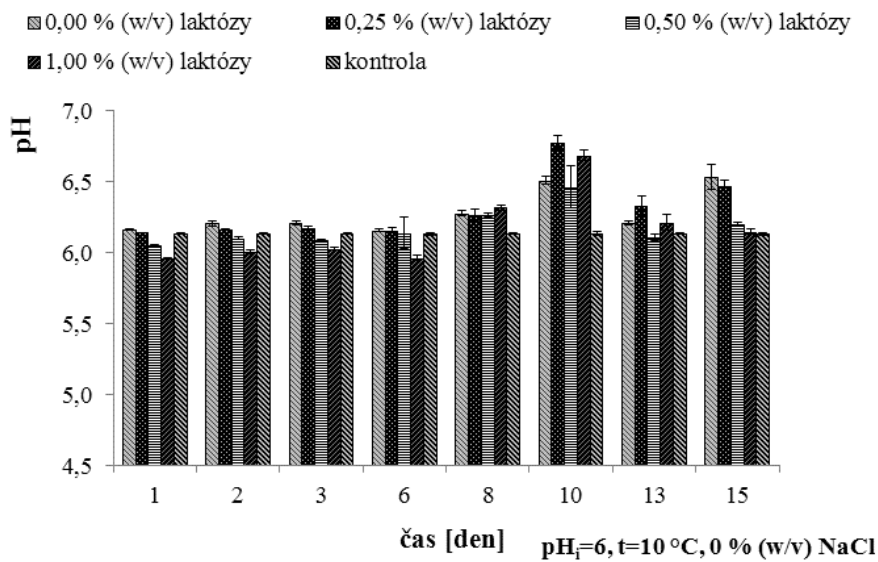
Obr. 10: Vývoj iniciačního pH (pH_i) $6 \pm 0,2$ kultivačního prostředí *Lactobacillus brevis* T02 v MRS bujónu při 37 °C a přidavku testovaných koncentrací laktózy (0,00-1,00 % (w/v)) a soli (0-2 % (w/v))



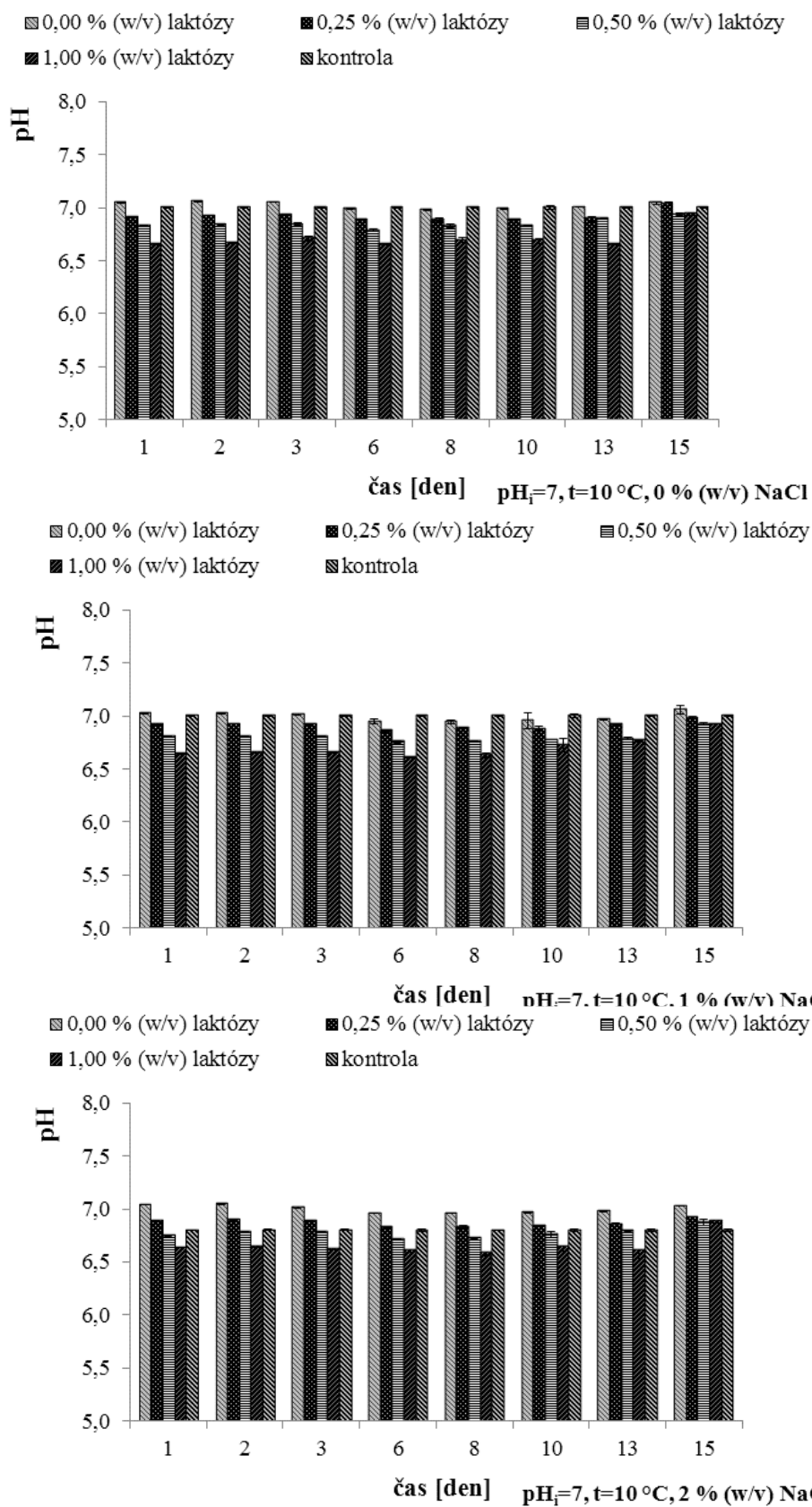
Obr. 11: Vývoj iniciačního pH (pH_i) $7\pm 0,2$ kulturačního prostředí *Lactobacillus brevis* T01 v MRS bujónu při $37^\circ C$ a přidavku testovaných koncentrací laktózy (0,00-1,00 % (w/v)) a soli (0-2 % (w/v))



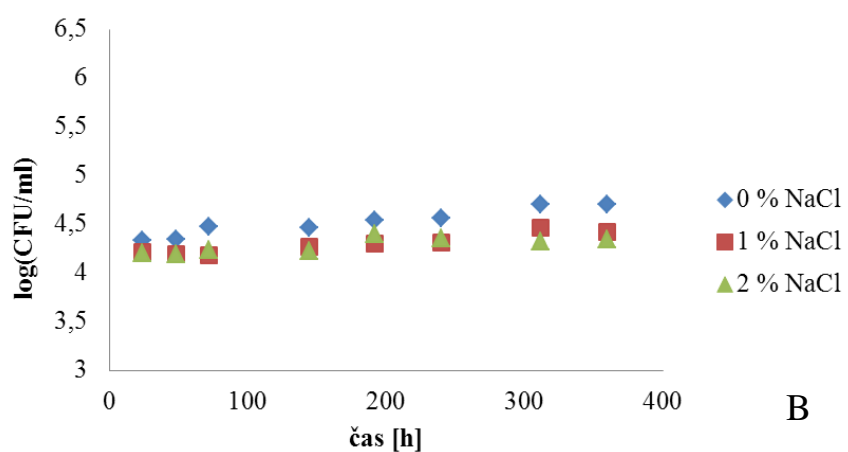
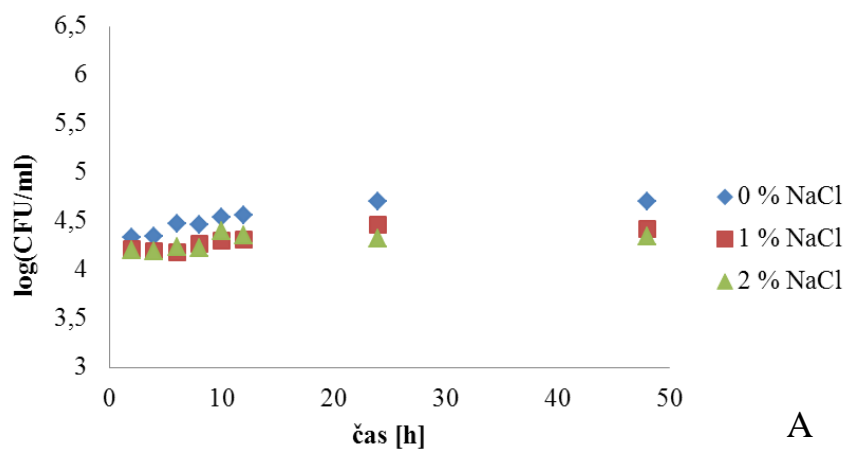
Obr. 12: Vývoj iniciačního pH (pH_i) $5\pm 0,2$ kulturačního prostředí *Lactobacillus brevis* T01 v MRS bujónu při 10 °C a přidavku testovaných koncentrací laktózy (0,00-1,00 % (w/v)) a soli (0-2 % (w/v))



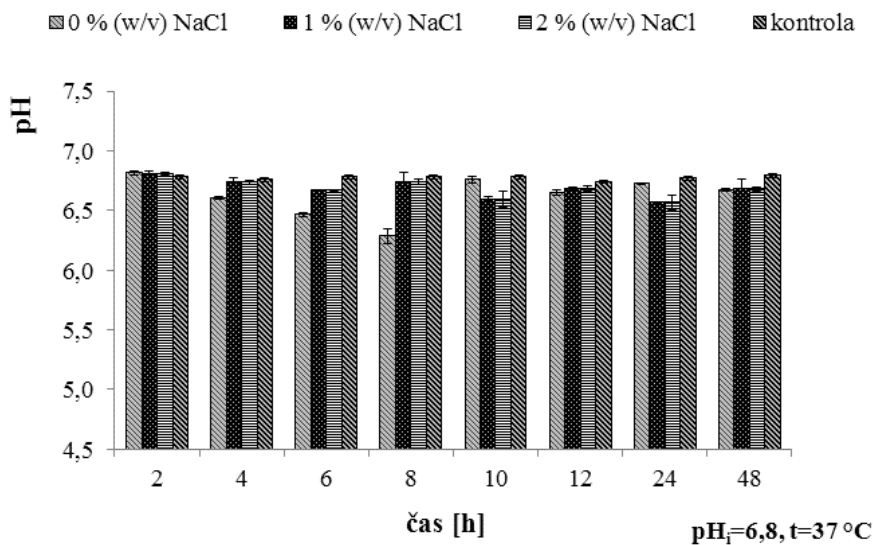
Obr. 13: Vývoj iniciačního pH (pH_i) $6\pm 0,2$ kultivačního prostředí *Lactobacillus brevis* T01 v MRS bujónu při $10\text{ }^\circ\text{C}$ a přidavku testovaných koncentrací laktózy (0,00-1,00 % (w/v)) a soli (0-2 % (w/v))



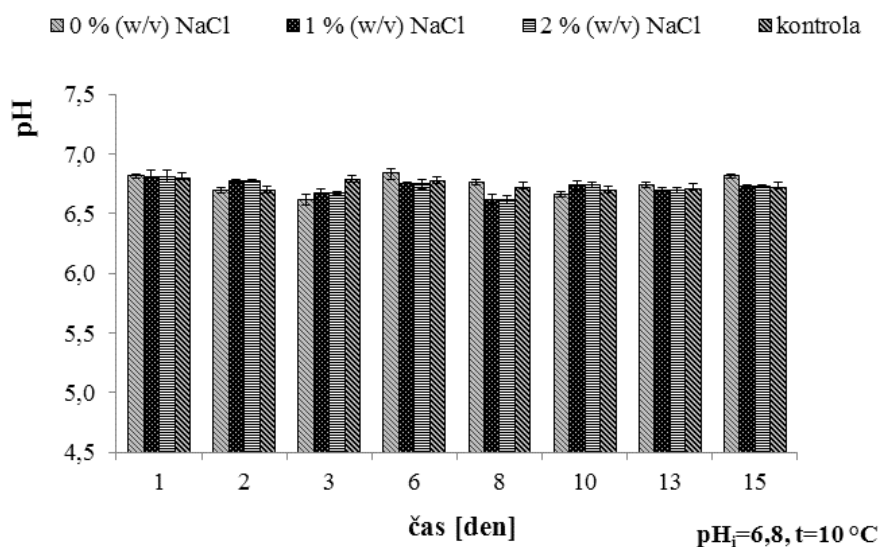
Obr. 14: Vývoj iniciačního pH (pH_i) $7 \pm 0,2$ kultivačního prostředí *Lactobacillus brevis* T01 v MRS bujónu při 10 °C a přidavku testovaných koncentrací laktózy (0,00-1,00 % (w/v)) a soli (0-2 % (w/v))



Obr. 15: Růst *Lactobacillus brevis* T01 za podmínek kultivace *in vitro* při pH $6,8 \pm 0,2$, 4,8 % (w/v) laktózy, $t=10$ (B) a 37 °C (A) s přidavkem koncentrací soli 0-2 % (w/v)

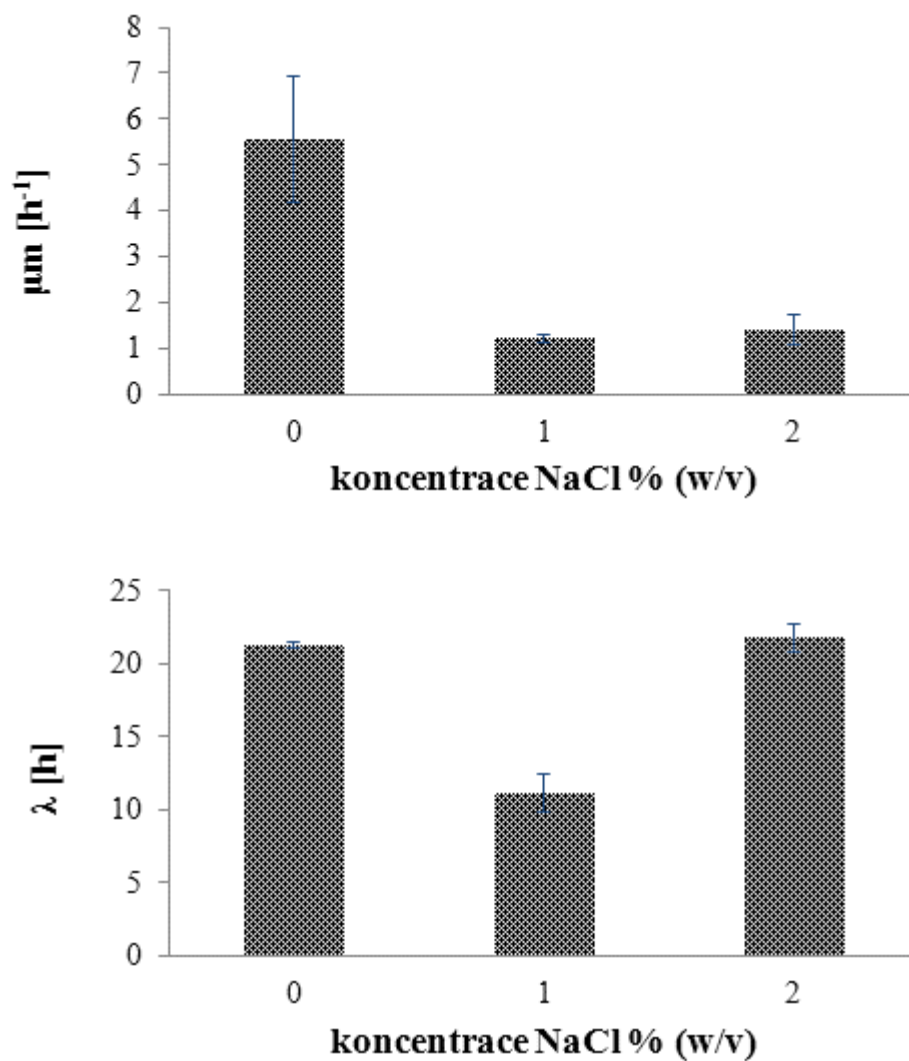


Obr. 16: Vývoj pH kultivačního prostředí *Lactobacillus brevis* T01 za podmínek kultivace *in vitro* při iniciačním pH (pH_i) $6,8 \pm 0,2$, s přidavkem 4,8 % (w/v) laktózy a soli 0-2 % (w/v), při teplotě $t=37$ °C

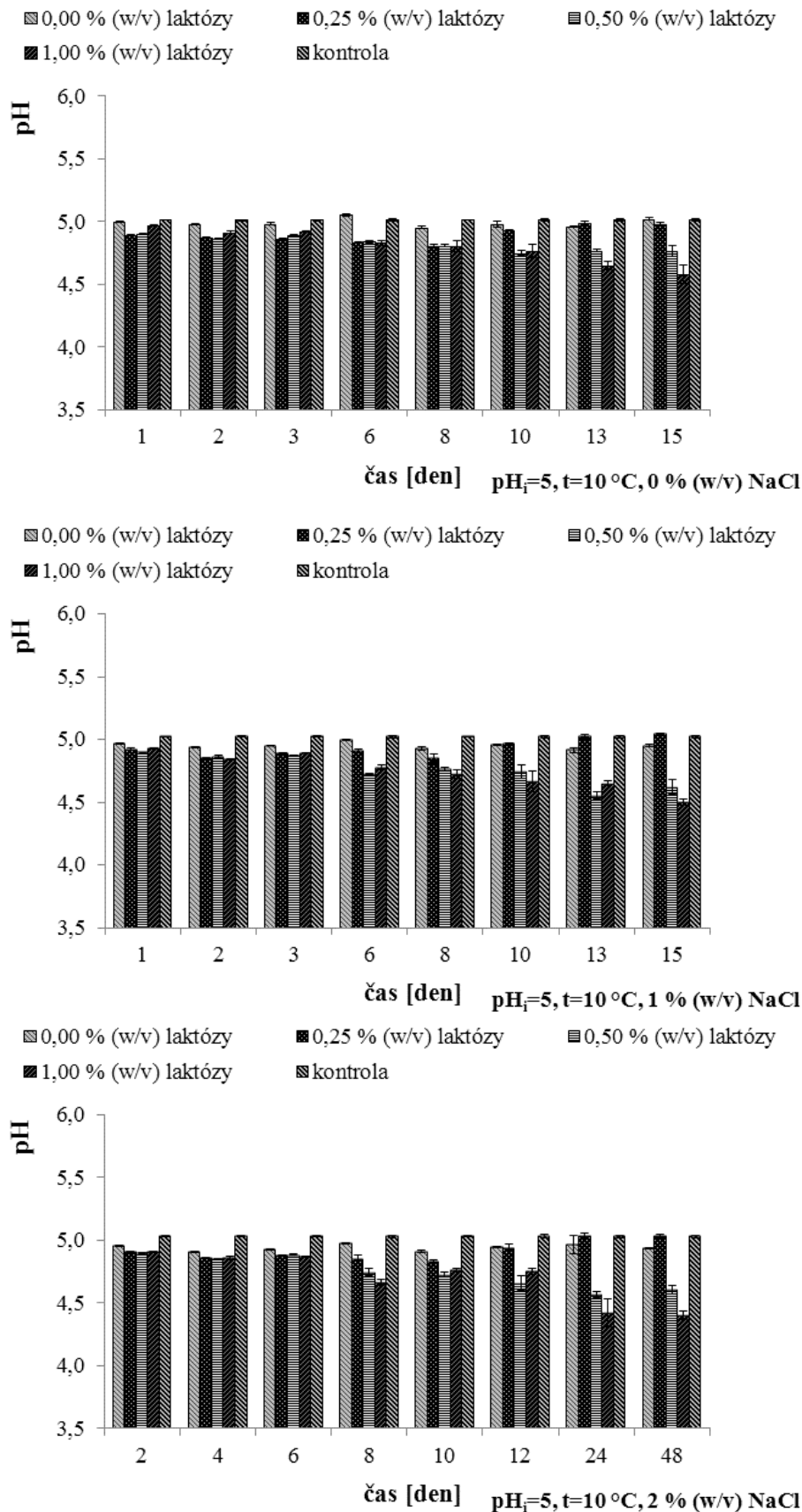


Obr. 16: Vývoj pH kultivačního prostředí *Lactobacillus brevis* T01 za podmínek kultivace *in vitro* při iniciačním pH (pH_i) $6,8 \pm 0,2$, s přidavkem 4,8 % (w/v) laktózy a soli 0-2 % (w/v), při teplotě $t=10$ °C

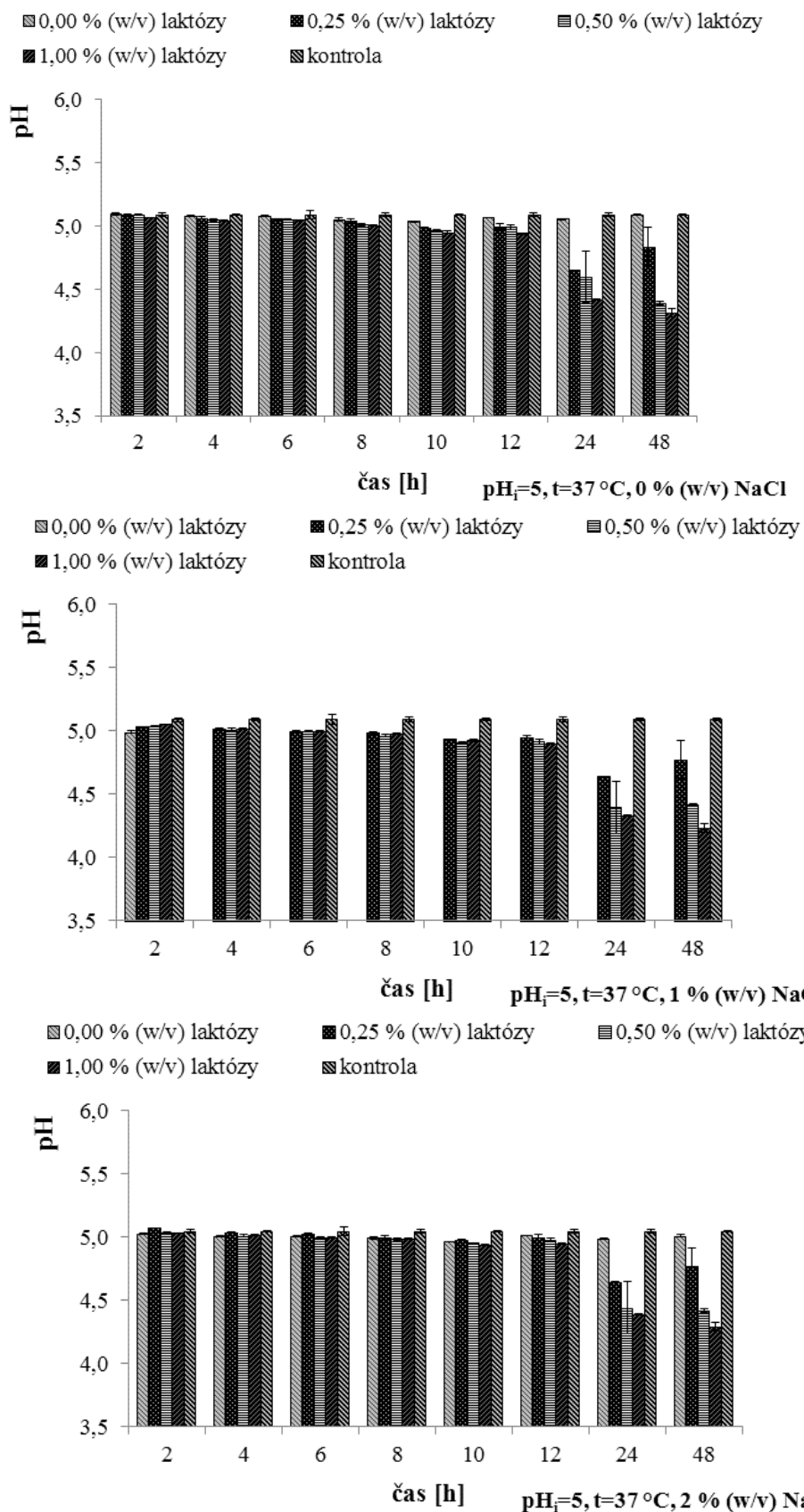
Příloha F



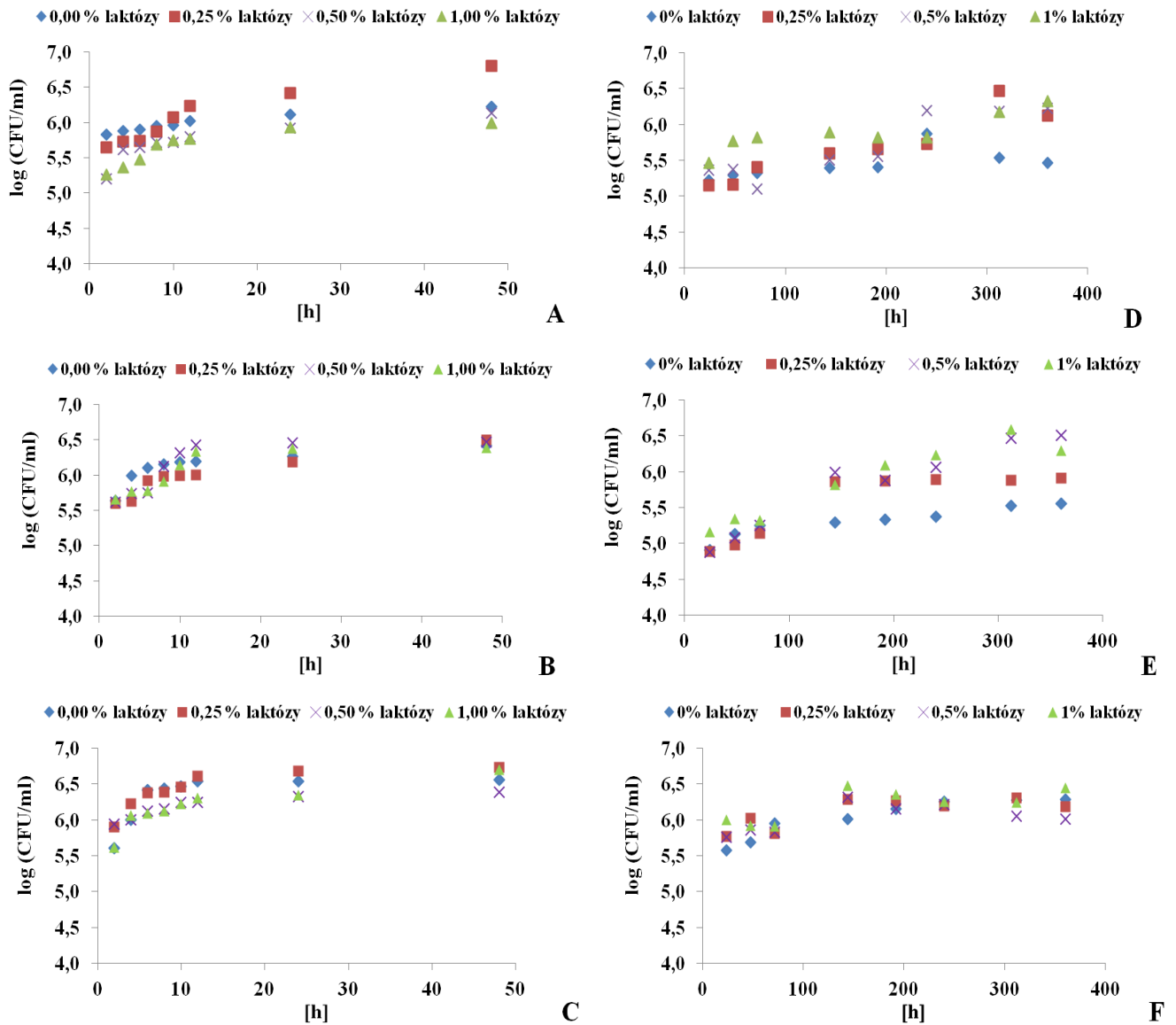
Obr. 1: Rychlost produkce tyraminu (μm) a lag fáze produkce tyraminu (λ) *Lactobacillus curvatus* T02 v dekarboxylačním médiu s přidavkem 4,8 % laktózy, 0-2 % NaCl (w/v) a pH 6,8 při 37 °C



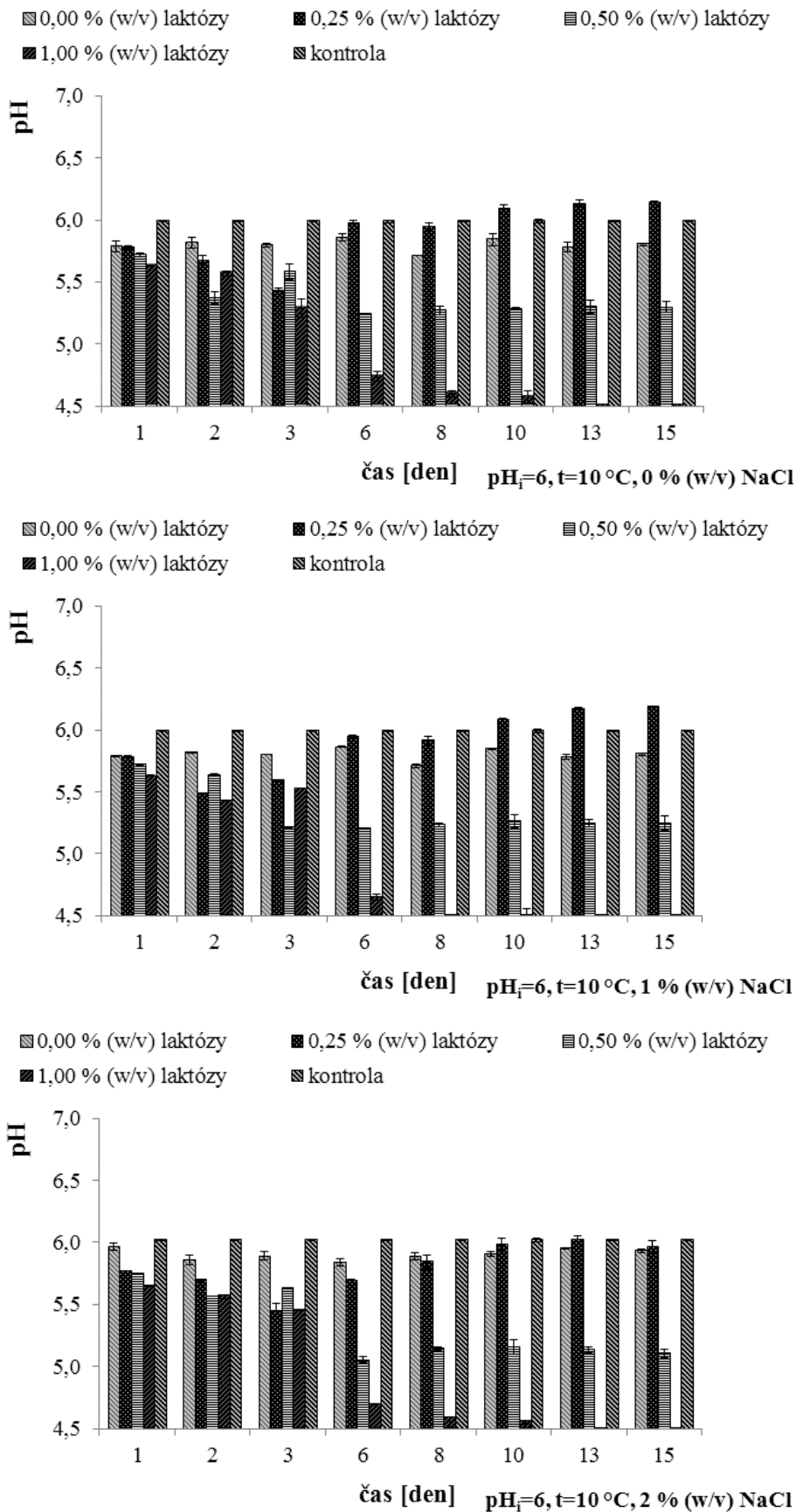
Obr. 2: Vývoj iniciačního pH (pH_i) $5 \pm 0,2$ kultivačního prostředí *Lb. curvatus* T02 při $10\text{ }^\circ\text{C}$ a přidavku testovaných koncentrací laktózy (0,00-1,00 % (w/v)) a soli (0-2 (w/v))



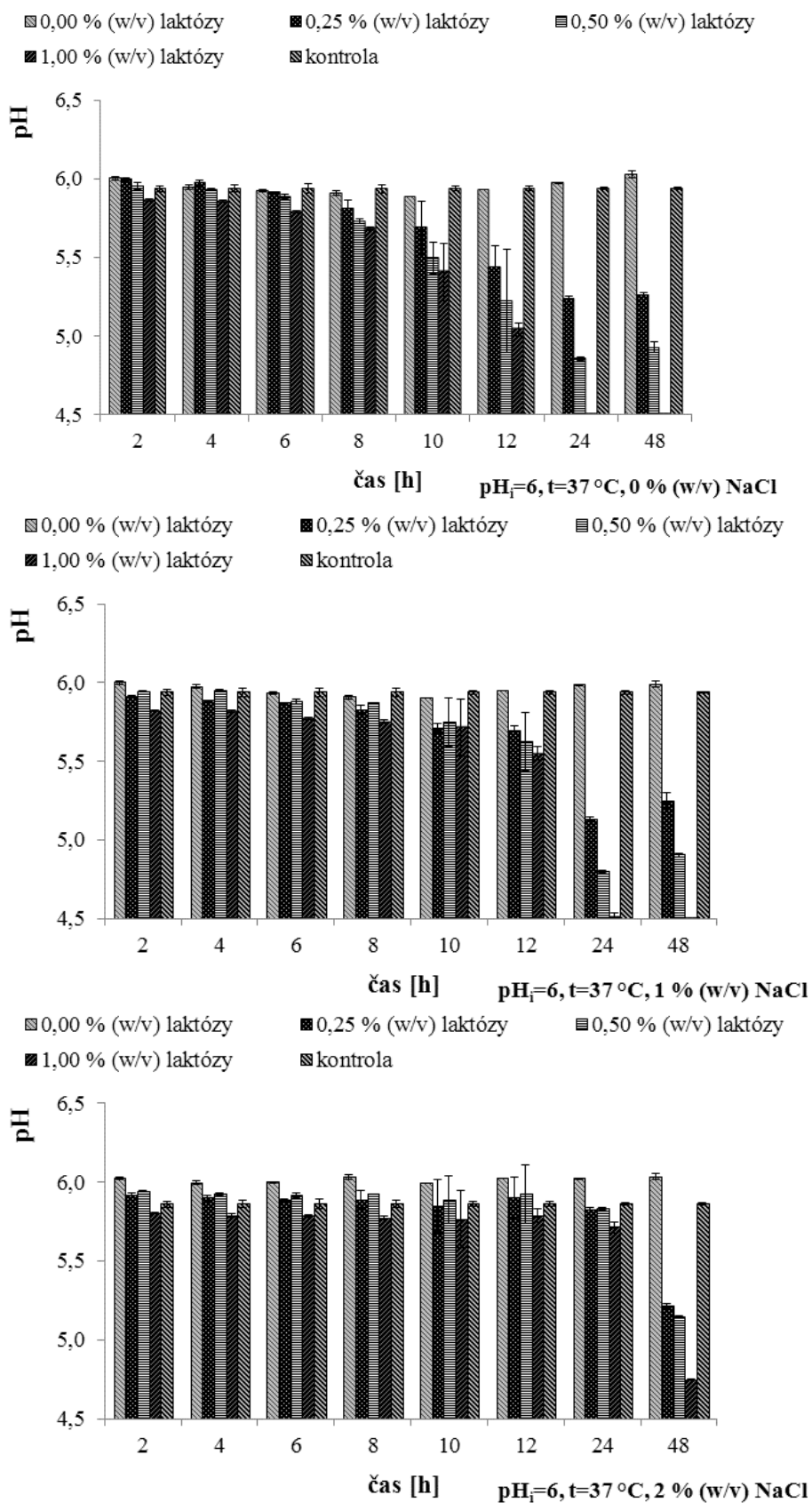
Obr. 3: Vývoj iniciačního pH (pH_i) $5 \pm 0,2$ kultivačního prostředí *Lb. curvatus* T02 při 37 °C a přidavku testovaných koncentrací laktózy (0,00-1,00 % (w/v)) a soli (0-2 (w/v))



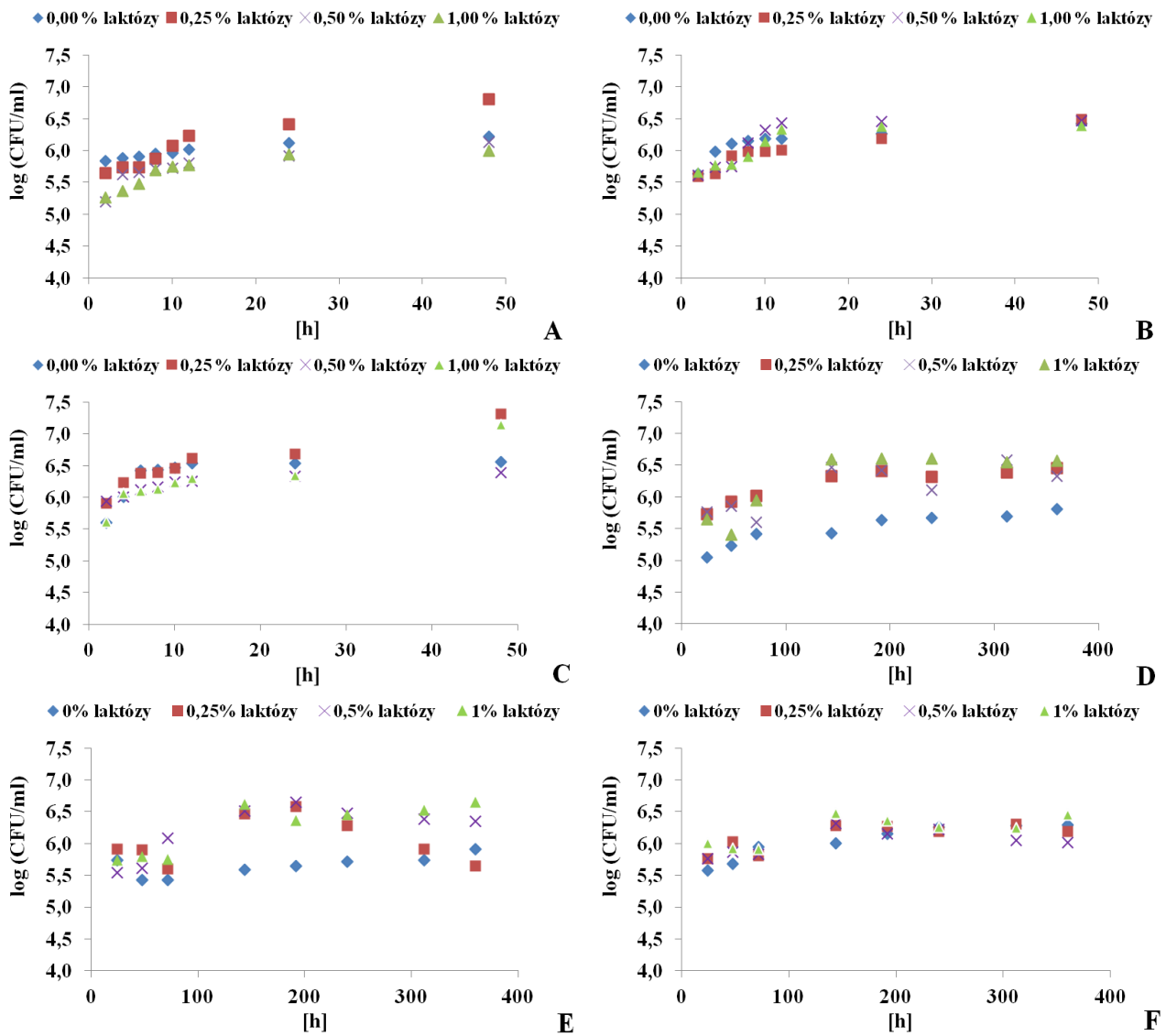
Obr. 4: Růst *Lactobacillus curvatus* T02 za podmínek kultivace *in vitro* při pH 5, $t=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (A-C), $t=10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (D-F) s přidavkem různých koncentrací soli a laktózy (w/v); A, D 0 % (w/v) NaCl; B, E 1 % (w/v) NaCl; C, F 2 % NaCl (w/v)



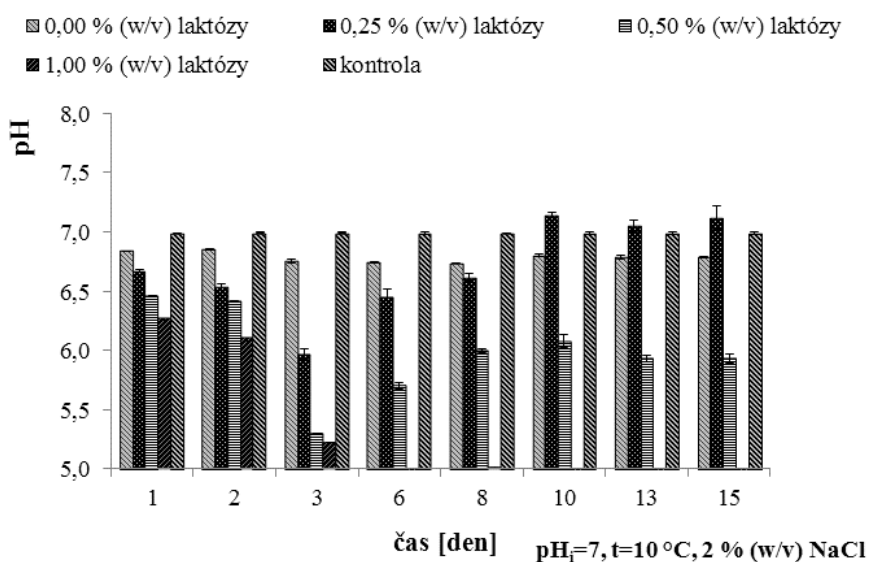
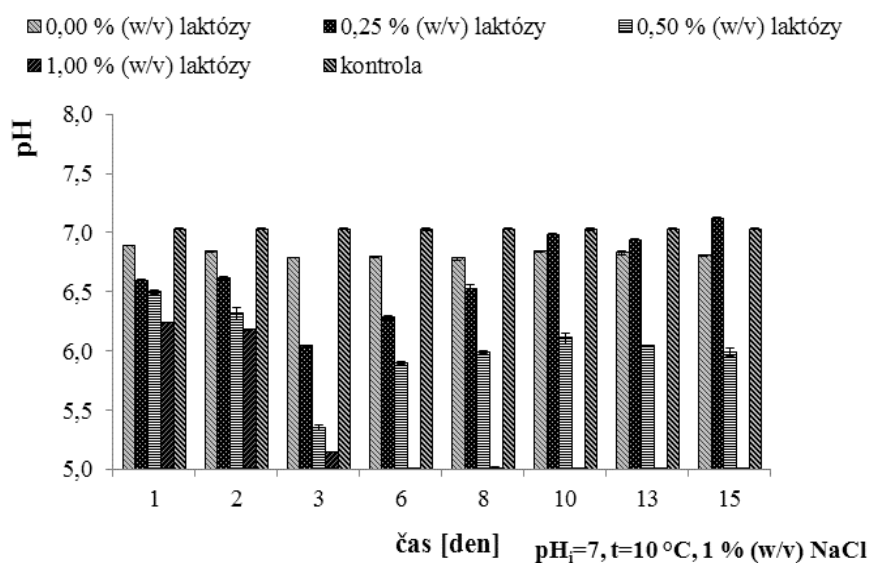
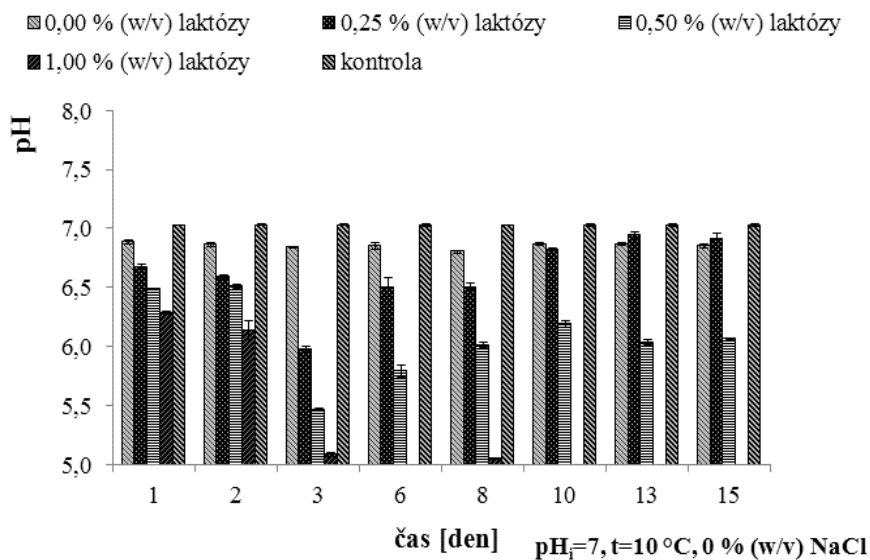
Obr. 5: Vývoj pH (pH_i) $6\pm 0,2$ kultivačního prostředí *Lb. curvatus* T02 při 10 °C a přídavku testovaných koncentrací laktózy (0,00-1,00 % (w/v)) a soli (0-2 % (w/v))



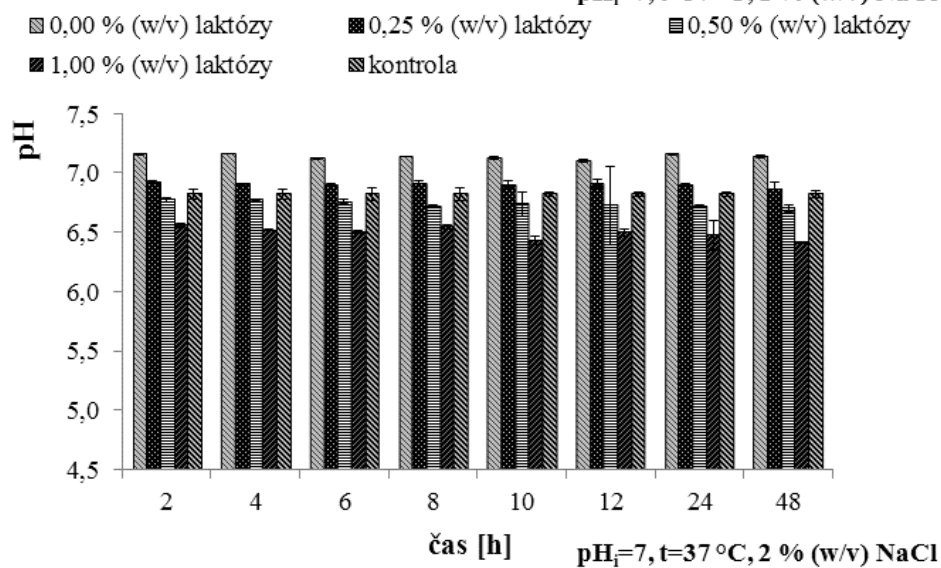
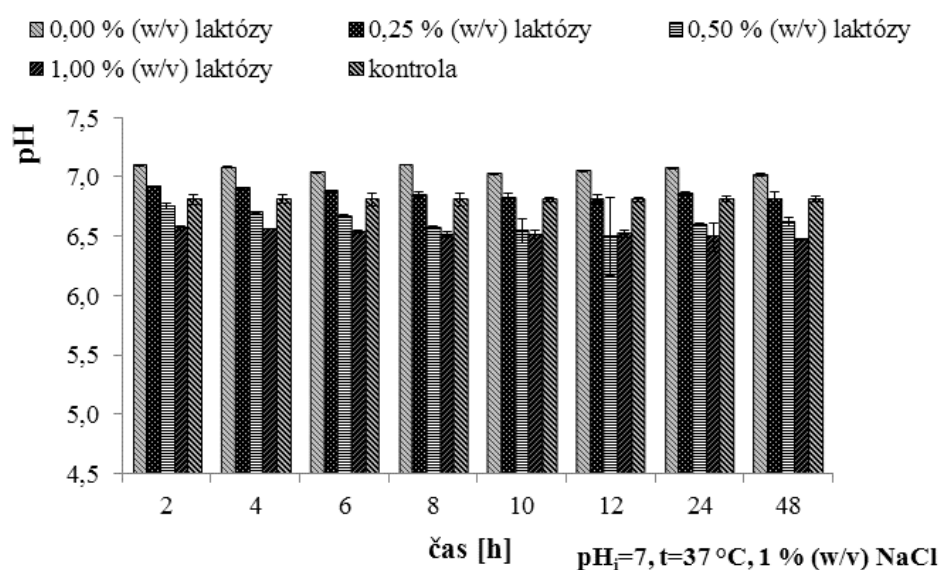
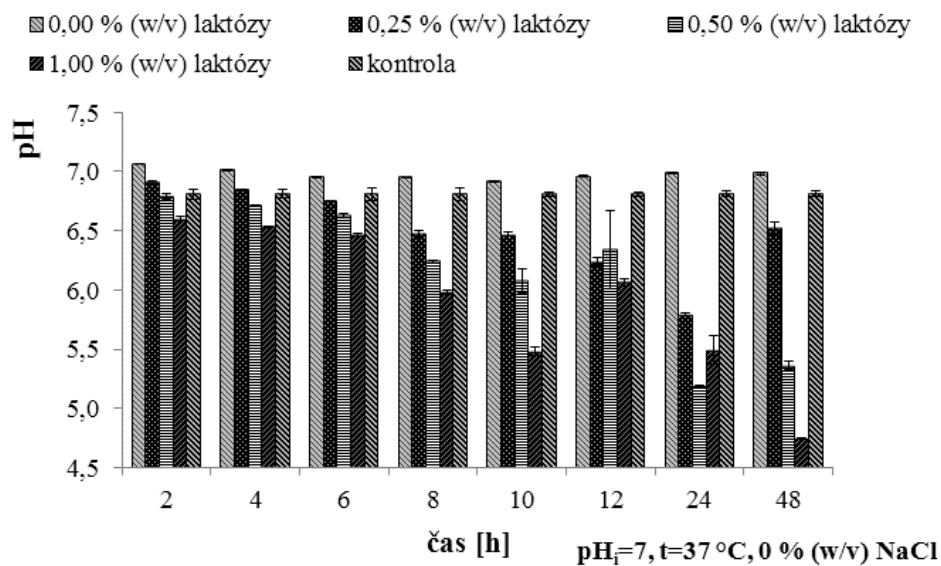
Obr. 6: Vývoj iniciačního pH (pH_i) $6 \pm 0,2$ kultivačního prostředí *Lb. curvatus* T02 při 37 °C a přidavku testovaných koncentrací laktózy (0,00-1,00 % (w/v)) a soli (0-2 % (w/v))



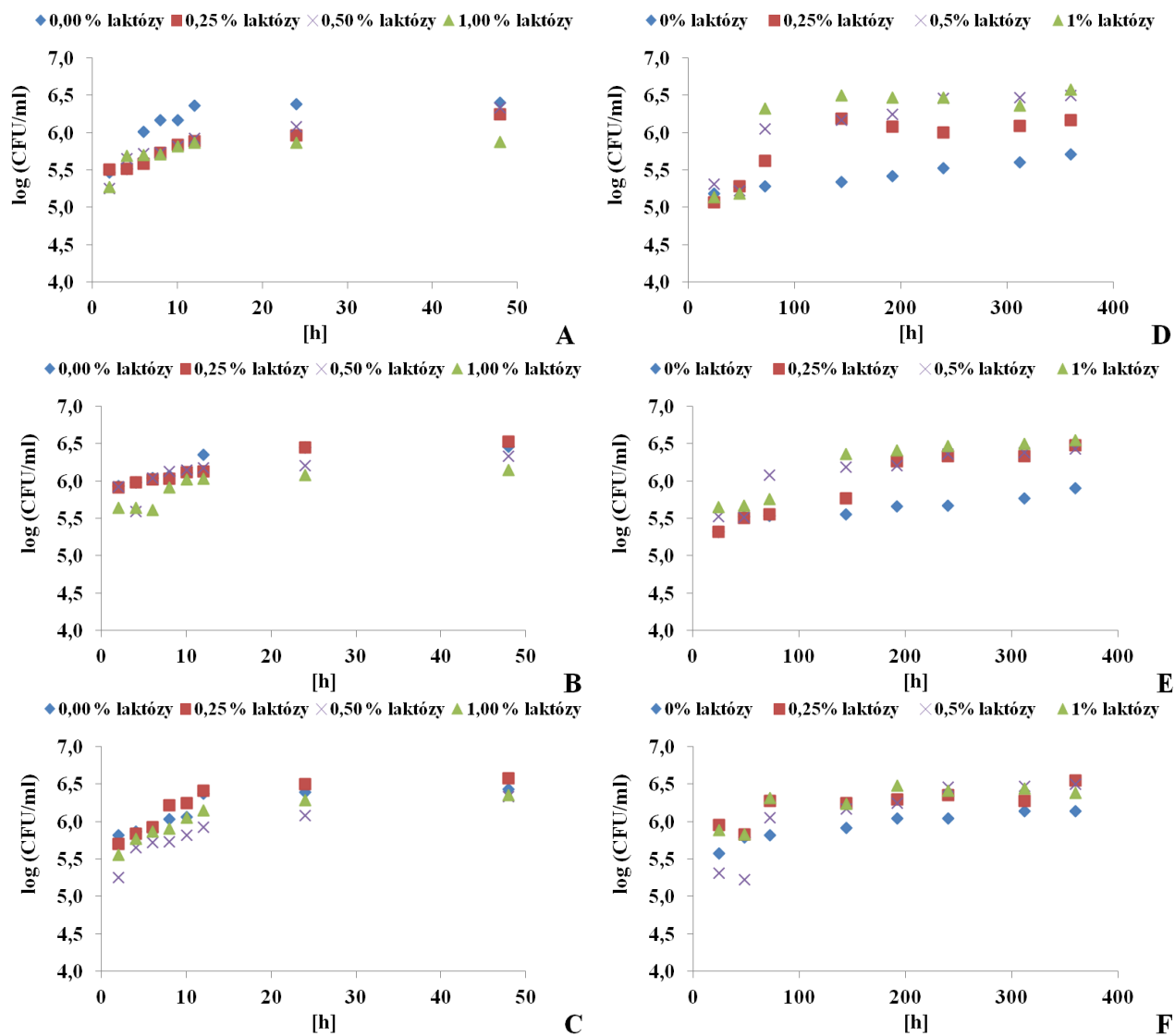
Obr. 7: Růst *Lactobacillus curvatus* za podmínek kultivace in vitro při pH 6, $t=37$ °C (A-C), $t=10$ °C (D-F), s přidavkem různých koncentrací soli a laktózy (w/v); A, D 0 % (w/v) NaCl; B, E 1 % (w/v) NaCl; C, F 2 % NaCl (w/v)



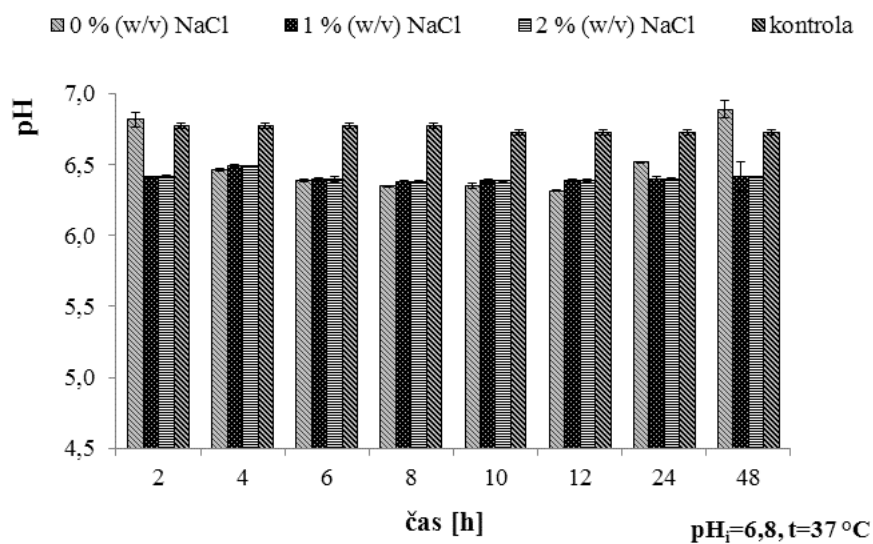
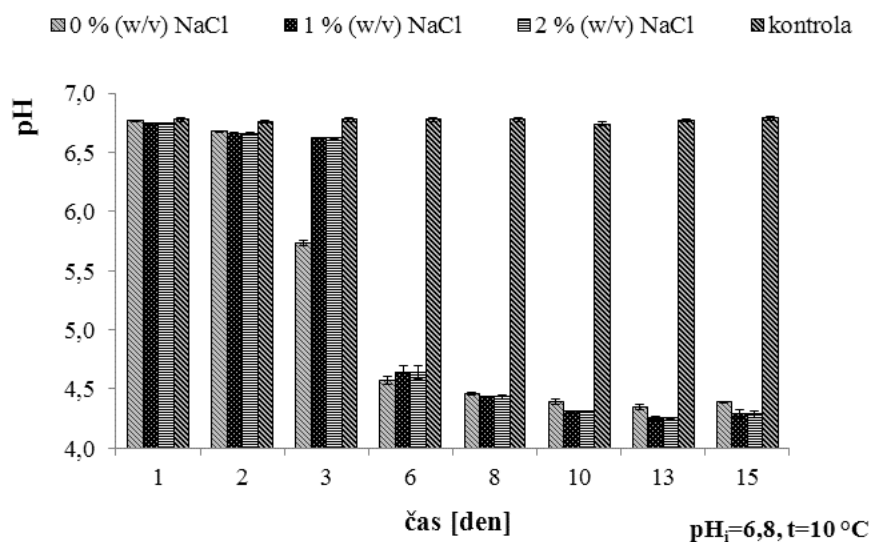
Obr. 8: Vývoj pH (pH_i) $7\pm 0,2$ kultivačního prostředí *Lb. curvatus* T02 při 10 °C a přidavku testovaných koncentrací laktózy (0,00-1,00 % (w/v)) a soli (0-2 % (w/v))



Obr. 9: Vývoj pH (pH_i) $7 \pm 0,2$ kultivačního prostředí *Lb. curvatus* T02 při 37 °C a přidavku testovaných koncentrací laktózy (0,00-1,00 % (w/v)) a soli (0-2 % (w/v))

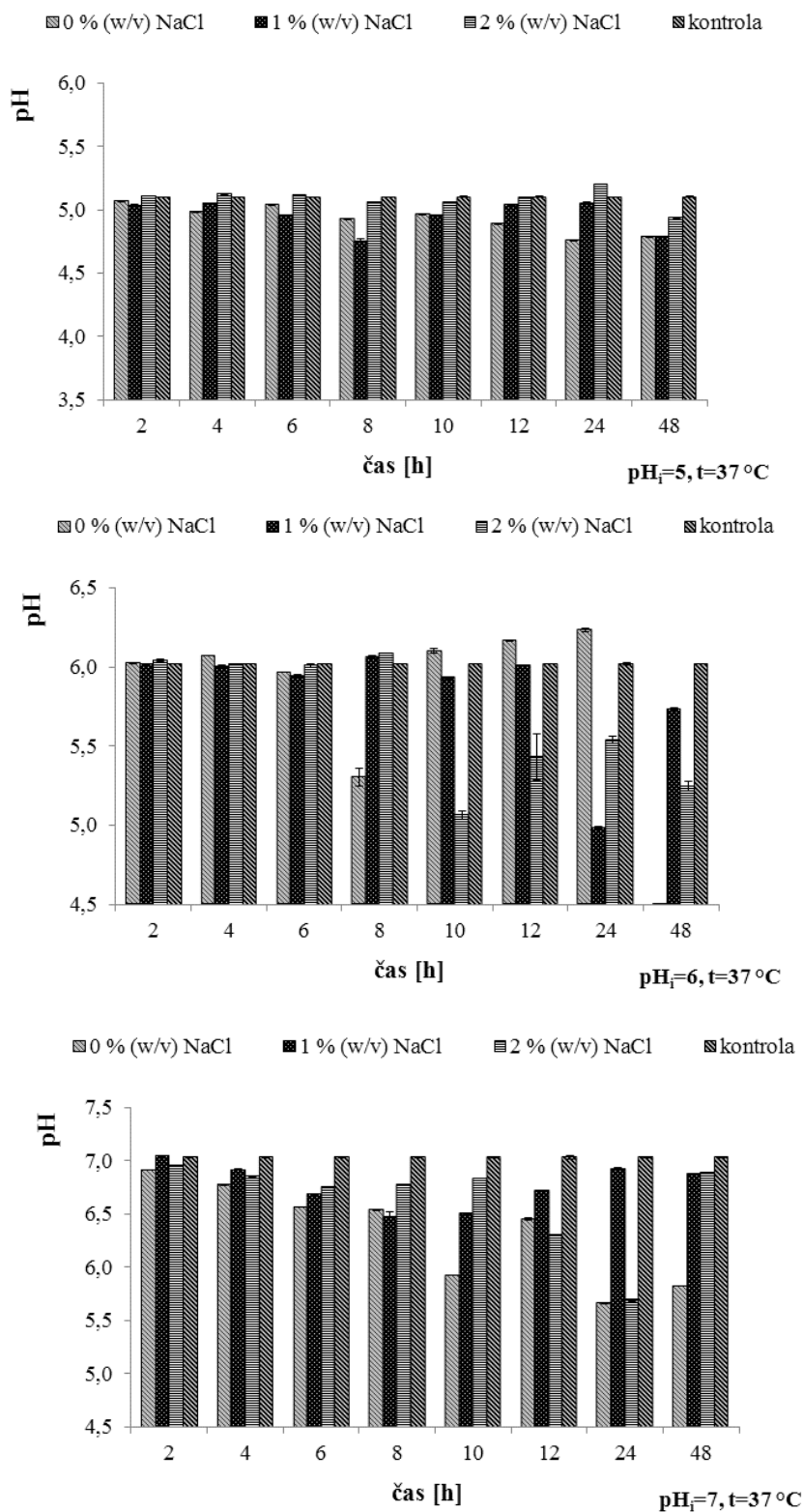


Obr. 10: Růst *Lactobacillus curvatus* T02 za podmínek kultivace *in vitro* při pH 7, $t=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (A-C), $t=10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (D-F), s přidavkem různých koncentrací NaCl a laktózy (w/v); A, D 0 % (w/v) NaCl; B, E 1 % (w/v) NaCl; C, F 2 % NaCl (w/v)

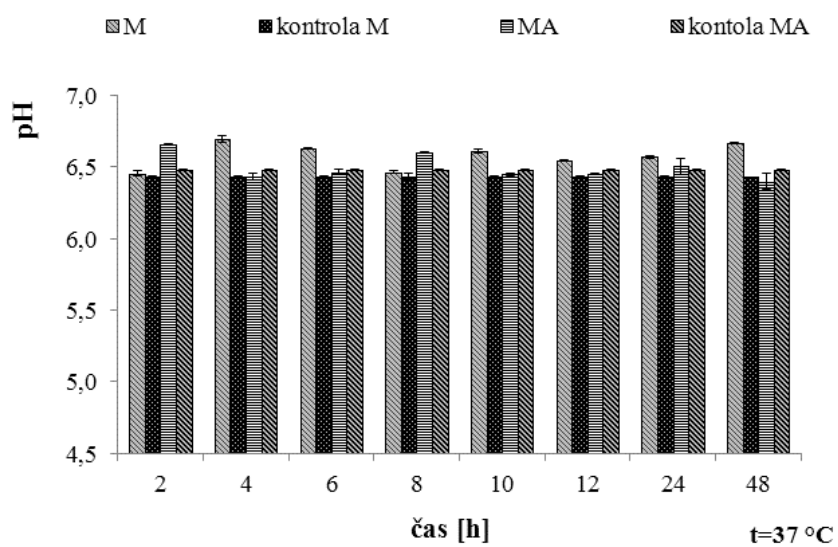
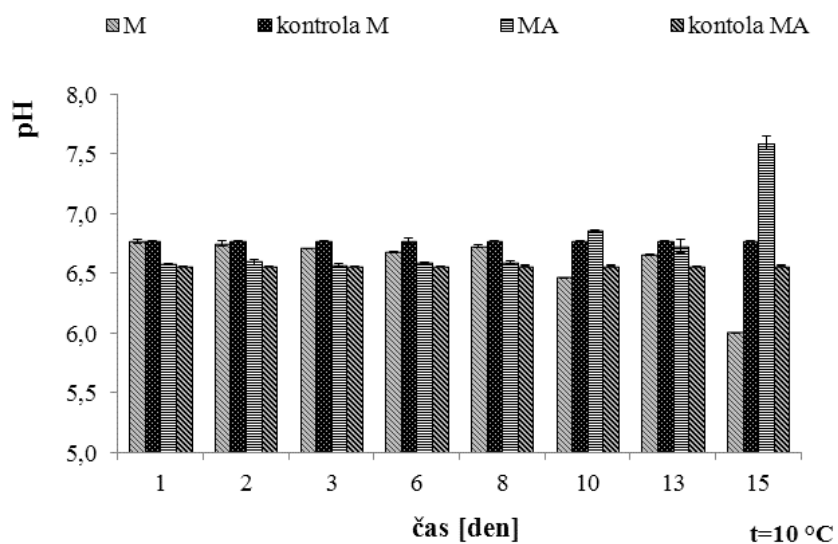


Obr. 11: Vývoj pH kultivačního prostředí simulující prostředí mléka po kultivaci *Lb. curvatus* při 37 (2-48 h.) a 10 °C (1.-15. den)

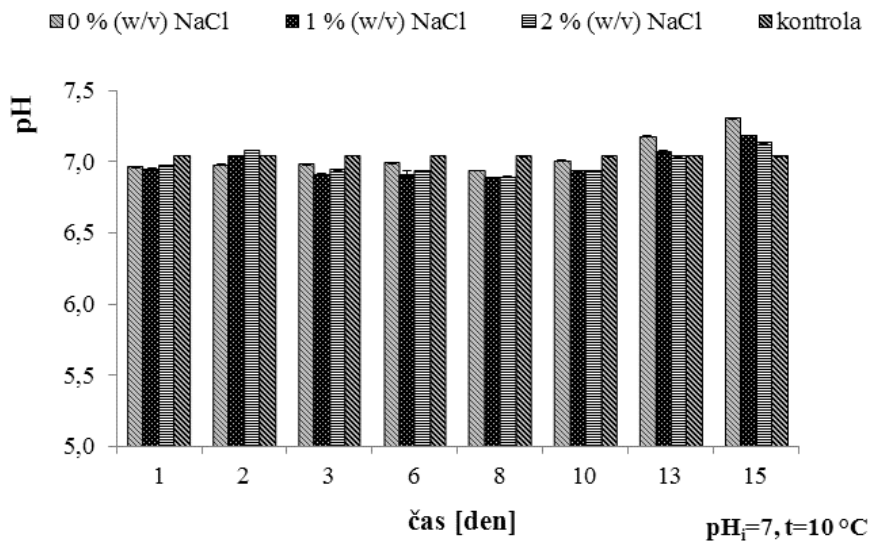
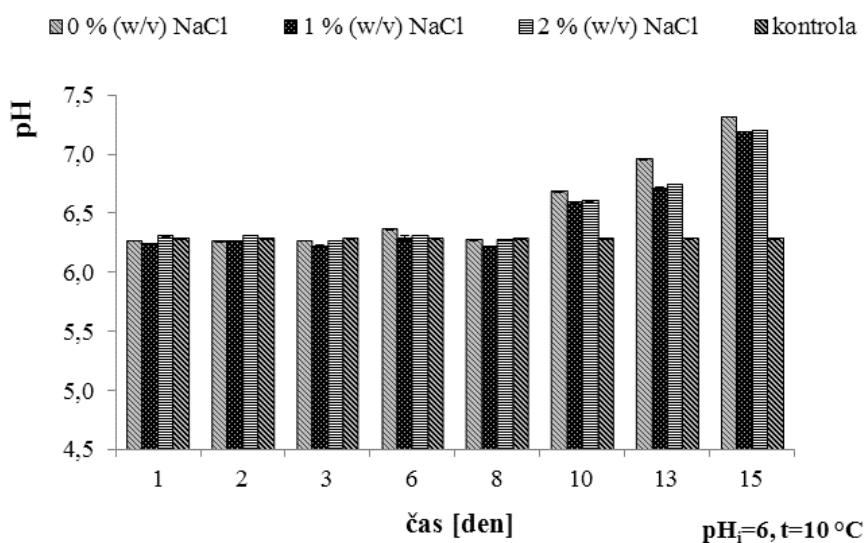
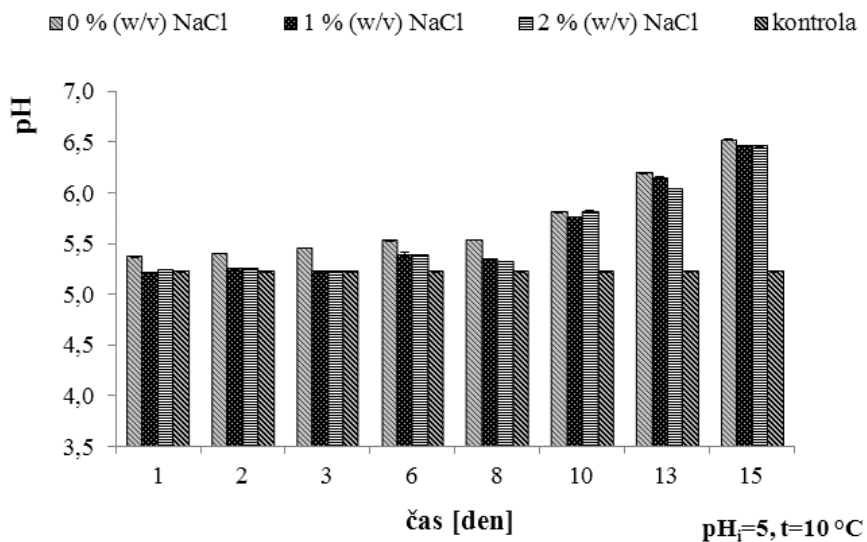
Příloha G



Obr. 1: Vývoj iniciačního pH prostředí mléka po kultivaci *Lb. brevis* T01 při 37 °C obohaceného aminokyselinami, s přidavkem soli (0-2%; w/v) a úpravou pH (pH 5-7); pH_i... iniciační pH

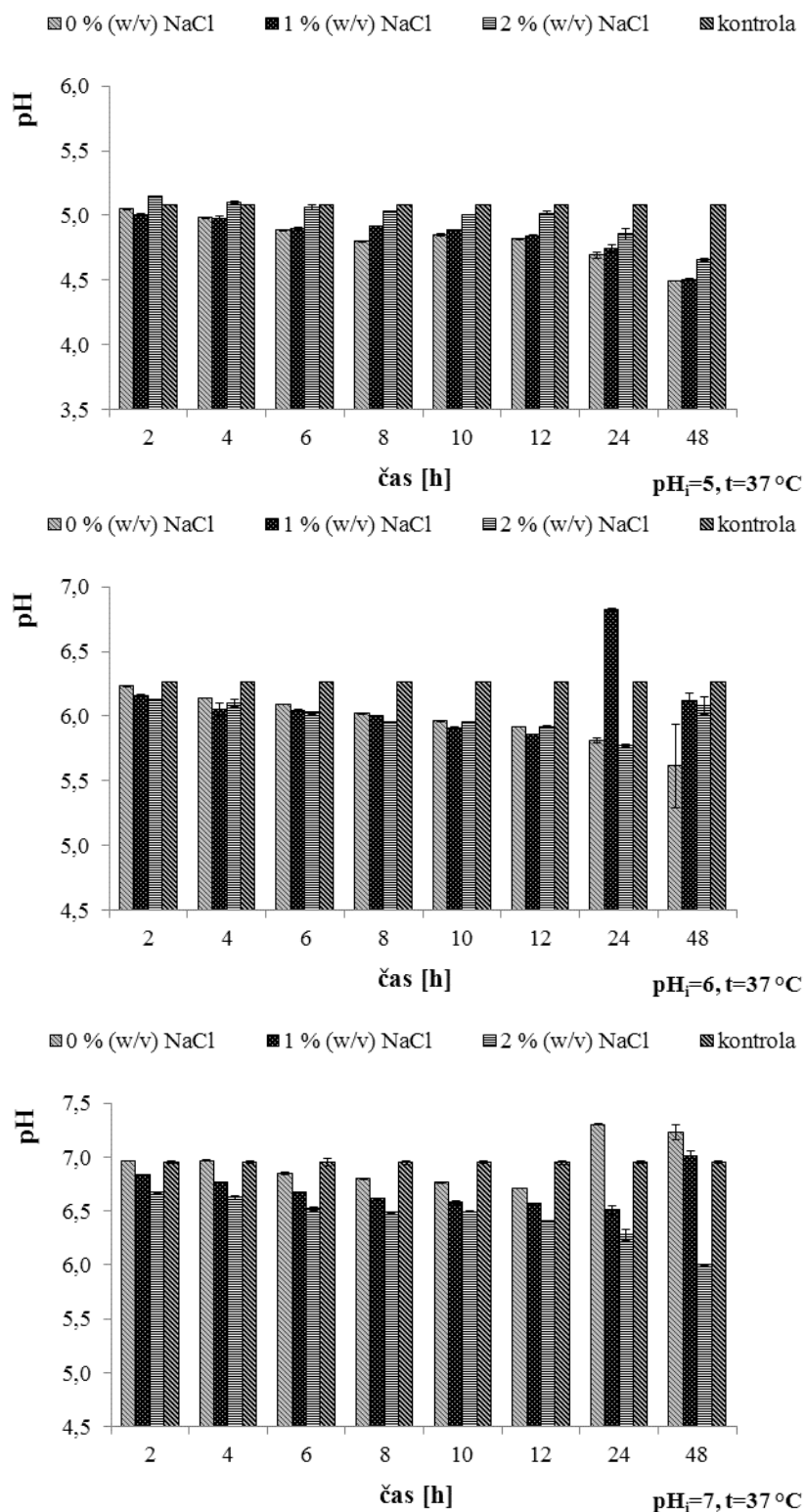


Obr. 2: Vývoj pH prostředí mléka bez a s přidavkem aminokyselin při kultivaci *Lactobacillus brevis* T01 při 10 a 37 °C; M...mléko bez aminokyselin, MA...mléko s aminokyselinami (0,3 %, w/v...tyrozin, ornitin, arginin, lyzin)

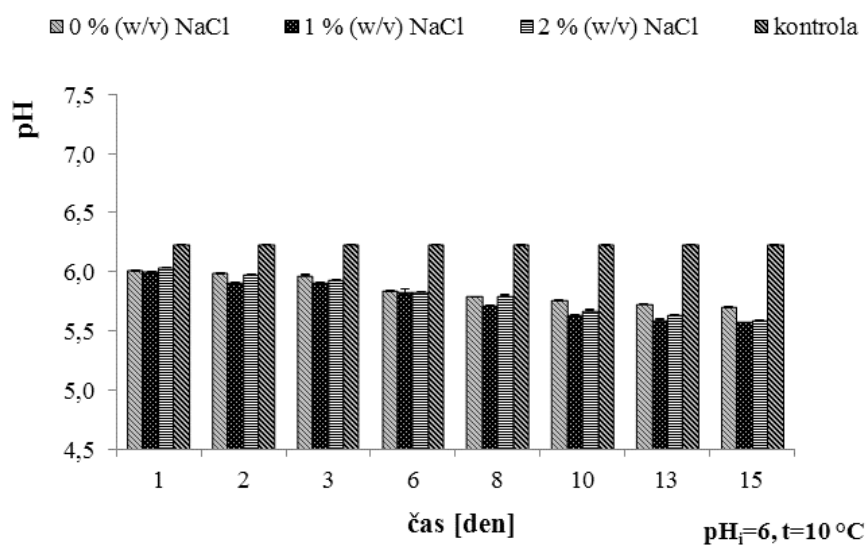
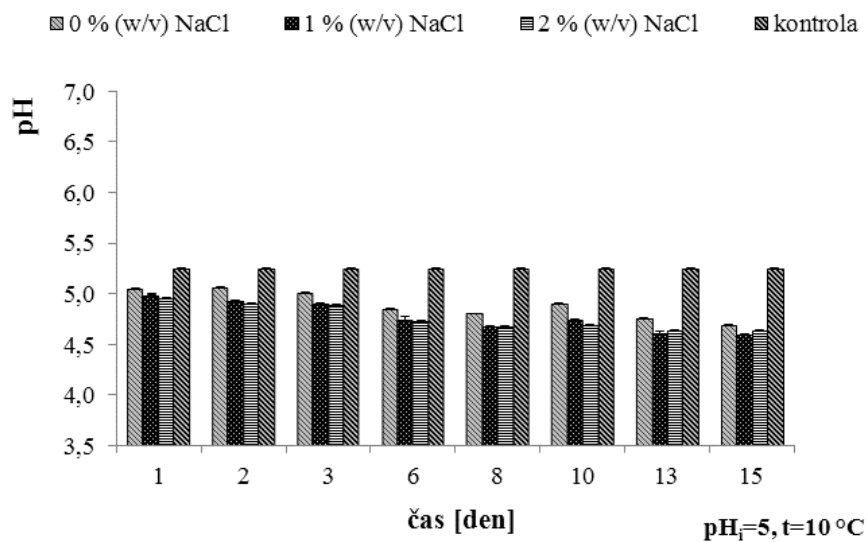


Obr. 3: Vývoj iniciačního pH prostředí mléka (pH_i) po kultivaci *Lb. brevis* T01 při 10 °C obohaceného aminokyselinami, s přidavkem soli (0-2%, w/v) a úpravou pH (pH 5-7)

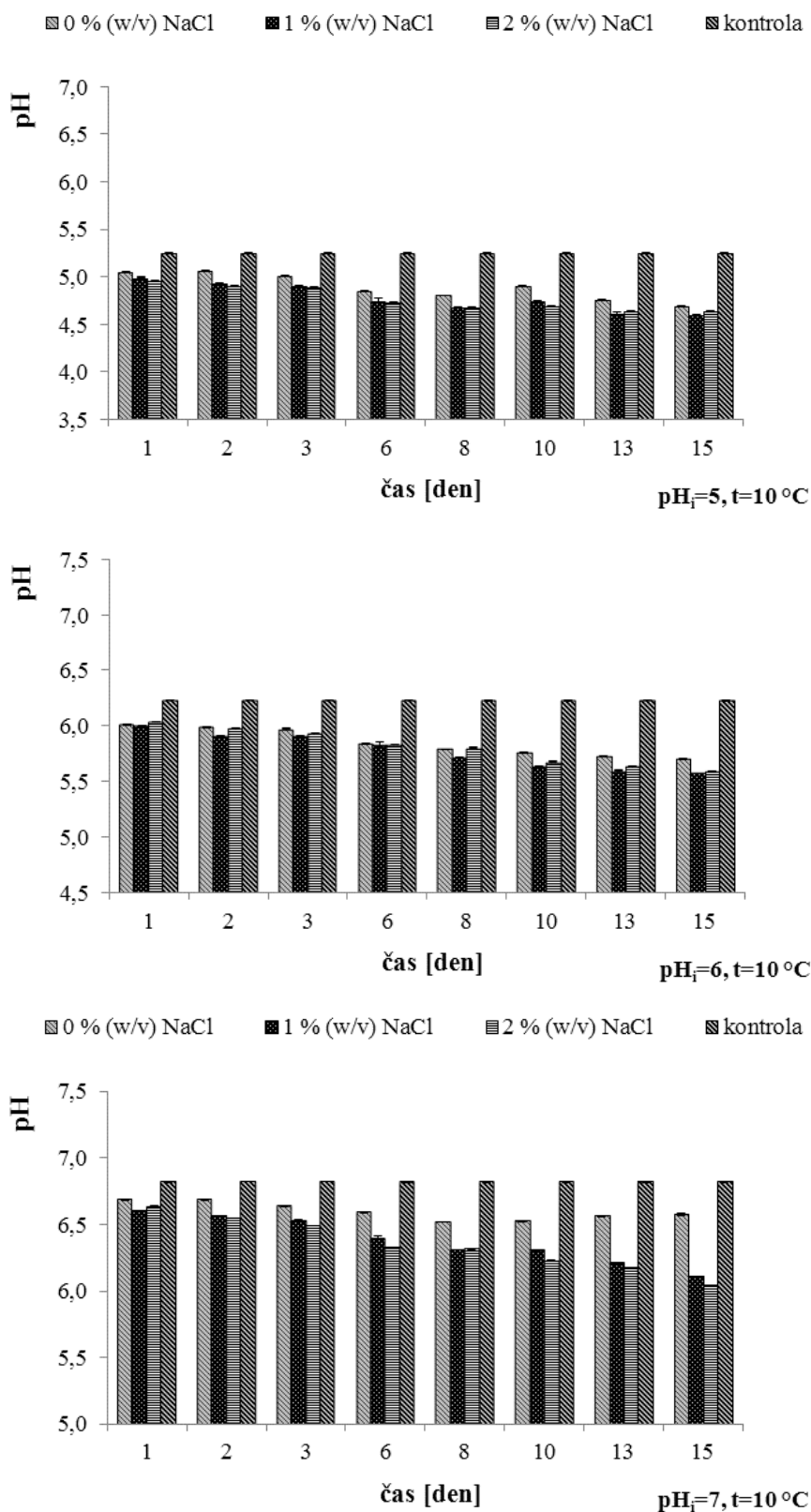
Příloha H



Obr. 1: Vývoj iniciačního pH prostředí mléka (pH_i) po kultivaci *Lb. curvatus* T02 při 37 °C obohaceného aminokyselinami, s přidávkou soli (0-2%) a úpravou pH (pH 5-7)



Obr. 2: Vývoj iniciačního pH (pH_i) prostředí mléka bez a s přidavkem aminokyselin při kultivaci *Lactobacillus curvatus* T02 při 10 a 37 °C; M...mléko bez aminokyselin, MA...mléko s aminokyselinami (0,3 % w/v...tyrozin, ornitin, arginin, lyzin)



Obr. 3: Vývoj iniciačního pH prostředí mléka (pH_i) po kultivaci *Lb. curvatus* T02 při 10 °C obohaceného aminokyselinami, s přidavkem soli (0-2%) a úpravou pH (pH 5-7)