

Vliv vybraných faktorů na kulturu degradující biogenní aminy v podmínkách *in vitro*

Bc. Iva Březinová

Diplomová práce
2016/2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Iva Březinová**
Osobní číslo: **T15275**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Vliv vybraných faktorů na kulturu degradující biogenní aminy v podmínkách *in vitro***

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Biogenní aminy.
2. Degradace biogenních aminů.
3. Charakteristika bakterií degradujících biogenní aminy.

II. Praktická část

1. Monitoring vlivu faktorů (teplota, pH, koncentrace NaCl) na degradaci biogenních aminů vybranými bakteriemi.
2. Zpracování výsledků.
3. Formulace závěrů na základě získaných výsledků.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] BENKERROUM, Noreddine. Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2016, vol. 15, s. 801-826.

[2] LEE, Yi-Chen, KUNG, Hsien-Feng, HUANG, Chun-Yung, HUANG, Tzou-Chi and Yung-Hsiang TSAI. Reduction of histamine and biogenic amines during salted fish fermentation by *Bacillus polymyxa* as a starter culture. *Journal of food and drug analysis*. 2016, vol. 24, s. 157-163.

[3] RUIZ-CAPILLAS, Claudia a Leo M NOLLET, 2016. Flow injection analysis of food additives. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 9781482218190.

[4] TOFALO, R., PERPETUINI, G., SCHIORONE, M., SUZZI, G. Biogenic Amines: Toxicology and Health Effect. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, 2015, s. 424-429, DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00071-4. ISBN 9780123849533.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

3. února 2017

Termín odevzdání diplomové práce:

28. dubna 2017

Ve Zlíně dne 3. února 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



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

Příjmení a jméno: BŘEZINOVÁ IVA.....

Obor: TP.....

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 27.4.2017.....

Březinová
.....

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

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

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

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

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

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

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

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Cílem této studie bylo zjistit vliv vybraných faktorů (pH, koncentrace NaCl, teplota, médium) na schopnost degradace vybraných biogenních aminů dvou bakterií (*B. subtilis* 23 a *B. pumilus* 26). Bylo zjištěno, že hodnota pH neovlivňuje degradační aktivitu těchto kmenů, naproti tomu koncentrace NaCl, teplota a složení kultivačního média ovlivňují významně schopnost degradace aminů testovaných bakterií. V optimálních podmínkách (30 °C, pH 7, 0 % NaCl) snížil *B. subtilis* 23 obsah tyraminu o 60 % po 48 hodinové kultivaci.

Klíčová slova: biogenní aminy, degradace, rod *Bacillus*

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate effect of selected factors (pH, NaCl concentration, temperature, medium) on degrading activity of two microorganisms (*B. subtilis* 23 and *B. pumilus* 26). There is no effect of pH values on degrading activity of *B. subtilis* 23 and *B. pumilus* 26. On the other hand NaCl concentration, temperature and medium effected ability to degrade biogenic amines significantly. *B. subtilis* 23 exhibited highest histamine-degrading activity in optimal conditions (30 °C, pH 7, 0 % NaCl). *B. subtilis* 23 reduced histamine contents by 60 % for 48 hours of incubation.

Keywords: biogenic amines, degradation, genus *Bacillus*

Poděkování patří doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení a rady, jenž mi poskytla při psaní této práce. Za pomoc v laboratoři a ochotu velmi děkuji Ing. Ludmile Zálešákové. Také děkuji rodičům za podporu při studiu.

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

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| ÚVOD | 10 |
| I TEORETICKÁ ČÁST | 11 |
| 1 BIOGENNÍ AMINY | 12 |
| 1.1 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ..... | 12 |
| 1.2 VLIV AMINŮ NA ORGANISMUS | 14 |
| 1.3 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH | 14 |
| 1.3.1 Maso a masné výrobky..... | 15 |
| 1.3.2 Sýry | 16 |
| 1.3.3 Alkoholické nápoje | 17 |
| 1.3.4 Ryby | 17 |
| 1.4 STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ..... | 18 |
| 1.4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) | 18 |
| 1.4.2 Plynová chromatografie (GC) | 20 |
| 1.4.3 Kapilární elektroforéza (CE)..... | 20 |
| 1.4.4 Iontová mobilní spektrometrie (IMS)..... | 20 |
| 2 DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ | 21 |
| 2.1 DETOXIKAČNÍ MECHANISMUS..... | 21 |
| 2.2 MOŽNOSTI SNÍŽENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁŘSTVÍ..... | 22 |
| 2.2.1 Aplikace mikroorganismů s aminoroxidasovou aktivitou..... | 22 |
| 2.2.2 Aplikace aminoroxidas | 23 |
| 2.2.3 Snížení kontaminace mikroorganismů s dekarboxylasovou aktivitou v potravinách..... | 24 |
| 3 CHARAKTERISTIKA RODU <i>BACILLUS</i> | 25 |
| 3.1 BIOCHEMICKÉ ZNAKY | 25 |
| 3.2 TVORBA SPOR..... | 26 |
| 3.3 PATOGENITA..... | 26 |
| 3.3.1 <i>Bacillus anthracis</i> | 26 |
| 3.3.2 <i>Bacillus cereus</i> | 27 |
| 3.4 DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ BAKTERIEMI RODU <i>BACILLUS</i> | 27 |
| II PRAKTICKÁ ČÁST | 29 |
| 4 CÍL PRÁCE | 30 |
| 5 POUŽITÉ MATERIÁLY A METODY | 31 |
| 5.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY..... | 31 |
| 5.2 CHEMIKÁLIE | 31 |
| 5.3 PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ A ROZTOKŮ..... | 33 |
| 5.3.1 Minerální médium s biogenními aminy | 33 |
| 5.3.2 Nutrient broth s biogenními aminy | 36 |
| 5.3.3 Roztok kyseliny chloristé | 36 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.3.4 | Pufr pro derivatizaci | 36 |
| 5.3.5 | Roztok dansylchloridu | 37 |
| 5.4 | POUŽITÉ MIKROORGANISMY | 37 |
| 5.4.1 | Příprava inokula | 37 |
| 5.5 | SLEDOVÁNÍ Vlivu vybraných faktorů na schopnost degradace biogenních aminů u <i>BACILLUS SUBTILIS</i> 23 a <i>BACILLUS PUMILUS</i> 26..... | 38 |
| 5.5.1 | Kontrolní vzorky | 38 |
| 5.5.2 | Inokulace | 39 |
| 5.5.3 | Odběry | 39 |
| 5.5.4 | Příprava vzorků na derivatizaci | 39 |
| 5.5.5 | Derivatizace..... | 39 |
| 5.6 | STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ | 40 |
| 6 | VÝSLEDKY A DISKUSE | 42 |
| 6.1 | SLEDOVÁNÍ Vlivu vybraných faktorů na schopnost degradace biogenních aminů u <i>BACILLUS SUBTILIS</i> 23 v minerálním médiu | 42 |
| 6.1.1 | Obsah biogenních aminů v médiu o pH 7 po kultivaci při teplotě 30 °C | 42 |
| 6.1.2 | Obsah biogenních aminů v médiu o pH 7 po kultivaci při teplotě 23 °C | 44 |
| 6.1.3 | Obsah biogenních aminů v médiu o pH 7 po kultivaci při teplotě 10 °C | 46 |
| 6.2 | SLEDOVÁNÍ Vlivu vybraných faktorů na schopnost degradace biogenních aminů u <i>B. SUBTILIS</i> 23 v médiu NUTRIENT BROTH | 48 |
| 6.3 | SLEDOVÁNÍ Vlivu vybraných faktorů na schopnost degradace biogenních aminů u <i>B. PUMILUS</i> 26 v minerálním médiu | 51 |
| 6.4 | SLEDOVÁNÍ Vlivu vybraných faktorů na schopnost degradace biogenních aminů u <i>B. PUMILUS</i> 26 v médiu NUTRIENT BROTH..... | 54 |
| 6.5 | SOUHRNNÁ DISKUSE..... | 58 |
| | ZÁVĚR | 63 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 64 |
| | SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK | 71 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ | 72 |
| | SEZNAM TABULEK..... | 73 |
| | SEZNAM PŘÍLOH..... | 74 |

ÚVOD

Problematikou biogenních aminů se zabývá spousta autorů, jedním z hlavních důvodů je jejich nepříznivý vliv na zdraví člověka. Vysoké koncentrace těchto látek mohou lidé nevědomky přijímat potravou. Typickými představiteli potravin, jež obsahují biogenní aminy ve velké míře, jsou fermentované zeleninové výrobky a uzeniny, sýry, pivo, víno a mnohé další. Jedná se o potraviny, které jsou užívány téměř každodenně. Je tedy žádoucí eliminovat množství těchto škodlivých látek v potravinách a vyhnout se tak nepříznivým účinkům, které mohou biogenní aminy způsobit.

Tato práce je zaměřena na možnosti snížení obsahu biogenních aminů prostřednictvím mikroorganismů s aminooxidasovou aktivitou, jejich úkolem je degradace aminů, jež do potraviny vstupují současně s použitými surovinami, popřípadě degradace biogenních aminů, které vznikají při procesu výroby potraviny. Tato metoda nepatří mezi běžně používané postupy v praxi, protože není ještě kompletně prostudována a popsána. Při aplikaci této metody se můžeme setkat s možnými problémy, jako jsou nehostinné podmínky pro daný mikroorganismus s aminooxidasovou aktivitou, které mohou při procesu výroby vzniknout. Jedná se především o nevhodné pH prostředí, příliš vysoké koncentrace chloridu sodného, kdy chlorid sodný je nedílnou součástí téměř každé potraviny, tudíž se jedná o významný faktor, jehož vliv na schopnost degradace organismů s aminooxidasovou aktivitou musí být prostudován. Použité aminooxidasové kultury mohou být inhibovány také vysokými teplotami. Vliv všech těchto faktorů byl popsán v této diplomové práci, přičemž experimenty byly provedeny *in vitro*. Pro ověření vhodnosti této metody při použití v potravinářském průmyslu je nutné provést další studie a to v reálném vzorku potraviny.

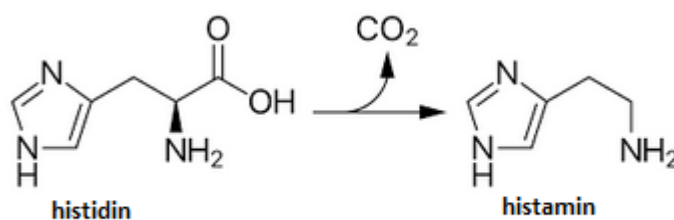
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

Z chemického pohledu jsou biogenní aminy nízkomolekulární dusíkaté sloučeniny s alifatickou, heterocyklickou, aromatickou strukturou odvozené od aminokyselin. Tyto látky se přirozeně vyskytují v rostlinných, živočišných i mikrobiálních buňkách, kde plní významné metabolické a fyziologické funkce (Cunha et al., 2017; Košmerl et al., 2013).

1.1 Vznik biogenních aminů

Biogenní aminy nejčastěji vznikají mikrobiální dekarboxylací odpovídajících aminokyselin v cytoplasmě, která je katalyzována specifickými enzymy (aminokyselinové dekarboxylasy). Aminokyseliny se do cytoplasmy dostávají antiportem s aminy, kdy je do buňky přenesena aminokyselina výměnou za biogenní amin, který je uvolněn do prostředí (Benkerroum, 2016). Například z aminokyseliny histidin vzniká za přítomnosti histidindekarboxylasy odštěpením molekuly oxidu uhličitého histamin (*Obr. 1*). Obdobným způsobem vznikají i ostatní aminy (*Tab. 1*). Těkavé aminy, s výjimkou fenyletylaminu, vznikají transaminací z odpovídajícího aldehydu nebo ketonu (Košmerl et al., 2013; Nowak a Czyzowska, 2011).



Obr. 1 Dekarboxylace histidinu (Košmerl et al., 2013)

Tab. 1 Prekursory biogenních aminů a jejich struktura (Cunha et al., 2017)

| Aminokyselina | Amin | Struktura |
|---------------|---------------|----------------|
| Lysin | Kadaverin | Alifatická |
| Ornitin | Putrescin | |
| Arginin | Agmatin | |
| Histidin | Histamin | Heterocyklická |
| Tryptofan | Tryptamin | |
| Tyrosin | Tyramin | Aromatická |
| Fenylalanin | Fenyletylamin | |

Dekarboxylasy mohou být syntetizovány kmeny některých mikroorganismů odpovědných za kažení potravin, popřípadě kultur, jež jsou použity při výrobě fermentovaných potravin. Z tohoto hlediska je nesmírně důležitá mikrobiální čistota použitých surovin, zachování vhodných podmínek při skladování surovin, správná výrobní a hygienická praxe při samotné výrobě potravin. Dodržováním těchto pravidel může být sníženo riziko nadměrné produkci aminů (Herrero et al., 2016; Nowak a Czyzowska, 2011). Schopnost dekarboxylace jedné nebo více aminokyselin byla prokázána u různých kmenů rodů *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Photobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Vibrio* (Nowak a Czyzowska, 2011; Şanlı a Şenel, 2015). Za časté producenty biogenních aminů jsou považovány také bakterie mléčného kvašení (např. *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*), jedná se o gram-pozitivní, nesporulující bakterie, které jsou schopny produkovat kyselinu mléčnou jakožto konečný produkt fermentace sacharidů. Mezi konkrétní druhy schopné produkce aminů patří např. *Lactobacillus hilgardii*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Oenococcus oeni* (Košmerl et al., 2013).

1.2 Vliv aminů na organismus

Biogenní aminy se přirozeně účastní metabolických a fyziologických funkcí živých organismů. V lidském těle se podílí na regulaci tělesné teploty, pH žaludku (pomocí sekrece HCl), ovlivňují imunitní systém, růst a diferenciaci buněk, jsou součástí prekursorů hormonů, fungují jako neurotransmitery. Spermin, spermidin a putrescin jsou součástí DNA, RNA a proteinů, podílejí se na růstu, stabilizaci membrán a prevenci stárnutí organismu (Košmerl et al., 2013). Všechny tyto děje probíhají za přítomnosti nízké koncentrace aminů v těle. Ve vysokých koncentracích mohou ohrozit zdraví, obzvláště u citlivých jedinců (Cunha et al., 2017; Košmerl et al., 2013).

Nejčastěji se v potravinách vyskytují tyramin a histamin, tyto aminy jsou také jedny z nejtoxičtějších. Otrava tyraminem, označována jako "cheese reaction", se projevuje bolestí hlavy, migrénami, neurologickými poruchami, zvracením, poruchami dýchání, hypertenzí. Mezi projevy otrav histaminem patří vyrážka, kopřivka, otoky, bušení srdce, zvracení, průjem, hypotenze, nepříznivé respirační příznaky, návaly horka (Rio et al., 2017; Şanlı a Şenel, 2015). Tyramin a histamin vykazují schopnost cytotoxicity, kdy byl podle Rio et al. (2017) potvrzen i jejich vzájemný synergický efekt. Nízké koncentrace jednotlivých látek (tyraminu a histaminu) nemají na buňky významný vliv, avšak jejich kombinací dochází ke změně morfologie a snížení počtu buněk. Synergický efekt histaminu a tyraminu by měl být brán v úvahu při stanovení limitních koncentrací těchto látek v potravinách legislativou (Redruello et al., 2017; Rio et al., 2017).

Podle Ignatenko et al. (2006) by mohl mít putrescin vliv na zvýšenou tvorbu adenomů. Jedná se o nádory žlázového epitelu, které jsou nezhoubné, ale může dojít k jejich malignizaci, a proto je nutné jejich odstranění.

Dalším rizikem spojovaným s biogenními aminy je jejich schopnost reagovat s dusitany za vzniku N-nitrosaminů, které jsou karcinogenní (Nowak a Czyzowska, 2011).

1.3 Výskyt biogenních aminů v potravinách

Přirozeně se biogenní aminy vyskytují v některých druzích ovoce a zeleniny, rybách a rybích výrobcích. Aminy jsou v nadměrné míře tvořeny během stárnutí a skladování potravin

či surovin a hlavně v potravinách, u nichž probíhají fermentační procesy (Košmerl et al., 2013, Şanlı a Şenel, 2015).

Obsah biogenních aminů v potravinách může být ovlivněn také použitým obalovým materiálem. Důkazem může být materiál OVTENE, jež obsahuje uhličitán vápenatý, mastek, oxid titaničitý, tyto suroviny jsou spojeny pomocí HDPE pryskyřice, díky své struktuře nepropouští kapaliny, ale plyny ano. OVTENE má schopnost větší inhibice mikroorganismů než ostatní používané materiály (papír + polyetylen, sklo, hliník, vakuové balení), včetně dekarboxylasa-pozitivních bakterií a tím nedochází k takové produkci biogenních aminů (Loizzo et al., 2016).

1.3.1 Maso a masné výrobky

Během zrání mastných výrobků jsou proteiny podrobeny degradačním procesům. Nejprve vznikají větší peptidy, ty jsou štěpeny na oligopeptidy, které jsou následně štěpeny na volné aminokyseliny, tyto mohou být dále katabolizovány za vzniku amoniaku, α -ketokyselin, metylketonů, aminů. Mezi bakterie izolované z masa, jež mají dekarboxylasovou aktivitu, patří zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* (*Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella terrigena*, *Salmonella arizonae*, *Escherichia coli*), kteří produkují významné množství putrescinu a kadaverinu (Lorenzo et al., 2010).

Bakterie *Brochothrix thermosphacta*, izolovaná z masa a masných výrobků, je schopna produkce malého množství histaminu a tyraminu. Zajímavostí je, že *B. thermosphacta* podporuje tvorbu biogenních aminů doprovodné mikroflóry v těchto výrobcích, to je dáno aktivací lysindekarboxylasy u gram-negativních bakterií rodů *Escherichia* a *Pseudomonas*, což zapříčiňuje nadměrnou tvorbu kadaverinu těmito bakteriemi. Důvodem jsou metabolity produkované *B. thermosphacta* okyselující prostředí. Na to *E. coli* reaguje zvýšenou produkcí zásaditého kadaverinu, který neutralizuje pH. Jedná se o obranný mechanismus *E. coli*, kdy dochází k aktivaci Cad systému, který je složen ze 3 proteinů: regulačního CadC, transportního CadB a enzymatického CadA (lysindekarboxylasa). Aktivita tohoto enzymu je při pH 5,5 asi dvakrát vyšší než při pH 6 a při pH 7 je aktivita téměř nulová (Nowak a Czyzowska, 2011).

Dalším faktorem, který ovlivňuje obsah biogenních aminů v masných výrobcích, je koncentrace soli. S ohledem na zdraví konzumentů je snaha snižovat příjem sodíku z potravin. Snižování koncentrace soli v masných výrobcích však podle Laranjo et al. (2017) vede k ná-

růstu obsahu biogenních aminů ve výrobku. To je způsobeno zvýšenou činností mikroorganismů s dekarboxylasovou aktivitou. Pro výrobu fermentovaných potravin se sníženým obsahem soli je vhodné použít startérovou kulturu se schopností inhibovat mikroorganismy s dekarboxylasovou aktivitou.

1.3.2 Sýry

Sýry jsou vhodným prostředím pro tvorbu biogenních aminů, protože obsahují bílkoviny, enzymy, kofaktory, vodu a mikroorganismy. I když výskyt biogenních aminů v mléce je nízký, jejich koncentrace v sýrech je o poznání vyšší. Při výrobě sýrů je jednou ze zásadních činností přidavek startérových kultur. Díky souboru reakcí, které při výrobě sýrů probíhají, dochází ke vzniku kyseliny mléčné, proteolýze za vzniku kratších peptidů až konečných volných aminokyselin, které přispívají k finální chuti a vůni výrobku. Mezi nejčastěji používané mezofilní kultury patří *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus helveticus*. Doba zrání sýrů je jedním z faktorů ovlivňujících množství biogenních aminů v sýru. Čím déle sýr zraje, tím větší množství aminů může vzniknout, a to z důvodu kumulace volných aminokyselin a přítomnosti bakterií s dekarboxylasovou aktivitou. Může tedy docházet k produkci velkého množství tyraminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu v sýru, a to jak startérovými, tak i non-startérovými kulturami. Z důvodu neexistence právních předpisů, které by omezovaly hladinu aminů v sýrech, nejsou výrobci povinni se touto problematikou zabývat (Flasarová et al., 2016; Şanlı a Şenel, 2015).

Teplota zrání a skladování sýrů má rovněž významný vliv na tvorbu biogenních aminů. Bylo zjištěno, že teplotní optimum pro bakterie s dekarboxylasovou aktivitou se pohybuje v rozmezí 20 až 27 °C. Zvolením nižších teplot při zrání a skladování můžeme docílit menší produkce aminů v průběhu těchto procesů. Hodnota pH má také vliv, kyselé prostředí (pH okolo 4 - 5,5) podporuje tvorbu aminů (Şanlı a Şenel, 2015). Pachlová et al. (2012) navíc zjistili, že obsah biogenních aminů se různí i v jednotlivých částech sýra (ve středové oblasti je koncentrace aminů nejmenší, naproti tomu okrajové části sýra obsahují nejvyšší koncentrace aminů).

1.3.3 Alkoholické nápoje

Některé biogenní aminy jsou tvořeny kvasinkami a jejich koncentrace se zvyšuje v průběhu alkoholového kvašení. Při výrobě vína většina biogenních aminů vzniká v důsledku jablečno-mléčného kvašení, způsobeném bakteriemi mléčného kvašení (Košmerl et al., 2013). Vysoká koncentrace biogenních aminů, ale může být dána zpracováním mikrobiálně napařených hroznů, nedostatečnou sanitací výrobního zařízení a dalšími kroky při výrobě vína (macerace a zrání v kalech, ale i faktory jako jsou pH, celkový obsah kyselin, alkoholu a SO₂). Pivo, obdobně jako víno, může obsahovat značné množství aminů. (Cunha et al., 2017; Košmerl et al., 2013).

Kromě negativního vlivu vysokých dávek biogenních aminů na zdravotní stav člověka, putrescin a kadaverin mohou mít negativní účinky na aroma a chuť vína (pach hnilyby, hnijícího masa). Obecně ale kvasinky produkují méně biogenních aminů nežli bakterie mléčného kvašení. Dále mohou aminy produkovat i plísně, například *Botrytis cinerea*. V otázce, zda kvasinky produkují biogenní aminy, existují protichůdné názory. Někteří autoři tvrdí, že kvasinky biogenní aminy produkují, jiné publikace tvrdí opak. Příliš výzkumů zabývajících se produkcí aminů kvasinkami zatím provedeno nebylo. Je proto nutné tuto problematiku důkladněji prostudovat (Košmerl et al., 2013).

Aminy se vyskytují i v likérech (kávové, medové, ovocné a bylinné), avšak přítomná množství jsou zanedbatelná s přihlédnutím k faktu, že likérů se konzumuje mnohem méně než piva a vína. Tudíž z pohledu výskytu biogenních aminů nejsou likéry pro konzumenty velkou hrozbou (Cunha et al., 2017).

1.3.4 Ryby

Nejvíce zastoupený amin v rybách je histamin. Je známo, že rybí maso podléhá velmi rychle mikrobiální zkáze, přítomné mikroorganismy tak mohou histidin, který se vyskytuje ve vysoké koncentraci v rybí svalovině, dekarboxylovat na histamin. Otrava histaminem je označována jako scombroid otrava, protože často nastává po konzumaci ryb patřících do čeledi *Scombroideae* (tuňák, makrela, sardinky) (Benkerroum, 2016; Şanlı a Şenel, 2015). Roku 2010 byla systémem RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed - Systém včasného varování pro potraviny a krmiva) zaznamenána jedna z nejvyšších koncentrací (10 000 mg/kg) histaminu ve filetě tuňáka v oleji. Tato fileta pocházela z Portugalska (Nowak a Czyzowska, 2011).

Biogenní aminy souvisí s kvalitou potravin, konkrétně u ryb může být podle jejich přítomnosti hodnocena jejich čerstvost. Ačkoliv se v rybách vyskytují různé biogenní aminy, podle platné legislativy EU (Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005) byly stanoveny limity pouze pro histamin (200 mg/kg) (Herrero et al., 2016).

1.4 Stanovení biogenních aminů

Mezi způsoby detekce biogenních aminů patří (Parchami et al., 2017):

- vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)
- plynová chromatografie (GC)
- kapilární elektroforéza (CE)
- iontová mobilní spektrometrie (IMS)
- chromatografie na tenké vrstvě (TLC) – není příliš častá.

1.4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

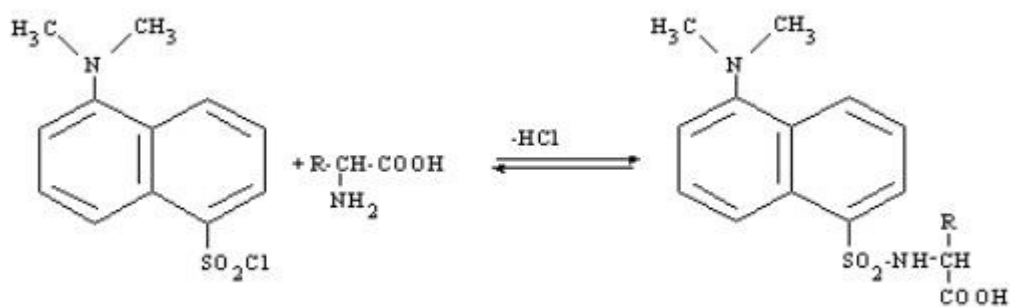
Pro analýzu biogenních aminů se nejčastěji používají techniky kapalinové chromatografie s různou detekcí. Kvůli nedostatku chromoforů (část molekuly zodpovědná za absorpci záření) vykazují aminy malou, popřípadě žádnou schopnost absorpce UV nebo viditelného světla, fluorescenční nebo elektrochemickou aktivitu a je nutná jejich předkolonová nebo postkolonová derivatizace (Herrero et al., 2016; Parchami et al., 2017). Při derivatizaci by měl vzniknout dostatečně stabilní derivát, který je možné detekovat ve fluorescenční či UV oblasti (Loukou a Zotou, 2003).

Při přípravě vzorků pro stanovení musí být do analyzované směsi přidáno přesně známé množství vnitřního standardu. Jako vnitřní standard se vždy používá látka, která není přirozeně přítomna ve stanovovaném vzorku, v případě biogenních aminů lze použít 1,7-diaminoheptan nebo cyklopentylamin. Následuje derivatizace, mezi nejznámější derivatizační činidla patří (Hernández-Borges et al., 2007; Tuberoso et al., 2015):

- dansylchlorid (Dsn-Cl)
- bansylchlorid (Bsc-Cl)

- o-ftalaldehyd (OPA)
- fluoresceinisothiokyanát
- 9-fluorenyl-methyloxycarbonyl chlorid (Fmoc-Cl)
- diethyl ethoxymethylenemalonát (DEEM).

Nejčastěji používaným činidlem je dansylchlorid (5-N,N'-dimethylaminonaftalen-1-sulfonylchlorid), a to pro svou schopnost tvořit stabilní sloučeniny s primárními a sekundárními aminy. Tato reakce probíhá v mírně alkalickém prostředí za vzniku příslušných sulfonamidů (*Obr. 2*) s absorpčním maximem při 298 nm. Dansylderiváty jsou žluté krystalické látky, rozpustné v organických rozpouštědlech, které fluoreskují při vlnové délce 470 až 530 nm. Při vyšším pH probíhá reakce rychleji, ale současně dochází k rychlejší hydrolyze vznikajících derivátů. Optimální pH prostředí se pohybuje od pH 9,5 do 10 (Male a Luong, 2001; Tuberoso et al., 2015).



Obr. 2 Reakce dansylchloridu a aminu za vzniku sulfonamidu (Loukou a Zotou, 2003)

Po odstranění přebytku dansylchloridu je extrakt zředěn v acetonitrilu a vzorky nastříknuty na kolonu s reverzní fází (Laranjo et al., 2017).

Kvůli rozmanitosti ve struktuře biogenních aminů (existence alifatických, heterocyklických, aromatických struktur) je nutná vhodná volba detektoru. Fluorescenční a UV detektory se používají nejčastěji, dále je možné využít detektory diodového pole (DAD), elektrochemickou nebo hmotnostní detekci (Herrero et al., 2016; Tuberoso et al., 2015).

1.4.2 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie se používá pro stanovení těkavých aminů či jejich derivátů. Netěkavé biogenní aminy lze taktéž stanovit pomocí GC, po jejich převedení na těkavější sloučeniny, například acylací. Využívá se plamenový ionizační detektor (FID) a hmotnostní detektor (Hernández-Borges et al., 2007).

1.4.3 Kapilární elektroforéza (CE)

Aminy jsou slabé báze a v blízkosti pH o hodnotě 4 může dojít k jejich protonizaci, tudíž je možné je dále separovat pomocí kapilární elektroforézy, přičemž není nutná předchozí derivatizace (He et al., 2017). Kapilární elektroforéza je založena na separaci látek na základě jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli. Probíhá v kapiláře naplněné roztokem základního elektrolytu (zpravidla pufr). V důsledku působení elektrického pole dochází k separaci analytů nadávkovaných na jednom konci kapiláry, kladně nabitě částice jsou přitahovány k záporné elektrodě a naopak. Detekce je nejčastěji založena na změně absorpance, vodivosti, iontového signálu nebo fluorescence při průchodu analytu detektorem (Gaš, 2001; He et al., 2017).

1.4.4 Iontová mobilní spektrometrie (IMS)

Iontová mobilní spektrometrie je rychlá metoda, kterou lze rovněž použít ke stanovení biogenních aminů. Vzorek se ionizuje pomocí beta zářiče ^{63}Ni . Vzniklé ionty jsou obklopeny vodní parou. Následně se na ionty a molekulární klastry (soubor atomů či molekul) uplatní elektrické pole a ionty se podle něj začnou pohybovat. Dělení je zajištěno inertním plynem (lze použít např. nonylamin), který se pohybuje protiproudě a malé ionty dopadnou na detektor dříve, než velké iontově-molekulární klastry, výsledkem je graf intenzity v závislosti na čase. Tato metoda je poměrně rychlá, avšak rozlišovací schopnost je nižší (Parchami et al., 2017).

2 DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ

Biogenní aminy jsou rozkládány pomocí enzymů aminooxidas. Jedná se o enzymy, které jsou také součástí detoxikačního mechanismu v lidském těle. Některé mikroorganismy jsou schopny produkce těchto enzymů (např. *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Arthrobacter crystallopoietes*, *Brevibacterium linens*) (Yi-Chen et al., 2016).

2.1 Detoxikační mechanismus

Lidské tělo disponuje přirozeným detoxikačním systémem, jenž se skládá z enzymů mono- a diaminooxidas (MAO, DAO), které uplatňují svou funkci hlavně v tenkém střevě. Oxidasy katalyzují deaminaci biogenních aminů za vzniku aldehydu, peroxidu vodíku a amoniaku (Obr. 3) (Košmerl et al., 2013).



Obr. 3 Oxidace histaminu pomocí DAO za vzniku imidazol acetaldehydu, amoniaku a peroxidu vodíku (Duelo, 2012)

Existují dvě formy monoaminooxidas, MAO-A a MAO-B. Liší na základě různé afinity k substrátu. Obě formy metabolizují tyramin a tryptamin. MAO-B navíc degraduje fenyletylamin (Moreno-Arribas a Polo, 2009). DAO se vyskytuje převážně v tenkém střevu, játrech, ledvinách a krevních leukocytech. DAO degraduje putrescin, kadaverin, histamin. Biogenní aminy bývají degradovány při průchodu střevní sliznicí (Duelo, 2012).

Putrescin a kadaverin zvyšují toxicitu histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, protože zasahují do detoxikačních reakcí (Košmerl et al., 2013). Další látkou, která se zapojuje do blokáce detoxikačního mechanismu, je etanol. Enzymy MAO a DAO nemají vysokou substrátovou specifitu a mohou vázat místo aminu alkohol a další látky jako acetaldehyd, antidepresiva,

či méně toxické biogenní aminy (např. kadaverin). Aminooxidasová aktivita u kuřáků je asi o 30 % nižší než u lidí, kteří nekouří, protože v tabáku se nacházejí látky mající inhibiční účinek na aminooxidasu (Berlin a Anthenelli, 2001). Nedostatečná detoxikace aminooxidasami ve střevě může být dána i z genetických důvodů (osoby trpící nedostatkem aminooxidas). Je tedy nutné zohlednit všechny tyto faktory při konzumaci potravin, aby nedošlo ke kumulaci aminů a nechtěné otravě organismu zvolením kombinace potravin, jež obsahují vysoké množství biogenních aminů a inhibitorů aminooxidas (Moreno-Arribas a Polo, 2009; Şanlı a Şenel, 2015). Podle Kanny et al. (2001) je běžný konzument schopen tolerovat 129 mg/l histaminu perorálně.

2.2 Možnosti snížení obsahu biogenních aminů v potravinářství

Možnosti použití degradačních mechanismů v potravinách jsou dvě:

- aplikace mikroorganismů s aminooxidasovou aktivitou
- aplikace samotných aminooxidas (Naila et al., 2010).

Přítomnost biogenních aminů v potravinách závisí na přítomnosti mikroorganismů s dekarboxylasovou aktivitou. Proto vhodnou metodou, jak snížit obsah biogenních aminů, je zamezení kontaminace surovin těmito mikroorganismy, popřípadě jejich koncentraci snížit na minimum pomocí dostupných prostředků. Tato metoda sice úplně nesouvisí s degradačními mechanismy aminů, avšak ukázala se jako velmi efektivní v oblasti snižování koncentrací aminů v potravinách (Linares et al., 2011).

2.2.1 Aplikace mikroorganismů s aminooxidasovou aktivitou

Přídavek mikroorganismů s aminooxidasovou aktivitou nepatří mezi klasické metody konzervace potravin, avšak jedná se o účinnou metodu snižování množství aminů v potravinách. Leuschner a Hammes (1998) testovali *Brevibacterium linens* a její schopnost degradace aminů ve vzorku sýru. Jako mazová kultura byla použita právě *B. linens* a bylo zaznamenáno snížení obsahu histaminu o 55 % a tyraminu o 70 %. Aminooxidasová aktivita byla prokázána i u dalších koryneformních bakterií. Výhodou aplikace těchto kultur je, že působí na povrchu sýrů, kde jsou ideální podmínky pro oxidaci (dostatečný přísun kyslíku a vhodné pH). *B. linens* je odpovědná za tvorbu oranžového pigmentu na povrchu sýru,

přispívá k tvorbě chuti a produkci aromatických látek, inhibuje růst kontaminující mikroflóry. Bylo zjištěno, že *B. linens* nejvíce degraduje aminy v exponenciální fázi růstu (Leuschner a Hammes, 1998).

Mezi mikroorganismy, u nichž byla prokázána schopnost degradace biogenních aminů, patří některé kmeny (Dapkevicius et al., 2000; Zaman et al., 2010):

- *Lactobacillus sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. casei*, *Lb. hilgardii*
- *Micrococcus* sp.
- *Staphylococcus xylosum*, *S. carnosus*, *S. intermedius*
- *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*
- *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis*
- *Kocuria varians*
- *Oenococcus oeni*
- *Geotrichum candidum*.

2.2.2 Aplikace aminooxidas

Je známo, že některé druhy vláknitých hub mají aminooxidasovou aktivitu a využívají aminy jako jediný zdroj dusíku. Cueva et al. (2012) izolovali aminooxidasové enzymy z *Penicillium citrinum*, kdy bylo zjištěno, že tato plíseň degraduje biogenní aminy ve velké míře. Extrakt aminooxidas byl účinný v rozmezí pH 4 - 5 a dosáhl snížení obsahu aminů v komerčních vínech o 20 % u histaminu, 40 % u tyraminu a 38 % u putrescinu.

Dapkevicius et al. (2000) použili enzym DAO při silážování rybích zbytků, tento enzym významně snižuje hladinu aminů v siláži, avšak pouze na začátku fermentačního procesu, protože následně pH klesne pod 4,5, kdy už enzym svou aktivitu ztrácí.

Pro snížení hladiny biogenních aminů v potravinách může být použití samotných aminooxidas účinnou metodou (Cueva et al. 2012).

2.2.3 Snížení kontaminace mikroorganismů s dekarboxylasovou aktivitou v potravinách

Biogenní aminy jsou sice termostabilní, ale vysokými teplotami lze usmrtit jejich producenty, proto je nutné syrové suroviny vždy tepelně ošetřit pasteračním či sterilačním zákrokem, je-li to možné (Linares et al., 2011; Naila et al., 2010). Na druhou stranu aplikací nízkých teplot dosáhneme zpomalení růstu mikroorganismů a v souvislosti s tím i snížení aktivity dekarboxylas. Popřípadě, udržujeme-li potraviny, typické pro vysoký obsah biogenních aminů, jako jsou ryby, při mrazírenských teplotách, koncentrace aminů se již dále nezvyšuje a zůstává konstantní. Mražení je tedy účinnější než chlazení (Naila et al., 2010).

Při výrobě fermentovaných potravin je vhodné dbát na pečlivý výběr startérových kultur. Měly by být preferovány kmeny bez dekarboxylasové aktivity. Dále pak kmeny mající schopnost tvorby aminosidas nebo ty, které mohou inhibovat růst dekarboxylasa pozitivních kmenů, takzvané protektivní kultury (Linares et al., 2011).

Dále byl prokázán vliv záření na hladinu aminů v potravinách. Ozařování potravin může ovlivňovat koncentraci aminů dvěma způsoby. V první řadě inhibuje přítomné mikroorganismy s dekarboxylasovou aktivitou, kdy pak nedochází k produkci dalších biogenních aminů. Záření, ale dokáže již přítomné aminy degradovat (Özogul a Özden, 2013). Kim et al. (2005) testovali vliv záření na aminy v modelovém vzorku roztoku aminů. Záření o síle 20 kGy degradovalo 95 % aminů v roztoku. Dále tyto poznatky studovali na reálném vzorku potraviny, kdy zjistili, že záření o síle 10 či 20 kGy kompletně degraduje putrescin v klobáse. Ozáření 10 kGy je považováno za bezpečné, je to dávka, při které se potravina nestává radioaktivní a nedochází k sensorickým změnám (Naila et al., 2010). Nejvyšší povolená dávka ozáření závisí na typu potraviny, např. koření a sušené byliny mají nejvyšší celkovou průměrnou absorbovanou dávku záření 10 kGy, ryby a ostatní mořští živočichové 3 kGy (Özogul a Özden, 2013).

Použitím konzervačních prostředků opět dochází k inhibici producentů biogenních aminů a tím zamezení vzniku nadměrných koncentrací aminů. Lze použít sorban sodný, sorban draselný, kyselinu citronovou a jablečnou (možnost potlačení produkce aminů ve fermentovaném zelí), chlorid sodný a další (Naila et al., 2010).

3 CHARAKTERISTIKA RODU *BACILLUS*

Rod *Bacillus* je rozsáhlou skupinou, která je taxonomicky řazena do čeledi *Bacillaceae*. Bakterie příslušící tomuto rodu se běžně vyskytují v přírodě, zejména v půdě a potravinách rostlinného původu, ale také v mase, rybách, mléku a mléčných výrobcích. Jedná se o gram-pozitivní, aerobní tyčinky dosahující délky 10 μm , se schopností tvorby spor. Většina druhů je pohyblivá s peritrichálním umístěním bičíků (tzn., že bičíky jsou umístěny po celém povrchu buňky). Patří mezi mesofilní organismy, které jsou schopny růstu v teplotním rozmezí 15 – 55 °C avšak optimální teplota se pohybuje v rozmezí 30 až 45 °C. Jsou také schopny růstu ve velmi širokém rozmezí pH 5,0 – 8,8, kdy optimum se pohybuje ve slabě kyselé až neutrální oblasti (pH 6 – 7). Některé druhy jsou schopny přežít i vysoké koncentrace soli, a to více než 15 % (Bednář, 1996; Eom et al., 2015; Lund et al., 2000).

3.1 Biochemické znaky

Mezi bacily se řadí katalasa pozitivní druhy, které disponují bohatou enzymatickou výbavou, tudíž se podílejí na rozkladu různých organických sloučenin. Naprostá většina druhů disponuje proteolytickými, amylolytickými a pektolytickými enzymy, účastní se tedy proteolytických reakcí při kažení masa nebo mléka a díky schopnosti štěpit škrob mohou být využívány v pivovarství a pekárenství. V pivovarském průmyslu jsou amylolytické enzymy, ve formě enzymových preparátů, přidávány k náhražkám sladu (surogátům), kde mají za úkol nahradit účinek sladových enzymů v procesu výroby mladiny. V pekárenství se enzymové preparáty, mikrobiálního či rostlinného původu, přidávají při úpravě mouky, aby bylo zajištěno dostatečné množství zkvasitelných sacharidů pro kvasinky při výrobě pečiva (Sluková a Skřivan, 2015). Některé druhy jsou schopny syntetizovat lecitinasu (Bednář, 1996; Lund et al., 2000).

Jednou z nejvíce ceněných vlastností bacilů je produkce antibiotik polypeptidové povahy (bacitracin, gramicidin a polymyxin), kdy některé druhy současně tvoří několik antibiotik a mohou být využívány pro jejich průmyslovou výrobu (Bednář, 1996).

U některých kmenů byla prokázána tvorba bakteriocinů (Sebei et al., 2007). Jedná se o nízkomolekulární peptidy produkované bakteriemi, které inhibují růst kmenů příbuzných producenta. Bakteriociny se rozdělují do několika tříd v závislosti na velikosti molekuly, post-

translačních úpravách nebo termostabilitě (Třída I - lanthibiotika, Třída II - tepelně stabilní peptidy, Třída III - větší termolabilní peptidy (Gray et al., 2006)). Bakteriocin cerein MRX1, syntetizovaný kmenem *B. cereus*, nevykazuje inhibiční působení na samotného producenta, avšak na ostatní kmeny tohoto druhu ano. Inhibuje také blízké příbuzné druhy, jako jsou *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. coagulans*, a další gram-pozitivní bakterie jako *Listeria innocua* a *Streptococcus bovis*. Odolnost vůči cereinu MRX1 byla prokázána u bakterií mléčného kvašení (Sebei et al., 2007). Příkladem dalších bakteriocinů produkovaných bacily jsou cerein 7A, cerein 7B, thuricin 17 (Oscáriz et al., 2006).

3.2 Tvorba spor

U bacilů je charakteristická tvorba jedné endospory, která probíhá za přítomnosti kyslíku (během sporulace je zintenzivněno dýchání) a energii potřebnou pro vznik spory buňka získává pomocí oxidace kyseliny poly- β -hydroxymáslé, což je rezervní látka přítomná v cytoplasmě buňky. Spory mají různé tvary v závislosti na konkrétním kmenu (elipsoidní, cylindrické, sférické) a jsou velmi odolné vůči vysokým teplotám, tlakům, záření, chemikáliím. Podle velikosti a tvaru spor se bacily dělí do skupin (Votava, 2003):

- Bakterie tvořící spory elipsoidního tvaru nezpůsobující zduření buňky (*B. megaterium*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* a *B. anthracis*).
- Bakterie tvořící spory elipsoidního tvaru způsobující zduření buňky (*B. macerans*, *B. polymyxa*, *B. alvei*, *B. brevis*).
- Bakterie tvořící spory sférického tvaru (*B. sphaericus*).

3.3 Patogenita

Většina druhů bacilů je nepatogenních, výjimku tvoří *Bacillus anthracis* a *B. cereus*, jež jsou patogenní pro člověka a *B. thuringiensis*, jež je patogenní pro hmyz a využívá se při výrobě insekticidů (Bednář, 1996; Lund et al., 2000).

3.3.1 *Bacillus anthracis*

Buňky *B. anthracis* jsou mohutné tyčinky se seseknutými konci, produkující antraxový toxin, který vyvolává onemocnění, přičemž záleží na cestě vstupu bakterie do těla. Při prů-

niku kůží v důsledku poranění vzniká kožní forma antraxu projevující se nekrózou a puchýři. Další možností je vdechnutí spor, kdy dochází ke vniknutí bakterie do lymfatického systému. Poslední možností je pozření masa nakažených zvířat. Všechny cesty mohou vést ke vzniku septikémie až úmrtí pacienta. Léčba spočívá v nasazení vysokých dávek antibiotik (Bednář, 1996).

3.3.2 *Bacillus cereus*

B. cereus lze nalézt téměř ve všech surovinách určených pro výrobu potravin, pokud nebyly podrobeny tepelnému ošetření. Může být původcem septikémie, meningitidy, očních infekcí a vyvolávat otravu z potravin prostřednictvím enterotoxinu, a to ve dvou formách.

1. Syndrom zvracení – charakteristický velmi krátkou inkubační dobou (1 – 5 hodin), mezi příznaky patří nevolnost zvracení, křeče, bolest břicha.
2. Průjmový syndrom – onemocnění je charakteristické inkubační dobou 8 – 16 hodin a zahrnuje příznaky, jako jsou bolest břicha nebo průjem.

Oba druhy otrav mají poměrně mírný průběh, většinou trvají méně než 24 hodin a z pravidla nevyžadují lékařskou pomoc (Bednář, 1996; Lund et al., 2000).

B. cereus je kultivačně nenáročná bakterie, na neselektivních médiích tvoří velké kolonie s nepravidelnými okraji a na krevním agaru je charakteristická β -hemolysou (úplný rozklad krvinek). Pro stanovení této bakterie se používají selektivně-diagnostické půdy MYP (manitol yolk polymyxin agar) nebo PEMBA (agar obsahující polymyxinpyruvát, yolk, manitol a bromtymolovou modř). Polymyxin B je antibiotikum, které inhibuje růst doprovodné mikroflóry, a obě média jsou založena na principu štěpení žloutkové emulze a nepřítomnosti produkce kyseliny z manitolu. *B. cereus* roste na MYP v podobě růžových kolonií s růžovou zónou precipitace. Na PEMBA roste ve formě modrých kolonií se zónou precipitace (Lund et al., 2000).

3.4 Degradace biogenních aminů bakteriemi rodu *Bacillus*

Schopnost degradace aminů je kmenově specifická, nikoli druhově. Princip degradace je stejný jako u detoxikačního mechanismu v lidském těle. Vlivem mono- a diaminooxidás dochází k oxidaci aminů za vzniku aldehydu, peroxidu vodíku a amoniaku za přítomnosti

kyslíku. Mezi bacily, u nichž byla pozorována schopnost degradace biogenních aminů, patří např. *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. polymyxa* (Kim et al., 2012; Yi-Chen et al., 2016; Zaman et al., 2010).

B. amyloliquefaciens má značnou schopnost degradace histaminu, a to až o 59 % za 24 hodin při 37 °C v reálném vzorku rybí omáčky (Kim et al., 2012), dále byla schopnost degradace této bakterie studována ve vzorku fermentované sójové omáčky, kde autoři Kim et al. (2012) taktéž dosáhli významného snížení hladiny histaminu, ale i putrescinu a kadaverinu.

B. subtilis, stejně jako *B. amyloliquefaciens*, snižuje hladinu histaminu, putrescinu a kadaverinu ve fermentovaných sójových výrobcích (Kim et al., 2012).

Jednou z bakterií se schopností degradovat biogenní aminy je *Bacillus polymyxa*. Ye-Chen et al. (2016), studovali vliv teploty, pH a koncentrace NaCl na histamin-degradační aktivitu této bakterie. Pokus byl prováděn v bujónu obohaceném histaminem. Výsledky ukázaly, že *B. polymyxa* nedegraduje histamin při 4 a 45 °C. Při teplotách 25, 30 a 37 °C se snížila hladina histaminu po šesti hodinách až o 100 %. *B. polymyxa* nedegraduje histamin při pH nižším jak 3 a vyšším jak 11. Nejvyšší rychlost degradace byla pozorována při pH 7. Se zvyšujícím se obsahem soli klesal počet životaschopných buněk *B. polymyxa*, proto nejvyšší degradační aktivita byla zaznamenána při koncentraci 0,5 % NaCl. Zda je *B. polymyxa* schopen snižovat hladinu histaminu v reálném vzorku potraviny testovali Hsien-Feng et al. (2015). Pro výrobu solené fermentované ryby byl jako startérová kultura použit *B. polymyxa*. Výsledky prokázaly schopnost degradace histaminu pomocí *B. polymyxa* i v reálném vzorku potraviny. Hladina histaminu se oproti kontrolnímu vzorku (fermentace bez použití *B. polymyxa*) snížila až o 45 %. Studie tedy potvrdila vhodnost použití této bakterie jako startérové kultury vykazující potenciál pro snížené koncentrace histaminu ve fermentované potravíně.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Toxicita biogenních aminů se dostává do povědomí lidí čím dál více. Projevuje se také snaha o snížení jejich množství v potravinách. Snížit množství biogenních aminů ve výrobku lze aplikací mikroorganismu s aminooxidasovou aktivitou. Je nutné důkladně prostudovat, jak ovlivňují schopnost degradace biogenních aminů vnější faktory, se kterými se běžně setkáváme při procesu výroby potravin (nízké/vysoké pH, vyšší koncentrace soli, teplota).

Cílem práce bylo zhodnotit vliv faktorů (teplota, čas, pH, koncentrace NaCl, médium) na schopnost degradace biogenních aminů dvou mikroorganismů *Bacillus subtilis* a *B. pumilus*.

5 POUŽITÉ MATERIÁLY A METODY

5.1 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy A&D GH-200 EC
- Autokláv VARIOKLAV
- Automatický dávkovač Biohit
- Biologický termostat MEMMERT
- Biohazard box TELSTAR
- Centrifuga HETTICH ROTANTA 460
- Laboratorní třepačka LT2
- Laboratorní váhy KERN
- Laboratorní sklo a plasty (zkumavky, Petriho misky, eppendorfkové mikrozkušavky, odměrné baňky, pipety)
- Mikropipeta Biohit
- pH metr EUTECH INSTRUMENTS pH 510
- systém HPLC (binární pumpa LabAlliance, USA, autosampler LabAlliance, USA, kolona s termostatem Agilent Eclipse Plus C18 RRHD 3,0 x 50 mm; UV/VIS DAD detektor ($\lambda = 254$ nm); a degaser 1260 Infinity, Agilent Technologies)
- termoblok BENCHMARK DIGITAL BLOCK

5.2 Chemikálie

- Acetonitril CHROMASOLV® (SIGMA – ALDRICH)
- Dansylchlorid (SIGMA – ALDRICH)
- Dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4 (Ing. Petr Lukeš)
- Dusičnan kobaltnatý hexahydrát $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (PENTA)
- Fenyletylamin (SIGMA – ALDRICH)

- Heptan CHROMASOLV® (SIGMA – ALDRICH)
- Hexahydrát síranu amonno-železnatého $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Ing. Petr Lukeš)
- Histamin (SIGMA – ALDRICH)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (LACHEMA)
- Hydrogenuhlíčan sodný NaHCO_3 (MERCK)
- Chlorid sodný NaCl (PENTA)
- Chlorid vápenatý dihydrát $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (PENTA)
- Kadaverin (SIGMA – ALDRICH)
- Kyselina boritá H_3BO_3 (Ing. Petr Lukeš)
- Kyselina chloristá 70-72% (MERCK)
- L-Prolin (MERCK)
- Molybdenan amonný tetrahydrát $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (Ing. Petr Lukeš)
- Nutrient broth (HIMEDIA)
- Putrescin (SIGMA – ALDRICH)
- Síran hořečnatý heptahydrát $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Ing. Petr Lukeš)
- Síran manganatý pentahydrát $\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (Ing. Petr Lukeš)
- Síran měďnatý pentahydrát $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (PENTA)
- Síran zinečnatý heptahydrát $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Ing. Petr Lukeš)
- Standard 1,7-diaminoheptan (SIGMA – ALDRICH)
- Tlaková lahev dusíku (Linde, Otrokovice)
- Tryptamin (SIGMA – ALDRICH)
- Tyramin (SIGMA – ALDRICH)
- Uhlíčan sodný bezvodý Na_2CO_3 (MERCK)
- Uhlíčan draselný K_2CO_3 (MERCK)

5.3 Příprava kultivačních médií a roztoků

5.3.1 Minerální médium s biogenními aminy

Schopnost degradace vybraných mikroorganismů byla sledována v minerálním médiu, jež není samo o sobě zdrojem živin a jako jediný zdroj dusíku a uhlíku sloužily přidané biogenní aminy.

Minerální médium bylo připraveno smícháním 8 roztoků, které byly připraveny následovně:

- Roztok KH_2PO_4

Navážka 9,07 g KH_2PO_4 byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 1000 ml a doplněna destilovanou vodou po risku.

- Roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

Navážka 23,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 1000 ml a doplněna destilovanou vodou po risku.

- Roztok $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Navážka 10 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 1000 ml a doplněna destilovanou vodou po risku.

- Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Navážka 1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 1000 ml a doplněna destilovanou vodou po risku.

- Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

Navážka 3 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 1000 ml a doplněna destilovanou vodou po risku.

- Roztok NaCl

Navážka 50 g NaCl byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 1000 ml a doplněna destilovanou vodou po risku.

- Roztok stopových prvků

Roztok stopových prvků byl připraven navážením příslušného množství sloučenin, jež jsou zobrazeny v *Tab. 2* a jejich rozpuštěním v 1000 ml destilované vody.

Tab. 2 Složení roztoku stopových prvků

| Látka | Hmotnost [g] |
|--|--------------|
| $\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ | 0,043 |
| H_3BO_3 | 0,057 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 0,043 |
| $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ | 0,037 |
| $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | 0,025 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ | 0,040 |

- Roztok biogenních aminů

Roztok biogenních aminů byl připraven navážením příslušného množství aminů, jež jsou zobrazeny v *Tab. 3* a jejich rozpuštěním v 1000 ml destilované vody.

Tab. 3 Složení roztoku biogenních aminů

| Biogenní amin | Hmotnost [g] |
|---------------|--------------|
| Tryptamin | 2 |
| Fenyletylamin | 2 |
| Putrescin | 2 |
| Kadaverin | 2 |
| Histamin | 2 |
| Tyramin | 2 |

Takto připravené roztoky byly použity pro přípravu minerálního média, kdy bylo odměřeno odpovídající množství každého roztoku podle Tab. 4 do odměrné baňky o objemu 1000 ml a baňka byla doplněna destilovanou vodou po risku.

Tab. 4 Složení minerálního média

| Roztok | Objem [ml] |
|---|------------|
| Roztok KH_2PO_4 | 20 |
| Roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ | 80 |
| Roztok $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 10 |
| Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 10 |
| Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | 10 |
| Roztok NaCl | 10 |
| Roztok stopových prvků | 2 |
| Roztok biogenních aminů | 100 |

Minerální médium bylo rozděleno do 3 lahví o stejném objemu, ve kterých byly pomocí HCl upraveny hodnoty pH na 5, 7 a 8,5. Pro každou hodnotu pH bylo připraveno minerální

médium obsahující koncentrace NaCl 0 %, 1 %, 2 % a 3 % (w/v). Tímto postupem bylo získáno 12 různých variant minerálního média, viz *Tab. 5*.

Tab. 5 Hodnoty pH a koncentrace NaCl jednotlivých variant minerálního média

| Varianta č. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|-----|-----|-----|
| pH | 5 | 5 | 5 | 5 | 7 | 7 | 7 | 7 | 8,5 | 8,5 | 8,5 | 8,5 |
| NaCl [% w/v] | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 1 | 2 | 3 |

Jednotlivé roztoky byly nadávkovány po 5 ml do plastových zkumavek. Zkumavky byly opatřeny vršky a pro zajištění sterility média autoklávovány (121 °C po dobu 20 minut).

5.3.2 Nutrient broth s biogenními aminy

Za předpokladu, že budou mikroorganismy v médiu bohatém na živiny využívat biogenní aminy méně než v minerálním médiu, byl úbytek biogenních aminů v médiu Nutrient broth sledován pouze při pH 7 a koncentraci soli 0 a 2 % (w/v).

K navážce 25g Nutrient broth bylo přidáno 100 ml roztoku biogenních aminů (viz *Tab. 3*) a směs byla doplněna destilovanou vodou do 1 litru, dokonale promíchána a rozpuštěna. Následně bylo upraveno pH na hodnotu 7 pomocí HCl. Roztok byl rozdělen na dvě poloviny. K jedné polovině byl přidán NaCl, aby výsledná koncentrace byla 2 % (w/v). Druhá polovina byla bez přídavku NaCl. Roztoky byly po 5 ml dávkovány do plastových zkumavek, uzavřeny vršky a pro zajištění sterility média autoklávovány (121 °C po dobu 20 minut).

5.3.3 Roztok kyseliny chloristé

51,1 ml 71% kyseliny chloristé bylo přidáno do odměrné baňky o objemu 500 ml, která již byla částečně naplněna destilovanou vodou. Baňka byla poté doplněna destilovanou vodou po risku. Takto byl získán 1,2 M roztok kyseliny chloristé.

5.3.4 Pufr pro derivatizaci

Pufr pro derivatizaci byl získán smíšením dvou roztoků. NaHCO₃ (připraven rozpuštěním 21 g NaHCO₃ v 500 ml destilované vody) a Na₂CO₃ (připraven rozpuštěním 26,5 g Na₂CO₃

v 500 ml destilované vody) tak aby výsledné pH roztoku bylo 9,2. K této směsi byl přidán K_2CO_3 v množství 0,333 g na 1 ml připravené směsi.

5.3.5 Roztok dansylchloridu

Roztok dansylchloridu byl připraven těsně před použitím čerstvý, o koncentraci 5 g/l. Požadovaná navážka byla rozpuštěna v odpovídajícím množství acetonu.

5.4 Použité mikroorganismy

Na základě výsledků diplomové práce Ing. Lucie Vítkové (2016) byly vybrány 2 mikroorganismy, u nichž byla prokázána schopnost degradace biogenních aminů. Jedná se o:

- *Bacillus subtilis* 23
- *Bacillus pumilus* 26.

Tyto mikroorganismy byly izolovány ze vzorků potravin, kdy zhomogenizovaný vzorek byl zaočkován do tekutého minerálního média s biogenními aminy. Vzorky byly kultivovány při 30°C a pokud byl pozorován zákal, byl vzorek přeočkován na tuhé minerální médium s biogenními aminy. Následně byla pomocí metody MALDI – TOF MS provedena identifikace izolovaných degradérů. Izoláty byly dlouhodobě uchovávány v eppendorfkových mikroskopických při -18°C (Vítková, 2016).

5.4.1 Příprava inokula

Mikroorganismy byly vyjmuty z mrazničky a ponechány při laboratorní teplotě k rozmrznutí. Obsah eppendorfkové mikroskopické vialy byl promíchán nasátím a vypuštěním suspenze a následně bylo odebráno 100 μ l inokula, které bylo zaočkováno do sterilního minerálního média obohaceného o biogenní aminy, následně proběhla kultivace při laboratorní teplotě do druhého dne na třepačce pro podpoření adaptace mikroorganismů na použité médium. Tento postup byl stejný pro oba použité mikroorganismy.

5.5 Sledování vlivu vybraných faktorů na schopnost degradace biogenních aminů u *Bacillus subtilis* 23 a *Bacillus pumilus* 26

Pro stanovení úbytku biogenních aminů v minerálním médiu o různém pH a koncentraci soli bylo využito 1308 zkumavek naplněných sterilním minerálním médiem obohaceným biogenními aminy. Byly sledovány následující faktory:

- teplota – 10, 23, 30 °C
- pH – 5,0; 7,0; 8,5
- koncentrace NaCl – 0 %, 1 %, 2 %, 3 % (w/v)
- čas – pro různé teploty byly zvoleny různé časy odběru

Pokus v médiu Nutrient broth neprobíhal v takovém rozsahu, protože jak již bylo zmíněno, nebyl zde očekáván tak velký úbytek biogenních aminů, jako v médiu minerálním. Sledované faktory byly následující:

- teplota – 10, 23, 30 °C
- pH 7
- koncentrace NaCl – 0 %, 2 % (w/v)
- čas – pro různé teploty byly zvoleny různé časy odběru, avšak stejné jako u kultivace v minerálním médiu.

Celkově bylo připraveno 224 zkumavek naplněných sterilním médiem Nutrient broth s biogenními aminy.

5.5.1 Kontrolní vzorky

Pro každé pH a koncentraci soli byly odebrány 2 zkumavky sterilního média (minerální i Nutrient broth) jako kontrolní vzorky, u kterých byl následně stanoven přesný obsah šesti sledovaných aminů (tryptamin, fenyletylamin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin), přičemž obsah biogenních aminů by se v závislosti na pH a koncentraci NaCl neměl lišit. Jedna zkumavka byla zanalyzována ihned na začátku experimentu (tímto byla zjištěna výchozí hodnota všech aminů) a druhá zkumavka byla v průběhu experimentu uchována v lednici a stanovení koncentrace aminů bylo provedeno po ukončení experimentu (pro ujištění, že aminy nedegradují v čase samy).

5.5.2 Inokulace

Ostatní zkumavky byly rozděleny do stojanů podle kultivační teploty (10, 23, 30 °C) a do každé zkumavky bylo pomocí pipety dávkováno 100 µl inokula. Zaočkované zkumavky byly umístěny do termostatů nastavených na 10, 23 a 30 °C. Postup byl pro oba mikroorganismy i obě média stejný.

5.5.3 Odběry

Pro každou teplotu byly zvoleny následující časy odběru:

- 10 °C – 12, 24, 36, 48, 72, 96 hodin
- 23 °C – 6, 12, 24, 36, 48, 72 hodin
- 30 °C – 4, 8, 12, 24, 36, 48 hodin

Časové intervaly mezi jednotlivými odběry při teplotě 30 °C jsou nejkratší, protože se jedná o teplotu, jež je optimální pro růst *B. subtilis* 23/ *B. pumilus* 26 a lze tedy očekávat rychlejší metabolismus, tím pádem i rychlejší úbytek aminů.

Ve stanovený čas byly odebrány 3 paralelní zkumavky pro každé médium, mikroorganismus, teplotu, pH a koncentraci NaCl.

5.5.4 Příprava vzorků na derivatizaci

Po odběru byl obsah zkumavek odstředěn na centrifuze (4500 otáček / 15 minut). Následně byly z jedné zkumavky připraveny 3 eppendorfkové mikrozkušavky (pro zajištění dostatečného počtu měření), kdy 2 z nich byly zderivatizovány a 1 byla ponechána jako zásobní. Do jedné eppendorfkové mikrozkušavky bylo pipetováno 650 µl supernatantu získaného při odstředění, který byl smíchán s 1,2 M kyselinou chloristou v poměru 1:1. Celkem tedy bylo zderivatizováno 3064 vzorků.

5.5.5 Derivatizace

Pomocí dansylchloridu byly biogenní aminy převedeny na deriváty, jež je možné detekovat v UV oblasti při vlnové délce 254 nm.

Do derivatizační nádoby bylo pomocí ručního dávkovače nadávkováno 100 µl vnitřního standardu 1,7-diaminoheptanu. Dále byl přidán 1 ml vzorku a 1,5 ml pufru pro derivatizaci.

Následně byl připraven čerstvý roztok dansylchloridu v acetonu a do derivatizační nádoby byly nadávkovány 2 ml tohoto roztoku. Nádoby byly uzavřeny a směs se nechala třepat v temnu 20 hodin. Po dvaceti hodinách bylo přidáno 200 μ l prolinu, derivatizační nádoby byly opět uzavřeny a umístěny na třepačku po dobu jedné hodiny. Poté byly přidány 3 ml heptanu a celý obsah byl důkladně protřepán ručně po dobu 3 minut. Dále byl odebrán 1 ml horní heptanové vrstvy do vialky, jejíž obsah byl následně při teplotě 60 °C odpařen pod proudem dusíku do sucha. Získaný odparek byl zředěn acetonitrilem, kdy přídavek acetonitrilu činil 1,5 ml. Bezprostředně před analýzou byl roztok přefiltrován přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 μ m a dávkován do chromatografického systému. V případě, že nebyl vzorek analyzován ihned, byl uchováván při teplotě -18 °C do doby analýzy.

Chromatografický systém obsahoval kolonu Agilent Eclipse Plus C18 RRHD o rozměrech 3,0 x 50 mm. V průběhu analýzy byla teplota na koloně nastavená na 30 °C a průtok byl 0,453 ml/min. Gradientový eluční program je znázorněn v *Tab. 6*. Dansylderiváty byly detekovány pomocí UV/VIS detektoru diodového pole při vlnové délce 254 nm.

Tab. 6 Program gradientové eluce

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

5.6 Statistické vyhodnocení výsledků

Výsledky obsahu biogenních aminů v kulturačních médiích po inkubaci za daných podmínek (vliv faktorů – viz kapitola 5.5) byly statisticky vyhodnoceny pomocí neparame-

trických testů, konkrétně Kruskal-Wallisova testu a Wilcoxonova testu na hladině významnosti 5 % ($P < 0,05$). Ke statistickému vyhodnocení výsledků byl použit software UNISTAT[®], verze 6.5.04 (Unistat, Ltd., Londýn, Velká Británie).

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

Celý experiment byl založen na sledování a popsání vlivu teploty (30, 23, 10 °C), pH (5,0; 7,0; 8,5), koncentrace NaCl (0, 1, 2, 3 % (w/v)), média (minerální médium, Nutrient broth) na schopnost degradace šesti biogenních aminů (tryptamin, fenyletylamin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin) dvou mikroorganismů (*B. subtilis* 23, *B. pumilus* 26). Výstupem tohoto experimentu byly chromatogramy, u kterých byly v programu Clarity odečteny plochy píků jednotlivých biogenních aminů, které byly přepočítány pomocí kalibračních rovnic na hmotnost. Následně bylo vypočteno procentuální zastoupení biogenních aminů ve vzorku. Poté byly vytvořeny grafy závislosti obsahu biogenních aminů na čase.

6.1 Sledování vlivu vybraných faktorů na schopnost degradace biogenních aminů u *Bacillus subtilis* 23 v minerálním médiu

6.1.1 Obsah biogenních aminů v médiu o pH 7 po kultivaci při teplotě 30 °C

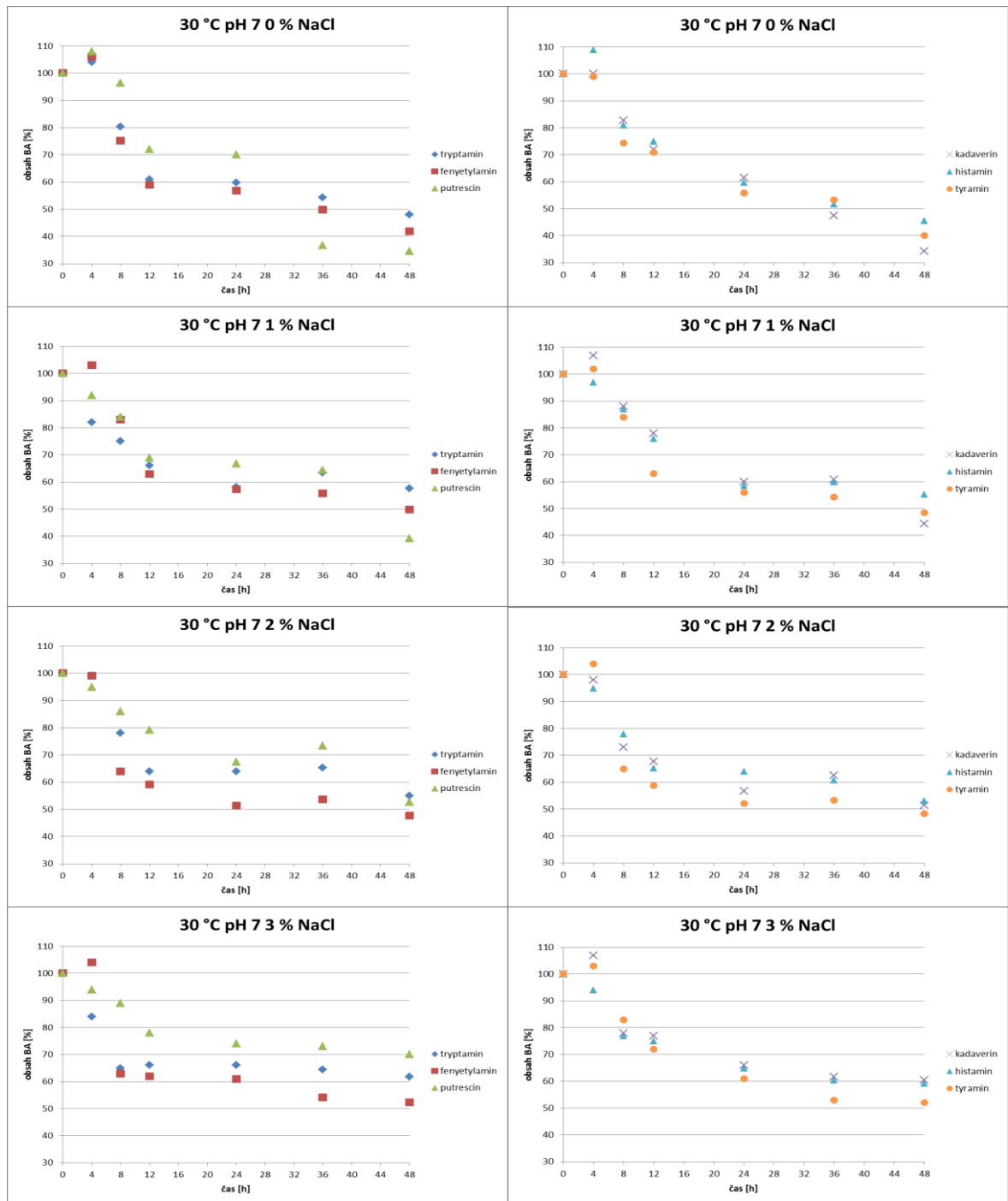
Schopnost degradace biogenních aminů bakterií *B. subtilis* 23 v minerálním médiu s přidavkem aminů, jehož počáteční pH bylo upraveno na hodnotu 7 při teplotě 30 °C o různém přidavku soli je zaznamenána na Obr. 4. Z uvedených grafů vyplývá, že se zvyšujícím se přidavkem soli klesá schopnost degradace vybraných biogenních aminů bakterií *B. subtilis* 23 s rozdílem statisticky významným ($P \leq 0,05$).

Po 4. hodině od zaočkování zatím není patrný pokles obsahu aminů, který se pohybuje okolo 100 %, avšak od 8. hodiny se začíná projevovat mírný úbytek všech aminů, který je s rostoucím časem výraznější. Tento trend je stejný u všech variant médií (s přidavkem 1, 2, 3 % (w/v) NaCl i bez přidavku NaCl) Obsah putrescinu a kadaverinu je po 48 hodinové kultivaci 34 % (ve srovnání s počátečním obsahem jednotlivých aminů v médiu). Obsah ostatních aminů, se po stejné době kultivace pohybuje v intervalu 48 – 40 %.

V prostředí 1% (w/v) koncentrace chloridu sodného v médiu dochází také k výraznému úbytku aminů, kdy nejvíce opět klesá putrescin na 39 % a kadaverin na 44 %. Koncentrace ostatních aminů se pohybují v rozmezí 57 – 48 %.

Při přidavku soli 2 % (w/v) dochází k úbytku všech aminů zhruba o jednu polovinu jejich původního množství, přičemž tyramin a fenyletylamin klesají mírně pod hodnotu 50 %.

Přítomnost 3 % (w/v) NaCl v médiu způsobuje, že *B. subtilis* 23 nedegraduje žádný z aminů o více jak 50 %.



Obr. 4 Degradace biogenních aminů bakterií *B. subtilis* 23 v minerálním médiu o pH 7 a koncentraci soli 0, 1, 2 a 3 % (w/v) při teplotě 30 °C

Různé hodnoty pH schopnost degradace *B. subtilis* 23 při teplotě 30 °C neovlivňují (toto tvrzení vychází ze zjištění, že rozdíly v úbytku biogenních aminů při různých pH nejsou statisticky významné ($P \geq 0,05$)), proto graf závislosti procentuálního úbytku biogenních aminů na čase v minerálních médiích o pH 5 a 8,5 při teplotě 30 °C nalezneme v příloze 1 a 2.

6.1.2 Obsah biogenních aminů v médiu o pH 7 po kultivaci při teplotě 23 °C

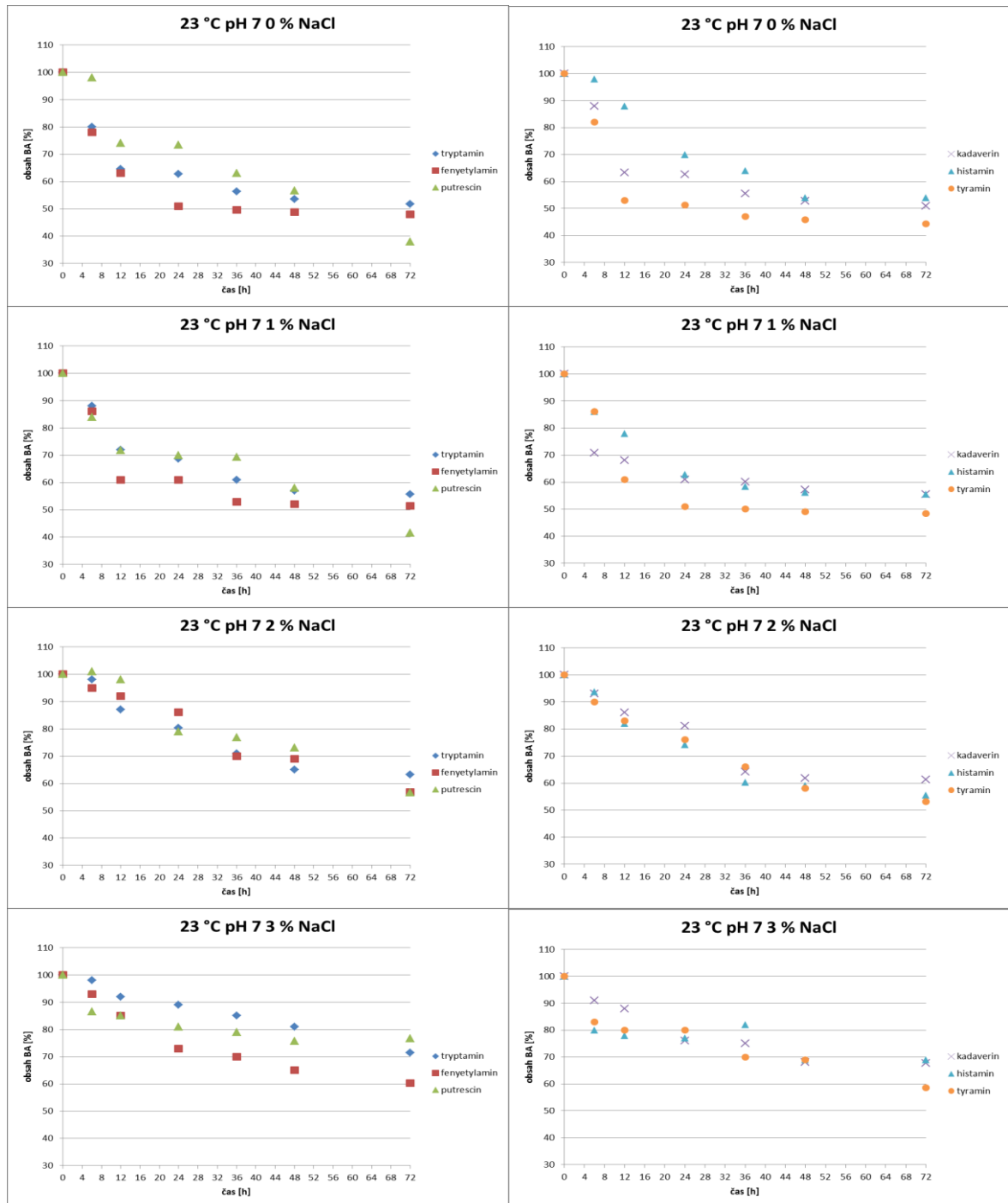
Na *Obr. 5* můžeme vidět degradační aktivitu bakterie *B. subtilis* 23 v minerálním médiu o pH 7 s různým přídatkem soli při teplotě kultivace 23 °C. Hodnota všech přítomných aminů mírně klesá již od prvního odběru (po šestihodinové kultivaci) a dále pozvolna klesá, tento postupný klesající trend vykazují všechny grafy na *Obr. 5*.

K největšímu úbytku aminů dochází opět ve variantě média bez přídatku NaCl, kde obsah putrescinu v kultivačním médiu klesá z původních 100 % až pod hranici 40 % (přesně 38 %). U ostatních 5 aminů je míra degradace přibližně 50 %.

V médiu obsahujícím 1 % (w/v) NaCl *B. subtilis* 23 nejvíce degraduje opět putrescin na 41 % a obsah ostatních aminů je po 72 hodinách v rozmezí 55 – 48 %. Tyto výsledky jsou téměř totožné s výsledky při teplotě kultivace 30 °C při pH 7 a koncentraci NaCl 1% (w/v), kde se obsah aminů kromě putrescinu pohybuje v intervalu hodnot 57 – 48 % na konci kultivace (kapitola 6.1.1), což potvrzují i výsledky statistické analýzy, kdy nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti ($P \geq 0,05$).

Přídavek 2 % (w/v) soli do média způsobuje, že obsahy kadaverinu a tryptaminu se v médiu po kultivaci *B. subtilis* 23 pohybují okolo hodnoty 60 % po ukončení kultivace, což je zhruba o 10 % více než v médiu bez přídatku soli. Histamin, tyramin, putrescin a fenyletylamin jsou tímto kmenem degradovány o něco více, jejich koncentrace klesají na 53 % pro tyramin a 55 % pro histamin, 56 % pro fenyletylamin a putrescin.

Tříprocentní koncentrace soli v médiu potlačuje schopnost degradovat aminy pomocí *B. subtilis* 23 nejvíce, protože obsahy všech přítomných aminů jsou v porovnání s ostatními přídatky NaCl nejvyšší. Například obsah putrescinu v médiu klesá pouze na 76 %, přitom v médiu bez přídatku NaCl klesá po 72 hodinách až na 38 %, jedná se o rozdíly statisticky významné ($P \leq 0,05$).



Obr. 5 Degradace biogenních aminů bakterií *B. subtilis* 23 v minerálním médiu o pH 7 a koncentraci soli 0, 1, 2 a 3 % (w/v) při teplotě 23 °C

Ani během inkubace při teplotě 23 °C nedochází k výraznému ovlivnění degradační aktivity kmene *B. subtilis* 23 v prostředí o počátečním pH 5 či 8,5 (rozdíly ve vlivu pH jsou sta-

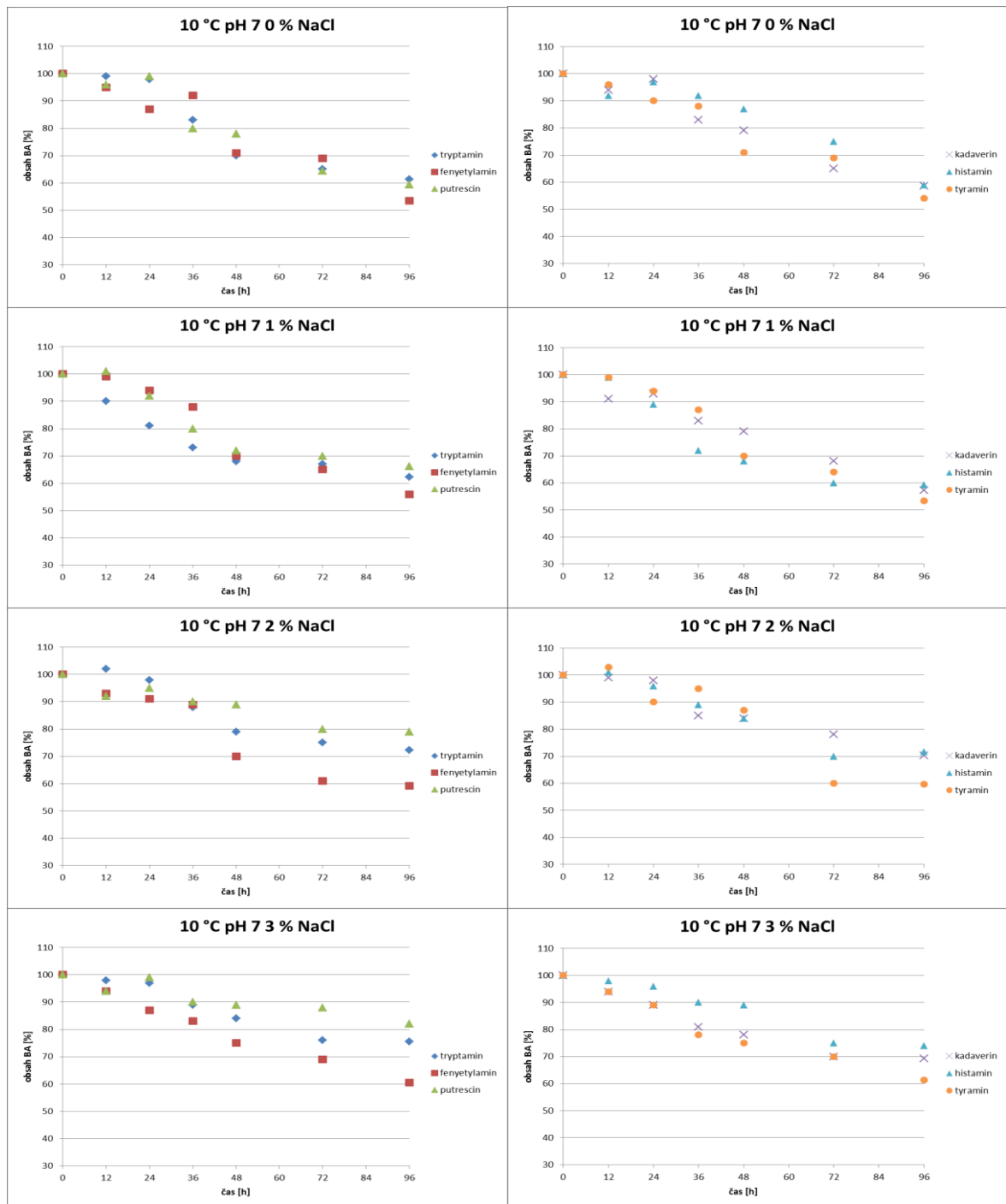
tisticky nevýznamné ($P \geq 0,05$)). Průběh degradace aminů při těchto hodnotách pH při 23 °C nalezneme v příloze 3 a 4.

6.1.3 Obsah biogenních aminů v médiu o pH 7 po kultivaci při teplotě 10 °C

Při teplotě 10 °C byla celková doba kultivace prodloužena až na 96 hodin (při 30 °C byla kultivace ukončena po 48 hodinách, při 23 °C po 72 hodinách). Průběh degradace bakterií *B. subtilis* 23 v závislosti na čase v prostředí minerálního média o pH 7 s různými přídávky NaCl je zaznamenán na Obr. 6. Odběry byly na začátku kultivace prováděny po 12 hodinách a poslední dva odběry byly provedeny s rozestupem 24 hodin. Při všech koncentracích NaCl se obsah aminů ve vzorcích snižuje lineárně v čase.

Ve vzorcích bez přídávky NaCl dochází k nejvyššímu stupni degradace u fenyletylaminu a tyraminu a to na 53 %. U kadaverinu a histaminu je zaznamenán pokles na 58 %, u putrescinu na 59 %. *B. subtilis* 23 nejméně degraduje tryptamin, jehož obsah klesá po 96 hodinách na 61 %, v porovnání s fenyletylaminem a tyraminem se jedná o rozdíl statisticky významný ($P \leq 0,05$), avšak mezi tryptaminem, kadaverinem, histaminem a putrescinem není rozdíl statisticky významný a *B. subtilis* 23 degraduje tyto aminy stejnou měrou.

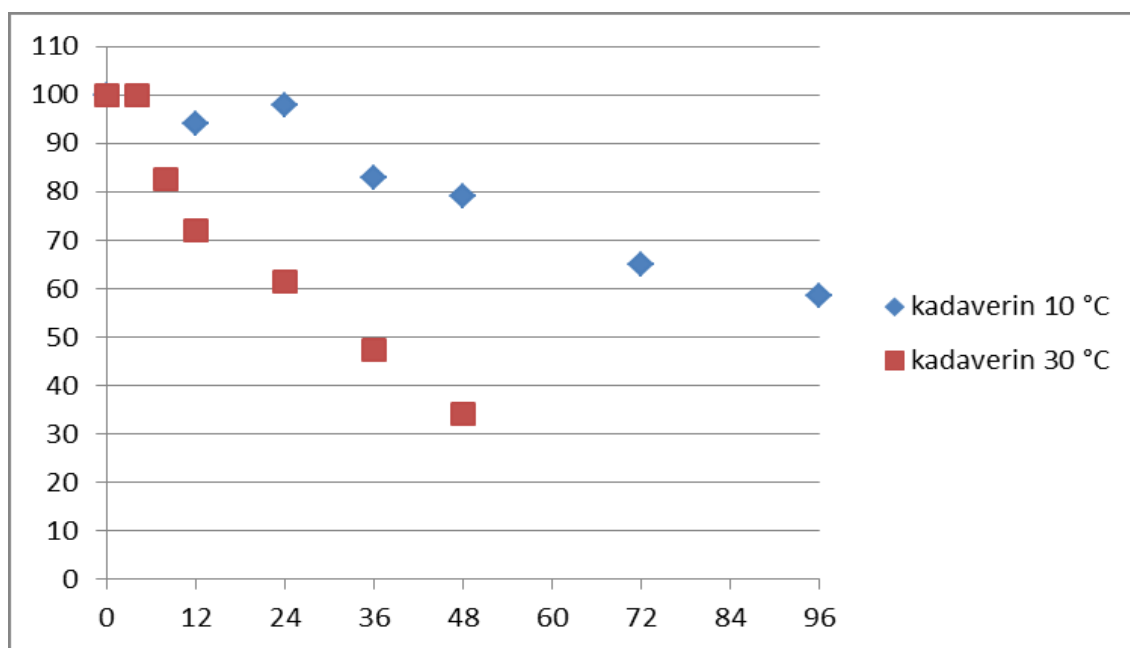
S dalšími přídávky chloridu sodného dochází k potlačení schopnosti degradovat aminy přítomné ve vzorku, přičemž čím více soli je v médiu přítomno tím méně bakterie *B. subtilis* 23 aminy degraduje (rozdíly statisticky významné, $P \leq 0,05$). V přítomnosti 3 % (w/v) NaCl se obsah putrescinu snižuje pouze o 18 % po 96 hodinové kultivaci. Naproti tomu například fenyletylamin je degradován až o 40 %, z toho vyplývá, že se obsah aminů na konci kultivace v prostředí se 3 % (w/v) NaCl pohybuje poměrně v širokém rozpětí.



Obr. 6 Degradace biogenních aminů bakterii *B. subtilis* 23 v minerálním médiu o pH 7 a koncentraci soli 0, 1, 2 a 3 % (w/v) při teplotě 10 °C

Různé hodnoty pH nemají ani při teplotě 10 °C vliv na schopnost degradace *B. subtilis* 23. Úroveň degradace dosahuje stejných výsledků při pH 5, 7 i 8,5 (rozdíly nejsou statisticky významné, $P \geq 0,05$). Průběh degradace aminů při pH 5 a 8,5 jsou k nahlédnutí v příloze 5 a 6.

Větší vliv na schopnost degradace než u počátečního pH kultivačního média je pozorován u teplot inkubace. Při 30 °C je schopnost degradace aminů nejvyšší a se snižující se teplotou klesá i schopnost bakterie degradovat biogenní aminy. Například při teplotě 30 °C klesá obsah kadaverinu po 48 hodinách kultivace na 34 % a při teplotě 10 °C klesá obsah kadaverinu po 48 hodinách na 80 % při stejném pH a koncentraci NaCl, kdy jsou tyto rozdíly statisticky významné ($P \leq 0,05$). Avšak prodloužením doby kultivace při nižších teplotách je taktéž dosaženo významného stupně degradace, kdy kadaverin degraduje na 58 % po 96 hodinách kultivace (Obr. 7).



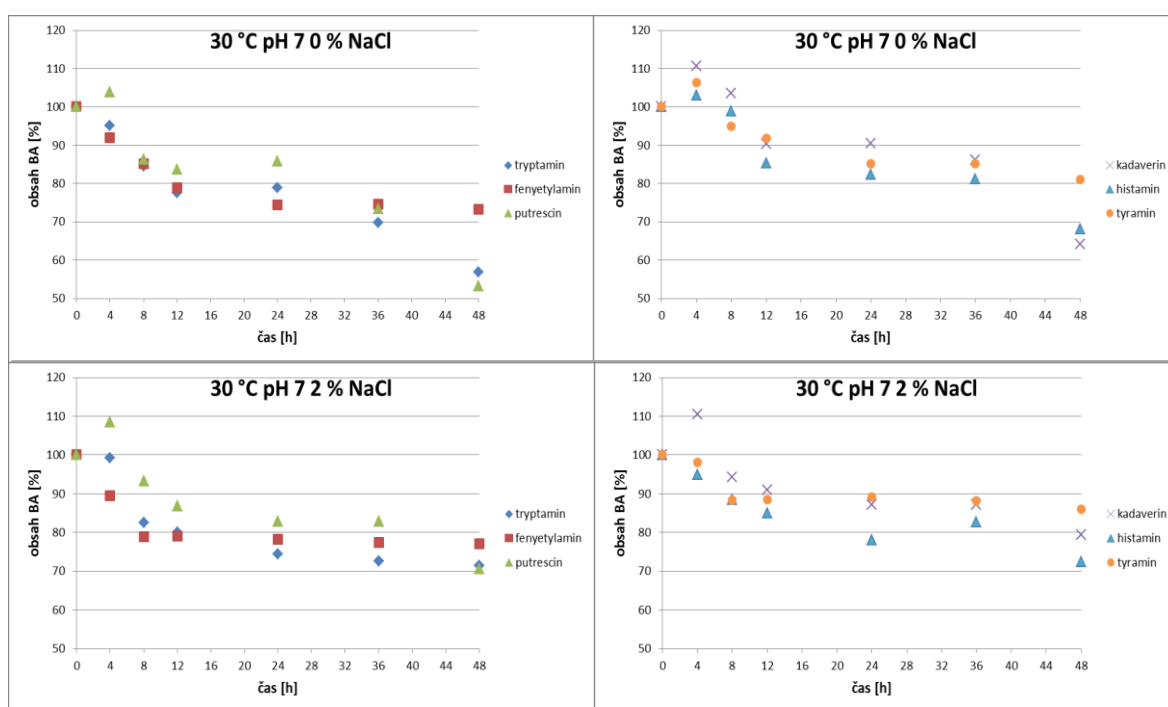
Obr. 7 Degradace kadaverinu bakterií *B. subtilis* 23 v minerálním médiu o pH 7 bez přídavku NaCl při teplotách 30 a 10 °C

6.2 Sledování vlivu vybraných faktorů na schopnost degradace biogenních aminů u *B. subtilis* 23 v médiu Nutrient broth

Schopnost degradace biogenních aminů bakterií *B. subtilis* 23 v závislosti na vybraných faktorech v Nutrient broth je znázorněna na obrázcích 8 – 10. Bakterie má v tomto médiu optimální podmínky k růstu, což se projevuje významným poklesem všech přítomných biogenních aminů. Nejvyšší pokles je pozorován při teplotě 30 °C bez přídavku chloridu sodného (Obr. 8) u putrescinu a tryptaminu, obsah těchto aminů se snižuje pozvolna a klesá téměř na polovinu po 48 hodinách kultivace. Obsah kadaverinu a histaminu klesá na

64 a 68 % ze své původní koncentrace a úbytek tyraminu činí pouze 20 % na konci kultivace.

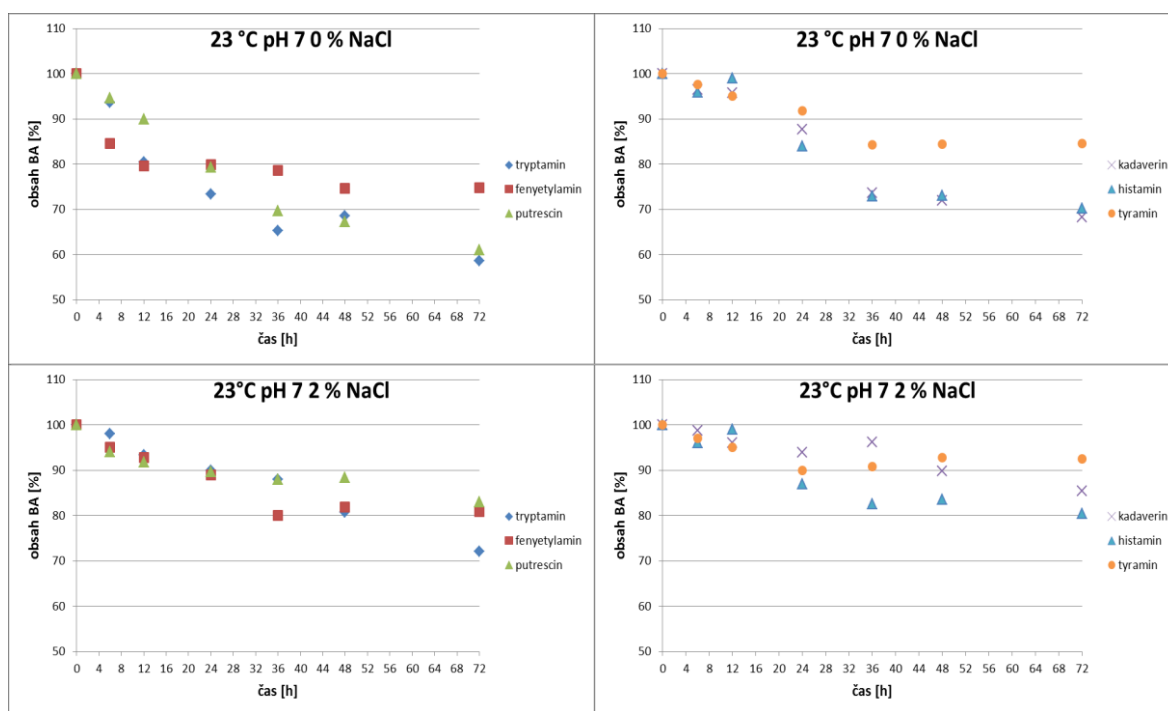
Po přidavku 2 % (w/v) NaCl do média dochází taktéž ke snížení obsahu aminů v médiu, avšak celkový úbytek není tak významný jako v případě média bez přidavku chloridu sodného. Žádný z biogenních aminů neklesá více jak o 30 % v prostředí 2% (w/v) přidavku NaCl. Rozdíl v úbytku biogenních aminů v médiu bez přidavku NaCl a s 2% (w/v) přidavkem NaCl je statisticky významný u tryptaminu, putrescinu a kadaverinu, u zbylých biogenních aminů je $P \geq 0,05$ a rozdíly tedy nejsou statisticky významné.



Obr. 8 Degradace biogenních aminů bakterií *B. subtilis* 23 v médiu Nutrient broth o pH 7 a koncentraci soli 0 a 2 % (w/v) při teplotě 30 °C

Procentuální úbytek biogenních aminů v médiu Nutrient broth po kultivaci *B. subtilis* 23 při teplotě 23 °C je znázorněn na Obr. 9. Obsah aminů v médiu bez přidavku soli se po 36. hodině od počátku kultivace pohybuje pod 70 % u putrescinu a tryptaminu, okolo 80 % u zbylých čtyř aminů. Dále obsah všech aminů velmi mírně klesá ještě zhruba o 10 %, kdy se konečná hodnota poklesu obsahu putrescinu a tryptaminu po 72 hodinách kultivace pohybuje okolo 60 %. Histamin a kadaverin jsou degradovány na 70 %.

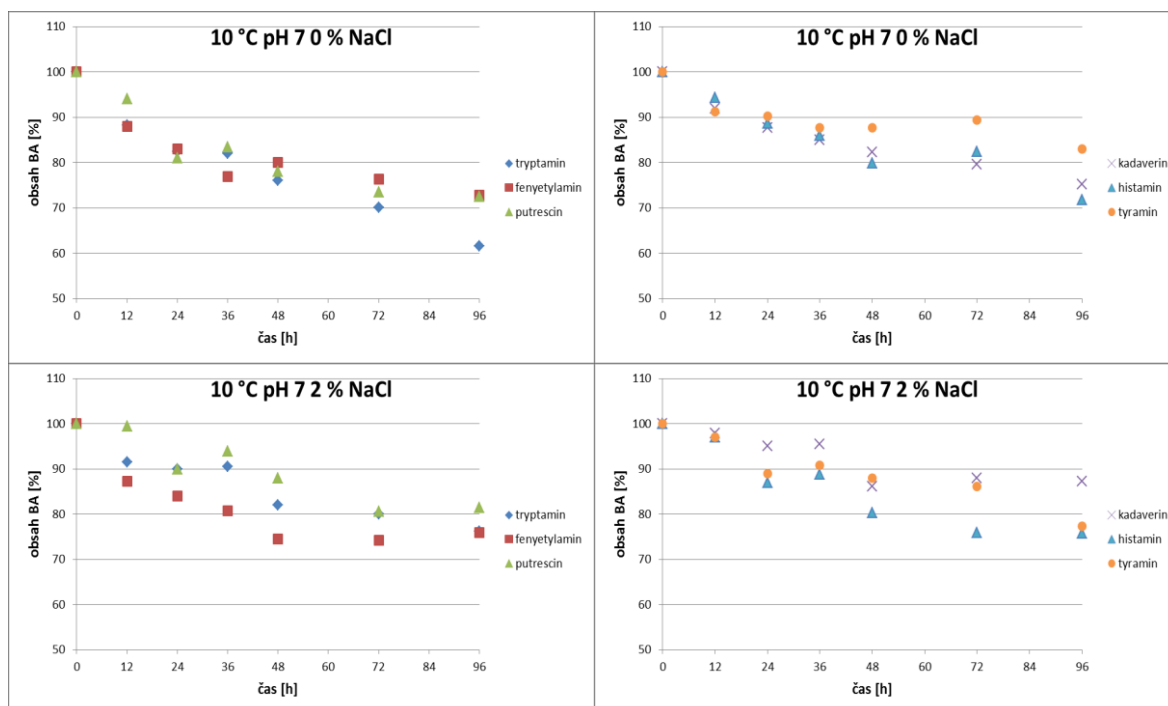
Přídavek 2 % (w/v) NaCl se opět projevuje zmírněním degradační aktivity testovaného kmene, kdy nejvíce klesá po 72 hodinové kultivaci obsah tryptaminu a to na 72 %. Tyramin poklesl pouze o necelých 10 % a u ostatních aminů činí pokles zhruba 20 % na konci kultivace.



Obr. 9 Degradace biogenních aminů bakterií *B. subtilis* 23 v médiu Nutrient broth o pH 7 a koncentraci soli 0 a 2 % (w/v) při teplotě 23 °C

Degradační aktivita *B. subtilis* 23 byla pozorována i během kultivace při 10 °C (Obr. 10) avšak délka inkubace nebyla 48 hodin jako při optimální teplotě (30 °C), ale byla prodloužena na 96 hodin. Obsah všech šesti aminů pozvolně klesá, přičemž nejvýznamnější pokles (o 39 %) je zaznamenán u tryptaminu, což je rozdíl statisticky významný v porovnání s poklesem ostatních aminů. Fenyletylamin, putrescín, kadaverin, histamin klesají o necelých 30 % a tyramin o 18 % po 96 hodinách.

Stejně jako u předchozích zjištění 2% (w/v) přídavek chloridu sodného způsobuje potlačení schopnosti degradovat vybrané biogenní aminy. Kromě kadaverinu se pokles aminů pohybuje okolo 20 % po 96 hodinách a samotný kadaverin klesá pouze o 13 %.



Obr. 10 Degradace biogenních aminů bakterií *B. subtilis* 23 v médiu Nutrient broth o pH 7 a koncentraci soli 0 a 2 % (w/v) při teplotě 10 °C

6.3 Sledování vlivu vybraných faktorů na schopnost degradace biogenních aminů u *B. pumilus* 26 v minerálním médiu

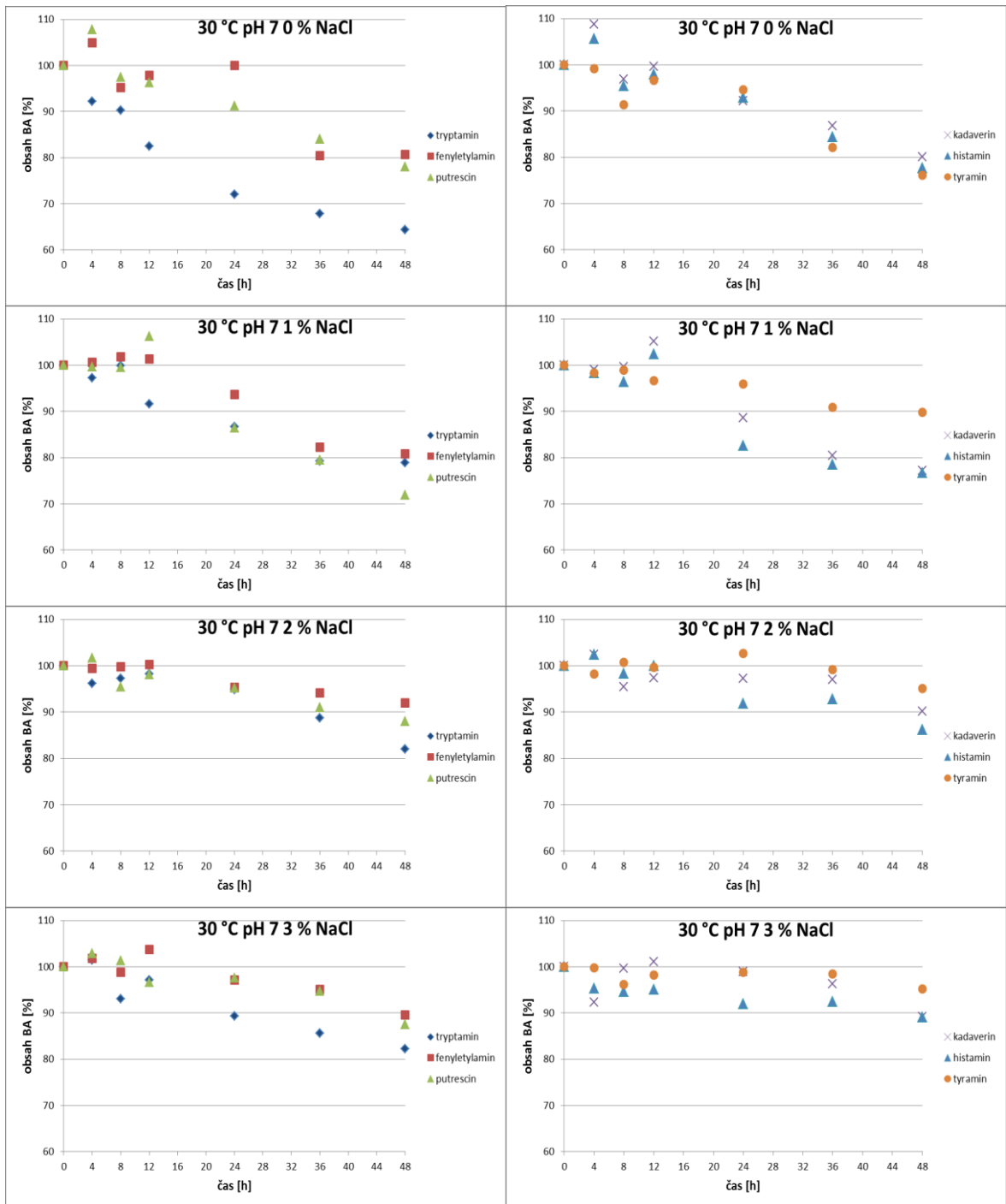
Schopnost degradace biogenních aminů bakterií *B. pumilus* 26 v minerálním médiu o pH 7 je zaznamenána pouze v podmínkách při teplotě 30 °C s různým přídatkem chloridu sodného (Obr. 11). Při ostatních kombinacích teplot, časů, pH a přídatků NaCl není zaznamenána degradační aktivita a obsah přítomných aminů v médiu se pohybuje okolo hodnoty 100 %.

Nejvyšší degradační aktivita *B. pumilus* 26 je pozorována v médiu o pH 7 při kultivační teplotě 30 °C bez přídatku NaCl (Obr. 11). V těchto podmínkách degraduje tryptamin až na 64 % po 48 hodinách, přičemž pokles obsahu tryptaminu v čase je lineární. Obsahy kadaverinu, histaminu, tyraminu, fenyletylaminu a putrescinu se až do 12. hodiny od zaočkování pohybují okolo hodnoty 100 % a od tohoto okamžiku klesají významněji pod hladinu 80 % (kadaverin 80 %, histamin 77 %, tyramin 76 %, fenyletylamin 80 %, putrescin 78 %, kdy rozdíly mezi těmito biogenními aminy nejsou statisticky významné ($P \geq 0,05$)).

Jednoprocentním přidavkem NaCl je zásadněji ovlivněna degradace u tryptaminu (obsah klesl na 78 %, v médiu se tak vyskytuje o 14 % více tryptaminu v porovnání s variantou bez přidavku NaCl, což je rozdíl statisticky významný ($P \leq 0,05$)) a tyraminu, který degraduje na 89 % (rozdíl v degradaci oproti médiu bez přidavku NaCl činí 13 %, kdy opět $P \leq 0,05$ a jedná se tedy o rozdíl významný z pohledu statistiky). Obsah zbývajících 4 aminů je přibližně stejný ve srovnání s médiem bez přidavku soli.

Rozdíl mezi 2% a 3% (w/v) přidavkem soli do média není téměř žádný, je to na první pohled patrné z *Obr. 11*, kdy je průběh těchto grafů téměř totožný. Výsledky ze statistického vyhodnocení také nepotvrzují statisticky významný rozdíl v těchto hodnotách ($P \geq 0,05$).

V prostředí se 3 % (w/v) chloridu sodného je schopnost degradace *B. pumilus* 26 utlumena, v porovnání s variantou bez přidavku NaCl je v průměru o 13 % nižší u všech biogenních aminů, což je rozdíl statisticky významný. Většina aminů degraduje zhruba na 90 % po 48 hodinách, pouze tryptamin klesá až na 82 % (nejedná se ale o statisticky významný rozdíl mezi poklesem obsahu tryptaminu a ostatních biogenních aminů).



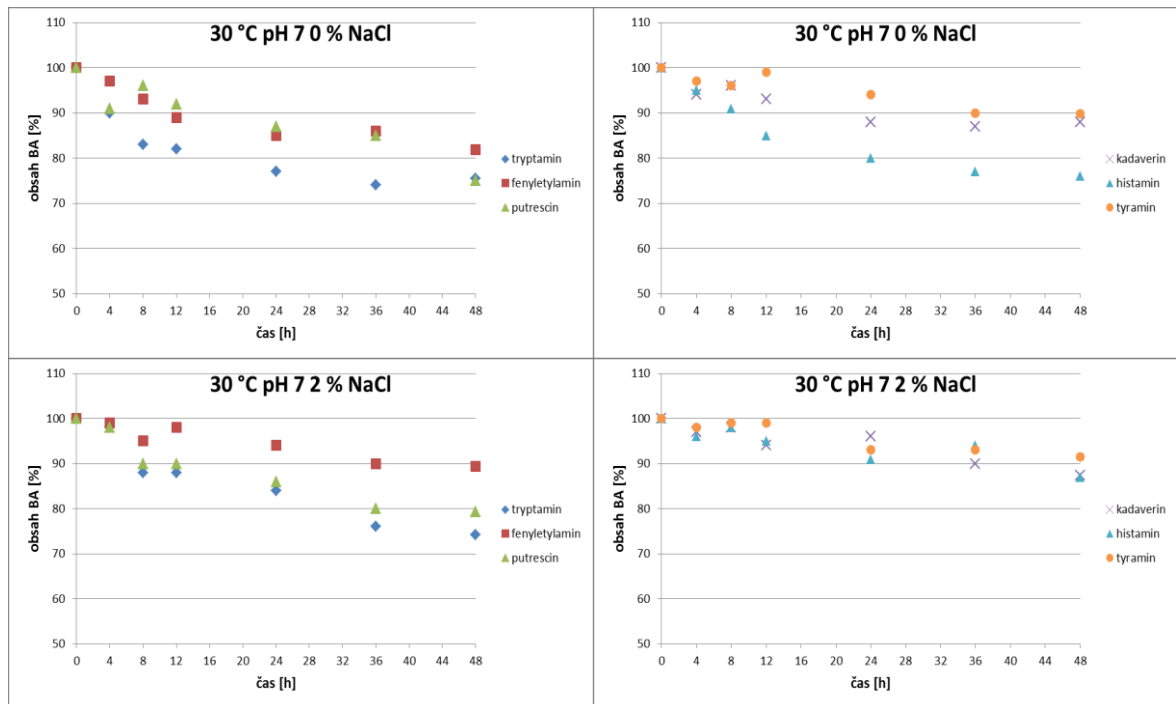
Obr. 11 Degradace biogenních aminů bakterií *B. pumilus* 26 v minerálním médiu o pH 7 a koncentraci soli 0, 1, 2 a 3 % (w/v) při teplotě 30 °C

6.4 Sledování vlivu vybraných faktorů na schopnost degradace biogenních aminů u *B. pumilus* 26 v médiu Nutrient broth

Schopnost degradace biogenních aminů u bakterie *B. pumilus* 26 v závislosti na vybraných faktorech v médiu Nutrient broth je znázorněna na obrázcích 12 – 14. Největší pokles obsahu aminů je pozorován při podmínkách optimálních pro růst této bakterie (30 °C bez přídavku soli).

Degradační aktivita při teplotě 30 °C je znázorněna na *Obr. 12*. V podmínkách bez přídavku NaCl je zjištěn klesající trend v obsahu u všech biogenních aminů, kdy nejvíce klesá obsah tryptaminu spolu s putrescinem, a to na 75 % a obsah histaminu na 76 % původního množství po 48 hodinách inkubace. Fenyletylamin klesá na hodnotu 81 %, u kadaverinu a tyraminu je zjištěn pokles pod 90 % na konci kultivace.

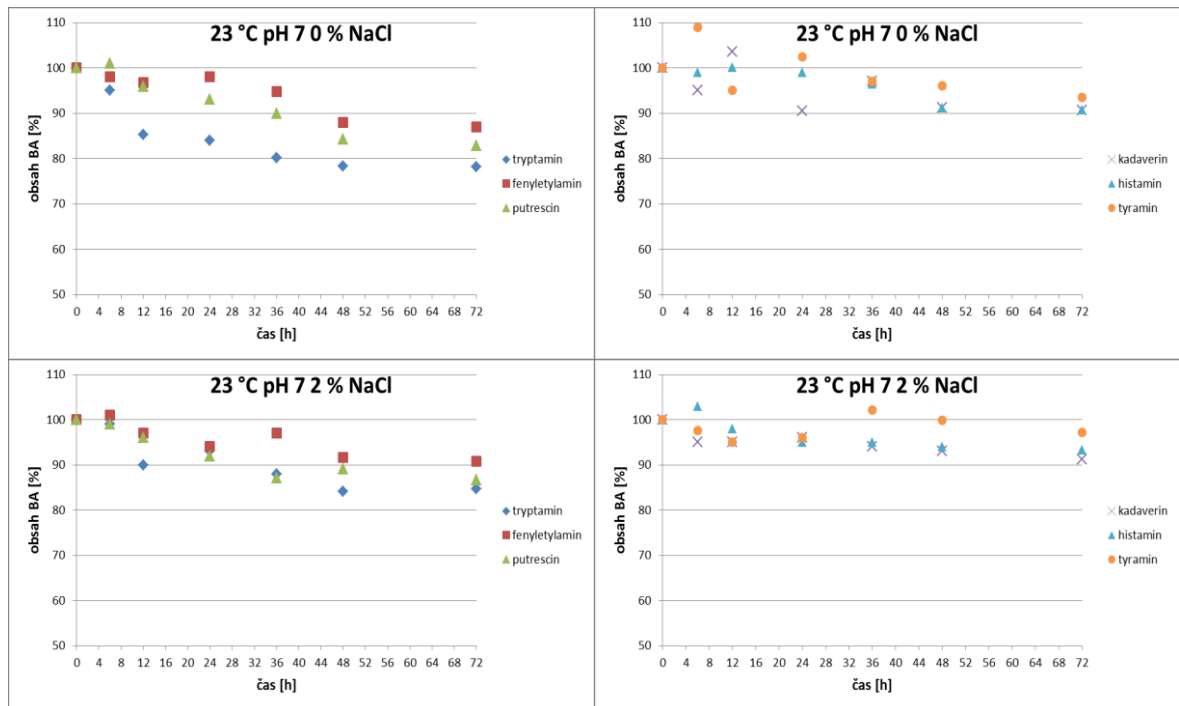
Dvouprocentní přídavek soli se nejvíce projevuje u histaminu, u něhož byl původně (bez přídavku soli) zaznamenán pokles o 24 % a po přídavku soli o pouhých 14 %, jedná se o rozdíl statisticky významný ($P \leq 0,05$). U ostatních aminů dochází, po přidání 2 % (w/v) soli do média, také ke snížení schopnosti degradace a to v průměru o 3 % (nejedná se ale o statisticky významný rozdíl mezi schopností degradace tryptaminu, fenyletyelaminu, putrescinu, kadaverinu, tyraminu bakterií *B. pumilus* 26 v médiu bez přídavku NaCl a s 2% (w/v) přídavkem).



Obr. 12 Degradace biogenních aminů bakterií *B. pumilus* 26 v médiu Nutrient broth o pH 7 a koncentraci soli 0 a 2 % (w/v) při teplotě 30 °C

Úbytek obsahu biogenních aminů v médiu Nutrient broth pomocí *B. pumilus* 26 během inkubace při teplotě 23 °C je zachycen na Obr. 13. Obecně lze říci, že pokles všech aminů při této teplotě se pohybuje v rozmezí 5 až 20 % po 72 hodinách. Nejvíce klesá tryptamin a to o 22 %.

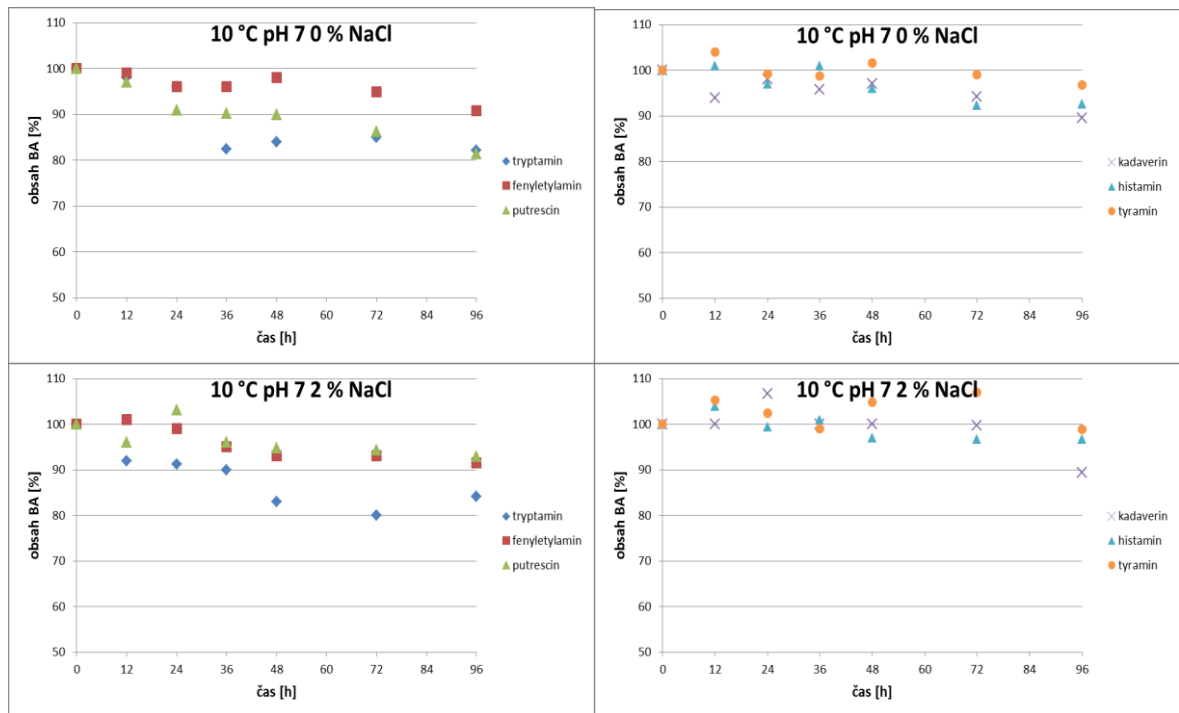
Dvouprocentní přídavek soli způsobuje mírné snížení degradační aktivity, kdy rozdíl ve schopnosti degradace aminů kmenem *B. pumilus* 26 není statisticky významný ($P \geq 0,05$) v porovnání s médiem bez přídavku NaCl.



Obr. 13 Degradace biogenních aminů bakterií *B. pumilus* 26 v médiu Nutrient broth o pH 7 a koncentraci soli 0 a 2 % (w/v) při teplotě 23 °C

Při teplotě 10 °C (Obr. 14) je degradační aktivita *B. pumilus* 26 poměrně nízká, bez přídavku soli klesá obsah tryptaminu a putrescinu nad 80 % po 96 hodinách. Obsah kadaverinu, histaminu a fenyletylaminu se pohybuje okolo 90 %. U tyraminu se neprojevil téměř žádný pokles po ukončení kultivace.

Dvouprocentní přídavek NaCl do média nemá velký vliv na schopnost degradace *B. pumilus* 26, protože v porovnání s médiem bez přídavku NaCl mezi nimi nejsou statisticky významné rozdíly ($P \geq 0,05$).



Obr. 14 Degradace biogenních aminů bakterií *B. pumilus* 26 v médiu Nutrient broth o pH 7 a koncentraci soli 0 a 2 % (w/v) při teplotě 10 °C

6.5 Souhrnná diskuse

V dnešní době se tématem toxicity biogenních aminů zabývá mnoho studií a stále více je usilováno o opětovné stanovení limitů přítomnosti aminů v potravinách legislativními předpisy. Avšak stanovit tyto kritické meze je velmi obtížné, protože reakce člověka na biogenní aminy je silně individuální. Existují jedinci, kteří mnohem citlivěji vnímají přítomnost aminů v potravinách a trpí bolestmi hlavy, pocity zvracení, kolísáním krevního tlaku či dalšími příznaky otravy, způsobené konzumací potravin obsahující nadměrné množství biogenních aminů. Velmi významnou roli v tom, jaké množství biogenních aminů bude obsahovat konečný výrobek, hraje mikrobiální čistota použitých surovin, a proto jsou také důležité procesy, jako je pasterace, sterilace, ozařování, čištění, zkrátka procesy vedoucí ke snížení celkového počtu mikroorganismů v surovině, protože čím více tyto počty snížíme, tím menší je pravděpodobnost výskytu mikroorganismů s dekarboxylasovou aktivitou, které jsou odpovědné za vznik aminů (Emborg a Dalgaard, 2008; Mbarki et al., 2008). Metody aplikace mikroorganismů s aminosidasovou aktivitou do potravin při procesu jejich výroby mají limitující omezení, zejména při použití v potravinách s nevhodnými podmínkami pro růst těchto organismů. Například vysoké teploty či koncentrace soli mohou zabraňovat růstu těchto mikroorganismů a tím i bránit jejich schopnosti degradovat biogenní aminy (Tapingkae et al., 2010). Z tohoto důvodu je tedy nutné nejdříve popsat chování mikroorganismů v přítomnosti různých faktorů *in vitro* před jejich samotnou aplikací do potravin, což bylo hlavním cílem této práce.

V průběhu experimentu bylo potvrzeno, že bakterie *B. subtilis* 23 a *B. pumilus* 26 degradují biogenní aminy. Avšak schopnost degradace byla u *B. subtilis* 23 v průměru asi 2x vyšší než u *B. pumilus* 26 za stejných podmínek (30 °C, pH 7, 0 % NaCl), kdy *B. subtilis* 23 degraduje histamin o 55 %, tyramin o 60 %, tryptamin o 52 % a *B. pumilus* 26 za stejných podmínek degraduje histamin o 23 %, tyramin o 24 %, tryptamin o 36 % za 48 hodin. Dapkevicius et al. (2000) testovali schopnost degradace histaminu různými kmeny *Lactobacillus sakei*, kdy nejvíce degradovaly histamin kmeny *Lb. sakei* 15.18 a *Lb. sakei* 15.35, které zapříčinily pokles obsahu histaminu o necelých 60 % po 24 hodinové kultivaci při teplotě 30 °C. *B. subtilis* 23, jež byl sledován v této diplomové práci, degradoval histamin po 24 hodinách o 41 % při 30 °C, nedosáhl takového stupně degradace jako *Lb. sakei* a histamin degradoval o 20 % méně. Eom et al. (2015) testovali schopnost degradace *B. sub-*

tilis HJ0-6, kdy tento kmen snižoval obsah histaminu v médiu (obohaceném histaminem) o 48 % po 24 hodinách kultivace při 30 °C. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky, prezentovanými v této práci.

Jedním z cílů práce bylo zjistit, zda existuje statisticky významný rozdíl v degradaci vybraných biogenních aminů v prostředí minerálního média, jenž obsahuje jako jediný zdroj uhlíku a dusíku biogenní aminy a média Nutrient broth, které nabízí širší škálu zdrojů uhlíku a dusíku, jenž může mikroorganismus využít ke svému růstu a množení. Nutrient broth se kromě biogenních aminů dále skládá z glukosy, peptonu, kvasničného extraktu, jeho složení se tak více přibližuje vzorku potravin. Teoreticky tak bylo předpokládáno, že aby bakterie v minerálním médiu rostla, musí využít přítomné aminy, a tudíž bude v tomto prostředí degradovat biogenní aminy mnohem více než v médiu Nutrient broth. Získané výsledky ukazují, že schopnost degradace *B. subtilis* 23 je v minerálním médiu vyšší (obsah všech aminů klesl průměrně o 60 %), avšak degradace aminů v médiu Nutrient broth byla také významná a obsah všech přítomných aminů se snížil v průměru o 36 %. *B. subtilis* 23 má tedy dobrý potenciál pro použití v potravinářství avšak jeho přímé použití při výrobě potravin je nutné otestovat.

Druhý z testovaných kmenů *B. pumilus* 26, byl schopen degradace aminů v minerálním médiu pouze během inkubace při teplotě 30 °C a pH 7 při koncentraci NaCl 0 – 3 % (w/v). U ostatních variant minerálního média a podmínek kultivace se obsah všech aminů pohyboval okolo 100 % na konci experimentu. Oproti tomu v médiu Nutrient broth byl zaznamenán úbytek aminů při všech kombinacích teplot a koncentrací NaCl, kdy ze získaných výsledků vyplynulo, že schopnost degradace v médiu Nutrient broth závisí na přidávku soli do média i na teplotě, avšak schopnost degradace nebyla v žádném z případů utlumena úplně. Proto by se dalo očekávat, že bude *B. pumilus* 26 degradovat aminy i v každé variantě minerálního média, což se nepotvrdilo. Bylo by tedy vhodné experiment opakovat pro potvrzení těchto výsledků.

Různé hodnoty pH schopnost degradace aminů kmenem *B. subtilis* 23 příliš neovlivňovaly. Například obsah histaminu po 48 hodinové kultivaci při 30 °C klesl na 48 % (pH 8,5) na 45 % (pH 7), na 47 % (pH 5) v minerálním médiu bez přidávku NaCl. Obsah kadaverinu klesl po 96 hodinové kultivaci při teplotě 10 °C na 61 % (pH 8,5), na 58 % (pH 7) a 62 % (pH 5) v minerálním médiu bez přidávku NaCl. To, že pH nebude mít příliš velký vliv na degradační aktivitu testovaných organismů, se dalo očekávat, protože samotný růst

bakterií rodu *Bacillus* není hodnotou pH (v testovaném rozsahu) příliš ovlivněn a roste ve velmi širokém rozmezí pH (Bednář, 1996). Ke stejným výsledkům dospěla ve své práci i Vítková (2016), která mimo jiné sledovala vliv pH na schopnost degradace u *B. subtilis*, i její výsledky naznačují minimální vliv pH na degradační aktivitu této bakterie.

Větší vliv na schopnost degradace vybraných biogenních aminů byl pozorován u teplot. Při 30 °C byla schopnost degradace nejvyšší a se snižující se teplotou klesala i schopnost bakterií (*B. subtilis* 23 i *B. pumilus* 26) degradovat biogenní aminy, porovnáváme-li vzorky odebrané ve stejném čase. Například při teplotě 30 °C klesá obsah putrescinu po 48 hodinách kultivace o 66 %. Při teplotě 10 °C klesá obsah putrescinu jinak za stejných podmínek po 48 hodinách o 22 %. Při nízkých teplotách dochází ke zpomalení metabolismu bakterií, tudíž se značně prodlužuje i jejich generační doba a růst (Lund a Hunter, 2008). S tím souvisí i pomalejší úbytek aminů z média. Proto byla poslední doba odběru při teplotě 10 °C prodloužena na 96 h a za tuto dobu klesá obsah putrescinu o 41 %. Tyto výsledky jsou pozitivní hlavně pro průmyslovou výrobu sýrů. Sýry jsou významným zdrojem biogenních aminů, především dlouze zrající, přičemž teplota zrání závisí na konkrétním typu sýra, ale většinou probíhá při teplotách blízkých 10 °C (např. sýry eidamského typu zrají při teplotě 6 – 12 °C). Při zrání pochodech dochází ke štěpení bílkovin až na volné aminokyseliny, které jsou přítomnými mikroorganismy s dekarboxylasovou aktivitou převedeny na biogenní aminy principem dekarboxylace. V sýru může být obsaženo až 1000 mg/kg aminů (Joosten a Nunes, 1996). Tento problém by mohl vyřešit přidavek kultury se schopností degradace aminů. Přidaná kultura by měla mít předpoklad k přežití výrobního procesu a v období, kdy sýr zraje při nízké teplotě, by se podílela na snižování obsahu aminů po celou dobu zrání (Joosten a Nunes, 1996).

Leuschner a Hammes (1998) testovali schopnost degradace histaminu a tyraminu různých kmenů *Brevibacterium linens*, jež se používá jako mazová kultura při výrobě sýrů s mazem na povrchu. Během čtyřtýdenního zrání došlo ke snížení obsahu histaminu o 55 % a tyraminu o 70 % v sýru. Nejvyšší schopnost degradace histaminu a tyraminu v sýru byla zaznamenána kmenem LTH 3686 a LTH 456, nejprve byly tyto bakterie testovány pro svou schopnost degradace v prostředí neutrálního pufru a následně v sýru obohaceném o biogenní aminy. V pufru klesl obsah histaminu i tyraminu vlivem LTH 456 na 31 % po 28 hodinách. *B. subtilis* 23, který byl použit při experimentu v této práci, snížil při stejných

podmínkách (pH 7, 30 °C) obsah tyraminu na 55 % a obsah histaminu na 59 % po 24 hodinách. *B. linens* tedy degraduje histamin a tyramin rychleji než *B. subtilis* 23.

Součástí experimentu bylo také sledovat vliv přídavku NaCl v médiu na schopnost degradace biogenních aminů. Chlorid sodný je součástí téměř každé potraviny, větší množství této látky nalezneme v sýrech, ale i ve fermentovaných mastných výrobcích. Běžně tyto výrobky obsahují 2 – 3 % NaCl (Marth a Steele, 2001). Obsah chloridu sodného ovlivňuje schopnost degradace aminů testovanými kmeny významně. S každým přídavkem soli byla degradační aktivita více utlumena. Nejvíce degradovaly testované mikroorganismy přítomné biogenní aminy v médiu bez přídavku NaCl a nejméně v přítomnosti 3 % (w/v) NaCl. I přesto byla schopnost degradace poměrně vysoká, například při 30 °C s přídavkem NaCl 3 % (w/v) degraduje *B. subtilis* 23 tryptamin o 39 %, fenyletylamin o 48 %, putrescin o 30 %, kadaverin o 40 %, histamin o 41 % a tyramin o 48 %, v průměru tedy celkový obsah aminů ve vzorku klesá o 41 %. Ve vzorku bez přídavku NaCl jinak za stejných podmínek klesá průměrný obsah všech aminů o 60 %.

Existují potraviny, které se nakládají do vysoce koncentrovaných solných roztoků. Jedná se například o balkánský sýr, který může obsahovat až 7 % soli, popřípadě různé solené rybí výrobky. Mah a Hwang (2009) sledovali úbytek biogenních aminů pomocí *Staphylococcus xylosus* při výrobě solených fermentovaných ančoviček. Ančovičky byly nasoleny na 15 % obsahu NaCl a ponechány při teplotě 25 °C po dobu 10 týdnů. Celá šarže byla rozdělena na 2 poloviny, kdy jedna byla zaočkována *S. xylosus* se schopností degradovat histamin a druhá byla ponechána bez zaočkování jako kontrola. *S. xylosus* snížil celkový obsah biogenních aminů ve vzorku fermentovaných ančoviček o 16 % oproti vzorku kontrolnímu. Zajímavým zjištěním bylo, že *S. xylosus* navíc inhibuje růst dekarboxylasa pozitivní bakterie *Bacillus licheniformis*. Objevení schopnosti degradovat aminy pomocí *S. xylosus* při vysokých koncentracích NaCl může být pro potravinářský průmysl přínosem, protože při takto vysoké koncentraci NaCl je potlačen růst velkého množství mikroorganismů a velmi těžko se hledají zástupci, kteří jsou navíc schopni degradace biogenních aminů. V této diplomové práci byla zvolena nejvyšší koncentrace přídavku chloridu sodného 3 % (w/v), při níž byla schopnost degradace všech přítomných aminů silně potlačena.

Lee et al. (2015) ve své práci popisovali obdobný experiment, jako byl proveden v této diplomové práci, a sice sledovali vliv pH v rozsahu hodnot 2 – 11, koncentrace NaCl 0,5 – 20 % a vliv teploty na schopnost degradace histaminu bakterií *Bacillus polymyxa*.

Nejprve byla zjištěna nejvhodnější teplota kultivace, čili teplota při níž *B. polymyxa* degraduje histamin nejvíce, což bylo 30 °C. Dále byl sledován vliv pH na degradaci histaminu touto bakterií, kdy byla připravena média s upraveným pH na hodnoty 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. Při pH 2 a 11 byl růst *B. polymyxa* kompletně inhibován, při pH 7 bylo dosaženo nejvyššího stupně degradace, avšak při pH 5, 6, 8, 9 byla schopnost degradace histaminu pouze o 18 % menší (Lee et al., 2015). V této diplomové práci nebyl prokázán vliv pH na schopnost degradace biogenních aminů *B. subtilis* 23, bylo pracováno s jinou bakterií, tudíž se výsledky mohou lišit. Vliv koncentrace NaCl byl sledován v mediích s hodnotou pH 7 obohacených o 0,5 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 % NaCl. Inkubace trvala 24 hodin při teplotě 30 °C. Lee et al. (2015) zjistili, že s rostoucí koncentrací NaCl klesá schopnost degradace histaminu pomocí *B. polymyxa*, stejných závěrů bylo dosaženo i v této diplomové práci.

ZÁVĚR

V této diplomové práci byl sledován vliv vybraných faktorů na schopnost degradace šesti biogenních aminů dvou mikroorganismů, *Bacillus subtilis* 23 a *B. pumilus* 26 v podmínkách *in vitro*. Sledované faktory byly teplota (10, 23, 30 °C), koncentrace NaCl (0, 1, 2, 3 % (w/v)), pH (5,0; 7,0; 8,5), médium (minerální, Nutrient broth).

Bylo zjištěno, že kmen *B. subtilis* 23 má vyšší schopnost degradovat vybrané biogenní aminy než kmen *B. pumilus* 26.

Ze všech sledovaných faktorů nejvíce ovlivňovala schopnost degradovat aminy obou testovaných kmenů teplota, kdy při teplotě kultivace 30 °C byla zaznamenána vždy nejvyšší degradační aktivita a při teplotě kultivace 10 °C byla schopnost degradace vybraných aminů nejvíce potlačena.

Vliv koncentrace chloridu sodného na schopnost degradace testovaných biogenních aminů byl opět u obou bakterií stejný. Se zvyšujícím se přídatkem NaCl se schopnost degradace aminů přítomných v médiu snižovala.

Vliv iniciační hodnoty pH se nepodařilo prokázat u žádného z kmenů a schopnost degradace biogenních aminů byla při všech testovaných pH obdobná za jinak stejných podmínek.

Bylo předpokládáno, že vybrané kmeny budou degradovat biogenní aminy v médiu Nutrient broth minimálně. Ze získaných výsledků vyplývá, že oba testované kmeny degradují biogenní aminy v minerálním médiu více než v médiu Nutrient broth, avšak schopnost degradace v Nutrient broth byla také významná.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

BEDNÁŘ, M., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil. ISBN 8023802976.

BENKERROUM, N., 2016. Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. **15**(4), 801-826 [cit. 2017-02-23]. DOI: 10.1111/1541-4337.12212. ISSN 15414337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12212>

BERLIN, I. a R. M. ANTHENELLI, 2001. Monoamine oxidases and tobacco smoking. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* [online]. **4**(01), - [cit. 2017-02-27]. DOI: 10.1017/S1461145701002188. ISSN 14611457. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ijnp/article-lookup/doi/10.1017/S1461145701002188>

CUEVA, C. et al., 2012. Degradation of biogenic amines by vineyard ecosystem fungi. Potential use in winemaking. *Journal of Applied Microbiology* [online]. **112**(4), 672-682 [cit. 2017-02-27]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05243.x. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2012.05243.x>

CUNHA, S. C. et al., 2017. Biogenic amines in liqueurs: Influence of processing and composition. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. (56), 147-155 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157516302150>

DAPKEVICIUS, M. L. N. et al., 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **57**, 107-114 [cit. 2017-02-27].

DUELO, R. C. a R. J. J. DUELO, 2012. Composition comprising diamine oxidase for the prevention of hangover symptoms [online]. [cit. 2017-02-22]. Dostupné z: <https://www.google.com/patents/WO2012127391A1?cl=en>

EMBORG, J. a P. DALGAARD, 2008. Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation by *Morganella psychrotolerans*. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **128**(2), 226-233 [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.016. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160508004789>

EOM, J. S. et al., 2015. Biogenic Amine Degradation by Bacillus Species Isolated from Traditional Fermented Soybean Food and Detection of Decarboxylase-Related Genes. *J. Microbiol. Biotechnol* [online]. **25**(9), 159 - 1527 [cit. 2017-02-28]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1506.06006>

FLASAROVÁ, R. et al., 2016. Biogenic amine production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains in the model system of Dutch-type cheese. *Food Chemistry* [online]. **194**, 68-75 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615010900>

GAŠ, B., 2001. Kapilární elektroforéza: Separační analytická metoda pro věk mikročipů. *Vesmír* [online]. **80**, 370-373 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: <http://www.cts.cuni.cz/vesmir>

GRAY, E. J. et al., 2006. Proteomic analysis of the bacteriocin thuricin 17 produced by *Bacillus thuringiensis* NEB17. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **255**(1), 27-32 [cit. 2017-02-28]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2005.00054.x. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2005.00054.x>

HE, L. et al., 2017. Simultaneous determination of aliphatic, aromatic and heterocyclic biogenic amines without derivatization by capillary electrophoresis and application in beer analysis. *Journal of Chromatography A* [online]. **1482**, 109-114 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967316317198>

HERNÁNDEZ-BORGES, J. et al., 2007. Nano-liquid chromatography analysis of dansylated biogenic amines in wines". *Journal of Chromatography A*, 1147, 192-199. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/6454119_Nano-liquid_chromatography_analysis_of_dansylated_biogenic_amines_in_wines

HERRERO, A. et al., 2016. A new multiresponse optimization approach in combination with a D-Optimal experimental design for the determination of biogenic amines in fish by HPLC-FLD. *Analytica Chimica Acta* [online]. 945, 31-38 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267016311618>

IGNATENKO, N. A. et al., 2006. Dietary Putrescine Reduces the Intestinal Anticarcinogenic Activity of Sulindac in a Murine Model of Familial Adenomatous Polyposis. *Nutrition and Cancer* [online]. **56**(2), 172-181 [cit. 2017-02-20].

JOOSTEN, H. M. a M. NUNEZ, 1996. Prevention of Histamine Formation in Cheese by Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* [online]. **62**(4), 1178-1181 [cit. 2017-04-10].

KIM, Y. S. et al., 2005. Effects of gamma irradiation on the biogenic amines in pepperoni with different packaging conditions. *Food Chemistry* [online]. **89**(2), 199-205 [cit. 2017-02-27]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.02.026. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814604001918>

KIM, Y. S. et al., 2012. Isolation of Biogenic Amines-Degrading Strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* from Traditionally Fermented Soybean Products. *Korean Journal of Microbiology* [online]. **48**(3), 220 - 224 [cit. 2017-02-28]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.7845/kjm.2012.042>

KOŠMERL, T. et al., 2013. Biogenic amines in red wine: The impact of technological processing of grape and wine. *Acta Agriculturae Slovenica* [online]. **2**(101), 249-261 [cit. 2017-02-20]. DOI: 10.2478/acas-2013-0021. ISBN 10.2478/acas-2013-0021. Dostupné z: <http://aas.bf.uni-lj.si/september2013/09Košmerl.pdf>

MAH, J - H. a H. - J. HWANG, 2009. Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. *Food Control* [online]. **20**(9), 796-801 [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.10.005. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713508002843>

MAMMANO, A. a L. ROSINO, 1968. The spectrum 1966-67 of the peculiar object MH alfa 328-116 (*V 1016 CYG*): note II. Firenze: Tipografia Raccini & Chiappi. Memorie della Societa astronomica Italiana, vol. 39, fasc. 3.

MORENO-ARRIBAS, M. V a M. C. POLO, 2009. Amino acids and biogenic amines. *Wine Chemistry and Biochemistry* [online]. s. 163-189 [cit. 2017-02-22]. ISBN 9780387741161. Dostupné z: <https://vinumvine.files.wordpress.com/2012/02/m-victoria-moreno-arribas-m-carmen-polo-wine-chemistry-and-biochemistry.pdf>

MARTH, E. H. aj. L. STEELE, 2001. *Applied dairy microbiology*. 2nd ed., rev. and expanded. New York: M. Dekker. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 110. ISBN 082470536x.

LARANJO, M. et al., 2017. Impact of salt reduction on biogenic amines, fatty acids, microbiota, texture and sensory profile in traditional blood dry-cured sausages. *Food Chemistry* [online]. 218, 129-136 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881461631439X>

LEUSCHNER, R. G. K. a W. P. HAMMES, 1998 Degradation of Histamine and Tyramine by *Brevibacterium linens* during Surface Ripening of Munster Cheese. *Journal of Food Protection* [online]. 61(7), 874-878 [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9678172>

LINARES et al., 2011. Biogenic Amines in Dairy Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 51(7), 691-703 [cit. 2017-02-27]. DOI: 10.1080/10408398.2011.582813. ISSN 10408398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2011.582813>

LOIZZO, M. R. et al., 2016. Influence of packaging conditions on biogenic amines and fatty acids evolution during 15 months storage of a typical spreadable salami ('Nduja). *Food Chemistry* [online]. 213, 115-122 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814616309542>

LORENZO, J. M. et al., 2010. Production of biogenic amines "in vitro" in relation to the growth phase by Enterobacteriaceae species isolated from traditional sausages. *Meat Science* [online]. 86(3), 684-691 [cit. 2017-02-20]. DOI: 10.1016/j.meatsci.2010.06.005. ISSN 03091740. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174010002342>

LOUKOU, Z. a A. ZOTOU, 2003. Determination of biogenic amines as dansyl derivatives in alcoholic beverages by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection and characterization of the dansylated amines by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, 996, 103-113. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/12830912/>

LUND, B. M. et al., 2000. *The microbiological safety and quality of food*. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers. ISBN 0834213230.

LUND, B. M. a P. R. HUNTER, 2008. *The microbiological safety of food in healthcare settings*. Ames, Iowa: Blackwell Pub. ISBN 9781405122207.

MALE, K. B. a J. H. T. LUONG, 2001. Derivatization, stabilization and detection of biogenic amines by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis–laser-induced fluorescence detection”. *Journal of Chromatography A*, 926, 309-317. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11556335>

MBARKI, R. et al., 2008. Influence of Gamma Irradiation on Microbiological, Biochemical, and Textural Properties of Bonito (*Sarda sarda*) During Chilled Storage. *Food Science and Technology International* [online]. 14(4), 367-373 [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1177/1082013208097444. ISSN 10820132. Dostupné z: <http://fst.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1082013208097444>

NAILA, et al., 2010. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science* [online]. 75(7), R139-R150 [cit. 2017-02-22]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x> (25)

Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny

NOWAK, A. a A. CZYZOWSKA, 2011. In vitro synthesis of biogenic amines by *Brochothrix thermosphacta* isolates from meat and meat products and the influence of other microorganisms. *Meat Science* [online]. 88(3), 571-574 [cit. 2017-02-20]. DOI: 10.1016/j.meatsci.2011.02.015. ISSN 03091740. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174011000726>

OSCÁRIZ, J. C. et al., 2006. Purification and sequencing of cerein 7B, a novel bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 254(1), 108-115 [cit. 2017-02-28]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2005.00009.x. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2005.00009.x>

ÖZOGUL, F. a Ö. ÖZDEN, 2013. The Effects of Gamma Irradiation on the Biogenic Amine Formation in Sea Bream (*Sparus aurata*) Stored in Ice. *Food and Bioprocess Technology* [online]. 6(5), 1343-1349 [cit. 2017-02-27]. DOI: 10.1007/s11947-011-0593-8. ISSN 19355130. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11947-011-0593-8>

PACHLOVÁ, V. et al., 2012. The effect of elevated temperature on ripening of Dutch type cheese. *Food Chemistry* [online]. 132(4), 1846-1854 [cit. 2017-03-03]. DOI:

10.1016/j.foodchem.2011.12.017. ISSN 03088146. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611017729>

PARCHAMI, R. et al., 2017. Determination of biogenic amines in canned fish samples using head-space solid phase microextraction based on nanostructured polypyrrole fiber coupled to modified ionization region ion mobility spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. **1481**, 37-43 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196731631696X>

REDRUELLO, B. et al., 2017. A UHPLC method for the simultaneous analysis of biogenic amines, amino acids and ammonium ions in beer. *Food Chemistry* [online]. **217**, 117-124 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814616312808>

RIO, B. et al., 2017. The dietary biogenic amines tyramine and histamine show synergistic toxicity towards intestinal cells in culture. *Food Chemistry* [online]. **218**, 249-255 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814616314297>

ŞANLI, T. a E. ŞENEL, 2015. *Formation of Biogenic Amines in Cheese* [online]. 223-230 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124046993000275>

SEBEI, S. et al., 2007. Characterization, N-terminal sequencing and classification of cerein MRX1, a novel bacteriocin purified from a newly isolated bacterium: *Bacillus cereus* MRX1. *Journal of Applied Microbiology* [online]. **103**(5), 1621-1631 [cit. 2017-02-28]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03395.x. ISSN 13645072. Dostupné z:
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2007.03395.x>

SLUKOVÁ, M. a P. SKŘIVAN, 2015. Jsou zlepšující přípravky v pekárenském oboru nezbytné? *Potravinářská revue* [online]. (4), 15-17 [cit. 2017-03-03]. Dostupné z:
<http://www.agral.cz/LinkClick.aspx?fileticket=encwG7pqPqY%3d&tabid=730&language=cs-CZ>

TAPINGKAE, W. et al., 2010. Degradation of histamine by extremely halophilic archaea isolated from high salt-fermented fishery products. *Enzyme and Microbial Technology* [on-

line]. **46**(2), 92-99 [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2009.10.011. ISSN 01410229. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022909002488>

TUBEROSO, C. I. G. et al., 2015. Determination of dansylated amino acids and biogenic amines in Cannonau and Vermentino wines by HPLC-FLD. *Food Chemistry* [online]. **175**, 29-35 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614018585>

VÍTKOVÁ, L. *Izolace mikroorganismů degradujících biogenní aminy*. Zlín, 2016. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická.

VOTAVA, M., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. ISBN 8090289665.

YI-CHEN, L. et al., 2016. Reduction of histamine and biogenic amines during salted fish fermentation by *Bacillus polymyxa* as a starter culture. *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. **24**, 157-163 [cit. 2017-02-23]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2015.02.002>

ZAMAN, M. Z. et al., 2010. Occurrence of biogenic amines and amines degrading bacteria in fish sauce. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. **28**(5), 440 - 449 [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-77958115268&origin=inward&txGid=1BA2F80502A36F8956A0CE33390230D1.wsnAw8kcdt7IPYLO0V48gA%3a2>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|---------|--|
| Bsc-Cl | Bansylchlorid |
| CE | Kapilární elektroforéza |
| DAD | Detektor diodového pole |
| DAO | Diaminooxidasy |
| DEEM | Diethyl ethoxymethylenemalonát |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina |
| Dsn-Cl | Dansylchlorid |
| EU | Evropská unie |
| FID | Plamenový ionizační detektor |
| FMOC-Cl | 9-fluorenyl-methyloxycarbonyl chlorid |
| GC | Plynová chromatografie |
| HDPE | Polyetylen s vysokou hustotou |
| HPLC | Vysokoučinná kapalinová chromatografie |
| IMS | Iontová mobilní spektrometrie |
| MAO | Monoaminooxidasy |
| MYP | Manitol yolk polymyxin agar |
| OPA | o-ftalaldehyd |
| PEMBA | Agar obsahující polymyxinpyruvát, yolk, manitol a bromtymolovou modř |
| RASFF | Rapid Alert System for Food and Feed - Systém včasného varování pro potraviny a krmiva |
| RNA | Ribonukleová kyselina |
| TLC | Chromatografie na tenké vrstvě |
| UV | Ultrafialové záření |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| <i>Obr. 1 Dekarboxylace histidinu (Košmerl et al., 2013)</i> | 12 |
| <i>Obr. 2 Reakce dansylchloridu a aminu za vzniku sulfonamidu (Loukou a Zotou, 2003)</i> | 19 |
| <i>Obr. 3 Oxidace histaminu pomocí DAO za vzniku imidazol acetaldehydu, amoniaku a peroxidu vodíku (Duelo, 2012)</i> | 21 |
| <i>Obr. 4 Degradace biogenních aminů bakterií B. subtilis 23 v minerálním médiu o pH 7 a koncentraci soli 0, 1, 2 a 3 % (w/v) při teplotě 30 °C</i> | 43 |
| <i>Obr. 5 Degradace biogenních aminů bakterií B. subtilis 23 v minerálním médiu o pH 7 a koncentraci soli 0, 1, 2 a 3 % (w/v) při teplotě 23 °C</i> | 45 |
| <i>Obr. 6 Degradace biogenních aminů bakterií B. subtilis 23 v minerálním médiu o pH 7 a koncentraci soli 0, 1, 2 a 3 % (w/v) při teplotě 10 °C</i> | 47 |
| <i>Obr. 7 Degradace kadaverinu bakterií B. subtilis 23 v minerálním médiu o pH 7 bez přídavku NaCl při teplotách 30 a 10 °C</i> | 48 |
| <i>Obr. 8 Degradace biogenních aminů bakterií B. subtilis 23 v médiu Nutrient broth o pH 7 a koncentraci soli 0 a 2 % (w/v) při teplotě 30 °C</i> | 49 |
| <i>Obr. 9 Degradace biogenních aminů bakterií B. subtilis 23 v médiu Nutrient broth o pH 7 a koncentraci soli 0 a 2 % (w/v) při teplotě 23 °C</i> | 50 |
| <i>Obr. 10 Degradace biogenních aminů bakterií B. subtilis 23 v médiu Nutrient broth o pH 7 a koncentraci soli 0 a 2 % (w/v) při teplotě 10 °C</i> | 51 |
| <i>Obr. 11 Degradace biogenních aminů bakterií B. pumilus 26 v minerálním médiu o pH 7 a koncentraci soli 0, 1, 2 a 3 % (w/v) při teplotě 30 °C</i> | 53 |
| <i>Obr. 12 Degradace biogenních aminů bakterií B. pumilus 26 v médiu Nutrient broth o pH 7 a koncentraci soli 0 a 2 % (w/v) při teplotě 30 °C</i> | 55 |
| <i>Obr. 13 Degradace biogenních aminů bakterií B. pumilus 26 v médiu Nutrient broth o pH 7 a koncentraci soli 0 a 2 % (w/v) při teplotě 23 °C</i> | 56 |
| <i>Obr. 14 Degradace biogenních aminů bakterií B. pumilus 26 v médiu Nutrient broth o pH 7 a koncentraci soli 0 a 2 % (w/v) při teplotě 10 °C</i> | 57 |

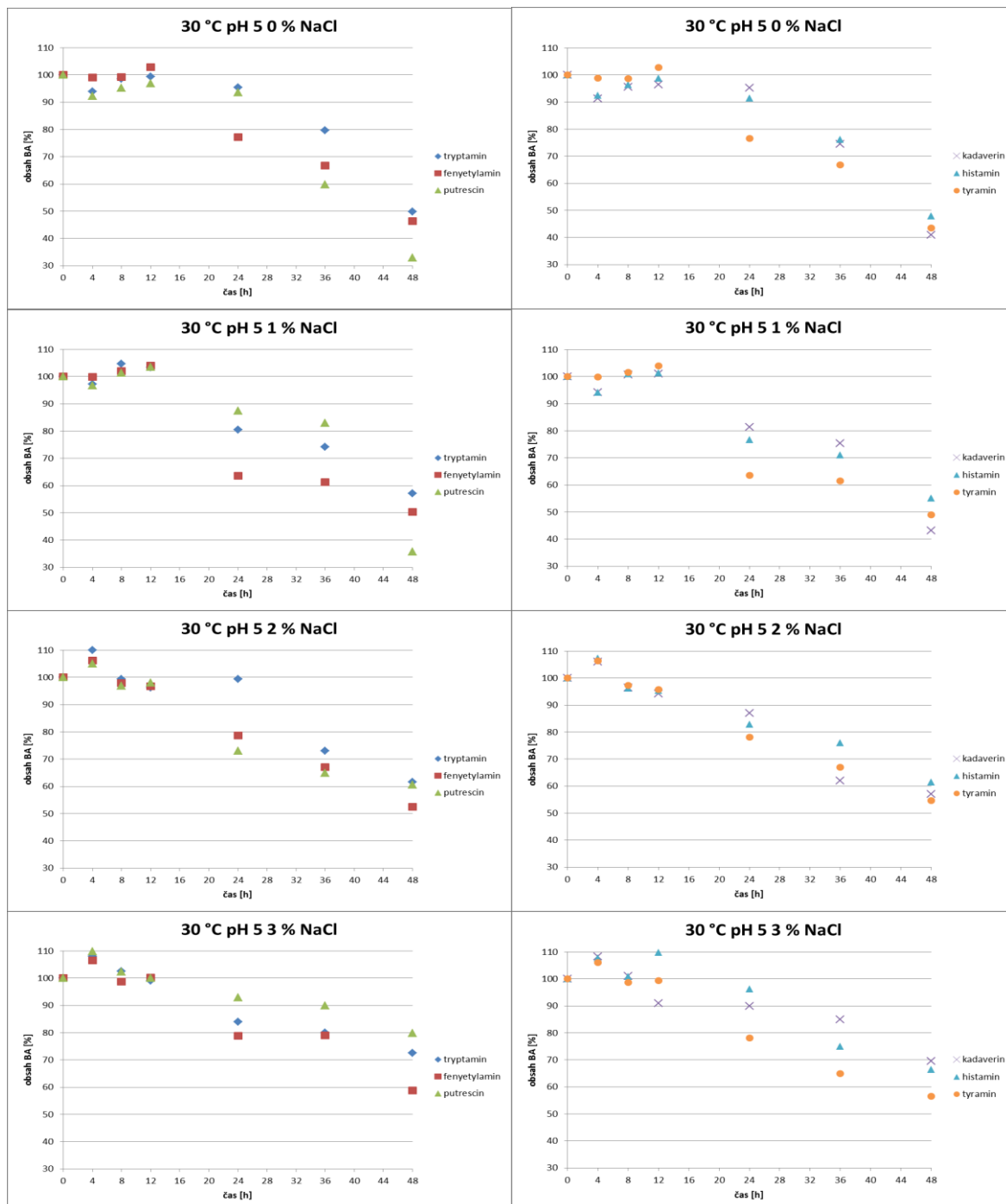
SEZNAM TABULEK

| | |
|--|----|
| <i>Tab. 1 Prekursory biogenních aminů a jejich struktura (Cunha et al., 2017)</i> | 13 |
| <i>Tab. 2 Složení roztoku stopových prvků</i> | 34 |
| <i>Tab. 3 Složení roztoku biogenních aminů</i> | 35 |
| <i>Tab. 4 Složení minerálního média</i> | 35 |
| <i>Tab. 5 Hodnoty pH a koncentrace NaCl jednotlivých variant minerálního média</i> | 36 |
| <i>Tab. 6 Program gradientové eluce</i> | 40 |

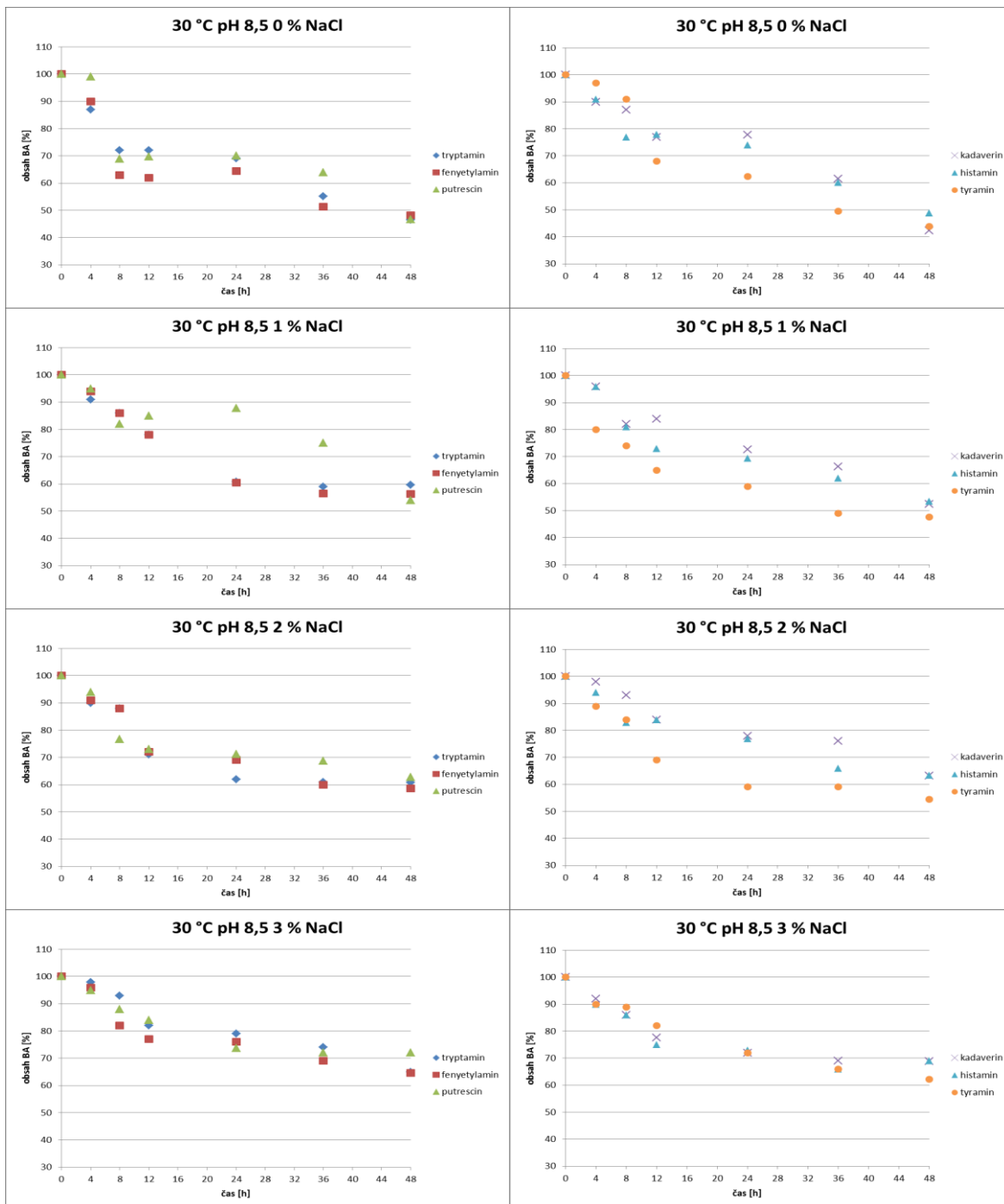
SEZNAM PŘÍLOH

| | |
|---|----|
| PŘÍLOHA P I: Degradace biogenních aminů bakterií <i>B. subtilis</i> v minerálním médiu o pH 5 a koncentraci soli 0, 1, 2, 3 % (w/v) při teplotě 30 °C | 75 |
| PŘÍLOHA P II: Degradace biogenních aminů bakterií <i>B. subtilis</i> v minerálním médiu o pH 8,5 a koncentraci soli 0, 1, 2, 3 % (w/v) při teplotě 30 °C | 76 |
| PŘÍLOHA P III: Degradace biogenních aminů bakterií <i>B. subtilis</i> v minerálním médiu o pH 5 a koncentraci soli 0, 1, 2, 3 % (w/v) při teplotě 23 °C | 77 |
| PŘÍLOHA P IV: Degradace biogenních aminů bakterií <i>B. subtilis</i> v minerálním médiu o pH 8,5 a koncentraci soli 0, 1, 2, 3 % (w/v) při teplotě 23 °C | 78 |
| PŘÍLOHA P V: Degradace biogenních aminů bakterií <i>B. subtilis</i> v minerálním médiu o pH 5 a koncentraci soli 0, 1, 2, 3 % (w/v) při teplotě 10 °C | 79 |
| PŘÍLOHA P VI: Degradace biogenních aminů bakterií <i>B. subtilis</i> v minerálním médiu o pH 8,5 a koncentraci soli 0, 1, 2, 3 % (w/v) při teplotě 10 °C | 80 |

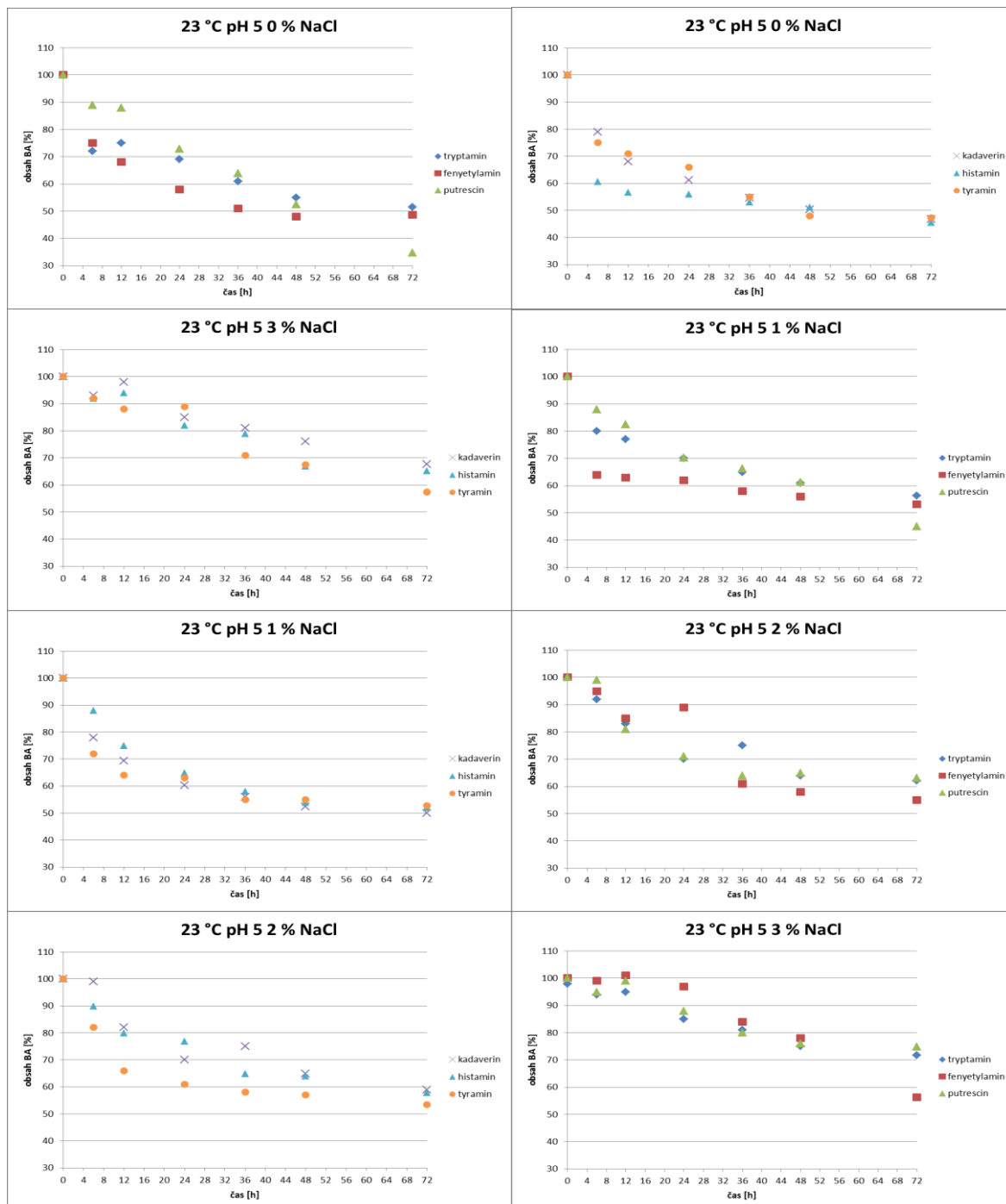
PŘÍLOHA P I: DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ BAKTERIÍ *B. SUBTILIS* V MINERÁLNÍM MÉDIU O PH 5 A KONCENTRACI SOLI 0, 1, 2, 3 % (W/V) PŘI TEPLOTĚ 30 °C



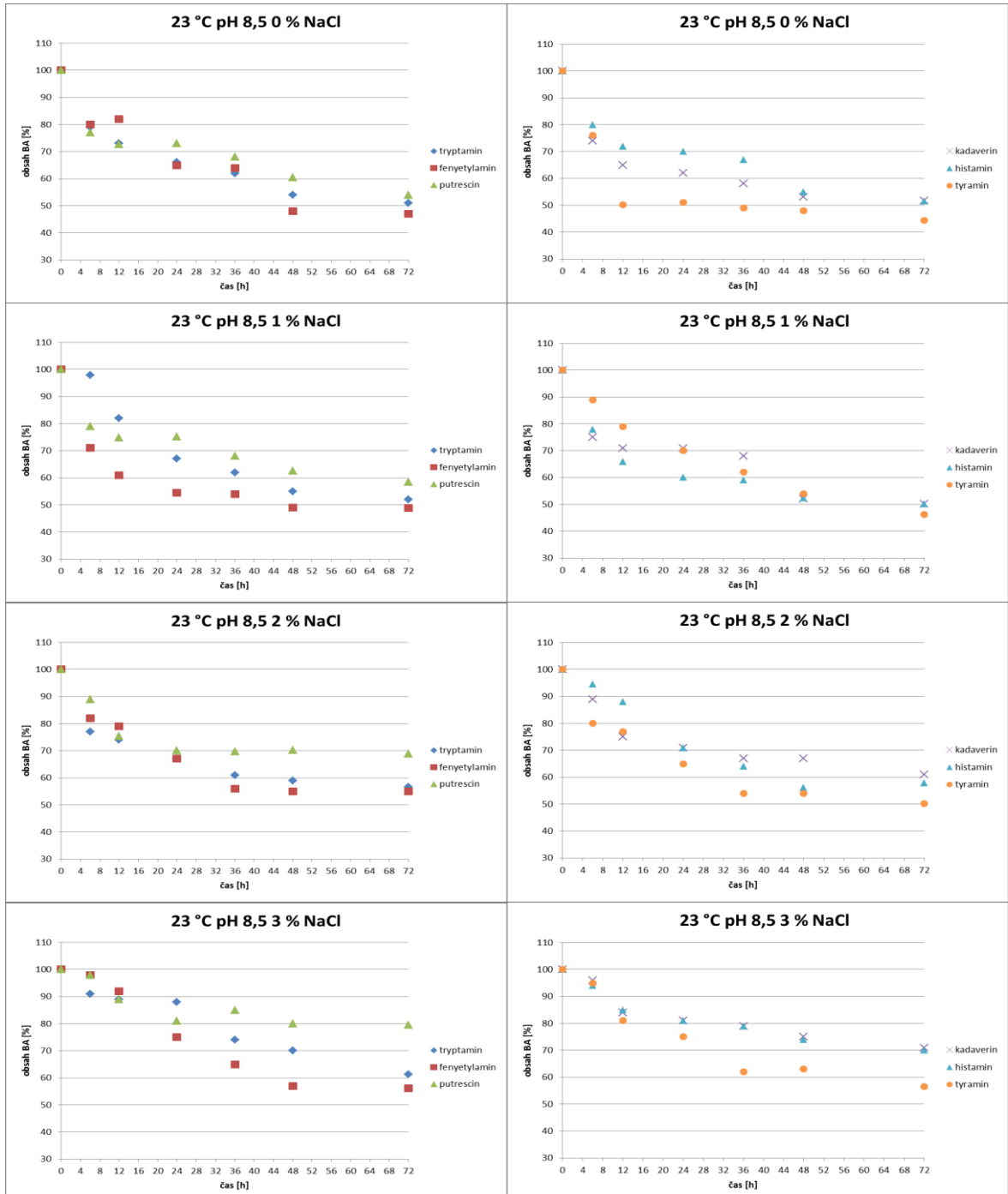
PŘÍLOHA P II: DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ BAKTERIÍ *B. SUBTILIS* V MINERÁLNÍM MÉDIU O PH 8,5 A KONCENTRACI SOLI 0, 1, 2, 3 % (W/V) PŘI TEPLOTĚ 30 °C



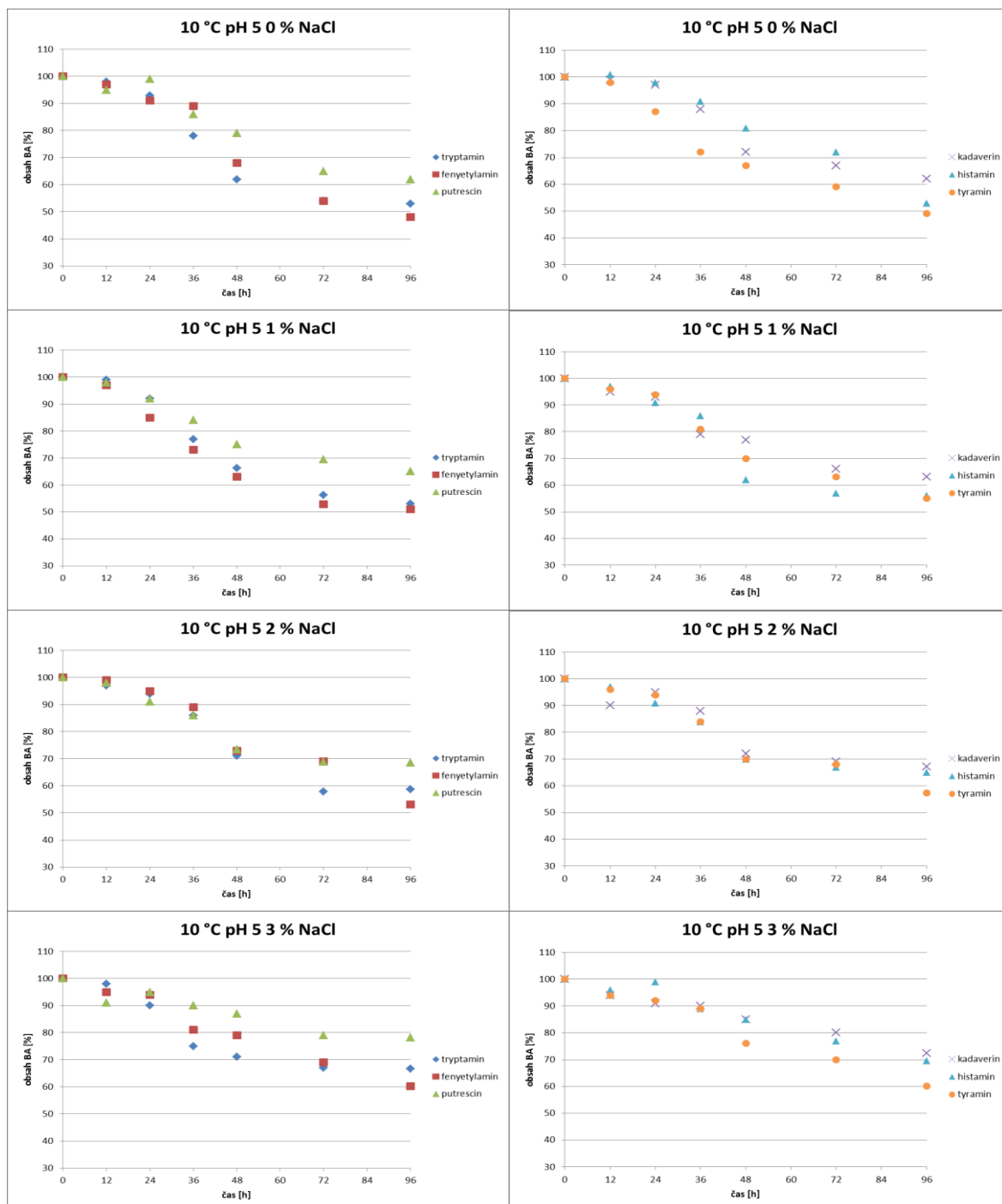
PŘÍLOHA P III: DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ BAKTERIÍ *B. SUBTILIS* V MINERÁLNÍM MÉDIU O PH 5 A KONCENTRACI SOLI 0, 1, 2, 3 % (W/V) PŘI TEPLOTĚ 23 °C



PŘÍLOHA P IV: DEGRADACE BIOGENÍCH AMINŮ BAKTERIÍ *B. SUBTILIS* V MINERÁLNÍM MÉDIU O PH 8,5 A KONCENTRACI SOLI 0, 1, 2, 3 % (W/V) PŘI TEPLOTĚ 23 °C



PŘÍLOHA P V: DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ BAKTERIÍ *B. SUBTILIS* V MINERÁLNÍM MÉDIU O PH 5 A KONCENTRACI SOLI 0, 1, 2, 3 % (W/V) PŘI TEPLOTĚ 10 °C



PŘÍLOHA P VI: DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ BAKTERIÍ *B. SUBTILIS* V MINERÁLNÍM MÉDIU O PH 8,5 A KONCENTRACI SOLI 0, 1, 2, 3 % (W/V) PŘI TEPLOTĚ 10 °C

