

Skríning vybraných bakterií využívaných v mlékárenství na schopnost degradace biogenních aminů

Štěpán Beneš

Bakalářská práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Štěpán Beneš**

Osobní číslo: **T15156**

Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Skríning vybraných bakterií využívaných v mlékárenství na schopnost degradace biogenních aminů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Biogenní aminy, jejich význam a výskyt v potravinách.
2. Bakterie mléčného kvašení.
3. Kontrola biogenních aminů v potravinách.

II. Praktická část

1. Ověření schopnosti růstu vybraných bakterií mléčného kvašení v minerálním médiu s biogenními aminy.
2. Ověření schopnosti degradace biogenních aminů vybranými bakteriemi mléčného kvašení.
3. Zpracování výsledků a formulace závěru.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] TORRIANI, Sandra a Giovanna SUZZI. Biogenic Amines in Fermented Foods. [online]. 1. Frontiers Media, 2015 [cit. 2017-08-10]. ISBN 9782889195930. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/researchtopic/512/biogenic-amines-in-fermented-foods>.
- [2] NAILA, Aishath, Steve FLINT, Graham FLETCHER, Phil BREMER a Gerrit MEERDINK. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. Journal of Food Science [online]. 2010, 75(7), R139-R150 [cit. 2017-12-19]. 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>.
- [3] SANTOS, M.H.Silla. Biogenic amines: their importance in foods. International Journal of Food Microbiology [online]. 1996, 29(2-3), 213-231 [cit. 2017-08-22]. DOI: 10.1016/0168-1605(95)00032-1. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/01681605950003212>.
- [4] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. Chemie potravin 1. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [5] ALVAREZ, Miguel A. a Ma Victoria MORENO-ARRIBAS. The problem of bio-genic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. Trends in Food Science [online]. 2014, 39(2), 146-155 [cit. 2017-09-11]. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.07.007. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224414001599>.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

2. února 2018

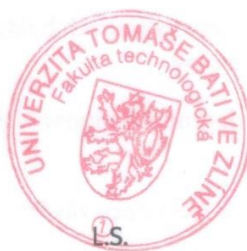
Termín odevzdání bakalářské práce:

3. května 2018

Ve Zlíně dne 2. února 2018



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



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

Příjmení a jméno: Štěpán Beneš

Obor: Chemie a technologie potravin

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 25.4.2018

..... 

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 nevydávalečně 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 výdělků 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 přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Bakalářská práce je zaměřena na ověření schopnosti vybraných bakterií využívaných v mlékárenském průmyslu na degradaci biogenních aminů. Teoretická část se zabývá biogenními aminy, popisuje jejich vznik, strukturu, výskyt v potravinách a jejich možnou kontrolu v potravinách.

V praktické části byl pomocí HPLC sledován úbytek biogenních aminů, na základě působení 54 kmenů bakterií rodů *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Brevibacterium*, *Micrococcus* a *Kocuria*. Redukce byla pozorována po 24 a 48 hodinové kultivaci v minerálním médiu s biogenními aminy a také v nutričně neúplném (polovičním) médiu s biogenními aminy.

Experimentem bylo zjištěno, že největší schopnost degradace vykazoval kmen *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198, který byl schopen po 24 hodinové kultivaci v polovičním médiu redukovat množství putrescinu, kadaverinu a histaminu o více než 50 %.

Klíčová slova: biogenní aminy, degradace, bakterie využívané v mlékárenství, HPLC

ABSTRACT

The bachelor thesis is focused on the ability of selected bacteria used in the dairy industry to degrade biogenic amines. The theoretical part describes biogenic amines, their origin, structure, occurrence in food and their possible control in food.

Purpose of the practical part, the loss of biogenic amines was monitored by HPLC, based on the action of 54 strains of the genera *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Brevibacterium*, *Micrococcus* and *Kocuria*. Reduction was observed after 24 and 48 hours of cultivation in mineral medium with biogenic amines and also in nutritionally incomplete (half) medium with biogenic amines.

The experiment found that the biggest degradation ability was detected by *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198, which was able to reduce an amount of putrescine, histamine and cadaverine more than 50 % after 24 hours of cultivation in nutritionally incomplete medium with biogenic amines.

Keywords: biogenic amines, degradation, bacteria used in dairy, HPLC

V prvé řadě bych chtěl velmi poděkovat vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, vstřícnost, čas a především za ochotu a cenné připomínky během zpracovávání této práce. Dále mé poděkování patří panu Ing. Pavlu Plevovi, Ph.D. za pomoc a rady při vyhodnocování praktické části práce a laborantkám Bc. Veronice Kučabové a Ing. Olze Vlčkové za pomoc při práci v laboratoři.

Velké poděkování také patří mé rodině za podporu a pomoc během celého studia.

Tato práce vznikla za podpory projektu Ministerstva zemědělství, Národní agentury pro zemědělský výzkum – program aplikovaného výzkumu ZEMĚ, číslo projektu QK1710156

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 BIOGENNÍ AMINY	11
1.1 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ	12
1.2 STRUKTURA BIOGENNÍCH AMINŮ	13
1.3 VYBRANÉ BIOGENNÍ AMINY	14
1.3.1 Tyramin	14
1.3.2 Histamin	15
1.3.3 Tryptamin	15
1.3.4 Kadaverin	16
1.3.5 2-fenyletylamin	16
1.3.6 Putrescin	17
1.3.7 Spermin a spermidin	17
1.4 REAKCE A ZMĚNY BIOGENNÍCH AMINŮ	18
1.5 BIOLOGICKÉ ÚČINKY A TOXICITA	18
2 BIOGENNÍ AMINY V POTRAVINÁCH	22
2.1 NEFERMENTOVANÉ POTRAVINY	22
2.1.1 Ryby	22
2.1.2 Ovoce a zelenina	23
2.1.3 Maso	23
2.1.4 Mléko	23
2.2 FERMENTOVANÉ POTRAVINY	23
2.2.1 Sýry	24
2.2.2 Fermentovaná zelenina.....	24
2.2.3 Fermentované masné výrobky	24
2.2.4 Pivo	25
2.2.5 Víno.....	25
3 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	26
3.1 ROD <i>LACTOCOCCUS</i>	27
3.2 ROD <i>LACTOBACILLUS</i>	28
3.3 ROD <i>OENOCOCCUS</i>	28
3.4 ROD <i>PEDIOCOCCUS</i>	28
3.5 ROD <i>STREPTOCOCCUS</i>	29
3.6 ROD <i>LEUCONOSTOC</i>	29
4 KONTROLA BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH	30
4.1 METODY ZPOMALOVÁNÍ AKUMULACE BIOGENNÍCH AMINŮ.....	30
4.1.1 Použití potravinářských přídatných a konzervačních látek.....	30
4.1.2 Vysoký hydrostatický tlak.....	31
4.1.3 Ozařování	31
4.1.4 Balení	32
4.1.5 Mikrobiální modelování.....	32
4.2 STARTEROVÉ MIKROORGANIZMY INHIBUJÍCÍ PRODUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ	32
4.2.1 Metody oxidace/degradace vytvořených biogenních aminů.....	33

II PRAKTICKÁ ČÁST	34
5 CÍL PRÁCE	35
6 MATERIÁL A METODY	36
6.1 OVĚŘENÍ SCHOPNOSTI RŮSTU VYBRANÝCH BAKTERIÍ VYUŽÍVANÝCH V MLÉKÁRENSTVÍ V MINERÁLNÍM MÉDIU S BIOGENNÍMI AMINY	36
6.1.1 Použité mikroorganismy	36
6.1.2 Kultivační média	38
6.1.3 Příprava bakterií pro ověření schopnosti růstu v přítomnosti biogenních aminů	41
6.2 OVĚŘENÍ SCHOPNOSTI DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ VYBRANÝMI KMENY BAKTERIÍ VYUŽÍVANÝCH V MLÉKÁRENSTVÍ POMOCÍ CHROMATOGRAFIE	41
6.2.1 Použité mikroorganismy	41
6.2.2 Kultivační média	41
6.2.3 Příprava a odběr vzorků	43
6.2.4 Derivatizace vzorků	43
6.2.5 Chromatografické stanovení biogenních aminů.....	44
7 VÝSLEDKY.....	45
7.1 SCHOPNOST RŮSTU VYBRANÝCH BAKTERIÍ VYUŽÍVANÝCH V MLÉKÁRENSTVÍ V MINERÁLNÍCH MÉDIÍCH S BIOGENNÍMI AMINY	45
7.2 CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ ÚBYTKU BIOGENNÍCH AMINŮ PŮSOBENÍM VYBRANÝCH MLÉKÁRENSKÝCH BAKTERIÍ	47
7.2.1 Degradace biogenních aminů kmeny <i>Lactobacillus casei</i>	47
7.2.2 Degradace biogenních aminů kmeny <i>Lactobacillus plantarum</i>	50
7.2.3 Degradace biogenních aminů ostatními kmeny laktobacilů	66
7.2.4 Degradace biogenních aminů kmeny <i>Pediococcus</i> spp.	67
7.2.5 Degradace biogenních aminů kmeny <i>Brevibacterium linens</i>	70
7.2.6 Degradace biogenních aminů kmeny <i>Kocuria</i> spp.	74
8 DISKUZE	76
ZÁVĚR	81
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	82
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	89
SEZNAM OBRÁZKŮ	90
SEZNAM TABULEK.....	93
SEZNAM PŘÍLOH.....	94

ÚVOD

Biogenní aminy jsou organické sloučeniny, vznikající z aminokyselin pomocí specifických enzymů dekarboxyláz. Mají vysokou biologickou aktivitu a vyskytují se v rostlinných a živočišných buňkách, kde zajišťují řadu důležitých funkcí. V nadměrném množství působí toxicky (bolest hlavy, vysoký/nízký tlak, zvracení, průjemy, poruchy CNS). V nízkých koncentracích jsou biogenní aminy přirozenou složkou mnoha potravin, a také mohou vznikat vlivem některých procesů při zpracování potravin.

Jednotlivé biogenní aminy (BA) vznikají z příslušných aminokyselin jejich dekarboxylací. Například z aminokyseliny histidinu vzniká histamin, z lyzinu kadaverin, z tyrozinu tyramin atd.

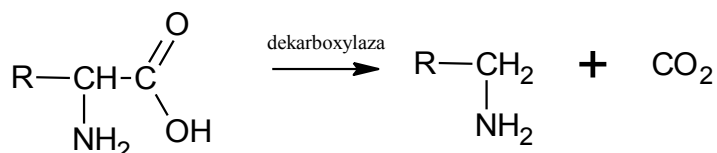
Ve vyšších množstvích se biogenní aminy nacházejí ve fermentovaných potravinách (kysané zelí, sýry, mléčné výrobky), ve kterých vznikají působením mikroorganismů. Příliš vysoké hladiny biogenních aminů v potravinách, jsou známkou kažení potravin a mohou vést k otrávám (především u ryb a masa).

Z hlediska možné toxicity je potřeba kontrolovat množství biogenních aminů v potravinách. Jedná se o metody zpomalující kumulaci BA v potravinách, např. přidavek aditiv, balení v modifikované atmosféře (MAP), ozařování nebo vysoký hydrostatický tlak. Další metody řízení biogenních aminů jsou založeny na jejich degradaci pomocí enzymů nebo použitím bakterií, schopných oxidovat biogenní aminy.

I. TEORETICKÁ ČÁST

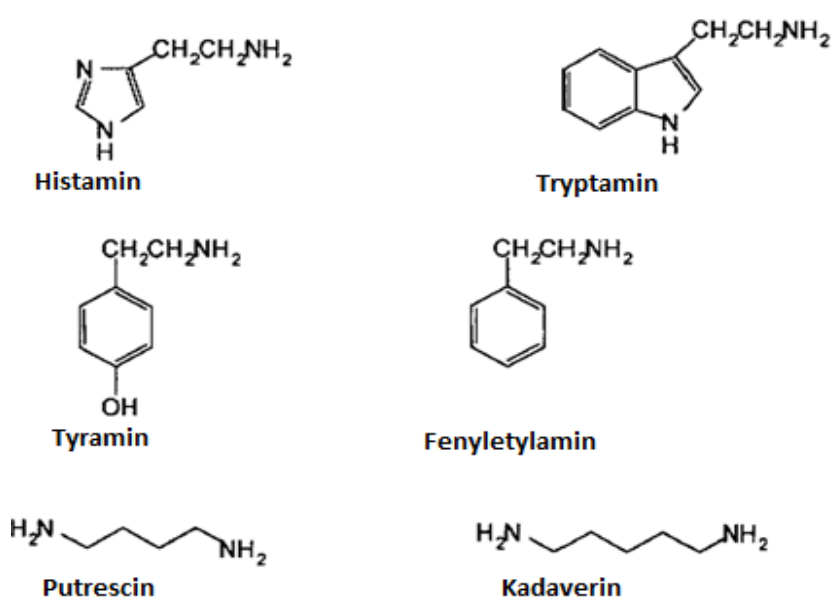
1 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy jsou zásadité dusíkaté sloučeniny vznikající dekarboxylací aminokyselin (obr. 1), aminací nebo transaminací aldehydů a ketonů. Jsou to organické báze o nízké molekulové hmotnosti vyskytující se v buňkách rostlinných a živočišných tkání [1,2,3].



Obr. 1. Dekarboxylace aminokyselin [4]

Biogenní aminy mají důležitou fyziologickou funkci, ale v nadměrném množství mohou způsobovat nežádoucí až toxické účinky. Jsou zdroji dusíku a prekurzorů pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů, které se vyskytují ve všech organizmech. Patří mezi ukazatele bakteriálního kažení a jejich výskyt je sledován především u potravin. Za normálních podmínek lidské spotřeby potravin nebo nápojů obsahujících tyto sloučeniny nejsou toxické, protože jsou rychle detoxikovány aktivitou aminových oxidačních enzymů, monoaminoxidáz (MAO) a diaminoxidáz (DAO). Množství BA je považováno za značku úrovně mikrobiologické kontaminace potravin. Nejdůležitějšími biogenními aminy, vyskytujícími se v potravinách, jsou histamin, putrescin, kadaverin, tyramin, tryptamin, β -fenyletylamin (obr. 2), spermin a spermidin [1,4,5,6].



Obr. 2. Strukturální vzorce a názvy vybraných biogenních aminů [6]

1.1 Vznik biogenních aminů

Biogenní aminy jsou produkty buněčné metabolické aktivity zvířat, rostlin i mikroorganismů. V potravinách a nápojích se tvoří mikrobiální dekarboxylací aminokyselin. V potravinách vznikají především dekarboxylací přirozených aminokyselin působením dekarboxyláz, kterými jsou vybaveny četné druhy hnilobných bakterií, ale také řada druhů bakterií mléčného kvašení. Enzym z karboxylové skupiny aminokyseliny odštěpí oxid uhličitý za vzniku aminu [7,8].

Předpoklady pro tvorbu biogenních aminů mikroorganismy jsou [9]:

1. dostupnost volných aminokyselin, ale ne vždy vedoucí k produkci aminů,
2. přítomnost dekarboxylázy pozitivních mikroorganismů,
3. podmínky umožňující růst bakterií, syntézu dekarboxyláz.

Nejběžnější monoaminy histamin (HIM), tyramin (TYM) a tryptamin (TRM) a diaminy (nebo polyaminy) putrescin (PUT) a kadaverin (CAD) se tvoří z histidinu, tyrozinu, tryptofanu, ornitinu a lyzinu. Polyaminy spermidin (SPD) a spermin (SPM) vznikají z putrescinu [3,6].

Tvorbu biogenních aminů v potravinách ovlivňuje také aktivita mikrobiálních dekarboxylačních enzymů. Tu ovlivňuje mnoho faktorů - teplota, doba skladování potravin, aktivita vody, pH, redoxní potenciál nebo obsah solí (tab. 1) [10].

Tab. 1. Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů [11]

Faktory	Vliv na dekarboxylázovou aktivitu
pH	aktivita silnější v kyselém prostředí (pH 4 - 5,5)
obsah glukózy	0,5 až 2 % optimální pro růst mikroorganismů vybavených dekarboxylázami, 3 % inhibují syntézu dekarboxyláz
teplota	20 až 37 °C optimální pro růst většiny mikroorganismů vybavených dekarboxylázami, nízké teploty zpomalují, až zastavují jejich růst
přítomnost NaCl	aktivuje tyrozin-dekarboxylázu, inhibuje histidin-dekarboxylázu
přítomnost NaNO ₂	aktivuje tyrozin-dekarboxylázu
přítomnost O ₂	potřebný pro růst mnohých mikroorganismů vybavených dekarboxylázami
množství přítomných aminů	histamin a putrescin inhibují histidin-dekarboxylázu

1.2 Struktura biogenních aminů

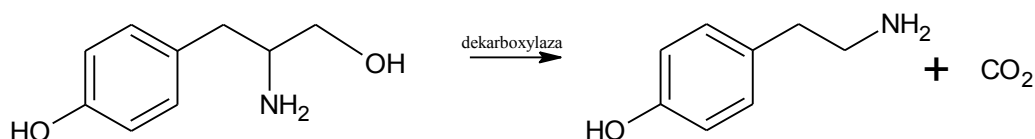
Bioaktivní aminy lze klasifikovat na základě počtu aminových skupin a chemické struktury. Podle počtu aminových skupin se dělí na monoaminy (tyramin, fenyletylamin), diaminy (histamin, tryptamin, putrescin, kadaverin) a polyaminy (spermin, spermidin, agmatin). Na základě chemické struktury se biogenní aminy člení na aromatické - tyramin a 2-fenyletylamin, heterocyklické - histamin a tryptamin, alifatické - putrescin a kadaverin a polyaminy - spermidin, spermin a případně agmatin. Někdy se mezi polyaminy zjednodušeně řadí i diaminy, podobně jako se heterocyklické aminy zjednodušeně řadí do skupiny aromatických aminů [3,8,9,12].

Tzv. endogenní biogenní aminy jsou v nízkých koncentracích jako produkty metabolismu přirozenou součástí prakticky všech potravin. Exogenní biogenní aminy vznikají v potravinách jako důsledek mikrobiální kontaminace a při kvasných procesech [3].

1.3 Vybrané biogenní aminy

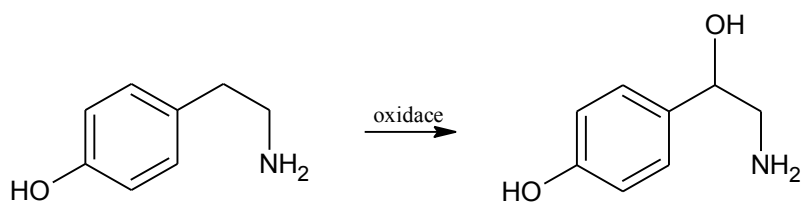
1.3.1 Tyramin

Tyramin je biogenní amin vznikající dekarboxylací z aminokyseliny tyrozinu (obr. 3). Je v některých potravinách (sýrech) metabolizován na katecholaminy, proto je jeho přívod v potravě kontraindikován při léčbě neselektivními tyroeretiky inhibitory monoaminoxidáz (MAO). U citlivých jedinců může vyvolat pseudoalergickou reakci [2]. Tyramin (p-hydroxyfenyletylamin) je aromatický biogenní amin, který je ve výživě člověka důležitý jako zdroj dusíku a prekurzor pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a bílkovin. Ačkoli je tyramin nepostradatelný pro zajištění řady velmi důležitých životních funkcí, může konzumace potravin obsahující vysoké koncentrace této látky vyvolat toxický účinek, nejčastěji vazomotorní, konkrétně vazokonstrikční. Pro tyramin je toxická dávka asi $20\text{-}80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ potravin [14].



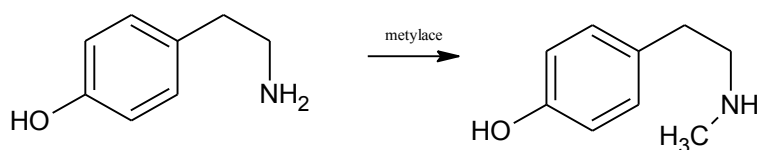
Obr. 3. Dekarboxylace tyrozinu za vzniku tyraminu [3]

Oxidací tyraminu vzniká oktopamin, 4-(2-amino-1-hydroxyetyl)fenol, který má funkci neurohormonu u bezobratlých živočichů (obr. 4) [3,14].



Obr. 4. Oxidace tyraminu na oktopamin [3]

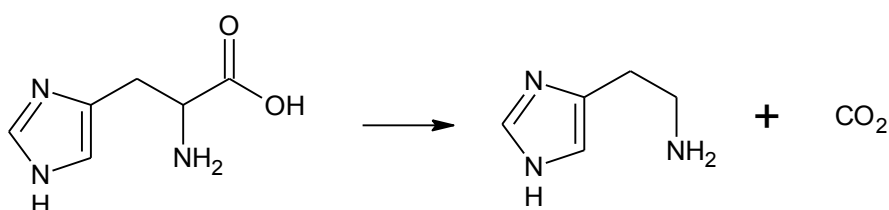
Metylací tyraminu vzniká *N*-metyltyramin (obr. 5), který je prekurzorem synefrinu v hořkých pomerančích a hordeninu v ječmeni [3,14].



Obr. 5. Metylace tyraminu za vzniku *N*-metyltyraminu [3]

1.3.2 Histamin

Imidazolyletylamin je heterocyklický amin vznikající z histidinu dekarboxylací pomocí enzymu histidindekarboxylázy (obr. 6), jeden z nejdůležitějších biogenních aminů obsažený v živočišných tkáních a v námelu. Je obsažen zejména v některých bílých krvinkách, bazofilích. Fyziologická role histaminu zahrnuje sekreci žaludeční kyseliny, buněčný růst a diferenciaci, ovlivňuje také učení a paměť. Histamin je nejen hlavní prostředník akutní zánětlivé a okamžité reakce přecitlivělosti, ale bylo také prokázáno, že ovlivňuje chronický zánět a reguluje několik základních událostí v imunitní odpovědi [16,17,18].

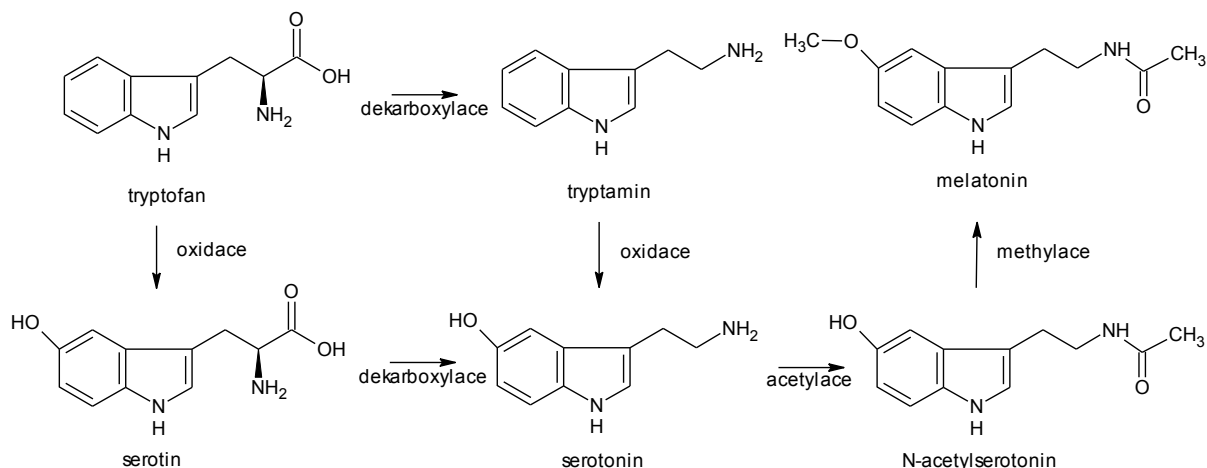


Obr. 6. Dekarboxylace histidinu za vzniku histaminu [11]

Histamin je jeden z nejtoxičtějších biogenních aminů v potravinách. Hranice snesitelnosti je asi 10 mg. Toxicita tohoto aminu může být zesílena jinými biogenními aminy (putrescin, kadaverin) nebo alkoholem. Příznaky otravy bývají silné, ale někdy také špatně rozpoznatelné (zarudnutí kůže, kopřivka, nevolnost, zvracení, bolest hlavy, závratě, žaludeční křeče). Otrava histaminem se dá překonat podáním antihistaminik [3,11,19].

1.3.3 Tryptamin

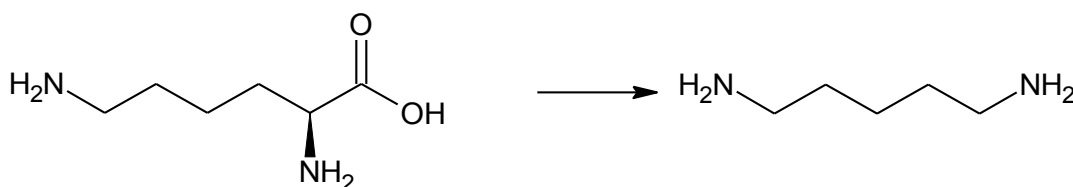
Tryptamin je biogenní amin, který vzniká dekarboxylací tryptofanu za katalýzy enzymem tryptofandekarboxyláza (obr. 7). Je obsažený v některých rostlinách a potravinách (sýry). Oxidací tryptaminu vzniká hormon serotonin, který je důležitý při přenosu nervových vzruchů. Serotonin-*N*-acetyltransferázou vzniká ze serotoninu *N*-acetylserotonin a z něj působením hydroxyindol-*O*-metyltransferázy hormon melatonin. Melatonin je hormon, který působí na ospalost a má další účinky na činnost mozku. Dále ovlivňuje regulaci spánku, spouštění puberty a imunitní funkce. [3,20,21].



Obr. 7. Dekarboxylace a další reakce tryptofanu [3]

1.3.4 Kadaverin

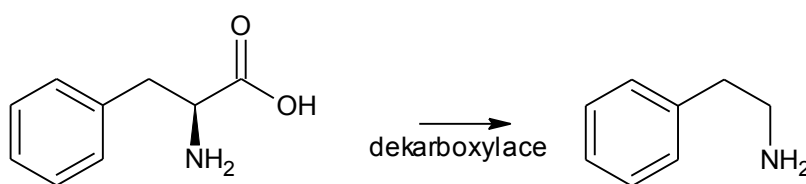
Dekarboxylací lyzinu pomocí enzymu lyzindekarboxyláza vzniká alifatický diamin kadaverin (1,5-diaminopentan) (obr. 8). Je to přírodní bioaktivní polyamin široce rozšířen u prokaryot i eukaryot. Hraje důležitou roli v přežití buněk při kyselém pH. V rostlinách se podílí na regulaci různých procesů, jako je například rostlinný růst a vývoj [3,11,22].



Obr. 8. Dekarboxylace lyzinu [3,23]

1.3.5 2-fenyletylamin

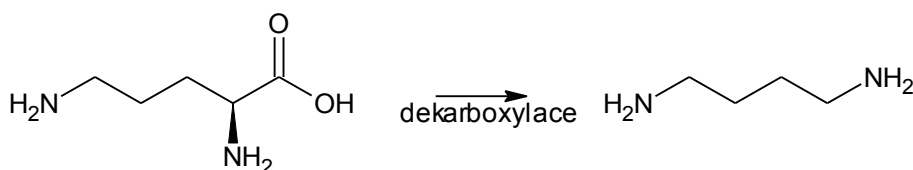
2-fenyletylamin vzniká dekarboxylací fenylalaninu za katalýzy enzymem fenylalanindekarboxyláza (obr. 9). Je to endogenní stopový amin, který se nachází v mozku několika savčích druhů včetně člověka. Výskyt 2-fenyletylaminu byl také zjištěn u několika druhů potravin, jako jsou kakaové výrobky, sýry a víno [3,24].



Obr. 9. Dekarboxylace fenylalaninu za vzniku 2-fenyletylaminu [3]

1.3.6 Putrescin

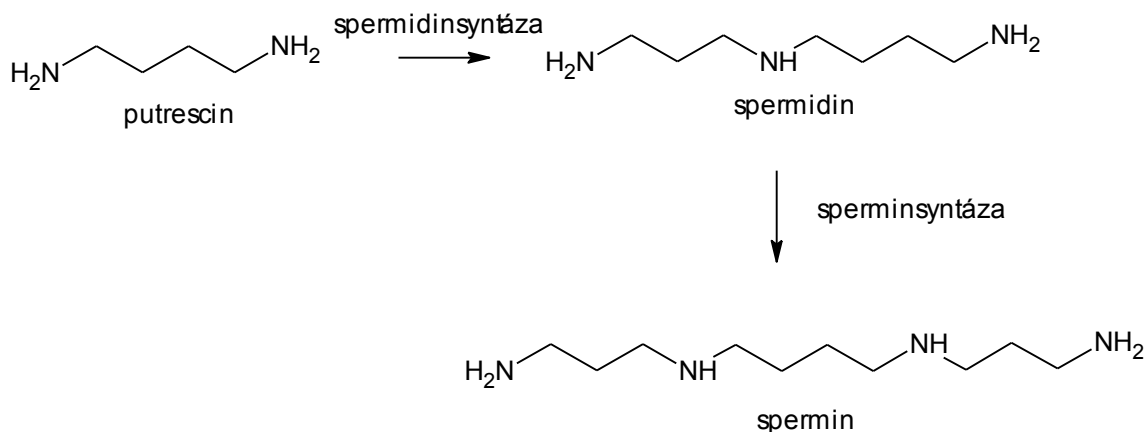
Alifatický diamin (polyamin) (1,4-diaminobutan) vzniká dekarboxylací ornitinu (tvoří se z argininu působením arginázy) působením ornitindekarboxylázy (obr. 10). Putrescin je jeden z nejběžnějších BA v potravinách. Jeho zvýšený výskyt v potravinách může vést k otravě jídlem v důsledku zvýšení toxických účinků jiných bakterií a rovněž ke snížení kvality potravy. Tento BA vykazuje mnoho fyziologických funkcí a je předchůdcem syntézy jiných polyaminů (spermin a spermidin) [3,25].



Obr. 10. Dekarboxylace ornitinu za vzniku putrescinu [3]

1.3.7 Spermin a spermidin

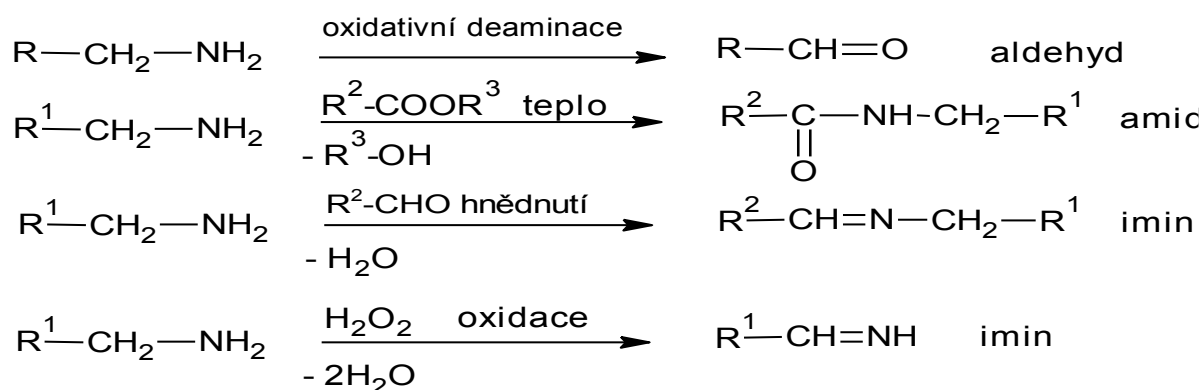
Spermin a spermidin jsou biologicky účinné polyaminy nacházející se v různých potravinách. Vznikají z putrescinu a jsou nezbytné pro růst buněk a lidské zdraví. Putrescin, který vzniká dekarboxylací ornitinu, je výchozí sloučeninou pro biosyntézu těchto polyaminů (obr. 11). Tyto reakce katalyzují spermidinsyntáza a sperminsyntáza, za účasti S-adenosyl-metioninu, a byly zaznamenány od bakterií až po savce. Tyto polyaminy hrají důležitou roli v mnoha buněčných procesech, včetně regulace transkripce a translace, kontroly aktivity iontových kanálů, modulace aktivit kinázy, účinku na buněčný cyklus, ochrany před oxidačním poškozením, stabilizace membránové struktury, podílejí se na vývoji střevní tkáně [3,9,26,27].



Obr. 11. Biosyntéza spermidinu a sperminu [3,27]

1.4 Reakce a změny biogenních aminů

Biogenní aminy jsou reaktivní látky. Enzymovými reakcemi dochází ke vzniku derivátů a jiných sloučenin jednotlivých biogenních aminů. Dalším typem reakcí, kterým podléhají aminy, jsou oxidativní deaminace na aldehydy (obr. 12). Dlouhodobým skladováním nebo za zvýšené teploty reagují s triacylglyceroly za vzniku amidů mastných kyselin. Podobně jako další aminosloučeniny vstupují do reakcí neenzymového hnědnutí, za vzniku příslušných iminů (obr. 12). Ty se tvoří také oxidací aminů peroxidem vodíku. Sekundární aminy mohou v reakcích s oxidy dusíku tvořit nitrosaminy, ty se považují za silné karcinogeny, které mohou způsobit nádorové bujení v různých orgánech a tkáních včetně plic, mozku, jater, ledvin, močového měchýře, žaludku a jícnu. S bílkovinami reagují biogenní aminy, jako je fenyletylamin, putrescin, histamin, spermidin a tyramin, za vzniku β -*N*-substituovaných derivátů diaminopropionové kyseliny [3,11,19,28].



Obr. 12. Hlavní reakce biogenních aminů [3]

1.5 Biologické účinky a toxicita

Biologicky aktivní aminy ovlivňují řadu procesů probíhajících v organismu člověka, zvířat, rostlin a mikroorganismů. Jsou také zdroji dusíku a prekurzorů pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů. Polyaminy jsou důležité pro růst, obnovu a metabolismus každého orgánu v těle [9,11].

Biogenní aminy jsou pro organismus nepostradatelné, ale ve vysokých koncentracích se mohou projevovat jako látky:

- psychoaktivní
- vazomotorické

Psychoaktivní aminy působí jako přenašeči v centrálním nervovém systému, vazoaktivní působí přímo nebo nepřímo na vaskulární systém [3,19].

Symptomy konzumace vysokých dávek biogenních aminů mohou být zvracení, dýchací potíže, pocení, bušení srdce, hypotenze nebo hypertenze a migrény. Biogenní aminy jsou odbourávány monoaminoxidázami (MAO) a diaminoxidázami (DAO), zatímco polyaminy se obvykle acetylují a poté oxidují polyaminoxidázami (PAO). Toxický účinek biogenních aminů je velice ovlivněn aktivitou těchto enzymů, která může být u jednotlivců různá a závisí na mnoha faktorech, např. na přítomnosti inhibitorů (léčiva, alkohol) nebo potenciátorů. Vysoké koncentrace biogenních aminů není schopen tento enzymový systém eliminovat. Část kapacity potřebné zejména pro detoxikaci histaminu a tyraminu odčerpávají putrescin a kadaverin, které samy o sobě nejsou rizikové, ale jejich obsah v řadě potravin bývá značný [3,12].

Při hodnocení toxického účinku je potřeba zvažovat nejen přítomnost konkrétního aminu, ale i ostatních faktorů, kterými jsou množství spotřebované potraviny, přítomnost jiných toxických látek apod. Z tohoto důvodu je velmi obtížné stanovit hranici toxicity biogenních aminů. Potenciálně nejvíce toxické aminy jsou histamin a tyramin. Nejčastější otrava jídlem bývá způsobena histaminem, je spojována s vysokou konzumací scombroidních ryb (čeleď makrelovití - *Scombridae*), jako jsou makrely nebo tuňáci [3,11,29,30].

Polyaminy spermin a spermidin plní řadu významných biologických rolí. Nejvýznamnější z nich je účast při proteosyntéze a biosyntéze nukleových kyselin, tzn. při dělení a růstu buněk. Na biologických pochodech u živočichů se podílejí polyaminy ze třech zdrojů:

- endogenní vytvářené v buňkách
- produkované mikroflórou trávicího traktu
- přijímané potravou

Zvýšený příjem potravních polyaminů je žádoucí pro urychlené hojení ran, popálenin, vývoj a obnovu střevní mukózy. U osob s nádorovým onemocněním by měl být příjem těchto polyaminů co nejnižší [3,11].

Tab. 2. Biogenní aminy, jejich prekurzory a biologický význam [3,11,19]

Biogenní amin	Původní aminokyselina	Biologický význam
histamin	histidin	lokální tkáňový hormon, snižuje krevní tlak, účast při anafylaktickém šoku a alergických reakcích
kadaverin	lyzin	stabilizace makromolekul, subcelulárních struktur (ribozomy), rostlinný hormon, zvyšuje toxicitu jiných aminů, bradykardie
putrescin	arginin (ornitin)	stabilizace makromolekul, subcelulárních struktur (ribozomy), rostlinný hormon, zvyšuje toxicitu jiných aminů
fenyletylamin	fenylalanin	prekurzor tyraminu, zvyšuje krevní tlak
tyramin	tyrozin	prekurzor dopaminu, lokální tkáňový hormon, zvyšuje krevní tlak, vliv na kontrakce hladkého svalstva, zvyšuje hladinu cukru v krvi
tryptamin	tryptofan	lokální tkáňové a rostlinné hormony, vliv na krevní tlak, peristaltiku střev, psychické funkce

Tab. 3. Toxické efekty biogenních aminů [12,29]

Biogenní amin	Potravina	Příznaky
histamin	<p>scombroidní ryby: makrela, tuňák,</p> <p>ostatní ryby: sardinky</p> <p>sýr: gouda, švýcarský, čedar</p> <p>kyselé zelí, klobásy, víno</p>	<p>gastrointestinální: nevolnost, zvracení, průjem, křeče v břiše</p> <p>neurologické: pulsující bolest hlavy, pálení v krku, svědění, slabý puls, závratě, brnění</p> <p>hemodynamické: hypotenze, dilatace kapilár</p> <p>kožní: vyrážka, kopřivka, lokalizovaný zánět</p> <p>vzácné případy: udušení, těžké respirační potíže</p>
tyramin	<p>sýr</p> <p>pivo</p> <p>víno</p>	<p>bolest hlavy, horečka, zvýšený krevní tlak, zvracení, pocení, slinění, slzení, dušnost</p>

2 BIOGENNÍ AMINY V POTRAVINÁCH

Ve všech potravinách, které obsahují bílkoviny nebo volné aminokyseliny a u nichž mohou být očekávány podmínky umožňující mikrobiální nebo biochemickou aktivitu, se dá předpokládat výskyt biogenních aminů. Celkové množství vytvořených aminů závisí na povaze potraviny, na přítomných mikroorganismech a může se měnit během výroby, zpracování, fermentace a skladování. Biogenní aminy jsou přítomny v široké škále potravin, jako jsou rybí, masné, mléčné výrobky, víno, pivo, zelenina, ovoce, ořechy a čokoláda [9,29].

Odstranění vzniklých aminů z potravin je velmi náročné. Snížení jejich koncentrace lze např. dosáhnout použitím diaminooxidázy, ale v praxi není tento způsob dekontaminace možný. K částečnému snížení množství aminů v potravinách dochází také v tepelně opracovaných výrobcích jejich reakcí s redukujícími cukry, resp. s rozkladnými produkty cukrů v Maillardových reakcích. Nejvhodnějším způsobem výroby potravin s nízkým obsahem biogenních aminů je dodržování technologických postupů a hygienických podmínek, které brání jejich vzniku [3].

2.1 Nefermentované potraviny

U nefermentovaných potravin je přítomnost biogenních aminů nad určitou úroveň považována za nežádoucí mikrobiální aktivitu. Proto je hladina aminů v potravinách použita jako indikátor mikrobiálního znehodnocení [9].

2.1.1 Ryby

Za normálních fyziologických podmínek rybí svalovina obsahuje vysoké hladiny sperminu a spermidinu a nízké hladiny histaminu a putresinu. Skombroidní (makrelovité) ryby jsou citlivé na tvorbu histaminu, protože obsahují velké množství volného histidinu. Histidin může být katabolizován dvěma způsoby. Prvním způsobem je deaminace za účelem získání kyseliny urokanové a druhým dekarboxylace na histamin. Za normálních fyziologických podmínek je deaminace hlavním katabolickým pochodem. Při vyšších teplotách je přítomnou mikroflórou dekarboxylován histidin na histamin. Skombroidní ryby jsou nejčastější příčinou intoxikace histaminem. Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 stanovuje maximální obsah histaminu v produktech rybolovu z druhů ryb spojovaných s vysokým množstvím histidinu ve výši 100 mg/kg (u rybích fermentovaných výrobků ve výši 200 mg/kg) [3,7,9,29,31].

2.1.2 Ovoce a zelenina

Hlavním biogenním aminem v ovoci a zelenině je tyramin, v menším množství se vyskytuje řada dalších aminů. U většiny ovocných džusů a nektarů převládá putrescin. Byla zjištěna vysoká množství aminů v pomerančových džusech (noradrenalin, tryptamin), rajčatech (histamin, tyramin, tryptamin), banánech (tyramin, tryptamin, serotonin), švestkách (noradrenalin, tyramin) a listech špenátu (histamin). Fenyletylamin je přirozenou složkou kakaových bobů, nachází se proto v čokoládě, čokoládových výrobcích a v cukrovinkách obsahujících čokoládu, respektive kakaovou hmotu. Některé druhy hub obsahují vysoké koncentrace fenyletylaminu. Nejčastějším druhem zeleniny obsahujícím biogenní aminy je čínské zelí a ledový salát, ty obsahují převážně polyamin spermidin [3,7,9].

2.1.3 Maso

Čerstvé a zpracované vepřové maso obsahuje vyšší hladiny adrenalinu, spermidinu a sperminu, ale nízké hladiny noradrenalinu, putrescinu, histaminu, kadaverinu a tyraminu. Při skladování masa dochází vlivem enzymové aktivity přítomné mikroflóry k růstu obsahu biogenních aminů a obsah některých z nich lze proto využít jako indikátor čerstvosti masa [3,9].

Vaření má relativně malý vliv na obsah biogenních aminů, dochází pouze k jejich částečnému vyluhování a rozkladu. V tepelně ošetřených masných výrobcích jsou spermin a spermidin jediné detekované aminy. I přesto, že jsou polyaminy odolné vůči teplu, dochází k jejich mírnému úbytku během tepelné úpravy [3,32].

2.1.4 Mléko

Obecně je obsah aminů v mléce poměrně nízký. Polyaminy spermin a spermidin jsou přirozeně přítomny v plnotučném a polotučném kravském mléce [29]. V lidském mléce byly detekovány spermin, spermidin a putrescin s velkou individuální variabilitou [9,23].

2.2 Fermentované potraviny

Při přípravě fermentovaných potravin lze očekávat přítomnost mnoha druhů mikroorganizmů, z nichž některé jsou schopny produkovat biogenní aminy. Většina produktů, ve kterých rostou bakterie mléčného kvašení, obsahuje značné množství putrescinu, histaminu, kadaverinu a tyraminu. Bakterie mléčného kvašení (BMK) fermentující potraviny se obecně považují za netoxické a nepatogenní. Při výrobě fermentovaných salámů a některých druhů

sýra obsah biogenních aminů roste. Tento nárůst je patrný především v počátečních fázích fermentace výrobků a je závislý na druhu přítomných mikroorganismů [3,9,33].

2.2.1 Sýry

Po rybách jsou sýry dalším nejčastějším typem potravin způsobujících otravu histaminem. Bylo provedeno mnoho studií pro určení obsahu aminů v různých typech sýrů. Výsledkem bylo nalezení různých biogenních aminů, jako jsou histamin, tyramin, kadaverin, putrescin a fenyletylamin. Obecně platí, že spermin a spermidin jsou přítomny na nízkých úrovních. Obsahy ostatních aminů se velmi liší v závislosti na druhu sýra, zrání, stáří a přítomných mikroorganismech. Sýry představují ideální prostředí pro produkci biogenních aminů a to nejen díky dostupným volným aminokyselinám, ale také přítomnosti dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů [9,29,34].

K obsahu biogenních aminů v sýrech přispívá několik faktorů. Za prvé, nezrající sýry obsahují méně aminů než sýry zrající. To může být způsobeno použitím pasterizovaného mléka při výrobě nezrajících sýrů nebo absencí doby zrání. Za druhé, hodnota pH může mít významný vliv na produkci biogenních aminů. Hodnota pH 5,0 je optimální pro tvorbu tyraminu a histaminu. Teplota zrání nebo skladovacího zařízení rovněž ovlivňuje produkci biogenních aminů. Při vyšších teplotách zrání nebo skladování je obsah biogenních aminů v sýrech výrazně vyšší. Posledním faktorem je koncentrace soli v sýru [7,9].

Mikroorganismy podílející se na produkci biogenních aminů mohou být součástí počáteční kultury nebo mohou být zaváděny kontaminací před, během nebo po výrobě sýra a skladování [34].

2.2.2 Fermentovaná zelenina

Fermentovaná zelenina je další skupinou potravin, kde lze předpokládat výskyt biogenních aminů, nejčastěji histaminu. Při produkci kysaného zelí dochází ke vzniku především putrescinu, který se hromadí v solném nálevu. Sójová omáčka vyrobená z fermentovaných sójových bobů obsahuje tyramin a histamin. Ve fermentovaných solených černých fazolích a krevetových omáčkách byl nalezen tyramin [7,9].

2.2.3 Fermentované masné výrobky

Nejběžnější amin, nacházející se ve fermentovaných masných výrobcích je tyramin, který se nachází ve vyšších koncentracích než ostatní aminy. Produkci biogenních aminů u této

skupiny ovlivňuje řada faktorů, včetně přítomné přírodní mikroflóry a její schopnosti dekarboxylace, výrobních procesů, druhu a jakosti masa a délky dozrávání [7]. Při fermentačním procesu se používá mnoho výchozích kultur, a ty ovlivňují obsah biogenních aminů ve fermentovaném mase. Studiemi bylo zjištěno, že počáteční kultury produkují méně biogenních aminů než přírodní mikroflóra při fermentaci [9].

2.2.4 Pivo

Pivo je dalším typem fermentované potraviny, ve které se nachází biogenní aminy, nejčastěji tyramin a histamin. Obsah aminů v pivu závisí na množství mikroorganismů ve sladině a dalších faktorech, jako je stárnutí a doba fermentace, technologie výroby, typ sladu a dalších surovin. Během alkoholového kvašení jsou kadaverin, histamin, putrescin a tyramin produkovány ve větším množství. V České republice je pivo velice oblíbené a každoroční spotřeba se pohybuje od 140 až 170 litrů na osobu. Důsledkem toho mohou být zdravotní rizika způsobená kontaminací biogenními aminy u některých spotřebitelů [7,9,35,36].

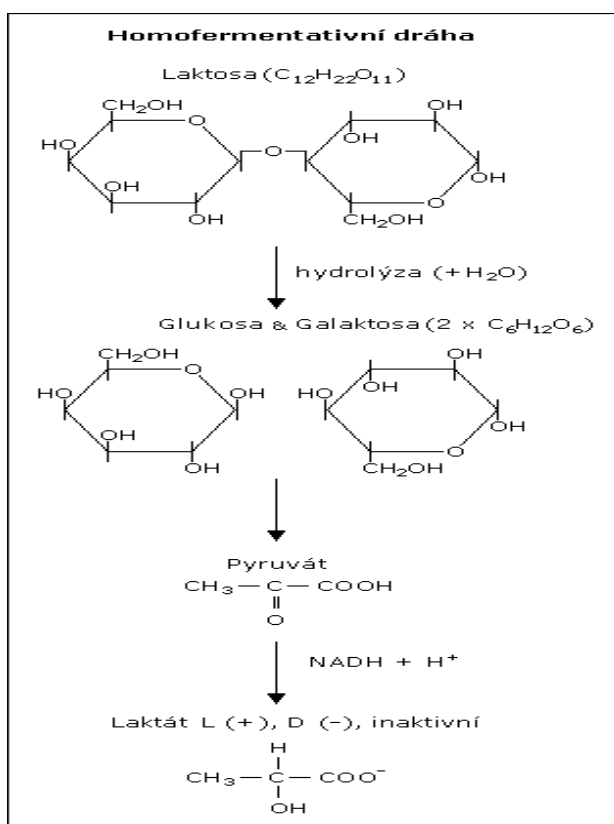
2.2.5 Víno

V červených a bílých vínech byla zjištěna přítomnost biogenních aminů, jako jsou tyramin, histamin, tryptamin, putrescin a kadaverin. Jsou tvořeny působením různých mikroorganismů v různých fázích výroby a skladování. Bílá vína obecně obsahují nižší úroveň aminů, zatímco červená vína značně víc. Vína, která obsahují 8 mg biogenních aminů v jednom litru, mohou při vyšší konzumaci způsobovat bolesti hlavy. Vznik aminů závisí na mikroflóře a aminokyselinovém složení vína po fermentaci. Aminokyselinové složení po fermentaci závisí na odrůdě hroznů, výživě vinné révy a na metabolismu kvasinek. Velmi důležitým faktorem je také pH, čím vyšší pH, tím vyšší úroveň produkovaných biogenních aminů [7,9,35,37,38].

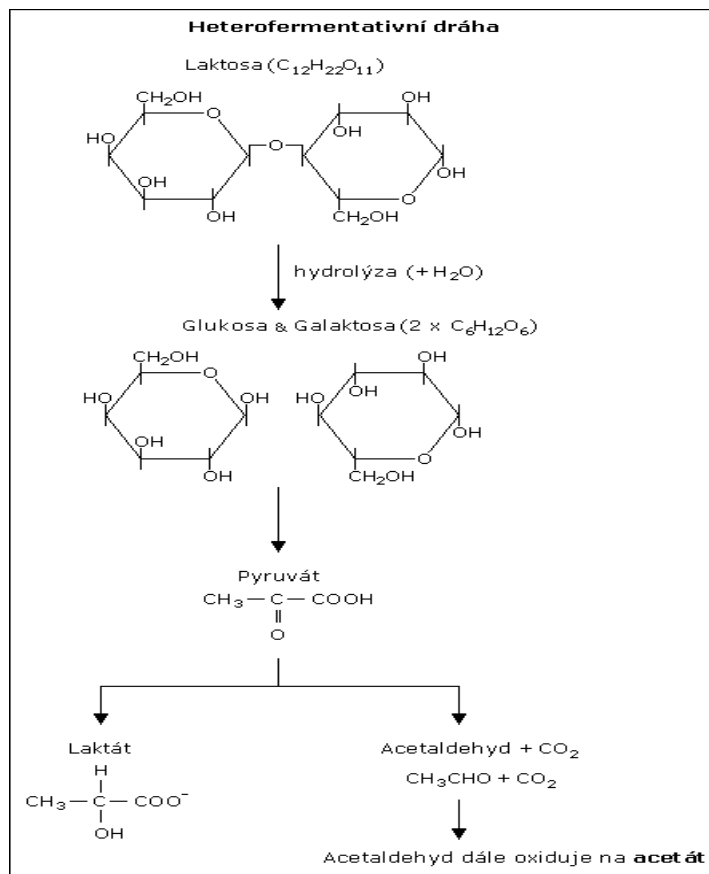
3 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Bakterie mléčného kvašení jsou skupinou, jejíž hlavní charakteristikou je produkce kyseliny mléčné jako hlavního konečného produktu během fermentace uhlohydrátů. Jedná se o gram-pozitivní, většinou nepohyblivé, kataláza negativní, nesporulující bakterie. Termín bakterie mléčného kvašení je úzce spojen s bakteriemi, které se účastní fermentace potravin a krmiv, včetně příbuzných bakterií běžně spojených s mukózními povrchy lidí a zvířat. Patří zde rody *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* a další [39,40,41].

Klasifikace bakterií mléčného kvašení do různých rodů je do značné míry založena na morfologii, způsobu fermentace glukosy, růstu při různých teplotách, konfiguraci produkované kyseliny mléčné, schopnosti růst při vysokých koncentracích soli a kyselé nebo zásadité toleranci. Podle typu metabolismu sacharidů mohou být bakterie mléčného kvašení homofermentativní (obr. 13), což primárně vede k produkci kyseliny mléčné nebo heterofermentativní (obr. 14), což vede k produkci kyseliny mléčné, CO₂ a jiných fermentačních produktů [39,40].



Obr. 13. Homofermentativní metabolická dráha
[42]



Obr. 14. Heterofermentativní metabolická dráha [42]

Bakterie mléčného kvašení jsou obecně spojeny s biotopy bohatými na živiny, jako jsou různé potravinářské produkty (mléko, maso, nápoje, zelenina), ale některé jsou také zástupci přirozené mikroflóry úst, střev a vagíny savců [40].

3.1 Rod *Lactococcus*

Jedná se o převážně užitečné bakterie izolované z mléka a z mléčných výrobků, v nichž se přirozeně vyskytují. Bakterie rodu *Lactococcus* jsou nesporetvorné, fakultativně anaerobní, homofermentativní, gram-pozitivní koky, které se mohou vyskytovat samostatně, ve dvojicích nebo v řetízích. Optimální teplota pro růst je mezi 20 - 30 °C, ale některé mohou růst i při 7 °C [39,41].

L. lactis subsp. *cremoris* a *L. lactis* subsp. *lactis* se používají jako výchozí kultury ve výrobě několika fermentovaných mléčných výrobků. Vyskytují se přirozeně v trávě, mléce a vemelech. *L. garviae* a *L. raffinolactis* byly také detekovány v trávě, syrovém mléce, slinách a kůži krav. Několik kmenů produkuje bakteriociny. Nejznámější bakteriocin je nisin produkováný *L. lactis* subsp. *lactis*, který inhibuje růst širokého rozsahu gram-pozitivních bakterií [39].

3.2 Rod *Lactobacillus*

Laktobacily jsou jedním z původních druhů bakterií mléčného kvašení. Jedná se o gram-pozitivní, nesporulující, většinou nepohyblivé, fakultativně anaerobní bakterie. Teplota růstu se pohybuje v rozmezí 2 - 53 °C, optimální teplota okolo 30 - 40 °C. Optimální hodnota pH pro růst laktobacilů je 5,5 - 6,2. V alkalických podmínkách je rychlost růstu zpomalená [39,41].

V potravinách bývají používány jako součást kultur při výrobě čtených fermentovaných potravin, jako jsou jogurty, sýry, zelí, okurky apod. Naproti tomu mohou působit jako kontaminanty znehodnocující kyselé produkty, včetně majonéz, piva a vína. Laktobacily jsou přirozenou součástí úst a zažívacího traktu lidí, mnoha savců a ptáků [39,41].

3.3 Rod *Oenococcus*

Rod *Oenococcus* zahrnuje gram-pozitivní, nesporulující, chemo-organotrofní, fakultativně anaerobní, nepohyblivé koky, které se vyskytují převážně ve dvojicích nebo v řetězcích. Jedná se o heterofermentativní bakterie, které fermentují glukózu na ekvimolární množství kyseliny mléčné, CO₂, etanolu nebo kyseliny octové. Teplota pro růst těchto bakterií se pohybuje mezi 20 - 30 °C. Pro rod *Oenococcus* je charakteristická odolnost vůči alkoholu, bakterie mohou růst v přítomnosti 5% etanolu a některé kmeny dokonce v přítomnosti 10% etanolu [39].

O. oeni se nachází v hroznovém moštu, víně a jablečném moštu. To hraje důležitou roli při výrobě některých druhů vína, při převedení kyseliny jablečné na kyselinu mléčnou (malolaktická fermentace). Tento druh sekundární fermentace přispívá k vývoji vůně, struktury a chuti vína s nízkým pH. (Buňky transportují malát ve víně a metabolizují ho na kyselinu mléčnou a CO₂. Tento proces snižuje kyselost ve víně.) [39,41].

3.4 Rod *Pediococcus*

Pediococcus je jedním z původních rodů bakterií mléčného kvašení. Jsou to gram-pozitivní, nepohyblivé, nesporulující, fakultativně anaerobní koky, které se mohou vyskytovat jednotlivě, v párech nebo v tetradách. Glukóza je fermentována pouze na kyselinu mléčnou, jedná se o homofermentativní bakterie. Optimální růstová teplota se pohybuje mezi 25 - 40 °C, ale některé kmeny mohou růst i při 50 °C [39,41].

Některé druhy mohou být přirozeně spojeny s rostlinami a ovocem. V potravinách mohou buď způsobit znehodnocení, nebo se používají jako kultury při výrobě fermentovaných produktů. *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus* a *P. dextrinicus* jsou spojeny s fermentací zelí, okurek, oliv a jiných produktů rostlinného původu. *P. damnosus* je spojován s kažením piva a vína [39,41].

3.5 Rod *Streptococcus*

Bakterie rodu *Streptococcus* jsou gram-pozitivní, nesporotvorné, nepohyblivé koky, nejčastěji se vyskytují ve dvojicích nebo v řetězcích. Buňky rostou obvykle kolem 37 °C, ale také mohou růst při 52 °C. Jsou fakultativně anaerobní a mají homofermentativní metabolismus sacharidů, při němž převládá kyselina mléčná jako finální produkt. Buňky mohou přežít pasteurizaci 60 °C po dobu 30 minut [39,41].

S. thermophilus, je široce používán jako výchozí kultura při výrobě jogurtů, fermentovaného mléka a sýrů. *S. uberis* a *S. dysgalactiae* způsobují mastitidu, kontaminují syrové mléko. Druhy skupiny "bovis" jsou přirozenou součástí střevního traktu zvířat a mají několik vlastností společných s rodem *Enterococcus* [39].

3.6 Rod *Leuconostoc*

Leuconostoc je dalším z původních rodů bakterií mléčného kvašení. Jedná se o nesporotvorné, nepohyblivé, fakultativně anaerobní, gram-pozitivní koky, nejčastěji v párech nebo řetězcích. Metabolismus sacharidů je heterofermentativní (vznik CO₂ a etanolu). Optimální růstová teplota se pohybuje okolo 20 - 30 °C. Některé kmeny jsou schopny přežít 60 °C po dobu 30 minut [39,41].

V potravinách se mohou nacházet jako kontaminanty nebo se používají jako kultury při výrobě fermentovaných potravin [39].

L. mesenteroides subsp. *cremoris* a *L. lactis* se používají jako výchozí kultury pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků. *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* hraje důležitou roli na začátku fermentace kysaného zelí a okurek. *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* hraje roli při fermentaci těsta a *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* se vyskytuje v chlebu. Některé druhy však mohou způsobit poškození nejrůznějších produktů masa, např. *L. carnosum*, *L. gasicomitatum* a *L. gelidum* [39,41].

4 KONTROLA BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH

Biogenní aminy jsou v prostředí produkovány mikroorganismy, rostlinami a zvířaty. Vykonnávají důležité fyziologické funkce, včetně řady klíčových rolí ve fyziologii eukaryotických buněk. Za normálních podmínek jsou biogenní aminy přijaté jídlem rychle detoxikovány aminooxidázami ve střevě. Tyto enzymy jsou klasifikovány jako mono- (MAO) nebo diaminoxidázy (DAO) v závislosti na počtu oxidovaných aminoskupin. Aminooxidázy (AO) jsou rozšířená skupina enzymů, přítomná ve všech živých systémech, kde kontrolují úroveň velmi aktivních sloučenin, tj. mono-, di- a polyaminů. Tyto enzymy však mají omezenou kapacitu, která nezvládne nadprůměrný příjem biogenních aminů [11,43,44].

Tvorba biogenních aminů může být řízena inhibicí mikrobiálního růstu nebo inhibicí aktivity dekarboxyláz mikrobů. Prevence tvorby biogenních aminů v potravinách se proto dosáhlo regulací teploty (nižší než 5 °C), použitím vysoce kvalitních surovin, správnou výrobní praxí, použitím fermentace, enzymů k oxidaci aminů, využitím mikrobiálního modelování k posouzení příznivých podmínek pro zpoždění tvorby biogenních aminů, ozářením a přidáváním potravinářských přídatných a konzervačních látek. Ve fermentovaných potravinách je výběr bakterií mléčného kvašení účastnicích se fermentačního procesu, převážně přizpůsoben přijetí mikrobiálních startérů postrádajících cesty k dekarboxylaci aminokyselin [43,45].

4.1 Metody zpomalování akumulace biogenních aminů

Jedná se o metody regulace biogenních aminů, které pouze zpožďují tvorbu aminů v potravinách, především prostřednictvím inhibice bakterií nebo enzymů dekarboxyláz zodpovědných za jejich tvorbu. Zahrnují především regulaci teploty pod 5 °C, použití potravinářských aditiv a konzervačních látek, ozařování, vysoký hydrostatický tlak, modelování mikroorganismů a balení [43,45].

4.1.1 Použití potravinářských přídatných a konzervačních látek

Potravinářské přídatné a konzervační látky mohou omezit tvorbu biogenních aminů v produktech, jako je makrela, inhibicí bakteriálního růstu a tím zabránit tvorbě aminů. Kyselina citronová, kyselina jantarová, D-sorbitol a kyselina jablečná inhibují dekarboxylázovou aktivitu a výslednou tvorbu histaminu u makrely skladované 10 dní při 25 °C. Bylo zjištěno, že sorban sodný a draselný, kyselina askorbová a dusičnan sodný mohou zabránit tvorbě aminů. Přídavek cukru může také mírně snížit produkci biogenních aminů v potravinách.

Nejvýznamnější úbytek byl však zjištěn při aplikaci glycinu do slaných fermentovaných sardelí, kdy došlo ke snížení produkce biogenních aminů o 63 až 73 %. Glycin se proto používá jako konzervační činidlo u různých fermentovaných rybích produktů. Aditiva a konzervační látky mohou inhibovat produkci biogenních aminů, ale u některých druhů potravin mohou naopak produkci zvyšovat, proto je nutné při volbě konzervačních látek zohlednit i možné negativní účinky [45].

4.1.2 Vysoký hydrostatický tlak

Jedná se o metodu „netepelné“ konzervace, která poškozují buněčné membrány mikroorganismů, a ty inaktivuje. Prostřednictvím inaktivace mikroorganismů vysoký hydrostatický tlak prodlužuje trvanlivost potravin a zachovává původní chuť a vlastnosti potravin. Tato metoda se používá například při konzervaci ovocných džemů a nápojů, vakuovém balení šunky, ale byla aplikována i u dalších potravin, jako jsou sýry, klobásy, kysané zelí nebo ryby. Inhibice tvorby biogenních aminů závisí na velikosti použitého tlaku. Například, během dozrávání sýra, za nízkotlakého zpracování 50 MPa po dobu 72 hodin se zvýšil obsah biogenních aminů, zatímco vysoký tlak 400 MPa po dobu 5 minut vedl k mírnému poklesu. Pro úspěšnou inhibici tvorby aminů je tedy nutné zvolit vysoký tlak [45].

4.1.3 Ozařování

I přes neochotu spotřebitelů přijímat ozařované potraviny kvůli nejistotě jejich bezpečnosti, ozařování získává popularitu jako metoda, která může účinně kontrolovat patogenní a kontaminující bakterie, viry, parazity a hmyz, stejně jako možné toxické chemické látky, například dusitany a nitrosaminy v potravinách, čímž zvyšuje jejich bezpečnost a udržuje kvalitu. Ozařování potravin bylo zavedeno s cílem prodloužit jejich trvanlivost, prodloužit skladovatelnost, zajistit jejich bezpečnost a ke snížení používaných chemických konzervačních látek. Pro ozařování potravin jsou povoleny různé dávky γ záření, v závislosti na jejich druhu a povaze. Ozařování může ovlivňovat tvorbu biogenních aminů v potravinách radiolýzou aminů nebo snížením počtu bakterií způsobující dekarboxylaci aminů. Radiolytickou degradaci lze dosáhnout až 95% degradace všech aminů. U některých druhů potravin však bylo důsledkem ozáření zaznamenáno zvýšení tvorby biogenních aminů nebo změny původní chuti [45,46].

4.1.4 Balení

Konzervace balením obvykle zahrnuje změnu plynné směsi prostředí obklopujícího výrobek. To může zpomalit produkci biogenních aminů v důsledku inhibice mikroorganismů nebo enzymů zodpovědných za produkci biogenních aminů. Ukázalo se, že enzym histidin-dekarboxyláza je více účinný v nepřítomnosti kyslíku, zatímco histaminázy (jako je např. DAO), enzymy, které oxidují histamin, byly účinné pouze v přítomnosti kyslíku. Nejčastěji se používá vakuové balení (losos) nebo balení v modifikované atmosféře (ryby, maso, klobásy). Významné jsou také tzv. aktivní obaly, obsahující různé odlučovače plynů (kyslíku, oxidu uhličitého), které mohou tyto plyny absorbovat a zabránit tak kontaktu s potravinou [45].

4.1.5 Mikrobiální modelování

Pro studium růstu a inaktivace lze použít mikrobiální modelování mikroorganismů s cílem kontrolovat růst a předpovídat rizikové faktory. K prozkoumání možného řízení tvorby aminů byly použity modelové mikroorganismy zodpovědné za jejich tvorbu. Teplota, čas a pH mají vliv na produkci biogenních aminů, a proto mohou být modelovány pro konkrétní druhy mikroorganismů ve specifických potravinách. Takové podmínky mohou pomoci omezit tvorbu biogenních aminů [45].

4.2 Starterové mikroorganismy inhibující produkci biogenních aminů

Počáteční kultury používané při fermentaci mohou rovněž zpozdit tvorbu biogenních aminů. Kultury používané pro fermentované potraviny jsou buď amin-negativní (nejsou schopné dekarboxylace aminokyseliny na biogenní aminy) nebo oxidují amin (oxidují biogenní aminy na aldehydy, hydroperoxid a amoniak). Tyto bakterie vyžadují optimální podmínky růstu, aby dominovaly nad mikroorganismy zodpovědnými za tvorbu biogenních aminů a dalšími kontaminujícími bakteriemi. Typické fermentované potraviny, kde byl studován účinek startérů na biogenní aminy, zahrnují klobásy, zelí, víno a zeleninu [45,46].

Bylo zjištěno, že řada bakterií má negativní dekarboxylázovou aktivitu nebo mají enzymy, které oxidují biogenní aminy v potravinách např. *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* jsou amin-negativní bakterie a byly navrženy jako potenciální startéry pro výrobu sýrů. Amin-negativní startéry, *Staphylococcus xylosus* a *Lactobacillus curvatus* zpomalují tvorbu putrescinu a kadaverinu při dozrávání a skladování suchých fer-

mentovaných klobás. Inokulace startérů, *Pediococcus acidilactici*, *Staphylococcus carnosus*, *S. xylosus* a *Lactobacillus sakei* do ryb uzených za studena, pomáhá kontrolovat biogenní aminy. Amin-negativní bakterie *S. carnosus*, *S. xylosus* a *Lactobacillus sakei* byly také použity během fermentace masných výrobků a bylo zjištěno, že potlačují akumulaci biogenních aminů. Smíšené startéry *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *S. xylosus*, *Lactobacillus casei* inhibovaly tvorbu biogenních aminů a potlačily kontaminující mikroorganismy ve fermentovaných rybích výrobcích [43,45].

4.2.1 Metody oxidace/degradace vytvořených biogenních aminů

Kromě existujících metod zpomalení akumulace biogenních aminů je k dispozici také několik metod, které mohou způsobit degradaci těchto sloučenin. Takové metody zahrnují použití mikroorganismů schopných oxidace biogenních aminů a enzymů (MAO, DAO). Bakterie degradující biogenní aminy mohou být zavedeny do některého kroku výroby potravin nebo mohou být použity jako startéry u fermentovaných potravin. Bakterie popsané jako degradéry biogenních aminů zahrnují např. *Kocuria varians*, *Natrinema gari*, *Brevibacterium linens*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* a *Staphylococcus xylosus* a další. Například *Brevibacterium linens* je schopna redukovat histamin až o 70 % a tyramin o 55 %. DAO je další možností pro degradaci biogenních aminů (převážně histaminu). Optimální teplota pro aktivitu DAO je 37 °C. Účinnost enzymů degradujících biogenní aminy v potravinách závisí na druhu potraviny a musí být zohledněna před použitím enzymů v konkrétních potravinách [43,45,46].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo popsat biogenní aminy, jejich vznik, strukturu, biologické účinky a toxicitu. Dalším účelem bylo poukázat na výskyt aminů v potravinách, charakterizovat bakterie mléčného kvašení a popsat možné způsoby řízení biogenních aminů v potravinách.

Cílem praktické části bylo pozorovat schopnost vybraných bakterií využívaných v mlékařství růst v přítomnosti biogenních aminů, v závislosti na koncentraci možných zdrojů uhlíku a dusíku. Hlavním účelem praktické části pak bylo ověřit schopnost degradace biogenních aminů vybranými bakteriemi pomocí HPLC.

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Ověření schopnosti růstu vybraných bakterií využívaných v mlékařenství v minerálním médiu s biogenními aminy

6.1.1 Použité mikroorganismy

V bakalářské práci byly na schopnost degradace biogenních aminů testovány následující bakterie (tab. 4). Tyto bakterie byly získány ze Sbírký mlékařenských mikroorganismů Laktoflora (CCDM).

Tab. 4. Seznam použitých kmenů

Testovaný kmen – kultivační podmínky
<i>Lactobacillus casei</i> CCDM 422 MRSC, 37 °C, AN
<i>Lactobacillus casei</i> CCDM 650 - MRSC, 37 °C, AN
<i>Lbc. casei</i> subsp. <i>casei</i> CCDM 145 - MRSC, 30 °C, AN
<i>Lbc. casei</i> subsp. <i>casei</i> CCDM 198 - MRSC, 37 °C, AN
<i>Lbc. casei</i> subsp. <i>casei</i> CCDM 802 - MRS, 37 °C, AN
<i>Lbc. hilgardii</i> CCDM 828 - MRS, 30 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 147 - MRS, 37 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 178 - MRS, 30 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 181 - MRS, 30 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 182 - MRS, 30 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 183 - MRS, 37 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 184 - MRS, 30 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 185 - MRS, 30 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 186 - MRS, 30 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 187 - MRS, 30 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 188 - MRS, 37 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 189 - MRS, 30 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 191 - MRS, 30 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 194 - MRS, 30 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 195 - MRS, 30 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 196 - MRS, 30 °C, AN

<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 336 - MRSC, 37 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 375 - MRS, 37 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 381 - MRS, 30 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 383 - MRS, 30 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 384 - MRS, 30 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 385 - MRS, 30 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 387 - MRS, 30 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 388 - MRS, 30 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 391 - MRS, 30 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 535 - MRS, 30 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 583 - MRS, 30 °C, AN
<i>Lbc. plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i> CCDM 383 - MRSC, 30 °C, AN
<i>Lbc. sakei</i> subsp. <i>carneus</i> CCDM 776 - MRSC, 30 °C, AN
<i>Lbc. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> CCDM 339 - MRSC, 37 °C, AN
<i>Pediococcus acidilactici</i> CCDM 595 - MRSC, 37 °C
<i>Pediococcus acidilactici</i> CCDM 814 - MRSC, 37 °C
<i>Pediococcus inopinatus</i> CCDM 829 - MRSC, 30 °C
<i>Pediococcus pentosaceus</i> CCDM 862 - MRSC, 30 °C
<i>Pediococcus</i> sp. CCDM 395 - MRSC, 30 °C
<i>Pediococcus</i> sp. CCDM 396 - MRSC, 30 °C
<i>Brevibacterium linens</i> CCDM 96 - MPA, 23 °C
<i>Brevibacterium linens</i> CCDM 97 - MPA, 23 °C
<i>Brevibacterium linens</i> CCDM 99 - MPA, 23 °C
<i>Brevibacterium linens</i> CCDM 200 - MPA, 23 °C
<i>Brevibacterium linens</i> CCDM 201 - MPA, 23 °C
<i>Brevibacterium linens</i> CCDM 203 - MPA, 23 °C
<i>Brevibacterium linens</i> CCDM 980 - MPA, 23 °C
<i>Brevibacterium linens</i> CCDM 1010 - MPA, 23 °C
<i>Brevibacterium linens</i> CCDM 1052 - MPA, 23 °C
<i>Micrococcus luteus</i> CCDM 231 - MPA, 30 °C
<i>Micrococcus</i> sp. CCDM 207 - MPA, 30 °C
<i>Kocuria rosea</i> CCDM 204 - MPA, 30 °C

<i>Kocuria rosea</i> CCDM 205 - MPA, 30 °C
--

MRS, MRSC, MPA – kultivační médium (viz kapitola 6. 2. 2)

AN – anaerobní kultivace

6.1.2 Kultivační média

U vybraných bakterií byl pozorován růst v pěti různých minerálních médiích. Každé z médií se skládalo ze dvou připravených, sterilních roztoků a přidavku roztoku vitaminů. Jednotlivé roztoky byly sterilně seskupeny spolu s vitaminy do minerálního média. Médium bylo sterilně rozpipetováno do sterilních zkumavek.

➤ Minerální médium 1

- Roztok A:

Roztok A byl připraven navážením příslušného množství jednotlivých složek (všechny Penta, Praha) a jejich rozpuštěním ve 100 ml destilované vody. Takto připravený roztok byl autoklávován.

NaCl	0,5 g
Na ₂ HPO ₄	3 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
Na ₂ SO ₄	0,0065 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g

- Roztok B

Roztok B byl připraven navážením příslušného množství jednotlivých složek (soli - Penta, Praha, ostatní složky Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a jejich rozpuštěním ve 400 ml destilované vody. Pomocí HCl bylo upraveno pH na hodnotu 6,8 a roztok byl autoklávován.

MgCl	0,1 g
CaCl ₂	0,005 g
FeCl ₃ · 7H ₂ O	0,0003 g
Tween 20	0,5 g
Glukóza	2,5 g
Octan sodný	1 g
Asparagin	0,04 g

Tyramin	1 g
Putrescin	1 g
Kadaverin	1 g
Histamin	1 g
Fenyletylamin	1 g
Tryptamin	1 g

Minerální médium 1 vzniklo sterilním převedením roztoku A do roztoku B. K takto vzniklému sterilnímu médiu bylo sterilně přidáno 5 ml 100x koncentrovaného roztoku vitaminů. Médium bylo sterilně rozpipetováno do zkumavek po 7 ml.

➤ Minerální médium 2

• Roztok C

Roztok C měl stejné složení jako roztok A s výjimkou:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g

• Roztok D

Stejné složení jako roztok B s výjimkou:

Glukóza 1,25 g

Octan sodný 0,5 g

Asparagin 0,02 g

➤ Minerální médium 3

• Roztok E

Stejné složení jako roztok A s výjimkou:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,25 g

• Roztok F

Stejné složení jako roztok B s výjimkou:

Glukóza 0,5 g

Octan sodný 0,25 g

Asparagin 0,02 g

Riboflavin	10mg
Kyselina nikotinová	10mg
Tyamin	10mg
Kyselina pantothenová	10mg
Pyridoxal	20mg

➤ Fyziologický roztok

K přípravě fyziologického roztoku byl použit chlorid sodný (Penta) rozpuštěním 8,5 g v 1000 ml destilované vody. Roztok byl pipetován do zkumavek po 4,5 ml a sterilován v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

6.1.3 Příprava bakterií pro ověření schopnosti růstu v přítomnosti biogenních aminů

Každý testovaný kmen byl pomocí sterilních kliček asepticky převeden z tuhé půdy do zkumavky se sterilním fyziologickým roztokem, tak byla vytvořena suspenze mikroorganismů. Z takto připravených suspenzí bylo sterilně odpipetováno 50 µl do jednotlivých zkumavek všech variant minerálních médií.

Zkumavky (vzorky) byly kultivovány aerobně/anaerobně při teplotách 23, 30 a 37 °C v závislosti na požadavcích a toleranci daných kmenů bakterií dle doporučení poskytovatele kultury. Poté byl během 14 dnů vyhodnocen růst jednotlivých kmenů vybraných bakterií. Schopnost růstu v minerálním médiu byla hodnocena intenzitou zákalu buněčné suspenze.

6.2 Ověření schopnosti degradace biogenních aminů vybranými kmeny bakterií využívaných v mlékárenství pomocí chromatografie

6.2.1 Použité mikroorganismy

Pro sledování degradace biogenních aminů byly použity vybrané kmeny bakterií využívaných v mlékárenství uvedené v tabulce 4 v podkapitole 6.1.1.

6.2.2 Kultivační média

Degradace byla pozorována v diagnostickém médiu dané skupiny bakterií s biogenními aminy a v polovičním diagnostickém médiu s biogenními aminy.

- 10x koncentrovaný roztok biogenních aminů

Zásobní roztok biogenních aminů byl připraven navážením příslušného množství jednotlivých biogenních aminů (všechny Sigma-Aldrich) a jejich rozpuštěním v 600 ml destilované vody.

Tyramin	12 g
Putrescin	12g
Kadaverin	12 g
Histamin	12 g
Fenyletylamin	12 g

- MRS bujón

MRS bujón byl připraven navážením 68,94 g půdy MRS broth (HiMedia, Bombai, Indie) a jejím rozpuštěním v roztoku, který vznikl smísením 1125 ml vody a 125 ml 10x koncentrovaného roztoku biogenních aminů.

- MRSC bujón

MRSC bujón byl připraven navážením 46,88 g MRS broth (HiMedia) a 1,7 g NaHCO₃ (Lach-Ner, Neratovice) a jejich rozpuštěním v 765 ml destilované vody a 85 ml 10x koncentrovaného roztoku biogenních aminů.

- MPB bujón

Byl připraven navážením 1,35 g masového výtažku (beef extract; HiMedia), 2,25 g peptonu (HiMedia) a 1,35 g chloridu sodného (Penta) a rozpuštěním ve 405 ml destilované vody a 45 ml 10x koncentrovaného roztoku biogenních aminů.

- M17

Byl připraven navážením 2,96 g půdy M17 (HiMedia) a rozpuštěním v 63 ml destilované vody s přidávkou 7 ml zásobního roztoku biogenních aminů.

- ½ MRS bujón

Byl připraven stejně jako MRS bujón s výjimkou navážky MRS broth (HiMedia), která byla snížena o polovinu, tj. 34,47g.

➤ ½ MRSC bujón

Byl připraven stejně jako MRSC bujón s výjimkou navážky MRS broth (HiMedia) a NaHCO_3 (Lach-Ner), jež byly sníženy o polovinu.

➤ ½ MPB bujón

Byl připraven stejně jako MPB bujón s výjimkou navážek, které byly sníženy na polovinu.

➤ ½ M17 bujón

Byl připraven stejně jako M17 bujón s výjimkou navážky půdy M17 (HiMedia), ta byla snížena o polovinu.

U všech takto připravených médií s biogenními aminy bylo pomocí koncentrované HCl (Lach-Ner) upraveno pH na hodnotu asi 6,5. Poté byla média rozplněna do skleněných zkumavek po 7 ml a sterilizována.

6.2.3 Příprava a odběr vzorků

Degradace byla sledována u 24 a 48 hodinových kultur, při podmínkách kultivace doporučených dodavatelem kultur (Sbírka mlékařských mikroorganismů Laktoflora) s ohledem na optimum a toleranci (požadavky) jednotlivých kmenů (kultivační půda, teplota, aerobní/anaerobní prostředí). Každý kmen byl v daném médiu kultivován paralelně v 6 zkumavkách. Celkem tedy byly kmeny pomnoženy ve 324 zkumavkách s bujónem a biogenními aminy a v 324 zkumavkách s ½ médiem a biogenními aminy. Odběrové časy byly vždy po 24 a 48 hodinách. Odběry byly provedeny ve stanovených časech ve 3 paralelních zkumavkách.

Vzorky byly centrifugovány (4600 otáček/min., 7 minut) a z každé zkumavky bylo odebráno do dvou eppendorfkových mikrozkušavek 650 μl supernatantu a přidáno 650 μl kyseliny chloristé (Sigma-Aldrich) o koncentraci 1,2 mol/l. Takto připravené vzorky byly zamrazeny a připraveny pro následnou derivatizaci.

6.2.4 Derivatizace vzorků

Ke každému vzorku supernatantu bylo přidáno 100 μl 1,7-heptandiaminu (Sigma-Aldrich) v koncentraci 500 mg/l jako interního standardu. Následně byl 1 ml vzorku odpipetován do derivatizační nádoby a přidáno 1,5 ml karbonátového pufru o pH 11,1 - 11,2. Ke vzorku bylo přidáno 2 ml čerstvě připraveného roztoku danzylchloridu (Sigma-Aldrich) o koncentraci 5 g/l v acetonu (Merck, Darmstadt, SRN). Derivatizační nádoba byla dobře uzavřena

a nechala se třepat v temnu 20 hodin. Poté bylo ke vzorku přidáno 200 μ l prolinu (Sigma-Aldrich) a vzorky byly třepány další hodinu. Následně byly ke vzorku přidány 3 ml heptanu (Merck) a po pečlivém uzavření byly vzorky třepány 3 minuty ručně. Poté byl odpipetován 1 ml heptanové vrstvy do vialky. Obsah vialky byl odpařen při teplotě 60 °C do sucha pod proudem dusíku a suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich). Vialky byly uchovávány v mrazicím zařízení při teplotách -18 °C do doby analýzy.

6.2.5 Chromatografické stanovení biogenních aminů

Bezprostředně před analýzou byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 μ m.

Separace byly provedeny gradientovou elucí (voda/acetonitril) na koloně Agilent Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 s parametry 50 x 3,0 mm, pórovitost 1,8 μ m (Agilent, Paolo Alto, USA) při teplotě 30 °C, průtok kolonou byl nastaven na 0,453 ml/min. Chromatografický systém Dionex HPLC UltiMate 3000 byl tvořen odplyňovací jednotkou (degaserem), binární pumpou, autosamplerem, termostatem kolon a UV/VIS detektorem (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Detekce probíhala pomocí UV/VIS detektoru při vlnové délce 254 nm. Chromatogramy byly vyhodnoceny pomocí softwaru Chromeleon™ 6.8.

Program gradientové eluce, kterým probíhala separace dansylderivátů biogenních aminů, je znázorněn v tabulce 6.

Tab. 6. Gradientový eluční program pro HPLC

Čas (min)	10% Acetonitril (%)	100% Acetonitril (%)
0,1	36	64
1,4	28	72
3,5	15	85
4,0	0	100
9,0	0	100
11,5	36	64
15,5	36	64

7 VÝSLEDKY

7.1 Schopnost růstu vybraných bakterií využívaných v mlékárenství v minerálních médiích s biogenními aminy

V pěti minerálních médiích (viz kapitola 6.1.2) rozdílného složení byla pozorována schopnost vybraných kmenů (tab. 4) růst v přítomnosti biogenních aminů. Jednotlivé varianty minerálních kultivačních médií se lišily v koncentracích možných zdrojů uhlíku a dusíku pro testované kmeny bakterií. Tabulka č. 7 znázorňuje dosažené výsledky tohoto skriningového experimentu. Kmeny, u nichž byla pozorována schopnost růstu, byly v tabulce označeny znakem „+“. Kmeny, jež nebyly schopny růstu, byly označeny znakem „-“.

Z tabulky 7 je patrné, že pouze 4 kmeny byly schopny růst ve všech variantách minerálních médií za daných podmínek. Jednalo se o kmeny *Lactobacillus plantarum* CCDM 178, *L. plantarum* CCDM 181, *L. plantarum* CCDM 189 a *Pediococcus acidilactici* CCDM 814. U kmenů *L. plantarum* CCDM 182, *L. plantarum* CCDM 183, *L. plantarum* CCDM 391 a *Pediococcus* sp. CCDM 396 byl pozorován růst v minerálních médiích 2, 3, 4 a 5. Ostatní kmeny sledovaných bakterií nebyly v námi testovaných podmínkách aktivní.

Tab. 7. Vyhodnocení schopnosti růstu bakterií v přítomnosti biogenních aminů

CCDM	MM5	MM4	MM3	MM2	MM1
<i>Lactobacillus casei</i> CCDM 422	-	-	-	-	-
<i>L. casei</i> CCDM 650	-	-	-	-	-
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> CCDM 145	-	-	-	-	-
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> CCDM 198	-	-	-	-	-
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> CCDM 802	-	-	-	-	-
<i>L. hilgardii</i> CCDM 828	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 147	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 178	+	+	+	+	+
<i>L. plantarum</i> CCDM 181	+	+	+	+	+
<i>L. plantarum</i> CCDM 182	+	+	+	+	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 183	+	+	+	+	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 184	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 185	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 186	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 187	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 188	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 189	+	+	+	+	+

<i>L. plantarum</i> CCDM 191	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 194	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 195	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 196	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 336	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 375	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 381	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 383	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 384	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 385	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 387	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 388	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 391	+	+	+	+	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 535	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> CCDM 583	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> s. <i>argenter.</i> CCDM 383	-	-	-	-	-
<i>L. sakei</i> subsp. <i>carneus</i> CCDM 776	-	-	-	-	-
<i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> CCDM 339	-	-	-	-	-
<i>Pediococcus acidilactici</i> CCDM 595	-	-	-	-	-
<i>P. acidilactici</i> CCDM 814	+	+	+	+	+
<i>P. inopinatus</i> CCDM 829	-	-	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i> CCDM 862	-	-	-	-	-
<i>Pediococcus</i> sp. CCDM 395	-	-	-	-	-
<i>Pediococcus</i> sp. CCDM 396	+	+	+	+	-
<i>Brevibacterium linens</i> CCDM 96	-	-	-	-	-
<i>B. linens</i> CCDM 97	-	-	-	-	-
<i>B. linens</i> CCDM 99	-	-	-	-	-
<i>B. linens</i> CCDM 200	-	-	-	-	-
<i>B. linens</i> CCDM 201	-	-	-	-	-
<i>B. linens</i> CCDM 203	-	-	-	-	-
<i>B. linens</i> CCDM 980	-	-	-	-	-
<i>B. linens</i> CCDM 1010	-	-	-	-	-
<i>B. linens</i> CCDM 1052	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> CCDM 231	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus</i> sp. CCDM 207	-	-	-	-	-
<i>Kocuria rosea</i> CCDM 204	-	-	-	-	-
<i>K. rosea</i> CCDM 205	-	-	-	-	-

7.2 Chromatografické stanovení úbytku biogenních aminů působením vybraných mlékářenských bakterií

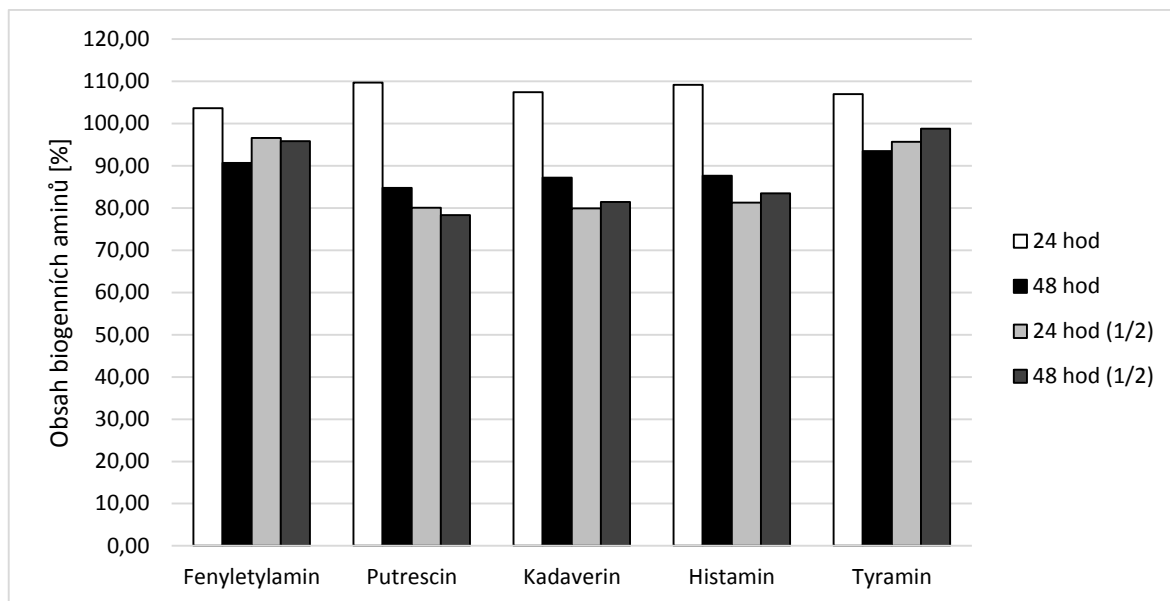
Byla sledována degradace 5 biogenních aminů (FEM - fenyletylamin, PUT - putrescin, KAD - kadaverin, HIM - histamin, TYM - tyramin) pomocí vybraných bakterií v závislosti na čase (24 hodin, 48 hodin) a obsahu živin. Úbytek biogenních aminů byl srovnáván s kontrolou, což byl příslušný bujón s biogenními aminy, který nebyl zaočkován bakteriemi.

Výsledky schopnosti degradace kmenů, kdy nedošlo v žádné z varianty médií po 24 a 48 hodinách k úbytku biogenních aminů vyššímu než 20 % jsou uvedeny v Příloze P I. Jednalo se o kmeny *Lactobacillus casei* CCDM 650, *L. casei* subsp. *casei* CCDM 145, *L. plantarum* CCDM 184, *L. plantarum* CCDM 381, *L. plantarum* CCDM 383, *L. plantarum* CCDM 384, *L. plantarum* CCDM 387, *L. plantarum* CCDM 535, *L. plantarum* CCDM 583, *L. sakei* subsp. *carneus* CCDM 776, *L. sakei* subsp. *sakei* CCDM 339, *Pediococcus acidilactici* CCDM 595, *P. acidilactici* CCDM 814, *Brevibacterium linens* CCDM 200, *B. linens* CCDM 980, *Micrococcus luteus* CCDM 231 a *Micrococcus* sp. CCDM 207.

7.2.1 Degradace biogenních aminů kmeny *Lactobacillus casei*

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus casei* CCDM 422

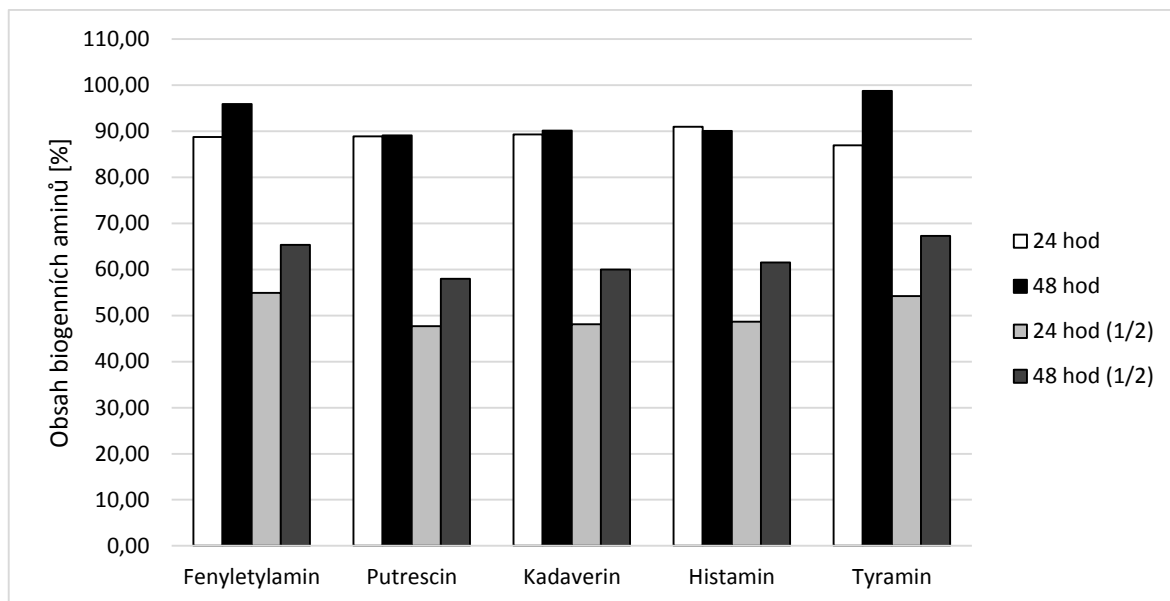
Z obrázku 15 je patrné, že kmen *Lactobacillus casei* CCDM 422 byl schopen nejlépe degradovat putrescin, a to v polovičním médiu po 48 hodinové kultivaci. Koncentrace putrescinu v polovičním médiu poklesla za 24 hodin na hodnotu 80 % a po dalších 24 hodinách klesla ještě o 2 %. Kadaverin a histamin byly rovněž lépe redukovány v polovičním médiu s biogenními aminy, kdy jejich koncentrace poklesla po 24 hodinách o 20 %. Nejmenší úbytek byl zaznamenán u biogenního aminu tyraminu, který byl redukován maximálně o 8 % a to po 48 hodinové kultivaci v optimálním médiu.



Obr. 15. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus casei* CCDM 422

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198

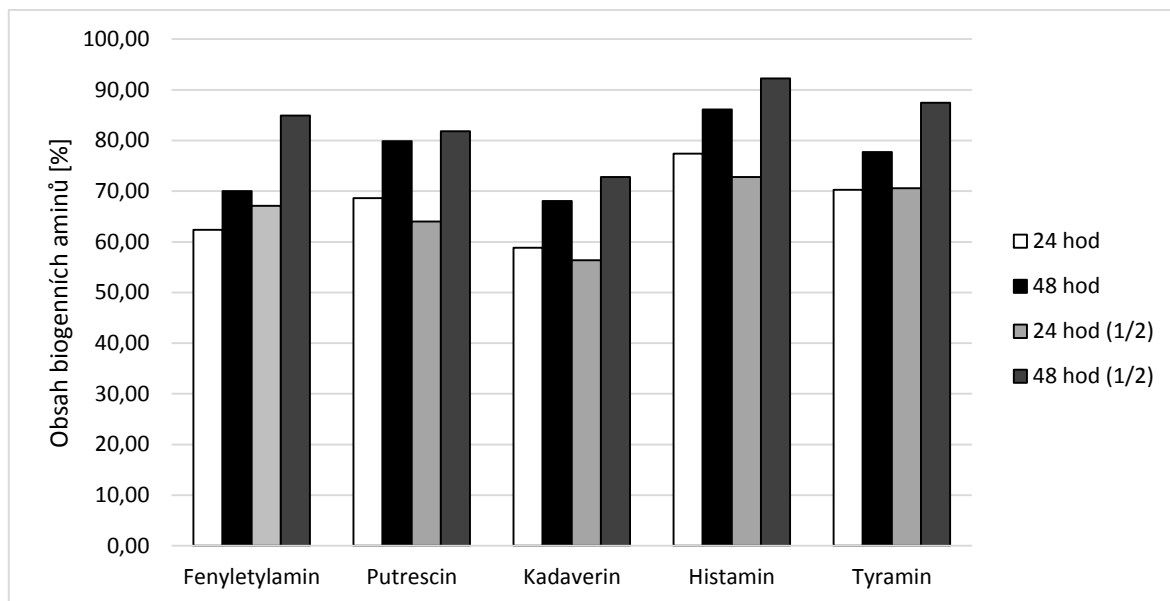
U kmene *L. casei* subsp. *casei* CCDM 198 byl pozorován jeden z největších úbytků (obr. 16). Této bakterii nejvíce vyhovovalo poloviční médium s biogenními aminy a doba kultivace 24 hodin. Za těchto podmínek došlo ke snížení koncentrace putrescinu, kadaverinu a histaminu o více než 50 %. Degradace fenyletylaminu a tyraminu byla za stejných podmínek o několik procent nižší, ale také se pohybovala okolo 50 %. Úbytek biogenních aminů v optimálním médiu se ani zdaleka nepřiblížil úbytku v polovičním médiu, kdy došlo k poklesu pouze na hodnotu okolo 90 %. Z celkového hlediska byl kmen schopen nejvíce redukovat putrescin a nejméně tyramin.



Obr. 16. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus casei subsp. casei* CCDM 198

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus casei subsp. casei* CCDM 802

Obrázek 17 znázorňuje degradaci biogenních aminů kmenem *L. casei subsp. casei* CCDM 802. Je zřejmé, že tento kmen byl schopen nejlépe redukovat množství kadaverinu, kdy po 24 hodinové kultivaci poklesla koncentrace kadaverinu o 40 % v optimálním médiu a o 45 % v polovičním. Fenyletylamin byl kmenem redukován na 70 % po 48 hodinové kultivaci v optimálním médiu. Nejmenší pokles byl pozorován u histaminu, jehož obsah poklesl maximálně o 30 %, a to v polovičním médiu po 24 hodinové kultivaci.

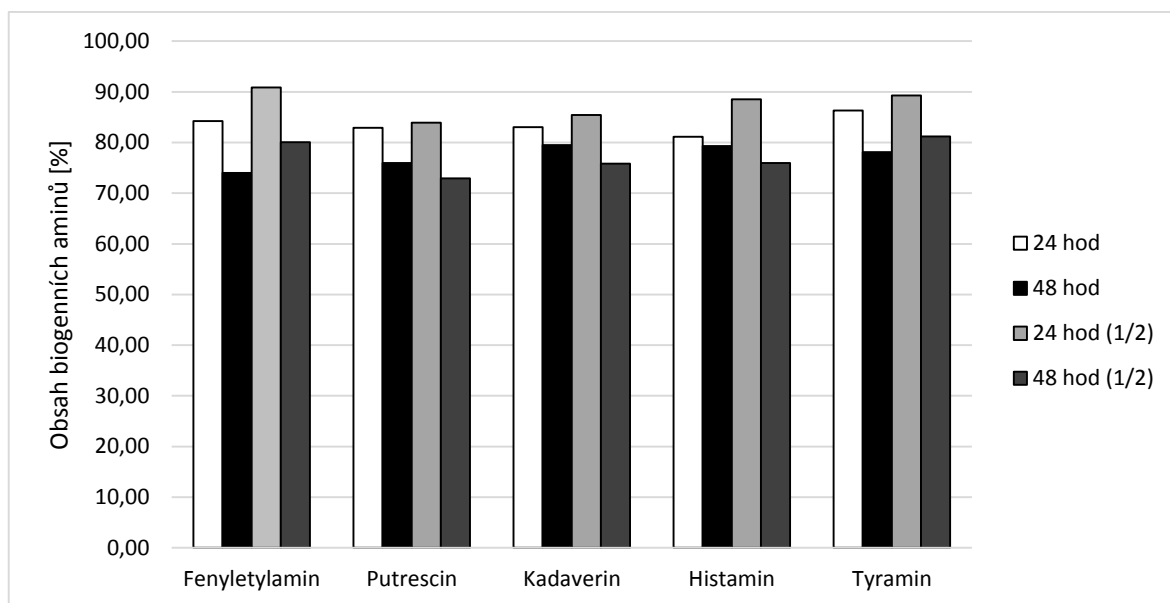


Obr. 17. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus casei subsp. casei* CCDM 802

7.2.2 Degradace biogenních aminů kmeny *Lactobacillus plantarum*

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 147

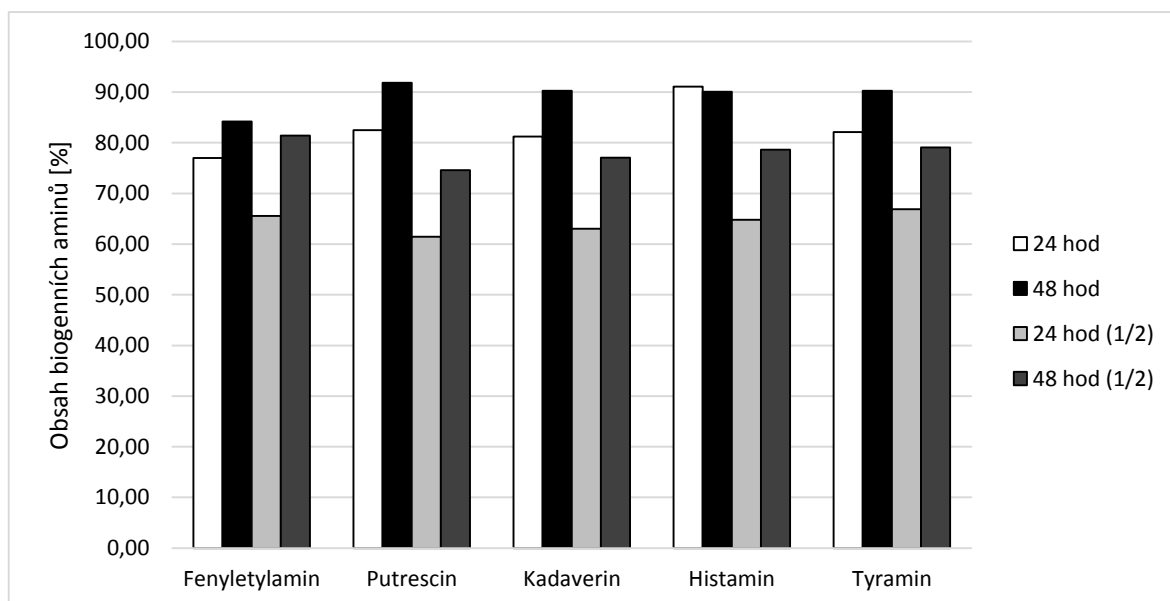
Z obrázku 18 je patrné, že k velkému úbytku sledovaných biogenních aminů, působením kmene *L. plantarum* CCDM 147 nedošlo. Po 24 hodinové kultivaci byly všechny aminy redukovány na přibližně stejnou hodnotu, která se pohybovala mírně nad hranicí 80 %. K největšímu úbytku došlo u fenyletylaminu a putrescinu, kdy fenyletylamin byl po 48 hodinách v optimálním médiu (MRS) zredukován o jednu čtvrtinu a putrescin po 48 hodinách v polovičním médiu o 27 %.



Obr. 18. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 147

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 178

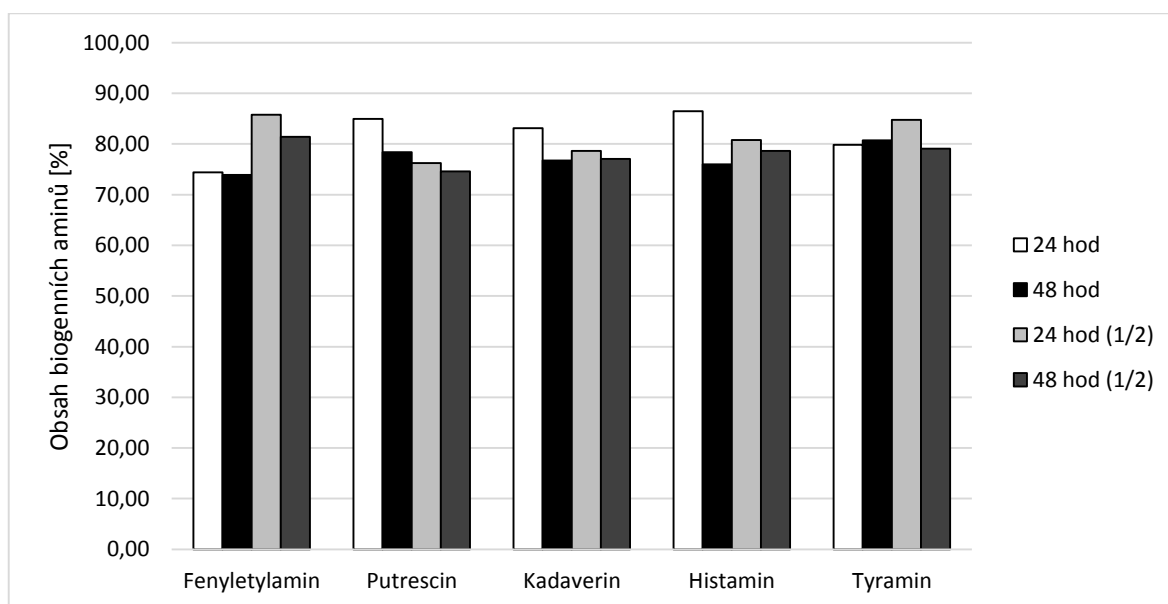
Kmen *L. plantarum* CCDM 178 byl schopen nejvíce degradovat aminy po 24 hodinové kultivaci v polovičním médiu (obr. 19). Za těchto podmínek poklesl fenyletylamin, histamin a tyramin na 65 %, putrescin a kadaverin na 60 %. Po 24 hodinách kultivace došlo k největšímu úbytku fenyletylaminu a to o 18 %. Nejmenší úbytek v optimálním médiu (MRS) byl zjištěn u histaminu, který byl redukován pouze o 10 % (po 24 i 48 hodinách).



Obr. 19. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 178

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 181

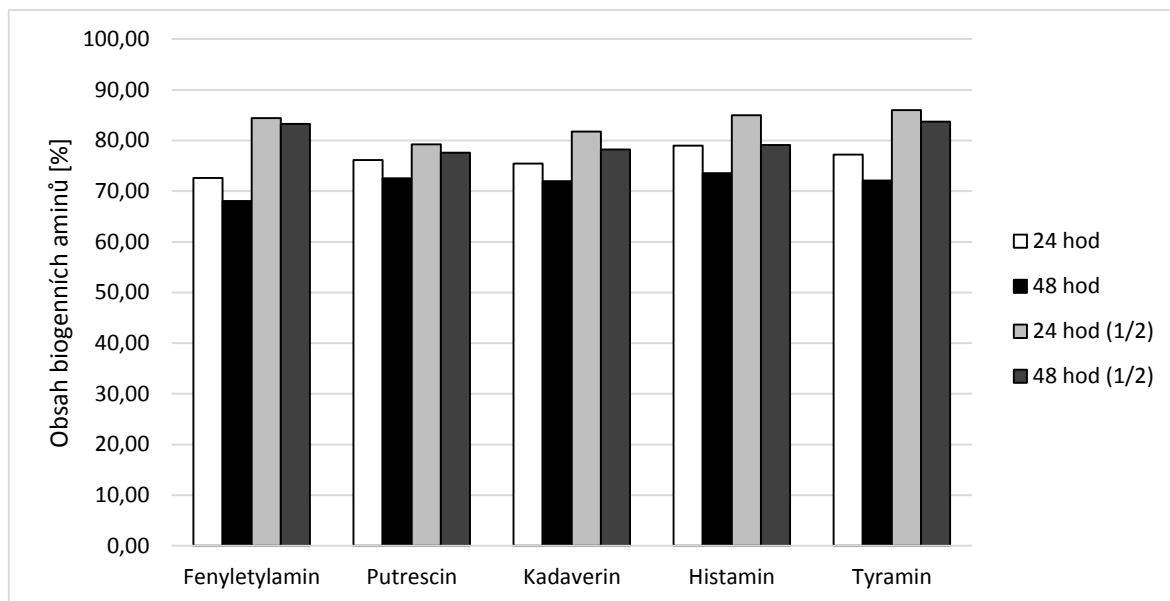
Obrázek 20 znázorňuje schopnost kmene *L. plantarum* CCDM 181 degradovat sledované biogenní aminy. Je patrné, že pro redukci fenyletylaminu kmene vyhovovalo spíše optimální médium, kdy došlo k jeho úbytku o 25 %, kdežto u polovičního média došlo k menšímu úbytku. Na druhou stranu, při kultivaci kmene v polovičním médiu došlo k vyššímu úbytku putrescinu než při kultivaci v optimálním médiu. Největší úbytek histaminu byl zjištěn po 48 hodinové kultivaci kmene v optimálním médiu a činil 75 % z původní koncentrace.



Obr. 20. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 181

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 182

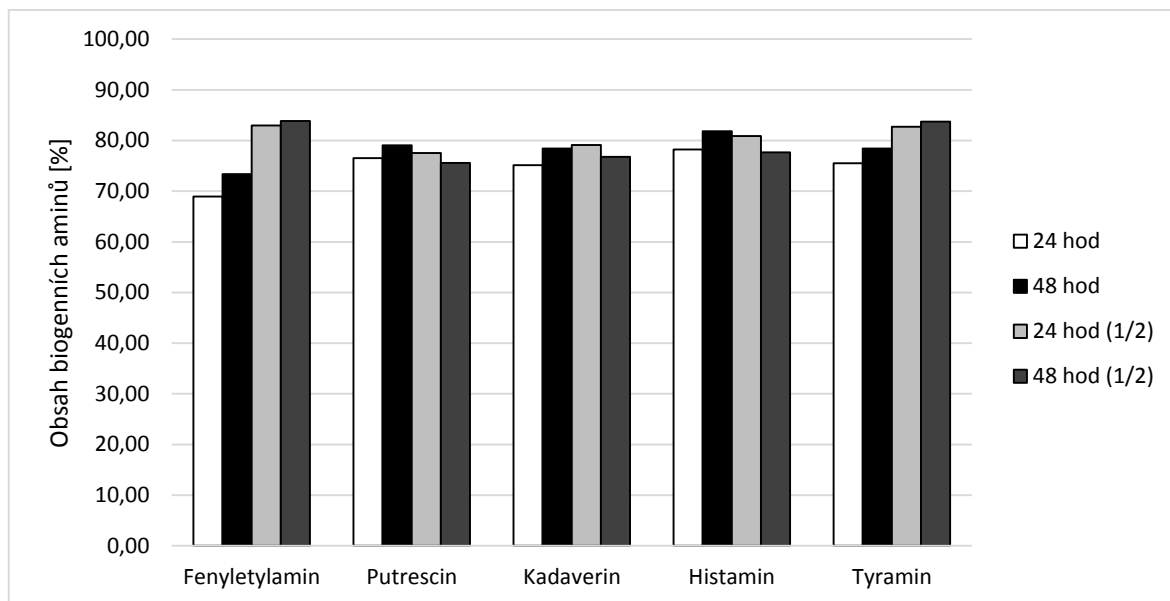
Z obrázku 21 je patrné, že kmen *L. plantarum* CCDM 182 degradoval sledované biogenní aminy lépe v optimálním médiu. V polovičním médiu byla schopnost tohoto kmene degradovat aminy horší. Největší úbytek byl pozorován u fenyletylaminu po 48 hodinové kultivaci v optimálním médiu, který byl okolo jedné třetiny. Degradace putrescinu, kadaverinu a tyraminu po 24 a 48 hodinách v optimálním médiu byla velice podobná. Koncentrace těchto aminů bylo mezi 24 a 48 hodinou snížena o dalších 5 %. Histamin byl ze všech sledovaných aminů nejméně degradován, ale jeho úbytek nebyl výrazně nižší než u ostatních aminů.



Obr. 21. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 182

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 183

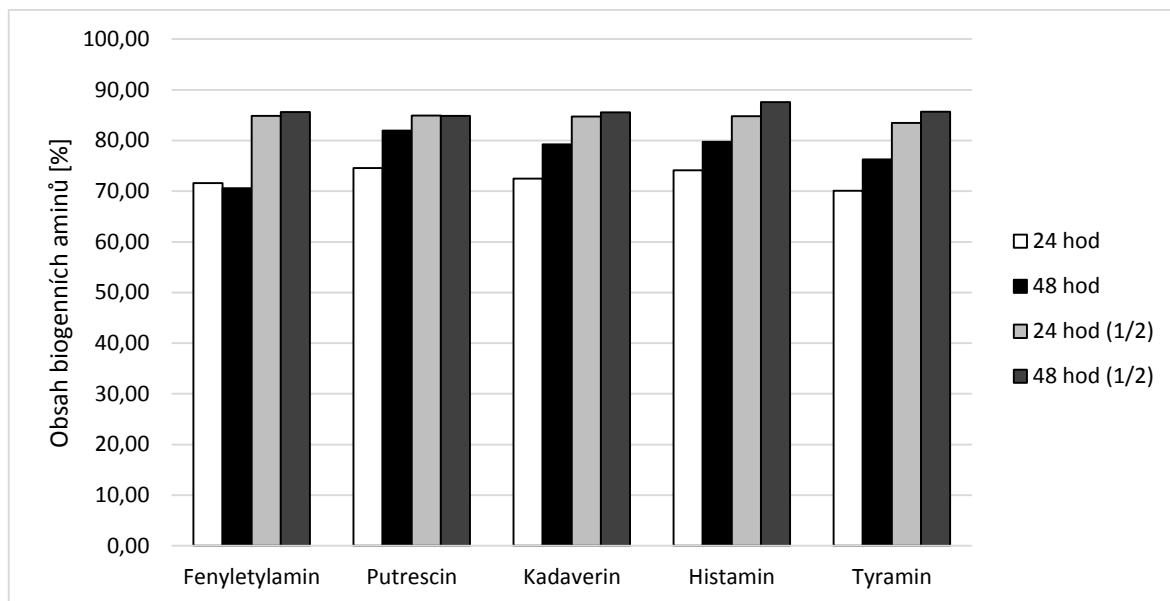
Sledovaný kmen *L. plantarum* CCDM 183 byl ze všech aminů schopen nejvíce redukovat množství fenyletylaminu a to po 24 hodinové kultivaci v optimálním médiu (obr. 22). Koncentrace fenyletylamin byla po 24 hodinách nižší o cca jednu třetinu. Úbytek fenyletylaminu v polovičním médiu byl značně menší než u optimálního média. Putrescin a kadaverin byly kmenem degradovány velice podobně. Koncentrace těchto aminů při všech sledovaných podmínkách klesla o 25 - 22 %. Histamin byl lépe degradován v polovičním médiu, kdy jeho koncentrace po 24 hodinách klesla o 20 % a dalších 24 hodinách ještě o 4 %. Tyramin byl lépe redukován v optimálním médiu po 24 hodinové kultivaci, kdy došlo k poklesu koncentrace na 75 %.



Obr. 22. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 183

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 185

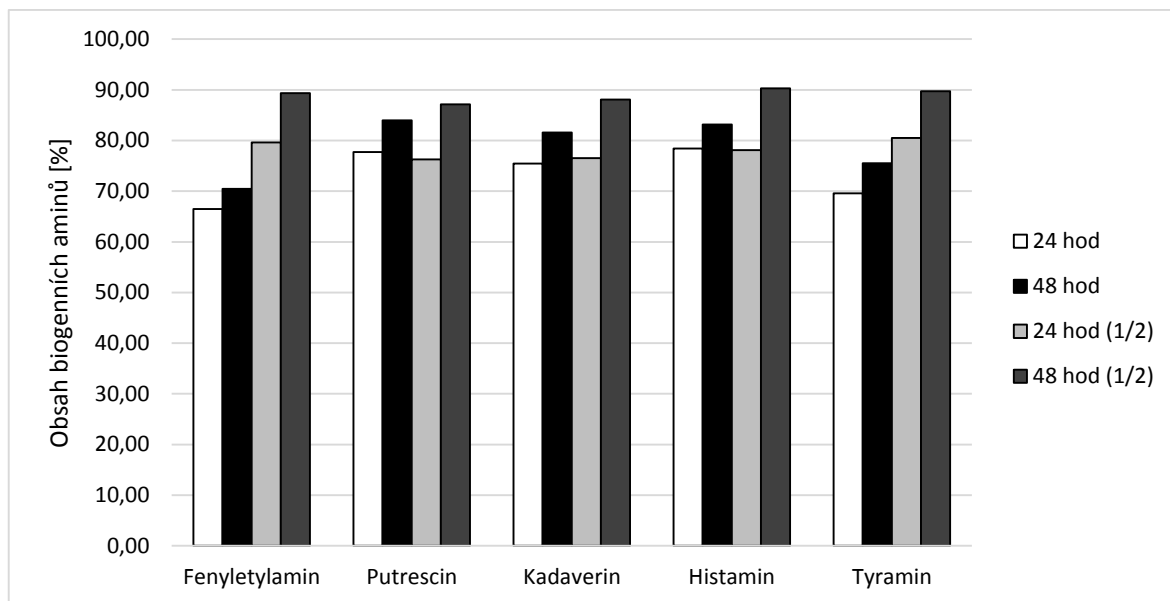
Kmen *Lactobacillus plantarum* CCDM 185 byl schopen degradovat všechny biogenní aminy. Z obrázku 23 lze usoudit, že pro degradaci sledovaných biogenních aminů kmenu více vyhovovalo optimální médium nežli poloviční. Největší úbytek byl zjištěn u fenyletylaminu po 48 hodinách kultivace v optimálním médiu. Jeho koncentrace poklesla na 70 % z původního celku. Putrescin, kadaverin a histamin byly po 24 hodinách v optimálním médiu redukovány o 25 % a tyramin o 30 %.



Obr. 23. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 185

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 186

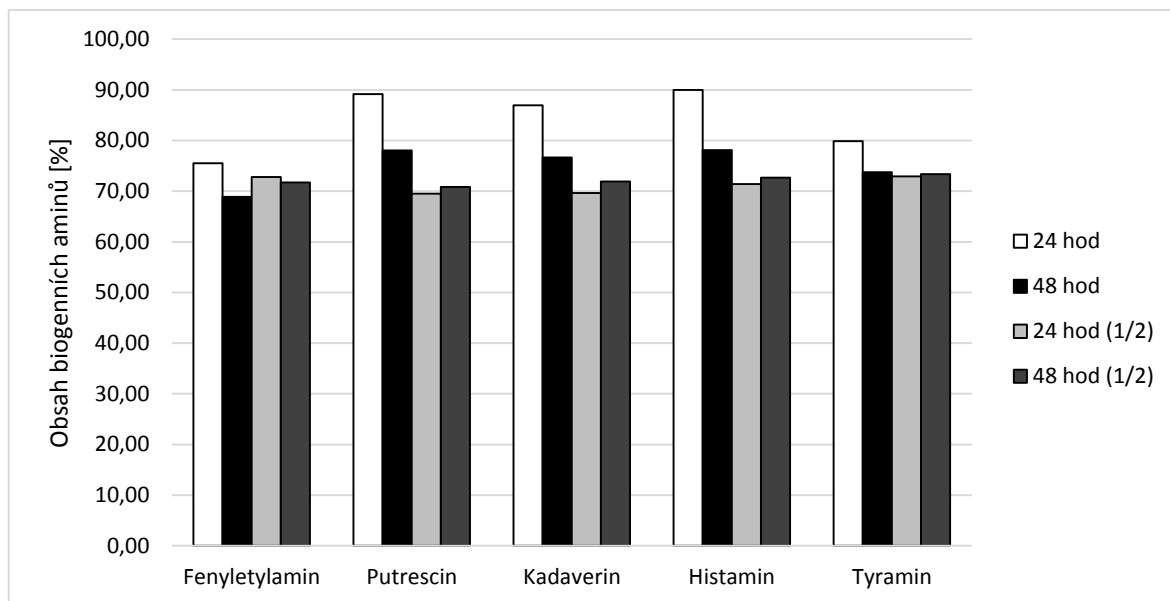
Na obrázku 24 je zobrazena schopnost kmene *L. plantarum* CCDM 186 degradovat biogenní aminy. Tento kmen byl schopen nejvíce redukovat množství fenyletylaminu po 24 hodinové kultivaci v optimálním médiu a to na cca dvě třetiny původní koncentrace. v polovičním médiu byl tento amin redukován značně méně než v médiu optimálním. Další významný úbytek byl zjištěn u tyraminu, který byl degradován o 30 % z původního množství. Putrescin a histamin byly nejlépe degradovány v polovičním médiu po 24 hodinové kultivaci. Jejich úbytek byl asi 22 %.



Obr. 24. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 186

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 187

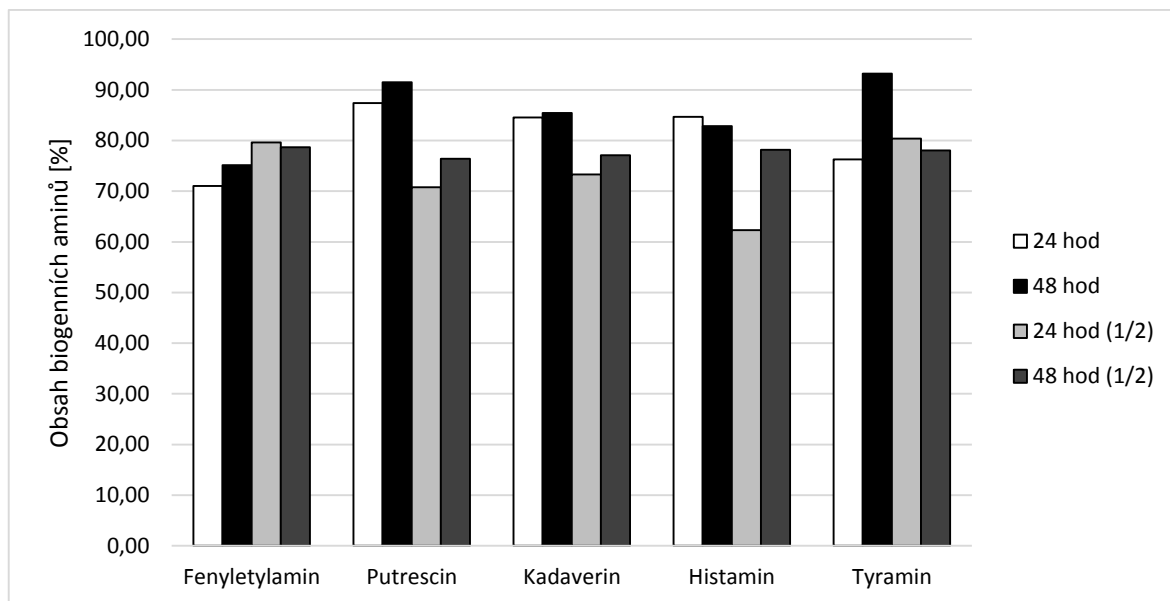
Z obrázku 25 je patrné, že kmen *Lactobacillus plantarum* CCDM 187 byl schopen lépe degradovat biogenní aminy v polovičním médiu. Všechny aminy byly zredukovány po 24 a 48 hodinách v polovičním médiu na hodnotu okolo 70 %. Nejmenší úbytek byl zaznamenán u putrescinu a histaminu po 24 hodinách v optimálním médiu, kdy došlo ke snížení koncentrace pouze o 10 %. Po dalších 24 hodinách došlo u těchto dvou aminů k poklesu koncentrace o dalších 12 %. Degradace fenyletylaminu byla srovnatelná za všech podmínek. Po 24 hodinách v optimálním médiu byl redukován na 75 %, po 48 hodinách na 68 % a po kultivaci kmene v polovičním médiu poklesla jeho koncentrace na 70 %.



Obr. 25. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 187

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 188

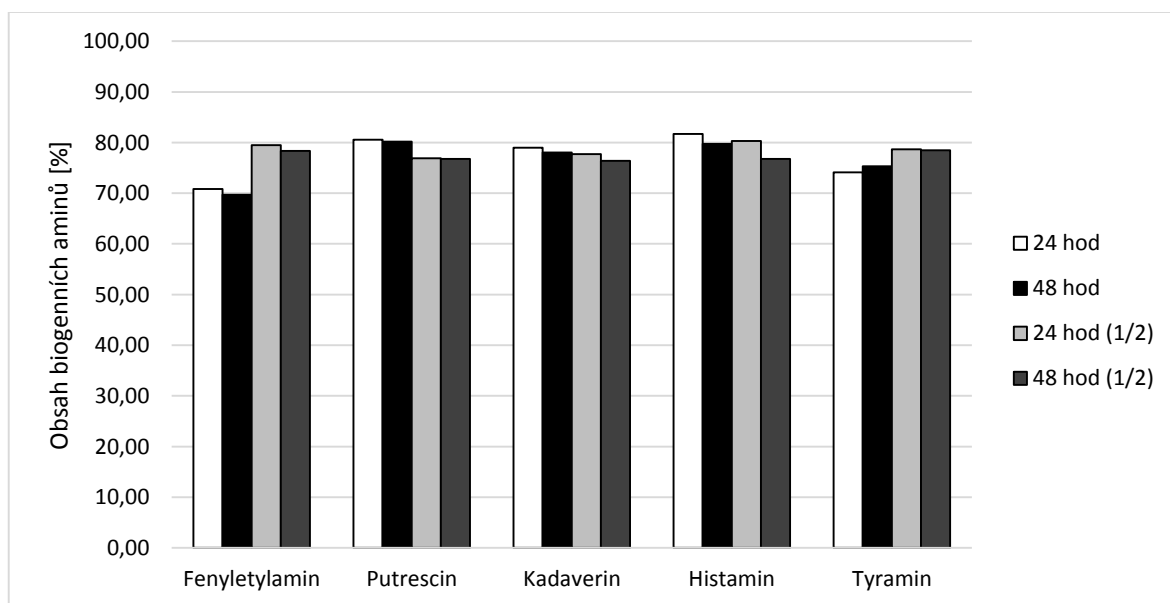
U kmene *L. plantarum* CCDM 188 byl zjištěn výrazný úbytek histaminu po 24 hodinové kultivaci v polovičním médiu, kdy došlo k poklesu koncentrace o 40 % (obr. 26). Nejméně byl degradován putrescin, jehož koncentrace v optimálním médiu nepoklesla pod 88 %. Úbytek tyraminu po 48 hodinách v optimálním médiu byl podstatně nižší než po 24 hodinové kultivaci, to mohlo být způsobeno možnou kontaminací vzorku. Fenyletylamin byl kmenem degradován nejlépe po 24 hodinách v optimálním médiu. Úbytek činil 30 % z původního množství. Putrescin byl nejlépe degradován v polovičním médiu po 24 hodinách, a to na 70 %.



Obr. 26. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 188

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 189

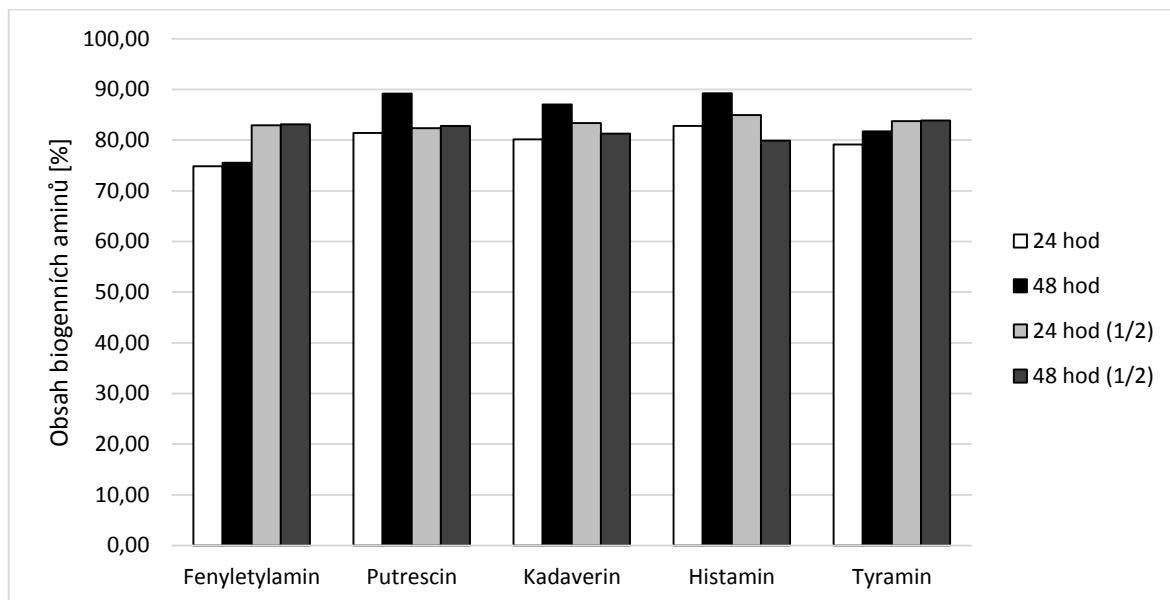
Z obrázku 27 je patrný největší úbytek fenyletylaminu po kultivaci kmene *Lactobacillus plantarum* CCDM 189 v optimálním médiu s biogenními aminy, který činil 30 %. Ostatní biogenní aminy byly degradovány za všech podmínek téměř identicky, kdy došlo k poklesu jejich koncentrace na hodnotu okolo 80 %.



Obr. 27. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 189

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 191

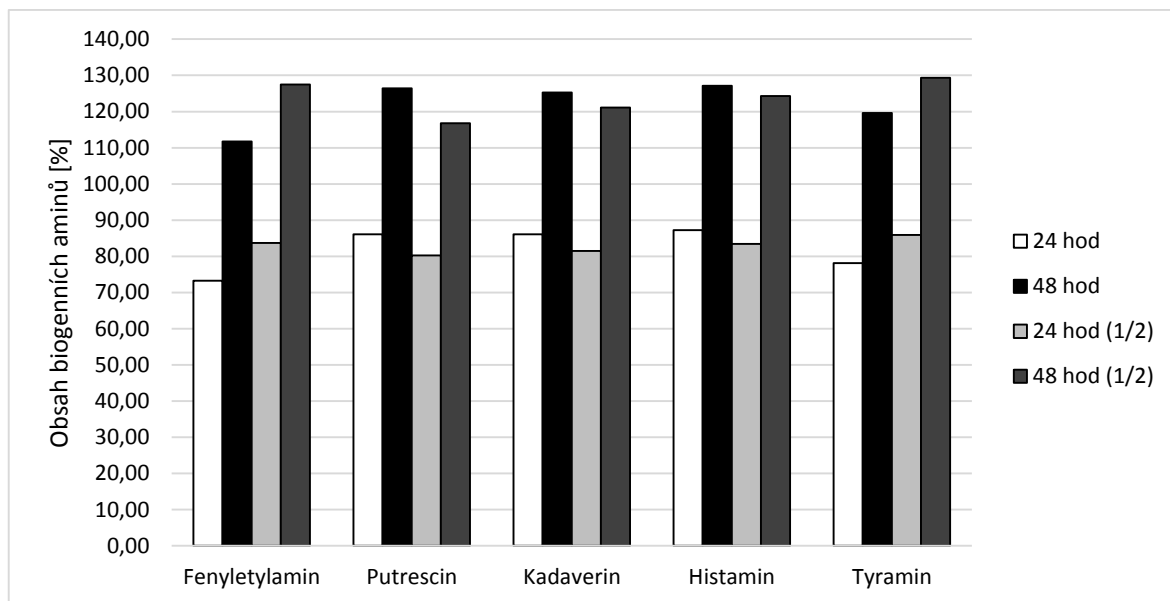
Degradace kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 191 byla podobná jako u ostatních kmenů, kdy žádný z aminů nebyl redukován více než o 25 % (obr. 28).



Obr. 28. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 191

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 194

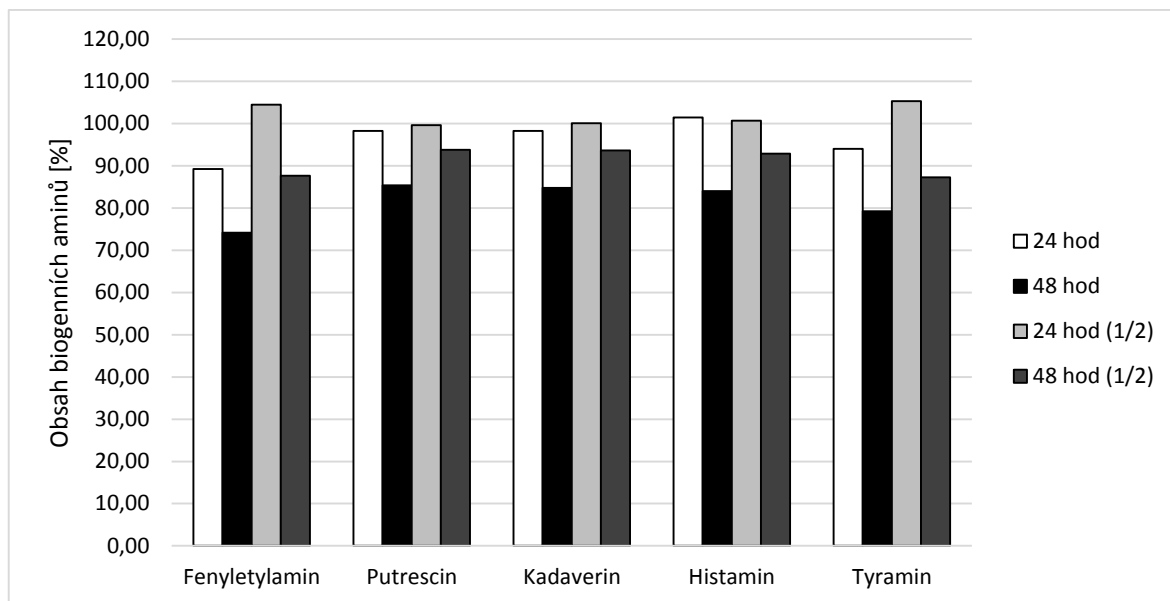
Na obrázku 29 je vidět úbytek aminů v optimálním médiu a polovičním médiu po 24 hodinové kultivaci kmenem *L. plantarum* CCDM 194. Naopak po 48 hodinové kultivaci v optimálním a polovičním médiu je vidět nárůst sledovaných aminů dokonce až o 30 %.



Obr. 29. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 194

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 195

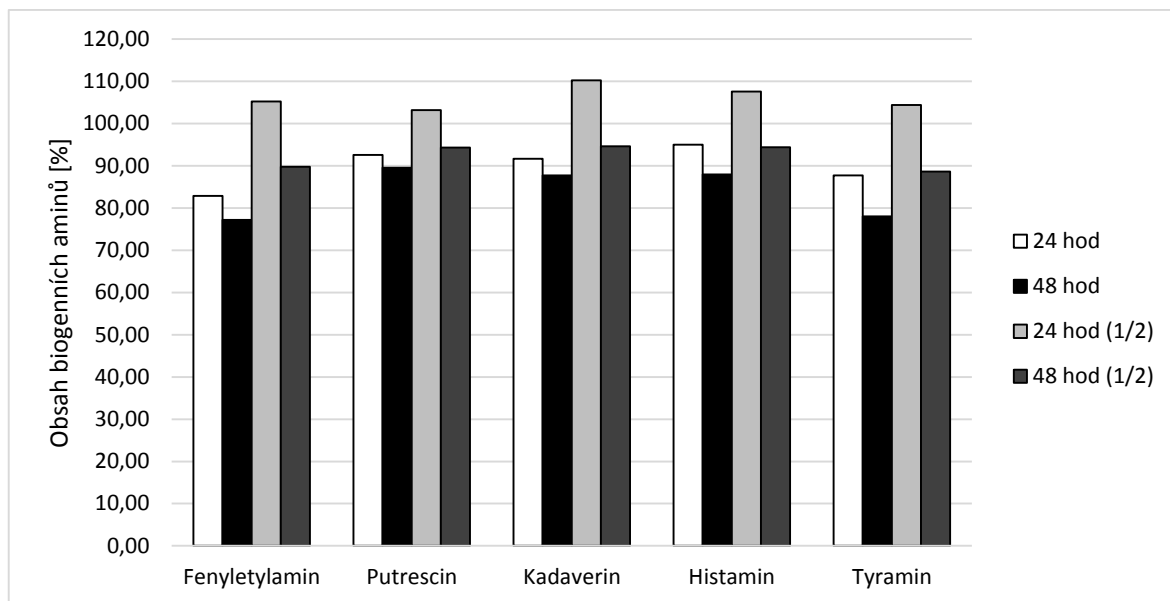
Lactobacillus plantarum CCDM 195 nejvíce vyhovovaly podmínky v optimálním médiu a 48 hodinová kultivace (obr. 30). Největší úbytek byl zaznamenán u fenyletylaminu po 48 hodinách v optimálním médiu, kdy došlo k jeho redukci o 25 %. Putrescin, kadaverin a histamin téměř nebyly po 24 hodinové kultivaci v optimálním médiu degradovány, ale po uplynutí dalších 24 hodin došlo k jejich úbytku asi o 15 %. Degradace těchto aminů v polovičním médiu po 24 hodinách nebyla rovněž zaznamenána. Největší úbytek v polovičním médiu byl zjištěn u tyraminu a fenyletylaminu po 48 hodinové kultivaci.



Obr. 30. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 195

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 196

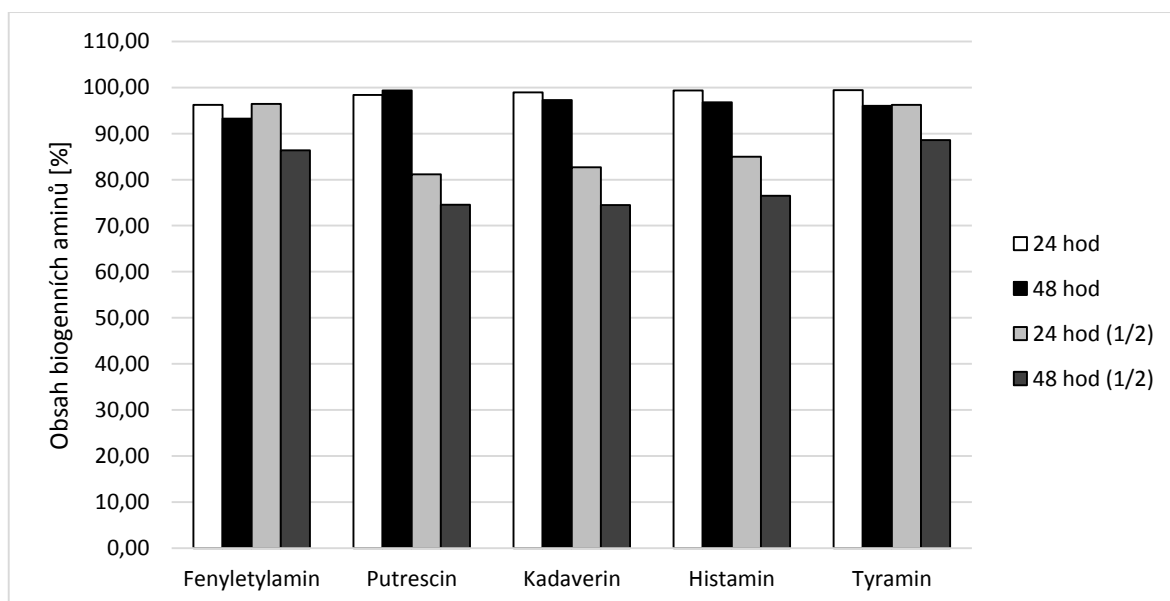
Z obrázku 31 je patrné, že kmen *Lactobacillus plantarum* CCDM 196 byl schopen lépe degradovat biogenní aminy v optimálním médiu. Nejvíce byl redukován fenyletylamin a tyramin po 48 hodinách v optimálním médiu. Jejich úbytek byl zhruba pětina. Ostatní biogenní aminy byly v optimálním médiu redukovány na hodnotu okolo 90 % po 24 i 48 hodinách. Největší úbytek v polovičním médiu byl rovněž u fenyletylaminu a tyraminu a to po 48 hodinové kultivaci, kdy došlo k degradaci pouze o 10 %.



Obr. 31. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 196

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 336

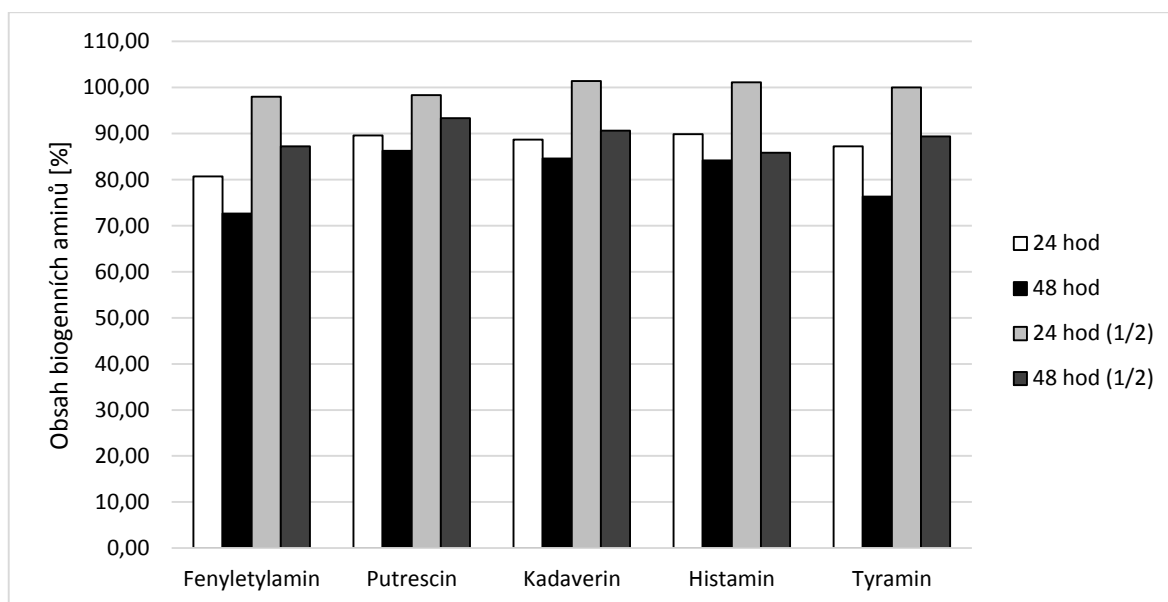
U kmene *Lactobacillus plantarum* CCDM 336 nebyl v optimálním médiu zaznamenán výrazný úbytek žádných biogenních aminů (obr. 32). Naopak v polovičním médiu byl zaznamenán výraznější úbytek putrescinu, který byl za 24 hodin redukován o 20 % a za 48 hodin o 25 %. Kadaverin a histamin byly také lépe degradovány v polovičním médiu, kdy po 48 hodinách došlo k jejich úbytku na hodnotu 75 %.



Obr. 32. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 336

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 375

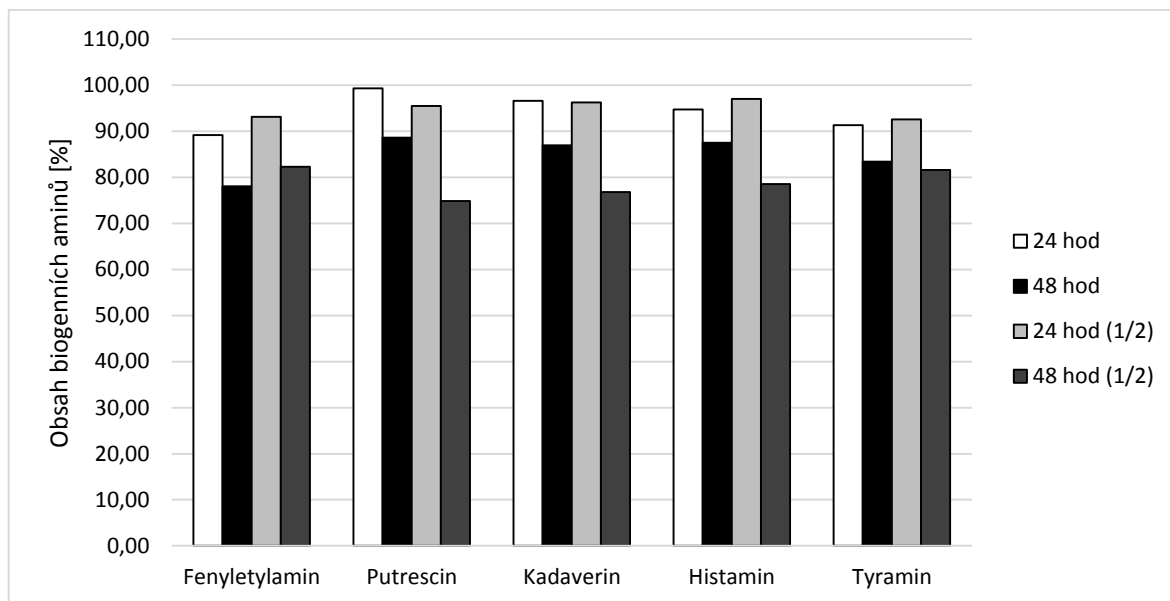
Na obrázku 33 je znázorněn úbytek biogenních aminů způsobený kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 375. Nejlépe kmen degradoval fenyletylamin v optimálním médiu, kdy po 24 hodinové kultivaci došlo k jeho redukci o 20 % a po dalších 24 hodinách ještě o 8 %. Výrazný úbytek byl zaznamenán také u tyraminu, který byl po 48 hodinách v optimálním médiu degradován o 25 %.



Obr. 33. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 375

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 385

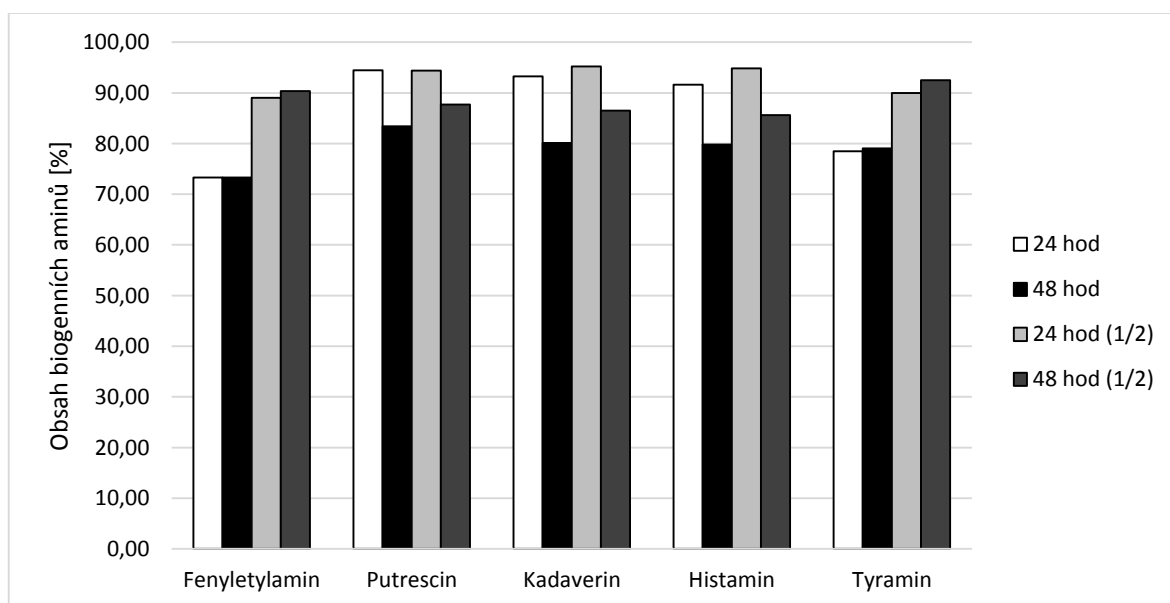
Kmen *Lactobacillus plantarum* CCDM 385 degradoval všechny testované biogenní aminy kromě putrescinu v optimálním médiu po 24 hodinové kultivaci (obr. 34). Fenyletylamin byl po 24 hodinové kultivaci v optimálním médiu redukován o 10 % a po 48 hodinách o 21 %. Nejvíce byl degradován putrescin v polovičním médiu s biogenními aminy po 48 hodinách. Tento úbytek činil 25 %. Další aminy, jako kadaverin a histamin, byly rovněž po 48 hodinách v polovičním médiu redukovány o více než pětinu.



Obr. 34. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 385

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 388

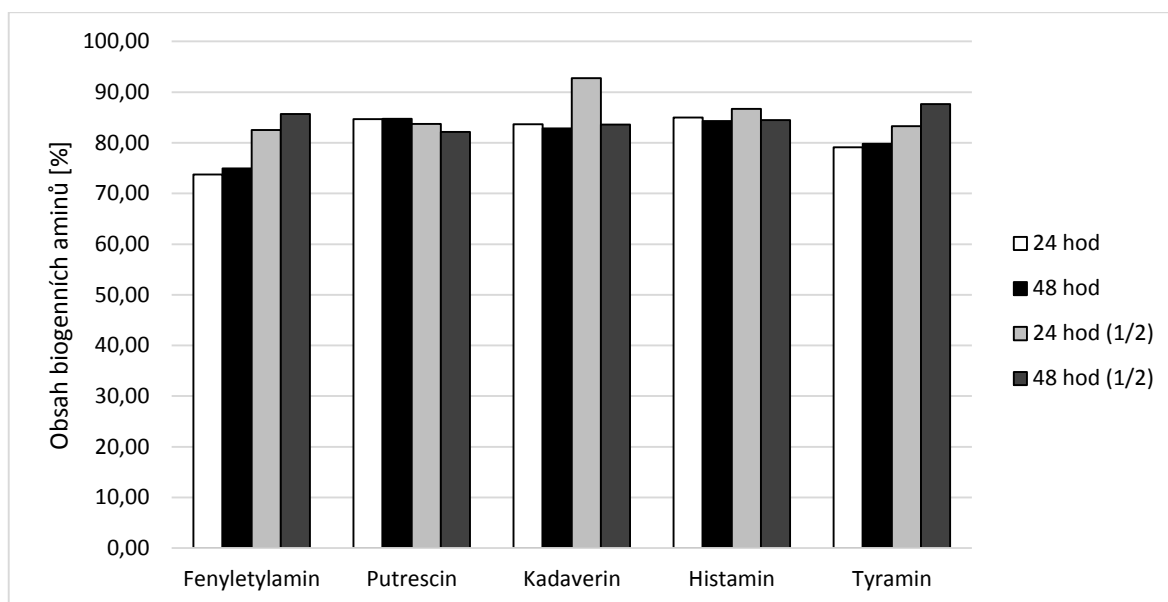
Z obrázku 35 je patrné, že kmen *Lactobacillus plantarum* CCDM 388 nejvíce degradoval fenyletylamin v optimálním médiu a to o 28 %. Tyramin byl po 24 a 48 hodinách v optimálním médiu redukován na hodnotu klesající mírně pod 80 %. V ostatních případech, za všech testovaných podmínek nedošlo k redukci na hodnoty nižší než 80 %.



Obr. 35. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 388

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 391

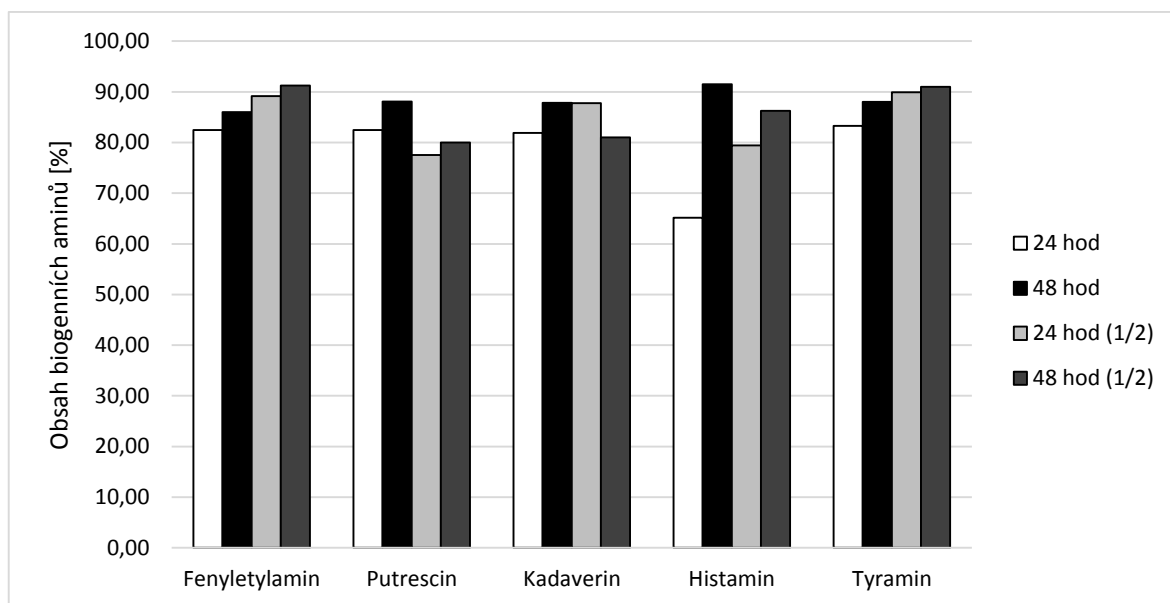
U kmene *Lactobacillus plantarum* CCDM 391 byla zaznamenána přibližně stejná degradace putrescinu a histaminu za všech testovaných podmínek, na hodnoty okolo 85 % (obr. 36). Degradace pod 80 % byla zjištěna pouze u fenyletylaminu v optimálním médiu a tyraminu v optimálním médiu po 24 hodinové kultivaci. Nejvíce byl degradován fenyletylamin po 24 hodinách v optimálním médiu a to na hodnotu 73 %.



Obr. 36. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 391

Degradace biogenních aminů kmenem *L. plantarum* subsp. *argentoratensis* CCDM 383

Na obrázku 37 je vidět největší úbytek histaminu po 24 hodinové kultivaci v optimálním médiu a to až o 35 %. U kmene *L. plantarum* subsp. *argentoratensis* CCDM 383 další výrazný úbytek nebyl zaznamenán. Pod hranici 80 % byl navíc redukován pouze putrescin a to v polovičním médiu po 24 hodinové kultivaci.

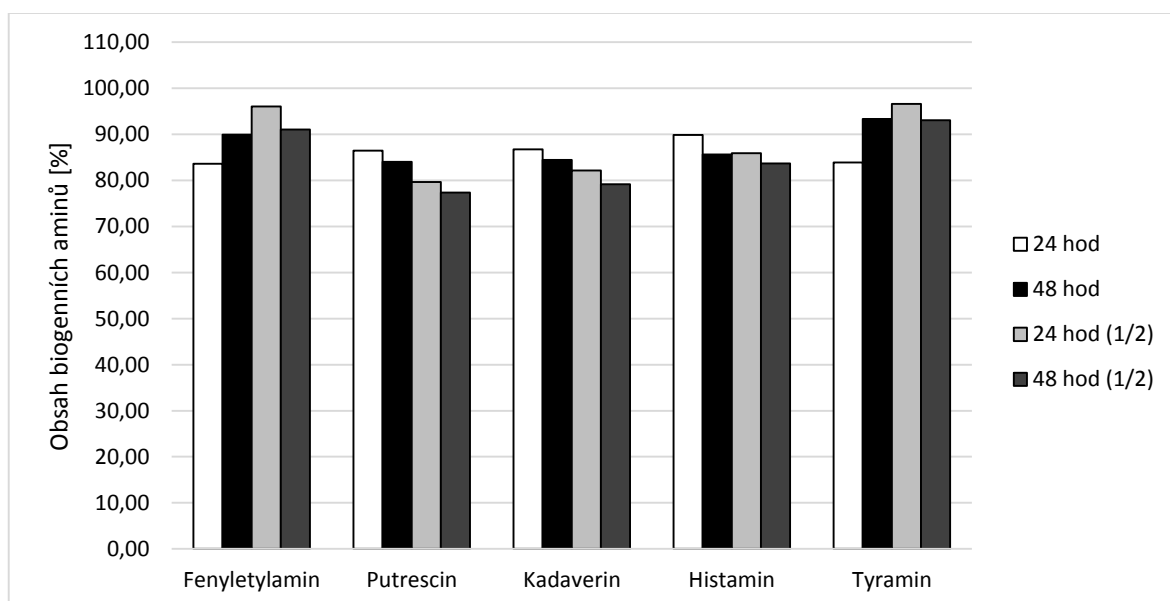


Obr. 37. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus plantarum subsp. argentoratensis* CCDM 383

7.2.3 Degradace biogenních aminů ostatními kmeny laktobacilů

Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus hilgardii* CCDM 828

Kmen *Lactobacillus hilgardii* CCDM 828 degradoval nejvíce putrescin v polovičním médiu po 48 hodinách na hodnotu 78 % (obr. 38). Ostatní biogenní aminy byly za všech testovaných podmínek redukovány maximálně na hodnotu 80 % z původního množství.

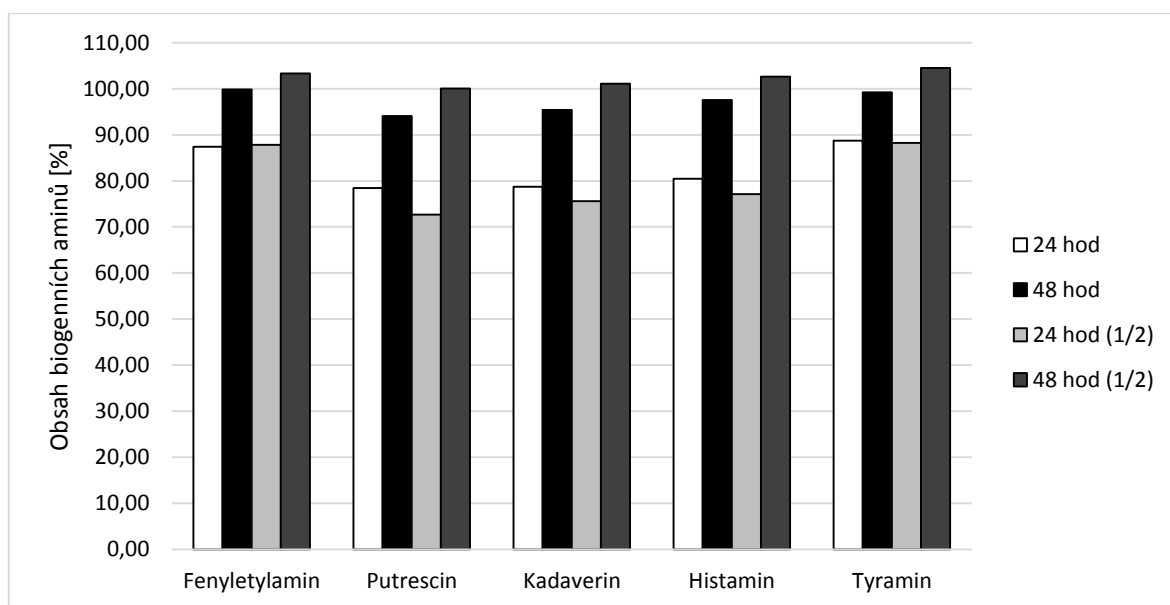


Obr. 38. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Lactobacillus hilgardii* CCDM 828

7.2.4 Degradace biogenních aminů kmeny *Pediococcus* spp.

Degradace biogenních aminů kmenem *Pediococcus inopinatus* CCDM 829

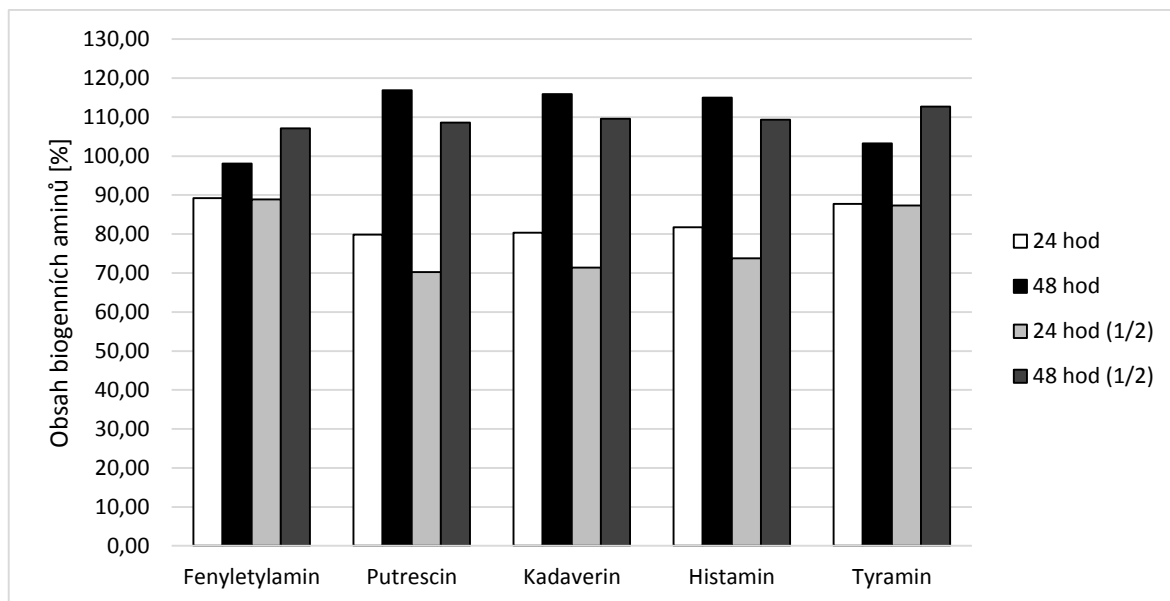
Na obrázku 39 je patrný úbytek všech biogenních aminů po 24 hodinové kultivaci v optimálním a polovičním médiu. Největší úbytek byl zaznamenán u putrescinu a to o 28 %. Po 24 hodinách v optimálním médiu byly putrescin, kadaverin a histamin degradovány na hodnotu 80 %. Fenyletylamin a tyramin byly po 24 hodinách v optimálním a polovičním médiu redukovány přibližně o 10 %.



Obr. 39. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Pediococcus inopinatus* CCDM 829

Degradace biogenních aminů kmenem *Pediococcus pentosaceus* CCDM 862

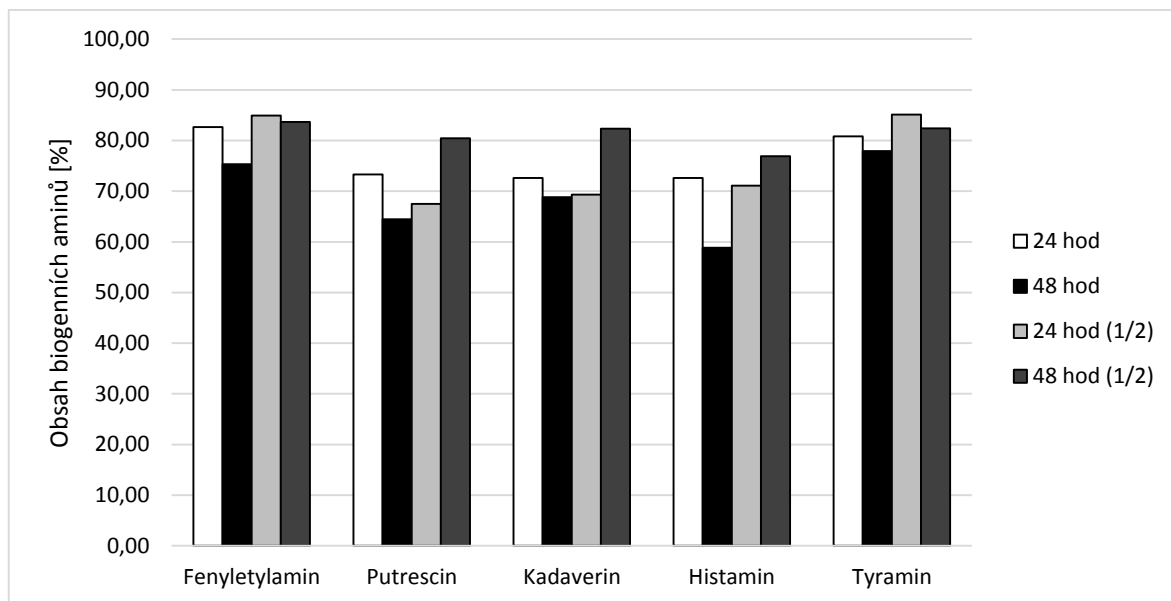
Kmen *Pediococcus pentosaceus* CCDM 862 nejvíce degradoval putrescin a kadaverin po 24 hodinové kultivaci v polovičním médiu, kdy došlo ke snížení jejich množství o necelou třetinu z původní hodnoty (obr. 40). Histamin byl za stejných podmínek redukován méně, a to o čtvrtinu. Úbytek putrescinu, kadaverinu a histaminu po 24 hodinové kultivaci v optimálním médiu činil jednu pětinu.



Obr. 40. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Pediococcus pentosaceus* CCDM 862

Degradace biogenních aminů kmenem *Pediococcus* sp. CCDM 395

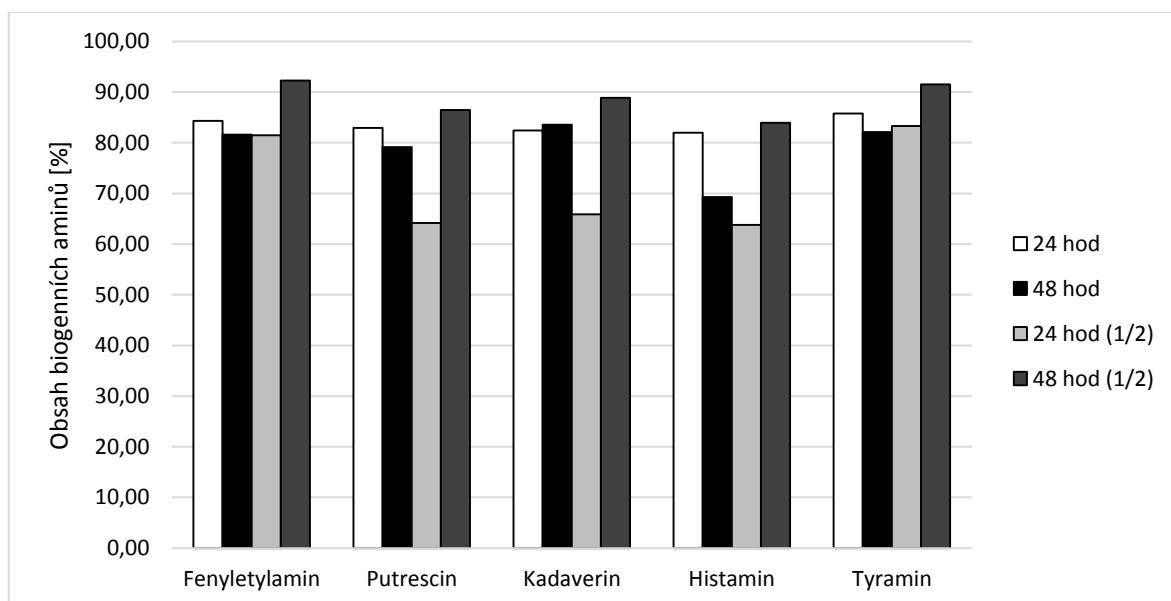
Z obrázku 41 lze vyčíst, že kmen *Pediococcus* sp. CCDM 395 byl schopen lépe degradovat biogenní aminy v optimálním médiu. Největší rozdíl 24 a 48 hodinami byl zaznamenán u histaminu. Za těchto podmínek došlo k úbytku histaminu po 24 hodinách o 27 % a po 48 hodinách dokonce až o 41 %. Značný úbytek byl rovněž zjištěn u putrescinu, kdy došlo k jeho úbytku po 24 hodinách v optimálním médiu o 27 % a po dalších 24 hodinách ještě o 10 %.



Obr. 41. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Pediococcus sp. CCDM 395*

Degradace biogenních aminů kmenem *Pediococcus sp. CCDM 396*

Kmen *Pediococcus sp. CCDM 396* výrazně redukoval množství putrescinu, kadaverinu a histaminu v polovičním médiu po 24 hodinové kultivaci, a to na hodnotu okolo 65 % (obr. 42). Významný je také úbytek histaminu v optimálním médiu mezi 24 a 48 hodinou, kdy došlo k poklesu z 82 % na 69 %. Kmen nejméně degradoval tyramin a fenyletylamin a to maximálně na hodnotu 80 %.

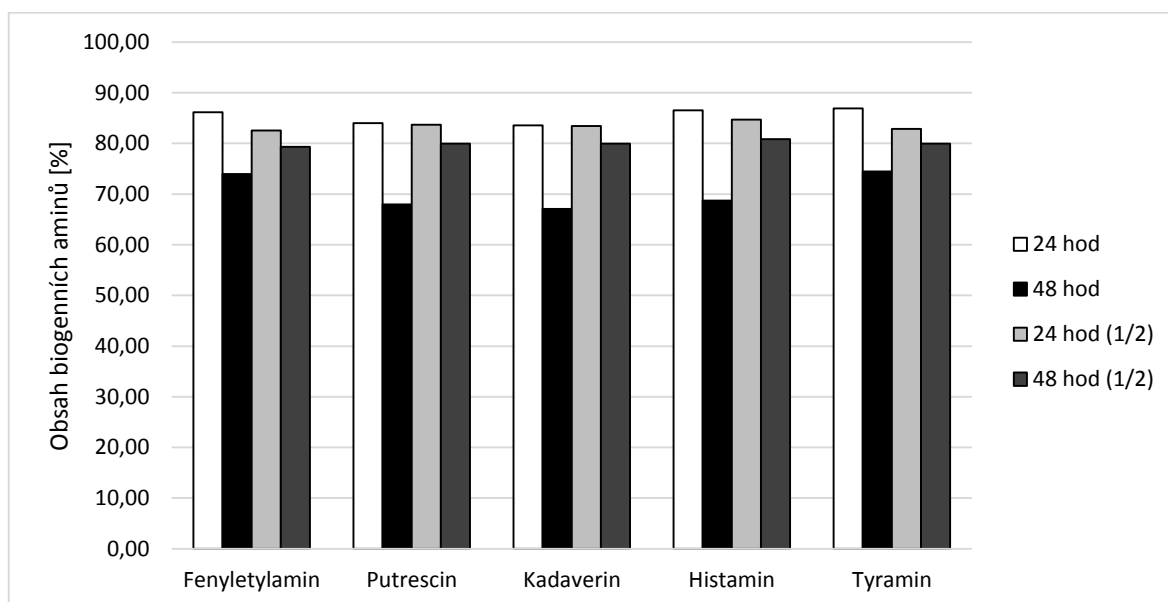


Obr. 42. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Pediococcus sp. CCDM 396*

7.2.5 Degradace biogenních aminů kmeny *Brevibacterium linens*

Degradace biogenních aminů kmenem *Brevibacterium linens* CCDM 96

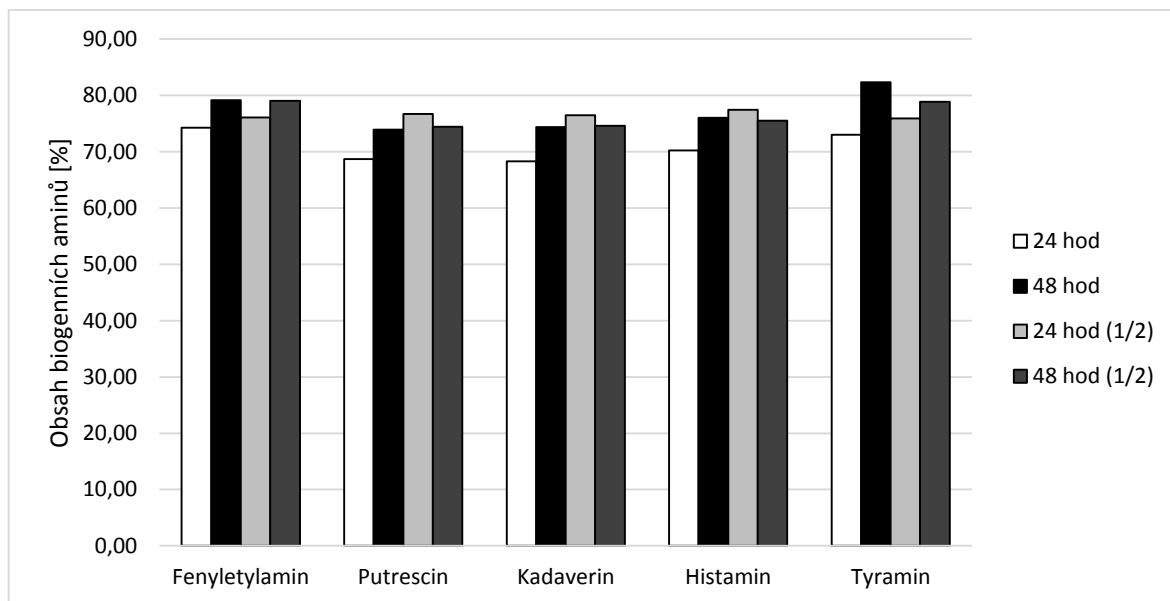
Obrázek 43 znázorňuje schopnost kmene *Brevibacterium linens* CCDM 96 degradovat biogenní aminy. Je patrné, že schopnost kmene degradovat aminy v optimálním a polovičním médiu rostla s prodlužující se dobou kultivace. Vůbec největší úbytek byl zaznamenán u kadaverinu po 48 hodinové kultivaci v optimálním médiu, a to na dvě třetiny původní hodnoty. Výrazný úbytek za stejných podmínek byl rovněž zjištěn u putrescinu a histaminu, které byly degradovány na hodnotu okolo 68 %. V polovičním médiu byly nejvíce degradovány fenyletylamin, putrescin, kadaverin a tyramin po 48 hodinách na hodnotu 80 %.



Obr. 43. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Brevibacterium linens* CCDM 96

Degradace biogenních aminů kmenem *Brevibacterium linens* CCDM 97

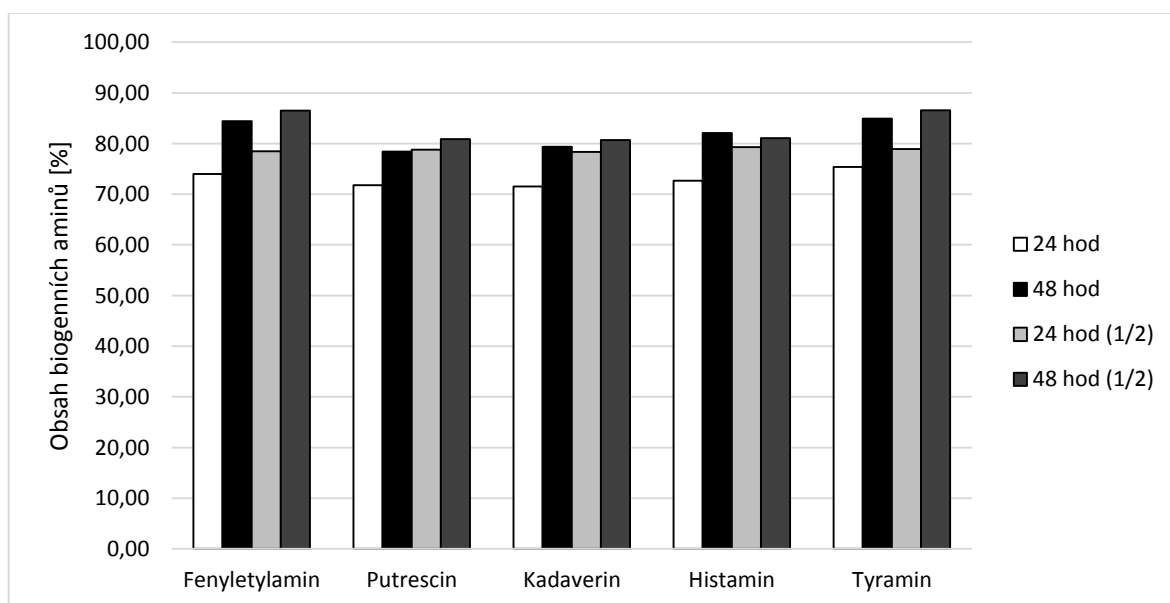
Schopnost kmene *B. linens* CCDM 97 degradovat biogenní aminy v polovičním a optimálním médiu byla srovnatelná (obr. 44). V optimálním médiu byl nejvíce redukován kadaverin a putrescin po 24 hodinové kultivaci. V polovičním médiu došlo k největšímu úbytku po 48 hodinách u putrescinu, kadaverinu a histaminu a to o 25 %. Nejméně byly kmenem degradovány fenyletylamin a tyramin, jejichž množství ani v jednom případě nepokleslo pod hranici 70 %.



Obr. 44. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Brevibacterium linens* CCDM 97

Degradace biogenních aminů kmenem *Brevibacterium linens* CCDM 99

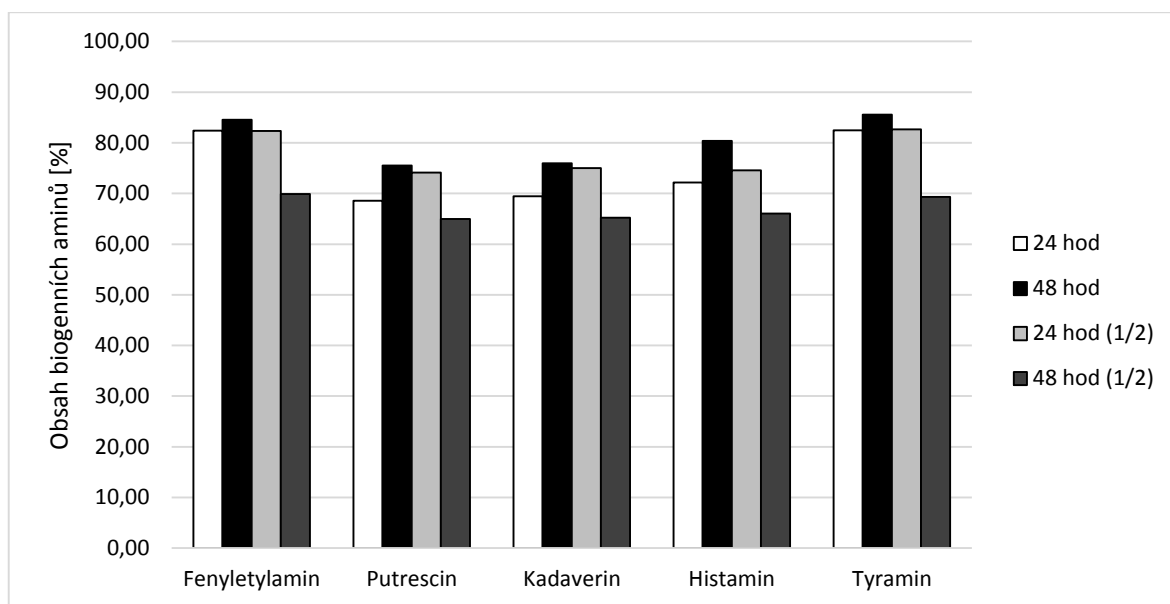
Z obrázku 45 je patný největší úbytek putrescinu, kadaverinu a histaminu po 24 hodinách v optimálním médiu na hodnotu 72 %. Fenyletylamin a tyramin byly rovněž po 24 hodinách v optimálním médiu degradovány okolo 25 %. Ve všech ostatních případech došlo k degradaci maximálně na hodnotu okolo 80 %.



Obr. 45. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Brevibacterium linens* CCDM 99

Degradace biogenních aminů kmenem *Brevibacterium linens* CCDM 201

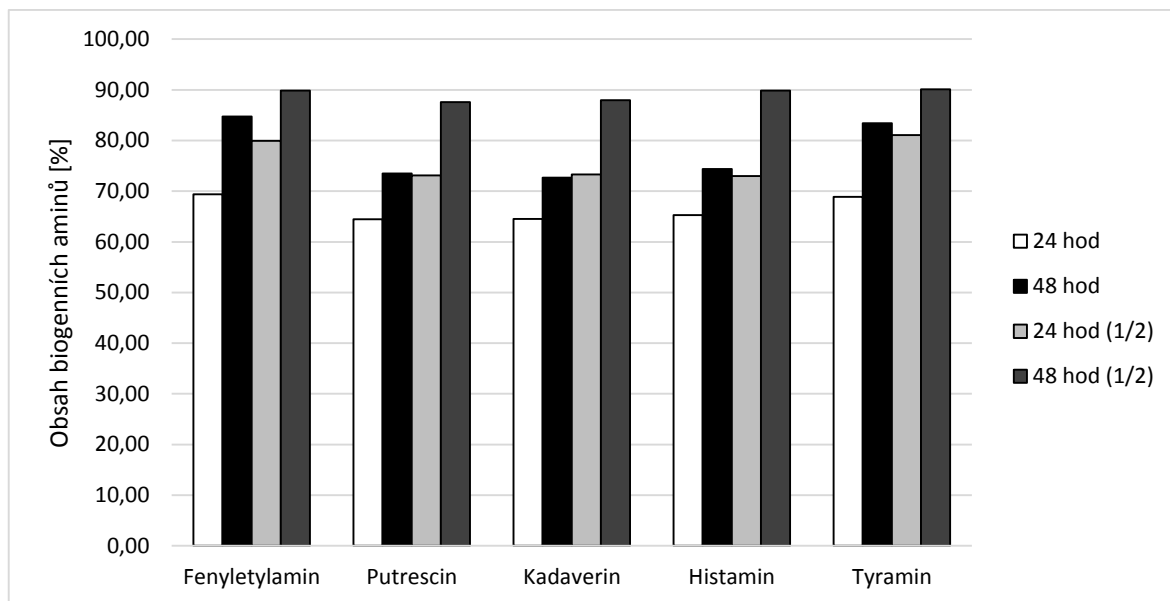
U kmene *B. linens* CCDM 201 byla zaznamenána největší schopnost degradace biogenních aminů putrescinu a kadaverinu (obr. 46). U všech aminů po 48 hodinách v polovičním médiu byl zjištěn úbytek o více než 30 %. Fenyletylamin a tyramin byly v optimálním médiu degradovány maximálně na hodnotu 82 %. U těchto aminů byl v polovičním médiu zjištěn úbytek mezi 24 a 48 hodinou o dalších 12 %.



Obr. 46. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Brevibacterium linens* CCDM 201

Degradace biogenních aminů kmenem *Brevibacterium linens* CCDM 203

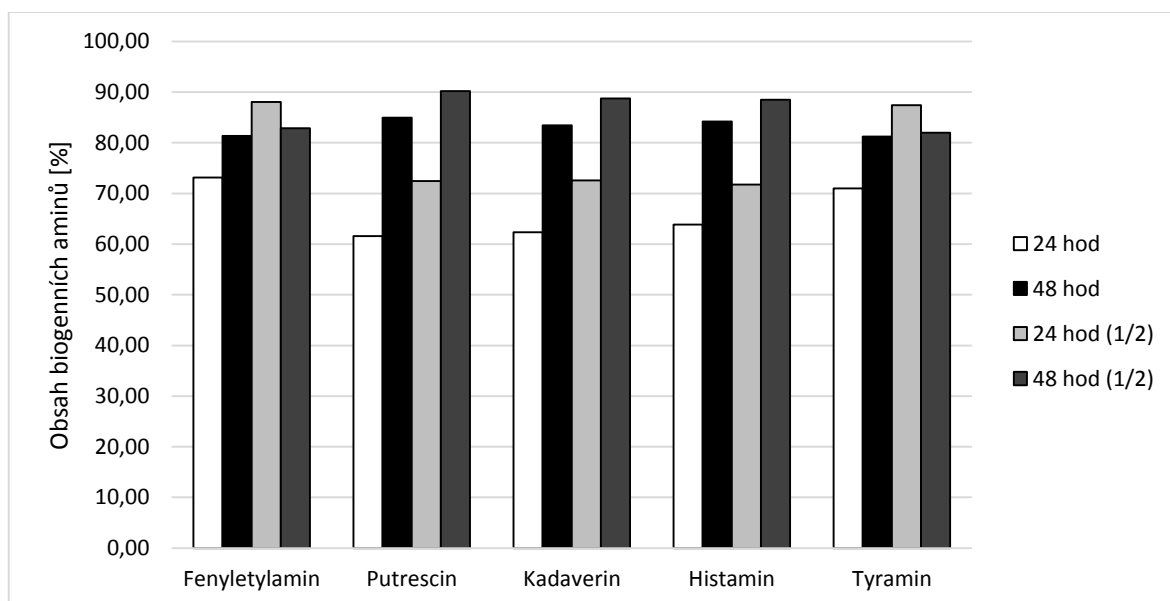
Na obrázku 47 je znázorněna schopnost kmene *B. linens* CCDM 203 degradovat biogenní aminy za sledovaných podmínek s maximální degradací v optimálním médiu s dobou kultivace 24 hodin. Za těchto podmínek došlo k úbytku všech biogenních aminů pod hodnotu 70 %, nejvíce byl redukován putrescin a kadaverin a to až o 35 %. Koncentrace aminů po 48 hodinové kultivaci v optimálním médiu byla výrazně vyšší než po 24 hodinové kultivaci, to mohlo být způsobeno kontaminací vzorku. Kmen byl schopen degradovat fenyletylamin, putrescin, histamin a tyramin také v polovičním médiu po 24 hodinové kultivaci.



Obr. 47. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Brevibacterium linens* CCDM 203

Degradace biogenních aminů kmenem *Brevibacterium linens* CCDM 1010

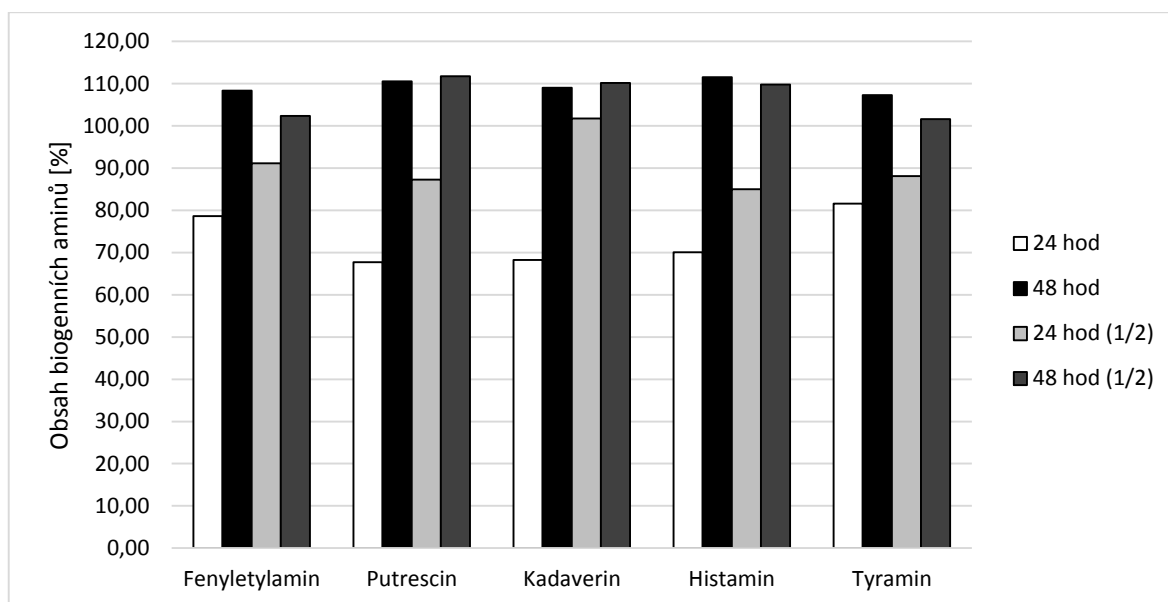
Kmen *Brevibacterium linens* CCDM 1010 nejvíce degradoval biogenní amin putrescin v optimálním médiu po 24 hodinách, kdy došlo k úbytku téměř o 40 % (obr. 48). Kadaverin a histamin byly za těchto podmínek rovněž degrádovány o více než 35 %. V polovičním médiu došlo k největšímu úbytku u histaminu po 24 hodinové kultivaci na hodnotu 70 %. Kmen byl nejméně schopen degradovat fenyletylamin.



Obr. 48. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Brevibacterium linens* CCDM 1010

Degradace biogenních aminů kmenem *Brevibacterium linens* CCDM 1052

Z obrázku 49 je patrné, že kmeni *Brevibacterium linens* CCDM 1052 vyhovovala více kultivace v optimálním médiu a doba 24 hodin. Největší úbytek byl zaznamenán u putrescinu a kadaverinu v optimálním médiu po 24 hodinách a to 31 %. Za stejných podmínek byl redukován histamin o 30 %, fenyletylamin o 20 % a tyramin o 18 %. V polovičním médiu byl zaznamenán největší úbytek u histaminu a to po 24 hodinové kultivaci.

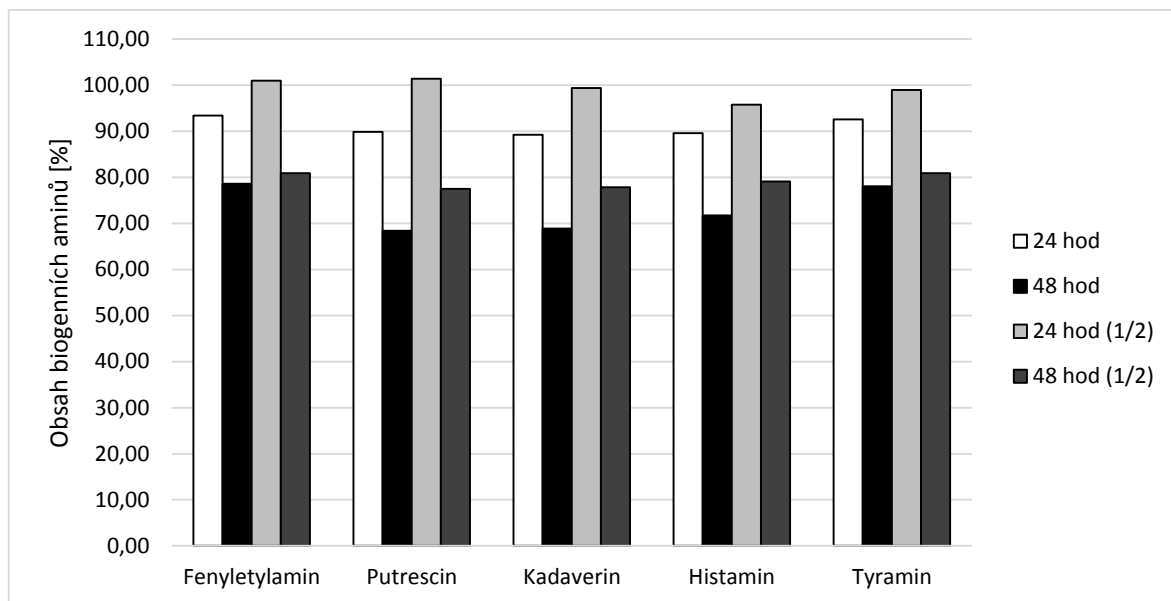


Obr. 49. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Brevibacterium linens* CCDM 1052

7.2.6 Degradace biogenních aminů kmene *Kocuria* spp.

Degradace biogenních aminů kmenem *Kocuria rosea* CCDM 204

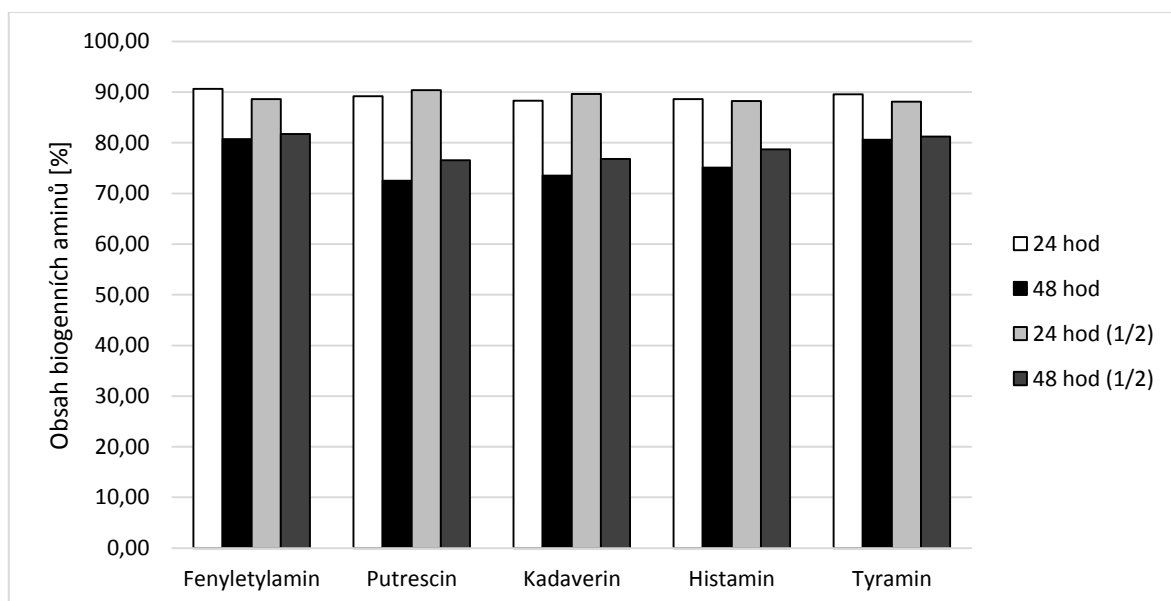
Na obrázku 50 je znázorněna schopnost kmene *Kocuria rosea* CCDM 204 degradovat biogenní aminy. Je patrné, že degradační schopnost kmene rostla se zvyšující se dobou kultivace u obou médií. Z obrázku 50 lze dále usoudit, že kmenu více vyhovovalo optimální médium. Největší úbytek byl zaznamenán u putrescinu v optimálním médiu po 48 hodinové kultivaci a to na hodnotu 68 %. Za těchto podmínek byly kadaverin a histamin degradovány asi na 70 %. Všechny biogenní aminy byly po 24 hodinách v optimálním médiu redukovány o 10 % kromě fenyletylaminu, jež byl degradován pouze o 7 %. V polovičním médiu byl kmen schopen nejvíce degradovat putrescin a kadaverin na hodnotu 88 %.



Obr. 50. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Kocuria rosea* CCDM 204

Degradace biogenních aminů kmenem *Kocuria rosea* CCDM 205

Kmen *Kocuria rosea* CCDM 205 po 24 hodinách v obou médiích degradoval všechny biogenní aminy maximálně o 11 % (obr. 51). Úbytky jednotlivých aminů po 48 hodinové kultivaci v obou médiích byly srovnatelné. Největší úbytek v optimálním médiu byl zjištěn u putrescinu po 48 hodinové kultivaci, a to 28 %. Naopak v polovičním médiu byl zjištěn největší úbytek kadaverinu 24 % po 48 hodinách.



Obr. 51. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem *Kocuria rosea* CCDM 205

8 DISKUZE

Biogenní aminy jsou organické sloučeniny odvozené od aminokyselin. Jedná se o látky nacházející se v rostlinných pletivech a živočišných tkáních, kde se účastní důležitých metabolických procesů. Mohou fungovat jako hormony nebo mohou být např. stavebními látkami pro hormony a alkaloidy [1,3,5].

V nízkých koncentracích jsou biogenní aminy přirozeně přítomny v řadě potravin. Jejich vysoký příjem však může být nebezpečný pro zdraví člověka. Symptomy konzumace vysokých dávek biogenních aminů mohou být zvracení, dýchací potíže, pocení, bušení srdce, hypotenze nebo hypertenze a migrény. Toxický účinek biogenních aminů je velice ovlivněn aktivitou enzymů zodpovědných za jejich odbourávání (MAO, DAO, PAO), která může být u jednotlivců různá a závisí na mnoha faktorech. Vysoké koncentrace biogenních aminů není schopen enzymový systém eliminovat zejména proto, že část kapacity potřebné pro detoxikaci histaminu a tyraminu odčerpávají putrescin a kadaverin, které samy o sobě nejsou až tolik rizikové, ale jejich obsah v řadě potravin bývá značný. Potenciálně nejtoxičtější je histamin, jehož hranice snesitelnosti je asi 10 mg. Toxicita tohoto aminu může být zesílena např. alkoholem. Ostatní aminy jsou považovány za méně toxické než histamin, avšak sekundární aminy mohou v reakcích s oxidy dusíku tvořit nitrosaminy, ty se považují za silné karcinogeny, které mohou způsobit nádorové bujení v různých orgánech a tkáních včetně plic, mozku a jater [3,5,8,11].

Ve vyšších množstvích se biogenní aminy vyskytují ve fermentovaných potravinách (kysané zelí, sýry, víno), kde vznikají působením mikroorganismů, jako jsou bakterie mléčného kvašení (rody *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*) [3,9].

Existuje mnoho faktorů ovlivňujících výskyt a kumulaci aminů v potravinách. Mikroorganismy způsobující jejich tvorbu mohou být inhibovány vysokým hydrostatickým tlakem, ozařováním, použitím potravinářských přídatných látek, balením v modifikované atmosféře nebo nedostatkem živin [45].

Několik studií se zabývá mikroorganismy, které jsou schopny pomocí enzymů aminooxidáz degradovat určitá množství biogenních aminů. Některé kmeny bakterií mléčného kvašení (např. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* a *Pediococcus acidilacti*) jsou schopny degradovat histamin, tyramin a některé dokonce putrescin. Na základě znalostí o schopnosti syntézy enzymů aminooxidáz, dochází k aplikaci mikroorganismů produkujících tyto enzymy do potravin. Mikroorganismy mohou být do potravin přidávány jako startérové kultury

do fermentovaných potravin nebo v průběhu výroby a tím redukovat množství biogenních aminů [47,48].

Cílem prvního experimentu bylo pozorovat schopnost růstu vybraných bakterií využívaných v mlékárenství v přítomnosti biogenních aminů v pěti minerálních médiích, které se navíc lišily v množství (koncentraci) možných zdrojů uhlíku a dusíku. Konkrétně se jednalo o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, glukózu, octan sodný a asparagin, který zároveň může sloužit i jako zdroj energie. Ve všech minerálních médiích byla koncentrace každého ze sledovaných biogenních aminů (tyramin, tryptamin, putrescin, kadaverin, histamin a fenyletylamin) 2 g/l. V minerálním médiu 1, které obsahovalo nejvíce potenciálních zdrojů živin, byly schopny růst pouze 4 testované kmeny, a to *Lactobacillus plantarum* CCDM 178, *L. plantarum* CCDM 181, *L. plantarum* CCDM 189 a *Pediococcus acidilactici* CCDM 814. Tyto kmeny byly rovněž schopny růst ve všech ostatních variantách minerálních médií. U kmenů *Lactobacillus plantarum* CCDM 182, *L. plantarum* CCDM 183, *L. plantarum* CCDM 391 a *Pediococcus* sp. CCDM 396 byl zjištěn růst v minerálních médiích 2, 3, 4 a 5. Těmto kmenům však nevyhovovaly vyšší koncentrace $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g/l), glukózy (5 g/l), octanu sodného (2 g/l) a asparaginu (0,08 g/l) v kombinaci s koncentrací biogenních aminů. U ostatních kmenů nebyl zaznamenán žádný zákal v průběhu kultivace, z čehož lze usoudit, že kultivační podmínky, zejména složení média, pro ně byly nevyhovující. Na základě tohoto experimentu lze říci, že nejvyšší schopnost růstu v podmínkách se sníženým obsahem živin vykazovaly kmeny *Lactobacillus plantarum*, u nichž se dá rovněž předpokládat určitá schopnost redukovat množství biogenních aminů.

Druhý experiment byl zaměřen na ověření schopnosti vybraných kmenů bakterií degradovat biogenní aminy metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Několika studii byla zjištěna schopnost degradace alespoň jednoho biogenního aminu kmeny *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei* a některými kmeny rodu *Pediococcus* [47]. V rámci této bakalářské práce byl sledován úbytek biogenních aminů, během kultivace kmenů rodu *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Brevibacterium* *Micrococcus* a *Kocuria* v kultivačních médiích MRS, MRSC a MPB a v nutričně neúplných (polovičních) médiích. Do těchto médií byly rovněž přidány biogenní aminy tyramin, putrescin, kadaverin, histamin a fenyletylamin, které představovaly pro jednotlivé kmeny zdroje dusíku a uhlíku. Poloviční médium bylo testováno z důvodu předpokladu vyšší schopnosti kmenů redukovat obsah biogenních aminů za podmínek, kdy bakterie nemusí mít všechny potřebné živiny v dostatečné koncentraci.

Úbytek biogenních aminů byl srovnáván s kontrolou, což byl příslušný bujón s biogenními aminy, který nebyl zaočkován bakteriemi.

Vůbec největší degradaci vykazoval kmen *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198, jež byl schopen snížit koncentraci biogenních aminů putrescinu, kadaverinu a histaminu o více než 50 % po 24 hodinové kultivaci v nutričně neúplném médiu. Za stejných podmínek kultivace kmen redukoval fenyletylamin a tyramin o 45 %. Porovnáním úbytků u obou využívaných médií, lze tvrdit, že poloviční médium mělo výrazně vyšší vliv na degradační schopnost kmene *L. casei* subsp. *casei* CCDM 198, než médium optimální, kdy došlo maximálně k úbytku o 12 %. Další výrazná degradace byla pozorována u kmene *Pediococcus* sp. CCDM 395. Této bakterii, na rozdíl od předchozího kmene, více vyhovovaly podmínky kultivace v optimálním médiu. Úbytek fenyletylaminu a tyraminu nebyl tak výrazný, ale histamin byl redukován po 24 hodinách v optimálním médiu na hodnotu 72 %. Po dalších 24 hodinách byl histamin zredukován až na hodnotu 59 %. Histamin byl rovněž velice dobře degradován kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 188, který jej po 24 hodinové kultivaci v polovičním médiu s biogenními aminy redukoval až o 40 %. U rodu *Brevibacterium* byla zjištěna lepší schopnost degradace v optimálním médiu než v polovičním. Výrazná degradace byla pozorována u kmenů *Brevibacterium linens* CCDM 203 a *B. linens* CCDM 1052, kdy po 24 hodinách v optimálním médiu došlo k úbytku putrescinu, kadaverinu a histaminu na obsah nižší než 70 %. Nejvyšší úbytek byl zaznamenán kmenem *Brevibacterium linens* CCDM 1010, který redukoval putrescin, kadaverin po 24 hodinách až na hodnotu 62 % z původní koncentrace. Testované kmeny rodu *Micrococcus* nebyly schopny za žádných sledovaných podmínek redukovat množství biogenních aminů na hodnoty nižší než 80 %. U rodu *Kocuria* byly testovány dva kmeny, z nichž větší úbytek byl zjištěn u kmene *Kocuria rosea* CCDM 204, jemuž vyhovovaly více podmínky 48 hodinové kultivace a optimální médium. Degradální schopnost kmene výrazně rostla s prodlužující se dobou kultivace. Putrescin a kadaverin byly mezi 24 a 48 hodinou v optimálním médiu redukovány z 90 % na 69 % z původní koncentrace těchto aminů.

Dosažené výsledky nabízejí možnost využití testovaných mikroorganismů v potravinářství, a to zejména při výrobě fermentovaných potravin, kde je vyšší pravděpodobnost kumulace biogenních aminů. Do těchto potravin mohou být přidávány v průběhu výroby nebo především jako startérové mikroorganismy. Praktická část bakalářské práce a některé další studie, dokazují, že některé kmeny *Lactobacillus casei* (konkrétně *Lactobacillus casei* subsp. *casei*

CCDM 198) a *Lactobacillus plantarum* (CCDM 188) mohou pozitivně ovlivňovat množství biogenních aminů.

Bylo provedeno hned několik studií, které se zabývaly degradační schopností mikroorganismů, jejich izolací a využitím v potravinách. Ve studii Herrero-Fresno a kol. bylo ze sýrů izolováno 17 kmenů *Lactobacillus casei*, z nichž všechny kmeny byly schopny redukovat obsah histaminu a tyraminu [49]. U fermentovaných klobás vyrobených z rybiho masa byl pozorován úbytek hlavních aminů tvořených při této fermentaci (putrescinu, kadaverinu a tyraminu) vlivem *Lactobacillus plantarum*. Bylo zjištěno, že kmen *L. plantarum* ZY-40 byl schopen redukovat koncentrace putrescinu a kadaverinu o více než 70 %, ale k úbytku tyraminu vlivem působení tohoto kmene nedošlo [50]. Studie Callejón a kol. se zabývala sledováním schopnosti degradace (díky enzymům) biogenních aminů některých bakterií mléčného kvašení, které byly izolovány z vína [47]. Některé kmeny *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. hilgardii*, *Pediococcus acidilactici* a *P. pentosaceus* byly enzymaticky aktivní vůči histaminu, tyraminu a putrescinu, které dokázaly redukovat. Nejvyšší schopnost degradace byla zaznamenána u enzymů kmene *Lactobacillus plantarum* J16, který byl schopen redukovat až 41 % putrescinu po 1 týdnu. Významná degradační schopnost byla také zjištěna u kmene *Pediococcus acidilactici* CECT 5930, jehož enzymy byly schopny redukovat histamin o 14 %, putrescin o 19 % a tyramin až o 40 % po 48 hodinové kultivaci [47].

U sýra typu Munster byla rovněž pozorována schopnost startérové kultury ovlivnit množství biogenních aminů během zrání. V průběhu fermentace byl přidán kmen *Brevibacterium linens* a také určité množství histaminu a tyraminu. Během 4-týdenního zrání byla zjištěna schopnost bakterie *B. linens* redukovat množství histaminu i tyraminu o 55 až 70 % [51].

Existují rovněž studie zabývající se redukcí biogenních aminů pomocí mikroskopických hub izolovaných z vín. Ve studii Cueva a kol. bylo izolováno celkem 44 kmenů hub, z nichž všechny vykazovaly schopnost redukovat množství tyraminu, histaminu a putrescinu. Druhy *Penicillium citrinum*, *Alternaria* sp., *Phoma* sp., *Ulocladium chartarum* a *Epicoccum nigrum* vykazovaly nejvyšší kapacitu pro aminovou degradaci. Například *Penicillium citrinum* JN578626 byl schopen degradovat koncentrace (0,05 g/l) histaminu až o 100 %, putrescinu o 99,69 % a tyraminu o 99,91 % po 10 dnech kultivace při 22 °C [52].

Výsledky experimentů realizovaných v rámci této bakalářské práce, podobně jako výsledky dalších studií zmiňovaných výše, poukazují na to, že schopnost degradace biogenních aminů nelze zobecňovat na jednotlivé rody nebo druhy bakterií, ale že se jedná o vlastnost kmenově

specifickou. Toto tvrzení podporují výsledky získané v této bakalářské práci, kdy bylo testováno několik kmenů náležících k témuž druhu (zejména kmeny druhů *Lactobacillus plantarum*, *L. casei* a *Brevibacterium linens*), u nichž byla zjištěna rozdílná schopnost degradace jednotlivých biogenních aminů. K podobným výsledkům dospěli i další autoři [47,49,50].

Schopnost degradace biogenních aminů byla v této práci studována v podmínkách *in vitro*, které se mohou odlišovat od podmínek reálných vzorků, tj. potravin, kde se tyto bakterie, schopné degradace aminů, mohou chovat jinak vlivem odlišných vnějších podmínek (např. dostupnosti živin, vodní aktivity, optimální teploty nebo pH, přítomnosti látek inhibujících růst mikroorganismů, apod.). Výsledky této práce tak mohou přispět ke studiu schopnosti degradace biogenních aminů testovanými bakteriálními kmeny, případně dalšími kmeny uvedených druhů bakterií (které byly testovány v jiných studiích). Uvedené výsledky bude třeba ověřit v podmínkách modelově vyrobených potravin za definovaných podmínek. Navíc bude třeba ověřit další vlastnosti těchto kmenů, jako například neschopnost produkce faktorů virulence, neschopnost přenosu rezistence k antibiotikům a dalších nežádoucích vlastností. Pokud za takto definovaných podmínek budou výsledky této práce ověřeny a potvrzeny, bude možné přistoupit k další fázi výzkumu, kdy bude možné přidávat kmeny schopné degradace biogenních aminů do potravin vyráběných v potravinářských provozech za podmínek dodržování hygienických podmínek s cílem snížit riziko výskytu těchto látek v potravinách.

ZÁVĚR

Hlavním tématem bakalářské práce byly biogenní aminy a především jejich možná degradace. Tato vlastnost byla testována u 54 kmenů bakterií využívaných v mlékárenství, které byly získány ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů (CCDM).

Praktická část byla rozdělena do dvou experimentů. Principem prvního experimentu bylo sledovat schopnost růstu vybraných kmenů v přítomnosti biogenních aminů v pěti minerálních médiích, které se lišily v koncentracích možných zdrojů uhlíku a dusíku pro testované kmeny. Na základě získaných výsledků z prvního experimentu lze uvést, že:

- pouze u kmenů *Lactobacillus plantarum* CCDM 178, *L. plantarum* CCDM 181, *L. plantarum* CCDM 189 a *Pediococcus acidilactici* CCDM 814 nebyla ovlivněna schopnost růstu jednak přidavkem biogenních aminů, jednak koncentrací možných zdrojů živin. Kmeny byly schopny růst ve všech variantách minerálních médií za daných podmínek,
- u kmenů *Lactobacillus plantarum* CCDM 182, *L. plantarum* CCDM 183, *L. plantarum* CCDM 391 a *Pediococcus* sp. CCDM 396 byl pozorován růst v minerálních médiích 2, 3, 4 a 5. Kmeny nebyly schopny růst v minerálním médiu 1,
- ostatních 46 kmenů nedokázalo překonat testované podmínky.

Principem druhého experimentu a hlavním cílem práce bylo ověřit schopnost vybraných kmenů degradovat biogenní aminy fenyletylamin, putrescin, kadaverin, histamin a tyramin v závislosti na čase (24 a 48 hodin) a obsahu živin (optimální a poloviční kultivační médium). Na základě získaných výsledků z druhého experimentu lze uvést, že:

- u všech 54 kmenů byl metodou HPLC stanoven úbytek koncentrace testovaných biogenních aminů,
- u jednotlivých kmenů byla zaznamenána rozdílná schopnost degradovat biogenní aminy v závislosti na preferenci testovaných podmínek,
- největší schopnost degradace vykazoval kmen *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198, který byl schopen po 24 hodinové kultivaci v polovičním médiu redukovat množství putrescinu, kadaverinu a histaminu o více než 50 %,
- výrazný úbytek histaminu, až o 40 %, byl zjištěn působením kmene *Lactobacillus plantarum* CCDM 188 v polovičním médiu po 24 hodinové kultivaci.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] WUNDERLICOVÁ, L., BUŇKOVÁ, L., KOUTNÝ, M., VALENTA, T., BUŇKA, F. Novel touchdown-PCR method for the detection of pu-trescine producing Gram-negative bacteria in food products. *Food Microbiology*. 2013, 34(2), 268-276. DOI: 10.1016/j.fm.2012.09.024. ISSN 07400020.
- [2] HOLEČEK, M. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1562-7.
- [3] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin 2. Rozš. a přeprac. 3. vyd.* Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [4] ŠÍCHO, V., VODRÁŽKA, Z., KRÁLOVÁ, B. *Potravinářská biochemie: ... učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické. 2., dopln. a přeprac. vyd.* Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1981.
- [5] TORRIANI, S., SUZZI, G. Biogenic Amines in Fermented Foods. [online]. 1. Frontiers Media, 2015 [cit. 2017-08-10]. ISBN 9782889195930. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/researchtopic/512/biogenic-amines-in-fermented-foods>
- [6] ÖNAL, A. Current analytical methods for determination of biogenic amines in foods. *Food chemistry*. 103: 1475-1486. 2006. ISSN: 03088146
- [7] DĄBROWSKI, V. M., SIKORSKI, Z. E. *Toxins in Food* [online]. 1. London: CRC Press, 2004 [cit. 2017-07-25]. ISBN 978-020-3502-358. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com.proxy.k.utb.cz/doi/abs/10.1201/9780203502358.ch6>
- [8] SMĚLÁ, D., PECHOVÁ, P., KOMPRDA, T., KLEJBUS, B., KUBÁŇ, V. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování, *Chemické listy*, 98(2004)432-437.
- [9] SANTOS, M. H. S. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1996, 29(2-3), 213-231 [cit. 2017-08-22]. DOI: 10.1016/0168-1605(95)00032-1. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/0168160595000321>
- [10] HALÁSZ, A., BARÁTH, A., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science*. 1994, 5(2): 42-49. DOI: 10.1016/0924-2244(94)90070-1. ISSN 09242244.

- [11] KOHAJDOVÁ, Z., KAROVIČOVÁ, J., GREIF, G. 2008. Biogénne amíny v potravinách. In *Potravinářstvo* [online]. 2. únor 2008, roč. 2, č. 1 [cit. 2017-09-12]. s. 30 - 49. Dostupné z: ISSN 1337-0960.
- [12] NOLLET, L. M. L., TOLDRÁ, F. *Handbook of food analysis* [online]. Third edition. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor, 2015 [cit. 2017-07-25]. ISBN 978-1-4665-5654-6. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com.proxy.k.utb.cz/doi/abs/10.1201/b18668-56>
- [13] Tyramin. In: *Velký lékařský slovník* [online]. [cit. 2017-08-22]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/pojem/tyramin>
- [14] BURDYCHOVÁ, R., DOHNAL, V. Využití HPLC ke stanovení produktu exprese genu pro mikrobiální tyramindekarboxylasu, *Chemické Listy*, 101(2007)907-910.
- [15] Histamin. In: *Velký lékařský slovník* [online]. [cit. 2017-08-22]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/pojem/histamin>
- [16] JUTEL, M., AKDIS, M., AKDIS, C. A. *Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology* [online]. [cit. 2017-08-25]. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2009.03374.x. ISBN 10.1111/j.1365-2222.2009.03374.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2222.2009.03374.x>
- [17] BÄUMER, W., ROBBACH, K. Histamine as an immunomodulator. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* [online]. 2010, 8(7), 495-504 [cit. 2017-09-12]. DOI: 10.1111/j.1610-0387.2010.07346.x. ISSN 16100379. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1610-0387.2010.07346.x>
- [18] RAUSCHER-GABERNIG, E., GROSSGUT, R., BAUER, F., PAULSEN, P. Assessment of alimentary histamine exposure of consumers in Austria and development of tolerable levels in typical foods. *Food Control* [online]. 2009, 20(4), 423-429 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.07.011. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713508001849>
- [19] SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* [online]. 1996, 29(7), 675-690 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1016/S0963-9969(96)00066-X. ISSN 09639969. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399699600066X>
- [20] Tryptamin. *Velký lékařský slovník* [online]. [cit. 2017-09-12]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/pojem/tryptamin>

- [21] Melatonin. *Velký lékařský slovník* [online]. [cit. 2017-09-12]. Dostupné z: <http://le-karske.slovníky.cz/pojem/melatonin>
- [22] MA, W., CHEN, K., LI, Y., HAO, N., WANG, X., OUYANG, P. Advances in Cadaverine Bacterial Production and Its Applications. *Engineering* [online]. 2017, 3(3), 308-317 [cit. 2017-09-12]. DOI: 10.1016/J.ENG.2017.03.012. ISSN 20958099. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S209580991730423X>
- [23] Lysin. [online]. [cit. 2017-09-12]. Dostupné z: <http://hplc1.sweb.cz/Amk/Formula/lysine.gif>
- [24] SENGUPTA, T., MOHANAKUMAR, K. P. 2-Phenylethylamine, a constituent of chocolate and wine, causes mitochondrial complex-I inhibition, generation of hydroxyl radicals and depletion of striatal biogenic amines leading to psycho-motor dysfunctions in Balb/c mice. *Neurochemistry International* [online]. 2010, 57(6), 637-646 [cit. 2017-09-12]. DOI: 10.1016/j.neuint.2010.07.013. ISSN 01970186. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018610002391>
- [25] WUNDERLICHOVÁ, L., BUŇKOVÁ, L., KOUTNÝ, M., JANČOVÁ, P., BUŇKA, F. Formation, Degradation, and Detoxification of Putrescine by Food-borne Bacteria: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2014, 13(5), 1012-1030 [cit. 2017-09-11]. DOI: 10.1111/1541-4337.12099. ISSN 15414337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12099>
- [26] SU, H. H., CHUANG, L. Y., TSENG, W. L., LU, CH. Y. Micro-scale strategy to detect spermine and spermidine by MALDI–TOF MS in foods and identification of apoptosis-related proteins by nano-flow UPLC–MS/MS after treatment with spermine and spermidine. *Journal of Chromatography B* [online]. 2015, 978-979, 131-137 [cit. 2017-09-13]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.11.037. ISSN 15700232. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023214007429>
- [27] PEGG, A. E. The function of spermine. *IUBMB Life* [online]. 2014, 66(1), 8-18 [cit. 2017-09-13]. DOI: 10.1002/iub.1237. ISSN 15216543. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/iub.1237>
- [28] Nitrosamines. *Encyclopedia of Toxicology* [online]. 3rd ed. Burlington: Elsevier Science, 2014, s. 584-585 [cit. 2017-09-13]. ISBN 9780123864550. Dostupné z:

- http://ac.els-cdn.com.proxy.k.utb.cz/B9780123864543005236/3-s2.0-B9780123864543005236-main.pdf?_tid=1b998c42-9882-11e7-bc71-00000aacb361&acdnat=1505307203_6a894aeaeefdf8d2c4780f283e7f84
- [29] HUI, Y. H. *Handbook of food science, technology, and engineering* [online]. Boca Raton: Taylor, 2006 [cit. 2017-09-19]. Food science and technology (Taylor, 148. ISBN 978-0-8493-9847-6. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com.proxy.k.utb.cz/doi/abs/10.1201/b15995-15>
- [30] RUIZ-CAPILLAS, C., NOLLET, L. M. L. *Flow Injection Analysis of Food Additives* [online]. 1. london: klk, 2014 [cit. 2017-07-25]. ISBN 978-1-4822-1820-6. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com.proxy.k.utb.cz/doi/abs/10.1201/b19644-45>
- [31] Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. In: *EUR – Lex* [European Union law], [online]. [cit. 2018-03-26]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX:32005R2073>
- [32] NOLLET, L. M. L., TOLDRÁ, F. *Safety Analysis of Foods of Animal Origin* [online]. 1. Hoboken: CRC Press, 2010 [cit. 2017-07-25]. ISBN 978-143-9848-197. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com.proxy.k.utb.cz/doi/abs/10.1201/EBK1439848173-14>
- [33] SPANO, G., RUSSO, P., LONVAUD-FUNEL, A., et al. Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2010, 64, S95-S100 [cit. 2017-09-20]. DOI: 10.1038/ejcn.2010.218. ISSN 0954-3007. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/ejcn.2010.218>
- [34] NOVELLA-RODRÍGUEZ, S., VECIANA-NOGUÉS, M. T., VIDAL-CAROU, M. C. Biogenic Amines and Polyamines in Milks and Cheeses by Ion-Pair High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2000, 48(11), 5117-5123 [cit. 2017-09-23]. DOI: 10.1021/jf0002084. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0002084>
- [35] DANIEL, D., DOS SANTOS, V. B., VIDAL, D. T. R., DO LAGO, L. Determination of biogenic amines in beer and wine by capillary electrophoresis–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2015, 1416, 121-128 [cit.

- 2017-09-22]. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.08.065. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967315012625>
- [36] BUŇKA, F., BUDINSKÝ, P., ČECHOVÁ, M., DRIENOVSKÝ, V., PACHLOVÁ, V., MATOULKOVÁ, D., KUBÁŇ, V., BUŇKOVÁ, L. Content of biogenic amines and polyamines in beers from the Czech Republic. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2012, 118(2), 213-216 [cit. 2017-09-22]. DOI: 10.1002/jib.31. ISSN 00469750. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jib.31>
- [37] GUO, Y. Y., YANG, Y. P., PENG, Q., HAN, Y. Biogenic amines in wine: a review. *International Journal of Food Science* [online]. 2015, 50(7), 1523-1532 [cit. 2017-09-22]. DOI: 10.1111/ijfs.12833. ISSN 09505423. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/ijfs.12833>
- [38] Biogenní aminy. *Bezpečnost potravin* [online]. [cit. 2017-09-22]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76472.aspx>
- [39] SILVA, N. *Microbiological examination methods of food and water: a laboratory manual* [online]. [cit. 2017-07-25]. ISBN 978-0-203-16839-4. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com.proxy.k.utb.cz/doi/abs/10.1201/b13740-15>
- [40] SALMINEN, S., VON WRIGHT, A., OUWEHAND, A. *Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects* [online]. 3rd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, 2004 [cit. 2017-07-25]. ISBN 978-082-4752-033. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com.proxy.k.utb.cz/doi/abs/10.1201/9780824752033.ch1>
- [41] RAY, B., BHUNIA, A. B. *Fundamental food microbiology*. Fifth edition. Boca Raton: CRS Press, Taylor, 2014. ISBN 978-1-4665-6443-5.
- [42] Mléčné kvašení. In: *Zatamoko mushroom* [online]. 2004 [cit. 2017-10-01]. Dostupné z: http://zatamoko.cz/houby/teorie_j.php?q=old/teorie_j.php
- [43] ALVAREZ, M. A., MORENO-ARRIBAS, M. V. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science* [online]. 2014, 39(2), 146-155 [cit. 2017-09-11]. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.07.007. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224414001599>
- [44] FLORIS, G., AGRÒ, A. F. Amine Oxidases. *Encyclopedia of Biological Chemistry* [online]. Elsevier, 2004, , 85 [cit. 2017-10-07]. DOI: 10.1016/B0-12-443710-

- 9/00409-9. ISBN 9780124437104. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0124437109004099>
- [45] NAILA, A., FLINT, S., FLETCHER, G., BREMER, P., MEERDINK, G. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science*[online]. 2010, 75(7), R139-R150 [cit. 2017-12-19]. 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>
- [46] BENKERROUM, N. Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2016, 15(4), 801-826 [cit. 2017-12-12]. DOI: 10.1111/1541-4337.12212. ISSN 15414337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12212>
- [47] CALLEJÓN, S., SENDRA, R., FERRER, S., PARDO, I. Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2014, 98(1), 185-198 [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1007/s00253-013-4829-6. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-013-4829-6>
- [48] LEE, Y. CH., LIN, CH. S., LIU, F. L., HUANG, T. CH., TSAI, Y. H. Degradation of histamine by *Bacillus polymyxa* isolated from salted fish products. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2015, 23(4), 836-844. DOI: 10.1016/j.jfda.2015.02.003. ISSN 10219498.
- [49] HERRERO-FRESNO, A., MARTÍNEZ, N., SÁNCHEZ-LLANA, E., DÍAZ, M., FERNANDÉZ, M., MARTÍN, M. C., LADERO, V., ALVAREZ MIGUEL, A. *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2012, 157(2), 297-304 [cit. 2018-04-25]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.002. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816051200284X>
- [50] ZHANG, Q., LIN, S., NIE, X. Reduction of biogenic amine accumulation in silver carp sausage by an amine-negative *Lactobacillus plantarum*. *Food Control* [online]. 2013, 32(2), 496-500 [cit. 2018-04-25]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.01.029. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713513000443>

- [51] LEUSCHNER, R. G. K., HAMMES, W. P. Degradation of Histamine and Tyramine by *Brevibacterium linens* during Surface Ripening of Munster Cheese. *Journal of Food Protection*[online]. 1998, 61(7), 874-878 [cit. 2018-04-25]. DOI: 10.4315/0362-028X-61.7.874. ISSN 0362-028X. Dostupné z: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-61.7.874>
- [52] CUEVA, C., GARCÍA-RUIZ, A., GONZÁLEZ-ROMPINELLI, E., BARTOLOME, B., MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J., SALAZAR, O., VINCENTE, M.F., BILLS, G.F., MORENO-ARRIBAS, M.V. Degradation of biogenic amines by vineyard ecosystem fungi. Potential use in winemaking. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2012, 112(4), 672-682 [cit. 2018-04-25]. 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>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BA	Biogenní aminy
CNS	Centrální nervová soustava
MAP	Balení v modifikované atmosféře
MAO	Monoaminoxidázy
DAO	Diaminoxidázy
HIM	Histamin
TYM	Tyramin
TRM	Tryptamin
PUT	Putrescin
CAD	Kadaverin
SPD	Spermidin
SPM	Spermin
PAO	Polyaminoxidázy
BMK	Bakterie mléčného kvašení
AO	Aminoxidázy
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Dekarboxylace aminokyselin [4].....	11
Obr. 2. Strukturní vzorce a názvy vybraných biogenních aminů [6].....	11
Obr. 3. Dekarboxylace tyrozinu za vzniku tyraminu [3]	14
Obr. 4. Oxidace tyraminu na oktopamin [3]	14
Obr. 5. Metylace tyraminu za vzniku N-metyltyraminu [3]	14
Obr. 6. Dekarboxylace histidinu za vzniku histaminu [11]	15
Obr. 7. Dekarboxylace a další reakce tryptofanu [3].....	16
Obr. 8. Dekarboxylace lyzinu [3,23]	16
Obr. 9. Dekarboxylace fenylalaninu za vzniku 2-fenyletylaminu [3]	16
Obr. 10. Dekarboxylace ornitinu za vzniku putrescinu [3]	17
Obr. 11. Biosyntéza spermidinu a sperminu [3,27].....	17
Obr. 12. Hlavní reakce biogenních aminů [3].....	18
Obr. 13. Homofermentativní metabolická dráha [42].....	26
Obr. 14. Heterofermentativní metabolická dráha [42]	27
Obr. 15. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus casei</i> CCDM 422	48
Obr. 16. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> CCDM 198	49
Obr. 17. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> CCDM 802	50
Obr. 18. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 147	51
Obr. 19. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 178	51
Obr. 20. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 181	52
Obr. 21. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 182	53
Obr. 22. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 183	54
Obr. 23. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 185	55

Obr. 24. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 186	56
Obr. 25. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 187	57
Obr. 26. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 188	58
Obr. 27. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 189	58
Obr. 28. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 191	59
Obr. 29. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 194	60
Obr. 30. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 195	61
Obr. 31. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 196	62
Obr. 32. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 336	62
Obr. 33. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 375	63
Obr. 34. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 385	64
Obr. 35. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 388	64
Obr. 36. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 391	65
Obr. 37. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i> CCDM 383	66
Obr. 38. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Lactobacillus hilgardii</i> CCDM 828	66
Obr. 39. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Pediococcus inopinatus</i> CCDM 829	67

Obr. 40. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Pediococcus pentosaceus</i> CCDM 862	68
Obr. 41. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Pediococcus</i> sp. CCDM 395	69
Obr. 42. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Pediococcus</i> sp. CCDM 396	69
Obr. 43. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Brevibacterium linens</i> CCDM 96	70
Obr. 44. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Brevibacterium linens</i> CCDM 97	71
Obr. 45. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Brevibacterium linens</i> CCDM 99	71
Obr. 46. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Brevibacterium linens</i> CCDM 201	72
Obr. 47. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Brevibacterium linens</i> CCDM 203	73
Obr. 48. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Brevibacterium linens</i> CCDM 1010	73
Obr. 49. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Brevibacterium linens</i> CCDM 1052	74
Obr. 50. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Kocuria rosea</i> CCDM 204	75
Obr. 51. Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem <i>Kocuria rosea</i> CCDM 205	75

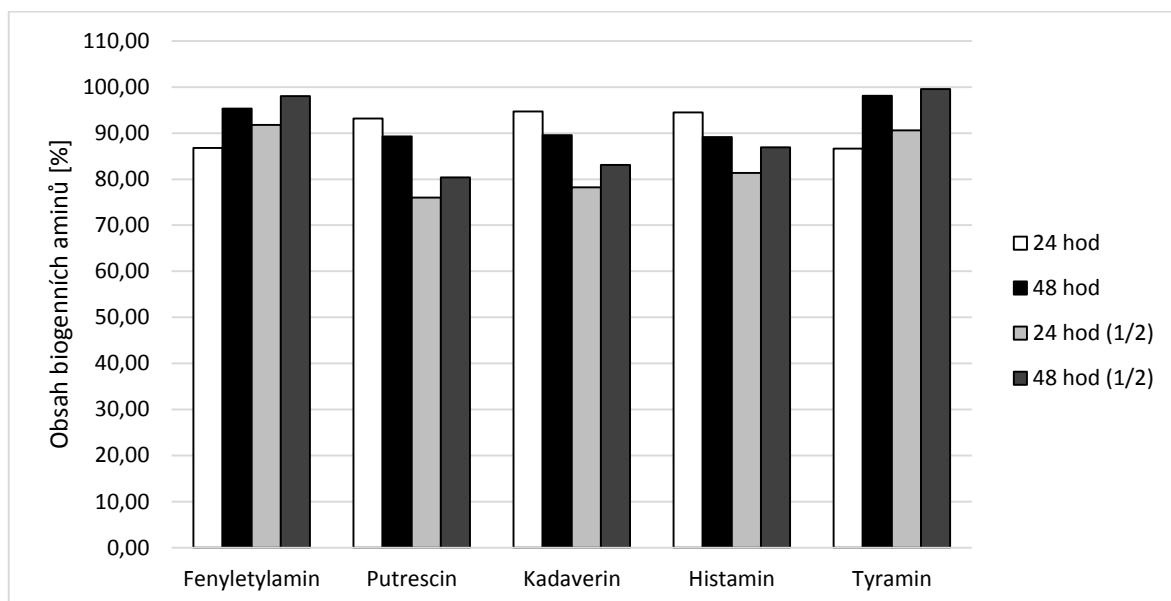
SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů [11]</i>	<i>13</i>
<i>Tab. 2. Biogenní aminy, jejich prekurzory a biologický význam [3,11,19]</i>	<i>20</i>
<i>Tab. 3. Toxické efekty biogenních aminů [12,29].....</i>	<i>21</i>
<i>Tab. 4. Seznam použitých kmenů</i>	<i>36</i>
<i>Tab. 5. Porovnání rozdílů mezi jednotlivými roztoky minerálních médií</i>	<i>40</i>
<i>Tab. 6. Gradientový eluční program pro HPLC.....</i>	<i>44</i>
<i>Tab. 7. Vyhodnocení schopnosti růstu bakterií v přítomnosti biogenních aminů.....</i>	<i>45</i>

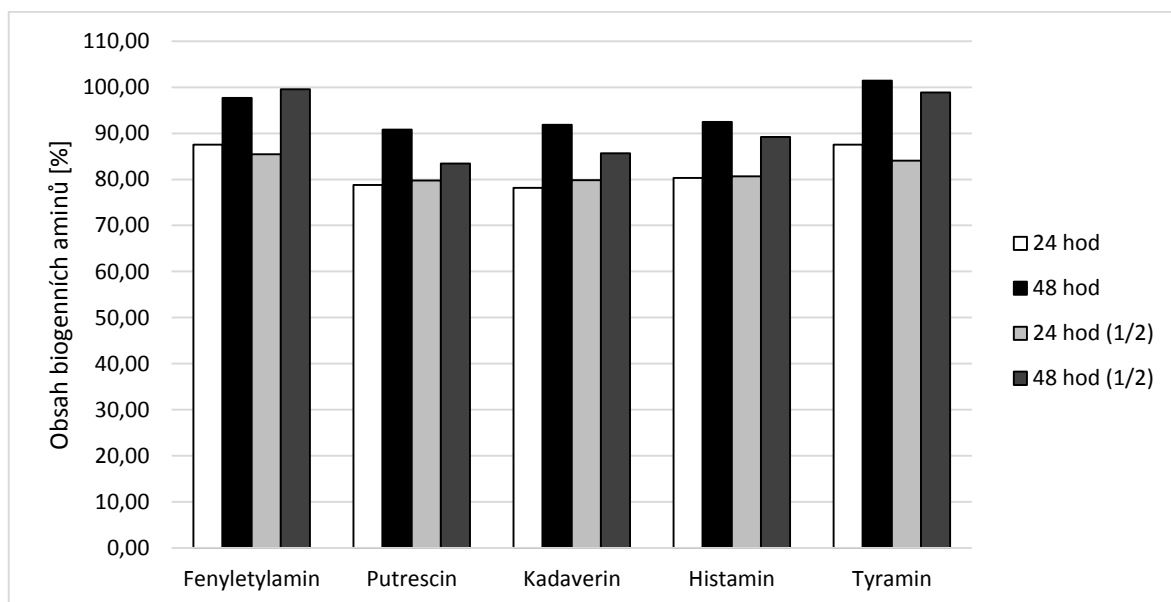
SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: OBSAH BIOGENNÍCH AMINŮ V KULTIVAČNÍCH MÉDIÍCH U
KMENŮ BEZ DEGRADAČNÍ AKTIVITY

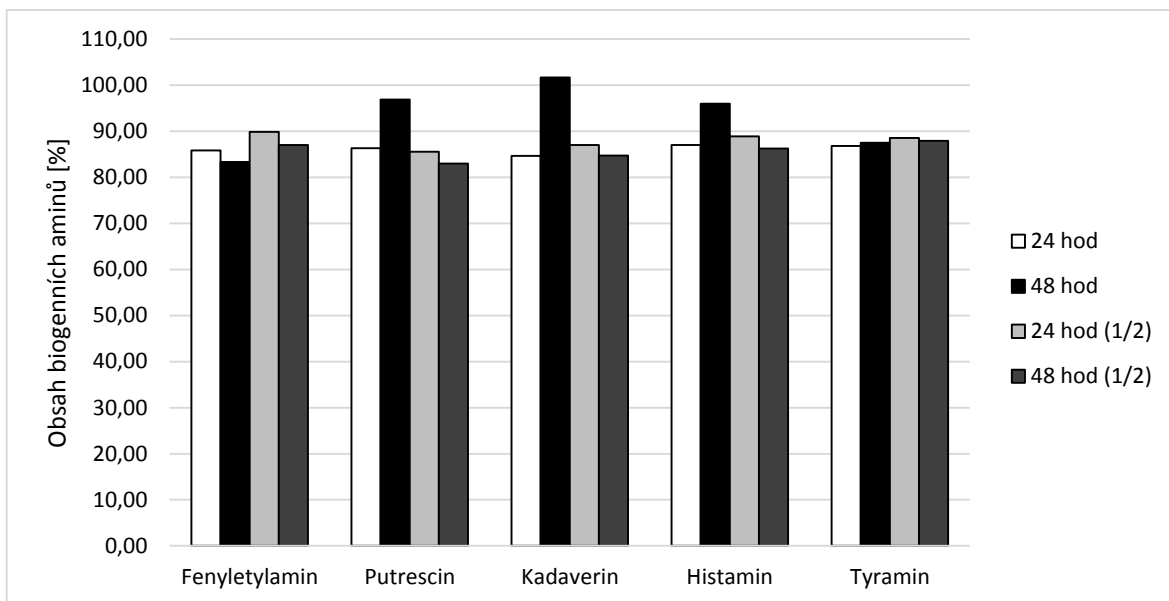
PŘÍLOHA P I: OBSAH BIOGENNÍCH AMINŮ V KULTIVAČNÍCH MÉDIÍCH U KMENŮ BEZ DEGRADAČNÍ AKTIVITY



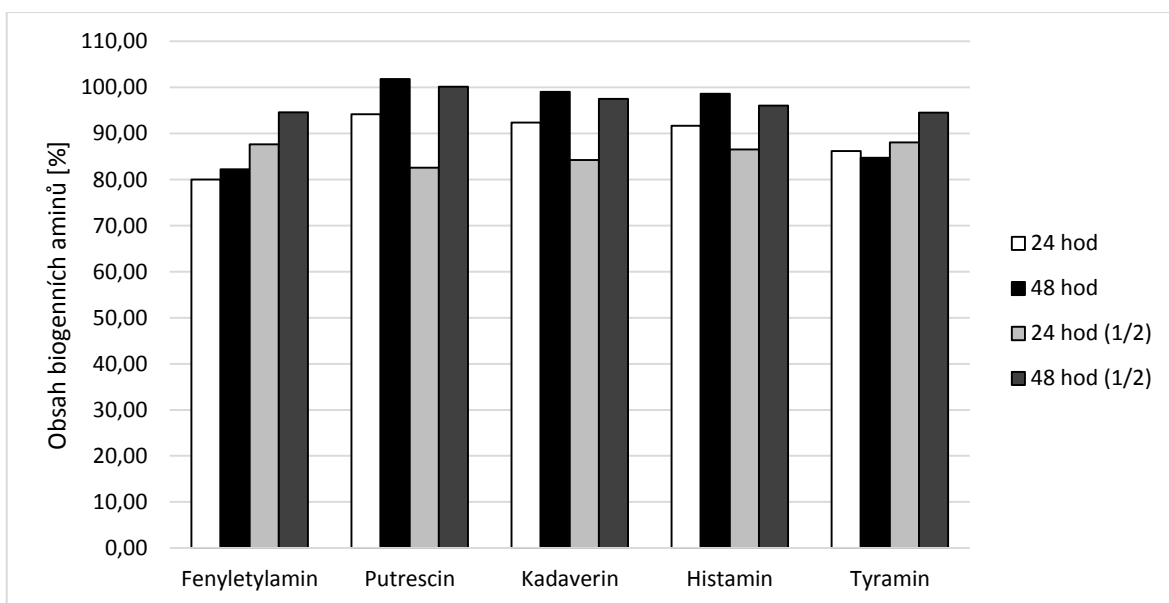
Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem Lactobacillus casei CCDM 650



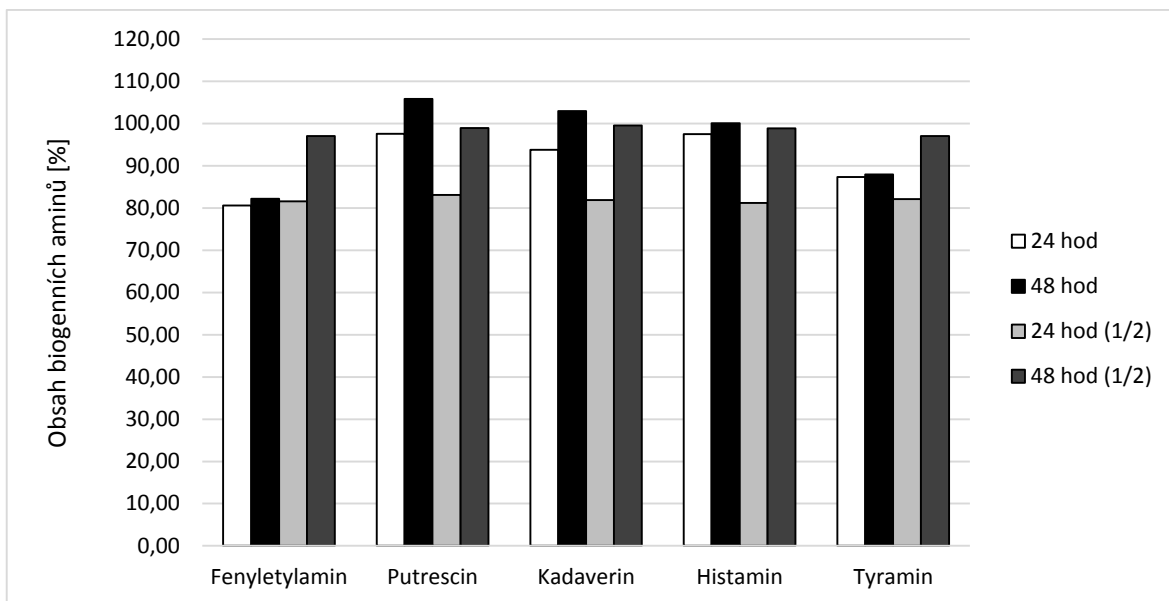
Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem Lactobacillus casei subsp. casei CCDM 145



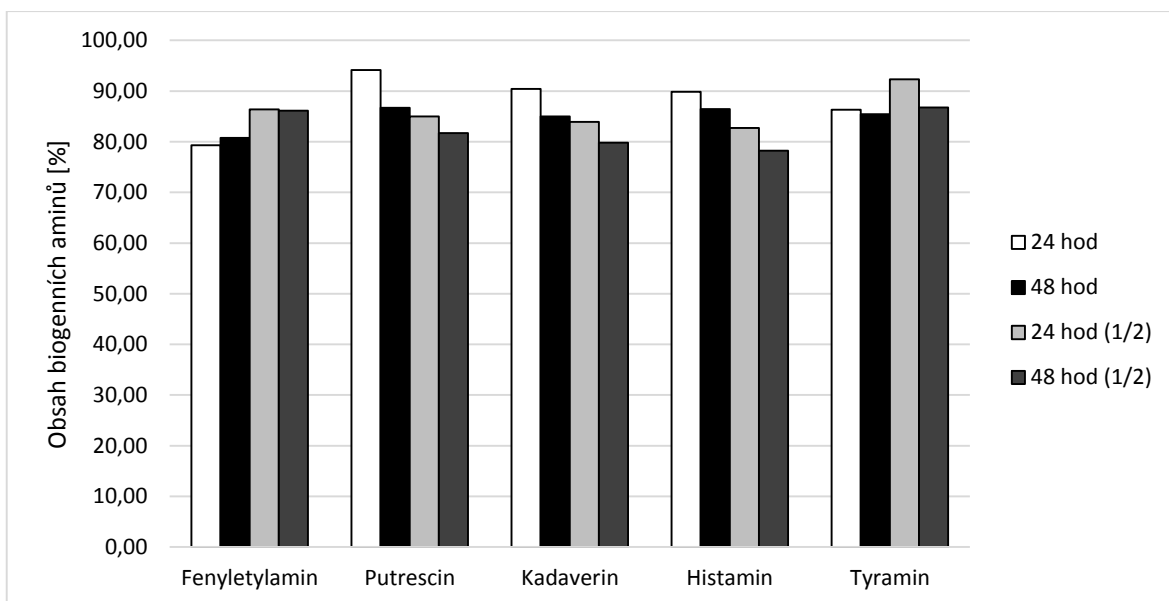
Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem Lactobacillus plantarum CCDM 184



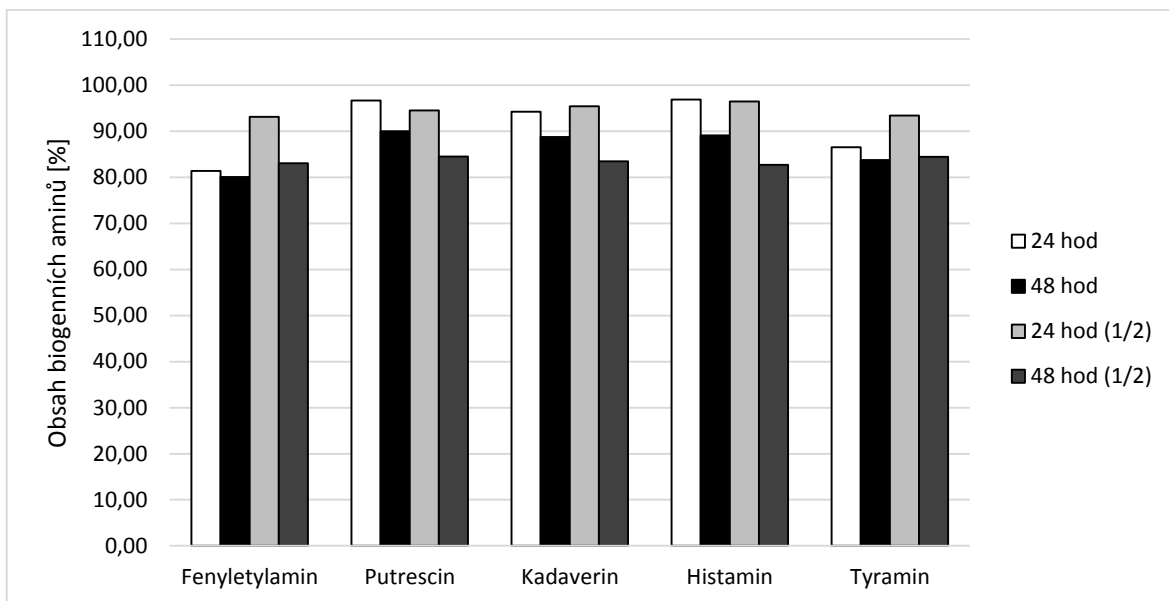
Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem Lactobacillus plantarum CCDM 381



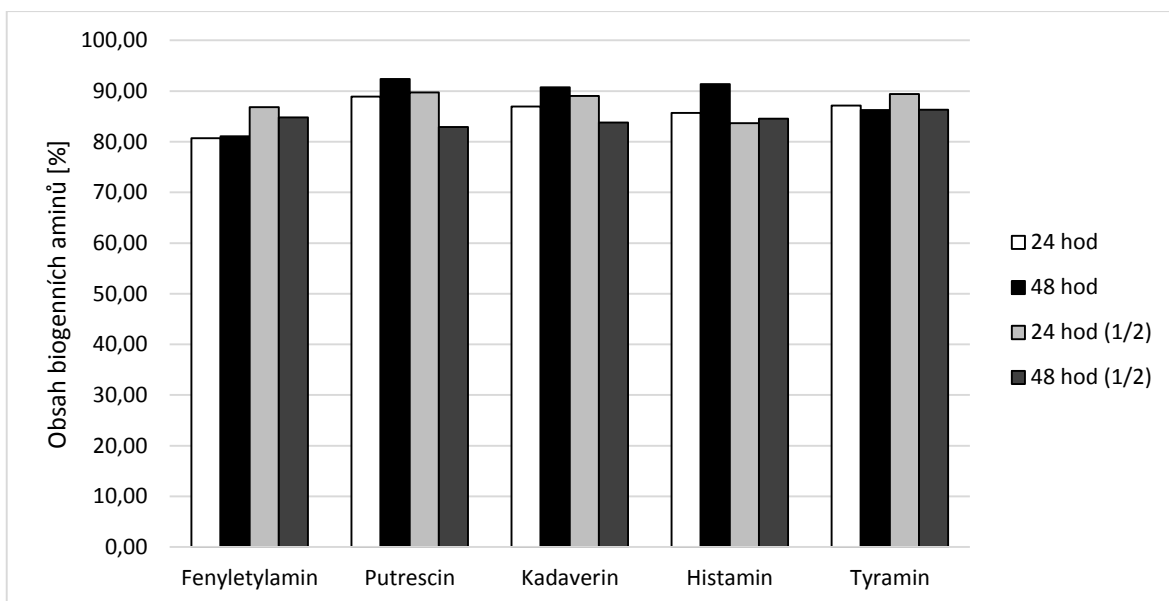
Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem Lactobacillus plantarum CCDM 383



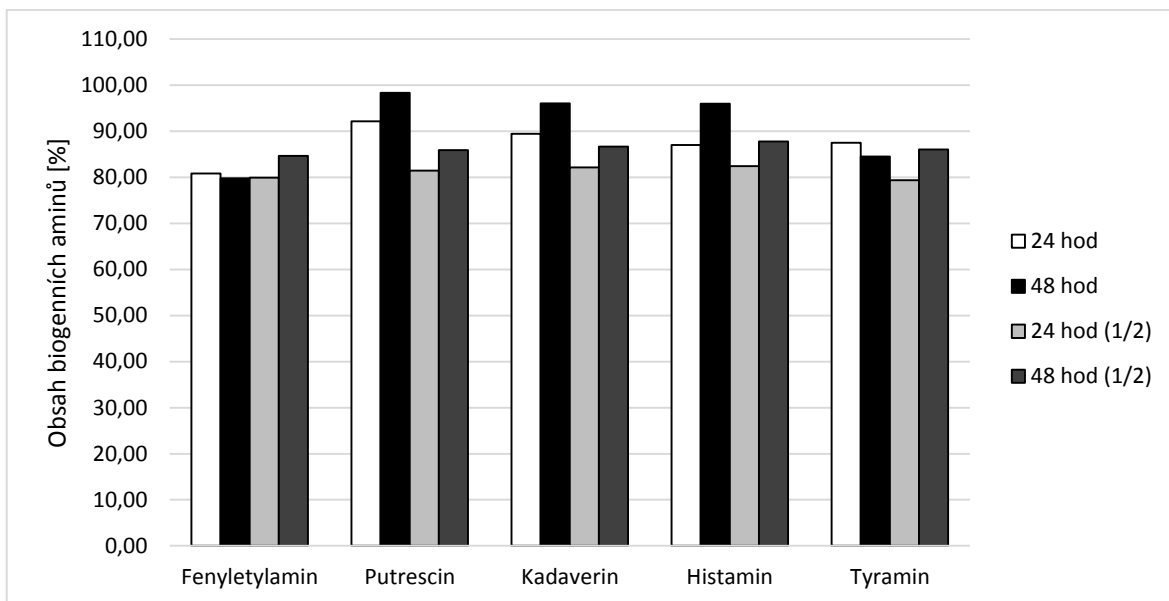
Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem Lactobacillus plantarum CCDM 384



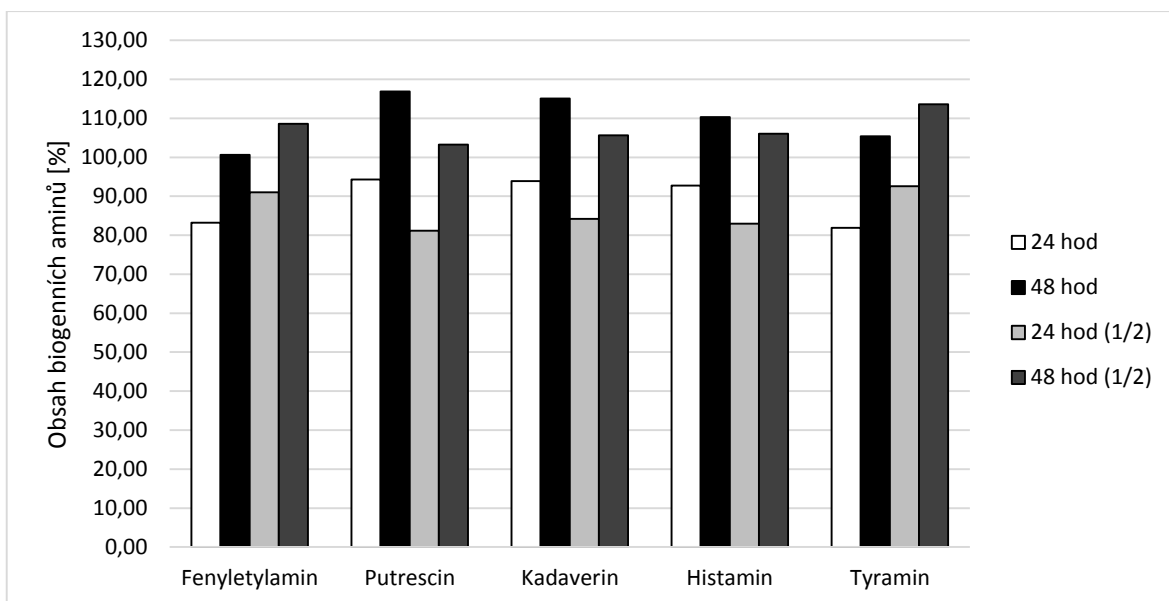
Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem Lactobacillus plantarum CCDM 387



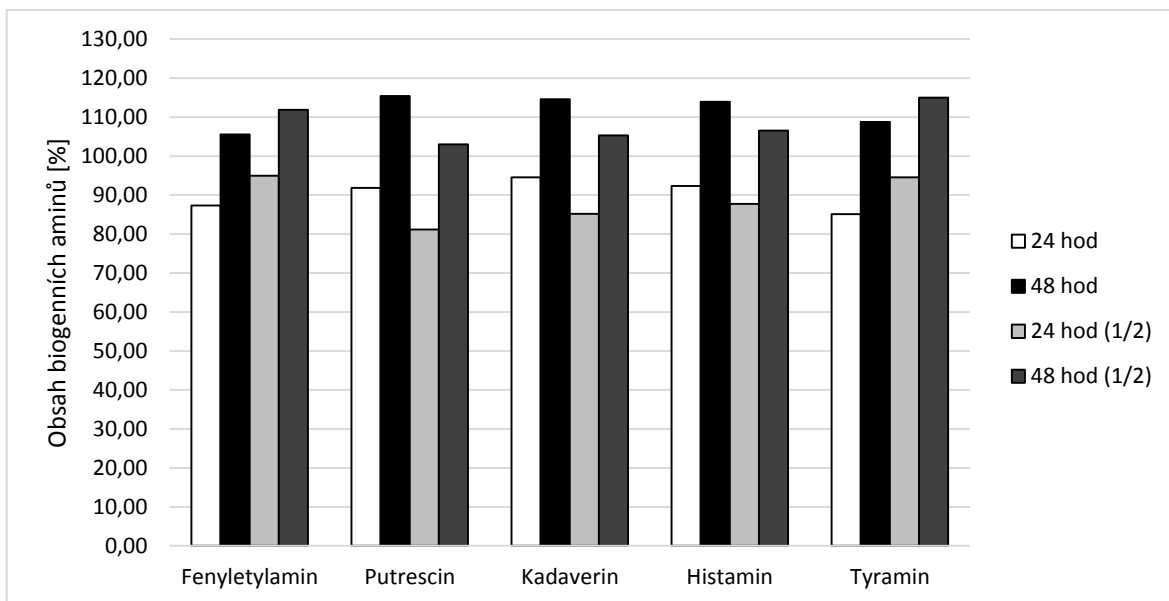
Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem Lactobacillus plantarum CCDM 535



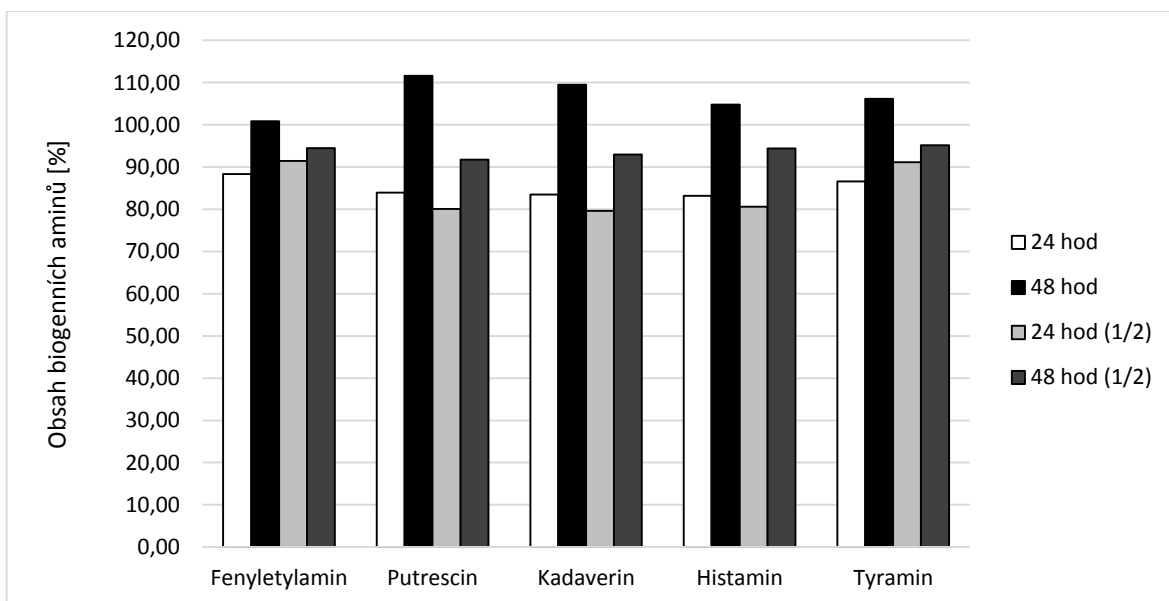
Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem Lactobacillus plantarum CCDM 583



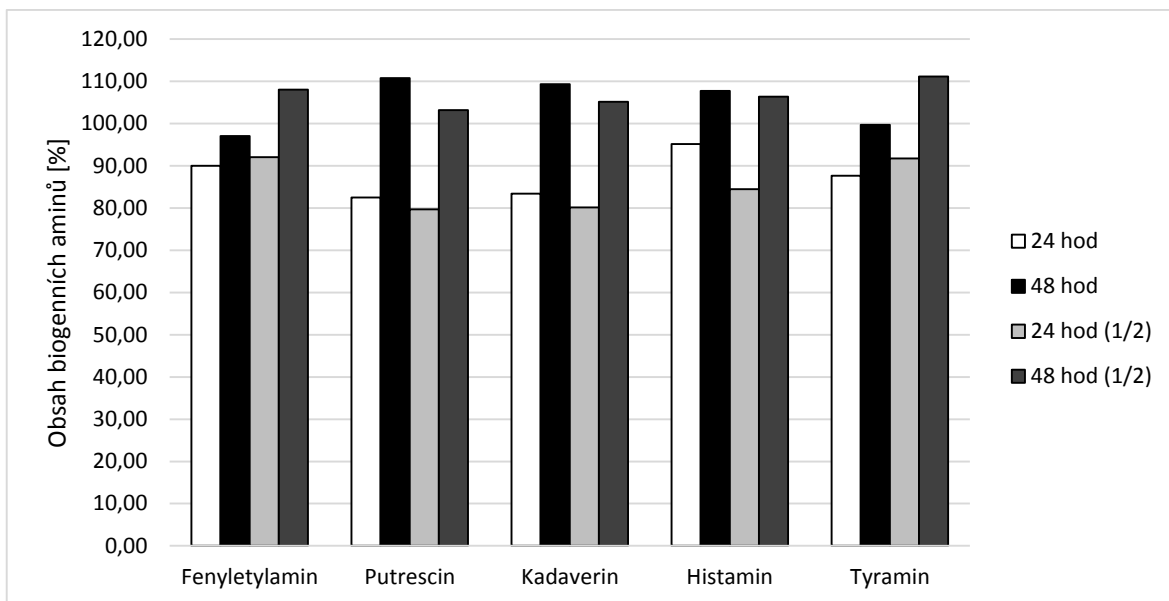
Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem Lactobacillus sakei subsp. carnosus CCDM 776



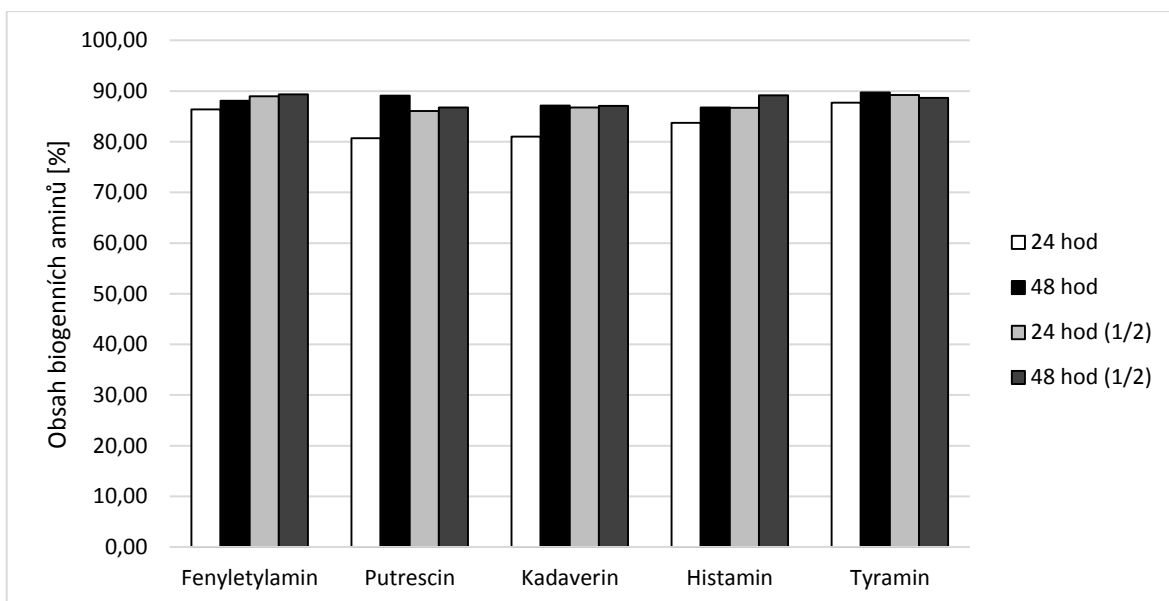
Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem Lactobacillus sakei subsp. sakei CCDM 339



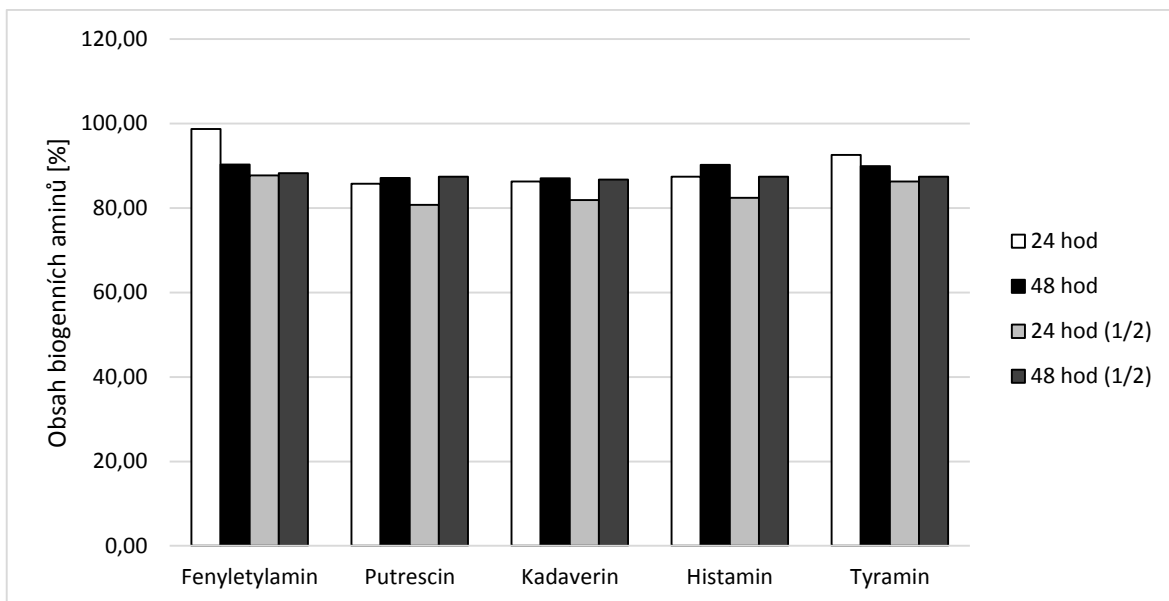
Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem Pediococcus acidilactici CCDM 595



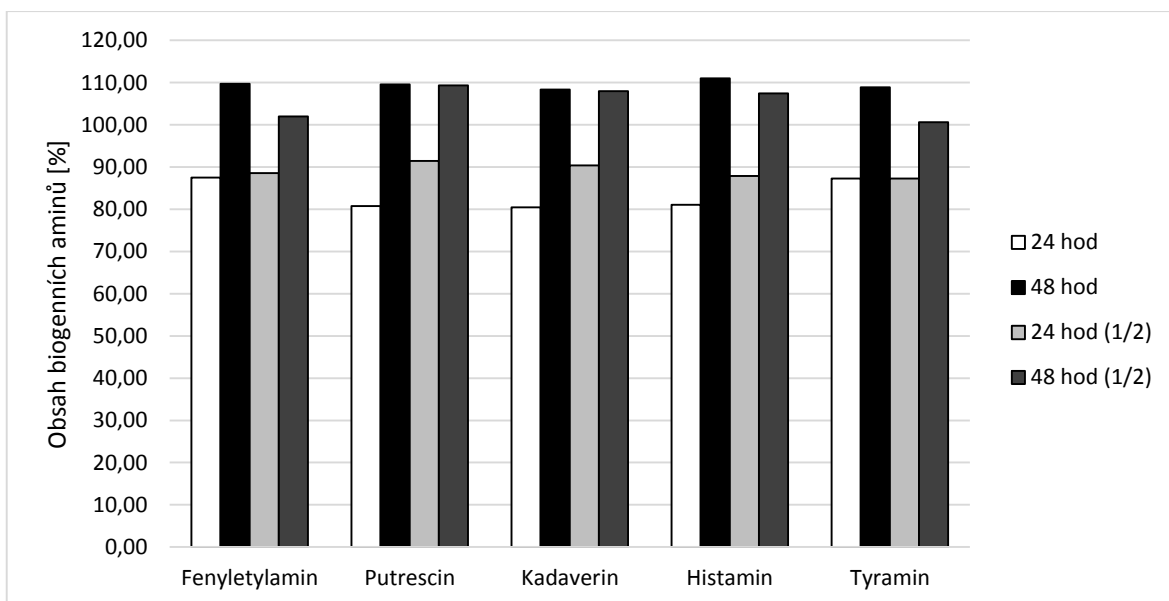
Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem Pediococcus acidilactici CCDM 814



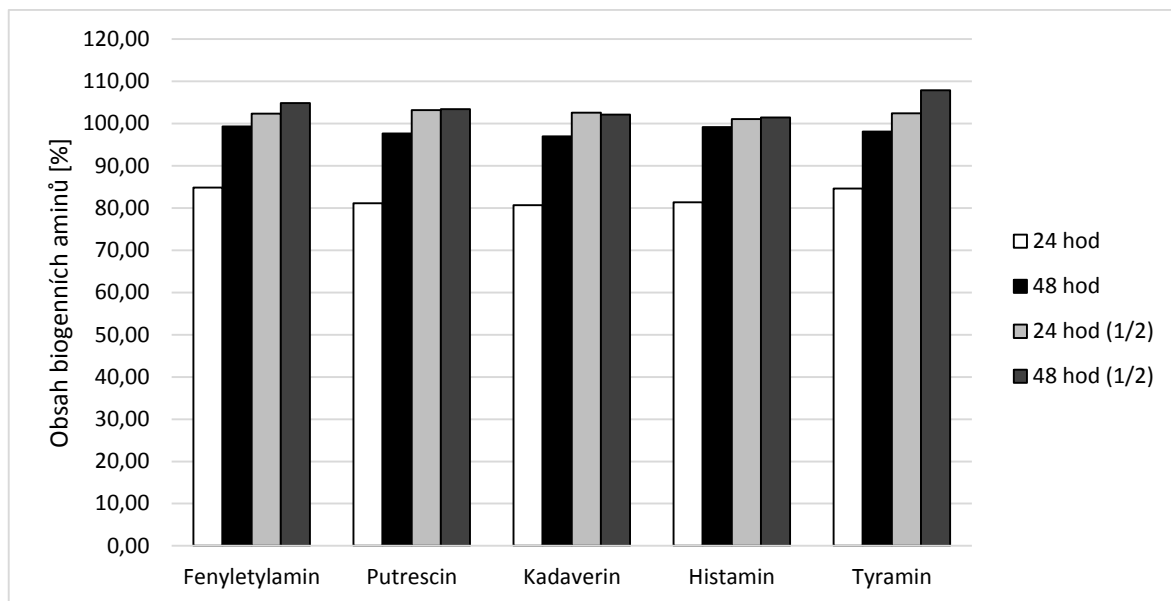
Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem Brevibacterium linens CCDM 200



Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem Brevibacterium linens CCDM 980



Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem Micrococcus luteus CCDM 231



Degradace biogenních aminů v optimálním a polovičním médiu kmenem Micrococcus sp. CCDM 207