

Vliv teploty a pH na produkci biogenních aminů u vybraných probiotických bakterií

Bc. Nikola Žouželková

Diplomová práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie a mikrobiologie potravin
akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Nikola ŽOUŽELKOVÁ**
Osobní číslo: **T10433**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Vliv teploty a pH na produkci biogenních aminů u vybraných probiotických bakterií**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika a vznik biogenních aminů v potravinách
2. Potravinářsky významné mikroorganismy schopné produkce biogenních aminů, zaměřit se na startérové kultury užívané v praxi pro produkci mléčných fermentovaných výrobků
3. Vlastnosti, zdravotní význam a potenciální dekarboxylázová aktivita probiotik

II. Praktická část

1. Metodika stanovení produkce biogenních aminů
2. Sledování vlivu vybraných vnějších faktorů na růst a produkci biogenních aminů vybranými probiotickými bakteriemi (*Lactobacillus rhamnosus*)
3. Statistické vyhodnocení výsledků
4. Formulace závěrů

Rozsah diplomové práce: 66 stran

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

1. KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ Z. Biogenic Amines in Food. Chemical Papers [online]. 2005, roč. 59(č. 1), 70-79 [cit. 2012-02-06].
2. TODOROV, S.D, GOMBOSSY DE MELO FRANCO. Lactobacillus Plantarum: Characterization of the Species and Application in Food Production [online]. Food Reviews International, 2010, s. 205-229 [cit. 2012-02-05]. ISBN 8755-9129.
3. SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. Food Research International [online]. 1996, roč. 29(č. 7), 675-690 [cit. 2012-02-05].
4. SANTOS, W.C., M.R. SOUZA, M.O.P. CERQUEIRA a M.B.A. GLÓRIA. Bioactive amines formation in milk by Lactococcus in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32°C. Food Chemistry [online]. 2003, roč. 81, 595-606 [cit. 2012-02-05].
5. PEREIRA, C.I., M.T.B. CRESPO a SAN ROMAO. Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in Lactobacillus curvatus and L. homohiochii. International Journal of Food Microbiology [online]. 2001, roč. 68, 211-216 [cit. 2012-02-05].

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Eva Lorencová

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

1. února 2012

Termín odevzdání diplomové práce:

2. května 2012

Ve Zlíně dne 10. února 2012


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




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

Příjmení a jméno: Bc. Nikola Žouželková

Obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby 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 2.5.2012

Bc. Žouželková Nikola

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá dekarboxylázovou aktivitou a vlivem faktorů (pH, teplota, přídavek glycerolu) na výslednou produkci biogenních aminů kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 za laboratorních podmínek. Tato kultura disponuje probiotickými účinky a je běžně používána v mlékárenském průmyslu jako starterová. Tvorba biogenních aminů byla sledována v supernatantu získaném po kultivaci pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s předkolonovou derivatizací dansylchloridem a UV detekcí. Testovaná mléčná bakterie byla schopná produkce detekovatelných množství putrescinu a tyraminu. Tento experiment prokázal, že lze změnou kultivačních podmínek a úpravou složení média do jisté míry ovlivnit konečné množství biogenních aminů vyprodukované *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289.

Klíčová slova: biogenní aminy, faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu, bakterie mléčného kvašení, probiotika, *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289

ABSTRACT

This thesis deals with the decarboxylation activity of *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 and influencing factors (pH, temperature, glycerol addition) on the total biogenic amine production at the model conditions. This culture disposes of probiotic effects and it is commonly used as starter culture in dairy industry. The production of biogenic amines was determined in the supernatants harvested after cultivation by the means of high performance liquid chromatography after pre-column derivatization by dansylchloride and UV detection. The tested lactic acid bacteria was able to produce detectable amounts of putrescine and tyramine. This experiment proved that the changes of the cultivation conditions can have to some extent the influence on the total amounts of produced biogenic amines by *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289.

Keywords: biogenic amines, influencing factors of decarboxylase activity, lactic acid bacteria, probiotics, *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289

Na tomto místě bych ráda poděkovala mé vedoucí Ing. Evě Lorencové za pomoc při řešení odborné problematiky, cenné rady, čas a spolupráci při zpracování praktické části.

Dále bych chtěla poděkovat paní laborantce Ing. Ludmile Zálešákové za ochotu a pomoc v laboratořích.

Motto: Čím víc se učíme, tím víc odhalujeme svoji nevědomost.

Percy Bysshe Shelley

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 CHARAKTERISTIKA, VZNIK V POTRAVINÁCH A ÚČINKY BIOGENNÍCH AMINŮ NA ZDRAVÍ KONZUMENTŮ	12
1.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA A VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ	12
1.1.1 Chemická struktura biogenních aminů	12
1.2 VLIV BIOGENNÍCH AMINŮ NA LIDSKÉ ZDRAVÍ	14
1.2.1 Histamin	15
1.2.2 Tyramin	16
1.2.3 Výskyt ostatních biogenních aminů	16
2 PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ BAKTERIEMI MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	18
2.1 MLÉČNÉ KVAŠENÍ	18
2.2 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	19
2.3 PROBIOTIKA A JEJICH ÚČINEK	20
2.3.1 Historie probiotik	21
2.3.2 Doposud zjištěné poznatky o probioticích	21
2.3.3 Požadované vlastnosti probiotik	23
2.4 BIOGENNÍ AMINY VZNIKAJÍCÍ BĚHEM FERMENTACE BMK	24
2.4.1 Sýry	24
2.4.2 Rybí výrobky	25
2.4.3 Masné výrobky	25
2.4.4 Víno a pivo	26
2.4.5 Fermentovaná zelenina	27
2.5 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VZNIK BA	27
2.5.1 Hodnota pH	28
2.5.2 Teplota	28
2.5.3 Koncentrace sacharidů	28
2.6 METODY STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	28
3 LACTOBACILLUS SP.	30
3.1 TAXONOMIE	30
3.2 BIOCHEMICKÉ VLASTNOSTI A CHARAKTERISTIKA	31
3.3 METABOLIZMUS RODU <i>LACTOBACILLUS</i>	31
3.4 <i>LACTOBACILLUS RHAMNOSUS</i>	32
3.4.1 Schopnost kmenu <i>Lactobacillus rhamnosus</i> tvořit biogenní aminy	32
II PRAKTICKÁ ČÁST	34
4 CÍL PRÁCE	35
5 MATERIÁL A METODIKA	36
5.1 BAKTERIÁLNÍ KULTURA	36
5.1.1 Příprava bakteriální suspenze	36
5.1.2 Kultivační médium	36

5.2	PRŮBĚH EXPERIMENTU	37
5.3	MĚŘENÍ OPTICKÉ DENZITY	37
5.4	MĚŘENÍ HODNOTY PH MÉDIA PO KULTIVACI.....	38
5.5	ANALÝZA OBSAHU BA VE VZORCÍCH SUPERNATANTŮ	38
6	VÝSLEDKY	39
6.1	VLIV PŘÍDAVKU GLYCEROLU, PH A KULTIVAČNÍ TEPLoty NA RŮST <i>KMENE</i> <i>LACTOBACILLUS RHAMNOSUS</i> CCDM 289.....	39
6.2	MONITORING ZMĚN PH KULTIVAČNÍHO MÉDIA	42
6.3	CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ.....	46
7	DISKUZE	52
8	ZÁVĚR	56
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	57
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	63
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	64
	SEZNAM TABULEK	66

ÚVOD

Současné trendy bezpečnosti potravin věnují zvýšenou pozornost stopovým komponentám, které mohou mít vliv na lidské zdraví. Právě takovými složkami mohou být biogenní aminy vznikající v potravine převážně mikrobiální činností. Akumulace těchto aminů v potravinách vyžaduje dostupnost aminokyselin, mikroorganismů s dekarboxylační aktivitou a vhodné podmínky pro jejich růst. Stanovení biogenních aminů v potravinách má značný význam nejen z hlediska toxikologického, ale může sloužit také jako ukazatel kvality a čerstvosti. Mezi nejčastěji sledované patří histamin, tyramin, tryptamin, spermin, spermidin, kadaverin a putrescin.

Problematice biogenních aminů a jejich stanovení se v současné době věnuje mnoho studií. Zabývají se nejen problematikou příčin vzniku, ale také vývojem rychlých a spolehlivých metod stanovení. Nové poznatky by mohly pomoci minimalizaci vzniku těchto substancí v potravinách během technologických procesů a podpořit tak bezpečnost fermentovaných výrobků. Tato práce je zaměřená hlavně na podmínky ovlivňující produkci biogenních aminů probiotickým kmenem užívaným jako starterová kultura pro výrobu sýrů. Schopnost tvorby těchto ve vyšších koncentracích toxických složek probiotik tedy může být chápána jako kontrast k blahodárným dieteticko-léčebným účinkům na lidský organizmus.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA, VZNIK V POTRAVINÁCH A ÚČINKY BIOGENNÍCH AMINŮ NA ZDRAVÍ KONZUMENTŮ

1.1 Obecná charakteristika a vznik biogenních aminů

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární organické látky dusíkaté povahy, které vznikají dekarboxylací volných aminokyselin, nebo případně procesem aminace či transaminace aldehydů a ketonů [1]. Volné aminokyseliny jsou v potravinách primárně přítomny, nebo mohou vznikat sekundárně pomocí proteolytických mikroorganismů [1, 2]. Potřebné enzymy pro tyto reakce jsou produkovány především dekarboxyláza pozitivními mikroorganismy. V organickém materiálu bílkovinné povahy se tato mikroflóra může vyskytovat přirozeně, nebo je přidávána záměrně jako kvasová kultura z technologického, senzorickeho či dieteticko-léčebného důvodu [1, 2, 3].

Množství BA v potravinách lze také brát jako určitý ukazatel čerstvosti a kvality surovin z hlediska mikrobiální kontaminace v rámci jejich zpracování a skladování [1], [2], [3].

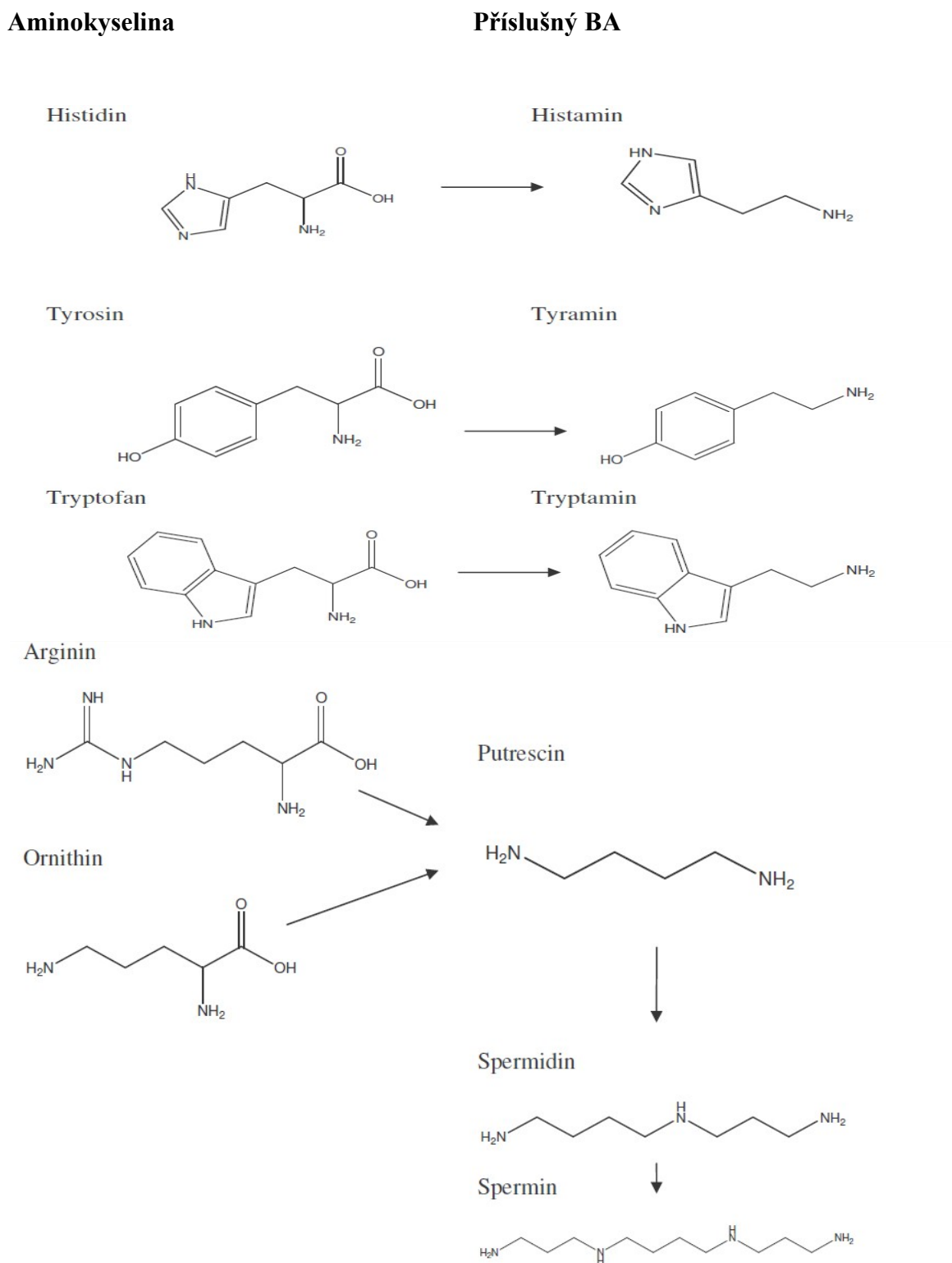
Vznik BA cestou dekarboxylace je znázorněna na obr. č 1., kdy dochází k odstranění α -karboxylové skupiny z aminokyselin a tvorbě odpovídajících BA [1].

1.1.1 Chemická struktura biogenních aminů

BA dělíme podle chemické struktury na alifatické (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatické (tyramin, fenyletylamin) a heterocyklické (histamin, tryptamin). Výše zmíněné alifatické BA jsou navíc řazeny do skupiny polyaminů [1].

Polyaminy jsou alifatické a nízkomolekulární organické sloučeniny se dvěma, třemi nebo čtyřmi aminoskupinami v molekule. Tyto organické sloučeniny se vyskytují jak v mikrobiální, rostlinné, tak i živočišné buňce a mají důležitou funkci v organismu, jelikož se uplatňují při regulaci nukleových kyselin, při stabilizaci membrán, jako donory dusíku v biochemických reakcích nebo při syntéze bílkovin. Původci polyaminů mohou být také střevní bakterie a nekrotické buňky. Některé mohou pocházet ze slinivky břišní a žlučových či střevních sekretů [4, 5, 6].

Nejčastěji se vyskytující polyaminy jsou putrescin a kadaverin, které patří mezi diaminy a představují prekurzor pro složitější spermidin a spermin. Cesta vzniku polyaminů z aminokyselin je znázorněna na obr. 1 [7].



Obr. 1. Biogenní aminy jako produkty dekarboxylace aminokyselin [8]

1.2 Vliv biogenních aminů na lidské zdraví

BA jsou přírodní antinutriční látky, které mohou být příčinou různých fyziologických reakcí. Histamin, tryptamin, fenyletylamin a tyramin jsou biologicky aktivní aminy s vazoaktivními či psychoaktivními účinky. Vazoaktivní aminy působí na vaskulární systém a psychoaktivní aminy působí na neurotransmitery, čímž ovlivňují nervový systém [9].

Lidský organizmus je schopen přijaté či vzniklé BA degradovat, protože disponuje detoxikačním mechanismem. Tato detoxikace zahrnuje činnost několika enzymů a probíhá zejména ve střevním traktu [10].

Zmíněný detoxikační systém představují následující enzymy: monoaminoxidáza (MAO), diaminoxidáza (DAO) a histidinmethyltransferáza (HMT) [10].

MAO hraje významnou roli při deaminaci BA v celém organizmu a vyskytuje se ve dvou biochemicky odlišných formách A a B. MAO-A je schopna deaminovat neurotransmitery, látky sloužící k přenosu signálů mezi nervovými buňkami. Její význam je tedy lokalizován v centrální nervové soustavě, kde zodpovídá za správné odbourávání noradrenalinu, dopaminu, serotoninu, tyraminu a monoaminů pocházejících z potravy. Pokud dojde k poruše syntézy nebo aktivity MAO-A, pak se neurotransmitery začnou hromadit v mozku a mohou mít vliv na jeho činnost, zvláště pak na inteligenci a chování [10, 11, 12].

MAO-B se vyskytuje zvláště v játrech a ve svalech. Proces deaminace probíhá aktivně hlavně u dopaminu a fenylethylaminu [10, 11].

Účinky enzymů DAO a HMT jsou lokalizovány v gastrointestinálním traktu (GIT). Proces deaminace aktivních aminů a aminů z potravy pomocí DAO probíhá ve střevech. HMT schopná katabolýzy histaminu působí i v játrech [10, 11, 12].

Výše zmíněné enzymy však nemusí mechanismus deaminace realizovat za každých podmínek a jejich činnost může být ovlivněna (zesílena/zeslabena) následujícími faktory např.

- věkem jedince – citlivé na BA jsou hlavně malé děti a senioři;
- zdravotním stavem – lidé se zhoršenou funkcí jater, alergičtí jedinci či pacienti užívající inhibitory MAO (psychofarmaka)
- množstvím přijatých BA potravou;
- konzumací alkoholu [10, 11, 13].

Histamin, putrescin, kadaverin, tyramin, tryptamin, fenyletylamin, spermin a spermidin jsou považovány za důležité a často se vyskytující BA v potravinách. Poměrně časté jsou intoxikace z potravin obsahujících BA [1].

BA mohou být navíc z určitého hlediska chápány jako karcinogeny díky jejich schopnosti reagovat s dusitany za vzniku potenciálně karcinogenních nitrosaminů [1].

Dalším nepříznivým vlivem BA na lidské zdraví jsou potravinové alergie. Jedná se o přecitlivělost organismu, která vzniká, zvláště pokud jich bylo v potravine obsaženo vyšší množství. Prvním projevem alergie je kopřivka. Při nadměrném příjmu BA jako je histamin nebo tyramin může být očekávána imunitní odpověď organismu právě formou kopřivky až po vážné ohrožení životně důležitých funkcí. Méně časté jsou reakce na putrescin, kadaverin nebo β -fenyletylamin [14].

1.2.1 Histamin

Histamin patří mezi nejčastější původce alimentární intoxikace. Nevýhodou histaminu v potravinách je, že na něj destruktivně nepůsobí vysoká teplota vaření. Jeho rozklad však může iniciovat světlo. Mezi potraviny s přirozeně vyšším obsahem tohoto BA náleží rajčata, špenát, vepřová játra, rybí maso (tuňák a losos, konzervy ančoviček či uzeného sledě), a samozřejmě fermentované výrobky (suché salámy, sýry a kysané zelí) [9, 15].

Endogenní syntéza histaminu může být také realizována střevní mikroflórou, a to za předpokladu nadměrné konzumace škrobnatých potravin (brambory, luštěniny, chléb, těstoviny a pečivo) a uvolnění organických kyselin, které mohou měnit střevní propustnost (leaky gut syndrome) s následným zvýšením systémového histaminu. Samozřejmě je působení histaminu a míra intoxikace organismu závislá na množství inhibitorů detoxikačních enzymů a taktéž na přirozené odolnosti intoxikované osoby. Kromě kopřivky se mohou vyskytovat i průjemy, bolesti hlavy, astma, vazodilatace a následná hypotenze či srdeční arytmie. Vzhledem k různým příznakům není často histaminová otrava ihned odhalena [1, 14, 15]. Negativní účinek histaminu na lidské zdraví je navíc podporován např. přítomností kadaverinu, tyraminu a putrescinu [13].

Evropská unie zavedla limity obsahu histaminu v daných potravinách, které jsou uvedeny v Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. U čerstvých syrových ryb se množství histaminu pohybuje kolem

1 mg.kg⁻¹, u ryb určených pro konzumaci by množství histaminu nemělo přesáhnout hranici 100 mg.kg⁻¹. Ve zkaženém rybím mase je možné se setkat s hodnotami vyššími než 200 mg.kg⁻¹ [16].

1.2.2 Tyramin

Mezi další toxikologicky významné aminy patří tyramin. Tyramin může zesilovat účinek výše zmíněného histaminu. Potraviny bohaté na tento BA jsou konzervované ryby, zvěřina, pivovarské kvasnice, čokoláda a zrající sýry. Mezi hlavní příznaky tyraminové intoxikace patří např. vyrážka, bolest hlavy, nadměrné slnění a slzení. Tyramin nepřímo uvolňuje noradrenalin, který v nervovém systému zvyšuje krevní tlak a zrychluje srdeční činnost. Společně s fenyletylaminem jsou schopny v lidském organismu iniciovat hypertenzi vrcholící až v hypertenzní krizi, což je závažný, zdraví nebezpečný stav [9]. Při tomto stavu dochází k masivnímu zvýšení diastolického či systolického tlaku způsobující poruchy až selhávání centrálního nervového systému, srdce, ledvin nebo i zraku [17]. Tyramin se také podílí na zvyšování cukru v krvi. V potravinách se vyskytuje v množství 100 až 800 mg.kg⁻¹. Je doporučeno, aby u sýrů tato hodnota nepřesahovala hranici 200 mg.kg⁻¹ [1, 14].

1.2.3 Výskyt ostatních biogenních aminů

Ostatní BA jako agmatin, kadaverin, fenyletylamin a polyaminy putrescin, spermin a spermidin se mohou hojně vyskytovat v rybách a výrobcích z ryb, fermentovaných sýrech, masných výrobcích a zelenině, také byl však jejich výskyt prokázán v čerstvém ovoci a zelenině, houbách (hlavně žampionech), pivu, víně a mléce [1, 9, 18].

Tyto BA se mohou dostat do gastrointestinálního traktu potravou. Nejvíce zastoupeným polyaminem v horní části tenkého střeva a tračníku je putrescin, který je po přijetí rychle přeměněn na metabolicky aktivní spermidin a spermin. Dva poslední zmíněné polyaminy jsou krátce po jídle odváděny pasivní difúzí z dvanáctníku a lačnicku, kde jsou poté absorbovány a distribuovány do celého těla a mohou být využity pro růst buněk [4].

Zvýšený výskyt polyaminů je registrován hlavně u rychle se dělících buněk, z čehož vyplývá, že mají pozitivní vliv při hojení poraněných tkání a jejich regeneraci. Naopak vliv polyaminů u rychle se dělících buněk může mít za i negativní následek podporu při růstu nádorů. Známá je také schopnost obnovy a pozitivní vliv na funkci střevního epitelu. Jejich

další příznivý význam týkající se konkrétně sperminu a spermidinu spočívá ve funkci růstových faktorů pro savčí a bakteriální buňky a jejich silná antioxidační aktivita [10].

2 PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ BAKTERIEMI MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

2.1 Mléčné kvašení

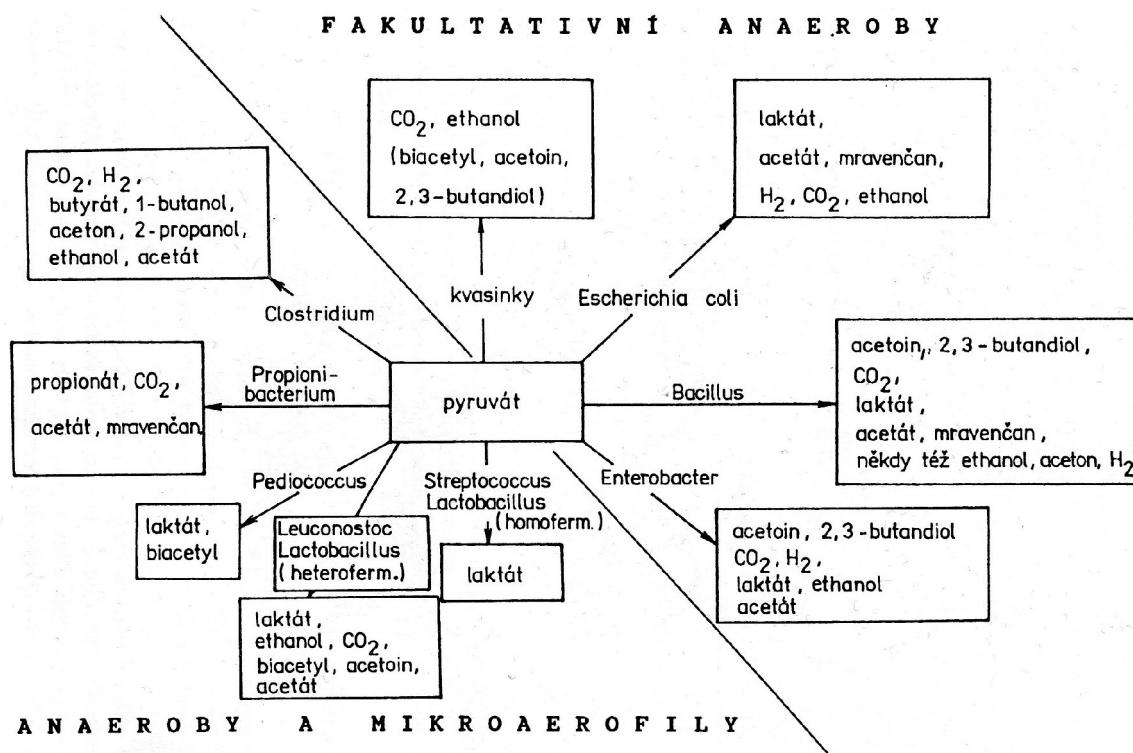
Glykolýza, nebo také tzv. Embden – Meyerhofova dráha, je anaerobní katabolický proces přeměny hexózu přes pyruvát na další produkty. Glykolýzou dochází ke vzniku makroergických sloučenin ATP a syntéze triacylglycerolů. Tento proces probíhá ve většině živých organismů za anaerobních podmínek a jsou jí samozřejmě schopny i bakterie mléčného kvašení (BMK), které patří mezi typické sacharolytické mikroorganismy [19].

K hlavním reakcím glykolýzy patří postupná fosforylace hexózu až ve fruktóza-1,6-bisfosfát, jeho následné štěpení na dva triózafosfáty a jejich oxidace na 1,3-bisfosfoglycerát za současnou redukci koenzymu NAD^+ na $\text{NADH} + \text{H}^+$. Část takto získané energie je uložena do ATP a další podíl energie je uvolněn až po přeměně makroergické sloučeniny fosfoenolpyruvátu v podobě druhé molekuly ATP. Vzniklý pyruvát je pak dále metabolizován různými mikroorganismy odlišným způsobem, jak je znázorněno na obr. 4 [19].

Mléčné kvašení můžeme rozdělit dle vzniklých produktů na homofermentativní a heterofermentativní [19].

Homofermentativní mléčné bakterie jsou schopny pyruvát, pocházející jako produkt glykolýzy, redukovat za spoluúčasti redukovaného kofaktoru NADH na laktát za anaerobních podmínek [19].

Heterofermentativní mléčné bakterie neobsahují glykolytický enzym aldolázu, který je schopen štěpit hexóza-1,6-bisfosfát na dva triózafosfáty, proto jsou hexózy oxidačním mechanismem převedeny na pentóza-5-fosfát a oxid uhličitý. Za spolupráce anorganického fosfátu dochází k enzymovému štěpení pentóza-5-fosfátu na acetylfosfát a glyceraldehyd-3-fosfát. Z acetylfosfátu za součinnosti redukovaného kofaktoru vzniká etanol a glyceraldehyd-3-fosfát. Glyceraldehyd-3-fosfát poté vstupuje do glykolýzy za vzniku pyruvátu a následně laktátu. Hlavními produkty heterofermentativního kvašení jsou např. oxid uhličitý, ethanol a laktát [19].



Obr. 2. Schéma přeměny pyruvátu u různých mikroorganismů [19]

2.2 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou heterogenní skupinou mikroorganismů, které spojují podobné morfologické, metabolické a fyziologické charakteristiky. Jedná se především o grampozitivní, anaerobní nebo aerotolerantní bakterie, které nesporulují a rostou při kyselém pH. Z hlediska fermentace jsou BMK členěny na homofermentativní a heterofermentativní druhy [19, 20, 21].

V současné době jsou do skupiny BMK řazeny např. rody *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella*. Z historických důvodů do nich bývají zahrnovány i bakterie rodu *Bifidobacterium*, které byly původně považovány za laktobacily právě kvůli společným znakům. Liší se však podstatně tím, že mají více G-C v genomu a jiný metabolismus sacharidů [22].

Průmyslově jsou BMK využívány jako starterové kultury pro produkci kyseliny mléčné u fermentovaných potravinových výrobků. Mají ovšem i význam při vzniku aroma, konzis-

tence a nutriční hodnoty těchto výrobků. BMK se přirozeně vyskytují v prostředí na substrátech různého charakteru, a proto může probíhat cílená fermentace jak v mléce, mase, tak i v zelenině a cereáliích za vzniku produktů se specifickými vlastnostmi [19, 20].

2.3 Probiotika a jejich účinek

Existuje několik platných definic probiotik, které se různě vyvíjely, avšak v současnosti můžeme použít jednu souhrnnou, která zní: „Probiotika jsou živé mikroorganismy, mající zdraví prospěšný význam pro hostitele a to zejména udržováním resp. zlepšováním složení mikroflóry GIT anebo na jiném anatomickém místě, pokud jsou podávány v dostatečném množství“ [23].

Jako probiotika je označovaná druhově nesourodá skupina mikroorganismů majících blahodárné účinky na lidský organizmus. Mikrobiální druhy náležící mezi probiotické kultury jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tab. 1. Mikrobiální druhy řazené mezi probiotika [10]

Rod		Další BMK	Druhy nepatřící k BMK
<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>		
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. Toyoi
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> (jen některé kmeny)
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

POZN. Názvy výše uvedených mikroorganismů byly ověřeny v databázi List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (2012) [24].

2.3.1 Historie probiotik

Střevní mikroflóra je významnou základnou pro imunitní systém. Pozitivní účinek mléčných bakterií na lidské zdraví publikoval již v roce 1907 Ilja Mečnikov jako „optimistickou studii o prodlužování věku“, ve které přisuzoval dlouhověkost lidí žijících v balkánských zemích pravidelné konzumaci mléčných kysaných výrobků obsahující živé bakterie. Dále byl přesvědčen, že tyto BMK omezují ve střevě činnost patogenních mikroorganismů a tím mohou i snížit riziko případné otravy jejich toxiny. Postupným zjišťováním příznivých účinků zmíněné mikroflóry působící ve střevech byl zaveden termín probiotikum v roce 1965. Tento termín poprvé použili Lilly a Stillwell a označili tak látku produkovanou prvokem, která stimulovala růst jiného. Název „probiotikum“ byl odvozen z latinského „pro bios“ („pro život“) a je tedy pravým opakem slova antibiotikum [23, 25].

Někteří autoři jdou ještě dále do historie a jako jednoho ze zakladatelů teorie probiotik uvádějí Henryho Tissiera, který v roce 1899 poprvé izoloval bifidobakterie ze stolice kojenců. Další významnou osobou může být také Alfred Nissle, který v roce 1916 izoloval nepatogenní *Escherichia coli* ze stolice vojáka, který jako jediný nepodlehł infekci úplavice. Tento kmen je dodnes zajímavý tím, že se stále používá jako probiotikum pro prevenci střevních infekčních onemocnění [25].

2.3.2 Doposud zjištěné poznatky o probioticích

Pro podávání probiotik bývá typické, že se účinná dávka liší v závislosti na jejich složení. Zcela obecně je však možné říci, že doporučená denní dávka pro dítě je $5\text{--}10 \cdot 10^9$ CFU a pro dospělého $10\text{--}20 \cdot 10^9$ CFU (colony forming units, kolonie tvořící jednotku) [27, 28].

Blahodárný význam probiotik vzhledem k výživě člověka spočívá v tom, že mohou zlepšit dostupnost, trávení a vstřebávání živin. Také byla dokázána schopnost probiotik rozkládat laktózu, čímž dochází i ke snížení problémů spojených s nesnášenlivostí laktózy. Některé kmeny jsou schopny štěpit další sacharidy, jako jsou α -galaktozidy rafinóza a stachyóza, které mohou při fermentaci ve střevech způsobit nadýmání a následné bolesti břicha. Pro-

biotika mohou také hydrolyzovat sloučeniny, které omezují biologickou dostupnost minerálů, jako jsou např. taniny a fytáty díky činnosti enzymů acylhydrolázy a fytázy [28].

Jak již bylo zmíněno, probiotika mohou svou činností zvýšit absorpci minerálních látek a to např. vápníku do buněk a tím předcházet onemocnění jako je osteoporóza. Co se týče produkce a podpory absorpce, tak pozitivní účinky byly pozorovány i pro vitamíny - skupiny B, které jsou rozpustné ve vodě. Lepší utilizace byla sledována konkrétně u vitamínu B₂ (riboflavin), B₉ (kyselina listová) a B₁₂ (kobalamin) [28].

Pozitivní vliv probiotik byl prokázán i z pohledu tvorby bakteriocinů. Bakteriociny jsou antibakteriální látky bílkovinné povahy, které jsou syntetizovány na ribosomech. Vzhledem k jejich relativně úzkému spektru účinku jsou dnes testovány jako výhledově možná alternativa antibiotik. Významnými bakteriociny jsou např. kolicin, pediocin, salivaricin, lakticin či mikrocín [26].

Zatím bylo provedeno málo studií zabývajících se metabolismem probiotických kmenů v přítomnosti nebo nepřítomnosti typické střevní mikroflóry. Přesto se řada výzkumů zaměřila na to, jak může přítomnost probiotik společně s prebiotiky vyloučit či snížit vznik potenciálně toxických metabolitů bílkovin [29].

Celá řada klinických studií se zabývá možným pozitivním účinkem probiotik u onemocnění atopická dermatitida. V tomto případě je předpokládaným mechanismem účinku probiotik ovlivnění tolerance lidského imunitního systému na alergeny pocházející z potravin. Podávání probiotik významně snižuje intenzitu projevů tohoto onemocnění, přičemž ještě lepší výsledky byly pozorovány u dětí s těžšími formami onemocnění. Velmi zajímavé závěry přinesla i nedávná studie probiotik s obsahem *Lactobacillus rhamnosus*, které byly podávány těhotným ženám počínaje 35. gestačním týdnem a konče 6. měsícem laktace. Právě u narozených dětí „léčených“ laktobacilem byla zjištěna výrazně nižší pravděpodobnost rozvoje atopického ekzému [27].

Další nové poznatky o probioticích by mohly být uplatněny u kriticky nemocných pacientů, kteří jsou hospitalizováni na jednotkách intenzivní péče, kde bývá těžká sepsa provázena mnohočetným orgánovým selháním jednou z nejčastějších příčin úmrtí. Ačkoliv jsou výsledky dosavadních klinických studií spíše skromné, i přesto je lze považovat jako nanejvýš povzbudivé. Předpokládá se, že u pacientů hraje významnou roli právě střevní mikroflóra a poškození intestinální bariéry, která zabraňuje přestupu bakterií či jejich toxinů do systémové cirkulace a tím významně ovlivňuje zdravotní stav. Nabízí se zde tedy mož-

nost podání běžných probiotických kmenů, jakými jsou *Bifidobacterium* či *Lactobacillus*, které by podpořily obnovení střevní „bariéry“ a následně zajistily systémovou imunitní odpověď [30].

S pojmem probiotik úzce kooperuje pojem prebiotik. Jedná se o pro člověka nestravitelné oligosacharidy, které stimulují růst nebo aktivitu určité bakterie či skupiny bakterií s rezistentní schopností vůči žaludečním kyselinám a vůči hydrolytickým enzymům v trávicím traktu [23, 26, 31].

2.3.3 Požadované vlastnosti probiotik

Lidský organizmus je denně ohrožován patogenními organizmy, volnými radikály, toxiny, apod. Jak už bylo zmíněno, probiotika mohou mít pro člověka zdraví prospěšný význam. Požadavky na ideální vlastnosti probiotik z hlediska terapeutického a preventivního jsou poměrně komplexní a náročné [23].

Zahrnují:

- rezistenci na žaludeční kyselinu a na žluč,
- adherentnost na epitelové buňky,
- zabránění nebo snížení adherence patogenů,
- schopnost produkovat mastné kyseliny s krátkým řetězcem, bakteriociny a peroxid vodíku,
- antimutagenost a antikarcinogenitu,
- produkci vitamínů,
- zdravotní bezpečnost (nepatogenost),
- spolupráci na udržování optimálního složení střevní mikroflóry,
- modulaci imunitního systému hostitele,
- vhodné technologické vlastnosti.

Výše uvedené požadavky jsou brány jako ideální a samozřejmě je nemusí komplexně splňovat všechny probiotické kmeny, které se na trhu vyskytují. Navíc výsledky testovaných kmenů mohou být ovlivněny aplikovanou dávkou probiotických bakterií [23, 25, 31].

2.4 Biogenní aminy vznikající během fermentace BMK

Jako kontrast k pozitivním účinkům probiotik může být sledován potenciál tvorby BA. Použití startovacích kultur s vysokou proteolytickou aktivitou pro fermentaci výrobků může mít výrazně vyšší pravděpodobnost produkce těchto substancí. Množství a druh BA v potravinách je závislý na povaze substrátu, technologických nebo skladovacích podmínkách a na přítomné mikroflóře. Velkou roli při vzniku BA hraje i obsah volných aminokyselin [13, 32].

2.4.1 Sýry

Zrání sýrů vyžaduje komplexní řadu biochemických reakcí, které vedou ke vzniku charakteristické chuti, vůně a struktury jednotlivých typů sýrů. Proteolýza probíhající v sýru během zrání je v posledním desetiletí předmětem aktivního výzkumu, ale vzhledem k novodobým analytickým technikám, které se používají ke sledování, bylo již mnoho typů sýrů prozkoumáno [33].

Právě intenzivnější proteolýza má vliv na vznik BA z uvolněných aminokyselin v přítomnosti dekarboxyláza pozitivních kmenů. U tvrdého sýru typu Gouda, který je vyráběn z kravského mléka, byly v rámci výzkumu použity rody *Lactobacillus* a byl sledován vliv jejich proteolytických enzymů podílejících se v pasterovaném mléce na vznik BA, hlavně na tvorbě putrescinu, histaminu a tyraminu během 12-ti týdenního období zrání. Detekovatelné množství tyraminu bylo vyprodukováno již v druhém týdnu zrání, u histaminu v 6. týdnu zrání a putrescinu v 8. týdnu zrání. Naměřené hodnoty se pohybovaly v rozmezí, ve kterém by mohly ovlivnit lidské zdraví, proto je obecně doporučeno vybírat starterové kultury, které nejsou dekarboxyláza pozitivní [34].

Dalším představitelem sýrů (tentokrát typu s plísní v těstě), které mohou být také nemalým zdrojem BA, je česká oblíbená Niva, kde je použita při výrobě smetanová kultura a specifická plíseň rodu *Penicillium roqueforti*. Ta má výrazné proteolytické i lipolytické vlastnosti [35, 36]. Při zrání dochází opět k enzymatické degradaci proteinů na volné aminokyseliny, které pak mohou být převedeny na BA. Právě proto jsou sýry díky svému zrání a bílkovinové povaze nejčastější příčinou otravy spojené s BA hned po rybích výrobcích.

Kvantitativně a toxikologicky nejvýznamnější BA vyskytující se u této skupiny sýrů jsou histamin, tyramin, tryptamin, fenyletylamin a kadaverin. [36].

BA byly studovány i ve zrajících sýrech z koziho pasterovaného mléka obsahující kultury *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nebo *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Zrání probíhalo 90 dnů a vyskytovaly se zde stejné BA jako u sýrů z kravského mléka [37].

2.4.2 Rybí výrobky

Čerstvé ryby a výrobky z různých druhů ryb se liší obsahem BA, avšak obecně platí, že u čerstvého rybiho masa je koncentrace BA minimální a postupně se může zvyšovat v závislosti na skladovacích podmínkách a případnou kontaminací. Nejčastější výskyt BA u ryb se týká hlavně tyraminu a histaminu [13].

Několik studií prokázalo schopnost produkovat velké množství histaminu již při nízkých teplotách [9, 13]. Podle studie Halász a kol. (1994) se mohou na rybím mase přirozeně vyskytovat psychofilní i halofilní bakterie, které jsou schopny produkovat BA již při 2,5 °C [32].

V případě fermentovaných výrobků z ryb se může množství BA výrazně lišit. Jedná se především o proces proteolýzy během skladování či fermentace, během které působí endogenní a exogenní proteázy pocházející z přirozené nebo kontaminující mikroflóry [32].

Výzkum zaměřen na obsah BA v rybích výrobcích probíhal v Koreji. Bylo zde testováno 11 různých druhů solených fermentovaných rybních výrobků. Úroveň kadaverinu, histaminu a spermidinu byla značně vysoká a výrazně rostla ještě během skladování po dobu delší než 10 dnů [38]. Celkově by se dalo shrnout, že sledované obsahy BA ve vzorcích tradičních fermentovaných výrobků z ryb, by mohly být nebezpečné pro lidské zdraví. Obecně lze také konstatovat doporučení pro snížení rizika výskytu BA by měly být používány smíšené starterové kultury, které neprojeví dekarboxylázovou aktivitu, vybírat pouze kvalitní a čerstvé maso a pečlivě dodržovat skladovací podmínky [38, 39].

2.4.3 Masné výrobky

Čerstvé nebo tepelně zpracované vepřové maso obsahuje vyšší hladinu adrenalinu, spermidinu a sperminu, ale zanedbatelnou hladinu noradrenalinu, putrescinu, histaminu, tyraminu a kadaverinu [13].

S odlišným obsahem BA se můžeme setkat u fermentovaných masných výrobků, které se na našem trhu běžně vyskytují. Vysoký obsah bílkovin a proteolytická aktivita během zpracování masa poskytuje prekurzory pro dekarboxylázovou aktivitu přítomných mikroorganismů. Na vznik BA u těchto fermentovaných masných výrobků mají tedy vliv mikroorganismy použité jako startovací kultury i mikroorganismy přítomné ve zpracovávaných surovinách. V případě fermentovaných salámů se jedná o výrobky ze syrového mělněného masa, ke kterému se přimíchává tuk, sůl, koření případně další přísady a startovací kultury. K nárůstu obsahu BA dochází hlavně v počátečních fázích fermentace, ale jejich rostoucí obsah byl pozorován i ve finální výrobní fázi a ve fázi uskladnění. Nicméně, stále se můžeme setkat s malými výrobci, kteří nepřidávají starterové kultury a uznávají tradiční způsob spontánní fermentace. V těchto případech je produkce BA velmi nevyzpytatelná [40, 41].

Startovací kultury zajišťují rychlé okyselení syrového masa a žádoucí senzoricou kvalitu konečného výrobku. V posledních letech se používají nové funkční startovací kultury s technologicky nebo nutričně důležitými aspekty. Nové startovací kultury ve srovnání s klasickými startovacími kulturami představují způsob, jak zlepšit a optimalizovat proces fermentace ve smyslu dosažení chutnějších, bezpečnějších a zdravějších produktů tak, že dochází ke vzniku aromatických látek, bakteriocinů nebo jiných antimikrobiálních látek. Dále mohou ovlivňovat barvu, mohou vykazovat probiotické vlastnosti a minimalizovat produkci BA a toxických látek [40].

Ve fermentovaných klobásách a fermentovaných masech (parmská šunka) pocházejících z jižní Evropy byla zjištěna přítomnost BA ve spojení s použitím klasické startovací kultury. Jednalo se převážně o vyšší úroveň fenyletylaminu, tyraminu, putrescinu, kadaverinu a histaminu. K produkci BA docházelo především v přítomnosti enterobakterií, enterokoků, pseudomonád, laktobacilů a stafylokoků [9, 13, 40].

2.4.4 Víno a pivo

Fermentace je proces, při kterém dochází ke vzniku ethanolu a oxidu uhličitého za anaerobních podmínek činností mikroorganismů. Během alkoholového kvašení dochází mimo jiných produktů i ke vzniku většího množství BA. Nejčastěji se jedná o agmatin, kadaverin, ethanolamin, histamin, putrescinu a tyramin [13].

Technologie vína, hlavně fermentace, by se dala shrnout jako biotransformace moštu na víno. Tato biotransformace je zajišťována především prostřednictvím kvasinek rodu *Saccharomyces* během primárního neboli alkoholového kvašení. Nepostradatelnou roli při výrobě vína hrají i BMK, které jsou zodpovědné za sekundární jablečno-mléčné kvašení zajišťující biologické odkyselení vína a zvýšení jak jeho stability, tak i kvality. S tímto jablečno-mléčným kvašením může dojít k produkci BA. Bylo dokázáno, že vína jak červená tak bílá obsahovala BA [12, 18, 42].

Ve víně jsou nejpravděpodobnějšími producenty BA laktobacily, pediokoky a také oenokoky. Nedávné studie prokázaly, že bakterie *Oenococcus oeni* jsou primárně odpovědné za tvorbu histaminu a putrescinu a rod *Lactobacillus* ovlivňuje hlavně produkci tyraminu [18, 42].

U piva je tomu jinak, jelikož při výrobě a skladování jsou zde mléčné bakterie v pozici kontaminace. Tyto bakterie jsou v pivovarském provozu nejobávanější a také nejčastější příčinou kažení a patří mezi zde laktobacily a pediokoky. Bakterie se vyskytují přirozeně na sladidě. V mladidě pak dochází k jejich pomnožení a při zrání piva v ležáckých tancích mohou pivo zcela znehodnotit ve formě zákalu, zhoršením sensorických vlastností a samozřejmě produkcí BA [43]. Mezi nejčastěji se vyskytující BA patří tyramin, v menší míře se objevoval histamin [44].

2.4.5 Fermentovaná zelenina

Fermentované (kysané, kvašené) zelí, náleží mezi oblíbené tradiční potraviny. Při procesu fermentace dochází k mléčnému kvašení prostřednictvím bakterií rodu *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Enterococcus*. Fermentované zelí je vhodným prostředím pro tvorbu BA a typickými zástupci jsou zde tyramin, putrescin a kadaverin [45].

Nízké hladiny BA byly také zjištěny u asijských potravin. Jednalo se převážně o výskyt histaminu a tyraminu u nakládané zeleniny, korejského kysaného zelí a „miso“, což je populární omáčka z fermentovaných sojových bobů, rýže či pšeničné mouky v Orientu [45, 46].

2.5 Faktory ovlivňující vznik BA

Pro vznik BA v potravinách musí být zajištěny následující podmínky:

- optimální podmínky pro růst mikroorganismů a enzymatickou činnost (pH, teplota, přístup kyslíku, živiny aj.),
- přítomnost dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů,
- dostupnost volných aminokyselin [47].

2.5.1 Hodnota pH

Hodnota pH zásadně ovlivňuje růst mikroorganismů a působí i na dekarboxylázovou aktivitu enzymů. Pokud se hodnota pH pohybuje v kyselé oblasti (okolo pH 4-5,5), pak jsou bakterie přirozeně povzbuzeny k produkci dekarboxylázových enzymů, kterými se bakterie chrání proti překyselení [48].

2.5.2 Teplota

Teplota má podstatný vliv na růst mikroorganismů a taktéž na produkci BA. Obecně by se dalo konstatovat, že teplota může aktivovat dekarboxylační a proteolytické enzymy a tím ovlivnit produkci BA. Obsah BA tedy narůstá v závislosti na činnosti mikroorganismů, délce a teplotě skladování, případně zrání. Tato teplota se pohybuje mezi 20 °C až 37 °C, avšak u psychrotrofních kmenů může být sledována aktivita enzymů podporující produkci BA i při 4 °C. Při teplotě nižší než 15 °C může docházet k zastavení růstu mikroorganismů, ale enzymatická aktivita nemusí být ovlivněna [1].

2.5.3 Koncentrace sacharidů

Přítomnost zkvasitelných sacharidů zvyšuje dekarboxylázovou činnost bakterií. Podle studie Karovičové, Kohajdové (2005) se pohybuje optimální obsah v případě D-glukózy v rozmezí 0,5–2,0 %, zatímco u hodnot vyšších než 3 % docházelo k inhibici dekarboxylázových enzymů [1].

2.6 Metody stanovení biogenních aminů

Analýza BA je důležitá, jednak z důvodu zjištění toxicity potravin a také může sloužit jako ukazatel stupně čerstvosti nebo znehodnocením potravin. Existuje několik metod pro stanovení BA v potravinách. Pro kvantifikaci BA jsou používány hlavně následující chromatografické metody:

- chromatografie na tenké vrstvě (TLC)
- plynová chromatografie (GC)

- kapilární elektroforéza (CE)
- a vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC).

V praxi jsou nejčastěji používané pro stanovení BA chromatografické metody RP-HPLC, s fluorescenční či UV detekcí, která následuje buď po danzylaci, benzoylaci nebo derivatizaci s 9-fluoromethyl chloroformátem, N-hydroxysuccinimidyl-6-chinolyl karbamátem nebo o-ftaldialdehydem (OPA). Dalším typem chromatografie je iontově párová HPLC nebo iontově výměnná chromatografie, kterou je možné stanovit aminy po postkolonové derivatizaci OPA. Také je možné využít vysoce citlivých chromatografických metod s elektrochemickou detekcí nebo detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (LC/MS) [49].

Z molekulárně–biologických metod je nutno uvést PCR (polymerase chain reaction), která je velice citlivá a přesná. Podstatou metody je detekce genů – sekvence nukleotidů zodpovědných za tvorbu dekarboxylačních enzymů. Nejedná se tedy o přímé stanovení, ale o detekci potenciálu tvořit BA. Z hlediska analýzy jde o elektroforetickou metodu [50].

Další možností je mikrobiologická metoda pro orientační stanovení dekarboxylázové aktivity. Jedná se o metodu kultivační s použitím dekarboxylačního média s aminokyselinami a pH indikátorem (bromkresol purpur). U pozitivní reakce dochází ke změně zbarvení dekarboxylačního kultivačního média po kultivaci za příslušných podmínek vztahujících se ke kmenu [51].

3 *LACTOBACILLUS* SP.

3.1 Taxonomie

Rod *Lactobacillus* byl poprvé popsán nizozemským mikrobiologem a botanikem Beijerinckem v roce 1901 [24, 52]. Poté byly ostatní rody postupně organizovány do skupin na základě fenotypových charakteristik:

- dle optimální teploty růstu,
- dle způsobu fermentace hexózy,
- obligátní/fakultativní, homo-/heterofermentativní schopnosti.

Ovšem s vývojem molekulárních přístrojů a genetické charakterizace byla nomenklatura rodu *Lactobacillus* přeorganizována a používá se víceúrovňová taxonomie [52].

Taxonomické zařazení rodu *Lactobacillus* je následující:

Doména: *Bacteria*

Oddělení: *Firmicutes*

Čeleď: *Lactobacillaceae* [24].

Nově jsou rody identifikovány dle genu 16S rRNA. Díky tomuto vývoji bylo popsáno mnoho dalších nových druhů. Rod *Lactobacillus* je velmi heterogenní skupinou bakterií a doposud není jisté, že se nebude ještě mnohokrát měnit. Díky nové moderní technice založené na sekvenování celých genomů by se mohlo docílit objasnění klasifikace systému a taxonomických vztahů problematických bakterií rodu *Lactobacillus*. Některé metabolické funkce, jako je možná produkce BA při fermentačním procesu, může negativně ovlivnit lidské zdraví, jak už bylo popsáno výše [52].

Jak je uvedeno v devátém vydání Bergey's Manual of Systematic Bacteriology z roku 1994, rozlišení druhů rodu *Lactobacillus* vyžaduje zvláštní odborné znalosti. Identifikace může být založena na fyziologických a biochemických kritériích nebo může být použita přesná metoda molekulární biologie PCR [52].

Rod *Lactobacillus* a aktualizace jeho členění je popsán a zpracován v List of Bacterial names with Standing in Nomenclature. Nyní je v této databázi zaznamenáno 180 druhů a 27 poddruhů laktobacilů [24].

3.2 Biochemické vlastnosti a charakteristika

Laktobacily jsou grampozitivní fakultativně anaerobní až mikroaerofilní, kataláza negativní, nesporogenní tyčinky až kokotyčinky, které se řadí do skupiny BMK viz obr. 3. [19, 52, 53]. Vyskytují se v substrátech s vyšším obsahem sacharidů, na materiálech rostlinného původu, v hnojivech, odpadních vodách, kazících se organických materiálech, či při fermentaci potravin. Osidlují i lidské tělo. Přirozeně se vyskytují v GIT již brzy po narození dítěte. Mohli bychom je najít např. v ústní dutině, střevech nebo svalech [20, 52, 53].



Obr. 3. Rod *Lactobacillus* sp. [54]



Obr. 4. Vzhled kolonií na plotně [55]

3.3 Metabolismus rodu *Lactobacillus*

Laktobacily jsou bakterie s vysokými nároky na bohatá růstová média. Patří do skupiny chemoorganotrofních mikroorganismů a disponují fermentatorním metabolismem. Dále jsou kataláza negativní, neschopné redukovat nitráty a hydrolyzovat želatinu. Optimální růstová teplota je 30 až 40 °C a optimální pH kolem 5,5 až 6,2 [19]. Na základě konečných produktů fermentace cukrů je možno laktobacily dělit do tří skupin:

1. obligátně homofermentativní – fermentace hexózy pouze na kyselinu mléčnou, fermentace neprobíhá u pentóz a kyseliny glukonové,
2. fakultativně heterofermentativní – fermentace hexózy na kyselinu mléčnou nebo směs kyseliny mléčné, octové, mravenčí a etanolu, fermentace pentóz na kyselinu mléčnou a octovou,

3. Obligátně heterofermentativní – fermentace hexózy na kyselinu mléčnou, octovou, příp. ethanol a CO₂, fermentace pentóz na kyselinu mléčnou a octovou [56].

Metabolická aktivita tohoto rodu, vztahující se k ovlivnění lidského zdraví, se netýká jen produkce BA, ale i dekonjugace žlučových kyselin, enzymatické aktivity β -glukuronidázy, azoreduktázy a nitroreduktázy, jejichž výsledkem činnosti je zvýšená akumulace jedovatých metabolitů vyskytujících se hlavně při fermentačních procesích odbourávání kyseliny hyaluronové a agregací krevních destiček [50, 52].

3.4 *Lactobacillus rhamnosus*

Při kultivaci na plotnách tvoří tento druh drobné, kulaté, lesklé a vypouklé kolonie béžové barvy s hladkými okraji viz obr. č. 4. [19].

Lactobacillus rhamnosus (*Lb. rhamnosus*) je pravidelná tyčinka, s fakultativně heterofermentativním metabolismem. Původně byl tento druh považován za poddruh *Lb. casei*, ale genetický výzkum ho později vyseletoval jako samostatný. *Lb. rhamnosus* GG je kmen izolován v roce 1983 Sherwoodem Gorbachem a Barry Goldinem z trávicího traktu zdravého člověka, proto zkratka GG jako začátek jejich příjmení. *Lb. rhamnosus* je také používán jako BMK s proteolytickými vlastnostmi při výrobě fermentovaných mléčných a masných výrobků. Je schopen produkce bakteriocinu, která je závislá na podmínkách kultivace a prostředí. Tento rod je často považován za prospěšný pro lidský organizmus, některé kmeny *Lb. rhamnosus* mohou mít však za určitých okolností na lidský organizmus nepříznivý účinek [50, 52, 57].

3.4.1 Schopnost kmenu *Lactobacillus rhamnosus* tvořit biogenní aminy

Studie na produkci BA byla provedena u fermentovaných klobás za použití tří probiotických kmenů *Lb. rhamnosus* GG, E-97800 a LC-705 a jednoho komerčního kmene *Pedococcus pentosaceus*. Během kvašení se počet BMK zvýšil o dva logaritmicke řády CFU/g a hodnoty pH se snížily z 5,6 na 4,9-5,0. Po celou dobu procesu zrání zůstala koncentrace BA nízká. Tyto výsledky naznačují, že studované kmeny *Lb. rhamnosus* GG, zejména kmeny E-97800, jsou vhodné pro použití u suchých fermentovaných klobás jako probiotické startovací kultury [58].

Dále byl proveden skríníng bakterií na produkci BA histaminu, tyraminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, sperminu a spermidinu. Byly použity tři různé metody a celkově bylo testováno 27 kmenů BMK, konkrétně 11 kmenů rodu *Lactobacillus* a 16 kmenů *Lactococcus lactis*, mezi kterými byl zahrnut i *Lb. rhamnosus*. Ze srovnání těchto tří metod vyplynulo, že jednoduchá skríníngová metoda s použitím dekarboxylačního média s příslušnou aminokyselinou a pH indikátorem je nejméně vhodná. Další dvě metody IEC a PCR prokázaly produkci BA. U technologicky významných kmenů BMK byla zjištěna schopnost dekarboxylovat aminokyselinu tyrozin za vzniku BA tyraminu. Z celkem 27 testovaných kmenů BMK byla produkce tyraminu zjištěna u 6 kmenů *Lactococcus lactis* a pouze u 1 kmene *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Z tohoto výzkumu vyplývá, že uvedenými metodami nebyla prokázána dekarboxylázová činnost kmene *Lb. rhamnosus* [51].

Další skríníng zaměřený na schopnost tvorby BA u probiotických startovacích kultur pro výrobu fermentovaných výrobků živočišného původu prověřil celkem 73 bakteriálních kmenů dodaných firmou SACCO (Itálie). Pro nepřítomnost genu histidindekarboxylázu nebyla testována produkce histaminu. Schopnost tvorby BA tyraminu v dekarboxylačním médiu s prekurzorem tyrosinem byla prokázána u všech 73 testovaných kmenů. Skríníng se týkal kmenů rodu *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* a rodu *Bifidobacterium*. Vzhledem k produkci BA v různých koncentracích (10 ng/ml až 1 mg/ml) u těchto komerčně používaných kmenů je vhodné pro prevenci rizika testovat a kontrolovat startovací kultury na produkci BA a provádět kontrolu množství BA ve finálním výrobku [59].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bylo definovat a charakterizovat BA a popsat jejich význam v potravinách a pro lidský organizmus. Dalším cílem bylo se zaměřit na úzce související potencionální dekarboxylázovou aktivitu starterových bakterií a objasnit vliv pH a teploty na produkci BA. Vzhledem k testované bakteriální kultuře byly popsány BMK rodu *Lactobacillus* a jejich použití v potravinářství. Dále byly probírány dieteticko-léčebné účinky probiotik.

U vybraného probiotického kmene (*Lactobacillus rhamnosus*) produkujícího BA budou v praktické části této diplomové práce studovány vlivy vnějších faktorů, jež by mohly v rámci technologického procesu výroby významněji ovlivnit množství vytvořených BA. Jedná se zejména o

- pH (pH v rozsahu 4,5 – 6,0),
- teplota (10 a 37 °C),
- přídavek glycerolu 0-1 % (w/v).

Testovaný rozsah hodnot zkoušených faktorů byl volen tak, aby mohly být výsledky aplikovány na technologickou praxi fermentovaných mléčných výrobků a rovněž měly jistou vypovídající hodnotu pro probiotické kmeny (viz 37 °C, teplota těla). Paralelně s produkcí BA bude sledováno růstové chování kultur ovlivněné změnou vnějších faktorů, a to měřením optické denzity bakteriální suspenze. Vývoj produkce BA v závislosti na čase kultivace a růstové charakteristiky budou dávány do souvislostí. Tento monitoring bude doplněn o sledování změn pH kultivačního prostředí.

5 MATERIÁL A METODIKA

5.1 Bakteriální kultura

Produkce BA byla zkoumána *in vitro* u kmene s dieteticko-léčebnými účinky ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů Laktoflora® (Cultures Collection of Dairy Microorganisms; CCDM) *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289.

5.1.1 Příprava bakteriální suspenze

Laktobacily byly kultivovány v médiu *Lactobacillus* MRS Broth (HiMedia, Mumbai, India). To bylo obohaceno pro růst zkoušených bakterií prekuzory sledovaných BA aminokyselinami argininem, lyzinem, ornitinem, fenylalaninem a tyrozinem (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) v koncentraci 0,3 % (w/v). Do takto suplementovaného MRS bujónu bylo ještě přidáno 0,005 % (w/v) pyridoxalfosfátu (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Jako další faktory byly zvoleny přídavky glycerolu v koncentracích 0; 1, 3 a 5 % (w/v) a pH bujónu před inokulací (4,0; 5,0; 6,0). Zkoumán byl také vliv teploty 10 ± 1 °C a 37 ± 1 °C. Všechny výše uvedené faktory byly testovány ve vzájemných 24 kombinacích. Příprava inokula byla provedena pomnožením bakterií v prostředí podobném dekarboxylačnímu médiu (bujón s přídavkem aminokyselin v koncentraci 0,3 % (w/v) a s 0,005 % (w/v) pyridoxalfosfátu) po dobu 24 hodin při teplotě 37 ± 1 °C. Následně bylo dekarboxylační médium o objemu 7 ml zaočkováno vždy 100 µl suspenze bakterií narostených přes noc.

5.1.2 Kultivační médium

Médium:

***Lactobacillus* MRS broth**

Složení:

Proteozový pepton.....	10,00 g/l
Hovězí extrakt	10,00 g/l
Kvasniční extrakt	5,00 g/l
Dextróza	20,00 g/l
Polysorbát 80	1,00 g/l

Citran amonný	2,00 g/l
Octan sodný	5,00 g/l
Síran hořečnatý	0,10 g/l
Síran manganatý	0,05 g/l
Hydrogenfosforečnan draselný.....	2,00 g/l

Příprava půdy: Bylo naváženo 55,15 g média *Lactobacillus* MRS Broth s příslušnými aminokyselinami, glycerolem dle požadované konečné koncentrace a přidavkem monohydrátu pyridoxal-5-fosfátu. Vše bylo rozpuštěno v 1000 ml vody a upravena hodnota pH. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut.

5.2 Průběh experimentu

Při 37 ± 1 °C byly odběry uskutečňovány v následujících časech (čas zaočkování 0): 2; 4; 6; 8; 10; 12; 24; 30; 34 a 48 hod od začátku kultivace. Při teplotě 10 ± 1 °C se postupovalo obdobně. Bylo uskutečněno rovněž deset odběrů, které byly provedeny v následujících dnech od zaočkování (den zaočkování 0): 1; 2; 3; 4; 5; 7; 9; 11; 13; a 15. Bylo odebíráno vždy 750µl vzorku pro analýzu produkce BA, které bylo zakonzervováno stejným množstvím 1,2M kyseliny chloristé. Dále byla měřena optická denzita a pH bakteriální suspenze.

5.3 Měření optické denzity

V případě kultury *Lb. rhamnosus* byl sledován nárůst kolonií měřením optické hustoty kultivačního média s výše uvedenými vlastnostmi v daných odběrových časech. Suspenze byla po řádném promíchání rozpipetována v množství 200 µl do jamek mikrotitrační destičky. Destička byla připravena tak, aby bylo možné hodnoty měřit duplicitně, tzn., že stejné koncentrace byly umístěny vedle sebe. Stejně tak byly do destičky umístěny i kontroly. Tyto kontroly obsahovaly bujón s upraveným pH, přidanými faktory bez inokula. U kontroly nebyl očekáván žádný nárůst. Testovaný kmen byl kultivován při teplotě 37 ± 1 °C po dobu 48 hodin a při teplotě 10 ± 1 °C po dobu 15 dní. Bakteriální nárůst, resp. změna

optické denzity, byla měřena na přístroji Benchmark Microplate Reader, (BIO-RAD, Japonsko) při vlnové délce 655 nm s třepáním po dobu 10 s proti kontrole bez zaočkovaných buněk. Pro sestavení křivek byly vypočítány průměry hodnot optické denzity v jednotlivých jamkách. Od těchto hodnot byly odečteny průměrné hodnoty naměřené u kontrol. Růstové křivky jsou v grafech zaznamenány jako závislost přirozeného logaritmu na čase kultivace.

5.4 Měření hodnoty pH média po kultivaci

Principem bylo sledování pH suspenze v závislosti na produkci kyselin nebo látek alkalické povahy (BA) v důsledku nárůstu bakterií s dekarboxylační aktivitou v jednotlivých odběrových časech. Hodnota pH byla proměřována po kultivaci pH metrem (pH Spear, EUTECH, Německo) vždy u každého vzorku 3x (včetně kontrol).

5.5 Analýza obsahu BA ve vzorcích supernatantů

Produkce 8 BA (tryptaminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, sperminu a spermidinu) byla stanovována s pomocí kapalinové chromatografie (HPLC). Bujón po kultivaci testovaných bakterií byl centrifugován (3 421 x g; 22±1 °C; 20 minut; odstředivka EBA 20, Hettich UK) a získaný supernatant byl zředěn v poměru 1:1 (v/v) kyselinou chloristou (c = 1,2 mol/l). Okyselená směs byla podrobena derivatizaci podle Dadáková a kol. (2009) [60]. Jako interní standard byl použit 1,7-heptandiamin. Derivatizované vzorky byly filtrovány (porozita 0,22 μm) a nanášeny na kolonu (kolona Cogent HPS C18 s rozměry 150 x 4,6 mm a velikostí částic 5μm, Cogent USA; termostat kolon Agilent 1260 Infinity, UV/VIS DAD detektor Agilent 1200, Agilent Technologies, USA; binární pumpa a autosampler LabAlliance, USA) s UV detekcí (λ = 254 nm) po předkolonové derivatizaci danzylchloridem. Podmínky separace a detekce sledovaných BA byly popsány v Smělá et al. (2004) [49].

Každý ze čtyř bujónů, včetně kontroly, byl derivatizován dvakrát a každá derivatizovaná směs nanášena na kolonu ve dvojím opakování (n = 20).

6 VÝSLEDKY

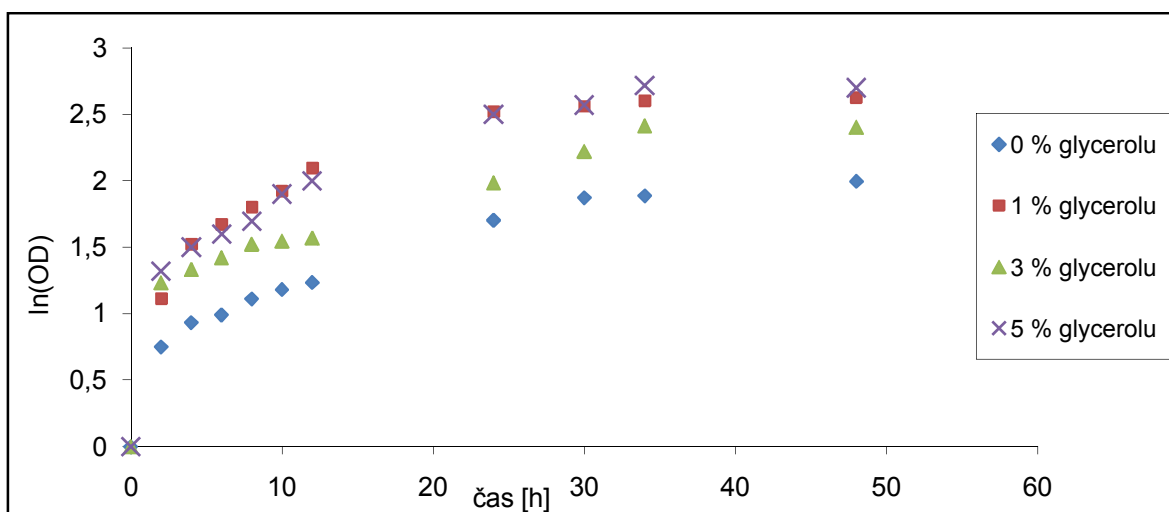
6.1 Vliv přídavku glycerolu, pH a kultivační teploty na růst kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289

Z průběhu růstových křivek, které jsou uvedené na obr. č. 5-7 je zřejmé, že testovaná kultura při kultivačních podmínkách 37 °C v obohaceném tekutém médiu *Lactobacillus* MRS Broth rostla. Vzhledem k daným podmínkám nebyla zaznamenána u růstové křivky lag fáze, exponenciální fáze je viditelná do 24h kultivace a dále už průběh pokračuje stacionárně, jak je zaznamenáno na grafech (Obr. 5-7). U kultivace při teplotě 10 °C (Obr. 8-10) byl průběh růstu odlišný, lag fáze je pozorovatelná do 1. dne kultivace, exponenciální fázi je možné zaznamenat do 9. dne kultivace, poté v následujících dnech pokračuje fáze stacionární.

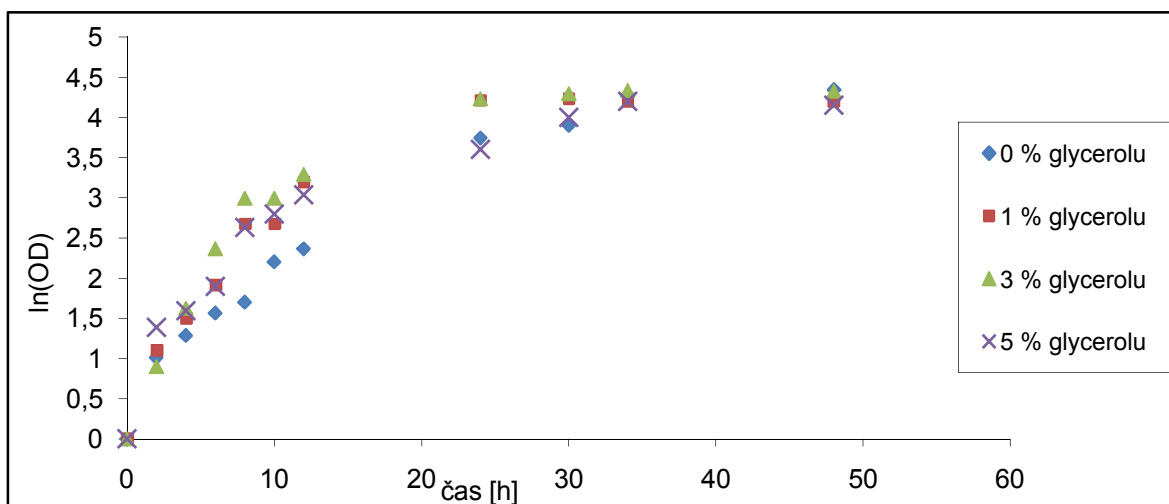
Růst testované kultury nejvíce podporovalo médium s počátečním pH 5 (Obr. 6 a 7) a pH 6 (Obr. 9 a 10) při obou testovaných teplotách. Naopak nejméně přívětivé podmínky pro růst dané mikroflóry zajistilo pH 4 (Obr. 5 a 8).

Bakteriální růst v médiu nejlépe podporoval přídavek glycerolu 1% (Obr. 6-7). Lze ale konstatovat zjevnou skutečnost, že na médiu bez přídavku glycerolu při teplotě 37°C růst probíhal nejpomaleji (Obr. 5-6).

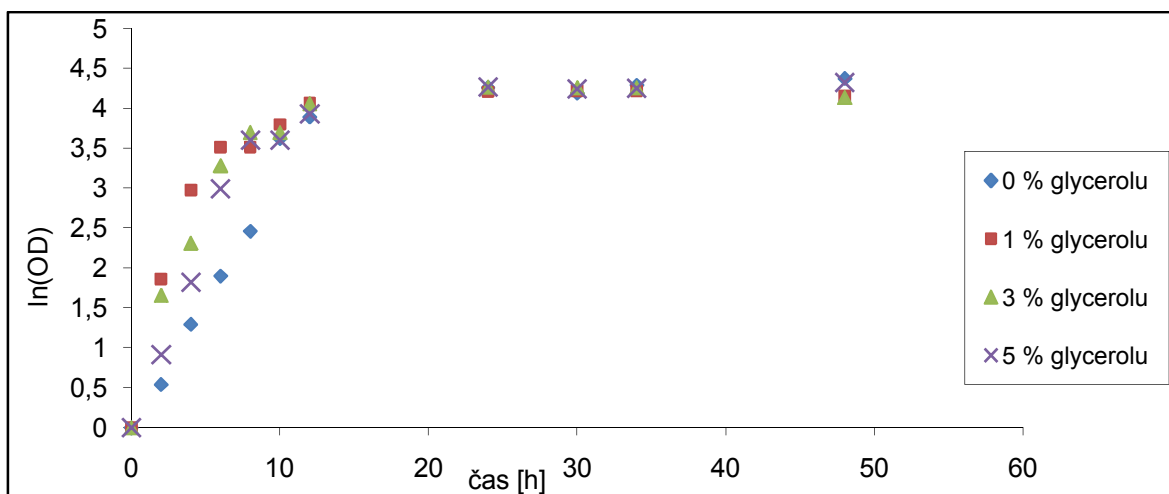
U druhé testované teploty 10 °C je patrné (Obr. 8-10), že koncentrace glycerolu v médiu neměla výrazný význam na bakteriální růst.



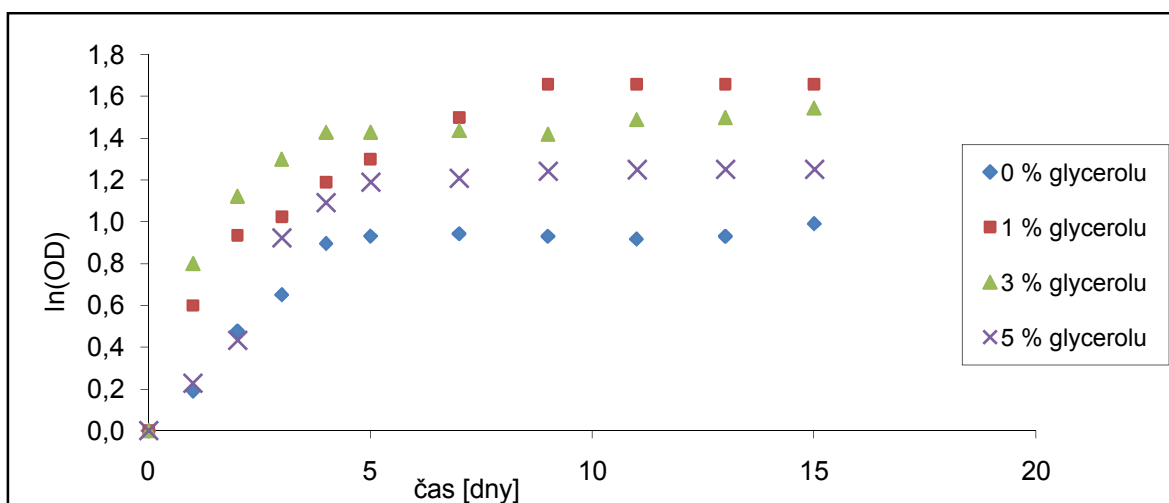
Obr. 5. Nárůst buněk během kultivace po dobu 48 hodin při 37°C a pH 4



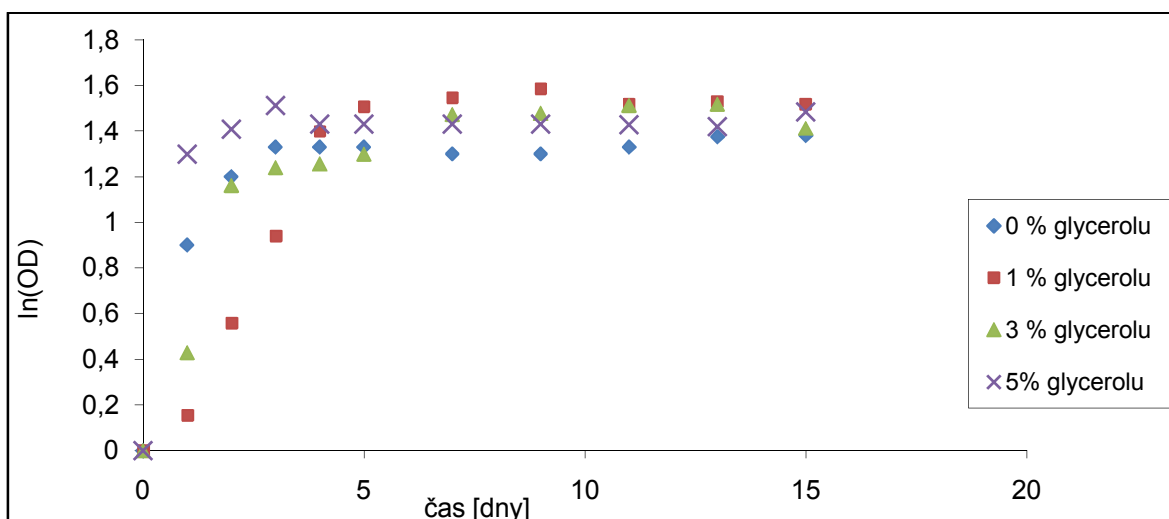
Obr. 6. Nárůst buněk během kultivace po dobu 48 hodin při 37°C a pH 5



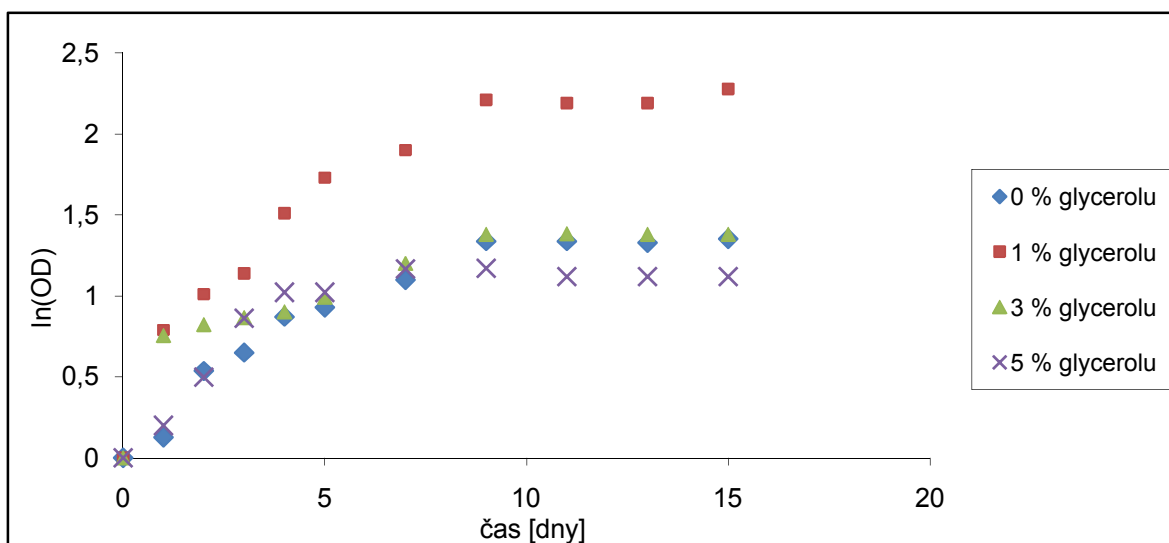
Obr. 7. Nárůst buněk během kultivace po dobu 48 hodin při 37°C a pH 6



Obr. 8. Nárůst buněk během kultivace po dobu 15 dní při 10°C a pH 4



Obr. 9. Nárůst buněk během kultivace po dobu 15 dní při 10°C a pH 5



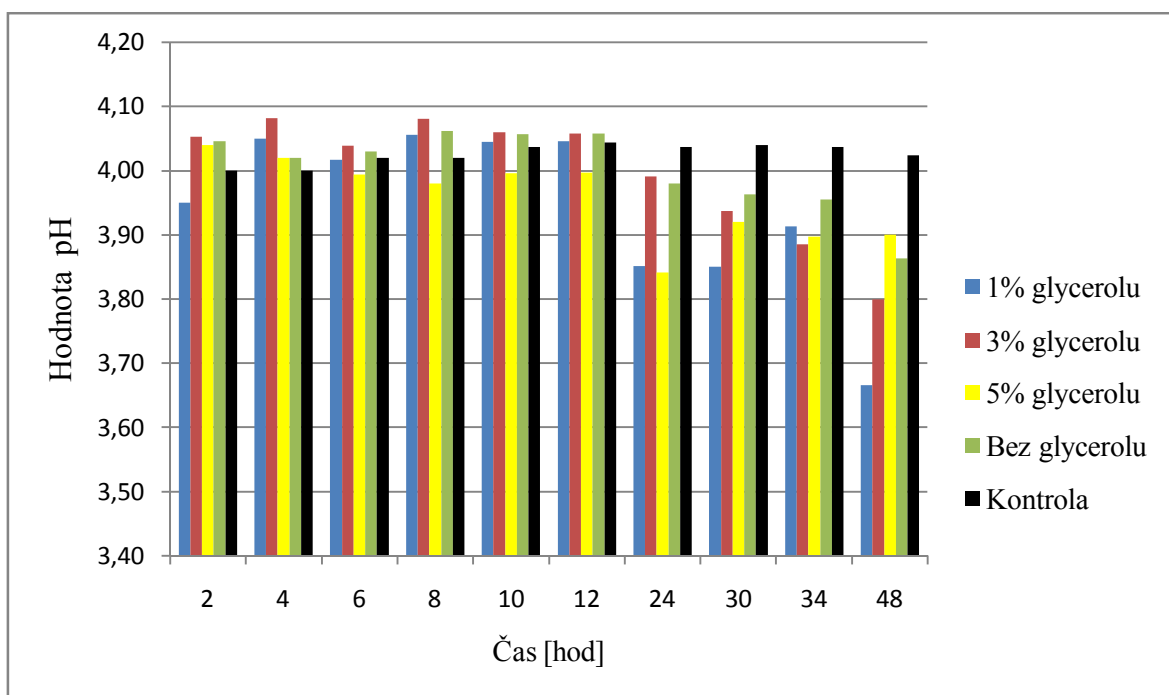
Obr. 10. Nárůst buněk během kultivace po dobu 15 dní při 10°C a pH 6

6.2 Monitoring změn pH kultivačního média

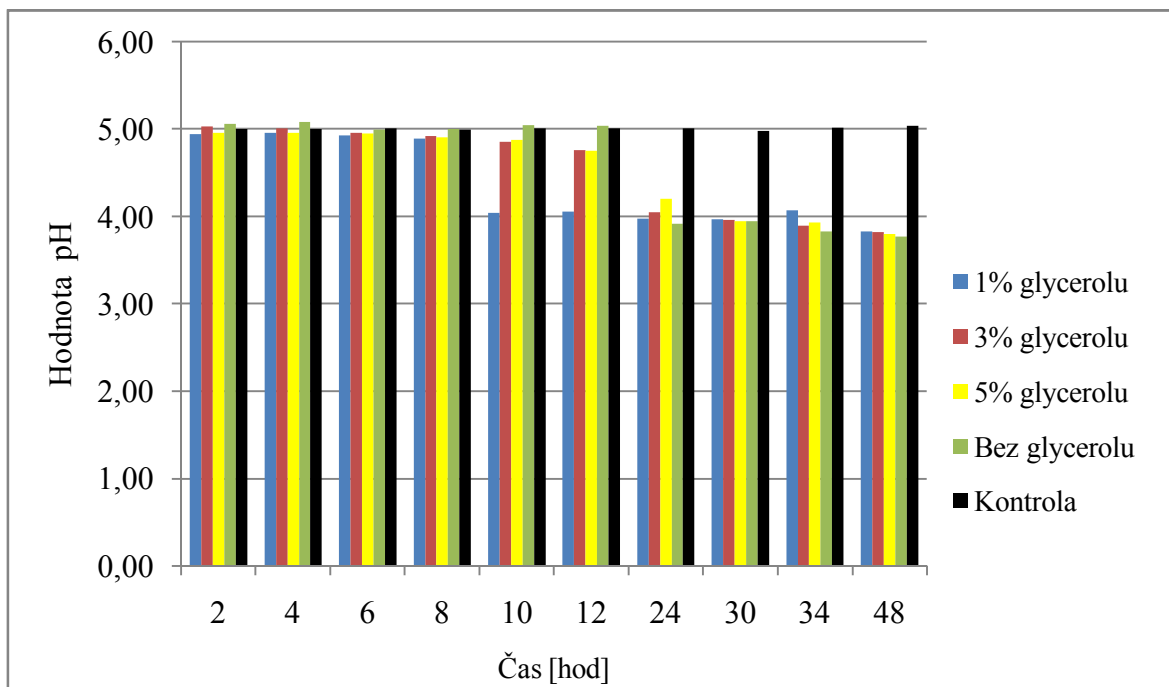
Dalším sledovaným faktorem byl vliv pH kultivačního média resp. jeho následná změna po kultivaci daného organismu. Hodnota pH se měnila v důsledku produkce kyseliny mléčné, tvorby BA nebo jiných sekundárních metabolitů kyselé i alkalické povahy. Z výsledků vyjádřených graficky (Obr. 11-16) je patrné, že ve výsledcích změny hodnot pH v průběhu kultivace byl u dvou testovaných kultivačních teplot pozorován markantní rozdíl.

Při kultivační teplotě 37 °C docházelo v případě počátečního pH 4 k výraznějšímu poklesu pH od 24 hodiny (Obr. 11). K nejstrmějšímu poklesu pH docházelo po kultivaci *Lb. rhamnosus* CCDM 289 u média s obsahem glycerolu 1 % (w/v), které dosáhlo hodnoty $3,68 \pm 0,01$. U koncentrací glycerolu 0, 3 a 5 % (w/v) byl pokles mírnější s průměrnou konečnou hodnotou pH $3,87 \pm 0,02$. U počátečního pH 5 (Obr. 12) došlo k výraznějšímu poklesu média také s koncentrací glycerolu 1% (w/v) v odběrové 10. hodině na hodnotu pH $4,04 \pm 0,02$, která v následujících hodinách kultivace dosáhla hodnoty $3,83 \pm 0,05$. U zbylých koncentrací glycerolu 0, 3 a 5 % (w/v) se pH snižovalo paralelně od 24. odběrové hodiny na konečné pH $3,81 \pm 0,02$. Podle kontroly došlo u počátečního pH média 6 (Obr. 13) během sterilizace vlivem teploty po dokonalém rozpuštění všech složek v médiu k poklesu na hodnotu 5,7. U všech koncentrací glycerolu se pH začalo snižovat od 6. odběrové hodiny a hodnoty měly podobný charakter s konečnou hodnotou kolem 4 pH.

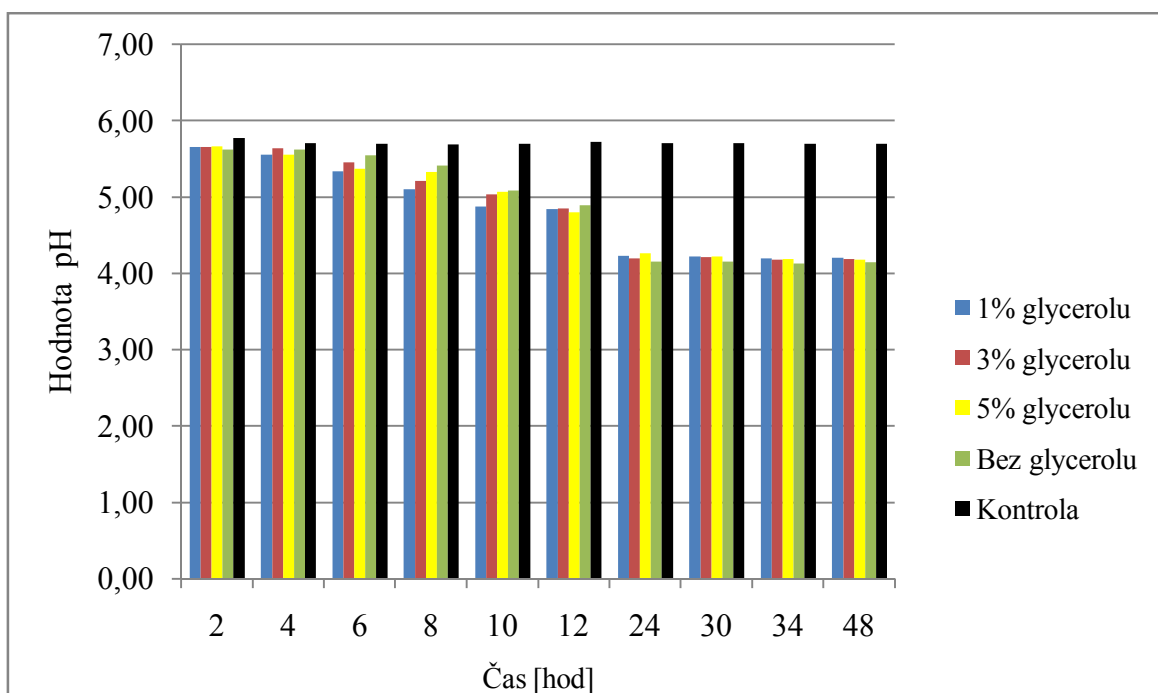
Při kultivační teplotě 10 °C po dobu 15 dní u počátečního pH média 4 (Obr. 14) koncentrací glycerolu 1, 3 a 5 % (w/v) byly hodnoty pH po celou dobu kultivace analogické. V případě média bez obsahu glycerolu byl pozorován výraznější pokles pH v 9. dni a konečné pH mělo hodnotu $3,72 \pm 0,01$ s nejvýraznějším poklesem ve 13. den kultivace. U počátečního pH 5 (Obr. 15) nebyly opět pozorovány změny v hodnotách pH u vzorků s obsahem glycerolu. Nulová koncentrace glycerolu však zřejmě ovlivnila pokles pH už od 7. dne s konečnou hodnotou pH $4,66 \pm 0,13$ a nejvýraznějším poklesem v 9. dni kultivace. V případě pH 6 (Obr. 16) došlo u vzorků s obsahem glycerolu k poklesu pH v porovnání s kontrolou. V jednotlivých dnech kultivace se pak po celou dobu hodnota pH výrazně neměnila. V případě média bez přídavku glycerolu byly pozorovány změny poklesu pH od 7. dne. K nejvýraznějšímu snížení došlo v 11. dni s konečnou hodnotou $5,51 \pm 0,01$.



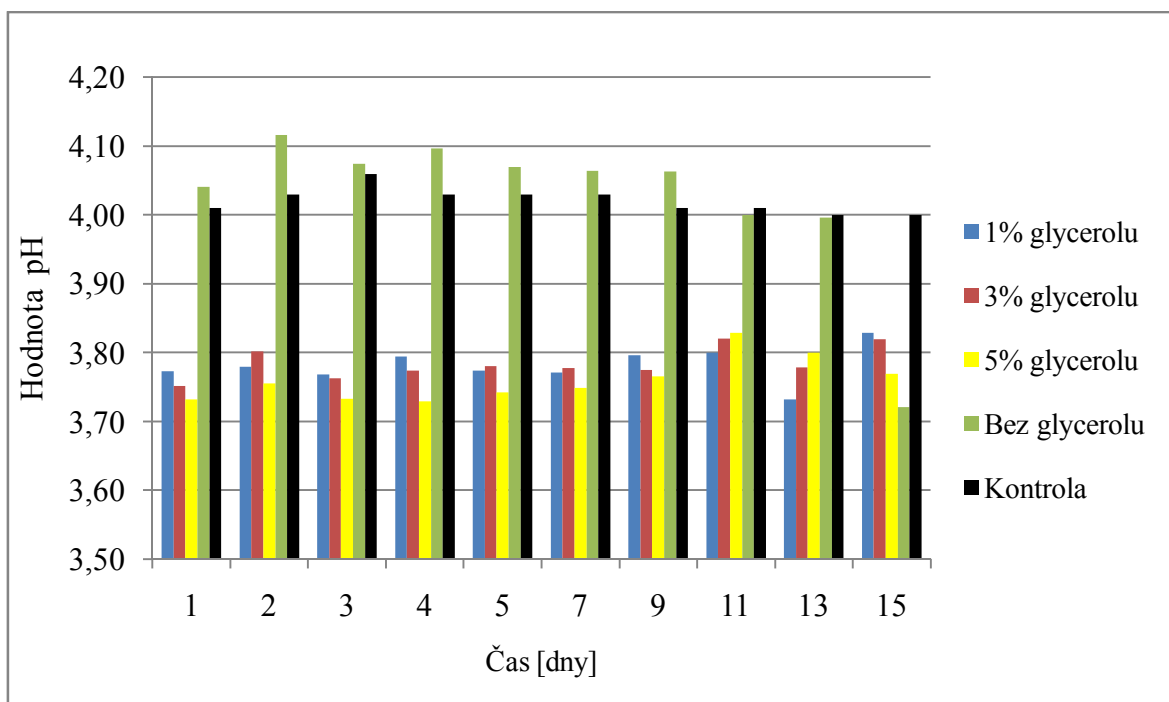
Obr. 11. Změna pH během kultivace testovaného kmene při 37°C po dobu 48 hodin médiu s počátečním pH 4



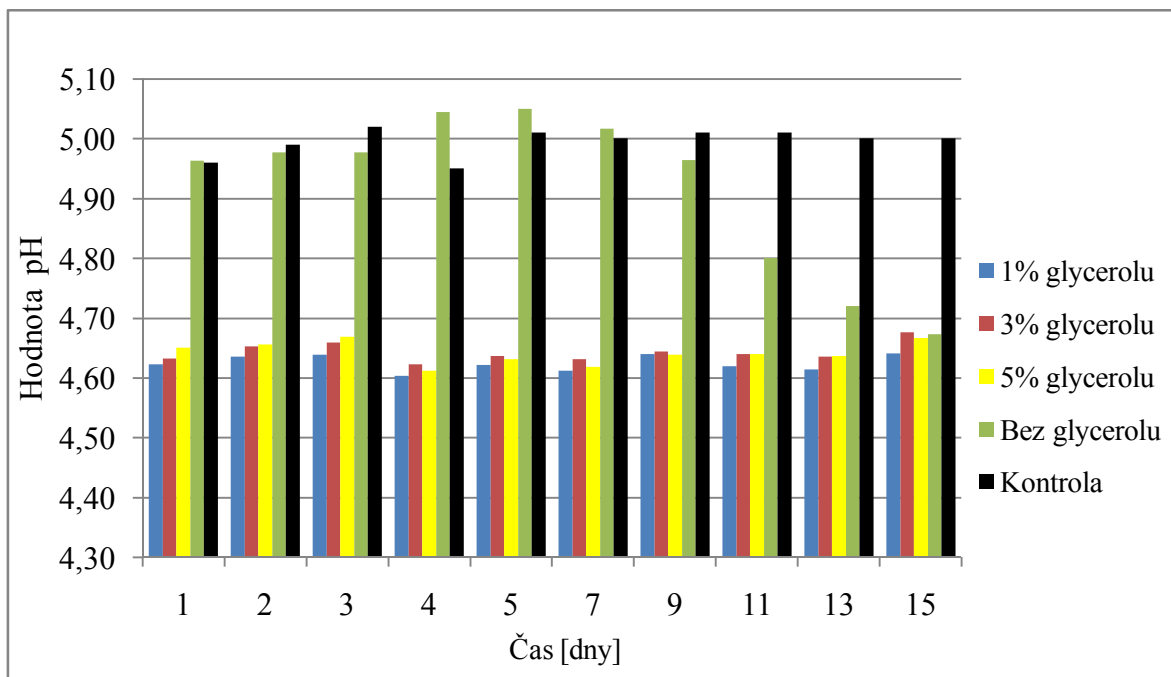
Obr. 12. Změna pH během kultivace testovaného kmene při 37°C po dobu 48 hodin v médiu s počátečním pH 5



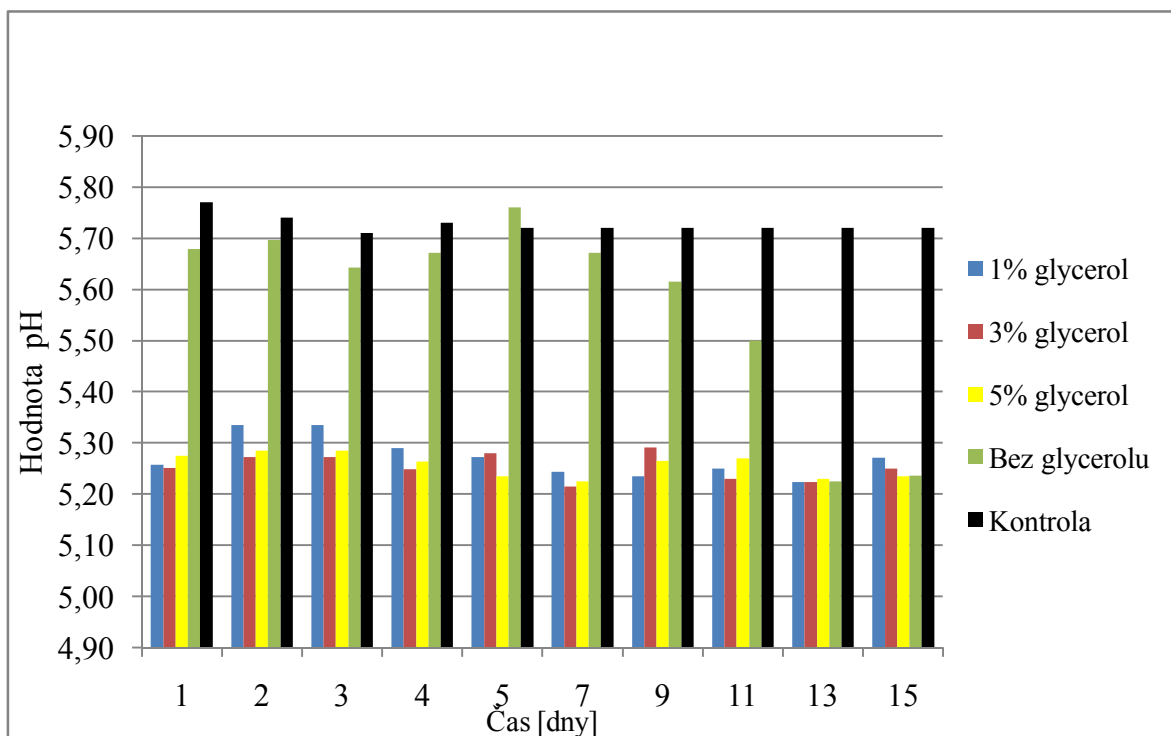
Obr. 13. Změna pH během kultivace testovaného kmene při 37°C po dobu 48 hodin v médiu s počátečním pH 6



Obr. 14. Změna pH během kultivace testovaného kmene při 10°C po dobu 15 dní v médiu s počátečním pH 4



Obr. 15. Změna pH během kultivace testovaného kmene při 10°C po dobu 15 dní v médiu s počátečním pH 5



Obr. 16. Změna pH během kultivace testovaného kmene při 10°C po dobu 15 dní v médiu s počátečním pH 6

6.3 Chromatografické stanovení biogenních aminů

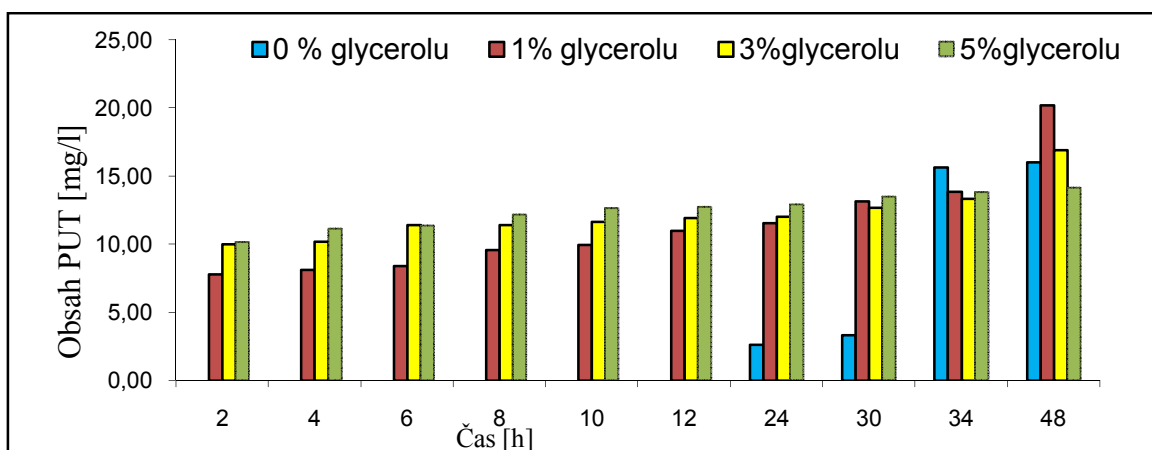
Pomocí metody kapalinové chromatografie byla u vzorků po kultivaci bakteriální kultury zjišťována přítomnost BA v daném médiu za přítomnosti či nepřítomnosti glycerolu. U testovaných vzorků byla metodou HPLC zjištěna produkce putrescinu a tyraminu. Na obr. č. 17–20 lze sledovat vývoj produkce BA, při kultivačních podmínkách a počátečního pH 4, různá koncentrace glycerolu neměla výrazný vliv na množství putrescinu a tyraminu. Výsledný obsah se pohyboval u PUT do 20 mg/l u TYR max. do 18 mg/l. Nejnižší hodnoty tyraminu byly za podmínek kultivační teploty 10 °C v médiu s koncentrací glycerolu 3 % a 5% (w/v).

Ve vzorcích po kultivaci v médiu s počátečním pH 5 (Obr. 21-24) byl rovněž obsah BA do 20 mg/l. Největší množství PUT vznikalo za podmínek kultivační teploty 10 °C s koncentrací glycerolu 0 % (w/v), naopak TYR se netvořil vůbec při stejné teplotě 10 °C a koncentraci glycerolu 5 % (w/v).

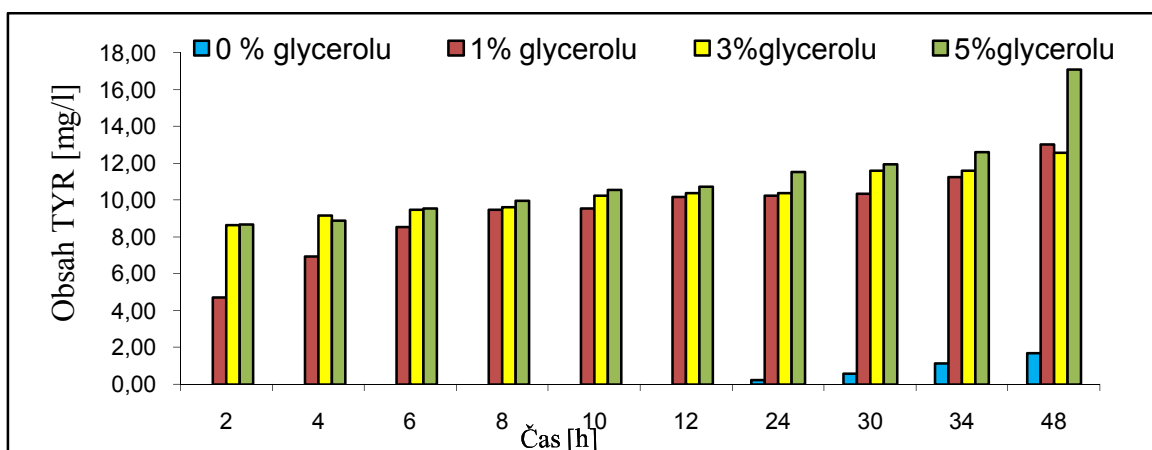
V případě produkce BA u média s počátečním pH 6 (Obr. 25-29) PUT dosahoval hodnot do 18 mg/l, nejnižší hodnoty je možno pozorovat za podmínek kultivační teploty 10 °C s koncentrací glycerolu 5 % (w/v). TYR dosahoval nejvyšších hodnot do 25 mg/l za podmínek 37 °C u koncentrací glycerolu 1, 3, a 5 % (w/v) a naopak vůbec nevznikal při 10 °C u koncentrace glycerolu 3 % a 5 % (w/v).

Ze souhrnného grafu (obr. 29), který je vytvořen z konečných hodnot (48. hodiny) pro teplotu 37 °C vyplývá nízká produkce PUT i TYR. Žádný TYR nevznikal v případě nulové koncentrace glycerolu.

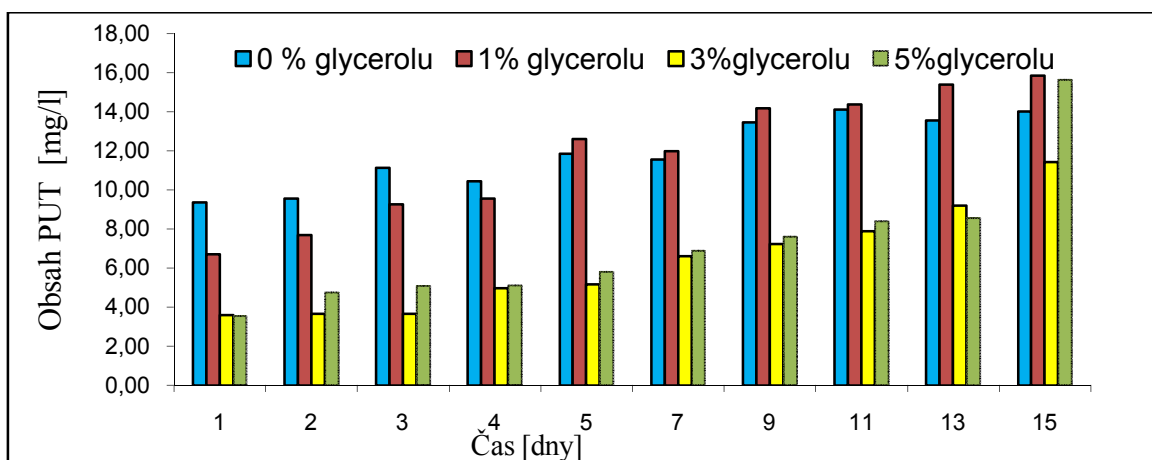
Souhrnný graf (obr. 30) pro vliv kultivační teploty 10 °C (v 15. dni) neovlivnil nízkou produkci PUT, ale tato teplota a koncentrace glycerolu 3 % a 5 % (w/v) zapříčinily nulovou až minimální produkci TYR.



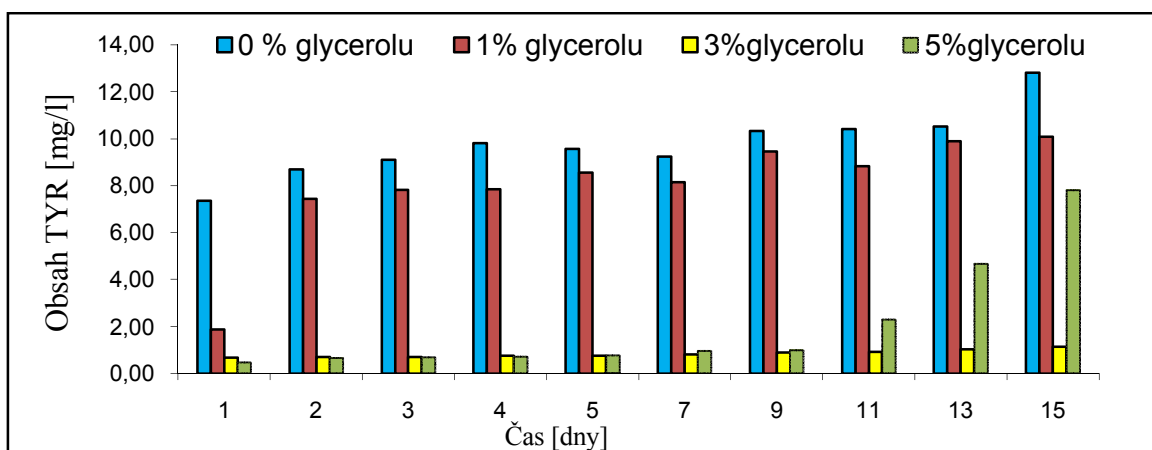
Obr. 17. Produkce putrescinu při 37 °C kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při pH 4 po dobu kultivace 48 hodin



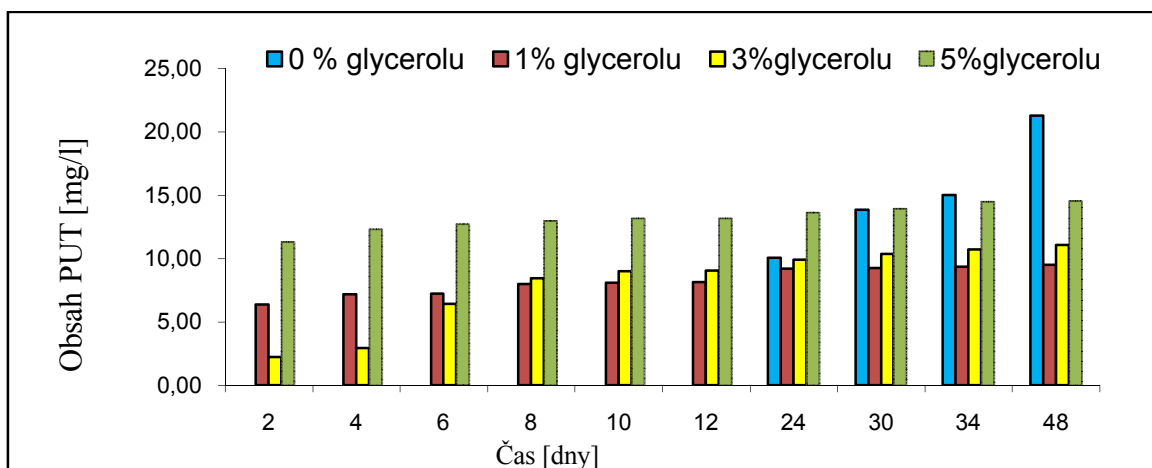
Obr. 18. Produkce tyraminu při 37 °C kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při pH 4 po dobu kultivace 48 hodin



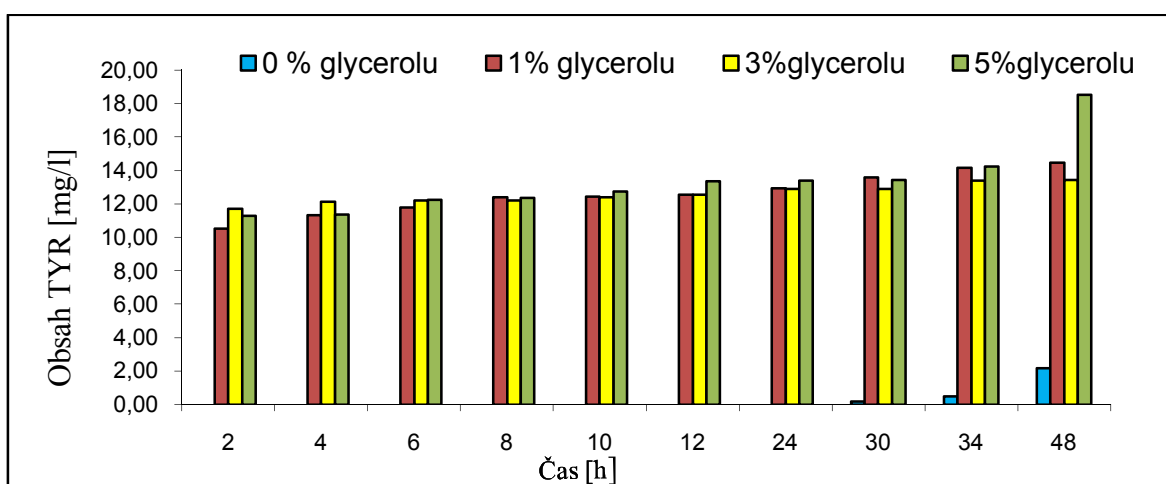
Obr. 19. Produkce putrescinu při 10 °C kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při pH 4 po dobu kultivace 15 dní



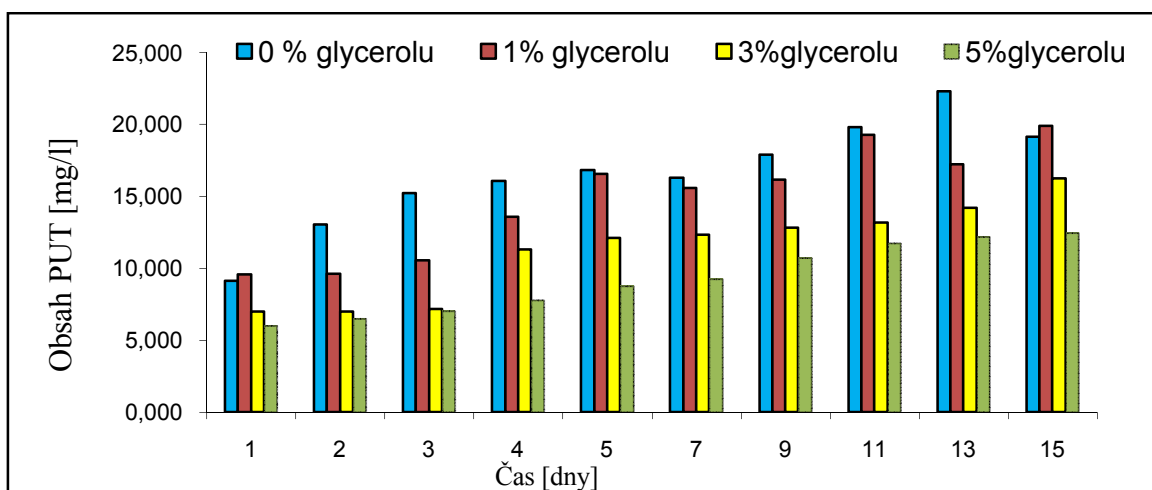
Obr. 20. Produkce tyraminu při 10 °C kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při pH 4 po dobu kultivace 15 dní



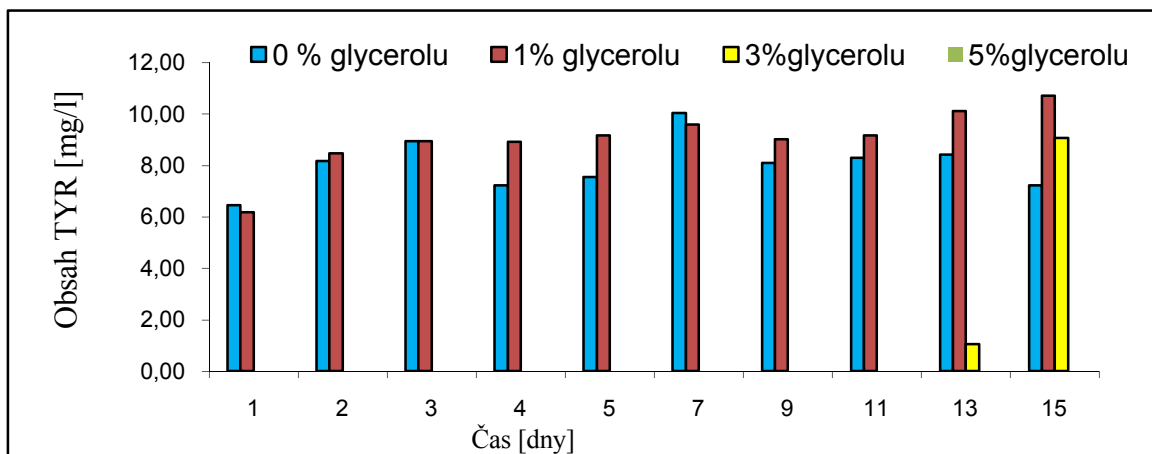
Obr. 21. Produkce putrescinu při 37 °C kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při pH 5 po dobu kultivace 48 hodin



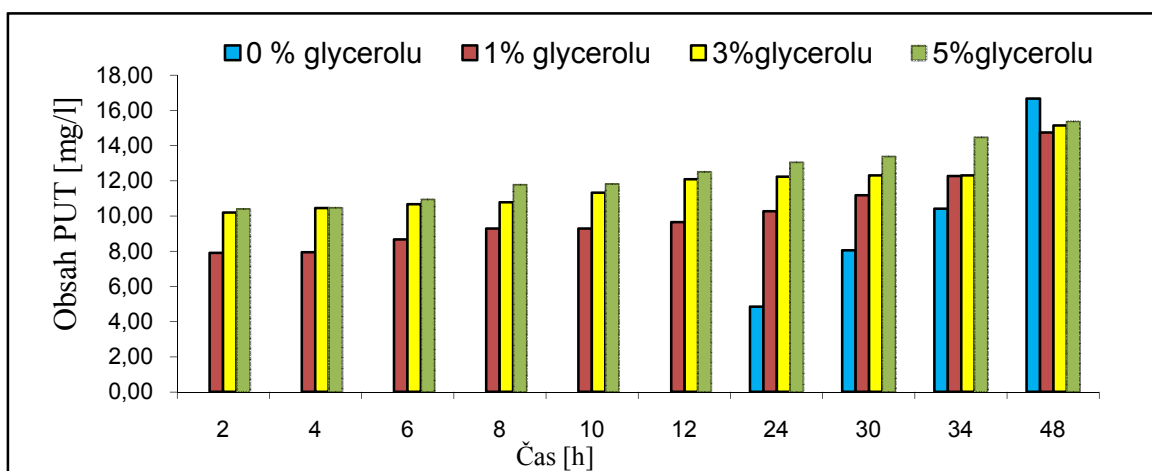
Obr. 22. Produkce tyraminu při 37 °C kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při pH 5 po dobu kultivace 48 hodin



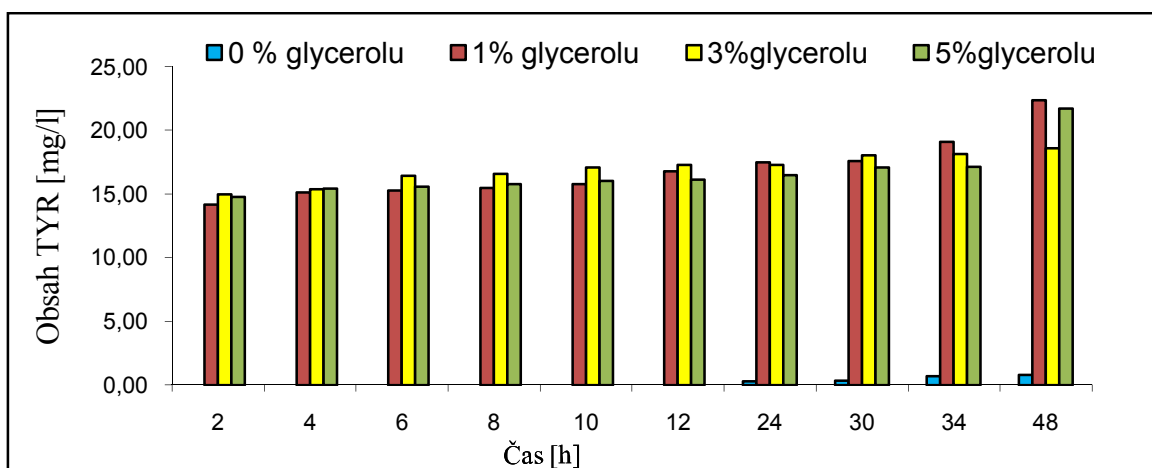
Obr. 23. Produkce putrescinu při 10 °C kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při pH 5 po dobu kultivace 15 dní



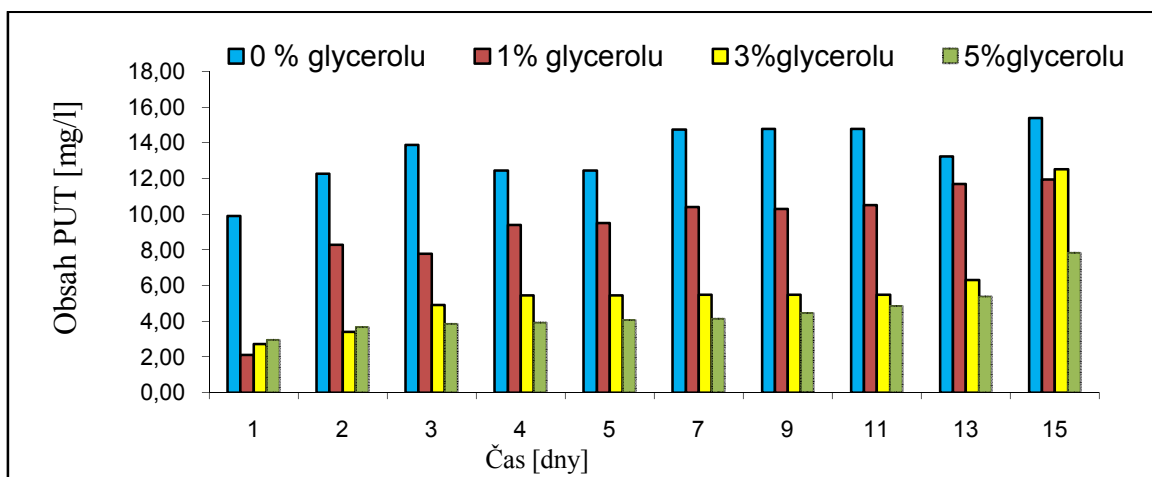
Obr. 24. Produkce tyraminu při 10 °C kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při pH 5 po dobu kultivace 15 dní



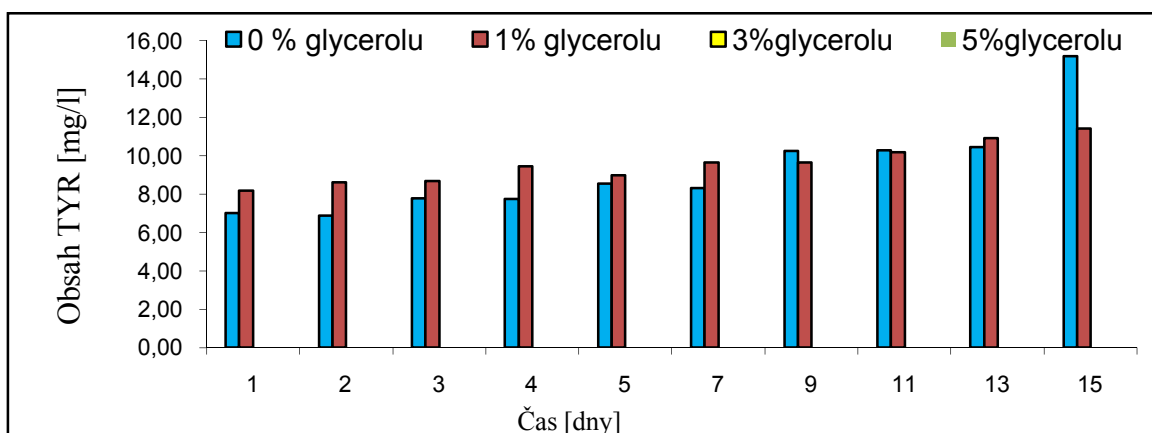
Obr. 25. Produkce putrescinu při 37 °C kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při pH 6 po dobu kultivace 48 hodin



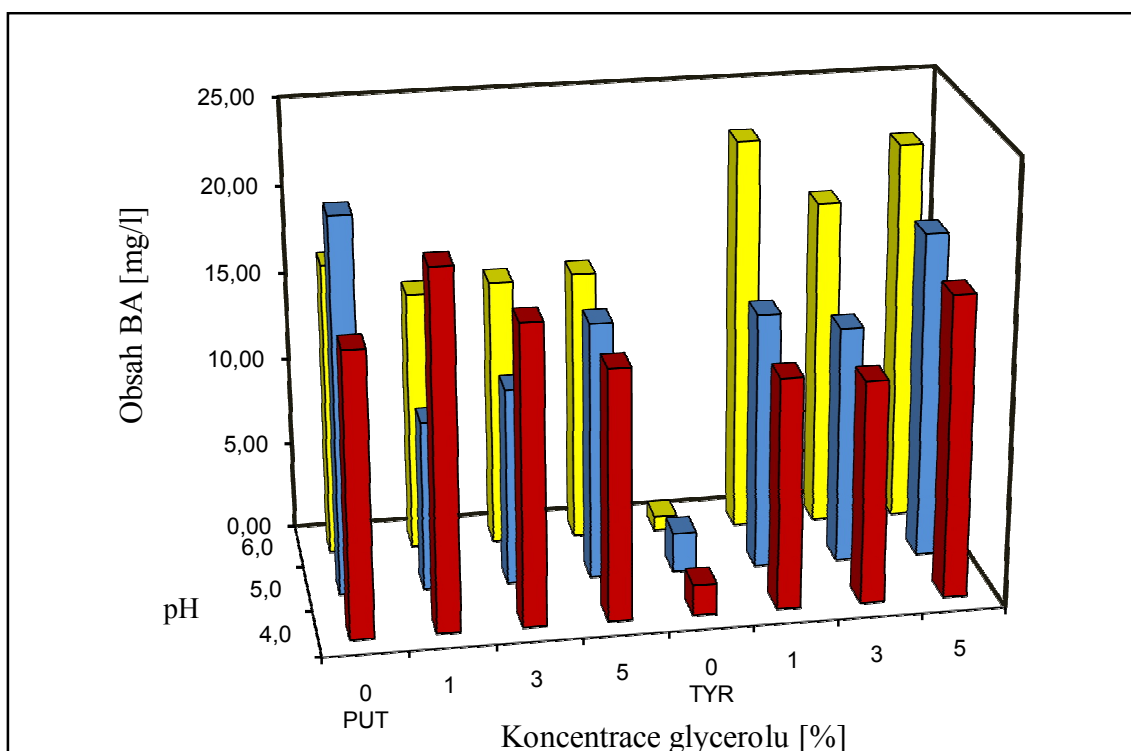
Obr. 26. Produkce tyraminu při 37 °C kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při pH 6 po dobu kultivace 48 hodin



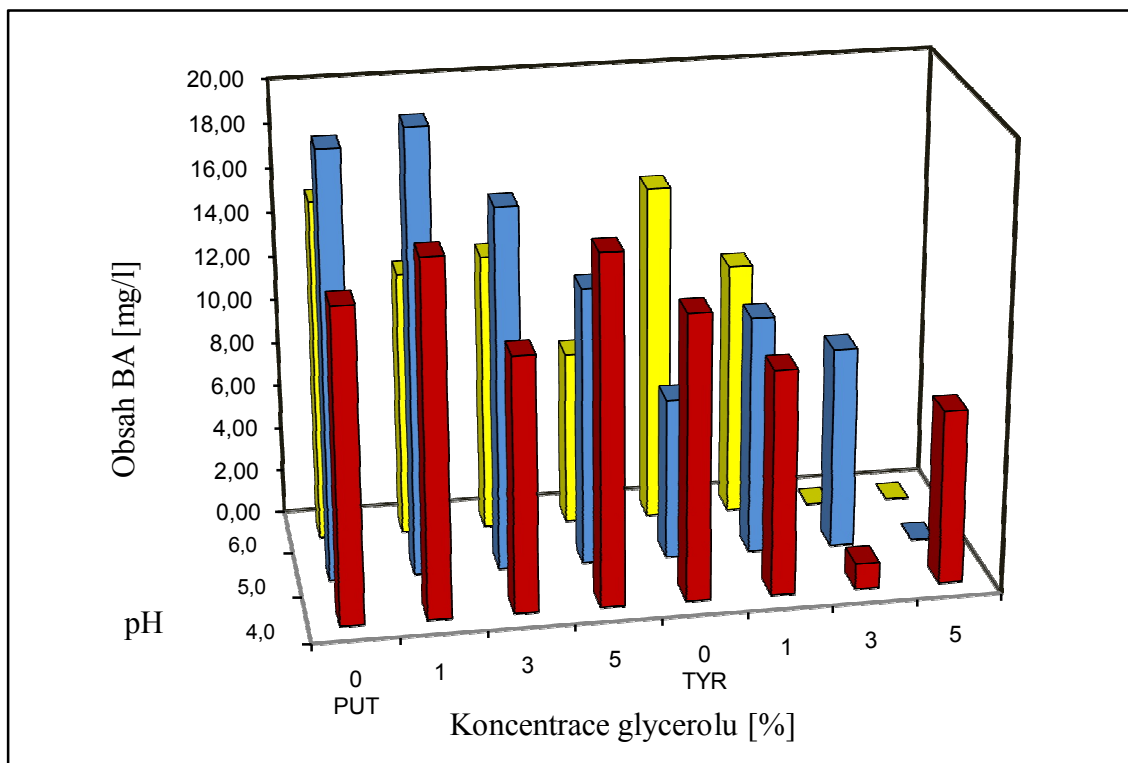
Obr. 27. Produkce putrescinu při 10 °C kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při pH 6 po dobu kultivace 15 dní



Obr. 28. Produkce tyraminu při 10 °C kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při pH 6 po dobu kultivace 15 dní



Obr. 29. Souhrnný graf produkce putrescinu a tyraminu po 48hodinách kultivace při 37°C kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289



Obr. 30. Souhrnný graf produkce putrescinu a tyraminu po 15 dnech kultivace při 10°C kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289

7 DISKUZE

V případě fermentovaných potravin dochází k produkci BA ve významnější míře, než je tomu u potravin bez procesu fermentace. U potravin, u kterých se používají BMK s možnou dekarboxylázovou aktivitou a v přítomnosti volných aminokyselin nebo aminokyselin vznikajících procesem proteolýzy, narůstá pravděpodobnost výskytu těchto sekundárních metabolitů. Mezi bakterie s prokázanou dekarboxylační aktivitou spadající do skupiny BMK patří především zástupci rodů *Enterococcus*, *Lactobacillus* a *Lactococcus* [13, 64].

Tato práce byla zaměřena na sledování faktorů vnějšího prostředí (různé koncentrace glycerolu, rozdílné počáteční pH kultivačního média a teploty kultivace) na dekarboxylázovou aktivitu bakterií rodu *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289. Vzhledem k dostupným literárním zdrojům je zřejmé, že problematice BA a jejich produkce mikroorganismy v potravinách je věnována zvýšená pozornost [1, 2, 4, 5, 18]. Rod *Lb. rhamnosus* spadající mezi mléčné bakterie s probiotickými účinky, byl vybrán v souvislosti s dekarboxylázovou aktivitou na podnět studie Sládkové a kol. (2007) [59]. Tvorba BA probiotiky představuje zajímavou skutečnost, která je kontrastem k jejich dieteticko-léčebným účinkům.

Produkce BA je omezena dostupnými aminokyselinami v prostředí, proto bylo kultivační médium *Lactobacillus* MRS Broth obohaceno přídavkem prekurzorů sledovaných BA aminokyselinami (arginin, lyzin, ornitin, fenylalanin a tyrozin) a navíc kofaktorem dekarboxylace pyridoxalfosfátem. Přípravou bakteriální suspenze s prekurzorem BA a kultivací za vhodných podmínek můžeme docílit podpory dekarboxylázové aktivity a eliminace přízpůsobování se bakterií novým podmínkám prostředí [1, 9].

Stanovené podmínky a úrovně faktorů byly nastaveny tak, aby se přibližovaly podmínkám při skladování tvrdých sýrů i teplotě v GIT člověka, kde mají probiotika působit. Proto byly zvoleny teploty kultivace 37 ± 1 °C a 10 ± 1 °C.

V této diplomové práci byla sledována produkce BA na základě předcházejícího skríningu, který prokázal dekarboxylační schopnost tohoto kmene *Lb. rhamnosus* CCDM 289.

Množství glycerolu v koncentracích 0, 1, 3 a 5 % (w/v) bylo přidáváno z důvodu podpory růstu bakterií, jako zdroje energie, a tedy i případnou produkci BA. V případě putrescinu nebyla koncentrace glycerolu příliš rozhodující. Vznik tyraminu byl však závislý i na teplotě a na počátečním pH kultivačního média, kdy nejvyšší detekované hodnoty byly za

podmínek koncentrace glycerolu 1-5 % (w/v), s počátečním pH kolem 6 a teplotě 37 °C. V případě nižší teploty kultivace naopak působily vyšší koncentrace glycerolu na produkci tyraminu negativně a množství BA se snižovalo. González-Fernández a kol. (2003) testovali a popsali účinek glukózy, laktózy a sacharózy na produkci BA u španělského typu klobás rodem *Lactobacillus* [61]. Nejvíce zastoupenými BA byly putrescin a tyramin, u kterých byla produkce nejvyšší při koncentraci glukózy 0,1 %. V minimálním množství byly detekovány i fenyletylamin, spermin a spermidin, avšak produkce histaminu nebyla prokázána. Obdobné výsledky přinesla studie Bover-Cid a kol. (2008), která taktéž prokázala nižší tvorbu tyraminu rodem *Lactobacillus* u vzorků fermentovaných klobásek bez přídavku glukózy [62]. Náš experiment potvrdil inhibiční účinky vyšších přídavků sacharidů, resp. v našem případě přídavku cukerného alkoholu glycerolu, který byl přidáván jako meziprodukt syntézy sacharidů a substrát potřebný pro vznik energie [63].

Vliv teploty na vývoj růstové křivky u 37 °C teploty vykazoval exponenciální fázi od 10. odběrové hodiny a u teploty 10 °C od 5. dne od zaočkování. V případě porovnání křivky růstu buněk s produkcí BA zjistíme, že obsah putrescinu i tyraminu ve vzorcích měly pozvolný trend navyšování a své maximum logicky dosahovaly v posledních časech odběru. Dle studie Komprda a kol. (2001) jsou teploty vyšší než chladničkové optimální pro produkci BA u potravin živočišného původu při použití BMK [64].

Dalším sledovaným faktorem byla hodnota pH daného kultivačního média v závislosti na dekarboxylázové aktivitě testovaného kmene. Tato hodnota pH byla proměřována v odběrových časech, měnila se v důsledku produkce kyseliny mléčné a BA v souvislosti nárůstu testovaného kmene. Snižování pH může navíc podpořit přítomnost cukrů, v našem případě cukerného alkoholu glycerolu. Existují rozdílné názory na produkci BA v závislosti na pH. Jeden z nich uvádí, že právě nízké pH zajišťuje nižší produkci BA (Bover-Cid a kol.(2008)) [62]. Naopak jiní vědci prokazují zvýšenou dekarboxylázovou aktivitu v kyselém prostředí z důvodu produkce zásaditých metabolitů (tedy BA), aby došlo ke zvýšení pH v prostředí buňky až do tzv. optimálního pH, ve kterém by se dekarboxylázová aktivita opět snížila (Gardini a kol. (2001)) [65]. V tomto experimentu docházelo k nejvýraznějšímu snížení pH při 37 °C u média s počáteční hodnotou kolem pH 6 již v 6. hodině kultivace, kdy je i na růstové křivce viditelný počátek exponenciální fáze. Produkce BA je při této teplotě nevýrazná a hodnoty se pohybují v rozmezí 10-15 mg/l, ovšem z tendence pozvolného navyšování hodnot by se dalo předpokládat další zvyšování obsahu putrescinu a ty-

raminu. U kultivační teploty 10°C dochází ke vzniku zanedbatelného množství tyraminu v důsledku nízkého nárůstu buněk. S vyšším množstvím putrescinu při zmíněné teplotě se můžeme setkat hlavně v případě vzorků média s nižší koncentrací glycerolu, kdy tendence vzniku BA opět narůstá v čase kultivace.

Co se týče produkce putrescinu a tyraminu, je příhodné srovnat produkované množství v posledních časech kultivace, jelikož zde jsou hodnoty nejvyšší. Ze souhrnných grafů pro jednotlivé teploty kultivace, počátečního pH a koncentrace glycerolu je zřejmé, že produkce putrescinu a tyraminu daného kmene a jeho dekarboxylázová aktivita je závislá na odlišných vnějších podmínkách (Obr. 29-30).

Množství putrescinu při teplotě 37°C po dobu kultivace 48 hodin dosahovalo nejvyšších hodnot při pH 5 v prostředí 0 % (w/v) glycerolu a nejnižších hodnot při stejném pH, ale při koncentraci glycerolu 1 % a 3 % (w/v). Z čehož by se dalo vyvodit, že rostoucí množství glycerolu nemá výrazný vliv na produkci putrescinu. Obdobně je tomu i při kultivačních teplotě 10 °C, kdy nejvyšší obsah putrescinu je možné pozorovat při pH 5 po 15 dnech a koncentraci glycerolu 0 % a 1 % (w/v) a nejnižší hodnoty byly zaznamenány v případě pH 6 a koncentraci glycerolu 5 % (w/v). Takže je opět potvrzen inhibiční vliv vyšší koncentrace glycerolu na produkci putrescinu.

V případě obsahu tyraminu je naprosto znatelný rozdíl v produkci při rozdílných kultivačních teplotách. Zatímco nejvyšších hodnot dosahoval tyramin při kultivační teplotě 37 °C u všech třech počátečních pH a koncentracích glycerolu 5 % (w/v), nejnižší množství se tvořilo při nulové koncentraci glycerolu. Přesně naopak je tomu u kultivační teploty 10 °C, kdy nejvyšší obsah tyraminu byl produkován bez přídavku glycerolu v 15. den kultivace a nejnižší množství jsou pozorovatelné u koncentrací glycerolu 3 % a 5 % (w/v). Jak popsali ve své studii Komprda a kol (2001) vliv teploty zrání 8 °C a 22 °C u fermentovaných masných výrobků s přídavkem sacharidů 1 % (w/v) ovlivňuje vyšší produkci PUT a TYR starterovými kulturami po 20-ti dnech [64].

Obecně by se dalo shrnout, že vnější podmínky jako jsou teplota, doba kultivace (u potravin myšlena doba zrání, skladování) a koncentrace glycerolu mají na produkci BA znatelný vliv. Rozdílné počáteční pH ovlivňovalo hlavně nárůst buněk. V případě testovaného kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 však produkce putrescinu i tyraminu byla zaznamenána v hodnotách do 25 mg/l, což jsou množství, která nejsou pro lidské zdraví nebezpečná. Avšak v případě směsných starterových kultur se může jednat o příspěvek k celko-

vému množství BA, a proto by starterové kultury neměly ideálně BA tvořit vůbec. V legislativě České republiky jsou stanovena přípustná množství pouze pro histamin, ostatní BA zde nejsou uvedeny [1]. Podle studie Santos (1996) by ve vzorcích sýru neměl součet TYR, PUT, histaminu a kadaverinu překročit maximální hodnotu 300 mg/kg [13]. Obsah BA by měl být proto v potravinách stále sledován, aby nedošlo k případným alimentárním otravám nadlimitními dávkami BA, které by mohly ovlivnit hlavně osoby spadající do skupiny konzumentů s odlišnou citlivostí (nízká imunita, stáří, užívání farmak, konzumace alkoholu, aj.) [13]. Rovněž by se mělo dbát správnosti hygienické praxe v průběhu technologie z důvodu možnosti sekundární kontaminace suroviny/ polotovaru/ potraviny, protože kontaminující mikroflóra může mít mnohdy vysokou dekarboxylační aktivitu a produkce BA může probíhat nekontrolovatelně a případně mít negativní dopady na lidský organizmus [6, 11].

Tento výzkum se týkal podmínek, které by mohly ovlivnit produkci BA konkrétním bakteriálním kmenem za podmínek *in vitro* v médiu s úpravou sledovaných faktorů. Ovšem v případě potravin je mnohem náročnější zajistit podmínky minimální produkce BA. I u technologicky významných BMK byla prokázána dekarboxylační aktivita s produkcí toxikologicky významných BA. Z tohoto důvodu je nezbytné, aby byly testovány starterové kultury používané pro výrobu fermentovaných potravin. V souvislosti s výsledky testů by měly být upraveny podmínky, které by minimalizovaly produkci BA a zajistily tak maximální bezpečnost potravin nebo by měla být provedena selekce kmenů [66].

8 ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na podmínky ovlivňující produkci BA bakteriálním kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 řazeného mezi BMK s probiotickými účinky. Byl sledován konkrétně vliv teploty a pH. Použité kultivační médium bylo obohaceno aminokyselinami jako prekurzory pro vznik BA a přídavek koncentrací glycerolu jako zdroj energie pro růst bakterií daného kmene.

- Na základě naměřených výsledků metodou kapalinové chromatografie byly detekovány aminy putrescin a tyramin.
- Nejvyšší produkce putrescinu byla za podmínek kultivační teploty 10 °C a počátečním pH 5 kultivačního média *Lactobacillus* MRS Broth po 13 dnech kultivace v nepřítomnosti glycerolu.
- Na podporu produkce tyraminu měly značný vliv podmínky kultivační teploty 37 °C, počáteční pH 6 a koncentrace 1 % (w/v) glycerolu po 48 hodinách kultivace.
- Obecně by se dalo konstatovat, že počáteční pH kultivačního média nemělo na produkci BA signifikantní vliv, jelikož se výsledky lišily v řádech jednotek.
- Kultivační teplota 10 °C brzdila jak růst kultury, tak produkci hlavně tyraminu.
- Obě testované kultivační teploty nevykazovaly charakteristický rozdíl v obsahu PUT.
- Výrazný vliv měla vyšší koncentrace glycerolu na produkci tyraminu při 37 °C a nižší koncentrace 0 a 1 % (w/v) na produkci putrescinu při 10 i 37 °C.
- Tento experiment prokázal, že lze do jisté míry ovlivnit konečné množství BA produkovaných kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM změnou kultivačních podmínek a úpravou složení média.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] J. KAROVIČOVÁ a Z. KOHAJDOVÁ. Biogenic Amines in Food. *Chemical Papers*. 2005, roč. 59, č. 1, 70-79.
- [2] BAIXAS-NOGUERAS, S., S. BOVER-CID, M. T. VECIANA-NOGUÉS a M.C. VIDAL-CARROU. Amino acid-decarboxylase activity in bacteria associated with Mediterranean hake spoilage. *European Food Research and Technology* 2003(č. 217), 164-167.
- [3] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin*. 3rd ed. Tábor: OSSIS, 2009. p. 623. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [4] KALAČ, P. a P. A. KRAUSOVÁ. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*, 2005, roč. 90, 219–230.
- [5] NOVELLA-RODRÍGUEZ S., M.T. VECINA-NOGUÉS, M. IZQUIERDO-PULIDO a M.C. VIDAL-CARROU. Distribution of Biogenic Amines and Polyamines in Cheese. *Journal of Food Science*. 2003, roč.68, č.3, 750-755.
- [6] LUKÁŠ, K. *Gastroenterologie a hepatologie pro zdravotní sestry*. Praha 7: Grada publishing a.s., 2005. ISBN 80-247-1283-0.
- [7] SHAH, P. a E. SWIATLO. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Molecular Microbiology*. 2008, roč. 68, č. 1, 4-16.
- [8] PLEVA, P. *Inhibiční vliv monoacylglycerolů na bakterie rodu Lactococcus*. Diplomová práce. FT, UTB Zlín, 2010, 26-28.
- [9] SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 1996, roč. 29, č. 7, 675-690.
- [10] JANOUŠKOVÁ, M. *Biogenní aminy*. Bakalářská práce. Univerzita Masarykova, Ústav preventivního lékařství, Brno 2010, 20-27.
- [11] HOTAMISLIGIL, G.S. a X. O. BREAKEFIELD. Human monoamine oxidase A gene determines levels of enzyme activity. *American Journal of Human Genetics*. roč. 49, č. 2, 383–392.
- [12] MAOA. In: U.S. National Library of Medicine [online]. 2012 [cit. 2012-04-24]. Dostupné z: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MAOA>

-
- [13] SANTOS, S.M.H. Biogenic amines: their importance in foods. *Food Microbiology*. 1996, roč. 29, 213-231.
- [14] BEAUDOUINA, E., J. M. RENAUDINA, P. SERGEANTB, M. MORISSETB, D.A. MONERET-VAUTRINB a G. KANNYB. Les principaux diagnostics différentiels en allergie alimentaire. *Revue Française d'Allergologie*. 2009, roč. 49, č. 3, 291–295.
- [15] MAINTZ, L a N. NOVAK. Histamine and histamine intolerance. 2007, roč. 85, 1185–1196.
- [16] BRYCHTA, J., E. KLÍMOVÁ a H. BULAWOVÁ. Alergie a nepříznivé reakce organismu na ryby a výrobky z nich. *MASO*. 2010, č. 2, 23-26.
- [17] WIDIMSKÝ, J. a KOLEKTIV. Hypertenze. 3. Praha: Triton, 2008. ISBN 13: 978-80-7387-077-5.
- [18] MANGANI, S., S. GUERRINI, L. GRANCHI a M. VINCENZINI. Putrescine Accumulation in Wine: Role of *Oenococcus oeni*. *CURRENT MICROBIOLOGY*. 2005, roč. 51, 6–10. DOI: 10.1007/s00284-004-4425-1.
- [19] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [20] KLAENHAMMER, T. R., R. BARRANGOU, B. L. BUCK, M. A. AZCARATE-PERIL a E. ALTERMANN. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bio-processing and health. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, roč. 29, č. 3, 393–409.
- [21] TEPLÝ, M., N. ČERMÍNOVÁ, M. DĚDEK, B. HYLMAR, L. PETERKOVÁ, L. POKORNÁ a M. URNEROVÁ. *Čisté mlékařské kultury: Výroba, kontrola, použití*. Praha 1: SNTL, 1984.
- [22] SALMINEN, S., A. VON WRIGHT a A. OUWEHAND. *Lactic acid bacteria: Micro-biological and functional aspects*. 3 vyd. Marcel Dekker, Inc., 2004. 633 s. ISBN 0-8247-5332-1.
- [23] KERESTEŠ, J. *Biotechnologie, výživa a zdravie: Klúčové potraviny pre preparáciu zdravotného stavu obyvateľstva*. Považská Bystrica: Eminent s.r.o., 2009. 528 s. ISBN 978-80-970205-9-0.

-
- [24] EUZÉBY, J.P. *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* [online]. 2012 [cit. 2012-04-02]. Dostupné z: <http://www.bacterio.cict.fr/>
- [25] RADA, V. Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. *Medicina pro praxi*. 2011, roč. 8, č. 1, 10-15.
- [26] GILLOR, O., A. ETYION a M.A. RILLEY. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 2008, č. 81, 591-606.
- [27] MICHAIL, S.K., A. STOLI, T. JOHANSON a G.M. ONADY. Efficacy of probiotics in the treatment of pediatric atopic dermatitis: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2008, č.101, 508-516.
- [28] TURPIN, W., CH. HUMBLLOT, M. THOMAS, a J.P. GUYOT. Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, č. 143, 87-102.
- [29] VAN NIEL, E.W., C.U. LARSSON, E.M. LOHMEIER-VOGEL a P.RÅDSTRÖM. The potential of biodetoxification activity as a probiotic property of *Lactobacillus reuteri*. *Int J Food Microbiol.* 2012, roč. 152, č. 3, 206-210.
- [30] MADSEN, K. Probiotics in critically ill patients. *J Clin Gastroenterol.* 2008, roč. 42, č.3, 116-S118.
- [31] HOLZAPFEL W. H., P. HABERER, R. GEISEN, J. BJÖRKROTH a U. SCHILLINGER. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2001, č. 73, 365–373.
- [32] HALÁSZ, A., A. BARÁTH, L. SIMON-SARKAD a W. HOLZAPFEL. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology.* 1994, roč. 5, 42-49.
- [33] SOUSAA, M.J., Y. ARDÖB a P.L.H. MCSWEENEY. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal.* 2001, roč. 11, 327–345.
- [34] LEUSCHNER, WALTER, R.G.K., R. KURIHARA a W.P. HAMMES. Effect of enhanced proteolysis on formation of biogenic amines by lactobacilli during Gouda cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology.* 1998, č. 44, 15–20.
- [35] FUQUAY, J.W., P.T. FOX a P.L.H. MCSWEENEY. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2. vyd. Ireland: Academic Press, 2011, 772–775. ISBN 9780123744029.

- [36] KOMPRDA, T., V. DOHNAL a R. ZÁVODNÍKOVÁ. Contents of Some Biologically Active Amines in a Czech Blue-vein Cheese. *Czech J. Food Sci.* 2008, roč. 26, č. 6, 428–440.
- [37] NOVELLA-RODRÍGUEZ, S., M. T. VECIANA-NOGUÉS, A. X. ROIG-SAGUÉS, A. J. TRUJILLO-MESA a M. C. VIDAL-CAROU. Influence of Starter and Nonstarter on the Formation of Biogenic Amine in Goat Cheese During Ripening. *American Dairy Science Association.* 2002, roč. 85, 2471–2478.
- [38] MAH, J.H., Y. J. HAN, K. OH, a H.J. HWANG. Biogenic amines in Jeotkals, Korean salted and fermented fish products. *Food Chemistry.* 2002, roč. 79, č. 2, 239–243.
- [39] YONGJIN, H., X. WENSHUI a L. XIAOYONG. Changes in biogenic amines in fermented silver carp sausages inoculated with mixed starter cultures. *Food Chemistry.* 2007, č. 104, 188–195.
- [40] LEROY, F., J. VERLUYTEN a L. DE VUYST. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology.* 2006, roč. 106, 270-285.
- [41] STEINHAUSER, L. a KOLEKTIV. *Hygiena a technologie masa.* 1995. Brno: LAST, 1995. 643 s. ISBN 80-900260-4-4.
- [42] VALICOVÁ, M., J. OMELKOVÁ, Š. TRACHTOVÁ a A. ŠPANOVÁ. Occurrence of lactic acid bacteria in grape must during alcoholic fermentation. *Chemické listy.* 2011, 1031-1031.
- [43] ASANO, S., K. SUZUKIA, K. IJIMA, Y. MOTOYAMA, H. KURIYAMA a Y. KITAGAWA. Effects of morphological changes in beer-spoilage lactic acid bacteria on membrane filtration in breweries. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2007, roč. 104, č. 4, 334–338.
- [44] KALAČ, P., J. ŠAVEL, M. KRÍŽEK, PELIKÁNOVÁ a M. PROKOPOVÁ. Biogenic amine formation in bottled beer. *Food Chemistry.* 2002, roč. 79, 431–434.
- [45] KALAČ, P., J. ŠPIČKA, M. KRÍŽEK a T. PELIKÁNOVÁ. The effects of lactic acid bacteria inoculants on biogenic amines formation in sauerkraut. *Food Chemistry.* 2000, roč. 70, 355–359.

- [46] KUNG, H.F., Y.H. TSAI a CH.I. WEI. Histamine and other biogenic amines and histamine-forming bacteria in miso products. *Food Chemistry*. 2007, roč. 101, č. 1, 351–356.
- [47] SUKOVÁ, I. Biogenní aminy v mléčných výrobcích. *Mliekarstvo*. 2006, roč. 37, č. 2, 38-42.
- [48] GREIF G., M. GREIFOVÁ a J. KAROVIČOVÁ.. Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter* spp. bacteria in model conditions *Journal of Food and Nutrition Research* 2010, roč. 45, č. 1, 21-29.
- [49] SMĚLÁ D., P PECHOVÁ, T. KOMPRDA, B. KLEJDUS a V. KUBÁŇ. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy*. 2004 č. 98, 432-437.
- [50] SARIKA, A.R., A.P. LIPTON a M.S. AISHWARYA. Bacteriocin Production by a New Isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under Different Culture Conditions. *Advance Journal of Food Science and Technology*. 2010, roč. 2, č. 5, 291 - 297.
- [51] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, M. HLOBILOVÁ, V. DRÁB a S. KRÁČMAR. Komparace různých metod detekce dekarboxylázové aktivity u bakterií mléčného kvašení. *Potravinářstvo*. 2010, roč. 4, 372-380
- [52] BERNARDEAU, M.B., J.P. VERNOUX, S. HENRI-DUBERNET a M. GUÉGUEN. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, roč. 126, č. 3, 278-285
- [53] KLABAN, V. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. Praha: Galen, 2005. ISBN 80-7262-341-9.
- [54] Tools for living better on home IV & tube feedings. In: *The oley foundation* [online]. 2007 [cit. 2012-03-24]. Dostupné z: <http://www.oley.org/lifeline/Probiotics.html>
- [55] *Lactobacillus acidophilus*. In: *AJCI's photostream* [online]. 2007 [cit. 2012-03-24]. Dostupné z: <http://www.flickr.com/photos/ajc1/512143798/>
- [56] RADA, V. a E. VLKOVÁ. Silážní inokulanty. Praha: Vědecký výbor výživy zvířat, 2010. ISBN 978-80-7403-069-7.

- [57] CONWAY, P.L., S.L. GORBACH a B.R. GOLDIN. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci.* 1987, roč. 70, č. 1, 1-12.
- [58] ERKKILÄ, S., M.L. SUIHKO, S. EEROLA, E. PETÄJÄ a T. MATTILA-SANDHOLM. Dry sausage fermented by *Lactobacillus rhamnosus* strains. *International Journal of Food Microbiology.* 2001, roč. 64, 205-210.
- [59] SLÁDKOVÁ, P., T. KOMPRDA a R. BURDYCHOVÁ. Skrining startovacích a probiotických kultur určených pro výrobu fermentovaných masných výrobků na schopnost tvorby biogenních aminů. In *MendelNet'07 Agro*. MZLU v Brně, 2007, 1-7. ISBN 978-807375-119-7.
- [60] DADÁKOVÁ, E., T. PELIKÁNOVÁ a P. KALÁČ. Content of biogenic amines and polyamines in some species of European wild-growing edible mushrooms. *European Food Research and Technology.* 2009, roč. 230, 163-171.
- [61] GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C., E. M. SANTOS, I. JAIME a J. ROVIRA. Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in chorizo dry sausage. *Food Microbiology.* 2003, č. 20, 275–284.
- [62] BOVER CID, S., M.J. MIGUÉLEZ-ARRIZADO, B. BECKER, W.H. HOLZAPFEL a M.C. VIDAL-CAROU. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiology.* 2008, č. 25, 269–277.
- [63] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. 2. vyd. Praha: Academia. ISBN 8020006001.
- [64] NEZNALOVÁ, J., S. STANDARA a S. KOMPRDA. Effect of starter culture and storage temperature on the content of biogenic amines in dry fermented sausage poličan. *Meat science.* 2001, č. 59, 267-276.
- [65] GARDINI, F., M. MARTUSCELLI, M.C. CARUSO, F. GALGANO, M.A. CRUDELE, F. FAVATI, M.E. GUERZONI a G. SUZZI. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology.* 2001, č. 64, 105-117.
- [66] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, M. Hlobilová, Z. Vaňátková, D. Nováková a V. Dráb. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*, 2009, č. 229, 533–538.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BA	Biogenní aminy
GIT	Gastrointestinální trakt
BMK	Bakterie mléčného kvašení
PUT	Putrescin
TYR	Tyramin
PCR	Polymerázová řetězová reakce.
HPLC	Kapalinová chromatografie
CFU	Kolonie tvořící jednotku

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Biogenní aminy jako produkty dekarboxylace aminokyselin [8]</i>	13
<i>Obr. 2. Schéma přeměny pyruvátu u různých mikroorganismů [19]</i>	19
<i>Obr. 4. Vzhled kolonií na plotně [55]</i>	31
<i>Obr. 3. Rod <i>Lactobacillus</i> sp.[54]</i>	31
<i>Obr. 5. Nárůst buněk během kultivace po dobu 48 hodin při 37°C a pH 4</i>	40
<i>Obr. 6. Nárůst buněk během kultivace po dobu 48 hodin při 37°C a pH 5</i>	40
<i>Obr. 7. Nárůst buněk během kultivace po dobu 48 hodin při 37°C a pH 6</i>	40
<i>Obr. 8. Nárůst buněk během kultivace po dobu 15 dní při 10°C a pH 4</i>	41
<i>Obr. 9. Nárůst buněk během kultivace po dobu 15 dní při 10°C a pH 5</i>	41
<i>Obr. 10. Nárůst buněk během kultivace po dobu 15 dní při 10°C a pH 6</i>	41
<i>Obr. 11. Změna pH během kultivace testovaného kmene při 37°C po dobu 48 hodin médiu s počátečním pH 4</i>	43
<i>Obr. 12. Změna pH během kultivace testovaného kmene při 37°C po dobu 48 hodin v médiu s počátečním pH 5</i>	43
<i>Obr. 13. Změna pH během kultivace testovaného kmene při 37°C po dobu 48 hodin v médiu s počátečním pH 6</i>	44
<i>Obr. 14. Změna pH během kultivace testovaného kmene při 10°C po dobu 15 dní v médiu s počátečním pH 4</i>	44
<i>Obr. 15. Změna pH během kultivace testovaného kmene při 10°C po dobu 15 dní v médiu s počátečním pH 5</i>	45
<i>Obr. 16. Změna pH během kultivace testovaného kmene při 10°C po dobu 15 dní v médiu s počátečním pH 6</i>	45
<i>Obr. 17. Produkce putrescinu při 37 °C kmenem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289 při pH 4 po dobu kultivace 48 hodin</i>	47
<i>Obr. 18. Produkce tyraminu při 37 °C kmenem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289 při pH 4 po dobu kultivace 48 hodin</i>	47
<i>Obr. 19. Produkce putrescinu při 10 °C kmenem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289 při pH 4 po dobu kultivace 15 dní</i>	47
<i>Obr. 20. Produkce tyraminu při 10 °C kmenem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289 při pH 4 po dobu kultivace 15 dní</i>	48
<i>Obr. 21. Produkce putrescinu při 37 °C kmenem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289 při pH 5 po dobu kultivace 48 hodin</i>	48

Obr. 22. Produkce tyraminu při 37 °C kmenem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289 při pH 5 po dobu kultivace 48 hodin.....	48
Obr. 23. Produkce putrescinu při 10 °C kmenem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289 při pH 5 po dobu kultivace 15 dní.....	49
Obr. 24. Produkce tyraminu při 10 °C kmenem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289 při pH 5 po dobu kultivace 15 dní.....	49
Obr. 25. Produkce putrescinu při 37 °C kmenem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289 při pH 6 po dobu kultivace 48 hodin.....	49
Obr. 26. Produkce tyraminu při 37 °C kmenem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289 při pH 6 po dobu kultivace 48 hodin.....	50
Obr. 27. Produkce putrescinu při 10 °C kmenem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289 při pH 6 po dobu kultivace 15 dní.....	50
Obr. 28. Produkce tyraminu při 10 °C kmenem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289 při pH 6 po dobu kultivace 15 dní.....	50
Obr. 29. Souhrnný graf produkce putrescinu a tyraminu po 48hodinách kultivace při 37°C kmenem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289.....	51
Obr. 30. Souhrnný graf produkce putrescinu a tyraminu po 15 dnech kultivace při 10°C kmenem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289.....	51

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Mikrobiální druhy řazené mezi probiotika [10]</i>	20
--	----