

# **Vnější faktory ovlivňující produkci biogenních aminů u vybraných grampozitivních bakterií**

Veronika Gajarová

---

Bakalářská práce  
2013

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky  
akademický rok: 2012/2013

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Veronika GAJAROVÁ**  
Osobní číslo: **T10146**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Vnější faktory ovlivňující produkci biogenních aminů u vybraných grampozitivních bakterií**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Charakteristika, klasifikace, vznik a faktory ovlivňující produkci biogenních aminů, identifikace producentů biogenních aminů.
2. Výskyt biogenních aminů v potravinách a vliv na lidské zdraví.
3. Dekarboxylázová aktivita vybraných potravinářsky významných bakterií (především bakterií mléčného kvašení).

### II. Praktická část

1. Stanovení produkce biogenních aminů metodou RP-HPLC po předkolonové derivatizaci dansylchloridem.
2. Skríníng dekarboxylázové aktivity u vybraných grampozitivních bakterií.
3. Formulace závěrů na základě získaných výsledků.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] KOMPRDA, T., BURDYCHOVÁ, R., DOHNAL, V., CWIKOVÁ, O., SLÁDKOVÁ, P., Some factors influencing biogenic amines and polyamines content in Dutch-type semi-hard cheese, *European Food Research and Technology*. 2008, vol. 227, p. 29–36. ISSN: 1438–2377.

[2] LINARES, D.M., MARTÍN, M.C., LADERO, V., ALVAREZ, M.A., FERNÁNDEZ, M. Biogenic Amines in Dairy Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011, vol. 51, iss. 7, p. 691–703. ISSN: 1040–8398.

[3] SILLA-SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, vol. 29, iss. 2–3, s. 213–231. ISSN: 0168–1605.

[4] ÖZOGUL, F. a ÖZOGUL, Y., The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures, *European Food Research and Technology*. 2007, vol. 225, p. 385–394.

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

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Eva Lorencová**

Ústav technologie potravin

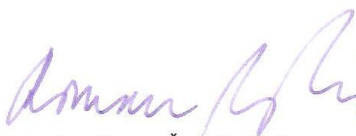
Datum zadání bakalářské práce:

**18. února 2013**

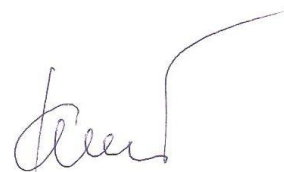
Termín odevzdání bakalářské práce:

**24. května 2013**

Ve Zlíně dne 18. února 2013



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



doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: Gajarová Veronika

Obor: Chemie a technologie výroby,  
tuků, kosmetiky a detergentů

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně ..... 27.5.2013

.....  
Gajarová

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **ABSTRAKT**

V bakalářské práci je přiblížen vliv faktorů, které ovlivňují produkci biogenních aminů u vybraných grampozitivních bakterií. Konkrétně byla sledována kinetika produkce biogenních aminů u kmene *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69 při 0; 3 a 6% (v/v) koncentraci etanolu v růstovém prostředí. *Lactobacillus brevis* je řazen mezi možné kontaminanty piva, které jsou navíc schopné zvýšené produkce biogenních aminů, čímž negativně ovlivňují kvalitu tohoto alkoholického nápoje, případně i zdraví konzumenta. Vznik biogenních aminů (tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu) byl po kultivaci sledován v supernatantu pomocí kapalinové chromatografie na reverzních fázích s předkolonovou derivatizací danzylchloridem a UV detekcí. U testovaného mikroorganismu bylo uskutečněno sledování kinetiky produkce tyraminu. Právě tyramin byl produkován v hojné míře, na rozdíl od ostatních BA, jejichž koncentrace nedosáhla ani 2 mg/l.

Klíčová slova: biogenní aminy, faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu, *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69

## **ABSTRACT**

In the bachelor thesis the factors affecting the production the biogenic amines in selected gram-positive bacteria is described. The kinetics of biogenic amine production by *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69 at 0, 3 and 6 % (v/v) concentration of ethanol in the growth medium was observed. *Lactobacillus brevis* is considered to be one of the most possible beer contaminants. These bacteria are able to produce higher levels of biogenic amines which negatively affect the quality of alcoholic drinks and subsequently the consumer's health. The formation of biogenic amines (tyramine, phenylethylamine, putrescine, cadaverine) was monitored after the cultivation in the supernatants by reverse phase liquid chromatography with pre-column derivatization by dansylchloride and UV detection. The observation of kinetics of tyramine production was realized. Only tyramine was produced by the current tested bacterial culture. The tyramine was formed in abundant measure in comparison with concentrations of other biogenic amines which were bellow 2 mg/l.

Keywords: biogenic amines, factors influencing decarboxylase activity, *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69

Především bych chtěla poděkovat mé vedoucí práce, Ing. Evě Lorencové, za její vynaložené úsilí, trpělivost, obětovaný čas, korekci mé práce, cenné rady a připomínky. A samozřejmě svým rodičům za veškerou podporu.

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



# OBSAH

|  |           |
|--|-----------|
| ÚVOD .....   | 11        |
| <b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>   | <b>12</b> |
| <b>1 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ .....</b>  | <b>13</b> |
| 1.1 KLASIFIKACE BIOGENNÍCH AMINŮ .....   | 13        |
| 1.2 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ - DEKARBOXYLACE .....   | 14        |
| 1.3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PRODUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ .....  | 15        |
| 1.3.1 Teplota .....  | 15        |
| 1.3.2 Hodnota pH .....   | 16        |
| 1.3.3 Chlorid sodný .....  | 17        |
| 1.3.4 Pyridoxal-5-fosfát .....   | 17        |
| 1.3.5 Přístup kyslíku a redoxní potenciál .....  | 17        |
| 1.3.6 Vliv zkvasitelných cukrů .....   | 18        |
| 1.3.7 Etanol .....   | 18        |
| 1.3.8 Relativní vlhkost prostředí a aktivita vody .....  | 18        |
| 1.3.9 Přítomnost prekurzorů pro vznik biogenních aminů .....   | 19        |
| 1.4 IDENTIFIKACE PRODUCENTŮ BIOGENNÍCH AMINŮ .....   | 19        |
| 1.5 KVAŠENÍ .....  | 20        |
| 1.5.1 Mléčné kvašení .....   | 22        |
| 1.5.2 Etanolové kvašení .....  | 23        |
| <b>2 BIOGENNÍ AMINY V POTRAVINÁCH A JEJICH ÚČINEK .....</b>  | <b>24</b> |
| 2.1 BIOGENNÍ AMINY V POTRAVINÁCH A NÁPOJÍCH .....  | 24        |
| 2.1.1 Nefermentované potraviny a nápoje .....  | 24        |
| 2.1.2 Fermentované výrobky .....   | 26        |
| 2.2 ÚČINKY BIOGENNÍCH AMINŮ NA LIDSKÉ ZDRAVÍ .....   | 29        |
| 2.2.1 Fyziologické účinky biogenních aminů .....   | 29        |
| 2.2.2 Nadměrný příjem biogenních aminů .....   | 29        |
| <b>3 MIKROORGANIZMY PRODUKUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY .....</b>   | <b>31</b> |
| 3.1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ .....  | 32        |
| 3.1.1 Rod <i>Lactobacillus</i> .....   | 32        |
| 3.1.2 Další grampozitivní bakterie s dekarboxylázovou aktivitou patřící mezi bakterie mléčného kvašení ..... | 33        |
| <b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>   | <b>35</b> |
| <b>4 ÚVOD DO PROBLEMATIKY .....</b>  | <b>36</b> |
| <b>5 CÍL PRÁCE .....</b>   | <b>37</b> |
| <b>6 MATERIÁL A METODIKA .....</b>   | <b>38</b> |
| 6.1 BAKTERIÁLNÍ KULTURA .....  | 38        |
| 6.1.1 Příprava média .....   | 38        |
| 6.1.2 Kultivační médium .....  | 38        |
| 6.1.3 Příprava bakteriální suspenze .....  | 39        |
| 6.1.4 Kinetika produkce biogenních aminů .....   | 39        |
| 6.2 PRŮBĚH EXPERIMENTU A STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ .....  | 39        |
| <b>7 VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>  | <b>41</b> |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 7.1      | VLIV KONCENTRACE ETANOLU NA KINETIKU PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ<br>KMENEM <i>LACTOBACILLUS BREVIS</i> RIBM 2-69 RŮSTOVÉM PROSTŘEDÍ ..... | 41        |
| <b>8</b> | <b>ZÁVĚR .....</b>  | <b>45</b> |
|          | <b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>  | <b>46</b> |
|          | <b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>   | <b>50</b> |
|          | <b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>  | <b>51</b> |
|          | <b>SEZNAM TABULEK .....</b>   | <b>52</b> |

## ÚVOD

Prakticky ve všech potravinách a nápojích, které obsahují proteiny nebo volné aminokyseliny, lze díky přítomným mikroorganismům s dekarboxylázovou aktivitou očekávat výskyt biogenních aminů. Biogenní aminy jsou dusíkaté, nízkomolekulární, biologicky aktivní látky vznikající činností živých organismů. Mikrobiální dekarboxylázová aktivita je považována za kmenovou charakteristiku a do značné míry je ovlivněna vnějšími fyzikálně-chemickými faktory jako např. teplotou, pH, koncentrací soli a pyridoxal fosfátu, přítomností zkvasitelných cukrů, aerobním či anaerobním prostředím atd.

Zvýšený výskyt biogenních aminů v potravinách a nápojích je nežádoucí nejen z důvodů možných toxikologických účinků na zdraví člověka, ale je také indikací jejich nízké kvality a kažení. Nejčastěji sledovanými biogenními aminy v potravinách jsou histamin, tyramin, tryptamin, spermin, spermidin, kadaverin a putrescin. V současné době je na toto téma zveřejněna celá řada vědeckých studií snažících se řešit (minimalizovat či zcela zastavit) nežádoucí vznik těchto dusíkatých ve vyšších koncentracích toxických látek.

V této práci byly charakterizovány biogenní aminy, faktory mající stimulační a inhibiční efekt na dekarboxylázovou aktivitu. Dále byla přiblížena problematika výskytu biogenních aminů v potravinách a nápojích, případné nežádoucí účinky biogenních aminů na lidské zdraví a byly popsány mikroorganismy schopné syntézy biogenních aminů.

Praktická část byla zaměřena na monitoring kinetiky produkce biogenních aminů u zástupce grampozitivní mikroflóry, u bakterie mléčného kvašení *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69. Tento kmen je označen za kontaminantu piva a je dekarboxyláza pozitivní. V souvislosti s produkcí biogenních aminů vybraným kmenem byly testovány faktory, které mohou dekarboxylázovou aktivitu ovlivnit ať už jako inhibitory nebo akcelerátory. Do růstového prostředí byly přidány prekurzory vzniku biogenních aminů (aminokyseliny tyrozin, arginin, ornitin, histidin, lyzin), bylo upraveno pH (pH 4,5) a byl přidán etanol v koncentraci 0; 3 a 6 % (v/v). Hodnoty sledovaných faktorů byly zvoleny tak, aby co nejvíce imitovaly prostředí piva, ve kterém by se zmíněná bakterie mohla vyskytovat.

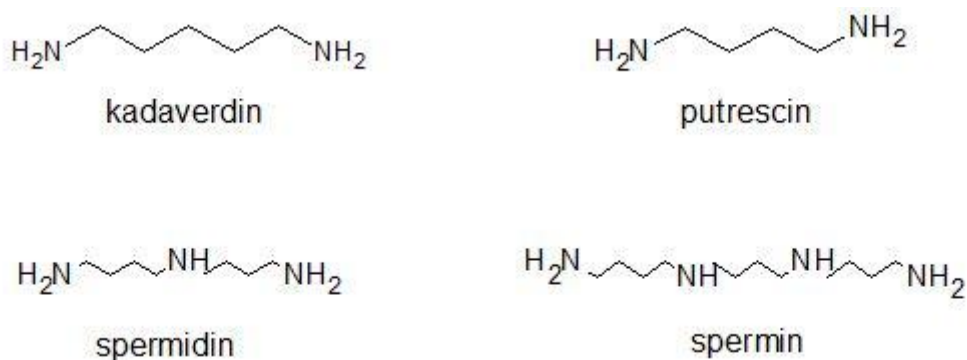
## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ

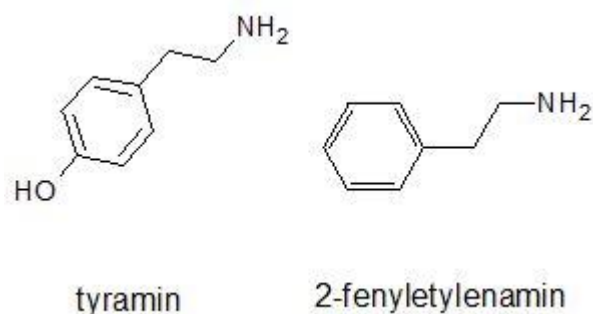
Biogenní aminy (BA) jsou organické, nízkomolekulární, přirozeně se vyskytující dusíkaté sloučeniny. Jak už sám název napovídá, jedná se o skupinu látek s biologickou aktivitou, která se uplatňuje v metabolismu zvířat, rostlin a lidí. Vznikají především dekarboxylací odpovídajících aminokyselin, dále pak procesem aminace a transaminace aldehydů a ketonů. BA jsou syntetizovány díky mikrobiálnímu, rostlinnému a živočišnému metabolismu. Běžně je najdeme v nefermentovaných a ve vyšších koncentracích ve fermentovaných potravinách [1, s. 691], [2, s. 213], [3, s. 375 – 739].

### 1.1 Klasifikace biogenních aminů

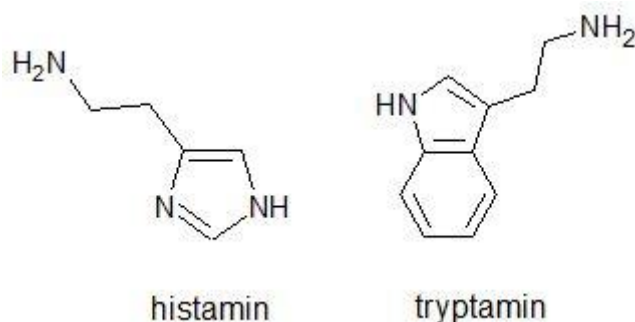
Nejvíce zastoupené BA, které se vyskytují v potravinách, lze rozdělit několika způsoby. Například je můžeme dělit podle jejich chemické struktury na: BA alifatické (putrescin, kadaverin, spermin a spermidin; Obr. 1), aromatické (tyramin, 2-fenyletylamin; Obr. 2), nebo heterocyklické (histamin, tryptamin; Obr. 3). Dále je pak můžeme rozlišovat podle toho, kolik aminových skupin tyto BA obsahují, na: monoaminy (tyramin, fenyletylamin), diaminy (putrescinu, kadaverin), nebo polyaminy (spermin, spermidin) [1, s. 691], [2, s. 213].



Obr. 1. Chemická struktura alifatických biogenních aminů [4, s. 1476]



Obr. 2. Chemická struktura aromatických biogenních aminů [4, s. 1476]

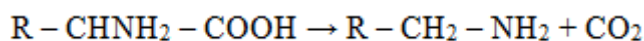


Obr. 3. Chemická struktura heterocyklických biogenních aminů [4, s. 1476]

## 1.2 Vznik biogenních aminů - dekarboxylace

Pro tvorbu BA je nutná přítomnost volných aminokyselin, vhodných bakterií schopných dekarboxylovat příslušné aminokyseliny a optimálních podmínek, při nichž bakterie mohou růst a syntetizovat dekarboxylázy. Nejznámějším BA je histamin, který vzniká z aminokyseliny histidinu. Z aminokyseliny tyrozinu vzniká tyramin, z ornitinu putrescin, z lyzinu kadaverin, z tryptofanu tryptamin a z fenylalaninu vzniká β-fenyletylamin [5, s. 71, 72].

BA vznikají dekarboxylací specifických volných aminokyselin, které jsou z proteinů uvolněny autolytickou nebo bakteriální proteolýzou. Dekarboxylace aminokyselin probíhá odštěpením  $\alpha$ -karboxylové skupiny za vzniku příslušného aminu (Obr. 4) [5, s. 71, 72]:



*Obr. 4. Dekarboxylační reakce [6, s. 2015]*

Různé bakterie se značně liší v množství produkované dekarboxylázy a také v její účinnosti. Na množství dekarboxylázy, které bakteriální buňky mohou vyprodukovat, má vliv povaha mikroflóry a složení prostředí [7, s. 385].

Proces dekarboxylace může probíhat [7, s. 385]:

1. Endogenně, kdy začne působit enzym dekarboxyláza vyskytující se přirozeně v potravinách;
2. Exogenně, kdy různé mikroorganismy uvolňují dekarboxylázu.

### 1.3 Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů

Pro syntézu BA je důležitá dostupnost aminokyselin v substrátu. Díky proteolýze, která v potravinách často nastává, je tento požadavek na přítomnost volných aminokyselin splněn. Dalším požadavkem pro vznik BA, resp. pro dekarboxylázovou aktivitu, jsou optimální vnější podmínky. Jedná se o fyzikálně-chemické faktory, mezi které např. řadíme teplotu, pH, koncentraci solí, přítomnost zkvasitelných cukrů, aerobní či anaerobní podmínky, v některých případech i přítomnost pyridoxal-5-fosfátu [2, s. 219], [8, s. 2].

Také je třeba brát v úvahu řadu mikroorganismů, které se významně podílí na tvorbě BA (především u fermentovaných potravin). Pokud dojde ve větším rozsahu k rozkladu bílkovin a k produkci BA může mít metabolismus zmíněné mikroflóry negativní dopad na jakost potravin. Tyto mikroorganismy se v potravinách mohou vyskytovat přirozeně a / nebo mohou být do potravin záměrně přidány (např. bakterie mléčného kvašení). Omezit vznik nežádoucí mikrobiální kontaminace je možné i na základě dodržování hygieny při zpracování, výrobě a skladování potravin, sledováním čerstvosti některých potravin (zejména ryb, ale i masných výrobků) [1, s. 691], [8, s. 2, 3, 6].

#### 1.3.1 Teplota

Jedním ze způsobů, jak efektivně zabránit tvorbě BA dekarboxyláza-pozitivními mikroorganismy, je správná regulace teploty působící po určitou dobu. Obecně se rychlost syntézy BA zvyšuje

s teplotou a naopak. Při nízkých teplotách dochází k inhibici mikrobiálního růstu a stejně tak ke snížení enzymové aktivity. Optimální teplota pro růst mezofilních bakterií mající dekarboxylázovou aktivitu je mezi 20 °C a 37 °C, u psychrotolerantních bakterií je však možná kumulace BA při nízkých teplotách pod 5 °C (i během skladování) [8, s. 14].

Také při delším skladování potravin je zvýšeno riziko většího výskytu BA, konkrétně tyraminu, putrescinu a kadaverinu. Proto jsou potraviny skladovány při teplotách nižších, kdy je značně omezen vznik BA. Důvodem je, jak již bylo naznačeno výše, snížení nejen proteolytické a dekarboxylační schopnosti související s omezením růstu bakterií. Avšak u psychrotrofních bakterií je možné zaznamenat dekarboxylázovou aktivitu i při relativně nízkých teplotách např. i u řádně chlazených ryb. Množství BA v potravinách lze ovlivnit tepelnou úpravou. Výjimkou je histamin, který je teplotně stabilní, jak při nižších, tak i při vyšších teplotách [1, s. 691], [5, s. 71, 72], [8, s. 14].

### 1.3.2 Hodnota pH

Dalším velmi důležitým faktorem ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů je pH. Obecně lze říci, že nepříznivé pH je příčinou větší citlivosti mikroorganismu k toxickým látkám a také, že mladé buňky jsou více citlivé na změny pH než buňky starší [8, s. 14], [9, s. 45].

Nízká hodnota pH (popř. rychlá acidifikace) může způsobit v prvním případě inhibici růstu mikroorganismů, nebo v druhém případě může mít za následek zvýšenou produkci a aktivitu enzymů, čímž začnou mikroorganismy ve větší míře produkovat dekarboxylázu v rámci jejich obranného mechanismu před nežádoucí nízkou hodnotou pH tedy zvýšenou kyselostí. Tyto dva procesy se navzájem ovlivňují a konečný výsledek závisí na jejich vzájemné rovnováze [8, s. 14]. Optimální pH pro syntézu BA odpovídá hodnotě 4,0, přičemž hodnoty pH nad 5,5 mají spíše inhibiční charakter. Avšak toto tvrzení je v rozporu se studiemi Sinell (1978) a Teodorović et al. (1994), kde je uvedeno, že tato optimální hodnota pH je v rozmezí 4,0 a 5,5, [2, s. 219], [9, s. 44].

Např. pro syntézu tyraminu v sýrech je ideální pH 5,0 [2, s. 219].

Snížit hodnotu pH lze pomocí glukono- $\delta$ -laktonu (GDL), kdy dojde ke stimulaci dekarboxylázové aktivity pro vznik histaminu a putrescinu. Tím je následně omezen růst fekálních streptokoků, aerobních mezofilních bakterií a koliformních bakterií. Příklad GDL nemá vliv na růst bakterií mléčného kvašení [2, s. 219].



### 1.3.3 Chlorid sodný

Chlorid sodný taktéž ovlivňuje dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů. Jeho účinek při syntéze BA může být buď inhibiční, nebo naopak stimulační. Záleží na specificitě příslušného kmene [8, s. 15].

Například určitá koncentrace chloridu sodného může způsobit u mikroorganismů aktivaci tyrozindekarboxylázy. Naopak jistá množství NaCl, může způsobit inhibici histidindekarboxylázy [2, s. 221], [5, s. 71].

Přidáním chloridu sodného např. do mléka při výrobě sýrů je možné zabránit vzniku BA. Avšak tento způsob inhibice BA může způsobit v procesu výroby sýrů změny jak v textuře, chuti, tak i v kvalitě výrobku [1, s. 694].

### 1.3.4 Pyridoxal-5-fosfát

Pyridoxal-5-fosfát působí jako kofaktor enzymů dekarboxyláz a může také ovlivnit produkci BA. Konkrétně u kmene *Lactobacillus rhamnosus* byla ve studii Lorencové et al. (2012) detekována mnohonásobně vyšší produkce tyraminu, avšak u zkoumaných bifidobakterií se hodnoty produkovaných BA po přidavku pyridoxalfosfátu nezměnily [1, s. 694], [10, s. 151].

### 1.3.5 Přístup kyslíku a redoxní potenciál

Na biosyntéze BA se významně podílí i přítomnost kyslíku nebo oxidačně-redukční potenciál kultivačního média. Přítomnost či absence vhodných oxidačních/redukčních činidel v médiu je důležitá pro růst a činnost všech mikroorganismů. Zda-li bude mít přítomnost kyslíku pozitivní nebo negativní dopad na produkci BA, záleží do jisté míry i na samotném mikroorganismu. Např. *Enterobacter cloacae* produkuje přibližně poloviční množství putrescinu za anaerobních při srovnání s aerobními podmínkami. *Klebsiella pneumoniae* syntetizuje výrazně méně kadaverinu, avšak za anaerobních podmínek je schopna produkovat ve větším množství putrescin. V přítomnosti kyslíku může být inaktivována nebo zničena histidin dekarboxyláza, přičemž ke zvýšení produkce histaminu dojde snížením redoxního potenciálu. Produkce tyraminu, fenyletylaminu a putrescinu bakterií *Lactobacillus curvatus* nebyla významně ovlivněna přítomností kyslíku [5, s. 71], [8, s. 15], [9, s. 51, 52].

Laktobacily spolu s dalším BMK vyžadují pro průběh fermentace anaerobní prostředí, tedy nižší hodnotu redoxního potenciálu. Také některé aerobní bakterie lépe rostou za mírně snížené hodnoty redoxního potenciálu. Jedná se o mikroaerofilní mikroorganismy, mezi které můžeme zařadit kampylobakterie a některé zástupce zmíněných laktobacilů [9, s. 51, 52], [11, s. 53].

### 1.3.6 Vliv zkvasitelných cukrů

Přítomnost zkvasitelných sacharidů, především D-glukózy, má pozitivní vliv na růst mikroorganismů a na jejich dekarboxylázovou aktivitu. Optimální koncentrace glukózy se pohybuje v rozmezí 0,5 – 2,0% (w/v), zatímco koncentrace vyšší než 3% (w/v) zamezuje vzniku dekarboxyláz [2], [5].

### 1.3.7 Etanol

Etanol spolu s fenolickými sloučeninami patří do skupiny dezinfekčních prostředků. Tyto chemické látky se používají za účelem odstranění mikroorganismů a ostatních zárodků infekce z vnějšího prostředí [11, s. 21, 22], [12, s. 168, 169].

Nejúčinnější jsou roztoky etanolu o koncentraci 50 – 70% (v/v), jelikož absolutní etanol je neúčinný. Působením alkoholu dochází ke koagulaci a denaturaci bílkovin [11, s. 21, 22], [12, s. 168, 169].

Etanol je jeden z faktorů mající inhibiční účinek na bakteriální růst. Do jaké míry bude etanol působit jako inhibitor, rozhodují i další faktory jako je např. teplota a pH. Obecně jsou mikroorganismy citlivější na působení etanolu při nižším pH. BMK byly dlouho považovány za rezistentní vůči působení etanolu. Inhibiční účinek etanolu byl prokázán ve studii Casadei et al. (2001) u *Lactobacillus delbrueckii* při nižších teplotách [13], [14, s. 125].

Růst bakteriální populace u kmene *Lactobacillus plantarum* při inkubační teplotě 18 °C poklesl za přítomnosti 7% (v/v) koncentrace etanolu na hodnotu 78,6 %, při působení 12% (v/v) koncentrace etanolu klesl na 45,6 % a za přítomnosti 13% (v/v) koncentrace etanolu poklesl na 39,5 % z celkového počtu živých buněk bez použití etanolu. Tento kmen je také tolerantní vůči působení 13% (v/v) koncentraci etanolu při nízkém pH v rozmezí 3,2 – 4 [13].

### 1.3.8 Relativní vlhkost prostředí a aktivita vody

Relativní vlhkost prostředí závisí na teplotě a obecně platí, že čím vyšší je teplota, tím nižší je relativní vlhkost a naopak. Potraviny, které mohou podléhat zkáze díky přítomnosti plísní, kvasinek a některých bakterií na povrchu potravin, by měly být skladovány při nízké relativní vlhkosti. Relativní vlhkost je také možné snížit změnou plynného prostředí [9, s. 56].

Vodní aktivita vyjadřuje dostupnost volné vody, kterou mikroorganismy potřebují pro průběh chemických reakcí. Optimální hodnota aktivity vody je jedním z požadavků pro růst mikroorganismů a pohybuje se v rozmezí 0,99 – 0,95. Vodní aktivita pro růst mikroorganismu je ovlivněna nejen teplotou, ale do určité míry i přítomností živin v substrátu, kdy lepší dostupnost

živin navyšuje hodnotu vodní aktivity. Citlivost vůči vodní aktivitě klesá v rámci potravinářsky významných mikroorganismů v následujícím pořadí: bakterie, kvasinky, plísně. K optimálnímu růstu vyžadují vyšší hodnotu vodní aktivity gramnegativní bakterie než grampozitivní bakterie. Rozdíl je dán odlišnou stavbou buněčné stěny. Avšak většina mikroorganismů je schopna přežít, růst a množit se i v prostředí mimo optimální hodnoty vodní aktivity [9, s. 56], [15], [16].

### **1.3.9 Přítomnost prekurzorů pro vznik biogenních aminů**

Histidindekarboxyláza závisí na samotné přítomnosti prekurzoru histaminu, tedy na koncentraci histidinu, dále na koncentraci sacharidů v médiu, na tenzi kyslíku, vitamínech a koenzymech přítomných v růstovém prostředí [3], [17, s. 29, 30].

Na syntézu histaminu má např. vliv i přítomnost glycinu (10 % w/v), kyseliny sorbové (0,1 – 0,2 % w/v), 10 % (w/v) kyseliny citrónové, jablečné a kyseliny jantarové. Zmíněné látky působí jako inhibitory jeho syntézy [2, s. 220].

## **1.4 Identifikace producentů biogenních aminů**

Pro identifikaci produkce BA lze použít analytické metody separační, které zahrnují chromatografické (LC, HPLC, GC) a elektroforetické stanovení, dále metody molekulárně genetické (PCR, kapilární elektroforéza) a metody kulturační [5, s. 74, 77], [18, s. 684, 685], [19, s. 432], [20], [21, s. 373].

### **a) Chromatografické metody**

Metoda používaná ke stanovení BA patřící do skupiny chromatografických metod je chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Metoda TLC je rychlá, přesná a levná. Stejně jako u modernější metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) je však nutné provést extrakci BA z vzorků a derivatizaci s následnou UV detekcí. Jedním z druhů HPLC je kapalinová chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC) s fluorescenční nebo UV detekcí, které předchází derivatizace příslušnými činidly (např. dansylchloridem). Dalším typem je iontově párová nebo iontově výměnná chromatografie (IEC), pomocí které je možné stanovit BA po postkolonové derivatizaci. Další vhodnou chromatografickou metodou pro detekci BA je plynová chromatografie (GC), avšak ta se dnes už téměř nevyužívá. GC může kolonu mít buďto kapilární nebo náplňovou a detektor elektronového záchytu, tepelně vodivostní nebo ioniozační plamen. GC je velmi citlivá,

jednoduchá, časově nenáročná a levná chromatografická metoda [5, s. 74, 77], [18, s. 684, 685], [19, s. 432].

#### **b) Metody molekulární biologie a kapilární elektroforéza**

Mezi molekulární metody je zařazena metoda PCR (polymerase chain reaction). Jedná se o nepřímou metodu založenou na detekci genů v DNA mikrobiálních původců zodpovědných za syntézu dekarboxylačních enzymů. Jedná se tedy spíše o stanovení potenciálu tvorby BA [20].

I když je bakterie s vhodnou genetickou výbavou schopna produkovat příslušné enzymy, neznamená to vždy, že dojde k jejich reálné syntéze a zapojení do metabolismu. Separace úseků amplifikovaných genů se provádí pomocí elektroforetické metody na agarózovém gelu [8, s. 63], [22].

Další možností identifikace BA je využití kapilární elektroforézy (CE). Jedná se o přímou, separační metodu, jejíž použití je rychlé, jednoduché, avšak s nedostačující citlivostí [5, s. 77], [20].

#### **c) Metoda kultivační**

V neposlední řadě je také možné využít metodu založenou na kultivaci dekarboxylačního média pomocí pH indikátorů. Tato metoda je však pouze orientační, jelikož v některých případech dává falešně negativní a falešně pozitivní výsledky [21, s. 373].

## **1.5 Kvašení**

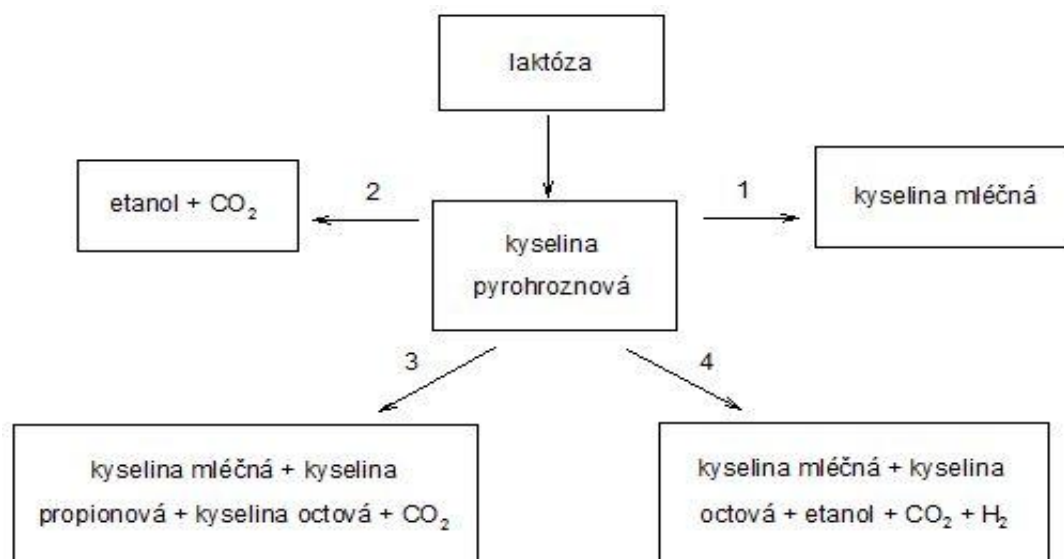
Kvašení (fermentace) je metabolický děj probíhající v anaerobním prostředí, jehož základem je rozklad sacharidů nejen chemoorganotrofními mikroorganismy, ale i samotnými buňkami. Základem je anaerobní katabolický proces všech chemoorganotrofních buněk neboli glykolýza neboli Embden–Meyerhof–Parnasova dráha (EMP dráha), kdy z glukózy vzniká sledem reakcí jako výsledný produkt kyselina pyrohroznová. K tomu je zapotřebí dodaná energie ve formě ATP [11, s. 53].

Principem je přeměna glukózy na fruktóza-1,6-difosfát za spotřeby 2 ATP. Fruktóza-1,6-difosfátu je dále se rozštěpen na dvě triózafosfáty (glyceraldehyd-3-fosfát a dihydroxyacetonfosfát). Na závěr EMP dráhy vzniknou dvě molekuly kyseliny pyrohroznové ze dvou molekul 1,3-difosfoglycerové kyseliny, přičemž oba fosfátové zbytky přejdou na ADP. Z jedné molekuly glukózy se vytvoří 4 molekuly ATP při současné spotřebě 2 molekul ATP na fosforylaci. Čistý zisk při odbourání

jedné molekuly hexózy jsou tedy pouze 2 molekuly ATP. Pro srovnání, za aerobních podmínek je z jedné molekuly glukózy odbourané až na  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  vytvořeno maximálně 38 molekul ATP [11, s. 53].

Procesy fermentace jsou z energetického hlediska nevýhodné, jelikož vzniklé metabolity mají ještě vysokou energetickou hladinu. Při dehydrogenaci je vodík předáván na  $\text{NAD}^+$  za uvolnění  $\text{CO}_2$ , kdy se současně regeneruje ATP. Jedna organická látka je tak redukována a druhá oxidována. Mikrobiální buňka tak musí na pokrytí celkové potřeby energie přeměnit velké množství substrátu. Aby k tomu mohlo dojít, musí mít mikroorganismus vhodný zdroj energie (pro vznik stejného počtu donorů a akceptorů, aby každé vzniklé  $\text{NADH}_2$  mohlo být opět oxidováno na  $\text{NAD}^+$  a znovu vráceno do procesu). Dále zdroj energie musí být rozložitelný na dva produkty (jeden produkt se bude chovat jako donor a druhý jako akceptor elektronů, přičemž současně vznikne molekula ATP). V neposlední řadě musí mít mikroorganismus vhodné genetické vybavení (geny pro enzymy katalyzující fermentaci) [11, s. 53], [23].

Produkty, jako jsou např. etanol, kyselina mléčná, kyselina propionová, vznikají při kvašení sacharidů a dalších látek samostatně nebo ve směsi. Podle výsledných produktů se pak dané kvašení označuje např. jako kvašení etanolové, mléčné, propionové. Nejvíce využívané fermentační procesy z průmyslového hlediska jsou etanolové a mléčné kvašení [11, s. 53], [23].



Mikroorganismy zkvašující laktózu:

- 1 *Streptococcus* a *Lactobacillus*
- 2 Kvasinky
- 3 Propionové bakterie
- 4 Koliformní bakterie

Obr. 5. Schéma čtyř způsobů zkvašování laktózy příslušnými mikroorganismy [24]

### 1.5.1 Mléčné kvašení

Mléčné kvašení je charakteristické pro bakterie mléčného kvašení (BMK), které získávají energii kvašením. Většina BMK není striktně anaerobní a mohou tak být anaerobní, mikroaerofilní nebo fakultativně anaerobní [11, s. 53], [25, s. 1419].

Pro průběh mléčné fermentace je důležitá energie, kterou BMK využívají ve formě ATP. Tuto energii mohou BMK získat třemi způsoby:

- dekarboxylací aminokyselin,
- dekarboxylací malátu,
- deiminací [25, s. 1419].

Tyto způsoby jsou důležité nejen pro energetický výdej, ale také se podílí na regulaci pH růstového prostředí. Při mléčné fermentaci dochází ke kumulaci kyselých produktů (zvláště kyseliny mléčné), tím pádem dochází ke snížení pH [25, s. 1419].

Mléčné kvašení lze rozdělit podle toho, jaké konečné produkty při tomto procesu vzniknou. Dělíme je tedy na homofermentativní a heterofermentativní [11, s. 53], [25, s. 1420]:

- a) Při homofermentativním mléčném kvašení jako hlavní produkt vzniká kyselina mléčná. Tento typ kvašení využívají především mikroorganismy rodu *Streptococcus* a *Lactococcus* a některé laktobacily, které jsou schopny pyruvát redukovat v laktát.
- b) Při heterofermentativním mléčném kvašení vznikají kromě kyseliny mléčné ještě další produkty (etanol, kyselina octová). Heterofermentativní mléčné bakterie využívají tzv. „hexózafosfátového zkratu“, kdy oxidují hexózy na pentóza-5-fosfát a oxid uhličitý. Důvodem je absence enzymu aldolázy, díky němuž je umožněno štěpení hexóza-1,6-bisfosfátu na dva triózafosfáty. V přítomnosti anorganického fosfátu dojde k rozštěpení pentóza-5-fosfátu na acetylfosfát a glycerinaldehyd-3-fosfát. Acetylfosfát při reakci s redukovaným kofaktorem umožní vznik etanolu. Glycerinaldehyd-3-fosfát je glykolýzou přeměněn v pyruvát a poté v laktát.

### 1.5.2 Etanolové kvašení

Etanolové kvašení je charakteristické pro kvasinky i bakterie, avšak průběh kvašení těchto mikroorganismů je odlišný:

- a) Etanolové kvašení u kvasinek probíhá až po vytvoření kyseliny pyrohroznové (EMP dráha), která je dekarboxylována na acetaldehyd. Ten je alkoholdehydrogenázou posléze redukován na etanol.
- b) Etanolové kvašení u bakterií začíná po fosforylaci glukózy, kdy je vzniklý glukonlaktón-6-fosfát dehydrogenován. Následně vzniká kyselina 2-keto-3-deoxy-6-fosfoglukonová, která se štěpí na 2 triózy (glycerinaldehyd-3-fosfát a pyruvát) a ty jsou v navazujícím kroku redukovány na etanol. Tento způsob kvašení není tak výkonný, jelikož bakterie tímto způsobem získá jen 1 molekulu ATP. Zmíněný způsob bakteriální etanolové fermentace je navíc využíván pouze gramnegativními bakteriemi [11, s. 53].

Etanolové kvašení se především uplatňuje při výrobě alkoholických nápojů a samotný etanol se využívá pro potravinářské i farmaceutické účely. S etanolovým kvašením se můžeme setkat i při kynutí těst v pekárenském průmyslu, kdy je využíván „vedlejší“ produkt CO<sub>2</sub>. Při průmyslovém etanolovém kvašení vzniká (kromě etanolu, CO<sub>2</sub> a malého množství glycerolu) ještě řada vedlejších produktů. Žádoucím vedlejším produktem mohou být estery, které nachází pozitivní uplatnění např. ve vinařství jako nezbytná součást tzv. buketu vína. Během etanolového kvašení vzniká v malém množství diacetyl. V pivovarnictví je tvorba diacetylu nežádoucí, jelikož i při jeho nízké koncentraci nepříznivě ovlivňuje chuť hotového výrobku. Značné množství diacetylu produkují příslušníci rodu *Pediococcus*, a proto jsou velmi obávanou kontaminací v pivovarnictví [9, s. 183], [11, s. 53].

## 2 BIOGENNÍ AMINY V POTRAVINÁCH A JEJICH ÚČINEK

Prakticky ve všech potravinách, které obsahují proteiny nebo volné aminokyseliny, lze při optimálních růstových podmínkách očekávat díky přítomným mikroorganismům výskyt BA [2, s. 214].

### 2.1 Biogenní aminy v potravinách a nápojích

Nejčastěji se BA nacházejí ve fermentovaných potravinách a nápojích např. v sýrech, mléčných výrobcích, v kysaném zelí, pivu a vínu. V potravinách připravených fermentační cestou jsou BA pravidelnou přirozenou součástí. Pro zahájení fermentace kvašených výrobků jsou standardně využívány startérové kultury. U nefermentovaných potravin je výskyt BA především indikátorem nežádoucí mikrobiální činnosti [3], [26].

Stanovení BA může být využito k posouzení míry rozkladu sledovaného materiálu. Obsah BA v potravinách může být ukazatelem jakosti vstupní suroviny a úrovně hygieny během výrobního procesu a skladování [3].

Nejdůležitější BA v potravinách a nápojích jsou histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, a  $\beta$ -fenylethylamin, tryptamin, agmatin, spermin, a spermidin, které jsou produkty dekarboxylace histidinu, tyrozinu, ornitinu, lyzinu a  $\beta$ -fenylalaninu [1, s. 691].

#### 2.1.1 Nefermentované potraviny a nápoje

##### a) Maso

Čerstvé a zpracované vepřové maso má vysoké hladiny adrenalinu, spermidinu a sperminu, naopak nízké hladiny noradrenalinu, putrescinu, histaminu, kadaverinu a tyraminu. U hovězího, skopového masa a u masných výrobků byla zjištěna především přítomnost histaminu [2, s. 214, 215].

##### b) Ryby

Největší nebezpečí tvorby BA je při vysoké mikrobiální kontaminaci ryb a při nedodržení chladírenského řetězce. Nejčastěji je kontaminace spojována s vyšším výskytem histaminu, který je možné detekovat i během skladování při nízkých teplotách. Další BA, které je možné najít v rybím



mase, např. u makrel, sledů, tuňáků a sardinek, jsou putrescin, kadaverin, tyramin, spermin, spermidin [2, s. 215, 216], [26].

Nejčastěji se BA tvoří ihned po vylovení ryb, které nejsou patřičně zchlazeny na teplotu odpovídající teplotu (kolem + 1 °C). Další rizikovou operací je tepelné opracování. Především se jedná o uzení ryb, hlavně makrel. Uzení ryb probíhá za nižších teplot (než řádná konzervace) a některé mikroorganismy (např. laktobacily) proces uzení mohou přežít. Za příznivých podmínek se pak mohou pomnožovat, a pokud jsou dekarboxyláza pozitivní, mohou produkovat biogenní aminy [26].

### c) Mléko

S produkcí BA v mléce bývají spojovány gramnegativní bakterie, jako *Hafnia alvei*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Serratia* sp., které se podílí na produkci histaminu a enterobakterie podílející se na produkci putrescinu. Příslušná koncentrace BA v mléce je charakteristická pro určité savce, např. u plnotučného a polotučného kravského mléka se běžně vyskytují v nižší koncentrace sperminu a spermidinu [1, s. 691], [2, s. 215, 216].

Přidáním chloridu sodného do mléka a/nebo použitím vhodného tlaku a teploty je možné inhibovat vznik BA. Použitím kvalitního mléka lze snížit možný výskyt BA při dalším zpracování ve finální mléčné výrobky [1, s. 700].

### d) Ovocné šťávy a zelenina

Obsah BA v ovoci je stanoven z hlediska zdravotní nezávadnosti především pro histamin, tyramin, putrescin a kadaverdin. Každý z jmenovaných BA se v ovoci vyskytuje do 5 mg/kg. V ovocných šťávách je koncentrace přítomného histaminu 3 mg/kg, u tyraminu, putrescinu a kadaverdinu se koncentrace pohybuje okolo 1 mg/kg [8, s. 32].

Ovocné šťávy, nektary a limonády vyrobené z pomerančů, malin, citrónů, grapefruitů, mandarinek, jahod, rybízu a vinné révy obsahují BA. Z hlediska zdravotního rizika je nejdůležitější stanovení koncentrace putrescinu. Nejvíce BA můžeme najít v pomerančové šťávě (noradrenalin, tryptamin), v rajčeti (tyramin, tryptamin, histamin), banánu (tyramin, noradrenalin, tryptamin, serotonin), ve švestkách (tyramin, noradrenalin) a listovém špenátu (histamin) [2, s. 215].

### e) Další nefermentované potraviny

V kakaových bobech se nachází přírodní složka fenyletylamin, jenž se pak následně vyskytuje v čokoládě, ve výrobcích a cukrovinkách z čokolády. Fenyletylamin také obsahují některé druhy hub, bílý a černý pepř. Histamin a kadaverin byly prokázány v karagenanu z mořských řas [2, s. 215].

## 2.1.2 Fermentované výrobky

Mnoho mikroorganismů má schopnost produkovat BA, včetně grampozitivních a gramnegativních bakterií různých rodů a druhů. Schopnost produkce BA je kmenovou charakteristikou. To znamená, že kmeny jednoho druhu se mohou lišit v produkci BA až o několik řádů. Je proto obtížné najít přesné korelace mezi obsahy BA a počty mikroorganismů. Vzhledem k různorodosti druhů a kmenů jsou specifické i optimální podmínky pro tvorbu BA. Kyselé pH, teplota při inkubaci, přidavek chloridu sodného do mléka či média může vést ke snížení produkce BA. Avšak působením fyzikálně-chemických faktorů by nemělo dojít ke změně textury, chuti nebo kvality výrobku [1, s. 693, 694], [3].

Jak již bylo zmíněno, přítomnost BA v potravinách je ukazatelem špatné kvality, nebo špatných výrobních postupů. Působením proteáz a peptidáz přítomných v sýru dochází k proteolýze kaseinu, k uvolnění aminokyselin a následnému vzniku BA. Každý typ sýra má charakteristický profil aminokyselin a BA, který vyplývá ze specifické mikrobiální degradace a syntézy. Sýry se srovnatelným mikrobiologickým profilem se mohou významně lišit v obsahu BA [1, s. 699, 700], [2, s. 216].

### a) Sýry a mléčné výrobky

Mléčné výrobky jsou důležitou součástí stravy v rozvinutých zemích [1, s. 692].

Sýry obvykle obsahují desítky až stovky mg/kg histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu, méně pak 2-fenylethylaminu a velmi malá množství tryptaminu. Obsahy BA však mohou výjimečně dosáhnout až gramových množství na jeden kilogram sýra, což závisí na ošetření výchozí suroviny a technologických faktorech, jako jsou teplota sýreniny, použití startovacích a plísňových kultur. Výrazně vyšší množství BA bylo zjištěno u sýrů z nepasterovaného mléka [3].

Koncentrace BA v sýrech české produkce jsou srovnatelné s obsahy BA v sýrech téhož typu zahraniční výroby. Ve většině případů mají české (tvrdé i tavené) sýry vyšší obsah tyraminu než histaminu, u velké části sýrů zahraniční produkce má sýr s vysokým obsahem histaminu také vysoký obsah tyraminu. Podle studie Standarové et al. (2008) můžeme sýry rozdělit do tří skupin podle maximální koncentrace BA na sýry: s vysokými koncentracemi BA (měkké zrající sýry, sýry

s vysokodohřívanou sýřeninou), se zvýšenou koncentrací BA (s nízkodohřívanou sýřeninou, plísňové sýry, resp. sýry kozí) a sýry s nízkou koncentrací BA (smetanové, termizované měkké sýry). Jelikož pro přípustné množství BA v sýrech nejsou dosud definovány hygienické limity, nelze určit hraniční hodnoty pro jednotlivé aminy [3].

Obsah BA lze pak snížit různými způsoby, mezi které patří pasteurace mléka, použití dekarboxyláza negativní startérové mikroflóry, volba kratších period fermentace, skladování vstupních surovin a sýrů za vhodných podmínek (zejména aplikace nízkých teplot pro inhibici aktivity dekarboxyláz) [3].

### b) Víno

Tento alkoholický nápoj vzniká fermentací moštu révy vinné. Za primární alkoholové kvašení jsou zodpovědné kvasinky rodu *Saccharomyces*, za sekundární jablečno-mléčné kvašení pak odpovídají BMK. Právě BMK z rodu *Lacobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* a *Oenococcus* jsou spojeny s produkcí BA ve víně. Avšak množství BA je při srovnání s jinými fermentovanými výrobky podstatně nižší. Konkrétně za výskyt histaminu a putrescinu ve víně jsou primárně odpovědné bakterie *Oenococcus oeni*. Rod *Lacobacillus* ovlivňuje hlavně produkci tyraminu. Mezi další BA obsažené ve víně mohou být zařazeny fenylalanin, etylamin a metylamin. Koncentrace BA ve víně je také ovlivněna stupněm zralosti hroznů, kvalitou zemědělských půd, množstvím dusíkatých látek v hroznové šťávě, přítomnými kvasinkami, dobou macerace, průběh a podmínkami kvašení [2, s. 217], [5, s. 73], [7, s. 388 – 393], [9, s. 184, 185].

### c) Pivo

Jedná se o alkoholický nápoj vyráběný z ječmenného sladu, vody a chmele, kdy působením pivovarských kvasinek dochází k fermentaci [9, s. 182, 183].

Pro Českou republiku je typické pivo světlé vyrábějící se dekokčním rmutováním a spodním kvašením. Světlé pivo můžeme dělit podle koncentrace mladiny (produktu chmelovaru, jehož chemické složení je rozhodující pro konečnou kvalitu vyrobeného piva) [27, s. 159]:

- Výčepní neboli konzumní piva: do 10,5 %
- Ležáky: do 12,5 %
- Piva speciální: nad 12,5 %
- Popř. piva se sníženým nebo nulovým obsahem alkoholu

Dále lze pivo podle obsahu alkoholu rozdělit následovně [30]:

Tab. 1. Přípustné koncentrace etanolu pro jednotlivé druhy piva stanovené podle Nařízení rady (ES) č. 510/2006 [30]

| Druh piva           | Koncentrace alkoholu v pivě |
|---------------------|-----------------------------|
| Světlý ležák        | 3,8 – 6,0 % (v/v) alkoholu  |
| Tmavý ležák         | 3,6 – 5,7 % (v/v) alkoholu  |
| Světlé výčepní pivo | 2,8 – 5,0 % (v/v) alkoholu  |
| Tmavé výčepní pivo  | 2,6 – 4,8 % (v/v) alkoholu  |
| Lehké pivo          | 2,6 – 3,6 % (v/v) alkoholu  |

I přesto, že pivo netvoří příliš příznivé prostředí pro růst mikroorganismů díky nízkému pH, nízkému obsahu kyslíku, přítomnosti oxidu uhličitého, hořkým chmelovým látkám, obsahu alkoholu a postupně klesajícímu obsahu zkvasitelných cukrů, je zde možný výskyt nežádoucích mikroorganismů podílejících se na kontaminaci piva [29, s. 336].

Mezi organizmy, které mají největší dopad na mikrobiologickou stabilitu piva, patří bakterie mléčného kvašení především rody *Lactobacillus* a *Pediococcus*. Mezi zástupce rodu *Lactobacillus* je možné zařadit jako pivní kontaminanty kmeny *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum*, *L. paracasei* subsp. *Paracasei* [9, s. 183, 184], [29, s. 336].

Tyto mikroorganismy mohou znehodnotit kvalitu piva vznikem sedliny, zákalu nebo zápachu a především jsou schopny produkce BA [9, s. 183, 184].

Za ukazatele mikrobiální kontaminace piva jsou považovány vyšší koncentrace BA histaminu, kadeverdinu a tyraminu (TYR), jejichž koncentrace se zvyšuje během kvašení. BA jako putrescin (PUT), spermidin, spermin a agmatin (AGM) jsou přirozenou součástí sladu, přičemž koncentrace PUT a AGM se sníží při rmutování. Snížit hladinu koncentrace TYR v pivě je možné omezením výskytu bakterie *Pediococcus*, čehož se dá docílit přidáním kyseliny fosforečné. Účinkem kyseliny fosforečné (vznikající při štěpení organických sloučenin fosforu kyselinotvornými enzymy) spolu s aminokyselinami (vzniklými při štěpení bílkovin) se dá také docílit nižších hodnot pH, které pak inhibují rozvoj zmíněných bakterií [27, s. 153, 154], [28, s. 123 – 124].

Hodnota pH piva je navíc důležitá z hlediska technologického. Pro ztekucování škrobového mazu  $\alpha$ -amylázou je optimální pH 4,6 (při teplotě 65 – 75 °C), pro zcukřování škrobového mazu  $\beta$ -amylázou je ideální hodnota pH 4,5 příp. i kyselější (při teplotě 75 – 85 °C). Podle Nařízení rady (ES) č. 510/2006 hodnota pH českého piva musí být v rozmezí 4,1 až 4,8 [9, s. 183], [27, s. 153, 154], [30].

## 2.2 Účinky biogenních aminů na lidské zdraví

Přestože rostliny, zvířata a mikroorganismy přirozeně produkují BA, konzumace potravin obsahujících velké množství těchto aminů může mít toxikologické následky [1, s. 691].

### 2.2.1 Fyziologické účinky biogenních aminů

BA hrají důležitou roli v oblasti farmakologie, fyziologie a psychologie. Tyto dusíkaté látky se uplatňují i jako neurotransmitery, neuromodulátory, neurohormony. Mezi neurotransmitery je možné zařadit katecholaminy (dopamin, norepinefrin, a epinefrin), indolaminy (serotonin) a imidazoleamin (histamin). Katecholaminy jsou deriváty aminokyseliny tyrozinu a mají stimulační účinek nejen v nervové soustavě, ale i v kardiovaskulárním a respiračním systému. Histamin působí mimo jiné i jako mediátor zánětu. Zejména funguje jako signalizace zánětu alergického [33, s. 10, 13], [34, s. 111].

Dopamin a serotonin jsou nezbytné pro správné fungování nervové soustavy. Změny koncentrací těchto neurotransmiterů vedou k nejrůznějším neurologickým onemocněním. Jejich nedostatek se projevuje opožděným vývojem, intelektuálním postižením, abnormálními pohyby a autonomní dysfunkcí [33, s. 10].

### 2.2.2 Nadměrný příjem biogenních aminů

Příjem BA v „přiměřeném“ množství je bez potíží metabolizován ve střevním traktu výkonným detoxifikačním systémem založeným na aktivitě enzymů monoaminoxidázy, diaminoxidázy a histidinmethyltransferázy. Avšak při nadměrném příjmu BA potravou detoxikační kapacita tohoto systému nemusí být dostačující. Při překročení metabolizovatelné koncentrace BA přijaté potravou se uvolní adrenalin a noradrenalin, může dojít ke stimulaci sekrece žaludeční kyseliny, k zvýšení srdečního rytmu, migréně, tachykardii, ke zvýšení hladiny cukru v krvi a změně krevního tlaku. Například toxicita histaminu způsobuje vazodilataci cév a snížení krevního tlaku (typické pro otravu z ryb, scombroid poisoning). Intoxikace tyraminem má pro změnu za následek zmiňovanou

migrénu a hypertenzní krizi, tzv. reakci na sýr (cheese reaction). Tato reakce se vyskytuje zejména u pacientů užívajících antidepresiva nebo trpící Parkinsonovou chorobou, schizofrenií [1, s. 692], [28, s. 123].

Zmíněná intoxikace se zvyšuje současně s požíváním alkoholu a potravin obsahujících jiné BA, jako diaminy a polyaminy. Sekundární aminy jako putrescin a kadaverin mohou také reagovat s dusitany za vzniku karcinogenních nitrozaminů. U skupiny polyaminů (sperminu, spermidinu) a diaminu kadaverinu byly však za určitých okolností pozorovány i jejich příznivé účinky jako je podpora regenerace a hojení tkání [1, s. 692], [3].

Do roku 2004 byly v české legislativě definovány přípustné koncentrace BA vyskytujících se v rybách, sýrech, pivu a vínu. Dnes se v potravinách a nápojích stanovují především koncentrace histaminu a tyraminu. Podle Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny je maximální přípustná hodnota histaminu přítomného v rybím mase 100 mg/kg. Pro masné výrobky byla doporučena horní hranice výskytu histaminu v potravinách 100 – 200 mg/kg. U alkoholických nápojů je přípustná koncentrace histaminu 2 mg/l. Přijatelná hodnota množství tyraminu v potravinách není přesně stanovena a pohybuje se v rozmezí 100 – 800 mg/kg. Výjimkou jsou sýry, u kterých je nejvyšší přípustná koncentrace tyraminu 200 mg/kg. Z alkoholických nápojů má nejvyšší koncentraci tyraminu pivo, příp. i víno. Proto by se osoby s narušeným detoxikačním systémem (např. díky užívání léků inhibující monoaminoxidázy), měli mít při konzumaci těchto alkoholických nápojů na pozoru, jelikož tyramin v množství 6 mg/l může u těchto jedinců zapříčinit intoxikaci [3], [5, s. 72], [35, s. 418].

Příjem histaminu v množství 10 mg je považován za únosný, avšak u citlivých osob pozření 5 – 10 mg histaminu může vyvolat nežádoucí účinky. Středních toxických účinků nabývá histamin při příjmu 100 mg, při příjmu 1000 mg je histamin vysoce toxický. Nutné je ovšem dodat, že důležitá je individuální citlivost k BA. Obzvláště u dětí se projevují příznaky již při hodnotách 50 mg ve 100 g potraviny [5, s. 72, 73], [26].

### 3 MIKROORGANIZMY PRODUKUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY

Jak již bylo zmíněno, BA mohou vzniknout díky mikrobiální aktivitě mikroorganismů resp. při mikrobiální dekarboxylaci aminokyselin. Schopnost syntézy BA mají některé grampozitivní a některé gramnegativní bakterie odlišných rodů i druhů (viz Tab. 2). Bakteriální dekarboxylázová aktivita je díky tomu spíše považován za kmenovou charakteristiku [1, s. 693], [20].

Například mezi gramnegativní bakterie produkující konkrétně histamin patří např. *Hafnia alvei*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Serratia* spp. Produkce putrescinu a kadaverinu je připsána enterobakteriím [1, s. 693].

Při výrobě sýrů se uplatňují grampozitivní bakterie, bakterie mléčného kvašení produkující především histamin a tyramin. Rody *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Streptococcus* jsou schopny produkovat BA. Mohou být přítomny v přirozeně se vyskytující mléčné mikroflóře, nebo představovat kontaminaci, která se do mléčných výrobků či mléka dostala před, v průběhu nebo po jeho zpracování na výrobek. Pokud nebyly kultury před použitím kontrolovány na dekarboxylázovou aktivitu, mohou být produkční kmeny dokonce součástí startérových kultur [1, s. 693].

Tab. 2. Přehled vybraných mikroorganismů syntetizující příslušné biogenní aminy [2, s. 220, 221], [7, s. 388 – 393], [8, s. 11 – 13]

| Produkce BA | Mikroorganismus   |  |
|-------------|---|--|
|             | grampozitivní   | gramnegativní  |
| histamin    | <i>Lactobacillus buchneri</i><br><i>Lactobacillus fermentum</i><br><i>Lactobacillus hilgardii</i><br><i>Lactobacillus curvatus</i><br><i>Lactococcus lactis</i><br><i>Oenococcus oeni</i><br><i>Tetragenococcus</i> | <i>Morganella morganii</i><br><i>Photobacterium phosphoreum</i><br><i>Photobacterium psychrotolerans</i><br><i>Hafnia alvei</i>  |
| tyramin     | <i>Lactobacillus curvatus</i><br><i>Enterococcus faecalis</i><br><i>Enterococcus faecium</i><br><i>Lactococcus</i><br><i>Leuconostoc</i>  | <i>Pseudomonas</i><br><i>Proteus</i>   |
| kadaverin   | <i>Bacillus halodurans</i><br><i>Bacillus subtilis</i><br><i>Clostridium Acetobutylicum</i><br><i>Listeria monocytogenes</i><br><i>Staphylococcus aureus</i>  | čeleď <i>Enterobacteriaceae</i><br>( <i>Escherichia coli</i> , <i>Hafnia alvei</i> ,<br><i>Salmonella enterica</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Shigella flexneri</i> )<br><i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Vibrio cholerae</i><br><i>Vibrio parahaemolyticus</i> |

Pokračování Tab. 2.

| Produkce BA | Mikroorganismus  |   |
|-------------|--|---|
|             | grampozitivní  | gramnegativní   |
| putrescin   | <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp.<br><i>curvatus</i><br><i>Lactobacillus helveticus</i><br><i>Enterococcus durans</i><br><i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Escherichia coli</i><br><i>Haemophilus influenza</i><br><i>Salmonella typhimurium</i><br><i>Vibrio cholerae</i><br><i>Vibrio parahaemolyticus</i><br><i>Shigella flexneri</i><br><i>Enterobacter cloacae</i> |

### 3.1 Bakterie mléčného kvašení

Tato skupina grampozitivních bakterií nese název podle produktu -kyseliny mléčné, který vzniká jejich působením v anaerobním prostředí při zkvašování cukrů (případně i dalších látek). Z taxonomického hlediska se jedná o různé rody bakterií, které mohou být fylogeneticky příbuzné. Výskyt bakterií BMK je obvykle spojen s přítomností substrátu bohatého na živiny, a proto je možné BMK najít v syrovém mléce, mase, ovoci a zelenině, ve fermentovaných potravinách, ale také v orgánech živočichů [11, s. 53], [31, s. 153], [36, s. 691].

Zástupci BMK, zejména *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, jsou schopni při svém růstu produkovat značné množství putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu. Tito zástupci spolu s bifidobakteriemi (viz dále) patří mezi nejužívanější probiotika [31, s. 156], [38, s. IV], [39, s. 87].

Někteří autoři řadí bifidobakterie mezi BMK, přestože s touto skupinou po stránce fylogenetického vývoje až tak dalece nesouvisí. Bifidobakterie jsou taktéž grampozitivní mikroorganismy mající probiotickou schopnost. Tento rod zahrnuje 30 druhů příslušných mikroorganismů, přičemž probiotické účinky jsou prokázány u druhů *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium longum* [36, s. 609].

#### 3.1.1 Rod *Lactobacillus*

Laktobacily jsou grampozitivní, nesporulující, mikroaerofilní bakterie, které mají tvar tyčinek nebo kokotýčinek. Pro jejich optimální růst je vhodná teplota 30 až 40 °C a pH v rozmezí 5,5 až 6,2, přičemž někteří zástupci vyžadují přítomnost kyslíku (fakultativně anaerobní mikroorganismy),



nebo koncentraci kyslíku v minimálním množství (mikroaerofilní mikroorganismy), případně vyžadují striktně anaerobní podmínky. Tyto mikroorganismy se vyskytují téměř ve všech prostředích, kde jsou k dispozici sacharidy, a to jak v potravinách (mléčné výrobky, zelenina, ovoce, nápoje, atd.), tak i v dýchacím, trávicím a pohlavním ústrojí savců [31, s. 155 – 157], [36, s. 595, 596].

Na syntéze BA se podílí celá škála zástupců z řad laktobacilů. Např. ve fermentovaných potravinách jsou schopny produkovat histamin *Lactobacillus saerimneri*, *L. hilgardii*, *L. buchnerii* a *L. curvatus*. Mezi producenty tyraminu je možné zařadit *L. curvatus* a *L. brevis*, přičemž *L. brevis* se spolu s *L. hilgardii* a *L. plantarum* se podílí na zkvašování piva či vína [8, s. 12 – 14].

Laktobacily obecně působí blahodárně na naše zdraví. Podporují trávení, vstřebávání, dostupnost živin. Podílí se také na syntéze vitamínů skupiny B (B2, kyseliny listové a B12), snižují intoleranci laktózy. Některé kmeny jsou schopny degradovat sacharidy (laktózu nebo  $\alpha$ -galaktosidy), které mohou v jistých případech způsobit bolest břicha, dále mohou hydrolyzovat sloučeniny a tím zlepšit absorpci minerálních látek do buněk. Laktobacily se nejvíce podílí na stimulaci imunitního systému a na prevenci vzniku možných onemocnění např. zánětlivého onemocnění střev, průjemového onemocnění, atd. [39, s. 87].

Kromě blahodárných účinků mohou mít laktobacily i nežádoucí vlastnosti. Jedná se o rezistenci vůči určitým antibiotikům a to, že při nízkém pH (pH 2-3) mohou mít (pokud je u nich deklarován dieteticko léčebný účinek) omezený probiotický účinek. Laktobacily jsou mimo jiné řazeny mezi pивní kontaminanty (viz kapitola 2.1.2) [39, s. 88].

### **3.1.2 Další grampozitivní bakterie s dekarboxylázovou aktivitou patřící mezi bakterie mléčného kvašení**

Do této skupiny je možné zahrnout grampozitivní fakultativně anaerobní bakterie z rodu *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* [39, s. 87], [8, s. 12 – 14].

Ve fermentovaných potravinách a nápojích je za vznik histaminu zodpovědný *Pediococcus parvalus*, *Pediococcus damnosus*, *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*. Při výrobě sýrů a fermentovaných masných výrobků dochází díky *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* ke vzniku tyraminu. Zástupci enterokoků a stafylokoků jsou schopny syntetizovat kromě tyraminu také fenylethylamin [8, s. 12 – 14].

### 1) Rod *Streptococcus*

Tento rod zahrnuje asi 67 druhů. Optimální podmínky pro růst zástupců tohoto rodu jsou průměrně při teplotě 37 °C (25 – 45 °C, při teplotě 10 °C je jejich růst značně inhibován) a mohou být patogenní, saprofytické a parazitické. Avšak významnou roli má *Streptococcus thermophilus*, který postupem času ztratil své patogenní vlastnosti a využívá se jako vhodná startérová kultura při výrobě fermentovaných výrobků, např. jogurtů [31, s. 154], [39, s. 88, 91].

### 2) Rod *Lactococcus*

Rod zahrnující 6 druhů, z nichž největší uplatnění z hlediska fermentační výroby má *Lactococcus lactis*, který se přirozeně nachází v mléce, mléčných výrobcích, v potravinách. Optimální teplota pro jejich růst je 37 °C (jsou schopny růst i při 10 °C), k inhibici růstu dochází při 6,5 % koncentraci NaCl [31, s. 153, 154].

### 3) Rod *Enterococcus*

Jedná se o poměrně odolné organizmy schopné růstu jak při 10 °C, tak při 45 °C i v přítomnosti 6,5 % koncentrace NaCl a hodnotě pH 9,6. Zcela běžně se vyskytují v půdě, vodě, rostlinách a trávicím traktu některých savců. Hlavním fermentačním produktem je kyselina mléčná, avšak bez vznikajícího CO<sub>2</sub> [9, s. 55, 483].

Charakteristickými zástupci toho rodu jsou *Enterococcus durans*, který je běžnou součástí životního prostředí a také mléčných potravin, dále *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* – přirozeně se vyskytují ve střevech člověka a zvířat a jsou indikátory fekálního znečištění vod [31, s. 158], [37, s. 612 - 615].

### 4) Rod *Pediococcus*

Při zkvašování sacharidů, obdobně jako u rodu *Enterococcus*, vzniká pouze kyselina mléčná. Optimální teplota růstu je v rozmezí 25 až 40 °C. Vyskytují se hojně na rostlinném materiálu, v potravinách i nápojích. Zástupce je např. *Pediococcus damnosus*, jehož výskyt je spojen s výrobou piva, vína a moštu [37, s. 615 - 618].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 ÚVOD DO PROBLEMATIKY

Biogenní aminy (BA) jsou běžně se vyskytující dusíkaté sloučeniny, které můžeme najít v živých organizmech, kde se podílejí na celé řadě metabolických dějů. Dále se běžně vyskytují v potravinách či alkoholických nápojích, které byly zfermentovány příslušnými mikroorganismy za určitých podmínek, a to při vhodném pH, teplotě, přístupu kyslíku, koncentraci živin, koncentraci soli, koncentraci alkoholu, atd. Avšak při nesprávném regulování těchto podmínek, nebo i při nevhodném technologickém postupu, může dojít k překročení limitních hodnot BA v potravinách či nápojích, následně k mikrobiální kontaminaci, což může mít negativní dopad na zdraví konzumenta.

V této práci byl sledován *Lactobacillus brevis*, který je spojován s kontaminací piva.

Právě zástupci BMK rodu *Lactobacillus* a rodu *Pediococcus* jsou zařazeny mezi mikroorganismy nejvíce narušující mikrobiologickou stabilitu piva. Tyto bakterie jsou totiž rezistentní vůči antimikrobiálním účinkům hořkých chmelových látek [29, s. 336, 337].

Růst bakterií v pivě je možný v rozmezí pH 4,0 – 5,0 a při vyvážené koncentraci využitelných živin. Pro získání výsledků experimentu bylo nutné zajistit takové kultivační podmínky, aby byly co nejvíce identické s podmínkami běžné výroby piva. Proto bylo pH v bakteriální suspenzi upraveno na hodnotu 4,5 a koncentrace etanolu byla nulová, tříprocentní a šestiprocentní. Hodnoty pH a koncentrace etanolu u českých piv určených ke konzumaci tak odpovídaly normě podle Nařízení Rady (ES) č. 510/2006 [30], [36, s. 387].

## 5 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bylo vytvořit literární rešerši zabývající se problematikou BA. Tyto dusíkaté sloučeniny jsou v poslední době spojovány s kontaminací potravin či nápojů, s intoxikací a následným negativním dopadem na lidské zdraví. Za tímto účelem byla přiblížena charakteristika BA nejen z hlediska chemické struktury, jejich vzniku (procesem dekarboxylace), ale byly popsány i vlivy vnějších faktorů ovlivňující produkci BA u vybraných mikroorganismů. Dále se tato práce zabývala problematikou identifikace mikroorganismů produkujících BA. Pozornost byla zaměřena na bakterie, které se účastní fermentačních procesů ať už jako startéry, non-startéry nebo kontaminanty. BA, které jsou někteří zástupci výše zmíněných skupin mikroorganismů schopny vyprodukovat, jsou nezbytné pro živé organismy, avšak v množství překračující tolerovatelné hodnoty pro jednotlivé BA působí toxicky.

Cílem praktické části této bakalářské práce bylo sledovat kinetiku produkce BA v pivě při různých koncentracích etanolu bakterií mléčného kvašení, která je označována za častou kontaminantu piva.

Testovaným mikroorganismem byl *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69, a to za těchto podmínek:

- kulturační teplota 30 °C;
- upravené pH na hodnotu 4,5;
- 0; 3 a 6 % (v/v) koncentrace etanolu.

Pro získání výsledků bylo nutné nejdříve provést derivatizaci vzorku, separaci dansylderivátů pomocí RP-HPLC s následnou detekcí produkce BA pomocí UV při vlnové délce 254 nm. Na základě výsledků získaných během experimentu byl zformulován závěr, kde byla zhodnocena produkce BA kmene *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69 za sledovaných podmínek.

## 6 MATERIÁL A METODIKA

### 6.1 Bakteriální kultura

V experimentální části byla sledována kinetika produkce BA v pivě při různých koncentracích etanolu u mikroorganismu *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69 ze Sbírký pivovarských mikroorganismů (RIBM) Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., v Praze.

#### 6.1.1 Příprava média

*Lactobacillus brevis* RIBM 2-69 byl kultivován v médiu *Lactobacillus* MRS Broth (HiMedia, Mumbai, Indie), do kterého byly přidány aminokyseliny jako prekurzory testovaných BA, konkrétně tyrozin, arginin, ornitin, histidin, lyzin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Každá aminokyselina byla přidávána v koncentraci 0,2 % (w/v). Do suplementovaného sterilního MRS bujónu byl přidán etanol (96% jemný potravinářský líh) v koncentraci 0; 3 a 6 % (v/v). Vliv koncentrace etanolu na produkci BA byl proveden v trojím opakování pro každou koncentraci. Stejným způsobem byla u každé koncentrace připravena kontrola (slepý vzorek nezaočkovaný bakteriální suspenzí sledovaného kmene).

#### 6.1.2 Kultivační médium

Médium: *Lactobacillus* MRS broth

Složení kultivačního média je následující (viz **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**):

Tab. 3. Složení kultivačního média

| Ingredience                  | Množství  |
|------------------------------|-----------|
| Pepton                       | 10,00 g/l |
| Masový extrakt               | 10,00 g/l |
| Kvasniční extrakt            | 5,00 g/l  |
| Dextróza                     | 20,00 g/l |
| Hydrogenfosforečnan draselný | 2,00 g/l  |
| Tween 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  |

Příprava půdy: Bylo naváženo 55,15 g média *Lactobacillus* MRS Broth. K navážce bylo přidáno 5 aminokyselin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) - tyrozin, arginin, ornitin, histidin a lyzin - každá v koncentraci 0,2 % (w/v). Vše bylo rozpuštěno v 1000 ml vody. Následně byla provedena úprava pH na hodnotu 4,5 pomocí 0,1M HCl a byla uskutečněna sterilace (Varioklav, Steam Sterilizers, H+P Labortechnik, Oberschleissheim, Germany) při teplotě 121°C po dobu 15 minut. Do sterilního média před zaočkováním zkoušenou kulturou byl přidán etanol v koncentraci 0; 3 a 6 % (v/v).

### **6.1.3 Příprava bakteriální suspenze**

Příprava inokula byla provedena pomnožením vyizolované kolonie bakterií v prostředí podobném dekarboxylačnímu médiu bez přídavku etanolu (bujón s přídavkem všech 5 aminokyselin v koncentraci 0,2 % (w/v)) po dobu 24 hodin při optimální teplotě pro danou kulturu ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Následně byl bujón o objemu 3 ml zaočkován vždy 25  $\mu\text{l}$  inokula bakterií narostlých přes noc.

### **6.1.4 Kinetika produkce biogenních aminů**

Vzorky byly odebírány v časech 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 30, 34 a 48 hod od zaočkování (čas 0). Současně se vzorky (každý vzorek v trojím opakování pro jednotlivou koncentraci etanolu) byly kultivovány i kontroly (nezaočkované zkumavky).

## **6.2 Průběh experimentu a stanovení biogenních aminů**

Bujón po kultivaci testovaných mikroorganismů byl centrifugován ( $3\,421 \times g$ ;  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 20 minut; odstředivka EBA 20, Hettich UK) a získaný supernatant byl zředěn 1,2 M kyselinou chloristou (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) v poměru 1:1 (v/v). Okyselená směs byla filtrována (velikost pórů 0,45  $\mu\text{m}$ ). Vzniklý filtrát byl podroben derivatizaci.

Produkce BA (tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu a kadaverinu) byla stanovována pomocí kapalinové chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC), kde byl jako interní standard použit 1,7-heptanediamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) o objemu 100  $\mu\text{l}$  a koncentraci 500 mg/l. Následně byl přidán 1 ml kyselého hydrolyzátu supernatantu, 1,5 ml uhličitanového pufru a 2 ml dansylchloridu o koncentraci 5 g/l. Tato směs byla třepána v temnu po dobu 20 hodin. Poté bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  roztoku prolinu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) o koncentraci 100 g/l. Tím byla derivatizační reakce pozastavena. Danzylderiváty byly podrobeny extrakci, byly vytřepány do heptanu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) o objemu 3 ml. Heptanová vrstva byla odebrána v objemu 1 ml a následně odpařena pod dusíkem při  $60 \pm 2^\circ\text{C}$ . Získaný odparek byl rozpuštěn v acetonitrilu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) o objemu 1,5 ml.

Derivatizované vzorky byly filtrovány (porozita 0,22  $\mu\text{m}$ ) a nanášeny na kolonu (kolona Zorbax RRHD C18 s rozměry 50 mm x 3,0 mm a velikostí částic 1,8  $\mu\text{m}$ , Cogent USA; termostat kolony Agilent 1260 Infinity, UV/VIS DAD detektor Agilent 1200, Agilent Technologies, USA; binární pumpa a autosampler LabAlliance, USA) s UV detekcí ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ). Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,45 ml/min. Program gradientové eluce je znázorněn v Tab. 4. Analýza probíhala při teplotě 30 °C.

Každý vzorek (včetně kontrol, n = 4; v každém odběrovém čase pro každou koncentraci etanolu n=144) byl derivatizován dvakrát a derivatizovaná směs byla na kolonu nanášena ve dvojnásobném opakování (n=576). Výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru Clarity.

*Tab. 4. Program gradientové eluce*

| Čas [min] | Koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi[%] |                        |
|-----------|--|------------------------|
|           | 10% (v/v) acetonitril                      | 100% (v/v) acetonitril |
| 0,0       | 39   | 61                     |
| 0,1       | 39   | 61                     |
| 1,4       | 30   | 70                     |
| 3,5       | 17   | 83                     |
| 4,0       | 0  | 100                    |
| 9,5       | 0  | 100                    |
| 11,5      | 39   | 61                     |
| 15,5      | 39   | 61                     |



## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

U kmene *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69 byl sledován vliv faktorů ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu. Sledovaný mikroorganismus byl kultivován v médiu obohaceném o aminokyseliny, které slouží jako prekurzory testovaných BA. Přidány byly aminokyseliny tyrozin, arginin, ornitin, histidin, lyzin, každá v koncentraci 0,2 % (w/v). U zkoumaného mikroorganismu byl pozorován účinek 0; 3 a 6 % (v/v) koncentrace etanolu, přičemž kultivační teplota byla 30 °C a pH bylo upraveno na hodnotu 4,5, která odpovídá pH v pivě [30].

### 7.1 Vliv koncentrace etanolu na kinetiku produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69 růstovém prostředí

Za různě upravených podmínek *in vitro* byla u kmene *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69 monitorována kinetika produkce BA, konkrétně tyraminu.

Obecně lze označit druh *Lactobacillus brevis* za kontaminantu, která je schopna narušit mikrobiologickou stabilitu piva. Znehodnocení piva tímto kmenem je dáno zejména jeho schopností odolat několika stresovým faktorům, jako koncentraci alkoholu, hořkým chmelovým látkám, přetlaku CO<sub>2</sub> a SO<sub>2</sub>. Zvýšená koncentrace hořkých chmelových látek je příčinou snížení specifické růstové rychlosti a prodloužením lag-fáze [29, s. 341].

Laktobacily jsou mezofilní mikroorganismy mající dekarboxylázovou aktivitu a k jejich růstu je ideální teplota mezi 20 °C a 37 °C. Teplota, při které byl pokus uskutečňován, byla 30 ± 1 °C a nachází se tedy ve výše uvedeném rozmezí. Bylo upraveno pH na hodnotu pH 4,5, které je optimální pro činnost dekarboxyláz [9, s. 44].

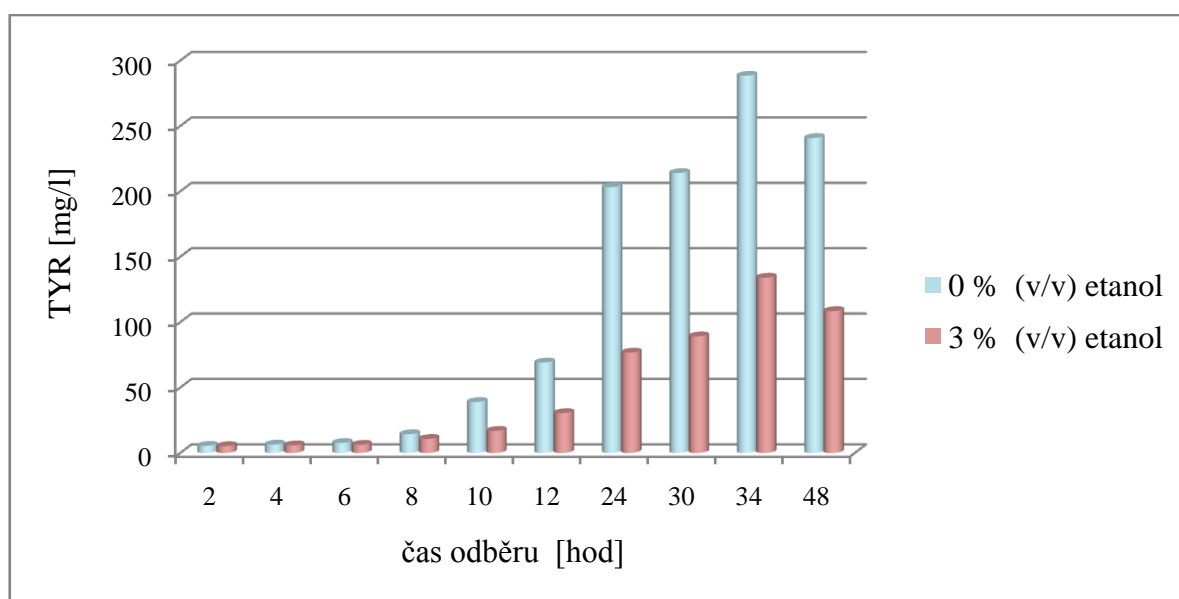
Optimální podmínky vedou nejen k růstu většiny mikroorganismů, ale také k produkci a aktivitě jejich enzymů. Naopak vliv etanolu může mít baktericidní (mikrobicidní) účinky [2, s. 219], [8, s. 14], [9, s. 44], [12, s. 168, 169].

Při 0; 3 a 6% (v/v) koncentraci etanolu, pH odpovídající hodnotě 4,5 a při inkubační teplotě 30 ± 1 °C byla u testovaného kmene zjištěna schopnost produkce detekovatelných množství tyraminu (TYR), histaminu a kadaverdinu. V bakalářské práci jsou zpracovány pro účely sledování kinetiky pouze výsledky produkce TYR, jelikož právě TYR (jako jediný z přítomných BA) byl produkován v koncentraci vyšší než 2 mg/l.

Vliv 0; 3 a 6% (v/v) koncentrace etanolu na produkci TYR je graficky znázorněn na Obr. 8.

Nejprudší rozvoj dekarboxylázové aktivity byl zaznamenán v kultivačním prostředí bez přítomnosti etanolu (viz Obr. 6 – 8). Zde došlo také k nejvyšší produkci TYR daným mikroorganizmem, přičemž maximální množství TYR bylo zaregistrováno po uplynutí 34 hod od zaočkování, a to 288,411 mg/l. V tomto médiu začala být tyrozindekarboxyláza nejvíce aktivní po 8 hod od zaočkování. Do té doby (do šesté hodiny kultivace) *Lactobacillus brevis* setrval zřejmě v lag-fázi a přizpůsoboval se růstovým podmínkám. Během doby lag-fáze byl TYR v médiu s 0% (v/v) koncentrací etanolu produkován v rozmezí 5,488 – 7,670 mg/l.

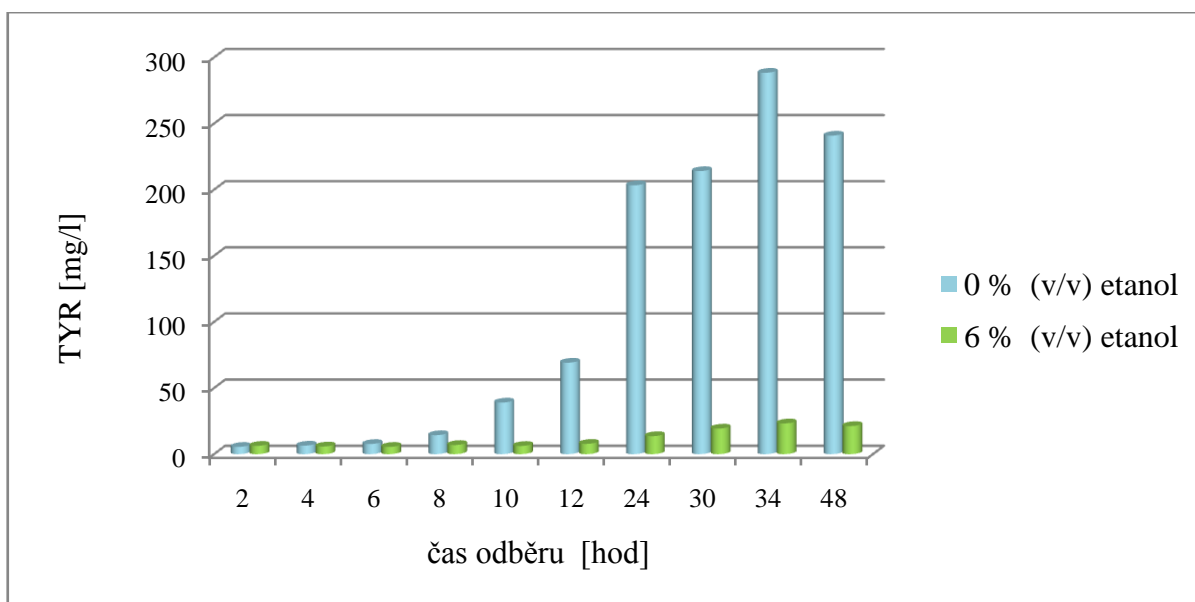
Obdobný poznatek byl zjištěn i při použití 3% (v/v) koncentrace etanolu v médiu (viz Obr. 6), kdy doba lag-fáze probíhala do 8. hodiny od zaočkování. V lag-fázi se zvýšila koncentrace TYR z 3 mg/l na 6,251 mg/l. Nejvyšší množství TYR v tomto médiu bylo taktéž vyprodukováno po uplynutí 34 hod od zaočkování, konkrétně 134,029 mg/l. Tříprocentní koncentrace etanolu prokázala inhibiční účinek na aktivitu příslušné dekarboxylázy, tím pádem produkce TYR nedosahovala takového množství jako v médiu s 0% (v/v) koncentrací etanolu.



Obr. 6. Kinetika produkce TYR kmenem *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69 při 0 a 3 % (v/v) koncentraci etanolu v růstovém prostředí

V médiu s 6% (v/v) koncentrací etanolu (viz Obr. 7) došlo k prodloužení doby lag-fáze a dekarboxyláza byla více aktivní až po 12. hod od zaočkování. Během této doby byl TYR produkován v množství 6,280 mg/l až 7,804 mg/l. Hodnota 23,229 mg/l v čase 34 hod

od zaočkování odpovídá nejvyšší koncentraci TYR v tomto médiu. Působením 6% (v/v) koncentrace etanolu v médiu je množství TYR nejnižší při porovnání s nulovou a tříprocentní koncentrací etanolu. Kmen *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69 produkoval při 6% (v/v) koncentraci etanolu nejnižší množství TYR a jeho dekarboxylázová aktivita byla nejnižší. Logicky lze odvodit, že přídavek zemědělského lihu inhiboval růst a tím pádem i produkce biogenního aminu.



Obr. 7. Kinetika produkce TYR kmenem *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69 při 0 a 6% (v/v) koncentraci etanolu v růstovém prostředí

Inhibiční účinek byl taktéž prokázán na produkci BA kadaverdinu a histaminu, jelikož tyto BA byly detekovány jen v médiu neobsahující alkohol. Při nulové koncentraci etanolu bylo nejvíce vyprodukováno kadaverdinu v čase 48 hod od zaočkování, a to 0,490 mg/l (nepublikovaná data). V čase 34 hod od zaočkování byla v médiu neobsahující etanol zaznamenána nejvyšší koncentrace histaminu o hodnotě 0,5973 mg/l (nepublikovaná data).

Na základě získaných výsledků u analyzovaného kmene *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69 lze konstatovat, že s rostoucí koncentrací přidaného etanolu byla jeho dekarboxylázová aktivita nižší a byla potlačena produkce BA tyraminu. S vyšší koncentrací etanolu je také spojena delší doba lag-fáze příslušného mikroorganismu.

Dalším faktorem, který prodlužuje lag-fázi a produkci BA je přítomnost hořkých chmelových látek, jak publikuje Matoulková et al. (2012) ve své studii [29, s. 341.] Přídavek pryskyřic v podobě

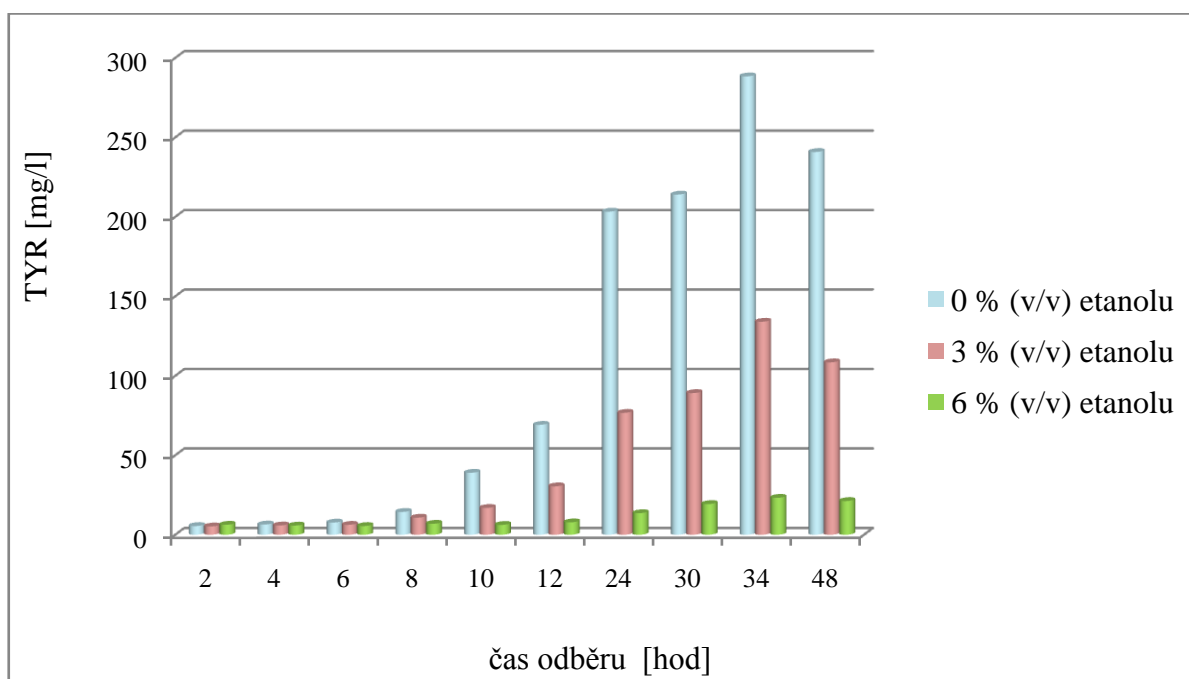
chmelových extraktů bude možným pokračováním tohoto experimentu, kdy bude sledován konkrétní vliv na vybraný kmen *Lactobacillus brevis*.

Uvážíme-li efekt přidavku inhibičních látek, do jisté míry je možné zamezit potenciální kontaminaci piva způsobené laktobacily, nebo omezit jejich rozvoj a předejít intoxikaci způsobené nadměrným příjmem BA.

Při konzumaci potravin či nápojů se zvýšeným obsahem přítomných BA převyšující limitní hodnoty (viz kapitola 2.2.2) mohou být u konzumenta vyvolány negativní zdravotní následky, jako jsou např. hypertenze, migréna či alergické reakce. Pro senzitivní jedince je doporučena maximální koncentrace TYR v pivě 6 mg/l [5, s. 72, 73].

Kromě množství BA, mají důležitou roli v pivě i koncentrace etanolu. Samotný rozsah zdravotních následků závisí také na vlastním detoxikačním systému jedince, na synergickém účinku především alkoholických nápojů a léků [28, s. 123, 124], [31, s. 156].

Detoxikační systém jedince je založen na aktivitě enzymů monoaminoxidázy, diaminoxidázy a histidinmethyltransferázy. Pokud konzument neužívá léky narušující aktivitu monoaminoxidáz, nekonzumuje potraviny s vysokým obsahem BA (např. pivo, sýr), nehrozí u něj intoxikace [8 s. 17], [28, s. 123, 124].



Obr. 8. Kinetika produkce TYR kmenem *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69 při 0; 3 a 6% (v/v) koncentraci etanolu v růstovém prostředí

## 8 ZÁVĚR

V této práci bylo pojednáno o biogenních aminech a vnějších faktorech působících na dekarboxylázovou aktivitu grampozitivních bakterií. Za různě upravených podmínek *in vitro* byla sledována kinetika produkce biogenních aminů u kmene *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69 ze Sbírký pivovarských mikroorganismů (RIBM) Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., v Praze.

Na základě výsledků praktické části lze formulovat následující závěry:

- Testovaný kmen *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69 byl schopen detekovatelné produkce tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu a kadaverinu.
- Tyramin byl produkován nejhojněji (maximální produkce v médiu bez etanolu dosáhla koncentrace až 284,298 mg/l), proto byla u něj sledována kinetika produkce.
- Dekarboxylázová aktivita u *Lactobacillus brevis* RIBM 2-69 byla prokazatelně potlačována rostoucí koncentrací přidaného etanolu bez ohledu na ostatní (dekarboxylázovou aktivitu podporující) podmínky.
- Doporučená koncentrace tyraminu v pivu je 6 mg/l, přičemž potraviny a nápoje obsahující tyramin je možné konzumovat v množství 100 – 800 mg/den, aniž by došlo k intoxikaci.
- Obsah etanolu v pivě (podle Nařízení rady (ES) č. 510/2006) se pohybuje v rozmezí 2,6 – 6,0 %.
- Koncentrace tyraminu při působení 3% (v/v) koncentrace etanolu dosahuje hodnoty až 130,274 mg/l a při působení 6% (v/v) koncentrace etanolu je zaznamenána nejvyšší koncentrace tyraminu odpovídající 20,133 mg/l.
- S rostoucí koncentrací etanolu byla inhibována dekarboxylázová aktiva příslušného mikroorganismu. Omezenou produkcí v přítomnosti etanolu je sníženo případné zdravotní riziko plynoucí z nadměrné konzumace biogenních aminů.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] LINARES, D. M., MARTÍN, M. C., LADERO, V., ALVAREZ, M. A., FERNÁNDEZ, M. Biogenic Amines in Dairy Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011, vol. 51, iss. 7, p. 691-703. ISSN: 1040-8398
- [2] SILLA-SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, vol. 29, iss. 2-3, p. 213-231. ISSN: 0168-1605
- [3] STANDAROVÁ, E., L. VORLOVÁ a I. BORKOVCOVÁ. Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě. *Vetweb zpravodaj časopisů Veterinářství a Veterinární klinika* [online]. 2008, č. 58, s. 735-739 [cit. 2013-02-07]. Dostupné z: [http://www.vetweb.cz/informace-z-oboru/hygiena-technologie/Obsah-biogennich-aminu-v-syrech-z-ceske-obchodni-site\\_\\_s1496x53853.html](http://www.vetweb.cz/informace-z-oboru/hygiena-technologie/Obsah-biogennich-aminu-v-syrech-z-ceske-obchodni-site__s1496x53853.html)
- [4] ÖNAL, A. Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. 2007, vol. 103, iss. 4, p. 1475–1486.
- [5] KARAVIČOVÁ, J. KOHAJDOVÁ Z. Biogenic Amines in Food. *Chemical Paper*. 2003, vol. 59, iss. 1, p. 70-79.
- [6] FADDA, S., VIGNOLO, G., OLIVER, G. Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and *Kocuria* strains. *Biotechnology Letters*. 2001, vol. 23, p. 2015 – 2019
- [7] ÖZOGUL, F., ÖZOGUL, Y., The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures, *European Food Research and Technology*. 2007, vol. 225, p. 385 - 394.
- [8] European Food Safety Authority (EFSA), Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* 2011; vol. 9, iss.10, p. 93.
- [9] JAY, A. M., LOESSNER, M. J., GOLDEN, D. A. Intrinsic and Extrinsic Parameters of Foods That Affect Microbial Growth. *Modern Food Microbiology, Seventh edition*. 2005, p. 790. ISSN: 0-387-23180-3
- [10] LORENCOVÁ, E., BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., ŽOUŽLKOVÁ, N., DRÁB, V., KUBÁŇ, V. Produkce biogenních aminů vybranými bakteriemi mléčného kvašení, Konference Mléko a sýry pořádané VŠCHT; Praha (23. – 24. 1. 2012), s. 149 – 154. ISBN: 978-80-70-80-832-2

- [11] Cepac. *Obecná mikrobiologie* [online]. [cit. 2013-02-21]. Dostupné z: [http://utb-files.cepac.cz/moduly/M0023\\_obecna\\_mikrobiologie/distancni\\_text\\_II/modul.xml#](http://utb-files.cepac.cz/moduly/M0023_obecna_mikrobiologie/distancni_text_II/modul.xml#)
- [12] PROVAZNÍK, K. *Manuál prevence v lékařské praxi, souborné vydání*. Praha: Státní zdravotní ústav, 2003, 2004, 730 s. ISBN: 80-7168-942-4
- [13] G-ALEGRÍA, E., LÓPEZ, I. RUIZ J., I., SÁENZ, J., FERNÁNDEZ, E., ZARAZAGA, M., DIZY, M., TORRES, C., RUIZ-LARREA, F. High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oenistrains* to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiology Letters*. 2004, vol. 230, iss. 1, p. 53 – 61. [online]. [cit. 2013-05-01]. Dostupné z: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/S0378-1097\(03\)00854-1/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/S0378-1097(03)00854-1/full)
- [14] CASADEI, M. A., INGRAM, R., HITCHINGS, E., ARCHER, J., GAZE, J. E. Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 63, iss. 1 – 2, p. 125 – 134. [online]. [cit. 2013-05-01]. Dostupné z <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160500004657>
- [15] MACHÁČKOVÁ, M. Vodní aktivita a růst mikroorganismů, Agronavigátor. 2004. [online]. [cit. 2013-04-02]. Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=15&typ=1&val=29259&ids=0STEINHAUSEROVÁ,I,>
- [16] CoJeCo. *Aktivita vody* [online]. 30. 9. 2008. [cit. 2013-05-10]. Dostupné z: [http://www.cojeco.cz/index.php?detail=1&s\\_lang=2&id\\_desc=394300](http://www.cojeco.cz/index.php?detail=1&s_lang=2&id_desc=394300)
- [17] KOMPRDA, T., BURDYCHOVÁ, R., DOHNAL, V., CWIKOVÁ, O., SLÁDKOVÁ, P., Some factors influencing biogenic amines and polyamines kontent in Dutch-type semi-hard cheese. *European Food Research and Technology*. 2008, vol. 227, p. 29-36. ISSN: 1438-2377
- [18] SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health, *Food Research International*. 1996, Vol. 29, iss. 7, p. 675-690.
- [19] 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, s. 432-437.
- [20] KOLÁŘOVÁ, M. *ChemPoint. Biogenní aminy* [online]. 2012, [cit. 2013-02-18]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/biogenni-aminy>

- [21] 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, s. 372-380
- [22] KAPRÁLEK, F. *Základy bakteriologie*. Praha: Karolinum, 2000, s. 241. ISBN 80-7184-811-5.
- [23] CoJeCo. *Kvašení* [online]. 13. 1. 2004. [cit. 2013-02-18]. Dostupné z: [http://www.cojeco.cz/index.php?detail=1&id\\_desc=50812&s\\_lang=2&title=kva%9Aen%E D](http://www.cojeco.cz/index.php?detail=1&id_desc=50812&s_lang=2&title=kva%9Aen%E D)
- [24] O'MAHONY, F. ILCA Manual. *Milk Processing* [online]. 1988, No. 4. [cit. 2013-02-18]. Dostupné z: [http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/fulldocs/ilca\\_manual4/MilkProcessing.htm#P20\\_2227](http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/fulldocs/ilca_manual4/MilkProcessing.htm#P20_2227)
- [25] PESSIONE, A., LAMBERTI, C., PESSIONE, E. Proteomics as a tool for studying energy metabolism in lactic acid bacteria. *Molecular BioSystems*. 2010, vol. 6, p. 1419–1430
- [26] STEINHAUSEROVÁ, I. Otravy biotoxiny ryb a mořských živočichů. *Vetweb zpravodaj časopisů Veterinářství a Veterinární klinika* [online]. 2004, č. 54, s. 172-175. [cit. 2013-02-07]. Dostupné z: [http://www.vetweb.cz/informace-z-oboru/hygiena-technologie/Otravy-biotoxiny-ryb-a-morskych-zivocichu\\_\\_s1496x51269.html](http://www.vetweb.cz/informace-z-oboru/hygiena-technologie/Otravy-biotoxiny-ryb-a-morskych-zivocichu__s1496x51269.html)
- [27] KADLEC, P. a kol. *Technologie potravin II*. Praha: VŠCHT, 2002. s. 536. ISBN 80-7080-510-2.
- [28] KALAC, P., KRÍŽEK, M. A Review of Biogenic Amines and Polyamines in Beer. *Journal of the Institute of Brewing*. 2003, vol. 102, iss. 2, p. 123-128
- [29] MATOULKOVÁ, D., KUBIZNIAKOVÁ, P., SIGLER, K. Schopnost mléčných bakterií kazit pivo a souvislost s přítomností genů *horA*, *horC* a *hitA*. *Kvasný Průmysl*. 2012, č. 11–12, s. 336–342.
- [30] NAŘÍZENÍ RADY (ES) č. 510/2006 ze dne 20. března 2006 o ochraně zeměpisných označení původu zemědělských produktů a potravin. EUR-lex [online]. [cit. 2013-04-24]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2008:016:0014:0022:CS:PDF>
- [31] CSERHÁTI, T., SZÓGYI, M. Chromatography of beer. *European Chemical Bulletin*. 2013, vol. 2, iss. 4, p. 154-159
- [32] LIU, S. -Q. Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification. *Journal of Applied Microbiology*. 2002, vol. 92, p. 589–601.



- [33] *BIOGENIC AMINES: PHARMACOLOGICAL, NEUROCHEMICAL AND MOLECULAR ASPECTS IN THE CNS*. Nova Science Publishers, Inc., 2010, iss. 3-5, p. 25 - 80. ISBN 978-1-60876-625-3.
- [34] NOVÁK, V. KUNČÍKOVÁ, M. Solen. *Nadměrná denní spavost a její léčba* [online]. 2011, č. 12, s. 110-115 [cit. 2013-02-18]. Dostupné z: <http://www.solen.sk/pdf/1b171bab81cc5614a5e2daa9c2abfe0c.pdf>
- [35] HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., HOLZAPFEL, W., H. The biogenic amine content of beer; the effect of barley, malting and brewing on amine concentration. *z Lebensm Unters Forsch A*. 1999, iss. 208, p. 418–423
- [36] MARTH, E. H., STEELE, J. L. *Applied Dairy Microbiology*, second edition. 2001, p. 705. ISBN: 0-8247-0536-X
- [37] FELIS E. G., DELLAGLIO F., TORRIANI S. Taxonomy of Probiotic Microorganisms. *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. 2009, iss. 15, p. 591 - 609. ISBN: 978-0-387-79057-2
- [38] HORÁČKOVÁ, Š., ŽALUDOVÁ K., PLOCKOVÁ M. Výběr bakterií mléčného kvašení s probiotickými vlastnostmi. *Mlékařské listy* [online]. 2010, č. 123, s. V [cit. 2013-02-18]. Dostupné z: [http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2010/123\\_s\\_iv-vii.pdf](http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2010/123_s_iv-vii.pdf)
- [39] TURPIN, W., HUMBLLOT, CH., THOMAS, M., GUYOT, J. P. Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, vol. 43, p. 87-102.

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

|           |  |
|-----------|--|
| BA        | Biogenní aminy                                 |
| GDL       | Glukono- $\delta$ -lakton                      |
| BMK       | Bakterie mléčného kvašení                      |
| TLC       | Chromatografie na tenké vrstvě                 |
| HPLC      | Vysokoučinná kapalinové chromatografie         |
| RP-HPLC   | Kapalinová chromatografie na reverzních fázích |
| GC        | Plynová chromatografie                         |
| PCR       | Polymerázová řetězová reakce                   |
| EMP dráha | Embden–Meyerhof–Parnasova dráha                |

## SEZNAM OBRÁZKŮ

|   |    |
|---|----|
| <i>Obr. 1. Chemická struktura alifatických biogenních aminů [4, s. 1476].....</i>   | 13 |
| <i>Obr. 2. Chemická struktura aromatických biogenních aminů [4, s. 1476].....</i>   | 14 |
| <i>Obr. 3. Chemická struktura heterocyklických biogenních aminů [4, s. 1476] .....</i>  | 14 |
| <i>Obr. 4. Dekarboxylační reakce [6, s. 2015].....</i>  | 15 |
| <i>Obr. 5. Schéma čtyř způsobů zkvašování laktózy příslušnými mikroorganismy [24] .....</i>   | 22 |
| <i>Obr. 6. Kinetika produkce TYR kmenem <i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-69 při 0 a 3 %<br/>(v/v) koncentraci etanolu v růstovém prostředí ..... <b>Chyba! Záložka není definována.</b></i> |    |
| <i>Obr. 7. Kinetika produkce TYR kmenem <i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-69 při 0 a 6%<br/>(v/v) koncentraci etanolu v růstovém prostředí ..... <b>Chyba! Záložka není definována.</b></i>  |    |
| <i>Obr. 8. Kinetika produkce TYR kmenem <i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-69 při 0; 3 a 6%<br/>(v/v) koncentraci etanolu v růstovém prostředí .....</i>                                      | 44 |

## SEZNAM TABULEK

|  |           |
|--|-----------|
| <i>Tab. 1. Přípustné koncentrace etanolu pro jednotlivé druhy piva stanovené podle Nařízení rady (ES) č. 510/2006 [30] .....</i>                 | <i>28</i> |
| <i>Tab. 2. Přehled vybraných mikroorganismů syntetizující příslušné biogenní aminy [2, s. 220, 221], [7, s. 388 – 393], [8, s. 11 – 13].....</i> | <i>31</i> |
| <i>Tab. 3. Složení kultivačního média.....</i>   | <i>38</i> |
| <i>Tab. 4. Program gradientové eluce.....</i>  | <i>40</i> |