Vliv vnějších faktorů na dekarboxylázovou aktivitu *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

Kalousová Iveta

Bakalářská práce
2014

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Iveta Kalousová**
Osobní číslo:	**T11590**
Studijní program:	**B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Chemie a technologie potravin**
Forma studia:	**prezenční**
Téma práce:	**Vliv vnějších faktorů na dekarboxylázovou aktivitu Bifidobacterium animalis subsp. lactis**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. **Biogenní aminy.**
2. **Faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů.**
3. **Výskyt biogenních aminů v potravinách a metody jejich stanovení.**
4. **Probiotické bakterie.**

II. Praktická část

1. **Sledování vybraných faktorů na produkci biogenních aminů u Bifidobacterium animalis subsp. lactis v podmínkách in vitro a v mléce metodou HPLC.**
2. **Zpracování výsledků.**
3. **Formulace závěrů na základě získaných výsledků.**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] ROGINSKI, H., FUQUAY, J.W., FOX, P.F. Encyclopedia of dairy sciences. London: Academic press, 2002. ISBN 0-12-227235-8.
[2] LINARES, D.M., MARTÍN, M., LADERO, V., AIVAREZ, M. A., FERNÁNDEZ, M., Biogenic amines in dairy products, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 51, 2011.
[3] KOMPRDA, T. Biogenní aminy a polyaminy ve fermentovaných potravinách živočišného původu. Veterinářství, 10, 2005.
[4] MATTILA-SANDHOLM, T., SAARELA, M. Functional dairy products. Woodhead Publishing Limited, Cambridge England, 2003. ISBN 1 85573 691 8.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **10. ledna 2014**

Termín odevzdání bakalářské práce: **2. května 2014**

Ve Zlíně dne 3. února 2014

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ
Fakulta technologická
L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

Příjmení a jméno: KALOUSOVÁ IVETA Obor: CHTP

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 22.4.2014 Kalousová

[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 nevýdělečně 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 vzdělávacího zařízení (školní dílo).

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

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

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

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

ABSTRAKT

Využívání mikroorganizmů v potravinářství je v současné době velice rozšířené, především díky jejich pozitivnímu ovlivňování senzorické jakosti produktů. Někteří zástupci jsou však zároveň schopni produkovat metabolity, které mohou pro konzumenta představovat určité zdravotní riziko. Předmětem této práce bylo studium současného vlivu několika vnějších faktorů na tvorbu biogenních aminů u vybraného kmene *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* v podmínkách *in vitro* a v mléce. Sledovanými faktory v umělých podmínkách byly teplota (10 a 37 °C), pH (5, 6 a 7) a koncentrace fermentovatelného sacharidu (0 – 4,8 % (w/v)). V mléce byl sledován vliv teploty, pH a přídavku volných aminokyselin. Stanovení biogenních aminů bylo provedeno metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Bakterie vykazovala nejvyšší dekarboxylázovou aktivitu v mléce obohaceném o volné aminokyseliny při pH 5 a 6 a teplotě 37 °C.

Klíčová slova: biogenní aminy, výskyt v potravinách, HPLC, probiotika, *Bifidobacterium*

ABSTRACT

The use of microorganisms in the food industry is currently very widespread, mainly due to the positive influence of sensory quality products. Some representatives, however, are also able to produce metabolites which may pose a health risk for the consumer. The objective of this work was to study the influences of several environmental factors on the formation of biogenic amines in selected strain of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis in vitro* and in milk. The monitored factors in artificial conditions were temperature (10 and 37 °C), pH (5, 6 and 7) and the concentration of fermentable carbohydrate (0 – 4,8 % (w/v)). In milk, the effects of temperature, pH and the addition of free amino acids were observed. Determination of biogenic amines was performed by high performance liquid chromatography. The bacteria showed the highest decarboxylase activity in milk supplemented with free amino acids at pH 5 and 6 and a temperature of 37 ° C.

Keywords: biogenic amines, occurrence in food, HPLC, Probiotics, *Bifidobacterium*

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odbornou pomoc, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala. Děkuji také paním laborantkám z Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí a Ústavu technologie potravin za výpomoc a odborný dohled během realizace praktické části mojí bakalářské práce. Mimořádně velké poděkování patří mojí rodině, která mě během mého studia psychicky i materiálně podporovala.

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

OBSAH

ÚVOD **10**
I TEORETICKÁ ČÁST **11**
1 BIOGENNÍ AMINY **12**
1.1 CHEMICKÁ STRUKTURA BIOGENNÍCH AMINŮ 12
1.2 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ 13
1.3 FYZIOLOGICKÝ VÝZNAM BIOGENNÍCH AMINŮ 15
1.4 TOXIKOLOGICKÝ VÝZNAM BIOGENNÍCH AMINŮ 16
2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU BIOGENNÍCH AMINŮ **18**
2.1 VLIV PH 18
2.2 VLIV TEPLOTY 18
2.3 VLIV SOLI 19
2.4 VLIV ZDROJE UHLÍKU 19
2.5 VLIV KYSLÍKU 20
2.6 VLIV STARTOVACÍ KULTURY 20
3 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH A METODY JEJICH STANOVENÍ **22**
3.1 BIOGENNÍ AMINY V POTRAVINÁCH A NÁPOJÍCH 22
3.1.1 Biogenní aminy v rybách a mořských plodech 22
3.1.2 Biogenní aminy v mase a nefermentovaných masných výrobcích 23
3.1.3 Biogenní aminy ve fermentovaných masných výrobcích 24
3.1.4 Biogenní aminy v mléčných výrobcích 24
3.1.5 Biogenní aminy v dalších potravinách a nápojích 25
3.2 METODY STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH 27
3.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie 27
3.2.2 Chromatografie na tenké vrstvě 28
3.2.3 Plynová chromatografie 28
3.2.4 Kapilární elektroforéza 29
3.2.5 Stanovení biogenních aminů pomocí biosenzorů 30
4 PROBIOTICKÉ BAKTERIE **31**
4.1 HISTORIE PROBIOTIK 31
4.2 SOUČASNÉ VYUŽITÍ PROBIOTIK 33
4.3 RIZIKA PROBIOTIK 34
4.4 ROD *BIFIDOBACTERIUM* 34
II PRAKTICKÁ ČÁST **39**
5 CÍL PRÁCE **40**
6 MATERIÁL A METODIKA **41**
6.1 POUŽITÉ MIKROORGANISMY 41
6.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A POMŮCKY 41
6.2.1 Přístroje a pomůcky 41
6.2.2 Chemikálie 42

6.3 PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ 43
6.4 PŘÍPRAVA BAKTERIÁLNÍ SUSPENZE 44
6.5 ZAOČKOVÁNÍ, KULTIVACE A ODBĚR VZORKŮ 44
6.6 EXTRAKCE VZORKŮ 45
6.7 PŘEDKOLONOVÁ DERIVATIZACE 45
6.8 CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ 45
7 VÝSLEDKY A DISKUZE 47
7.1 SLEDOVÁNÍ VLIVU VNĚJŠÍCH FAKTORŮ NA PRODUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ U *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS* CCDM 239 47
7.1.1 Sledování produkce BA v podmínkách *in vitro* 47
7.1.2 Sledování produkce BA v mléce 55
7.2 SLEDOVÁNÍ ZMĚN PH KULTIVAČNÍHO MÉDIA BĚHEM KULTIVACE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS* CCDM 239 58
7.2.1 Sledování změn pH bujónu 58
7.2.2 Sledování změn pH mléka 59
7.3 DISKUZE 60
ZÁVĚR 64
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 65
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 74
SEZNAM OBRÁZKŮ 76
SEZNAM TABULEK 78
SEZNAM PŘÍLOH 79

ÚVOD

Biogenní aminy (BA) představují nízkomolekulární dusíkaté organické sloučeniny s významnými fyziologickými a farmakologickými účinky. Vznikají činností živých organizmů jako produkty dekarboxylace aminokyselin přímo v buňkách. Schopnost dekarboxylace aminokyselin mají jen některé rody, respektive kmeny bakterií a do značné míry jsou tyto procesy ovlivněny vnějšími fyzikálně-chemickými faktory. [1, 2]

Důvodem, proč se BA, vyskytující se v potravinách, stávají předmětem mnoha vědeckých studií, je jejich možný toxický účinek na lidský organizmus. Některé BA jsou však pro organizmus v nízkých koncentracích prospěšné, jelikož hrají významnou roli v mnoha lidských a živočišných fyziologických funkcích, jako je například regulace tělesné teploty, pH žaludku a mozkové činnosti a nebo plní funkci prekurzorů dalších molekul. [3, 4]

Nejvíce studovanými biogenními aminy, právě díky své značné toxicitě, jsou histamin, tyramin, trypamin, spermin, spermidin, kadaverin a putrescin. Jsou to produkty metabolizmu mnoha zástupců čeledi *Enterobacteriaceae* a bakterií rodů *Lactobacillus, Micrococcus, Streptococcus*, *Pediococcus, Pseudomonas, Propionibacterium* a zástupci *Bacillus macerans.* Biogenní aminy mohou produkovat také zástupci startovacích a probiotických kultur, používaných při výrobě fermentovaných potravin. Probiotika jsou živé mikroorganizmy, které se do potravin často přidávají s cílem příznivého ovlivňování zdraví člověka. Probiotika se po požití dostávají do střev, kde se množí a příznivě ovlivňují složení a rovnováhu střevní mikroflóry. Bohužel tyto mikroorganizmy také patří mezi potencionální producenty BA a je tedy nutné jejich schopnost tvorby biogenních aminů prověřovat. V nefermentovaných potravinách vznikají biogenní aminy činností hnilobných bakterií, které rozkládají přítomné bílkoviny. V těchto potravinách pak mohou BA sloužit jako indikátory mikrobiální kontaminace potravin. [5, 6]

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

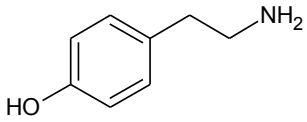
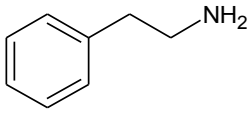
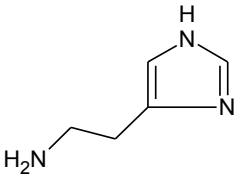
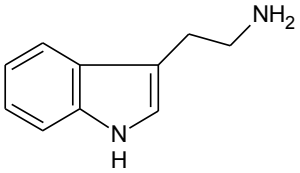
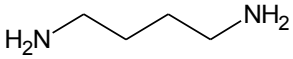
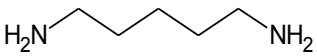
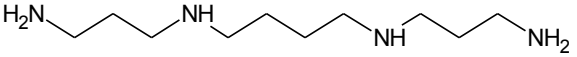
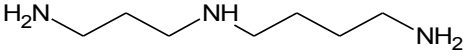
1.1 Chemická struktura biogenních aminů

Jak už bylo naznačeno v úvodu, biogenní aminy jsou dusíkaté bazické sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností. [7]

Podle chemické struktury rozlišujeme BA aromatické, heterocyklické, alifatické diaminy a alifatické polyamidy. Dále rozlišujeme BA primární, sekundární či terciární a to podle počtu alkylových a arylových skupin navázaných na atom dusíku. [8]

Strukturní vzorce a rozdělení nejvýznamnějších BA podle jejich chemické struktury je uvedeno v Tabulce 1. V tabulce jsou také uvedeny systematické a k nim odpovídající triviální názvy biogenních aminů.

Tabulka 1. Biogenní aminy vyskytující se v potravinářských výrobcích [8, 9].

Chemická struktura	Strukturní vzorec Název triviální/systematický
Aromatické	 tyramin/4-(2-aminoetyl)fenol
	 fenyletylamin/2-fenyletanamin
Heterocyklické	 histamin/2-(1H-imidazol-5-yl)etanamin
	 tryptamin/2-(1H-indol-3yl) etanamin
Alifatické diaminy	 putrescin/butan-1,4-diamin
	 kadaverin/pentan-1,5-diamin
Alifatické polyaminy	 spermin/*N,N´*-bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin
	 spermidin/*N*-(3-aminopropyl)butan-1,4- diamin

1.2 Vznik biogenních aminů

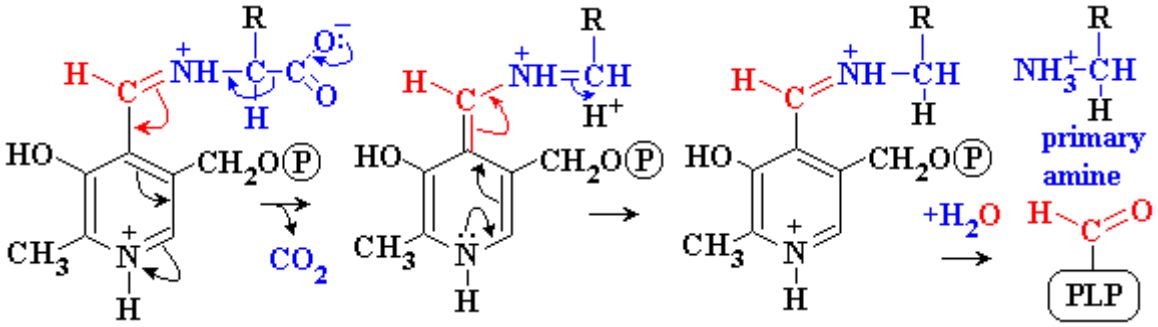
Biogenní aminy v potravinách vznikají především rozkladnou činností hnilobných bakterií během skladování, ale také během fermentačních procesů některými bakteriemi mléčného kvašení. [5]

BA jsou nejčastěji produkty enzymově katalyzované dekarboxylace aminokyselin. Popsán je i vznik transaminací a aminací aldehydů a ketonů. Dekarboxylační reakce aminokyselin jsou katalyzovány specifickými enzymy dekarboxylázami vznikajícími v důsledku metabolické činnosti některých bakterií. [10] Biogenní aminy mohou být tímto způsobem tvořeny prakticky ve všech potravinách, pokud jsou splněny následující podmínky [11]:

1. přítomnost volných aminokyselin v potravině,
2. přítomnost dekarboxyláza-pozitivních mikroorganizmů,
3. vhodné růstové podmínky pro dekarboxyláza-pozitivní mikroorganizmy.

Tvorba BA závisí také na aktivitě dekarboxylačních enzymů, která je vysoká především u bakterií. Dekarboxylace probíhá také v rostlinných a živočišných organizmech. [10]

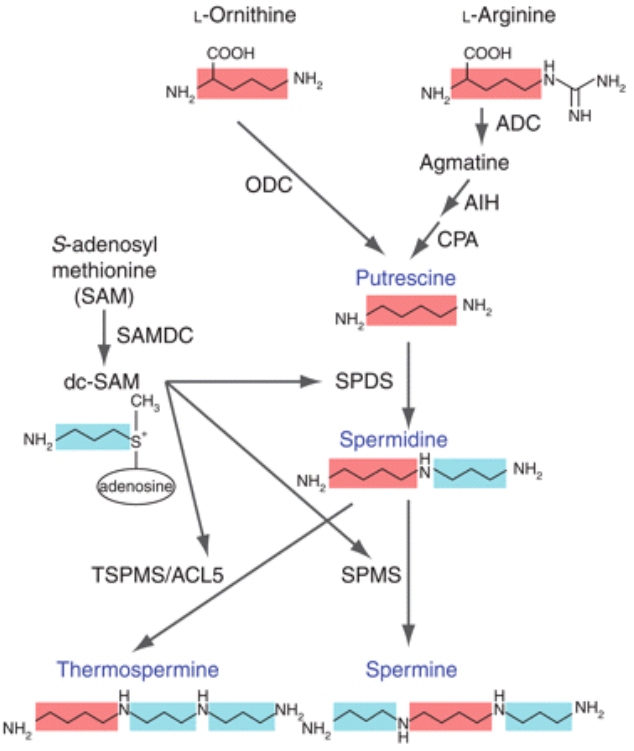
Při dekarboxylaci se často uplatňuje jako kofaktor dekarboxyláz pyridoxalfosfát. Z aminokyseliny a pyridoxalfosfátu vzniká Schiffova báze. Kladně nabité atomy dusíku pyridinového kruhu přitahují elektrony, čímž se vytvoří příznivý mezomérní stav, který vzniká jen, když se z alfa-uhlíku aminokyseliny odštěpí substituent jako kationt. Nejčastěji se odštěpuje karboxylová skupina, méně často i postranní řetězec (např. u serinu). Mezomérní mezistav se poté stabilizuje adicí jednoho protonu na alfa-uhlík a hydrolýzou Schiffovy báze na primární amin (Obrázek 1). Při dekarboxylaci se zachovává konfigurace molekuly. [10]



Obrázek 1. Obecné schéma dekarboxylace aminokyselin. [37]

(PLP - Pyridoxal fosfát, P – fosfát)

Procesem dekarboxylace vzniká například histamin z aminokyseliny histidinu působením enzymu histidindekarboxylázy. Z lyzinu vlivem lyzindekarboxylázy vzniká kadaverin a podobně vzniká i tyramin z tyrozinu, tryptamin z tryptofanu a fenyletylamin z fenylalaninu. Putrescin může vznikat dekarboxylací ornitinu nebo dekarboxylací argininu arginindekarboxylázou na agmatin a následnou hydrolýzou agmatinu na putrescin a močovinu. Z putrescinu může vznikat metylací S-adenosylmetioninem spermidin a dále spermin (Obrázek 2). [12, 13, 14]



Obrázek 2. Biosyntetické dráhy vzniku polyaminů v rostlinách. [89]

(Zkratky: ACL5 – ACAULIS 5; ADC – arginindekarboxyláza; AIH – agmatiniminohydroláza; CPA – N-karbamoylputrescinamidohydroláza; ODC – ornitindekarboxyláza; SAMDC – S-adenosylmetionindekarboxyláza; SPDS – spermidinsyntáza; SPMs – sperminsyntáza; TSPMS – termosperminsyntáza)

1.3 Fyziologický význam biogenních aminů

V prokaryotických buňkách není fyziologická role BA zatím zcela objasněna. Syntéza BA bakteriemi je pravděpodobně jedním z obranných mechanizmů proti kyselému prostředí. Při dekarboxylaci bakterie spotřebovávají protony a uvolňují oxid uhličitý a aminy a tím se do jisté míry snaží vyrovnat nízké vnitrobuněčné pH vůči vnějšímu prostředí. Produkce BA může také nabídnout způsob, jak získat energii, a to díky elektrogennímu antiportu aminokyselina/amin, při kterém se generuje na membráně protonový gradient. Aminokyselina je transportována do buňky, kde je specifickým enzymem dekarboxylována. Při reakci se spotřebuje proton a produkt reakce je stejným přenašečem vyloučen z buňky do prostředí. Tento způsob tvorby energie je zvláště důležitý pro fermentující mikroorganizmy, které syntetizují ATP pouze fosforylací na úrovni substrátu, což jim neumožňuje generovat takové množství ATP, které získávají aerobní mikroorganizmy fosforylací na úrovni membrány. [15, 16, 17]

BA mohou zprostředkovat i další fyziologické funkce bakterií, jako jsou například reakce na osmotický a oxidační stres. Různé studie podmínek tvorby biogenních aminů prokázaly okamžitou tvorbu putrescinu bakteriemi *Escherichia coli*, které byly podrobeny hyperosmotickému šoku. Vyšší koncentrace putrescinu byly zjištěny i při oxidačním stresu vyvolaným reaktivním kyslíkem. [18]
V eukaryotických buňkách je biosyntéza BA také důležitá, protože některé z nich plní v organizmu člověka důležitou funkci prekurzorů pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů. Některé BA mají roli neurotransmiterů, zatímco jiné, jako například putrescin a spermidin, jsou potřebné pro kritické biologické funkce, jako je modulace DNA, RNA a proteosyntézy. [19, 20]

Histamin je lokální tkáňový hormon, ovlivňuje krevní tlak, rozšiřuje cévy, má vliv na sekreci žaludečních šťáv a na kontrakci hladkého svalstva bronchů, uteru a ilea. Jako neuromediátor se účastní alergických reakcí a anafylaktického šoku, dráždí kůži a vyvolává hypersenzitivu. [14, 21]

Tyramin je lokální tkáňový hormon a prekurzor dopaminu, adrenalinu a noradrenalinu (mediátory sympatických nervů) a stejně jako histamin je neuromediátorem, ovlivňuje krevní tlak a kontrakce hladkého svalstva. Prekurzorem tyraminu je fenyletylamin. [14]

Tryptamin je lokální tkáňový a rostlinný hormon ze skupiny indolaminů, ovlivňuje krevní tlak, střevní peristaltiku a psychické funkce. Tryptamin je také prekurzorem serotoninu a melatoninu. [14]

Putrescin dokáže stabilizovat makromolekuly a subcelulární struktury (ribozomy), stimuluje diferenciaci buněk, čímž podporuje hojení a regeneraci poraněných tkání, je prekurzorem sperminu a spermidinu a společně s nimi i s dalšími BA může zneškodňovat volné radikály. [10, 14]

1.4 Toxikologický význam biogenních aminů

I když BA plní v organizmu mnoho důležitých fyziologických funkcí, nadměrný příjem těchto látek potravou může být pro lidský organizmus toxický. [3]

Pokud jsou BA konzumovány v malém množství, jsou běžně metabolizovány v organizmu na fyziologicky méně aktivní formy prostřednictvím působení aminooxidáz (monoaminooxidázy a diaminooxidázy). Histamin může být také detoxikován metylací (pomocí histidinmetyltransferázy) nebo acetylací. Někdy ale organizmus není schopen dostatečně detoxikovat přijaté BA, což může být způsobeno nadměrnou konzumací BA a následným nadměrným zatížením detoxikačního systému, nebo také inhibičním účinkem některých léků a alkoholu na detoxikační enzymy a v neposlední řadě je detoxikační aktivita ovlivněna genetickou výbavou jedince. [22, 23] Aminy pak vstupují do krevního oběhu, podporují uvolňování adrenalinu a noradrenalinu, zvyšují sekreci žaludečních šťáv, srdeční výdej a krevní tlak, jsou také příčinou migrény a zvýšené hladiny cukru v krvi. [19, 24]

Významným vazoaktivním biogenním aminem je tyramin, který zvyšuje krevní tlak s možným důsledkem hypertenzní krize, migrenózních bolestí hlavy, v těžkých případech tento stav končí krvácením do mozku nebo selháním srdce. Toxický účinek tyraminu závisí na přijatém množství, přítomnosti jiných biogenních aminů a na celkovém fyziologickém stavu jedince. [25, 26]

Negativní účinky histaminu na organizmus člověka jsou způsobené interakcí histaminu se specifickými receptory v buněčných membránách. Vazba histaminu na příslušné receptory cévní stěny vyvolává dilataci periferních krevních cév s důsledkem poklesu tlaku, což může mít za následek silné bolesti hlavy. Interakce histaminu s receptory

střevní stěny s následnou kontrakcí hladké svaloviny střeva vyvolává břišní křeče, průjmy a zvracení. [26]

Pro histamin se uvádí toxická dávka asi 70 - 100 mg na jeden kilogram potraviny, pro tyramin asi 20 - 80 mg/kg. Tato množství však závisí na individuálních rozdílech mezi lidmi a na přítomnosti dalších biogenních aminů v potravě. Toxicitu histaminu a tyraminu zvyšují zejména diaminy a polyamidy, které vyčerpají detoxikační kapacitu monoaminooxidáz, diaminooxidáz a histidinmetyltransferázy, čímž se zesílí účinek ostatních BA. [26, 27]

Diaminy a polyaminy se negativně podílejí na rozvoji nádorových onemocnění. Jak již bylo řečeno v kapitole 1.3., putrescin, jakožto zástupce diaminů, zvyšuje diferenciaci buněk a tím pozitivně ovlivňuje hojení tkání. Tato vlastnost je však zcela nežádoucí při diferenciaci nádorových buněk. Toxikologický význam polyaminů spočívá také ve schopnosti vytvářet stabilní karcinogenní N-nitrososloučeniny. [14, 28, 29]

2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU BIOGENNÍCH AMINŮ

Výskyt biogenních aminů lze předpokládat v potravinách obsahujících bílkoviny a nebo volné aminokyseliny, zvláště pokud poskytují vhodné podmínky pro aktivitu dekarboxyláz nebo přítomných mikroorganizmů s dekarboxylační aktivitou. Produkce BA je ovlivněna množstvím a dostupností zdroje uhlíku, přítomností růstových faktorů, koncentrací solí, pH a teplotou prostředí, vodní aktivitou, dostupností kyslíku, podílem mikrobiální populace s dekarboxylázovou činností atd. [25, 2]

2.1 Vliv pH

Hodnota pH je důležitým faktorem, který ovlivňuje dekarboxylázovou činnost dvěma způsoby současně. Jedním z nich je vliv na růst mikroorganizmů. Každý mikroorganizmus je schopen se rozmnožovat pouze v určitém rozmezí pH a zvyšováním kyselosti prostředí dochází k inhibici růstu mikroorganizmů. Extrémní pH může mikroorganizmy dokonce usmrtit. Na druhé straně jsou bakterie v kyselém prostředí více stimulovány k produkci dekarboxyláz a tedy i k tvorbě zásaditých biogenních aminů jako součást jejich obranných mechanizmů proti kyselému intracelulárnímu pH. Největší dekarboxylační aktivita byla pozorována v prostředí při hodnotách pH 4,0 – 5,5. [30, 25, 31, 32]

2.2 Vliv teploty

Tvorba BA bakteriemi je značně ovlivněna teplotou. Optimální teplota pro růst a tvorbu biogenních aminů mezofilními dekarboxyláza pozitivními bakteriemi se pohybuje mezi 20 a 37 °C. Nízké teploty pod 5 °C a vyšší teploty nad 40 °C pak působí inhibičně na mikrobiální růst a aktivitu enzymu. V chlazených potravinách (např. chlazené čerstvé ryby uložené na ledu) uchovávaných při teplotách pod 5 °C jsou hlavními producenty BA psychrotrofní bakterie: *Pseudomonas* ssp., *Morganella* ssp., *Serratia marcescens* nebo *Micrococcus luteus* (dříve *Sarcina lutea*). [7, 31, 33]

Tvorbu BA lze výrazně ovlivnit teplotou skladování. U potravin uchovávaných při teplotách blízkých bodu mrazu lze pozorovat negativní senzorické změny v potravině dříve, než hodnoty obsahu BA dosáhnou toxických dávek. Toto tvrzení však neplatí u potravin obsahující již zmiňované psychrotrofní bakterie.[7]

Vhodným způsobem, jak snížit obsah BA v potravinách (mléku), je například pasterace. V syrovém mléce se vyskytuje řada mikroorganizmů, z nichž některé vykazují dekarbo-

xylázovou aktivitu. Mezi tyto mikroorganizmy patří mezofilní bakterie mléčného kvašení (enterokoky, laktokoky, laktobacily nebo *Leuconostoc*), enterobakterie a psychrotrofní bakterie rodů *Pseudomonas* a *Acinetobacter*. Pasterace snižuje bakteriální zatížení mléka, tudíž snižuje i obsah bakterií produkujících BA. Její účinek však není 100% a navíc většina aminů je tepelně stálá. Dokonce i některé dekarboxylázy si po pasteraci uchovávají část své aktivity. [34, 35]

2.3 Vliv soli

Dalším faktorem, který má vliv na akumulaci BA, je koncentrace soli v potravině. Tradičně se sůl používá při výrobě potravin s cílem omezit nebo zcela zastavit růst patogenních mikroorganizmů a zabránit kažení potravin během skladování. Současně však obsah soli snižuje růstovou rychlost dekarboxyláza pozitivních bakterií, čímž dochází ke snížení tvorby BA. [35]

Studiem vlivu obsahu soli na produkci BA se zabývali Pleva *et al.* [42]. Ve své studii pozorovali produkci biogenních aminů u izolátu *Enterococcus faecium* z králičího masa a dospěli k závěru, že koncentrace soli v prostředí významně ovlivňuje pouze tvorbu tyraminu. Ze získaných výsledků vyplývá, že obsah soli do 3 % (w/v) působí stimulačně na tvorbu BA, zatímco přídavek 6 % (w/v) NaCl tvorbu BA zpomaluje. [42]

Gardini *et al.* [36] se zaměřili na produkci tyraminu bakteriemi *Enterococcus faecalis* ve fermentovaných suchých salámech. Při 5% koncentraci NaCl bakterie produkovaly tyramin v zanedbatelném množství (méně než 0,0001 %), zatímco při 0 % NaCl byl obsah tyraminu více než 0,02 %. [36]

Je však potřeba zmínit, že existují i halotolerantní bakterie, kterým vyšší obsah soli naopak vyhovuje. Například zvýšená aktivita histidin dekarboxylázy byla zjištěna u halotolerantních stafylokoků izolovaných ze solených ančoviček. [31]

2.4 Vliv zdroje uhlíku

Přítomnost zkvasitelných sacharidů, jako je glukóza, zvyšuje růst bakterií a jejich dekarboxylázovou činnost. Kimura *et al.* [38] zjistili že *Tetragenococcus muriaticus* produkoval histamin pouze v množství 0,0082 % v médiu bez glukózy, ale obohacením média o 1 – 3 % glukózy (w/v) se hladina aminu výrazně zvýšila (na 0,041 až 0,077 %). [25, 38]

Andresová [40] studovala růst a produkci putrescinu bakterií *Serratia marcescens*. Autorka dospěla k závěru, že přídavek monosacharidů (zejména fruktózy) do média při pH 6 zvyšoval tvorbu putrescinu a to nejvíce při dodání 0,25 – 0,75% koncentrace. Při pH 7 a 8 naopak došlo ke snížení produkce putrescinu vlivem přídavku zkvasitelných cukrů. Z toho vyplývá, že jednotlivé faktory se navzájem ovlivňují. [40]

Obecně se jako optimální koncentrace sacharidů pro dekarboxylázovou aktivitu udává 0,5 – 2 % glukózy v médiu. [7]

2.5 Vliv kyslíku

Biogenní aminy mohou být tvořeny mikroorganizmy aerobními, anaerobními i fakultativně anaerobními. Fakultativně anaerobní mikroorganizmy jsou schopny produkovat BA v aerobním i anaerobním prostředí. [7]

Ze studie Valenty [41] vyplývá, že *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (CCDM 53) v prostředí s obsahem glukózy 0,5 % a za aerobních podmínek tvoří 2750 $mg.1^{-1}$ tyraminu zatímco za anaerobních podmínek „jen“ kolem 1870 $mg.1^{-1}$ tyraminu. [41]

Zjišťováním vlivu kyslíku na tvorbu BA se zabývali také Pleva *et al.* [42], kteří sledovali dekarboxylázovou aktivitu *Enterococcus faecium* izolovaného z masa králíka. Produkce biogenních aminů byla zkoumána v závislosti na teplotě (6±1°C a 30±1°C), dostupnosti kyslíku a koncentraci NaCl (0; 1; 2; 3 a 6 % (w/v)). Po 16 dnech kultivace při 6 °C za anaerobních podmínek byl detekován vyšší obsah tyraminu a putrescinu než při kultivaci na aerobních podmínek, a naopak spermidinu bylo vyprodukováno více za aerobních podmínek. U vzorků kultivovaných při 30 °C po dobu 48 hodin byla vyšší produkce tyraminu a spermidinu zjištěna při aerobních podmínkách, obsah putrescinu byl za přítomnosti a nepřítomnosti kyslíku přibližně stejný. Z těchto poznatků je zřetelné, že intenzita produkce BA je výsledkem součinnosti mnoha faktorů. [42]

2.6 Vliv startovací kultury

Jedním z nejdůležitějších aspektů při výrobě fermentovaných potravin je typ použité startovací kultury. Jedná se o speciální kmeny mikroorganizmů, které svou činností ovlivňují kvalitu výrobku (chutnost, barva, textura, údržnost, obsah nitrátů), nezávadnost výrobků (potlačení výskytu patogenů) a výrobní postup (zkrácení a standardizace doby zrání). [43] Bohužel i některé tyto kmeny mohou ve vhodných podmínkách vyka-

zovat dekarboxylázovou aktivitu. Častými producenty biogenních aminů jsou zástupci rodů *Lactococcus*, *Streptococcus* a *Lactobacillus*. [35]

Tvorbu BA ve fermentovaných produktech lze minimalizovat použitím dobře charakterizovaných startovacích kultur, které netvoří biogenní aminy a zároveň dokáží potlačit růst přirozené mikroflóry s dekarboxylázovou aktivitou. [44]

Další možností vedoucí ke snížení hromadění BA v mléčných produktech může být použití doplňkových bakteriálních kultur, které jsou schopné BA rozkládat. [35]

3 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH A METODY JEJICH STANOVENÍ

3.1 Biogenní aminy v potravinách a nápojích

Při posuzovaní výskytu BA se obyčejně potraviny dělí na fermentované a nefermentované, což vyplývá z podstaty vzniku BA. Přítomnost biogenních aminů v nefermentovaných potravinách obecně naznačuje špatné hygienické podmínky při zpracování nebo dlouhodobé a nesprávné skladování. V těchto případech bývají producenty biogenních aminů mnohé bakterie patřící do čeledi *Enterobacteriaceae,* případně další gramnegativní bakterie. Větší výskyt BA lze však předpokládat ve fermentovaných potravinách, kde hlavní podíl na dekarboxylaci aminokyselin mají některé bakterie mléčného kvašení. Nicméně také v rámci nefermentovaných potravin mohou hodnoty obsahu BA dosáhnout toxických dávek, především jedná-li se o špatně skladované ryby. [7, 8, 49]

3.1.1 Biogenní aminy v rybách a mořských plodech

Potraviny z ryb, hlavonožců a korýšů jsou zdrojem vysoce kvalitních proteinů, esenciálních vitaminů, minerálních látek a polynenasycených mastných kyselin, které příznivě ovlivňují lidské zdraví. Konzumace těchto potravin může v některých případech sebou nést i zdravotní riziko. [39]

Během rozkladu těl mořských živočichů dochází k tvorbě různých biogenních aminů v koncentracích, které závisejí na druhu ryb. Při nesprávném skladování a zároveň vysokém mikrobiálním znečištění ryb se může vytvořit toxické množství BA dříve, než se senzoricky projeví ryba jako závadná. Prevencí proti vysoké produkci BA je rychlé zchlazení čerstvě ulovených ryb na teplotu kolem +1 °C a dodržení chladírenských teplot během přepravy, distribuce a skladování. [39, 46]

Nejčastěji se vyskytující biogenní aminy spojované s kažením ryb jsou histamin, tyramin, putrescin a kadaverin. Toxické koncentrace histaminu jsou nejčastěji zaznamenávány u ryb z čeledi *Scombridae* (makrelovití), jejichž svalovina je bohatá na histidin. Alimentární intoxikace histaminem je v tomto případě označována jako otrava scombrotoxinem. [7, 39]

Evropská legislativa stanovuje maximální přípustné množství histaminu v rybách na 200 $mg.kg^{-1}$. Dodržování tohoto limitu v rybách u nás prodávaných pravidelně kontroluje Státní veterinární správa ČR. [46]

3.1.2 Biogenní aminy v mase a nefermentovaných masných výrobcích

Čerstvé maso a nefermentované masné výrobky obsahují jen výjimečně množství BA, které by mohlo představovat zdravotní riziko. [47]

V čerstvém mase jsou přítomny ve významných množstvích spermidin a spermin. Obsah sperminu v mase a masných výrobcích z teplokrevných zvířat bývá obvykle mezi 20 a 60 $mg.kg^{-1}$ oproti spermidinu, jehož hladina v mase zřídka kdy překročí 10 $mg.kg^{-1}$. Další biogenní aminy (tyramin, putrescin a kadaverin) se mohou v mase tvořit v průběhu skladování působením kontaminující mikroflóry. [48]

Obsah BA lze využít jako indikátor mikrobiálního kažení masa a nefermentovaných masných výrobků. Čerstvé jatečné vepřové maso má hodnoty kadaverinu a putrescinu do 7 $mg.kg^{-1}$, zatímco zkažené maso 60 $mg.kg^{-1}$ a více. Nicméně množství biogenních aminů v těchto potravinách nemusí korelovat s růstem mikroorganizmů způsobujících kažení, protože všechny mikroorganizmy nemusí být dekarboxyláza-pozitivní. [14, 25]

Výskytem biogenních aminů v mase různých živočišných druhů se zabývá mnoho studií. Krausová *et al*. [49] sledovali změny počátečních koncentrací BA ve vepřovém mase v závislosti na různých tepelných úpravách. U odebraných vzorků byly provedeny tepelné úpravy: vaření, dušení, pečení, pečení na pánvi bez oleje, úprava jako vídeňský řízek. Navíc byl odebírán vývar a tuk pro stanovení obsahu polyaminů. Obsah sperminu ve vzorcích z vepřové panenky klesl asi na 40 % původního množství během úprav vařením, dušením a smažením, pečením na pánvi bez oleje se dosáhlo přibližně 55% ztráty. Vývar a tuk, které vznikly během tepelných úprav masa, spermin neobsahovaly. [49]

Kaniou *et al*. [50] se ve své práci zabývali vlivem vakuového balení na trvanlivost hovězího masa. Autoři nakonec dospěli k závěru, že vakuové balení ztrojnásobuje dobu skladování masa a zachovává jeho organoleptické vlastnosti na velmi dobré úrovni. Zároveň navrhují jednoduchý způsob, jak snížit hladiny biogenních aminů v mase. Stačí maso opláchnout pod tekoucí vodou, protože značné množství BA se nachází právě na povrchu masa. [50]

3.1.3 Biogenní aminy ve fermentovaných masných výrobcích

Trvanlivé fermentované masné výrobky jsou ve Vyhlášce ministerstva zemědělství č. 326/2001 Sb., ve znění pozdějších předpisů, definovány jako výrobek tepelně neopracovaný určený k přímé spotřebě, u kterého v průběhu fermentace, zrání, sušení, popřípadě uzení za definovaných podmínek došlo ke snížení aktivity vody s hodnotou a_w(max.) = 0,93, s minimální dobou trvanlivosti 21 dní při teplotě plus 20 ºC. Příkladem těchto výrobků na českém trhu jsou salámy Poličan, Herkules nebo Lovecký salám, z klobás např. Gombasecká klobása, Dunajská nebo Čabajská klobása. [51, 52]

BA lze nalézt ve fermentovaných masných výrobcích (dále jen FMV) v důsledku činnosti mikroorganizmů zodpovědných za fermentační procesy a/nebo jsou produkovány kontaminující mikroflórou, jejíž zdrojem byla nekvalitní nebo znečištěná surovina, případně produkt. [48]

Nejintenzivnější dekarboxylace probíhá v masové složce FMV, která obsahuje vysoké množství bílkovin. Zrání FMV je doprovázeno štěpením bílkovin masa, při čemž vznikají prekurzory pro dekarboxylázovou činnost startovacích kultur a divoké mikroflóry. [44, 48]

Obsah a zastoupení jednotlivých BA se v různých druzích FMV závisí na složité interakci vnějších a vnitřních faktorů v průběhu výrobního procesu a skladování, jako je pH, oxido-redukční potenciál, teplota, koncentrace NaCl, velikost výrobku, hygienické podmínky výroby a vlastnosti startovací kultury. [44, 48]

Vysoké hodnoty BA byly zjištěny u fermentovaných salámů, obsahují průměrně 23,0 – 23,6 $mg.kg^{-1}$ histaminu, 136 $mg.kg^{-1}$ tyraminu, 84,2 – 84,6 $mg.kg^{-1}$ putrescinu, 37,4 – 38,0 $mg.kg^{-1}$ kadaverinu. Obsah fenyletylaminu je poměrně nízký, kolem 6,6 $mg.kg^{1}$. V ostatních vyzrálých masných výrobcích je množství BA výrazně nižší. [31]

3.1.4 Biogenní aminy v mléčných výrobcích

Mléčné fermentované výrobky poskytují vhodné prostředí pro tvorbu BA, zejména sýry obsahují potenciálně toxické množství tyraminu, histaminu a putrescinu. V menším rozsahu je zastoupen i kadaverin. Obsah těchto aminů značně kolísá mezi různými druhy sýrů, ale také v rámci stejného druhu a to díky různým vnějším a vnitřním faktorům.

Nejvyšší koncentrace BA byly zjištěny u zrajících sýrů vyrobených ze syrového mléka a u sýrů se silnými smyslovými vadami (až 1800 $mg.kg^{-1}$ kadaverinu) [23, 35, 45]

Hlavní producenti BA v sýrech jsou většinou bakterie mléčného kvašení, konkrétně zástupci rodů *Enterococcus, Lactobacillus, Leuconostoc*, *Lactococcus* a *Streptococcus*. Tyto mikroorganizmy se do sýrů dostávají společně s hlavní vstupní surovinou – mlékem, jako součást jeho přirozené mikroflóry, kontaminací v průběhu celého procesu výroby sýra nebo dokonce mohou být součástí záměrně přidávaných startovacích a pomocných kultur. [35]

Podmínkou vzniku toxického množství BA v sýrech je proteolýza, která je při zrání sýrů považována za jeden z nejdůležitějších pochodů ovlivňujících kvalitu sýra a je také zdrojem aminokyselin pro následnou dekarboxylaci. [1]

Další fermentované mléčné výrobky, jako jsou kefír, podmáslí, kumys a jogurty, většinou obsahují taková množství BA, která nepředstavují pro konzumenta významnější zdravotní riziko. Také v mléce a smetaně bylo zjištěno malé množství BA, převážně polyaminy spermin a spermidin, není však zcela jasné, jsou-li produktem metabolizmu mikroorganizmů nebo mají původ endogenní. [25, 35]

3.1.5 Biogenní aminy v dalších potravinách a nápojích

Z dalších produktů potravinářského průmyslu obsahující významná množství biogenních aminů jsou fermentovaná zelenina, víno a pivo. [45]

V rámci skupiny fermentované zeleniny je v podmínkách střední Evropy nejrizikovější potravinou kysané zelí, zvláště spontánně fermentované, ve kterém zastoupení BA může být až desítky mg/100 g potraviny. Spontánní kvašení probíhá díky činnosti bakterií mléčného kvašení, které jsou součástí přirozené mikroflóry zelí. Tyto bakterie v průběhu fermentace rozkládají jednoduché cukry na kyselinu mléčnou, kyselinu octovou, etanol a oxid uhličitý. Některé bakterie mléčného kvašení, ale také jiné mikroorganizmy přítomné v surovině, mohou současně produkovat biogenní aminy. [7, 45]

Spontánní fermentaci lze nahradit fermentací řízenou, při které je použita vhodná startovací kultura. Tento způsob fermentace umožňuje získat produkty standardní jakosti a s nižším obsahem biogenních aminů. Kulturní kmeny laktobacilů navíc rychle rozkládají sacharidy na kyseliny, díky tomu rychle vzrůstá kyselost a dochází k potlačení růstu nežádoucí mikroflóry a tvorby BA. [45]

Obsah BA ve vínech je značně variabilní, což bývá způsobeno různými podmínkami výroby a skladování vín, kvalitou suroviny, rozdíly ve vinařském procesu, případně mikrobiální kontaminací během různých operací. Celková koncentrace BA ve víně pak může dosáhnout hodnoty až 130 mg/l, nebo naopak může být téměř nulová. Červená vína většinou obsahují více BA než vína bílá. Nejčastěji nalezené BA ve vínech jsou histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, spermin a spermidin. [53, 54]

Některé aminy jsou již přirozenou součástí hroznů. Oplodí a semena hroznů jsou bohatá na putrescin a polyamin spermidin, semena v sobě navíc ukrývají ve vysoké koncentraci také kadaverin. K tvorbě dalších BA dochází činností bakterií mléčného kvašení během jablečno-mléčné fermentace nebo činností kontaminující mikroflóry. Kvasinky zodpovědné za alkoholové kvašení většinou nejsou významnými producenty BA. V některých studiích byl naopak popsán pokles BA během fermentace alkoholických nápojů. [45, 54]

Přítomnost BA ve vínech ve vysokých koncentracích může mít zdravotní i ekonomické důsledky. O toxických účincích různých BA na lidský organizmus bylo pojednáváno již v kapitole 1.4. Z ekonomického hlediska jsou biogenní aminy zodpovědné za senzorické vady vína, především v jeho chuti. [54]

Pivo je dalším alkoholickým nápojem, jehož konzumace představuje pro některé spotřebitele možné zdravotní riziko v důsledku vysokého příjmu biogenních aminů. Zvláště nebezpečná je spotřeba velkého množství piva během krátkého časového intervalu. [45]

Hlavní příčinou zdravotních problémů po konzumaci piva bývá intoxikace tyraminem a histaminem, jejichž účinek může být ještě zesílen jinými v pivu přítomnými BA. Kromě toho se spekuluje o možném synergickém vztahu mezi etanolem a aminy. Etanol totiž působí inhibičně na enzymy detoxikačního systému lidského organizmu. [45, 55]

Agmatin, putrescin, spermin a spermidin se do piva dostávají společně se sladem, zatímco tyramin, histamin a kadaverin jsou tvořeny v průběhu hlavního kvašení kontaminující mikroflórou bakterií mléčného kvašení. Také kvasinky mohou během fermentace produkovat menší množství BA, konkrétně putrescin, spermin a spermidin, tato vlastnost je však přirozenou součástí jejich metabolizmu. Tvorba tyraminu a histaminu nebyla u kvasinek spodního kvašení *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* prokázána. [45, 56]

3.2 Metody stanovení biogenních aminů v potravinách

Existují dva důvody proč sledovat výskyt BA v potravinách. Zaprvé je to jejich potenciální toxicita a zadruhé poskytují informace o čerstvosti nebo znehodnocení potravin. Stanovení BA je náročné s ohledem na nároky na citlivost a přesnost stanovení a vliv matrice na předseparační kroky. Analytické metody pro kvantifikaci BA jsou založeny hlavně na chromatografických metodách, z nichž nejpoužívanější je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Dalšími chromatografickými metodami jsou chromatografie na tenké vrstvě (TLC), plynová chromatografie (GC) a kapilární elektroforéza (CE). BA se v potravinách stanovují také metodami enzymatickými, imunologickými, kapilární izotachoforézou, fluorometricky nebo s pomocí biosenzorů. [47, 57, 58]

Před detekcí je u většiny analytických technik nutné provést extrakci vzorku vhodných extrakčním činidlem. Těmito činidly jsou 0,6M kyselina chloristá, 5 – 10% kyselina trichloroctová a 0,1M kyselina chlorovodíková. U mléčných výrobků je vhodná extrakce biogenních aminů metanolem při zvýšené teplotě. Pro extrakci při zásaditém pH lze použít i butanol nebo směs butanolu a chloroformu. [58]

3.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Detekční limit testů založených na HPLC je kolem 0,1 mg BA/kg vzorku. HPLC je uváděna jako referenční metoda pro zjišťování obsahu histaminu v potravinách, ale lze s ní kvantifikovat i ostatní BA. Tato metoda vyžaduje speciální vybavení a proškolený personál. [31]

Úprava vzorku před vlastní detekcí zahrnuje homogenizaci, extrakci, filtraci resp. centrifugaci a alkalizaci alikvotního podílu kyselého extraktu. Jelikož alifatické BA nevykazují výraznější absorpci záření v UV oblasti, je potřeba aminy převést na vhodný derivát, který bude zároveň stabilní. Existuje několik postupů derivatizace, těmi základními jsou předkolonová a postkolonová. Předkolonová derivatizace se provádí před vlastní chromatografickou separací, kdy volné aminy reagují v alkalickém prostředí s derivatizačním činidlem. Nejčastěji se používá dansylchlorid (5-dimetylaminonaftalen-1-sulfonylchlorid; DANS-Cl). Dalšími vhodnými činidly jsou benzoylchlorid, dabsylchlorid (dimetylamino-azobenzensulfonylchlorid; DABS-Cl), 9-fluorenylmetoxykarbonylchlorid (FMOC), p-toluensulfonylchlorid (TSCl) a o-

ftaldialdehyd (OPA). Při postkolonové derivatizaci reagují aminy s činidlem až po separaci na koloně. Používanými derivatizačními činidly jsou ninhydrin a OPA. [58, 59, 60]

Separace složek vzorku probíhá v koloně se stacionární fází, kterou protéká mobilní fáze. Dnes je nejpoužívanější metodou HPLC systém s reverzní fází (RP-HPLC), kde stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze polární rozpouštědlo. Nejčastějším nosičem stacionární fáze je silikagel s kovalentně navázanými alkylovými řetězci různé délky. Mobilní fázi běžně tvoří voda a s ní mísitelné polární rozpouštědlo (metanol, acetonitril, tetrahydrofuran). [58]

Detekce složek vzorku se provádí elektrochemickými, fluorescenčními a UV/VIS detektory. Výsledkem HPLC analýzy je chromatogram. K identifikaci separovaných látek ve vzorcích se používá porovnání retenčních časů standardů a přítomných látek ve vzorku. [29, 59]

3.2.2 Chromatografie na tenké vrstvě

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) slouží pro svou jednoduchost a instrumentální nenáročnost hlavně pro rychlé orientační stanovení aminů. Rozlišujeme TLC rozdělovací a absorpční. V prvním případě je stacionární fáze tvořena kapalinou zachycenou v tenké vrstvě, kdežto u adsorpční TLC je stacionární fází tuhý adsorbent, který je již součástí tenké vrstvy. Mobilní fáze je v obou případech kapalná. [60, 61]

Podstata TLC spočívá v různé interakci složek vzorku se stacionární fází. Vzorek se nanese ve formě malé kulaté skvrnky na tenkou vrstvu a poté se mobilní fáze nechá vzlínat póry tenké vrstvy, přičemž s sebou unáší dělené látky ze vzorku. Tyto látky se různě adsorbují nebo rozpouštějí ve stacionární fázi a tím se více či méně zpožďují. [61]

Separaci látek na tenké vrstvě předchází jejich derivatizace. Derivatizačním činidlem může být DANS-Cl, který reaguje s primárními i sekundárními aminoskupinami, nebo fluorescein reagující s primárními aminoskupinami. [58]

3.2.3 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) nepatří mezi běžně používané metody pro stanovení BA. Tato metoda je vysoce senzitivní, jejíž detekční limity se pohybují v rozmezí jednotek pikomolů. Příprava vzorku pro GC analýzu vyžaduje derivatizaci aminů za účelem dosažení dostatečné těkavosti analytů. Výtěžek derivatizace je však variabilní a v důsledku toho mohou v kvantifikaci BA vznikat nepřesnosti. [58, 62]

Mobilní fází je v tomto případě nosný plyn přiváděný z tlakové láhve. Podle typu detektoru se volí jako nosný plyn helium, vodík, argon nebo dusík. Kapalné vzorky se do plynu vstřikují přes septum, kde se vlivem vysoké teploty kapalina okamžitě vypaří. Plynné vzorky jsou do plynu vstřikovány plynotěsnou stříkačkou. Chromatografické kolony podle provedení rozlišujeme na náplňové a kapilární. Náplňové kolony jsou naplněny granulovaným nosičem s mikrofilmem stacionární fáze. Kapilární kolony jsou tenké šroubovitě stočené kapiláry, jejichž vnitřní stěny jsou povlečeny stacionární fází. Na výstupu z chromatografické kolony je umístěn detektor. Pro stanovení BA je nejčastěji používán plamenově-ionizační detektor (FID – flame ionization detektor), tepelněvodivostní detektor (TCD – thermal conductivity detector) a detektor elektronového záchytu (ECD – electron capture detector). [58, 63]

3.2.4 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) patří mezi separační metody využívající pohyb nabitých částic, ať už anorganických iontů nebo organických makromolekul (proteiny, fragmenty DNA), v elektrickém poli. Mezi největší výhody této metody patří především její vysoká účinnost, krátké časy analýz a nízká spotřeba chemikálií a dávkovaných vzorků. Ve spojení s laserem indukovanou fluorescenční (LIF) detekcí poskytuje CE vysokou citlivost. [64, 65]

Transport analyzovaných iontů (analytů) a jejich separace probíhá v kapiláře, která propojuje dvě nádobky naplněné roztokem základního elektrolytu (anglicky *background electrolyte*, BGE). Kapilára je většinou z taveného křemene s vnitřním průměrem řádově desítky či stovky mikrometrů a délkou mezi 10 centimetry až 1 metrem. Do roztoku základního elektrolytu v nádobkách jsou vnořeny také elektrody, jimiž se přivádí elektrické napětí obstarávající pohyb iontů. Před vlastním měřením je kapilára naplněna BGE přetlakem nad hladinou kapaliny v jedné nádobce. Potom se jeden konec kapiláry ponoří do nádobky s analyzovaným vzorkem a nasaje se malý objem vzorku. Kapilára se vrátí do nádobky s BGE, vloží se napětí a tím se zahájí separace. Jednotlivé složky vzorku se pohybují rozdílnými rychlostmi směrem ke katodě a v různých časech tak prochází detektorem. Často používanými detektory jsou UV/VIS absorpční detektor, elektrochemický, vodivostní, LIF a MS detektor. [64, 65]

Stejně jako u předešlých chromatografických metod, i zde je potřeba nejprve převést aminy na vhodné deriváty s vysokou absorpcí UV záření a fluorescencí. Volba derivati-

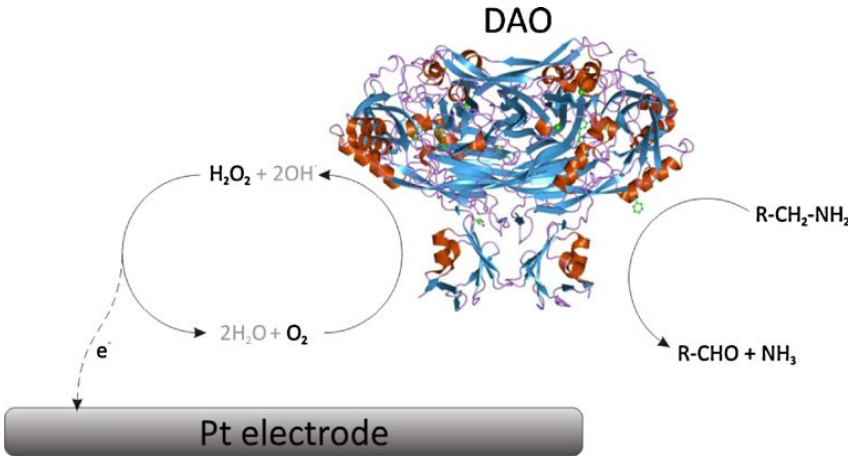
začního činidla je ovlivněna typem detektoru, který bude použit pro detekci separovaných složek, vlastnostmi prostředí, složením analytu a požadovanou úrovní citlivosti. [66]

3.2.5 Stanovení biogenních aminů pomocí biosenzorů

V posledních letech je stále více věnována pozornost metodám stanovení BA pomocí elektrochemických biosenzorů. Tyto metody se vyznačují jednoduchostí, reprodukovatelností, nízkými náklady, krátkou dobou analýzy, nízkým detekčním limitem a také možností aplikace mimo laboratoř. [58, 67]

Biosenzor je analytický přístroj obsahující citlivý prvek biologického původu (např. enzym), který je buď součástí, nebo v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem poskytujícím elektrický signál. Tento signál je přímo úměrný koncentraci analyzované látky. [68]

Biosenzory používané pro detekci BA využívají katalytických schopností animo-oxidáz, které katalyzují oxidaci aminů molekulárním kyslíkem na aldehydy za současného vzniku amoniaku (NH_3) a peroxidu vodíku (H_2O_2). Enzymatická reakce je poté sledována ampérometrickou detekcí elektrochemické oxidace H_2O_2 (Obrázek 3). [67]



Obrázek 3. Sledování enzymatické reakce ampérometrickým měřením elektrochemické oxidace proudu H_2O_2. [67]

Enzymatické optické senzory pro detekci biogenních aminů vyvíjené Ústavem chemických procesů AV ČR jsou také založeny na enzymově katalyzované oxidační deaminaci aminů vzdušným kyslíkem. Spotřeba kyslíku v reakci je v tomto případě detekována zvyšující se fluorescencí, resp. dobou trvání fluorescence organického komplexu ruthenium tris-(1,10-fenantrolin)chloridu. [68]

4 PROBIOTICKÉ BAKTERIE

Probiotika jsou definována jako živé mikroorganizmy, které přispívají ke zlepšení zdravotního stavu hostitele, a to pokud jsou podávány v adekvátním množství. Jako probiotické kultury jsou obvykle používány bakterie, které přirozeně obývají lidský trávicí trakt. Nejpoužívanější jsou bakterie rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium.* [69]

4.1 Historie probiotik

Jako počátek teorie probiotik je nejčastěji uváděn rok 1907, kdy Ilja Mečnikov ve své knize o prodlužování věku „*The prolongation of life. Optimistic studies*" poukázal na příznivé účinky jogurtových bakterií na lidské zdraví. Vycházel při tom z vlastního zjištění, že kavkazští pastýři se dožívají vyššího průměrného věku, oproti obyvatelům Paříže a Američanům, a to právě díky pravidelné konzumaci mléčných kysaných výrobků obsahujících živé bakterie. Mečnikov v knize vysvětluje, že ne všechny mikroorganizmy jsou škodlivé pro lidské zdraví. Některé mikroorganizmy mohou mít naopak přínos v léčbě střevních onemocnění, protože vytlačují škodlivé mikroby a zabraňují tak hnilobným procesům ve střevech. Terapeutických účinků kysaných mléčných výrobků se začalo využívat už v roce 1906, kdy francouzská společnost "*Le Fermente*" dodávala do lékáren fermentované mléko pod názvem "*Lactobacilline*". S první probiotickou bakterií se však vědci setkali už v roce 1899, kdy se Henrymu Tissierovi podařilo izolovat bifidobakterie ze stolice kojenců. [69, 70]

Do historie výzkumu probiotik se zapsal také německý lékař a vědec Alfred Nissle, když v roce 1916 izoloval nepatogenní kmen *Escherichia coli* ze stolice vojáka, který jako jediný odolával infekci úplavice. Tento bakteriální kmen, dodnes používaný k léčbě střevních onemocnění, byl pojmenován „*Escherichia coli* Nissle 1917" [69, 72]

Za necelých deset let po smrti Mečnikova se začal prodávat výrobek získaný kyselým srážením mléka, nazývaný „jogurt", který se rychle rozšířil po Evropě a Severní Americe. Již v této době byla výroba jogurtů založena na fermentačních schopnostech dvou mikroorganizmů izolovaných právě z mléka od kavkazských a bulharských pastevců, *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*. Tehdejší vědci však brzy začali zesměšňovat Mečnikova a jeho tvrzení, protože u konzumentů jogurtů nebyl ve stolici prokázán výskyt těchto dvou bakterií. Terapeutické využití fermentovaných potravin tak přestávalo mít své zastánce. [70, 72]

Ve dvacátých letech japonský mikrobiolog Minoru Shirota zjistil obrannou schopnost některých střevních bakterií proti bakteriálním patogenům a následně se mu podařilo izolovat a kultivovat bakterii, která byla pojmenována *Lactobacillus casei* Shirota. V roce 1935 se v Japonsku začalo s výrobou nápoje obsahující tento mikroorganizmus, tzv. Yakult ®. [70]

V roce 1936 byl zaznamenám další významný příspěvek k Mečnikově teorii. Studie dvou veterinářů, Zobella a Andersena, hovoří hovoří o „mikrobiálním filmu" v tlustém střevě, což je vlastně vrstva z mnoha druhů bakteriálních populací ulpívajících na střevní sliznici, které tak představují komplexní ekosystém s intenzivní metabolickou aktivitou. [70]

Termín *probiotikum* poprvé použili Lilly a Stillwell v roce 1965 pro popis látky vylučovanou jedním prvokem, která stimulovala růst jiného prvoka. Při uvedení tohoto termínu vycházeli autoři z řeckého slova „*pro bios*", což znamená „pro život". [69, 71]

Až do konce 80. let byly jako probiotika označovány nejen živé bakteriální kultury, ale také určité látky (mikrobiální metabolity, enzymy, aminokyseliny apod.) s příznivými účinky na mikroflóru trávicího traktu. Některé z těchto látek však byly v rozporu s významem slova *probiotikum,* protože jejich účinek byl antibiotický. Se smyslu platnou definicí probiotik přišel v roce 1989 Fuller, který probiotika popsal jako živé mikrobiální krmné a potravní doplňky, které příznivě ovlivňují hostitele zlepšením jeho střevní mikrobiocenózy. Dnešní definice probiotik byla přijata Světovou zdravotnickou organizací (WHO) a Organizací pro výživu a zemědělství (FAO) při Organizaci spojených národů (OSN) v roce 2001. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) však tuto definici odmítá, protože obsahuje zdravotní tvrzení, které není měřitelné. [69, 72]

Problematika probiotik, a s nimi souvisejících prebiotik, je dlouhodobě studována celou řadou vědeckých týmů a institucí po celém světě. Také u nás se tato problematika řeší, např. ve Vědeckých výborech pro potraviny (VVP) a pro výživu zvířat (VVVZ), které spadají pod Ministerstvo zemědělství ČR. V roce 2006 byla v ČR založena Společnost pro probiotika a prebiotika (SPP). Cílem všech zmiňovaných institucí je mimo jiné posuzování kvality probiotik a prebiotik. SPP zahájila přípravu udělování loga pro výrobky, které obsahují kvalitní probiotické a prebiotické doplňky. [69]

4.2 Současné využití probiotik

Zájem o probiotika v posledních dvaceti letech zaznamenal značný nárůst, ať už v oblasti výzkumu nebo u spotřebitelů. Pokrok v laboratorních technikách umožňuje identifikovat bakteriální geny a prohlubovat tak znalosti o jednotlivých probiotických kmenech. V současné době se mezi probiotické mikroorganizmy řadí některé bakteriální kmeny rodů *Lactobacillus, Enterococcus, Streptococcus, Lactococcus, Bifidobacterium, Escherichia*, *Bacillus* a *Propionibacterium,* dále pak některé kmeny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a plísně *Aspergillus oryzae.* [69, 71]

Probiotické mikroorganizmy mají uplatnění jak ve výživě lidí, tak zvířat. Běžně se přidávají do mléčných kysaných výrobků (hlavně bifidobakterie a *Lactobacillus casei*), sýrů (bifidobakterie, laktobacily, propionové bakterie), fermentovaných masných výrobků (různé mléčné bakterie), ale i do náplní sušenek a oplatků (*Enterococcus faecium*). Do potravin se společně s probiotiky mohou přidávat i prebiotika. Podle definice od Gibsona a Roberfroida z roku 1995 jsou prebiotika nestravitelné potravní ingredience, které příznivě ovlivňují hostitele prostřednictvím selektivní stimulace růstu a/nebo aktivity určitých bakterií v tlustém střevě. Laicky lze prebiotika nazvat jako „potrava“ pro probiotické bakterie. Další možností podávání probiotik lidem je v podobě různých probiotických preparátů, většinou jako součást alternativní terapie. [69, 71]

Do skupiny probiotických mikroorganizmů, vhodných pro použití v lidské výživě, lze zařadit pouze kmeny, které splňují tyto požadavky [70]:

- nesmí ztrácet své vlastnosti během skladování,
- běžně se vyskytují ve střevech člověka,
- musí odolávat kyselému prostředí žaludku, působení žaludečních šťáv, střevních enzymů a žlučových solí,
- musí kolonizovat střevo a přilnout ke střevním buňkám,
- mají blahodárné účinky na lidské zdraví a jsou antagonisty patogenních mikroorganizmů tím, že produkují antimikrobiální látky,
- jsou bezpečné, nevyvolávají imunitní či jinak škodlivé reakce,
- musí být podávány ve vhodných dávkách při příznivém poměru ceny a účinku.

V klinické praxi je příznivý účinek probiotik pozorován při prevenci a terapii průjmových onemocnění, zánětlivých chorobách a syndromech střev, alergických nemocech

jako je atopický ekzém a astma, v prevenci kolorektálního karcinomu a rakoviny močového měchýře a regulaci hladiny krevního cholesterolu. Některá probiotika také přispívají ke správné funkci metabolizmu, podporují imunitní systém, jsou významným zdrojem vitaminu B_{12} a K, napomáhají trávení potravy a mohou zvyšovat nutriční hodnotu některých potravin tím, že jejich složky dále rozkládají. Navíc udržují ve střevech kyselé pH a vytváří tak nepříznivé životní podmínky pro patogenní mikroorganizmy. [69, 71, 72]

Rozšířené je používání probiotik také v chovu hospodářských zvířat, kde se očekává příznivý vliv jak na zdraví, tak užitkové vlastnosti zvířete. [69]

4.3 Rizika probiotik

Jednou z podmínek použití probiotik je jejich nepatogenita vůči hostitelskému organizmu a tudíž zdravotní komplikace, jako bakteriemie nebo fungemie, vyvolané právě probiotickými mikroorganizmy jsou vcelku vzácné. Odhaduje se, že riziko vzniku bakteriemie po požití probiotických laktobacilů je méně než 1:1 000 000 a riziko vzniku fungemie způsobené kvasinkami *Sachcaromyces boulardii* je asi 1:560 000. Vznik těchto komplikací je pravděpodobnější u jedinců se sníženou imunitou, po hospitalizaci, závažném onemocnění nebo předchozí antibiotické léčbě. [71]

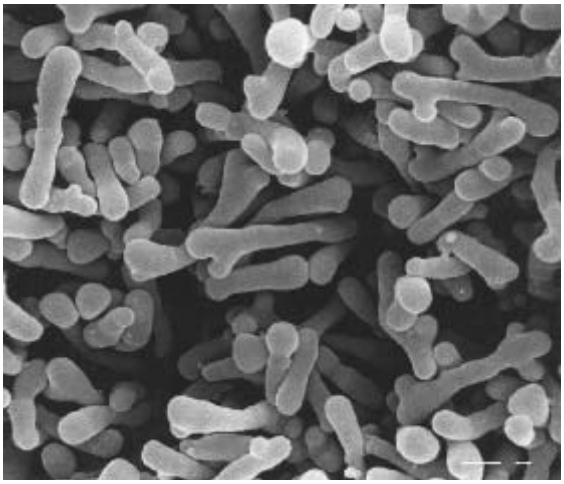
Dalším teoretickým rizikem spojeným s probiotiky je možný transfer antibiotické rezistence probiotických kmenů na patogenní bakterie. Tento jev však dosud nebyl pozorován. [71]

Zde je také potřeba připomenout, že někteří zástupci probiotických kultur patří mezi potenciálními producenty biogenních aminů. [6]

4.4 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie byly objeveny v roce 1899, kdy se Henrymu Tissierovi podařilo izolovat ze stolice kojenců nepravidelné bakterie ve tvaru "Y", které pojmenoval jako *Bacillus bifidus*. V roce 1917 byly tyto bakterie zařazeny do čeledi *Lactobacillaceae* a o tři roky později přejmenovány na *Lactobacillus bifidus*. V roce 1924 dánský mikrobiolog Orla-Jensen navrhl zařazení těchto bakterií do samostatného rodu *Bifidobacterium*. V současné době rod *Bifidobacterium* zahrnuje více než 30 druhů (Tabulka 2). [69, 75]

Zástupci rodu *Bifidobacterium* jsou gram-pozitivní, obligátně anaerobní, nepohyblivé, nesporulující tyčinky různého tvaru (krátké, pravidelné, tenké buňky se špičatými konci, dlouhé buňky mírně zahnuté nebo s výčnělky), různě větvené, jednotlivě, v řetízcích, ve hvězdicovitém nebo palisádovém uspořádání. V závislosti na životních podmínkách mohou buňky růst také ve tvaru "Y" nebo "V" (Obrázek 4). [73, 74]



Obrázek 4. *Bifidobacterium* spp.; rastrovací elektronová mikroskopie; měřítko 1 μm; mikrofotografie byla pořízena na Istituto di Microbiologia, Piacenza University, It. [75]

Optimální teplota pro růst bifidobakterií je 37 až 41 °C, při teplotách pod 20 °C a nad 46 °C nerostou. Výjimkou je *B. thermacidophilum,* který je schopen růst za mírně termofilních podmínek (49,5 °C) a *B. psychroaerophilum*, jehož růst byl pozorován i při 4 °C. Bifidobakterie jsou acidotolerantní mikroorganizmy. Optimální pH růstu je mezi 6,5 a 7,0. Při pH nižším než 4,5 a vyšším než 8,5 růst bakterií již nebyl pozorován. Výjimku tvoří opět *B. thermacidophilum*, který vykazuje pomalý růst i při pH 4. [75, 85]

Bifidobakterie patři do skupiny sacharolytických mikroorganizmů. Hexózy fermentují pomocí charakteristického enzymu fruktóza-6-fosfát-fosfoketoláza po fosfoketolázové dráze (označované také jako "bifid shunt") na kyselinu mléčnou, octovou, mravenčí a etanol. Právě díky schopnosti tvorby kyseliny mléčné jsou bifidobakterie často nesprávně zařazovány mezi bakterie mléčného kvašení. [75, 76]

Bifidobacterium spp. mohou být detekovány v různých ekologických prostředích, jako jsou mléčné výrobky, zubní kazy, odpadní vody a především střeva různých obratlovců a bezobratlých, kde jako součást střevní mikroflóry koexistují s mnoha dalšími bakteriemi. Odhaduje se, že střevní mikroflóra člověka je složena z 500 až 1000 různých bak-

teriálních druhů a jejich celková hmotnost přesahuje jeden kilogram. Složení střevní mikroflóry lidí a zvířat je odlišné a je specifické i pro každého jedince. Typickými bifidobakteriemi kolonizujícími střeva zvířat jsou *Bifidobacterium magnum* a *B. cuniculi* nalezené ve vzorcích králičí stolice, *B. pullorum* a *B. gallinarum* žijící pouze ve střevech kuřat a *B. suis* nalezené jen ve výkalech selat. Skupina "lidských" bifidobakterií zahrnuje druhy, které byly nalezeny ve střevech nebo výkalech dětí nebo dospělých jedinců a kterými jsou *Bifidobacterium pseudocatenulatum, B. catenulatum, B. adolescentis, B. longum, B. breve, B. angulatum* a *B. dentium*. Přehled v současné době uznávaných druhů *Bifidobacterium* a stanovišť, ze kterých byly izolovány jsou uvedeny v Tabulce 2. [74, 75, 76]

Tabulka 2. V současné době uznávané druhy *Bifidobacterium.* [75, 76]

Druh	**Stanoviště**
B. actinicoloniformis	Střevo čmeláka zemního (*Bombus terrestris*)
B. adolescentis	Výkaly dospělého člověka, bachor skotu, ženská vagína
B. angulatum	Lidské výkaly, odpadní vody
B. animalis subsp. *animalis*	Výkaly kuřat, potkanů, králíků, telat a morčat, odpadní vody
B. animalis subsp. *lactis*	Kysané mléko
B. asteroides	Střevo včely medonosné (*Apis mellifera*)
B. bifidum	Výkaly dospělých lidí, kojenců a sajících telat, ženská vagína
B. bohemicus	Střevo čmeláka zemního (*Bombus terrestris*)
B. bombi	Střevo čmeláka zemního (*Bombus terrestris*)
B. boum	Hovězí bachor, výkaly selat
B. breve	Výkaly kojenců a sajících tela, ženská vagína, odpadní vody
B. catenulatum	Výkaly kojenců a dospělých lidí, odpadní vody
B. choerinum	Výkaly selat
B. coryneforme	Střevo včely medonosné (*Apis mellifera*)
B. crudilactis	Syrové mléko a sýry ze syrového mléka
B. cuniculi	Výkaly králíků
B. denticolens	Zubní kazy u lidí
B. dentium	Zubní kazy a dutina ústní lidí, lidské výkaly, abscesy, appendix
B. gallicum	Lidské výkaly
B. gallinarum	Střevo kuřat
B. indicum	Střevo včely medonosné (*A. mellifera*) a včely obrovské (*A. dorsata*)
B. longum subsp. *infantis*	Střeva kojenců, ženská vagína
B. longum subsp. *suis*	Výkaly selat
B. longum subsp. *longum*	Střeva dětí a dospělých lidí, ženská vagína
B. magnum	Výkaly králíků
B. merycicum	Hovězí bachor
B. minimum	Odpadní vody
B. mongoliense	Fermentovaný mléčný výrobek z kobylího mléka
B. pseudocatenulatum	Výkaly dětí a sajících telat, odpadní vody
B. pseudolongum subsp. *globosum*	Výkaly selat, sajících telat, potkanů, králíků a jehňat, hovězí bachor
B. pseudolongum subsp. *pseudolongum*	Výkaly prasat, kuřat, býků, telat, potkanů a morčat
B. psychraerophylum	Prasečí střevo
B. pullorum	Výkaly kuřat
B. ruminantium	Hovězí bachor
B. saeculare	Výkaly králíků
B. scardovii	Výkaly dospělých lidí
B. subtile	Odpadní vody
B. thermophilum	Výkaly prasat, kuřat a sajících telat, hovězí bachor, odpadní vody
B. thermacidophilum	Anaerobní fermentor
B. tsurumiense	Zubní plak křečků

Kolonizace lidského gastrointestinálního traktu (GIT) bakteriemi začíná ihned po narození a je závislá na mnoha faktorech, včetně způsobu porodu (tj. císařským řezem nebo přirozeně) a krmení dítěte (kojení nebo umělá výživa), povahy doplňkové a pokračovací stravy, hygienických podmínek, četnosti a povahy onemocnění (zejména GIT) a vystavování organismu působení antibiotik. Prvními bakteriemi kolonizujícími GIT jsou právě bifidobakterie, doprovázené méně početnými populacemi *Escherichia coli* a bakteriemi z rodů *Bacteroides* a *Clostridium*. [76]

Bifidobakterie žijící ve střevním traktu přispívají svojí aktivitou k udržení zdraví hostitele. Velmi významná je jejich ochranná činnost vůči patogenním mikroorganizmům, a to prostřednictvím tvorby antimikrobiálních látek a/nebo zabránění adheze patogenů, čímž zachovávají správnou rovnováhu střevní mikroflóry. Neméně důležitou vlastností bifidobakterií je schopnost modulace imunitní odpovědi, či rozklad nestravitelných sacharidů na krátké řetězce mastných kyselin (Short Chain Fatty Acids, SCFA) a další organické sloučeniny, z nichž některé mohou být pro hostitele prospěšné. Konkrétně SCFA jsou zdrojem energie pro jaterní a epitelové buňky sliznice tlustého střeva, stimulují adsorpci vody a sodíku v tlustém střevě a indukují enzymy, které podporují obnovu sliznic. [75, 76]

Nejběžnějším druhem používaným v potravinách je *Bifidobacterium animalis*, který se vyznačuje vysokou odolností vůči kyslíku a kyselinám. Pokračující adaptace tohoto druhu na prostředí mléčných fermentovaných výrobků vedla k evoluci nového druhu, klasifikovaného jako *B. lactis*. Podrobnějším zkoumáním tohoto druhu byla zjištěna jeho velmi úzká genetická podobnost s *B. animalis.* Na základě těchto zjištění byl *B. lactis* uznán jako poddruh *B. animalis.* Typickou potravinou obsahující probiotické kmeny *B. animalis* subsp. *lactis* je výrobek firmy Danone probiotický jogurt Activia®. Activia® byla uvedena na trh ve Francii již v roce 1987, prodává se v 71 zemích a její účinky na zdraví konzumentů byly sledovány v sedmnácti klinických studiích. Některé z těchto studií prokázaly, že pravidelná konzumace tří výrobků Activia® denně po dobu dvou týdnů jako součást vyvážené stravy a zdravého životního stylu pomohla vyřešit problém s příliš pomalým průchodem střevního obsahu tlustým střevem. [77, 78, 79]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem praktické části této práce bylo sledovat účinek vybraných faktorů (teploty, pH, koncentrace laktózy) na kinetiku růstu a dekarboxylázovou aktivitu bakterie *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* v podmínkách *in vitro* a v mléce a na základě získaných výsledků formulovat závěry.

Vlastnímu stanovení biogenních aminů metodou RP-HPLC předcházela kultivace bakterií v bujónu a v mléce při různých hodnotách vybraných faktorů, odběr vzorků ve stanovených intervalech a upravení vzorku, které zahrnovalo centrifugaci, extrakci a derivatizaci dansylchloridem.

K pochopení problematiky biogenních aminů bylo také nezbytné zpracovat na toto téma literární rešerši.

6 MATERIÁL A METODIKA

6.1 Použité mikroorganismy

Schopnost produkce biogenních aminů byla sledována u kmene *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 získaného ze Sbírky mlékárenských mikroorganizmů Laktoflora® (Cultures Collection of Dairy Microorganisms; CCDM).

Tento mikroorganizmus je taxonomicky zařazen do domény *Bacteria*, kmene *Actinobacteria,* třídy *Actinobacteria,* řádu *Bifidobacteriales,* čeledi *Bifidobacteriaceae,* rodu *Bifidobacterium* a druhu *Bifidobacterium animalis.* [76]

6.2 Použité chemikálie, přístroje a pomůcky

6.2.1 Přístroje a pomůcky

Příprava vzorků:

- Sterilizátor H+P Varioklav 135S (H+P Labortechnik AG, Německo)
- Tlakový hrnec Test SANO clav (Adolf Wolf SANO clav, Německo)
- Analytické váhy ADVENTURER Pro (OHAUS, New Jersey, USA)
- Inkubátor mikrobiologický (Memmert, Německo)
- Chladnička (Zanussi, Itálie)
- Mrazící box (Whirpool, ČR)
- Box laminární BIO IIA, typ Biohazard (TELSTAR)
- Dávkovač Seripettor® (BRAND, Německo)
- Mikropipety (Biohit, Finsko) + špičky
- Laboratorní sklo – zkumavky, láhve reagenční (Simax, ČR), odměrný válec
- Ostatní – porcelánová lodička na vážení, lžička oboustranná plastová, kovová víčka ke zkumavkám

Úprava vzorků před derivatizací:

- Centrifuga MIKRO 200 (Hettich-Zentrifugen, Německo)
- pH tester (Oakton® instruments, USA)
- Vortex Mixer (Heidolph Reax, Německo)
- Mikropipety (Biohit, Finsko) + špičky
- Mikrozkunavky Eppendorf

- Zkumavky centrifugační s kónickým dnem, krabičky do mrazících boxů – papírové, plastové

Derivatizace:

- Analytické váhy A&D GH-200 EC (LABICOM, ČR)
- Laboratorní třepačka Kavalier LT2 (Votice, ČR)
- Odstředivka EBA 21 (Hettich-Zentrifugen, Německo)
- Termoblok Benchmark Digital HEAT BLOCK (Benchmark Scientific, Inc., New Jersey, USA)
- Hlubokomrazící box (SANYO, Japonsko)
- Mikropipety (Biohit, Finsko) + špičky
- Derivatizační nádobky, vialky

Chromatografie:

- Stříkačkový filtr s porozitou 0,22 μm
- Chromatograf HPLC Agilent Technologies (binární pumpa a autosampler LabAlliance, FLD a DAD detektor Agilent Technologies 1260 Infinity, degaser)
- Kolona Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD

6.2.2 Chemikálie

Příprava kultivační půdy a úprava vzorků před derivatizací:

- 1 mol.l^{-1} HCl (Lachema), 1 mol.l^{-1} NaOH (Ing. Petr Lukeš, ČR)
- Kyselina chloristá 70 - 72% pro analýzu (Merck spol. s r.o, ČR)

Chemikálie použité při přípravě kultivačního média jsou uvedeny v Tabulce 3.

Derivatizace:

- 1,7-heptandiamin (Sigma-Aldrich, USA)
- Hydrogenuhličitan sodný pro analýzu (Merck spol. s r.o, Německo)
- Uhličitan sodný bezvodý pro analýzu (Merck spol. s r.o, Německo)
- Uhličitan draselný pro analýzu (Merck spol. s r.o, Německo)
- Dansylchlorid Bio Reagent ≥ 99% pro HPLC (Sigma-Aldrich, USA)
- Aceton (Merck spol. s r.o, Německo)
- L-Prolin (Sigma-Aldrich, USA)
- Heptan CHROMASOLV®, ≥ 99% pro HPLC (Sigma-Aldrich, USA)

- Acetonitril CHROMASOLV® Plus, ≥ 99,9% pro HPLC (Sigma-Aldrich, USA)

6.3 Příprava kultivačních médií

Kultivace bakterií probíhala v tekuté půdě MRS s přídavkem aminokyselin a v mléku.

Příprava živné půdy MRS zahrnovala navážení jednotlivých složek v množství uvedeném v Tabulce 3 a jejich rozpuštění v odpovídajícím objemu destilované vody. Celkem bylo připraveno pět půd o různé koncentraci laktózy. Poté následovala úprava pH jednotlivých tekutých půd 1 mol.l^{-1} kyselinou chlorovodíkovou, resp. 1 mol.l^{-1} hydroxidem sodným na hodnotu 5, 6 a 7 a jejich rozpipetování po cca 7 ml do připravených zkumavek. Naplněné a zazátkované zkumavky byly sterilovány v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Tímto způsobem bylo získáno 15 sad zkumavek s živnou půdou, při čemž každá sada představovala jednu z množných kombinací pH a koncentrace laktózy:

- pH 5, 6, 7
- laktóza 0; 0,25; 0,5; 1; 4,8 % (w/v).

Tabulka 3. Složení kultivačního média.

Složka	**Množství [g.l^{-1}]**
Proteózo-pepton (HiMedia, Indie)	10,0
Beef extrakt (HiMedia, Indie)	10,0
Yeast extrakt (HiMedia, Indie)	5,0
Tween 80 (Lach-Ner, ČR)	1,0
Citran amonný (Ing. Petr Lukeš, ČR)	2,0
Octan sodný (Ing. Petr Lukeš, ČR)	5,0
Síran hořečnatý (Ing. Petr Lukeš, ČR)	0,1
Síran manganatý (Lach-Ner, ČR)	0,005
Hydrogenfosforečnan didraselný (PENTA, ČR)	2,0
Arginin, ornitin, tyrozin, lyzin (Sigma-Aldrich, USA)	0,3
Laktóza (Sigma-Aldrich, USA)	0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 4,8

K přípravě mléčného kultivačního média bylo použito cca 900 ml rekonstruovaného odstředěného mléka. Polovina tohoto množství byla obohacena o volné aminokyseliny (0,3 % (w/v)). Obě mléka (s aminokyselinami a bez) byla rozdělena na tři díly, u kte-

rých bylo následně upraveno pH na hodnotu 5, 6 a 7. Upravená mléka byla po 7 ml rozpipetována do zkumavek a tepelně ošetřena šetrnou pasterací.

6.4 Příprava bakteriální suspenze

Kultura *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 byla přenesena bakteriální kličkou z pevné půdy do zkumavky s tekutou živnou půdou MRS. Zaočkovaná zkumavka byla ponechána v termostatu 24 hodin při teplotě 37 °C. Po uplynutí této doby bylo přeneseno 100 µl promíchané suspenze buněk do další zkumavky s MRS, která byla opět uložena v termostatu do druhého dne. Druhý den bylo suspenzí zaočkováno dalších šest zkumavek s MRS a opět kultivováno za stejných podmínek. Následující den byla kultura připravena k zaočkování všech sad zkumavek s mlékem a obohaceným MRS médiem.

6.5 Zaočkování, kultivace a odběr vzorků

Do sterilních médií bylo přeneseno 100 µl suspenze bakteriálních buněk a obsah byl promíchán. Celkem bylo zaočkováno 270 zkumavek s obohacenou půdou MRS a 108 zkumavek s mlékem. Ze všech zaočkovaných sad zkumavek byla třetina uložena do termostatu vytemperovaného na 37 °C a dvě třetiny byly uloženy do chladničky, kde teplota dosahovala 10 °C. K zaočkovaným zkumavkám byly do chladničky i termostatu přidány také zkumavky nezaočkované, které sloužily jako vzorky kontrolní. V následujících 14 dnech bylo provedeno celkem šest odběrů vzorků:

36 °C: 1. odběr po 24 hodinách,

2. odběr po 48 hodinách,

10 °C: 1. odběr po 72 hodinách (3 dnech),

2. odběr po 168 hodinách (7 dnech),

3. odběr po 240 hodinách (10 dnech),

4. odběr po 336 hodinách (14 dnech).

Pokaždé byly odebírány tři vzorky paralelně (tři zkumavky z každé sady) a jeden vzorek kontrolní.

6.6 Extrakce vzorků

Z důvodu sledování intenzity metabolizmu a produkce kyselin bakteriemi bylo u odebraných zkumavek změřeno pH kultivačního média. Obsah zkumavek byl promíchán a přelit do plastových centrifugačních zkumavek. Poté byly vzorky odstředěny na centrifuze při 4600 ot./min po dobu 15 minut. Z jednotlivých získaných supernatantů bylo pipetováno vždy 600 µl do dvou mikrozkumavek Eppendorf se stejným objemem 0,6M kyseliny chloristé. Takto připravené kyselé extrakty vzorků byly uchovávány v mrazícím boxu až do doby dalších úprav.

6.7 Předkolonová derivatizace

Před vlastní HPLC analýzou byly připravené extrakty vzorků podrobeny derivatizaci dansylchloridem.

Do derivatizačních nádobek bylo postupně odpipetováno 100 µl vnitřního standartu (1,7-heptandiamin v koncentraci 500 $mg.l^{-1}$), 1 ml kyselého extraktu a 1,5 ml karbonátového pufru o pH 11,0 – 11,1. Pufr bylo potřeba připravit čerstvý. Ke 0,5M roztoku $NaHCO_3$ byl přidáván 0,5M roztok Na_2CO_3 až do dosažení pH směsi 9,2. Poté byl k tomuto roztoku přidán uhličitan draselný v množství 0,333 g na 1 ml pufru.

V dalším kroku byly do derivatizačních nádobek přidány 2 ml čerstvě připraveného derivatizačního činidla (roztok dansylchloridu v acetonu v koncentraci 5 $g.l^{-1}$). Takto naplněné nádobky byly uzavřeny a v temnu třepány 20 hodin. Po ukončení třepání bylo ke vzorkům přidáno 200 µl roztoku prolinu, nádobky byly opět uzavřeny a třepány další hodinu. Následně byly vzorky zředěny 3 ml heptanu a tři minuty ručně protřepávány. Z vyčeřené heptanové vrstvy byl odpipetován 1 ml do vialky, jejíž obsah byl poté odpařen při teplotě 60 °C pod proudem dusíku do sucha. Suché odparky byly nakonec zředěny 1,5 ml acetonitrilu. Až do doby HPLC analýzy byly vzorky uchovávány v mrazícím zařízení při teplotě pod -18 °C

6.8 Chromatografické stanovení obsahu biogenních aminů

Derivatizované vzorky byly po danzylaci přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 µm a nanášeny na kolonu chromatografického systému. Analýza byla realizována na chromatografu HPLC Agilent Technologies, který se skládal z binární pumpy LabAlliance, autosampleru LabAlliance, DAD a FLD detektoru Agilent Technologies a

degaseru. Separace derivátů BA byla provedena na koloně Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD o rozměrech 50 x 3 mm a velikosti částic pevné fáze 1,8 μm. Vzorky byly měřeny při vlnové délce 254 nm pomocí DAD detektoru Agilent Technologies 1260 Infinity. Separace probíhala dle elučního programu uvedeného v Tabulce 4.

Tabulka 4. Eluční program.

Čas [min]	Obsah acetonitrilu v mobilní fázi [%]	
	10% (v/v) acetonitril	100% (v/v) acetonitril
do 0,1	41	59
do 1,9	37	63
do 3,5	18	82
do 4,0	0	100
do 9,5	0	100
do 11,5	41	59
do 15,5	41	59

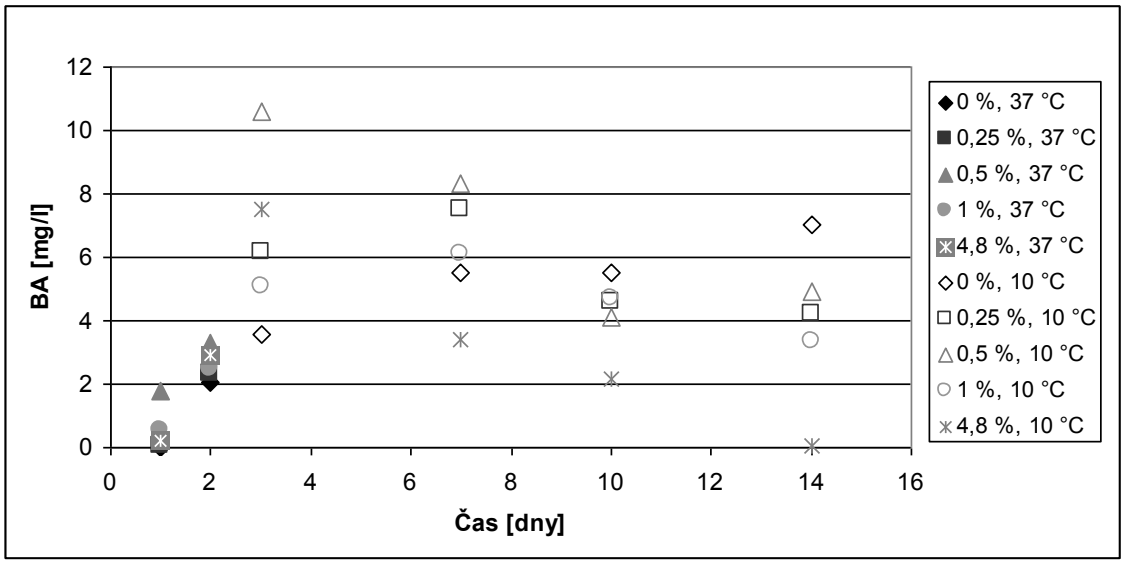
7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Sledování vlivu vnějších faktorů na produkci biogenních aminů u *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239

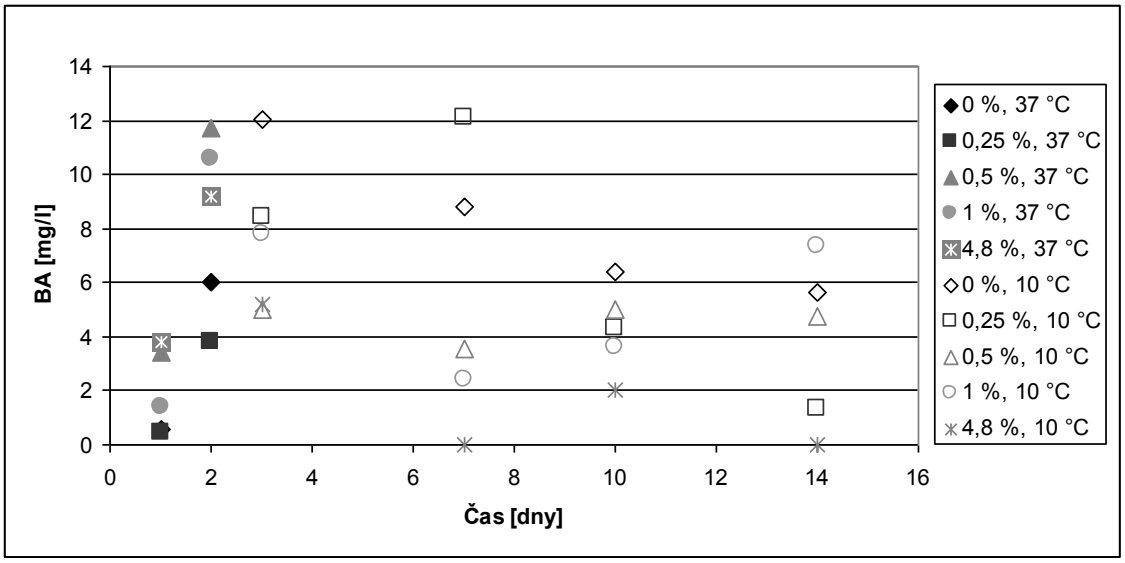
Produkce biogenních aminů bakterií byla sledována v období 14 dnů v podmínkách *in vitro* a v mléce při různých podmínkách kultivace. V prvním případě byla zjištěna produkce šesti biogenních aminů - tryptaminu (TRYP), putrescinu (PUT), kadaverinu (CAD), tyraminu (TYM), spermidinu (SPD) a sperminu (SPM). V mléce mikroorganizmus produkoval PUT, CAD, TYM a SPM.

7.1.1 Sledování produkce BA v podmínkách *in vitro*

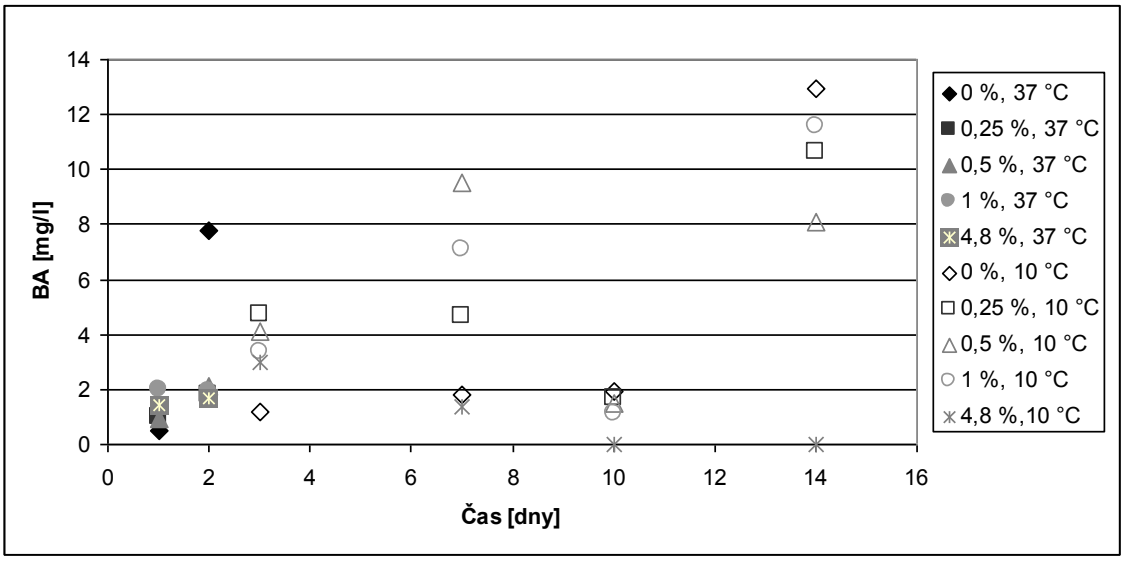
Produkce BA bakterií *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 byla sledována v období 14 dnů v médiu bez přídavku a s přídavkem 0,25; 0,5; 1,0 a 4,8% (w/v) laktózy a při počátečním pH 5, 6 a 7. Vzorky byly kultivovány při 37 a 10 °C. Kultivace při teplotě 37 °C probíhala po dobu 24 a 48 hodin od zaočkování. Vzorky z 10 °C byly odebírány po 3, 7, 10 a 14 dnech. Průběh změn celkového množství BA v závislosti na pH a koncentraci laktózy během 14 dnů je graficky znázorněn na Obrázcích 5 – 7.



Obrázek 5. Produkce biogenních aminů kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 při pH 5.



Obrázek 6. Produkce biogenních aminů kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 při pH 6.



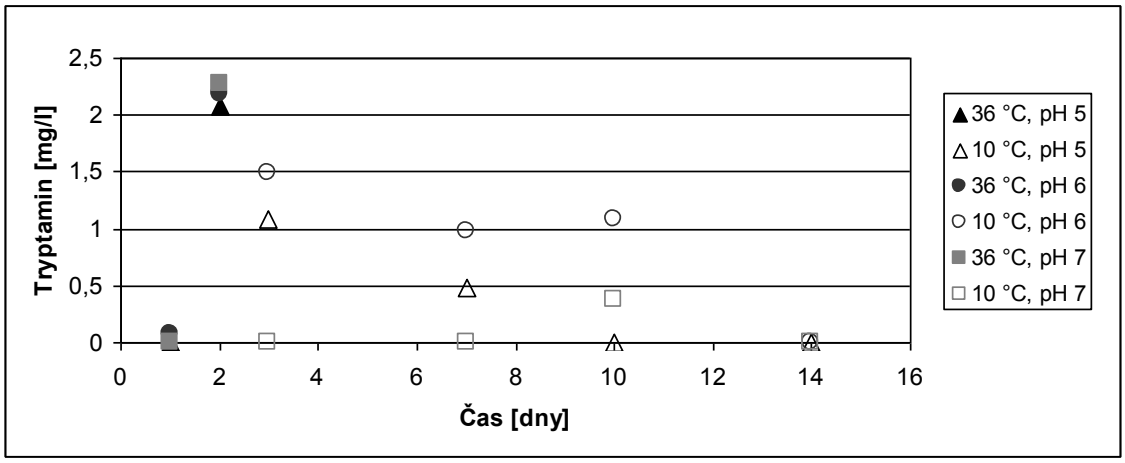
Obrázek 7. Produkce biogenních aminů kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 při pH 7.

Nejvyšší dekarboxylázová aktivita sledovaného kmene kultivovaného při 37 °C byla pozorována v médiu s 0,5 a 1,0 % (w/v) laktózy a počáteční hodnotou pH 6 (Obr. 6). V médiu s 0,5 % (w/v) laktózy byl celkový obsah BA po dvou dnech kultivace 11,7 $mg.l^{-1}$ a v médiu s 1 % (w/v) laktózy 10,6 $mg.l^{-1}$. Nejnižší produkce BA byla zaznamenána v bujónu s výchozím pH 7 (Obr. 7). V tomto prostředí byla navíc tvorba PUT a SPD zcela inhibována. Kyselé prostředí (pH 5) se také neprojevilo jako vhodné pro produkci většiny sledovaných BA (Obr. 5). Koncentrace PUT, TYM, SPD a SPM byly i po dvou dnech kultivace na nulové hodnotě při všech koncentracích laktózy.

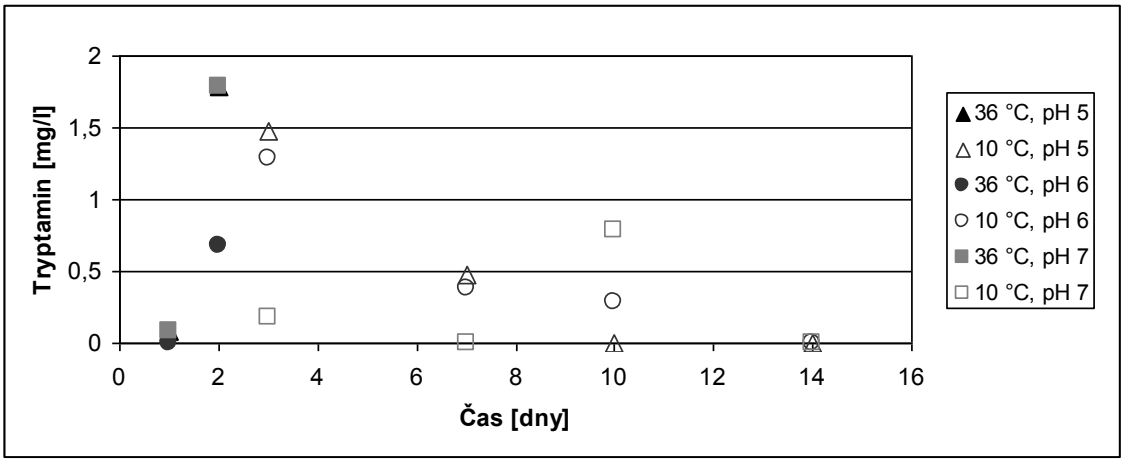
CAD byl tvořen až od 0,25 % (w/v) laktózy v médiu a dále se zvyšující se koncentrací sacharidu jeho produkce rostla. Při pH 5 byl nejvíce produkován TRYP, a to hlavně při 0,5 % (w/v) laktózy v bujónu (2,6±0,6 $mg.l^{-1}$). Tvorba PUT a SPD nebyla zaznamenána ani při pH 6. Naopak toto prostředí působilo stimulačně na produkci SPD (až 5,8±0,1 $mg.l^{-1}$ při 4,8 % (w/v) laktózy).

U vzorků odebraných třetí den kultivace byla zjištěna nejvyšší produkce BA při pH 6 a bez laktózy (12,0 $mg.l^{-1}$) (Obr. 6). V prostředí nejnižšího pH (pH 5) byl celkový obsah BA o něco nižší, přičemž nejvíce BA bylo vyprodukováno v médiu s 0,5 % (w/v) laktózy (10,6 $mg.l^{-1}$) (Obr. 5). Obsah BA v médiu o počátečním pH 7 po prvních třech dnech kultivace nepřesáhl hodnotu 4,7 $mg.l^{-1}$ (Obr. 7). Na konci sledovaného období bylo ve většině vzorcích kultivovaných při 10 °C stanoveno méně BA než při prvním odběru z této teploty. Výjimku tvořily vzorky s pH 7 a 0 – 1 % (w/v) laktózy, u kterých koncentrace BA v čase rostla. Největší nárůst obsahu BA byl zaznamenán v prostředí bez sacharidu. Po 14 dnech kultivace toto médium obsahovalo 12,92 $mg.l^{-1}$ biogenních aminů.

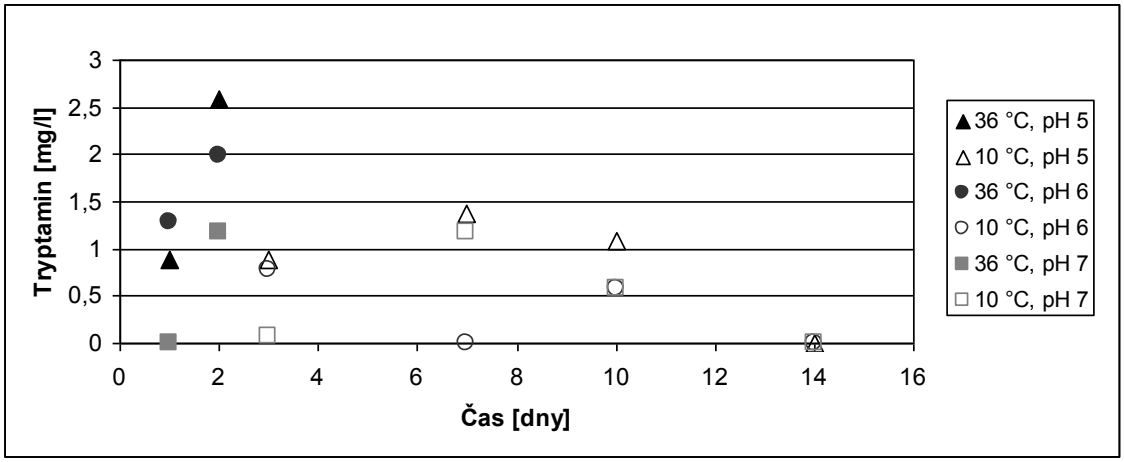
V prvních třech dnech kultivace v 10 °C byla tvorba TRYP nejintenzivnější při pH 6 a koncentraci laktózy 0 % (w/v) (1,5±0,6 $mg.l^{-1}$). V dalších dnech se obsah TRYP snižoval až na nulovou hodnotu. Podobný průběh se stejným výsledkem byl pozorován i ve zbývajících prostředích (Obrázek 8 – 12).



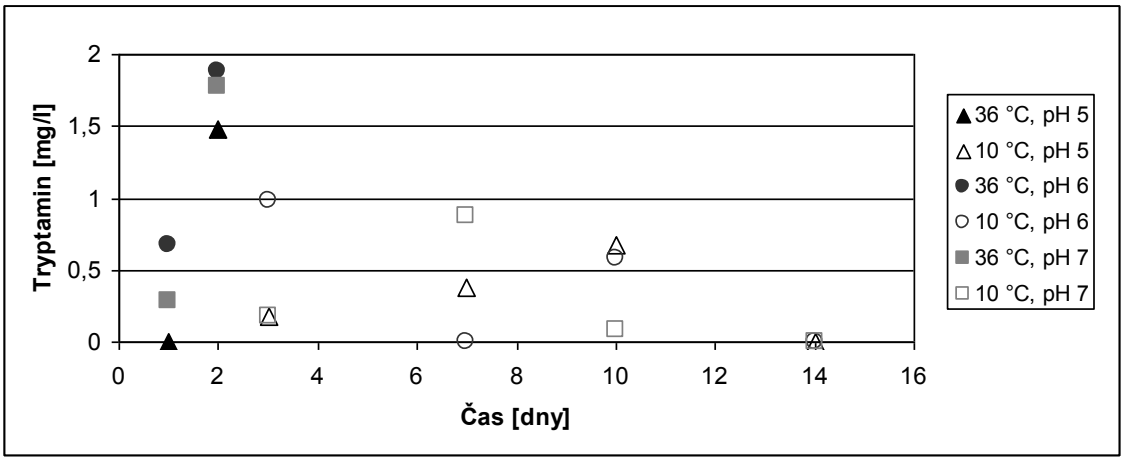
Obrázek 8. Produkce tryptaminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0 % (w/v) laktózy.



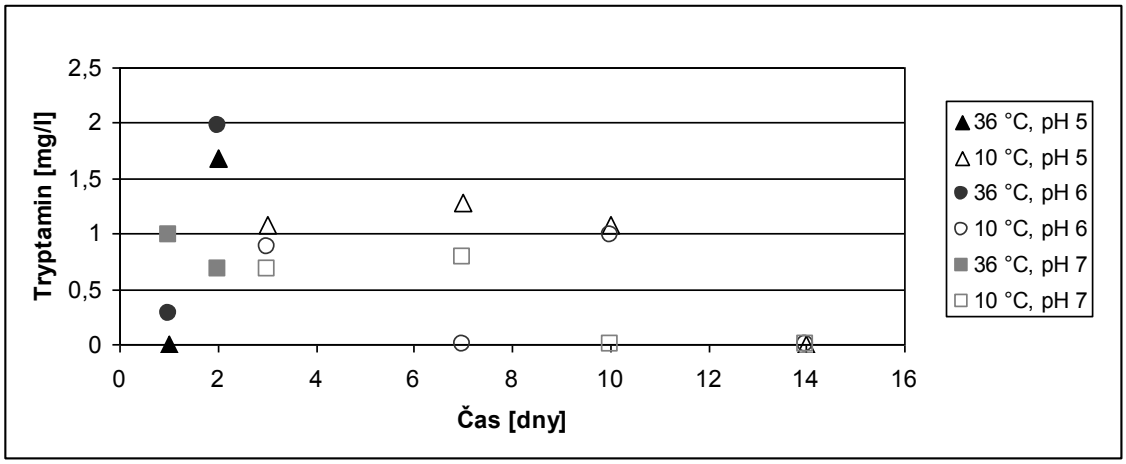
Obrázek 9. Produkce tryptaminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0,25 % (w/v) laktózy.



Obrázek 10. Produkce tryptaminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0,5 % (w/v) laktózy.

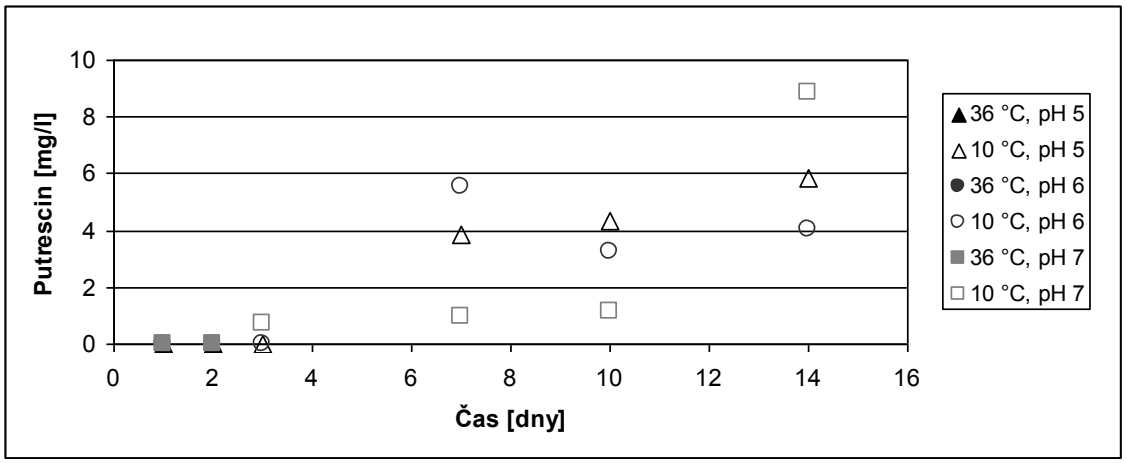


Obrázek 11. Produkce tryptaminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 1 % (w/v) laktózy.

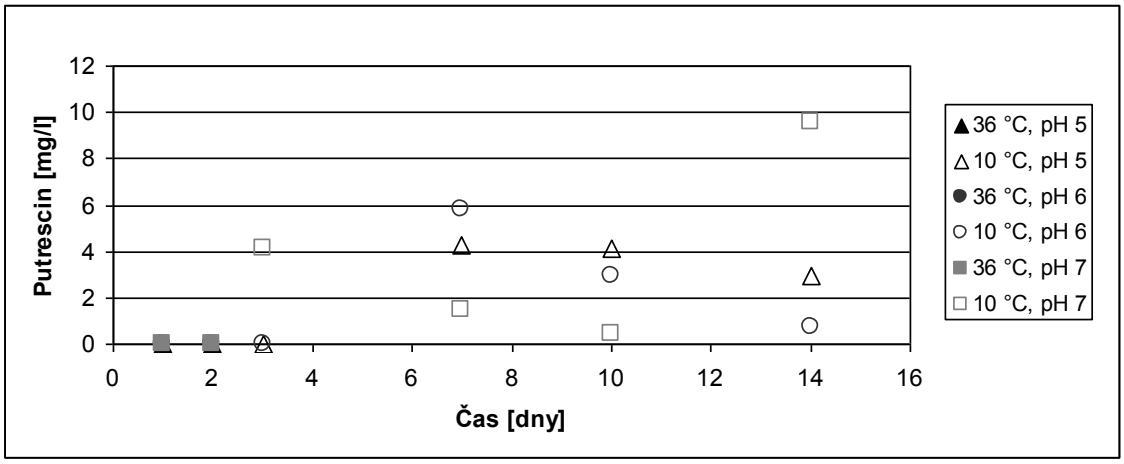


Obrázek 12. Produkce tryptaminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 4,8 % (w/v) laktózy.

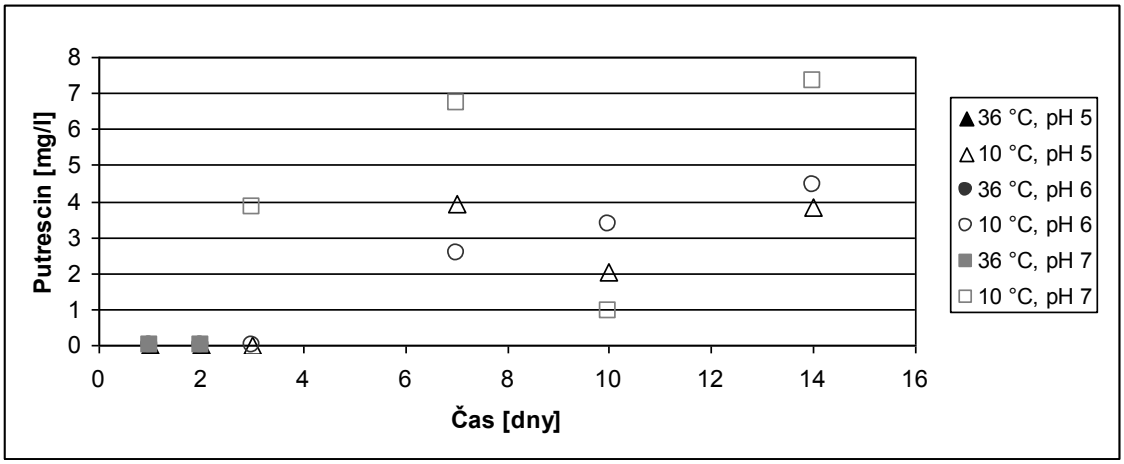
Na produkci PUT působilo stimulačně především vyšší pH. Jeho produkce po třech dnech kultivace byla zaznamenána jenom při pH 7 s maximem (4,1±0,4 $mg.l^{-1}$) při 0,25 % (w/v) laktózy v prostředí. Při druhém odběru byl PUT detekován i v prostředí o pH 5 a 6. Z grafického zpracování (Obrázek 13 – 17) zjištěných koncentrací PUT ve vzorcích odebíraných v průběhu 14 dnů je zřejmé, že vysoká koncentrace zkvasitelného sacharidu v prostředí zcela inhibuje schopnost sledovaného bakteriálního kmene produkovat tento amin.



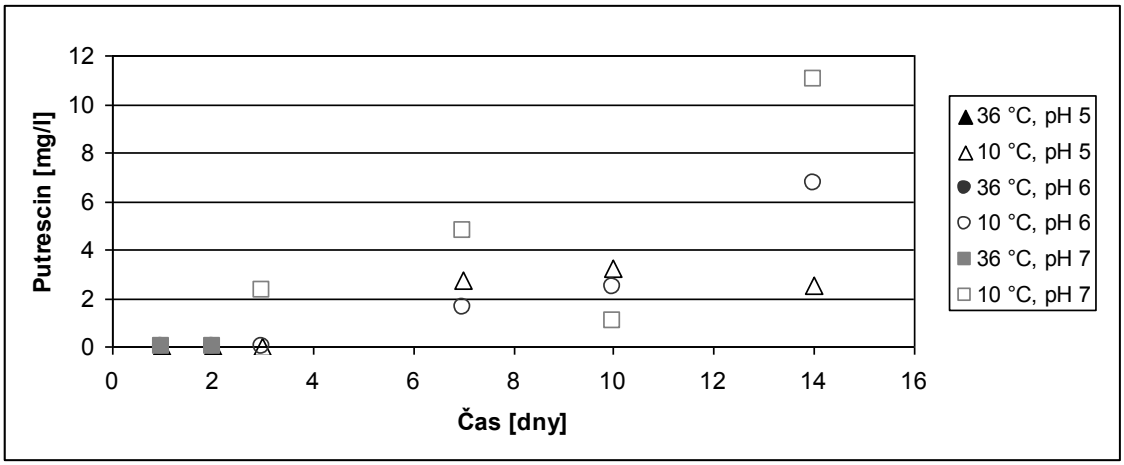
Obrázek 13. Produkce putrescinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0 % (w/v) laktózy.



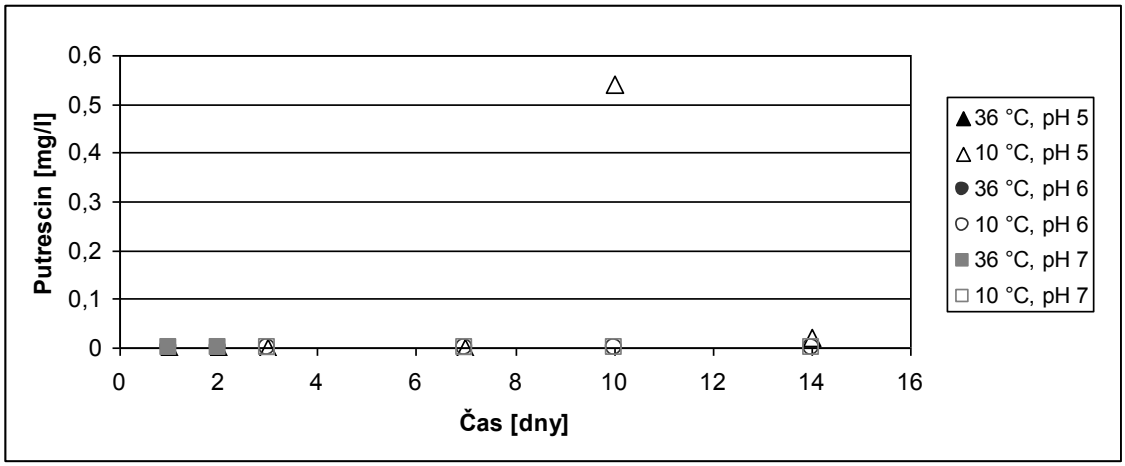
Obrázek 14. Produkce putrescinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0,25 % (w/v) laktózy.



Obrázek 15. Produkce putrescinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0,5 % (w/v) laktózy.

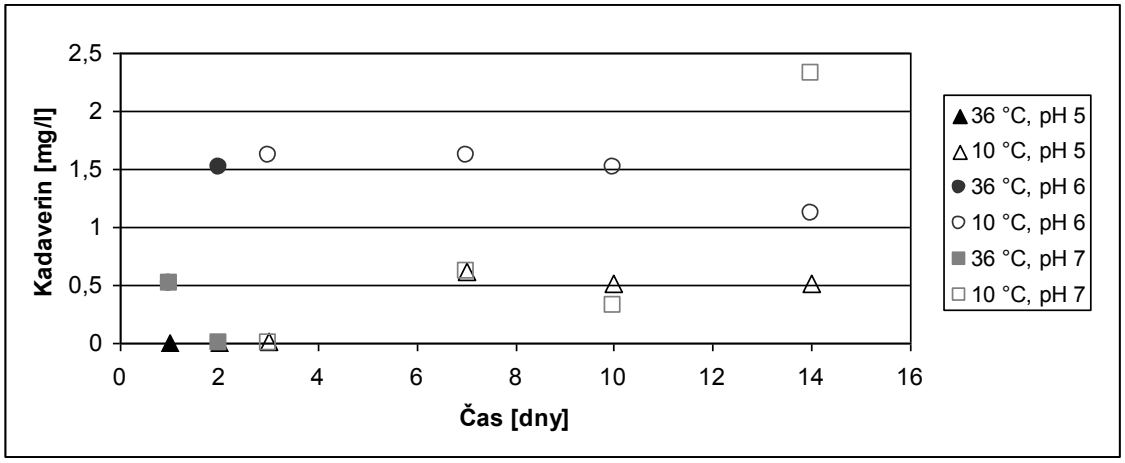


Obrázek 16. Produkce putrescinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 1 % (w/v) laktózy.

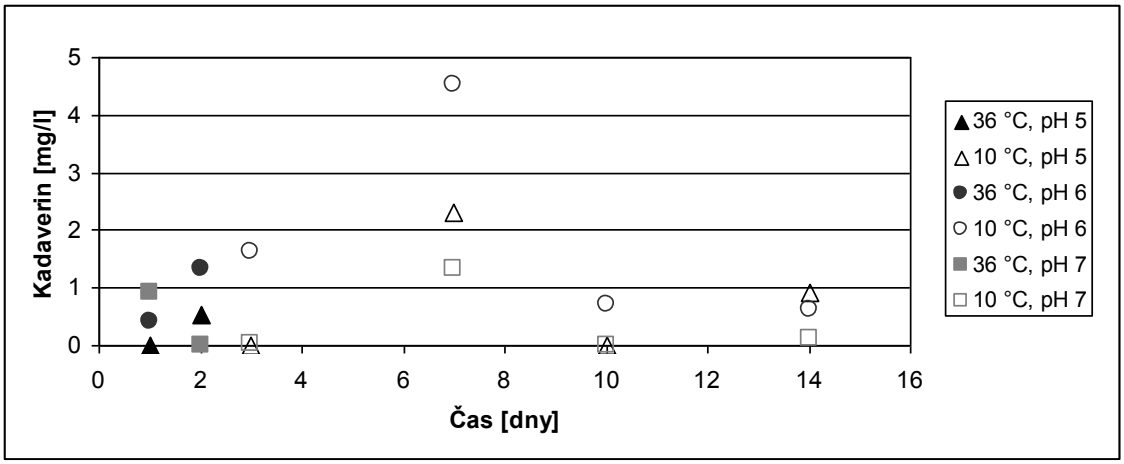


Obrázek 17. Produkce putrescinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 4,8 % (w/v) laktózy.

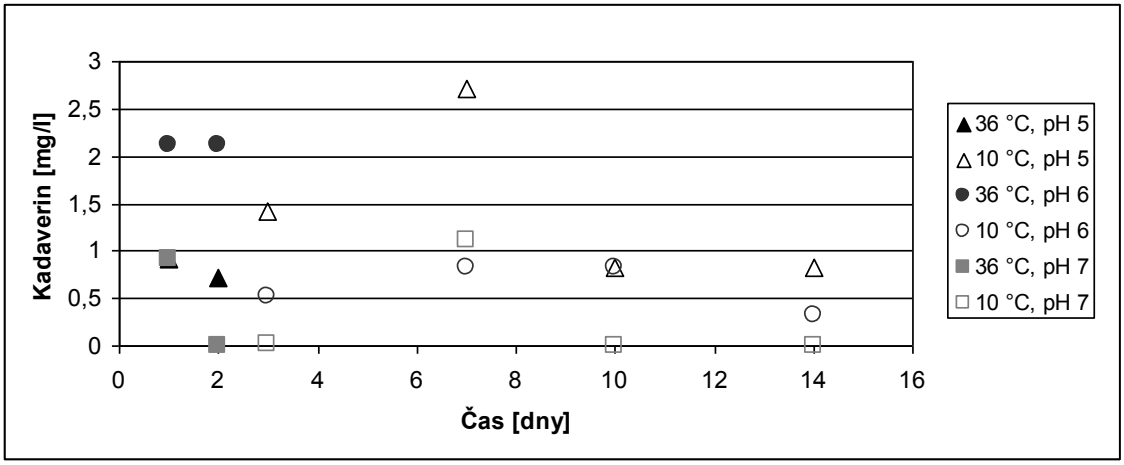
Výsledky stanovení CAD jsou k vidění na Obrázku 18 – 22. Nižší tvorba CAD byla pozorována v pH 7. Nejvíce CAD obsahovaly vzorky odebrané 7. den kultivace při střední hodnotě pH a 0,25 % (w/v) laktózy (4,5±0,5 mg.l^{-1}).



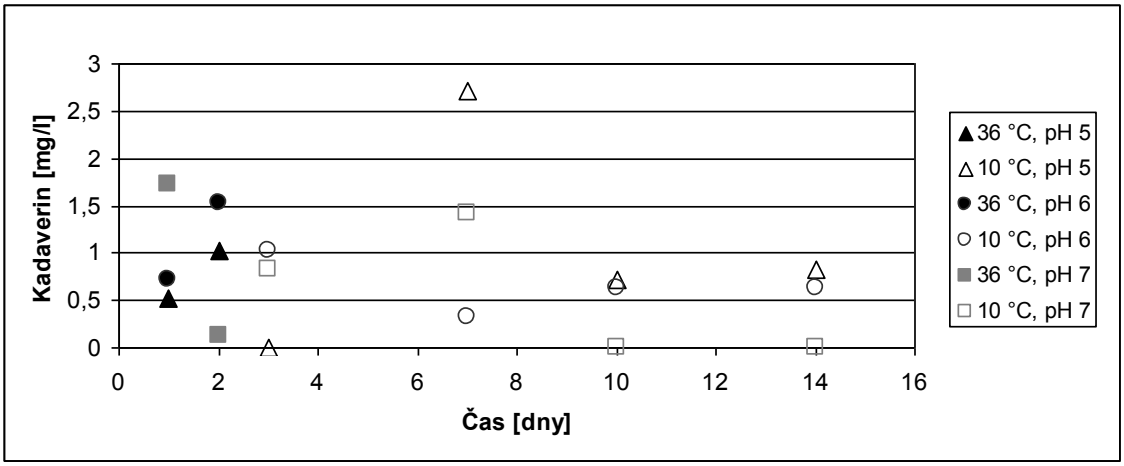
Obrázek 18. Produkce kadaverinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0 % (w/v) laktózy.



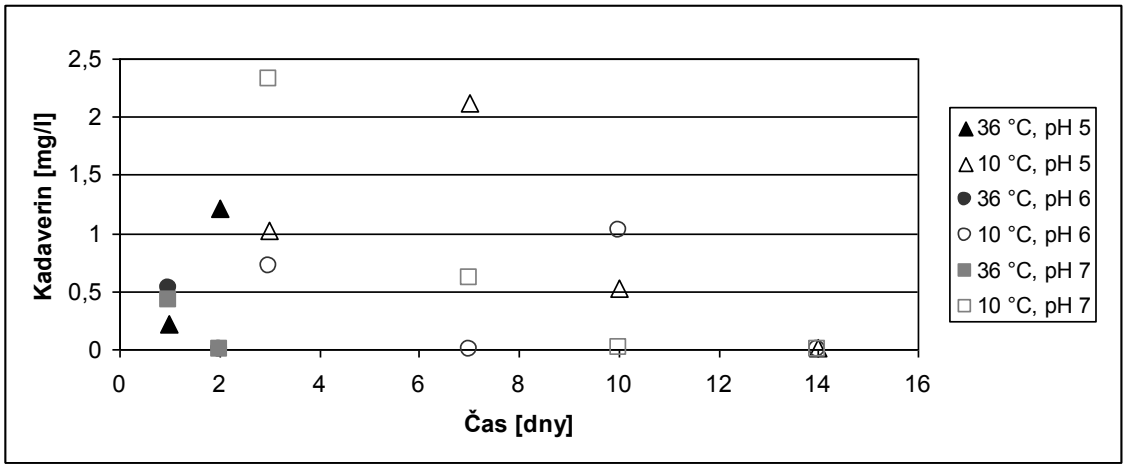
Obrázek 19. Produkce kadaverinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0,25 % (w/v) laktózy.



Obrázek 20. Produkce kadaverinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0,5 % (w/v) laktózy.



Obrázek 21. Produkce kadaverinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 1 % (w/v) laktózy.



Obrázek 22. Produkce kadaverinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 4,8 % (w/v) laktózy.

Přítomnost TYM a SPM vyprodukovaného sledovaným kmenem při teplotě 10 °C byla zjištěna pouze ve vzorcích z prvního odběru s pH 5 a 6 (Příloha 1 a 2). Na produkci SPD působilo stimulačně vyšší pH. Přesto však byl tento amin během sledovaného období tvořen v nevýznamném množství, přičemž v prostředí s 4,8 % (w/v) laktózy nebyl vůbec detekován, jak lze vidět na obrázcích v Příloze 3.

7.1.2 Sledování produkce BA v mléce

Dekarboxylázová aktivita bakterie *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 v mléce byla pozorována v období 14 dnů v závislosti na pH, teplotě a přídavku volných aminokyselin, jež měly sloužit jako prekurzory biogenních aminů. Odběr vzorků probíhal ve stejných dnech jako v podmínkách *in vitro* (v MRS bujónu).

Z výsledků HPLC analýzy vyplývá, že mléko samo o sobě sledovanému bakteriálnímu kmenu neposkytuje vhodné podmínky pro tvorbu BA. Ve většině vzorků nebyly detekovány žádné BA bakteriálního původu. Pokud v některých vzorcích byla prokázána přítomnost některého aminu, bylo jeho množství nevýznamné. Některé BA byly dokonce již přirozenou součástí mléka. Kompletní výsledky jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5: Výsledky stanovení BA (mg.l^{-1}) v mléce bez přídavku aminokyselin.

pH 5, bez AK								
Den/teplota	TRYP	PEA	PUT	CAD	HIM	TYM	SPD	SPM
1/37 °C	ND	ND	0,2	ND	ND	0,9	ND	ND
2/37 °C	ND	ND	0,1	ND	ND	ND	ND	ND
3/10 °C	ND	ND	0,2	ND	ND	ND	ND	ND
7/10 °C	ND	ND	0,1	ND	ND	ND	ND	ND
10/10 °C	ND	ND	0,4	0,9	ND	0,8	ND	ND
14/10 °C	ND	ND	0,1	ND	ND	ND	ND	ND
pH 6, bez AK								
Den/teplota	TRYP	PEA	PUT	CAD	HIM	TYM	SPD	SPM
1/37 °C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2/37 °C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3/10 °C	ND	ND	0,1	ND	ND	1,1	ND	0,1
7/10 °C	ND	ND	ND	ND	ND	1,1	ND	ND
10/10 °C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14/10 °C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
pH 7, bez AK								
Den /teplota	TRYP	PEA	PUT	CAD	HIM	TYM	SPD	SPM
1/37 °C	ND	ND	0,1	ND	ND	ND	ND	ND
2/37 °C	ND	ND	0,1	ND	ND	ND	ND	ND
3/10 °C	ND	ND	0,1	ND	ND	ND	ND	ND
7/10 °C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10/10 °C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14/10 °C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Kontrola							
TRYP	PEA	PUT	CAD	HIM	TYM	SPD	SPM
ND*	ND*	1,8	ND*	ND*	ND*	ND*	2,3

TRYP – tryptamin, PEA – fenyletylamin, PUT – putrescin, CAD –kadaverin, HIM – histamin, TYM – tyramin, SPD – spermidin, SPM – spermin, AK – aminokyseliny, ND – nebylo detekováno

Dekarboxylázová aktivita testovaného kmene *B. animalis* subsp. *lactis* v mléce obohaceném o 0,3 % (w/v) volných aminokyselin byla na velmi vysoké úrovni. Toto prostředí vytvářelo příznivé podmínky především pro tvorbu SPM, který v neobohaceném mléce nebyl téměř vůbec produkován. Koncentrace SPM v obohaceném mléce dosáhla po dvou dnech kultivace při teplotě 37 °C úrovně až 82,9±4,4 mg.l^{-1} v prostředí s pH 6. Při teplotě 10 °C byla tvorba SPM v tomto prostředí již nižší. Třetí den kultivace bylo v médiu stanoveno 51,4±1,8 mg.l^{-1} SPM a poslední den 57,1±4,3 mg.l^{-1} SPM. V prostředí s pH 5 při 37 °C bylo po 48 hodinách od zaočkování vyprodukováno 74,7±5,6 mg.l^{-1} SPM. Při teplotě 10 °C byla tvorba tohoto aminu opět nižší, přičemž do sedmého dne kultivace koncentrace SPM v médiu rostla a v dalších dnech opět klesala. Také při pH 7 bylo vyprodukováno značné množství SPM, a to především během kulti-

vace při 37 °C, kdy se obsah SPM vyšplhal až na 67,0±4,0 mg.l^{-1}. Při 10 °C a pH 7 byla aktivita sledovaného kmene ve tvorbě SPM oproti tomu poloviční.

B. animalis subsp. *lactis* CCDM 239 v obohaceném mléce produkoval v menším množství také PUT. Tvorba PUT byla podpořena nízkým pH (pH 5) a teplotou 10 °C. Na konci sledovaného období bylo v mléce za těchto podmínek stanoveno 2,5±0,4 mg.l^{-1} PUT.

V Tabulce 6 jsou shrnuty výsledky stanovení BA v mléce obohaceném o aminokyseliny. V některých vzorcích bylo detekováno také malé množství CAD a TYM. Tyto výsledky však nejsou dostačující pro vyvozování jakýchkoli závěrů.

Tabulka 6: Výsledky stanovení BA (mg.l^{-1}) v mléce obohaceném o aminokyseliny.

pH 5, AK								
Den/teplota	TRYP	PEA	PUT	CAD	HIM	TYM	SPD	SPM
1/37 °C	ND	ND	0,2	ND	ND	1,2	ND	73,6
2/37 °C	ND	ND	0,8	ND	ND	ND	ND	74,7
3/10 °C	ND	ND	0,6	ND	ND	ND	ND	61,9
7/10 °C	ND	ND	2,3	ND	ND	ND	ND	73,6
10/10 °C	ND	ND	2,4	0,9	ND	0,8	ND	56,5
14/10 °C	ND	ND	2,5	ND	ND	ND	ND	49,9
pH 6, AK								
Den/teplota	TRYP	PEA	PUT	CAD	HIM	TYM	SPD	SPM
1/37 °C	ND	ND	0,3	ND	ND	ND	ND	68,6
2/37 °C	ND	ND	0,3	ND	ND	ND	ND	82,9
3/10 °C	ND	ND	0,2	ND	ND	ND	ND	51,4
7/10 °C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	48,4
10/10 °C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	47,4
14/10 °C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	57,1
pH 7, AK								
Den/teplota	TRYP	PEA	PUT	CAD	HIM	TYM	SPD	SPM
1/37 °C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	40,2
2/37 °C	ND	ND	1,7	ND	ND	ND	ND	67,0
3/10 °C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	35,2
7/10 °C	ND	ND	0,3	ND	ND	ND	ND	33,0
10/10 °C	ND	ND	0,2	ND	ND	ND	ND	33,9
14/10 °C	ND	ND	0,3	1	ND	1	ND	34,1
Kontrola								
TRYP	PEA	PUT	CAD	HIM	TYM	SPD	SPM	
ND	ND	1,8	ND	ND	ND	ND	2,3	

TRYP – tryptamin, PEA – fenyletylamin, PUT – putrescin, CAD –kadaverin, HIM – histamin, TYM – tyramin, SPD – spermidin, SPM – spermin, AK – aminokyseliny, ND – nebylo detekováno

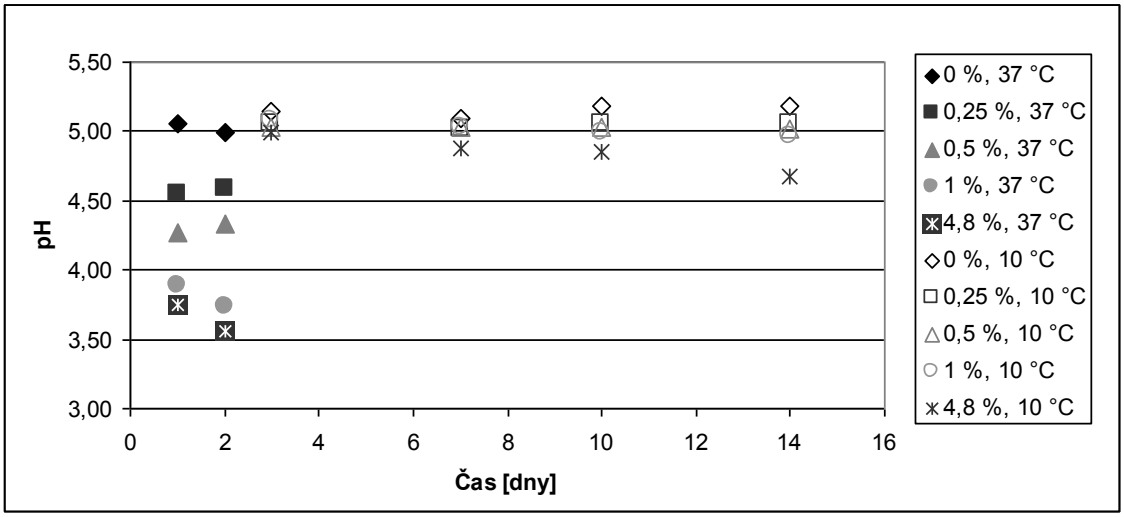
7.2 Sledování změn pH kultivačního média během kultivace *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239

Na základě znalostí o metabolizmu bifidobakterií lze předpokládat, že pH kultivačního média bude v čase více či méně klesat. Rychlost poklesu pH bude také značně ovlivněna přítomností zkvasitelného sacharidu, z něhož anaerobní oxidací vznikají organické kyseliny.

7.2.1 Sledování změn pH bujónu

Jak bylo předpokládáno, koncentrace laktózy v médiu značně ovlivnila produkci kyselin, a tím i pokles pH prostředí. Kompletní výsledky jsou graficky znázorněny na Obrázcích 23 – 25.

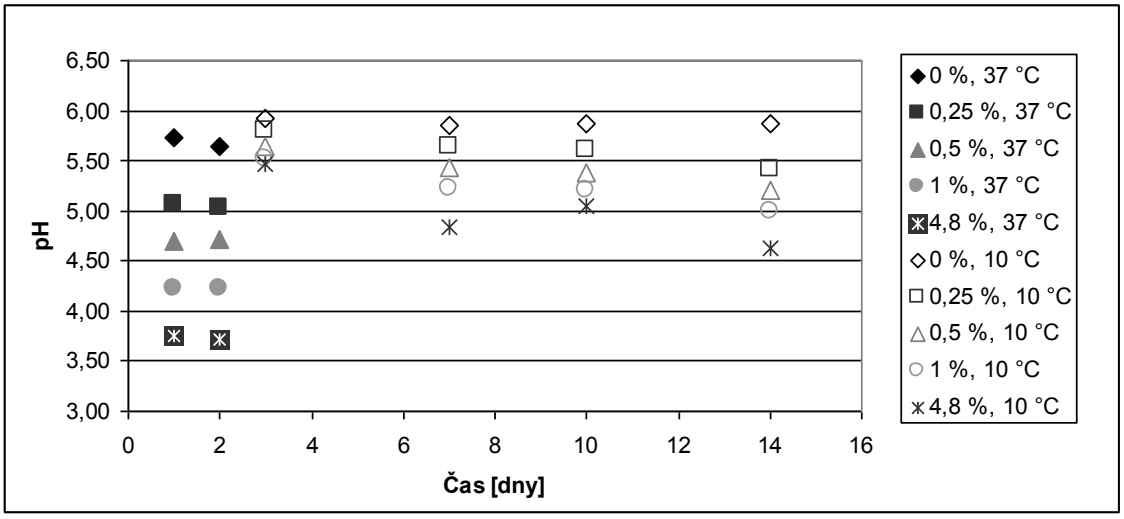
Nejvýraznější změny byly zaznamenány v médiích obsahujících 4,8 % (w/v) laktózy a naopak k minimálnímu okyselení došlo v prostředí bez laktózy. V médiích s počátečním pH 5 a nulovou koncentrací sacharidu byl dokonce od sedmého dne kultivace při teplotě 10 °C pozorován pozvolný růst pH (Obr. 23).



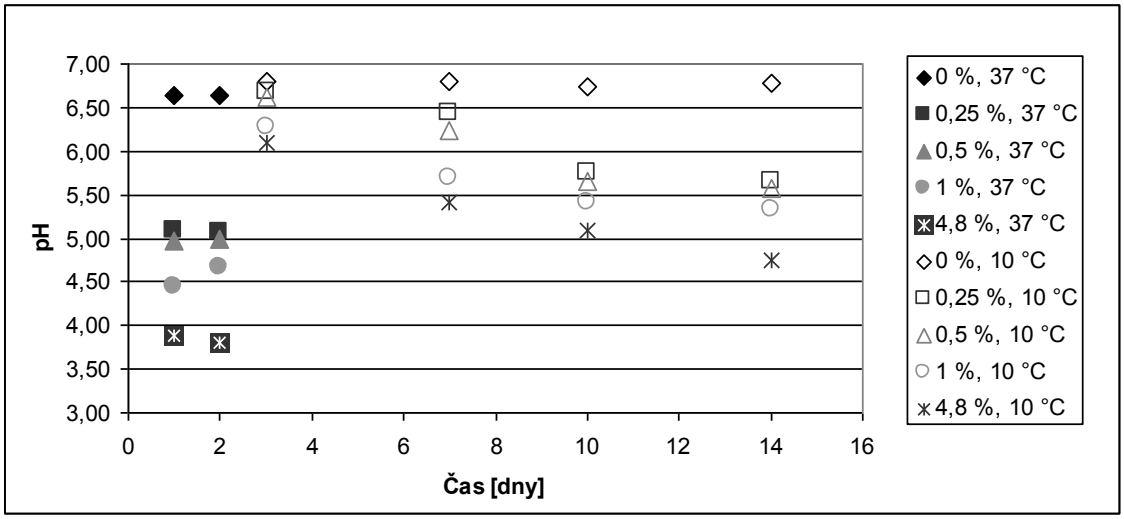
Obrázek 23. Změny pH média během kultivace *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 v médiu při počátečním pH 5.

Rychlost oxidace sacharidů byla také ovlivněna teplotou kultivace. Teplota 37 °C stimulovala mikroorganizmus k intenzivní fermentaci sacharidů a během 48 hodin došlo k poklesu pH ze všech tří původních hodnot až pod pH 4 při 4,8% (w/v) laktózy. Při 10 °C bylo okyselování prostředí mnohem pozvolnější a ani po 14 dnech kultivace pH nekleslo pod 4,6. Na produkci kyselin mělo vliv i samotné počáteční pH bujónu. Nevýraz-

nější byl pokles pH v prostředí s 4,8% laktózy z původních 7 na 3,81 při teplotě 37 °C a na 4,75 při 10 °C (Obr. 25).



Obrázek 24. Změny pH média během kultivace *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 v médiu při počátečním pH 6.

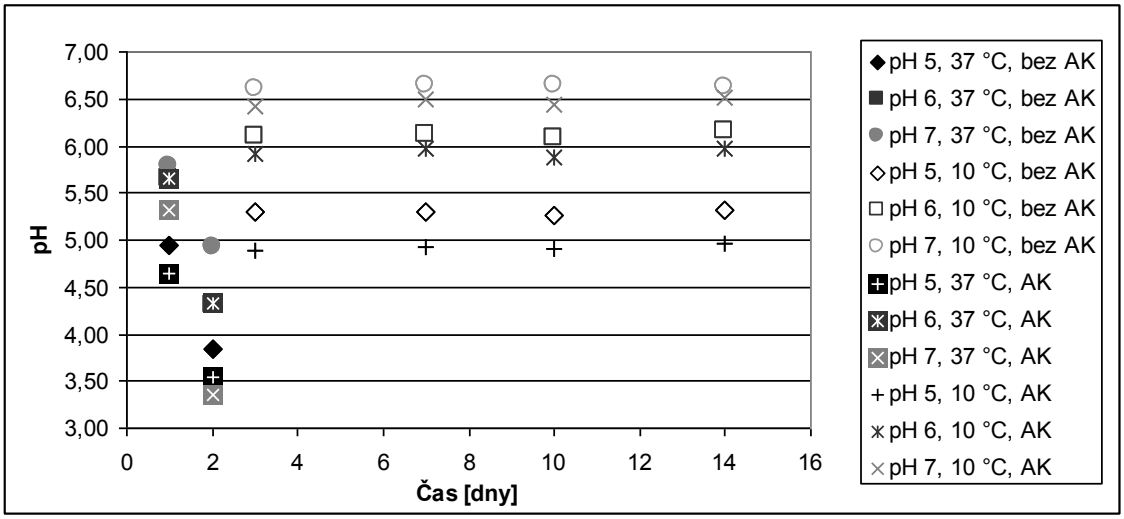


Obrázek 25. Změny pH média během kultivace *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 v médiu při počátečním pH 7.

7.2.2 Sledování změn pH mléka

Na produkci kyselin sledovaným bakteriálním kmenem v mléčném médiu měla zásadní vliv teplota. Jak lze vidět na Obrázku 26, při teplotě 10 °C se pH mléka v čase téměř neměnilo a naopak při teplotě 37 °C došlo během dvou dnů k poklesu pH mléka obohaceného o volné aminokyseliny z pH 7 až na pH 3,35. Také u ostatních mléčných médií

byla při teplotě 37 °C zaznamenána zvyšující se kyselost s tím, že více kyselin bylo produkováno v mléku obohaceném o aminokyseliny.



Obrázek 26. Změny pH mléka během kultivace *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239.

7.3 Diskuze

Schopnost produkce biogenních aminů byla již v minulosti prokázána u řady mikroorganizmů používaných jako startovací kultury při výrobě fermentovaných potravin. Podobné vlastnosti byly pozorovány také u některých probiotických bakterií, jejichž používání v mlékárenském průmyslu má dlouhou tradici. V současné době je velkým trendem přidávat probiotické mikroorganizmy také do fermentovaných masných výrobků. U všech probiotických a startovacích kultur používaných při výrobě fermentovaných potravin je tvorba biogenních aminů nežádoucí, a proto je nutné tyto mikroorganizmy na produkci těchto látek testovat, případně prověřovat obsah biogenních aminů přímo ve finálních výrobcích. [80]

V této práci byla prověřena schopnost tvorby BA u bakteriálního kmene *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 v laboratorních a přirozených podmínkách. Dekarboxylázová aktivita mikroorganizmu byla nejprve sledována v bujónu MRS záměrně obohaceném o prekurzory některých biogenních aminů, za účele zjistit, zdali bakterie disponuje specifickými dekarboxylačními enzymy a jaká je jejich aktivita v závislosti na vnějších podmínkách. V druhé fázi byla bakterie testována na produkci BA v modelových podmínkách mléčných výrobků, k čemuž bylo využito obnovené mléko s různě upraveným pH. Polovina mléka byla navíc opět obohacena o aminokyseliny.

Kultivace bakterií probíhala při dvou specifických teplotách, 37 a 10 °C. Teplota 37 °C je uváděna jako optimální pro růst bifidobakterií. [75] Teplotou 10 °C byly vytvářeny podobné podmínky jako při skladování fermentovaných mléčných výrobků. Bifidobakterie patří mezi chemoorganotrofní mikroorganizmy, tudíž vyžadují v prostředí přítomnost vhodných organických látek, které by byly pro ně zdrojem energie a uhlíku pro syntézu vlastních látek. [81] Konkrétně bifidobakterie využívají sacharidy. [75] Pro účely této práce byl bujón obohacen disacharidem laktózou v množství 0,25; 0,5; 1,0 a 4,8 % (w/v). Současně byla sledována dekarboxylační aktivita bakterie v bujónu bez sacharidu. Kultivace bakterie v mléce byla založena na jeho přirozeném obsahu laktózy.

Dodanými volnými aminokyselinami do MRS média byly arginin a ornitin, jakožto prekurzory PUT, SPD a SPM, dále tyrozin, který je prekurzorem tyraminu, a lyzin, z něhož dekarboxylací vzniká CAD [13, 14]. Z výsledků HPLC analýzy je zřejmé, že sledovaný kmen disponuje všemi enzymy nezbytnými pro tvorbu zmiňovaných aminů. Mezi detekovanými BA se vyskytoval také TRYP i přesto, že jeho tvorba nebyla podpořena přídavkem charakteristického prekurzoru do média. Zdrojem prekurzoru tohoto aminu mohla být některá ze základních složek kultivačního média, pravděpodobně proteózo-pepton, beef extrakt nebo kvasničný extrakt.

Nejvyšší dekarboxylázová aktivita testovaného kmene v podmínkách *in vitro* byla v prvních dnech pozorována při pH 6, a to jak při teplotě 37 °C, tak také při 10 °C (až 12,1 $mg.l^{-1}$ BA). Už tato skutečnost zpochybňuje tvrzení Biavatiho *et al.* [75], že bifidobakterie při teplotách pod 20 °C nerostou. Kultivace při 37 °C byla po dvou dnech od zaočkování médií ukončena. V důsledku rychlého metabolizmu a intenzivního rozkladu laktózy vznikalo velké množství organických kyselin, což způsobilo rychlý pokles pH prostředí z původních hodnot (5, 6 a 7) až pod pH 4. V takto kyselém prostředí bifidobakterie již nejsou schopny růstu, tudíž ani produkci BA nebylo potřeba věnovat další pozornost. [75] Kultivace při teplotě 10 °C pokračovala až do 14. dne od zaočkování. V prostředí s počátečním pH 5 a 6 se intenzita produkce BA postupně snižovala, což mělo spojitost s poklesem pH pod optimum. V bujónu s výchozím pH 7 se dekarboxylázová aktivita mikroorganizmu naopak zvyšovala, protože díky produkci kyselin pH klesalo k hodnotám ideálním pro tvorbu BA. Na rychlost poklesu pH a tedy i míru produkce BA měla vliv koncentrace laktózy v médiu. Nejstrměji klesalo pH médií obsahujících 4,8 % (w/v) laktózy. Naopak, pH médií bez laktózy se měnilo minimálně. Toto prostředí však testovanému kmeni ve fázi největší aktivity neposkytovalo dostatek ži-

vin. Z celkového pohledu se jako optimální množství sacharidu pro dekarboxylázovou aktivitu bakterie *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 jevila koncentrace 0,25 – 1 % (w/v).

Nejprodukovanějším biogenním aminem (<5,83 $mg.l^{-1}$) při 37 °C v bujónu byl SPM, a to konkrétně v prostředí s pH 6 a 0,5 – 4,8 % (w/v) laktózy. Při pH 5 jeho produkce nebyla zaznamenána. Produkce TRYP při téže teplotě byla největší v médiu s pH 5 obsahujícím 0,5 % (w/v) laktózy, u vyššího pH se ideálně jevilo prostředí bez sacharidu. Ve významnějším množství byl při pH 6 a 0,5 % (w/v) cukru tvořen také CAD a při 1 % (w/v) cukru TYM. V prostředí s pH 5 TYM nebyl detekován. PUT a SPD při 37 °C nebyly produkovány. Na druhou stranu nízká teplota (10 °C) stimulovala sledovaný kmen k tvorbě PUT. Během 14 dnů se v médiu s počátečním pH 7 a 1 % (w/v) laktózy nakumulovalo až 11 $mg.l^{-1}$ tohoto aminu. Tvorba ostatních aminů byla nulová nebo nevýznamná. Některá zde uvedená zjištění nekorespondovala s výsledky Svobodové [84], která také sledovala produkci BA u *B. animalis* subsp. *lactis* CCDM 239. Autorka ve své práci uvádí, že bakterie v pH 4,5 produkovala SPM a TYM. [84] Ke stejnému výsledku dospěla také Georgová [87], která zkoumala u téže bakterie produkci tyraminu. Obě autorky zaznamenaly nejvyšší produkci tyraminu při pH 4,5 v médiu s 0,25 % (w/v) laktózy a 1 % (w/v) NaCl. [84, 87] Možným vysvětlením neshody výše uvedených výsledků se závěry této práce by mohl být právě přídavek soli do média.

Produkce BA v mléce bakterií *B. animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 zdaleka nenabyla takového významu jako v případě bujónu. Při 37 °C byla pozorována jenom výraznější produkce kyselin. Při 10 °C byly všechny životní projevy mikroorganizmu vysoce potlačeny. Míra vyprodukovaného TYM, PUT, případně i CAD bakterií *B. animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 v tomto případě nepředstavovala z hlediska zdraví konzumentů výraznější riziko. Bifidobakterie, stejně jako další probiotické bakterie, se však používají převážně ve formě směsných kultur z důvodu jejich pomalého růstu v mléce a méně výrazné chuti výsledného produktu. Například jogurtová kultura, jejíž součástí mohou být probiotické bakterie, vždy obsahuje bakterie mléčného kvašení *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus,* které jsou zodpovědné za rychlé prokysání mléka a vytvoření produktu požadovaných vlastností a u nichž se taktéž může vyskytovat dekarboxylační systém. [82, 83] V případě použití kultury obsahující více kmenů schopných dekarboxylace aminokyselin je větší předpoklad, že množství vyprodukovaných BA v potravině stoupne až na toxickou úroveň. Toto riziko může

být ještě znásobeno přídavkem volných aminokyselin do prostředí, o čemž svědčí výsledky této studie ze stanovení BA v mléce obohaceném o arginin, ornitin, tyrozin a lyzin. Toto prostředí vytvářelo příznivé podmínky pro tvorbu SPM, jehož koncentrace po dvou dnech kultivace při 37 °C v prostředí s pH 6 překročila hranici 80 $mg.l^{-1}$, což rozhodně nelze považovat za nevýznamné množství. Navíc je potřeba brát úvahu také přirozený obsah SPM v mléce. Obsah volných aminokyselin v potravinách nemusí být podmíněn pouze jejich přídavkem během procesu výroby. Aminokyseliny mohou vznikat přímo v potravině proteolytickou činností přítomných mikroorganizmů. [1] Tuto skutečnost popisuje ve své práci Weiglová [86], která si všimla možné spojitosti tvorby aminokyselin se zvyšující se koncentrací BA v zákysu.

Sledování produkce biogenních aminů u bakterií rodu *Bifidobacterium* se zabývali také Sládková *et al.* [80]. Autoři se zaměřili na tvorbu tyraminu a histaminu v dekarboxylačním médiu obohaceném o prekurzory těchto dvou biogenních aminů. Studie byla provedena také u několika kmenů rodů *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Pediococcus.* Schopnost tvořit histamin nebyla zjištěna u žádné z prověřovaných kultur. U některých kultur, včetně bifidobakterií, byla prokázána přítomnost genu pro tyrozindekarboxylázu (13 kmenů rodu *Lactobacillus*, 14 kmenů rodu *Staphylococcus*, 3 kmeny rodu *Streptococcus* a 2 kmeny rodu *Bifidobacterium*). Tyto kultury skutečně produkovaly tyramin, a sice v množství 10 $ng.ml^{-1}$ – 1 $mg.ml^{-1}$. [80] Produkci tyraminu u *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* B25 popsala také Svobodová [84]. Nejvyšší množství tyraminu (13,47 $mg.l^{-1}$) tato bakterie vyprodukovala v dekarboxylačním médiu při pH 4,5 bez přídavku soli a laktózy. V největší míře (32,36 $mg.l^{-1}$) však byl produkován SPM, a to konkrétně v podmínkách pH 5; 1 % (w/v) laktózy a 2 % (w/v) soli. PUT a SPD bakterie produkovala v zanedbatelném množství. [84] Porovnáním těchto poznatků s výsledky této práce lze dospět k závěru, že schopnost produkce biogenních aminů je vlastnost specifická pro určité kmeny bakterií než vlastnost typická pro daný druh. [88] Ze získaných výsledků také vyplývá, že dekarboxylázová aktivita mikroorganizmů, zde konkrétně *B. animalis* subsp. *lactis* CCDM 239, je silně závislá na intenzitě mnoha vnějších faktorů. Je také potřeba mít na paměti, že to, co platí v laboratorních podmínkách, nemusí platit v praxi

ZÁVĚR

Biogenní aminy a polyaminy jsou biologicky aktivní látky pro lidský organizmus nepostradatelné. Vznikají převážně enzymatickou dekarboxylací aminokyselin v živých buňkách, kde také hrají důležitou roli v mnoha buněčných fyziologických funkcích. Ve vysokých koncentracích v organismu mohou tyto látky vykazovat nežádoucí až toxické účinky.

Biogenní aminy produkují také některé potravinářsky významné mikroorganizmy využívající se při výrobě fermentovaných potravin a nebo způsobující jejich kažení. V některých případech může obsah biogenních aminů v těchto potravinách dosáhnout úrovně ohrožující zdraví potenciálních konzumentů.

Snaha zabezpečit zdravotní nezávadnost potravin podporuje rozvoj výzkumu biogenních aminů a možností jak zabránit jejich tvorbě v potravinách a/nebo jak snížit jejich obsah v surovinách a hotových produktech. Součástí tohoto výzkumu je také sledování produkce biogenních aminů u kulturních kmenů mikroorganizmů používaných při výrobě fermentovaných potravin v závislosti na různých podmínkách vnějšího prostředí. Kmeny, u kterých je prokázána produkce BA, jsou méně vhodné pro výrobu fermentovaných potravin. Pokud je jejich použití nevyhnutelné, doporučuje se důsledně kontrolovat koncentraci biogenních aminů ve finálním výrobku.

V této bakalářské práci byl na schopnost tvorby biogenních aminů prověřen probiotický kmen *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239. Na základě zjištěných poznatků lze říci, že tento kmen netvoří BA v množství, které by pro potenciálního konzumenta znamenalo zdravotní riziko. Pozornost jeho dekarboxylázové aktivitě je potřeba věnovat v případě, že je součástí směsných kultur, které obsahují i jiné dekarboxyláza pozitivní mikroorganizmy. V úvahu je nutno brát také přirozený obsah biogenních aminů v potravinářských surovinách, např. v mléce se přirozeně vyskytují spermin, spermidin a putrescin.

.

.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] ČERNÝ, V., KVASNIČKOVÁ, E., HAVLÍKOVÁ, Š., KALHOTKA, L. *Výskyt mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou v sýrech*. Mlékařské listy. 2009, č. 116, s. 16–18.

[2] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., POLLAKOVÁ, E., PODEŠVOVÁ, T., DRÁB, V. *The effects of laktose, NaCl and an aero/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase aktivity of Lactococcus lactis subsp. cremosis and Lactococcus lactis subsp. lactis.* Int. J. Food Mikrobiol. 2011, roč. 147, č. 2, s. 112-119.

[3] *Zástupci startovacích kultur mohou tvořit biogenní aminy* [online]. 6.6.2007 [cit. 22-11-2013]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/zastupci-startovacich-kultur-mohou-tvorit-biogenni-aminy/>.

[4] STRATTON, J. E., HUTKINS, R. W., TAYLOR, S. L. *Biogenic Amines in Cheese and Other Fermented Foods: a review*. J. Food Protect. 1991, č. 54, s. 460–470.

[5] KOLÁŘOVÁ, M. *Biogenní aminy* [online]. MENDELU, 15.5.2012 [cit. 22-11-2013] Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/biogenni-aminy>.

[6] BURDYCHOVÁ, R. *Mikrobiologická detekce probiotických mikroorganismů ve fermentovaných mléčných výrobcích*. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. sv. LV, 2007, č. 2, s. 15-20.

[7] KOMPRDA, T. *Obecná hygiena potravin*. Brno, MZLU. 2004, 145 s. ISBN 978-80-7157-757-7.

[8] KŘÍŽEK, M., KALAČ, P. *Biogenic Amines in Foods and Their Roles in Human Ntrition*. Czech J. Food sci. roč. 16, 1998, s. 151–159.

[9] ROGINSKI, H., FUQUAY, J.W., FOX, P. F. *Encyclopedia of dairy sciences*. London: Academic press. 2002. ISBN 0-12-227235-8.

[10] KOHAJDOVÁ, Z., KAROVOČOVÁ, J., GREIF, G. *Biogenně amíny v potravinách*. Potravinárstvo. roč. 2, 2008, č. 1, s. 30-49.

[11] MOTARJEMI, Y., STADLER, R. H., STUDER, A., DAMIANO, V. *Application of the HACCP Approach for the Management of Processing.* Process-induced Food Toxicants: Occurrence, Formation, Mitigation, and Health Risks. USA, 2008. ISBN 978-0-470-07475-6.

[12] PODEŠVOVÁ, T. *Dekarboxylázová aktivita mikroorganizmů*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Bakalářská práce, 2008.

[13] SHAH, P., SWIATLO, E. *A Multifaceted Role for Polyamines in Bacterial Pathogens.* Molecular Microbiology. roč. 68, 2008, č.1, s. 4–16.

[14] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. 1. vyd. Tábor: Ossis, 1999. 368 s. ISBN 80-902391-5-3.

[15] RHEE, J. E., RHEE, J. H., RYU, P. Y., CHOI, S. H. *Identification of the cadBA Operon from Vibrio vulnificus and its Influence on Survival to Acid Stress*. FEMS Microbiol. Lett. 2002, č. 208, s. 245–251.

[16] VAN DE GUCHTE, M., SERROR, P., CHERVAUX, C., SMOKVINA, T., EHRLICH, S.D., MAGUIN, E. *Stress responses in lactic acid bacteria*. Antonie van Leeuwenhoek. 2002, č. 82, s. 187–216.

[17] MOLENAAR, D., BOSSCHER, J. S., TEN BRINK, B., DRIESSEN, A. J. M., KONINGS, W. N. *Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in Lactobacillus buchneri.* J. Bacteriol. 1993, č. 175, s. 2864–2870.

[18] TKACHENKO, A., NESTEROVA, L., PSHENICHOV, M. *The role of the natural polyamine putrescine in defense against oxidative stress in Escherichia coli*. Archives Microbiol. 2001, č. 176, s. 155–157.

[19] PREMONT, R. T., GAINETDINOV, R. R., CARON, M. G. *Following the Trace of Elusive Amines.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2001, č. 98, s. 9474–9475.

[20] TABOR, C.W., TABOR, H. *Polyamines in Microorganisms.* Microbiol. Rev. 1985, č. 49, s. 81–99.

[21] *Terapie: Histamin a antihistaminika* [online]. VOŠ zdravotnická a Střední zdravotnická škola, Hradec Králové. [cit. 20-1-2014]. Dostupné z: <http://ose.zshk.cz/vyuka/terapie.aspx?tid=76>.

[22] BODMER, S., IMARK, C., KNEUBÜHL, M. B*iogenic amines in foods: Histamine and food processing.* Inflam. Res. 1999, č. 48, s. 296–300.

[23] NOVELLA-RODRÍGUEZ, S., VECIANA-NOGUÉS, M. T., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M. C. *Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese.* J. Food sci. 2003, č. 68(3), s. 750–755.

[24] SHALABY, A. R. *Significance of biogenic amines to food safety and human health.* Food Res. Int.. 1996, č. 29, s. 675–690.

[25] SILLA-SANTOS M. *Biogenic amines: their importance in foods.* Int. J. Food Microbiol. 1996, č. 29, s. 213-231. □

[26] KOMPRDA, T. *Biogenní aminy a polyaminy ve fermentovaných potravinách živočišného původu.* Veterinářství. 2005, č. 10, s. 646-650.

[27] STADLER, R. H. a D. R. LINEBACK. *Process-induced food toxicants: occurrence, formation, mitigation, and health risks.* New Jersey: John Wiley & Sons. 2009, č. 723, s. 321-361. ISBN 978-047-0074-756.

[28] KOMPRDA, T. et al. *Some factors influencing biogenic amines and polyamines content in Dutch-type semi-hard cheese*. Eur. Food Res. Technik. 2008, roč. 227, č. 1, s. 29-36.

[29] SMĚLÁ, D., PECHOVÁ, P., KOMPRDA, T., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. *Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování*. Chemické listy. 2004, roč. 98, č. 7, s. 432-437.

[30] ČECHOVÁ, L., JANALÍKOVÁ, M. *Obecná mikrobiologie*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. 2007, 190 s. ISBN 978-80-7318-516-9.

[31] EFSA. *Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods.* EFSA Journal [online]. roč. 9, 2011, č. 10, 93 s. [cit. 4-2-2014]. Dostupné na: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2393.pdf> □

[32] JUNEJA, V. K., SOFOS, J. N. *Pathogens and Toxins in Food: Challenges and Interventions.* Washington, DC: ASM Press. 1. vyd, 2010, č. 512, s. 248-274. ISBN 978-1-55581-459-5.

[33] MAIJALA, R. L., EEROLA, S. H., AHO, M. A., HIRN, J. A. *The effect of GLD – induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat.* J. Food Prot. 1993, roč. 56, č. 2, s. 125-129.

[34] BRINK, B. ten, DAMINK, C., JOOSTEN, H. M. L. J., HUIS in´t VELD, J. H. J. *Occurrence and formation of biologically active amines in foods*. Int. J. Food Microbiol. 1990, č. 11, s. 73-84.

[35] LINARES, D., DEL RIO, B., LADERO, V., MARTINEZ, N., FERNANDEZ, M., MARTIN, M. C., ALVAREZ, M. A. *Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products.* Front. Microbiol. 2012, č. 3, s. 180.

[36] GARDINI, F., BOVER-CID, S., TOFALO, R., BELLETTI, N., GATTO, V., SUZZI, G., TORRIANI, S. *Modeling the aminogenic potential of* Enterococcus faecalis *EF37 in dry fermented sausages through chemical and molecular approaches*. Appl. Environ. Microbiol. 2008, č. 74(9), s. 2740–50.

[37] *Lecture 29: Biologically active amines and related amino acid derivatives* [online]. Department of Chemistry and Biochemistry, University of Guelph, Ontario. 2005 [cit. 4-2-2014]. Dostupné z: http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/chm452/lectur29.htm

[38] KIMURA, B., KONAGAYA, Y., FUJII, T. *Histamine formation by Tetragenococcus muriaticus, a halophilic lactic acid bacterium isolated from fish sauce*. Int. J. Food Microbiol. 2001, č. 70, s. 71-77.

[39] PRESTER, L. *Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review.* Food Additives and Contaminantes. 2011, roč. 28, č. 11, s. 1547-1560.

[40] ANDRESOVÁ, A. *Dekarboxylázová aktivita bakterie Serratia marcescens.* Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Diplomová práce, 2010.

[41] VALENTA, T. *Vliv zdrojů uhlíku na dekarboxylázovou aktivitu bakterií rodu Lactococcus.* Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Bakalářská práce, 2010.

[42] PLEVA,P., BUŇKOVÁ, L., LAUKOVÁ, A., LORENCOVÁ, E., KUBÁŇ, V., BUŇKA, F. *Factors affected decarbolaxylation aktivity of Enterococcus faecium isolated from rabbit.* Potravinárstvo, 2012, roč. 6, č. 2, s. 46-49.

[43] NÁPRAVNÍKOVÁ, E. *Technologie trvanlivých fermentovaných masných výrobků - pohled mikrobiologa.* Sborník ze semináře o údržnosti masa a masných výrobků, Praha. 2005, s. 27-30.

[44] SUZZI, G., GARDINI, F. *Biogenic amines in dry fermented sausages: a review.* Int. J.Food Mikrobiol. 2003, č. 88, s. 41-54.

[45] KALAČ, P., GLÓRIA, M. B. A. *Biogenic amines in cheese, wines, beer and sauerkraut*. Biological Aspects of Amines, Polyamines and Conjugates. 2009, s. 267-309. ISBN: 978-81-7895-249-9.

[46] SEIFERTOVÁ, E. *Kontroly histaminu v rybách bez nálezu* [online]. 2011 [cit. 5-2-2014]. Dostupné z: <http://zemedelec.cz/kontroly-histaminu-v-rybach-bez-nalezu/>.

[47] ZORNÍKOVÁ, G. *Biogenní aminy v potravinách* [online]. Mendelova univerzita v Brně. 2012 [cit. 5-2-2014]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/biogenni-aminy-v-potravinach>.

[48] STADNIK, J., DOLATOWSKI, Z. J. *Biogenic amines in meat and fermented meat products.* Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 2010, č. 9(3), s. 251-263.

[49] KRAUSOVÁ, P., KALAČ, P., KŘÍŽEK, M., PELIKÁNOVÁ, T. *Content of biologically active polyamines in livers of cattle, pigs and chickens after animal slaughter.* Meat Sci. 2006, č. 73, s. 640-644.

[50] KANIOU, I., AMOURIS,G., MOURATIDOU, T., ELEFTHERIADOU, A., ZANTOPOULOS, N. *Determination of biogenic amines in fresh unpacked and vacuum-packed beef during storage at 4°C*. Food Chem. 2001, roč 74, č. 4, s. 515-519.

[51] Vyhláška Ministerstva zemědělství, kterou se provádí § 18 písm. a), d), g), h), i) a j) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, pro maso, masné výrobky, ryby, ostatní vodní živočichy a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich. *Sbírka zákonů ČR,* 1997, částka 126.

[52] KAMENÍK, J. *Hygiena a technologie masa: trvanlivé masné výrobky*. Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav hygieny a technologie masa, Brno, 2012. ISBN 978-80-7305-608-7.

[53] ANCÍN-AZPILICUETA, C., GONZÁLEZ-MARCO, A., JIMÉNEZ-MORENO, N. *Current Knowledge about the Presence of Amines in Wine.* Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2008, č. 48, s. 257–275.

[54] BENEDUCE, L., ROMANO, A., CAPOZZI, V., LUCAS, P., BARNAVO, L., BACH, B., VUCHOT, P., GRIECO, F., SPANO, G. *Biogenic Amines in Wines*. Springer – Verlag and the University of Milan. 2010.

[55] TANG, T., SHI, T., QIAN, K., LI, P., LI, J., CAO, Y. *Determination of biogenic amines in beer with pre-column derivatization by high performance liquid chromatography.* J. Chrom. B. 2009, č. 877, s. 507-512.

[56] KALAČ, P., ŠAVEL, J., KŘÍŽEK, M., PELIKÁNOVÁ, T., PROKOPOVÁ, M. *Biogenic amine formation in bottle beer.* Food Chem. 2002, č. 79, s. 431-434.

[57] ÖNAL, A. *Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods: a review*. Food Chem. 2007, č. 103, s. 1475–1486.

[58] KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. *Biogenic Amines in Food*. Chem. Pap., 2005, č. 59, s. 70-79.

[59] ČÍŽKOVÁ, H., HOFTA, P., KOLOUCHOVÁ, I., DOSTÁLEK, P. *Význam aminokyselin v pivovarnictví a nové postupy jejich stanovení.* Kvasný průmysl. 2005, roč. 51, č. 2, s. 47-51.

[60] KŘÍŽEK, M., HLAVATÁ, V. *Stanovení vybraných biogenních aminů v pivu.* Kvasný průmysl. 1995, roč. 41, č. 9, s. 265-269.

[61] *Thin Layer Chromatography, TLC; Paper Chromatography, PC* [online]. VŠCHT. [cit. 20-2-2014]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/ana/TLC2.pdf>.

[62] SZENTIVÁNYI, K., HANSÍKOVÁ, H., KRIJT, J., ZEMAN, J., HONZÍK, T. *Význam vyšetření hladiny metabolitů biogenních aminů v mozkomíšním moku vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií v diagnostice dětských neurotransmiterových onemocnění.* Klin. Biochem. Metab. 2011, roč. 19(40), č. 3, s. 155–161.

[63] POLÍVKOVÁ, J. *Seznámení s plynovou chromatografií* [online]. Eldiag s.r.o. 2013 [cit. 20-2-2014]. Dostupné z: <http://www.eldiag.cz/cz/texty/seznameni-s-plynovou-chromatografii>.

[64] GAŠ, B. *Kapilární elektroforéza - Separační analytická metoda pro věk mikročipů*. Vesmír. 2001, č. 80, s. 370-372.

[65] RYVOLOVÁ, M., TÁBORSKÝ, P., VRÁBEL, P., HAVEL, J.,MPREISLER, J. *Derivatizace aminokyselin, peptidů a proteinů pro laserem indukovanou fluorescenční detekci v kapilární elektroforéze*. Chemické listy. 2006, č. 100, s. 191-195.

[66] XIN L., LI-XIANG Y., YING-TANG L. *Determination of biogenic amines by 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescens detection*. J. Chrom. A. 2003, č. 998, s. 213-219.

[67] DI FUSCO, M., FEDERICO, R., BOFFI, A., MACONE, A., FAVERO, G., MAZZEI, F. *Characterization and application of a diamine oxidace from Lathyrus sativus as component of an electrochemical biosensor for the determination of biogenic amines in wine and beer.* Anal. Bioanal. Chem. 2011, č. 401, s. 707-716.

[68] *Po stopách zločinu: Optické biosenzory – budoucnost vyšetřování na místě činu* [online]. Ústav chemických procesů AV ČR. [cit. 5-3-2014]. Dostupné z: < http://www.icpf.cas.cz/cs/system/files/users/public/bendova_8/misto_cinu/biosenzory.pdf>.

[69] RADA, V. *Využití probiotik, prebiotik a synbiotik*. Interní Medicína. 2010, č. 12(2), s. 92–97.

[70] MALAGO, J.J., KONINKX, J.F.J.G., MARINSEK-LOAR, R. *Probiotic Bacteria and Enteric Infections.* Springer Science+Business Media B.V. 2011. ISBN 978-94-007-0385-8.

[71] NOVÁKOVÁ, D. *Současné možnosti využití probiotik*. Tempus medicorum – časopis České lékařské komory. 2011, roč. 20, č. 10, s. 26-28.

[72] RICHARDS, L. *The History of Probiotics* [online]. The Candida Diet, 9.2.2014 [cit. 7-3-2014]. Dostupné z: < http://www.thecandidadiet.com/the-history-of-probiotics/>.

[73] SCARDOVI, V. *Genus Bifidobacterium*. . In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology (volume 2). Williams and Wilkins, Baltimore. 1986, 472AL, s. 1418-1434

[74] BAFFONI, L., STENICO, V., STRAHSBURGER, E., GAGGIA, F., DI GIOIA, D., MODESTO, M., MATTARELLI, P., BIAVATI, B. *Identification of species belonging to the Bifidobacterium genus by PCR-RFLP analysis of a hsp60 gene fragment*. BMC Microbiol. 2013, č. 13, s. 149.

[75] BIAVATI, B., VESCOVO, M. TORRIANI, S., BOTTAZZI, V. *Bifidobacteria: History, ekology, physiology and applications*. Ann. Mikrobiol. 2000, č. 50, s. 117-131.

[76] POKUSAEVA, K., FITZGERALD, G., SINDEREN, D. *Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria.* Genes Nutr. 2011, č. 6(3), s. 285–306.

[77] PALARIA, A., JOHNSON-KANDA, I., O´SULLIVAN, J. *Effect of a Synbiotic Yogurt on Levels of Fecal Bifidobacteria, Clostridia, and Enterobacteria*. Appl. Environ. Mikrobiol. 2012, roč. 78, č. 4, s. 933-940.

[78] *Klinické studie* [online]. DANONE, 2014 [cit. 7-3-2014]. Dostupné z: <http://www.danone.cz/nase-kvalita/klinicke-studie.html>.

[79] *ACTIVIA® is a probiotic yogurt that helps with occasional iregularity* [online]. DANNON, 2014 [cit. 7-3-2014]. Dostupné z: < http://activia.us.com/App_Master/pdf/approved-activa-summary-95837.pdf>.

[80] SLÁDKOVÁ, P., KOMPRDA, T., BURDYCHOVÁ, R. *Skríning startovacích a probiotických kultur určených pro výrobu fermentovaných masných výrobků na schopnosti tvorby biogenních aminů.* Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, MENDELU v Brně, 2007. ISBN 978-80-7375-119-7.

[81] AMBROŽOVÁ, J. *Mikrobiologie v technologii vod*. 1. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 2004. ISBN 80-7080-534-X.

[82] TAMIME, A. *Probiotic Dairy Products*. Blackwell Publishing Ltd., 2005. ISBN 10-1-4051-2124-6.

[83] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., HLOBILOVÁ, M., VAKÁTKOVÁ, Z., NOVÁKOVÁ, D., DRÁB, V. *Tyramine production of technological important strains of Lactobacillus, Lactococcus and Streptococcus.* Eur. Food Res. Technol. 2009, č. 229, s. 533–538.

[84] SVOBODOVÁ, Z. *Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů u bakterií rodu Bifidobacterium.* Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Diplomová práce, 2013.

[85] SIMPSON, P. J., ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F., STANTON, C. *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. *nov. and Aeriscardovia aeriphila gen. nov., sp. nov., isolated froma porcine caecum*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004, č. 54, s. 401 – 406.

[86] WEIGLOVÁ, V. *Proteolytická aktivita vybraných zákysových kultur.* Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Diplomová práce, 2013.

[87] GEORGOVÁ, N. *Dekarboxylázová aktivita vybraných probiotických bakterií*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Bakalářská práce, 2013.

[88] ARENA, M. E., MANCA DE NADRA, M. C., MUÑOZ, R. *The arginine deiminase pathway in the wine lactic acid bacterium Lactobacillus hilgardii X1B*: *structural and functional study of the arcABC gene.* Gene. 2002, roč. 301, s. 61-66.

[89] *Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses* [online]. Annals of Botany Copany. 2014 [cit. 20-4-2014]. Dostupné z: <http://aob.oxfordjournals.org/content/105/1/1/F1.expansion>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AK	aminokyseliny
ATP	adenosintrifosfát
a_w	aktivita vody
BA	biogenní aminy
BGE	background electrolyte
CAD	kadaverinu
CCDM	Česká sbírka mlékárenských mikroorganismů
CE	kapilární elektroforéza
ČR	Česká republika
DABS-Cl	dabsylchlorid
DANS-Cl	dansylchlorid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
ECD	detektor elektronového záchytu
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
FID	plamenově-ionizační detektor
FMOC	9-fluorenylmethoxykarbonylchlorid
FMV	fermentované masné výrobky
GC	plynová chromatografie
GIT	gastrointestinální trakt
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LIF	laserem indukovaná fluorescence
MS	Mass Spectrometry
ND	nebylo detekováno
OPA	o-ftaldialdehyd
OSN	Organizace spojených národů
PUT	putrescin
RNA	ribonukleová kyselina

RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází
SCFA	Short Chain Fatty Acids
SPD	spermidin
SPM	spermin
SPP	Společnost pro probiotika a prebiotika
TCD	tepelně-vodivostní detektor
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TRYP	tryptamin
TSCl	p-toluensulfonylchlorid
TYM	tyramin
UV	ultrafialové (záření)
VIS	viditelné záření
VVP	Vědeckých výbor pro potraviny
VVVZ	Vědeckých výbor pro výživu zvířat
WHO	Světová zdravotnická organizace
(w/v)	hmotnostní zlomek

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Obecné schéma dekarboxylace aminokyselin. 14
Obrázek 2. Biosyntetické dráhy vzniku polyaminů v rostlinách. 14
Obrázek 3. Sledování enzymatické reakce ampérometrickým měřením elektrochemické oxidace proudu H_2O_2 30
Obrázek 4. *Bifidobacterium* spp.; rastrovací elektronová mikroskopie; měřítko 1 μm; mikrofotografie byla pořízena na Istituto di Microbiologia, Piacenza University, It. 35
Obrázek 5. Produkce biogenních aminů kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 při pH 5. 47
Obrázek 6. Produkce biogenních aminů kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 při pH 6. 48
Obrázek 7. Produkce biogenních aminů kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 při pH 7. 48
Obrázek 8. Produkce tryptaminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0 % (w/v) laktózy. 49
Obrázek 9. Produkce tryptaminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0,25 % (w/v) laktózy. 50
Obrázek 10. Produkce tryptaminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0,5 % (w/v) laktózy. 50
Obrázek 11. Produkce tryptaminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 1 % (w/v) laktózy. 50
Obrázek 12. Produkce tryptaminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 4,8 % (w/v) laktózy. 51
Obrázek 13. Produkce putrescinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0 % (w/v) laktózy. 51
Obrázek 14. Produkce putrescinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0,25 % (w/v) laktózy. 52
Obrázek 15. Produkce putrescinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0,5 % (w/v) laktózy. 52
Obrázek 16. Produkce putrescinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 1 % (w/v) laktózy. 52

Obrázek 17. Produkce putrescinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 4,8 % (w/v) laktózy. 53
Obrázek 18. Produkce kadaverinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0 % (w/v) laktózy. 53
Obrázek 19. Produkce kadaverinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0,25 % (w/v) laktózy. 54
Obrázek 20. Produkce kadaverinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0,5 % (w/v) laktózy. 54
Obrázek 21. Produkce kadaverinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 1 % (w/v) laktózy. 54
Obrázek 22. Produkce kadaverinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 4,8 % (w/v) laktózy. 55
Obrázek 23. Změny pH média během kultivace *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 v médiu při počátečním pH 5. 58
Obrázek 24. Změny pH média během kultivace *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 v médiu při počátečním pH 6. 59
Obrázek 25. Změny pH média během kultivace *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 v médiu při počátečním pH 7. 59
Obrázek 26. Změny pH mléka během kultivace *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 60

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Biogenní aminy vyskytující se v potravinářských výrobcích. 12
Tabulka 2. V současné době uznávané druhy *Bifidobacterium* 37
Tabulka 3. Složení kultivačního média. 43
Tabulka 4. Eluční program. 46
Tabulka 5: Výsledky stanovení BA ($mg.l^{-1}$) v mléce bez přídavku aminokyselin. 56
Tabulka 6: Výsledky stanovení BA ($mg.l^{-1}$) v mléce obohaceném o amino-kyseliny. 57

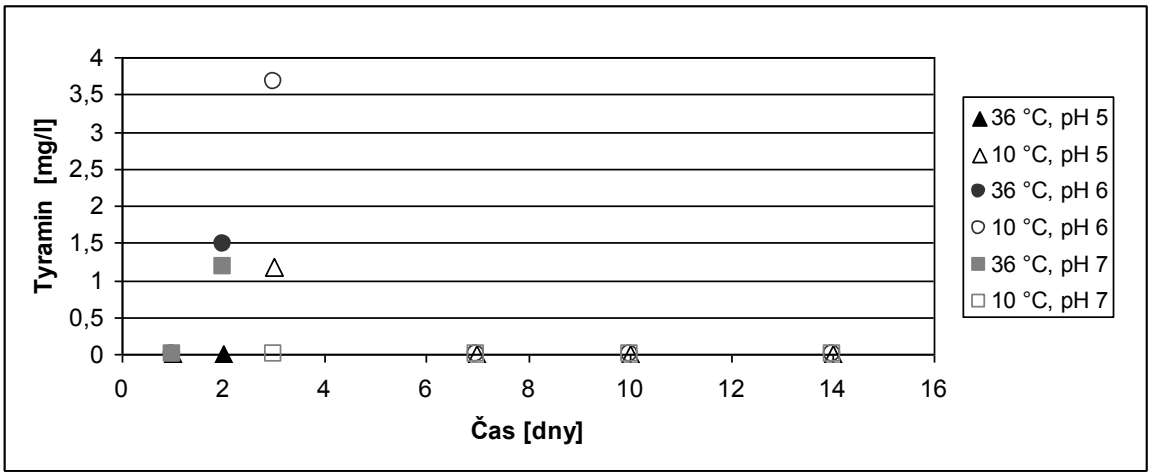
SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA 1: Produkce tyraminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 80

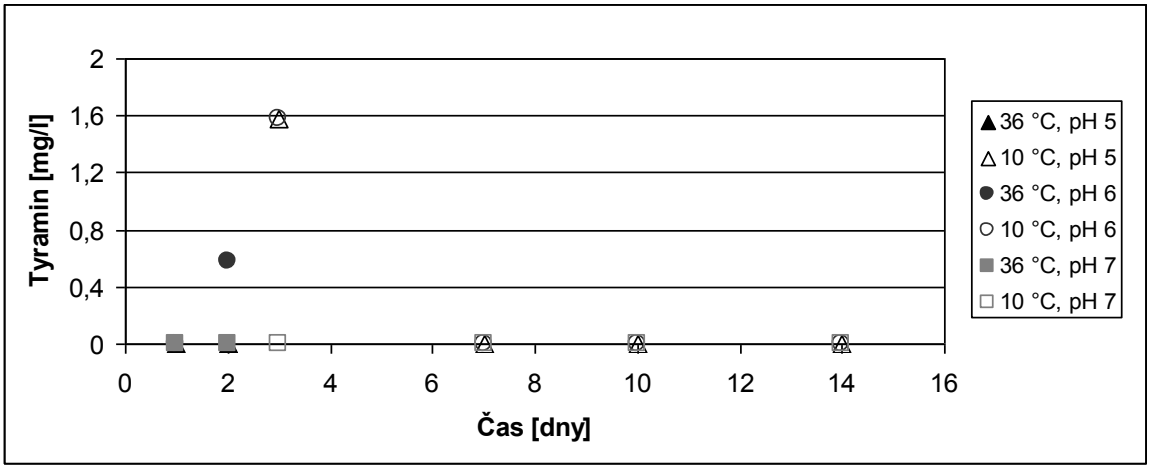
PŘÍLOHA 2: Produkce sperminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 80

PŘÍLOHA 3: Produkce spermidinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 84

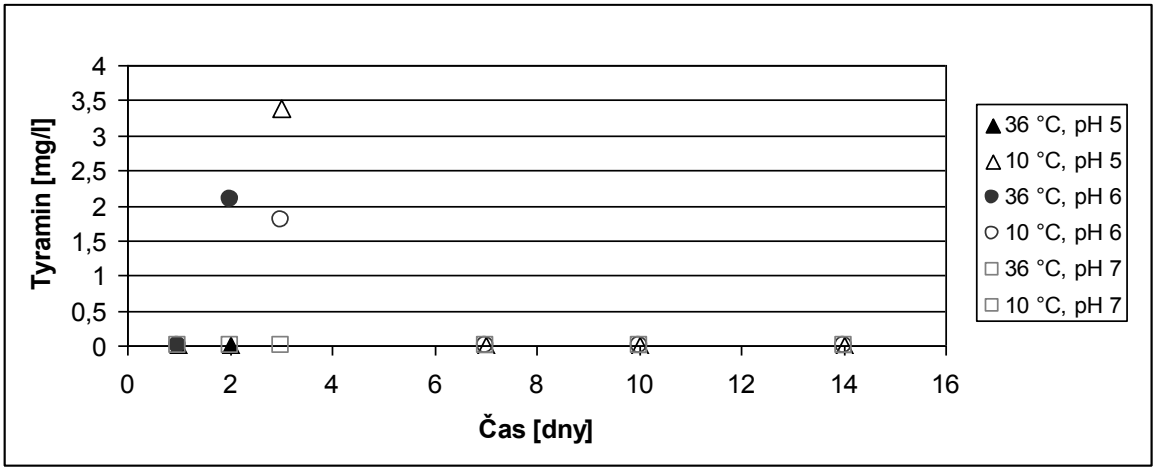
PŘÍLOHA 1: Produkce tyraminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239



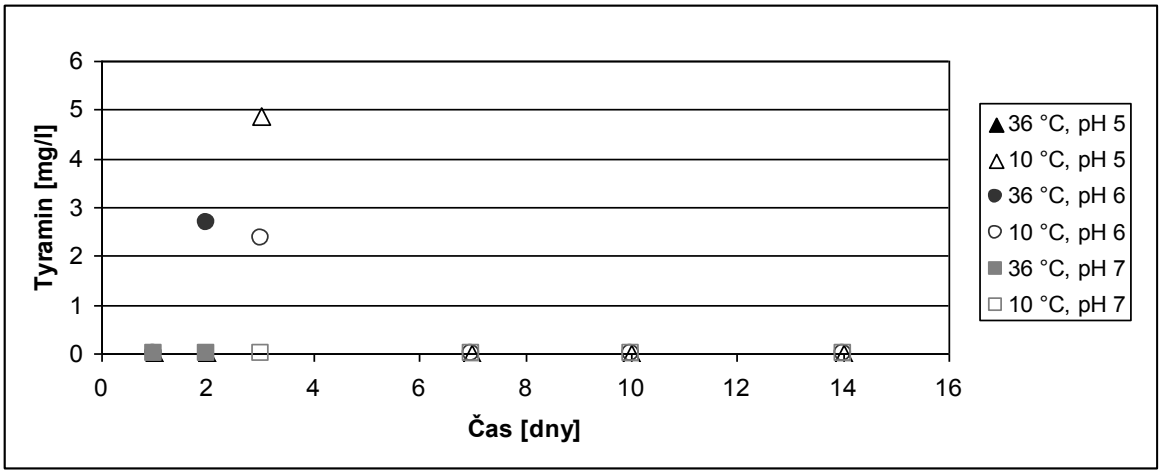
Produkce tyraminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0 % (w/v) laktózy.



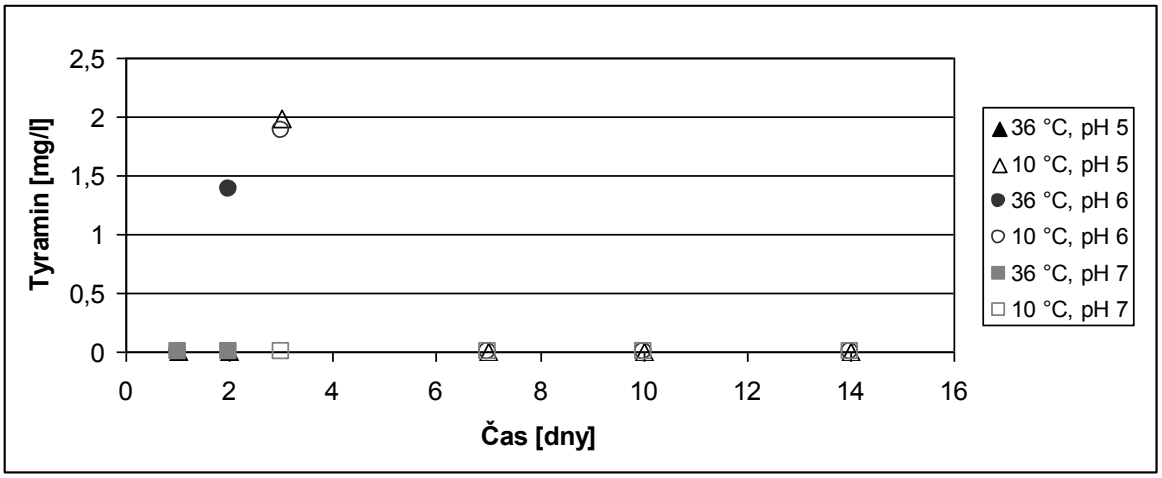
Produkce tyraminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0,25 % (w/v) laktózy.



Produkce tyraminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0,5 % (w/v) laktózy.

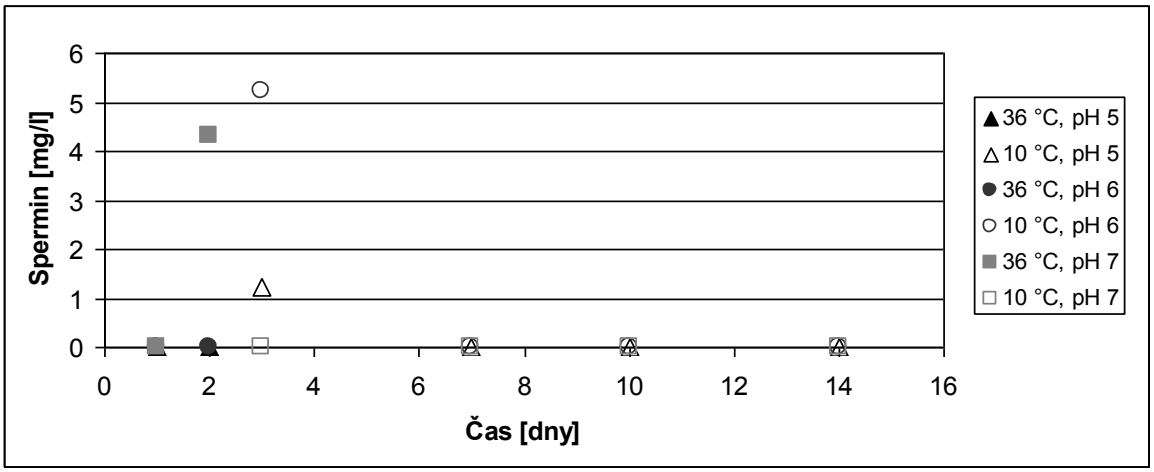


Produkce tyraminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 1 % (w/v) laktózy.

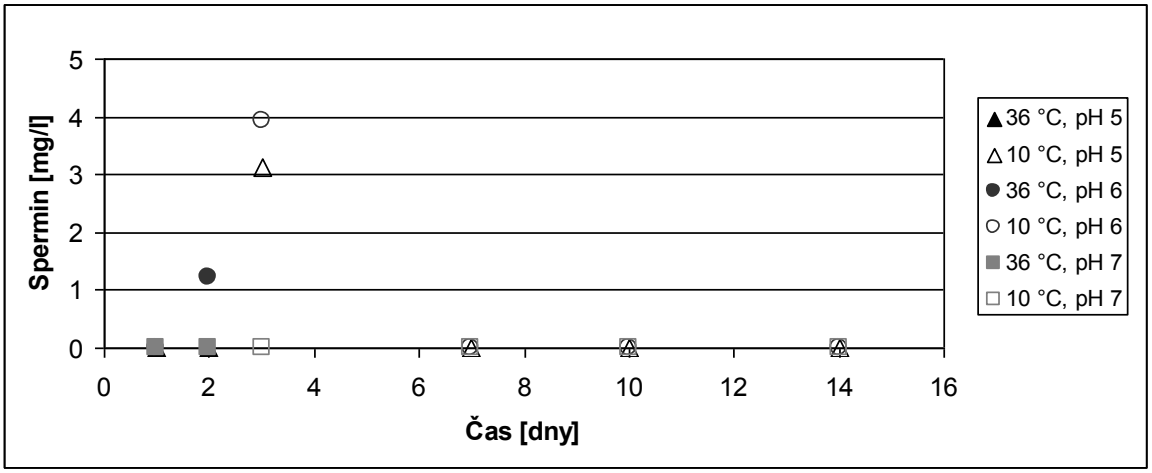


Produkce tyraminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 4,8 % (w/v) laktózy.

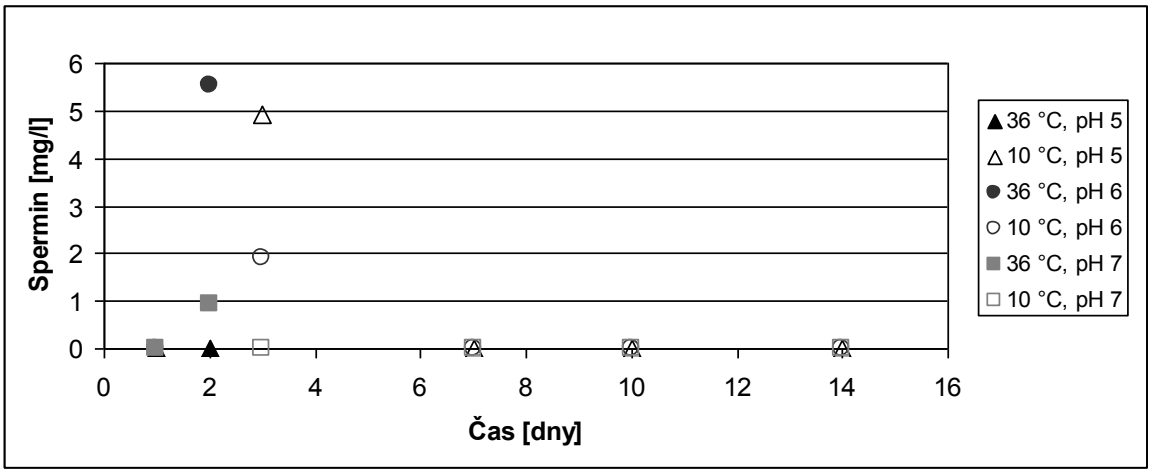
PŘÍLOHA 2: Produkce sperminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239



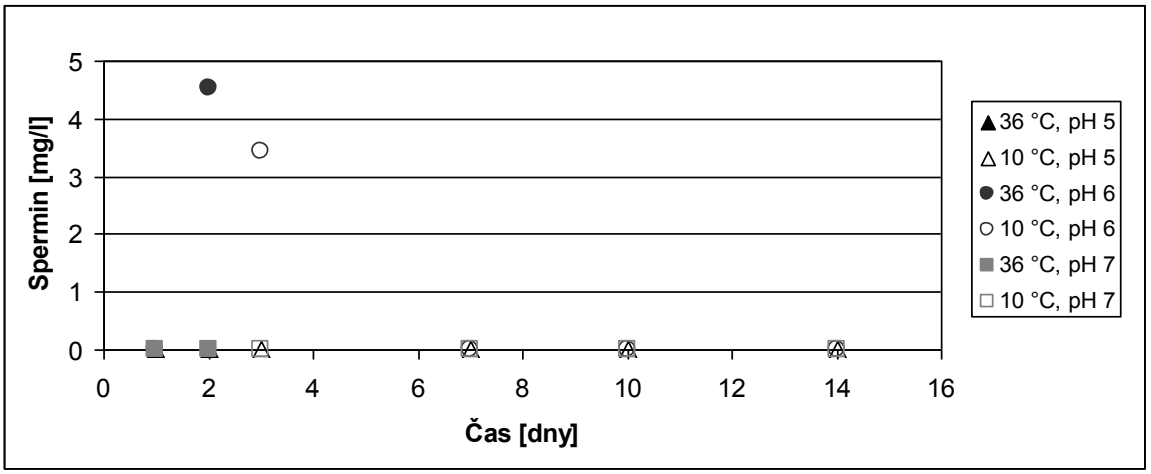
Produkce sperminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0 % (w/v) laktózy.



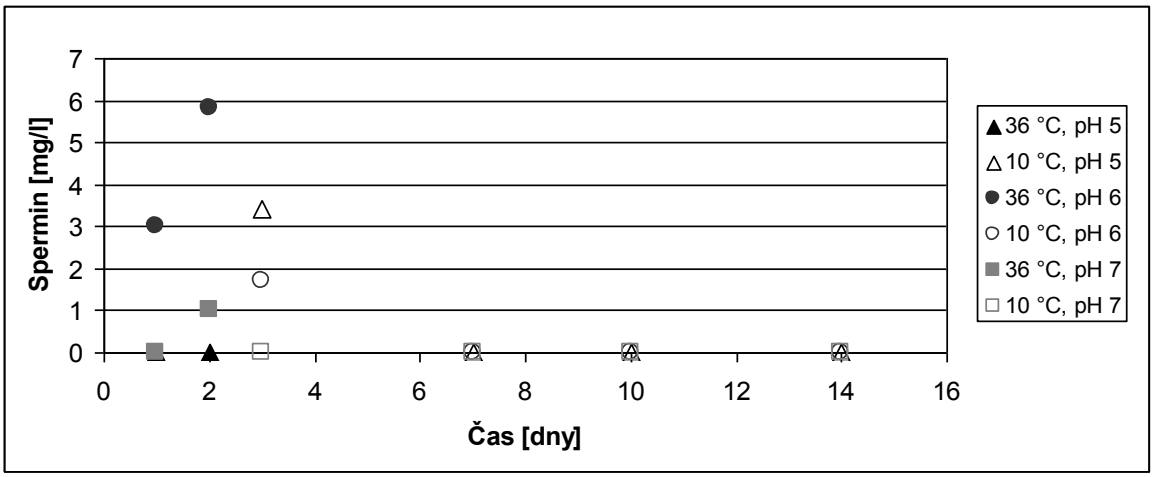
Produkce sperminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0,25 % (w/v) laktózy.



Produkce sperminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0,5 % (w/v) laktózy.

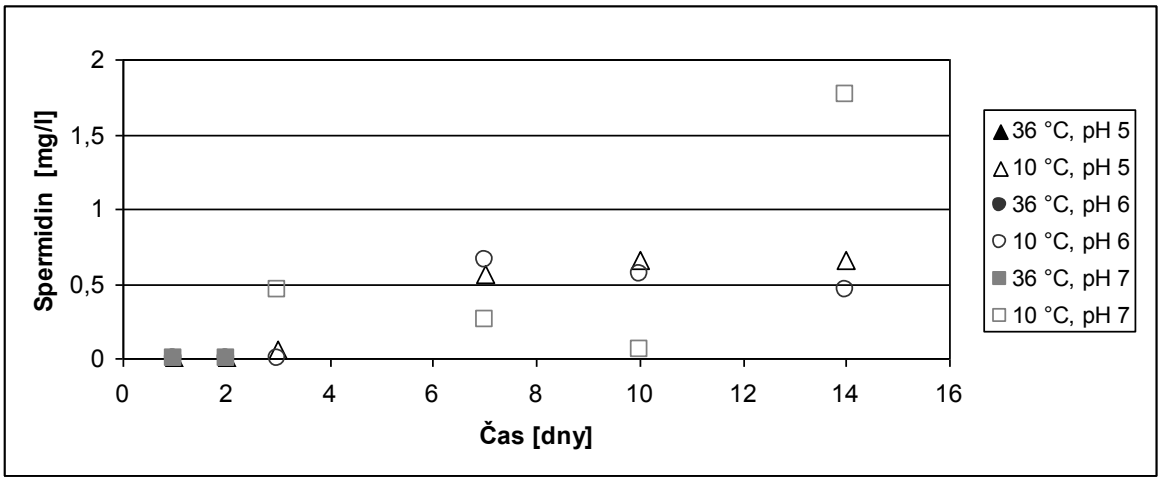


Produkce sperminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 1 % (w/v) laktózy.

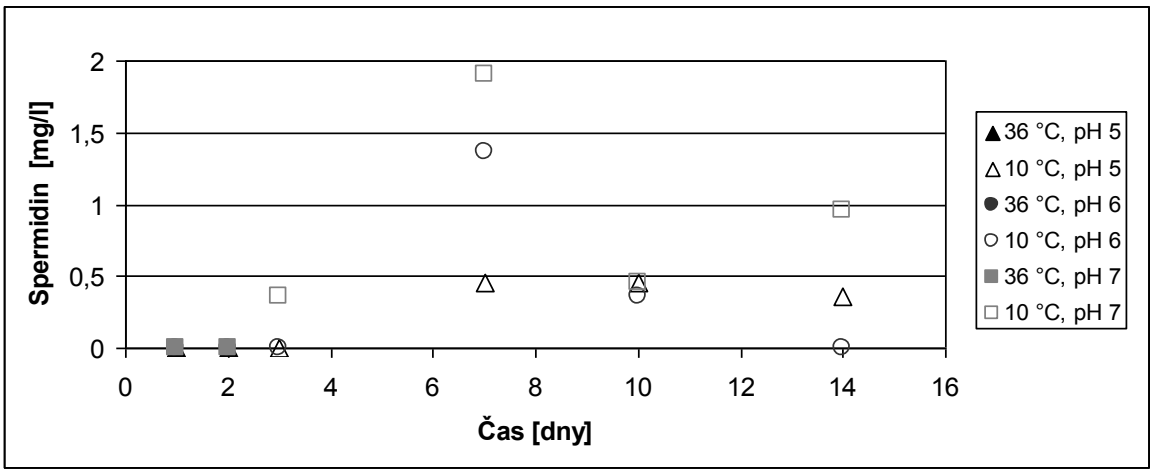


Produkce sperminu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 4,8 % (w/v) laktózy.

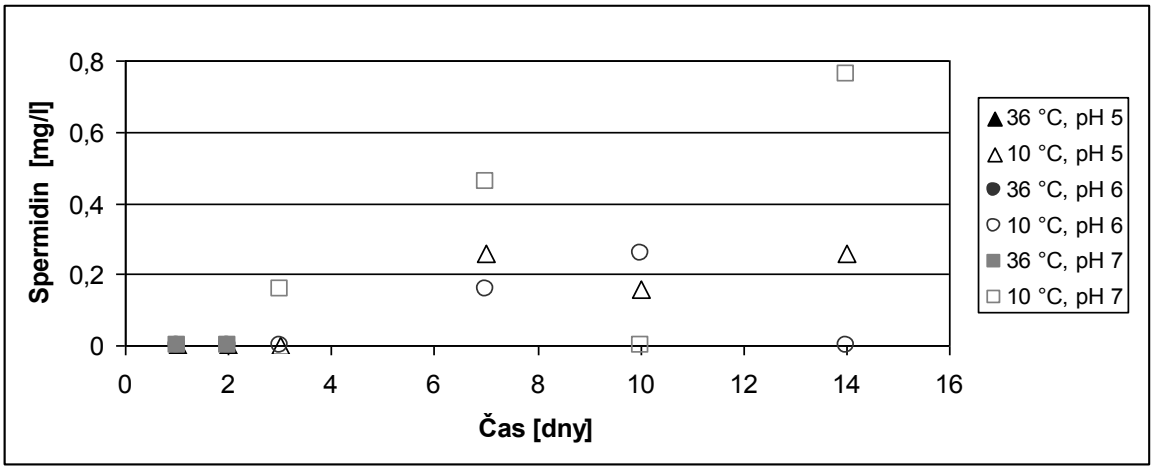
PŘÍLOHA 3: Produkce spermidinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239



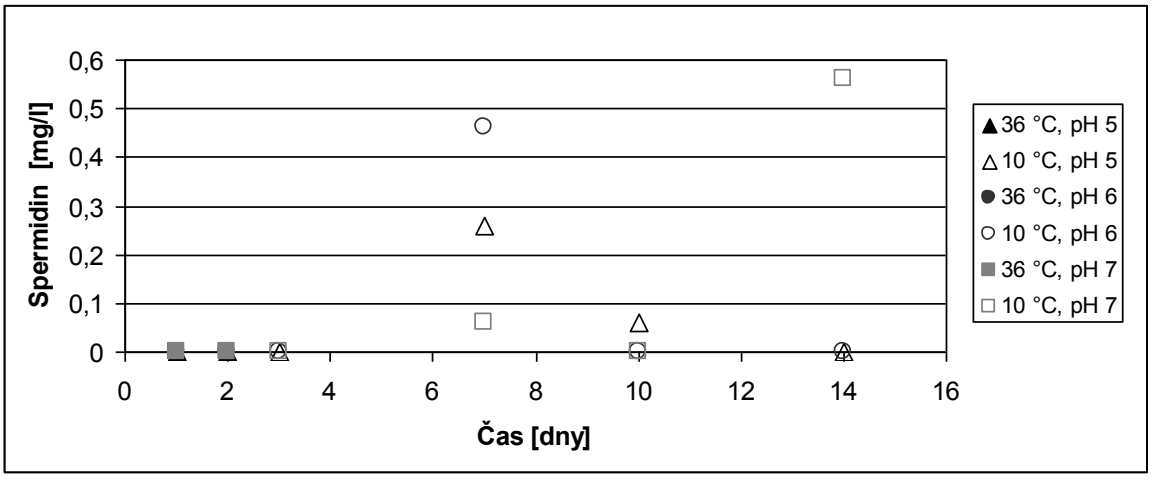
Produkce spermidinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0 % (w/v) laktózy.



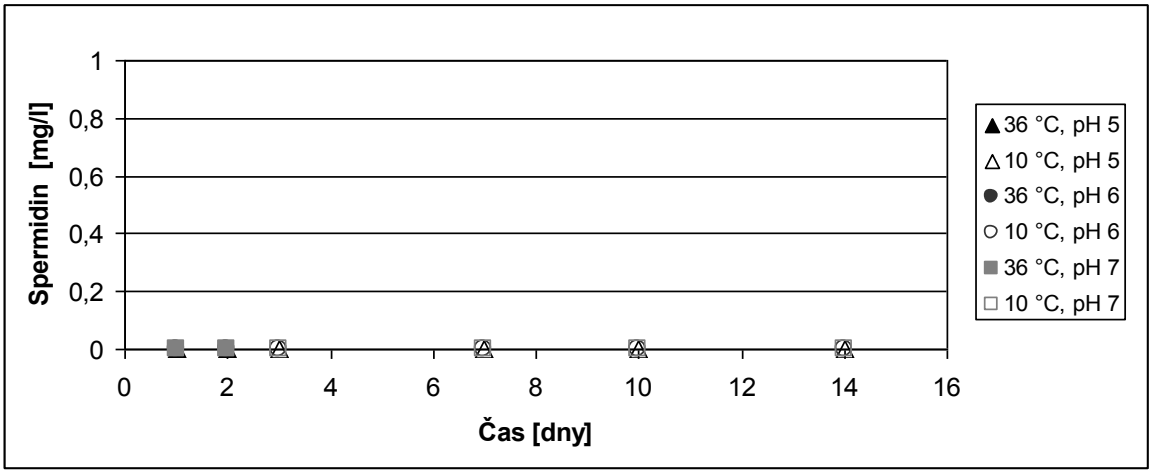
Produkce spermidinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0,25 % (w/v) laktózy.



Produkce spermidinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 0,5 % (w/v) laktózy.



Produkce spermidinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 1 % (w/v) laktózy.



Produkce spermidinu kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 kultivovaného v médiu s 4,8 % (w/v) laktózy.