

Možnosti snížení obsahu biogenních aminů bakteriemi izolovanými z potravin

Bc. Sokolová Iveta

Diplomová práce
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Iveta Sokolová**
Osobní číslo: **T17244**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Možnosti snížení obsahu biogenních aminů bakteriemi izolovanými z potravin**

Zásady pro vypracování:

- 1. Biogenní aminy – charakterizace, vlastnosti a význam v potravinách.**
- 2. Možnosti snížení obsahu biogenních aminů v potravinách.**
- 3. HPLC stanovení obsahu biogenních aminů v bujónu po kultivaci potravinářsky významných bakterií.**
- 4. Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd.* Tábor: OSSIS, 2009, 623 s. ISBN 978-80-86659-17-6.

[2] ALVAREZ, Miguel A. a Ma Victoria MORENO-ARRIBAS, 2014. The problem of bio-genic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading micro-organisms as a solution. *Trends in Food Science*. 39(2), 146-155.

[3] HERRERO-FRESNO, Ana et al., 2012. Lactobacillus casei strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International Journal of Food Microbiology*. 157(2), 297-304.

[4] Vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect, SciFinder Scholar, Medline aj.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

2. února 2019

Termín odevzdání diplomové práce:

3. května 2019

Ve Zlíně dne 2. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Jiří Miček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno:

Obor:

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

.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce bylo seznámení s biogenními aminy, bakteriemi mléčného kvašení a zjištění možností snížení obsahu biogenních aminů v potravinách pomocí bakterií izolovaných z potravin. Bakterie, které byly použity pro tento experiment, byly *Lactobacillus casei* (Sbírka mlékárenských mikroorganismů Laktoflora CCDM) a *Lactobacillus paracasei* (izolované z chlebového kvásku v Portugalsku S3). Z těchto kmenů byli vybráni dva degradéři, u kterých byl sledován vliv faktorů (množství živin, teplota, čas). Úbytek biogenních aminů byl sledován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Byly vybrány bakterie kmenu *Lactobacillus casei* CCDM 422 a CCDM 802, u kterých byly sledovány úbytky při 30 °C v půdě MRS u fenyletylaminu a histaminu kolem 40 % a při 37°C v poloviční půdě MRS-C úbytek fenyletylaminu o 70 %.

Klíčová slova: biogenní aminy, bakterie mléčného kvašení, degradace, HPLC

ABSTRACT

The aim of thesis was to familiarization with biogenic amines, lactic acid bacteria and to find out possibilities of reducing the content of biogenic amines in food using bacteria isolated from food. The bacteria used for this experiment were *Lactobacillus casei* (The dairy microorganism collection Lactoflora CCDM) and *Lactobacillus paracasei* (isolated from bread yeast in Portugal S3). The main two degraders from CCDM samples were selected from these strains, where different factors were observed (amount of nutrients, temperature, time). The loss of biogenic amines was monitored by high performance liquid chromatography(HPLC).

Bacteria of the *Lactobacillus casei* CCDM 422 and CCDM 802 were selected, in which the loss was in 30 °C in the MRS soil of phenylethylamine and histamine around 40 % and in 37°C in half soil of MRS-C the loss of phenylethylamine was by 70 %.

Keywords: biogenic amines, lactic acid bacteria, degradation, HPLC

Tímto bych chtěla velmi poděkovat vedoucí mé práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, vstřícnost a především za její čas, konzultace a připomínky během zpracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat za pomoc při vyhodnocování mé praktické části panu Ing. Pavlu Plevovi, Ph.D. a laborantkám Ing. Olze Vlčkové a Bc. Veronice Kučabové za pomoc v laboratořích. Jako poslední bych poděkovala mé rodině za podporu a trpělivost se mnou

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

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST.....	12
1 BIOGENNÍ AMINY.....	13
1.1 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ	14
1.2 CHARAKTERIZACE BIOGENNÍCH AMINŮ.....	15
1.2.1 Fenyletylamin.....	15
1.2.2 Putrescin	16
1.2.3 Kadaverin	16
1.2.4 Histamin	16
1.2.5 Tyramin	17
1.2.6 Spermin a spermidin	17
1.3 MOŽNOSTI STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	17
1.3.1 Vysoce účinná kapalinová chromatografie	18
1.3.2 Plynová chromatografie	18
1.3.3 Kapilární elektroforéza.....	18
1.4 BIOGENNÍ AMINY V POTRAVINÁCH.....	19
2 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	21
2.1 ROZDĚLENÍ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	21
2.1.1 Rod <i>Lactobacillus</i>	23
2.1.2 Rod <i>Lactococcus</i>	23
2.1.3 Rod <i>Pediococcus</i>	24
2.1.4 Rod <i>Streptococcus</i>	24
2.1.5 Rod <i>Leuconostoc</i>	24
2.1.6 Rod <i>Oenococcus</i>	25
2.2 VÝZNAM BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	25
2.3 DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA LAB.....	26
2.4 SCHOPNOST DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ POMOCÍ LAB.....	27
3 MOŽNOSTI SNÍŽENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH.....	28
3.1 ENZYMY	28
3.2 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ S INHIBIČNÍMI ÚČINKY NA DEKARBOXYLÁZA-POZITIVNÍ MIKROORGANISMY	28
3.3 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY PŮSOBÍCÍ NA DEKARBOXYLÁZA-POZITIVNÍ MIKROORGANISMY	29
3.4 TECHNOLOGICKÉ ZÁKROKY	30
3.4.1 Balení	30
3.4.2 Ozařování	30
3.4.3 Pulzní elektrické pole.....	31
3.4.4 Hydrostatický tlak a vysokotlaká homogenizace	31
II PRAKTICKÁ ČÁST	32
4 CÍLE PRÁCE	33

5	MATERIÁL A METODIKA PRÁCE.....	34
5.1	VÝBĚR MIKROBIÁLNÍCH KULTUR	34
5.2	KULTIVAČNÍ MÉDIA A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	34
5.2.1	Kultivační média	34
5.2.2	Příprava bakterií pro ověření schopnosti růstu v přítomnosti biogenních aminů a aminokyselin	36
5.2.3	Přístrojové vybavení.....	36
5.3	OVĚŘENÍ SCHOPNOSTI DEGRADACE VYBRANÝCH MIKROORGANISMŮ V KULTIVAČNÍM MÉDIU S BIOGENNÍMI AMINY	36
5.3.1	Použité mikrobiální kmeny	36
5.3.2	Kultivační média a roztoky	37
5.3.3	Příprava a odběr vzorků na analýzu HPLC.....	37
5.3.4	Derivatizace vzorků	38
5.3.5	Chromatografické stanovení biogenních aminů a aminokyselin	38
6	VÝSLEDKY	39
6.1	PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ Z AMINOKYSELIN	39
6.2	SKRÍNING DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ KMENY <i>Lbc. casei</i> A <i>Lbc. paracasei</i>	40
6.2.1	Skríning degradace biogenních aminů kmeny <i>Lbc. paracasei</i> v půdě MRS	41
6.2.2	Skríning degradace biogenních aminů kmeny <i>Lbc. paracasei</i> v půdě s nižším obsahem živin	42
6.2.3	Skríning degradace biogenních aminů kmeny <i>Lbc. casei</i> v půdě MRS-C	43
6.2.4	Skríning degradace kmeny <i>Lbc. casei</i> v půdě s nižším obsahem živin	44
6.3	DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ KMENY <i>LACTOBACILLUS CASEI</i>	45
6.3.1	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Lactobacillus casei</i> CCDM 422	45
6.3.1.1	Degradace biogenních aminů <i>Lactobacillus casei</i> CCDM 422 v půdách MRS a MRS-C	45
6.3.1.2	Degradace biogenních aminů pomocí <i>Lactobacillus casei</i> CCDM 422 při 30 °C v půdách s nižším obsahem živin.....	47
6.3.1.3	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Lactobacillus casei</i> CCDM 422 při 37 °C v půdách MRS-C a MRS	48
6.3.1.4	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Lactobacillus casei</i> CCDM 422 při 37 °C v půdách s nižším obsahem živin.....	50
6.3.2	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Lactobacillus casei</i> CCDM 802	51
6.3.2.1	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Lactobacillus casei</i> CCDM 802 při 30 °C v půdách MRS-C a MRS	51
6.3.2.2	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Lactobacillus casei</i> CCDM 802 při 30 °C v půdách s nižším obsahem živin.....	53
6.3.2.3	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Lactobacillus casei</i> CCDM 802 při 37 °C v půdách MRS-C a MRS	54
6.3.2.4	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Lactobacillus casei</i> CCDM 802 při 37 °C v půdách s nižším obsahem živin.....	56
7	DISKUZE	57

ZÁVĚR	62
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	63
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	73
SEZNAM OBRÁZKŮ	74
SEZNAM TABULEK.....	75

ÚVOD

V dnešní době jsou biogenní aminy velmi diskutované téma a jedná se o celosvětový problém, protože biogenní aminy v nadměrném množství mohou způsobit velmi vážné zdravotní problémy. Biogenní aminy se vyskytují ve všech potravinách, které obsahují proteiny nebo volné aminokyseliny, a které mohou podléhat mikrobiálním či biochemickým přeměnám. [1] [2] [3]

Jsou to organické, bazické, dusíkaté sloučeniny odvozené od aminokyselin, které vznikají především dekarboxylací aminokyselin, dále aminací a transaminací. Vyskytují se v potravinách jako přirozená složka nebo vznikají činností mikroorganismů. [1] [2] [3]

Biogenní aminy mají jak pozitivní, tak negativní účinky. Mezi jejich kladné vlastnosti můžeme zařadit to, že mohou vykazovat různé biologické účinky (hormony, stavební látky pro biosyntézu hormonů, apod.) a podílet se na metabolických procesech v živých tkáních. Avšak jejich nadměrný příjem může působit toxicky. Mezi nežádoucí účinky můžeme zařadit hypertenzi, hypotenzi, migrény a bolesti hlavy, bušení srdce, pocení, zvracení, vyrážku, průjem, v krajním případě anafylaktický šok až smrt. [1] [2] [3]

Bakterie mléčného kvašení jsou heterogenní skupina mikroorganismů, která produkuje kyselinu mléčnou jako primární nebo sekundární produkt fermentace. Mají vysokou odolnost vůči kyselému prostředí a ovlivňují chuť mléčných výrobků, jejich konzistenci a nutriční hodnoty. Vyskytují se v různých prostředích. [25] [26]

Pro snížení obsahu biogenních aminů v potravinách se například využívají startovací kultury bakterií mléčného kvašení, které mají inhibiční účinek na dekarboxyláza-pozitivní bakterie, dále enzymy, technologické zákroky nebo antimikrobiální látky. [38] [44] [48] [55]

Některé startovací kultury postrádají dekarboxylační aktivitu a je možné je využít k pozastavení růstu ostatních nežádoucích bakterií. Přidávají se například do kysaných mléčných výrobků. Některé jejich enzymy mohou přeměňovat biogenní aminy na méně toxické produkty. Mezi enzymy, které působí detoxikačně, řadíme monoaminoxidázy, diaminoxidázy a dále například histaminázy. [48] [49]

V této práci byly použity bakterie mléčného kvašení *Lactobacillus casei/paracasei* a dále byl sledován jejich vliv na snížení obsahu biogenních aminů. Mezi sledované aminy patřily histamin, fenyletylamin, putrescin, kadaverin a tyramin. Jejich úbytek byl dále analyzován a stanoven pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy (BA) jsou organické, bazické, dusíkaté sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností, přítomné v rostlinných, mikrobiálních a živočišných buňkách a mohou být detekovány v surových a ve fermentovaných potravinách. Jsou tvořeny mikrobiální dekarboxylací některých volných aminokyselin nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů. I když jsou zapojeny do několika biologických aktivit (např. lidská mozková aktivita), nadměrný perorální příjem těchto molekul může způsobit několik problémů lidskému zdraví. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) z toxikologického hlediska považuje histamin a tyramin za nejdůležitější biogenní aminy, protože jejich konzumace ve vysokých koncentracích může u některých jedinců způsobit hypotenzi nebo hypertenzi, bolesti hlavy, palpitaci a zvracení. [1]

Biogenní aminy se obvykle vytvářejí během procesu rozkladu nebo znehodnocování potravin, který zahrnuje tvorbu volných aminokyselin proteolýzou spolu s produkcí bakteriálních dekarboxyláz. Mezi potraviny, ve kterých mohou biogenní aminy vznikat ve významném rozsahu, patří sýry, maso, ryby, červené víno, fermentované potraviny, jako jsou klobásy, a potraviny obsahující kakao, jako je čokoláda. [2]

BA mohou sloužit jako zdroje dusíku a prekurzory pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů. Mohou také ovlivnit procesy v organismu, jako je regulace tělesné teploty, příjem živin, zvýšení nebo snížení tlaku. V rostlinách se diaminový putrescin a polyaminy spermidin a spermin podílejí na řadě fyziologických procesů, jako je buněčné dělení, kvetení, vývoj ovoce, reakce na stres a senescence. [3]

Polyaminy jsou důležité pro růst, renovaci a metabolismus každého orgánu v těle a jsou nezbytné pro udržení vysoké metabolické aktivity normálního fungování a imunologického systému střev. Význam putrescinu, spermidinu a sperminu při růstu nádorů je znám a inhibice biosyntézy polyaminů u jedinců s nádorem je jedním z hlavních cílů výzkumu rakoviny. BA jsou potenciální prekurzory pro tvorbu karcinogenních N-nitrososloučenin. Mohou tvořit nitrosaminy reakcí s dusitanem, zatímco terciární aminy produkují řadu labilních N-nitroso produktů. [3]

Některé BA, jako putrescin, kadaverin, spermidin, mohou vylučovat volné radikály. Tyramin má antioxidační aktivitu, která se s jeho obsahem zvyšuje. Inhibiční účinek tedy závisí na aminoskupinách a hydroxylových skupinách [5]. Spermin je schopen regenerovat tokoferol z tokoferoxylového radikálu přes donor vodíku z aminoskupiny. Radikál sperminu dále

váže lipidové nebo peroxidové radikály do lipidového komplexu. Některé BA přispívají k chuti jídla. [3]

1.1 Vznik biogenních aminů

Aminy mohou být klasifikovány jako přírodní polyaminy a biogenní aminy v závislosti na jejich syntéze. Přírodní polyaminy jsou přirozeně produkovány živočichy, rostlinami a mikroorganismy a jsou to především spermidin, spermin, a dále diaminy jako je putrescin, kadaverin a agmatin. Zatímco biogenní aminy jsou produkovány především dekarboxylací volných aminokyselin zprostředkovaných pomocí enzymů. [4]

Biogenní aminy jsou tedy vytvořené zejména mikrobiální dekarboxylací aminokyselin v potravinách nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů pomocí transamináz. [5]

Tvorba vysokého množství biogenních aminů závisí na několika faktorech:

- a) Dostupnost substrátu (volné prekurzorové aminokyseliny nebo krátké peptidy obsahující tyto aminokyseliny) a dostupnost kofaktorů (např. pyridoxal 5'-fosfát)
- b) Odpovídající podmínky prostředí (např. pH, teplota, atd.)
- c) Přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou [4]

Gramnegativní bakterie mají homomerní enzymy, které jsou závislé na pyridoxal 5'-fosfátu, zatímco grampozitivní bakterie mají heteromerní enzymy, které obsahují esenciální pyruvoylovou skupinu, ale ne pyridoxal 5'-fosfát. Některé kmeny mohou dekarboxylovat jednu nebo i více aminokyselin, zatímco jiné ne. [4]

Názvy mnoha BA odpovídají pojmenování jejich původních aminokyselin: histamin vzniká z histidinu, tyramin z tyrosinu, β -fenylethylamin z fenylethylalaninu, tryptamin z tryptofanu. V rostlinách a některých mikroorganismech existuje alternativní cesta produkce putrescinu z argininu přes agmatin. Lysin je dekarboxylován lysin-dekarboxylázou na kadaverin. Dekarboxylázová aktivita je silnější v kyselém prostředí, optimální pH se pohybuje mezi 4,0 a 5,5. Kromě toho jsou v takovém prostředí bakterie silněji vybízeny k produkci těchto enzymů, jako součást jejich obranných mechanismů proti kyselému prostředí. Produkci BA dále ovlivňuje dostupnost kyslíku, redoxní potenciál a teplota. Teplota pro tvorbu BA bakteriemi je optimální mezi 20 °C a 37 °C, při snížené teplotě se zpomalí jejich růst. [3]

1.2 Charakterizace biogenních aminů

Biogenní aminy (BA) mohou být klasifikovány jako monoaminy (tyramin, histamin, β -fenylethylamin a tryptamin), diaminy (putrescin, kadaverin) nebo polyaminy (PA) (spermin a spermidin) podle počtu aminoskupin v jejich chemické struktuře. [6]

Biogenní aminy také mohou fungovat jako poslové v periferním nervovém systému (PNS) a centrálním nervovém systému (CNS) u obratlovců a bezobratlých. Pět zavedených biogenních aminových neurotransmiterů u obratlovců spadá do tří tříd: 1) katecholaminy - norepinefrin, epinefrin a dopamin,

2) indoleamin - serotonin

3) imidazolamin - histamin. [7]

U bezobratlých jsou norepinefrin a epinefrin nahrazeny dvěma fenolaminy, tyraminem a oktopaminem, které působí jako neurotransmitery, neuromodulátory nebo neurohormony zprostředkovávající různě složitě chování. [7]

Biogenní aminy regulují mnoho funkcí v mozku, včetně endokrinní sekrece, kognitivní funkce, agrese, spánku a bdění, emočních stavů, motivace, rozhodování, učení a paměti. [7]

U lidí je patogeneze spojena s abnormální úrovní biogenních aminů v CNS různých neurologických onemocnění, jako je Alzheimerova choroba (AD), Parkinsonova choroba (PD), Huntingtonova nemoc (HD), schizofrenie nebo deficit pozornosti hyperaktivního onemocnění (ADHD). [7]

Biogenní aminy a jejich metabolity jsou důležité signální molekuly regulující funkce nervových buněk v nervovém systému u obratlovců a bezobratlých. [7]

1.2.1 Fenyletylamin

Fenylethylamin (FEM) je endogenní amfetamin a jako takový blokuje transportéry monoaminů a v menší míře vezikulární transport, čímž zvyšuje hladinu odpovídajících molekul neurotransmiterů v synaptické štěrbině. Ve fyziologickém systému působí FEM jako neuromodulátor a je primárně metabolizován lidskou monoaminoxidázou B na odpovídající aldehyd a amoniak. [8]

1.2.2 Putrescin

Putrescin (1,4-diaminobutan), malý alifatický diamin, je všudypřítomný v široké škále živých buněk a hraje důležitou roli v mnoha fyziologických procesech, zejména v buněčném růstu. Zvýšení produkce putrescinu je často spojováno s několika onemocněními, například maligním nádorem. Kromě toho se také putrescin obvykle nachází ve zkažených potravinách v důsledku dekarboxylace aminokyselin mikroorganismy. Proto je stanovení koncentrace putrescinu velmi důležité v klinických, biologických a chemických vzorcích, stejně tak při zpracování a fermentaci potravin. [9]

1.2.3 Kadaverin

Kadaverin (1,5-diaminopentan) je přírodní polyamin s více bioaktivitami, který je široce distribuován v prokaryotech a eukaryotech. Kadaverin vykazuje široké možnosti pro různé aplikace, zejména jako důležitý monomer pro bioamidy na bázi polyamidu. [10] [11]

Většinou vzniká hydrolýzou proteinu během hnilobného rozkladu tkáně. Kadaverin má relativně nízkou teplotu varu. Relativně snadno se odpařuje a destiluje. [10]

Kadaverin hraje důležitou roli v přežití buněk při kyselém pH a chrání buňky. V rostlinách se podílí na regulaci různých procesů, jako je růst a vývoj rostlin, signalizace buněk, reakce na stres a obrana před hmyzem. Tvorba kadaverinu také souvisí s růstem zvířat a tvorbou nádorů. Kadaverin se tvoří dekarboxylací L-lysinu, a proto jeho biosyntéza závisí na L-lysinu. [11]

1.2.4 Histamin

Histamin (2-(imidazol-4-yl) ethanamin) je důležitým mediátorem mnoha fyziologických a patologických procesů, včetně zánětu, sekrece žaludeční kyseliny, neuromodulace, regulace imunitní funkce, buněčné proliferace a diferenciaci. Histamin vykazuje své biologické účinky navázáním na čtyři různé subtypy receptoru spojeného s G proteinem (H1-H4). [12]

Vysoký obsah histaminu byl zjištěn v různých potravinách, zejména v rybách a dále například ve fermentovaných potravinách. Konzumace potravin s vysokým obsahem histaminu může způsobit otravu histaminem, která je známá jako scombroidní otrava. Může způsobit pouze mírné onemocnění se symptomy, jako jsou závratě, bolesti hlavy, hypotenze, orální pálení a pocení, ale také otravy ohrožující život. [12]

1.2.5 Tyramin

Tyramin (4- (2-aminoethyl) fenol), je biogenní aromatická monoaminová sloučenina vznikající dekarboxylací aminokyseliny tyrosinu. Tyramin se může hromadit ve vysokých koncentracích v širokém spektru syrových a fermentovaných potravin, jako jsou ryby, maso, ovoce, sýry, sójové produkty a víno. [13]

Vysoká hladina tyraminu může vyvolat zdravotní problémy, jako je migréna, srdeční selhání a krvácení do mozku. Dále způsobuje periferní vazokonstrikci, zvýšení hladiny cukru v krvi a vylučování norepinefrinu. [14] [15]

1.2.6 Spermin a spermidin

Spermin (N,N-bis(3-aminopropyl) butan-1,4-diamin) a spermidin (N'-(3-aminopropyl) butan-1,4-diamin) jsou polyaminy (PA) přirozeně se vyskytující ve všech organismech, ve kterých mají důležité fyziologické funkce (regulace genové exprese, prevence fragmentace DNA zprostředkované endonukleázou a inhibice poškození DNA). Přebytek PA však souvisí se zdravotními riziky. PA se v některých potravinách hromadí v poměrně vysokých koncentracích. [6] [16]

1.3 Možnosti stanovení biogenních aminů

Pro stanovení biogenních aminů existuje několik kvalitativních a kvantitativních metod. Metody byly navrženy jako skrínigové postupy a většina z nich zahrnuje použití diagnostického média obsahující prekurzorovou sloučeninu (substrát) a indikátor pH (bromkrezolpurpur), který mění barvu v důsledku způsobené změny pH média, když je prekurzorová aminokyselina dekarboxylována na zásaditý amin. Mezi tyto metody patří především skrínigová kultivační metoda. Dále se mohou použít metody, jako je tenkovrstvá chromatografie, vysoce účinná kapalinová chromatografie a molekulárně-biologické metody založené na polymerázové řetězové reakci (PCR), které jsou používány k potvrzení přítomnosti genů kódujících dekarboxylázy aminokyselin zodpovědné za syntézu biogenních aminů. [4]

Molekulární metody včasné a rychlé detekce produkčních bakterií se stávají alternativou tradičních kultivačních metod. Metody PCR nabízejí výhody rychlosti, citlivosti, jednoduchosti a specifické detekce genů aminokyselinových dekarboxyláz. Kromě toho tyto molekulární metody detekují potenciální rizika mikrobiální tvorby biogenních aminů v potravinách. [17]

1.3.1 Vysoce účinná kapalinová chromatografie

Metody HPLC (vysoce účinná kapalinová chromatografie) byly úspěšně použity pro stanovení aminů. Vysoce polární, netěkavé a tepelně nestabilní sloučeniny mohou být analyzovány pomocí HPLC. Byly vyvinuty modifikované postupy pro extrakci a derivatizaci biogenních aminů a využití kyseliny chloristé a dansylchloridu pro extrakci a derivatizaci. Tato metoda se využívá pro aminy, heterocyklické aminy, které mají charakteristické UV spektrum a jsou elektrochemicky oxidovatelné. Některé méně polární aminy fluoreskují v polárních rozpouštědlech. Proto lze tyto sloučeniny detekovat pomocí UV, DAD, elektrochemického a fluorescenčního detektoru. [18]

Byla také vyvinuta metoda μ -LC (kapalinová chromatografie s minimalizací průtoků a nákladů pro stanovení) pro rychlou a citlivou analýzu aromatických aminů elektrochemickou detekcí, dále metoda pro stanovení aromatických aminů a fenolů v environmentálních vzorcích selektivní SPE elucí (extrakce na pevné fázi) a HPLC s amperometrickou detekcí a metoda analýzy aromatických aminů v povrchových vodách, které se dostávají do odpadních vod z textilního průmyslu pomocí LC (kapalinová chromatografie) s elektrochemickou detekcí. [19] [20]

1.3.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie není pro stanovení BA v potravinách běžně používána jako kapalinová chromatografie nebo kapilární elektroforéza. Používá se jako detekční technika s použitím hmotnostního spektrometru. Plynová chromatografie je specificky aplikována ve fermentovaných nápojích za účelem nabídnutí alternativních metod k HPLC. [21]

Před analýzou je třeba provést derivatizaci vzorků, aby se změnila vlastnosti BA (například rozpustnost, bod varu nebo tání, chemické složení) včetně snížení jejich polarity. Jako derivatizační činidla mohou být použita například pentafluorbenzoylchlorid nebo alkylované chlorformiáty. Jednou z výhod použití těchto sloučenin je, že derivatizační reakce může být prováděna ve vodném zásaditém roztoku. [21]

1.3.3 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) je v poslední době považována jako slibná technika navzdory její nízké citlivosti vůči jiným metodám, ale díky její jednoduchosti, rychlosti a spolehlivosti. [21]

Komerčně dostupné CE jsou automatizované podobným způsobem jako HPLC a nabízejí minimální náklady na čas, organické rozpouštědla a použití dalších činidel. CE provádí rozdělení rozpuštěných látek uvnitř kapiláry vlivem elektrického pole. Kapilární elektroforéza je univerzální a má k jejímu rozdělení několik režimů, kdy její hlavní dva režimy jsou kapilární (CZE) a micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). Tyto režimy jsou zaměnitelné. CZE využívá vnitřních rozdílů ve volné elektroforetické mobilitě roztoku k dosažení oddělení, ale je omezena na separaci nabitých analytů tak, že neutrální analyty nejsou detekovány. Jako alternativní režim separace při řešení neutrálních analytů můžeme využít MEKC, kde dochází k separaci analytů mezi vyrovnávací pamětí a pseudostacionární fází, která je tvořena micelami povrchově aktivních látek (aglomeráty velikosti koloidu). [19]

Migrační chování ionizovaných sloučenin je závislé na různých faktorech, jako je pH pufru, organický modifikátor, koncentrace pufrového roztoku, teplota kapilárních trubek a intenzita elektrického pole. Metoda CE je vhodná pro určení ekologicky významných aromatických aminů a MEKC pro přímou detekci některých aromatických aminů ve vzorcích vody. [19]

Kapilární elektroforéza se využívá při stanovení biogenních aminů v pivě, víně a například ještě v ústřicích. [62] [63]

1.4 Biogenní aminy v potravinách

Biogenní aminy jsou organické látky přítomné v potravinách, které mohou vyvolat zdravotní problémy (alergické reakce, obtíže s dýcháním, svědění, vyrážku, zvracení, horečku, hypotenzii a hypertenzi). Vyskytují se v potravinách bohatých na bílkoviny a aminokyseliny (například v rybách, mase, sýrech, zelenině, víně a fermentovaných produktech), které umožňují biochemickou aktivitu mikroorganismů. Nejčastější intoxikace bývají způsobeny histaminem, který se nejčastěji vyskytuje v rybách, jako jsou tuňák, makrela a sardinka. Další zdravotní problémy může způsobovat například tyramin. Putrescin a kadaverin mohou inhibovat detoxikační enzymy histaminu, a tím působí jako potenciátoři toxicity histaminu. [3] [22]

Nebezpečná množství histaminu produkují především bakterie rodů *Proteus*, *Hafnia*, *Vibrio* a *Klebsiella* a tyto bakterie se objevují především v rybách, kdy mohou způsobit scombroidovou otravu. Dále ryby mohou obsahovat velká množství tryptaminu, putrescinu, kadaverinu, tyraminu, spermidinu a sperminu). [23]

V kysaném zelí byl zjištěn především zvýšený obsah putrescinu a tyraminu, kdy putrescin se hromadí zejména v zelí v solném nálevu. Produkci těchto BA způsobují především bakterie *Leuconostoc mesenteroides* a *Lactobacillus*. Kadaverin, histamin, putrescin, spermidin a tyramin byly rovněž nalezeny ve fermentované mléčné zelenině. [3]

Výskyt biogenních aminů v mléce je celkem nízký, ale u sýrů dosahuje vysokých hodnot, protože sýr obsahuje bílkoviny, enzymy, kofaktory, vodu a bakterie, a proto představuje ideální prostředí pro produkci BA z volných aminokyselin mikrobiální dekarboxylační aktivitou. [1] [3]

Zpracované maso může obsahovat vysoké množství histaminu, kadaverinu a tyraminu. BA ve fermentovaných masných výrobcích mohou vzniknout z kontaminované suroviny nebo během samotného procesu fermentace. V těchto výrobcích se vyskytují především tyramin, putrescin a kadaverin, které mohou vzniknout z důsledku aktivity bakterií rodů *Pseudomonas*, *Carnobacterium* a čeledi *Enterobacteriaceae*. [3] [24]

Převládající BA ve víně jsou histamin, tyramin, putrescin a β -fenylethylamin. [3]

2 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Bakterie mléčného kvašení představují skupinu gram-pozitivních bakterií, které mají určité společné morfologické, metabolické a fyziologické vlastnosti. Jsou nesporulující, kataláza-negativní, superoxid dismutáza pozitivní koky nebo tyčinky. [25]

Všechny bakterie mléčného kvašení rostou anaerobně, ale dokáží růst i v přítomnosti kyslíku jako aerotolerantní anaerobové. Dále disponují alternativními způsoby detoxikace peroxidových radikálů pomocí peroxidázových enzymů. [25] [26]

Bakterie mléčného kvašení získávají energii přeměnou cukrů. Mnoho rodů bakterií produkuje jako hlavní produkt fermentace kyselinu mléčnou. [25] [26]

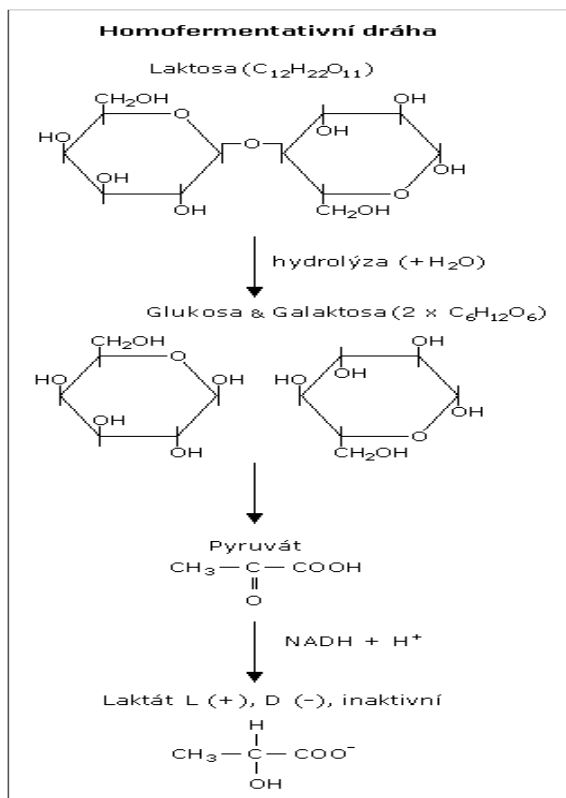
Mezi základní fermentace patří homolaktická (homofermentativní) a heterolaktická (heterofermentativní) cesta. Homofermentativní cesta je založena na glykolýze (nebo na dráze Embden-Meyerhof-Parnas) a produkuje prakticky jen kyselinu mléčnou. Při heterofermentativní cestě (pentosafosfoketolázové cestě) je kromě kyseliny mléčné produkováno i významné množství CO₂ a ethanolu nebo acetátu. Zpravidla lze pentózy fermentovat pouze heterofermentativně, kdežto hexózy oběma cestami. Při homolaktické fermentaci vznikají 2 moly ATP z jednoho molu glukózy a při heterofermentativní 1 mol. [26]

2.1 Rozdělení bakterií mléčného kvašení

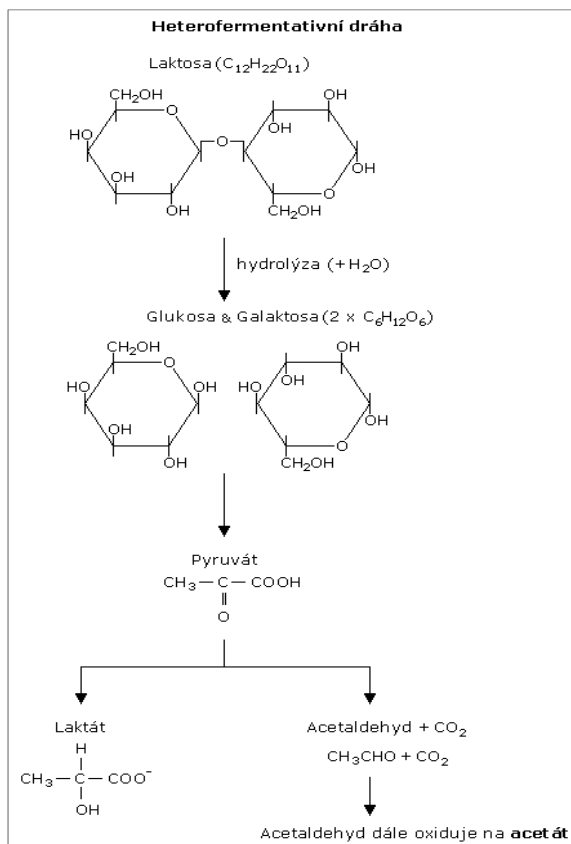
Klasifikace bakterií mléčného kvašení do různých rodů je do značné míry založena na morfologii, způsobu fermentace glukosy, růstu při různých teplotách, konfiguraci produkované kyseliny mléčné, schopnosti růst při vysokých koncentracích soli a kyselé nebo zásadité toleranci.

Podle způsobu fermentace dělíme bakterie mléčného kvašení na:

- a) obligátně homofermentativní (obr. 1) - druhy *Lactobacillus acidophilus*, *Lbc. delbrueckii*, a *Lbc. helveticus*
- b) fakultativně heterofermentativní - *Lbc. casei*, *Lbc. curvatus* a *Lbc. plantarum*
- c) obligátně heterofermentativní (obr. 2) - rody *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella*, druhy *Lactobacillus brevis*, *Lbc. fermentum*, *Lbc. reuteri* [26]



Obrázek 1: Homofermentativní dráha [27]



Obrázek 2: Heterofermentativní dráha [27]

2.1.1 Rod *Lactobacillus*

Laktobacily jsou mikroaerofilní gram-pozitivní bakterie běžně se vyskytující v různých prostředích, včetně mléčných prostředí bohatých na živiny, na povrchu lidských sliznic, na rostlinách a v půdě. Rod *Lactobacillus* se řadí do kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli* a řádu *Lactobacillales*. [26]

Tento rod je gram-pozitivní tyčinkovitá bakterie. Zástupci rodu *Lactobacillus* jsou důležití pro výrobu fermentovaných mléčných a rostlinných výrobků. Produkují kyselinu mléčnou a jiné kyseliny. [28]

Na základě 16S rRNA sekvencí jsou laktobacily fylogeneticky rozděleny do sedmi skupin: *Lactobacillus buchneri* (bu gr), *Lactobacillus casei* (ca), *Lactobacillus delbrueckii* (de), *Lactobacillus plantarum* (pl), *Lactobacillus reuteri* (re), *Lactobacillus sakei* (sa) a *Lactobacillus salivarius* (sl). Rod je dále rozdělen do tří skupin založených na sacharidových fermentačních drahách: (1) obligátně homofermentativní; (2) fakultativně heterofermentativní; a (3) obligátně heterofermentativní laktobacily. Laktobacily mohou fungovat jako startovací kultury (rychle produkují kyselinu) a jako probiotické kultury. Laktobacily mohou být jednou z mála kontaminujících bakterií, které jsou schopny růst v sýru po výrobě (nonstarterové bakterie mléčného kvašení, NSLAB). Startovací kultury a NSLAB mohou hrát odlišnou roli v metabolismu laktózy, laktátu a citrátu, proteolýzy a lipolýzy, které jsou považovány za primární události během zrání sýrů. [29]

2.1.2 Rod *Lactococcus*

Rod *Lactococcus* jsou z gram-pozitivní koky. *Lactococcus* je nejznámější pro svou úlohu ve výrobě mléčných výrobků v důsledku své schopnosti rychle produkovat kyselinu mléčnou z laktózy. Různé druhy mohou produkovat kromě kyseliny mléčné i další metabolické konečné produkty, které sýrům dodávají zvláštní aroma. [30]

Rod *Lactococcus* zahrnuje dvanáct druhů: *Lactococcus lactis* (včetně poddruhů *cremoris*, *lactis* a *hordniae*), *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum* a *L. raffinolactis*, *L. chungangensis*, *L. formosensis*, *L. fujiensis*, *L. hircilactis*, *L. laudensis*, *L. taiwanensis* a *L. nasutitermitis*. [26] [31]

2.1.3 Rod *Pediococcus*

Pediococcus je gram-pozitivní, oxidáza-negativní a kataláza-negativní mikroorganismus, který se vyskytuje ve formě sférických buněk stejnoměrné velikosti, které tvoří tetrády ve dvou kolmých směrech. Obvykle netvoří řetězce buněk. Pediokoky jsou fakultativně anaerobní homofermentativní bakterie, které produkují kyselinu mléčnou jako hlavní produkt. Pediokoky mohou růst při pH 5, při pH 9 už se jejich růst zastavuje. Tvoří bakteriociny (např. pediociny). [26]

2.1.4 Rod *Streptococcus*

Streptokoky jsou gram-pozitivní, nemotilní, nesporulující, kataláza-negativní koky, které se vyskytují ve dvojicích nebo řetězcích. Jsou to fakultativní anaerobové a někteří jsou striktně anaerobní. Streptokoky jsou klasifikovány na základě morfologie kolonií, hemolýzy a biochemických reakcí. Podle typu hemolýzy jsou děleny do tří skupin: β -hemolytické (čirá, kompletní lýza červených krvinek), α -hemolytické (neúplná hemolýza – viridace) a γ -hemolytické (bez hemolýzy). Streptokoky jsou součástí normální lidské mikroflóry. Mají široký význam v lékařství a průmyslu. V průmyslových a mléčných procesech se používají jako indikátory znečištění. V mlékárenském průmyslu je využíván druh *Streptococcus thermophilus*. [32]

2.1.5 Rod *Leuconostoc*

Leuconostoc je gram-pozitivní, fakultativně anaerobní, kataláza negativní bakterie, kdy buňky jsou elipsoidní či kulovité, často protáhlé a obvykle se vyskytují ve dvojicích nebo řetězcích. Optimální pH pro růst je 6,5. Optimální růstová teplota je mezi 20 °C a 30 °C. Psychrotrofní druhy *L. carnosum*, *L. gasicomitatum* a *L. gelidum* mohou růst při chladírenských teplotách, růst některých kmenů byl detekován i při 1 °C. [26]

Kmeny patřící k rodu *Leuconostoc* jsou heterofermentativní bakterie, které se často používají v mlékárenském průmyslu, kde mohou hrát různé důležité role, jako je produkce aromatických látek, dextranu a plynu (CO₂) v sýrech. Druhy/ poddruhy leukonostoků významné pro mlékárenský průmysl zahrnují *Leuconostoc mesenteroides* (subsp. *mesenteroides*, *dextranicum* a *cremoris*), *Leuconostoc pseudomesenteroides* a *Leuconostoc lactis*, většinou používané jako kultury produkující aroma v mléčných fermentačních produktech. [33]

2.1.6 Rod *Oenococcus*

Oenococcus má podobně jako rod *Leuconostoc* heterofermentativní metabolismus a nepřítomnost arginin-deiminázy. Buňky tohoto rodu mají tvar koků, které jsou buď protáhlé, nebo elipsoidní. [26]

Tento rod je gram-pozitivní, nemotilní, oxidáza-negativní, kataláza-negativní a fakultativně anaerobní. *Oenococcus* je hlavní druh bakterií mléčného kvašení, které jsou zodpovědné za malolaktickou fermentaci ve víně. [34] [35]

2.2 Význam bakterií mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (LAB) fermentují rostliny, ryby, maso a mléko a proměňují je v chutné potravinářské výrobky se zvýšenou trvanlivostí; ostatní LAB mohou působit jako probiotika a tím podporovat fyziologickou střevní mikroflóru. Výroba jogurtu, sýru a kysaného zelí, ale také chleba, šunky a oliv, nebo okurek, sójové a rybí omáčky vyžaduje metabolickou aktivitu LAB. Bakterie mléčného kvašení se využívají pro tvorbu aroma nebo pro získání požadované textury výrobku díky své velké rozmanitosti druhů a kmenů s různými funkcemi. [36]

LAB využívají prostředí, která jsou bohatá na cukry a bílkoviny (často jsou také k dispozici tuky, vitaminy a nukleotidy). V důsledku toho je většina LAB auxotrofní pro mnohé aminokyseliny a vitaminy. [36]

Protektivní funkce LAB je spojena s produkcí antimikrobiálně aktivních metabolitů (organické kyseliny, diacetyl, acetaldehyd, peroxid vodíku, oxid uhličitý, bakteriociny, deriváty aminokyselin) a zvyšuje bezpečnost potravin a prodlužuje jejich trvanlivost. Probiotická funkce vyplývá z mnoha aktivit LAB chemické, biochemické a mikrobiologické povahy, jejichž výsledkem je pozitivní působení na zdravotní stav a kvalitu života lidí nebo zvířat. [36] [37]

Pro potravinářské aplikace LAB má význam i syntéza texturně významných látek jako jsou exopolysacharidy (EPS), které mohou být syntetizovány vybranými kmeny LAB z galaktózových, glukózových a rhamnózových jednotek. Produkce EPS se pozitivně uplatňuje např. při ovlivnění textury fermentovaných výrobků a ochraně buněk LAB před napadením bakteriofágy. Produkce sensoricky významných látek LAB zahrnuje hlavně organické kyseliny

(kyselina mléčná, kyselina octová), aldehydy a ketony (acetaldehyd, diacetyl) a směs těkavých metabolitů vznikajících rozkladem sacharidů, bílkovin a lipidů a jejich vzájemnými reakcemi. [37]

Pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků má z hlediska technologie z výše uvedených vlastností LAB největší význam metabolismus laktózy, v menší míře pak rozklad bílkovin. LAB se v průmyslu používají ve formě čistých mlékařských kultur, které mohou být ve formě tekuté, lyofilizované nebo hluboce zmražené. Nejčastěji se setkáváme s jogurtovou kulturou (*Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) v jogurtech a jogurtových mlékách, se smetanovou kulturou (směs druhů rodu *Lactococcus* a *Leuconostoc*) v kysaných mlékách, smetanových zákysech, v zakysaných smetanách a v kysaném podmáslí, s acidofilní kulturou (*Lactobacillus acidophilus*) či tzv. ABT kulturou, která kromě *L. acidophilus* a *Streptococcus thermophilus* obsahuje ještě bifidobakterie. Bakterie mléčného kvašení jsou využívány rovněž pro výrobu kefirů a kefirových mlék. Řada výrobců v současné době používá zvláště do jogurtů přídatné kultury - probiotické kmeny bifidobakterií nebo laktobacilů, u kterých byl testován jejich zdravotně prospěšný účinek. [36] [37]

2.3 Dekarboxylázová aktivita LAB

Řada bakterií mléčného kvašení syntetizuje jako dekarboxylační produkty prekurzorových aminokyselin biogenní aminy. Odpovědné enzymy, dekarboxylázy aminokyselin, jsou přítomny v mnoha mikroorganismech, jak přirozeně se vyskytujících nebo přidaných bakterií mléčného kvašení (LAB), které se podílejí na fermentaci potravin a nápojů. [38]

Dekarboxyláza-pozitivní LAB mohou vytvářet z volných aminokyselin velké množství biogenních aminů, jako jsou tyramin, histamin, putrescin a β -fenylethylamin. Například *Lactobacillus curvatus* je schopný dekarboxylovat AMK na BA. [41]

Dekarboxylace určitých aminokyselin, jako jsou tyrosin a histidin, může vyvolat vznik bioaktivních molekul (tyraminu a histaminu), které se účastní patologických reakcí. Některé kmeny LAB dokáží syntetizovat melatonin (bioaktivní molekula), který je odvozen od dekarboxylace tryptofanu a serotoninu, který stabilizuje imunitu, záněty a karcinogenitu. Biosyntéza tyraminu je druhově charakteristická pro *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* a *E. durans*, a syntéza putrescinu je druhovým znakem *E. faecalis*. [39] [40]

2.4 Schopnost degradace biogenních aminů pomocí LAB

Biogenní aminy se mohou hromadit v potravinách ve vysokých koncentracích v důsledku mikrobiální aktivity. V některých fermentovaných produktech je obtížné zabránit hromadění BA, ale alternativou v takových případech je použití potravinových mikroorganismů, které jsou schopny degradovat BA, jakmile jsou syntetizovány v potravinové matrici. [38]

Například se mohou použít startovací kultury bakterií mléčného kvašení, které jsou schopny působit proti akumulaci BA ve fermentovaných potravinách. Tyto použité kultury jsou charakterizovány nepřítomností jakékoli dekarboxylační aktivity. Některé tyto použité mikroorganismy jsou schopny tvořit bakteriociny. Dále tyto startovací kmeny jsou používány při výrobě mléčných výrobků (například sýrů), například rod *Lactobacillus paracasei*, a dále při výrobě masných produktů. [42] [43]

LAB používané jako startovací kultury mohou indukovat rychlé okyselení, čímž inhibují růst dekarboxylačních mikroorganismů, což vede ke snížení tvorby BA. [42] [43]

Lactobacillus plantarum, *Lb. sakei*, *Lb. pentosus*, *Pediococcus acidilactici*, *Micrococcus* sp. a *Brevibacterium linens* mají schopnost degradovat *in vitro* tyramin a histamin. Čtyři kmeny *Lb. sakei* dokáží degradovat histamin ve fermentovaných rybích výrobcích. *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus plantarum* mohou degradovat tyramin. [42] [43]

3 MOŽNOSTI SNÍŽENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH

Pro snížení biogenních aminů v potravinách existuje několik možností, například aplikace enzymů (mono- a diaminooxidáz různého původu), použití LAB s inhibičními účinky na dekarboxyláza-pozitivní mikroorganismy, aplikace antimikrobních látek působících na dekarboxyláza-pozitivní mikroorganismy a technologické zákroky. [38] [44] [48] [55]

3.1 Enzymy

Mnoho mikroorganismů může produkovat aminooxidázy (flavoproteiny), které jsou zodpovědné za detoxikaci BA. Tyto enzymy metabolizují BA deaminací. V závislosti na počtu aminokyselin se dělí na mono- (MAO-A, MAO-B) a diaminooxidázy (DAO). Tyto enzymy jsou také přítomny na střevní sliznici. Za normálních podmínek je přijímaný biogenní amin z potravin rychle detoxikován aminooxidázami střevní sliznice. Histamin může být také detoxikován pomocí methyl- nebo acetyltransferáz a dále pomocí histamináz. [38] [44]

U některých jedinců je tento mechanismus odbourávání nedostačující, například u dětí, pacientů se sníženou funkcí jater, pacientů užívajících léky jako antidepresiva nebo u lidí, kteří mají vysoký příjem biogenních aminů potravinou. Činnost aminooxidáz dále může inhibovat i acetaldehyd, který vzniká metabolismem alkoholu. [45]

Tyto enzymy byly prokázány také u některých bakterií rodů *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Brevibacterium* a *Staphylococcus*. [46]

Staphylococcus carnosus a *Bacillus amyloliquefaciens* dokáží redukovat biogenní aminy při výrobě rybích omáček. [47]

3.2 Bakterie mléčného kvašení s inhibičními účinky na dekarboxyláza-pozitivní mikroorganismy

LAB s inhibičními účinky na dekarboxyláza-pozitivní mikroorganismy neboli LAB s aminooxidázovou aktivitou se používají ke snižování BA v potravinách. Tyto kultury jsou buď amin-oxidující (oxidují biogenní aminy na aldehydy, hydroperoxid a amoniak) nebo amin-negativní (nejsou schopné dekarboxylovat aminokyseliny na biogenní aminy). [48] [49]

Mezi takové LAB řadíme například startovací kultury. Tyto kultury jsou vybrané a prověřené kmeny mikroorganismů, které jsou ve formě čisté kultury nebo ve směsích s jinými

kmeny přidávány do potravin v průběhu výrobního procesu za účelem vyvolání určitých požadovaných změn, v tomto případě redukce obsahu BA. [48] [49]

Některé kmeny bakterií, které se používají jako startovací kultury při výrobě fermentovaných potravin, mohou tvořit biogenní aminy. Proto se požaduje, aby startovací kultury byly dekarboxyláza-negativní. [50]

Bylo zjištěno, že řada bakterií má inhibiční účinek na dekarboxyláza-pozitivní mikroorganismy nebo produkuje enzymy, které zabraňují vzniku biogenních aminů (*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, které se používají startěři pro výrobu sýrů). [22]

Přídavek dekarboxyláza-negativních startovacích kultur do různých fermentovaných masných výrobků dokáže snížit akumulaci biogenních aminů odlišným způsobem v závislosti na druhu a kmeni. Při výrobě řeckých salámů bylo dosaženo snížení biogenních aminů pomocí *Lactobacillus sakei*, kdy u tyraminu byl úbytek na 62 % a u histaminu na 71 %. U portugalských masných produktů se používá například *Staphylococcus equorum* (redukce kadaverinu o 45 %) a *Lactobacillus sakei* (redukce o 75 %). U španělského fuetu snížil přídavek *Lactobacillus sakei* v kombinaci se *Staphylococcus xylosus* obsah tyraminu až o 50 %. [51]

Lactobacillus casei se běžně vyskytuje v potravinových maticích, jako jsou ryby, maso a siláž. Schopnost degradovat biogenní aminy záleží na použitém kmeni. Nyní se používá jako doplňková kultura pro snížení přítomnosti biogenních aminů v sýrech nebo ve fermentovaném zelí, kde dokáže 10x snížit obsah putrescinu. [52] [53]

Lactobacillus plantarum má příznivý vliv na obsah biogenních aminů v rybách. Inokulace této bakterie způsobuje rychlé okyselení, tím inhibuje růst nežádoucích bakterií, jako je *Pseudomonas* a *Enterobacteriaceae*, a následně snižuje hromadění putrescinu a kadaverinu. [54]

3.3 Antimikrobiální látky působící na dekarboxyláza-pozitivní mikroorganismy

Látky s antimikrobiálními vlastnostmi mohou působit na mikroorganismy produkující biogenní aminy, kdy narušují jejich dekarboxylázovou aktivitu. Mezi antimikrobiální látky lze zařadit jak konzervační a přídatné látky, tak i koření nebo soli. Soli dusičnanů a dusitanů se běžně používají ve fermentovaných uzeninách pro různé účely, jako ovlivnění barvy, chutě a dále mohou ovlivňovat akumulaci BA. [55]

Ke kontrole akumulace BA v potravinách byly použity také antimikrobiální látky obsahující síru. Látky obsahující síru hrají klíčovou roli při redukci BA v alkoholických nápojích, zejména u vína. [56]

Jako další antimikrobiální látky mohou být použity sorban sodný, kyselina citronová, jablečná a jantarová. V několika druzích koření se nachází látky inhibující BA (piperin v černém pepři, tymol v tymiánu, kapsaicin v paprice), mnohé však ztrácí svou aktivitu při tepelném opracování. Dále se může použít ke zpomalení tvorby BA například zázvor, hřebíček a skořice. [57]

Vysoký účinek na inhibici biogenních aminů má také extrakt z česneku, který se používá například při výrobě fermentované sardele. Studie ukázaly, že díky přidání česnekového extraktu byl snížen obsah putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu a spermidinu až o 11 %, 18 %, 12 %, 31 % a 17 % ve srovnání s kontrolou. [58]

Také přídavek cukru ovlivňuje tvorbu biogenních aminů. Zvýšení množství cukru v italském salámu snížilo akumulaci kadaverinu až na 43 %. [58]

3.4 Technologické zákroky

3.4.1 Balení

Přítomnost, respektive nepřítomnost, kyslíku může ovlivnit produkci BA. Atmosféra použitá pro balení může ovlivnit tvorbu BA kvalitativně a kvantitativně. CO₂ je hlavní plyn, který se používá jako bakteriostatická látka. Například v modifikované atmosféře prodlužuje skladovací dobu potravin a inhibuje mikrobiální růst bakterií, které mohou produkovat BA. [44]

Dále se při balení aplikují potravinářské lapače kyslíku, které eliminují kyslík v balení nebo pronikají obalovým materiálem během skladování. Použití těchto lapačů vzduchu může snižovat tvorbu BA. [44]

3.4.2 Ozařování

Ozařování se používá u několika druhů potravin, jako jsou masné výrobky, ryby, mořské plody a fermentované sójové pasty. Mechanismus mikrobiální inaktivace zářením spočívá v poškození nukleových kyselin. Přímé nebo nepřímé poškození je způsobeno oxidačními radikály vznikajícími radiolýzou. Ozařování potravin může být použito ke zvýšení bezpečnosti a skladovatelnosti potravin snížením růstu mikrobů. Tato metoda se také používá pro

stanovení obsahu kontaminující i patogenní mikroflóry, ale také pro stanovení chemických látek a parazitů. Pomocí ozařování lze zvýšit bezpečnost potravin, jejich skladovatelnost a trvanlivost. Gama-záření v povolených dávkách, které jsou bezpečné, účinné a šetrné k životnímu prostředí, snižuje obsah BA v potravinách v důsledku zpoždění růstu náhodných mikroorganismů. [59] [60] [61]

3.4.3 Pulzní elektrické pole

Aplikace pulzního elektrického pole je neteplná metoda konzervace potravin, která využívá krátké elektrické pulzy pro mikrobiální inaktivaci a přitom má minimální negativní vliv na vlastnosti potravin. [44]

3.4.4 Hydrostatický tlak a vysokotlaká homogenizace

Hydrostatický tlak (HHP) a vysokotlaká homogenizace (HPH) patří mezi alternativní způsoby k tepelnému zpracování potravin. Při použití vysokého tlaku dochází k poškození buněčné membrány mikroorganismů, které tím ztrácejí své vlastnosti. HHP může modifikovat mikroflóru ošetřených potravin jak kvantitativně, tak kvalitativně. Pomocí těchto technik je možné snížit populaci potenciálně dekarboxylačních mikroorganismů, což omezuje akumulaci BA. [62]

Výhoda použití této metody spočívá v zachování vlastností potravin a prodloužení jejich trvanlivosti. Tato metoda se využívá při výrobě nápojů, ovocných džemů a fermentovaných potravin. [22]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části diplomové práce bylo popsat biogenní aminy, jejich vznik, charakteristické vlastnosti, výskyt v potravinách, možnosti jejich stanovení a vliv působení bakterií mléčného kvašení na produkci biogenních aminy a možnosti snížení obsahu biogenních aminů v potravinách pomocí těchto bakterií.

Cílem praktické části diplomové práce bylo otestovat 18 gram pozitivních mikrobiálních kmenů, které je možné využít v mlékárenství a nalezení takových kultur, které jsou schopny degradovat biogenní aminy. Úbytek biogenních aminů byl stanoven ve vybraných tekutých médiích pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Dílním cílem bylo zjistit, zda výše uvedené kmeny jsou schopny z aminokyselin tvořit biogenní aminy.

5 MATERIÁL A METODIKA PRÁCE

5.1 Výběr mikrobiálních kultur

V diplomové práci bylo použito 18 mikrobiálních kmenů (tabulka 1), které je možné využít v mlékárenství. Pět kmenů bylo získáno ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů Laktoflora (označeny zkratkou CCDM) a dalších 13 kmenů bylo izolováno z kvásku při výrobě chleba v Portugalsku (označení S3). Tyto kmeny poskytla Ing. Hana Pištěková, která je izolovala. Všechny testované kmeny laktobacilů byly uchovávány v mikrobiologické laboratoři Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí na Fakultě technologické UTB ve Zlíně.

Tabulka 1: Testované mikrobiální kmeny

	Označení	Identifikace
1	S3-22	<i>Lactobacillus paracasei</i>
2	S3-23	<i>Lactobacillus paracasei</i>
3	S3-25	<i>Lactobacillus paracasei</i>
4	S3-26	<i>Lactobacillus paracasei</i>
5	S3-27	<i>Lactobacillus paracasei</i>
6	S3-32	<i>Lactobacillus paracasei</i>
7	S3-33	<i>Lactobacillus paracasei</i>
8	S3-34	<i>Lactobacillus paracasei</i>
9	S3-37	<i>Lactobacillus paracasei</i>
10	S3-38	<i>Lactobacillus paracasei</i>
11	S3-40	<i>Lactobacillus paracasei</i>
12	S3-42	<i>Lactobacillus paracasei</i>
13	S3-45	<i>Lactobacillus paracasei</i>
14	CCDM 198	<i>Lactobacillus casei</i>
15	CCDM 422	<i>Lactobacillus casei</i>
16	CCDM 650	<i>Lactobacillus casei</i>
17	CCDM 145	<i>Lactobacillus casei</i>
18	CCDM 802	<i>Lactobacillus casei</i>

5.2 Kultivační média a přístrojové vybavení

5.2.1 Kultivační média

U vybraných mikrobiálních kmenů byl sledován růst ve dvou kultivačních médiích. Pro některé experimenty byly použity i média s nižším obsahem živin (poloviční navážky médií).

- *Médium MRS (De Man, Rogosa and Sharpe agar, HiMedia)*

Složení na 1000 ml destilované vody:

Hydrolyzát kaseinu	2,5 g
Pepton	2,5 g
Sójový pepton	5 g
Kvasniční extrakt	2,5 g
Masový extrakt	5 g
Kyselina askorbová	0,5 g
Síran hořečnatý	0,25 g
Laktóza	5 g
Glycerylfosfát sodný	19 g

Výsledné pH 7,1±0,1.

- *MRS+C (De Man, Rogosa and Sharpe agar /HiMedia) + uhličitan sodný /Penta/)*

Složení na 1000 ml vody:

Hydrolyzát kaseinu	2,5 g
Pepton	2,5 g
Sójový pepton	5 g
Kvasniční extrakt	2,5 g
Masový extrakt	5 g
Kyselina askorbová	0,5 g
Síran hořečnatý	0,25 g
Laktóza	5 g
Glycerylfosfát sodný	19 g
Uhličitan sodný	0,2 g

Výsledné pH 7,1±0,1.

- *Roztok biogenních aminů*

Zásobní roztok biogenních aminů byl připraven navážením 0,5 g příslušného biogenního aminu (tyraminu, putrescinu, kadaverinu, fenyletylaminu, histaminu, tryptaminu, vše Sigma-Aldrich) a jejich rozpuštěním v 1000 ml destilované vody. Následně bylo upraveno pH roztoku pomocí 35% kyseliny chlorovodíkové (Penta) na hodnotu 6,5 - 6,8. Konečná koncentrace biogenních aminů v kultivačním médiu byla 0,5 % (w/v).

- *Roztok aminokyselin*

Zásobní roztok aminokyselin byl připraven navážením 2 g příslušné aminokyseliny (argininu, ornitinu, histidinu, tyrozinu, lyzinu, fenylalaninu, vše Sigma-Aldrich) a jejich rozpuštěním v 1000 ml destilované vody. Následně bylo upravováno pH na hodnotu 6,5 – 6,8 pomocí kyseliny chlorovodíkové (35 %). Konečná koncentrace aminokyselin v bujónu byla 0,2 % (w/v).

5.2.2 Příprava bakterií pro ověření schopnosti růstu v přítomnosti biogenních aminů a aminokyselin

Každý testovaný kmen byl pomocí sterilní kličky nebo pipety asepticky převeden z tuhé/tekuté půdy do zkumavky s připravenými sterilními bujóny a kultivován přes noc při teplotě 30 °C. Z takto připravených suspenzí bylo sterilně odpipetováno 100 µl do jednotlivých zkumavek s připravenými médii s biogenními aminy nebo aminokyselinami. V půdě MRS byly kultivovány kmeny *Lactobacillus paracasei* a v půdě MRS+C kmeny *L. casei*.

Bakterie byly kultivovány anaerobně při teplotě 30 °C.

5.2.3 Přístrojové vybavení

Pro experimenty bylo použito běžné laboratorní vybavení pro mikrobiologickou práci, jako jsou pH metry, automatické mikropipety, termostaty, inkubátory, vortex, centrifuga, sterilní boxy, třepačka, HPLC, přístroj na zahřívání a odpařování dusíkem a další.

5.3 Ověření schopnosti degradace vybraných mikroorganismů v kultivačním médiu s biogenními aminy

5.3.1 Použité mikrobiální kmeny

Pro experimenty v této části práce byly použity vybrané kmeny bakterií mléčného kvašení náležící do rodu *Lactobacillus*. Schopnost degradace těchto mikroorganismů byla zkoumána

v kultivačních médiích obohacených o biogenní aminy, které sloužily jako zdroj uhlíku a dusíku. Schopnost tvorby biogenních aminů byla pozorována v médiích, které obsahovaly aminokyseliny sloužící jako prekurzory pro vznik biogenních aminů.

5.3.2 Kultivační média a roztoky

Byly připraveny kultivační média MRS a MRS+C, které byly obohaceny biogenními aminy (fenyletylamin, histamin, kadaverin, putrescin, tyramin) v koncentraci 0,5 g/l (w/v). Hodnota pH roztoku byla upravena na 6,5 - 6,8. Média byla rozplněna po 5 ml do zkumavek a následně sterilována v autoklávu.

Pro zjištění tvorby biogenních aminů byla zhotovena kultivační média MRS a MRS+C, která obsahovala přídavek aminokyselin o koncentraci 2 g/l (arginin, ornitin, histidin, tyrozin, lyzin, fenylalanin). Následně se upravilo pH tohoto roztoku na hodnotu 6,5 – 6,8 a poté byla média rozpipetována po 5 ml do zkumavek, které byly sterilovány.

5.3.3 Příprava a odběr vzorků na analýzu HPLC

Mikrobiální kmeny byly pomnoženy v kultivačních médiích bez přídavku biogenních aminů a aminokyselin (kapitola 5.2.2) a dále pak v kultivačních médiích obohacenými o biogenní aminy a aminokyseliny. V každém médiu bylo upraveno pH na 6,5 - 6,8 k základnímu experimentu.

Degradace biogenních aminů byla sledována při teplotě 30 °C.

Odběry vzorků byly provedeny po 24 a 48 hodinách. Následně byly vybrány dva kmeny *Lbc. casei* (CCDM 802 a CCDM 422), které byly podrobeny dalšímu testování. Tyto kmeny byly následně kultivovány při 30 °C a 37 °C v půdách MRS, MRS+C a v půdách s polovičným množstvím živin s výjimkou biogenních aminů a odebírány vzorky v časových intervalech po 6, 12, 24, 28, 32, 36, 48 a 72 hodinách kultivace.

Vzorky byly centrifugovány (4600 otáček/min., 7 minut) a z každé zkumavky bylo odebráno do dvou eppendorfkových mikrozkušavek 700 µl supernatantu a přidáno 700 µl kyseliny chloristé (Sigma-Aldrich) o koncentraci 1,2 mol/l. Takto připravené vzorky byly zamrazeny a připraveny pro následnou derivatizaci.

5.3.4 Derivatizace vzorků

K připraveným vzorkům supernatantu s kyselinou chloristou bylo přidáno 100 µl vnitřního standardu 1,7-heptandiaminu (Sigma-Aldrich) v koncentraci 500 mg/l. Dále byl odpipetován 1 ml vzorku do derivatizační nádoby a bylo přidáno 1,5 ml čerstvě připraveného karbonátového pufru o pH 11,1 – 11,2 a 2 ml čerstvě připraveného dansylchloridu (Sigma-Aldrich) o koncentraci 5 g/l v acetonu (Merck). Uzavřené nádoby byly třepány 20 hodin v temnu. Poté bylo ke vzorkům přidáno 200 µl roztoku prolinu (Sigma-Aldrich) a vzorky byly třepány další hodinu. Následně byly ke vzorku přidány 3 ml heptanu (Merck) a po pečlivém uzavření nádobek se vzorky třepaly 5 minut ručně. Poté bylo odpipetováno 1 ml heptanové vrstvy do vialek. Obsah vialek byl odpařen při teplotě 65 °C do sucha pod proudem dusíku a suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich). Vialky byly zamrazeny na teplotu -18 °C do doby analýzy.

5.3.5 Chromatografické stanovení biogenních aminů a aminokyselin

Bezprostředně před analýzou HPLC byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 µm.

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

6 VÝSLEDKY

V první fázi byly vybrané kmeny testovány na produkci biogenních aminů z aminokyselin. Následně proběhl skrínig kmenů bakterií druhů *Lbc. casei* a *Lbc. paracasei* na degradaci biogenních aminů, z kterých byly vybrány dva kmeny *Lbc. casei* s nejlepšími výsledky, u kterých byly sledovány faktory ovlivňující degradaci biogenních aminů.

6.1 Produkce biogenních aminů z aminokyselin

Všech 18 kmenů bylo testováno na produkci biogenních aminů (FEM - fenyletylaminu, PUT - putrescinu, KAD - kadaverinu, HIM - histaminu, TYM – tyraminu), kdy jako prekurzory sloužily příslušné aminokyseliny. Tyto kmeny byly kultivovány v doporučené půdě dle dodavatele (MRS nebo MRS+C) a vzorky pro analýzu byly odebírány po 24 hodinách a 48 hodinách. Tento experiment byl realizován z důvodu vyloučení kmenů pro průmyslové aplikace, u kterých by byla zjištěna nadměrná produkce biogenních aminů. Nárůst biogenních aminů byl srovnáván s kontrolními vzorky, což byly příslušné bujóny s aminokyselinami, který nebyly zaočkovány bakteriemi. U kmenů, kde byla pozorována produkce některého z biogenních aminů, byla tato označena znakem „+“, nepřítomnost BA byla označena znakem „-“. U všech kmenů byla zjištěna produkce některého z biogenních aminů, avšak u kmenů *Lbc. casei* to bylo minimální množství, kdežto u některých kmenů *Lbc. paracasei* byl nárůst biogenních aminů vysoký (*Lbc. paracasei* S3-26 – tyramin – 13 % při 48 hodinách, *Lbc. paracasei* S3-27 – putrescin – 43 % při 48 hodinách). Výsledky produkce biogenních aminů testovanými kmeny jsou shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2: Produkce biogenních aminů testovanými kmeny *Lbc. casei* a *Lbc. paracasei*

Kmen	Biogenní aminy*				
	FEM	PUT	KAD	HIM	TYM
S3-22	+	-	-	+	+
S3-23	+	+	+	-	+
S3-25	-	-	-	-	+
S3-26	-	-	-	-	+
S3-27	-	+	+	-	+
S3-32	-	+	+	-	+
S3-33	-	-	-	-	+
S3-34	-	-	-	-	+
S3-37	-	+	+	-	+
S3-38	-	+	+	-	+
S3-40	+	+	+	-	+
S3-42	+	+	+	-	+
S3-45	+	-	+	-	+
CCDM 802	-	+	-	-	+
CCDM 422	-	-	-	-	+
CCDM 650	-	-	-	-	+
CCDM 145	-	-	-	-	+
CCDM 198	-	-	-	-	+

Pozn.:* + ...produkce BA; - ... BA nedetekován

6.2 Skríning degradace biogenních aminů kmeny *Lbc. casei* a *Lbc. paracasei*

V další fázi praktické části diplomové práce byla sledována schopnost degradovat 5 biogenních aminů ((FEM - fenyletylamínu, PUT - putrescinu, KAD - kadaverinu, HIM - histaminu a TYM - tyraminu) testovanými kmeny v závislosti na čase (24 hodin, 48 hodin). Kmeny byly kultivovány v MRS nebo MRS+C (*Lbc. casei*) a v půdách s polovičním množstvím živin (poloviční navážky; viz kapitola 5). U kmenů, kde byl pozorován úbytek některého z

analyzovaných biogenních aminů, byl tento amin označen znakem „+“, v případě, kde nebyl úbytek biogenních aminů pozorován, bylo označeno znakem „-“.

6.2.1 Skríníng degradace biogenních aminů kmeny *Lbc. paracasei* v půdě MRS

- *Skríníng po 24 hodinách*

Nejvyšší úbytky biogenních aminů byly pozorovány u kmenů *Lbc. paracasei* S3-26, S3-32, S3-34, S3-37 a S3-45. U kmene *Lbc. paracasei* S3-32 byla pozorována nejlepší schopnost degradace, a to především histaminu, kde byl zjištěn úbytek až o 27 % a u ostatních BA byl zjištěn úbytek kolem 20 %. U kmene *Lbc. paracasei* S3-26 byly zjištěny úbytky kadaverinu a histaminu až o 20 %. U kmene *Lbc. paracasei* S3-45 byl úbytek putrescinu a kadaverinu až o 25 %. U dalších kmenů *Lbc. paracasei* byla degradace aminů nižší, kolem 15 % (tabulka 3).

- *Skríníng po 48 hodinách*

Tři kmeny *Lbc. paracasei* (S3-26, S3-32 S3-33) byly schopny snížit obsah histaminu, a to asi o 5 %. U bakterie *Lbc. paracasei* S3-40 byla zjištěna degradace všech biogenních aminů kromě putrescinu a kadaverinu, největší úbytek byl zjištěn u histaminu, a to o 22 % (tabulka 3). *Lbc. paracasei* S3-42 nedokázal degradovat pouze putrescin, u histaminu byl zaznamenán pokles na 76 %. Největší schopnost degradace po 48 hodinách byla pozorována u kmene *Lbc. paracasei* S3-45, kde byl zjištěn úbytek všech biogenních aminů. Fenyletylamin poklesl o 15 %, kadaverin a putrescin o 3 %, histamin a tyramin o 19 %, respektive 11 %.

Tabulka 3: Skrining degradace biogenních aminů kmeny *Lbc. paracasei* v MRS

		<i>Lbc. paracasei</i> S3-												
Čas	BA*	22	23	25	26	27	32	33	34	37	38	40	42	45
24 h	FEM	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	PUT	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	KAD	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	HIM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	TYM	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
48 h	FEM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	PUT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	KAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	HIM	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+
	TYM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Pozn.:* + ... degradace BA; - ... degradace BA nezaznamenána

6.2.2 Skrining degradace biogenních aminů kmeny *Lbc. paracasei* v půdě s nižším obsahem živin

- *Skrining po 24 hodinách*

V půdě s polovičním množstvím živin byl po 24 hodinách kultivace zjištěn největší úbytek histaminu o 14-17 % u kmenů *Lbc. parasei* S3-27, S3-37 a S3-38. Tvorba tyraminu byla snížena o 20 % kmenem *Lbc. paracasei* S3-23. U ostatních biogenních aminů, které byly degradovány, bylo snížení nejvíce o 10 % (tabulka 4).

- *Skrining po 48 hodinách*

Po 48-hodinové kultivaci byla zjištěna degradace tyraminu kmeny *Lbc. paracasei* S3-27, S3-32, S3-37 a S3-40, a to kolem 10-12 %.

Tabulka 4: Skrining degradace biogenních aminů kmeny *Lbc. paracasei* v půdě s nižším obsahem živin

		Kmen S3												
Čas	BA*	22	23	25	26	27	32	33	34	37	38	40	42	45
24 h	FEM	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
	PUT	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-
	KAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	HIM	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
	TYM	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
48 h	FEM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PUT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HIM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TYM	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-

Pozn.*: + ... degradace BA; - ... degradace BA nezaznamenána

6.2.3 Skrining degradace biogenních aminů kmeny *Lbc. casei* v půdě MRS-C

- *Skrining po 24 hodinách*

Lbc. casei CCDM 422 byl schopen degradovat všechny biogenní aminy, obsah fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu poklesl o 10-12 % a obsah histaminu a tyraminu o 6-8 % (tab. 5). Největší pokles histaminu (o 12 %) byl zjištěn u *Lbc. casei* CCDM 145. Ostatní biogenní aminy (putrescin, kadaverin, fenyletylamin, tyramin) byly sníženy o cca 20 %.

- *Skrining po 48 hodinách*

Jako nejslabší degradér po 48 hodinách byl označen kmen *Lbc. casei* CCDM 650. Kmeny *Lbc. casei* CCDM 145 a CCDM 198 degradovaly fenyletylamin, histamin a tyramin. Pokles fenyletylaminu byl vyšší u kmene *Lbc. casei* CCDM 145, a to o 16 %. Histamin byl snižen o 10 % a tyramin o 25-35 % (tabulka 5).

Tabulka 5: Skríníng degradace biogenních aminů kmeny *Lbc. casei* v MRS-C

		<i>Lbc. casei</i> CCDM				
Čas	BA*	802	422	650	145	198
24 hodin	FEM	-	+	-	+	+
	PUT	+	+	-	+	+
	KAD	+	+	-	+	+
	HIM	+	+	-	+	+
	TYM	-	+	-	-	+
48 hodin	FEM	-	-	-	+	+
	PUT	-	-	-	-	-
	KAD	-	-	-	-	-
	HIM	-	-	-	+	-
	TYM	-	-	-	+	+

Pozn.: *+ ... degradace BA; - ... degradace BA nezaznamenána

6.2.4 Skríníng degradace kmeny *Lbc. casei* v půdě s nižším obsahem živin

- *Skríníng po 24 hodinách*

V půdě s polovičním množstvím živin (MRS+C) byly z části degradovány po 24 hodinách kultivace kmeny *Lbc. casei* (kromě kmene CCDM 802) všechny analyzované biogenní aminy. Úbytek biogenních aminů fenyletylamínu, putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu však nečinil více jak 20 % (tabulka 6).

- *Skríníng po 48 hodinách*

Po 48 hodinách vykazoval největší degradační účinky kmen *Lbc. casei* CCDM 422, který dokázal snížit obsah kadaverinu (o 5 %), histaminu (o 5 %), tyraminu (o 17 %). Ostatní kmeny degradovaly pouze tyramin (tabulka 6).

Tabulka 6: Skríning degradace biogenních aminů kmeny *Lbc. casei* v půdě s nižším obsahem živin

		<i>Lbc. casei</i> CCDM				
Čas	BA*	802	422	650	145	198
24 hodin	FEM	-	+	+	+	+
	PUT	-	+	+	+	+
	KAD	-	+	+	+	+
	HIM	-	+	+	+	+
	TYM	-	+	+	+	+
48 hodin	FEM	-	-	-	-	-
	PUT	-	-	-	-	-
	KAD	-	+	-	-	-
	HIM	-	+	-	-	-
	TYM	+	+	+	+	+

Pozn.: *+ ... degradace BA; - ... degradace BA nezaznamenána

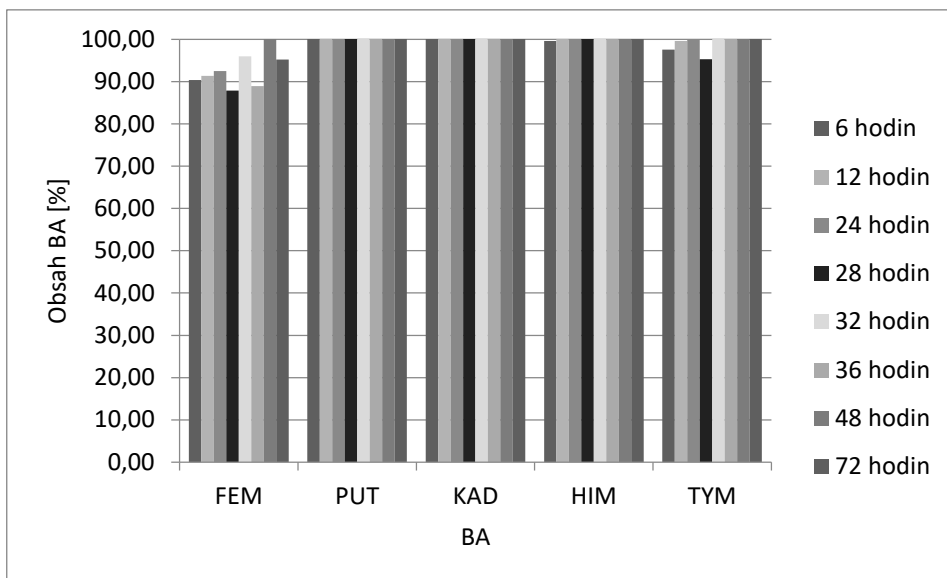
6.3 Degradace biogenních aminů kmeny *Lactobacillus casei*

V poslední fázi experimentu byly vybráni dva degradéři z kmenů *Lactobacillus casei*, konkrétně kmeny CCDM 802 a CCDM 422. U těchto kmenů byl sledován vliv teploty (30 °C, 37 °C), složení půd (MRS, MRS+C a menší obsah živin) a vliv času kultivace (0-72h).

6.3.1 Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus casei* CCDM 422

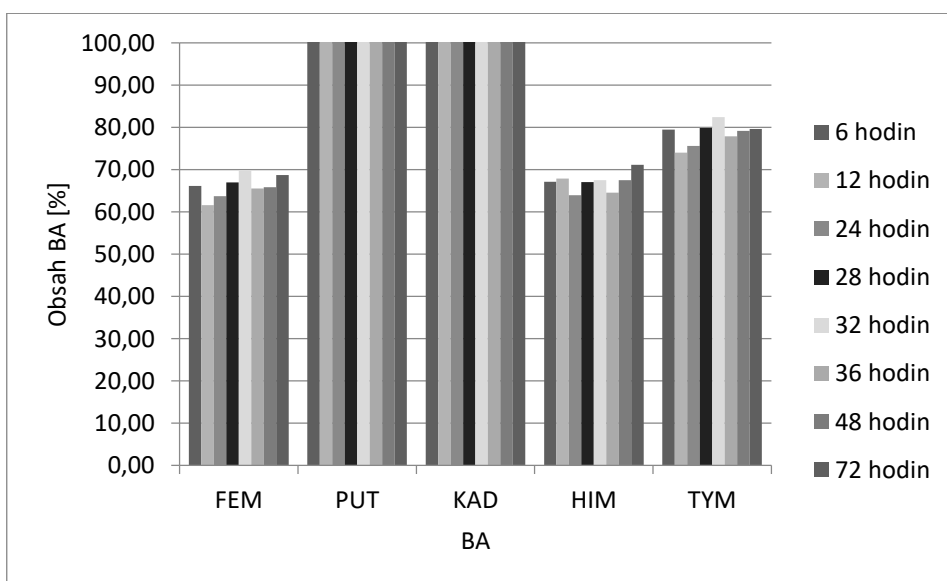
6.3.1.1 Degradace biogenních aminů *Lactobacillus casei* CCDM 422 v půdách MRS a MRS-C

Kmen *Lactobacillus casei* CCDM 422 při 30 °C v půdě MRS-C nejlépe degradoval fenyletylamin, a to především v čase 28 hodin, kdy jeho úbytek byl o 12 % a dále v čase 36 hodin, kdy jeho úbytek činil 11 %. Tyramin poklesl nejvíce o 5 % po 28hodinové kultivaci. Ostatní biogenní aminy nebyly tímto kmenem v půdě MRS+C redukovány (obr. 3).



Obrázek 3: Degradace BA kmenem *Lbc. casei* CCDM 422 při 30 °C v MRS-C

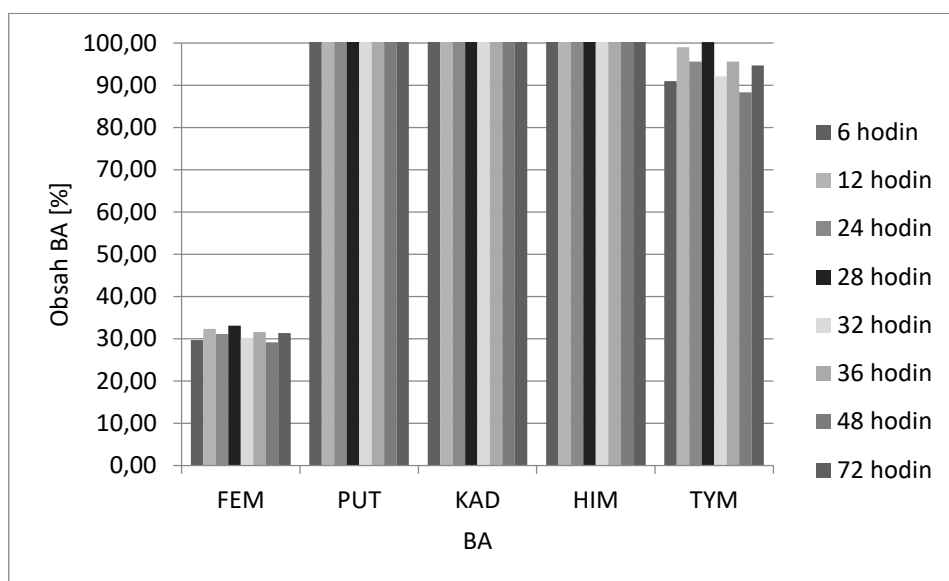
V půdě MRS (bez přidavku uhličitanu sodného, jak doporučuje dodavatel kultur) při 30 °C byl schopen tento kmen degradovat jak fenyletylamin, tak histamin a tyramin. Obsah fenyletylaminu byl snížen v každém analyzovaném čase o 30-38 %. Snížení obsahu histaminu bylo pozorováno opět v každém čase, kdy nejvýraznější pokles byl v čase 24 hodin o 36 %, ostatní úbytky histaminu byly kolem 33 %. Pomocí tohoto kmenu byl dále snížen obsah tyraminu, opět v každém čase odběru vzorků, kdy jeho nejvyšší úbytek byl zaznamenán v čase 12 hodin o 26 %, obsah tyraminu byl v kultivačním médiu v ostatních časových odběrech snížen o 20 %. Putrescin a kadaverin nebyly tímto kmenem degradovány (obr. 4).



Obrázek 4: Degradace biogenních aminů kmenem *Lbc. casei* CCDM 422 při 30 °C v MRS

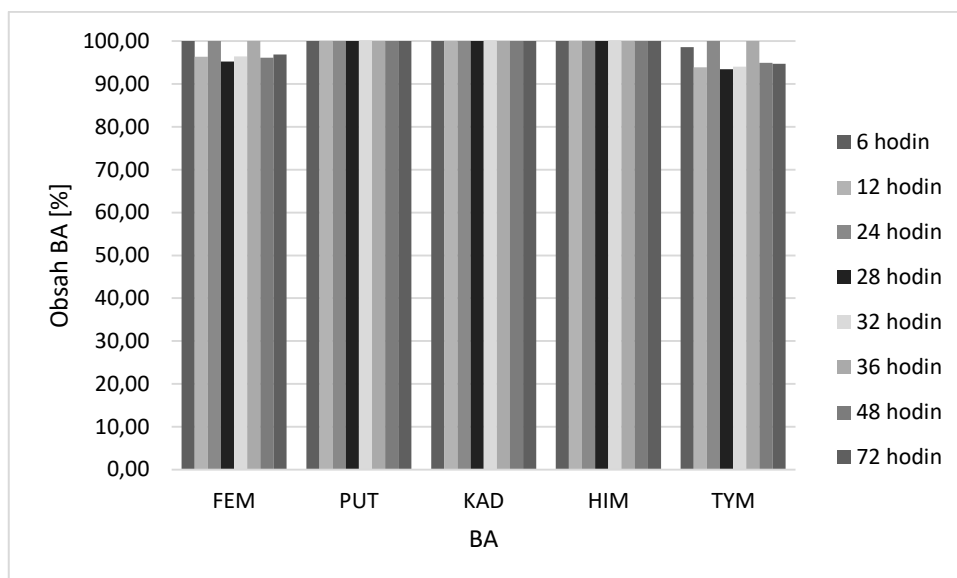
6.3.1.2 Degradace biogenních aminů pomocí *Lactobacillus casei* CCDM 422 při 30 °C v půdách s nižším obsahem živin

V MRS-C půdě s polovičním obsahem živin vykazoval největší snížení obsahu fenyletylamin, který degradoval v každém čase. Největší úbytek byl v čase 48 hodin a to o 71 %. V ostatních časech byl úbytek o něco málo nižší a to o 67-70 %. Další biogenní amin, který degradovalán, byl tyramin, který degradoval kolem 1-12%, kdy největší úbytek byl v čase 48 hodin (o 12%). (obr. 5)



Obrázek 5: Degradace BA kmenem *Lbc. casei* CCDM 422 při 30°C v ½ MRS-C

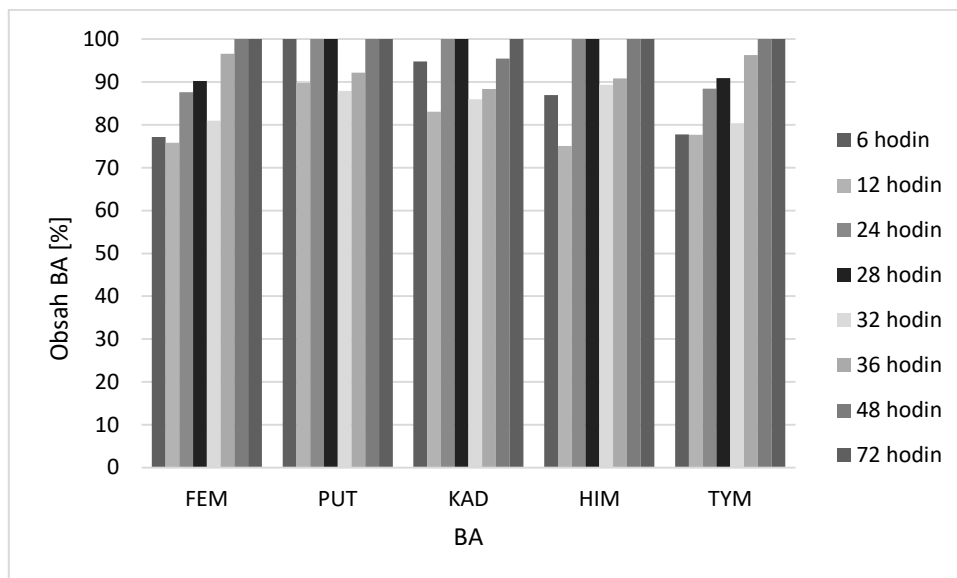
V půdě MRS s nižším obsahem živin při 30 °C kmen *Lactobacillus casei* CCDM 422 nevykazoval příliš velké degradační schopnosti. Dokázal degradovat pouze fenyletylamin a tyramin, a to pouze o necelých 10 %. (obr. 6)



Obrázek 6: Degradace BA kmenem *Lbc. casei* CCDM 422 při 30°C v 1/2 MRS

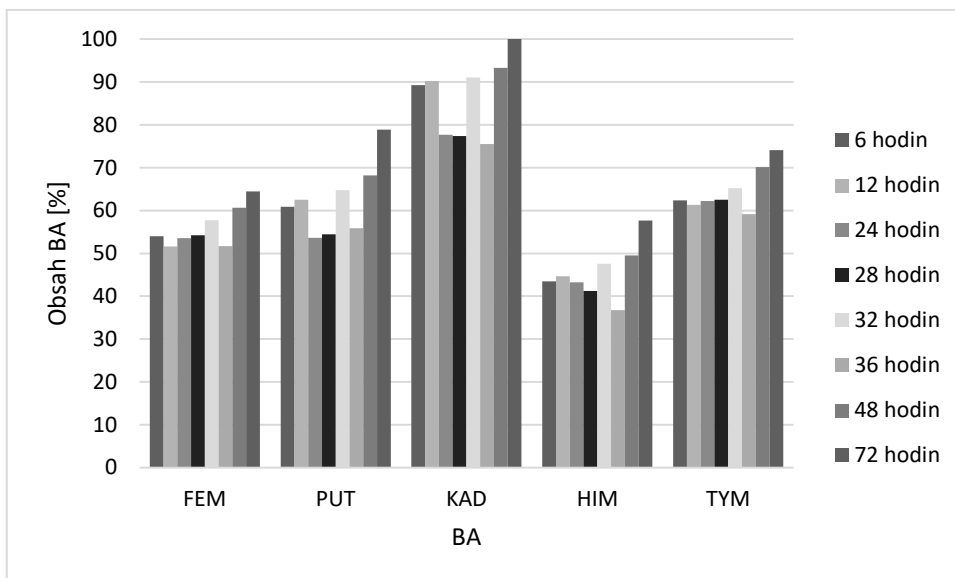
6.3.1.3 Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus casei* CCDM 422 při 37 °C v půdách MRS-C a MRS

Pomocí kmene *Lactobacillus casei* CCDM 422 při 37 °C byl pozorován pokles obsahu u všech BA. Pokles fenyletylaminu byla zjištěn ve všech časech kromě 48 a 72 hodin. Největší úbytek obsahu FEM byl po 12 hodinách, a to o 24 %, v ostatních časech byl snížen obsah o 4-13 % (nejnižší úbytek v čase 36 hodin). Snížení obsahu PUT bylo v časech 32 a 36 hodin o 12 a 8 %. KAD byl degradován v časech 6, 12, 32, 36 a 38 hodin, kdy největší snížení obsahu bylo pozorováno v čase 12 hodin o 17 %. Ostatní úbytky KAD byly o 5-14 %. Histamin byl nejlépe degradován v čase 12 hodin o 25 %, dále byl jeho obsah snížen po 6 hodinách (o 15 %), po 32 hodinách (o 11 %) a po 36 hodinách (o 10 %). Úbytek TYM byl ve všech časech kromě 48 hodin a 72 hodin, kdy největší snížení obsahu bylo v časech 6 a 12 hodin o 23 %, v ostatních časech bylo snížení obsahu o 4-12 %. (obr. 7)



Obrázek 7: Degradace BA kmenem *Lbc. casei* CCDM 422 při 37°C v MRS-C

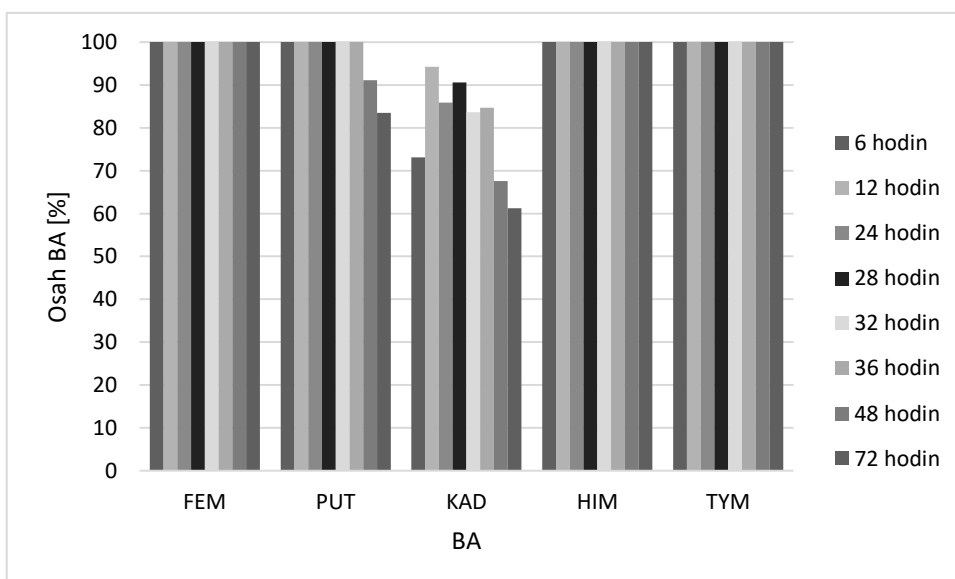
V půdě MRS při 37 °C degradoval kmen *Lactobacillus casei* CCDM 422 všechny biogenní aminy, kromě kadaverinu po 72 hodinách. Největší úbytek vykazoval histamin, a to v čase 36 hodin o 63 %. V ostatních časech bylo snížení HIM o 42 % (72 hodin) a o 50-56 %. Mezi druhý nejvíce degradovaný biogenní amin patřil fenyletylamin, u kterého byl snížen obsah o 49 % v časech 12 a 36 hodin. Další úbytky FEM tvořily okolo 22-40 %, kdy nejnižší úbytek byl v čase 72 hodin. Obsah putrescinu byl v každém čase snížen o 21-46 %, kdy největší snížení obsahu bylo v čase 24 hodin. Snížení obsahu kadaverinu bylo nejnižší ze všech biogenních aminů, kdy největší degradace byla zaznamenána v čase 36 hodin o 25 % a v čase 24 hodin o 23 %, ostatní úbytky KAD byly okolo 10 %. Tyramin byl nejlépe degradován tímto kmenem v čase 36 hodin o 41%, v ostatních časech bylo snížení o 26-38 %, kdy v čase 72 hodin byl úbytek nejnižší. (obr. 8)



Obrázek 8: Degradace BA kmenem *Lbc. casei* CCDM 422 při 37°C v MRS

6.3.1.4 Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus casei* CCDM 422 při 37 °C v půdách s nižším obsahem živin

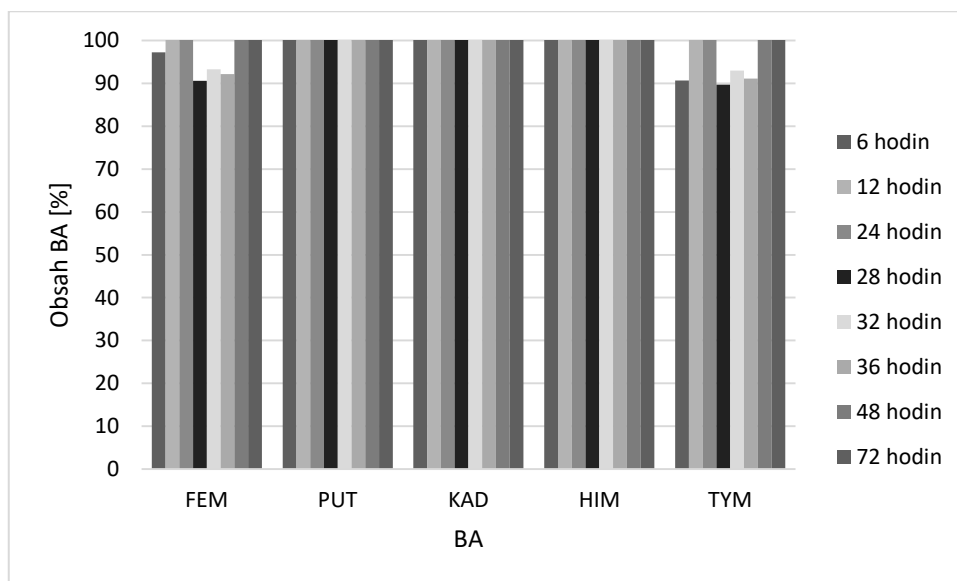
V půdě ½ MRS-C při 37 °C vykazoval největší úbytek kadaverin a dále putrescin. Ostatní biogenní aminy nebyly degradovány. Kadaverin byl degradován ve všech časech, kdy největší úbytek v této půdě byl v čase 72 hodin o 39 % a nejnižší v čase 12 hodin o 6 %. Obsah putrescinu poklesl v časech 48 a 72 hodin o 9 a 17%. (obr. 9)



Obrázek 9: Degradace BA kmenem *Lbc. casei* CCDM 422 při 37°C v ½ MRS-C

Pomocí kmene *Lactobacillus casei* CCDM 422 v poloviční půdě MRS při 37 °C byly degradovány dva biogenní aminy, fenyletylamin a tyramin. U fenyletylaminu byl největší úbytek po 28 hodinách o 10 %, v ostatních časech (6, 32 a 36 hodin) byly úbytky menší než 10 %.

Obsah tyraminu byl nejvíce snížen v čase 28 hodin o 11%, další úbytky tvořily méně než 10 % v časech 6, 32 a 36 hodinách. Ostatní BA nevykazovaly známky degradace. (obr. 10)

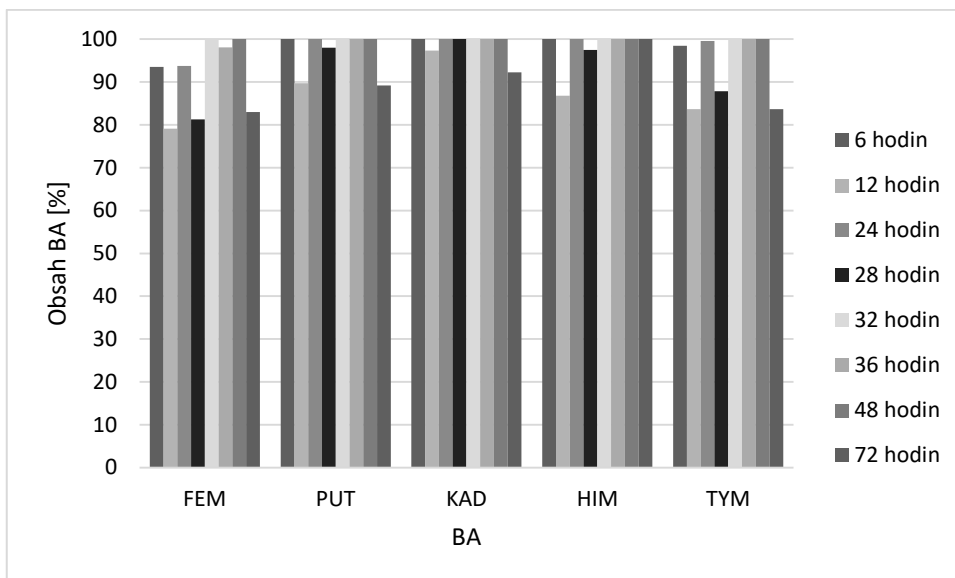


Obrázek 10: Degradace BA kmenem *Lbc. casei* CCDM 422 při 37 °C v ½ MRS

6.3.2 Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus casei* CCDM 802

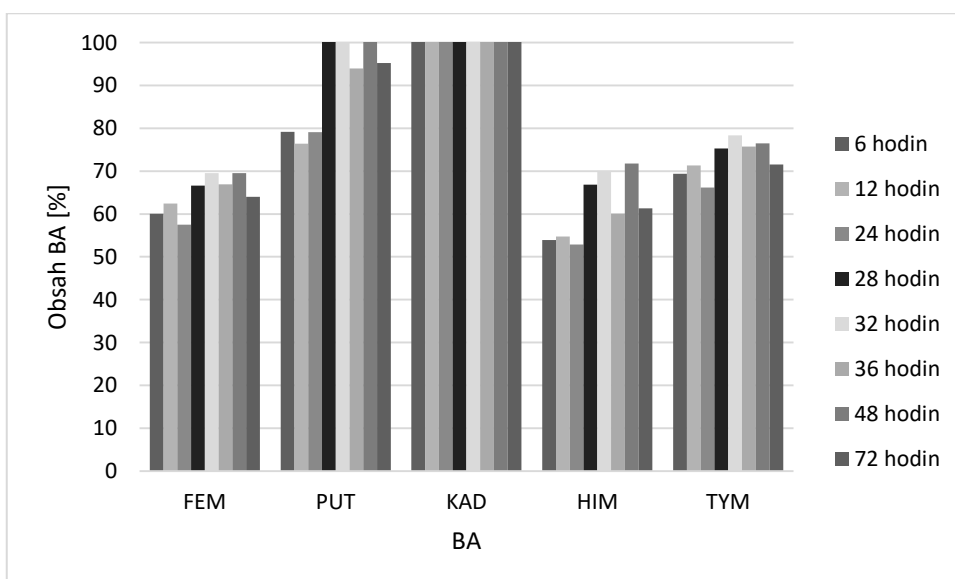
6.3.2.1 Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus casei* CCDM 802 při 30 °C v půdách MRS-C a MRS

Pomocí kmene *Lactobacillus casei* CCDM 802 v půdě MRS-C při 30 °C degradovaly všechny biogenní aminy, kdy největší úbytek byl u fenyletylaminu po 12 hodinách o 21 %. Další větší úbytek FEM byl v čase 28 hodin o 19 % a v čase 72 hodin o 17 %, ostatní jeho úbytky byly menší než 10 %. Snížení obsahu putrescinu bylo zjištěno po 12, 28 a 72 hodinách o 10, 2 a 11%. Obsah kadaverinu byl snížen jen v čase 12 hodin, a to pouze o 3 %. Úbytek histaminu byl v časech 12 a 28 hodin o 13 a 3%. Snížení obsahu tyraminu proběhlo ve všech časech kromě 32, 36 a 48 hodin. Největší jeho úbytek byl v časech 12 a 72 hodin o 17 %, v ostatních časech (6, 24 a 28 hodin) byl úbytek 2-12 %. (obr. 11)



Obrázek 11: Degradace BA kmenem *Lbc. casei* CCDM 802 při 30°C v MRS-C

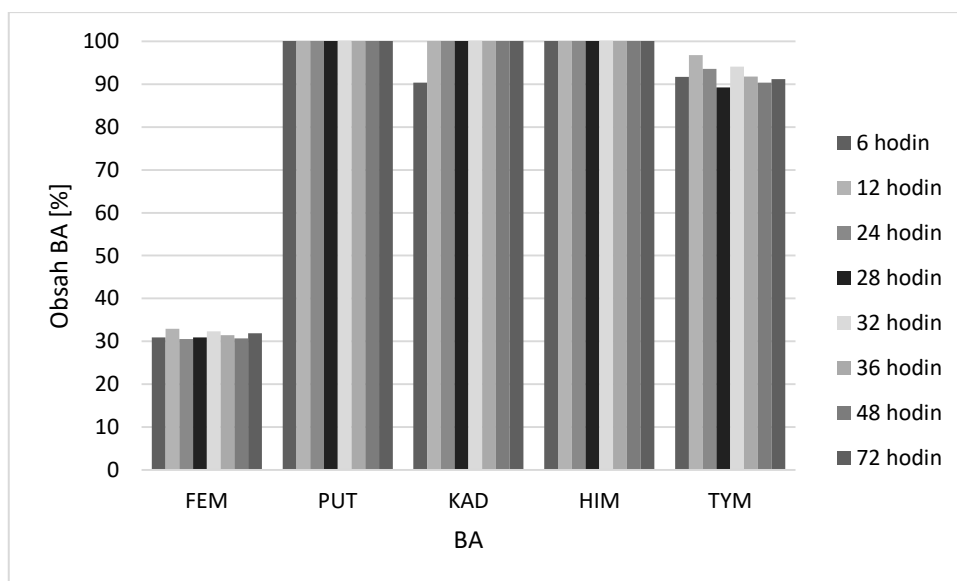
V půdě MRS při 30 °C kmen *Lactobacillus casei* CCDM 802 degradoval všechny BA kromě kadaverinu. Největší úbytky byly u FEM, HIM a TYM. U PUT byl úbytek nejmenší, kdy degradoval v časech 6, 12 a 24 hodin kolem 32 % a v časech 36 a 72 hodin o 5-7 %. U FEM byl největší úbytek po 24 hodinách o 43%, ostatní jeho úbytky byly kolem 31-40 % ve všech dalších časech. Snížení obsahu HIM proběhlo ve všech časech, kdy největší pokles HIM byl v čase 24 hodin o 48 %, v časech 6 a 12 hodin byl pokles o 46 %, v dalších časech bylo snížení obsahu HIM o 30-40 %. Obsah TYM byl snížen ve všech časech, kdy jeho pokles byl okolo 30%. (obr. 12)



Obrázek 12: Degradace BA kmenem *Lbc. casei* CCDM 802 při 30°C v MRS

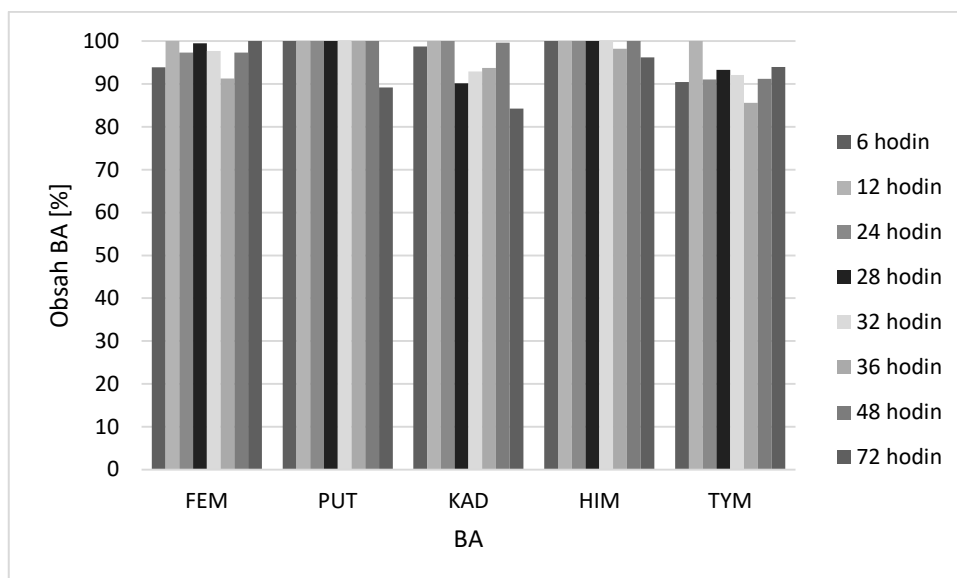
6.3.2.2 Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus casei* CCDM 802 při 30 °C v půdách s nižším obsahem živin

V půdě MRS-C s polovičním obsahem živin byl degradován nejvíce fenyletylamin, kdy byl jeho obsah snížen v každém čase kolem 70 %. Úbytek kadaverinu byl v čase 6 hodin o 10%. Další biogenní amin, který byl v této půdě degradován, byl tyramin, kdy jeho úbytky ve všech časech byly kolem 10 %. Ostatní BA nedegradovaly. (obr. 13)



Obrázek 13: Degradace BA kmenem *Lbc. casei* CCDM 802 při 30°C v ½ MRS-C

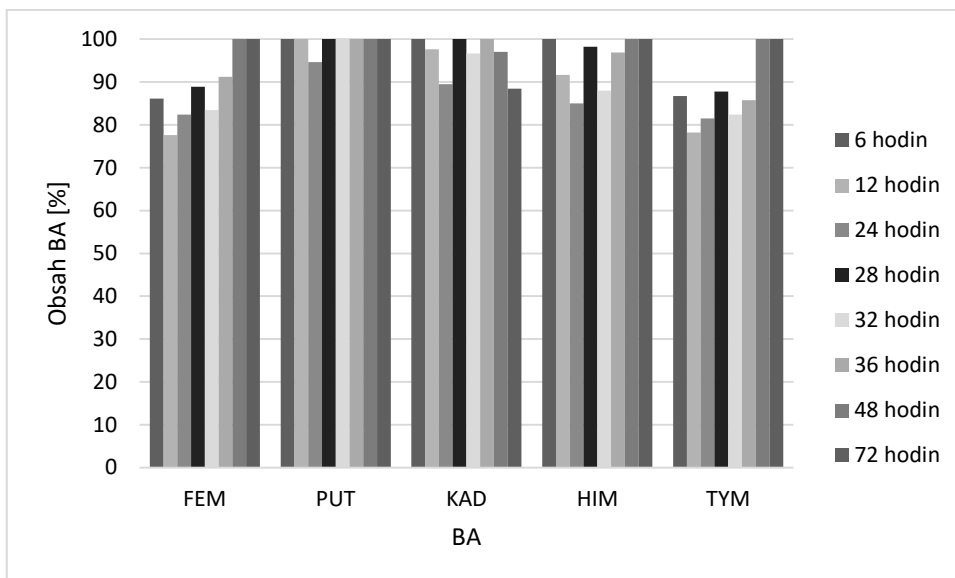
V poloviční půdě MRS degradovaly pomocí tohoto kmene při 30 °C všechny biogenní aminy, kdy největší pokles obsahu byl u tyraminu v čase 36 hodin o 15 % a u kadaverinu v čase 72 hodin o 16 %. Ostatní úbytky BA netvořily více jak 10 %. (obr. 14)



Obrázek 14: Degradace BA kmenem *Lbc. casei* CCDM802 při 30°C v ½ MRS

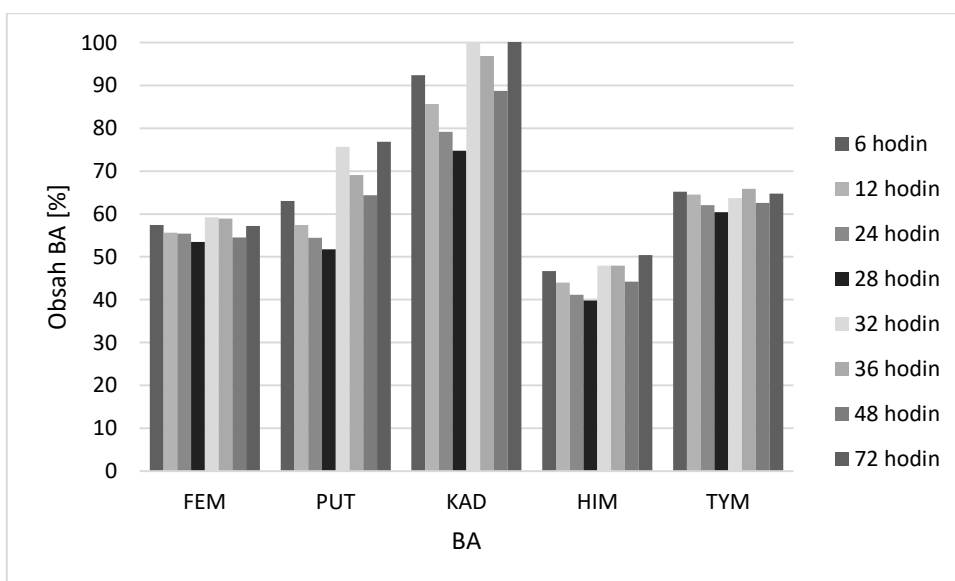
6.3.2.3 Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus casei* CCDM 802 při 37 °C v půdách MRS-C a MRS

V půdě MRS-C při 37 °C degradovaly všechny biogenní aminy, kdy u putrescinu proběhla degradace pouze v čase 24 hodin o pouhých 5 %. Největší úbytky byly pozorovány u fenyletylaminu, a to v čase 12 hodin o 22 %, dále v časech 6, 24, 28, 32 a 36 hodin bylo snížení o 14, 18, 12, 17 a 9 %. Snížení obsahu kadaverinu bylo menší jak 10 % v časech 12, 24, 32, 48 a 72 hodin. Pokles histaminu byl nejvýše o 15 % v čase 24 hodin, ostatní jeho úbytky v časech 12, 28, 32 a 36 hodinách byly 9, 2, 12 a 4 %. U tyraminu byl největší pokles v čase 12 hodin o 22 %. Další úbytky TYM byly kolem 15 % v časech 6, 24, 28, 32 a 36 hodin (obr. 15).



Obrázek 15: Degradace BA kmenem *Lbc. casei* CCDM 802 při 37°C v MRS-C

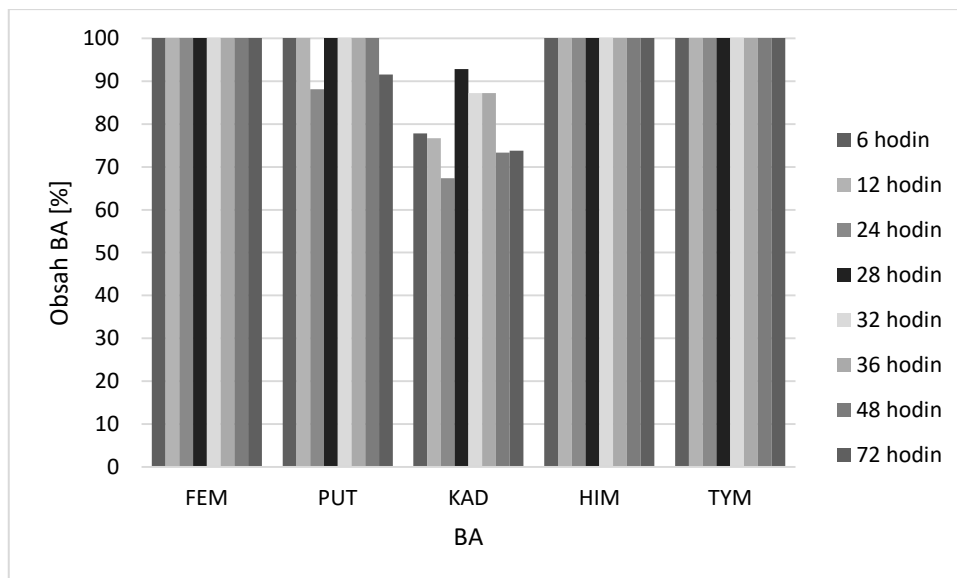
Pomocí kmene *Lactobacillus casei* CCDM 802 proběhla degradace všech BA při 37 °C v půdě MRS. Všechny BA byly degradovány kolem 50 %, kromě kadaverinu, který měl největší úbytek v čase 28 hodin o 26 %. V čase 32 hodin nebyl degradován KAD vůbec. Ostatní jeho úbytky byly kolem 10 %. Největší úbytek byl u histaminu v čase 28 hodin o 61 %. Ostatní jeho úbytky v každém čase odběru byly kolem 50-60 %. Snížení obsahu u fenyletylaminu bylo v každém čase kolem 40-50 %. U tyraminu bylo snížení ve všech časech kolem 35-40% a u putrescinu kolem 25-49, kdy největší úbytek byl v čase 28 hodin (obr. 16).



Obrázek 16: Degradace BA kmenem *Lbc. casei* CCDM 802 při 37°C v MRS

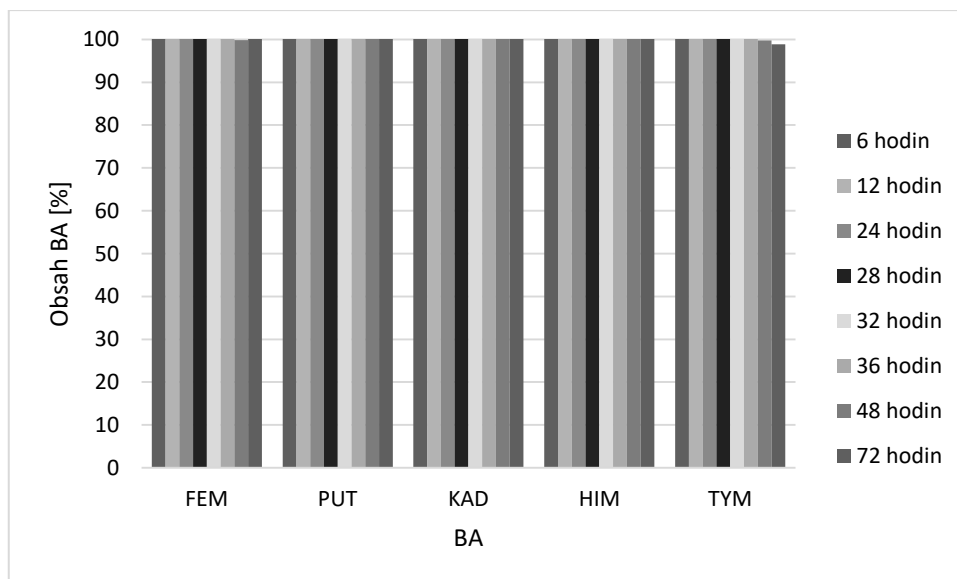
6.3.2.4 Degradace biogenních aminů kmenem *Lactobacillus casei* CCDM 802 při 37 °C v půdách s nižším obsahem živin

V půdě ½ MRS-C degradovaly pouze dva biogenní aminy, putrescin a kadaverin. PUT degradoval pouze v časech 24 a 72 hodin o 12 a 9 %. Degradace KAD proběhla ve všech časech, kdy největší úbytek byl v čase 24 hodin o 33 % a nejmenší v čase 28 hodin o 8%. V ostatních časech degradoval kolem 25-27 %. (obr. 17)



Obrázek 17: Degradace BA kmenem *Lbc. casei* CCDM 802 při 37°C v ½ MRS-C

V poloviční půdě při 37 °C degradovaly minimálně (< 2%) FEM a TYM. (obr. 18)



Obrázek 18: Degradace BA kmenem *Lbc. casei* CCDM 802 při 37°C v ½ MRS

7 DISKUZE

Biogenní aminy jsou organické, bazické, dusíkaté sloučeniny, které se tvoří pomocí mikrobiální dekarboxylace některých volných aminokyselin nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů. Jsou přítomny jak v rostlinných, tak mikrobiálních i živočišných buňkách, kde mohou být zapojeny do několika biologických aktivit (např. lidská mozková aktivita). [1]

V potravinách se v nízkých koncentracích můžou přirozeně vyskytovat. Vyskytují se především v potravinách bohatých na bílkoviny a aminokyseliny, které umožňují biochemickou aktivitu mikroorganismů, a proto se biogenní aminy mohou vytvářet během procesu rozkladu nebo znehodnocování potravin. Proto jejich nadměrný perorální příjem může způsobit několik zdravotních problémů, jako bolesti hlavy, zvracení, horečku a vyrážku. Biogenní aminy se vyskytují především v sýrech, rybách, fermentovaných potravinách a v červeném víně. [1] [3]

Existuje několik možností pro snížení obsahu biogenních aminů v potravinách, například použití enzymů, jako jsou monoaminoxidáza a diaminoxidáza různého původu, které metabolizují biogenní aminy deaminací, použití bakterií mléčného kvašení s inhibičními účinky na dekarboxyláza-pozitivní mikroorganismy, dále aplikace antimikrobních látek působící na dekarboxyláza-pozitivní mikroorganismy (např. soli dusitanů a dusičnanů, koření, kyselina citrónová) a použití technologických zákroků (např. hydrostatický tlak, ozařování, balení). [38][44][48][55]

Mezi potenciálně nejtoxičtější biogenní aminy řadíme histamin a dále tyramin (podle EFSA), kdy nejčastější intoxikace bývají způsobeny právě histaminem, který se nejčastěji vyskytuje v rybách, jako jsou tuňák, makrela a sardinky. Putrescin a kadaverin mohou inhibovat detoxikační enzymy histaminu, a tím působí jako potenciátoři toxicity histaminu. [1] [3] [22]

Bakterie rodů *Proteus*, *Hafnia*, *Vibrio* a *Klebsilla* jsou významní producenti histaminu, především v rybách, kdy mohou způsobit scombroidovou otravu. Dále ryby mohou obsahovat vysoká množství tryptaminu, putrescinu, kadavarinu, tyraminu a polyaminů (spermin, spermidin). [23]

Bakterie rodů *Leuconostoc mesenteroides* a *Lactobacillus* mohou produkovat zvýšený obsah putrescinu a tyraminu, kdy tyto biogenní aminy vznikají především v kysaném zelí. Dále ve fermentované mléčné zelenině byly nalezeny i ostatní biogenní aminy. [3]

U sýrů dosahují biogenní aminy vysokých hodnot z důvodu velkého množství bílkovin, enzymů, kofaktorů a obsahu bakterií, a proto představují sýry vhodné prostředí pro produkci biogenních aminů pomocí dekarboxylázové aktivity. [3]

Dále zpracované maso (především fermentované masné výrobky) je velmi vhodným prostředím pro tvorbu vysokého množství histaminu a tyraminu díky bakteriím rodů *Pseudomonas*, *Carnobacterium* a *Enterobacteriaceae*. [3] [24]

Několik studií se zabývá mikroorganismy, které jsou schopny inhibovat dekarboxyláza-pozitivní kmeny. Buď pomocí svých enzymů, nebo svých degradačních schopností. Mezi studované bakterie řadíme především bakterie mléčného kvašení, které se používají například jako startovací kultury nebo jako probiotika v kysaných mléčných výrobcích pro dosažení bezpečnosti potravin, prodloužení jejich trvanlivosti a dále pro získání požadovaných vlastností. [36]

Cílem první části praktické části diplomové práce bylo pozorovat schopnost produkce biogenních aminů z přidaných aminokyselin ve dvou půdách po dobu 24 hodin a 48 hodin. Půdy, které byly použity, byly MRS a MRS-C. Ve všech médiích byla koncentrace každé aminokyseliny 2 g/l (arginin, ornitin, histidin, tyrozin, lyzin, fenylalanin). Kmeny *Lactobacillus casei* tvořily biogenní aminy z přidaných aminokyselin zcela minimálně, kdežto kmeny *Lactobacillus paracasei* (které byly zkoumány poprvé) byla tvorba biogenních aminů u kmenů *Lbc. paracasei* S3-26 a S3-27 vysoká, a to především tyraminu a putrescinu. Ostatní kmeny *Lbc. paracasei* vytvářely biogenní aminy minimálně. Uvedené dva kmeny produkující biogenní aminy tak nejsou vhodné pro další aplikace, včetně testování na schopnost degradace biogenních aminů.

Druhá část experimentu byla zaměřena na ověření schopnosti testovaných kmenů bakterií degradovat biogenní aminy. V této části práce byly použity kmeny bakterií *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus paracasei*, kdy byl sledován úbytek biogenních aminů během jejich kultivace po 24 a 48 hodinách. Byly použity čtyři půdy a to MRS, MRS-C a půdy s polovičním obsahem živin, kdy do každého z těchto médií bylo přidáno pět biogenních aminů v koncentraci 0,5 g/l (tyramin, putrescin, kadaverin, histamin, fenyletylamin). U polovičních médií byl předpoklad vyšší schopnosti vybraných kmenů snížit obsah biogenních aminů, kdy bakterie využijí rychleji živiny z médií a následně začnou metabolizovat biogenní aminy. Snížení obsahu biogenních aminů byl srovnáván s kontrolou, což bylo příslušné médium s biogenními aminy, ale bez zaočkování příslušné bakterie.

Skríning kmenů *Lactobacillus paracasei* dokazoval degradaci především po 24 hodinové kultivaci, kdy degradovaly kolem 10 % putrescin a histamin u kmene *Lbc. paracasei* S3-22; kolem 10 % fenyletylamin, histamin a tyramin u kmene *Lbc. paracasei* S3-23; kolem 5 % fenyletylamin a histamin u kmene *Lbc. paracasei* S3-25; kolem 4% putrescin a histamin u *Lbc. paracasei* S3-32; kolem 15 % putrescin a histamin a kolem 5% fenyletylamin a tyramin u kmene *Lbc. paracasei* S3-37; ostatní kmeny *Lbc. paracasei* vykazovaly minimální úbytky biogenních aminů nebo vůbec žádné. Po 48 hodinách nebylo zjištěno výrazné snížení biogenních aminů.

Skríning kmenů *Lactobacillus casei* na degradaci BA ukazoval snížení biogenních aminů po 24 a 48 hodinách kultivace. Kmen *Lbc. casei* CCDM 422 vykazoval degradaci všech biogenních aminů po 24 hodinách, kdy největší úbytek byl u kadaverinu o 14 % a po 48 hodinách u tyraminu (o 17 %). Kmen *Lbc. casei* CCDM 802 vykazoval minimální úbytky. Kmen *Lbc. casei* CCDM 650 měl úbytky všech biogenních aminů po 24 hodinách kolem 10 % a po 48 hodinách degradoval pouze tyramin o 10 %. Kmen *Lbc. casei* CCDM 145 dokázal degradovat putrescin, kadaverin a histamin o 15 % při 24 hodinách. Kmen *Lbc. casei* CCDM 198 degradoval všechny biogenní aminy po 24 hodinách o 10-15 %.

Po skrínungu kmenů *Lbc. casei* byly vybrány dále dva kmeny, které byly podrobeny dalšímu experimentu. Mezi vybrané kmeny patří kmen bakterie *Lactobacillus casei* CCDM 422 a *Lactobacillus casei* CCDM 802. Tyto kmeny byly testovány v různých kultivačních médiích (MRS, MRS-C, ½ MRS, ½ MRS-C) při různé teplotě (30 °C, 37 °C) a v odlišných časech kultivace (6-72 hodin).

Lactobacillus casei CCDM 422 a *Lactobacillus casei* CCDM 802 vykazovaly při 30 °C nejlepší degradační účinky v polovičním médiu MRS-C u fenyletylaminu, kdy byl úbytek obsahu tohoto biogenního aminu až o 70 % v obou případech. Dále kmen *Lactobacillus casei* CCDM 802 při 30 °C vykazoval výborné degradační schopnosti v půdě MRS, kdy úbytek fenyletylaminu byl až o 43 % po odběru ve 24 hodin a úbytek histaminu o 48 % po 24 hodinách. Za stejných podmínek v celém médiu byl úbytek o poznání nižší, čímž můžeme říct, že poloviční médium při teplotě 30 °C má výrazně vyšší vliv na degradaci BA těmito vybranými kmeny.

Tyto kmeny při teplotě 37°C měly nejlepší degradační schopnosti v půdě MRS, především v čase 28 hodin. Kmen *Lbc. casei* CCDM 802 snížil obsah histaminu až o 61 % v čase 28 hodin, v ostatních odběrech dokázal degradovat histamin o 50-59 %. Dále byl významný úbytek fenyletylaminu (až o 47 %), putrescinu (49 %) a tyraminu (na 60 %). Kadaverin měl

největší úbytek také v čase 28 hodin a to o 26 %. Kmen *Lbc. casei* CCDM 422 degradoval nejlépe histamin a to na 41%, další významný úbytek byl u fenyletylaminu, kdy jeho obsah byl snížen o 49% v časech 12 a 36 hodinách. Putrescin byl nejlépe degradován v čase 24 hodin o 47 %. U tyraminu došlo k poklesu nejvíce o 41 % (36 hodin) a u kadaverinu o 23% v čase 24 a 28 hodin. Při teplotě 37 °C byla největší schopnost těchto kmenů v celém médiu o hodně vyšší než v polovičním, protože to může být způsobeno jejich optimální teplotou oproti 30 °C.

Díky tomuto experimentu byly dosaženy výsledky, které nabízejí možnost použití těchto testovaných mikroorganismů v potravinářství, například při výrobě kysaných mléčných výrobků nebo fermentovaných potravin, kde se kumuluje nejvíce biogenních aminů. V těchto potravinách mohou být součástí startovacích kultur nebo se mohou použít během technologie zpracování.

V odborných člancích a několika studiích se zabývají právě degradační schopností mikroorganismů, jejich využití v potravinářském průmyslu a také jejich izolací. Například se mohou použít bakterie mléčného kvašení jako startovací kultury, které jsou schopny degradovat biogenní aminy ve fermentovaných potravinách, v mléčných výrobcích (například rod *Lactobacillus paracasei*) nebo v masné výrobě. Tyto používané kultury jsou charakteristické pro svou nepřítomnost dekarboxylázové aktivity. Startovací bakterie mléčného kvašení mohou indukovat kyselé prostředí, čímž inhibují růst dekarboxylačních mikroorganismů, což vede ke snížení tvorby BA. [42] [43]

Bylo zjištěno, že řada bakterií má inhibiční účinek na dekarboxyláza-pozitivní mikroorganismy nebo produkuje enzymy, které zabraňují vzniku biogenních aminů (*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, které se používají startěři pro výrobu sýrů). [22]

Přídavek dekarboxyláza-negativních startovacích kultur do různých fermentovaných masných výrobků dokáže snížit akumulaci biogenních aminů odlišným způsobem v závislosti na druhu a kmeni. Při výrobě řeckých salámů bylo dosaženo snížení biogenních aminů pomocí *Lactobacillus sakei*, kdy u tyraminu byl úbytek na 62 % a u histaminu na 71 %. U portugalských masných produktů se používá například *Staphylococcus equorum* (redukce kadaverinu o 45 %) a *Lactobacillus sakei* (redukce o 75 %). U španělského fuetu snížil přídavek *Lactobacillus sakei* v kombinaci se *Staphylococcus xylosus* obsah tyraminu až o 50 %. [51]

Lactobacillus casei se běžně vyskytuje v potravinových maticích, jako jsou ryby, maso a siláž. Schopnost degradovat biogenní aminy záleží na použitém kmeni. Nyní se používá jako doplňková kultura pro snížení přítomnosti biogenních aminů v sýrech nebo ve fermentovaném zelí, kde dokáže 10x snížit obsah putrescinu. [52] [53]

Lactobacillus plantarum má příznivý vliv na obsah biogenních aminů v rybách. Inokulace této bakterie způsobuje rychlé okyselení, tím inhibuje růst nežádoucích bakterií, jako je *Pseudomonas* a *Enterobacteriaceae*, a následně snižuje hromadění putrescinu a kadaverinu. [54]

Lactobacillus plantarum, *Lb. sakei*, *Lb. pentosus*, *Pediococcus acidilactici*, *Micrococcus* sp. a *Brevibacterium linens* mají schopnost degradovat *in vitro* tyramin a histamin. Čtyři kmeny *Lb. sakei* dokáží degradovat histamin ve fermentovaných rybích výrobcích. *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus plantarum* mohou degradovat tyramin. [42] [43]

Výsledky této práce mohou být užitečné pro další studium degradace biogenních aminů testovanými kmeny, nebo dalšími kmeny, které byly použity při jiném výzkumu. Degradční schopnost vybraných kmenů na biogenní aminy byla testována v podmínkách *in vitro*, které se mohou lišit několika způsoby, například se mohou lišit od podmínek reálných vzorků, ve kterých se tyto testované bakterie mohou chovat jinak z důvodu jiných vnějších podmínek jako je dostupnost kyslíku, živin, vodní aktivity a další ovlivňující látky, které se mohou použít pro snížení obsahu biogenních aminů.

ZÁVĚR

Hlavním cílem diplomové práce bylo seznámení s biogenními aminy a především jejich možná degradace pomocí kmenů *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus paracasei*. Tato vlastnost byla zkoumána u zmíněných kmenů, kdy *Lactobacillus casei* byly kmeny využívané v mlékárenství ze Sbirky mlékárenských mikroorganismů (CCDM) a z chlebového kvásku v Portugalsku (S3).

Praktická část se zabývala jak produkcí biogenních aminů, aby se mohly vyloučit především kmeny produkující BA, zejména *Lbc. paracasei* S3 (které nebyly dosud prozkoumány), tak možnostmi snížení obsahu biogenních aminů v různých druzích půd, při různých teplotách a odlišných časech odběru.

Při produkci biogenních aminů bylo zjištěno, že kmeny *Lactobacillus casei* produkovaly biogenní aminy z aminokyselin pouze minimálně, kdežto některé z kmenů *Lactobacillus paracasei* zvyšovaly obsah BA v kultivační půdě, především kmen S3-26, který produkoval vysoké množství tyraminu a kmen S3-27, který vytvářel vysoký obsah putrescinu. Ostatní kmeny *Lbc. paracasei* tvořily biogenní aminy z aminokyselin minimálně.

Při druhém experimentu praktické části bylo hlavním cílem zjistit u dvou degradérů *Lbc. casei* podmínky, za kterých byli schopni snížit obsah vybraných biogenních aminů (fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu) v závislosti na typu půdy, času odběru a teploty kultivace. U jednotlivých kmenů byla zaznamenána odlišná schopnost degradovat biogenní aminy v závislosti na testovaných podmínkách.

Z kmenů *Lbc. casei* byl vybrán kmen *Lbc. casei* CCDM 422 a CCDM 802. *Lbc. casei* CCDM 422 vykazoval nejvyšší úbytky biogenních aminů při 30 °C v půdě MRS-C s nižším obsahem živin, kdy fenyletylamin degradoval o 71 % při 48 hodinách a v půdě MRS při 37 °C degradoval nejvíce histamin, a to o 63 % při 36 hodinách. *Lbc. casei* CCDM 802 vykazoval největší degradační schopnosti při teplotě 30 °C v půdě MRS u histaminu o 48 % (24 hodin) a v půdě MRS-C s nižším obsahem živin klesl fenyletylamin o 70%. Při teplotě 37 °C v půdě MRS degradoval tento kmen nejlépe při 28 hodinách histamin o 61 %.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] TITTARELLI, Fabrizia, Giorgia PERPETUINI, Paola DI GIANVITO a Rosanna TOFALO. Biogenic amines producing and degrading bacteria: A snapshot from raw ewes' cheese. *LWT* [online]. 2019, **101**, 1-9 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.11.030. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643818309812>
- [2] ZAMORA, Rosario, Rosa M. DELGADO, Francisco J. HIDALGO a Rosanna TOFALO. Formation of β -phenylethylamine as a consequence of lipid oxidation: A MD-simulation and DFT studies. *Food Research International* [online]. 2012, **46**(1), 321-325 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.12.029. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996912000142>
- [3] KAROVICOVA, J. a Z. KOHAJDOVA. Biogenic Amines in Food. *ChemInform* [online]. 2005, **36**(34) [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1002/chin.200534338. ISSN 0931-7597. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/chin.200534338>
- [4] ROIG-SAGUÉS, Artur X., Claudia RUIZ-CAPILLAS, Diana ESPINOZA a Manuela HERNÁNDEZ. *The decarboxylating bacteria present in foodstuffs and the effect of emerging technologies on their formation*[online]. 2009. India: Transworld Research Network, 2009 [cit. 2019-03-20]. ISBN 978-81-7895-249-9
- [5] EKICI, Kamil a Abdullah Khalid OMER. The determination of some biogenic amines in Turkish fermented sausages consumed in Van. *Toxicology Reports* [online]. 2018, **5**, 639-643 [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.1016/j.toxrep.2018.05.008. ISSN 22147500. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214750018303354>
- [6] DEL RIO, Beatriz, Begoña REDRUELLO, Daniel M. LINARES, et al. Spermine and spermidine are cytotoxic towards intestinal cell cultures, but are they a health hazard at concentrations found in foods? *Food Chemistry* [online]. 2018, **269**(3), 321-326 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.06.148. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618311336>
- [7] FAROOQUI, Tahira a Akhlaq A. FAROOQUI. *Biogenic amines: pharmacological, neurochemical and molecular aspects in the CNS*. New York: Nova Biomedical Books, c2010. Pharmacology-research, safety testing, and regulation series. ISBN 978-1-60876-625-3

- [8] DASGUPTA, Subrata, Soumita MUKHERJEE, Bishnu P. MUKHOPADHYAY a Rosanna TOFALO. Recognition of trans and gauche phenylethylamine conformers in the active site of human monoamine oxidase B: A MD-simulation and DFT studies. *Computational and Theoretical Chemistry* [online]. 2018, **1127**, 44-51 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1016/j.comptc.2018.01.021. ISSN 2210271X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2210271X18300355>
- [9] XIA, Hong-qi, Yuki KITAZUMI, Osamu SHIRAI, Hirokazu OHTA, Shin KURIHARA a Kenji KANO. Putrescine oxidase/peroxidase-co-immobilized and mediator-less mesoporous microelectrode for diffusion-controlled steady-state amperometric detection of putrescine: A MD-simulation and DFT studies. *Journal of Electroanalytical Chemistry* [online]. 2017, **804**(1), 128-132 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1016/j.jelechem.2017.09.056. ISSN 15726657. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1572665717306859>
- [10] HONG, Yun-Gi, Hyun-Joong KIM, Jong-Min JEON, et al. Selective recovery of cadaverine from lysine decarboxylase bioconversion solution using methyl ethyl ketone: A MD-simulation and DFT studies. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* [online]. 2018, **64**(1), 167-172 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1016/j.jiec.2018.03.013. ISSN 1226086X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1226086X18301345>
- [11] MA, Weichao, Kequan CHEN, Yan LI, et al. Advances in Cadaverine Bacterial Production and Its Applications: A MD-simulation and DFT studies. *Engineering* [online]. 2017, **3**(3), 308-317 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1016/J.ENG.2017.03.012. ISSN 20958099. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S209580991730423X>
- [12] DÍAZ NEBREDA, Antonela, Carlos Daniel ZAPPÍA, Angela RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, et al. Involvement of histamine H1 and H2 receptor inverse agonists in receptor's crossregulation: A MD-simulation and DFT studies. *European Journal of Pharmacology* [online]. 2019, **847**(3), 42-52 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.01.026. ISSN 00142999. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299919300597>
- [13] GONZÁLEZ-JIMÉNEZ, Mario, Jorge ARENAS-VALGAÑÓN, María del Pilar GARCÍA-SANTOS, et al. Mutagenic products are promoted in the nitrosation of tyramine: Yb,Er@NaYF₄ upconversion nanoparticles. *Food Chemistry* [online]. 2017, **216**(3), 60-65 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.08.006. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616312365>

- [14] WANG, Huihui, Yunyun LU, Lun WANG, et al. Detection of tyramine and tyrosinase activity using red region emission NaGdF₄: Yb,Er@NaYF₄ upconversion nanoparticles. *Talanta* [online]. 2019, **197**(3), 558-566 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.01.079. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914019300761>
- [15] PŁONKA, Joanna, Virginia GARCÍA-CAÑAS, Carolina SIMÓ, Alejandro CIFUENTES, María FERNÁNDEZ, Maria Cruz MARTIN, Victor LADERO a Miguel A. ALVAREZ. Food analysis – samples preparation and chromatographic methods in determination of selected biogenic amines, methylxanthines and water-soluble vitamins. *Analytical Methods* [online]. 2012, **4**(10), 147-167 [cit. 2019-02-19]. DOI: 10.1039/c2ay25706h. ISSN 1759-9660. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2ay25706h>
- [16] RAWAT, Karuna A., Jigna R. BHAMORE, Rakesh Kumar SINGHAL, et al. Microwave assisted synthesis of tyrosine protected gold nanoparticles for dual (colorimetric and fluorimetric) detection of spermine and spermidine in biological samples: Yb,Er@NaYF₄ upconversion nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2017, **88**(3), 71-77 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1016/j.bios.2016.07.069. ISSN 09565663. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566316307023>
- [17] LANDETE, José María, Blanca DE LAS RIVAS, Angela MARCOBAL, Rosario MUÑOZ, Jacek NAMIEŚNIK a Justyna PŁOTKA-WASYLKA. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2007, **117**(3), 258-269 [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.05.001. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160507002644>
- [18] EEROLA, S., R. HINKKANEN, E. LINDFORS a T. HIRVI. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *JAOAC Int.*, 1993, **76**, 575-577
- [19] FEKETE, Agnes, Ashok Kumar MALIK, Ashwini KUMAR a Philippe SCHMITT-KOPPLIN. Amines in the Environment: Encrypted Peptides and Biogenic Amines. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* [online]. 2010, **40**(2), 102-121 [cit. 2019-02-20]. DOI: 10.1080/10408340903517495. ISSN 1040-8347. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408340903517495>

[20] ERB, Robert, Katharina LEITHNER, Andreas BERNKOP-SCHNÜRCH a Herbert OBERACHER. Phosphorothioate Oligonucleotide Quantification by μ -Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *The AAPS Journal* [online]. Elsevier, 2012, 2003, **14**(4), 728-737 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1208/s12248-012-9381-2. ISBN 9780122270550. ISSN 1550-7416. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1208/s12248-012-9381-2>

[21] PAPAGEORGIOU, Myrsini, Dimitra LAMBROPOULOU, Calum MORRISON, Ewa KŁODZIŃSKA, Jacek NAMIEŚNIK a Justyna PŁOTKA-WASYLKA. Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2018, **98**, 128-142 [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.1016/j.trac.2017.11.001. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993617303990>

[22] NAILA, Aishath, Steve FLINT, Graham FLETCHER, Phil BREMER a Gerrit MEERDINK. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science* [online]. 2010, **75**(7), R139-R150 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x>

[23] ZHAI, Honglei, Xianqing YANG, Laihao LI, Guobin XIA, Jianwei CEN, Hui HUANG, Shuxian HAO a Robson Maia FRANCO. Biogenic amines in commercial fish and fish products sold in southern China: A snapshot from raw ewes' cheese. *Food Control* [online]. 2012, **25**(1), 303-308 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.10.057. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713511004786>

[24] LÁZARO, César Aquiles, Carlos Adam CONTE-JÚNIOR, Anna Carolina CANTO, Maria Lucia Guerra MONTEIRO, Bruno COSTA-LIMA, Adriano Gomes da CRUZ, Eliane Teixeira MÁRSICO a Robson Maia FRANCO. Biogenic amines as bacterial quality indicators in different poultry meat species: A snapshot from raw ewes' cheese. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2015, **60**(1), 15-21 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.09.025. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643814005805>

[25] <http://textbookofbacteriology.net/lactics.html>

[26] SALMINEN, Seppo. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 4th ed. Boca Raton, c2012. ISBN 978-1-4398-3677-4.

[27] Mléčné kvašení. In: Zتامoko mushroom [online]. 2004 [cit. 2017-10-01]. Dostupné z: http://zتامoko.cz/houby/teorie_j.php?q=old/teorie_j.php

[28] BATT, C.A., Francesca DORIA, Juan-Carlos SAIZ, Emilia GARCIA-MORUNO, Marion DALMASSO, Jean-Marie LAPLACE a Marina CRETENET. LACTOBACILLUS | Introduction: Implications for malolactic fermentation in wine. *Encyclopedia of Food Microbiology* [online]. Elsevier, 2014, 2014, **246**, 409-411 [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00176-2. ISBN 9780123847331. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123847300001762>

[29] DE ANGELIS, M., M. GOBBETTI, Juan-Carlos SAIZ, Emilia GARCIA-MORUNO, Marion DALMASSO, Jean-Marie LAPLACE a Marina CRETENET. Lactobacillus SPP: General Characteristics ☆. *Reference Module in Food Science* [online]. Elsevier, 2016, 2016, **246**, 409-411 [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.00851-9. ISBN 9780081005965. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081005965008519>

[30] BATT, C.A., M. GOBBETTI, Juan-Carlos SAIZ, Emilia GARCIA-MORUNO, Marion DALMASSO, Jean-Marie LAPLACE a Marina CRETENET. LACTOCOCCUS | Introduction: General Characteristics ☆. *Encyclopedia of Food Microbiology* [online]. Elsevier, 2014, 2014, **246**, 439-441 [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00181-6. ISBN 9780123847331. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123847300001816>

[31] NARVHUS, J.A. a L. AXELSSON. LACTIC ACID BACTERIA. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* [online]. Elsevier, 2003, 2003, , 3465-3472 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1016/B0-12-227055-X/00673-8. ISBN 9780122270550. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B012227055X006738>

[32] BARON, Samuel. *Medical microbiology*. 4th ed. Galveston, Tex.: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. ISBN 09-631-1721-1.

[33] PUJATO, Silvina A., Daniela M. GUGLIELMOTTI, Manuel MARTÍNEZ-GARCÍA, Andrea QUIBERONI a Francisco J.M. MOJICA. Leuconostoc mesenteroides and Leuconostoc pseudomesenteroides bacteriophages: Genomics and cross-species host ranges. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2017, **257**, 128-137 [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.009. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160517302775>

- [34] COUSIN, Fabien J., Rozenn LE GUELLEC, Caroline CHAGNOT, Didier GOUX, Marion DALMASSO, Jean-Marie LAPLACE a Marina CRETENET. *Oenococcus sicerae* sp. nov., isolated from French cider: Genomics and cross-species host ranges. *Systematic and Applied Microbiology*[online]. 2018, **257**, 128-137 [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.1016/j.syapm.2018.12.006. ISSN 07232020. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0723202018302613>
- [35] COSTANTINI, Antonella, Francesca DORIA, Juan-Carlos SAIZ, Emilia GARCIA-MORUNO, Marion DALMASSO, Jean-Marie LAPLACE a Marina CRETENET. Phage-host interactions analysis of newly characterized *Oenococcus oeni* bacteriophages: Implications for malolactic fermentation in wine. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2017, **246**, 12-19 [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.020. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160517300478>
- [36] TEUSINK, Bas a Douwe MOLENAAR. Systems biology of lactic acid bacteria: For food and thought. *Current Opinion in Systems Biology*[online]. 2017, **6**, 7-13 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1016/j.coisb.2017.07.005. ISSN 24523100. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452310017301294>
- [37] HORÁČKOVÁ, Šárka, Kristina BIALASOVÁ a Milada PLOCKOVÁ. Metabolismus a význam bakterií mléčného kvašení ve fermentovaných mléčných výrobcích. *Mlékařské listy*. Praha, 2018, **29**(5), 22-24.
- [38] ALVAREZ, Miguel A., Ma Victoria MORENO-ARRIBAS, Carolina SIMÓ, Alejandro CIFUENTES, María FERNÁNDEZ, Maria Cruz MARTIN, Victor LADERO a Miguel A. ALVAREZ. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Analytical Methods* [online]. 2014, **39**(2), 146-155 [cit. 2019-02-19]. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.07.007. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224414001599>
- [39] CAPOZZI, Vittorio, Pasquale RUSSO, Victor LADERO, María FERNÁNDEZ, Daniela FIOCCO, Miguel A. ALVAREZ, Francesco GRIECO a Giuseppe SPANO. Biogenic Amines Degradation by *Lactobacillus plantarum*: Toward a Potential Application in Wine. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2012, **3** [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00122. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00122/abstract>

- [40] LADERO, V., M. FERNÁNDEZ, M. CALLES-ENRÍQUEZ, E. SÁNCHEZ-LLANA, E. CANEDO, M.C. MARTÍN, et al. Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci? *Food Microbiology*, 2012, **30**, 132-138
- [41] PESSIONE, Enrica a Simona CIRRINCIONE. Bioactive Molecules Released in Food by Lactic Acid Bacteria: Encrypted Peptides and Biogenic Amines. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016, **7** [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00876. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00876/abstract>
- [42] LEUSCHNER, R.G., M. HEIDEL, W.P. HAMMES, Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms, *International Journal of Food Microbiology*, 1998, **39**, 1-10
- [43] DAPKEVICIUS, M.L.N.E., M.J.R. NOUT, F.M. ROMBOUTS, J.H. HOUBEN a W. WYMENGA, Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms, *International Journal of Food Microbiology*, 2000, **57**, 107-114
- [44] GARDINI, Fausto, Yesim ÖZOGUL, Giovanna SUZZI, Giulia TABANELLI, Fatih ÖZOGUL, M. CALLANAN, C. RAUH a D. KNORR. Technological Factors Affecting Biogenic Amine Content in Foods: A Review. *Frontiers in Microbiology* [online]. Elsevier, 2016, **2003**, **7**(9), 868-872 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01218. ISBN 9780122270550. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.01218/abstract>
- [45] MARTÍNKOVÁ, Jiřina. Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů. 2., zcela přeprac. a doplň. vyd. Praha: Grada, 2014. ISBN 9788024713564
- [46] MAH, J. a HWANG, H. Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. *Food Control*. 2009, **20**(9), 796-801. ISSN 09567135
- [47] ZAMAN, Muhammad Zukhrufuz, Fatimah ABU BAKAR, S. JINAP a Jamilah BAKAR. Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2011, **145**(1), 84-91 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.031. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160510006628>
- [48] BURDYCHOVÁ, R., 2007: Mikrobiologická detekce probiotických mikroorganismů ve fermentovaných mléčných výrobcích. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis.*, LV, 2: 15–20. ISSN 1211-8516

- [49] BURDYCHOVÁ, R., 2006: Skríning vybraných startovacích bakteriálných kultur na prítomnosť sekvencií kodujúcich dekarboxylázu tyrosínu. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis.*, LIV, 5: 7–11. ISSN 1211-8516
- [50] SHUKLA, S., PARK, H., LEE, J., KIM, J. a KIM, M. Reduction of biogenic amines and aflatoxins in Doenjang samples fermented with various Meju as starter cultures. *Food Control*. 2014, 42, 181-187. ISSN 09567135
- [51] LATORRE-MORATALLA, M.L., S. BOVER-CID, R. TALON, et al. Strategies to reduce biogenic amine accumulation in traditional sausage manufacturing. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2010, 43(1), 20-25 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1016/j.lwt.2009.06.018. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364380900190X>
- [52] HERRERO-FRESNO, Ana, Noelia MARTÍNEZ, Esther SÁNCHEZ-LLANA, et al. Lactobacillus casei strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2012, 157(2), 297-304 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.002. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816051200284X>
- [53] RABIE, Mohamed A., Hassan SILIHA, Soher EL-S Aidy, et al. Reduced biogenic amine contents in sauerkraut via addition of selected lactic acid bacteria. *Food Chemistry* [online]. 2011, 129(4), 1778-1782 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.05.106. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611008090>
- [54] ZHANG, Qilin, Shenglin LIN, Xiaohua NIE, et al. Reduction of biogenic amine accumulation in silver carp sausage by an amine-negative Lactobacillus plantarum. *Food Control* [online]. 2013, 32(2), 496-500 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.01.029. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713513000443>
- [55] GENÇCELEP, Hüseyin, Güzin KABAN, Muhammet İrfan AKSU, Fatih ÖZ, Mükerrrem KAYA, M. CALLANAN, C. RAUH a D. KNORR. Determination of biogenic amines in sucuk: A review. *Food Control* [online]. Elsevier, 2008, 2003, 19(9), 868-872 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2007.08.013. ISBN 9780122270550. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713507001880>

- [56] LONVAUD-FUNEL A. a A. JOYEUX, Histamine production by wine lactic acid bacteria. Isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol*, 1994, 77401–407. 10.1111/j.1365-2672.1994.tb03441.x
- [57] NAILA, Aishath et al., 2010. Control of Biogenic Amines in Food—Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science*. 75 (7), 139-150 s. ISSN 1750-3841
- [58] MAH, Jae-Hyung, Young Jun KIM, Han-Joon HWANG a Jamilah BAKAR. Inhibitory effects of garlic and other spices on biogenic amine production in Myeolchi-jeot, Korean salted and fermented anchovy product. *Food Control* [online]. 2009, 20(5), 449-454 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.07.006. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713508001783>
- [59] KIM, J.-H., H.-J. AHN, D.-H. KIM, C. JO, H.-S. YOOK, H.-J. PARK a M.-W. BYUN. Irradiation Effects on Biogenic Amines in Korean Fermented Soybean Paste During Fermentation. *Journal of Food Science* [online]. Elsevier, 2003, 2003, 68(1), 80-84 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb14118.x. ISBN 9780122270550. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2003.tb14118.x>
- [60] BENKERROUM, N. Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2016, 15(4), 801-826 [cit. 2017-12-12]. DOI: 10.1111/1541-4337.12212. ISSN 15414337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12212>
- [61] NEI, Daisuke, Susumu KAWASAKI, Yasuhiro INATSU, et al. Effectiveness of gamma irradiation in the inactivation of histamine-producing bacteria. *Food Control* [online]. 2012, 28(1), 143-146 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.05.006. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713512002290>
- [62] GEORGET, E., R. SEVENICH, K. REINEKE, A. MATHYS, V. HEINZ, M. CALLANAN, C. RAUH a D. KNORR. Inactivation of microorganisms by high isostatic pressure processing in complex matrices: A review. *Journal of Food Science* [online]. Elsevier, 2015, 2003, 27(1), 1-14 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1016/j.ifset.2014.10.015. ISBN 9780122270550. ISSN 14668564. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856414001726>
- [63] DANIEL, Daniela, Vagner Bezerra DOS SANTOS, Denis Tadeu Rajh VIDAL a Cláudio Lucio DO LAGO. Determination of biogenic amines in beer and wine by capillary electrophoresis–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2015,

1416, 121-128 [cit. 2019-04-27]. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.08.065. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967315012625>

[64] AN, Dong, Zhuqiu CHEN, Jiachun ZHENG, Siyuan CHEN, Li WANG, Zhiyong HUANG a Ling WENG. Determination of biogenic amines in oysters by capillary electrophoresis coupled with electrochemiluminescence. *Food Chemistry* [online]. 2015, 168, 1-6 [cit. 2019-04-27]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.07.019. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614010516>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BA	Biogenní aminy
PA	Polyaminy
MAO-A, MAO-B	Monoaminoxidázy
DAO	Diaminoxidázy
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
μ-LC	Kapalinová chromatografie s minimalizací průtoků a nákladů
LC	Kapalinová chromatografie
PCR	Polymerázová řetězová reakce
GC	Plynová chromatografie
CE	Kapilární elektroforéza
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie
LAB	Bakterie mléčného kvašení
NSLAB	Non-startovací bakterie mléčného kvašení
EPS	Exopolysacharidy
AMK	Aminokyseliny
FEM	Fenyletylamin
PUT	Putrescin
KAD	Kadaverin
HIM	Histamin
TYM	Tyramin
SPE	Spermin
SPD	Spermidin
HHP	Hydrostatický tlak
HPH	Vysokotlaká homogenizace

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Homofermentativní dráha [27].....	22
Obrázek 2: Heterofermentativní dráha [27].....	22
Obrázek 3: Degradace BA kmenem <i>Lbc. casei</i> CCDM 422 při 30 °C v MRS-C	46
Obrázek 4: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Lbc. casei</i> CCDM 422 při 30 °C v MRS.....	46
Obrázek 5: Degradace BA kmenem 422 při 30°C v ½ MRS-C	47
Obrázek 6: Degradace BA kmenem 422 při 30°C v ½ MRS	48
Obrázek 7: Degradace BA kmenem 422 při 37°C v MRS-C	49
Obrázek 8: Degradace BA kmenem 422 při 37°C v MRS	50
Obrázek 9: Degradace BA kmenem 422 při 37°C v ½ MRS-C	50
Obrázek 10: Degradace BA kmenem 422 při 37 °C v ½ MRS	51
Obrázek 11: Degradace BA kmenem 802 při 30°C v MRS-C	52
Obrázek 12: Degradace BA kmenem 802 při 30°C v MRS	52
Obrázek 13: Degradace BA kmenem 802 při 30°C v ½ MRS-C	53
Obrázek 14: Degradace BA kmenem 802 při 30°C v ½ MRS	54
Obrázek 15: Degradace BA kmenem 802 při 37°C v MRS-C	55
Obrázek 16: Degradace BA kmenem 802 při 37°C v MRS	55
Obrázek 17: Degradace kmenu 802 při 37°C v ½ MRS-C.....	56
Obrázek 18: Degradace kmenu 802 při 37°C v ½ MRS.....	56

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1: Testované mikrobiální kmeny</i>	34
<i>Tabulka 2: Produkce biogenních aminů testovanými kmeny <i>Lbc. casei</i> a <i>Lbc. paracasei</i></i>	40
<i>Tabulka 3: Skrining degradace biogenních aminů kmeny <i>Lbc. paracasei</i> v MRS</i>	42
<i>Tabulka 4: Skrining degradace biogenních aminů kmeny <i>Lbc. paracasei</i> v půdě s nižším obsahem živin</i>	43
<i>Tabulka 5: Skrining degradace biogenních aminů kmeny <i>Lbc. casei</i> v MRS-C</i>	44
<i>Tabulka 6: Skrining degradace biogenních aminů kmeny <i>Lbc. casei</i> v půdě s nižším obsahem živin</i>	45