

# **Skríning dekarboxylázové aktivity u vybraných probiotických bakterií**

Bc. Michaela Sýkorová

---

Diplomová práce  
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2012/2013

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela Sýkorová**  
Osobní číslo: **T11724**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**  
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Skríning dekarboxylázové aktivity u vybraných probiotických bakterií.**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Charakteristika, vznik biogenních aminů a faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu bakterií.
2. Výskyt biogenních aminů a mikrobiální původci zvýšeného obsahu těchto substancí ve fermentovaných potravinách.
3. Vlastnosti, vliv na zdravotní stav člověka a potenciální dekarboxylázová aktivita probiotických mikroorganismů.

### II. Praktická část

1. Stanovení produkce biogenních aminů metodou RP-HPLC.
2. Skríning dekarboxylázové aktivity kmenů rodu *Bifidobacterium*.
3. Zpracování výsledků a formulace závěrů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

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

[2] HALÁSZ, A., Á. BARÁTH, A., L. SIMON-SARKADI a W. HOLZAPFEL. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*. 1994, vol. 5, iss. 2, s. 42-49. ISSN 0924-2244.

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

[4] KAROVIČOVÁ, J. a Z. KOHAJDOVÁ. Biogenic Amines in Food. *Chemical Papers*. 2005, vol. 59, iss.1, s. 70-79. ISSN: 0366-6352.

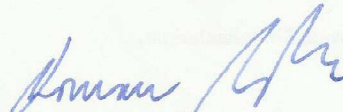
[5] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, M. HLOBILOVÁ, Z. VAŇÁTKOVÁ, D. NOVÁKOVÁ a V. DRÁB. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*. 2009, vol. 229, s. 533-538. ISSN: 1438-2377.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Eva Lorencová  
Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce: 11. února 2013

Termín odevzdání diplomové práce: 17. května 2013

Ve Zlině dne 11. února 2013

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



  
doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.  
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Sýkorová Michaela

Obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby<sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3<sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji 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 10.5.2013

Sýkorová

---

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

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

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k 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.

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

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

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

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

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

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

## ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na sledování dekarboxylázové aktivity vybraných kmenů probiotických bakterií převážně rodu *Bifidobacterium* za podmínek *in vitro*. Některým zástupcům tohoto rodu jsou přisuzovány probiotické účinky a běžně se používají jako kultury v potravinářství. Proto by jejich případná dekarboxylázová aktivita mohla být chápána jako protiklad k pozitivním dieteticko-léčebným účinkům. Produkce biogenních aminů byla monitorována v supernatantu získaném po kultivaci vybraných kmenů (celkový počet kmenů 53) ve dvou druzích dekarboxylačního média (MRS, WCH) s aminokyselinami (arginin, ornitin, lyzin, tyrozin) pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s předkolonovou derivatizací dansylchloridem a UV detekcí. Z osmi sledovaných biogenních aminů byl detekován tyramin a spermin. U 17% testovaných kmenů byla produkce v obou médiích zanedbatelná ( $<2 \text{ mg.l}^{-1}$ ). 30,2% byly detekovány koncentrace BA vyšší než  $10 \text{ mg.l}^{-1}$ . Zatímco příhodnější pro produkci tyraminu bylo médium Willkins Chalgren Broth. Vyšší koncentrace sperminu byly detekovány v dekarboxylačním médiu MRS.

Klíčová slova: biogenní aminy, dekarboxylace, probiotika, *Bifidobacterium*, podmínky kultivace

## ABSTRACT

This diploma thesis is focused on the observation of the decarboxylase activity of selected probiotic bacterial strains (predominantly *Bifidobacterium*) at *in vitro* conditions. Some representatives of *Bifidobacterium* genera are highlighted to be probiotic cultures and they have been already applied in the functional food production. Therefore, the potential decarboxylase activity could be considered the contrast to their positive dietary effect. The biogenic amine formation was determined in the supernatants harvested after the cultivation. Two different decarboxylation media (MRS broth, Willkins-Chalgren broth) enriched in amino acids (arginine, ornithine, lysine, tyrosine) were used. The measurement was realized by the means of high performance liquid chromatography after the pre-column derivatization by dansyl chloride and UV detection. Just one of eight observed biogenic amine, tyramine, was detected. In 17 % tested strains the production was insignificant ( $<2 \text{ mg.l}^{-1}$ ). About 30,2 % tested strains were able to produce higher concentrations ( $>10 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Being preferable for producing tyramine medium was Willkins Chalgren broth. Higher concentrations of spermine were detected decarboxylation medium MRS.

Keywords: biogenic amines, decarboxylation, probiotics, *Bifidobacterium*, cultivation conditions

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce Ing. Evě Lorencové za odborné vedení, cenné připomínky a trpělivost i čas strávený při konzultacích.

Můj velký dík patří také rodině za podporu během celé doby studia.

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



# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 BIOGENNÍ AMINY</b> .....	<b>12</b>
1.1 STRUKTURA A ČLENĚNÍ BIOGENNÍCH AMINŮ .....	12
1.2 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ .....	14
1.3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU BIOGENNÍCH AMINŮ MIKROORGANIZMY .....	18
1.3.1 pH.....	18
1.3.2 NaCl .....	18
1.3.3 Teplota.....	18
1.3.4 Sacharidy.....	19
1.3.5 Aditiva.....	19
<b>2 VÝSKYT BA A MIKROBIÁLNÍ PŮVODCI VPOTRAVINÁCH</b> .....	<b>20</b>
2.1 POTRAVINY ŽIVOČIŠNÉHO PŮVODU .....	20
2.1.1 Mléko a mléčné výrobky.....	20
2.1.2 Maso a masné výrobky.....	21
2.1.3 Potraviny rostlinného původu .....	21
2.1.4 Fermentované alkoholické nápoje.....	22
2.2 MIKROORGANIZMY ZPŮSOBUJÍCÍ ZVÝŠENÝ OBSAH BA VE FERMENTOVANÝCH POTRAVINÁCH.....	23
2.2.1 Bakterie mléčného kvašení a starterové kultury .....	24
<b>3 VLIV BIOGENNÍCH AMINŮ NA ZDRAVOTNÍ STAV ČLOVĚKA</b> .....	<b>26</b>
3.1 KLINICKÉ ASPEKTY .....	26
3.2 TOXIKOLOGICKÝ VÝZNAM BIOGENNÍCH AMINŮ .....	28
3.2.1 Detoxikační systém .....	29
3.3 HYGIENICKÉ LIMITY BA.....	30
3.4 LEGISLATIVNÍ LIMITY .....	30
<b>4 POTENCIÁLNÍ DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA PROBIOTICKÝCH MIKROORGANIZMŮ</b> .....	<b>31</b>
4.1 DEFINICE A VLASTNOSTI PROBIOTIK.....	31
4.2 PROBIOTICKÉ BAKTERIÁLNÍ KULTURY .....	32
4.2.1 Rod <i>Lactobacillus</i> .....	33
4.2.2 Rod <i>Bifidobacterium</i> .....	34
4.2.3 Rod <i>Enterococcus</i> .....	35
4.3 DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA PROBIOTICKÝCH MIKROORGANIZMŮ .....	36
4.3.1 Dekarboxylázová aktivita bakterií rodu <i>Lactobacillus</i> .....	36

4.3.2	Dekarboxylázová aktivita bakterií rodu <i>Enterococcus</i> .....	37
4.3.3	Dekarboxylázová aktivita bakterií rodu <i>Bifidobacterium</i> .....	38
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>		<b>39</b>
<b>5</b>	<b>CÍL PRÁCE .....</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>METODIKA A MATERIÁL .....</b>	<b>41</b>
6.1	POUŽITÉ KULTURY BAKTERIÍ.....	41
6.1.1	Příprava kultivačních médií .....	41
6.1.2	Příprava suspenze bakterií.....	43
6.2	SLEDOVÁNÍ KINETIKY RŮSTU U KMENE <i>BIFIDOBACTERIUM</i> .....	44
6.2.1	Stanovení optické hustoty buněk .....	44
6.2.2	Stanovení pH kultivačního média .....	45
6.3	STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ .....	45
6.3.1	Příprava chemikálií .....	45
6.3.2	Příprava vzorků k derivatizaci .....	46
6.3.3	Postup derivatizace.....	46
6.3.4	Chromatografické stanovení .....	46
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>47</b>
7.1	SKRÍNING DEKARBOXYLÁZOVÉ AKTIVITY U VÝBRANÝCH PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ .....	47
7.2	KINETIKA PRODUKCE KMENE <i>BIFIDOBACTERIUM</i> .....	52
7.2.1	Stanovení pH dekarboxylačních médií .....	52
7.2.2	Stanovení růstu buněk .....	54
7.2.3	Produkce biogenních aminů .....	55
7.3	DISKUZE.....	56
<b>ZÁVĚR .....</b>		<b>61</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>		<b>62</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>		<b>70</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>		<b>71</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>		<b>72</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>		<b>73</b>

## ÚVOD

Zdravotní nezávadnost potravin, která může být ovlivněna do značné míry metabolizmem mikroorganismů, hraje významnou roli v ochraně spotřebitelů před alimentárním onemocněním. Mikroorganismy disponují celou řadou enzymů, jako jsou proteázy, lipázy, nebo sacharolytické enzymy, které rozkládají základní složky potravin. Další enzymy např. reduktázy nebo dekarboxylázy se mohou podílet na vzniku toxických látek. Mezi tyto látky patří i biogenní aminy, které mohou sloužit také jako indikátory kažení potravin. Metabolické činnosti mikroorganismů se na druhé straně využívá k výrobě celé řady potravin, jako jsou např. kysané mléčné výrobky, sýry, fermentované uzeniny aj. V potravinách vznikají především dekarboxylací volných aminokyselin působením bakteriálních enzymů. Zástupce produkující mikroflóry můžeme nalézt i mezi startérovými kulturami, které se využívají při výrobě mléčně fermentovaných výrobků, ale dokonce i mezi probiotiky. I když množství biogenních aminů vyprodukované těmito bakteriemi není toxikologicky významné (zdaleka nepřesahuje  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), tak může přispívat k celkovému množství biogenních aminů v potravinách a ohrozit tak případně zdravotní stav konzumenta. Z těchto důvodů jsou kultury bakterií mléčného kvašení preventivně před aplikací ve výrobě testovány na schopnost produkce biogenních aminů.

Biogenní aminy lze očekávat prakticky ve všech fermentovaných nebo kazících se potravinách obsahujících bílkoviny nebo volné aminokyseliny, které jsou vystaveny podmínkám umožňujícím mikrobiální nebo biochemickou aktivitu. Celkové množství různých aminů silně závisí na charakteru potravin a přítomné mikroflóře. Nejvýznamnější biogenní aminy vyskytující se v potravinách jsou histamin, tyramin, tryptamin, putrescin, kadaverin, spermin, spermidin, fenylethylamin. Příjem potravin obsahujících vysoké koncentrace biogenních aminů může u citlivých osob vyvolat alimentární intoxikaci. Pro jejich negativní vliv na lidské zdraví je žádoucí, aby se tyto aminy v potravinách vyskytovaly v minimálním množství.

Tato diplomová práce je zaměřena na méně prozkoumanou problematiku produkce biogenních aminů probiotickými bakteriemi. Zvláštní pozornost byla věnována dekarboxylázové aktivitě bakterií rodu *Bifidobacterium*. Byl uskutečněn skrínig produkce u 53 probiotických kultur. V rámci pozorování této části metabolismu zmíněných bakterií byla navíc sledována i kinetika produkce biogenního aminu tyraminu u vybraného kmene *Bifidobacterium*.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy (BA) jsou dusíkaté sloučeniny tvořené hlavně dekarboxylací aminokyselin nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů. BA jsou tvořeny v průběhu metabolické činnosti mikroorganismů (MO), rostlin a živočichů. Jsou zdrojem dusíku a fungují jako prekurzory pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a bílkovin [1, 2]. Mohou také ovlivnit procesy v organismu např. regulace tělesné teploty, příjem výživy, zvýšení, nebo snížení krevního tlaku [3]. BA se buď vyskytují jako přirozená součást buněčných struktur, nebo vznikají v procesu výroby a skladování potravin jako výsledek metabolického působení MO. Stávají se indikátorem mikrobiální kontaminace a jejich koncentrace může být ukazatelem kvality potravin [4].

### 1.1 Struktura a členění biogenních aminů

Obecně BA obsahují jednu a více aminoskupin. Svojí strukturou se však vzájemně liší.

Podle chemické struktury se BA člení na:

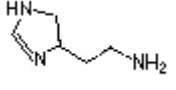
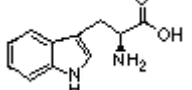
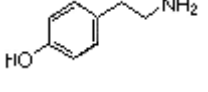
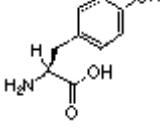
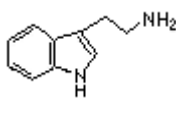
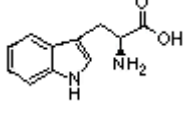

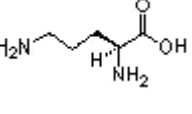
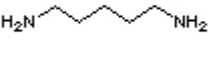
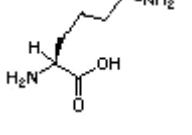
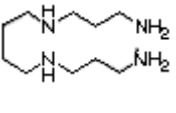
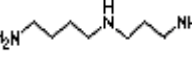
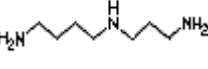

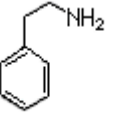
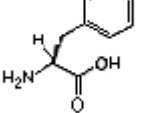
- alifatické: putrescin, kadaverin, spermidin, spermin, agmatin;
- aromatické: tyramin, fenylethylamin;
- heterocyklické: histamin, tryptamin;
- polyaminy: spermidin, spermin, putrescin [2, 5, 6].

Podle počtu aminových skupin lze BA dělit na:

- monoaminy: tyramin, fenylethylamin;
- diaminy: putrescin, kadaverin;
- polyaminy: spermin a spermidin [7].

Přehled BA a jejich prekurzorů je znázorněn v Tab. 1. Z jiného úhlu pohledu je možné řadit alifatické diaminy zjednodušeně mezi polyaminy, stejně jako heterocyklické BA do skupiny aromatických BA [5, 6]. Polyaminy jako jsou putrescin, spermidin a spermin jsou dnes klasifikovány jako samostatná skupina [8, 9].

Tab. 1. Chemická struktura potravinářsky významných BA a jejich prekurzorů [10, 11].

BA	Strukturní vzorec BA	Systematický název BA	Prekurzor BA	Strukturní vzorec prekurzoru
Histamin		2-(1H-imidazol-5-yl)etanamin	Histidin	
Tyramin		4-(2-aminoethyl)fenol	Tyrozín	
Tryptamin		2-(1H-imidazol-5-yl)etanamin	Tryptofan	
Putrescin		butan-1,4-diamin	Ornitin	
Kadaverin		pentan-1,5-diamin	Lyzin	
Spermin		N,N'-bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin	Spermidin	
Spermidin		N-(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin	Putrescin	
Fenyletylamin		2-fenyletanamin	Fenylalanin	

## 1.2 Vznik biogenních aminů

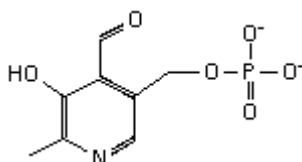
V potravinách je vznik BA možný třemi způsoby: dekarboxylací aminokyselin, aminací a transaminací aldehydů a ketonů [3, 12]. Primární aminy vznikají z volných aminokyselin působením dekarboxyláz. Sekundární a terciální BA jsou výsledkem aminace a transaminace aldehydů a ketonů [12]. Dekarboxylace je běžná obzvláště v živočišných materiálech. Vznik aminů z aldehydů se uplatňuje hlavně v rostlinných materiálech [10].

Endogenní BA se v potravinách mohou vyskytovat v nízkých koncentracích jako produkty metabolismu organismů, které se zde dostanou prostřednictvím surovin. Exogenní BA vznikají během fermentačních procesů, nebo jsou důsledkem mikrobiální kontaminace [10,12].

Pro vznik BA v potravinách je důležité, aby byly splněny tři základní podmínky:

- přítomnost prekurzorů pro vznik BA, aminokyselin;
- přítomnost dekarboxylázy pozitivních MO;
- vhodné podmínky pro růst a množení MO [3, 10, 11, 13, 14].

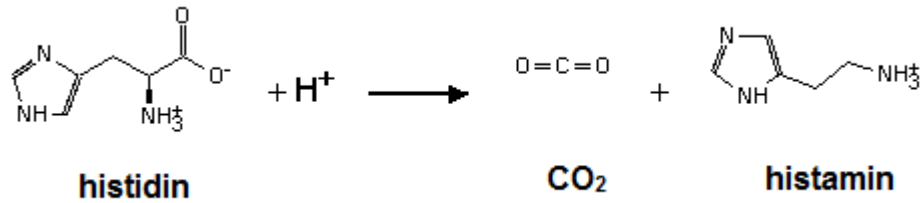
Většina BA v potravinách vzniká dekarboxylací volných aminokyselin působením enzymů bakteriálního původu. Dekarboxylace aminokyselin se dělí dle mechanismu účinku na reakce závislé na pyridoxalfosfátu jako koenzymu a reakce na něm nezávislé. Při účasti pyridoxal-5-fosfátu (Obr. 1.) karbonylová skupina snadno reaguje s aminokyselinami za vzniku Schiffovy báze jako meziprojektu. Ta je pak dekarboxylována na odpovídající BA [12, 14].



Obr. 1. Kofaktor pyridoxalfosfát-5-fosfát [15].

Při reakcích bez účasti pyridoxal-5-fosfátu plní jeho funkci pyruvoylový zbytek. Mechanismus dekarboxylace zůstává nezměněný. Přičemž je pyruvoylový zbytek vázaný na aminoskupinu fenylalaninového bočního řetězce enzymu [12, 14].

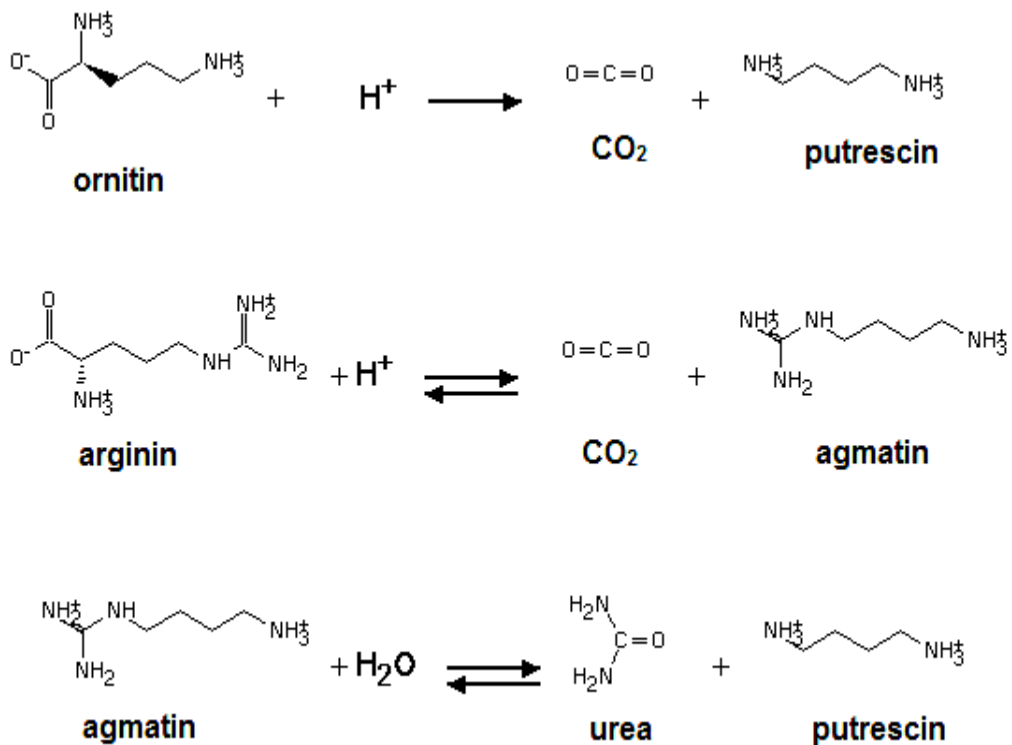
Z histidinu vzniká působením histidindekarboxylázy histamin, zlyzinu vzniká zase vlivem lyzindekarboxylázy kadaverin (Obr. 2.) [10].



Obr. 2. Dekarboxylace histidinu a lyzinu [15].

Putrescin je syntetizován dvěma cestami (Obr. 3.), a to:

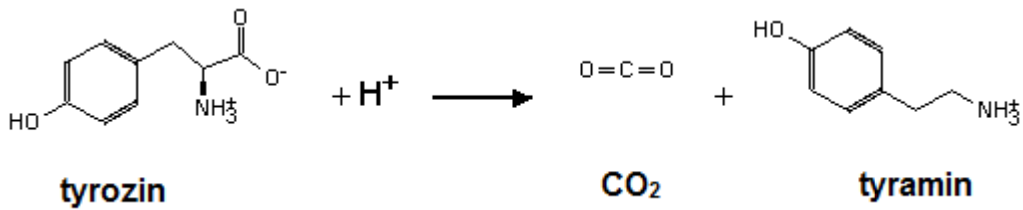
- dekarboxylací ornitinu ornitindekarboxylázou;
- dekarboxylací argininu arginindekarboxylázou na agmatin s následujícím přetvořením agmatinu na putrescin a močovinu agmatinureohydrolázou [16].



Obr. 3. Dekarboxylace putrescinu [15].

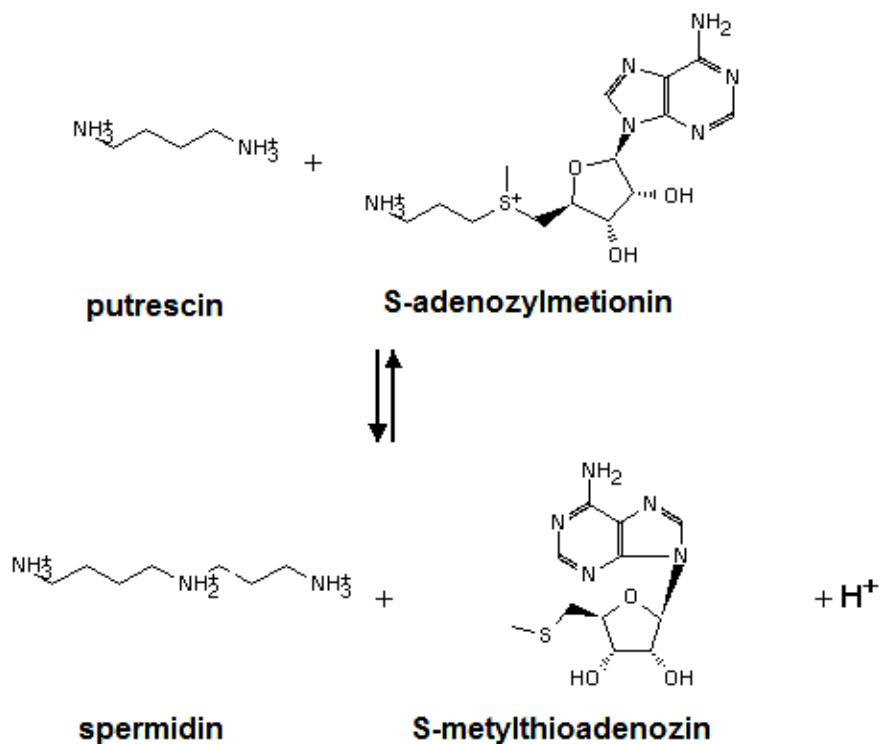


Z tyrozinu činností tyrozindekarboxylázy vzniká tyramin (Obr. 4) [10].



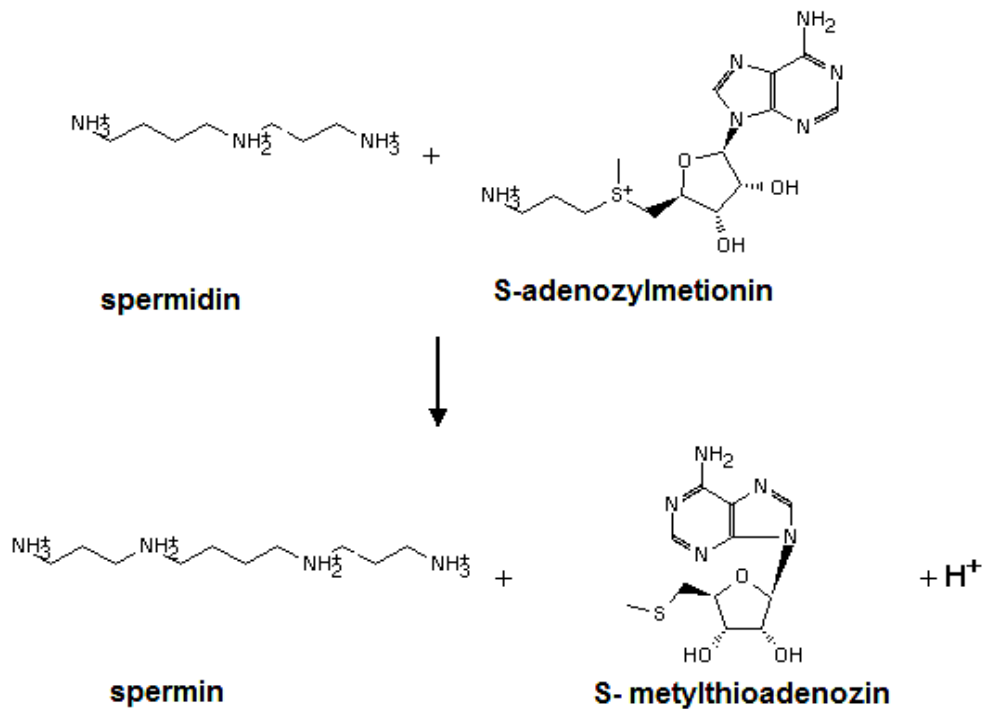
Obr. 4. Vznik tyraminu [15].

Biosyntéza spermidinu začíná přeměnou methioninu na S-adenozylmetionin (SAM) pomocí enzymu adenozyltransferázy (SAM syntetáza). Konečnou fází syntézy je převedení putrescinu spermidinsyntázou na spermidin (Obr. 5.) [16].



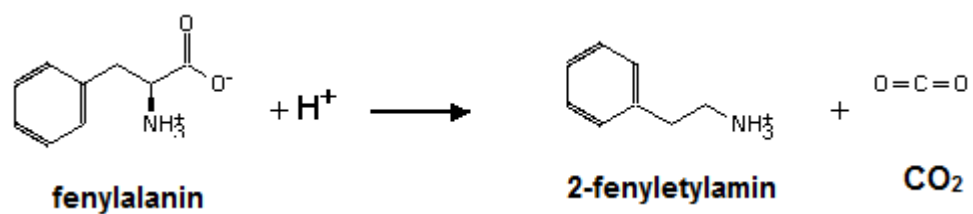
Obr. 5. Vznik spermidinu [15].

Spermin vzniká metylací spermidinu, které se účastní S-adenozylmetionin (Obr. 6).



Obr. 6. Vznik sperminu [15].

Dekarboxylací fenylalaninu fenylalanindekarboxylázou vzniká 2-fenyletylamin (Obr. 7) [10].



Obr. 7. Vznik 2-fenyletylaminu [15].

### 1.3 Faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů mikroorganismy

Schopnost tvořit BA byla popsána zejména u bakteriálních zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*, u některých druhů bakterií rodu *Pseudomonasa Clostridium* a výjimkou nejsou ani kmeny bakterií mléčného kvašení (BMK) [13]. Tvorba BA může být ovlivněna mnohými vnějšími faktory. Tyto faktory působí zejména na kinetiku dekarboxylačních reakcí. Mezi vnější faktory, které ovlivňují tvorbu BA bakteriemi, patří teplota a pH prostředí, aero-/anaerobióza, dostupnost zdrojů uhlíku (např. glukózy), přítomnost růstových faktorů, růstové fáze buněk, koncentrace NaCl, aktivita vody aj. [17].

#### 1.3.1 pH

Hodnota pH ovlivňuje růst a také dekarboxylázovou aktivitu MO. Optimální pH pro aktivitu dekarboxyláz se pohybuje okolo pH 4,5 - 5,0. V kyselém prostředí bakterie více vytvářejí dekarboxylační enzymy, jako součást obranného mechanismu proti překyselení buňky [4,18]. Obecně lze říci, že kyselé prostředí, které je optimální pro dekarboxylační enzymy, vyhovuje rovněž BMK, což může v konečném důsledku podpořit dekarboxylázovou aktivitu těchto bakterií [19]. Zatímco zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* a třeba i bakterie rodu *Staphylococcus* nízkému pH rozhodně nejsou nakloněni [18].

#### 1.3.2 NaCl

Rozdíl v poměru množství vody a soli během fermentace a skladování fermentovaných uzenin, hraje významnou roli na množení MO. Solení potravin inhibuje tvorbu BA. Se zvyšující koncentrací NaCl dochází k redukci produkce BA [12]. Avšak histamin a tyramin plní v bakteriích osmoprotektivní funkci, proto u některých kmenů dochází při zvyšování koncentrace solí v substrátu k aktivaci dekarboxylázy tyrozinu (příp. histidinu), a tím k zvyšování koncentrace příslušných BA [2, 18].

#### 1.3.3 Teplota

Teplota má rozhodující vliv na růst MO a tím na produkci BA [3]. Při vyšší teplotě probíhá proteolýza a dekarboxylace ve větší míře a přispívá ke zvýšení obsahu BA [18]. Optimální

teplota pro růst většiny MO vybavených dekarboxylázami je 20 až 37 °C. Nízké teploty jejich růst naopak zastavují [3, 12]. Při teplotě 15 °C mohou bakteriální dekarboxylázy zůstat aktivní, i když během skladování většina MO dosáhla stacionární fáze růstu nebo fáze odumírání [20]. Většina aminů je tepelně stálá a aktivita u některých dekarboxyláz je zachována i po tepelném ošetření (např. po pasteraci), proto se obsah BA může zvyšovat i během skladování [12, 21, 22].

#### **1.3.4 Sacharidy**

Přídavkem sacharidů je ovlivněna populační dynamika a produkce BA, protože mohou podpořit růst dekarboxylázovou aktivitu bakterií [18]. Optimální koncentrace glukózy pro růst MO vybavených dekarboxylázami je 0,5 až 2 % (w/v), naopak při koncentraci 3 % (w/v) inhibují syntézu dekarboxyláz [3, 12].

#### **1.3.5 Aditiva**

Na produkci BA má vliv přídavek glukono-delta-laktonu, který je běžně aplikován do rychle zrajících masných výrobků na začátku výroby kvůli snížení pH. Následkem toho dochází k vyšší dekarboxylázové aktivitě bakterií, kdy se zvyšuje produkce histaminu, tyraminu a putrescinu. Polyaminy putrescin, kadaverin, spermidin a spermin mohou přispívat ke vzniku karcinogenních nitrozaminů z dusitanů [12].

## 2 VÝSKYT BA A MIKROBIÁLNÍ PŮVODCI VPOTRAVINÁCH

BA se vyskytují prakticky ve všech potravinách jako běžné produkty metabolismu. Jak již bylo zmíněno v předešlých kapitolách, ve vyšším množství se BA nachází ve fermentovaných výrobcích (např. sýry, trvanlivé salámy, pivo, víno, kysané zelí aj.), kde vznikají mikrobiální činností, nebo se vyskytují u potravin v pokročilém stupni kažení [10]. Obsah některých BA se v průběhu kažení potravin zvyšuje (histamin, putrescin, kadaverin), u jiných klesá (spermin, spermidin) [2]. Stanovení obsahu BA může být tedy využito k posouzení míry rozkladu sledovaného materiálu. V případě skladování potravin může být přítomnost BA ukazatelem jakosti vstupní suroviny a úrovně hygieny během výrobního procesu a skladování [13].

Obsah BA v potravinách ovlivňuje: kvalita surovin, délka a podmínky skladování, hygiena provozu, zvolená technologie a přirozeně přítomná (non-startérová), startérová a kontaminující mikroflóra [10, 18].

### 2.1 Potraviny živočišného původu

V mase, rybách a sýrech bývají hlavními BA histidin, kadaverin, putrescin a tyramin. Při skladování masa dochází vlivem enzymové aktivity přítomné mikroflóry k růstu obsahu BA, a obsah některých z nich lze proto využít jako indikátor čerstvosti masa [10].

#### 2.1.1 Mléko a mléčné výroby

V mléce samotném se nacházejí pouze nízké koncentrace polyaminů – sperminu, spermidinu a putrescinu. Spermidin a spermin nejsou tvořeny mikrobiální činností sýrů, z tohoto důvodu je množství těchto BA v konečném výrobku zanedbatelné [2, 27].

Působením proteáz a peptidáz přítomných v sýru dochází k proteolýze kaseinu a tvorbě volných aminokyselin a následně BA. Každý typ sýra má charakteristický profil aminokyselin a tudíž i BA. Ten vyplývá ze specifické degradace a syntézy. Častější příčinou výskytu BA v sýrech je sekundární kontaminace MO z přidávané startovací kultury. Sýry se srovnatelným mikrobiologickým profilem se mohou významně lišit v obsahu BA. Dokon-

ce i různé kmeny jednoho druhu se mohou lišit v koncentraci BA až o několik řádů. Je proto obtížné najít přesné korelace mezi obsahy BA a počty MO [24].

Po rybách jsou sýry další nejčastěji spojovanou potravinou s otravou histaminem, navíc mohou obsahovat i značná množství tyraminu [23]. Právě vysoká množství tyraminu v sýrech jsou příčinou otravy známé jako "cheese reaction" [7]. Nejedná se však o sýry obecně, ale především o sýry tvrdé nebo polotvrdé, které dlouhodobě zrají [23].

Sýry obvykle obsahují jednotky až stovky miligramů histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu na kilogram sýrové hmoty, jednotky až desítky miligramů fenyletylaminu na kilogram a stopová množství tryptaminu. Obsahy BA však mohou výjimečně dosáhnout až gramových koncentrací. Tato skutečnost opět závisí na spoustě faktorů např. na ošetření výchozí suroviny, na teplotě sýřeniny, použití startovacích a plísňových kultur. Výrazně vyšší množství BA bylo zjištěno u sýrů z nepasterovaného mléka, důvodem je právě aktivita proteáz a bohatší mikroflóra [24].

### 2.1.2 Maso a masné výrobky

V čerstvém masu jsou hladiny BA (tyraminu, kadaverinu, putrescinu a histaminu) téměř zanedbatelné. Obsah BA vzrůstá při dlouhodobějším skladování a při fermentaci v rámci technologického postupu výroby trvanlivých masných výrobků [20].

Velíšek (2002) uvádí, že startovací kultura s vysokou dekarboxylázovou aktivitou u fermentovaných salámů je schopna během 21 dnů vyprodukovat v kultivačním prostředí potraviny vyšší množství tyraminu a kadaverinu. Zanedbatelná je produkce putrescinu, histaminu a fenyletylaminu. Oproti tomu startovací kultura s nízkou dekarboxylázovou aktivitou během stejné doby proukovala pouze nízká množství putrescinu, histaminu, fenyletylaminu, kadaverinu a tyraminu [10].

### 2.1.3 Potraviny rostlinného původu

BA se jako přirozená součást vyskytují i v potravinách rostlinného původu [10]. V ovoci a zelenině jsou zastoupeny v různých koncentracích a jejich obsah se zvyšuje se stupněm zralosti [13]. Nejčastěji se vyskytujícími BA v ovoci a zelenině jsou tryptamin, tyramin, noradrenalin [4, 13] a řada dalších se zde vyskytuje v menším množství [10]. Často se vyskytují jako

konjugáty se skořicovými kyselinami nebo s mastnými kyselinami. Dále se v rostlinách nachází i deriváty BA [10].

BA lze nalézt v relativně velkém množství v některých fermentovaných potravinách rostlinného původu jako je např. zelí nebo sójová omáčka, kde vznikly v důsledku mikrobiální aktivity [25]. Ve strouhaném zelí, obvykle připraveném spontánním mléčným kvašením, se tyramin, putrescin a histamin vyskytují v koncentracích dosahujících stovky  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  [26].

Ovoce je mimořádně bohaté na putrescin, zatímco zelenina je bohatá na spermidin. V rostlinách se vyskytuje spermin v nižším množství než spermidin, na rozdíl od potravin živočišného původu. Během skladování se zvyšuje obsah BA u špenátu, především histaminu [27]. Zvýšené obsahy tyraminu byly zjištěny v rajčatech, švestkách a banánech. V banánech dále fenyletylamin, histamin, dopamin, serotonin a norepinefrin. V klíčícím ječmeni se nachází derivát tyraminu hordenin. U jedlých hub vznikají během skladování za méně příznivých podmínek putrescin a kadaverin. Džusy, nektary a limonády vyrobené z pomerančů, malin, citronů, grapefruitů, mandarinek, jahod, rybízu a hroznů obsahují různé BA v různých koncentracích, z nichž nejvýznamnějším je putrescin [2, 10].

#### 2.1.4 Fermentované alkoholické nápoje

Alkoholické nápoje, jako jsou pivo a víno, reprezentují další kategorii fermentovaných výrobků, které mohou představovat riziko intoxikace BA [28]. Jsou vyráběny mikrobiální fermentací sacharidů, kdy kromě jiných metabolitů vznikají i BA [2].

Ve vínech se celková koncentrace BA pohybuje od několika miligramů po  $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Histamin je obvykle přítomný v koncentraci okolo  $4,15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a aromatické aminy fenyletylamin a tyramin v množství  $1,7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , resp.  $7,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Prevence nutná k omezení výskytu BA spočívá ve sběru zralých bobulí bez potřeby docukřování moštů, optimálních podmínek v průběhu fermentace, dokonalém odkalování (pomocí odstředivek) a včasném stáčení mladých vín přes křemelinový filtr. Obsah existujících BA ve vínech je možné snížit vhodnými postupy čiření a stabilizací vín. Nejúčinnější při čiření je svou vazebnou schopností bentonit, který však nemá příliš velký vliv na produkci histaminu [12].

V pivovarnictví jsou druhy aminů závislé na surovinách, na metodách vaření piva a možné mikrobiální kontaminaci, k níž mohlo dojít v průběhu procesu vaření piva nebo při skladování. Slad je zdrojem agmatinu, putrescinu, spermidinu a sperminu, zatímco tyramin, his-

tamin kadaverin jsou vytvořené během hlavního kvašení kontaminujícími bakteriemi mléčného kvašení [29]. U spontánně fermentovaného piva množství vazoaktivních aminů dosahuje vysokých hodnot, a to u tyraminu nad 20 mg.l<sup>-1</sup> u histaminu kolem 10 mg.l<sup>-1</sup>. Bakteriální původ těchto aminů se odráží na mikrobiologické jakosti a na špatných hygienických podmínkách fermentačního procesu [28].

## 2.2 Mikroorganismy způsobující zvýšený obsah BA ve fermentovaných potravinách

Původci zvýšeného obsahu BA mohou být MO přirozeně přítomnými, záměrně přidávanými nebo pocházející z kontaminující mikroflóry [30]. Mezi kontaminanty patří především zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* rody *Citrobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* [2, 8, 12, 21, 31] a čeledi *Micrococcaceae* (rody *Micrococcus* a *Kocuria*) [32, 18]. Do skupiny kontaminantů můžeme řadit i některé další rody např. *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Photobacterium*, *Clostridium*.

Na produkci BA se mohou podílet také prospěšné, v potravinářství hojně využívané BMK rodu *Lactobacillus* (dále jen *L.*), *Enterococcus* (dále jen *E.*), *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* a *Leuconostoc* [18, 33, 34]. Do této skupiny patří nejen zástupci startovacích kultur používaných při výrobě fermentovaných potravin, ale i probiotické kultury [30, 35].

Objem produkce BA jednotlivými druhy bakterií nelze předpokládat. Dekarboxylázová aktivita je spíše kmenovou charakteristikou. Přítomnost dekarboxyláz je různá, různá je tedy i produkce BA u kmenů jednoho druhu. Koncentrace BA vyprodukované kmeny jednoho druhu se mohou lišit dokonce až o 3 řády [12, 21]. Příklady dekarboxyláza pozitivních bakterií ve specifických skupinách potravin jsou uvedeny v Tab. 2.

Výskyt indikátorových MO z čeledi *Enterobacteriaceae* naznačují špatnou hygienu provozu resp. nevhodnou sanitaci a nedodržení pracovních postupů [36].



Tab. 2. Příklady bakterií produkujících BA v potravinách [10, 12].

Potraviny	Bakterie	Biogenní aminy
maso a masné výrobky	<i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>	histamin, kadaverin, pustrescin, tyramin, 2-fenyletylamin, tryptamin
ryby	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vul-</i> <i>garis</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Enterobacter</i> <i>aerogenes</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Staphylococcus</i>	histamin, kadaverin, pustrescin, tyramin, agmatin, spermidin, spermin
sýry	<i>L. buchneri</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Streptococcus. mitis</i> , <i>Bacillus macerans</i> , <i>Propionibacterium</i> spp.	histamin, kadaverin, pustrescin, tyramin, 2-fenyletylamin, tryptamin
fermentovaná zelenina	<i>L. plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus</i> spp.	histamin, kadaverin, pustrescin, tyramin, tryptamin
fermentované produkty ze sóji	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Trichosporon beigllii</i> , <i>L. plantarum</i>	histamin, kadaverin, pustrescin, tyramin, tryptamin

### 2.2.1 Bakterie mléčného kvašení a starterové kultury

BMK jsou obecně považovány za zdraví prospěšné [18]. Podílí se na výrobě fermentovaných mléčných a masných výrobků, kde zastoupení jejich mikroflóry hraje významnou roli v technologickém procesu fermentace [37]. Jak již bylo zmíněno výše, i mezi BMK najdeme zástupce dekarboxyláza pozitivní mikroflóry [18].

V sýrech je tvorba BA závislá na koncentraci aminokyselin nebo peptidů a přítomnosti bakterií schopných dekarboxylace. K tvorbě BA v sýrech také přispívají startovací kultury ke zvýšení stupně proteolýzy [12]. V mlékárenském průmyslu jsou často aplikovány jako startovací kultury bakterie *Lactococcus lactis* a *L. helveticus*, které mají schopnost produ-

kovat histamin. Dekarboxilázová aktivita byla prokázána také u *E. faecium*, *Streptococcus mitis*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus* a čeledi *Propionibacteriaceae* [14].

V mase a masných výrobcích se využívají BMK *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. curvatus*, *L. carnis*, *L. divergens* a *L. hilgardii*, u kterých byla prokázána dekarboxylázová aktivita. Za vysokou úroveň BA je však spíše zodpovědná kontaminující mikroflóra, než samotné startovací kultury [14]. V suchých salámech se často používají kombinace startovacích kultur *L. sake*, *Staphylococcus carnosus* nebo *Staphylococcus xylosum*. Vzhledem k nízké produkci tyraminu, mohou být použity bez jakéhokoli rizika pro lidské zdraví. Na druhé straně je třeba věnovat více pozornosti některým kmenům *L. curvatus* a *L. plantarum* z důvodu produkce tyraminu, které jsou rovněž používány při výrobě fermentovaných masných výrobků. Např. *L. curvatus* a *Staphylococcus carnosus*, používané jako startovací kultury, jsou prokazatelně schopné produkovat tyramin, kadaverin, putrescin a fenyletylamin. Z tohoto důvodu je třeba používat kultury, které netvoří BA [12].

Množství tyraminu ve zrajícím sýru může díky přítomnosti proteolytických enzymů a tyramindekarboxyláza pozitivních kmenů *E. faecalis* dosáhnout hodnot až  $500 \text{ mg.kg}^{-1}$  [38, 12].

Mezi MO, které naopak disponují aminosidázovou aktivitou, patří např. *Brevibacterium linens*. Zmíněná bakterie během zrání snižuje množství tyraminu a histaminu v sýrech [39].

Při fermentaci zelí dochází k mléčnému kvašení prostřednictvím aktivní mikroflóry bakterií *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus* spp. a *Pediococcus* spp. Tyto bakterie jsou schopné produkovat putrescin, tyramin a histamin. Avšak řízenou fermentací kmenem *L. plantarum* je možné potlačit růst této mikroflóry (*Leuconostoc mesenteroides* a *Pediococcus* spp.) [12].

Některé BMK produkují bakteriociny a působí proti hnilobné kontaminující mikroflóře, čímž omezují tvorbu BA [12, 40]. Použitím některých bakteriocinů při výrobě sýrů lze zabránit vzniku BA. Kmeny citlivé na nizin byly též citlivé na enterokokové bakteriociny. Dva kmeny *E. faecalis* produkující enterocin EFS 2 a enterocin INIA 4-07 a jeden laktokokový kmen produkující nizin (*Lactococcus lactis*) inhibovaly růst *L. buchneri* a *L. brevis*, které produkují BA v sýrech [41].

### 3 Vliv biogenních aminů na zdravotní stav člověka

#### 3.1 Klinické aspekty

BA jsou v živých organizmech zodpovědné za mnoho fyziologických a farmakologických funkcí [31, 42]. Přirozeně se zde vyskytují v nízké koncentraci [1]. Jejich účinek můžeme rozdělit na psychoaktivní - hrají důležitou roli jako neurotransmitery v centrálním nervovém systému a vazoaktivní - působí na cévní systém [14].

Vysoké koncentrace BA mohou být toxické pro lidský organismus. Vyšší hodnoty BA ovlivňují neurotransmitery, způsobují změny vnímání, ovlivňují hladké svalové kontrakce a zapříčiňují bolest hlavy [1, 2, 31, 42].

U zdravých jedinců je přirozeně se v organismu vyskytující detoxikační systém schopen degradovat i vyšší koncentrace BA [43]. Schopnost detoxikačního systému může být negativně ovlivněn řadou faktorů, jako jsou např.: vysoký příjem BA z potravin, věk jedince (děti, senioři), zdravotní stav (alergické osoby, nemocí oslabení jedinci) a užívání léků (zejména antidepresiv, které fungují jako inhibitory monoaminoxidáz) [6]. Nebezpečí spočívá také při konzumaci alkoholu, kdy dochází k interferenci alkoholu s detoxikačním systémem příslušných aminooxidáz. V důsledku toho dochází ke snížení účinnosti detoxikačního systému [30].

Přehled BA vyskytujících se v potravinách, jejich biologická aktivita a hlavní produkty jejich transformace je uveden v (Tab. 3.) [10].

Tab. 3. BA, produkty transformace a biologický význam [10].

BA	Další produkty AMK a transformace aminu	Biologický význam
Histamin		lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak a sekreci žaludeční šťávy, účast při anafylaktických a alergických reakcích
Kadaverin		stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny), subcelulárních struktur (ribozomy), diferenciace buněk, rostlinný hormon
Putrescin	N – methylputrescin spermidin spermin	stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny), subcelulárních struktur (ribozomy), diferenciace buněk, rostlinný hormon
Agmatin	putrescin N – methylputrescin spermidin spermin	stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny) a subcelulárních struktur (ribozomy), diferenciace buněk, rostlinný hormon
Fenyletylamin	tyramin, dopamin, adrenalin a noradrenalin	prekurzor tyraminu
Tyramin	dopamin, adrenalin, noradrenalin, hordenin a synefrin	prekurzor dopaminu, lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak a kontrakce hladkého svalstva
Dopamin	adrenalin noradrenalin	mediátory sympatických nervů
Tryptamin	serotonin melatonin	lokální tkáňové a rostlinné hormony (katecholaminy), vliv na krevní tlak, peristaltiku střev, psychické funkce

### 3.2 Toxikologický význam biogenních aminů

K toxikologicky nejvýznamnějším BA patří tyramin, histamin, kadaverin a putrescin. Nejvíce prostudovaný je tyramin a histamin [2, 31].

Příznaky otravy histaminem jsou většinou slabé. Jejich reakční doba je krátká (asi 30 – 60 minut) [21]. Otrava histaminem (scombroid poisoning) se vyskytuje po požití potravin s vyšším obsahem BA, zejména histaminu. Projevuje se jako typ alergické reakce charakterizované obtížemi při dýchání, svěděním, vyrážkou, zvracením, horečkou a hypertenzí [44]. Může být i příčinou rozšíření periferních krevních cév, což vede ke snížení krevního tlaku a bolestem hlavy [6, 11, 31]. Tyto příznaky se vyskytují zvláště u pacientů trpících intolerancí na histamin. Zmíněné onemocnění je charakterizováno poruchou degradace histaminu na základě snížení aktivity monoaminoxidázy (konkurenční inhibice alkoholu a mnoha léků) nebo nedostatkem tohoto enzymu [11]. Negativní účinek histaminu může být podporován i přítomností putrescinu a kadaverinu, které inhibují detoxifikační enzymy histaminu [2].

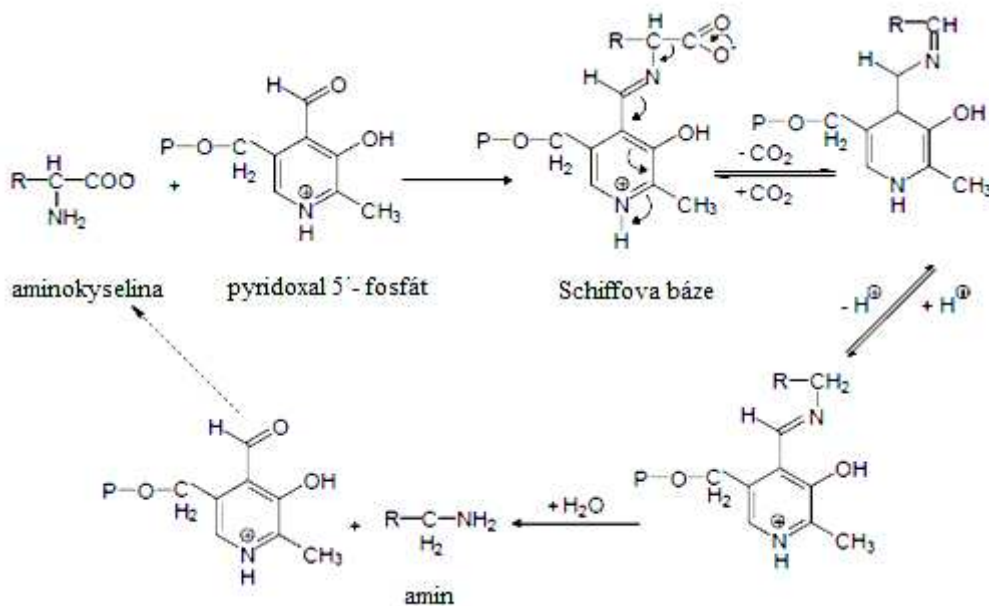
Ze skupiny vazoaktivních aminů zvyšujících krevní tlak (hypertenzi) je neúčinnější tyramin [21]. Vysoká koncentrace tyraminu může způsobit otravu známou jako reakce na sýr (cheese reaction), která má podobné příznaky jako otrava histaminem [44]. Dále může, především při podávání léků inhibujících monoaminoxidázy, vyvolávat hypertenzi, migrény, může být příčinou krvácení do mozku nebo selhání srdce [21].

Dalšími zástupci ze skupiny vazoaktivních aminů jsou tryptamin a fenyletylamin. Jejich účinky jsou slabší než u tyraminu [12]. Sekundární aminy agmatin, spermin, spermidin mohou tvořit reakcí s dusitany nitrosaminy karcinogenní sloučeniny [2]. Potenciálně karcinogenní jsou putrescin a kadaverin. Jejich záhřevem může vzniknout z putrescinu pyrolidin a z kadaverinu piperidin [21], dalším působením tepla vznikají N - nitrosopyrolidin a N - nitrosopiperidin [12]. Polyaminy jsou důležité pro růst, obnovu a metabolismus orgánů v těle [12, 45]. Mají vliv na růst a množení buněk, což se může příznivě projevit při hojení ran. Zároveň ale mohou být zcela nežádoucí, kdy se uplatňují při onkologických onemocněních, při růstu nádorů [6]. Putrescin, kadaverin, spermidin mohou zneškodňovat volné radikály, navíc jsou schopné inhibovat oxidaci polyenových mastných kyselin [2, 12].

### 3.2.1 Detoxikační systém

Ve střevním traktu savců působí detoxikační systém, který metabolizuje BA přijaté z potravin [21]. Enzymatická degradace aminů probíhá pomocí monoaminoxidáz (MAO), diaminoxidáz (DAO) a histidin-N-methyltransferáz (HNMT) [46].

Histamin je metabolizován v lidském organismu dvěma cestami a to oxidativní deaminací působením DAO nebo metylací pomocí HNMT (Obr. 8). Katabolismus tyraminu, fenyletylaminu a tryptaminu je zprostředkován především MAO. Existují dvě formy MAO - MAO-A a MAO-B s různou lokalizací a substrátovou specifitou. MAO-A převládá v žaludku, střevech a placentě. Upřednostňovanými substráty jsou polární aromatické aminy (noradrenalin a oktopamin). MAO-B převažuje v mozku a vzniká selektivní deaminací nepolárních aromatických aminů (fenyletylamin a dopamin). Tyramin je substrátem pro jakoukoliv formu MAO. MAO-A je zodpovědný za intestinální metabolismus tyraminu, a tím brání jeho systémové absorpci. Tyramin a fenyletylamin jsou také podrobeny metylaci N-methyltransferáz, kdy vytváří noradrenalin [46].



Obr. 8. Metabolismus histaminu v lidském těle [12].

Polyaminy putrescin, kadaverin, spermidin, spermin jsou inhibitory MAO a DAO. Fenyletylamin je inhibitor DAO a HNMT. Tyramin inhibuje MAO. Tryptamin inhibuje DAO [2, 14].

### 3.3 Hygienické limity BA

Toxické dávky BA a jejich limitní hodnoty v potravinách je obtížné stanovit. Důvodem je značné kolísání množství BA v rámci určitých skupin výrobků. Navíc, jak již bylo řečeno, detoxifikační schopnost jednotlivců je značně individuální, což je důvodem nelehkého stanovení přijatelné koncentrace jednotlivých BA [31].

V současné době nejsou stanoveny maximální výše BA v mléčných a masných výrobcích. Silná intoxikace histaminem probíhá při hodnotách nad  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  potravin. U citlivých jedinců je tato koncentrace mnohonásobně nižší ( $5\text{-}10 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) [1, 12, 21].

Jako přijatelný obsah tyraminu se uvádí široké rozpětí  $100\text{ - }800 \text{ mg.kg}^{-1}$ . V ČR je považováno za přípustné množství u sýrů  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$ , pro červené víno  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  a u ostatních potravin  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  [21]. Příjem vyšší než  $100 \text{ mg}$  může vyvolat zdravotní komplikace [12].

Navrhované tolerovatelné sumární množství BA histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu by nemělo překročit hodnotu  $900 \text{ mg.kg}^{-1}$  [22].

### 3.4 Legislativní limity

V současnosti jsou legislativní limity stanoveny pouze pro histamin u produktů rybolovu a výrobků z ryb. Tuto problematiku řeší Nařízení komise Evropských společenství č. 2073/2005 O mikrobiologických kritériích pro potraviny. Zmíněné nařízení udává limit pro histamin ve výši  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ . U dvou z devíti vzorků může být překročen limit na  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Legislativa neurčuje výrobcům deklarovat obsah BA na obale [47].

## 4 POTENCIÁLNÍ DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA PROBIOTICKÝCH MIKROORGANIZMŮ

### 4.1 Definice a vlastnosti probiotik

Organizace pro výživu a zemědělství a Světová zdravotnická organizace definují probiotika jako živé MO, které při podávání v dostatečném množství ovlivňují příznivě zdravotní stav konzumenta [48]. Substrát, který stimuluje růst probiotik, zejména nestravitelné látky sacharidové povahy (např. fruktooligosacharidy a další typy vlákniny), se nazývají prebiotika. Kombinace probiotika s prebiotikem se nazývá symbiotikum. Dnes existuje také celá řada přípravků s probiotiky nebo symbioticky s dieteticko-léčebnými účinky [49].

Probiotické bakterie jsou vybírány na základě řady kritérií zaručující jejich bezpečné užívání a prokazatelné probiotické účinky v potravinách. Z tohoto důvodu je doporučen následující postup výběru:

- Identifikace a charakteristika fenotypovými a molekulárně genetickými metodami na úroveň rodu druhu a kmene. Kmen je následně uložen v mezinárodní sbírce MO.
- Funkční charakteristika (*in vitro* testy nebo testy na zvířatech), testace rezistence na kyseliny a žluč, adherence na střevní buňky, produkce specifických metabolitů.
- Bezpečnost kultury vyloučením patogenity a to především vznikem enterotoxinů a enteroinvazivita.
- Technologická charakteristika vhodnost pro danou technologii, stabilita při skladování [50, 51].

Jak vyplývá z výše uvedených požadavků, musí probiotické MO přežít průchod trávicím traktem a zároveň mít schopnost osídlit střeva a množit se zde [48]. Vhodná koncentrace živých buněk je ve fermentovaných mléčných probiotických výrobcích účinná od koncentrace  $10^6$  životaschopných buněk v 1g či 1 ml [50, 52].

Důležitou vlastností probiotik je produkce antimikrobiálních látek, jejich adheze ke střevní mukóze a antagonistické působení proti patogenním MO. Exogenními nebo endogenními faktory může být střevní mikroflóra u zdravých jedinců narušena, avšak po konzumaci probiotik (např. v podobě kysaných mléčných výrobků), je obnovena fyziologická rovno-



váha. Probiotika jsou schopná zmírňovat obtíže spojené se změnou střevní mikroflóry způsobené např. léčbou antibiotiky, infekcích gastrointestinálního traktu atd. [52].

- Fyziologické a terapeutické vlastnosti probiotik jsou:
- kompetice s patogenními mikroby v adhezi na střevní epitelie a zesílení imunitních odpovědí na patogeny,
- tvorba peptidů s bakteriostatickými a baktericidními účinky (mikrociny, koliciny),
- regulace funkcí střevní bariéry a mikrobiální translokace,
- modulace funkcí střevních epitelí a vyzrávání slizničního imunitního systému,
- inhibice přerůstání patogenů,
- stimulace eliminace toxinů,
- tvorba steroidů z cholesterolu,
- ovlivnění střevních funkcí (vstřebávání, motility, splachnické cirkulace, tvorby a sekrece hlenu) [53].

Zároveň však i zástupci probiotických kultur disponují dekarboxylázovou aktivitou a mohou patřit mezi potencionální producenty BA. Z tohoto důvodu je třeba prověřit schopnosti jejich tvorby [31].

## 4.2 Probiotické bakteriální kultury

Mezi rody, nejčastěji využívané jako probiotika se řadí především *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* [48, 50, 52, 54]. Produkují řadu bakteriocinů např. laktociny, helveticiny, laktaciny, nizin či bifidociny [55]. *L. acidophilus* a bifidobakterie také podporují tvorbu makrofágů a jiných nespecifických buněčných faktorů. Stimulují imunitu zvýšením protilátek [52]. Jako součást probiotik určených pro člověka a zvířata jsou často využívány enterokoky, především jako prevence např. střevních onemocnění při dlouhodobém užívání antibiotik. Dále se využívají grampozitivní koky *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* [50, 54, 56], *Leuconostoc* a *Oenococcus* [54].

#### 4.2.1 Rod *Lactobacillus*

Tato skupina bakterií patří do čeledi *Lactobacillaceae* a zaujímá více než 100 druhů laktobacilů. Jako probiotika jsou využívány druhy *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* a *L. salivarius* [56, 57].

Laktobacily jsou grampozitivní, mikroaerofilní, nepohyblivé, nesporující tyčinky nebo kokotyčinky, které jsou kataláza i oxidáza negativní [56, 58]. Vyskytující se v respiračním systému, gastrointestinálním traktu, rostlinném materiálu i odpadních vodách. Jsou rovněž součástí fermentovaných mléčných a masných výrobků, zeleniny, ovoce a nápojů [56].

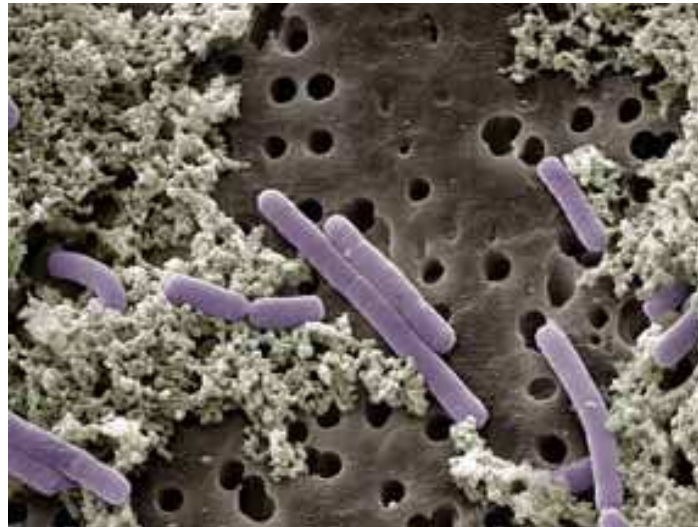
Většina druhů zkvašuje laktózu a podle produktů katabolického metabolismu rozdělujeme rod *Lactobacillus* na:

- homofermentativní, které produkují prakticky výhradně kyselinu mléčnou;
- heterofermentativní, které produkují kromě kyseliny mléčné značné množství etanolu a CO<sub>2</sub> [59].

Produkce kyseliny mléčné zastavuje rozmnožování hnilobných bakterií a stafylokoků. Tato vlastnost mléčných bakterií se využívá ke konzervaci zeleniny i některých krmiv [59].

Při výrobě sýrů se používají homofermentativní laktobacily např. *L. casei*, *L. delbrueckii* ssp. *lactis* a *L. helveticus* [59]. Při výrobě podmáslí, jogurtových nápojů a mléčných nápojů se používají probiotické bakterie *L. acidophilus*, *L. casei* (Obr. 9.), *L. rhamnosus*, *L. johnsonii*, *L. reuteri* a *L. plantarum* [57]. *L. plantarum* se uplatňuje při konzervaci zelí a společně s heterofermentativními druhy *L. brevis* a *L. fermentum* se vyskytuje v pekařském kvásku. Ve vinařství nebo pivovarnictví mohou být některé heterofermentativní laktobacily kontaminující mikroflórou [59].

Laktobacily, obecně používané při výrobě funkčních potravin, mají v lidském organismu řadu prospěšných funkcí. Osídlují mikroflóru zažívacího traktu, čímž potlačují růst patogenních bakterií. Pomáhají také při chronických průjmech. Svou úlohu plní i při alergiích a dermatitidách, čímž potlačují tyto zdravotní obtíže [53].

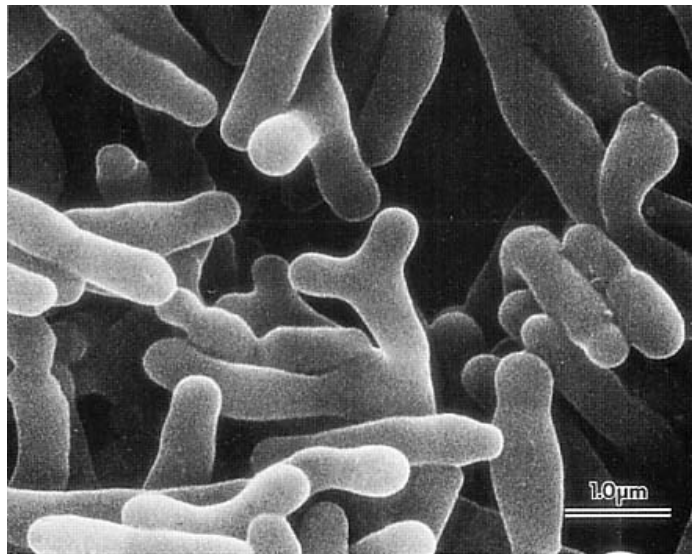


Obr. 9. *Lactobacillus casei* [60].

#### 4.2.2 Rod *Bifidobacterium*

Rod *Bifidobacterium* (dále jen *B.*, Obr. 10.) patří do čeledi *Actinomycetaceae*, z nichž se jako probiotika využívají především rody *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. animalis* ssp. *lactis*, *B. adolescentis*, *B. animalis* ssp. *animalis* [61]. Bifidobakterie jsou grampozitivní, striktně anaerobní, nesporeující, nepohyblivé tyčky. Buňky bifidobakterií jsou velmi pleomorfní, takže se nemusí jednat vždy o typické pravidelné tyčinky. Můžeme se setkat s kokovitými tvary přes kyjovité až k dlouhým větveným tyčinkám [59]. Produkty jejich fermentace jsou kyselina mléčná a kyselina octová v poměru 2:3 [62].

Vyskytují se v trávicím traktu kojenců, dospělých lidí i zvířat, v dutině ústní, v odpadních vodách [59]. Jsou přirozenou vaginální mikroflórou [62]. Široké uplatnění bifidobakterie zaujímají při výrobě funkčních potravin [59].



Obr. 10. *Bifidobacterium* sp.[60].

#### 4.2.3 Rod *Enterococcus*

Enterokoky náleží do čeledi *Enterococcaceae*. Jsou to grampozitivní, kataláza negativní koky, které jsou uspořádané v řetízcích. *Enterococcus* je řazen mezi homofermentativní BMK a tudíž téměř jako jediný produkt metabolismu cukrů tvoří kyselinu mléčnou [59]. Enterokoky se používají jako indikátory bezpečnosti potravin a mohou být původci alimentárního onemocnění [62, 63].

Bakterie rodu *Enterococcus* (Obr. 11.) jsou často izolovány z fermentovaných potravin, ať už jsou to masné nebo mléčné výrobky. V sýrech se mohou vyskytovat buď jako přirozeně se vyskytující non-staréry (především u kozích a ovčích sýrů), nebo jako startovací kultura, která hraje důležitou roli při zrání sýrů. Mají vliv především na konečné sensorické vlastnosti [11].

Ačkoli jsou enterokoky široce využívány při výrobě fermentovaných potravin, jejich role je velmi sporná. Především některé vlastnosti jako je např. schopnost produkovat virulentní faktory, odolnost vůči mnoha antibiotikům a také produkce BA jsou předmětem dohadů v rámci určení jejich bezpečnosti aplikace při výrobě potravin [11].



Obr. 11. *Enterococcus faecium* [60].

### 4.3 Dekarboxylázová aktivita probiotických mikroorganismů

#### 4.3.1 Dekarboxylázová aktivita bakterií rodu *Lactobacillus*

Potravinu fermentované laktobacily jsou obecně považovány za netoxické a nepatogenní. Některé druhy laktobacilů, však mohou produkovat BA. Z tohoto důvodu dekarboxylázová aktivita laktobacilů izolovaných z fermentovaných salámů byla široce studována. Druhy *L. buchneri*, *L. alimentarius*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. farciminis*, *L. sakei*, *L. homohiochii* a *L. reuteri* byly pozitivní na produkci BA. Přičemž nejhojněji produkováný BA byl tyramin [18, 64, 65, 66].

Mnozí autoři nepozorovali činnost histidindekarboxylázy v laktobacilech izolovaných z uzenin [2, 18, 65]. Naopak přítomnost tohoto enzymu byla potvrzena u uzenin z *Lactobacillus* spp. [67].

Priyadarshani a Rakshit (2011) testovali 15 probiotických kmenů *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* a *L. plantarum*. V kultivačním prostředí vykazoval vysokou produkci histaminu ( $1820,9 \text{ mg.l}^{-1}$ ) i tyraminu ( $5486,99 \text{ mg.l}^{-1}$ ) kmen *L. casei* a přítomnost histidindekarboxylázy byla prokázána u kmene *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* TISTR 895 s produkcí  $459,1 \text{ mg.l}^{-1}$  histaminu [35]. Také Buňková et al. (2009)

detekovala produkci BA u kmenů BMK získaných z kultur Sbírký mléčných MO. V rámci 11 testovaných kmenů *L. delbrueckii* ssp.*bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus* a *L. acidophilus*, byla produkce tyraminu zjištěna pouze u jednoho kmene *L. delbrueckii* ssp.*bulgaricus* [68].

Několik autorů uvádí, že tyrozindekarboxylázovou aktivitu mají druhy *L. plantarum* a proto jsou producenty tyraminu [33, 40, 69]. Bover-Cid a Holzapfel (1999) zaznamenali u 1 z 16 testovaných *L. plantarum* produkci tyraminu. Zároveň poukazují na potenciální produkci tyraminu u *L. casei* [33]. Naproti tomu Landete et al. (2005) u třech zkoušených kmenů *L. casei* produkci tyraminu nepotvrdil [70]. *L. casei* totiž nepatří k běžným producentům BA [71]. Pircher et al. (2007) uvádí, laktobacily jako malé producenty kadaverinu v množství nižším než 100 mg.l<sup>-1</sup> [72].

Lorencová et al. (2012) zjistila, že mnohé kultury BMK získané z České sbírky mlékárenských mikroorganismů Laktoflóra byly producenty BA. Z 36 testovaných kmenů laktobacilů bylo deset zdrojem tyraminu. Vyšší produkce tyraminu byla zjištěna u *L. curvatus* a *L. casei* / *paracasei* v desítkách až stovkách mg.l<sup>-1</sup>. U ostatních kmenů *L. acidophilus* *L. animalis*, *L. plantarum* a *L. rhamnosus* byla produkce nižší než 10 mg.l<sup>-1</sup> tyraminu. Rovněž byly zjištěny nižší koncentrace kadaverinu pod 10 mg.l<sup>-1</sup> u 17 kmenů laktobacilů [30].

#### 4.3.2 Dekarboxylázová aktivita bakterií rodu *Enterococcus*

Pokud jde o enterokoky, mnoho kmenů bylo schopno produkovat tyramin [73]. Bover-Cid et al. (2001) prokázali u všech 25 testovaných kmenů *E. faecalis* i *E. faecium* produkci tyraminu [64].

Také studie Plevy et al. (2012) poukazuje na produkci BA u enterokoků izolovaných z králičího masa. Z 33 izolátů *Enterococcus* spp. a *Enterococcus faecium* u 31 byla prokázána dekarboxylázová aktivita. U 12 izolátů enterokoků byl detekován kadaverin a tyramin, devět kmenů produkovalo fenyletylamin spolu s kadaverinem a tyraminem a dva kmeny putrescin v kombinaci s kadaverinem a tyraminem. U jednoho izolátu byla zaznamenána rovněž produkce kadaverinu a fenyletylaminu. U čtyř kmenů byl detekován tyramin a u zbývajících třech kmenů kadaverin [74]. Významnou tvorbu BA uvádí i Halász et al. (1994) ze strany enterokoků [13]. Pircher et al. (2007) poukazuje na nízkou produkci

histaminu a putrescinu u *E. faecium* naproti tomu u kmene *Enterococcus* sp. hlásí vysokou produkci tyraminu [72].

Vzhledem k možnému ohrožení zdravotního stavu spotřebitelů je třeba dekarboxylázovou aktivitu enterokoků dále studovat [74].

#### 4.3.3 Dekarboxylázová aktivita bakterií rodu *Bifidobacterium*

Sládková et al. (2007) uvádí, že specifické DNA sekvence pro enzym tyrosindekarboxylázu byly detekovány u dvou testovaných kmenů rodu *Bifidobacterium* a tyto bakterie byly označeny za potenciální původce tvorby BA [31]. Schopnost tvořit histamin nebyla zjištěna u žádné z prověřovaných kultur. V rámci studie Lorencové et al. 2012 byla zjištěna v kultivačním prostředí (dekarboxylační médium MRS) bifidobakterií přítomnost BA. Významnější množství tyraminu bylo zjištěno u dvou ze čtyř testovaných kmenů *B. animalis* ssp. *lactis* (nad 10 mg.l<sup>-1</sup>). Zároveň byl u všech probiotických bakterií *B. animalis* ssp. *lactis* detekován kadaverin v rozmezí 5 až 14 mg.l<sup>-1</sup>. Kadaverin rovněž produkovaly *B. adolescentis*, *B. bifidum* a *B. longum* (<2 mg.l<sup>-1</sup>). Produkce ostatních BA u testovaných probiotických bakterií *Bifidobacterium* sp., *B. adolescentis*, *B. bifidum* a *B. longum* nebyla monitorována. Probiotické kultury mají potenciál a mohou tedy tvořit detekovatelná množství BA. Ta sice nedokážou způsobit intoxikaci, ale mohou přispět k celkovému množství BA v mléčných výrobcích, kde se tyto kultury používají [30].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**



## 5 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo sledovat dekarboxylázovou aktivitu u vybraných probiotických bakterií rodu *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* a *Vagococcus*. Konkrétní testované kmeny byly zástupci *Bifidobacterium* sp., *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. bifidum*, *B. animalis* ssp. *lactis*, *B. breve*, *B. animalis* ssp. *animalis*, *B. choerinum*, *B. thermophilum*, *B. ruminantium*, *L. reuteri*, *L. bombi* a *Vagococcus entomophilum*.

Teoretická část této diplomové práce měla za cíl charakterizovat skupinu BA, popsat faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu bakterií a následně se zaměřit na výskyt a mikrobiální původce zvýšeného obsahu BA ve fermentovaných potravinách. Důležité bylo popsat pozitivními účinky na zdravotní stav člověka, ale zároveň vysvětlit jejich toxikologický význam. Součástí teoretické části byla rovněž bližší charakterizace skupiny probiotických bakterií hojně využívaných v potravinářství a monitoring jejich potenciální dekarboxylázové aktivity.

Praktická část této diplomové práce byla zaměřena na sledování tvorby BA u probiotických bakterií v dekarboxylačním médiu MRS a Wilkins-Chalgren. Pro stanovení koncentrace BA bylo využito kapalinové chromatografie UV/VIS při vlnové délce ( $\lambda=254$  nm) po předkolonové derivatizaci dansylchloridem. Na základě prvotního skríningu produkce BA humánními izoláty byl založen pokus sledující kinetiku produkce u jednoho kmene *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* DSM 10140 SZU-B 25. V této souvislosti byly studovány podmínky kultivace. Paralelně s produkcí BA bylo sledováno růstové chování bakterií měřením optické hustoty bakteriální suspenze. Výsledky této diplomové práce mohou přispět k objasnění málo prozkoumané části metabolismu bakterií rodu *Bifidobacterium*.

Na základě výsledků získaných z jednotlivých měření byly formulovány závěry.

## 6 METODIKA A MATERIÁL

### 6.1 Použité kultury bakterií

V experimentální části této práce byla sledována produkce BA *in vitro* u humáních izolátů střevní mikroflóry kmene *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, získaných ze sbírky mikroorganismů České zemědělské univerzity v Praze (SZU). Konkrétně se jedná probiotické kmeny: *B. longum* ssp. *longum* DSM 20097 (SZU- B1, SZU- B18 a SZU- B26), *B. longum* BIFIDO IBS (SZU- B2, SZU- B10 a SZU- B15), *B. longum* (SZU- B 34 a SZU – B51), *B. longum* ssp. *longum* (SZU - B40 a DSM 20218), *B. longum* ssp. *suis* (SZU- B57 a SZU- B61), *B. bifidum* (DSM 20239, 48 PIM, DSM 20082, SZU - B32, SZU - B33, SZU - B36 a SZU - B37), *B. animalis* ssp. *lactis* (SZU-B13, SZU-B28 a SZU-B29), *B. animalis* ssp. *lactis* DSM 10140 (SZU-B17, SZU-B20, SZU-B21, SZU-B22, SZU-B23, SZU-B25 a SZU-B27), *B. animalis* ssp.*animalis* (SZU – B38, SZU – B41, SZU – B42, SZU – B44, SZU – B45, SZU – B46, SZU – B54, SZU – B54, SZU – B59, SZU – B63 a SZU – B64), *B. breve* (DSM 20213T a SZU – B24), *B. choerinum* SZU – B43, *B. thermophilum* (SZU – B56 a SZU – B60), *B. ruminantium* SZU – B48, *Bifidobacterium* sp. SZU – B24, *B. pseudolongum* SZU – B47, *B. pseudolongum* ssp. *globosum* (SZU – B49 a SZU – B50), *L. bombi* sp. nov. (SZU – B52 a SZU – B53), *L. reuteri* SZU – L1 a *Vagococcus entomophilum* sp. nov. SZU – B31.

#### 6.1.1 Příprava kultivačních médií

##### Tekuté médium *Lactobacillus* MRS Broth

Složení:

Proteozový pepton	10,00 g.l <sup>-1</sup>
Hovězí extrakt	10,00 g.l <sup>-1</sup>
Kvasniční extrakt	5,00 g.l <sup>-1</sup>
Dextróza	20,00 g.l <sup>-1</sup>
Polysorbát 80	1,00 g.l <sup>-1</sup>
Citran amonný	2,00 g.l <sup>-1</sup>

Octan sodný	5,00 g.l <sup>-1</sup>
Síran hořečnatý	0,10 g.l <sup>-1</sup>
Síran manganatý	0,05 g.l <sup>-1</sup>
Konečné pH (při 25 °C)	6,5±0,2

Příprava média: Pro přípravu půdy bylo naváženo 55,15 g média *Lactobacillus* MRS Broth obohaceného o AMK lyzin, tyrozin, ornitin a arginin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) v koncentraci 0,3 % (w/v). Vše bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody a byla upravena hodnota pH. Takto připravená půda byla rozplněna po 7 ml do jednotlivých zkumavek a zavíčkována. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut.

#### **Tekuté médium WCH (Wilkins-Chalgren Anaerobic Broth Base)**

Složení:

enzymatický hydrolyzát kaseinu	10,00 g.l <sup>-1</sup>
masový pepton	10,00 g.l <sup>-1</sup>
kvasničný extrakt	5,00 g.l <sup>-1</sup>
dextrosa	1,00 g.l <sup>-1</sup>
chlorid sodný	5,00 g.l <sup>-1</sup>
L-arginin	1,00 g.l <sup>-1</sup>
pyrohroznán sodný	1,00 g.l <sup>-1</sup>
hemin	0,005 g.l <sup>-1</sup>
menadion	0,0005 g.l <sup>-1</sup>

Konečné pH (při 25 °C) 7,1±0,2

Příprava média: Pro přípravu půdy bylo naváženo 33,01 g média Wilkins Chalgren Anaerobic Broth Base obohaceného o AMK lyzin, tyrozin, ornitin a arginin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) v koncentraci 0,3 % (w/v), 1 ml Tween 80 a 10 g sojového peptonu. Vše bylo

rozpuštěno v 1000 ml destilované vody a upravena hodnota pH. Takto připravená půda byla rozplněna po 7 ml do jednotlivých zkumavek a zavíčkována. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut.

#### **Pevná půda WCH (Wilkins-Chalgren Anaerobic Agar)**

Wilkins Chalgren Anaerobic Broth Base (HiMedia)	33,01 g
Sojový pepton	10,00 g
Agar	10,00 g
Twen 80	1,00 ml
Voda	1000,00 ml

#### **Pevná půda Lactobacillus MRS**

Lactobacillus MRS Broth (HiMedia)	55,15 g
Agar	10,00 g
Voda	1000,00 ml

Příprava pevných půd: Pro rozizolování jednotlivých kmenů byl použit WCH agar a MRS agar. Pro jednotlivé půdy bylo naváženo uvedené množství jednotlivých přísad a vše bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Takto připravená půda byla sterilována v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut. Po sterilaci proběhlo rozlití do připravených Petriho misek o průměru 60 mm v množství 10 ml.

### **6.1.2 Příprava suspenze bakterií**

Kmeny byly dodány v měkkém agaru v lékovkách o objemu 20 ml, odkud byla suspenze bakterií sterilně odebrána a rozizolována křížovým roztěrem na pevnou půdu MRS i WCH. Následovala kultivace za anaerobních podmínek při 37°C po dobu 24 hodin. Z Petriho misky byla pak odebrána typická kolonie, která byla inokulována do jednotlivých kultivačních médií MRS a WCH s aminokyselinami. Ze suspenze 24 hodinové kultury bylo ode-

bráno a zaočkováno 150  $\mu$ l suspenze do zkumavek s médií v trojím opakování. Takto připravené vzorky byly kultivovány za anaerobních podmínek při teplotě 37°C 48 hodin. Anaerobní podmínky při kultivaci byly zajištěny převrstvením suspenze bakterií sterilním parafínem o objemu 750  $\mu$ l. Po kultivaci bakterií byly bakteriální suspenze použity po odstředění k monitoringu obsahu BA.

## 6.2 Sledování kinetiky růstu u kmene *Bifidobacterium*

U vybraného kmene *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* DSM 10140 SZU-B 25, byl rovněž sledován nárůst bakterií v jednotlivých časových intervalech u tekutého média MRS i WCH. Intervaly pro odběry byly stanoveny po třech, šesti, devíti, dvanácti, dvaceti čtyřech, dvaceti sedmi, třiceti, třiceti čtyřech, čtyřiceti osmi a sedmdesáti dvou hodinách od začátku kultivace (od zaočkování=čas 0).

### 6.2.1 Stanovení optické hustoty buněk

Nárůst kolonií kmene *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* DSM 10140 SZU-B 25 byl sledován měřením optické denzity kultivačního média v daných odběrových časech. Pro každý časový interval a každou půdu byly vzorky suspenze připraveny duplicitně. Jako negativní kontrola sloužilo nezaočkované testované médium, kultivované za stejných podmínek. V čase odběru byla každá zkumavka se suspenzí promíchána na vortexu a v množství 200  $\mu$ l odpipetována do mikrotitrační destičky typu P v tripletu. Bakteriální nárůst, resp. změna optické denzity, byla měřena na přístroji Benchmark Microplate Reader, (BIO-RAD, Japonsko) při vlnové délce 655 nm. Vzorky byly před měřením protřepány po dobu 10 sekund. Pro sestrojení křivek byly vypočítány průměry hodnot optické denzity v jednotlivých jamkách. Od těchto hodnot byly odečteny průměrné hodnoty naměřené u kontrol (nezaočkované médium). Růstové křivky byly v grafu znázorněny jako závislost přirozeného logaritmu na čase kultivace.

### 6.2.2 Stanovení pH kultivačního média

V jednotlivých časových intervalech byly sledovány změny pH kultivačního média. Měření bylo prováděno při laboratorní teplotě pomocí vpichového pH-metru (EUTECH, Instruments Junction), který byl před měřením řádně kalibrován. Všechny vzorky byly měřeny ve třech opakováních.

## 6.3 Stanovení biogenních aminů

### 6.3.1 Příprava chemikálií

#### Uhličitanový pufr

$K_2CO_3$	333,00 g
Pufr AB	1000,00 ml

Příprava pufru AB: 250 ml pufru A (Tab. 4.) bylo upraveno pufrům B na pH=9,2. Příprava jednotlivých pufrů je uvedena v Tab. 5. Pufr AB byl připraven těsně před použitím.

Následně byla navážka 83,25g  $K_2CO_3$  doplněna do 250 ml pufrům AB.

*Tab. 4. Příprava jednotlivých pufrů použitých při derivatizaci.*

Navážka na přípravu 1000,00 ml jednotlivých pufrů:	
Pufr	Navážka
A	52,40 g $Na_2CO_3$
B	42,00 g $NaHCO_3$

#### Dansylchlorid

Dansylchlorid	5,00 g
Aceton	1000,00 ml

Pro derivatizaci byl použit dansylchlorid o koncentraci  $5g.l^{-1}$ .

### 6.3.2 Příprava vzorků k derivatizaci

Po kultivaci testovaných bakterií byl odstraněn parafín a suspenze byla centrifugována (4000 otáček za minutu,  $22 \pm 1$  ° C, 15 minut). Získaný supernatant byl naředěn v poměru 1:1 (v/v) kyselinou chloristou ( $c = 1,2 \text{ mol.l}^{-1}$ ). Takto připravený vzorek byl podroben derivatizaci.

### 6.3.3 Postup derivatizace

Produkce BA (tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu a kadaverinu) byla stanovována s pomocí kapalinové chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC). Ke vzorku bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  interního standardu 1,7-heptandiaminu o koncentraci  $500 \text{ mg.l}^{-1}$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), poté 1 ml kyselého hydrolyzátu supernatantu, 1,5 ml uhličitanového pufru a 2 ml dansylchloridu o koncentraci  $5 \text{ g.l}^{-1}$ . Takto připravená směs byla v temnu třepána 20 hodin. Následně byl přidán roztok prolinu 200  $\mu\text{l}$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) v koncentraci ( $100 \text{ g.l}^{-1}$ ), čímž byla zastavena derivatizační reakce. Dansylderiváty byly extrahovány vytřepáním do 3 ml heptanu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Jeden mililitr heptanové vrstvy byl odebrán a odpařen pod dusíkem při  $60 \pm 2^\circ\text{C}$ . Odparek byl následně rozpuštěn v 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

### 6.3.4 Chromatografické stanovení

Derivatizované vzorky byly zfiltrány (porozita 0,22  $\mu\text{m}$ ) a aplikovány na kolonu (ECLIPSE Plus C18 RRHD s rozměry 3,0 x 50 mm) s chromatografickým systémem (binární pumpa a autosampler Agilent Technologies 1260 Infinity, USA), odplynovačem, UV / VIS-DAD detektorem ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) a kolonovým termostatem (Agilent Technologies, USA). Výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru Clarity. Clarity je účinný program, který slouží k získávání, zpracovávání a vyhodnocování chromatografických dat.

## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

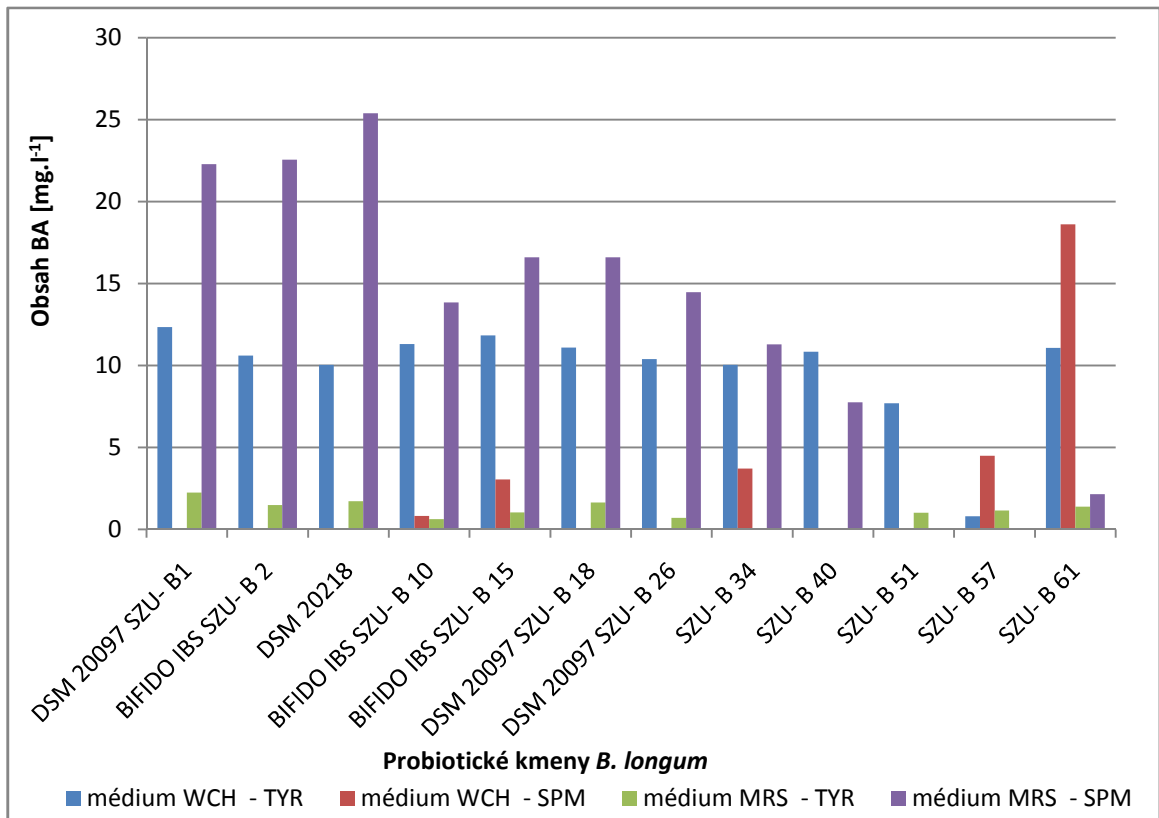
Pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s předkolonovou derivatizací dansylchloridem a UV detekcí byla sledována dekarboxylázová aktivita u vybraných probiotických bakterií v dekarboxylačním médiu MRS a Wilkins-Chalgren. Byla sledována produkce 8 biogenních aminů (tyraminu, putrescinu, kadaverinu, spermidinu, sperminu, fenyletylaminu, agmatinu a histaminu).

### 7.1 Skríníng dekarboxylázové aktivity u vybraných probiotických bakterií

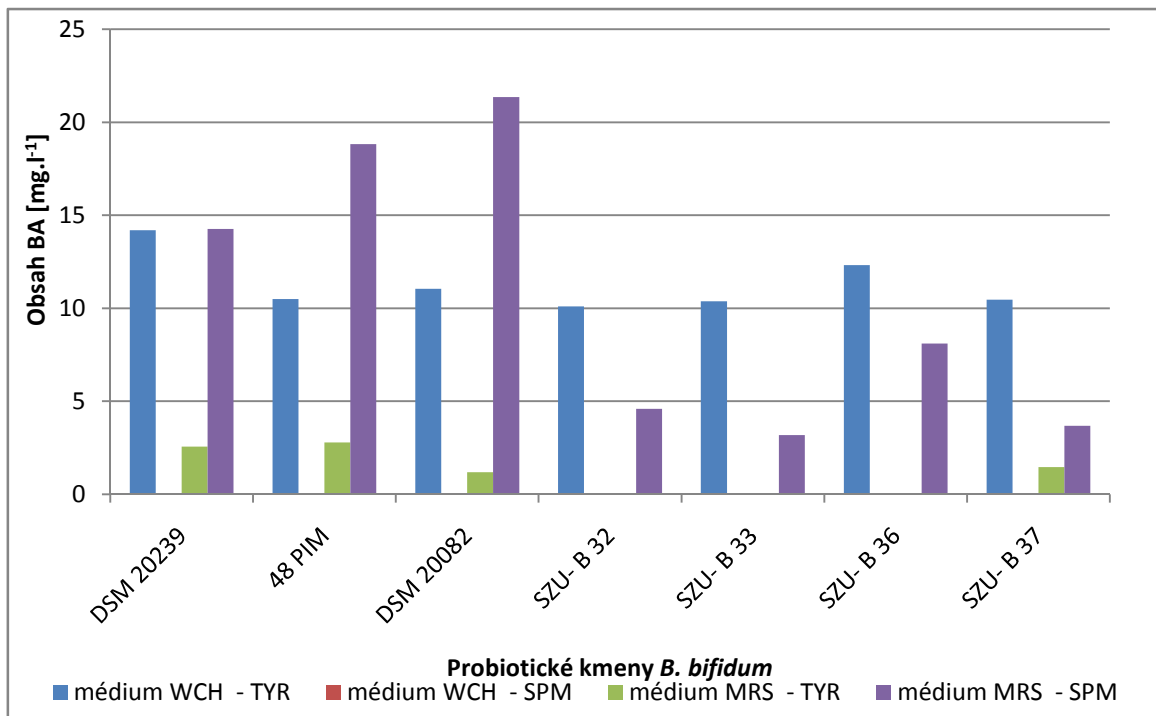
Z daných výsledků je patrné (příloha I), že pro produkci sperminu bylo výhodnější dekarboxylační médium MRS, kde byly zjištěny jeho vyšší hodnoty. Naopak příhodnější pro produkci tyraminu bylo médium WCH. V obou médiích byly detekovány pouze BA spermin a tyramin. Vzhledem k přítomnosti sperminu lze očekávat, že dané kmeny jsou schopné produkovat i putrescin. Tento však vzhledem ke kontaminaci mobilní fáze acetonitrilu, nebylo možné stanovit.

Jak vypývá z Obr. 12. kmen *B. longum* byl schopný za daných podmínek produkovat BA. Významnější produkce sperminu byla prokázána v dekarboxylačním médiu MRS. Z dvanácti testovaných kmenů *B. longum* produkovalo spermin osm izolátů v koncentraci vyšší než  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  a dva kmeny vykazovaly produkci 2-10  $\text{mg.l}^{-1}$ . Oproti tomu produkce tyraminu ve stejném médiu byla zanedbatelná. U 10 vzorků supernatantů *B. longum* po kultivaci byla prokázána produkce tyraminu, ale pouze u jednoho kmene bylo toto množství významnější (2-10  $\text{mg.l}^{-1}$ ). Naopak v dekarboxylačním médiu WCH byl u všech dvanácti testovaných probiotik detekován tyramin. Významnější množství tyraminu bylo zjištěno u 10 kmenů *B. longum* (nad 10  $\text{mg.l}^{-1}$ ) a jeden kmen produkoval 2-10  $\text{mg.l}^{-1}$ . Spermin byl v WCH médiu detekován u pěti kmenů, z nichž tři kmeny produkovaly množství 2-10  $\text{mg.l}^{-1}$  a pouze jeden kmen produkoval  $18,61 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  sperminu.





Obr. 12. Produkce biogenních aminů u probiotických kmenů *B. longum*.



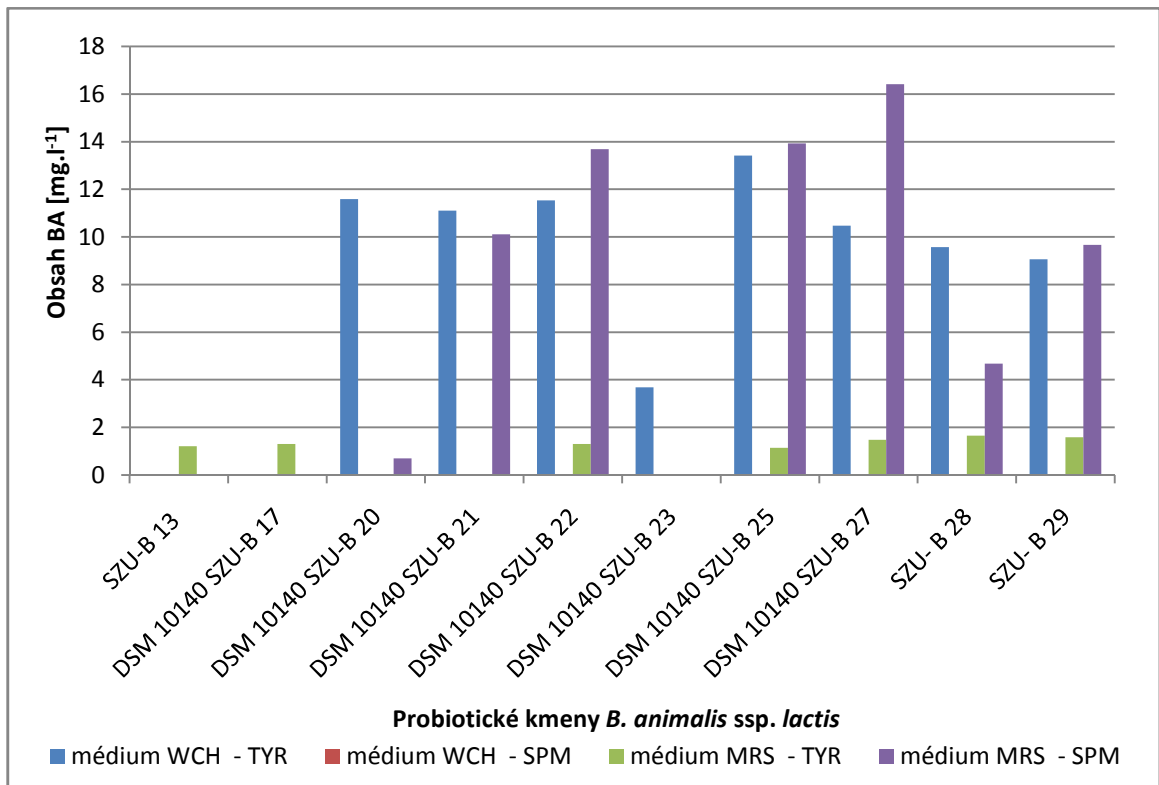
Obr. 13. Produkce biogenních aminů u probiotických kmenů *B. bifidum*.

Kmen *B. bifidum* (Obr. 13.) vykazoval opět vyšší koncentrace tyraminu v dekarboxylačním médiu WCH, a to u všech sedmi kmenů v koncentraci nad 10 mg.l<sup>-1</sup>. Produkce sperminu zde nebyla prokázána. Naopak v médiu MRS produkovaly všechny kmeny *B. bifidum* spermin, z toho tři kmeny vyšší koncentrace (> 10 mg.l<sup>-1</sup>), ostatní 2-10 mg.l<sup>-1</sup>.

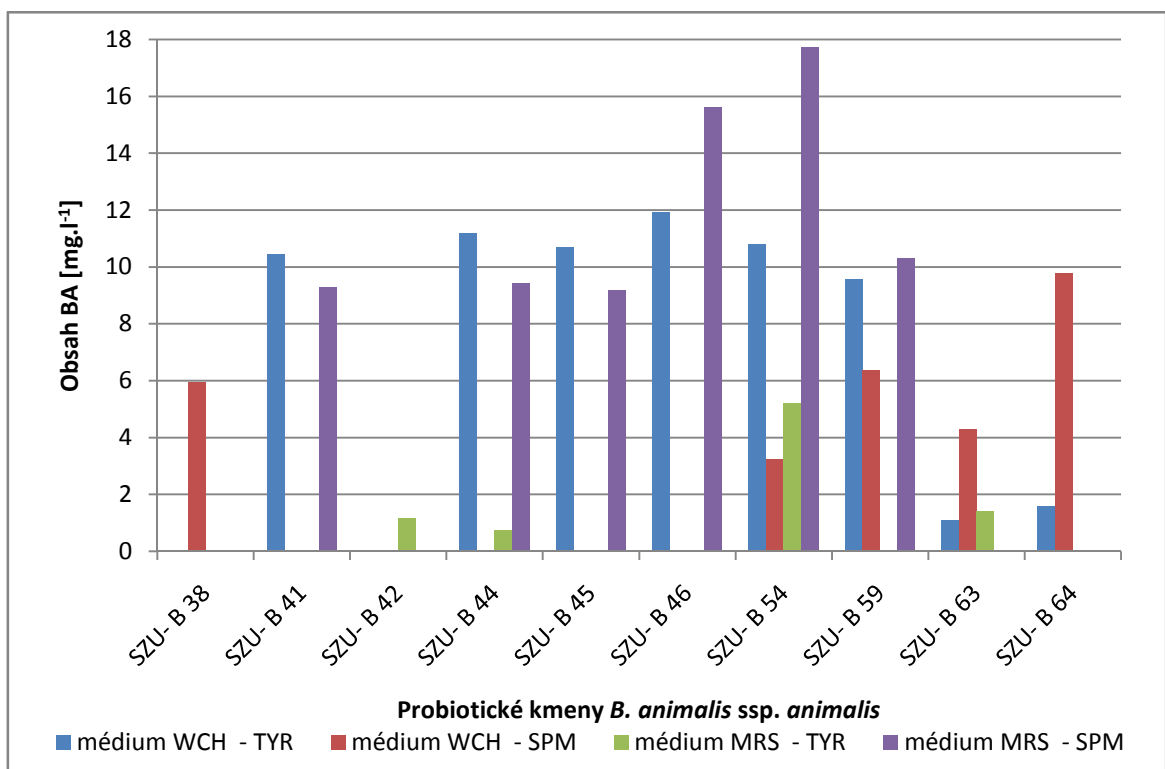
Jak je patrné z Obr. 14. v médiu WCH byla u probiotického kmene *B. animalis* ssp. *lactis* prokázána činnost pouze tyrozindekarboxylázy. Osm kmenů z 10 testovaných produkovalo tyramin, z toho pět s produkcí nad 10 mg.l<sup>-1</sup>. Naproti tomu v médiu MRS byla produkce tyraminu zanedbatelná. Sedm kmenů vykazovalo produkci < 2 mg.l<sup>-1</sup>. Spermin byl u *B. animalis* ssp. *lactis* detekován u sedmi izolátů, z toho produkce nad 10 mg.l<sup>-1</sup> byla prokázána u čtyř kmenů.

Také kmen *B. animalis* ssp. *animalis* byl schopný produkovat BA (Obr. 15.). Z 10 testovaných kmenů bylo v WCH médiu detekováno množství tyraminu > 10 mg.l<sup>-1</sup> u pěti izolátů. Jeden kmen *B. animalis* ssp. *animalis* produkoval 2-10 mg.l<sup>-1</sup> a dva kmeny < 2 mg.l<sup>-1</sup>. Naopak spermin v médiu MRS produkovaly tři kmeny s koncentrací > 10 mg.l<sup>-1</sup> a u třech izolátů byla detekována hodnota 2-10 mg.l<sup>-1</sup>. Produkce tyraminu byla zaznamenána u čtyř kmenů, ale pouze u jednoho kmene byla zaznamenána vyšší produkce v rozmezí 2-10 mg.l<sup>-1</sup>.

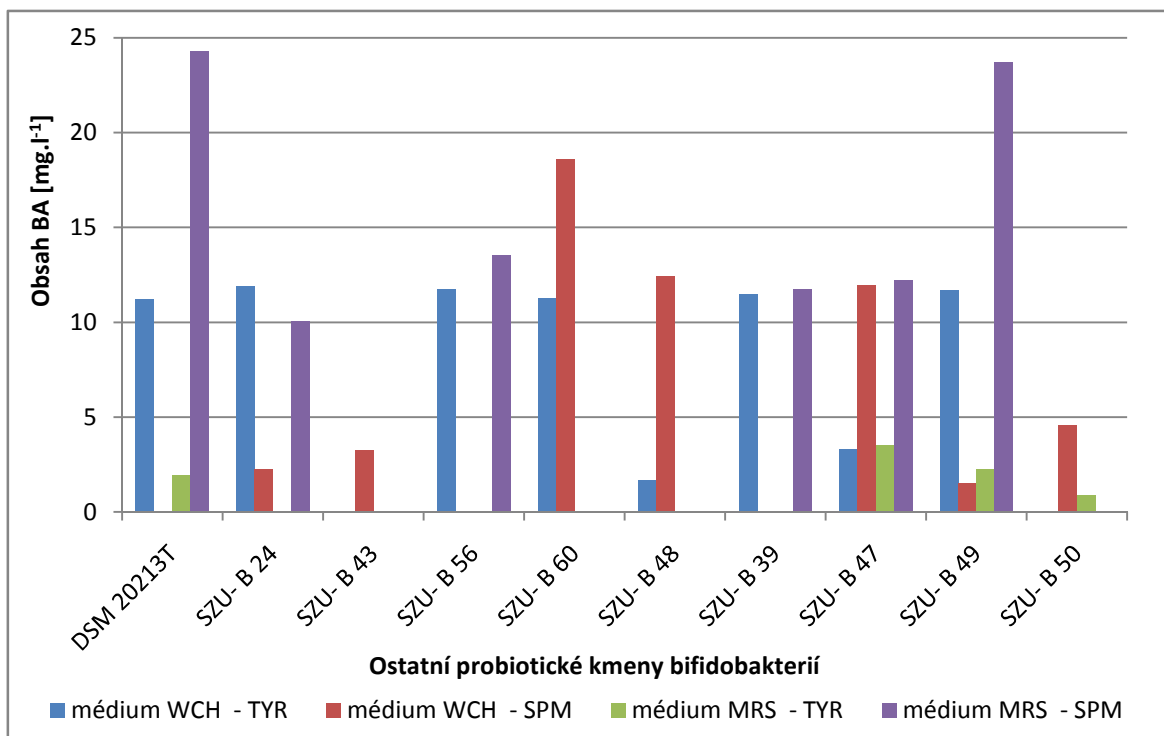
Jak vyplývá z Obr. 16., také u ostatních kmenů bifidobakterií byla prokázána dekarboxylázová aktivita. Vyšší koncentrace (> 10 mg.l<sup>-1</sup>) tyraminu byly stanoveny v médiu MRS, a to u kmene *B. breve* DSM 20213T a SZU - B24, *B. thermophilum* SZU - B56 a SZU - B60, *Bifidobacterium* sp. SZU - B39, *B. pseudolongum* ssp. *globosum* SZU - B49. Zanedbatelná produkce tyraminu v MRS byla detekována u *B. ruminantium* SZU - B48 (< 2mg.l<sup>-1</sup>) a *B. pseudolongum* SZU - B47 (2-10 mg.l<sup>-1</sup>). U testovaných kmenů *B. thermophilum* SZU - B60, *B. ruminantium* SZU - B48 a *B. pseudolongum* SZU - B47 bylo množství sperminu v médiu WCH > 10 mg.l<sup>-1</sup>. Oproti tomu nižší produkce tyraminu (2-10 mg.l<sup>-1</sup>) v médiu WCH byla detekována pouze u *B. pseudolongum* SZU - B47 a *B. pseudolongum* ssp. *globosum* SZU - B49 a u dvou kmenů *B. breve* DSM 20213T a *B. pseudolongum* ssp. *globosum* SZU - B50 byla produkce tyraminu zanedbatelná (< 2mg.l<sup>-1</sup>). V dekarboxylačním médiu WCH dosáhly vyšších koncentrací sperminu (> 10 mg.l<sup>-1</sup>) *B. breve* DSM 20213T a SZU - B24, *B. thermophilum* SZU - B56, *Bifidobacterium* sp. SZU - B39, *B. pseudolongum* SZU - B47 a *B. pseudolongum* ssp. *globosum* SZU - B49.



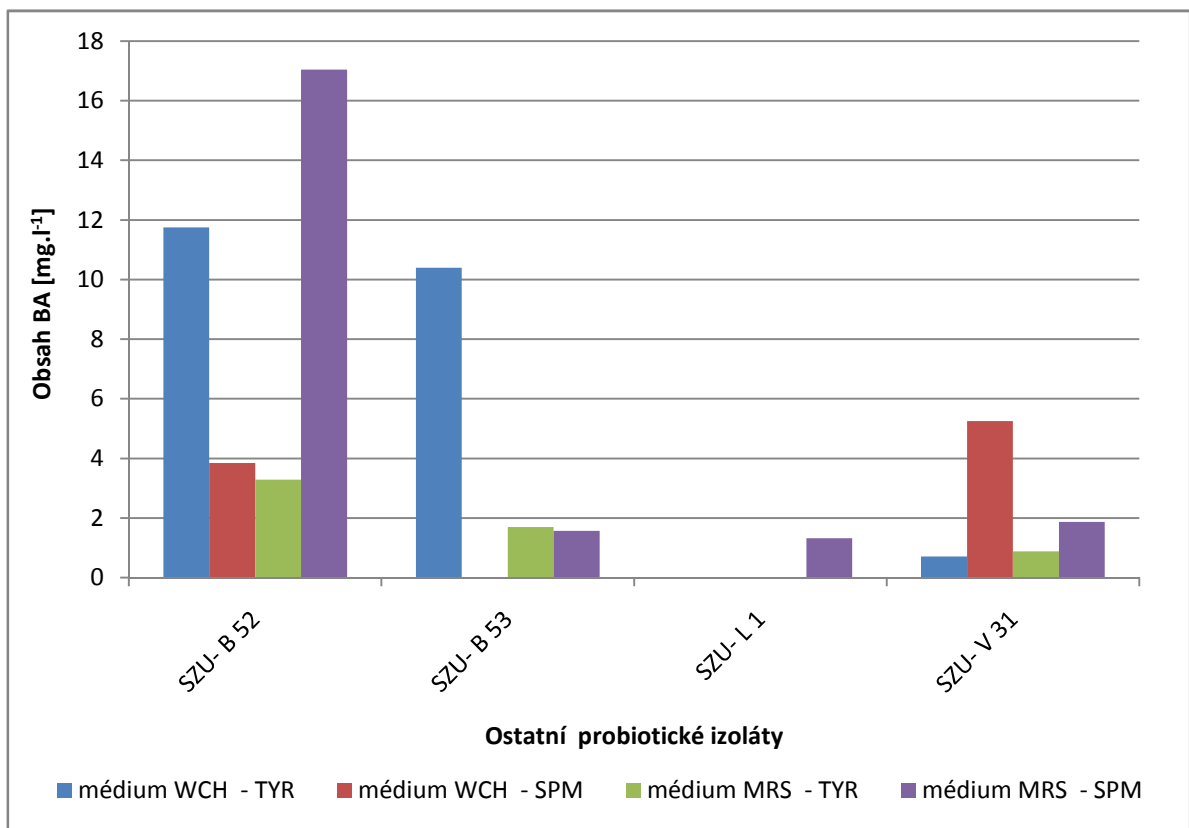
Obr. 14. Produkce biogenních aminů u probiotických kmenů *B. animalis ssp. lactis*.



Obr. 15. Produkce biogenních aminů u probiotických kmenů *B. animalis ssp. animalis*.



Obr. 16. Produkce biogenních aminů u ostatních kmenů bifidobakterií.



Obr. 17. Produkce biogenních aminů u ostatních probiotických kmenů.

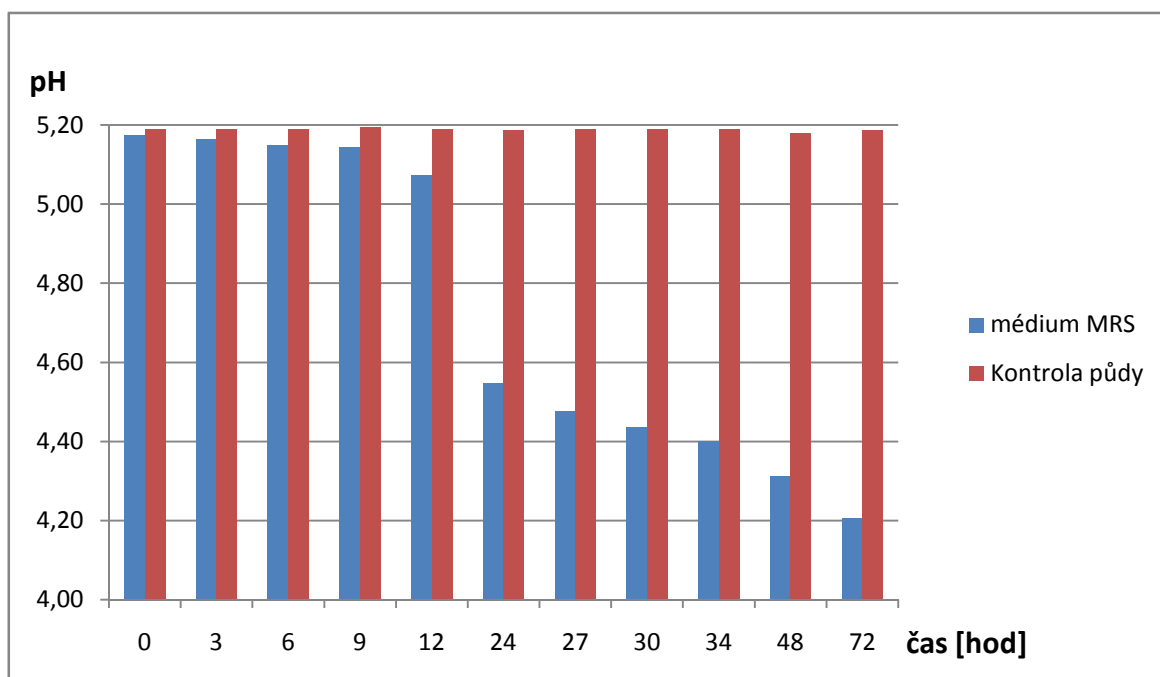
U ostatních probiotických izolátů (Obr. 17.) byla rovněž prokázána dekarboxylázová aktivita. Vyšší koncentrace ( $> 10 \text{ mg.l}^{-1}$ ) tyraminu byly detekovány v médiu WCH u *L. bombi* sp. nov. (SZU – B52 a SZU – B53). Ve stejném kultivačním médiu spermin produkovaly v nižší koncentraci ( $2\text{-}10 \text{ mg.l}^{-1}$ ) *L. bombi* sp. nov. SZU – B52, a *Vagococcus entomophilum* sp. nov. (SZU – B31). V médiu MRS byla zaznamenána významnější koncentrace sperminu  $17,04 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$  pouze u *L. bombi* sp. nov. SZU – B52. U ostatních izolátů byla produkce sperminu v tomto médiu zanedbatelná. Vyšší dekarboxylázová aktivita tyraminu ( $2 - 10 \text{ mg.l}^{-1}$ ) v médiu MRS byla prokázána pouze u *L. bombi* sp. nov. (SZU – B52).

## 7.2 Kinetika produkce kmene *Bifidobacterium*

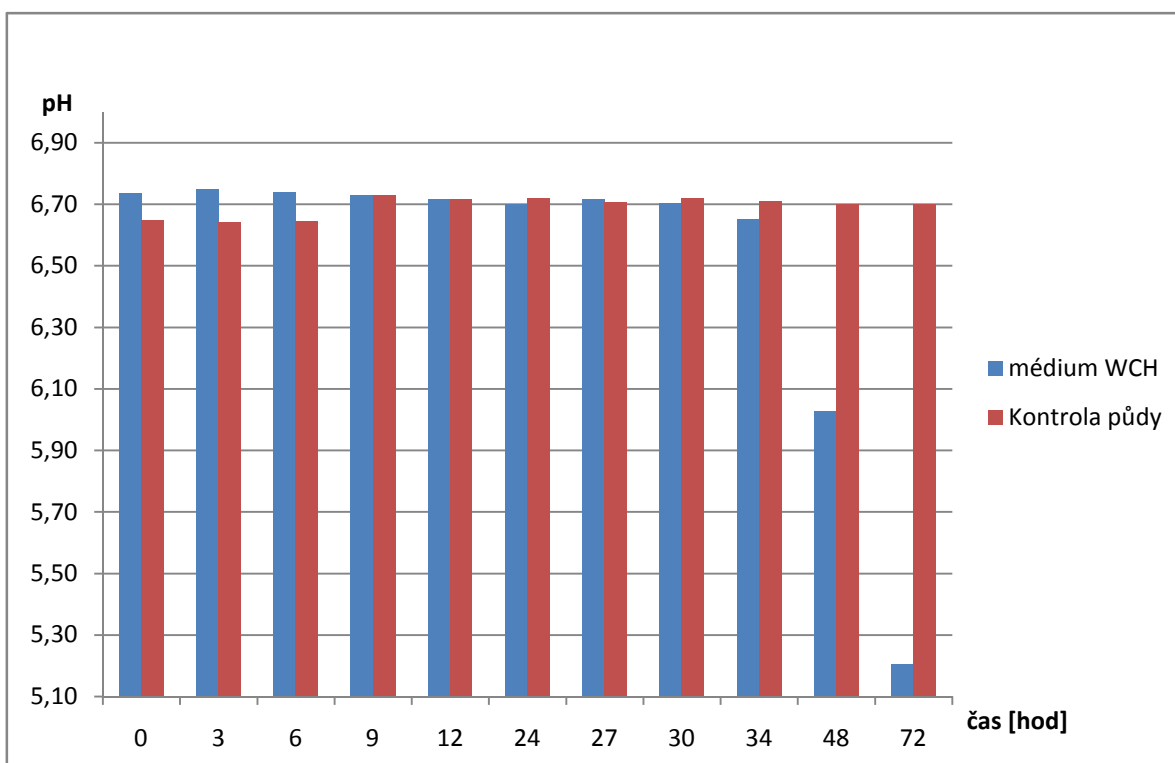
Na základě prvotního skríningu produkce BA u humánních izolátů byl založen pokus sledující kinetiku produkce BA. Vzhledem k časové náročnosti, kdy bylo nutné většinu sledovaných probiotických kmenů rozizolovat, byl k tomuto účelu vybrán kmen *B. animalis* ssp. *lactis* DSM 10140 SZU-B 25, u něhož byla prokázána čistota kmene. V této souvislosti byly studovány podmínky kultivace. Paralelně s produkcí BA byla měřena i optická denzita bakteriální suspenze, pomocí níž byl sledován růst bakterií.

### 7.2.1 Stanovení pH dekarboxylačních médií

Sledovaným znakem bylo pH kultivačních médií MRS i WCH (Obr. 18. a Obr. 19.) v různých odběrových časech po kultivaci testovaných probiotických izolátů při kultivační teplotě  $37^\circ\text{C}$ . Vlivem nárůstu probiotických bakterií došlo k poklesu pH daného kultivačního média, způsobeného produkcí metabolických produktů. Největší pokles pH byl zaznamenán u média MSR během dvaceti čtyř hodin kultivace. V dalších odběrových intervalech došlo ještě k mírnému poklesu pH. Iniciační pH tohoto média MRS bylo  $5,17 \pm 0,0$  (v čase 0) a jeho konečná hodnota pH po sedmdesáti dvou hodinách kultivace byla  $4,21 \pm 0,0$ . V médiu WCH, jehož počáteční pH bylo  $6,74 \pm 0,0$ , byl pokles pH zaznamenán později a to v časech odběru čtyřiceti osmi a sedmdesáti dvou hodin na konečné pH  $5,21 \pm 0,0$ . Po celou dobu bylo sledováno také kontrolní kultivační médium MRS i WCH. Jeho pH se pohybovalo v rozmezí  $6,65\text{-}6,73$  u WCH a u dekarboxylačního média MRS bylo toto rozpětí pH  $5,18\text{-}5,19$ .



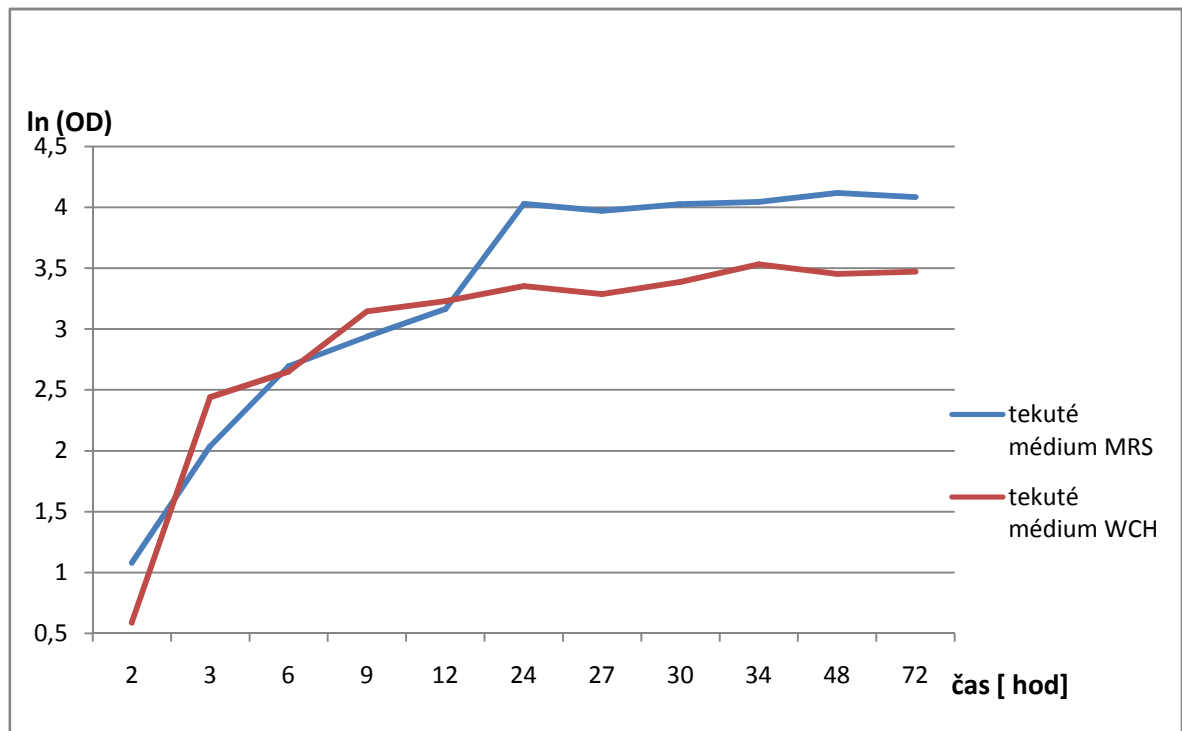
Obr. 18. Graf závislosti pH v čase u kmene *B. animalis* ssp. *lactis* DSM 10140 SZU-B 25 kultivovaného v dekarboxylačním médiu MRS.



Obr. 19. Graf závislosti pH v čase u kmene *B. animalis* ssp. *lactis* DSM 10140 SZU-B 25 kultivovaného v dekarboxylačním médiu WCH.

### 7.2.2 Stanovení růstu buněk

Měřením optické hustoty buněk byl sledován nárůst testovaného probiotického kmene. Jak vyplývá z Obr. 20. k největšímu nárůstu OD došlo u obou médií v průběhu dvaceti čtyř hodin. Po zbylou dobu kultivace došlo už pouze k nepatrnému nárůstu OD.

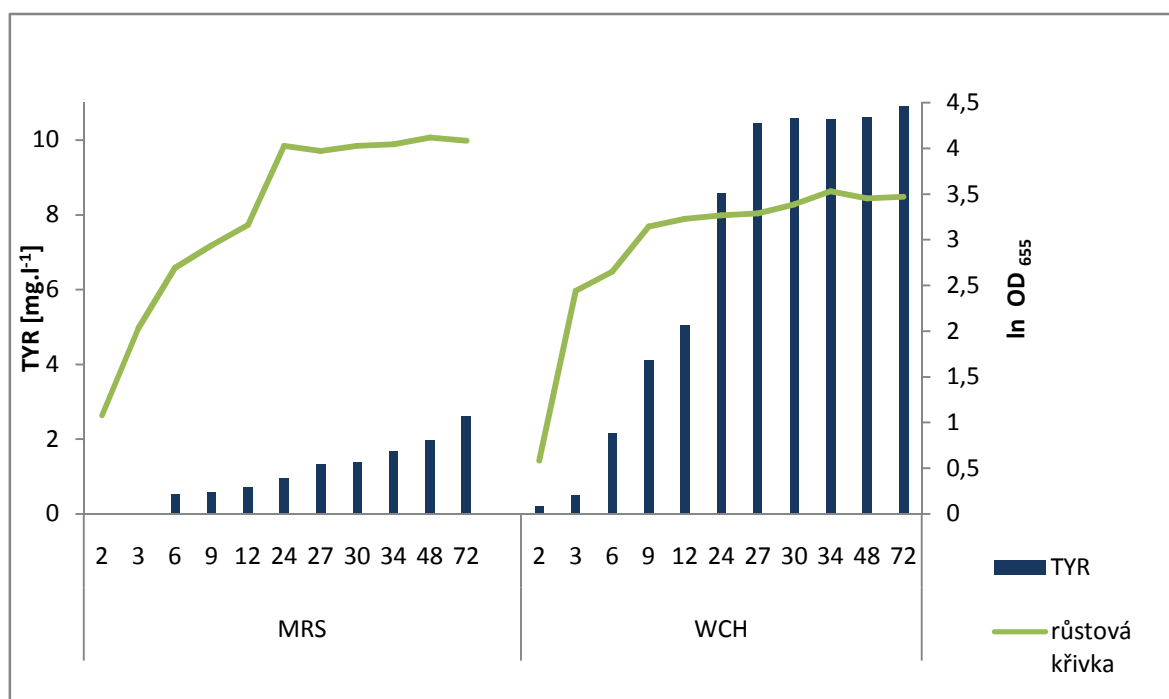


Obr. 20. Vývoj optické denzity kmene *B. animalis* ssp. *lactis* DSM 10140 v čase kultivace.

### 7.2.3 Produkce biogenních aminů

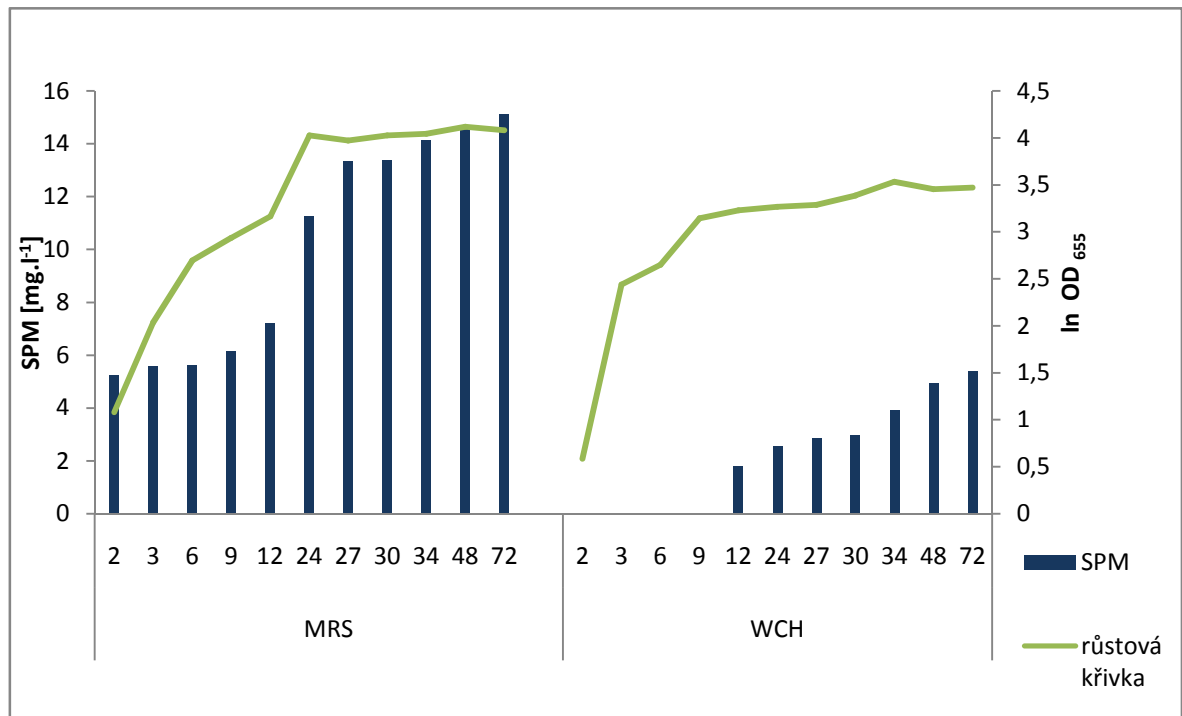
Z daných výsledků je patrné (Obr. 21.), že vyšší hodnoty produkce tyraminu byly zjištěny v médiu WCH. Přičemž k nejmarkantnějšímu přírůstku došlo v průběhu 27 hodin. Poté se již koncentrace tyraminu výrazně nezvyšovala. Konečná hodnota produkce tohoto biogenního aminu v médiu WCH byla  $10,89 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ . Oproti tomu produkce tyraminu v kultivačním médiu MRS byla výrazně nižší. Během kultivace 72 hodin došlo k postupnému nárůstu produkce tyraminu kmenem *B. animalis* ssp. *lactis* na hodnotu  $2,61 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ .

Na druhou stranu médium MRS bylo příznivější pro produkci sperminu (Obr. 22) u testovaného kmene *B. animalis* ssp. *lactis*. Jeho koncentrace během 72 hodin v tomto médiu dosáhla  $15,11 \pm 0,3 \text{ mg.l}^{-1}$ . Opakem byla produkce sperminu v dekarboxylačním médiu WCH, která během kultivační doby testovaného probiotika dosáhla hodnoty  $5,39 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ . Jak je patrné z obou grafů (Obr. 21. a Obr. 22.) se zvyšující se OD koncentrace BA u kmene *B. animalis* ssp. *lactis* roste. Lze tedy usuzovat, že vzrůstající koncentrace tyraminu i sperminu u obou půd, koreluje s nárůstem této probiotické bakterie.



Obr. 21. Srovnání produkce tyraminu v časových intervalech u kmene *B. animalis* ssp. *lactis* DSM 10140 SZU-B 25 v obou dekarboxylačních médiích.





Obr. 22. Srovnání produkce sperminu v časových intervalech u kmene *B. animalis* ssp. *lactis* DSM 10140 u obou dekarboxylačních médií.

### 7.3 Diskuze

Tato práce byla zaměřena na sledování dekarboxylázové aktivity vybraných kmenů probiotických bakterií převážně rodu *Bifidobacterium* za podmínek *in vitro*. Tato skupina probiotických bakterií byla vybrána zejména z důvodu nedostatku odborné literatury, zabývající schopností bifidobakterií produkovat BA. Vzhledem negativnímu vlivu BA na lidské zdraví je snahou využívat v potravinářském průmyslu probiotické kmeny s co možná nejnižší aktivitou dekarboxyláz [31]. Proto bylo naším cílem zjistit, zda jsou probiotické kmeny bifidobakterií schopné produkovat BA.

V současnosti se používají probiotické bakterie nejen při výrobě mléčných výrobků, ale trendem je i využití při výrobě fermentovaných masných výrobků. Vzhledem k potenciální produkci BA těmito zástupci probiotických kultur, je nutné prověřovat jejich dekarboxylázovou aktivitu [31]. Tvorba BA probiotiky by proto mohla být chápána jako protiklad k jejich pozitivním dieteticko-léčebným účinkům.

Suspenze bakterií ke stanovení BA byla připravena kultivací v dekarboxylačních médiích MRS, Wilkins-Chalgren s prekurzory sledovaných BA argininem, ornitinem, lyzinem a tyrozinem. Přípravou suspenze buněk s aminokyselinami dochází k rychlejšímu nástupu dekarboxylázové aktivity a zároveň se eliminuje přizpůsobování se bakterií podmínkám prostředí. Bifidobakterie jsou rovněž citlivé na kyslík, proto bylo při kultivaci zajištěno anaerobní prostředí. Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících tvorbu BA je přítomnost prekurzorů volných aminokyselin [73]. V prostředí bez těchto prekurzorů BA je schopnost dekarboxylázové aktivity bakterií opožděna a zároveň se produkce BA snižuje [3, 14].

Ačkoliv u obou médií byla zaznamenána produkce tyraminu i sperminu, výhodnější pro produkci tyraminu bylo médium WCH. Naopak vhodnější podmínky pro produkci sperminu byly v dekarboxylačním médiu MRS. Tuto skutečnost, je možné vysvětlit různým složením dekarboxylačních médií. I když mají obě kultivační média společné základní složky (kvasniční extrakt, pepton) převážná část komponent půd nebo jejich koncentrace je odlišná. Bifidobakterie jsou citlivé na některé vnější faktory (např. přítomnost kyslíku, pH), proto je třeba zajistit optimální podmínky pro jejich růst. Látky, které příznivě ovlivňují životaschopnost bifidobakterií se nazývají růstové faktory (bifidogenní faktory). Mezi tyto látky patří např. kvasniční extrakt, threonin, cystein, pepton, dextrin, maltóza a hydrolyzáty kaseinu. Významnými růstovými faktory využívanými rovněž jako prebiotika jsou galaktooligosacharidy, inulin, rafinosa nebo fruktooligosacharidy [75].

V obou dekarboxylačních médiích u dvanácti testovaných probiotických bakterií *B. longum* byla zaznamenána produkce tyraminu v 91,7% a produkce sperminu v 62,5%. Nejvyšší koncentrace tyraminu byla přitom zaznamenána u *B. longum* ssp. *longum* DSM 20097 SZU- B1 v množství  $12,34 \pm 0,3 \text{ mg.l}^{-1}$  (WCH) a sperminu u *B. longum* ssp. *longum* DSM 20218 v koncentraci  $25,4 \pm 0,3 \text{ mg.l}^{-1}$  (MRS).

Kmeny *B. bifidum* produkovaly tyramin ze 78,6 % a spermin z 50 % (MRS a WCH médium) u sedmi testovaných probiotických bakterií. Nejvyšší tyrozindekarboxylázovou aktivitu vykazoval kmen *B. bifidum* DSM 20239 v MRS ( $14,2 \pm 0,3 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Oproti tomu nejvyšší koncentraci sperminu vykazoval *B. bifidum* DSM 20082 v množství  $21,36 \pm 0,3 \text{ mg.l}^{-1}$  (WCH).

V obou dekarboxylačních médiích u probiotických izolátů *B. animalis* ssp. *lactis* byla zaznamenána produkce tyraminu v 75 % a sperminu v 35 % u deseti testovaných probiotik.

Nejvyšší koncentrace tyraminu byla u kmene *B. animalis* ssp. *lactis* DSM 10140 SZU-B 25 v množství  $13,42 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  a sperminu u *B. animalis* ssp. *lactis* DSM 10140 SZU-B 27 v koncentraci  $16,41 \pm 0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ . Tyto výsledky jsou v souladu se studií Lorencové et al. (2012), která v dekarboxylačním médiu MRS u dvou ze čtyř testovaných kmenů *B. animalis* ssp. *lactis* detekovala vyšší množství tyraminu (nad  $10 \text{ mg.l}^{-1}$ ) [30].

Kmeny *B. animalis* ssp. *animalis* produkovaly v médiu MRS a WCH tyramin u 60% a spermin u 55% u deseti testovaných probiotických bakterií. Nejvyšší tyrozindekarboxylázovou aktivitu vykazoval izolát *B. animalis* ssp. *animalis* SZU- B 46 u WCH ( $11,95 \pm 0,3 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Oproti tomu nejvyšší koncentraci sperminu vykazoval *B. animalis* ssp. *animalis* SZU- B 54 v médiu MRS ( $17,73 \pm 0,3 \text{ mg.l}^{-1}$ ).

Další skupina se skládala z deseti různých kmenů bifidobakterií, rovněž schopných v obou dekarboxylačních médiích produkovat BA. Byly sem zařazeny probiotické izoláty *B. breve*, *B. choerinum*, *B. thermophilum*, *B. ruminantium*, *Bifidobacterium* sp., *B. pseudolongum*. Nejvýznamnější koncentrace tyraminu byla zaznamenána u kmene *B. breve* SZU- B 24 s koncentrací  $11,93 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  v médiu WCH. Naproti tomu nejvíce sperminu ( $24,27 \pm 0,6 \text{ mg.l}^{-1}$ ) bylo zaznamenáno v dekarboxylačním médiu MRS u kmene *B. breve* DSM 20213T.

Poslední skupinu tvořili čtyři zástupci rodu *Lactobacillus* a *Vagococcus*, konkrétně kmeny *L. bombi*, *L. reuteri* a *Vagococcus entomophilum*. Největší dekarboxylázová aktivita byla prokázána u kmene *L. bombi* sp. nov. SZU- B 52. Produkce tyraminu v WCH byla  $11,75 \pm 0,4 \text{ mg.l}^{-1}$  a sperminu v médiu MRS  $17,04 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ . Hojně diskutovanými zástupci probiotických bakterií jsou laktobacily. *L. reuteri* byly pozitivní na produkci BA. Přičemž nejvýznamější produkce byla zaznamenána u tyraminu [18, 64, 65, 66]. Někteří autoři uvádí, že většina laktobacilů je považována za malé producenty BA [30, 33, 70, 71]. Vyšší produkce tyraminu byla zjištěna u *L. curvatus* a *L. casei / paracasei* [30].

Získané výsledky této práce tedy ukazují, že humánní izoláty probiotických bakterií jsou schopné produkovat tyramin a spermin. Vzhledem k přítomnosti sperminu lze předpokládat i schopnost kmenů produkovat putrescin, který však nebylo možné odečíst z důvodu kontaminace mobilní fáze. Produkce BA byla prokázána u všech testovaných kmenů. Nejvyšší procentuální zastoupení probiotických izolátů schopných tvořit tyramin i spermin

(91,7 % a 62,5 %) bylo u skupiny tvořené kmeny *B. longum*. Vzhledem k přítomnosti specifických DNA sekvencí pro enzym tyrozindekarboxylázu, jsou bifidobakterie potenciálními původci BA. Sládková et al. (2007) prokázala u dvou probiotických kultur *Bifidobacterium* (SACCO, Itálie) nízkou produkci tyraminu [31]. Kmeny *B. adolescentis*, *B. bifidum* a *B. longum* produkovaly kadaverin ( $<2 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Produkce ostatních BA u testovaných probiotických bakterií *Bifidobacterium* sp., *B. adolescentis*, *B. bifidum* a *B. longum* nebyla hlášena [30].

Při srovnání průměrů stanovených hodnot BA u jednotlivých testovaných kmenů byl jako nejvýznamnější producent BA označen kmen *B. thermophilum* SZU- B 60, který ovšem produkoval tyramin i spermin ( $11,24 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$  a  $18,6 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ ) pouze v médiu WCH. Spermin v médiu MRS nejvíce produkovala probiotická bakterie *B. longum* ssp. *longum* DSM 20218 ( $25,4 \pm 0,3 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Nejvyšší hodnoty tyraminu ( $11,95 \pm 0,3 \text{ mg.l}^{-1}$ ) byly detekovány u *B. animalis* ssp. *animalis* SZU- B 46 v médiu WCH. Oproti tomu nejnižší produkce BA byla detekována u *B. animalis* ssp. *animalis* SZU- B 42, který produkoval pouze spermin ( $1,15 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ ) v médiu MRS.

Tyto výsledky poukazují na to, že přítomnost dekarboxyláz a schopnost produkovat BA je specifitou kmenovou ne druhovou či rodovou. Dokonce i kmeny jednoho druhu se mohou lišit produkcí BA až o tři řády [12]. Toxické množství pro konkrétní aminy je velmi obtížné stanovit, závisí mimo jiné na schopnosti detoxikace systému, přítomnosti jiných aminů a řadě dalších vlivů. Potenciální toxické hodnoty pro tyramin jsou  $40\text{--}100 \text{ mg.kg}^{-1}$ , které vyvolávají mírné otravy [19]. Příjem vyšší než 100 mg může vyvolat zdravotní komplikace [12]. Probiotické kultury mají schopnost tvořit detekovatelná množství BA, která však nedokážou způsobit intoxikaci, ale mohou přispět k celkovému množství BA např. v mléčných výrobcích, kde se tyto kultury používají [30].

V této práci byla rovněž sledována kinetika produkce BA u kmene *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* DSM 10140 SZU-B 25. Nárůst bakterií byl sledován měřením pH a optické hustoty kultivačního média v časových intervalech u tekutého média MRS i WCH. Srovnáním růstové křivky s křivkou produkce tyraminu u testovaného kmene, zjistíme, že produkce v obou testovaných médiích začala během logaritmické fáze. Přičemž produkce tyraminu v médiu MRS narůstala postupně až do posledního odběrového intervalu po 72 hodinách na konečnou hodnotu  $2,61 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ . Kdežto v kultivačním médiu WCH docházelo k postupnému nárůstu v průběhu 27 hodin a následně se koncentrace měnila jen

nepatrně  $10,89 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ . Také koncentrace sperminu v MRS se zvyšovala průběžně již od logaritmické fáze na  $15,11 \pm 0,3 \text{ mg.l}^{-1}$ . Oproti tomu spermin v médiu WCH byl detekován až ve stacionární fázi a v průběhu kultivace pak postupně jeho koncentrace narůstala až na  $5,39 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ . Syntéza a aktivita dekarboxyláz závisí především na vlastnostech kultivačního prostředí [73].

V souvislosti s nárustem probiotických bakterií, docházelo ke kumulaci metabolitů a tím rovněž k poklesu pH. V dekarboxylačním médiu MRS docházelo vlivem nárustu bakterií k postupnému poklesu pH až na  $4,21 \pm 0,0$ , což bylo v souladu s kinetikou produkce BA. Ovšem pH u WCH se začalo výrazněji snižovat až po 48 hodinách na konečné pH  $5,21 \pm 0,0$ , kdežto produkce tyraminu byla zaznamenána již po 2 hodinách. Kinetiku dekarboxylázových reakcí může ovlivnit řada vnějších faktorů [17]. U BMK byla prokázána zvýšená dekarboxylázová aktivita v kyselém prostředí, kde jsou díky optimálnímu pH (4 až 5,5) schopné produkovat snad více BA [73, 14]. Naopak např. zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* a třeba i *Staphylococcus* nízkému pH rozhodně nejsou nakloněni [14]. Z toho plyne, že dekarboxylázová aktivita nezávisí pouze na optimálním pH, ale stejně důležitou vlastností je růstová aktivita dané bakterie [73].

Pro technologické účely je vhodné znát kinetiku tvorby BA za podmínek simulující technologický proces výroby např. fermentovaných mléčných výrobků [6]. Zástupci probiotických kultur patří mezi potencionální producenty BA a proto je nutné prověřovat na schopnost jejich tvorby [31]. Závěrem lze tedy říci, že ačkoliv probiotické kultury dokáží přispívat produkcí minimálního množství BA, jejich pozitivní probiotický účinek převažuje.

## ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala dekarboxylázovou aktivitou vybraných probiotických bakterií získaných z humánních izolátů střevní mikroflóry. Produkce biogenních aminů byla sledována u rodů *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* za podmínek *in vitro* v dekarboxylačních médiích MRS a Willkins Chalgren Broth.

- Na základě výsledků získaných vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s předkolonovou derivatizací dansylchloridem a UV detekcí lze konstatovat, že testované probiotické bakterie jsou schopné produkce aminů tyraminu a sperminu.
- Příhodnější pro produkci tyraminu bylo médium Willkins Chalgren Broth. Naopak vyšší koncentrace sperminu byly detekovány v dekarboxylačním médiu MRS. Rozdílnou produkci obou BA, je možné zdůvodnit odlišným složením dekarboxylačních médií.
- Bylo prokázáno, že všechny probiotické bakterie byly schopné produkovat biogenní aminy, ovšem tyto koncentrace byly zanedbatelné, proto by neměly mít vliv na lidské zdraví.
- Při srovnání průměrů stanovených hodnot BA u jednotlivých testovaných kmenů byl jako nejvýznamnější producent BA označen kmen *B. thermophilum* SZU- B 60, který ovšem produkoval tyramin i spermin pouze v médiu WCH.
- Spermin v médiu MRS nejvíce produkovala probiotická bakterie *B. longum* ssp. *longum* DSM 20218.
- Nejvyšší hodnoty tyraminu byly detekovány u *B. animalis* ssp. *animalis* SZU- B 46 v médiu WCH.
- Nejnižší dekarboxylázové aktivity byl schopný kmen *B. animalis* ssp. *animalis* SZU- B 42, který produkoval pouze spermin v médiu MRS.
- Na základě prvotního skríningu produkce BA humánními izoláty byl rovněž založen pokus sledující kinetiku produkce u kmene *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* DSM 10140 SZU-B 25. Z jehož výsledku lze konstatovat, že pH média i růst bakterií měl vliv na dekarboxylázovou aktivitu.

Na závěr této práce lze říci, že koncentrace biogenních aminů je důležitým ukazatelem kvality potravin. Proto je snahou sledovat jejich obsah v potravinách a zároveň kontrolovat faktory, které by jejich vznik mohly ovlivnit.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] BUŇKA, F., L. ZÁLEŠÁKOVÁ, R. FLASAROVÁ, V. PACHLOVÁ, P. BUDINSKÝ, L. BUŇKOVÁ. Biogenic amines content in selected commercial fermented products of animal origin. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2012, vol. 2, iss. 1, s. 209-218. ISSN 1338-5178.
- [2] SILLA-SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, vol. 29, iss. 2-3, s. 213-231. ISSN 0168-1605.
- [3] KAROVIČOVÁ, J. a Z. KOHAJDOVÁ. Biogenic Amines in Food. *Chemical Papers*. 2005, vol. 59, iss.1, s. 70-79. ISSN 0366-6352.
- [4] SCHNELLER, R., P. GOOD, M. JENNY. Influence of pasteurised milk, raw milk and different ripening cultures on biogenic amine concentrations in semi-soft cheeses during. *Z Lebensm Unters Forsch A*. 1997, vol. 204, iss. 4, s. 265-272. ISSN 1431-4630.
- [5] KOMPRDA, T. *Obecná hygiena potravin*. vyd. Brno, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004.145s. ISBN 80-7157-757-X.
- [6] SMĚLÁ D., P. PECHOVÁ, T. KOMPRDA, B. KLEJDUS a V. KUBÁŇ. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické Listy*. 2004, vol. 98, iss. 7, 432–437. ISSN 1213-7103.
- [7] LINARES, D. M., M. C. MARTÍN, V. LADERO, M. A. ALVAREZ a M. FERNÁNDEZ. Biogenic Amines in Dairy Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011, vol. 51, iss. 7, s. 691-703. ISSN 1040-8398.
- [8] STANDAROVÁ E., L. VORLOVÁ a I: BORKOVCOVÁ. Zastoupení vybraných biogenních aminů v sýrech s bílou plísní na povrchu. *Acta fytotechnica et zootecnica*. 2009, Mimoriadne číslo, s. 610-617, 2009. ISSN 1336-9245.
- [9] BACHRACH, U. Naturally Polyamines: Interaction with Macromolecules. *Current Protein and Peptide Science*. 2005, vol. 6, p 559-566. ISSN 1389-2037.
- [10] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. 2. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. 343 s. ISBN 80-86659-02-X.
- [11] BUŇKOVÁ L., F. BUŇKA, V. DRÁB, S. KRÁČMAR a V. KUBÁŇ. Effects of NaCl, lactose and availability of oxygen on tyramine production by the *Entero-*

- coccus durans* CCDM 53. *European Food Research and Technology*. 2012, vol. 234, iss. 6, s. 973-979. ISSN1438-2377.
- [12] KOHAJOVÁ, Z., J. KAROVIČOVÁ a G. GREIF. Biogénne amíny v potravinách. *Potravinárstvo*. 2008, vol. 2, iss. 2, s. 30-49. ISSN 1338-0230.
- [13] HALÁSZ, A., Á. BARÁTH, A. L. SIMON-SARKADI a W. HOLZAPFEL. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*. 1994, vol. 5, iss. 2, s. 42-49. ISSN 0924-2244.
- [14] SHALABY, A., R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 1996, vol. 29, iss. 7, s. 675-690. ISSN 0963-9969.
- [15] Guide to the BioCyc Database Collection. *MetaCyc Encyclopedia of Metabolic Pathways* [online]. ©2013 [cit. 2013-02-10]. Dostupné z: <http://www.biocyc.org/metacyc/index.shtml>.
- [16] SHAH, P., E. SWIATLO. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Molecular Microbiology*. 2008, vol. 68, iss.1, 4-16. ISSN 1365-2958.
- [17] BUŇKOVÁ L., F. BUŇKA, E. POLLAKOVÁ, T. PODEŠVOVÁ, V. DRÁB a S KRÁČMAR. Vliv aerobního/anaerobního prostředí na dekarboxylázovou aktivitu vybraných bakterií mléčného kvašení. *Potravinárstvo*. 2010, vol. 4, iss. 2, s 5-7. ISSN1338-0230.
- [18] SUZZI, G., F. GARDINI. Biogenic amines in dry sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, vol. 88, iss. 1, s. 41-54. ISSN 0168-1605.
- [19] ERKKILÄ, S., M. L. SUIHKO, S. EEROLA, E. PETÄJÄ a T. MATTILA-SANDHOLM. Dry sausage fermented by *Lactobacillus rhamnosus* strains. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 64, iss. 1-2, s. 205-210. ISSN 0168-1605.
- [20] BOVER-CID, S., M. IZQUIERDO-PULIDO a M. C. VIDAL-CAROU. Influence of hygienic quality of raw material on biogenic amine production during ripening and storage of dry fermented sausages. *Journal of Food Protection*. 2000, vol. 63, iss.11, s. 1544– 1550. ISSN 0362-028X.
- [21] KŘÍŽEK, K., KALÁČ, P. Biogenní aminy v potravinách a jejich role ve výživě, přehled. *Czech Journal of Food Science*. 1998, vol. 16, iss. 4, s. 1-159. ISSN 1212-1800.



- [22] PLEVA P., L. BUŇKOVÁ, A. LAUKOVÁ, E. LORENCOVÁ, V. KUBÁŇ a F. BUŇKA. Factors affected decarboxylation activity of *Enterococcus faecium* isolated from rabbit. *Potravinarstvo* [online]. 2012, vol. 6, no. 2 [cit. 2013-05-08]. ISSN 1337-0960. Dostupné z: <http://www.potravinarstvo.com/journal1/index.php/potravinarstvo/article/view/182/171>
- [23] KOMPRDA, T., D. SMĚLÁ, K. NOVICKÁ, L. KALHOTKA, K. ŠUSTOVÁ a P. PECHOVÁ. Content and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard cheese. *Food Chemistry*. 2007, vol. 102, iss. 1, s. 129-137. ISSN 0308-8146.
- [24] STANDAROVÁ, E., BORKOVCOVÁ I. a VORLOVÁ L. Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě. *Veterinářství*. 2008, vol. 58, s. 735-739. ISSN 0506-8231.
- [25] BOVER-CID, S., M. IZQUIERDO-PULIDO a M. C. VIDAL-CAROU. Effect of the interaction between a low tyramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic staphylococci on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 65, iss. 1-2, s. 113–123. ISSN 0168-1605.
- [26] ŠPIČKA, J., P. KALACH, S. BOVER-CID a M. KRŽÍŽEK. Application of lactic acid bacteria starter cultures for decreasing the biogenic amine levels in sauerkraut. *European Food Research and Technology*. 2002, vol. 215, s. 509–514. ISSN 1438-2377.
- [27] T. LAVIZZARI, M. T. VECIANA-NOGUÉS, O. WEINGART, S. BOVER-CID, A. MARINÉ-FONT a M. C. VIDAL-CAROU. Occurrence of Biogenic Amines and Polyamines in Spinach and Changes during Storage under Refrigeration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, vol. 55, iss. 23, s. 9514–9519. ISSN 0021-8561.
- [28] LORET, S., P. DELOYER a G. DANDRIFOSSE. Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: Data from Belgian samples. *Food Chemistry*. 2005, vol. 89, iss. 4, s. 519–525. ISSN 0308-8146.
- [29] MARINO, M., M. MAIFRENI, I. BARTOLOMEOLI a G. RONDININI. Evaluation of amino acid-decarboxylative microbiota throughout the ripening of an Italian PDO cheese produced using different manufacturing practices. *Journal of Applied Microbiology*. 2008, vol. 105, iss. 2, s. 540–549. ISSN 1364-5072.

- [30] LORENCOVÁ, E., L. BUŇKOVÁ, D. MATOULKOVÁ, V. DRÁB, P. PLEVA, V. KUBÁŇ a F. BUŇKA. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *International Journal of Food Science & Technology*. 2012, vol. 47, iss.10, s. 2086–2091. ISSN 0950-5423.
- [31] SLÁDKOVÁ, P., T. KOMPRDA a R. BURDYCHOVÁ. *Screening of starter and probiotic cultures intended for processing of fermented meat products for their ability to produce biogenic amine*[online]. 2007, [cit. 2013-03-18]. Dostupné z:<http://mnet.mendelu.cz/mendelnet07agro/articles/tp/sladvka.pdf>
- [32] MARTUSCELLI, M., M. A. CRUDELE, F. GARDINI a G. SUZZI. Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosum* strains from artisanal fermented sausages. *Letters in Applied Microbiology*. 2000, vol. 31, iss. 3, s. 228–232. ISSN 0266-8254.
- [33] BOVER-CID, S. a W. H. HOLZAPFEL. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, vol. 53, iss. 1, s. 33–41. ISSN 0168-1605.
- [34] LONVAUD-FUNEL, A. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2001, vol. 199, iss.1 [cit. 2013-20-03]. ISSN 1574-6968. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10643.x/pdf>
- [35] PRIYADARSHANI, W. M. D. a S. K. RAKSHIT. Screening selected strains of probiotic lactic acid bacteria for their ability to produce biogenic amines (histamine and tyramine). *International Journal of Food Science & Technology*. 2011, vol. 46, s. 2062–2069. ISSN 0168-1605.
- [36] GREIF, G., M. GREIFOVÁ, J. DVORAN, J. KAROVIČOVÁ a V. BUCHTOVÁ. Štúdium rastu a produkcie biogénnych amínov nektorými mikroorganizmami za modelových podmienok. *Czech Journal of Food Science*. 1998, vol. 17, iss. 1, s. 15-21. ISSN 1212-1800.
- [37] ŠTEGNEROVÁ, H., E. NÁPRAVNÍKOVÁ, I. STEINHAUSEROVÁ a P. ŠVEC. Identifikace bakterií mléčného kvašení v mase baleném v podmínkách ochranné Atmosféry. *Veterinářství*. 2007, vol. 57, iss.1, s. 39-42. ISSN 0506-8231.
- [38] LEUSCHNER, R. G. K., R. KURIHARA a W. P. HAMMES. Formation of biogenic amines by proteolytic enterococci during cheese ripening. *Journal of the*

- Science of Food and Agriculture*. 1999, vol. 79, iss. 8, s. 1141–1144. ISSN 0022-5142.
- [39] LEUSCHNER, R. G., M. HEIDEL a W. P. HAMMES. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 1998, vol. 39, iss. 1-2, s. 1-10. ISSN 0168-1605.
- [40] MASON, F., R. TALON a M. C. MANTEL. Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, vol. 32, iss. 1–2, s. 199–207. ISSN 0168-1605.
- [41] JOOSTEN, H. M. L. J., a M. NUÑEZ. Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin-producing lactic Acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996, vol. 62, no. 4, s. 1178-1181. ISSN 0099-2240.
- [42] SACCANI, G, E. TANZI E, P. PASTORE, S. CAVALLI a M. REY. Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by suppressed ion chromatography-mass spectrometry using a cation-exchange column. *Journal Chromatography A*. 2005, vol. 1082, no. 1, s. 43-50. ISSN 0021-9673.
- [43] KOMPRDA T., K. NOVICKÁ, L. KALHOTKA a D. SMĚLÁ. Biogenic Amine Content in Sterilised and Pasteurised Long-Term Stored Processed Cheese. *Czech Journal of Food Science*. 2005, vol. 23, no. 5, s. 209-216. ISSN 1212-1800.
- [44] NAILA A., S. FLINT, G. FLETCHER, P. BREMER, a G. MEERDINK. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science*. 2010, vol. 75, iss. 7, s.139–150. ISSN 1750-3841.
- [45] BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science Technology*. 1995, vol. 6, iss. 10, s. 341–346. ISSN 0924-2244.
- [46] EFSA. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* [online]. 2011, vol. 9, iss. 10 [cit. 2013-03-27]. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2393.pdf>
- [47] Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. Listopadu 2005 O mikrobiologických kritériích pro potraviny. Dostupný z:<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:CS:PDF>

- [48] WHO. *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria* [online]. [cit. 2012-06-28]. Dostupné z: [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf)
- [49] GROFOVÁ, Z. Probiotika a jejich vliv na dyslipidemii a diabetes. *Medicína pro praxi*. 2010, vol. 7, iss. 5, s. 233–234. ISSN 1214-8687.
- [50] RADA, V. Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. *Interní Medicína pro praxi*. 2010; vol. 12, iss.2, s. 92–97. ISSN 1212-7299.
- [51] HORÁČKOVÁ, Š., K. ŽALUDOVÁ a M. PLOCKOVÁ. Výběr bakterií mléčného kvašení s probiotickými vlastnostmi. *Mlékařské listy* [online]. 2010, vol. 123 [cit. 2013-03-18]. ISSN 1212-950X. Dostupné z: [http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2010/123\\_s\\_iv-vii.pdf](http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2010/123_s_iv-vii.pdf)
- [52] NECIDOVÁ L., Š. CUPÁKOVÁ, B. JANŠTOVÁ, P. NAVRÁTILOVÁ. Úloha probiotik v kysaných mléčných výrobcích. *Veterinářství*. 2002 vol. 52, s. 66-68. ISSN 0506-8231.
- [53] FRIČ P. Probiotika, prebiotika a atopie. *Dermatologie v praxi*. 2007; vol. 1, iss. 2, s. 87–89. ISSN 1802-2960.
- [54] TURPIN, W., CH. HUMBLLOT, M. THOMAS a J. P. GUYOT. Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, vol. 143, s. 87-102. ISSN 0168-1605.
- [55] MARŠÁLOVÁ, L. Do jaké míry mohou prebiotika a probiotika ovlivnit změnu osídlení zažívacího traktu. *Bioprospect*. 2011, vol. 21, iss. 3, s. 56-58. ISSN 1210-1737.
- [56] FELIS, G. E., F. DELLAGLIO, S. TORRIANI. Taxonomy of probiotic microorganisms. In: CHARALAMPOPOULOS, D., RASTALL, R. A., *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. New York: Springer. 591-637, s. 1252. ISBN 978-0-387-79057-2
- [57] TAMIME, A. Y., M. SAARELA, A. KORSLUND SØNDERGAARD, V. V. MISTRY a N. P. SHAH. Production and Maintenance of Viability of Probiotic Micro-organisms in Dairy Products. In: TAMIME, A. Y. *Probiotic dairy product*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2005, s. 256. ISBN 1-4051-2124-6.

- [58] TODOROV S. D. a B. D. GOMBOSSY DE MELO FRANCO. *Lactobacillus plantarum*: Characterization of the Species and Application in Food Production. *Food Reviews International*. 2010, vol. 26, iss. 3, str. 205-209. ISSN: 8755-9129.
- [59] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [60] ANONYM. *Potravinářská mikrobiologie I – Mikroorganismy v potravinářství* [online]. UTB ve Zlíně, Technologická fakulta. [cit. 2013-04-04]. Dostupné z: <http://utb.cepac.cz/Screens/Explorer.aspx?id=7>.
- [61] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*, 2. opravené vyd. Praha: Academia, 2002, dotisk 2007, 192 s. ISBN 80-200-0439-4.
- [62] HASSAN, A. N. a J. F. FRANK. Starter cultures and their use. Metabolism. In: MARTH, E. H. a J. L. STEELE. *Applied Dairy Microbiology*. Second edition, revised and expanded. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001, s. 736. ISBN 0-8247-0536-X.
- [63] EFSA. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed. *EFSA Journal* [online]. 2011, vol. 9., iss.12 [cit. 2013-03-27]. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2497.pdf>
- [64] MASSON, F., R. TALON a M. C. MONTEL. Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, vol. 32, s. 199–207. ISSN 0168-1605.
- [65] BOVER-CID, S., M. HUGAS, M. IZQUIERDO-PULIDO, M. C. VIDAL-CAROU. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 66, iss.3, s. 185-189. ISSN 0168-1605.
- [66] PEREIRA, C. I., M. T. BARRETO CRESPO a M. V. SAN ROMÃO. Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 68, iss. 3, s. 211-216. ISSN 0168-1605.
- [67] MAIJALA, R. M. Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. *Letters in Applied Microbiology*. 1993, vol. 17, iss. 1, s. 40–43. ISSN 0266-8254.

- [68] LANDETE J. M., S. FERRER, I. PARDO. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control*. 2007, vol. 18, iss. 12, s. 1569–1574. ISSN 0956-7135.
- [69] ARENA, M. E., D. FIOCCO, M. C. MANCA DE NADRA, I. PARDO, G. SPANO. Characterization of a *Lactobacillus plantarum* Strain Able to Produce Tyramine and Partial Cloning of a Putative Tyrosine Decarboxylase Gene. *Current microbiology*. 2007, vol. 55 iss. 3, s. 205-210. ISSN 0343-8651.
- [70] LANDETE J. M., S. FERRER, I. PARDO. Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine? *Journal of applied microbiology*. 2005, vol. 99, iss. 3, s. 580-586. ISSN 1364-5072.
- [71] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, M. HLOBILOVÁ, Z. VAŇÁTKOVÁ, D. NOVÁKOVÁ a V. DRÁB. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*. 2009, vol. 229, s. 533-538. ISSN 1438-2377.
- [72] PIRCHER, A., F. BAUER, P. PAULSEN. Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *European Food Research and Technology*. 2007, vol. 226, s. 225–231. ISSN 1438-2377.
- [73] GARDINI, F., M. MARTUSCELLI, M. C. CARUSO, F. GALGANO, M. A. CRUDELE, F. FAVATI, M. E. GUERZONI, G. SUZZI. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 64, iss. 1-2 s. 105-117. ISSN 0168-1605.
- [74] PLEVA, P., L. BUŇKOVÁ, A. LAUKOVÁ, E. LORENCOVÁ, V. KUBÁŇ a F. BUŇKA. Decarboxylation Activity of Enterococci Isolated from Rabbit Meat and Staphylococci Isolated from Trout Intestines. *Veterinary Microbiology*. 2012, vol. 159, iss. 3-4, s. 438-442. ISSN 0378-1135.
- [75] RUDOLFOVÁ, J. a L. ČURDA. Prebiotický účinek galaktooligosacharidů a využití pro jejich produkci. *Chemické Listy*. 2005, vol. 99, iss. 3, s. 168-174. ISSN 1213-7103.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

BA	Biogenní aminy
MO	Mikroorganizmy
BMK	Bakterie mléčného kvašení.
MAO	Monoaminoxidáza
DAO	Diaminoxidáza
HNMT	Histidin-N-methyltransferáza

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Kofaktor pyridoxalfosfát-5-fosfát [15] .....	14
Obr. 2. Dekarboxylace histidinu a lyzinu [15] .....	15
Obr. 3. Dekarboxylace putrescinu [15] .....	15
Obr. 4. Vznik tyraminu [15] .....	16
Obr. 5. Vznik spermidinu [15] .....	16
Obr. 6. Vznik sperminu [15] .....	17
Obr. 7. Vznik 2-fenyletylaminu [15] .....	17
Obr. 8. Metabolismus histaminu v lidském těle [12] .....	29
Obr. 9. <i>Lactobacillus casei</i> [60] .....	34
Obr. 10. <i>Bifidobacterium</i> sp. [60] .....	35
Obr. 11. <i>Enterococcus faecium</i> [60] .....	36
Obr.12. Produkce biogenních aminů u probiotických kmenů <i>B. longum</i> .....	48
Obr. 13. Produkce biogenních aminů u probiotických kmenů <i>B. bifidum</i> .....	48
Obr. 14. Produkce biogenních aminů u probiotických kmenů <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> .....	50
Obr. 15. Produkce biogenních aminů probiotických kmenů <i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> .....	50
Obr. 16. Produkce biogenních aminů u ostatních kmenů bifidobakterií .....	51
Obr. 17. Produkce biogenních aminů u ostatních probiotických kmenů .....	51
Obr. 18. Graf závislosti pH v čase u kmene <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140 SZU-B 25 kultivovaného v dekarboxylačním médiu MRS .....	53
Obr. 19. Graf závislosti pH v čase u kmene <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140 SZU B 25 kultivovaného v dekarboxylačním médiu WCH .....	53
Obr. 20. Vývoj optické denzity kmene <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140 v čase kultivace. ....	54
Obr. 21. Srovnání produkce tyraminu v časových intervalech u kmene <i>B.</i> <i>animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140 SZU-B 25 u obou dekarboxylačních médií .....	55
Obr. 22. Srovnání produkce sperminu v časových intervalech u kmene <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140 u obou dekarboxylačních médií .....	56



**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1. Chemická struktura potravinářsky významných BA a jejich prekurzorů [10,11].....	13
Tab. 2. Příklady bakterií produkujících BA v potravinách [10, 12].....	24
Tab. 3. BA, produkty transformace a biologický význam [10].....	27
Tab. 4. Příprava jednotlivých pufrů použitých při derivatizaci.....	45

## SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA I: Výsledky stanovení BA u probiotických bakterií

## PŘÍLOHA P I: VÝSLEDKY STANOVENÍ BA U PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ

Název probiotického kmene	Dekarboxylační médium WCH		Dekarboxylační médium MRS	
	Množství tyraminu (mg.l <sup>-1</sup> )*	Množství sperminu (mg.l <sup>-1</sup> )*	Množství tyraminu (mg.l <sup>-1</sup> )*	Množství sperminu (mg.l <sup>-1</sup> )*
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> DSM 20097 SZU – B1	12,34±0,3	ND	2,25±0,1	22,29±0,1
<i>B. longum</i> BIFIDO IBS SZU – B2	10,61±0,3	ND	1,48±0,1	22,55±0,3
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> DSM 20218	10,03±0,3	ND	1,71±0,0	25,4±0,3
<i>B. longum</i> BIFIDO IBS SZU – B10	11,31±0,2	0,83±0,1	0,62±0,1	13,84±0,2
<i>B. longum</i> BIFIDO IBS SZU – B15	11,83±0,2	3,04±0,1	1,04±0,0	16,6±0,3
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> DSM 20097 SZU – B18	11,10±0,1	ND	1,64±0,2	16,61±0,3
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> DSM 20097 SZU – B26	10,40±0,3	ND	0,7±0,1	14,47±0,2
<i>B. longum</i> SZU- B 34	10,04±0,3	3,71±0,2	ND	11,28±0,5
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> SZU - B40	10,84±0,3	ND	ND	7,76±0,3
<i>B. longum</i> SZU - B51	7,7±0,1	ND	1,02±0,0	ND
<i>B. longum</i> ssp. <i>suis</i> SZU- B57	0,8±0,1	4,5±0,2	1,16±0,0	ND
<i>B. longum</i> ssp. <i>suis</i> SZU- B 61	11,07±0,4	18,61±0,1	1,39±0,1	2,15±0,1
<i>B. bifidum</i> DSM 20239	14,2±0,3	ND	2,57±0,1	14,26±0,2
<i>B. bifidum</i> 48 PIM	10,49±0,1	ND	2,78±0,2	18,82±0,2
<i>B. bifidum</i> DSM 20082	11,05±0,2	ND	1,19±0,1	21,36±0,3
<i>B. bifidum</i> SZU - B32	10,1±0,3	ND	ND	4,59±0,1
<i>B. bifidum</i> SZU - B 33	10,38±0,2	ND	ND	3,18±0,1
<i>B. bifidum</i> SZU - B 36	12,32±0,3	ND	ND	8,1±0,2
<i>B. bifidum</i> SZU - B 37	10,46±0,3	ND	1,46±0,0	3,69±0,1
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> SZU-B13	ND	ND	1,21±0,1	ND
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140 SZU – B17	ND	ND	1,3±0,1	ND
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140 SZU – B20	11,59±0,5	ND	ND	0,7±0,1

<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140 SZU – B21	11,11±0,4	ND	ND	10,11±0,4
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140 SZU – B22	11,53±0,3	ND	1,3±0,1	13,68±0,4
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140 SZU – B23	3,68±0,0	ND	ND	ND
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140 SZU – B25	13,42±0,1	ND	1,14±0,1	13,93±0,4
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140 SZU – B27	10,47±0,1	ND	1,48±0,1	16,41±0,4
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> SZU - B28	9,57±0,2	ND	1,66±0,1	4,68±0,1
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> SZU - B29	9,06±0,1	ND	1,58±0,1	9,67±0,3
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> SZU – B38	ND	5,95±0,1	ND	ND
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> SZU – B41	10,46±0,3	ND	ND	9,29±0,4
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> SZU – B42	ND	ND	1,15±0,1	ND
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> SZU – B44	11,18±0,5	ND	0,74±0,0	9,43±0,3
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> SZU – B45	10,69±0,5	ND	ND	9,2±0,1
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> SZU – B46	11,95±0,3	ND	ND	15,6±0,1
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> SZU – B54	10,8±0,4	3,26±0,2	5,22±0,2	17,73±0,3
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> SZU – B59	9,56±0,3	6,36±0,1	ND	10,32±0,3
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> SZU – B63	1,1±0,1	4,32±0,1	1,4±0,0	ND
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> SZU – B64	1,58±0,0	9,8±0,1	ND	ND
<i>B. breve</i> DSM 20213T	11,2±0,4	ND	1,91±0,0	24,27±0,6
<i>B. breve</i> SZU – B24	11,93±0,1	2,25±0,1	ND	10,03±0,2
<i>B. choerinum</i> SZU – B43	ND	3,23±0,1	ND	ND
<i>B. thermophilum</i> SZU – B56	11,75±0,1	ND	ND	13,55±0,3
<i>B. thermophilum</i> SZU – B60	11,24±0,2	18,6±0,1	ND	ND
<i>B. ruminantium</i> SZU – B48	1,68±0,1	12,43±0,3	ND	ND
<i>Bifidobacterium</i> sp. SZU – B24	11,46±0,3	ND	ND	11,76±0,2
<i>B. pseudolongum</i> SZU – B47	3,3±0,1	11,95±0,2	3,54±0,1	12,23±0,2
<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i> SZU – B49	11,71±0,3	1,51±0,1	2,26±0,1	23,7±0,3
<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i> SZU – B50	ND	4,58±0,1	0,89±0,0	ND
<i>Lbc. bombi</i> sp. nov. SZU – B52	11,75±0,4	3,85±0,1	3,29±0,2	17,04±0,2

<i>Lbc. bombi</i> sp. nov. SZU – B53	10,4±0,2	ND	1,7±0,1	1,57±0,1
<i>Lactobacillus reuteri</i> SZU – L1	ND	ND	ND	1,32±0,0
<i>Vagococcus entomophilum</i> sp. nov. SZU – B31	0,71±0,0	5,25±0,2	0,88±0,1	1,87±0,1

\* výsledky vyjádřeny jako průměr±směrodatná odchylka

\*\* ND – nebylo detekováno