

Vliv vnějších faktorů na produkci biogenních aminů u *Lactobacillus rhamnosus*

Lucie Vítková

Bakalářská práce
2014

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lucie Vítková**

Osobní číslo: **T11365**

Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Vliv vnějších faktorů na produkci biogenních aminů u *Lactobacillus rhamnosus***

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika a vznik biogenních aminů.
2. Výskyt biogenních aminů v potravinách a metody jejich stanovení.
3. Charakteristika bakterií rodu *Lactobacillus*.

II. Praktická část

1. Sledování vybraných faktorů na produkci biogenních aminů u kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 v podmínkách *in vitro* a v mléce metodou HPLC.
2. Zpracování výsledků.
3. Formulace závěrů na základě získaných výsledků.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

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

[2] Halász, A., Baráth, Á, Simon-Sarkadi, L. and Holzapfel, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. Trends Food Sci Technol. 5: 42-49. 1994.

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

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

[5] VELÍŠEK, J. Chemie potravin III. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902391-5-3.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

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

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

Ve Zlíně dne 3. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




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

Příjmení a jméno: VITKOVÁ LUCIE

Obor: CHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- 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. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ 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 § 60³⁾ 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 2.5.2019

Vitková

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

(1) Vysoká škola nevyjádřeně 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.*

³⁷ 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).*

³⁸ 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 díla:

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

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

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

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá problematikou biogenních aminů. Práce je rozdělena na teoretickou část, která se zabývá jejich obecnou charakteristikou, výskytem v potravinách, biologickými účinky, faktory ovlivňující jejich vznik a metodami stanovení. Poslední teoretická část je věnována obecné charakteristice rodu *Lactobacillus*. V praktické části práce jsou sledovány vnější podmínky ovlivňující produkci biogenních aminů kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289. Ke stanovení biogenních aminů byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie, zkoumaná bakterie byla schopná produkovat tyramin, spermin a spermidin. Nejvíce produkovaným biogenním aminem byl tyramin, nejvyšší koncentrace 350 mg.l⁻¹ byla detekována v médiu obsahující laktózu v koncentraci 1 % (w/v) s počátečním pH 5.

Klíčová slova: biogenní aminy, dekarboxylázová aktivita, *Lactobacillus*

ABSTRACT

The bachelor thesis deals with the problematic of biogenic amines. Thesis is divided to theoretical part, which deals with the general characteristics, their occurrence in foods, biological effects, factors influencing the formation and methods of determination. Last theoretical part is devoted to the general characteristics of the genus *Lactobacillus*. In the practical part of the work is monitored the effect of selected factors on the production of biogenic amines strain *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289. For the determination of biogenic amines was used high-performance liquid chromatography, tested bacteria were able to produce tyramine, spermine and spermidine. The most produced biogenic amine was tyramin, the highest concentration of 350 mg.l⁻¹ was detected in the medium with initial pH 5 consisting of lactose at a concentration of 1 % (w/v).

Keywords: biogenic amines, decarboxylase activity, *Lactobacillus*

Poděkování

Mé upřímné poděkování patří vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D za odborné vedení, podporu, trpělivost, vstřícnost a věnovaný čas při zpracování této práce. Poděkování také patří laborantkám Lence Machákové, Bc. Veronice Kučábové a Ing. Ludmile Zálešákové za ochotu a pomoc v laboratoři při měření praktické části práce.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 BIOGENNÍ AMINY	12
1.1 ROZDĚLENÍ A VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ	12
1.2 VÝSKYT V POTRAVINÁCH	13
1.2.1 Potraviny rostlinného původu	14
1.2.1.1 Nefermentované potraviny rostlinného původu	14
1.2.1.2 Fermentované potraviny rostlinného původu	15
1.2.2 Potraviny živočišného původu	15
1.2.2.1 Maso, masné výrobky	15
1.2.2.2 Ryby	16
1.2.2.3 Sýry	17
1.2.3 Nápoje	17
1.2.3.1 Víno	17
1.2.3.2 Pivo	18
1.2.4 Legislativní limity BA v potravinách.....	19
1.2.5 Mikroorganismy produkující biogenní aminy v potravinách	19
1.3 BIOLOGICKÉ ÚČINKY	20
1.3.1 Skombrotoxikóza	21
1.3.2 Intoxikace tyraminem.....	21
1.4 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITU	21
1.4.1 Vliv pH.....	22
1.4.2 Vliv teploty.....	22
1.4.3 Vliv startovacích kultur u fermentovaných výrobků	22
1.4.4 Vliv konzervačních a přídatných látek.....	23
1.4.5 Balení	23
1.4.6 Vliv NaCl	24
1.4.7 Ostatní faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu.....	24
1.5 STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	24
1.5.1 Chromatografie	24
1.5.1.1 Kapalinová chromatografie.....	25
1.5.1.2 Plynová chromatografie	26
1.5.1.3 Chromatografie na tenké vrstvě	26
1.5.1.4 Kapilární elektroforéza	27
2 LACTOBACILLUS	28
2.1 PROBIOTICKÉ ÚČINKY RODU <i>LACTOBACILLUS</i>	29
2.1.1 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	29
II PRAKTICKÁ ČÁST	31
3 CÍL PRÁCE	32
4 MATERIÁLÝ A METODIKA	33

4.1	PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	33
4.2	POUŽITÉ MIKROORGANIZMY.....	33
4.3	KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	33
4.3.1	Modifikovaný bujón MRS	33
4.3.2	Mléko	34
4.3.3	Obohacené mléko.....	34
4.4	STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ METODOU HPLC.....	34
4.4.1	Zaočkování kultivačních medií	34
4.4.2	Příprava vzorků pro derivatizaci před HPLC	35
4.4.3	Derivatizace dansylchloridem.....	35
4.4.4	Chromatografické stanovení biogenních aminů.....	36
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	37
5.1	VLIV KONCENTRACE LAKTÓZY, pH A KULTIVAČNÍ TEPLoty NA PRODUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ KMENEM <i>LACTOBACILLUS RHAMNOSUS</i> CCDM 289 V BUJÓNU MRS	37
5.2	VLIV pH, KULTIVAČNÍ TEPLoty A PŘÍTOMNOSTI AMINOKYSELIN NA PRODUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ KMENEM <i>LACTOBACILLUS RHAMNOSUS</i> CCDM 289 V MLÉKU	40
5.3	SLEDOVÁNÍ ZMĚNY pH U KULTIVAČNÍCH MÉDÍÍ	41
5.4	SOUHRNNÁ DISKUZE	42
	ZÁVĚR	45
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	46
	SEZNAM OBRÁZKŮ	50
	SEZNAM TABULEK.....	51
	SEZNAM PŘÍLOH.....	52

ÚVOD

Biogenní aminy jsou alifatické, aromatické anebo heterocyklické nízkomolekulární dusíkaté báze s různými biologickými účinky. Mohou se vyskytovat ve všech potravinách jako běžné, produkty metabolismu. Za produkci biogenních aminů v potravinách jsou odpovědny mikroorganismy vybaveny enzymy dekarboxylázami. Mezi tyto mikroorganismy patří četné druhy hnilobných bakterií, ale také řada druhů bakterií mléčného kvašení. Proto vyšší množství biogenních aminů vzniká při výrobě fermentovaných výrobků, jako jsou sýry, trvanlivé salámy, pivo a víno, ale také během skladování masa a ryb působením kontaminující mikroflóry. Mezi významné faktory, kterými lze v potravinách ovlivnit produkci biogenních aminů patří skladovací podmínky, výrobní postupy, kvalita vstupní suroviny, způsob balení potraviny, pH potraviny, přítomnost kontaminující mikroflóry s dekarboxylázovými enzymy a výběr vhodných startovacích kultur při fermentaci. V platné legislativě je stanoveno pouze maximální přípustné množství histaminu vyskytující se v rybách. (Santos, 1996, s. 19; Velíšek, 1999, s. 368)

Praktická část je zaměřena na produkci biogenních aminů probiotickým kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289. Dekarboxylázová aktivita byla sledována za působení různých faktorů v modifikovaném bujónu MRS a mléku. Produkované biogenní aminy byly stanoveny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

I. TEORETICKÁ ČÁST

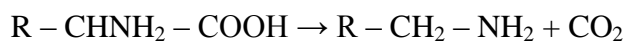
1 BIOGENNÍ AMINY

Aminy, dříve označovány jako ptomainy, neboli mrtvolné jedy, mají zpravidla výrazný fyziologický účinek, proto se označují jako biogenní (Klaban, 2005, s. 654). Biogenní aminy jsou bazické sloučeniny, které vznikají působením metabolismu mikroorganismů, rostlin a zvířat převážně dekarboxylací aminokyselin, popřípadě aminací anebo transaminací aldehydů a ketonů. (Křížek a Kalač, 1998, s. 9; Santos, 1996, s. 19)

1.1 Rozdělení a vznik biogenních aminů

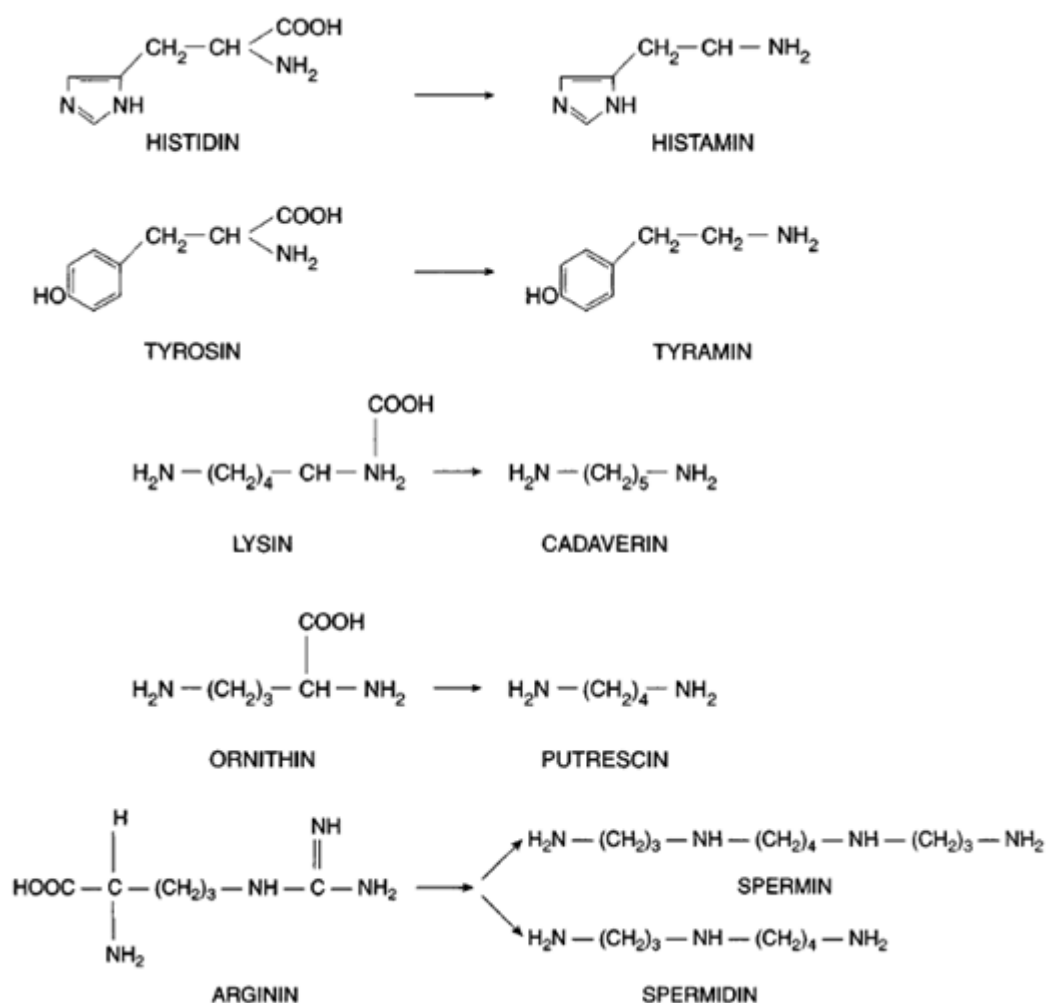
Je několik možností, jak biogenní aminy rozdělit. Podle chemické struktury se aminy dělí na alifatické (putrescin, kadaverin, spermin a spermidin), aromatické (tyramin, fenyletylamin) a heterocyklické (histamin a tryptamin). Podle počtu amino skupin se dělí na monoaminy (tyramin, fenyletylamin), diaminy (putrescin, kadaverin) a polyaminy (spermin, agmatin a spermidin). (Křížek a Kalač, 1998, s. 9; Linares et al., 2011, s. 14)

Většina biogenních aminů vzniká dekarboxylací přirozeně se vyskytujících aminokyselin. Při dekarboxylaci je odštěpen oxid uhličitý z karboxylové skupiny aminokyseliny, vzniká příslušný amin a oxid uhličitý (Klaban, 2005, s. 654). Dekarboxylaci lze obecně vyjádřit rovnicí:



Kofaktorem převážné většiny dekarboxylázových enzymů, které katalyzují reakci, je pyridoxalfosfát. Pyridoxalfosfát se vyskytuje u gramnegativních bakterií. Grampozitivní bakterie používají enzymy s kovalentně vázaným pyruvolem. (Velíšek, 1999, s. 368; Kalač a Glória, 2009, s. 43; Landete et al., 2007, s. 12)

Dekarboxylací histidinu (působením histidindekarboxylázy) vzniká histamin, z lyzinu (působením lyzindekarboxylázy) vzniká kadaverin, z fenylalaninu (fenylalanindekarboxylázou) vzniká fenyletylamin, z argininu (arginindekarboxylázou) vzniká agmatin a dále putrescin, ten může vznikat také přímo dekarboxylací ornitinu (ornithindekarboxylázou). Z putrescinu vzniká spermidin a spermin. (Velíšek, 1999, s. 368) Vznik vybraných biogenních aminů je uveden na Obrázku 1. (Adams a Nout, 2001, s. 314)



Obr. 1. Vznik vybraných biogenních aminů (Adams a Nout, 2001, s. 314)

1.2 Výskyt v potravinách

Pro tvorbu významného množství biogenních aminů v potravinách je nutné, aby potraviny obsahovaly dostatečné množství volných aminokyselin (popřípadě řetězce peptidů, obsahující požadované aminokyseliny), vyskytující se bakterie byly vybaveny enzymy dekarboxylázami a dále, aby byly splněny podmínky (např. teplota, pH, doba skladování), které umožňují růst bakterií a biosyntézu dekarboxyláz (Křížek, Kalač, 1998, s. 9; Roig-Sagués et. al, 2009, s. 30). Je obtížné, až nemožné, uvést průměrné a tabulkové hodnoty obsahu biogenních aminů v potravinách, protože jejich obsahy kolísají v širokém rozmezí několika řádů, a to nejen mezi jednotlivými druhy potravin, ale i uvnitř druhů. (Křížek a Kalač, 1998, s. 9)

Biogenní aminy vznikají v potravinách bohatých na bílkoviny, jako jsou maso a masné výrobky, ale také v potravinách rostlinného původu a alkoholických nápojích (Roig-Sagués et. al, 2009, s. 30). Ve fermentovaných potravinách, např. fermentovaných salámech, v sýru, pivu, vínu a kysaném zelí, jsou biogenní aminy přirozenou a pravidelnou součástí, jedná se o potraviny s vyšším rizikem výskytu biogenních aminů. U nefermentovaných potravin jsou především indikátorem nežádoucí mikrobiální činnosti a stanovení může být využito k posouzení míry rozkladu sledované potraviny. V případě skladování potravin může být obsah biogenních aminů ukazatelem jakosti vstupní suroviny a úrovně hygieny během výrobního procesu a skladování. (Standarová, Borkovcová a Vorlová, 2008, s. 6)

Odstranění biogenních aminů z potravin je obtížné, při tepelném zpracování dochází jen k částečnému snížení obsahu, kdy aminy reagují s redukcujícími cukry v Maillardově reakci. Proto je důležité při výrobě potravin dodržet preventivní podmínky (hygienické podmínky, technologický postup), které vzniku biogenních aminů brání. (Velíšek, 1999, s. 368)

1.2.1 Potraviny rostlinného původu

Neporušené ovoce a zelenina je chráněno před mikrobiálním napadením, proto obsah biogenních aminů zde není vysoký. S poškozením vzrůstá riziko pomnožení mikrobiální kontaminace a tím i riziko výskytu biogenních aminů (Křížek a Kalač, 1998, s. 9). V ovoci a zelenině se nejčastěji nachází tyramin, v menším množství také řada dalších biogenních aminů. (Velíšek, 1999, s. 368)

1.2.1.1 Nefermentované potraviny rostlinného původu

Zvýšený obsah tyraminu byl zjištěn v banánech, rajčatech a švestkách, histamin ve špenátu a fenyletylamin v kakau. V jedlých houbách může vznikat při nevhodném skladování putrescin a kadaverin (Křížek a Kalač, 1998, s. 9). Kalač, Švecová a Pelikánová (2001) zjistili v mraženém špenátovém pyré obsah histaminu od $2,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ do $9,8 \text{ mg.kg}^{-1}$, tyraminu od $3,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ do $31,8 \text{ mg.kg}^{-1}$. Kečup obsahoval histamin od 2 mg.kg^{-1} do 18 mg.kg^{-1} , tyramin od $4,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ do 149 mg.kg^{-1} a také obsahoval zvýšený obsah putrescinu od $2,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ do 165 mg.kg^{-1} .

1.2.1.2 Fermentované potraviny rostlinného původu

Přítomnost biogenních aminů byla také zjištěna u zelených oliv, kvašených okurek a kvašeném zelí. Jedná se o fermentované potraviny, u kterých obsah biogenních aminů závisí na složení mikroflóry a na technologii fermentace (Křížek a Kalač, 1998, s. 9; Adams a Nout, 2001, s. 314). V kvašeném zelí se nachází histamin a tyramin v desítkách mg.kg^{-1} , v láku jsou hodnoty vyšší od 100 až 200 mg.kg^{-1} (Křížek a Kalač, 1998, s. 9). Španělské fermentované zelné olivy obsahovaly kadaverin, histamin, tyramin, tryptamin a putrescin. Nejvyšších koncentrací u oliv dosahovaly biogenní aminy po 3 měsících naložení v solném láku. (Jay, Loessner a Golden, 2005, s. 790)

1.2.2 Potraviny živočišného původu

Nejčastějšími biogenními aminy v mase, rybách a sýrech jsou histamin, tyramin, kadaverin a putrescin (Velíšek, 1999, s. 368). V průběhu kažení masa a ryb obvykle vzrůstá obsah histaminu, putrescinu a kadaverinu, ale původní obsah sperminu a spermidinu klesá. Index biogenních aminů (BAI) hodnotí kvalitu suroviny:

$$\text{BAI} = \frac{\text{histamin} + \text{putrescin} + \text{kadaverin}}{1 + \text{spermin} + \text{spermidin}}$$

Výsledek BAI nižší než 1 je pokládán za výbornou kvalitu, hodnota vyšší než 10 za velmi špatnou. (Křížek a Kalač, 1998, s. 9; Zaman et al., 2009, s. 13)

1.2.2.1 Maso, masné výrobky

V mase a masných výrobcích se vyskytuje tyramin, kadaverin, putrescin, spermin a spermidin. Fermentací masných výrobků může vznikat histamin. (Shalaby, 1996, s. 16)

Na množství biogenních aminů v mase má vliv tepelné opracování a skladování. Obsah některých z biogenních aminů lze využít jako indikátor čerstvosti masa, protože v čerstvém vepřovém mase se nachází kadaverin a putrescin do 7 mg.kg^{-1} , u zkaženého masa je to 60 mg.kg^{-1} a více (Velíšek, 1999, s. 368). Čerstvé vepřové maso přirozeně obsahuje spermin, spermidin a stopy ostatních biogenních aminů. Během skladování vepřového masa dochází vlivem teploty skladování ke zvýšení obsahu biogenních aminů. Při 30 °C obsahovalo maso vyšší koncentrace biogenních aminů, než při teplotách skladování 4 °C, při teplotách -18 °C se úroveň biogenních aminů v průběhu 9 měsíců neměnila. Vakuové balení

čerstvého masa vzniku biogenních aminů nebrání. Významné hladiny biogenních aminů u hovězího vakuově baleného masa byly detekovány při 1 °C po 20 dnech skladování. (Shalaby, 1996, s. 16)

Obsahy běžných biogenních aminů u sušených a fermentovaných masných výrobků se pohybuje v rozmezí jednotek až stovek mg.kg^{-1} . Výsledný obsah biogenních aminů závisí na ošetření vstupní suroviny (chlazené maso je bohatým zdrojem dekarboxylujících bakterií), výběrem startérové kultury laktobacilů a pediokoků a na použité technologii. (Velíšek, 1999, s. 368; Křížek a Kalač, 1998, s. 9)

Studie sledovala obsah biogenních aminů u trvanlivého salámu Herkules v průběhu fermentačního procesu a jejich změn během skladování v nebaleném stavu a vakuovém balení při laboratorní teplotě. Po dvou týdnech skladování byl obsah tyraminu vyšší než 120 mg.kg^{-1} , ke konci doby minimální trvanlivosti byl jeho obsah kolem 300 mg.kg^{-1} . V případě vakuově balených salámů nebyl pozorován žádný vliv na obsah aminů v porovnání s nebalenými. (Smělá et al., 2004, s. 6)

1.2.2.2 Ryby

V čerstvém rybím mase je obsah biogenních aminů nízký, v jednotkách mg.kg^{-1} . Rybí maso je bohaté na obsah volného histidinu, od 1 g.kg^{-1} u sledě až po 15 g.kg^{-1} u tuňáka. Při vyšších teplotách skladování dochází ke značné dekarboxylaci histidinu, makrela může obsahovat až 3000 mg.kg^{-1} histaminu, tuňák dokonce až 8000 mg.kg^{-1} (Velíšek, 1999, s. 368, Shalaby, 1996, s. 16). Optimální teplota pro tvorbu histaminu, která závisí na mikrobiální aktivitě, byla zjištěna při 37,8 °C (Shalaby, 1996, s. 16), ale může se lišit, podle mikrobiálního zastoupení v rybím mase (Roig-Sagués et. al, 2009, s. 30). Skladování ryb při nízkých teplotách redukuje vznik biogenních aminů, při 0 °C byla po 18 dnech skladování stanovena přítomnost pouze malého množství histaminu, při 10 °C překročil histamin obsah 1 g.kg^{-1} . Jsou známy i studie, které popisují vznik histaminu i při nízkých teplotách skladování, a to díky přítomnosti psychrofilních bakterií (Santos, 1996, s. 19, Halász et al., 1994, s. 8). Vakuové balení ryb nemá vliv na produkci biogenních aminů (Shalaby, 1996, s. 16). Ke stejnému závěru došla i jiná studie, která doporučuje nahradit vakuové balení za balení v modifikované atmosféře s 40 % CO_2 a 60 % O_2 . (Emborg Laursen a Dalgaard, 2004, s. 17)

1.2.2.3 Sýry

Výskyt biogenních aminů v mléce je nízký, přibližně $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Sýry představují větší riziko, protože proteiny, enzymy, kofaktory, voda, sůl, a bakterie obsaženy v sýrech vytváří ideální podmínky pro jejich tvorbu (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 10). Působením proteáz a peptidáz přítomných v sýru dochází k proteolýze kaseinu a tvorbě volných aminokyselin, které jsou přístupné dekarboxylázám. Sekundární kontaminace mikroorganismy je další častá příčina výskytu biogenních aminů v sýrech. Sýry obvykle obsahují jednotky až stovky $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu, jednotky až desítky $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 2-fenyletylaminu a velmi malá množství tryptaminu. (Standarová, Borkovcová a Vorlová, 2008, s. 6)

Na obsah biogenních aminů v sýrech má vliv tepelné ošetření mléka. Sýry vyrobené z čerstvého mléka mají vyšší koncentraci biogenních aminů, než sýry z mléka pasterovaného. Pasterace redukuje počty patogenních a sporotvorných mikroorganismů a tím i počty mikroorganismů produkujících biogenní aminy (Linares et al., 2011, s. 14). Teplota zrání a koncentrace soli v sýru jsou další faktory, které ovlivňují tvorbu biogenních aminů. Produkce biogenních aminů je rychlejší při vyšší teplotě zrání ($18\text{-}21 \text{ }^\circ\text{C}$). Současná tendence snižovat množství soli v potravinách, může mít u sýrů za následek zvýšení obsahu histaminu. (Roig-Sagués et. al, 2009, s. 30)

Zrající sýry obsahují větší množství biogenních aminů než sýry čerstvé, je to způsobeno tím že, mikroorganismy mají dostatečnou dobu na jejich produkci. (Buňková et al., 2013, s. 4)

Ve studii, které analyzovala 215 vzorků sýrů, byla stanovena celková nejvyšší koncentrace biogenních aminů u měkkých zrajících sýrů a sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou, biogenní aminy dosáhly hodnot až 3 g na kg sýra. (Standarová, Borkovcová a Vorlová, 2008, s. 6)

1.2.3 Nápoje

1.2.3.1 Víno

Ve víně, které patří k fermentovaným alkoholickým nápojům, se zejména nachází histamin, tyramin a putrescin (Lonvaud-Funel, 2001, s. 5). Podmínky fermentace, jako teplota, pH, obsah kyslíku a malolaktické kvašení ovlivňují vzniklé množství biogenních aminů.

Kontrolou a sledováním kritických faktorů při výrobě vína lze vyrobit víno s nízkým výskytem biogenních aminů. (Anlı a Bayram, 2009, s. 18)

Po alkoholovém kvašení je koncentrace biogenních aminů nízká, k jejich produkci dochází zejména při malolaktické fermentaci. Malolaktické kvašení následuje po alkoholovém kvašení vína pomocí kvasinek. Jde tedy o sekundární kvašení, při kterém se používají bakterie mléčného kvašení. V této sekundární fázi kvašení dochází k odbourávání kyselin, kyselina jablečná se mění na jemnější kyselinu mléčnou a oxid uhličitý. Pokud bakterie v této fázi mají kontakt s kvasinkovým kalem, peptidy a volné aminokyseliny jsou jim více dostupné a mohou je snadno hydrolyzovat a dekarboxylovat. Tím se vysvětluje vyšší obsah biogenních aminů u vín, která nejsou včas odkalena. Na obsah proteinů a aminokyselin má také vliv macerace, čím déle extrakce ze slupek hroznů probíhá, tím více těchto látek se do moštu uvolňuje. Hlavními producenty biogenních aminů ve víně jsou bakterie mléčného kvašení, ale vliv má také různá dekarboxylázová aktivita v závislosti na jejich kmenu. Dalším faktorem je pH, v dnešní době na popud spotřebitele se vyrábí méně kyselá vína než v minulosti. Zvyšováním pH roste i počet a různorodost mikrobiální populace a zvyšuje se riziko přítomnosti nežádoucích mikroorganismů. Bílá vína, která jsou obecně kyslejší, obsahují nižší koncentrace biogenních aminů než vína červená. Použití oxidu siřičitého snižuje koncentraci biogenních aminů během zrání vína. (Anlı a Bayram, 2009, s. 18; Lonvaud-Funel, 2001, s. 5)

Teplota skladování vína má nepatrný vliv na změnu koncentrace biogenních aminů. Při experimentu pouze koncentrace histaminu byla vyšší ve víně, které bylo skladováno 105 dní při pokojové teplotě oproti skladování při 4 a 35 °C. (Marco a Azpilicueta, 2006, s. 6)

1.2.3.2 Pivo

Nejvíce biogenních aminů v pivě vzniká během hlavního kvašení. Zvýšený obsah tyraminu a kadaverinu indikuje kontaminaci především mléčnými bakteriemi. I v nealkoholickém pivu může být obsah tyraminu vyšší než 10 mg.l⁻¹. Na celkový obsah biogenních aminů u piva má vliv výběr odrůdy ječmene, sladovnická technologie, zpracování mladiny a podmínky fermentace. Přítomnost histaminu vždy značí mikrobiální kontaminaci, protože dekarboxylázová aktivita ani histamin nebyl u pivovarských kvasnic prokázán. (Křížek a Kalač, 1998, s. 9; Halász et al., 1994, s.7)

Ve studii, které se věnovala stanovení obsahu biogenních aminů u 195 vzorků piv z Evropy, byl nalezen ve všech pivech tyramin, putrescin a agmatin. Histamin byl přítomen

v rozmezí 0,5 až 1,1 mg.l⁻¹. Hladina tyraminu byla variabilní a nepředvídatelná, což může znamenat zdravotní komplikace pro pacienty léčené inhibitory monoaminoxidázami. (Izquierdo-Pulido et al., 1996, s. 5)

1.2.4 Legislativní limity BA v potravinách

Ministerstvo zdravotnictví České republiky ve vyhlášce 305/2004 Sb. v platném znění stanovuje přípustné množství 100 mg.kg⁻¹ histaminu u ryb a rybích výrobků. Přípustné množství může být u 2 vzorků z 9 překročeno o 100 %. (Vyhláška 305/2004 Sb.)

Evropská legislativa v Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 v produktech rybolovu z druhů ryb spojovaných s vysokým množstvím histidinu (ryb čeledí *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae*, *Scombrosidae*) stanovuje limit histaminu 100 mg.kg⁻¹. V produktech rybolovu, které byly ošetřeny enzymatickým zráním v láku, vyrobené z druhů ryb spojovaných s vysokým množstvím histidinu, stanovuje limit histaminu 200 mg.kg⁻¹. Limit histaminu může být u 2 vzorků z 9 překročen o 100 %. Limity se vztahují na produkty uvedené na trh během jejich doby údržnosti a stanovují se pomocí referenční analytické metody HPLC. (Nařízení komise č. 2073/2005)

1.2.5 Mikroorganismy produkující biogenní aminy v potravinách

Dekarboxylázovými enzymy jsou vybaveny četné druhy hnilobných bakterií, ale také řada druhů bakterií mléčného kvašení. Mezi bakterie produkující biogenní aminy patří rody *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Photobacterium* a rody bakterií mléčného kvašení *Lactobacillus*, *Pedococcus* a *Streptococcus*. Přehled významných bakterií schopných dekarboxylovat aminokyseliny v různých potravinách je uveden v Tabulce 1. (Santos, 1996, s. 19; Křížek a Kalač, 1998, s. 9; Adams a Nout, 2001, s. 314; Velíšek, 1999, s. 368)

Tab. 1. Významné mikroorganismy produkující biogenní aminy. (Santos, 1996, s. 19; Křížek a Kalač, 1998, s. 9; Adams a Nout, 2001, s. 314; Velíšek, 1999, s. 368)

Potraviný	Mikroorganismy	Produkované aminy
ryby	<i>Morganella morgani</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Vibro alginolytiens</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Staphylococcus xylosum</i>	histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, agmatin, spermin, spermidin
sýry	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Bacillus macerans</i> , <i>Propionibacterium</i> sp.	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, fenyletylamin, tryptamin
maso a masné výrobky	<i>Pediococcus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i> sp.	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, fenyletylamin, tryptamin
fermentovaná zelenina	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococci</i> spp., <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin
fermentované produkty ze sóji	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Trichosporon beiglii</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin
víno	<i>Pediococcus cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus parabuchneri</i> , <i>Lactobacillus rossiae</i>	histamin

1.3 Biologické účinky

V eukaryotických buňkách působí biogenní aminy jako prekurzory pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin, proteinů. V potravinách vytváří biogenní aminy významné aroma, ale působí také jako potencionální prekurzory pro vznik karcinogenních nitroso sloučenin (Santos, 1996, s. 19). Některé biogenní aminy působí jako neurotransmitery, jedná se o psychoaktivní aminy. Jiné ovlivňují krevní tlak, histamin krevní tlak snižuje, tyramin jej zvyšuje (Křížek a Kalač, 1998, s. 9). Spermin, spermidin a putrescin v organismu plní řadu fyziologických funkcí, například se podílí na syntéze nukleových kyselin a bílkovin (Křížek a Kalač, 1998, s. 9; Kalač, Krausová, 2005, s. 12). Tyto polyaminy se tradičně řadí mezi biogenní aminy, ale kvůli jejich specifické roli v živých buňkách je někteří autoři odlišují jako zvláštní skupinu. (Kalač, Krausová, 2005, s. 12)

Nadměrný příjem potravin obsahující vysoké koncentrace biogenních aminů, může u citlivých osob vyvolat alimentární intoxikaci (Standarová, Borkovcová a Vorlová, 2008, s. 6). Proti účinkům aminů působí ve střevním traktu savců detoxikační systém enzymů monoaminoxidáza a diaminoxidáza, které biogenní aminy odbourávají. Detoxikační schopnost je u jednotlivých jedinců různá, toxický účinek biogenních aminů závisí na aktivitě monoaminoxidázy a diaminoxidázy. Aktivitu enzymů snižuje alkohol, léky (inhibitory monoaminoxidázy) a některá onemocnění (Santos, 1996, s. 19; Křížek a Kalač, 1998, s. 9). Příznaky konzumace nadměrného množství biogenních aminů jsou zvracení, pocení, dýchací potíže, bušení srdce, hypotenze nebo hypertenze a migrény. (Velíšek, 1999, s. 368)

1.3.1 Skombrotoxikóza

Otrava histaminem se často označuje jako skombrotoxikóza, protože původcem otravy jsou často skombroidní ryby a výrobky z nich (Křížek a Kalač, 1998, s. 9). Příznaky otravy histaminem jsou gastrointestinální (nevolnost, zvracení, křeče v břiše a průjem), neurologické (mravenčení, návaly horka, bušení srdce, bolesti hlavy, pálení a svědění), kožní (kopřivka a vyrážka) a hypotenze. Příznaky se objevují obvykle do 1 h po konzumaci, ale závisí na koncentraci histaminu a citlivosti jedince (Ray, 2004, s. 626). Toxicita histaminu závisí také na přítomnosti dalších biogenních aminů, které mají navzájem synergické účinky. (Santos, 1996, s. 19)

1.3.2 Intoxikace tyraminem

Otrava tyraminem se často označuje jako reakce na sýr. Intoxikace může vyvolat hypertenzi se silnou bolestí hlavy, krvácení do mozku nebo selhání srdce. (Křížek a Kalač, 1998, s. 9)

1.4 Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu

Biogenní aminy jsou tvořeny enzymatickou aktivitou potravin nebo dekarboxylázovou aktivitou bakterií. Inhibice takové činnosti a prevence rozvoji bakterií je důležitá pro regulaci obsahů biogenních aminů v potravinách. (Santos, 1996, s. 19)

Faktorů ovlivňující produkci biogenních aminů v potravinách je mnoho, mezi ty významné patří skladovací podmínky, výrobní postupy, kvalita vstupní suroviny, způsob balení potravin, pH potravin, dostupnost volných aminokyselin, přítomnost kontaminující mikro-

biální populace s dekarboxylázovými enzymy a výběr startovacích kultur při fermentaci. (EFSA, 2011, s. 93; Naila et al., 2010, s. 12)

1.4.1 Vliv pH

Hodnota pH výrazným způsobem ovlivňuje produkci biogenních aminů. Nízké pH inhibuje růst mikroorganismů, ale zároveň stimuluje produkci dekarboxyláz jako obranný mechanismus proti kyselému prostředí, protože zásadité biogenní aminy zvyšují okolní pH (EFSA, 2011, s. 93). Proto v kyselém prostředí je dekarboxylázová aktivita silnější, optimální hodnota pH je v rozmezí 4 až 5,5. (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 10)

1.4.2 Vliv teploty

Dodržení správné teploty skladování patří mezi nejdůležitější metody prevence (Naila et al., 2010, s. 12). Optimální teplota pro většinu mezofilních dekarboxylujících bakterií je mezi 20 °C a 37 °C, přičemž produkce biogenních aminů se snižuje při teplotách nižších než 5 °C a vyšších než 40 °C (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 10; EFSA, 2011, s. 93). Psychrotolerantní bakterie (např. *Photobacterium phosphoreum* a *Morganella psychrotolerans*) produkují značné množství biogenních aminů i při teplotách skladování nižších než je 5 °C. (Naila et al., 2010, s. 12; EFSA, 2011, s. 93)

Nízkou teplotou skladování lze omezit také proteolytickou aktivitu mikroorganismů (EFSA, 2011, s. 93). Při proteolýze dochází k rozložení bílkovin na jednotlivé aminokyseliny, tím roste dostupnost volných aminokyselin pro mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou. (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 10)

1.4.3 Vliv startovacích kultur u fermentovaných výrobků

Prevence proti vzniku biogenních aminů ve fermentovaných potravinách, je používat krátkých fermentací s pečlivě vybranými startovacími kulturami. (Santos, 1996, s. 19)

Řada startovacích kultur produkuje tyramin a histamin. I zástupci probiotických kultur, které mohou mít také funkci startovacích kultur, patří mezi potencionální producenty biogenních aminů. Probiotické kultury se používají při výrobě fermentovaných potravin pro jejich pozitivní účinek na lidské zdraví, příznivě ovlivňují složení a rovnováhu střevní mikroflóry. Probiotika musí přežít průchod trávicím traktem, musí být schopné množit se ve střevě a nesmí být pro člověka toxické či patogenní. (Sládková, Komprda a Burdychová, 2007, s. 7)

Tvorba biogenních aminů při výrobě fermentovaných výrobků je nežádoucí, proto je vhodné všechny probiotické a startovací kultury prověřit na schopnost tvorby biogenních aminů. Touto problematikou se zabývala studie, které prověřila 73 druhů bakteriálních kultur (používaných v potravinářství jako startovací či probiotické kultury) na schopnost tvorby biogenních aminů. Schopnost tvořit histamin nebyla zjištěna u žádné z testovaných kultur, tyramin byl prokázán u všech kultur, u kterých byl detekován gen pro tyrozindekarboxylázu (13 kmenů rodu *Lactobacillus*, 14 kmenů rodu *Staphylococcus*, 3 kmeny rodu *Streptococcus* a 2 kmeny rodu *Bifidobacterium*). (Sládková, Komprda a Burdychová, 2007, s. 7)

Další možností je použití vhodných startovacích kultur s aminoroxidázovou činností, které snižují tvorbu biogenních aminů v potravinách. *Kocuria varians* snižuje obsah tyraminu v trvanlivých salámech. *Brevibacterium linens* během zrání sýrů snižuje obsah tyraminu a histaminu. V kysaném zelí *Lactobacillus plantarum* potlačuje rozvoj mikroorganismů zodpovědných za produkci biogenních aminů. (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 10)

1.4.4 Vliv konzervačních a přídatných látek

Konzervační a přídatné látky mohou snížit tvorbu biogenních aminů v potravinách, tím že inhibují přítomné mikroorganismy. Sorban sodný, hexametfosfát, D-sorbitol, kyselina citronová, jantarová a jablečná inhibují dekarboxylázovou činnost. (Naila et al., 2010, s. 12)

V koření se přirozeně vyskytují inhibiční látky, jako například kurkumin v kurkumě, kapsaicin v paprice, piperin v černém pepři, tymol v tymiánu a oreganu. Nevýhodou u těchto látek je ztráta účinnosti v průběhu vaření. Zázvor, česnek, zelená cibulka, červená paprika, hřebíček, skořice zpomaluje tvorbu biogenních aminů. (Naila et al., 2010, s. 12)

1.4.5 Balení

Způsob balení je další faktor, kterým lze v potravinách ovlivnit produkci biogenních aminů. Uchovávání v obalu obvykle zahrnuje změnu atmosféry obklopující produkt, což může zpomalit produkci biogenních aminů důsledkem inhibice mikroorganismů nebo jejich enzymů zodpovědných za produkci biogenních aminů. Nicméně úplně zabránit vzniku biogenních aminů nelze, protože jak anaerobní, tak i aerobní bakterie jsou schopné produkovat biogenní aminy. Vakuové balení, balení v modifikované atmosféře a aktivní balení

s různými lapači plynů efektivněji inhibuje nebo zpomaluje tvorbu biogenních aminů v porovnání s balením potravin bez úpravy atmosféry. (Naila et al., 2010, s. 12)

1.4.6 Vliv NaCl

Chlorid sodný ovlivňuje aktivitu dekarboxyláz. Vysoká koncentrace soli zpomaluje činnost histidin dekarboxylázy například u *Staphylococcus capitis*, *Enterobacter cloacae* a *Pantoea agglomerans*, ale opačný efekt má na halotolerantní *Staphylococcus* spp., který byl izolován v solených ančovičkách. (EFSA, 2011, s. 93)

1.4.7 Ostatní faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu

Optimální obsah glukózy pro dekarboxylázovou aktivitu je 0,5 až 2 %, obsah vyšší než 3 % tuto činnost inhibuje (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008). Antibiotika (penicilin, tetracyklin) přidané do ryb potlačují syntézu histaminu, ale tento způsob inhibice v potravinářství je nepoužitelný. (Adams a Nout, 2001, s. 314)

1.5 Stanovení biogenních aminů

Stanovení biogenních aminů v potravinách je důležité z hlediska jejich potenciální toxicity, celkový obsah lze využít jako ukazatel kvality potraviny. Sledováním obsahu biogenních aminů lze kontrolovat kvalitu surovin, meziproductů, koncových produktů, monitorovat fermentační procesy a řídit je. (Önal, 2007, s. 12)

1.5.1 Chromatografie

Analytické metody pro kvantifikaci biogenních aminů jsou založeny zejména na chromatografických metodách (Önal, 2007, s. 12):

- chromatografie na tenké vrstvě (TLC)
- plynová chromatografie (GC)
- kapilární elektroforéza (CE)
- vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Chromatografie je metoda založená na kvalitativní a kvantitativní analýze vzorku, při stanovení je možné určit složení směsi i koncentrace jednotlivých složek (Káš, Kodíček a Valentová, 2005, s. 258). Jedná se o separační metodu, při které se oddělují složky obsaže-

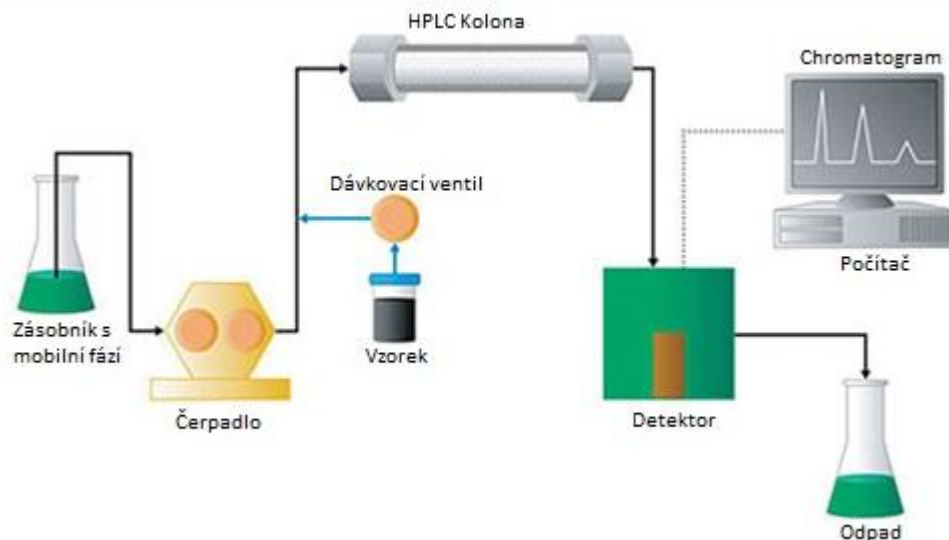
né ve vzorku. Při analýze se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Nepohyblivá je stacionární fáze (umístěná v trubici zvané kolona), mobilní fáze je pohyblivá. Vzorek je umístěn na začátek stacionární fáze a pohybem mobilní fáze přes fázi stacionární je vzorek unášen. Složky, které se silně poutají na stacionární fázi, se při pohybu zdržují a tím dochází k postupné separaci jednotlivých složek. (Klouda, 2003, s. 132)

1.5.1.1 Kapalinová chromatografie

Pro stanovení biogenních aminů se nejčastěji používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie. (Önal, 2007, s. 12)

Biogenní aminy nevykazují výraznou absorpci v UV/VIS oblasti, proto pro stanovení nelze použít spektrofotometrické detektory. Před detekcí je nutné vzorky derivatizovat. Dansylchlorid je nejpoužívanější činidlo pro derivatizaci biogenních aminů před HPLC (Karo- vičová a Kohajdová, 2005, s. 10). Po derivatizaci vhodným činidlem je detekce separova- ných látek u HPLC založena na absorpci UV záření, v případě požadavku na vyšší citlivost je možné stanovení fluorometricky (Křížek a Kalač, 1998, s. 9). Detektory v HPLC by mě- ly být málo citlivé na mobilní fázi a selektivní na analyty. Mezi nejčastěji používané detek- tory patří fotometrický, refraktometrický a fluorescenční. (Klouda, 2003, s. 132)

Základní zařízení pro kapalinovou chromatografii se skládá ze zásobníku mobilních fází, dávkovače vzorku, kolony, čerpadel, detektoru, jímače frakcí a výstupu analyzovaných dat - počítač nebo zapisovač (Káš, Kodíček a Valentová, 2005, s. 258). Základní schéma HPLC je uvedeno na Obrázku 2.



Obr. 2. Schéma HPLC

(http://www.waters.com/webassets/cms/category/media/other_images/primer_e_1_csystem.jpg)

1.5.1.2 Plynová chromatografie

U plynové chromatografie je mobilní fází nosný plyn, do kterého se dávkuje vzorek, a ten je dále unášen kolonou. V koloně se složky oddělují díky různé schopnosti vázat se na stacionární fází. (Klouda, 2003, s. 132)

Pro stanovení biogenních aminů v potravinách se tato metoda často nevyužívá. (Önal, 2007, s. 12)

1.5.1.3 Chromatografie na tenké vrstvě

Při chromatografii na tenké vrstvě je sorbent rozprostřen v tenké vrstvě na desku z inertního materiálu (sklo, aluminiová folie), na desku je dále nanesen vzorek a je napojena na mobilní fází, která protéká přes fází stacionární. Při průtoku se látky více rozpustné ve stacionární fází budou pohybovat pomaleji, látky s vyšší rozpustností ve fází mobilní se budou pohybovat rychleji a tím dojde k oddělení jednotlivých složek. Mobilní fáze vzlíná tenkou vrstvou pomocí kapilárních sil, při pohybu přes start s sebou unáší složky, poté se separované složky na desce detekují. (Káš, Kodíček a Valentová, 2005, s. 258; Klouda, 2003, s. 132)

1.5.1.4 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza se řadí mezi elektromigrační separační metody, které využívají pohybu ionizovaných částic v elektrickém poli. Při elektroforéze po aplikaci napětí se nabitě částičky pohybují k opačně nabitě elektrodě. Separace složek vzorku je rozdílná podle rychlosti jejich migrace. (Káš, Kodíček a Valentová, 2005, s. 258; Klouda, 2003, s. 132)

Kapilární elektroforéza má řadu výhod: jednoduchost, rychlost, cenová efektivnost a spolehlivost. (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 10)

2 LACTOBACILLUS

Taxonomicky je rod *Lactobacillus* zařazen do domény *Bacteria*, kmenu *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales* a čeledi *Lactobacillaceae*. (Sedláček, 2007, s. 270; Lee, 2009, s. 596)

Bakterie rodu *Lactobacillus* mají společné znaky, jsou grampozitivní, nesporulující, fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní tyčinky, občas také koky. Laktobacily jsou acidotolerantní až acidofilní, řadí se mezi bakterie mléčného kvašení, metabolitem fermentace sacharidů je kyselina mléčná, dále také kyselina octová, etanol a oxid uhličitý (Jay, Loessner a Golden, 2005, s. 790; Šilhánková, 2008, s. 363). Pokud se vytváří kyseliny mléčné jako jediný produkt, jde o homofermentativní mléčné kvašení. Některé druhy laktobacilů produkují kromě kyseliny mléčné v menším množství také např. kyselinu octovou, mravenčí, etanol, CO₂, jedná se o heterofermentativní mléčné kvašení. (Klaban, 2005, s. 654)

Optimální růstová teplota je 30 °C až 40 °C, optimální rozmezí pH je 5,5 až 6,2. Přítomnost 5 % CO₂ obecně podporuje jejich růst. Při kultivaci vyžadují bohatá komplexní média, jejich metabolismus je fermentatorní. (Sedláček, 2007, s. 270)

Laktobacily patří mezi nejpočetnější skupinu bakterií mléčného kvašení, do tohoto rodu se řadí více než 120 druhů a 20 poddruhů a každoročně tento počet stoupá o nově objevené druhy. (Lee, 2009, s. 596)

V přírodě jsou laktobacily velmi rozšířeny, lze je nalézt v potravinách živočišného i rostlinného původu (nejen jako startovací kultury), vyskytují se v mléce, kde způsobují přirozené kysání mléka, dále v nápojích, čisté i znečištěné vodě, silážích, běžně osídlují trávicí trakt savců a ptáků. Pouze vzácně jsou patogenní. (Šilhánková, 2008, s. 363; Sedláček, 2007, s. 270)

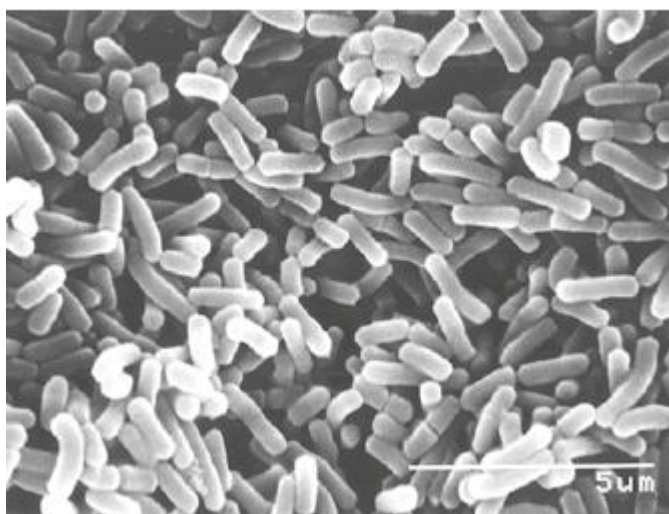
Z potravinářského a biotechnologického hlediska je *Lactobacillus* velice důležitý, protože produkovaná kyselina mléčná zastavuje rozmnožování hnilobných bakterií a stafylokoků. Této vlastnosti se využívá například při konzervaci zeleniny (kysané zelí, okurky), při přípravě sýrů (např. použitím *L. casei*, *L. delbruckei* subsp. *lactis*, *L. helveticus*), kvašeného mléka (např. *L. acidophilus*). (Šilhánková, 2008, s. 363)

2.1 Probiotické účinky rodu *Lactobacillus*

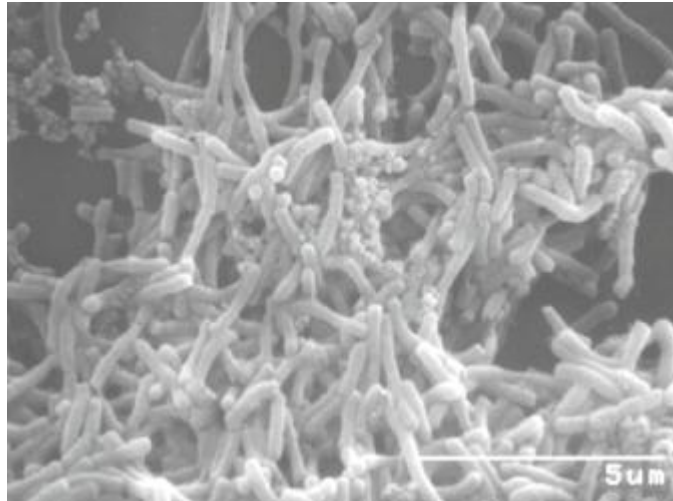
Probiotika jsou definována jako „živé mikroorganismy, které jsou-li podávány v adekvátním množství, přispívají ke zlepšení zdravotního stavu hostitele“. Jako probiotické kultury jsou používány bakterie, které se přirozeně nachází v lidském trávicím traktu. Nejčastěji používanými rody jsou *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Mezi příznivé účinky probiotik patří imunostimulační účinky, tlumení alergií, prevence kolorektálního karcinomu, zmírnění zácpy. Probiotika působí pomocí různých mechanismů: bariérová efekt (např. produkce antimikrobiálních látek), ovlivnění střevní mikroflóry (pokles pH), imunostimulační účinky (podporují fagocytózu, produkují protilátky a cytokiny) a redukce kolonizace a množení patogenních bakterií. (Rada, 2011, s. 4)

2.1.1 *Lactobacillus rhamnosus*

Lactobacillus rhamnosus se řadí mezi kmeny s probiotickými účinky. (Malago, 2011, s. 476)



Obr. 3. *Lactobacillus rhamnosus* – morfologie při skenování elektronovým mikroskopem (Malago, 2011, s. 476)



Obr. 4. *Lactobacillus rhamnosus* – morfologie při skenování jogurtové struktury elektronovým mikroskopem (Malago, 2011, s. 476)

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části práce bylo vytvořit literární rešerši zabývající se biogenními aminy. Tato část se zabývá charakteristikou BA, a zejména jejich výskytem v potravinách a dopadem na lidské zdraví při nadměrné konzumaci, byly popsány faktory ovlivňující jejich vznik a také mikroorganismy, které jsou schopné produkce biogenních aminů. Poslední část teoretické části se věnuje charakteristice rodu *Lactobacillus*.

Cílem praktické části bakalářské práce bylo prozkoumat dekarboxylázovou aktivitu *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289. Produkce biogenních aminů *Lactobacillus rhamnosus* byla sledována za působení různých faktorů v modifikovaném bujónu MRS a mléku. Zkoumané faktory simulují možné podmínky v potravinách, které ovlivňují produkci biogenních aminů probiotickou kulturou *Lactobacillus rhamnosus*.

V bujónu MRS byl sledován vliv pH upravené na hodnoty 5, 6 a 7, vliv laktózy v koncentracích v kultivačním médiu 0; 0,25; 0,5; 1; a 4,8 % (w/v) a vliv kultivačních teplot při 10 °C a 37 °C. V mléce byl sledován vliv pH, vliv přídavku aminokyselin argininu, ornitinu, tyrozinu a lyzinu a vliv kultivačních teplot. Množství produkovaných biogenních aminů bylo stanoveno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Na základě získaných výsledků z praktické části byl zformulován závěr, který popisuje tvorbu biogenních aminů zkoumaným kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 během kultivace za sledovaných podmínek.

4 MATERIÁLÝ A METODIKA

4.1 Přístroje a pomůcky

Váhy laboratorní OHAUS Adventurer Pro 500

Inkubátor mikrobiologický Memmert

Biohazard box Bio IIA, výrobce Telstar

pH metr EUTECH instruments pHTester 20

Varioklav 135 S, Steam Sterilizers, H+P Labortechnik

Systém HPLC Agilent Technologies (sestava se skládá z autosampleru, DAD a FLD detektoru, pumpy a degaseru)

Eppendorfkové mikrozkušky

Laboratorní sklo a plasty

4.2 Použité mikroorganizmy

Vliv vnějších faktorů na produkci biogenních aminů byl sledován u kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289, který byl získán ze Sbírký mlékárenských mikroorganizmů Laktoflora® (CulturesCollectionofDairyMicroorganisms; CCDM).

4.3 Kultivační média

4.3.1 Modifikovaný bujón MRS

Lactobacillus rhamnosus byl kultivován v modifikovaném bujónu MRS, složení bujónu je uvedeno v Tabulce 1. Nejprve byly naváženy jednotlivé složky, které byly rozpuštěny v 1 l destilované vody. Poté médium bylo rozděleno na třetiny, u každé třetiny bylo upraveno pH na požadovanou hodnotu 5, 6 nebo 7 pomocí HCl nebo NaOH. Dále každé pH bylo rozděleno na pětiny, do každé části byla přidána navážka laktózy v koncentraci 0; 0,25; 0,5; 1; nebo 4,8 % (w/v). Připravený bujón byl sterilován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Tab. 2. Složení modifikovaného bujónu MRS

Složka	Množství (g.l ⁻¹)
Pepton	10
Masový extrakt	10
Kvasničný extrakt	5
Tween 80	1
Citran amonný	2
Octan sodný	5
Síran hořečnatý	0,1
Síran manganatý	0,005
Hydrogenfosforečnan draselný	2
Arginin	0,3
Ornitin	0,3
Tyrozín	0,3
Lyzin	0,3

4.3.2 Mléko

Pro přípravu bylo naváženo 50 g sušeného mléka, které bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody. Rozpuštěné mléko bylo rozděleno na tři díly, u kterých bylo upraveno pH na požadovanou hodnotu 5, 6 nebo 7 pomocí HCl a NaOH. Připravené mléko bylo sterilováno.

4.3.3 Obohacené mléko

Pro přípravu bylo naváženo 50 g sušeného mléka a 0,3 g argininu, ornitinu, tyrozinu a lyzinu, vše bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody. Po rozdělení mléka na třetiny bylo upraveno pH na požadovanou hodnotu 5, 6 nebo 7 pomocí HCl a NaOH. Připravené mléko bylo sterilováno.

4.4 Stanovení biogenních aminů metodou HPLC

4.4.1 Zaočkování kultivačních medií

Lactobacillus rhamnosus byl zaočkován do modifikovaného bujónu MRS, mléka a do obohaceného mléka o aminokyseliny arginin, ornitin, tyrozín a lyzin. Přidané aminokyseliny do bujónu MRS a mléka slouží jako prekurzory pro vznik biogenních aminů.

Na produkci biogenních aminů v bujónu MRS byl zkoumán vliv koncentrace laktózy a vliv pH. Pro danou kombinaci pH a koncentraci laktózy byly zaočkovány paralelně tři zkumav-

ky. Pro zaočkování do zkumavky se 7 ml bujónu bylo použito 25 μl bakteriální suspenze kultivované 48 hodin.

Dále byl *Lactobacillus rhamnosus* zaočkován do mléka a do mléka obohaceného o aminokyseliny. Pro každou hodnotu pH v mléce byly zaočkovány paralelně tři zkumavky, stejným způsobem byly připraveny vzorky u obohaceného mléka o aminokyseliny. Do zkumavek s 5 ml mléka bylo použito pro inokulaci 25 μl bakteriální suspenze kultivované 48 hodin.

Připravené a zaočkované vzorky byly kultivovány při 37 °C po dobu 24 a 48 hodin a další část vzorků při 10 °C po dobu 4, 7, 10 a 14 dnů.

4.4.2 Příprava vzorků pro derivatizaci před HPLC

Po kultivaci u všech vzorků odebraných v jednotlivé dny bylo změřeno pH kultivačního média. Následně byly vzorky centrifugovány při 4600 otáčkách po dobu 15 minut. Po centrifugování bylo ze získaného supernatantu odebráno 600 μl vzorku do dvou mikrozku-mavek, každá mikrozku-mavka byl zředěna 600 μl 1,2 M kyselinou chloristou. Takto připravené a označené vzorky byly podrobeny derivatizaci.

4.4.3 Derivatizace dansylchloridem

Derivatizace dansylchloridem byla provedena dle návodu v laboratoři Ústavu technologie potravin.

K upraveným vzorkům bylo přidáno 100 μl vnitřního standardu (1,7-heptandiamin v koncentraci 500 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Z této směsi bylo odpipetováno 1 ml do derivatizační nádoby, dále do derivatizačních nádobek bylo přidáno 1,5 ml karbonátového pufru s pH 11,0 – 11,1 a 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu o koncentraci 5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ v acetonu. Dobře uzavřené nádoby byly třepány v temnu po dobu 20 hodin. Poté se ke vzorkům přidalo 200 μl roztoku prolinu a vzorky se daly třepat na další hodinu. Po hodině třepání se ke vzorkům přidaly 3 ml heptanu a po uzavření nádobek se vzorky 3 minuty třepaly ručně. Následně bylo odpipetováno z derivatizačních nádobek 1 ml heptanové vrstvy do vialek. Pod proudem dusíku byl z vialek odpařen vzorek při teplotě 60 °C. Suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrem. Do doby analýzy byly takto připravené vzorky uchovány v mrazícím zařízení při teplotách pod -18 °C.

4.4.4 Chromatografické stanovení biogenních aminů

Před analýzou byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 μm a dávkovány do chromatografického systému (přístroj HPLC - Agilent Technologies) s kolonou Zorbax Eclipse plus RRHD C18 50 mm x 3,0 mm.

Program gradientové eluce, kterým probíhala separace dansylderivátu biogenních aminů, je znázorněn v Tabulce 2. Detekce dansylderivátu biogenních aminů probíhala spektrofotometricky UV zářením o vlnové délce 254 nm (pomocí DAD detektoru Agilent Technologies 1260 Infinity).

Tab. 3. Gradientový eluční program HPLC

Čas (min)	10% Acetonitril (%)	100% Acetonitril (%)
0,1	41	59
1,9	37	63
3,5	18	82
4,0	0	100
9,5	0	100
11,5	41	59
15,5	41	59

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

U kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 byla pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie zkoumána za různých kultivačních podmínek schopnost produkce 8 biogenních aminů – tryptaminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu. Obsah těchto biogenních aminů byl určen pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Produkce biogenních aminů testovaným kmenem byla zkoumána ve dvou kultivačních médiích (modifikovaný bujón MRS a mléko). V tekutém bujónu MRS byl zkoumán vliv pH, přítomnost laktózy a vliv kultivační teploty. V mléku byl zkoumán vliv pH, přídavek aminokyselin a vliv kultivační teploty. Výsledky z analýzy jsou uvedeny v Příloze I-II.

5.1 Vliv koncentrace laktózy, pH a kultivační teploty na produkci biogenních aminů kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 v bujónu MRS

U každého zaočkovaného vzorku došlo vlivem dekarboxylázové činnosti *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 k produkci biogenních aminů, celkové množství biogenních aminů kolísalo ve vzorcích od 6,2 mg.l⁻¹ až po 350,4 mg.l⁻¹ (viz. Příloha I).

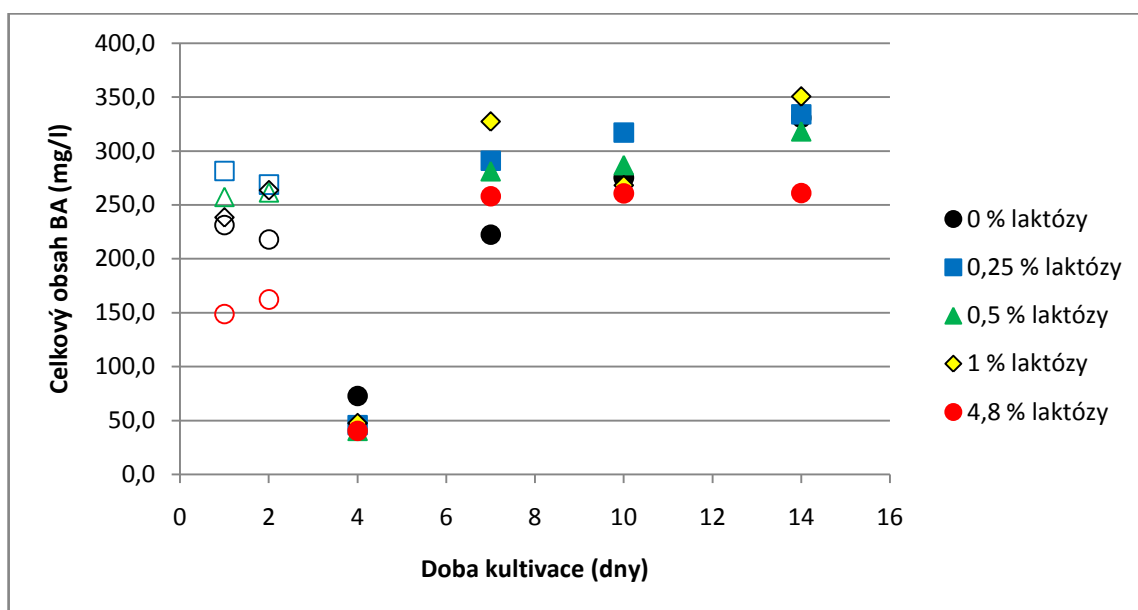
Obrázky 5 - 7 znázorňují vývoj produkce celkového obsahu biogenních aminů v bujónu MRS s počáteční hodnotou kultivačního média pH 5, 6 a 7, do kterého byla přidána laktózy v koncentraci 0; 0,25; 0,5; 1; a 4,8 % (w/v). Vzorky kultivované při 37 °C byly odebrány 1. a 2. den po zaočkování, vzorky kultivované při 10 °C byly odebrány 4. 7. 10. a 14. den po zaočkování.

Většinový podíl na celkovém obsahu biogenních aminů má tyramin, ten je také nejčastěji stanoveným biogenním aminem, který byl detekován u každého vzorku. Stanovené množství tyraminu kolísalo ve vzorcích od 4,8 ± 1,1 mg.l⁻¹ až po 350 ± 23,8 mg.l⁻¹. Druhým detekovaným biogenním aminem byl spermidin, ten když byl detekován, tak pouze v nízkém množství od 0,1 ± 0,1 mg.l⁻¹ do 2,31 ± 0,4 mg.l⁻¹. Tryptamin, fenyletylamin, putrescin, kadaverin, histamin a spermin nebyly detekovány v žádném vzorku.

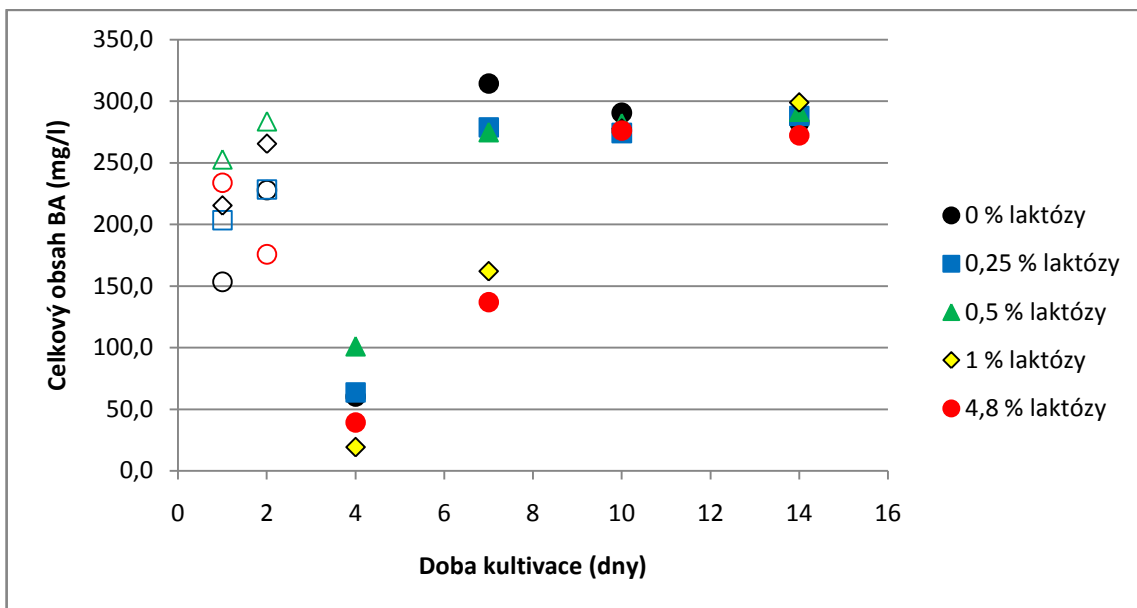
Nejvyšší produkce tyraminu byla zjištěna v 14. dnu odběru v médiu obsahující laktózu v koncentraci 1 % (w/v) s počátečním pH média 5, tyramin zde dosahoval obsahu 350 ±

23,8 mg.l⁻¹ za podmínek kultivace při 10 °C (Obr. 5.). Nejnižší produkce tyraminu byla zjištěna v médiu obsahující laktózu v koncentraci 0 % (w/v) s počátečním pH média 7, tyramin zde dosahoval při 10 °C obsahu 4,8 ± 1,1 mg.l⁻¹ (Obr. 7.). Spermidin byl nejvíce produkován 4. den v koncentraci laktózy 0 % (w/v) s počátečním pH média 5 v obsahu 2,31 ± 0,4 mg.l⁻¹ za podmínek kultivace při 10 °C.

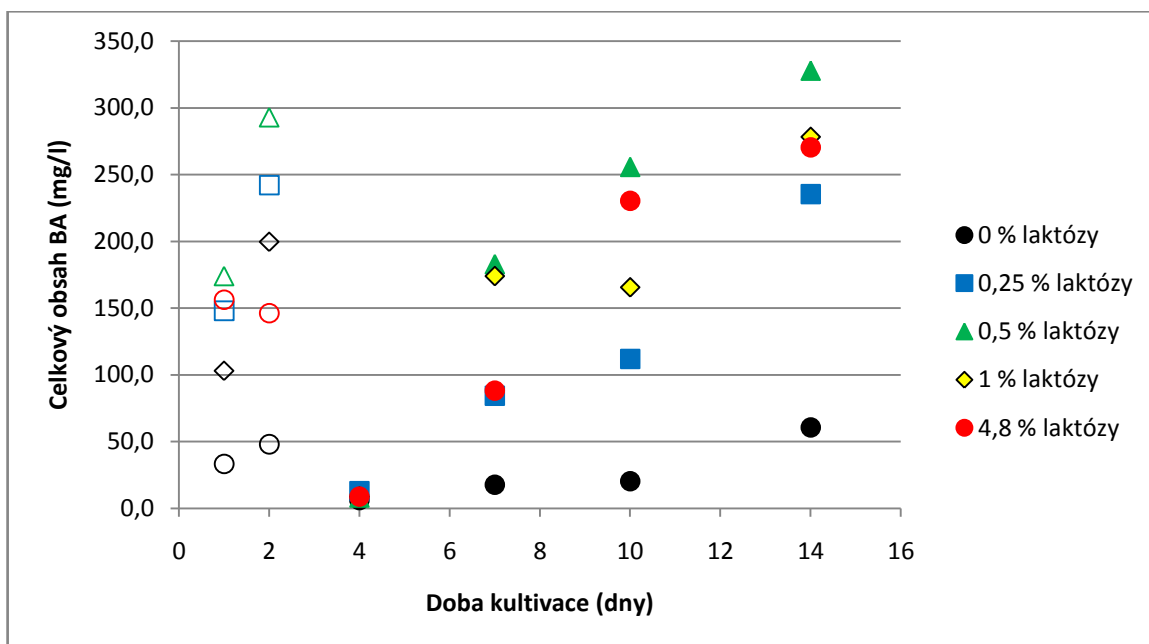
Jak je patrné z Obrázků 5 - 7 na produkci biogenních aminů má velký vliv kultivační teplota. Při teplotě 37 °C je produkce biogenních aminů výrazně vyšší již 1. den od zaočkování (nejvyšší celkové množství biogenních aminů je 283,7 mg.l⁻¹ v pH 6 s 0,5 % (w/v) laktózy v médiu), než při teplotě 10 °C ve 4. dnu od zaočkování (nejvyšší celkové množství aminů bylo 101 mg.l⁻¹ v pH 6 s 0,5 % (w/v) laktózy v médiu). Při kultivační teplotě 10 °C docházelo k nárůstu produkce biogenních aminů až od 7. dne.



Obr. 5. Celková produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při počátečním pH 5 pro různé koncentrace laktózy. Body bez barevné výplně znázorňují kultivaci při 37 °C, body s barevnou výplní kultivaci při 10 °C.



Obr. 6. Celková produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při počáteční pH 6 pro různé koncentrace laktózy. Body bez barevné výplně znázorňují kultivaci při 37 °C, body s barevnou výplní kultivaci při 10 °C.



Obr. 7. Celková produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 při počáteční pH 7 pro různé koncentrace laktózy. Body bez barevné výplně znázorňují kultivaci při 37 °C, body s barevnou výplní kultivaci při 10 °C.

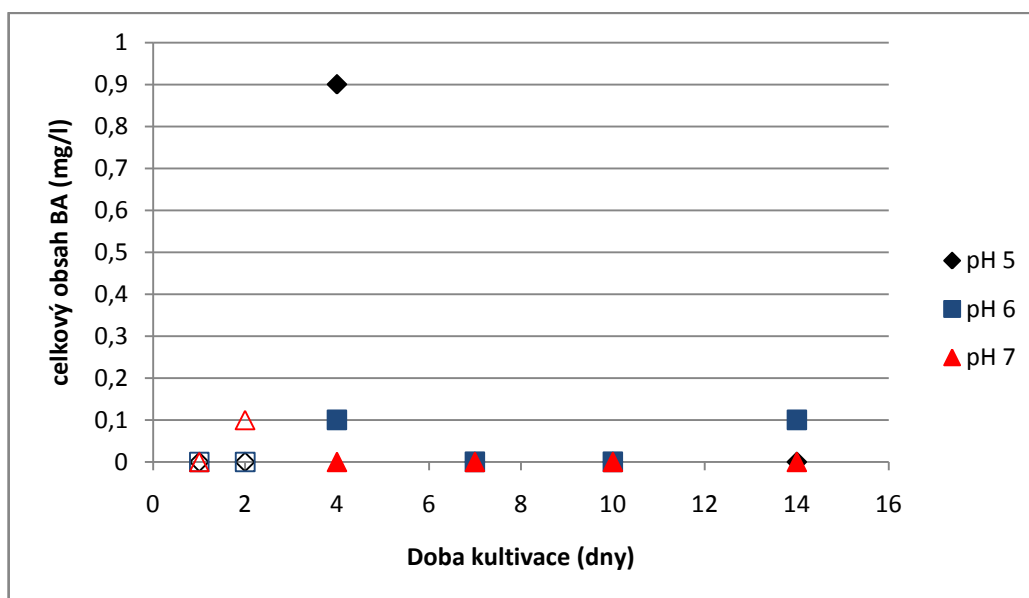
5.2 Vliv pH, kultivační teploty a přítomnosti aminokyselin na produkci biogenních aminů kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 v mléku

Po kultivaci *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 v mléku byla pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie zjišťována přítomnost biogenních aminů v médiu za přítomnosti či nepřítomnosti aminokyselin společně za současného vlivu různých kultivačních teplot a počátečního pH média 5, 6 a 7.

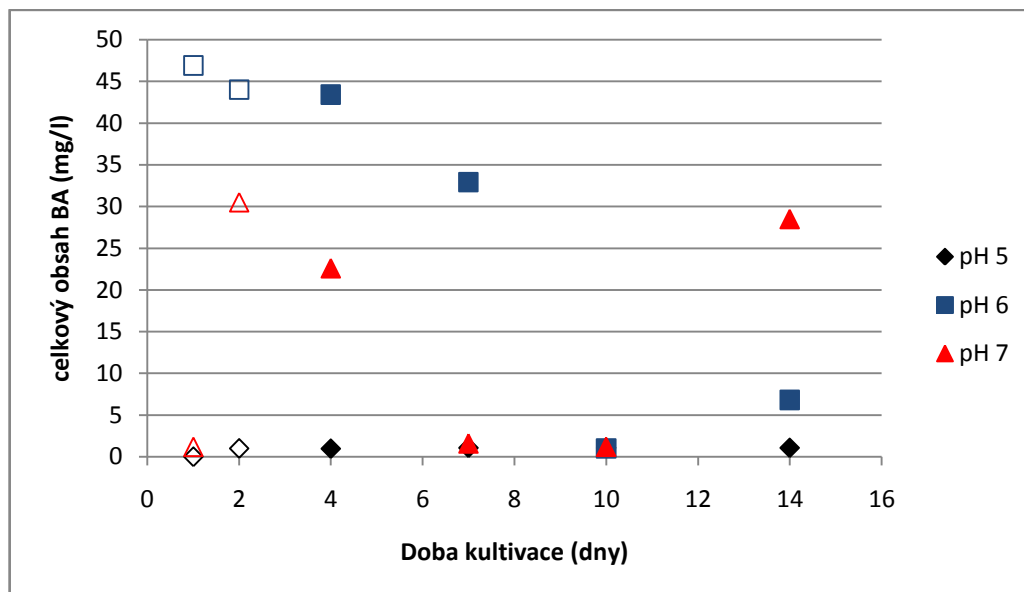
Mléko pro kmen *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 nevytváří vhodné podmínky pro produkci biogenních aminů. Tryptamin, fenyletylamin, putrescin, kadaverin, histamin a spermidin nebyl detekován v žádném vzorku. Ve většině vzorků nebyly biogenní aminy vůbec detekovány (viz. Příloha II).

Mléko obohacené o prekurzory biogenních aminů (aminokyseliny) představovaly lepší prostředí k tvorbě biogenních aminů, byl zde detekován spermin a tyramin, celkový obsah biogenních aminů se zde pohyboval od 1,1 mg.l⁻¹ do 46,9 mg.l⁻¹.

Obrázky 8 a 9 znázorňují vývoj produkce celkového obsahu biogenních aminů.



Obr. 8. Celková produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 v mléku při počátečních hodnotách kultivačního média 5,6 a 7. Body bez barevné výplně znázorňují kultivaci při 37 °C, body s barevnou výplně kultivaci při 10 °C.



Obr. 9. Celková produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 v mléku obohaceném o aminokyseliny při počátečních hodnotách kultivačního média 5,6 a 7. Body bez barevné výplně znázorňují kultivaci při 37 °C, body s barevnou výplní kultivaci při 10 °C.

5.3 Sledování změny pH u kultivačních médií

U všech vzorků bylo po kultivaci změřeno pH kultivačního média. V závislosti na produkci kyselin (např. kyselina mléčná) nebo látek zásaditých (např. biogenní aminy) docházelo ke změně pH daného kultivačního média. V Příloze III je graficky znázorněn průběh změn pH u bujónu MRS a mléka v závislosti na době kultivace.

Při kultivační teplotě 37 °C docházelo v případě počátečního pH 5 u tekutého média MRS k výraznému poklesu pH již první den odběru. K nejvyššímu poklesu došlo v 1. den u média s koncentrací laktózy 4,8 % (w/v) až na hodnotu pH 3,75, v 2. den se pH snížilo až na hodnotu 3,6. V případě počátečního pH 6 došlo 2. den u média s koncentracemi laktózy 0,025 a 0,5 % (w/v) k mírnému zvýšení pH. K nejstrmějšímu poklesu z počáteční hodnoty pH 7 na hodnotu pH 3,89 došlo u média s koncentrací laktózy 4,8 % (w/v) již 1. den odběru.

Při kultivační teplotě 10 °C docházelo u bujónu k pozvolnějšímu poklesu pH oproti vyšší kultivační teplotě 37 °C. Nejnižší hodnota pH 4,6 byla naměřena 14. den kultivace u média s 4,8 % (w/v) laktózy.

U nulové koncentrace laktózy v bujónu docházelo k nejmenším změnám v pH u obou kultivačních teplot, u média s počátečním pH 5 oscilovaly naměřené hodnoty kolem tohoto pH, stejně tak u počátečního pH 6 a 7. V případě koncentrace laktózy 4,8 % (w/v) v médiu docházelo k největšímu snížení pH v porovnání s nižším obsahem laktózy v bujónu.

U mléka docházelo k analogickým změnám pH, nejvyšší pokles nastal při teplotě kultivace 37 °C, kdy 2. den kultivace z pH 5 kleslo pH na hodnotu 3,67 u mléka, 3,58 u obohaceného mléka o aminokyseliny. V případě počátečního pH 6 kleslo pH na hodnotu 4,05 u mléka a 4,23 u obohaceného mléka. Počáteční pH 7 u mléka kleslo na 4,52 a obohacené mléko na 5,31. Při kultivační teplotě 10 °C nedocházelo k tak výrazným změnám pH, o něco kyselější bylo mléko s přidanými aminokyselinami.

5.4 Souhrnná diskuze

Probiotické kultury mají na lidské zdraví pozitivní účinek, ale mnoho probiotických kmenů, mezi které se řadí i *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289, je schopno produkovat biogenní aminy. Biogenní aminy mají na lidské zdraví negativní účinek, proto u potravin s potenciálním rizikem výskytu těchto sloučenin by se mělo dbát na výběr kultur s nízkou dekarboxylázovou aktivitou, popřípadě nastavit takové vnější podmínky, které takovou činnost inhibují.

Tato práce sledovala v závislosti na působení různých faktorů vnějšího prostředí, dekarboxylázovou aktivitu kmenu *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289. Vybrané faktory simulují podmínky, které mohou nastat v potravinách. Mezi sledované faktory patří teplota (10 °C představuje chladírenské teploty, 37 °C teplotu lidského těla a optimální růstovou teplotu testovaného kmene), pH (5, 6 a 7), obsah laktózy (v koncentraci 0; 0,25; 0,5; 1; a 4,8 % (w/v)) a přítomnost aminokyselin v kultivačním médiu. Pro kultivaci byly použity dvě média, modifikovaný bujón MRS a mléko.

Z daných výsledků je patrné, že dekarboxylázovou aktivitu *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 podporuje modifikovaný bujón MRS, kde byly zjištěny násobně vyšší hodnoty biogenních aminů, než u kultivačního média mléka. Tento bujón svým složením představuje optimální podmínky pro růst sledovaného kmene. Mléko pro zkoumaný kmen nevytváří vhodné podmínky pro vysokou produkci biogenních aminů, ani v případě že obsahuje volné aminokyseliny, prekurzory biogenních aminů. Tento fakt může být způsoben tím, že

daný kmen v mléce roste pomaleji, respektive, že v mléce není dostatečné množství živin pro sledovaný kmen.

V bujónu MRS výsledky ukazují, že tyramin byl zkoumaným kmenem produkován za všech sledovaných podmínek. Oproti tomu v mléce byl tyramin produkován jen za určitých podmínek a vždy v nižších koncentracích v porovnání s bujónem MRS. Tyto výsledky zřejmě ukazují na to, že v mléce nebylo dostatečné množství prekurzorů pro biogenní aminy, v tomto případě aminokyseliny tyrozinu. V bujónu MRS lze za zdroj volných aminokyselin, včetně tyrozinu, považovat pepton, masový a kvasničný extrakt, které obsahují hydrolyzáty bílkovin.

V případě zvyšující se koncentrace laktózy v bujónu MRS byl zaznamenán inhibiční účinek na produkci detekovaných biogenních aminů tyraminu a spermidinu. U tyraminu měla laktóza inhibiční účinek v prostředí s pH 5 a 7, v případě pH 6 nedošlo k jeho snížení. V prostředí s pH 5 a s 1 % (w/v) laktózy bylo množství vyprodukovaného tyraminu $350 \text{ mg.l}^{-1} \pm 23,8 \text{ mg.l}^{-1}$, se zvýšením obsahu laktózy na 4,8 % (w/v) se snížil obsah tyraminu na $260,7 \text{ mg.l}^{-1} \pm 26,4 \text{ mg.l}^{-1}$. V případě spermidinu došlo k poklesu obsahu v prostředí u všech třech testovaných pH, se zvýšením obsahu laktózy na 4,8 % (w/v) v prostředí s pH 7 nebyl tento biogenní amin vůbec detekován. Inhibiční účinky sacharidů na dekarboxylázovou aktivitu potvrzuje studie Bover Cid et. al (2008). Média s nižším obsahem glukózy obsahovala vyšší koncentraci biogenních aminů, než média s vyšším obsahem glukózy (Bover Cid et. Al, 2008, s. 9). Stejně tak ve studii González-Fernández et al. (2003) doporučují pro snížení produkce biogenních aminů ve fermentovaných salámech použít glukózu v koncentraci vyšší než 0,5 %. Při použití starterových kultur vyšší obsah glukózy urychluje pokles pH v salámu (González-Fernández et al., 2003, s. 10). Vliv vyššího obsahu sacharidů na rychlejší pokles pH byl také v této práci potvrzen. U všech vzorků s koncentrací laktózy 4,8 % (w/v) byla zaznamenána nižší hodnota pH, než u vzorků s 0, 0,25 0,5 a 1 % (w/v) laktózy. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že laktóza podporuje pomnožení laktobacilů, které okyselují prostředí vyšším množstvím produkované kyseliny mléčné.

Na produkci biogenních aminů má velký vliv kultivační teplota, která byla dalším sledovaným faktorem. Při teplotě 37 °C byla produkce biogenních aminů násobně vyšší 1. den odběru, než 4. den při teplotě 10 °C. Z těchto výsledků se dá vyvodit, že kmen *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289 rychleji produkuje biogenní aminy při teplotě 37 °C. Tato kultivační teplota leží v rozmezí optimálních teplot laktobacilů (Siegrist, 2009). Teplota kulti-

vace 10 °C produkci biogenních aminů zpomaluje, zejména díky tomu, že při této teplotě byl růst testovaného kmene zpomalen. Ale ani chladírenské teploty zcela dekarboxylázovou aktivitu neinhibují, protože od 7. dne docházelo k nárůstu biogenních aminů, kdy jejich obsah byl stejný, anebo v určitých podmínkách i vyšší než u kultivace při 37 °C. Obdobné výsledky uvedla studie Santos et al. (2003, s. 12), která zkoumala produkci biogenních aminů v mléce u kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Vyšší koncentrace biogenních aminů byly stanoveny ve vzorcích inkubovaných při teplotě 32 °C než při 20 °C.

Jednou z podmínek vzniku biogenních aminů je přítomnost prekurzorů (příslušných aminokyselin) v prostředí (Křížek, Kalač, 1998, s. 9; Roig-Sagués et al., 2009, s. 30). V kultivačním médiu bez přidaných prekurzorů (mléko) byla produkce biogenních aminů nízká (nejvýše $0,9 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$), v mléku obohaceném o aminokyseliny byla pozorována zvýšená produkce biogenních aminů (v celkovém rozmezí od $1,1 \text{ mg.l}^{-1}$ do $46,9 \text{ mg.l}^{-1}$).

Studie (Lorencová et al., 2014, s. 6) sledovala vliv vybraných faktorů na schopnost produkce biogenních aminů u rodu *Bifidobacterium*. V kyselém prostředí byl zde pozorován nárůst koncentrace biogenních aminů. Dá se předpokládat, že vyšší produkce biogenních aminů působí jako obranný mechanismus bakterií proti nízkému pH prostředí. V této bakalářské práci rozdílné počáteční pH kultivačního média mělo vliv na produkci biogenních aminů pouze v kombinaci s dalšími faktory. V případě pH 7 a koncentrace laktózy 0 % byla produkce biogenních aminů výrazně nejnižší v porovnání s ostatními výsledky.

Studie (Moreno-Arribas a Lonvaud-Funel, 1999, s. 6) sledovala produkci tyraminu kmenem *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 izolovaného z vína. Na dekarboxylázovou aktivitu byl sledován vliv pH v rozmezí od 2 do 9. K produkci tyraminu došlo v rozmezí pH 3 až 7. Studie potvrdila stimulaci kyselého prostředí k produkci biogenních aminů, tyramin byl nejvíce produkován při pH 5.

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na biogenní aminy a vnější faktory, které ovlivňují jejich produkci zkoumaným kmenem *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289. Mezi sledované faktory patřila kultivační teplota, vliv pH, obsah laktózy a přítomnost aminokyselin v kultivačním médiu.

Závěrem lze výsledky shrnout:

- Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie byla zjištěna produkce tyraminu, sperminu a spermidinu.
- Kultivační teplota má vliv na vyprodukované množství biogenních aminů, nižší teplota 10 °C produkci biogenních aminů zpomaluje.
- Bujón MRS svým složením představuje optimální podmínky pro růst sledovaného kmene.
- Mléko pro zkoumaný kmen nevytváří vhodné podmínky pro produkci biogenních aminů, v médiu není dostatečné množství živin.
- Za daných kultivačních podmínek byl nejvíce produkovaným biogenním aminem tyramin, stanovené množství se pohybovalo v rozmezí 4,8 až 350 mg.l⁻¹.
- Nejvyšší produkce tyraminu byla detekována u vzorku obsahující laktózu v koncentraci 1 % (w/v) s počátečním pH média 5.
- Nejnižší produkce tyraminu byla zjištěna v médiu obsahující laktózu v koncentraci 0 % (w/v) s počátečním pH média 7.
- Působením kombinací různých faktorů a úpravou média lze ovlivnit produkci biogenních aminů u kmenu *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ADAMS, Martin R. a NOUT, M.J. Robert, 2001. *Fermentation and food safety*. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers. 314 s. ISBN 08-342-1843-7.
- [2] ANLI, R. Ertan a BAYRAM, Mustafa, 2009. Biogenic Amines in Wines. *Food Reviews International*. **25**, 86-102 s. ISSN 1525-6103.
- [3] BOVER CID, Sara et al., 2008. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiology*. **25**, 269-277 s. ISSN 0740-0020.
- [4] BUŇKOVÁ, Leona et al., 2013. Monitoring of biogenic amines in cheeses manufactured at small-scale farms in fermented dairy products in the Czech Republic. *Food Chemistry* [online]. **141** (1), 548–551 s. [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.036>
- [5] ČESKO, 2004. Vyhláška č. 305.
- [6] EFSA, 2011. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* [online]. **9** (10), 93 s. [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: www.efsa.europa.eu/efsajournal
- [7] EMBORG, Jette, LAURSEN, Birgit Groth, DALGAARD, Paw, 2004. Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2 C—effect of vacuum- and modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. **101**, 263-279 s. ISSN 0168-1605.
- [8] EROPSKÁ UNIE, 2005. Nařízení komise č. 2073.
- [9] GONZÁLET-FERNÁNDEZ, Consuelo et al., 2003. Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in chorizo dry sausage. *Food Microbiology*. **20**, 275-284 s. ISSN 0740-0020.
- [10] HALÁSZ, Ann et al., 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*. **5** (2), 42-49 s. ISSN 0924-2244.
- [11] IZQUIERDO-PULIDO, Maria et al. 1996. Biogenic Amines in European Beers. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 3159-3163 s. ISSN 1520-5118.
- [12] JAY, James M., LOESSNER, Martin J. a GOLDEN, David Allen, 2005. *Modern food microbiology*. 7th ed. New York: Springer. 790 s. ISBN 03-872-3413-6.

- [13] KALAAČ, Pavel a GLÓRIA, Maria Beatriz Abreu., 2009. Biogenic amines in cheeses, wines, beers and sauerkraut. In: *Biological Aspects of Biogenic Amines, Polyamines and Conjugates*. Transworld Research Network. India. 267-309 s. ISBN 978-81-7895-249-9.
- [14] KALAAČ, Pavel a KRAUSOVÁ, Petra, 2005. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*. **90**, 219-230 s. ISSN: 0308-8146.
- [15] KALAAČ, Pavel, ŠVECOVÁ, Stanislava, PELIKÁNOVÁ, Tamara, 2001. Levels of biogenic amines in typical vegetable products. *Food Chemistry*. **77** (3), 349-351 s. ISSN 0308-8146.
- [16] KAROVÍČOVÁ, J a KOHAJDOVÁ, Z., 2005. Biogenic amines in food. *Chemical Papers*. **59** (1), 70–79 s. ISSN 0366–6352.
- [17] KÁŠ, Jan, KODÍČEK, Milan a VALENTOVÁ, Olga, 2005. *Laboratorní techniky biochemie* [online]. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. 258 s. [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-586-2/pages-img/01.html
- [18] KLABAN, Vladimír, 2005. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. české vyd. Praha: Galén. 654 s. ISBN 80-7262-341-9.
- [19] KLOUDA, Pavel, 2003. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, **132** s. ISBN 80-86369-07-2.
- [20] KOHAJOVÁ, Z., J. KAROVÍČOVÁ a G. GREIF, 2008. Biogénne amíny v potravinách. *Potravinárstvo*. **2** (2), s. 30-49. ISSN 1338-0230.
- [21] KRŽÍZEK, Martin a KALAAČ, Pavel, 1998. Biogenní aminy v potravinách a jejich role ve výživě. *Czech Journal of Food Science*. **16**, č. 4. 110-116 s.
- [22] LANDETE, José María et al., 2007. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *International Journal of Food Microbiology*. **117**, 258-269 s. ISSN 0168-1605.
- [23] LEE, Yuan a SALMINEN, Seppo, 2009. *Handbook of probiotics and prebiotics*. 2nd ed. Hoboken: Wiley, 596 s. ISBN 978-0-470-13544-0.
- [24] LINARES, Daniel M. et al., 2011. Biogenic Amines in Dairy Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **51** (7). 691-703 s. ISSN 1040-8398.
- [25] LONVAUD-FUNEL, Aline, 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. **199**, 9-13 s. ISSN 1574-6968.

- [26] LORENCOVÁ, Eva, 2014. Selected factors influencing the ability of Bifidobacterium to form biogenic amines. *International Journal of Food Science and Technology*. **49**, 1302–1307 s. ISSN 1365-2621.
- [27] MALAGO, Joshua J., 2011. *Probiotic bacteria and enteric infections cytoprotection by probiotic bacteria*. Dordrecht: Springer. ISBN 978-940-0703-865.
- [28] MARCO, Ana González a AZPILICUETA, Ancín, 2006. Amine concentrations in wine stored in bottles at different temperatures. *Food Chemistry*. **99**, 680-685 s. ISSN 0308-8146.
- [29] MORENO-ARRIBAS, V. a LONVAUD-FUNEL, A., 1999. Tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. brevis* ATCC 367. *FEMS Microbiology Letters*. **180**, 55-60 s. ISSN 1574-6968.
- [30] NAILA, Aishath et al., 2010. Control of Biogenic Amines in Food—Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science*. **75** (7), 139-150 s. ISSN 1750-3841.
- [31] ÖNAL, Armagan, 2007. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. **103**, 1475-1486 s. ISSN 0308-8146.
- [32] RADA, Vojtěch, 2011. Využití probiotik, prebiotik a symbiotik. Interní medicína pro praxi. *Medicína pro praxi*. **8** (1), s. 10-15. ISSN 1212-7299.
- [33] RAY, Bibek, 2004. *Fundamental food microbiology* [online]. 3rd ed. Boca Raton, Fla: CRC, [cit. 2014-04-20]. ISBN 02-039-9825-1.
- [34] ROIG-SAGUÉS, Artur X. et al., 2009. The decarboxylating bacteria present in foodstuffs and the effect of emerging technologies on their formation. In: *Biological Aspects of Biogenic Amines, Polyamines and Conjugates*. Transworld Research Network. India. 30 s. ISBN 978-81-7895-249-9.
- [35] SANTOS, Silla H. M., 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. **29**, 213-231 s. ISSN 0168-1605.
- [36] SANTOS, Wandilma C. et al., 2003. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. *Food Chemistry*. **81**, 595-606 s. ISSN 0308-8146.
- [37] SEDLÁČEK, Ivo, 2007. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 270 s. ISBN 978-80-210-4207-0.
- [38] SHALABY, Ali R., 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. In: *Food Research International*. **29** (7), 675-690 s. ISSN 1985-4668.

- [39] SIEGRIST, Jvo, 2009. Lactobacilli [online]. *Microbiology Focus Edition 1.1.* [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Fluka/Brochure/1/mibi_focus_1_1.pdf
- [40] SLÁDKOVÁ, P., KOMPRDA, T. a BURDYCHOVÁ, R., 2007. *Skríning startovacích a probiotických kultur určených pro výrobu fermentovaných masných výrobků na schopnost tvorby biogenních aminů* [online]. Sborník Mendelovy Univerzity [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: <http://mnet.mendelu.cz/mendelnet07agro/articles/tp/sladvkova.pdf>
- [41] SMĚLÁ et al., 2004. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chem. Listy*. **98**, 432–437 s. ISSN 1213-7103.
- [42] STANDAROVÁ, BORKOVCOVÁ, E. I. a VORLOVÁ, L., 2008. Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě. *Veterinářství*. **58**. 735-739 s. ISSN 0506-8231.
- [43] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila, 2008. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 363 s. ISBN 978-80-200-1703-1.
- [44] VELÍŠEK, Jan, 1999. *Chemie potravin 3*. Vyd. 1. Tábor: OSSIS, 342 s. ISBN 8090239153.
- [45] ZAMAN, Muhammad Z. et al., 2009. A Review: Microbiological, Physicochemical and Health Impact of High Level of Biogenic Amines in Fish Sauce. In: *American Journal of Applied Sciences*. **6** (6), 1199-1211 s. ISSN 1546-9239.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Vznik vybraných biogenních aminů (Adams a Nout, 2001, s. 314)	13
Obr. 2. Schéma HPLC (http://www.waters.com/webassets/cms/category/media/other_images/primer_e_lcsystem.jpg)	26
Obr. 3. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> – morfologie při skenování elektronovým mikroskopem (Malago, 2011, s. 476).....	29
Obr. 4. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> – morfologie při skenování jogurtové struktury elektronovým mikroskopem (Malago, 2011, s. 476)	30
Obr. 5. Celková produkce biogenních aminů kmenem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289 při počátečním pH 5 pro různé koncentrace laktózy. Body bez barevné výplně znázorňují kultivaci při 37 °C, body s barevnou výplní kultivaci při 10 °C.	38
Obr. 6. Celková produkce biogenních aminů kmenem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289 při počáteční pH 6 pro různé koncentrace laktózy. Body bez barevné výplně znázorňují kultivaci při 37 °C, body s barevnou výplní kultivaci při 10 °C.	39
Obr. 7. Celková produkce biogenních aminů kmenem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289 při počáteční pH 7 pro různé koncentrace laktózy. Body bez barevné výplně znázorňují kultivaci při 37 °C, body s barevnou výplní kultivaci při 10 °C.	39
Obr. 8. Celková produkce biogenních aminů kmenem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289 v mléku při počátečních hodnotách kultivačního média 5,6 a 7. Body bez barevné výplně znázorňují kultivaci při 37 °C, body s barevnou výplní kultivaci při 10 °C.	40
Obr. 9. Celková produkce biogenních aminů kmenem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 289 v mléku obohaceném o aminokyseliny při počátečních hodnotách kultivačního média 5,6 a 7. Body bez barevné výplně znázorňují kultivaci při 37 °C, body s barevnou výplní kultivaci při 10 °C.	41

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Významné mikroorganismy produkující biogenní aminy. (Santos, 1996, s. 19; Křížek a Kalač, 1998, s. 9; Adams a Nout, 2001, s. 314; Velíšek, 1999, s. 368).....	20
Tab. 2. Složení modifikovaného bujónu MRS	34
Tab. 3. Gradientový eluční program HPLC.....	36

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: DETEKOVANÁ CELKOVÁ MNOŽSTVÍ BIOGENNÍCH AMINŮ V
TEKUTÉM MÉDIU MRS

PŘÍLOHA P II: DETEKOVANÉ BIOGENNÍCH AMINY V MLÉKU

PŘÍLOHA P III: ZMĚNA PH KULTIVAČNÍCH MEDIÍ

**PŘÍLOHA P I: DETEKOVANÁ CELKOVÁ MNOŽSTVÍ
BIOGENNÍCH AMINŮ V TEKUTÉM MÉDIU MRS**

Celkové množství biogenních aminů (mg.l ⁻¹)					
pH 5					
Odběrové dny	0% laktózy	0,25% laktózy	0,5% laktózy	1% laktózy	4,8% laktózy
1 (37 °C)	231,4	281,5	257,4	238,5	148,8
2 (37 °C)	218	268,9	261,6	263,6	162,3
4 (10 °C)	72,9	45,8	40,6	47,7	40,6
7 (10 °C)	222,4	290,8	281,3	327,2	257,9
10 (10 °C)	275,2	317	287	268,1	260,5
14 (10 °C)	330,6	333,8	318,3	350,4	260,8
pH 6					
	0% laktózy	0,25% laktózy	0,5% laktózy	1% laktózy	4,8% laktózy
1 (37 °C)	153,4	203,5	252,8	215,3	233,9
2 (37 °C)	227,8	228,4	283,7	265,5	175,8
4 (10 °C)	60,4	63,6	101	19,2	39,3
7 (10 °C)	314,2	278,7	274,9	161,9	137
10 (10 °C)	290,5	274,2	282,1	277,6	276,1
14 (10 °C)	282,8	288,1	291,5	298,8	272,3
pH 7					
	0% laktózy	0,25% laktózy	0,5% laktózy	1% laktózy	4,8% laktózy
1 (37 °C)	33,2	148	173,9	103,1	156,2
2 (37 °C)	48	242	292,8	199,6	146,2
4 (10 °C)	6,2	13	8	8,9	8,7
7 (10 °C)	17,7	84,4	182,8	173,9	88
10 (10 °C)	20,3	111,9	255,6	165,5	230,2
14 (10 °C)	60,5	235,3	327,7	278,1	270,3

Obsah tyraminu (mg.l ⁻¹)					
pH 5					
Odběrové dny	0% laktózy	0,25% laktózy	0,5% laktózy	1% laktózy	4,8% laktózy
1 (37 °C)	231,4 ± 11,6	281,5 ± 26,4	257,4 ± 25,9	238,5 ± 20,7	148,8 ± 13,5
2 (37 °C)	218 ± 26,7	268,9 ± 20,1	261,6 ± 24,3	263,6 ± 18,9	162,3 ± 11,1
4 (10 °C)	70,5 ± 6,0	43,5 ± 2,4	39 ± 3,9	46 ± 2,1	39,9 ± 2,7
7 (10 °C)	220,4 ± 20,7	289,2 ± 16,2	279,1 ± 18,9	325,6 ± 17,4	256,9 ± 16,5
10 (10 °C)	274,7 ± 8,8	316,4 ± 30,3	286,6 ± 18,4	267,7 ± 27,3	260,4 ± 16,3
14 (10 °C)	329,9 ± 6,1	333 ± 10,8	317,8 ± 20,6	350 ± 23,8	260,7 ± 26,4
pH 6					
Odběrové dny	0% laktózy	0,25% laktózy	0,5% laktózy	1% laktózy	4,8% laktózy
1 (37 °C)	153,4 ± 7,8	203,5 ± 17	252,8 ± 8,9	215,3 ± 102,0	233,9 ± 20,3

2 (37 °C)	227,8 ± 21,8	228,4 ± 25,8	283,7 ± 16,7	265,5 ± 20,6	175,8 ± 11,6
4 (10 °C)	58,6 ± 5,8	61,8 ± 6,8	99,2 ± 10,7	17,6 ± 1,2	38,9 ± 3,0
7 (10 °C)	313,5 ± 24,7	277,8 ± 10,9	274,5 ± 23,1	161,6 ± 7,5	136,9 ± 5,6
10 (10 °C)	289,8 ± 22,9	273,8 ± 18,8	281,8 ± 18,5	277,6 ± 7,1	276,1 ± 24,7
14 (10 °C)	282,8 ± 15,1	288,1 ± 24,1	291,5 ± 6,1	298,8 ± 15,2	272,3 ± 17,9
pH 7					
Odběrové dny	0% laktózy	0,25% laktózy	0,5% laktózy	1% laktózy	4,8% laktózy
1 (37 °C)	33,2 ± 6,1	148 ± 20,6	173,9 ± 18,2	103,1 ± 10,8	156,2 ± 12,8
2 (37 °C)	46,3 ± 5,6	241,5 ± 7,1	292,3 ± 12,7	199,1 ± 13,0	146,2 ± 13,3
4 (10 °C)	4,8 ± 1,1	11,8 ± 0,9	6,7 ± 1,2	7,9 ± 1,2	8,7 ± 1,6
7 (10 °C)	17,3 ± 1,9	84,2 ± 6,5	182,6 ± 9,3	173,9 ± 7,6	88 ± 9,3
10 (10 °C)	20 ± 1,3	111,6 ± 3,7	255,6 ± 22,3	165,4 ± 16,1	230,2 ± 13,3
14 (10 °C)	48 ± 3,2	235,2 ± 20,3	327,6 ± 29,5	278,1 ± 21,6	270,3 ± 16,2

Obsah spermidinu (mg.l ⁻¹)					
pH 5					
Odběrové dny	0% laktózy	0,25% laktózy	0,5% laktózy	1% laktózy	4,8% laktózy
1 (37 °C)	0	0	0	0	0
2 (37 °C)	0	0	0	0	0
4 (10 °C)	2,31 ± 0,4	2,28 ± 0,4	1,5 ± 0,3	1,7 ± 0,3	1 ± 0,2
7 (10 °C)	1,9 ± 0,3	1,6 ± 0,2	2,2 ± 0,3	1,5 ± 0,2	1,1 ± 0,3
10 (10 °C)	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,4	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,2
14 (10 °C)	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,1
pH 6					
Odběrové dny	0% laktózy	0,25% laktózy	0,5% laktózy	1% laktózy	4,8% laktózy
1 (37 °C)	0	0	0	0	0
2 (37 °C)	0	0	0	0	0
4 (10 °C)	1,8 ± 0,3	1,7 ± 0,3	1,8 ± 0,3	1,6 ± 0,3	0,4 ± 0,2
7 (10 °C)	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,2
10 (10 °C)	0,7 ± 0,3	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0	0
14 (10 °C)	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0
pH7					
Odběrové dny	0% laktózy	0,25% laktózy	0,5% laktózy	1% laktózy	4,8% laktózy
1 (37 °C)	0	0	0	0	0
2 (37 °C)	1,7	0,5	0,5	0,4	0
4 (10 °C)	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1 ± 0,2	0
7 (10 °C)	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0	0
10 (10 °C)	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0
14 (10 °C)	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0	0

PŘÍLOHA P II: DETEKOVANÉ BIOGENNÍCH AMINY V MLÉKU

Kultivační médium - mléko

Dny	Celkové množství biogenních aminů (mg.l ⁻¹)					
	pH 5		pH 6		pH 7	
	SPM (mg.l ⁻¹)	TYM (mg.l ⁻¹)	SPM (mg.l ⁻¹)	TYM (mg.l ⁻¹)	SPM (mg.l ⁻¹)	TYM (mg.l ⁻¹)
1 (37 °C)	0	0	0	0	0	0
2 (37 °C)	0	0	0	0	0	0,1 ± 0,1
4 (10 °C)	0,9 ± 0,2	0	0,1 ± 0,1	0	0	0
7 (10 °C)	0	0	0	0	0	0
10(10°C)	0	0	0	0	0	0
14(10°C)	0	0	0,1 ± 0,1	0	0	0

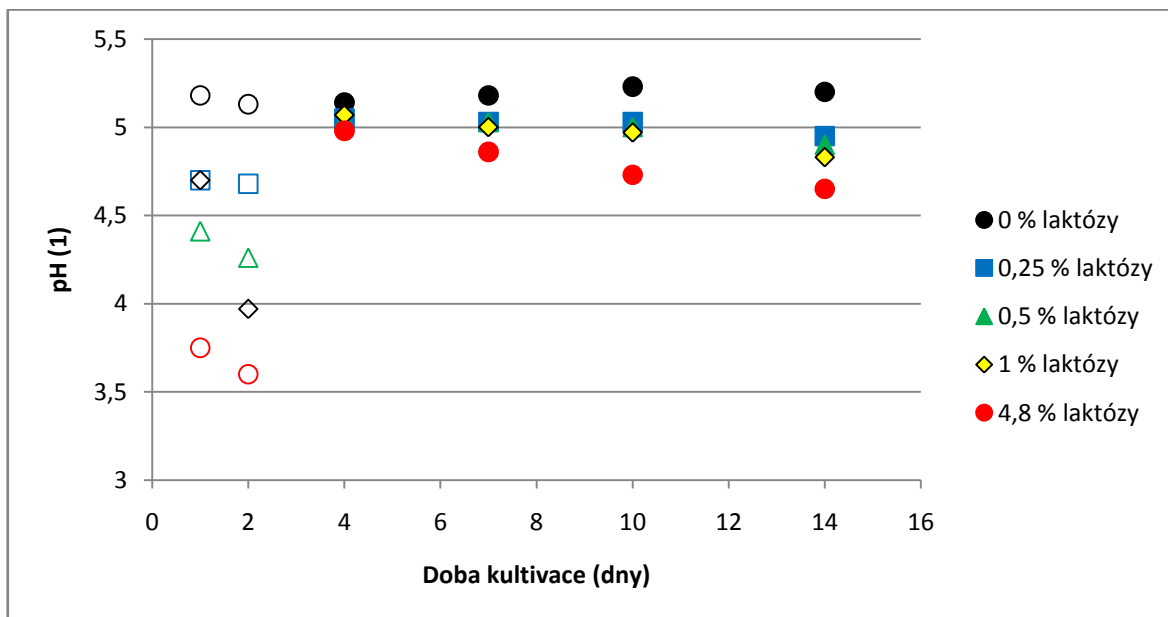
SPM – spermin, TYM – tyramin

Kultivační médium - mléko obohacené o aminokyseliny

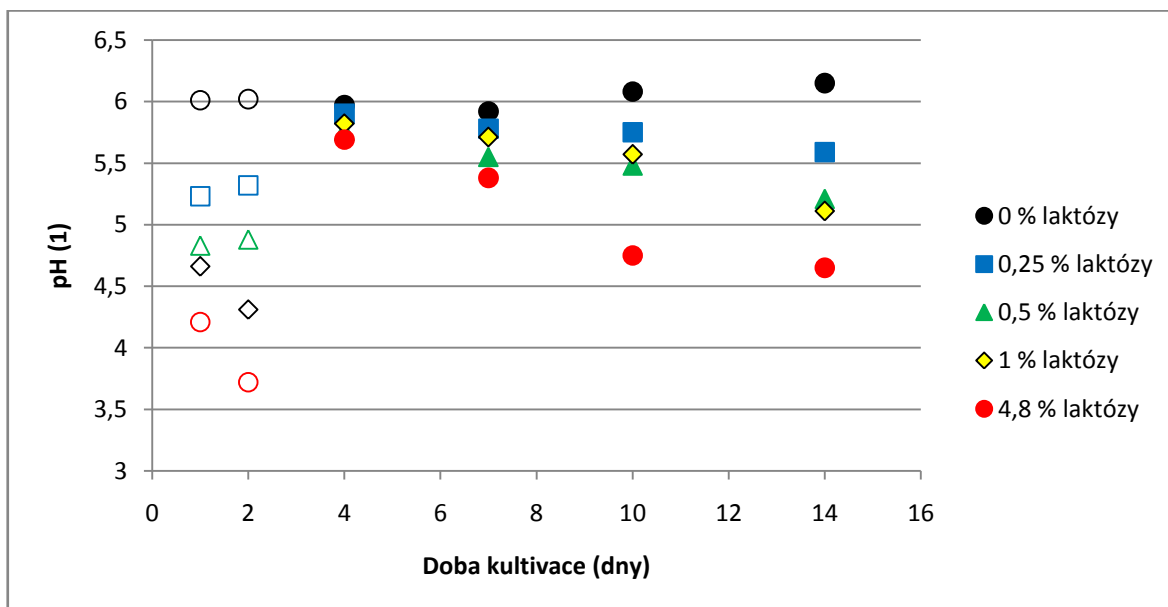
Dny	Celkové množství biogenních aminů (mg.l ⁻¹)					
	pH 5		pH 6		pH 7	
	SPM (mg.l ⁻¹)	TYM (mg.l ⁻¹)	SPM (mg.l ⁻¹)	TYM (mg.l ⁻¹)	SPM (mg.l ⁻¹)	TYM (mg.l ⁻¹)
1 (37 °C)	0	0	46,9 ± 3,2	0	1,2 ± 0,1	0
2 (37 °C)	1 ± 0,3	0	44 ± 3,1	0	30,5 ± 2,9	0
4 (10 °C)	1 ± 0,3	0	43,4 ± 4,3	0	22,6 ± 1,8	0
7 (10 °C)	1,1 ± 0,3	0	32,9 ± 2,9	0	1,3 ± 0,3	0,3 ± 0,1
10(10 °C)	1,1 ± 0,2	0	1 ± 0,3	0	0,8 ± 0,3	0,4 ± 0,1
14(10 °C)	1,1 ± 0,3	0	0,7 ± 0,3	6,1 ± 0,3	28,5 ± 1,4	0

SPM – spermin, TYM – tyramin

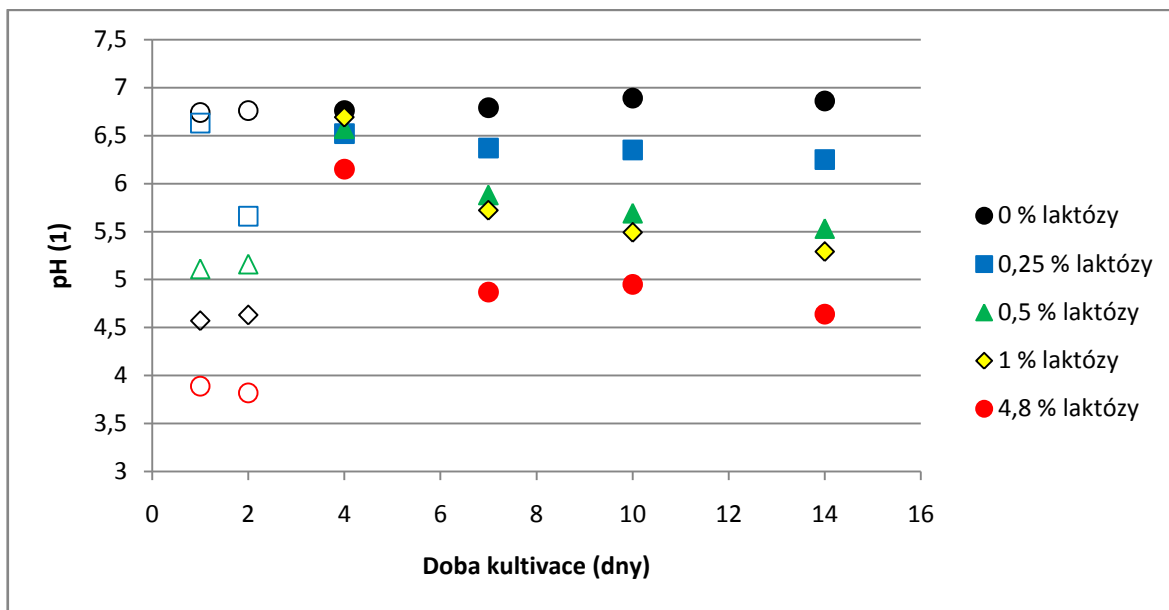
PŘÍLOHA P III: ZMĚNA PH KULTIVAČNÍCH MEDIÍ



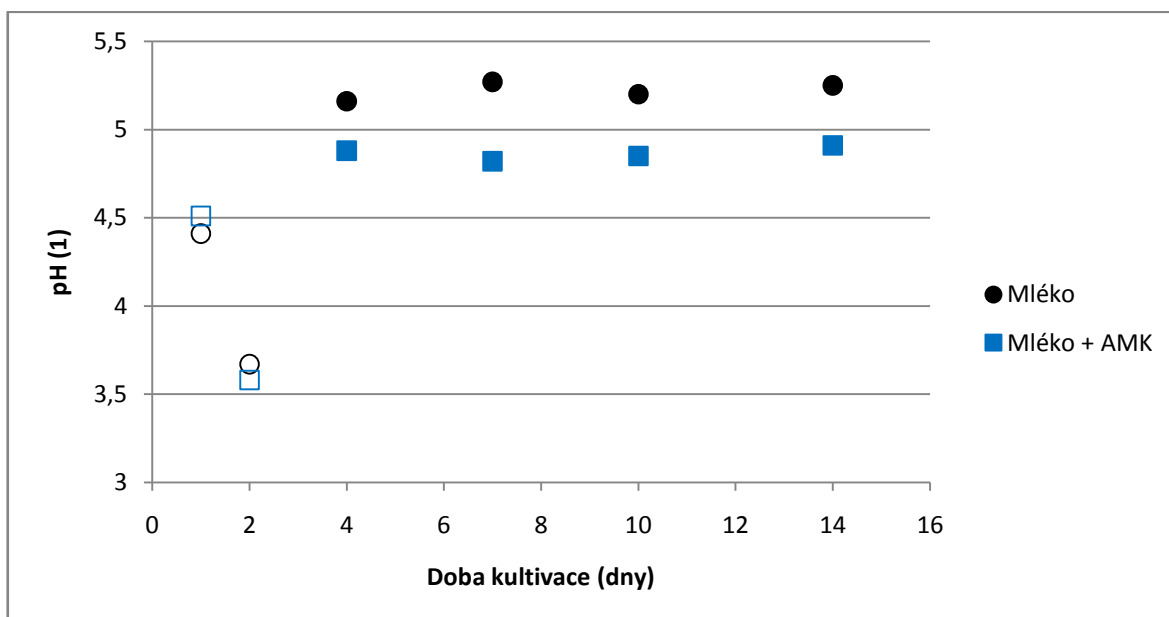
Změna pH u kultivačního média MRS s počáteční hodnotou pH 5 s různými koncentracemi laktózy



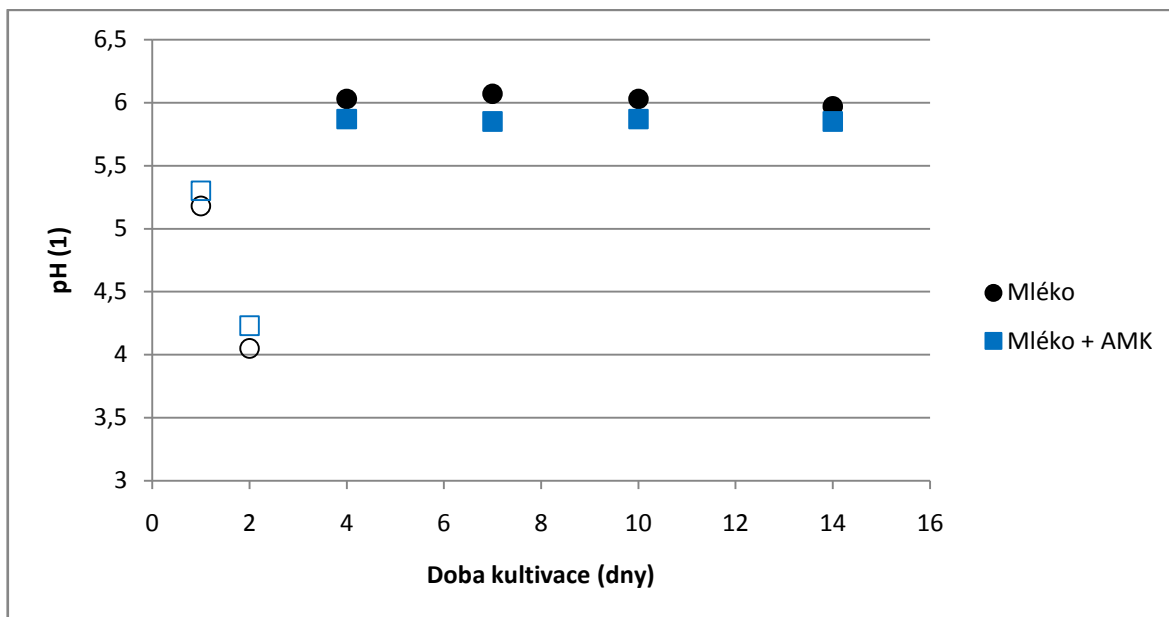
Změna pH u kultivačního média MRS s počáteční hodnotou pH 6 s různými koncentracemi laktózy



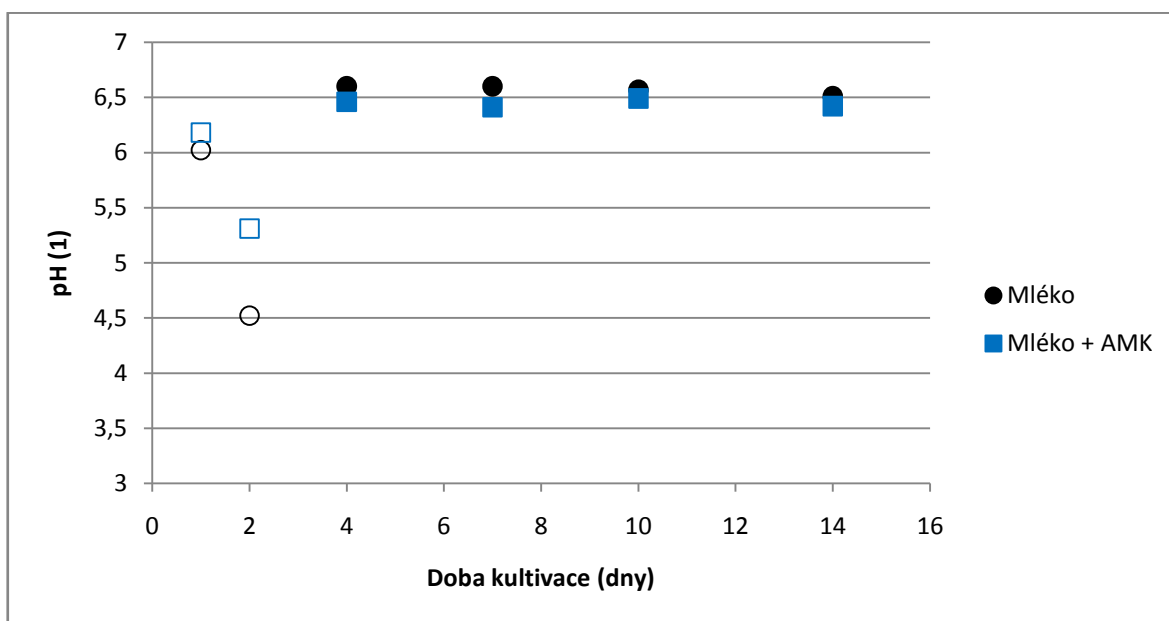
Změna pH u kultivačního média MRS s počáteční hodnotou pH 7 s různými koncentracemi laktózy



Obr. 3. Změna pH mléka s počáteční hodnotou pH 5 s různými koncentracemi laktózy



Obr. 3. Změna pH mléka s počáteční hodnotou pH 6 s různými koncentracemi laktózy



Obr. 3. Změna pH mléka s počáteční hodnotou pH 7 s různými koncentracemi laktózy