

Produkce biogenních aminů bakteriemi izolovanými z moravských vín

Simona Ondruchová

Bakalářská práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Simona ONDRUCHOVÁ**
Osobní číslo: **T10072**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Produkce biogenních aminů bakteriemi izolovanými z moravských vín**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika mikroorganismů ve vínech a jejich dekarboxylázová aktivita.
2. Výskyt biogenních aminů ve vínech.

II. Praktická část

1. Chromatografické stanovení produkce biogenních aminů bakteriemi izolovanými z vín.
2. Vyhodnocení produkce biogenních aminů.
3. Diskuse získaných výsledků a formulace závěrů práce.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] ANLI, R. Ertan a Mustafa BAYRAM. Biogenic Amines in Wines. Food Reviews International [online]. 2008-12-22, roč. 25, č. 1, s. 86-102 [cit. 2013-01-09]. ISSN 8755-9129. DOI: 10.1080/87559120802458552. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/87559120802458552>
- [2] FUGELSANG, K. a Charles G. EDWARDS. Wine microbiology. 2nd ed. New York, NY: Springer, c2007, xx, 393 p. ISBN 03-873-3349-5.
- [3] LANDETE, José M., Sergi FERRER, Lucía POLO a Isabel PARDO. Biogenic Amines in Wines from Three Spanish Regions. Journal of Agricultural and Food Chemistry [online]. 2005, roč. 53, č. 4, s. 1119-1124 [cit. 2013-01-09]. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf049340k. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf049340k>
- [4] BENEDEUCE, L., A. ROMANO, V. CAPOZZI, P. LUCAS, L. BARNAVON, B. BACH, P. VUCHOT, F. GRIECO a G. SPANO. Biogenic amine in wines. Annals of Microbiology [online]. 2010, roč. 60, č. 4, s. 573-578 [cit. 2013-01-09]. ISSN 1590-4261. DOI: 10.1007/s13213-010-0094-4. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s13213-010-0094-4>
- [5] LANDETE, José Maria, Blanca DE LAS RIVAS, Angela MARCOBAL a Rosario MUÑOZ. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. International Journal of Food Microbiology [online]. 2007, roč. 117, č. 3, s. 258-269 [cit. 2013-01-09]. ISSN 01681605. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.05.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160507002644>

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

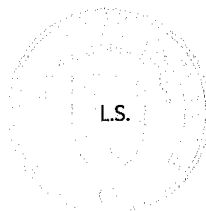
16. ledna 2013

Termín odevzdání bakalářské práce:

2. května 2013

Ve Zlíně dne 4. února 2013


doc. Ing. Román Čermák, Ph.D.
děkan




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

Příjmení a jméno: ONDRUCHOVA SIMONA

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, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 14.5.2013

..... Ondruchova

²⁾ 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.

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

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

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

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

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdětku 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 výdětku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

V bakalářské práci byla sledována produkce osmi biogenních aminů u 140 kmenů bakterií vyizolovaných z moravských vín, které byly kultivovány na třech půdách.

Teoretická část je zaměřena na charakteristiku a význam mikroorganismů a biogenních aminů vyskytujících se ve vínech a problematiku s ní spojenou.

V praktické části je sledována produkce biogenních aminů bakteriemi pomocí kapalinové chromatografie po předchozí derivatizaci dansylchloridem.

Klíčová slova: víno, biogenní aminy, mikroorganismy, bakterie mléčného kvašení

ABSTRACT

The bachelor thesis deals with the production of eight biogenic amines in 140 strains of bacteria isolated from Moravian wines that were grown on three broths. The theoretical part is focused on the characteristics and importance of microorganisms and biogenic amines in wines. In the practical part of the thesis was monitored the production of biogenic amines by bacteria using liquid chromatography after derivatisation of dansylchloride.

Keywords: wine, biogenic amines, microorganisms, lactic acid bacteria

Poděkování:

Především bych chtěla poděkovat vedoucí práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D za odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi umožnily vypracovat tuto bakalářskou práci. Ráda bych také poděkovala všem ostatním, kteří mi jakýmkoli způsobem pomohli při práci

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 CHARAKTERISTIKA MIKROORGANISMŮ VE VÍNECH	11
1.1 MIKROBIOLOGIE HROZNŮ.....	11
1.2 MIKROORGANISMŮ S AMINOKYSELINOVOU DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITOU	12
1.2.1 Bakterie mléčného kvašení	12
1.2.1.1 Rod <i>Pediococcus</i>	14
1.2.1.2 Rod <i>Lactobacillus</i>	14
1.2.1.3 Rod <i>Leuconostoc</i>	15
1.2.1.4 Rod <i>Oenococcus</i>	16
1.2.2 Bakterie octového kvašení	16
1.2.2.1 <i>Gluconobacter oxydans</i>	17
2 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ	18
2.1 TVORBA A PŮVOD BIOGENNÍCH AMINŮ VE VÍNĚ	19
2.1.1 Dělení biogenních aminů	20
2.2 VLASTNOSTI A BIOLOGICKÉ ÚČINKY BIOGENNÍCH AMINŮ	21
2.3 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ V ŽIVOČIŠNÝCH MATERIÁLECH	23
2.4 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ V ROSTLINNÝCH MATERIÁLECH.....	23
2.5 STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	24
II PRAKTICKÁ ČÁST	25
3 MATERIÁL A METODY	26
3.1 CHARAKTERISTIKA TESTOVANÝCH VZORKŮ BAKTERIÍ.....	26
3.2 PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO ANALÝZU BIOGENNÍCH AMINŮ.....	26
3.3 STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ METODOU KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE	27
4 VÝSLEDKY	29
4.1 PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ BAKTERIEMI IZOLOVANÝMI NA PŮDĚ PCA.....	29
4.2 PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ BAKTERIEMI IZOLOVANÝMI NA PŮDĚ M17.....	31
4.3 PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ BAKTERIEMI IZOLOVANÝMI NA PŮDĚ MRS	34
5 DISKUZE	36
ZÁVĚR	40
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	41
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	45
SEZNAM OBRÁZKŮ	46
SEZNAM TABULEK	47

ÚVOD

Vino je jednou z nejzajímavějších forem přeměny surového rostlinného materiálu na alkoholický nápoj, která začíná převozem sklizených hroznů do sklepů a končí nejaktivnějšími a rozhodujícími fermentačními kroky. Poté vína prochází dlouhou dobu zrání, při které se rozvíjí a zdokonaluje chuť a vůně vína [1,2].

Přeměna hroznového moštu ve víno je spontánním jevem, kdy je mikrobiální komplex bobulí hroznů vystaven novému ekosystému, když jsou hrozny drceny a lisovány. Tato mikroflóra se během celého procesu výroby mění a upravuje, dochází ke vznikům produktů jejich metabolismů, které mají pozitivní i negativní vliv na jejich technologii [2,3].

Během pěstování, sklizně a dalšími procesy výroby dochází díky přítomnosti mikroorganismů se schopností aminokyselinové dekarboxylace ke vznikům biogenních aminů. Biogenní aminy mají na lidský organismus pozitivní vliv, tak i negativní, ten je spojen především s vysokým příjmem z potravy a může mít za vliv závažné zdravotní komplikace. A proto je nutné tyto hodnoty sledovat a zkoumat příčiny jejich vzniku [4].

Tato práce se zabývá zhodnocením obsahu osmi biogenních aminů u 140 kmenů bakterií vyizolovaných z moravských vín.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA MIKROORGANISMŮ VE VÍNECH

Téměř před 150 lety Louis Pasteur dokázal, že víno je výrobek alkoholového kvašení hroznové šťávy působením kvasinek. Mikrobiální ekologie procesu nyní však zahrnuje kromě alkoholového kvašení i komplexní interaktivní příspěvky kvasinek, vláknitých hub, bakterií mléčného kvašení, bakterií octového kvašení, případně jiných bakteriálních skupin a dokonce i bakteriofágů [1]. Mikrobiální ekologie vína je komplex, kde mikroorganismy mohou hrát jak pozitivní, tak i negativní roli v kvalitě konečného výrobku [5].

Kvašení hroznového moštu a produkce nejkvalitnějších vín je složitý biochemický proces, který zahrnuje interakce enzymů z mnoha různých mikrobiálních druhů, ale především kvasinek a bakterií mléčného kvašení. Kvasinky jsou ve víně zodpovědné za alkoholové kvašení, zatímco bakterie mléčného kvašení za jablečno-mléčnou fermentaci [4].

1.1 Mikrobiologie hroznů

Hrozny mají složitou mikrobiální ekologii, zahrnující vláknité houby, kvasinky a bakterie s různými fyziologickými vlastnostmi, které se projeví při výrobě vína. Některé druhy se nacházejí pouze v hroznech, příkladem mohou být parazitické houby, zatímco jiné mají schopnost přežít a růst ve vínech, tvořící vinné mikrobiální společenství. Toto společenství zahrnuje druhy kvasinek, bakterie mléčného a octového kvašení [6].

Podíl jednotlivých skupin mikroorganismů závisí na fázi zralosti hroznů a na dostupnosti živin. Bobule jsou náchylné na houbové parazity, po dozrání je mikroflóra neporušených bobulí podobná listům rostlin, na kterých jsou dominantní kvasinky skupiny *Basidiomycetes* (např. *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., *Sporobolomyces* spp.) a kvasinky *Aureobasidium pullulans*. Kutikula vizuálně neporušených plodů může mít na povrchu mikrotrhliny, dále dochází k měknutí zráním, čím se zvyšuje prostupnost živin a vysvětluje se tím také možné dominantní postavení oxidační nebo slabě fermentativní populace askomycet (např. *Candida* spp., *Hanseniaspora* spp., *Metschnikowia* spp., *Pichia* spp.) s blížící se sklizní [6].

Pokud je slupka bobulí viditelně poškozena, dostupnost vysoké koncentrace cukru na povrchu bobule podporuje nárůst askomycet s vyšší fermentační aktivitou jako je *Pichia* spp. a *Zygoascus hellenicus*, včetně nebezpečných kvasinek vinného kažení (např. *Zygosaccharomyces* spp., *Torulasporea* spp.) a bakterií octového kvašení (např. *Gluconobacter* spp., *Acetobacter* spp.). Druhy cukerné fermentace *Saccharomyces cerevisiae* se zřídka

nachází na povrchu hroznů bez poškození, upřednostňují poškozené bobule. Bakterie mléčného kvašení jsou vedlejšími zástupci hroznové mikroflóry, ale zároveň jsou typickým původcem jablečno-mléčného kvašení [6]. Nicméně vzhledem k jejich nutričním požadavkům je druhová rozmanitost a hustota osídlení omezena. Nepoškozené ovoce obsahuje $<10^3$ CFU/g a také i populace v hroznovém moštu je během raných fází zpracování nízká [8]. *Oenococcus oeni* je jen zřídka izolován přímo z hroznů [6]. Pokud dojde ke zhoršení kvality ovoce, může dojít ke značnému rozvoji mikroorganismů. Není však známo, zda zvýšení počtu nativní bakteriální populace je v důsledku zvýšené dostupnosti živin (vyplývající z degradace ovoce) nebo z jiného důvodu souběžně s infekcí [8].

Druhy, izolovány z hroznových moštů jsou *Lactobacillus hilgardii*, *L. plantarum*, *L. casei*, *O. oeni*, *Leuconostoc mesenteroides* a *Pediococcus damnosus* [8].

1.2 Mikroorganismy s aminokyselinovou dekarboxylázovou aktivitou

Mnoho bakterií mléčného kvašení, patřících do rodů *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus* a *Leuconostoc* je schopno dekarboxylace aminokyselin. Mezi další mikroorganismy obsahují enzymy umožňující dekarboxylaci aminokyselin v potravinách lze zařadit zástupce rodů *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Photobacterium*, a také rodů čeledi *Enterobacteriaceae* (např. *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*), *Micrococcaceae* a nebo rod *Staphylococcus* [14].

1.2.1 Bakterie mléčného kvašení

Mošty a vína jsou selektivní média, která podporují růst pouze několika druhů bakterií mléčného kvašení [7]. Bakterie mléčného kvašení (BMK) tvoří velkou přirozenou skupinu nepohyblivých, nesporulujících grampozitivních koků a tyčinek, které fermentují sacharidy za fakultativně anaerobních (případně mikroaerofilních) podmínek a tvoří při tom hlavně kyselinu mléčnou. Ve svém fermentativním metabolismu produkují látky a vytvářejí podmínky, které jsou pro jiné (nežádoucí) bakterie zpravidla škodlivé. Konzervační vlastnosti bakterií mléčného kvašení a jejich fermentačních produktů se využívají na prodloužení trvanlivosti potravin živočišného a rostlinného původu [10].

Hlavním terminálním produktem kvašení je kyselina mléčná, její metabolismus může za aerobních podmínek vést až k oxidační disimilaci za vzniku oxidu uhličitého a kyseliny octové. Přitom se jako meziprodukt tvoří mikrobicidní peroxid vodíku. Dalším významným selekčním faktorem BMK je rychlé snížení pH prostředí na hodnoty pH 4 a nižší.

Mnohé nežádoucí bakterie v potravinách nesnáší takto nízké hodnoty a jako i nedisociovanou kyselinu mléčnou a kyselinu octovou [10].

BMK využívají cukry buď homo- nebo heterofermentativní cestou [8]. Homofermentativní bakterie produkují z glukózy více než 85% kyseliny mléčné. Heterofermentativní bakterie produkují ke kyselině mléčné navíc oxid uhličitý, etanol, a kyselinu octovou [9]. Vzhledem k tomu, že růst některých bakterií je ve víně žádoucí, může růst jiných vést k jejich znehodnocení [8].

BMK jsou ve víně zastoupeny především čtyřmi rody: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* a *Oenococcus*. V průběhu alkoholového kvašení je populace bakterií mléčného kvašení složena hlavně z *Pediococcus* spolu s *Oenococcus oeni*. Hlavní druhy přítomné v hroznech, homofermentativní laktobacily rychle zmizí po zahájení alkoholového kvašení ve prospěch *Leuconostoc mesenteroides*, který je na konci kvašení nahrazen *Oenococcus oeni* [7].

Bakterie rodu *Pediococcus* jsou homofermentativní, *Leuconostoc* a *Oenococcus* patří mezi heterofermentativní, *Lactobacillus* může prezentovat jak homo- tak i heterofermentativní chování a jsou rozděleny do tří skupin [9]:

1. přísně homofermentativní (tato skupina doposud nebyla identifikována ve víně),
2. fakultativně heterofermentativní,
3. přísně heterofermentativní.

Tyto bakterie vyžadují bohatý zdroj živin a růstových faktorů, které jim v přírodě poskytují neporušené a rozkládající se rostliny a potraviny. Na tyto bohaté zdroje si přivykly tak, že nemají schopnost samy si syntetizovat určité růstové faktory, jako jsou aminokyseliny, vitaminy skupiny B a jiné. Při kultivaci BMK na umělých živných půdách anebo při fermentaci na získání maximálního množství biomasy se musí proto tyto látky přidávat ve formě kvasničného autolyzátu (extraktu), mléčné syrovátky a rostlinných šťáv (rajčatové, mrkvové). Za růst a metabolismus BMK za standardních podmínek zodpovídá určité množství dané aminokyseliny anebo určitého vitamínu B v prostředí. Tato skutečnost se využívá na mikrobiologické stanovení některých aminokyselin a vitaminů v potravinách a krmivech [10].

BMK jsou rovněž důležitou složkou skupin technologicky významných mikroorganismů, které se používají jako výrobní prostředky při fermentačních procesech v technologii kysaných potravin živočišného a rostlinného původu (čistě bakteriální kultury, zákysy, starté-

ry). Kromě hlavní úlohy, tedy kysnutí příslušné poživatiny, dále přispívají i vedlejšími metabolismy k tvorbě typické chuti a aroma příslušného fermentovaného produktu [10].

1.2.1.1 Rod *Pediococcus*

Původním stanovištěm bakterií rodu *Pediococcus* jsou rostliny, z kterých se dostávají do příslušných poživatin. V některých jsou škůdci, v jiných jsou součástí fermentační mikrofóry. Pokud jsou přítomny v přiměřeném množství ve víně, zúčastňují se odbourávání jablečné dikarboxylové kyseliny na monokarboxylovou kyselinu mléčnou a CO₂, čímž se snižuje obsah kyselin ve víně. Při nepřiměřeném množství může *Pediococcus* produkovat nežádoucí acetoin a z něj následně diacetyl [10].

Z vína byly izolovány tyto druhy: *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus* a *P. pentosaceus*, přičemž mezi nejčastěji se vyskytující patří *P. damnosus* a *P. parvulus* [8].

1.2.1.2 Rod *Lactobacillus*

Lactobacillus představuje velmi různorodou skupinu mikroerofilních bakterií, které se pod mikroskopem jeví jako dlouhé či krátké tyčinky nebo dokonce jako kokobacily [8].

Laktobacily rostou, rozmnožují se a metabolizují za anaerobních podmínek, ale i při sníženém obsahu kyslíku ve všech prostředích, které poskytují dostatek fermentovatelných sacharidů, štěpných produktů bílkovin, nukleových kyselin a vitaminů skupiny B. Upřednostňují mezofilní a mírné termofilní teploty. Při fermentaci sacharidů tvorbou kyselin snižují kyselost prostředí až pod pH 4,0. Kyselina mléčná a octová jsou v kyselém prostředí málo disociované a v tomto stavu působí spolu se sníženým pH inhibičně až mikrobicidně na ostatní mikroorganismy v prostředí, s výjimkou jiných BMK a kvasinek [10].

V přírodě se laktobacily nacházejí v menším množství na povrchu neporušených rostlin, na druhou stranu spolu s ostatními BMK rostou ve velkém množství na rozkládajících se rostlinných materiálech, jmenovitě na kazícím se ovoci. Z tohoto důvodu mají velký význam při výrobě mnoha rostlinných fermentovaných výrobků a také při kažení poživatin a krmiv rostlinného původu, jako je kysané zelí, kvašené okurky, kvašená zeleninová směs, siláž, pivo, víno ovocné šťávy a jiné [10].

Mezi druhy, které byly vyizolovány z hroznů a vín po celém světě patří: *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. vini*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. fructivorans*, *L. lindneri*, *L. hilgardii*, *L. jensenii* a další [8, 20, 21].



Obr. 1 – *L. brevis* zobrazen v mikroskopu s fázovým kontrastem při zvětšení 1000x [8].

1.2.1.3 Rod *Leuconostoc*

Buňky bakterií jsou okrouhlé, kulovité až čočkovité spojené po dvou nebo do řetízků a netvoří spory. Jsou fakultativně anaerobní, kataláza negativní. Nejsou proteolytické, nehemolyzují a neredukují dusičnan na dusitan. Na vhodných polotuhých živných půdách tvoří zpravidla drobné okrouhlé hladké světle bílé kolonie. V bujónu způsobují pravidelný zákal, ale kmeny tvořící dlouhé řetízky se usazují na dně zkumavky. Jejich optimální růstové teploty jsou v širokém rozmezí 20 až 30 °C. V živných půdách vyžadují přítomnost růstových faktorů, aminokyselin a vitaminy skupiny B [10].

Růst je podmíněn přítomností fermentovatelného sacharidu. Glukózu fermentují všechny druhy pomocí kombinace hexosomonofosfátových a fosfoketolásových metabolických drah. Tvoří kyselinou mléčnou, CO₂ a etanol. Některé kmeny mají i oxidativní mechanismus, tyto produkují na místo etanolu kyselinou octovou [10].

Druhy *Leuconostoc* se vyskytují v rostlinách, zelenině, silážích, mléce a mléčných výrobcích a dále v syrovém a zpracovaném mase. V současné době je známo pět druhů: *Leuconostoc mesenteroides*, *Leu. paramesenteroides*, *Leu. lactis*, *Leu. carnosum* a *Leu. gelidum*. *Leuconostoc mesenteroides* má tři poddruhy: subsp. *mesenteroides*, subsp. *dextranicum*, a subsp. *cremoris*. *Leuconostoc* je morfologicky heterogenní a může obsahovat geneticky různorodé skupiny bakterií. Nedávno z něj byly vyčleněny dva nové rody *Weissella* a *Oenococcus* [12].

1.2.1.4 Rod *Oenococcus*

Bakterie vína patřící do rodu *Oenococcus* byla již dříve klasifikována jako *Leuconostoc oenos*, později fylogenetické studie odhalily, že se *Leu. oenos* výrazně odlišuje od ostatních *Leuconostoc* spp., což vedlo k vytvoření nového rodu. Od ostatních leukonostoků se liší několika charakteristickými znaky. Roste dobře v kyselém prostředí (počáteční pH 4,2 až 4,8), snáší prostředí s 10 % ethanolu. Jeho růst je pomalý a vyžaduje 5 až 7 dní 22 °C. Jiné leukonostoky v takto kyselém prostředí nezačínají růst [10].

Vzhledem k tomu, že tyto bakterie disponují, rozmanitými fyziologickými vlastnostmi, jako je např. způsob fermentace sacharidů, je možné, že *O. oeni* může představovat více než jeden druh [8].

Druh *O. oeni* je popsán, jako elipsoidní až kulovité buňky, které se obvykle vyskytují v párech nebo řetězcích. Buňky mohou být mikroskopicky obtížně rozpoznatelné od krátkých tyčinek laktobacilů [8].

1.2.2 Bakterie octového kvašení

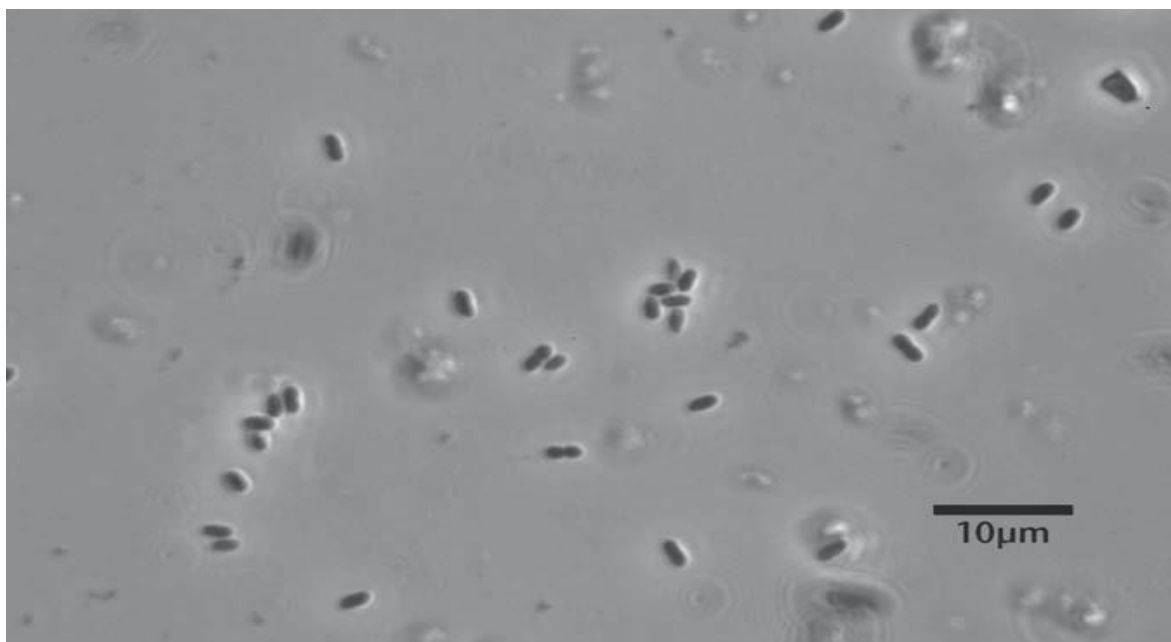
Bakterie octového kvašení (BOK) byly poprvé rozpoznány jako původci kažení vína v devatenáctém století. Jejich schopnost oxidovat etanol na kyselinu octovou vyvolává kažení vína, ale má zásadní význam pro komerční produkci octa [13].

BOK jsou gramnegativní, aerobní, katalázapozitivní tyčinky čeledi *Acetobacteraceae*. *Acetobacter* a *Gluconobacter* jsou popisovány jako tyčinky elipsoidního tvaru, i když jsou značné mikroskopické variace mezi druhy a stejně i mezi příslušnými kmeny. Dokonce i ověřené čisté kultury mohou vykazovat značnou morfológickou nesourodost v rozmezí od zakřivených po vláknité tyčinky, které se vyskytují jednotlivě, v párech nebo v krátkých řetězcích [13].

BOK se dělí do čtyř rodů: *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Gluconobacter* a *Gluconacetobacter*. Z hroznů a vín byly izolovány *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus*, *Gluconacetobacter liquefaciens* (dříve *A. liquefaciens*) a *Gluconacetobacter hansenii* (dříve *A. hansenii*) [8].

Na rozvoj octových bakterií má velký vliv způsob sklizně a transport hroznů ke zpracování. Při transportu hroznů poškozených nebo napadených houbovými chorobami je důležitá rychlost a aplikace oxidu siřičitého přímo při sklizni ve vinici a nízké teploty při sklizni a transportu. Oxid siřičitý dokáže rozvoj bakterií účinně brzdit. Po vylisování moštu je

vhodné rychle nastartovat kvašení, díky kterému se zvyšuje obsah alkoholu a tvorba CO₂, což dokáže inhibovat velikost populace a rozvoj octových bakterií [6].



Obr. 2 – *A. aceti* zobrazen v mikroskopu s fázovým kontrastem při zvětšení 1000x [8].

1.2.2.1 *Gluconobacter oxydans*

Gluconobacter oxydans obecně roste v prostředí bohatém na cukr, kde alkohol buď chybí, nebo je přítomen v nízkých koncentracích [8]. Vyskytuje se jako kontaminace pekařského droždí, piva, vína a jiných nápojů. V přírodě se často vyskytuje i v květních nektarech a na včelách [11].

Typická místa pro izolaci *Gl. oxydans* jsou části květin a kazící se ovoce. Pro srovnání, *Acetobacter* spp. je obvykle izolován z fermentovaných substrátů (víno, pivo, atd.), přestože je lze nalézt také v rozpadajícím se ovoci procházejícím kvašením [8]. Na zdravých hroznech se nejvíce vyskytuje druh *Gl. oxydans*, který je dominantní v moštu a na počátcích kvašení, ke konci kvašení opět převažuje *Acetobacter aceti* [6].

2 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ

Biogenní aminy (BA) jsou organické báze disponující biologickou činností, které se často vyskytují ve fermentovaných potravinách a nápojích. Jsou produkovány především v důsledku dekarboxylace aminokyselin. Vysoká koncentrace BA může u citlivých lidí vyvolat nežádoucí fyziologické účinky. Konkrétněji je známo, že histamin způsobuje bolesti hlavy, nízký krevní tlak, bušení srdce, zvracení, průjem a další příznaky. Tyramin a fenyletylamin mohou způsobit vysoký krevní tlak uvolněním noradrenalinu a norefedrinu. Putrescin a kadaverin, které samostatně nejsou toxické, zhoršují nežádoucí účinky histaminu, tyraminu i fenyletylaminu, protože zasahují do působení enzymů, které je metabolizují [15]. Za nejdůležitější BA v potravinách jsou považovány histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, spermin, spermidin, 2-fenyletylamin a tryptamin. BA lze nalézt jako důsledek mikrobiální činnosti v potravinách, jako je víno, kysané masné a rybí výrobky, sýry a fermentovaná zelenina [14].

BA jsou skupinou alifatických, aromatických nebo heterocyklických bází odvozených od aminokyselin, které vykazují různé biologické účinky, neboť v živočišných tkáních a rostlinných pletivech plní různé funkce. Některé BA jsou např. protoalkaloidy rostlin (hordeinin, gramin), stavebními látkami pro biosyntézu fytohormonů ze skupiny auxinů, alkaloidů a dalších sekundárních metabolitů rostlin, v živočišných tkáních mají funkci tkáňových hormonů (histamin), jsou prekurzory hormonů nadledvinek živočichů (katecholaminy) [16,23,24].

BA vznikají z aminokyselin působením dekarboxyláz (dekarboxyláz obsahujících jako kofaktor pyridoxal-fosfát) nebo z aminokyselin a karbonylových sloučenin působením transamináz. Tzv. endogenní aminy jsou jako produkty metabolismu v nízkých koncentracích přirozenou složkou prakticky všech potravin. Exogenní BA vznikají v potravinách jako důsledek mikrobiální kontaminace a při kvasných procesech [16].

BA jsou důležité dusíkaté sloučeniny v rostlinných, mikrobiálních a živočišných buňkách. Mohou být detekovány v syrových i zpracovaných potravinách. V potravinářské mikrobiologii jsou někdy spojovány s kazivostí nebo fermentací potravin. Aminy, které jsou nízkomolekulární organickou zásadou, mohou být tvořeny i degradovány v důsledku normálních metabolických pochodů ve zvířatech, rostlinách i mikroorganismech. Produkce aminů je spojena s ochrannými mechanismy mikroorganismů vůči kyselému prostředí [4].

2.1 Tvorba a původ biogenních aminů ve víně

Akumulace BA v potravinách vyžaduje dostupnost prekurzorů (tj. aminokyselin), dále přítomnost mikroorganismů se schopností aminokyselinové dekarboxylace a příznivých podmínek zajišťující jejich růst a dekarboxylační činnost [14].

Existují tři hlavní požadavky na tvorbu biogenních aminů:

1. dostupnost volných aminokyselin,
2. přítomnost dekarboxyláza-pozitivních mikroorganismů,
3. podmínky, které zajišťují růst bakterií, dekarboxylázovou syntézu a aktivitu.

Základní reakce mikrobiálního katabolismu aminokyselin zahrnují dekarboxylaci, transaminaci, deaminaci a desulfurikaci. Mnoho bakterií je schopno dekarboxylace aminokyselin, tato reakce probíhá z důvodu podpory růstu a přežití v kyselém prostředí, jelikož vede ke zvyšování pH [4].

Tři možné původy BA ve víně [4]:

1. pocházejí již z moštu,
2. jsou vytvořeny kvasinkami během alkoholového kvašení,
3. tvořeny ve víně působením bakterií podílejících se na jablečno-mléčné fermentaci.

Fermentační podmínky, jako je teplota, změny pH a přístup kyslíku jsou důležité faktory, které ovlivňují množství BA v konečném výrobku. Mezi další faktory ovlivňující přítomnost BA patří, ošetřování hroznů, přítomnost vlákniny a slupek, obsah alkoholu, koncentrace oxidu siřičitého a přídatných živin [4]. Zvláštní význam náleží hodnotě pH, jelikož se zjistilo, že zvláště u hodnot pH nad 3,6 jsou podporovány bakteriální přeměny. Během alkoholového kvašení se tvoří hlavně etanolamin, mimoto se mají následkem prokvašení čistými kulturami kvasinek ve srovnání se spontánním kvašením tvořit ve zvýšené míře BA [19].

Spontánní, nekontrolovatelné odbourávání kyselin bakteriemi druhu *Lactobacillus*, resp. *Pediococcus* vede ke zvýšení BA, zvláště histaminu. Při použití startovacích čistých kultur bakterií, které jsou běžně k dostání v obchodní síti (selektované *Oenococcus oeni*) nebylo zjištěno žádné zvýšení, resp. bylo zjištěno zvýšení jen nepodstatné. Dále by se mělo zaměřit tomu, aby příliš vysoké dávky SO₂ (50 mg/l SO₂) před biologickým odbouráním kyselin požadované bakterie potlačily, a tak se podpořily původci poškození. Jelikož je tvorba BA zpravidla vyvolána mikrobiologickými aktivitami, je možno zvýšený obsah především

kadaverinu, putrescinu a histaminu považovat za příznak zkaženosti, resp. za znak nedostatečné hygieny ve sklepě [19].

Některé aminy jsou přirozenými složkami hroznů v různých množstvích a v různých variacích, kdy záleží na typu půdy a jejím složení, hnojení, klimatických podmínkách během růstu a stupni zrání, na metodě zpracování vína, rozšíření autolýzy, růstu bakterií mléčného kvašení, reziduální mikrobiální populaci, procesu čiření a enologickém ošetřování vína a také i na kmenu kvasinek zasahujících do kvašení [4].

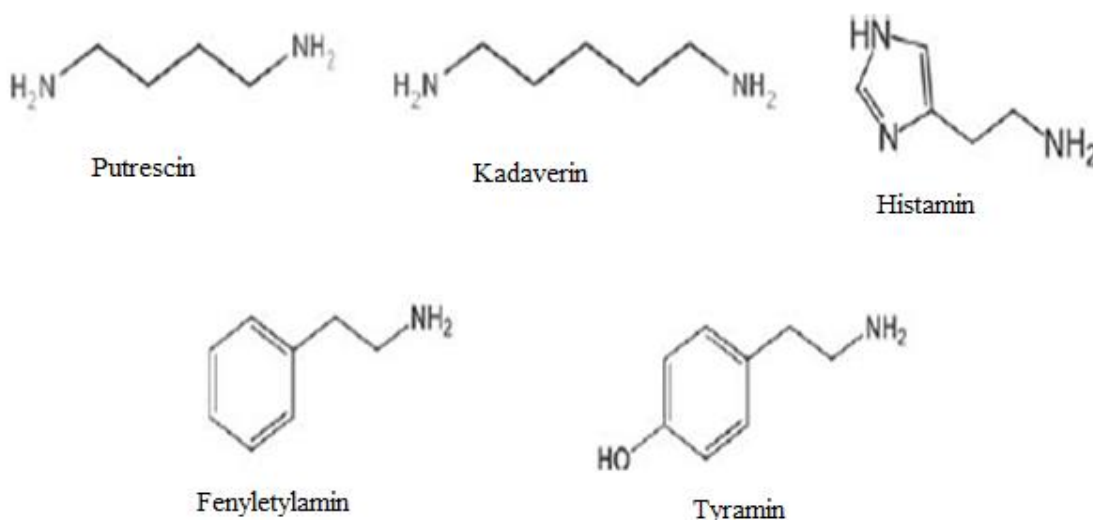
Některé z těchto faktorů zvyšují koncentraci prekurzorů (aminokyselin), zatímco jiné podporují rozvoj mikroorganismů se schopností tvořit aminy. Jablečno-mléčná fermentace ve víně je sekundární fermentací, která se obvykle vyskytuje na konci alkoholového kvašení kvasinkami, ačkoli se někdy vyskytne i dříve [4].

2.1.1 Dělení biogenních aminů

Podle chemické struktury se BA člení na:

- aromatické (tyramin a 2-fenyletylamin),
- heterocyklické (histamin a tryptamin),
- alifatické (putrescin a kadaverin),
- polyaminy (spermidin, spermin a příp. agmatin).

Někdy se mezi polyaminy zjednodušeně řadí i diaminy podobně jako se heterocyklické aminy zjednodušeně řadí do skupiny aromatických aminů [23,24].



Obr. 3 – Chemická struktura BA nejčastěji se vyskytujících ve víně [22].

2.2 Vlastnosti a biologické účinky biogenních aminů

BA jsou nezbytné pro několik fyziologických funkcí, např. regulaci tělesné teploty a sekreci žaludeční kyseliny, ale konzumace potravin s vysokou koncentrací BA může vést k významným nežádoucím účinkům, např. hypotenzi (histamin), hypertenzi (tyramin), nevolnosti, zvracení, průjmů, migrénám (fenyletylamin, tyramin), bušení srdce, selhání ledvin, případně až smrti [16, 28].

Ve vysokých koncentracích se mohou projevat jako látky:

- psychoaktivní,
- vasoaktivní.

Psychoaktivní aminy působí jako přenašeči v centrálním nervovém systému, vasoaktivní aminy působí přímo nebo nepřímo na vaskulární systém. Vasoaktivní aminy se podle účinku dělí na:

- vasokontraktibilní aminy (např. tyramin)
- vasodilatační aminy (např. histamin).

Monoaminoxidáza a diaminoxidáza jsou hlavními enzymy, které BA ve střevech odbourávají. Spermidin a spermin jsou odbourávány polyaminoxidázou. Toxický účinek BA je silně ovlivněn aktivitou těchto enzymů, která může být u jednotlivých jedinců různá a závislá na řadě faktorů, např. na přítomnosti inhibitorů (určitá léčiva, zejména ze skupiny psychofarmak, v menší míře i alkohol) nebo potenciátorů. Vysoké koncentrace BA není již schopen tento enzymový systém eliminovat. Při hodnocení toxického účinku je nutné zvažovat nejen přítomnost konkrétního aminu, ale i ostatních faktorů, jakými jsou množství spotřebované potraviny, přítomnost jiných toxických látek apod. Z tohoto důvodu je velmi obtížné stanovit hranici toxicity BA. Koncentrace histaminu vyšší než 500-1000 mg.kg⁻¹ se považují pro člověka za nebezpečné. Zvýšené množství histaminu může vyvolat anafylaktický šok (tj. silný otřes provázený poruchou hlavních funkcí organismu). Otravy histaminem (histaminóza) z mořských ryb a výrobků z nich jsou v přímořských zemích jednou z nejčastějších příčin otravy vyvolaných potravinami (alimentární intoxikací) [16,24].

V řadě zemí je předepsáno nejvyšší povolené množství histaminu a tyraminu. Pro fenyletylamin se uvádějí hodnoty 30 mg.kg⁻¹ [16].

Vyhláška č. 53/2002 Sb., zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, platná do vstupu ČR do EU v květnu 2004, udávala nejvyšší přípustné množství histaminu

v rybách a rybích výrobcích 200 mg.kg^{-1} a přípustné množství histaminu v pivu a vínu 20 mg.kg^{-1} . Přípustné množství tyraminu ve vínu bylo (Vyhláška č. 298/1997 Sb.) 50 mg.kg^{-1} , sýrech 200 mg.kg^{-1} a v potravinách všeobecně 100 mg.kg^{-1} . Současná platná Vyhláška č. 305/2004 Sb. udává hodnoty pouze pro histamin: nejvyšší povolené množství 200 mg.kg^{-1} pro ryby a rybí výrobky a přípustné množství 20 mg.dm^{-3} pro pivo a víno [16,17,18].

Polyaminy spermidin a spermin, jako vícefunkční kationty, plní řadu významných biologických rolí. Nejvýznamnější z nich je účast při proteosyntéze a biosyntéze nukleových kyselin, tzn. při dělení a růstu buněk. Na biologických pochodech u živočichů se podílejí polyaminy ze třech zdrojů [16]:

1. endogenní vytváření v buňkách,
2. produkované mikroflórou trávicího traktu,
3. přijímané potravou.

Zvýšený příjem potravních polyaminů je žádoucí pro urychlené hojení ran, popálenin, vývoj a obnovu střevní mukózy apod. Naopak jejich příjem potravou má být co nejnižší u osob s nádorovými onemocněními. Téměř obecně platí, že v rostlinných materiálech je více spermidinu než sperminu, zatímco u živočišných produktů je tomu naopak. Fyziologická potřeba polyaminů pro člověka zdravého i nemocného avšak není známá [16].

V případě konzumace vína mohou být nežádoucí či negativní účinky zesíleny v důsledku souběžného podávání etanolu, který snižuje či inhibuje aktivitu monoaminoxidázy a diaminoxidázy. Tyto aminy vznikají během procesu výroby vína, zejména pak při alkoholové a jablečno-mléčné fermentaci. Kvasinky zodpovědné za alkoholové kvašení produkují některé BA jako je putrescin, kadaverin a 2-fenyletylamin, ale v mnohem menších množstvích ve srovnání bakteriemi podílejícími se na jablečno-mléčné fermentaci. Tento fermentační krok je způsoben bakteriemi mléčného kvašení, ve většině případů druhem *Oenococcus oeni* [28].

Ačkoli obsah BA ve víně závisí na několika faktorech, jako je macerace, vinobraní, kyselost, odrůda, koncentrace aminokyselin, obsah kalu a schopnost bakteriální dekarboxylázy, je všeobecně uznáváno, že vznik BA je silně závislý na druhu bakterií mléčného kvašení odpovědných za jablečno-mléčnou fermentaci [28].

2.3 Výskyt biogenních aminů v živočišných materiálech

BA se vyskytují prakticky ve všech potravinách jako běžné produkty metabolismu. Ve vyšším množství se nacházejí ve fermentovaných výrobcích (např. sýry, trvanlivé salámy, pivo, víno, kysané zelí, aj.), kde vznikají mikrobiální činností. Působením kontaminující mikroflóry vznikají hlavně v rybách a v mase během skladování [14,16].

V mase, rybách a sýrech bývají hlavními BA histamin, 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. Čerstvé vepřové maso např. obsahuje do 7 mg.kg^{-1} kadaverinu a putrescinu, zatímco zkažené maso 60 mg.kg^{-1} a více. Vaření má relativně malý vliv na obsah BA, dochází pouze k jejich částečnému luhování a rozkladu. U masa vepřového je úbytek BA vyšší. Obsah polyaminů spermidinu a sperminu při tepelných úpravách masa a drobů klesá až o několik desítek procent, vyšší úbytky jsou při pečení a smažení než při vaření a dušení [16].

Obsah BA vzrůstá při výrobě fermentovaných salámů a některých sýrů, a to zejména zrajících. Tento nárůst je patrný hlavně v počátečních fázích fermentace výrobků a je závislý na druhu přítomných mikroorganismů. Při zrání sýrů dochází k výrazné tvorbě BA jen v provozech s nedostatečnou hygienickou úrovní, tedy vlivem kontaminující mikroflóry. Při dobré technologii a dodržování správných hygienických zásad obsahují i dlouhodobě zrající sýry jen poměrně malá množství BA, z polyaminů bývá v nejvyšším množství přítomen spermidin [6,16].

2.4 Výskyt biogenních aminů v rostlinných materiálech

BA se jako přirozená součást vyskytují také v potravinách rostlinného původu. Hlavním BA v ovoci a zelenině bývá tyramin, v menším množství se vyskytuje řada dalších BA. Často se vyskytují konjugáty BA se skořicovými kyselinami či mastnými kyselinami. V některých rostlinách se nacházejí ve významném množství různé deriváty BA, které se běžně řadí mezi protoalkaloidy [16].

Poměrně hodně putrescinu mají citrusové plody, v banánech se jako hlavní BA vyskytuje tyramin a dále také histamin, dopamin či serotonin, v listech špenátu se vyskytuje volný histamin v množství zhruba 60 mg.kg^{-1} [16].

V případě vína je koncentrace BA závislá na jedné straně na přirozeném obsahu v bobulích a na druhé straně na podmínkách během výroby – zvláště hygieně a hodnotě pH. Průměrný

celkový obsah v moštu z nahnílého materiálu byl o 150 % vyšší než u zdravých hroznů. Vyšší celkový obsah byl způsoben především izopentylaminem a fenyletylaminem, zatímco se obsah ostatních BA (i histidinu) zvýšil jen nepatrně [19].

Tabulka 1 - Obsah hlavních BA v potravinách rostlinného původu [16]

Obsah v mg.kg ⁻¹						
Potravina	Histamin	Putrescin	Spermidin	Kadaverin	Fenyletylamin	Tyramin
Banány	-	5	10	-	-	7-95
Špenát	60	s-120	1-15	-	-	0-680
Pivo	0-22	2-15	0-7	0-40	0-8	1-68
Červené víno	0-30	2-20	s	0-47	s	0-90
Bílé víno	0-20	1-11	s	3-108	-	s-212

s = stopy

Obsah BA závisí také na typu vína. Je známo, že červená vína obsahují vyšší koncentrace BA, než vína bílá, což je způsobeno tím, že výroba červených vín zahrnuje maceraci se slupkou hroznů, která nejen zvyšuje množství polyfenolů, ale i dalších látek, jako např. aminokyselin. Zároveň se používá vyšší teplota fermentace a rovněž se uplatňuje jablečno-mléčná fermentace, která není běžně používaná u výroby bílých vín, nebo v případě jejího využití u výroby bílých vín po kratší dobu trvání [4].

2.5 Stanovení biogenních aminů

Pro stanovení BA bylo vyvinuto několik technik zahrnujících tenkovrstvou chromatografii (TLC), plynovou chromatografii (GC), kapilární elektroforézu (CE) a kapalinovou chromatografii (HLPC) [23,24].

V praxi se nejčastěji používají vysoce citlivé chromatografické metody na reverzních fázích s fluorescenční nebo UV detekcí po dansylaci, benzoylaci nebo derivatizaci. V poslední době se jeví jako velmi spolehlivé a vysoce citlivé chromatografické metody s elektrochemickou detekcí nebo detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (LC/MS) [23,24].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Charakteristika testovaných vzorků bakterií

V bakalářské práci byl stanoven obsah osmi biogenních aminů (tryptaminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu) u vzorků bakterií izolovaných z moravských vín.

K analýze byly použity dvě série vzorků vína. První řada vín jsou vína, které poskytl doc. Balík ze Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity. Všechny vzorky vína pocházely z téhož vína, jednalo se o odrůdu Frankovka.

Druhá řada vín byla vína, která byla získána od dvou vinařů z Polešovic. Po proběhnutí hlavního kvašení byla vína stáhnutá z kvasnic a zaočkována kulturou. Oba vinaři zaočkovali 2 odrůdy a to Zweigeltrebe a Cabernet Moravia kulturou BioStart[®] Forte SK2 (odolný kmen *Oenococcus oeni* určený pro biologické odbourávání kyseliny jablečné pro bílá a červená vína; Erbslöh, SRN) [25].

Ze vzorků výše uvedených vín bylo v rámci diplomové práce Simony Liškové [25] vyizolováno 140 bakteriálních kmenů, které byly v této bakalářské práci podrobeny chromatografickému stanovení produkce osmi biogenních aminů. Všechny vzorky byly od odběru až do doby provedení experimentu skladovány v mrazničce při teplotě -18 ± 2 °C.

3.2 Příprava vzorků pro analýzu biogenních aminů

Dekarboxylázová aktivita jednotlivých mikroorganismů vyizolovaných z moravských vín byla posuzována po jejich kultivaci v modifikovaných bujonech, které mají vybudit produkci BA. Pro jednotlivé izoláty byly využity následující půdy: PCA/Nutrient Broth (Plate Count Agar/živný bujón pro kultivace bakterií, které nevyžadují zvláštní kultivační nároky), M17 (pro kultivaci mléčných koků) a MRS (pro kultivaci mléčných tyčinek, zejména laktobacilů). Všechny půdy (s výjimkou M17) byly vyrobeny firmou HiMedia (Indie), u půdy M17 byl výrobcem Oxoid (Velká Británie). Pro podporu dekarboxylázové činnosti jednotlivých kmenů byly bujony obohaceny o prekurzory jednotlivých BA (aminokyseliny tyrozin, ornitin, lyzin, arginin a fenylalanin; všechny Sigma, USA) v koncentraci 2 g/l (každého prekurzoru). Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 48 hodin. Každý izolát byl kultivován třikrát pro navození dekarboxylázové aktivity. Bujón byl po kultivaci testova-

ných bakterií centrifugován a získaný supernatant byl zředěn v poměru 1:1 (v/v) kyselinou chloristou (Sigma, 1,2 mol/l) a dvojnásobně derivatizován [26].

3.3 Stanovení obsahu biogenních aminů metodou kapalinové chromatografie

Obsah osmi aminů (tryptaminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu) byl stanoven metodou kapalinové chromatografie (přístroje LabAlliance, USA a Agilent Technologies, Agilent, USA, skládající se z binární pumpy LabAlliance, USA, autosampleru LabAlliance, USA, kolony s termostatem; UV/VIS DAD $\lambda = 254$ nm a degaseru 1260 Infinity, Agilent Technologies) po předchozí derivatizaci dansylchloridem [27].

Do derivatizační nádoby byl odpipetován 1 ml zředěného supernatantu, následně bylo do každého vzorku přidáno 100 μ l vnitřního standardu 1,7-heptandiamu (Sigma) v koncentraci 500 mg/l a 1,5 ml karbonátového pufru s pH 11,0 – 11,1. Dále byly přidány 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu (Sigma) o koncentraci 5 g/l v acetonu. Takto připravené vzorky byly uzavřeny a třepány po dobu 20 hodin [27].

Po uplynutí této doby bylo přidáno 200 μ l roztoku prolinu (Sigma), vzorky byly znovu uzavřeny a třepány další 1 hodinu. Poté byly přidány 3 ml heptanu (Sigma), uzavřeny a po dobu 3 minut třepány ručně. Z každého vzorku byl odpipetován 1 ml heptanové vrstvy do připravené vialky, které byly odpařeny při teplotě 60 °C do sucha pod proudem dusíku. Suchý odparek následně zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Sigma), takto připravené vzorky byly uchovávány v mrazícím zařízení při teplotách pod -18 °C pro následnou analýzu [27].

Bezprostředně před analýzou byly tyto vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 μ m a dávkovány do chromatografického systému [27].

Derivatizované vzorky byly rozpouštěny v mobilní fázi (acetonitril, který se používá v koncentracích 10 % a 100 %; Tabulka 2) při průtoku 0,45 ml/min a teplotě 30 °C. Pro vyhodnocování chromatogramu byl použit program Clarity, který umožňuje grafický záznam píku [27].

Tabulka 2 – Střídání koncentrací acetonitrilu v závislosti na čase

Čas (min)	10% acetonitril	100% acetonitril
0	39	61
0,1	39	61
1,4	30	70
3,5	17	83
4	0	100
9,5	0	100
11,5	39	61
15,5	39	61

4 VÝSLEDKY

Obsah BA byl analyzován ve 140 izolátech bakterií, kde nejčastěji se vyskytujícími BA byly putrescin, kadaverin, tyramin a spermin (tabulka 3, 4, 5).

4.1 Produkce biogenních aminů bakteriemi izolovanými na půdě PCA

Produkce BA byla zjištěna u všech 61 vzorků izolátů bakterií z půdy PCA (Tabulka 3). V případě sledovaných bakterií nebyla zjištěna produkce tryptaminu, fenyletylaminu a spermidinu. Pouze u jediného izolátu číslo 20 byla detekována produkce histaminu, a to v množství 15,04 mg/l. U všech 61 vzorků byl detekován spermin a pouze u 6 izolátů nebyla pozorována produkce tyraminu (vzorky 12, 32, 37, 38, 39, 40). Produkce putrescinu byla zaznamenána u deseti izolátů z půdy PCA (číslo 12, 15, 17, 19, 20, 32, 33, 36, 38 a 39), kdy byl putrescin produkován v hodnotách od 218,67 do 618,25 mg/l. Schopnost dekarboxylace lyzinu byla zjištěna u 17 vzorků, množství vyprodukovaného kadaverinu u těchto kmenů kolísalo od 3,76 do 1021,28 mg/l.

Celkové množství vyprodukovaných BA se pohybovalo v rozmezí 3,77 až 1049,05 mg/l. U 47 izolátů byla zjištěna celková produkce BA pod 100 mg/l. V případě 13 izolátů byla hodnota součtu vyprodukovaných biogenních aminů v rozmezí 100 až 1000 mg/l. Hodnota produkce 1000 mg/l biogenních aminů byla překročena v případě jednoho izolátu (číslo 10) a to v celkovém množství 1049,05 mg/l.

Tabulka 3 – Produkce biogenních aminů (mg/l) u bakterií izolovaných na půdě PCA

Kód izolátu	Putrescin	Kadaverin	Tyramin	Spermin	Suma
1	-	-	15,78	37,00	52,77
2	-	-	18,37	35,95	54,32
3	-	-	15,97	37,90	53,87
4	-	-	13,01	32,33	45,33
5	-	-	18,06	40,34	58,40
6	-	-	14,51	33,38	47,88
7	-	403,03	15,27	35,01	453,31
8	-	381,41	10,89	29,43	421,73
9	-	-	17,22	26,08	43,29
10	-	1021,28	7,11	20,66	1049,05
11	-	893,008	11,38	29,06	933,52

Pokračování Tabulka 3

Kód izolátu	Putrescin	Kadaverin	Tyramin	Spermin	Suma
12	545,80	15,10	-	22,05	582,95
13	-	-	17,89	31,98	49,88
14	-	-	4,32	10,01	14,34
15	618,25	-	14,55	24,93	657,72
16	-	-	13,72	22,93	36,65
17	506,42	14,08	14,18	27,92	562,60
18	-	-	12,49	26,09	38,58
19	233,64	-	15,99	27,72	277,36
20	573,81	-	15,03	28,31	632,19
21	-	-	11,97	32,65	44,62
22	-	-	15,79	39,37	55,15
23	-	-	11,15	30,68	41,83
24	-	-	15,70	35,56	51,26
25	-	-	12,69	35,20	47,90
26	-	-	14,17	39,37	53,54
27	-	-	10,86	18,15	29,01
28	-	-	17,11	44,33	61,44
29	-	-	9,12	22,70	31,82
30	-	-	14,72	38,41	53,12
32	400,20	-	-	13,50	413,70
33	486,92	-	15,14	32,88	534,94
34	-	-	11,94	33,03	44,96
35	-	-	3,03	9,44	12,46
36	504,88	8,21	2,99	9,92	526,00
37	-	-	-	5,51	5,51
38	218,67	-	-	8,11	226,78
39	511,82	-	-	5,74	517,55
40	-	-	-	3,77	3,77
41	-	-	31,21	44,47	75,68
42	-	-	20,30	37,19	57,49
43	-	-	22,06	40,56	62,63

Pokračování Tabulka 3

Kód izolátu	Putrescin	Kadaverin	Tyramin	Spermin	Suma
44	-	3,76	22,31	31,03	57,10
45	-	-	25,23	44,53	69,76
46	-	4,78	26,72	42,13	73,62
47	-	-	20,42	53,17	73,59
48	-	-	22,70	48,68	71,38
49	-	-	23,23	47,63	70,87
50	-	-	22,83	42,88	65,70
51	-	-	27,76	66,15	93,91
52	-	-	20,74	52,60	73,34
146	-	7,66	23,24	44,80	75,70
147	-	5,52	19,87	37,17	62,56
149	-	5,92	16,46	36,45	58,83
202	-	4,69	11,03	20,92	36,64
204	-	6,17	14,78	28,56	49,51
205	-	5,28	21,06	41,85	68,19
247	-	-	20,44	29,71	50,15
248	-	-	11,95	25,38	37,33
249	-	6,56	11,17	15,56	33,29
250	-	7,72	20,33	44,63	72,69

- biogenní amin nedetekován

4.2 Produkce biogenním aminů bakteriemi izolovanými na půdě M17

Obsah BA po kultivaci bakteriemi v bujónu M17 byl analyzován u 70 vzorků. U všech sledovaných vzorků bujónu byl přítomen spermin, v případě tyraminu nebyla produkce tohoto biogenního aminu zjištěna pouze u 4 izolátů (číslo 78, 82, 83, 84).

Celkové hodnoty vyprodukovaných BA bakteriemi izolovanými na půdě M17 se pohybovaly v rozmezí od 12,60 do 1567,48 mg/l. U 35 izolátů mléčných koků byla zjištěna celková produkce BA nižší než 100 mg/l. Celkový obsah vyprodukovaných biogenních aminů v rozmezí od 100 do 1000 mg/l byl zaznamenán u 34 vzorků. V případě jednoho izolátu mléčných koků překročila hodnota vyprodukovaných BA 1000 mg/l, a to u vzorku číslo 82, kde bylo v bujónu M17 po kultivaci detekováno 1567,48 mg/l BA.

Produkce putrescinu byla zaznamenána u pěti izolátů z půdy M17 (číslo 63, 65, 79, 80 a 92). Množství vyprodukovaného putrescinu u těchto kmenů, kolísalo od 14,20 do 321,05 mg/l. Dekarboxylace aminokyseliny lyzinu byla zjištěna u 27 vzorků, kdy byl kadaverin produkován v hodnotách od 2,48 do 849,87 mg/l.

V bujónu M17 byl po kultivaci bakterií izolovaných z moravských vín detekován fenyletylamin v pěti případech (vzorek číslo 70, 93, 150, 211, 212). Zjištěná množství se pohybovala v rozmezí 2,24 až 185,95 mg/l.

Schopnost dekarboxylace aminokyseliny histidinu byla zjištěna u dvou vzorků mléčných koků, u izolátu číslo 82 (768,62 mg/l) a 83 (384,86 mg/l). Produkce biogenních aminů tryptaminu a spermidinu nebyla u bakterií izolovaných na půdě M17 z moravských vín zjištěna.

Tabulka 4 – Produkce biogenních aminů (mg/l) u bakterií izolovaných na půdě M17

Kód izolátu	Putrescin	Kadaverin	Tyramin	Spermin	Suma
56	-	-	31,28	63,21	94,49
57	-	8,61	27,05	41,47	77,12
58	-	7,17	23,33	44,37	74,88
59	-	7,42	28,54	49,00	84,96
60	-	7,55	20,10	38,03	65,68
61	-	5,66	29,87	41,06	76,58
62	-	8,35	24,48	34,61	67,44
63	32,32	8,89	24,65	43,00	108,86
64	-	-	23,30	46,39	69,69
65	32,94	-	25,43	67,95	126,33
66	-	-	21,27	54,63	75,91
67	-	-	25,71	84,36	110,08
68	-	-	26,38	51,76	78,14
69	-	-	26,40	58,70	85,10
70	-	-	21,46	52,48	83,57
71	-	-	29,02	73,79	102,81
72	-	-	18,56	47,18	65,74
73	-	-	24,43	63,49	87,92
74	-	2,48	15,19	38,24	55,91

Pokračování Tabulka 4

Kód izolátu	Putrescin	Kadaverin	Tyramin	Spermin	Suma
75	-	2,72	17,01	46,28	66,01
76	-	785,69	2,77	10,21	798,67
77	-	4,03	5,41	14,56	24,00
78	-	26,22	-	6,93	33,15
79	21,88	563,82	4,12	8,49	598,31
80	14,20	652,76	5,11	6,27	678,33
81	-	4,59	5,96	11,32	21,87
82	-	788,44	-	10,42	1567,48
83	-	350,11	-	10,39	745,36
84	-	685,39	-	7,64	693,03
85	-	-	3,41	9,19	12,60
86	-	815,41	18,56	30,87	864,84
87	-	-	8,73	16,07	24,81
88	-	-	16,57	26,10	42,67
89	-	4,28	8,55	14,54	27,37
90	-	-	26,59	31,46	58,05
91	-	4,34	9,13	15,93	29,40
92	321,05	7,68	25,23	34,09	387,06
93	-	849,87	4,34	7,41	878,14
94	-	2,86	13,29	15,76	31,91
95	-	-	23,68	24,50	48,18
96	-	2,66	15,81	19,11	37,58
97	-	2,97	15,87	18,24	37,08
98	-	646,51	12,60	19,54	678,66
99	-	-	15,24	18,22	33,46
100	-	-	15,99	39,60	55,59
101	-	-	15,10	40,46	55,55
102	-	-	15,56	45,23	60,79
103	-	-	35,99	86,33	122,32
104	-	361,98	41,90	100,48	504,35
105	-	-	39,51	96,65	136,16

Pokračování Tabulka 4

Kód izolátu	Putrescin	Kadaverin	Tyramin	Spermin	Suma
106	-	-	35,13	93,13	128,25
107	-	-	33,86	70,61	104,46
108	-	-	39,23	74,29	113,52
109	-	-	39,36	76,42	115,78
110	-	-	22,06	51,15	73,21
111	-	-	33,83	74,96	108,78
112	-	570,48	27,36	77,32	675,15
150	-	-	646,46	29,35	90,99
151	-	-	30,93	78,78	109,71
156	-	-	35,23	84,80	166,68
207	-	-	32,55	84,12	116,66
208	-	-	30,61	76,06	106,67
209	-	-	32,37	80,47	112,84
210	-	-	37,85	102,89	140,74
211	-	-	38,80	93,15	274,35
212	-	-	36,78	88,39	311,12
213	-	-	37,49	88,74	126,23
214	-	-	31,68	82,27	113,94
215	-	-	32,75	88,15	120,90
216	-	-	28,09	76,15	104,25

-.....biogenní amin nedetekován

4.3 Produkce biogenních aminů bakteriemi izolovanými na půdě MRS

Obsah BA v bujónu MRS po kultivaci bakterií izolovaných z moravských červených vín byl zjištěn u všech 9 analyzovaných vzorků (tabulka 5). Celkový obsah BA se pohyboval v rozmezí 45,15 až 1278,51 mg/l. U sedmi izolátů mléčných tyčinek celkové množství BA nepřekročilo hodnotu 100 mg/l, biogenní aminy v množství od 100 do 1000 mg/l byly zjištěny v izolátu číslo 244 a pouze u jednoho izolátu (číslo 54) byla detekována hodnota celkového množství vyprodukovaných biogenních aminů vyšší než 1000 mg/l, a to v množství 1278,51 mg/l.

U všech vzorků byla zjištěna produkce sperminu a to v hodnotách od 8,73 do 52,41 mg/l. Dekarboxylace aminokyseliny tyrozinu byla rovněž zjištěna u všech devíti izolátů mléčných tyčinek, příslušný biogenní amin (tyramin) byl detekován v množství 15,02 až 1149,44 mg/l.

Aminokyselina lyzin byla detekována dvěma izoláty mléčných tyčinek, kadaverin byl detekován v MRS bujónech po kultivaci izolátu číslo 152 v množství 4,80 mg/l a izolátu 153 v množství 2,33 mg/l.

Dekarboxylace fenylalaninu byla zaznamenána u jednoho izolátu (číslo 54), u kterého byl fenyletylamin detekován v množství 120,34 mg/l. V případě mléčných bakterií izolovaných na půdě MRS z moravských vín nebyla zjištěna produkce čtyř biogenních aminů, a to tryptaminu, histaminu a spermidinu a putrescinu.

Tabulka 5 – Produkce biogenních aminů (mg/l) u bakterií izolovaných na půdě MRS

Kód izolátu	Putrescin	Kadaverin	Tyramin	Spermin	Suma
53	-	-	22,50	40,83	63,33
54	-	-	1149,44	8,73	1278,51
55	-	-	17,24	34,31	51,55
152	-	4,80	15,02	25,33	45,15
153	-	2,33	21,80	34,72	58,84
244	-	-	516,35	15,66	532,01
245	-	-	27,71	51,25	78,95
246	-	-	24,48	52,41	76,89
264	-	-	26,47	36,65	63,12

- biogenní amin nedetekován

5 DISKUZE

Víno může u řady lidí vyvolat řadu symptomů, podobným alergiím, např. zrudnutí, svědění, bolesti hlavy aj. Biogenní aminy se považují za nejvýznamnější příčinu intolerance vína a s ní spojenými problémy. V červených vínech bývá obvykle vyšší koncentrace BA než ve vínech bílých [16,19,29]. Z alkoholických nápojů právě červená vína vyvolávají nejčastěji nežádoucí reakce. I když červená vína obsahují jen mírné koncentrace BA ve srovnání se sýry (až 2500 mg/kg), uzeninami (až 600 mg/kg), tak intolerance červeného vína může být typickým markerovým symptomem, a proto byla navržena pro intoleranci histaminu [29].

Farmakologické vlastnosti BA ve víně jsou pravděpodobně umocněny i některými vedlejšími účinky etanolu, např. zvýšenou permeabilitou střev nebo potenciálním narušením drah metabolizujících aminy. Klinické pokusy ukazují, že ne všechna červená vína vyvolávají ve stejné míře nežádoucí reakce. To lze vysvětlit různým obsahem aminů v různých výrobcích. Tato skutečnost inspirovala některé vinaře, aby se specializovali na výrobu vín s nízkým obsahem histaminu. Očekávají, že tato vína budou tolerovat dokonce osoby citlivé na víno [29].

Výzkumníci v Rakousku provedli studii, v rámci které zjišťovali obsah histaminu a jiných biogenních aminů ve stovce vysoce kvalitních červených vín. Vzhledem k tomu, že špatné hygienické podmínky během výroby vína vedou k vysokým koncentracím aminů, byla zvolena kvalitní vína, aby se tento vliv eliminoval. Histamin a jiné biogenní aminy (isoamylamin, tryptamin, fenyletylamin, putrescin, kadaverin, tyramin, spermidin, spermin) se stanovovaly metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Vína byla vyrobena ze sedmi různých odrůd hroznového vína: Zweigelt (25), Blaufränkisch (25), Merlot (10), St. Laurent (10), Pinot noir (10), Shiraz (10), Cabernet-Sauvignon (10). Výsledky ukázaly, že obsah histaminu a jiných biogenních aminů se u červených vín značně lišil bez ohledu na odrůdu vína, a že se jejich vysoký obsah vyskytoval i u vysoce kvalitních vín. Pokud by byl v EU zaveden legislativní limit pro obsah histaminu ve víně ve výši 10 mg/l (dříve byl tento limit zaveden v některých zemích), pak by 34 % analyzovaných vín muselo být staženo z trhu [29].

Pro jiné farmakologicky aktivní aminy, jako je tyramin a fenyletylamin, neexistují žádné limity. Dosud je málo vědeckých poznatků a často jsou protichůdné o zdravotních účincích mírných dávek biogenních aminů nacházejících se v červeném víně. Pacienti s bolestí hla-

vy indukovanou fenyletylaminem paradoxně reagovali častěji na komerční vína s nízkým obsahem aminů než na vína s jejich vysokým obsahem. Studie provedená ve Francii (2001) mezi osobami s intolerancí vína došla k závěru, že nebyl nalezen zřetelný vztah mezi obsahem aminů ve víně a četností a závažností symptomů vyvolaných těmito víny, což vede k domněnce, že ve víně existují další složky, které mohou být dokonce důležitější v intoleranci vína než biogenní aminy [29].

V České republice byla před vstupem do EU (rok 2004) vyhláškou č. 53/2002 Sb., zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích uvedena přípustná množství biogenních aminů ve víně, v případě histaminu se jednalo o množství 20 mg/l. Přípustné množství tyraminu ve vínu bylo upraveno vyhláškou č. 298/1997 Sb., a to na množství 50 mg/l. Současná platná vyhláška č. 305/2004 Sb. udává hodnoty platné pouze pro histamin, kdy přípustné množství ve víně je 20 mg/l [16,17,18].

Četné průzkumy ukázaly, že se k obsahu biogenních aminů ve víně nedá prohlásit nic obecného, ale že hodnoty ukazují značné rozpětí [19].

V bakalářské práci bylo analyzováno 140 izolátů bakterií z moravských vín (jednalo se o odrůdu Frankovka a vína z Polešovic zočkovaná dvěma odrůdami Zweigeltrebe a Cabernet Moravia kulturou BioStart[®] Forte SK2). Jednotlivé izoláty byly půdy kultivovány na PCA/Nutrient Broth, M17 a MRS.

Ze 140 analyzovaných izolátů bakterií z moravských vín byla zjištěna přítomnost minimálně jednoho biogenního aminu, a to u všech 140 vzorků. U všech analyzovaných vzorků nebyla zjištěna produkce tryptaminu a spermidinu. V případě analýzy na základě rozdílnosti půd nebyl u bakterií izolovaných z moravských vín na půdě M17 detekován pouze tryptamin a spermidin, bakterií izolovaných na půdě PCA nebyla zjištěna produkce fenyletylaminu a u bakterií izolovaných na půdě MRS nebyla zjištěna produkce histaminu a putrescinu. K podobným výsledkům dospěl i Eder [19] kde v případě biogenních aminů spermidinu a tryptaminu nezjistili jejich přítomnost v rakouských bílých a červených vínech.

Pro lidský organismus je z biogenních aminů vyskytujících se ve víně nebezpečný svými negativními účinky především histamin [16,24]. U testovaných izolátů bakterií nebyla zjištěna jeho produkce u mléčných tyčinek (izolovaných z půdy MRS), v případě bakterií izolovaných na zbývajících 2 půdách byl detekován ve třech případech. U izolátu číslo 20, a to v množství 15,04 mg/l. Schopnost dekarboxylace aminokyseliny histidinu, byla zjištěna

u dvou vzorků izolovaných na půdě M17, u izolátu číslo 82 (768,62 mg/l) a 83 (384,86 mg/l). S ohledem na platnou vyhlášku č. 305/2004 Sb., která uvádí množství pouze do 20 mg/l, jsou zjištěná množství histaminu v izolátech (číslo 82 a 83) vysoce přesahující přípustnou mez. V případě izolátu číslo 82 přesahuje zjištěné množství o 748,62 mg/l a u izolátu číslo 83 o 364,86 mg/l. Eder [19] ve výsledcích uvádí většinou nízké hodnoty u BA histaminu, ve zkoumaných 56 vzorcích bílých vín jsou minimální a maximální hodnoty od 0,16 do 4,22 mg/l, kdy průměrné množství histaminu bylo 0,83 mg/l. U 38 zkoumaných vzorků červených vín byla zjištěná produkce v rozmezí 0,21 do 6,33 mg/l, a průměrné množství bylo 1,20 mg/l. V případě 16 vzorků vín s přívlastkem byla zjištěna množství od 0,16 do 0,83 mg/l, průměrné množství 0,38 mg/l. Dále byla analyzována i šumivá vína (26 vzorků), s detekovaným množstvím od 0,16 do 5,9 mg/l a s průměrným množstvím 0,56 mg/l. I v německých pracích byly u více než 90 % zkoumaných bílých vín a 70 % vín červených zjištěny hodnoty pod 1 mg/l [19].

Po kultivaci bakterií izolovaných z moravských vín byl detekován fenyletylamin v pěti případech (vzorek číslo 70, 93, 150, 211, 212) na půdě M17, a kdy se zjištěná množství pohybovala v rozmezí od 2,24 do 185,95 mg/l. Dekarboxylace fenyletylaminu byla zaznamenána u jednoho izolátu (číslo 54) na půdě MRS u kterého byl fenyletylamin detekován v množství 120,34 mg/l. Produkce biogenního aminu fenyletylaminu nebyla u bakterií izolovaných na půdě PCA z moravských vín zjištěna.

Biogenní aminy putrescin a kadaverin samy o sobě nepůsobí toxicky, ale mohou zvyšovat nežádoucí účinky dalších BA (zejména histaminu, tyraminu a fenyletylaminu) [6,16]. Podle práce Edera [19] bývá putrescin detekován v případě bílých vín v hodnotách 0,1 do 8 mg/l a u červených vín v hodnotách od 0,9 do 35 mg/l. Kadaverin u bílých vín v hodnotě do 29 mg/l a u červených vín do 21,8 mg/l. Zatímco Velíšek [16] udává hodnoty putrescinu v bílých vínech od 1 do 11 mg/l a v červeném víně od 2 do 20 mg/l, a kadaverin v hodnotách do 47 mg/l v případě červených vín a od 3 do 108 mg/l u vín bílých.

V případě mléčných bakterií izolovaných na půdě MRS z moravských vín nebyla zjištěna produkce biogenního aminu putrescinu. Produkce putrescinu byla celkově zjištěna u 15 vzorků, zaznamenaná u pěti izolátů z půdy M17 (číslo 63, 65, 79, 80 a 92) u deseti izolátů z půdy PCA (číslo 12, 15, 17, 19, 20, 32, 33, 36, 38 a 39). Množství vyprodukovaného putrescinu u těchto kmenů, kolísalo od 14,20 do 618,25 mg/l.

Dekarboxylace aminokyseliny lyzinu byla zjištěna celkem u 46 izolátů. V bujónu M17 byla zjištěna u 27 vzorků, u 17 izolátů z půdy PCA a v případě MRS byla produkce kadaverinu zjištěna u dvou izolátů. Množství vyprodukovaného kadaverinu kolísalo od 2,48 do 1021,28 mg/l.

U všech bakterií izolovaných z moravských vín byla zjištěna produkce sperminu a to v hodnotách od 3,77 do 102,89 mg/l.

Posledním zjišťovaným BA byl tyramin, který byl detekován u 130 izolátů. Jeho detekce nebyla zjištěna v případě 4 izolátů z půdy M17 (číslo 78, 82, 83, 84) a 6 izolátů z půdy PCA (vzorky 12, 32, 37, 38, 39, 40). Produkce BA tyraminu se pohybovala v rozmezí od 2,99 do 1149,44 mg/l. Podle výzkumu Edera [19] se hodnoty tyraminu v případě bílých rakouských vín pohybovala v rozmezí od 0,1 do 6,5 mg/l a v případě červených (rakouských) vín od 0,1 do 8 mg/l. Zatímco Velíšek [16] udává hodnoty u bílých vín do 212 mg/l a u bílých vín je rozmezí hodnot od 0 do 90 mg/l.

Na základě získaných hodnot obsahu BA v bujónech po kultivaci bakterií izolovaných z moravských vín jsou patrné odlišnosti v zjištěném množství jednotlivých biogenních aminů.

ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na monitoring produkce osmi biogenních aminů v bakteriích izolovaných z moravských vín. Cílem této práce byla detekce biogenních aminů pomocí kapalinové chromatografie u 140 izolátů.

Na základě výsledků této práce lze konstatovat:

- u sledovaných izolátů bakterií byla zjištěna dekarboxylázová aktivita
- celkové množství biogenních aminů dosáhlo maximální hodnoty 1278,445 mg/l, a to u kmene číslo 54, který byl izolován na půdě MRS
- nejčastěji detekován byl spermin, a to u všech 140 kmenů, dále tyramin u 130 kmenů, kadaverin u 46 kmenů, putrescin u 15 izolátů, fenyletylamin u 6 kmenů, histamin u 3 izolátů
- produkce tryptaminu a spermidium nebyla zjištěna v žádném ze zkoumaných izolátů
- nejvyšší detekované množství sperminu bylo 102,89 mg/l (vzorek číslo 210), tyraminu 1149,44 mg/l (vzorek číslo 54), kadaverinu 1021,28 mg/l (vzorek číslo 10), putrescinu 618,25 mg/l (vzorek číslo 15), fenyletylaminu 185,95 mg/l (vzorek číslo 212), histaminu 768,62 mg/l (vzorek číslo 82).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] FLEET, G. Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* [online]. roč. 50, 1-2, s. 101-117 [cit. 2013-02-16]. ISSN 01681605. DOI: 10.1016/S0168-1605(99)00080-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816059900080X>
- [2] MORENO-ARRIBAS, M a M POLO. Wine chemistry and biochemistry. New York: Springer, 2009, xv, 735 p. ISBN 9780387741185-1.
- [3] PAVLOUŠEK, Pavel. Výroba vína u malovinařů. 2. aktualizované a rozšířené vydání. Praha: Grada publishing, 2010, 120 s. ISBN 978-80-247-3487-3
- [4] ANLI, R. Ertan a Mustafa BAYRAM. Biogenic Amines in Wines. *Food Reviews International* [online]. 2008-12-22, roč. 25, č. 1, s. 86-102 [cit. 2013-02-20]. ISSN 8755-9129. DOI: 10.1080/87559120802458552. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/87559120802458552>
- [5] IVEY, Melissa L. a Trevor G. PHISTER. Detection and identification of microorganisms in wine: a review of molecular techniques. *Journal of Industrial Microbiology* [online]. 2011, roč. 38, č. 10, s. 1619-1634 [cit. 2013-02-18]. ISSN 1367-5435. DOI: 10.1007/s10295-011-1020-x. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10295-011-1020-x>
- [6] BARATA, A., M. MALFEITO-FERREIRA a V. LOUREIRO. The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2012, roč. 153, č. 3, s. 243-259 [cit. 2013-02-18]. ISSN 01681605. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160511006878>
- [7] MORENO-ARRIBAS, M. Victoria, M. Carmen POLO, Felisa JORGANES a Rosario MUNOZ. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2003, roč. 84, č. 1, s. 117-123 [cit. 2013-02-20]. ISSN 01681605. DOI: 10.1016/S0168-1605(02)00391-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160502003914>
- [8] FUGELSANG, Kenneth C. a Charles G. EDWARDS. Wine microbiology. 2nd ed. /. New York, NY: Springer, c2007, s. 3-60. ISBN 0-387-33341-X

- [9] RIBÉREAU-GAYON, Pascal, Denis DUBOURDIEU a Bernard DONÈCHE. Handbook of enology. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, c2006-, s. 115-193. ISBN 0-470-01034-7
- [10] GÖRNER, Fridrich a Ľubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967-0649-7
- [11] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 361s. ISBN 80-856-0571-6
- [12] RAY, Bibek. *Fundamental Food Microbiology*. 3rd ed. Hoboken: Taylor, 2003. ISBN 02-039-9825-1
- [13] JACKSON, Ron S. *Wine science: principles, practice, perception*. 2nd ed. San Diego: Academic Press, c2000, xv, 648 p. ISBN 01-237-9062-X
- [14] SUZZI, G. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2003-11-15, roč. 88, č. 1, s. 41-54 [cit. 2013-02-19]. ISSN 01681605. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00080-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160503000801>
- [15] LANDETE, J.M., S. FERRER a I. PARDO. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control* [online]. 2007, roč. 18, č. 12, s. 1569-1574 [cit. 2013-04-12]. ISSN 09567135. DOI: 10.1016/j.foodcont.2006.12.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713507000059>
- [16] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin. Rozš. a přeprac.* 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 623 s. ISBN 978-80-86659-17-6
- [17] Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. In: *Sbírka zákonů*. 1997, částka 38 (1997)
- [18] Vyhláška č. 305/2004 Sb., kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách. In: *Sbírka předpisů*. 2004, částka 100 (2004)
- [19] EDER, Reinhard. *Vady vína*. Vyd. 1. Valtice: Národní vinařské centrum, 2006, 263 s. ISBN 80-903-2016-3

- [20] RUSSO, Pasquale, Pilar FERNÁNDEZ DE PALENCIA, Andrea ROMANO, María FERNÁNDEZ, Patrick LUCAS, Giuseppe SPANO a Paloma LÓPEZ. Biogenic amine production by the wine *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 in systems that partially mimic the gastrointestinal tract stress. *BMC Microbiology* [online]. 2012, roč. 12, č. 1, s. 247- [cit. 2013-04-18]. ISSN 1471-2180. DOI: 10.1186/1471-2180-12-247. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/12/247>.
- [21] DICKS, L. M. T. a A. ENDO. Taxonomic Status of Lactic Acid Bacteria in Wine and Key Characteristics to Differentiate Species. *South African Journal of Enology & Viticulture*. 2009, roč. 30, č. 1, s. 72-90. ISSN 0253939X
- [22] MORENO-ARRIBAS, M a M POLO. *Wine chemistry and biochemistry*. New York: Springer, c2009, xv, 735 p. ISBN 9780387741185
- [23] SMĚLÁ, D. a kol. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy*, 2004, č. 98, s. 432-43
- [24] ÖNAL, Armagan, Serife Evrim Kepekci TEKKELI a Cem ÖNAL. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry* [online]. 2013, roč. 138, č. 1, s. 509-515 [cit. 2013-04-18]. ISSN 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.10.056. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612015944>
- [25] LIŠKOVÁ, Simona. Vliv řízené fermentace na výskyt bakterií ve vybraných vínech. Zlín, 2012. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie a mikrobiologie potravin. Vedoucí práce doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.
- [26] LORENCOVÁ, Eva, Leona BUŇKOVÁ, Dagmar MATOULKOVÁ, Vladimír DRÁB, Pavel PLEVA, Vlastimil KUBÁŇ a František BUŇKA. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *International Journal of Food Science* [online]. 2012, vol. 47, issue 10, s. 2086-2091 [cit. 2013-05-08]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2012.03074.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2012.03074.x>
- [27] DADÁKOVÁ, E., KŘÍŽEK, P., PELIKÁNOVÁ, T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*, 116, 365-370. 2009.

- [28] HENRÍQUEZ-AEDO, Karem, Mario VEGA, Sonia PRIETO-RODRÍGUEZ a Mario ARANDA. Evaluation of biogenic amines content in chilean reserve varietal wines. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2012, roč. 50, č. 8, s. 2742-2750 [cit. 2013-02-19]. ISSN 02786915. DOI: 10.1016/j.fct.2012.05.034. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691512003778>
- [29] KVASNIČKOVÁ, Alexandra. Biogenní aminy v červeném vínu. ÚZEI, agronavigátor[online]. 11.5.2011[cit. 2013-05-13]. Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=152&ch=13&typ=1&val=110499>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BA Biogenní aminy.

BMK Bakterie mléčného kvašení.

BOK Bakterie octového kvašení.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 – <i>L. brevis</i> zobrazen v mikroskopu s fázovým kontrastem při zvětšení 1000x [8].	15
Obr. 2 – <i>A. aceti</i> zobrazen v mikroskopu s fázovým kontrastem při zvětšení 1000x [8].	17
Obr. 3 – Chemická struktura BA nejčastěji se vyskytujících ve víně [22].	20

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Obsah hlavních BA v potravinách rostlinného původu [16].....	24
Tabulka 2 – Střídání koncentrací acetonitrilu v závislosti na čase	28
Tabulka 3 – Produkce biogenních aminů (mg/l) u bakterií izolovaných na půdě PCA	29
Tabulka 4 – Produkce biogenních aminů (mg/l) u bakterií izolovaných na půdě M17.....	32
Tabulka 5 – Produkce biogenních aminů (mg/l) u bakterií izolovaných na půdě MRS.....	35