

Skríning non-starterových bakterií izolovaných z potravin na schopnost degradace biogenních aminů

Vendula Molková

Bakalářská práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Vendula Molková**
Osobní číslo: **T15169**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Skríníng non-starterových bakterií izolovaných z potravin na schopnost degradace biogenních aminů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Biogenní aminy a jejich produkce gramnegativními bakteriemi izolovanými z potravin
2. Možnosti mikrobiální degradace biogenních aminů

II. Praktická část

1. Ověření schopnosti degradace biogenních aminů vybranými bakteriemi
2. Diskuze získaných výsledků a formulace závěrů práce

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] SUZZI, G., TORRIANI, S. Editorial: Biogenic amines in foods. *Frontiers in Microbiology*. 2015, vol. 6, s. 472. ISSN: 1664-302x
- [2] ÖNAL, A. Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food chemistry*. 2007, 103, s. 1475-1486. ISSN: 03088146
- [3] HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., SIMON-SAKARDI, L., HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*. 1994, vol. 5, s. 42-49. ISSN: 09242244
- [4] NAILA, A., FLINT, S., FLETCHER, G., BREMER, P., MEERDINK, G. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science*. 2010, 75, s. 139-150. ISSN: 0022-1147
- [5] PAPAGEORGIOU, M., LAMBROPOULOU, D., MORRISON, C., KŁODZIŃSKA, E., NAMIEŚNIK, J., PŁOTKA-WASYLKA, J. Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2018, vol. 98, s. 128-142. ISSN: 01659936

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

2. února 2018

Termín odevzdání bakalářské práce:

3. května 2018

Ve Zlíně dne 2. února 2018



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



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

Příjmení a jméno: MOLKOVÁ VĚNDULA

Obor: CHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit 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 2.5.2018

Molková

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

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

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

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

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

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě 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 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 přihlíádne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo ověření schopnosti degradace biogenních aminů vybranými bakteriemi, jelikož bakterie s aktivitou aminooxidáz jsou v poslední době v popředí pozornosti z důvodu možnosti snižování koncentrace biogenních aminů v potravinách. Teoretická část líčí biogenní aminy, popisuje jejich vznik, produkci bakteriemi, výskyt v potravinách a možnosti jejich mikrobiální degradace.

Praktická část této práce se zabývala ověřením schopnosti degradace biogenních aminů vybranými kmeny a poté byl chromatograficky stanoven úbytek biogenních aminů v médiu Nutrient Broth s biogenními aminy a ½ médiu Nutrient Broth s biogenními aminy, při 24 a 48 hodinové kultivaci pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie po předchozím převedení na deriváty, které bylo možno detekovat v UV oblasti. K významnému úbytku u všech sledovaných biogenních aminů došlo kmenem *Citrobacter gillenii* B58 a kmenem *Citrobacter gillenii* B59. Dobrou degradační aktivitou disponoval také kmen *Enterococcus faecium* B51.

Klíčová slova: biogenní aminy, mikrobiální degradace biogenních aminů, bakteriální degradace biogenních aminů

ABSTRACT

The aim of this work was to verify the biodegradability of biogenic amines by selected bacteria, because bacteria with amino acid activity have been at the forefront of attention due to the possibility of reducing the concentration of biogenic amines in food. The theoretical part describes biogenic amines, their origin, bacterial production, occurrence in food and possibilities of their microbial degradation.

The practical part of this work deals with verification of biogenic amine biodegradability by selected strains and then chromatographically determines the loss of biogenic amines in Nutrient Broth medium with biogenic amines and ½ medium Nutrient Broth with biogenic amines at 24 and 48 hours cultivation by high performance liquid chromatography after previous conversion to derivatives that can be detected in the UV area. Significant loss of all biogenic amines observed occurred in *Citrobacter gillenii* B58 strain and *Citrobacter gillenii* B59 strain. The strain *Enterococcus faecium* B51 had also a good degradation activity.

Keywords: biogenic amines, microbial degradation of biogenic amines, bacterial degradation of biogenic amines

Ráda bych na tomto místě upřímně poděkovala vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení a rady, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování mé práce věnovala. Za rady a pomoc při zpracování praktické části patří mé díky laborantkám Bc. Veronice Kučabové a Ing. Olze Vlčkové. Děkuji také Ing. Pavlu Plevovi, Ph.D. za pomoc při zpracování výsledků. Rovněž bych chtěla velmi poděkovat mé rodině a nejbližším přátelům za podporu, kterou mi při studiu věnovali.

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

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST.....	12
1 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ.....	13
1.1 BIOGENNÍ AMINY	13
1.1.1 Vznik biogenních aminů	14
1.1.2 Produkce biogenních aminů bakteriemi	15
1.2 BIOGENNÍ AMINY V POTRAVINÁCH	16
1.2.1 Faktory ovlivňující aktivitu aminokyselinových dekarboxyláz	17
1.2.2 Výskyt biogenních aminů v potravinách.....	17
1.2.2.1 Maso a masné výrobky	17
1.2.2.2 Sýry a mléčné výrobky	17
1.2.2.3 Ovoce, zelenina a výrobky z nich	18
1.2.2.4 Ryby.....	18
1.3 TOXICITA BIOGENNÍCH AMINŮ	19
2 MOŽNOSTI MIRKOBIÁLNÍ DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ	20
2.1 BAKTERIE DEGRADUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY	21
2.1.1 Rod <i>Bacillus</i>	21
2.1.2 Rod <i>Lactobacillus</i>	21
2.1.3 Rody <i>Micrococcus</i> a <i>Kocuria</i>	22
2.1.4 Rod <i>Staphylococcus</i>	22
2.1.5 Rod <i>Brevibacterium</i>	22
2.1.6 Rod <i>Pseudomonas</i>	22
2.1.7 Rod <i>Citrobacter</i>	22
2.2 KVASINKY DEGRADUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY	22
2.3 PLÍSNĚ DEGRADUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY	23
II PRAKTICKÁ ČÁST	24
3 CÍL PRÁCE	25
4 POUŽITÉ MATERIÁLY A METODY	26
4.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	26
4.2 PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ A ROZTOKŮ	26
4.2.1 Minerální médium s biogenními aminy	26
4.2.2 Nutrient Broth s biogenními aminy.....	28
4.2.3 ½ Nutrient Broth s biogenními aminy.....	28
4.2.4 Fyziologický roztok	28
4.3 POUŽITÉ MIKROORGANISMY.....	29
4.4 OVĚŘENÍ SCHOPNOSTI DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ VYBRANÝMI BAKTERIEMI	29
4.5 CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ ÚBYTKU BIOGENNÍCH AMINŮ VYBRANÝMI BAKTERIEMI	29
4.5.1 Příprava a odběr vzorků pro analýzu	29

4.5.2	Derivatizace vzorků	30
4.5.3	Chromatografické stanovení biogenních aminů.....	30
5	VÝSLEDKY	32
5.1	OVĚŘENÍ SCHOPNOSTI DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ VYBRANÝMI BAKTERIEMI	32
5.2	CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ ÚBYTKU BIOGENNÍCH AMINŮ VYBRANÝMI BAKTERIEMI	33
5.2.1	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Citrobacter gillenbergii</i> B58.....	34
5.2.2	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Citrobacter gillenbergii</i> B59.....	35
5.2.3	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Escherichia coli</i> B50	36
5.2.4	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Hafnia alvei</i> B97.....	37
5.2.5	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Pantoea agglomerans</i> B87	38
5.2.6	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Yersinia enterocolitica</i> B43	39
5.2.7	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Acinetobacter</i> sp. B21.....	40
5.2.8	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Enterococcus durans</i> B68.....	41
5.2.9	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Enterococcus faecium</i> B51	42
5.2.10	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Staphylococcus vitulinus</i> B88.....	43
5.2.11	Srovnání degradace biogenních aminů vybranými kmeny	44
6	DISKUZE	45
	ZÁVĚR	48
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	49
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	53
	SEZNAM OBRÁZKŮ	54
	SEZNAM TABULEK.....	55

ÚVOD

Biogenní aminy jsou organické báze s nízkou molekulovou hmotností s alifatickými, aromatickými a heterocyklickými strukturami. Tvorba biogenních aminů v potravinách mikrobiální dekarboxylací aminokyselin může vést k tomu, že spotřebitel přijímá vyšší množství biogenních aminů, což může u citlivých jedinců vyvolat nežádoucí symptomy, jako alergickou reakci, ztížené dýchání, vyrážku, horečku, hypotenzi či hypertenzi, migrénu či zažívací obtíže. Mezi typické potraviny, které mohou obsahovat biogenní aminy ve vysokých koncentracích, patří fermentované potraviny (pivo, víno, sýry, trvanlivé salámy).

Kvůli potenciální toxicitě biogenních aminů je třeba věnovat pozornost jejich koncentraci v potravinách, ale také z toho důvodu, že jejich množství v potravinách může sloužit jako ukazatel čerstvosti dané potraviny.

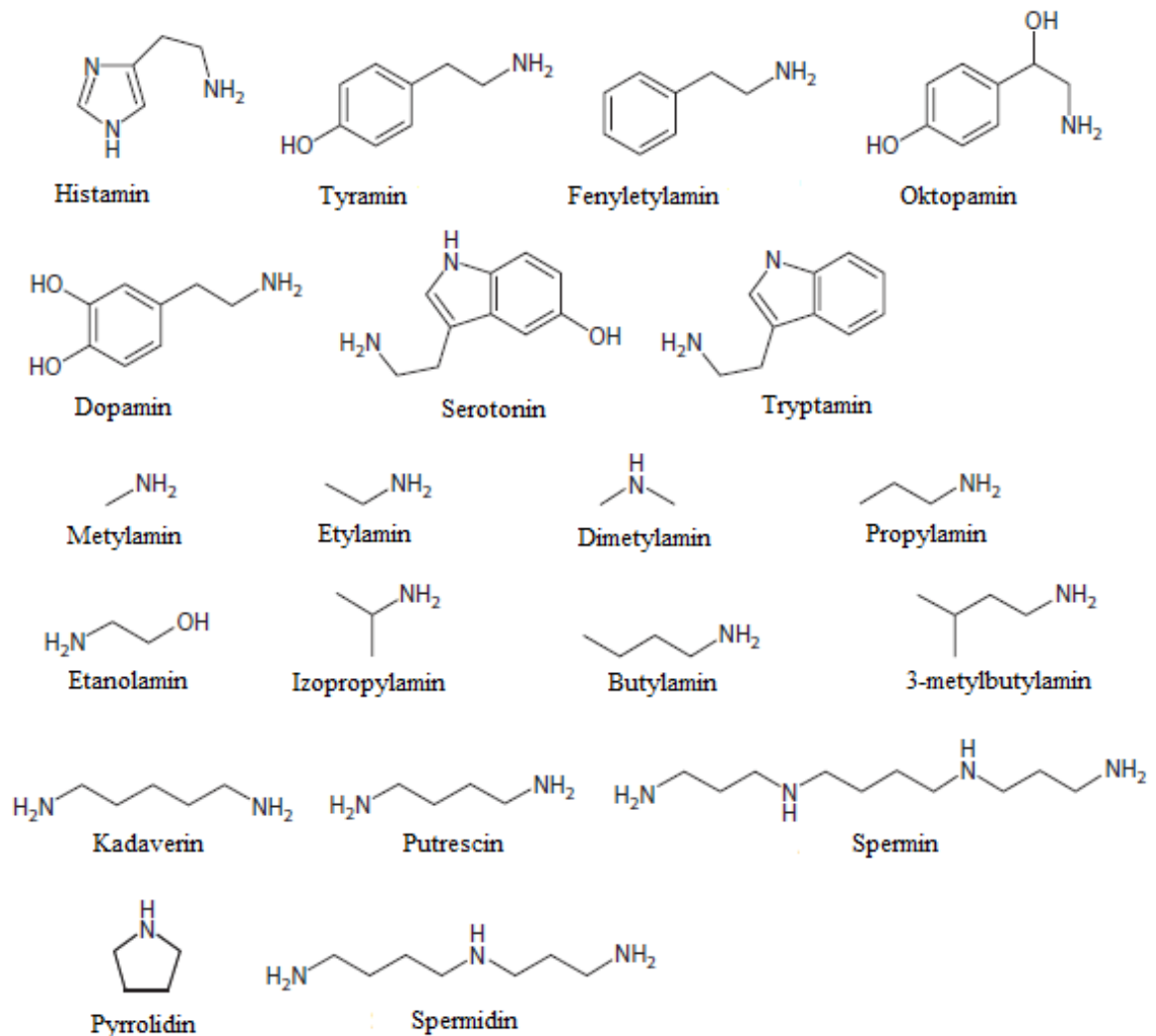
Tvorbu biogenních aminů, jsme schopni v potravinách redukovat. A to pomocí inhibice mikroorganismů s aktivitou aminokyselinových dekarboxyláz (chlazení, zmrazování) nebo pomocí dalších konzervačních metod, jako je ozařování nebo použití aditiv. Pro již vzniklé biogenní aminy lze použít metodu přímého odstranění. K tomu slouží pouze jedna metoda, a to odstranění pomocí enzymů aminos oxidáz či použití mikroorganismů, které těmito enzymy disponují.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ

1.1 Biogenní aminy

Biogenní aminy (BA) jsou sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností bazického charakteru. Tyto sloučeniny jsou produkty enzymatické dekarboxylace aminokyselin nebo jsou syntetizovány aminací a transaminací aldehydů a ketonů v důsledku metabolismu zvířat, rostlin a mikroorganismů. Chemická struktura biogenních aminů může být alifatická (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatická (tyramin, fenyletylamin) či heterocyklická (histamin, tryptamin) a podle počtu aminových skupin je můžeme dělit na monoaminy, diaminy a polyaminy. Chemická struktura některých biogenních aminů je znázorněna na obrázku 1 (Santos, 1996; Halász et al., 1994).



Obrázek 1: Chemická struktura některých biogenních aminů (Restuccia, 2015)

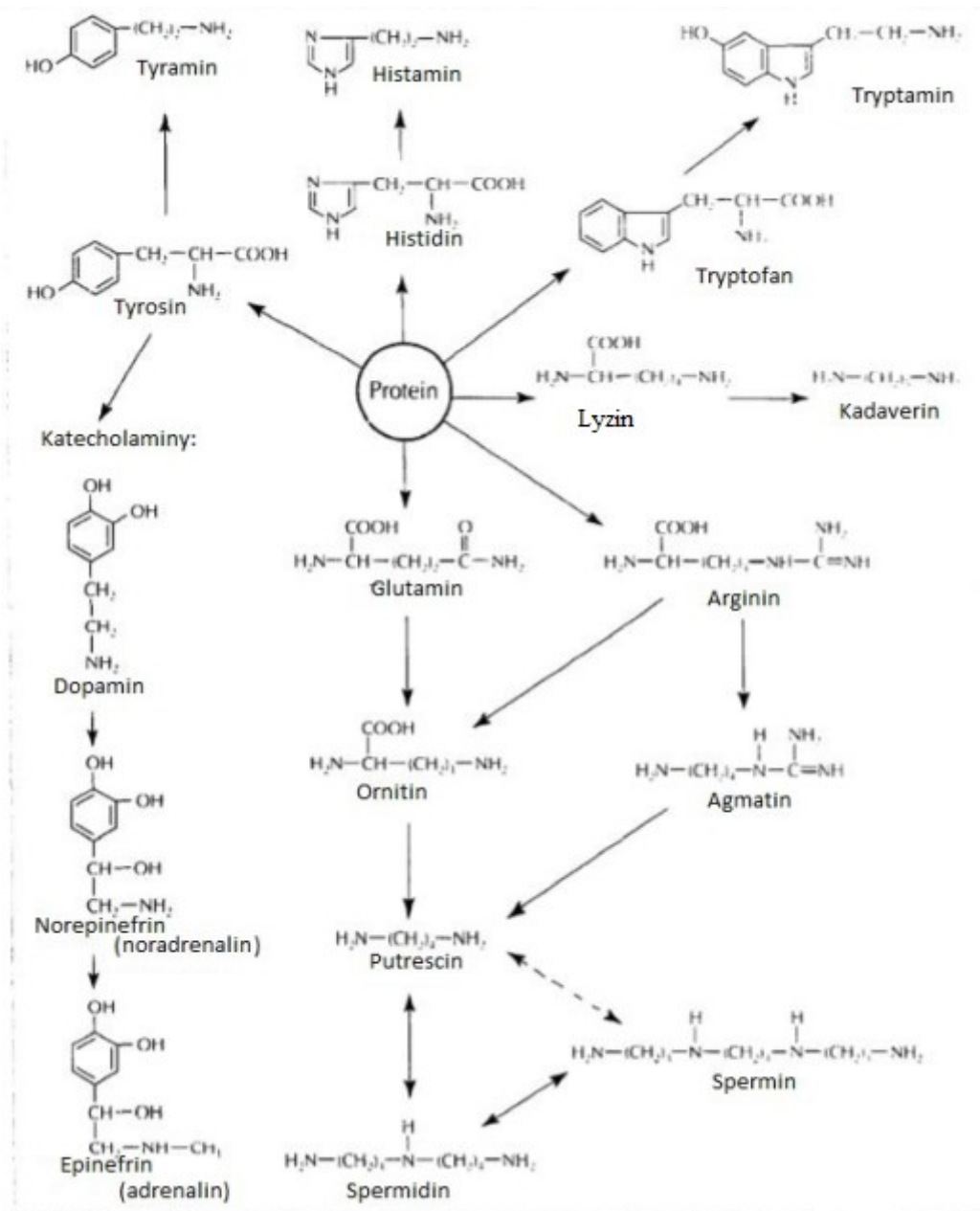
Biogenní aminy jsou obecně zdroji dusíku a prekurzory pro syntézu mnoha specifických sloučenin, jako jsou alkaloidy, hormony, nukleové kyseliny a bílkoviny. Navíc jsou zodpovědné za několik procesů v organismu, jako je regulace tělesné teploty či příjem potravy. Ve vysokých koncentracích ale mohou způsobovat řadu zdravotních problémů, jako je nevolnost, bolest hlavy, hypotenze nebo hypertenze, migréna, kožní alergie a zažívací obtíže. Bylo také prokázáno, že biogenní aminy jsou potenciální prekurzory karcinogenních N-nitrososloučenin. Dalším účinkem biogenních aminů je vliv na organoleptické vlastnosti potravin (Papageorgiou et al., 2018).

1.1.1 Vznik biogenních aminů

Biogenní aminy vznikají z aminokyselin působením karboxyláz nebo z aminokyselin a karbonylových sloučenin působením transamináz. Dekarboxylací argininu působením argininidekarboxylázy vzniká agmatin a z něj putrescin. Z putrescinu dále metylací vzniká spermidin a z něj spermin. Dekarboxylací fenylalaninu vzniká fenyletylamin, z tyrozinu tyramin, z tryptofanu vzniká tryptamin, z histidinu histamin, či z lyzinu kadaverin (Santos, 1996; Velíšek, 1999). Metabolické cesty vzniku biogenních aminů, jsou uvedeny na obrázku 2.

Základní podmínky pro vznik biogenních aminů v potravinách působením mikroorganismů jsou:

- 1/ V substrátu (potravině) musí být přítomny volné (biologicky dostupné) aminokyseliny.
- 2/ Nutná přítomnost mikroorganismů s dekarboxylační aktivitou.
- 3/ Musí být zabezpečeny podmínky, které umožňují růst bakterií, syntézu dekarboxyláz a podmínky podporující aktivitu těchto enzymů (Golian, Zeleňáková, 2014).



Obrázek 2: Metabolické cesty tvorby biogenních aminů (Angioi et al., 2004)

1.1.2 Produkce biogenních aminů bakteriemi

Dekarboxylázovou aktivitu vykazuje řada bakterií, lze například jmenovat rody *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*. Z bakterií mléčného kvašení to jsou např. *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* a *Streptococcus* (Golian, Zelenáková, 2014).

Cesta dekarboxylace zahrnuje pouze dvě bílkoviny, dekarboxylázu a transportní bílkovinu. Aminokyselina je poté v cytoplazmě konvertována na biogenní amin a oxid uhličitý (Pereira et al., 2009).

1.2 Biogenní aminy v potravinách

Přítomnost biogenních aminů může být očekávána ve všech potravinách, které obsahují bílkoviny nebo volné aminokyseliny (prekurzory) a jsou zde podmínky vhodné pro mikrobiální a biochemickou aktivitu mikroorganismů produkujících biogenní aminy. Mezi nejčastěji nalezené biogenní aminy v potravinách patří histamin, putrescin, kadaverin, tyramin, tryptamin, fenyletylamin, spermin a spermidin. Biogenní aminy se mohou vyskytovat v nízkých koncentracích u nefermentovaných potravin, jako je ovoce, zelenina, maso, mléko a ryby. Vysoká koncentrace byla zaznamenána u fermentovaných potravin (např. sýry, trvanlivé salámy, pivo, víno aj.), zejména v důsledku kontaminace mikroflórou vykazující aktivitu aminokyselinových dekarboxyláz (Halász et al., 1994; Önal, 2007). Přehled mikroorganismů podílejících se na produkci biogenních aminů v jednotlivých potravinách je uveden v následující tabulce 1.

Tabulka 1: Významné mikroorganismy produkující biogenní aminy (Velíšek, 1999)

Potravina	Mikroorganismy	Produkováné aminy
ryby	<i>Morganella morganii</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>Bacillus</i> sp., <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, tryptamin
maso a masné výrobky	<i>Pediococcus</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp.	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, fenyletylamin, tryptamin
fermentovaná zelenina	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus</i> sp.	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, fenyletylamin, tryptamin

Důvody pro stanovení biogenních aminů v potravinách jsou dvojí, první je jejich potenciální toxicita a druhý je jejich použití jako ukazatele kvality potravin v závislosti na jejich koncentraci, související s hygienickou kvalitou procesu a čerstvostí surovin a zpracovaných produktů (Restuccia, 2015).

1.2.1 Faktory ovlivňující aktivitu aminokyselinových dekarboxyláz

Tvorba biogenních aminů je multifaktoriální jev, kombinované působení těchto jevů, udává jejich výslednou koncentraci a tyto faktory jsou na sobě vzájemně závislé (Restuccia, 2015).

Průběh dekarboxylace závisí na přítomnosti mikroorganismů, koncentraci volných aminokyselin a také na dalších faktorech jako je pH, dostupnost kyslíku, zdroji energie, teplotních podmínkách či na vodní aktivitě (Halász et al., 1994; Pleva, 2012).

Mezi postupy redukcující tvorbu biogenních aminů je možné zařadit například snížení mikrobiálního růstu prostřednictvím chlazení nebo zmrazování, dále pomocí hydrostatického tlaku, ozařování, balení v ochranné atmosféře nebo použití vhodných potravinářských aditiv (Suzzi et al., 2015).

1.2.2 Výskyt biogenních aminů v potravinách

1.2.2.1 Maso a masné výrobky

Biogenní aminy v masných výrobcích můžeme nalézt jako důsledek mikrobiální aktivity spojené s fermentací při jejich zpracování nebo v surovinách jako důsledek mikrobiální kontaminace. Proto u nefermentovaných výrobků může přítomnost biogenních aminů sloužit jako ukazatel hygienické kvality. Mezi nejčastěji detekované biogenní aminy v těchto produktech lze zařadit putrescin, tyramin, kadaverin a také histamin. Mezi biogenní aminy přítomné na významné úrovni v čerstvém mase patří spermin a spermidin (Halász et al., 1994; Angioi et al., 2004).

1.2.2.2 Sýry a mléčné výrobky

Sýry jsou jedny z potravin s nejvyšším obsahem biogenních aminů, mezi nejčastěji nacházené patří tyramin, histamin, kadaverin a putrescin. Sýr je ideální substrát pro tvorbu biogenních aminů hned z několika důvodů. Při výrobním procesu zahrnujícím proteolýzu bíl-

kovin, je zajištěna dostupnost volných aminokyselin a jsou zde také vhodné podmínky pro růst bakterií schopných dekarboxylace těchto aminokyselin (Halász et al., 1994; Loizzo et al. 2013).

V syrovém mléku jsou zastoupeny polyaminy ve značném množství, také v mléčných výrobcích můžeme nalézt biogenní aminy jako je kadaverin, putrescin, histamin, tyramin, fenyletylamin či tryptamin (Papageorgiou et al., 2018).

1.2.2.3 Ovoce, zelenina a výrobky z nich

Čerstvé ovoce a zelenina obsahují biogenní aminy endogenního původu, a kvůli nekontrolovatelné mikrobiální enzymatické aktivitě mohou být akumulovány. Až dosud, bylo v čerstvém ovoci a zelenině detekováno 22 biogenních aminů, kdy nejčastěji se vyskytuje tyramin, putrescin, kadaverin, histamin a spermidin, zatímco serotonin a agmatin nebyly detekovány v žádném vzorku (Papageorgiou et al., 2018).

Pokud jde o fermentované zelí, byly zaznamenány vyšší koncentrace putrescinu, tyraminu a histaminu (Papageorgiou et al., 2018).

1.2.2.4 Ryby

Otrava histaminem, je jednou z nejběžnějších intoxikací způsobenou konzumací ryb a výrobků z nich. Histamin se zřídka vyskytuje u čerstvých ryb, jeho koncentrace se zvyšuje s jejich rozkladem. Mikroorganismy, které se přirozeně vyskytují na žábrách a ve střevech živých ryb, začínají růst až po smrti jedince, kdy dojde k inaktivaci obranných mechanismů. Jakmile je produkován enzym histidindekarboxyláza, může pokračovat produkce histaminu i při chladírenských teplotách, u zmrazených ryb je sice aktivita tohoto enzymu potlačena, avšak po rozmrazení může být znovu aktivován (Visciano et al., 2014).

1.3 Toxicita biogenních aminů

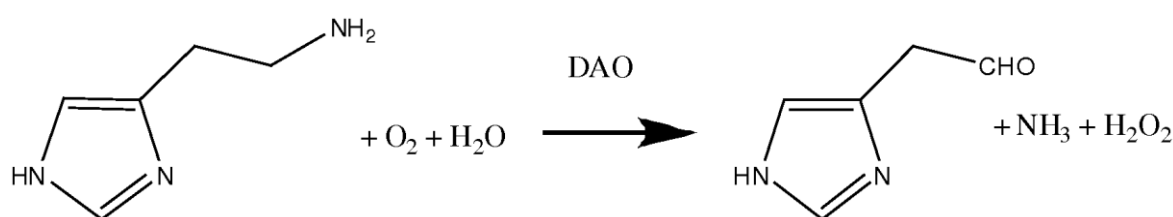
Přestože jsou některé biogenní aminy (histamin, tyramin, putrescin) potřebné pro řadu důležitých funkcí u člověka, zvířat i dalších organismů, může konzumace potravin s vysokým obsahem biogenních aminů mít toxické účinky (Santos, 1996).

Ve střevním traktu savců existuje účinný detoxikační systém, který je schopen metabolizovat běžné denní dávky biogenních aminů. Za normálních podmínek u člověka jsou exogenní aminy přijaté z potravin ihned detoxikovány pomocí aminooxidáz (monoaminoxidáza - MAO, diaminoxidáza - DAO) nebo konjugací. Otrava jídlem může nastat zejména v přítomnosti inhibitorů aminooxidáz (antidepresiva, drogy), v důsledku konzumace alkoholu či gastrointestinálních onemocnění (Santos, 1996; Papageorgiou et al., 2018; Őnal, 2007).

Mnohé z biogenních aminů v přítomnosti dusitanů mohou být potenciálně karcinogenní při přeměně na N-nitrosaminy. To může představovat riziko u masných výrobků, které obsahují dusitanové a dusičnanové soli (Papageorgiou et al., 2018; Őnal, 2007).

2 MOŽNOSTI MIRKOBIÁLNÍ DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ

Bakterie s aktivitou aminooxidáz jsou v poslední době v popředí pozornosti z důvodu možnosti snižování koncentrace biogenních aminů v potravinách, například v mase, rybách či u fermentovaných masných výrobků. Biogenní aminy mohou být degradovány prostřednictvím oxidační deaminace, katalyzované aminooxidázami za vzniku aldehydu, amoniaku a peroxidu vodíku (Obrázek 3), (Zaman et al., 2011; Murooka et al., 1979; Košmerl et al., 2013).



Obrázek 3: Oxidace histaminu pomocí DAO za vzniku imidazol acetaldehydu, amoniaku a peroxidu vodíku (Duelo et al., 2012)

MAO poskytuje významnou degradační cestu pro biogenní aminy, v přírodě můžeme tento enzym najít u vyšších organismů, ale byl také popsán u bakterií. DAO rovněž poskytuje degradační cestu pro biogenní aminy, především diaminy, a jejími typickými zdroji jsou prasečí játra či ledviny, lidská placenta, krevní plazma nebo mikroorganismy jako je *Pseudomonas aeruginosa* či *Clostridium fesiari*. Aktivita aminooxidáz byla dále popsána u čeledi *Enterobacteriaceae*, konkrétně pro rody *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Serratia* a *Proteus* (Murooka et al., 1979; Leuschner et al. 1998; Voight a Eitenmiller, 1978; Zaman et al., 2011).

Mezi další enzymy schopné oxidační deaminace za vzniku příslušných aldehydů, můžeme zařadit dehydrogenázy (Siddiqui et al. 2000).

Pro snížení hromadění biogenních aminů v potravinách existuje spousta možností, jako je inhibice bakterií s dekarboxylázovou aktivitou či snížení proteolytické aktivity. Dalším způsobem, jak snížit množství biogenních aminů v potravinách je jejich přímé odstranění. Pro tento způsob je jediná známá metoda, a to odstranění biogenních aminů pomocí enzymů, jako je MAO, DAO nebo použití mikroorganismů, které disponují těmito enzymy a jsou tedy schopny degradovat biogenní aminy. Tato metoda, ale není v současné době

uznávanou konzervační metodou (Butor et al., 2017; Alvarez et al., 2014; Naila et al., 2010).

2.1 Bakterie degradující biogenní aminy

Některé kmeny bakterií mohou díky aminooxidáze degradovat biogenní aminy (Alvarez et al., 2014). Degradáční aktivita se považuje spíše za kmenově než druhově specifickou vlastnost (Zaman et al., 2010).

Ukázalo se, že enzym histidindekarboxyláza je účinnější v nepřítomnosti kyslíku, zatímco histaminoxidázy byly nalezeny účinné pouze v přítomnosti kyslíku. Avšak jak aerobní, tak anaerobní bakterie jsou schopny produkovat biogenní aminy a stejně tak je i degradovat. Proto nalezení rovnováhy, která by kontrolovala mikrobiální růst a enzymovou aktivitu, může být obtížné (Naila et al., 2010; Kapeller-Adler, 1940).

2.1.1 Rod *Bacillus*

Mezi zástupce rodu *Bacillus*, kteří jsou schopni degradovat biogenní aminy, patří například *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* (Lee et al., 2016; Alvarez et al., 2014; Zaman et al., 2011; Zaman et al., 2010).

B. subtilis je schopen katalyzovat oxidační deaminaci většího počtu biogenních aminů, včetně histaminu a tyraminu. Díky této vlastnosti, je využíván při předejití tvorby biogenních aminů či snižování jejich koncentrací zejména u fermentovaných potravin (Eom et al., 2015). Mah a Hwang (2009) popisují významnou schopnost degradace histaminu u *B. coagulans*. Zaman et al. (2010) popisují schopnost degradovat histamin, putrescin a kadaverin u *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. humi*.

2.1.2 Rod *Lactobacillus*

Dapkekevicus et al. (2000) studovali schopnost bakterií mléčného kvašení izolovaných z rybích výrobků (pasta z makrely), na degradaci biogenních aminů. Bylo zjištěno, že *L. sakei* je schopen degradovat histamin. Dle studie Capozziho et al. (2012) je *L. plantarum* schopen degradovat tyramin a putrescin ve víně. Také *L. pentosus* je schopen degradovat histamin (Leuschner et al., 1998).

2.1.3 Rody *Micrococcus* a *Kocuria*

Leuschner et al. (1998) uvádějí, že *Kocuria varians* (dříve *Micrococcus varians*) snižuje množství tyraminu během zrání fermentovaných uzenin. *Kocuria rosea* (dříve *Micrococcus roseus*) má putrescinoxidázu a tyraminoxidáza je přítomna u *Micrococcus luteus* (dříve *Sarcina lutea*), (Callejón et al., 2014).

2.1.4 Rod *Staphylococcus*

S. xylosus dle Mah a Hwang (2009) degraduje histamin, degraduje také tyramin, ale ne na tak významné úrovni. *S. carnosus* izolovaný z rybí omáčky degraduje histamin a *S. intermedius* degraduje putrescin a kadaverin (Zaman et al., 2010).

2.1.5 Rod *Brevibacterium*

Bakterie *Brevibacterium linens* vykazuje vysoký potenciál k degradaci histaminu a tyraminu. V některých případech bylo pozorováno úplné vymizení biogenních aminů (Leuschner et al., 1998).

2.1.6 Rod *Pseudomonas*

Rod *Pseudomonas*, včetně *P. aeruginosa* může využívat polyaminy (putrescin, spermin, spermidin) jako zdroj uhlíku a dusíku. Přítomná spermidindehydrogenáza oxiduje spermin a spermidin (Dasu et al., 2006). *P. putida* je schopna degradovat tyramin a dopamin (Arcos et al., 2010).

2.1.7 Rod *Citrobacter*

Citrobacter freundii je schopen degradace sperminu a spermidinu (Dasu et al., 2006).

2.2 Kvasinky degradující biogenní aminy

Bäumliberger et al. (2015) pozorovali u některých druhů kvasinek, jako jsou *Debaryomyces hansenii* a *Yarrowia lipolytica*, schopnost degradovat biogenní aminy. Když byla kultivována *D. hansenii* a *Y. lipolytica*, byly všechny přidané biogenní aminy (fenyletylamin, tyramin, histamin, etanolamin) po 8 dnech zcela degradovány. Dále byly tyto druhy také schopny degradovat putrescin či tryptamin. To znamená, že použití kvasinkové aminooxidázy ke snížení biogenních aminů v potravinách, může být alternativní strategií.

2.3 Plísně degradující biogenní aminy

Druhy jako *Epicoccum nigrum*, *Penicillium citrinum* či *Alternaria* sp. mají vysoký potenciál k degradaci biogenních aminů. Mezi další rody, izolované z révy vinné, které mohou degradovat histamin, tyramin a putrescin, patří například *Dendryphion penicillatum*, *Ulocladium chartarum*, *Fusarium* sp. či *Phoma* sp. Schopnost degradace byla také pozorována u *Aspergillus oryzae* či *Penicillium roqueforti* (Cueva et al., 2012).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části této bakalářské práce byla charakterizace biogenních aminů. Byl popsán jejich vznik, význam a faktory ovlivňující aktivitu aminokyselinových dekarboxyláz. Dalším cílem bylo popsat možnosti mikrobiální degradace biogenních aminů a jejich využití.

Cílem praktické části bylo ověření schopnosti degradace biogenních aminů vybranými kmeny non-starterových bakterií izolovanými z potravin. Následně byl stanoven úbytek biogenních aminů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) po předchozím převedení na deriváty, které bylo možno detekovat v UV oblasti při vlnové délce 254 nm.

4 POUŽITÉ MATERIÁLY A METODY

4.1 Přístroje a pomůcky

- Automatická pipeta BIOHIT
- Box laminární BIO IIA, Biohazard box TELSTAR
- Centrifuga HETTICH ROTANTA 460R
- Chromatografický systém Dionex HPLC UltiMate 3000
- Kolona Agilent Zorbax RRHD Eclipse Plus C18
- Laboratorní sklo a plasty (zkumavky, Petriho misky, eppendorfkové mikrozukavky, zkumavky pro centrifugaci, reagenční láhve, pipety)
- Laboratorní váhy Adventrure Pro (OHAUS)
- Mikrobiologický inkubátor MEMMERT (30 °C)
- pH metr (EUTECH instruments)
- Sterilizátor H+P Varioklav 135 S

4.2 Příprava kultivačních médií a roztoků

4.2.1 Minerální médium s biogenními aminy

Schopnost degradace biogenních aminů vybranými kmeny byla ověřována v minerálním médiu, jež není samo o sobě zdrojem živin a jako jediný zdroj dusíku a uhlíku sloužily vybrané biogenní aminy.

K přípravě minerálního média byly odměřeny jednotlivé roztoky dle dále uvedeného množství a doplněny do 1000 ml destilovanou vodou. Médium bylo rozpipetováno po 5 ml do zkumavek a autoklávováno.

Roztok A (9,07 g KH_2PO_4 /1000ml)	20 ml
Roztok B (23,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ /1000ml).....	80 ml
Roztok stopových prvků	2 ml
$\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (10 g/l).....	10 ml
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (3 g/l).....	10 ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (1 g/l).....	10 ml
NaCl (50 g/l)	10 ml
Roztok biogenních aminů	100 ml
Destilovaná voda.....	doplnit do 1000 ml

➤ **Roztok stopových prvků**

Roztok stopových prvků byl připraven navážením dále zobrazených složek a jejich rozpuštěním v 1000 ml destilované vody.

$\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,043 g
H_3BO_3	0,057 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,043 g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,037 g
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,040 g

➤ **Roztok biogenních aminů**

Roztok biogenních aminů byl připraven navážením daného množství biogenních aminů a jejich rozpuštěním v 1000 ml destilované vody. Následně bylo upraveno pH tohoto roztoku pomocí HCl nebo NaOH na hodnotu 6,8.

Tyramin..... 2 g

Putrescin..... 2 g

Kadaverin..... 2 g

Histamin..... 2 g

Fenyletylamin 2 g

4.2.2 Nutrient Broth s biogenními aminy

Bylo připraveno médium Nutrient broth navážením 25 g dané směsi a doplněním do 900 ml. K takto připravenému médiu bylo přidáno 100 ml desetkrát koncentrovaného roztoku biogenních aminů, dle kapitoly 4.2.1. Následně byl roztok rozpipetován po 5 ml do zkumavek a autoklávován.

4.2.3 ½ Nutrient Broth s biogenními aminy

Bylo připraveno médiu stejným způsobem jako u kapitoly 4.2.2, ale byla použita poloviční navážka Nutrient broth. Následně byl roztok rozpipetován po 5 ml do zkumavek a autoklávován.

4.2.4 Fyziologický roztok

Fyziologický roztok byl připraven navážením 8,5 g NaCl a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody a poté byl autoklávován.

4.3 Použité mikroorganismy

K ověření schopnosti degradace a následnému stanovení úbytku biogenních aminů byly využity bakterie, které jsou dostupné ve sbírce Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí Fakulty technologické Univerzity Tomáše Bati. Byly použity bakterie izolované z bažantího masa.

- B58 *Citrobacter gilleni*
- B59 *Citrobacter gilleni*
- B50 *Escherichia coli*
- B97 *Hafnia alvei*
- B87 *Pantoea agglomerans*
- B43 *Yersinia enterocolitica*
- B21 *Acinetobacter* sp.
- B68 *Enterococcus durans*
- B51 *Enterococcus faecium*
- B88 *Staphylococcus vitulinus*

4.4 Ověření schopnosti degradace biogenních aminů vybranými bakteriemi

Ověření schopnosti degradace biogenních aminů bylo provedeno v minerálním médiu s biogenními aminy. Testované kmeny byly pomocí sterilních kliček asepticky převedeny z tuhé půdy do zkumavky s fyziologickým roztokem. Z takto vytvořené suspenze bylo pipetováno 50 µl do jednotlivých zkumavek s minerálním médiem. Kmeny byly kultivovány v minerálním médiu při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin. Schopnost růstu v minerálním médiu byla hodnocena intenzitou zákalu buněčné suspenze.

4.5 Chromatografické stanovení úbytku biogenních aminů vybranými bakteriemi

4.5.1 Příprava a odběr vzorků pro analýzu

Varianty daných kultivačních médií byly zaočkovány 100 µl suspenze bakterií kultivovaných přes noc. Kmeny byly tedy pomnoženy ve 40 zkumavkách s Nutrient Broth s biogenními aminy a ve 40 zkumavkách s ½ Nutrient Broth s biogenními aminy.

Degradace byla sledována při teplotě 30 °C a odběrové časy byly vždy po 24 a 48 hodinách. Odběry byly provedeny ve stanovených časech ve 2 paralelních zkumavkách.

Vzorky byly centrifugovány (4600 otáček/min., 7 minut) a z každé zkumavky bylo odebráno do třech eppendorfkových mikrozkušavek 600 µl supernatantu a bylo přidáno 600 µl kyseliny chloristé (Sigma-Aldrich) o koncentraci 1,2 mol/l. Vzorky v mikrozkušavkách byly zamrazeny a připraveny pro následnou derivatizaci.

4.5.2 Derivatizace vzorků

Pomocí dansylchloridu (Sigma-Aldrich) byly biogenní aminy převedeny na deriváty, jež je možné detekovat v UV oblasti při vlnové délce 254 nm.

Do derivatizační nádoby bylo pomocí ručního dávkovače nadávkováno 100 µl 1,7-diaminoheptanu (Sigma-Aldrich) o koncentraci 500 mg/l (jako vnitřní standard), 1 ml vzorku a 1,5 ml pufru pro derivatizaci. Následně byl připraven čerstvý roztok dansylchloridu v acetonu (Merck) o koncentraci 5 g/l a do derivatizační nádoby byly nadávkovány 2 ml tohoto roztoku. Nádoby byly uzavřeny a směs se nechala třepat v temnu 20 hodin. Poté bylo ke vzorku přidáno 200 µl prolinu (Sigma-Aldrich) a vzorky byly opět umístěny na třepačku po dobu jedné hodiny. Následovalo přidání 3 ml heptanu (Merck) ke vzorku a po pečlivém uzavření byly vzorky třepány 3 minuty ručně. Dále byl odpipetován 1 ml horní heptanové vrstvy do vialky. Obsah vialky byl odpařen při teplotě 60 °C do sucha pod proudem dusíku a suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich). V případě, že vzorky nebyly analyzovány ihned, byly uchovávány v mrazicím zařízení při teplotách -18 °C do doby analýzy.

4.5.3 Chromatografické stanovení biogenních aminů

Bezprostředně před analýzou byl roztok přefiltrován přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 µm a dávkován do chromatografického systému.

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

Program gradientové eluce, kterým probíhala separace dansylderivátů biogenních aminů je znázorněna v následující tabulce 2.

Tabulka 2: Gradientový eluční program pro HPLC

Čas [min]	10% Acetonitril [%]	100% Acetonitril [%]
0,1	36	64
1,4	28	72
3,5	15	85
4,0	0	100
9,0	0	100
11,5	36	64
15,5	36	64

5 VÝSLEDKY

5.1 Ověření schopnosti degradace biogenních aminů vybranými bakteriemi

Před chromatografickým stanovením úbytku byla ověřena schopnost degradace biogenních aminů vybranými bakteriemi dle kapitoly 4.4, jako schopnost růstu v minerálním médiu. Výsledky jsou znázorněny v následující Tabulce 3.

Tabulka 3: Ověření schopnosti degradace biogenních aminů

Vzorek	Schopnost růstu v minerálním médiu
<i>Citrobacter gillenii</i> B58	ANO
<i>Citrobacter gillenii</i> B59	ANO
<i>Escherichia coli</i> B50	ANO
<i>Hafnia alvei</i> B97	ANO
<i>Pantoea agglomerans</i> B87	ANO
<i>Yersinia enterocolitica</i> B43	ANO
<i>Acinetobacter</i> sp. B21	ANO
<i>Enterococcus durans</i> B68	ANO
<i>Enterococcus faecium</i> B51	ANO
<i>Staphylococcus vitulinus</i> B88	ANO

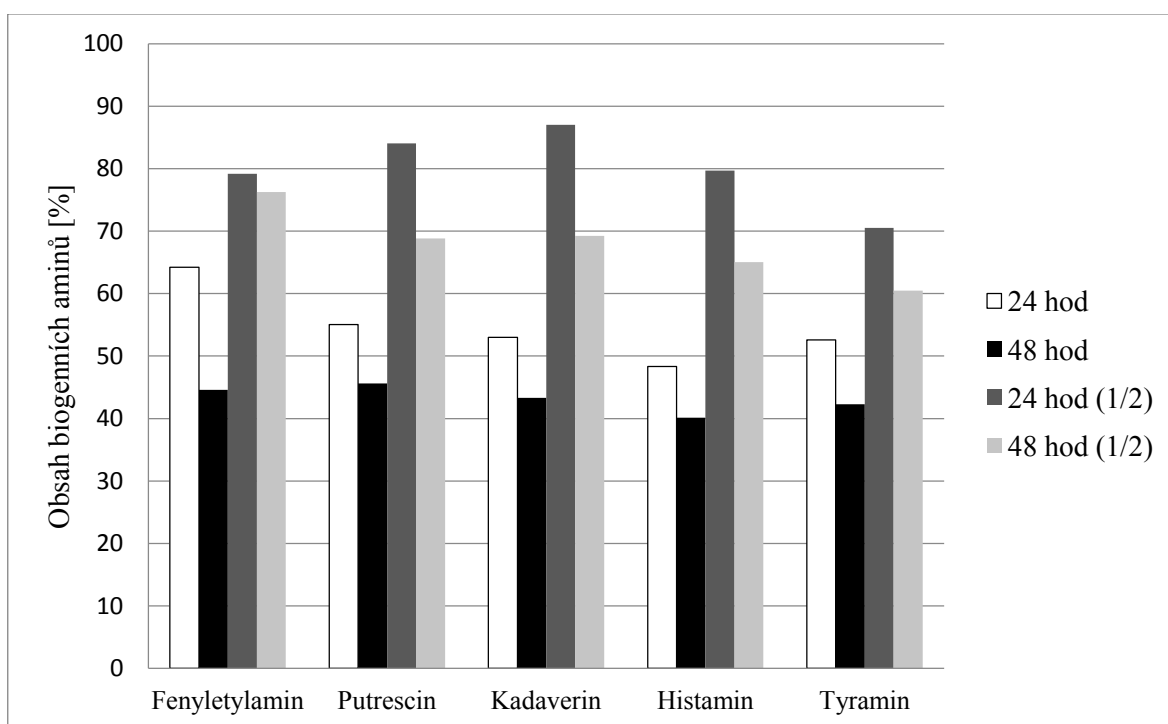
Všechny vybrané kmeny bakterií, u kterých byl po kultivaci v minerálním médiu s biogenními aminy pozorován zákal (bakteriální suspenze), lze považovat za schopné degradace biogenních aminů. Je tedy pravděpodobné, že byly schopny využívat biogenní aminy jako zdroj živin.

5.2 Chromatografické stanovení úbytku biogenních aminů vybranými bakteriemi

U vybraných degradérů byla zkoumána schopnost degradace 5 biogenních aminů (PHE – fenyletylamin, PUT – putrescin, KAD – kadaverin, HIS – histamin, TYM – tyramin) v závislosti na čase (24 hodin, 48 hodin) a médiu (Nutrient Broth s biogenními aminy – optimální médium, ½ Nutrient Broth s biogenními aminy – neúplné médium). Úbytek biogenních aminů byl srovnáván s kontrolou, což byl příslušný bujón (Nutrient Broth, respektive ½ Nutrient Broth) s biogenními aminy, který však nebyl zaočkován bakteriemi.

5.2.1 Degradace biogenních aminů kmenem *Citrobacter gillienii* B58

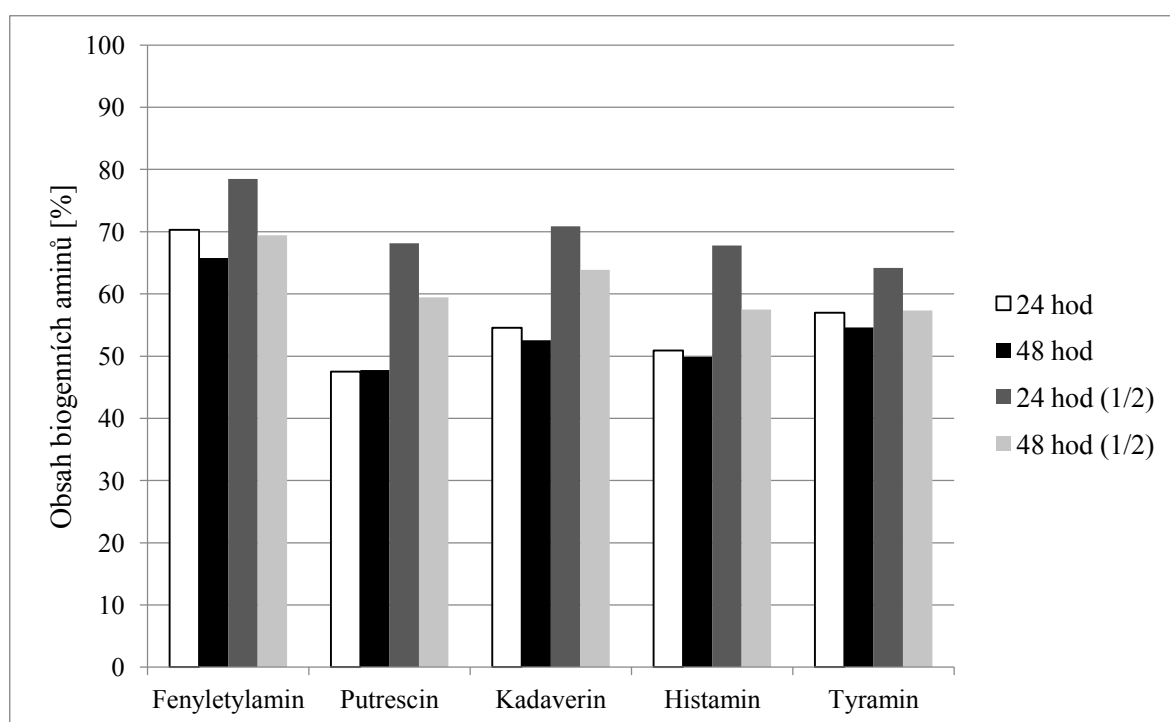
Zkoumaný kmen *Citrobacter gillienii* B58 nejlépe degradoval histamin po 48 hodinách v optimálním médiu, jak je patrné z grafu na obrázku 4. Během prvních 24 hodin nejprve došlo k poklesu téměř o 1/2 a po dalších 24 hodinách došlo k poklesu o dalších 10 %. K největší redukci všech sledovaných biogenních aminů došlo po 48 hodinách v optimálním médiu, a to v průměru na 43 % původní koncentrace. Nejmenší úbytek byl zaznamenán při 24 hodinové kultivaci v polovičním médiu u kadaverinu, pouze na 87 % z původní koncentrace. Bakterie nejlépe degradovala sledované biogenní aminy v optimálním médiu po 48 hodinách a nejmenší úbytek byl sledován v polovičním médiu po 24 hodinách.



Obrázek 4: Degradace biogenních aminů v médiu Nutrient Broth a v 1/2 médiu Nutrient Broth kmenem *Citrobacter gillienii* B58

5.2.2 Degradace biogenních aminů kmenem *Citrobacter gillienii* B59

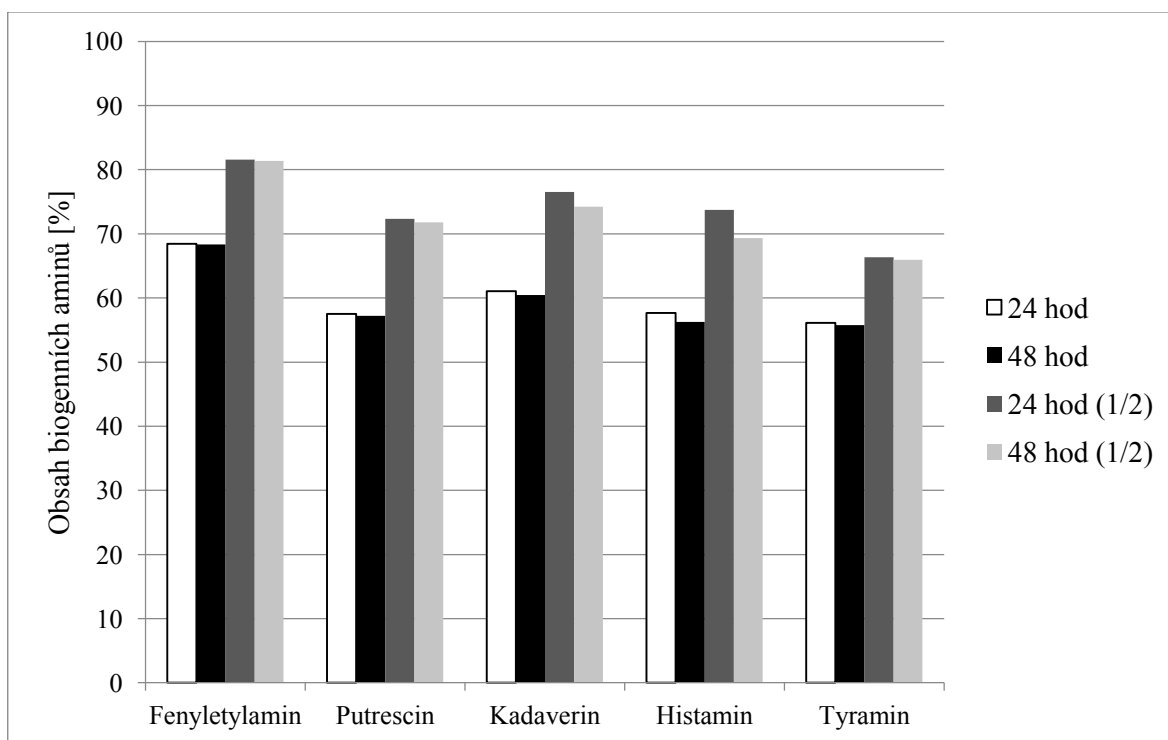
Byla sledována degradační schopnost kmene *Citrobacter gillienii* B59, která je znázorněna na obrázku 5. Tato schopnost byla nejvyšší v optimálním médiu pro všechny sledované biogenní aminy. Pokles v optimálním médiu mezi 24 hodinovou a 48 hodinovou kultivací je maximálně 5 %, a to u fenyletylaminu. U ostatních sledovaných biogenních aminů v optimálním médiu, je úbytek v závislosti na čase nepatrný. Nejlépe byl degradován putrescin, v optimálním médiu na 47 % z původní koncentrace a na 59 % z původní koncentrace u polovičního média. Nejméně byl redukován fenyletylamin, v optimálním médiu byl zaznamenán pokles na 65 % a u polovičního média na 69 % z původní koncentrace.



Obrázek 5: Degradace biogenních aminů v médiu Nutrient Broth a v 1/2 médiu Nutrient Broth kmenem *Citrobacter gillienii* B59

5.2.3 Degradace biogenních aminů kmenem *Escherichia coli* B50

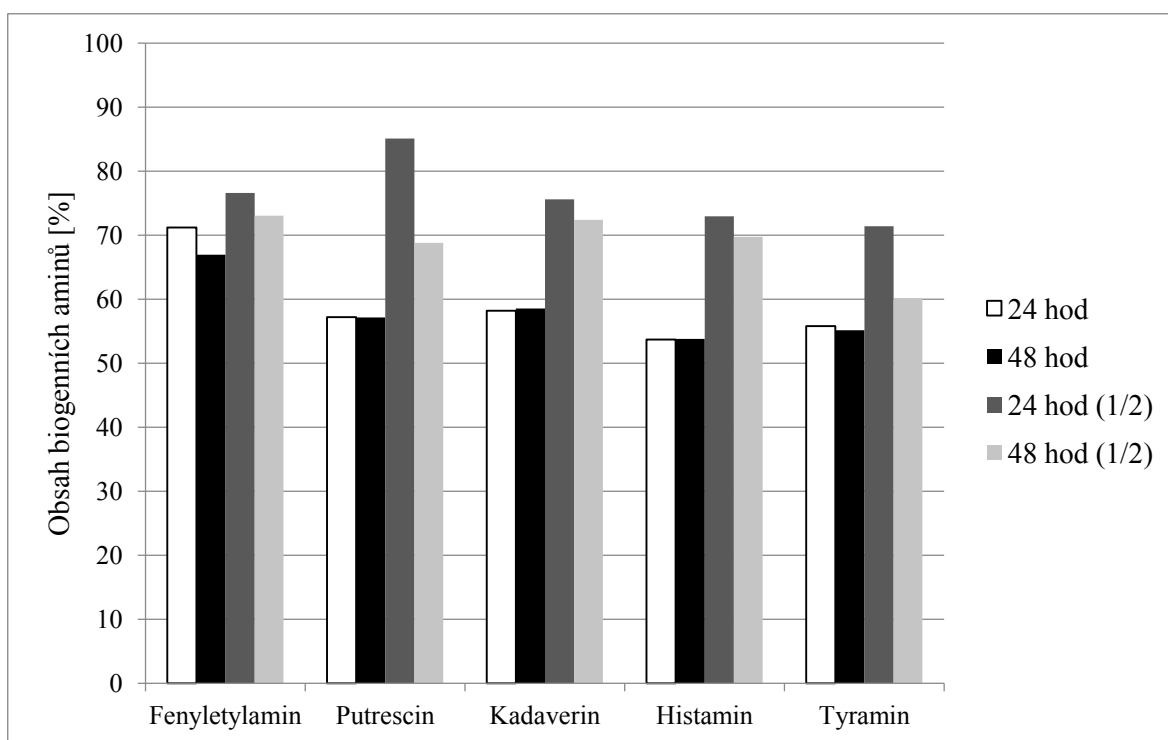
Z obrázku 6 je zřejmé, že kmen *Escherichia coli* B50 nejlépe degradoval tyramin. V optimálním médiu došlo k redukci o 45 % a v polovičním médiu o 35 % z původní koncentrace. Nejmenší pokles byl zaznamenán u fenyletylaminu, v optimálním médiu o 32 % a v polovičním médiu pouze o 19 %. Lze říci, že sledované biogenní aminy, byly v optimálním médiu degradovány na podobné hodnoty, až na fenyletylamin, u kterého byla degradační aktivita nižší. U putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu došlo k redukci na 56 až 60 % z původní koncentrace, kdežto u fenyletylaminu pouze na 68 %. Z grafu je dále patrné, že schopnost degradovat vybrané biogenní aminy kmenem *Escherichia coli* B50, se lišila spíše v závislosti na použitém médiu, nikoli v závislosti na čase.



Obrázek 6: Degradace biogenních aminů v médiu Nutrient Broth a v 1/2 médiu Nutrient Broth kmenem *Escherichia coli* B50

5.2.4 Degradace biogenních aminů kmenem *Hafnia alvei* B97

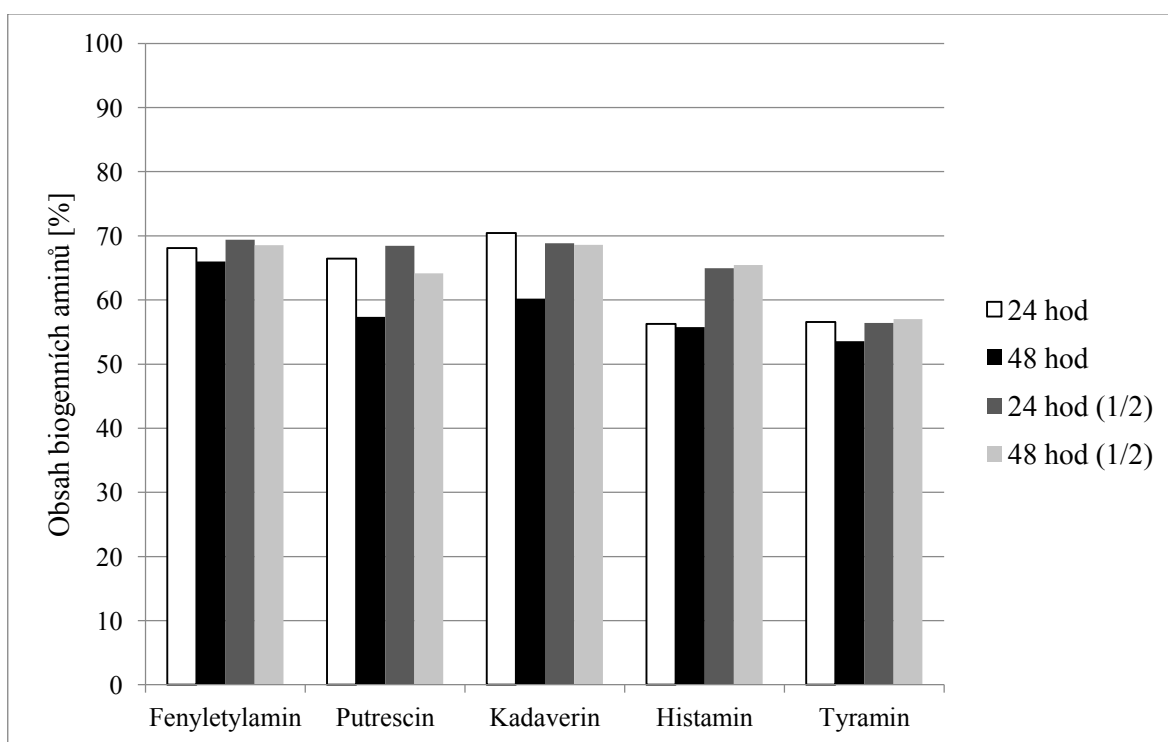
Testovaný kmen *Hafnia alvei* B97 nejlépe degradoval histamin, téměř o 1/2 v optimálním médiu. To podobně platilo také pro putrescin, kadaverin a tyramin. V optimálním médiu byl nejhůře degradován fenyletylamin, a to o 1/3. V polovičním médiu došlo k největšímu úbytku u tyraminu, na 71 % po 24 hodinách, po dalších 24 hodinách byla tato hodnota 60 %. K nejmenšímu úbytku u polovičního média po 24 hodinách došlo u putrescinu, a to pouze o 15 %. Z grafu je patrné, že pro redukci sledovaných biogenních aminů, je vhodnější optimální médium, kdy nezáviselo, zdali se jednalo o 24 nebo 48 hodinovou kultivaci, protože tento rozdíl byl zanedbatelný.



Obrázek 7: Degradace biogenních aminů v médiu Nutrient Broth a v 1/2 médiu Nutrient Broth kmenem *Hafnia alvei* B97

5.2.5 Degradace biogenních aminů kmenem *Pantoea agglomerans* B87

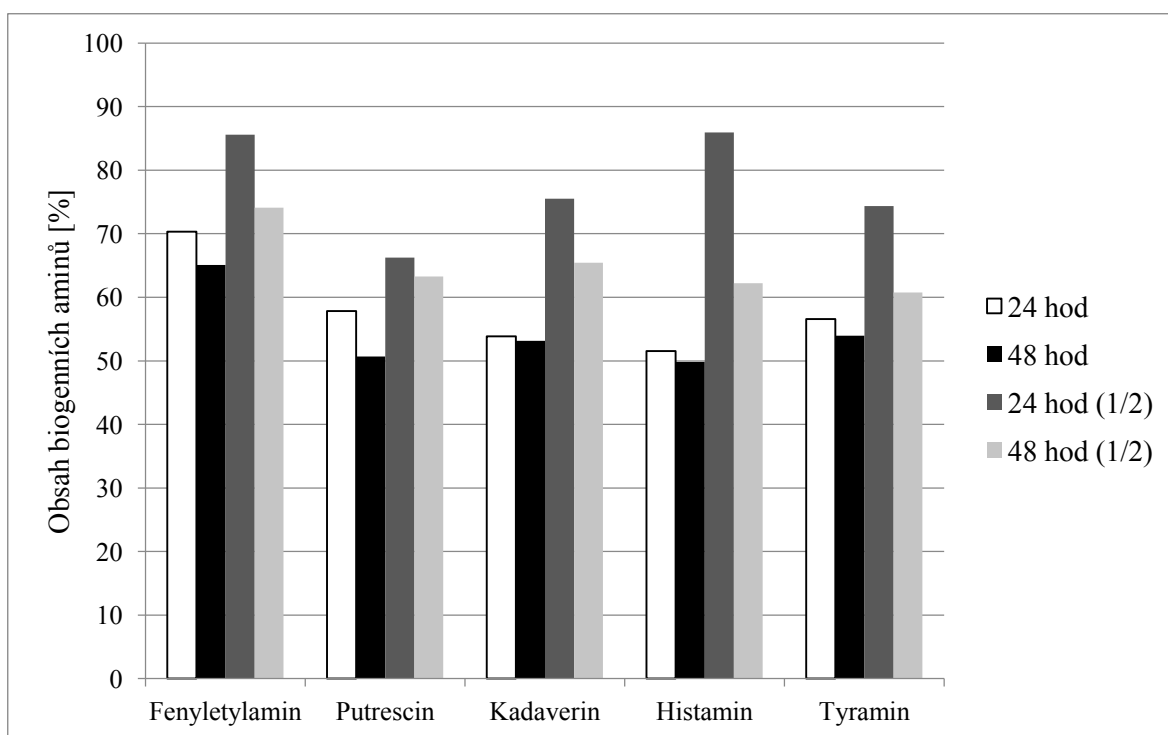
Na obrázku 8, je znázorněna degradační aktivita kmene *Pantoea agglomerans* B87. Tato aktivita byla nejvyšší u tyraminu, kdy u obou médií došlo k redukci téměř o 1/2 bez závislosti na čase. Totéž podobně platilo i pro fenyletylamin, kdy rozdíl degradační aktivity pro obě média nebyl zaznamenán, stejně jako nebyl pozorován rozdíl v degradační aktivitě v čase a došlo k redukci o 1/3. Putrescin, kadaverin a histamin byly v optimálním médiu po 48 hodinách degradovány podobně, a to o 40 až 44 % z původní koncentrace. U polovičního média po 48 hodinách, byly také putrescin, kadaverin a histamin degradovány podobně, a to o 32 až 36 %. Dá se říct, že degradace v optimálním médiu byla o něco vyšší než u polovičního média.



Obrázek 8: Degradace biogenních aminů v médiu Nutrient Broth a v 1/2 médiu Nutrient Broth kmenem *Pantoea agglomerans* B87

5.2.6 Degradace biogenních aminů kmenem *Yersinia enterocolitica* B43

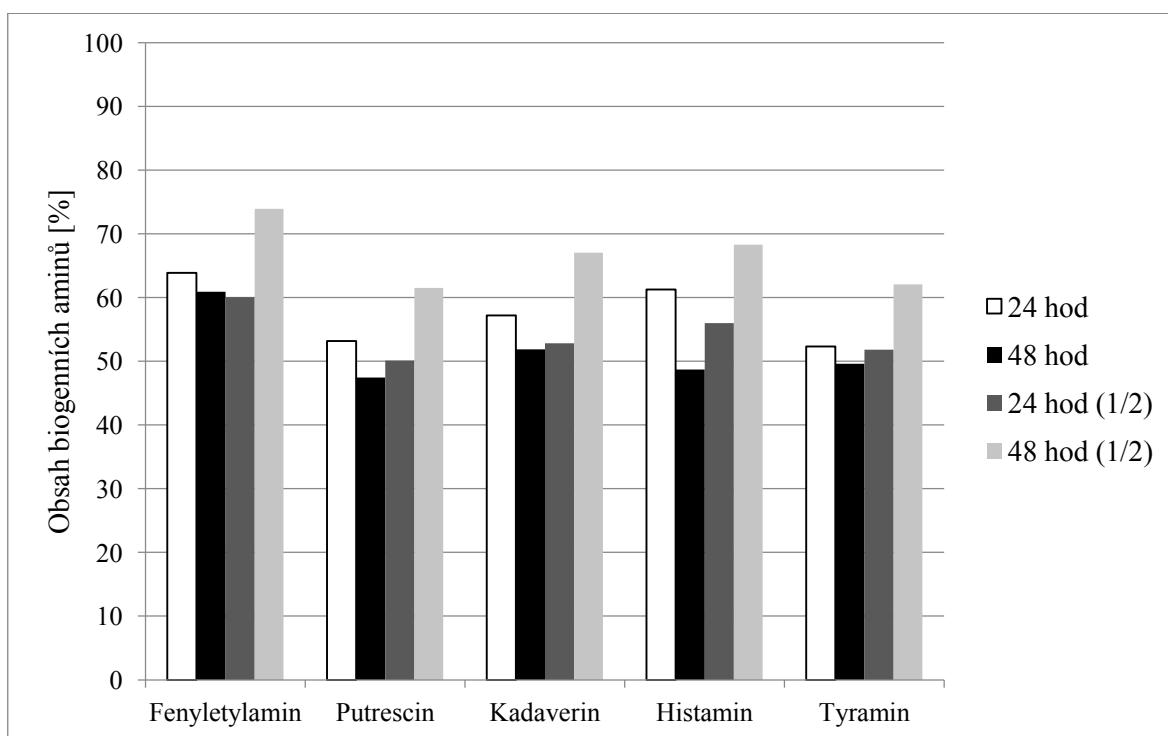
Degradace vybraných biogenních aminů kmenem *Yersinia enterocolitica* B43 je znázorněna na obrázku 9. Z tohoto grafu můžeme vyčíst, že podobně byly v optimálním médiu po 48 hodinách degradovány histamin, putrescin, kadaverin a tyramin, a to v průměru o 1/2. Nižší úbytek byl zaznamenán u fenyletylaminu, a to o 35 %. V polovičním médiu byl nejlépe degradován tyramin po 48 hodinách, a to na 60 % původní koncentrace. Histamin byl v polovičním médiu za prvních 24 hodin zredukován pouze na 86 %, během dalších 24 hodin, byla tato hodnota snížena na 62 %. Tento kmen lépe degradoval vybrané biogenní aminy v optimálním médiu než v polovičním.



Obrázek 9: Degradace biogenních aminů v médiu Nutrient Broth a v 1/2 médiu Nutrient Broth kmenem *Yersinia enterocolitica* B43

5.2.7 Degradace biogenních aminů kmenem *Acinetobacter* sp. B21

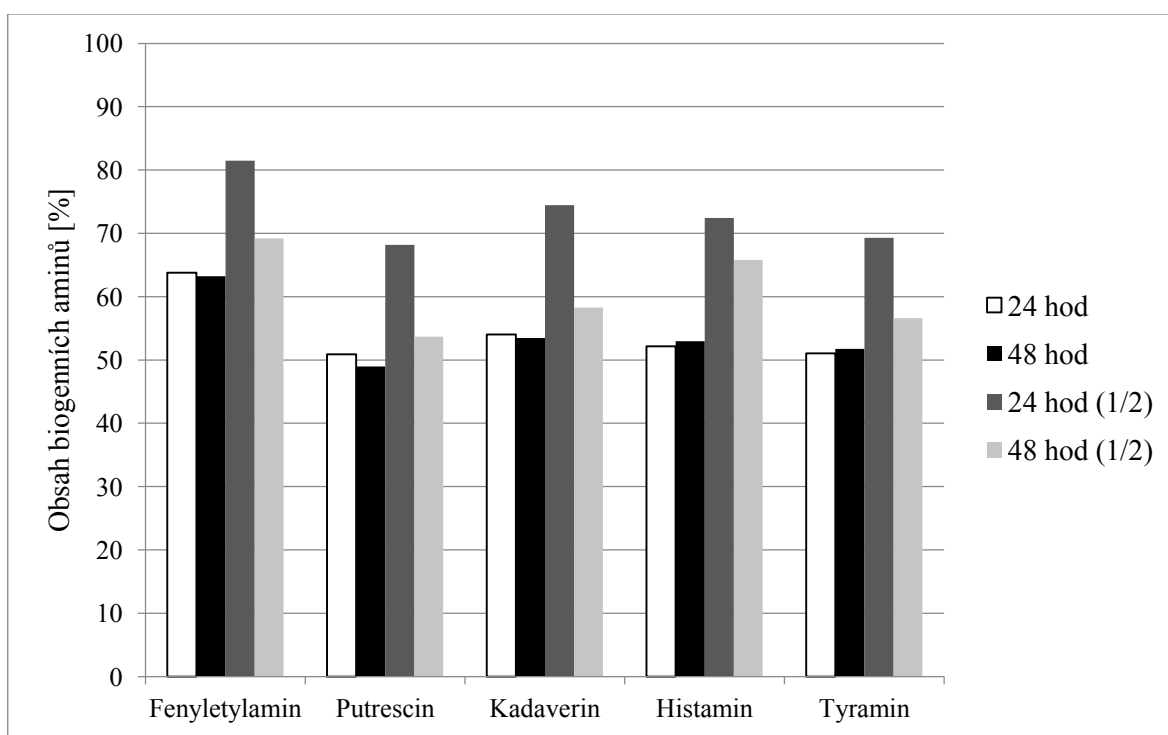
Obrázek 10, znázorňuje degradaci vybraných biogenních aminů kmenem *Acinetobacter* sp. B21. Ten nejlépe redukoval putrescin, a to o 53 % v optimálním médiu po 48 hodinách. Také u histaminu a tyraminu, za stejných podmínek, byl sledován podobný úbytek, a to o 51 %. Hůře byl pak degradován fenyletylamin, za stejných podmínek o 39 %. U polovičního média po 24 hodinách byl sledován podobný úbytek jako u optimálního po 48 hodinách. Můžeme tedy říct, že k degradaci vyhovovala obě média.



Obrázek 10: Degradace biogenních aminů v médiu Nutrient Broth a v 1/2 médiu Nutrient Broth kmenem *Acinetobacter* sp. B21

5.2.8 Degradace biogenních aminů kmenem *Enterococcus durans* B68

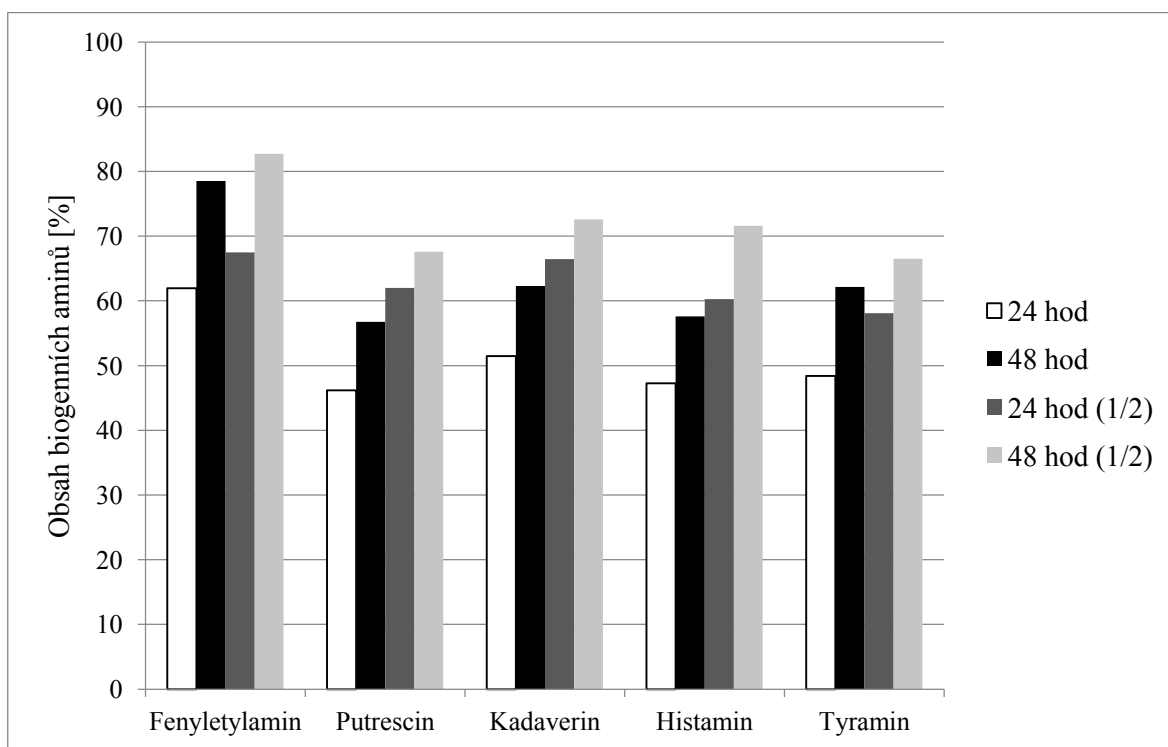
Schopnost kmene *Enterococcus durans* B68 degradovat vybrané biogenní aminy, je znázorněna na obrázku 11. U všech sledovaných biogenních aminů, kromě fenyletylaminu, byl sledován obdobný úbytek v optimálním médiu po 48 hodinách, a to přibližně o 1/2 (47 až 51 %). Fenyletylamin, byl za těchto podmínek, redukován pouze o 37 %. U optimálního média, bylo pozorováno, že úbytek mezi 24 hodinovou a 48 hodinovou kultivací je minimální, kdy nejvyšší byl u putrescinu, a to 2 %. Nižší schopnost degradovat vybrané biogenní aminy byla pak pozorována u polovičního média, kdy nejvíce byl degradován po 48 hodinách putrescin, a to na 54 % původní koncentrace a nejmenší úbytek byl u fenyletylaminu, a to na 69 %.



Obrázek 11: Degradace biogenních aminů v médiu Nutrient Broth a v 1/2 médiu Nutrient Broth kmenem *Enterococcus durans* B68

5.2.9 Degradace biogenních aminů kmenem *Enterococcus faecium* B51

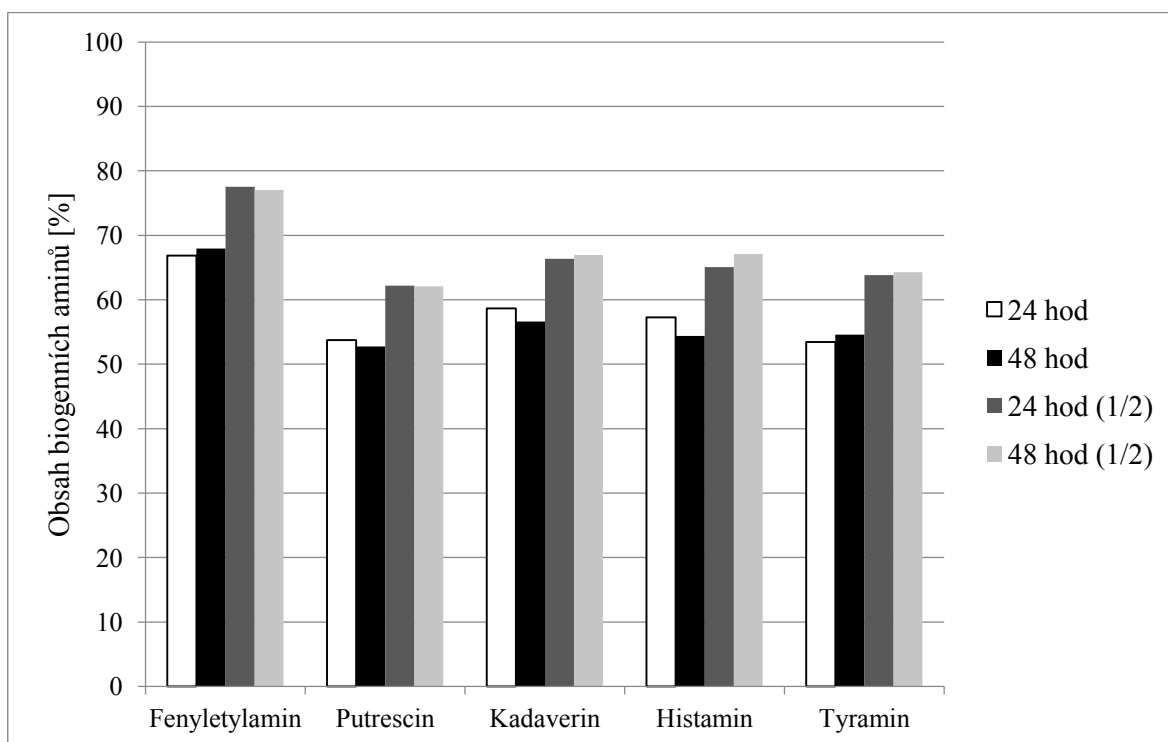
Schopnost degradovat vybrané biogenní aminy kmenem *Enterococcus faecium* B51, je znázorněna na obrázku 12. Tento kmen dokázal nejlépe degradovat putrescin a histamin v optimálním médiu. Po 24 hodinách došlo k redukci o 53 % u obou z nich. Degradace byla zaznamenána i u polovičního média, putrescin měl koncentraci 62 % a histamin 60 % po 24 hodinové kultivaci. Hůře byl degradován fenyletylamin, a to ve všech sledovaných podmínkách. Pro tento kmen byly nejvhodnější podmínky optimálního média při 24 hodinové kultivaci.



Obrázek 12: Degradace biogenních aminů v médiu Nutrient Broth a v 1/2 médiu Nutrient Broth kmenem *Enterococcus faecium* B51

5.2.10 Degradace biogenních aminů kmenem *Staphylococcus vitulinus* B88

Kmen *Staphylococcus vitulinus* B88, byl nejlépe schopen degradovat putrescin, jak je zřejmé z grafu na obrázku 13. Putrescin byl v optimálním médiu degradován téměř o 1/2 a v polovičním médiu o 38 %. Nejmenší redukce byla pozorována u fenyletylaminu, kdy u optimálního média byl zaznamenán pokles o 32 % a u polovičního média o necelou čtvrtinu. Tento kmen měl lepší degradační schopnost v optimálním médiu než v médiu polovičním. Nejlépe byl ve všech sledovaných podmínkách redukován putrescin a nejhůře pak fenyletylamin.



Obrázek 13: Degradace biogenních aminů v médiu Nutrient Broth a v 1/2 médiu Nutrient Broth kmenem *Styphylococcus vitulinus* B88

5.2.11 Srovnání degradace biogenních aminů vybranými kmeny

Fenyletylamin byl nejlépe degradován kmenem *Citrobacter gillanii* B58 po 48 hodinách v optimálním médiu, a to o 55 %. Nejhůře pak byl degradován kmenem *Yersinia enterocolitica* B43 v polovičním médiu po 24 hodinové kultivaci, a to o 14 %.

Nejvyšší úbytek u putrescinu byl zaznamenán kmenem *Citrobacter gillanii* B58 v optimálním médiu po 48 hodinách, a to o 54 %. Redukce o 53 % byla zaznamenána kmenem *Acinetobacter* sp. B21 v optimálním médiu po 48 hodinách. Nejnižší úbytek byl sledován u kmene *Hafnia alvei* B97, a to o 15 %.

Kmen *Citrobacter gillanii* B58 nejlépe redukoval kadaverin v optimálním médiu po 48 hodinách, a to o 57 %. Zároveň tento kmen v polovičním médiu po 24 hodinách, redukoval kadaverin nejméně, a to o 13 % z původní koncentrace.

Nevyšší pokles koncentrace histaminu, byl zaznamenán u kmene *Citrobacter gillanii* B58 v optimálním médiu po 48 hodinách, pokles činil 60 %. Nejmenší schopnost degradovat histamin pak byl zaznamenán u kmene *Yersinia enterocolitica* B43 v polovičním médiu po 24 hodinové kultivaci, a to o 15 %.

Tyramin byl, podobně jako histamin, nejlépe degradován kmenem *Citrobacter gillanii* B58 v optimálním médiu po 48 hodinách a pokles činil 58 %. A stejně tak jako u histaminu, došlo k nejmenší degradaci kmenem *Yersinia enterocolitica* B43 v polovičním médiu po 24 hodinové kultivaci, totéž obdobně platilo i pro tyramin, kdy došlo k poklesu koncentrace o 26 %.

K nejvyššímu úbytku ze všech sledovaných biogenních aminů došlo u histaminu kmenem *Citrobacter gillanii* B58 v optimálním médiu po 48 hodinách, a to na 40 % původní koncentrace. Nejmenší úbytek ze všech sledovaných biogenních aminů byl zaznamenán u kadaverinu také kmenem *Citrobacter gillanii* B58, v polovičním médiu po 24 hodinách, a to na 87 % původní koncentrace.

6 DISKUZE

Nízká množství biogenních aminů zpravidla nezpůsobují vážné riziko pro lidské zdraví, protože aminooxidázy (MAO, DAO) v lidském střevě, mohou detoxikovat tyto aminy. Avšak požití vyšších koncentrací biogenních aminů, může vést k toxikologickým příznakům. V některých případech může být aktivita DAO nedostatečná a může být ovlivněn metabolismus dokonce i nízkých koncentrací biogenních aminů. Ke snížení aktivity může dojít při gastrointestinálních onemocněních či sekundárními účinky léků (antihistamika, antidepresiva) nebo alkoholu. Fenyletylamin s tyraminem zvyšují krevní tlak, naopak histamin jej snižuje. Intoxikace tyraminem může způsobit bolesti hlavy, migrénu, nevolnost, zvracení. Histamin slouží jako primární mediátor okamžitých příznaků při alergických reakcích (Biji et al. 2016, Alvarez et al. 2014, Halász et al., 1994). Z tohoto důvodu se hledají cesty, jak v potravinách snížit obsah biogenních aminů.

Několik studií se zabývá mikroorganismy, které jsou schopny degradovat biogenní aminy pomocí enzymů aminooxidáz, které dokážou tvořit méně toxické produkty. Mikroorganismy mohou oxidovat biogenní aminy na aldehyd, peroxid vodíku a amoniak. Některé kmeny bakterií mléčného kvašení (např. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*) aktinobakterie (*Brevibacterium linens*, *Rhodococcus* spp.), stafylokoky (např. *St. carnosus* nebo *St. xylosus*), jiné koky (*Micrococcus luteus*) nebo houby (*Candida* spp., *Alternaria* spp., *Phoma* spp.) jsou schopny degradovat biogenní aminy. Tyto mikroorganismy mohou tvořit MAO, DAO, histaminoxidázu, putrescinoxidázu, tyraminoxidázu apod. Díky schopnosti degradovat biogenní aminy, lze tyto mikroorganismy přidávat v průběhu zpracování potravin nebo jako starterové kultury při výrobě fermentovaných potravin, a tím snížit nebo úplně eliminovat přítomnost biogenních aminů (Callejón et al., 2014, Lee et al., 2015).

Cílem prvního experimentu bylo ověřit schopnost degradovat biogenní aminy u vybraných bakterií. To bylo ověřeno na základě kultivace v minerálním médiu, které bylo obohaceno biogenními aminy. Právě biogenní aminy v tomto médiu představovaly zdroj dusíku a uhlíku. Všech 10 testovaných kmenů, bylo schopno využívat biogenní aminy jako zdroj živin, což se projevilo růstem testovaných bakterií v minerálním médiu.

Druhá část experimentu se pak zabývala stanovením úbytku vybraných biogenních aminů (fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu) v optimálním médiu Nutrient Broth a neúplném médiu ($\frac{1}{2}$ Nutient Broth). Nejlepší schopnost degradovat všechny zkoumané biogenní aminy vykazoval kmen *Citrobacter gillienii* B58. V optimálním médiu

snižoval koncentraci biogenních aminů nejméně o 36 %, nejvíce pak o 60 %. V polovičním médiu byla tato schopnost o poznání nižší. K nejvyššímu úbytku koncentrace došlo u histaminu, jehož konečná hodnota činila 48 % po 24 hodinách v optimálním médiu. Po 48 hodinách byla tato koncentrace 40 %. Dalším kmenem s dobrou schopností degradace byl *Citrobacter gillenii* B59. Tato schopnost byla nejlepší v optimálním médiu po 24 i 48 hodinách, u putrescinu, kadaverinu a histaminu. Ke snížení koncentrace došlo v průměru o 1/2. Kmen *Enterococcus faecium* B51 byl schopen degradovat putrescin, histamin a tyramin, v optimálním médiu alespoň o 1/2. Putrescin byl také alespoň o 1/2 degradován v optimálním médiu po 48 hodinách těmito kmeny, *Yersenia enterocolitica* B43, *Acinetobacter* sp. B21 a *Enterococcus durans* B68.

Z uvedených výsledků je patrné, že u testovaných kmenů bakterií se nepotvrdil původní předpoklad, že v neúplném (polovičním) médiu bude degradace biogenních aminů vyšší. Předpoklad vycházel z toho, že mikroorganismy v polovičním médiu vyčerpají dříve všechny lépe dostupné živiny, zejména zdroje uhlíku a dusíku a začnou dříve spotřebovávat biogenní aminy. Naopak, výsledky lze vysvětlit tím, že sice v polovičním médiu testované bakterie vyčerpaly dříve lépe dostupné živiny, což však mohlo vést k jejich dřívější lyzi. Buněčný obsah dříve lyzovaných buněk pak byl ještě rostoucími buňkami využit jako živiny (zdroje uhlíku a dusíku).

Leuschner et al. (1998) testovali schopnost degradace histaminu a tyraminu různými kmeny *Brevibacterium linens*, jež se používá jako mazová kultura při výrobě sýrů s mazem na povrchu. Použitím této kultury došlo během zrání ke snížení obsahu histaminu o 55 % a tyraminu o 70 % v sýru.

Bover Cid et al. (2008) prokázali snížení putrescinu, kadaverinu a tyraminu ve španělských salámech použitím starterových kultur (*Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus carnosus* a *Staphylococcus xylophilus*). Při použití této kultury došlo ke snížení koncentrace těchto biogenních aminů až o 90 %.

Zhang et al. (2013) zkoumali schopnost redukovat množství biogenních aminů během fermentace rybí klobásy kmenem *Lactobacillus plantarum*. Ten byl schopen snížit koncentraci putrescinu a kadaverinu o více než 70 %, ale k redukci tyraminu nedošlo.

Dle studie Capozziho et al. (2012) je *Lactobacillus plantarum* schopen degradovat tyramin a putrescin ve víně. Také *Lactobacillus pentosus* je schopen degradovat histamin (Leuschner et al., 1998).

Mah a Hwang (2009) popisují významnou schopnost degradace histaminu u *Bacillus coagulans*. Zaman et al. (2010) popisují schopnost degradovat histamin, putrescin a kadaverin u *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus humi*. Eom et al. (2015) izolovali z fermentovaných sójových výrobků několik druhů *Bacillus*, které byly schopně významně degradovat histamin a tyramin.

Výsledky výše zmíněných studií, podobně jako výsledky uvedené v této bakalářské práci, podporují tvrzení, že schopnost degradace biogenních aminů je vlastnost charakteristická pro jednotlivé kmeny bakterií, která je rovněž patrná z toho, že úroveň degradace jednotlivých aminů se u testovaných kmenů odlišovala.

Nicméně výsledky této práce je třeba i kriticky zhodnotit zejména z toho důvodu, že na schopnost degradace byly testovány zejména bakterie, které jsou považovány za kontaminanty potravin nebo dokonce za potenciálně patogenní (obecně *Yersinia enterocolitica*, některé kmeny *E. coli*). Navíc úbytek těchto toxických látek byl v této práci studován v podmínkách *in vitro*, které se mohou odlišovat od „skutečných“ podmínek, ve kterých se tyto bakterie běžně vyskytují, což platí i o potravinách. V takových podmínkách, odlišných od laboratorních podmínek, se tyto bakterie mohou chovat jinak, například z důvodu jiného zastoupení živin a tím i jejich dostupnosti, optimální teploty nebo pH, vodní aktivity, přítomnosti konkurenční mikroflóry, apod. Proto lze také v přirozených podmínkách očekávat odlišnou schopnost degradace těchto látek. Uvedené výsledky bude proto třeba ověřit v přirozených podmínkách, např. v potravinových maticích.

I přesto mohou výsledky této práce přispět ke studiu schopnosti degradace biogenních aminů testovanými bakteriálními kmeny. Pokud budou tyto výsledky ověřeny, bylo by možné některé z testovaných kmenů využít při snížení obsahu biogenních aminů v potravinách. Z důvodů uvedených výše (možná kontaminující mikroflóra) by bylo možné izolovat degradační enzymy a ty poté přidávat do potravin. Toto však bude třeba nejdříve ověřit v laboratorních podmínkách při výrobě potravin definovaných vlastností a teprve poté lze navázat další fází, a to testováním v potravinářských provozech.

ZÁVĚR

Hlavním tématem této bakalářské práce byly biogenní aminy a následné ověření schopnosti vybraných bakterií, degradovat 5 zvolených biogenních aminů. V praktické části tedy bylo provedeno ověření této schopnosti a následně, byl stanovován úbytek biogenních aminů (fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu), pomocí HPLC v závislosti na čase (24 a 48 hodin) a obsahu živin (optimální médium, poloviční médium).

Na základě dosažených výsledků lze uvést, že:

- kultivací v minerálním médiu s biogenními aminy, byla ověřena schopnost degradace u vybraných 10 kmenů,
- u všech 10 kmenů, bylo vyhodnoceno, že jsou schopny degradovat biogenní aminy,
- v minerálním médiu, jako jediný zdroj uhlíku a dusíku, sloužily právě biogenní aminy,
- u jednotlivých kmenů, byla pozorována odlišná schopnost snižovat koncentraci biogenních aminů v závislosti na upřednostňovaných podmínkách kultivace,
- obecně platilo, že degradační schopnost byla vyšší u optimálního média,
- k největšímu úbytku u všech vybraných biogenních aminů došlo kmenem *Citrobacter gillanii* B58 v optimálním médiu po 48 hodinách. Degradoval 55 % fenyletylaminu, 54 % putrescinu, 57 % kadaverinu, 60 % histaminu a 58 % tyraminu,
- výrazný úbytek putrescinu, kadaverinu a histaminu, a to v průměru o 1/2, byl pozorován u kmene *Citrobacter gillanii* B59 v optimálním médiu již po 24 hodinách.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALVAREZ, M. A. a MORENO-ARRIBAS, V. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science & Technology*. 39, 146-155, 2014. ISSN: 09242244.

ANGIOI, S., GENNARO, M. C., GIANOTTI V., MARENGO, E., ROBOTTI, E. Organic Bases. *Handbook of Food Analysis*. 2. New York, 2004. ISBN 0824750373.

ARCOS, M., OLIVERA, E. R., ARIAS, S., NAHARRO, G., LUENGO, J. M. The 3,4-dihydroxyphenylacetic acid catabolon, a catabolic unit for degradation of biogenic amines tyramine and dopamine in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*. 12(6), 1684-1704, 2010. ISSN: 14622912.

BÄUMLISBERGER, M., MOELLECKEN, U., KÖNIG, H., CLAUS, H. The potential of the yeast *Debaryomyces hansenii* H525 to degrade biogenic amines in food. *Microorganisms*. 3, 839-850, 2015. ISSN: 2076-2607.

BIJI, K. B., RAVISHANKAR, C. N., VENKATESWARLU, R., MOHAN, C. O., SRINIVASA GOPAL, T. K. Biogenic amines in seafood: a review. *Journal Food Science Technology*. 53(5), 2210-2218, 2016. ISSN 0022-1155.

BOVER CID, S., MICHUÉLEZ-ARRIZADO, M. J., BECKER, B., HOLZAPFEL, W. H., VIDAL-CAROU, M. C. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiology*. 25, 269-277, 2008. ISSN 07400020.

BUTOR, I., PIŠTĚKOVÁ, H., PUREVDORJ, K., JANČOVÁ, P., BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L. Biogenic amines degradation by microorganisms isolated from cheese. *Slovak Journal of Food Sciences*. 11(1), 302-308, 2017. ISSN: 1337-0960.

CALLEJÓN, S., SENDRA, R., FERRER, S., PARDO, I. Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98(1), 185-198, 2014. ISSN: 0175-7598.

CAPOZZI, V., RUSSO, P., LADERO, V., FERNÁNDEZ, M., FIOCCO, D., ALVAREZ, M. A., GRIECO, F., SPANO, G. Biogenic amines degradation by *Lactobacillus plantarum*: toward a potential application in wine. *Frontiers in Microbiology*. 3, 2012. ISSN: 1664-302X.

CUEVA, C., GARCÍA-RUIZ, A., GONZÁLEZ-ROMPINELLI, E., BARTOLOME, B., MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J., SALAZAR, O., VICENTE, M. F., BILLS, G. F., MORENO-ARRIBAS, M. V. Degradation of biogenic amines by vineyard ecosystem fungi. Potential use in winemaking. *Journal of Applied Microbiology*. 112, 672-682, 2012. ISSN: 1364-5072.

DAPKEVICIUS, M. L. N., NOUT, M. J. R., ROMBOUTS, F. M., HOUBEN, J. H., WYMWNGA, W. Biogenic amines formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 57, 107-114, 2000.

DASU, V. V., NAKADA, Y., OHNISHI-KAMEYAMA, M., KIMURA, K., ITOH, Y. Characterization and role of *Pseudomonas aeruginosa* spermidine dehydrogenase in polyamine catabolism. *Microbiology*. 152, 2265-2272, 2006. ISSN 1350-0872.

DUELO, R. C. DUELO. R. J. J. Composition comprising diamine oxidase for the prevention of hangover symptoms. 2012.

EOM, J. S., SEO, B. Y., CHOI, H. S. Biogenic amines degradation by *Bacillus* species isolated from traditional fermented soybean food and detection of decarboxylase-related genes. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25(9), 1519-1527, 2015. ISSN: 1017-7825.

GOLIAN, J., ZELENÁKOVÁ, L. *Ochorenia z potravín*. Nitra: SPU, 2014. ISBN: 978-80-552-1235-7.

HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., SIMON-SAKARDI, L., HOLZAPEEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*. 5, 42-49, 1994. ISSN: 09242244.

KAPPELLER-ADLER, R. Histidine metabolism in toxæmia of pregnancy. Isolation of histamine from the urine of patients with toxæmia of pregnancy. *From the Institute of Animal Genetics and the Biochemical Laboratory of the Royal Infirmary, Edinburgh*. (1940).

KOŠMERL, T., ŠUCÚR, S., PROSEN, H. Biogenic amines in red wine: The impact of technological processing of grape wine. *Acta agriculturae Slovenica*. 101(2), 249-261, 2013. ISSN: 1854-1941.

LEE, Y., LIN, CH., LIU, F., HUANG, T., TSAI, Y. Degradation of histamine by *Bacillus polymyxa* isolated from salted fish products. *Journal of Food and Drug Analysis*. 23, 836-844, 2015. ISSN 10219498.

- LEE, Y., KUNG, H., HUANG, CH., HUANG, T., TSAI, Y. Reduction of histamine and biogenic amines during salted fish fermentation by *Bacillus polymyxa* as a starter culture. *Journal of Food and Drug Analysis*. 24, 157-163, 2016. ISSN: 10219498.
- LEUSCHNER, R. G., HEIDEL, M., HAMMES, W. P. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 39, 1-10, 1998.
- LOIZZO, M. R., FRANCESCO, M., PICCI, N., PUOCI, F., SPIZZIRRI, U. G., RESTUCCIA, D. Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese. *Trends in Food Science & Technology*. 30, 38-55, 2013. ISSN: 09242244.
- MAH, J. H., HWANG, H. Inhibition of biogenic amines formation in salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. *Food Control*. 20, 796-801, 2009. ISSN: 09567135.
- MUROOKA, Y., DOI, N., HARADA, T. Distribution of membrane-bound monoamine oxidase in *Bacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*. 38(4), 565-569, 1979.
- NAILA, A., FLINT, S., FLETCHER, G., BREMER, P., MEERDINK, G. Control of biogenic amines in food - Existing and emerging approaches. *Journal of Food Science*. 75(7), 2010, 75(7), ISSN 00221147.
- ÖNAL, A., Current analytical methods for the determination of biogenic amines in food. *Food Chemistry*. 103, 1475-1486, 2007. ISSN: 03088146.
- PAPAGEORGIOU, M., LAMBROPOULOU, D., MORRISON, C., KŁODZIŃSKA, E., NAMIEŚNIK, J., PŁOTKA-WASYLKA, J. Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. *Trends in Analytical Chemistry*. 98, 128-142, 2018. ISSN: 01659926.
- PEREIRA, C., MATOS, D., ROMÃO, M. V. San, CRESPO, M. T. B. Dual role for the tyrosine decarboxylation pathway in *Enterococcus faecium* E17. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(2), 345-352, 2009. ISSN: 00992240.
- PLEVA, P., BUŇKOVÁ, L., LAUKOVÁ, A., LORENCOVÁ, E., KUBÁŇ, V., BUŇKA, F. Decarboxylation activity of enterococci isolated from rabbit meat and staphylococci isolated from trout intestines. *Veterinary Microbiology*. 159, 438-442, 2012. ISSN: 14382377.

RESTUCCIA, D., Accumulation of Biogenic Amines in Food: Hazard Identification and Control Options. *Microbial Food Safety and Preservation Techniques*. 2015. ISBN 978-1-4665-9306.

SANTOS, M. S. Biogenic amines: their importance in Foods. *International Journal of Food Microbiology*. 29, 213-231, 1996. ISSN: 01681605.

SIDDIQUI, J. A., SHOEB, A. M., TAKAYAMA, S., SHIMIZU, E., YORIFUJI, T. Purification and characterization of histamine dehydrogenase from *Nocardioides simplex* IFO 12069. *FEMS Microbiology Letters*. 189, 183-187, 2000.

SUZZI, G., TORRIANI, S. Editorial: Biogenic amines in foods. *Frontiers in Microbiology*. 6, 472, 2015. ISSN: 1664-302x.

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

VISCIANO, P., SCHIRONE, M., TOFALO, R., SUZZI, G. Histamine poisoning and control measures in fish and fishery products. *Frontiers in Microbiology*. 5, 500-502, 2014. ISSN: 1664302X.

VOIGT, M. N. a EITENMILLER R. R. Role of histidine and tyrosine decarboxylases and mono- and diamine oxidases in amine build-up in cheese. *Journal of Food Protection*. 41(3), 182-186, 1978.

ZAMAN, M. Z., BAKAR, F. A., SELEMAT, J., BAKAR, J. Occurrence of biogenic amines and amines degrading bacteria in fish sauce. *Czech Journal of Food Science*. 28(5), 440-449, 2010.

ZAMAN, M. Z., BAKAR, F. A., BAKAR, J. Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation. *International Journal of Food Science*. 145, 84-91, 2011.

ZHANG, Q., LIN, S., NIE, X. Reduction of biogenic amine accumulation in silver carp sausage by an amine-negative *Lactobacillus Plantarum*. *Food Control*. 32(2), 496-500, 2013. ISSN: 0956-7135.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

TYM Tyramin

PUT Putrescin

KAD Kadaverin

HIS Histamin

PHE Fenyletylamin

HPLC Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

MAO Monoaminoxidáza

DAO Diaminoxidáza

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Chemická struktura některých biogenních aminů (Restuccia, 2015).....	13
Obrázek 2: Metabolické cesty tvorby biogenních aminů (Angioi et al., 2004).....	15
Obrázek 3: Oxidace histaminu pomocí DAO za vzniku imidazol acetaldehydu, amoniaku a peroxidu vodíku (Duelo et al., 2012).....	20
Obrázek 4: Degradace biogenních aminů v médiu Nutrient Broth a v ½ médiu Nutrient Broth kmenem <i>Citrobacter gillenii</i> B58	34
Obrázek 5: Degradace biogenních aminů v médiu Nutrient Broth a v ½ médiu Nutrient Broth kmenem <i>Citrobacter gillenii</i> B59	35
Obrázek 6: Degradace biogenních aminů v médiu Nutrient Broth a v ½ médiu Nutrient Broth kmenem <i>Escherichia coli</i> B50	36
Obrázek 7: Degradace biogenních aminů v médiu Nutrient Broth a v ½ médiu Nutrient Broth kmenem <i>Hafnia alvei</i> B97	37
Obrázek 8: Degradace biogenních aminů v médiu Nutrient Broth a v ½ médiu Nutrient Broth kmenem <i>Pantoea agglomerans</i> B87	38
Obrázek 9: Degradace biogenních aminů v médiu Nutrient Broth a v ½ médiu Nutrient Broth kmenem <i>Yersinia enterocolitica</i> B43.....	39
Obrázek 10: Degradace biogenních aminů v médiu Nutrient Broth a v ½ médiu Nutrient Broth kmenem <i>Acinetobacter</i> sp. B21	40
Obrázek 11: Degradace biogenních aminů v médiu Nutrient Broth a v ½ médiu Nutrient Broth kmenem <i>Enterococcus durans</i> B68	41
Obrázek 12: Degradace biogenních aminů v médiu Nutrient Broth a v ½ médiu Nutrient Broth kmenem <i>Enterococcus faecium</i> B51	42
Obrázek 13: Degradace biogenních aminů v médiu Nutrient Broth a v ½ médiu Nutrient Broth kmenem <i>Styphilococcus vitulinus</i> B88.....	43

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1: Významné mikroorganismy produkující biogenní aminy (Velíšek, 1999).....</i>	16
<i>Tabulka 2: Gradientový eluční program pro HPLC</i>	31
<i>Tabulka 3: Ověření schopnosti degradace biogenních</i>	32