

Vliv bakterie *Lacticaseibacillus casei* na redukci biogenních aminů ve vybraných mléčných produktech

Bc. Klára Sigmundová

Diplomová práce

2022



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Klára Sigmundová
Osobní číslo: T20043
Studijní program: N0721A210004 Technologie potravin
Forma studia: Kombinovaná
Téma práce: Vliv bakterie *Lacticaseibacillus casei* na redukci biogenních aminů ve vybraných mléčných produktech

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

1. Biogenní aminy – charakteristika, tvorba, toxicita.
2. Možnosti redukce biogenních aminů v potravinách.
3. Bakterie se schopností degradovat biogenní aminy.

II. Praktická část

1. Kultivace *Lacticaseibacillus casei* ve vybraných potravinách.
 2. Stanovení obsahu biogenních aminů po kultivaci metodou HPLC.
 3. Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce.
-

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Alvarez, M. a Moreno-Arribas, M. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science and Technology*, 39(2), 146-155, 2014
- [2] 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
- [3] Herrero-Fresno, A., Martínez, N., Sánchez-Llana, E., Díaz, M., Fernández, M., Martín, M.C., Ladero, V., Alvarez Miguel, A. *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2): 297-304, 2012
- [4] Linares, D.M., Martín, M.C., Ladero, V., Álvarez, M.A., Fernández, M. Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51: 691 – 703, 2011
- Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Lucie Klementová**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **31. prosince 2021**

Termín odevzdání diplomové práce: **13. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Robert Gál, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 18. února 2022

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou 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);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové 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.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

V diplomové práci byla pozorována schopnost kmene *Lacticaseibacillus casei* (dříve *Lactobacillus casei*) CCDM 198 redukovat množství biogenních aminů v reálné potravíně. Kmen *Lacticaseibacillus casei* byl kultivován v mléce při různém pH a teplotě. Byl sledován vliv daného prostředí na degradaci fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu. Pro zjištění obsahu biogenních aminů byla použita metoda HPLC.

Z naměřených dat bylo zjištěno, že nejlépe byl degradován putrescin v mléce o pH 5,4 při teplotě 11 °C. Koncentrace putrescinu byla při této teplotě snížena o 46 %. Výrazná redukce byla zaznamenána také u putrescinu, kadaverinu a histaminu v mléce o pH 5,4 při teplotě 23 °C. Za těchto podmínek byla pozorována degradace putrescinu o 44 %, histaminu o 39 % a kadaverinu o 37 %. Fenylethylamin a tyramin byl nejvýrazněji redukován při pH 7 a teplotě 30 °C. Během kultivace došlo ke snížení množství fenylethylaminu o 29 % a tyraminu o 23 %.

Klíčová slova: biogenní aminy, *Lacticaseibacillus casei*, degradace, HPLC, mléko

ABSTRACT

The aim of this thesis was to observe the ability of the *Lacticaseibacillus casei* strain (formerly *Lactobacillus casei*) CCDM 198 to reduce the amount of biogenic amines in foods. The *Lacticaseibacillus casei* strain was cultivated in milk at different pH and temperature. This study observed the effect of different pH and temperature on the ability of *Lacticaseibacillus casei* strain to degrade of biogenic amines: phenylethylamine, putrescine, cadaverine, histamine and tyramine in foods. The HPLC method was used for determination of biogenic amines content.

From the measured data, it was found that putrescine showed the best degradation ability in milk at pH 5.4 and temperature 11 °C. The concentration of putrescine was reduced by 46 % at this temperature and pH. A significant decrease was also observed for cadaverin, putrescine and histamine in milk at pH 5.4 at 23 °C. At this pH and temperature, a degradation by 44 % was observed for putrescine, 39 % for histamine and 37 % for cadaverine. Phenylethylamine and tyramine were most significantly reduced in milk at pH 7.0 and temperature 30 °C. During the cultivation the amount of phenylethylamine decreased by 29 % and tyramine by 23 %.

Keywords: biogenic amines, *Lacticaseibacillus casei* strain, degradation, HPLC, milk

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce paní Mgr. Lucii Klementové za odborné vedení, trpělivost, vstřícnost, cenné rady a čas, který mi věnovala při vypracování praktické i teoretické části diplomové práce. Velké díky taky patří ostatním pracovníkům laboratoře, kteří mi vždy byli nápomocni.

Velké poděkování patří také mé rodině, která mě při studiu vždy podporovala.

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

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| ÚVOD..... | 10 |
| I TEORETICKÁ ČÁST | 11 |
| 1 BIOGENNÍ AMINY..... | 12 |
| 1.1 VÝZNAM A FYZIOLOGICKÉ ROLE BIOGENNÍCH AMINŮ | 12 |
| 1.2 KLASIFIKACE BIOGENNÍCH AMINŮ..... | 13 |
| 1.3 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH..... | 14 |
| 1.4 TOXICITA BIOGENNÍCH AMINŮ | 16 |
| 1.5 BAKTERIE PRODUKUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY | 17 |
| 2 MOŽNOSTI REDUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH | 18 |
| 2.1 VYSOKÝ HYDROSTATICKÝ TLAK | 18 |
| 2.2 OZÁŘENÍ | 19 |
| 2.3 BALENÍ POTRAVIN | 19 |
| 2.4 KONZERVAČNÍ A PŘÍDATNÉ LÁTKY | 20 |
| 2.5 STARTÉROVÉ KULTURY | 21 |
| 2.5.1 Bakterie se schopností degradovat biogenní aminy | 21 |
| 3 METODY STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ..... | 24 |
| 3.1 VYSOCE ÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE..... | 24 |
| 3.2 KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA..... | 25 |
| 3.3 PLYNOVÁ CHROMATOGRFIE | 25 |
| 4 CHARAKTERISTIKA A SLOŽENÍ KRAVSKÉHO MLÉKA | 27 |
| 4.1 BÍLKOVINY..... | 27 |
| 4.1.1 Kaseinové bílkoviny..... | 28 |
| 4.1.2 Syrovátkové bílkoviny | 28 |
| 4.1.3 Srážení kaseinových micel..... | 28 |
| 4.2 TUK..... | 29 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.3 | LAKTÓZA | 29 |
| 4.4 | VITAMÍNY | 30 |
| 4.5 | MINERÁLNÍ LÁTKY | 31 |
| 4.6 | ENZYMY | 31 |
| II | PRAKTICKÁ ČÁST..... | 33 |
| 5 | CÍL PRÁCE | 34 |
| 6 | MATERIÁL A METODIKA | 35 |
| 6.1 | POUŽITÉ MIKROORGANISMYSY | 35 |
| 6.2 | SLEDOVANÉ FAKTORY | 35 |
| 6.3 | POUŽITÉ ROZTOKY | 35 |
| 6.3.1 | Koncentrovaný roztok biogenních aminů 4 g/l..... | 35 |
| 6.3.2 | Příprava roztoku mléka s biogenními aminy o koncentraci 0,2 g/l..... | 35 |
| 6.4 | PŘÍPRAVA A ODBĚR VZORKŮ | 36 |
| 6.5 | DERIVATIZACE | 36 |
| 6.6 | CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ | 37 |
| 7 | VÝSLEDKY A VYHODNOCENÍ..... | 38 |
| 7.1 | DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ PŘI TEPLOTĚ 30 °C..... | 38 |
| 7.2 | DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ PŘI TEPLOTĚ 23 °C..... | 42 |
| 7.3 | DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ PŘI TEPLOTĚ 11 °C..... | 47 |
| 8 | DISKUZE | 53 |
| | ZÁVĚR | 56 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 57 |
| | SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK..... | 66 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ | 67 |
| | SEZNAM TABULEK..... | 68 |

ÚVOD

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární organické báze, které vznikají dekarboxylací aminokyselin. Přirozeně se vyskytují v potravinách, rostlinách a zvířatech. Nachází se například v masu, rybách, mléčných výrobcích, zelenině, ovoci, víně a pivu. Mezi biogenní aminy řadíme například tyramin, histamin, tryptamin, kadaverin, spermin, spermidin, putrescin a fenylethylamin (Wójcik et al., 2020; Capozzi et al., 2012).

Biogenní aminy jsou nezbytné pro správné fungování živých organismů. Slouží jako nervové mediátory, prekurzory při syntéze bílkovin, hormonů a alkaloidů. Účastní se také různých metabolických procesů v organismu. Pokud jsou přítomny ve vysoké koncentraci mohou tyto sloučeniny způsobit řadu nežádoucích účinků, jako bolest hlavy, nevolnost, hypotenzi nebo hypertenzi, pocení a dýchací problémy (Callejón et al., 2014; Buňková et al., 2012; Wójcik et al., 2020).

Z důvodů jejich toxických účinků je potřeba kontrolovat a redukovat množství biogenních aminů v potravinách. Důležité je dodržovat hygienické podmínky a technologické postupy. Pro zpomalení produkce biogenních aminů se využívá řada metod. Potravina může být ošetřena ozářením, vysokým hydrostatickým tlakem, balením v ochranné atmosféře nebo přidáním konzervačních látek do potraviny. Mohou být také použity bakterie, které rozkládají biogenní aminy na méně toxické sloučeniny nebo mají nízkou dekarboxylační aktivitu (Naila et al., 2010; Benkerroum, 2016; Doeun et al., 2017).

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

1.1 Význam a fyziologické role biogenních aminů

Biogenní aminy (BA) jsou organické, dusíkaté sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností. Vznikají dekarboxylací aminokyselin nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů. Přirozeně se vyskytují jako meziproducty a producty metabolismu u rostlin, živočichů, ale i u mikroorganismů. Mají řadu fyziologických funkcí. Mohou být zdrojem dusíku, nervovými mediátory a prekurzory pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a bílkovin (Wójcik et al., 2021; Linares et al., 2011). Dále mají vliv na růst buněk a stabilitu membrány. Kromě toho přispívají ke zvýšení odolnosti proti kyselému prostředí a chrání buňku před osmotických a oxidativním stresem (Wójcik et al., 2021; Benkerroum, 2016; Santos, 1996).

Histamin se vyskytuje v organismu hlavně v žírných buňkách (mastocytech) a bazofilech. Uplatňuje se při zánětlivých a alergických reakcích. Podílí se na regulaci krevního tlaku, zvyšuje sekreci hlenu a žaludeční šťávy. Histamin způsobuje kontrakce hladké svaloviny, a také má uplatnění jako neurotransmitter (Peters et al., 2009). Tyramin má antioxidační účinek, zvyšuje hladinu glukózy v krvi, krevní tlak a tepovou frekvenci (Santos, 1996; Alvarez et al., 2014). Tryptamin a 2-fenylethylamin zvyšují krevní tlak. Putrescin a kadaverin byly identifikovány jako potenciátory, které zvyšují toxicitu histaminu (Halász et al., 1994). Polyaminy putrescin, spermin a spermidin se nacházejí ve všech živých buňkách. Mají důležitou roli téměř v každém kroku syntézy nukleových kyselin a proteinů. Jsou nezbytné při růstu a dělení buněk (Bardócz, 1995). Inhibují oxidaci polynenasycených mastných kyselin, tento antioxidační účinek koreluje s počtem aminů obsažených v těchto polyaminech (Santos, 1996).

1.2 Klasifikace biogenních aminů

Biogenní aminy můžeme dělit na základě jejich chemické struktury nebo také podle počtu aminových skupin.

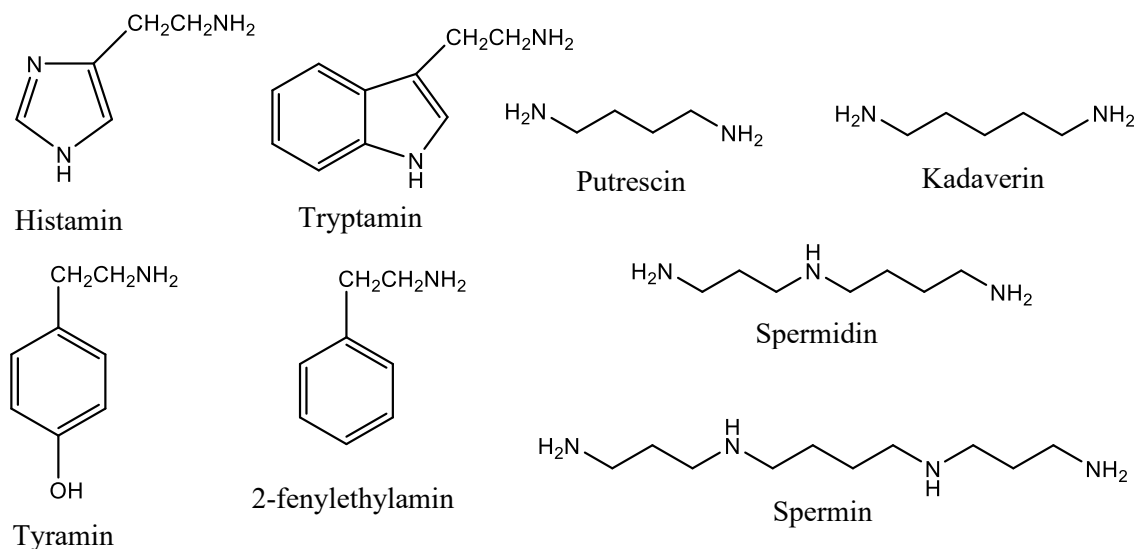
Podle jejich chemické struktury se dělí na:

- alifatické (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin)
- aromatické (tyramin, 2-fenylethylamin)
- heterocyklické (histamin, tryptamin)

Podle počtu aminoskupin se rozdělují na:

- monoaminy (tyramin, 2-fenylethylamin)
- diaminy (kadaverin)
- polyaminy (putrescin, spermin, spermidin) (Linares et al., 2011)

Strukturní vzorce jednotlivých biogenních aminů jsou znázorněné na Obr. 1.



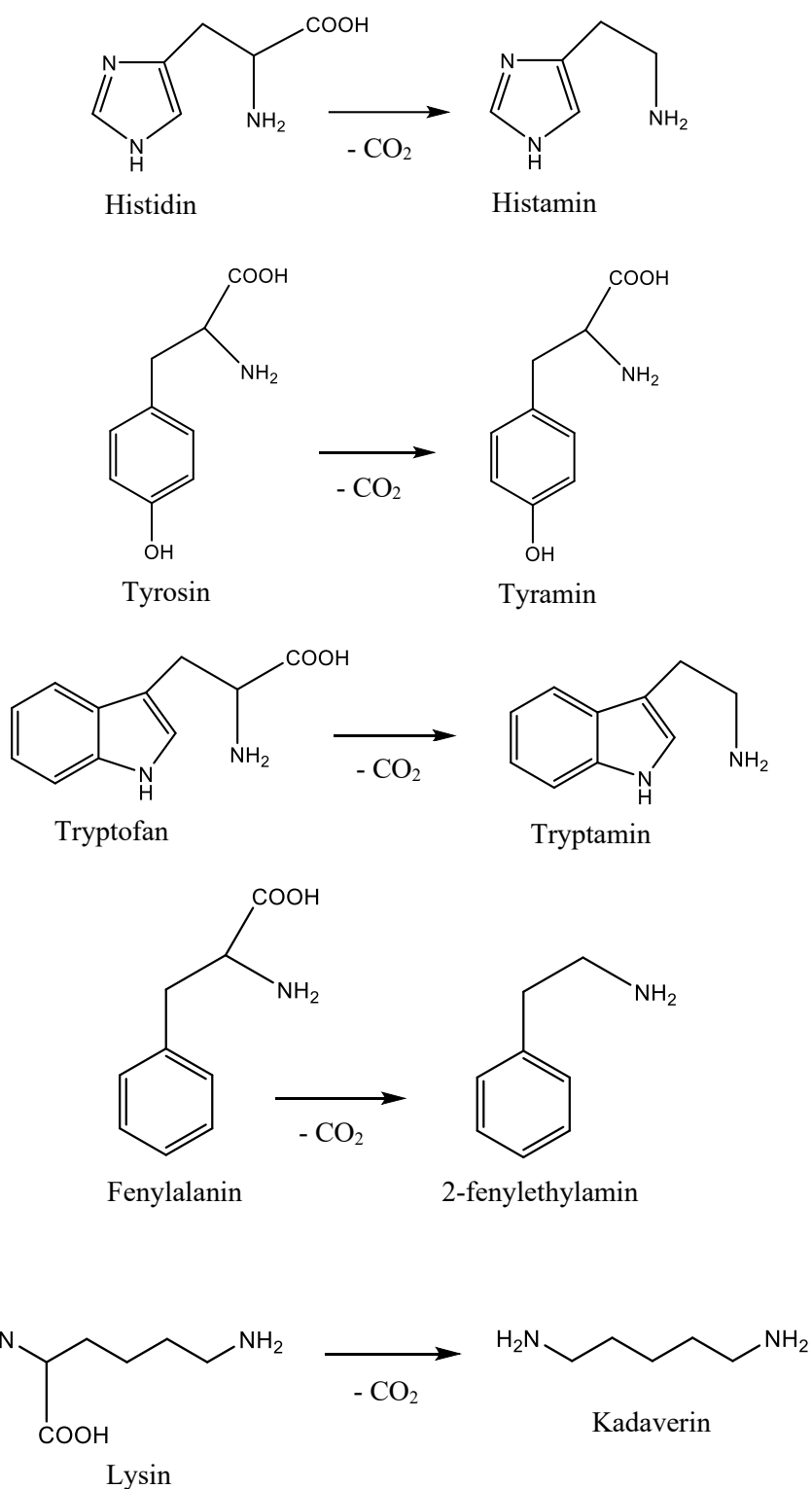
Obr. 1 Strukturní vzorce biogenních aminů (Chong et al., 2011)

1.3 Vznik biogenních aminů v potravinách

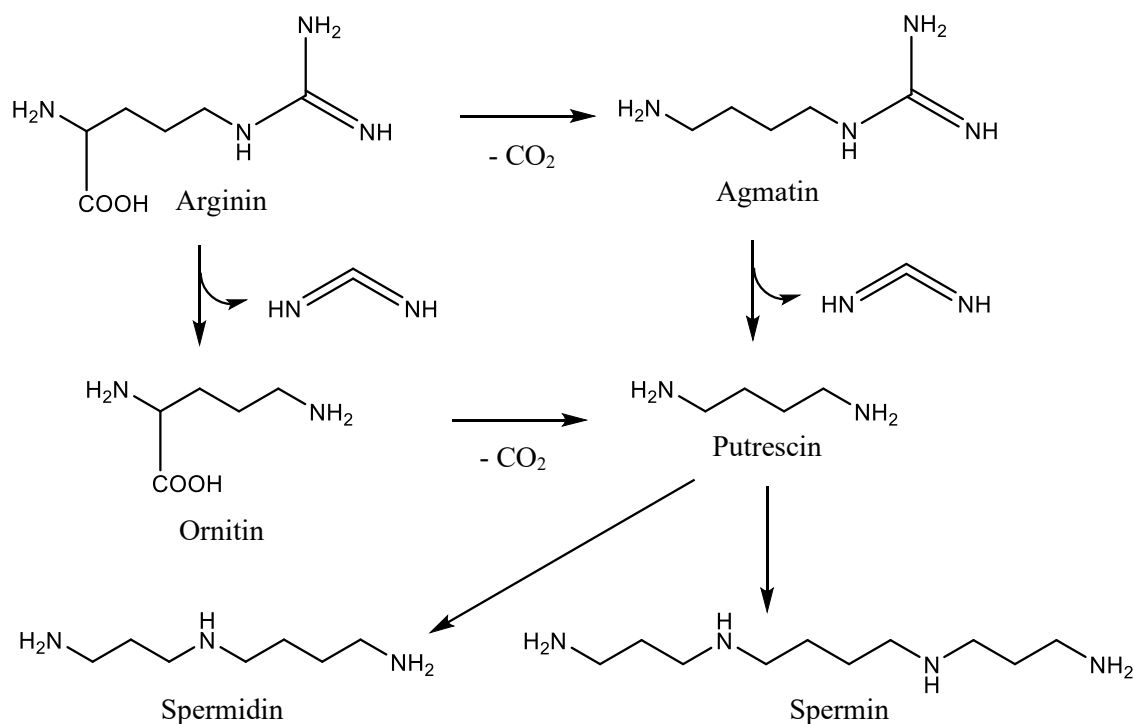
Základním předpokladem pro vznik aminů v potravinách je dostupnost volných aminokyselin, přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou a vhodné podmínky, které umožňují růst mikroorganismů a činnost dekarboxylázy. Tvorbu biogenních aminů ovlivňuje teplota, aktivita vody, pH, startovací kultury a také doba skladování (Santos, 1996; Halász et al., 1994; Burdychová, 2009).

Biogenní aminy se nacházejí zejména v masu, rybách, ovoci, pivu, vínu, sýru a také ve fermentovaných mléčných a masných výrobcích. Nejčastějšími aminy v potravinách jsou histamin, tyramin, tryptamin, putrescin, kadaverin, spermin a spermidin (Wójcik et al., 2021; Alvarez et al., 2014; Halász et al., 1994).

Syntéza biogenních aminů probíhá v cytoplasmě mikroorganismu a vzniklé produkty jsou následně vylučovány mimo buňku pomocí aktivního transportu do potravin (Benkerroum, 2016; Buňková et al., 2012). Histamin vzniká dekarboxylací histidinu, tyramin dekarboxylací tyrosinu. Tryptamin lze získat po odštěpení karboxylové skupiny z tryptofanu. Dekarboxylací lyzinu vzniká kadaverin. Produktem dekarboxylace aminokyseliny fenylalanin je 2-fenylethylamin (Santos, 1996). Putrescin může být syntetizován z více prekurzorů. Vzniká dekarboxylací argininu na agmatin a dále na putrescin. Další možností syntézy putrescinu je dekarboxylace přímo z ornitinu (Wunderlichová et al., 2014). Polyaminy spermin a spermidin vznikají z putrescinu (Benkerroum, 2016). Syntéza biogenních aminů v potravinách je znázorněna na Obr. 2 a Obr. 3.



Obr. 2 Syntéza biogenních aminů histaminu, tyraminu, tryptaminu, 2-fenylethylaminu a kadaverinu (Kohajdová et al., 2008)



Obr. 3 Syntéza putrescinu, sperminu a spermidinu (Kohajdová et al., 2008)

1.4 Toxicita biogenních aminů

Za normálních podmínek jsou biogenní aminy z potravy nejčastěji metabolizovány v lidském těle ve střevech enzymy monoaminoxidázami (MAO, EC 1.4.3.4) a diaminoxidázami (DAO, EC 1.4.3.6) (Karovičová et al., 2005). Histamin lze také odbourat methylací nebo acetylací. Pokud jsou tyto enzymy nefunkční, dochází k nedostatečnému odbourávání biogenních aminů. To má za následek hromadění biogenních aminů v těle a vznik nežádoucích účinků na organismus. Mezi inhibitory MAO a DAO patří antidepressiva, analgetika, a alkohol. Při nadměrné konzumaci potravy s vysokým obsahem biogenních aminů může dojít také k nedostatečné redukci aminů. Míra detoxikace je velice individuální u každého jedince (Alvarez et al., 2014; Capozzi et al., 2012; Tittarelli et al., 2019).

Nejčastější intoxikace je způsobena histaminem a tyraminem. Otrava histaminem je často spojována s konzumací ryb, jako je makrela, tuňák a sardinky. Nejčastějšími příznaky otravy jsou vyrážka, zrudnutí, bolest hlavy a průjem. Mezi méně časté příznaky patří křeče v břiše, rozmazané vidění, závratě, nevolnost, pocení a tachykardie (Traylor et al., 2020). Maximální povolená hladina histaminu v čerstvých rybách podle Nařízení Komise (ES) 1441/2007 je

100 mg/kg, ve fermentovaných produktech 400 mg/kg (Wójcik et al., 2021). Problémem je, že pokud dojde k vytvoření histaminu v potravině, nelze jej odstranit varem ani dlouhodobým působením tepla (Naila et al., 2010). Sýry patří mezi produkty bohaté na tyramin, a proto je intoxikace tyraminem označována jako „sýrová reakce“. Mezi její projevy patří bolest hlavy, migréna, neurologické poruchy, nevolnost, zvracení, respirační poruchy a hypertenze (Del Rio et al., 2017). Abnormálně vysoká hladina tyraminu v mozku může vyvolávat deprese, schizofrenii a Parkinsonovu chorobu (Alvarez et al., 2014). U tryptaminu a 2-fenylethylaminu bylo prokázáno, že zvyšují krevní tlak a způsobují migrénu. Putrescin, kadaverin, spermin a spermidin mohou reagovat s dusitany za vzniku karcinogenních nitrosaminů (Bardócz, 1995; Ten Brink et al., 1990).

1.5 Bakterie produkující biogenní aminy

Řada gramnegativních, grampozitivních bakterií a kvasinek je schopna dekarboxylace jedné nebo více aminokyselin. Mezi tyto bakterie se řadí rody *Bacillus*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Photobacterium* a bakterie mléčného kvašení, např. *Lactobacillus* (a nové rody odvozené od rodu *Lactobacillus*), *Pediococcus* a *Streptococcus* (Santos, 1996; Karovičová et al., 2005). Mezi kvasinky produkující biogenní aminy patří např. *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia jadinii* nebo *Geotrichum candidum* (Alvarez et al., 2014).

Produkcí biogenních aminů ve fermentovaných nápojích a potravinách ovlivňuje zavedení startérové kultury. Součástí startérové kultury jsou bakterie mléčného kvašení (Santos, 1996; Alvarez et al., 2014). Bakterie jako *Morganella morganii* a určité kmeny *Klebsiella pneumoniae* jsou odpovědné za tvorbu histaminu v rybích nefermentovaných produktech, zatímco ve fermentovaných produktech produkují histamin bakterie mléčného kvašení (De las Rivas et al., 2005). U *Escheria coli* a *Pseudomonas* byla zjištěna aktivita histidindekarboxylázy a tyrosindekarboxylázy. Z masa a masných výrobků byly izolovány bakterie mléčného kvašení *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus brevis* zodpovědné za tvorbu biogenních aminů. Bakterie, které jsou součástí probiotických kultur, mohou být také producenti biogenních aminů. Mezi ně patří například rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. V pivě mohou přítomné kvasinky tvořit kadaverin, putrescin nebo také spermin (Santos, 1996; Lorencová et al., 2012).

2 MOŽNOSTI REDUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH

Odstranění vzniklých biogenních aminů v potravinách je velmi obtížné, neboť se jedná o vysoce termostabilní sloučeniny. Další problém nastává u fermentovaných potravin, kdy může dojít k tvorbě biogenních aminů již při jejich zpracování. Z tohoto důvodu byly navrženy různé strategie, které mohou redukovat jejich vznik. V první řadě je třeba zajistit správné hygienické podmínky při výrobě a skladování potravin. Důležité také je zamezit růstu bakterií produkujících biogenní aminy a snížit proteolytickou aktivitu, aby se omezila dostupnost prekurzorů pro jejich tvorbu. Tradičním způsobem omezení růstu bakterií je metoda chlazení během skladování. Teplota totiž významně ovlivňuje růst bakterií, optimální teplota růstu je 20–37 °C. Při nízkých teplotách dochází k inhibici růstu mikroorganismů a ke snížení jejich dekarboxylázové aktivity. Tvorbu biogenních aminů v potravinách lze tedy kontrolovat přísným dodržováním chladicího řetězce. Bohužel chlazení není vždy účinné vzhledem k tomu, že některé bakterie jsou schopny růst i při teplotách nižších než 5 °C. Efektivnější metoda je tedy zmrazení. Možné je také použití vysokoteplotního ošetření, pasterizace mléka při výrobě mléčných produktů, uzení masných výrobků, ozařování, balení v modifikované atmosféře, použití potravinářských přídatných látek nebo startovacích kultur (Naila et al., 2010; Benkerroum, 2016; Doeun et al., 2017).

2.1 Vysoký hydrostatický tlak

Metoda zahrnující aplikaci vysokého hydrostatického tlaku (HHP) je jedna z rozvíjejících se technologií, která je intenzivně zkoumána v posledních letech. Jedná se o konzervační metodu, během které dochází k inaktivaci mikroorganismů narušením membrán, denaturací enzymů a změnou buněčné morfolgie. Prodlužuje tak životnost potravin a neovlivňuje její vlastnosti a ani chuť. Rozsah deaktivace závisí na několika parametrech, jako je druh mikroorganismu, teplota procesu, čas, pH a aktivita vody. Gramnegativní bakterie jsou citlivější na tlak než grampozitivní bakterie. Velké rozdíly v tlakové odolnosti byly hlášeny také mezi různými kmeny stejného druhu (Naila et al., 2010; Ruiz-Capillas et al., 2007; Chong et al., 2011).

Účinnost redukce biogenních aminů závisí na intenzitě aplikovaného tlaku. Například během zrání sýra při použití nízkého tlaku 50 MPa po dobu 72 hodin byl zjištěn mírný nárůst obsahu biogenních aminů, při aplikaci vysokého tlaku 400 MPa po dobu 5 minut obsah

biogenních aminů mírně klesl (Novella-Rodriguez et al., 2002). Při ošetření fermentované klobásy vysokým tlakem 350 MPa po dobu 15 min došlo k poklesu počtu bakterií mléčného kvašení o 20,1 %, pokles kadaverinu činil 12,5 %, putrescinu 8,7 % a tyraminu 17 % během 160 dní skladování v chladu ve srovnání s klobásou neošetřenou HHP (Ruiz-Capillas et al., 2007). Dalším příkladem je použití vysokého tlaku 200 MPa po dobu 10 minut při 17 °C, který inhibuje růst enterobakterií a snižuje obsah kadaverinu a putrescinu v mase pro výrobu fermentovaných uzenin (Latorre-Moratalla et al., 2007).

2.2 Ozáření

Ozáření je další technologie určená k prodloužení trvanlivosti a zajištění bezpečnosti potravin, např. u masných výrobků, ryb, plodů moře, fermentované sójové pasty a čerstvé zeleniny. Potraviny jsou nejčastěji vystavovány gama záření, které způsobuje inhibici růstu bakterií poškozením nukleových kyselin. Gama záření je považováno za bezpečné a šetrné k životnímu prostředí při záření 10 kGy. Při použití vyšších dávek však musí dojít k důkladnému posouzení účinnosti, neboť může docházet ke změnám sensorických vlastností (Naila et al., 2010; Chong et al., 2011; Nei et al., 2012; Rabie et al., 2011).

U makrelky ozařování 1 až 3 kGy zpomalilo produkci histaminu, tyraminu, kadaverinu a putrescinu (Mendes et al., 2000). Dalším příkladem je ozařování párků s dávkováním 2, 4 a 6 kGy, které snížilo koncentraci biogenních aminů o 40 %, 47 % a 68 % během jejich skladování (Rabie et al., 2010). Existují však příklady, u kterých dochází naopak ke zvýšení obsahu některých biogenních aminů. Například v kuřecím mase byla při ozáření 2 kGy snížena hladina některých biogenních aminů, zatímco obsah histaminu, spermidinu a sperminu vzrostl (Min et al., 2007).

2.3 Balení potravin

Oblíbenou konzervační metodou je balení v upravené atmosféře zahrnující změnu složení balícího plynu a použití speciálních obalů. Využívají se směsi plynů kyslíku, dusíku a oxidu uhličitého, které mají bakteriostatické a fungicidní účinky. Dochází tak k inhibici mikrobiálního růstu a prodlužuje se doba skladování potravin. Existuje řada studií, které prokázaly úspěšné zpomalení produkce obsahu biogenních aminů. Patří mezi ně balení v modifikované atmosféře, vakuové balení a aktivní balení za použití aktivních obalů s pohlcovači plynu, např. kyslíku nebo oxidu uhličitého. Tyto obaly tak zabraňují kontaktu plynu s potravinou. Nejúčinnější je však balení v modifikované atmosféře (Naila et al., 2010;

Chong et al. 2011). To dokázal Emborg et al. (2005) ve studii, která se zabývala produkcí histaminu v tuňáku skladovaného ve vakuovém obalu a v obalu s modifikovanou atmosférou. Při použití atmosféry se směsí plynu o složení 40 % oxidu uhličitého a 60 % kyslíku došlo k inhibici tvorby histaminu, zatímco při použití vakuového balení byla hladina histaminu vyšší. Özogul a Özogul (2006) ve své studii prokázali účinek na redukcii obsahu histaminu v sardinkách a sledí s využitím směsí plynu o složení 60 % oxidu uhličitého a 40 % dusíku. Bylo však dokázáno, že účinek na zastavení produkce biogenních aminů závisí na typu mikroflóry a na podmínkách prostředí jako je teplota a složení směsi plynů použité v případě balení v modifikované atmosféře (Loizzo et al., 2013).

2.4 Konzervační a přídatné látky

Bylo prokázáno, že používání aditiv a konzervačních látek v potravinách může snížit obsah biogenních aminů, a to díky inhibici růstu některých mikroorganismů zodpovědných za jejich tvorbu (Naila et al., 2011; Doeun et al., 2017).

Kyselina jantarová, jablečná, citrónová a D-sorbitol působí na dekarboxylázovou aktivitu a zabraňují tak tvorbě histaminu v makrele (Shalaby, 1996). Kyselina citrónová již při koncentraci 1 % může snížit produkci biogenních aminů v nakládaném zelí během kvašení (Yuecel et al., 2008). V uzeninách snižuje obsah biogenních aminů sorbát draselný a kyselina askorbová (Bozkurt et al., 2004). Dusitan a dusičnan sodný se běžně používá ve fermentovaných uzeninách k ovlivnění chuti a barvy, při vyšších koncentracích však mohou také inhibovat tvorbu biogenních aminů (Gardini et al., 2016). Pro redukcii obsahu biogenních aminů ve fermentovaných rybích produktech se nejčastěji používá glycin (Mah et al., 2009a). Cukr je také schopný omezit aminotvornou aktivitu u mikroorganismů (Bover-Cid et al., 2001). Použití soli v potravinách většinou omezuje růst bakterií a dekarboxylázovou aktivitu. Produkce histaminu a tyraminu může být snížena při koncentraci chloridu sodíku 3,5–5,5 %, zatímco při nižších koncentracích soli je inhibice neúčinná (Chong et al., 2011).

Některé antimikrobiální látky se přirozeně vyskytují v koření. Mezi tyto látky patří kurkumin (kurkuma), kapsaicin (červená paprika) a piperin (černý pepř). Nevýhodou je, že ztrácí svou účinnost během vaření. Antioxidační a antimikrobiální účinky má také thymol, který je hlavní složkou tymiánu a oregana (Naila et al., 2010). Bylo prokázáno, že zázvor, česnek, zelená cibule, červená paprika, hřebíček a skořice zpomalují produkci biogenních aminů

v Myeolchi-jeot, což je korejský solený a kvašený výrobek z ančoviček. Při přidání 5 % česneku během zrání Myeolchi-jeot došlo ke snížení hladiny biogenních aminů o 8,7 % (Mah et al., 2009b).

Mnoho studií prokázaly inhibiční účinky potravinářských aditiv a konzervačních látek na akumulaci biogenních aminů, v některých případech však mohou jejich tvorbu naopak podporovat. Proto je důležité, aby byly látky s pozitivním účinkem na redukci obsahu biogenních aminů důkladně prozkoumány v různých potravinářských systémech, protože mohou také způsobovat zpožděnou produkci biogenních aminů (Naila et al., 2010; Mah et al., 2009a; Mah et al., 2009b; Yuceel et al., 2008).

2.5 Startérové kultury

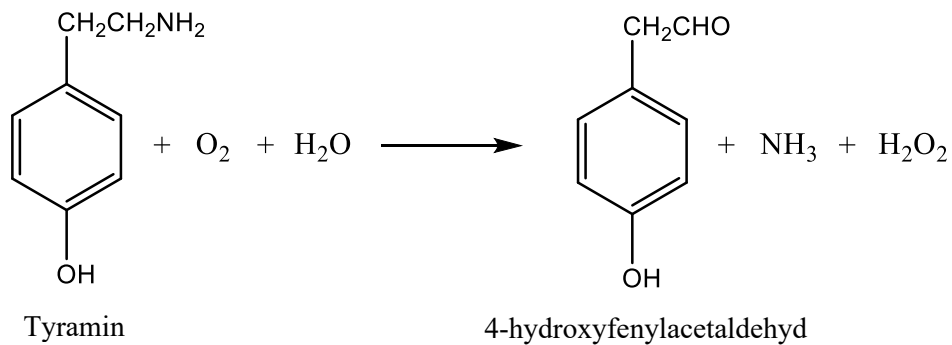
Do fermentovaných potravin se přidává startérová kultura k urychlení procesu kvašení, k získání žádoucích vlastností, textury a ke zlepšení skladovatelnosti. Startérové kultury mohou také ovlivňovat tvorbu biogenních aminů. Nejčastěji bývají používány kultury různých kmenů bakterií mléčného kvašení, stafylokoků a mikrokoků (Chong et al., 2011).

Akumulace biogenních aminů během fermentace může být ovlivňována dvěma způsoby. První varianta využívá kmeny, které oxidují biogenní aminy například na aldehydy. Další přístup spočívá v nízké dekarboxylační aktivitě mikroorganismů. Nedochozí tak k dekarboxylaci aminokyselin na biogenní aminy. Tyto bakterie však potřebují optimální podmínky pro svůj růst, aby dominovaly nad bakteriemi, které produkují biogenní aminy (Naila et al., 2010; Chong et al., 2011).

2.5.1 Bakterie se schopností degradovat biogenní aminy

Biogenní aminy v potravinách mohou být degradovány enzymem **aminooxidázou** (EC 1.4.3.-) přirozeně se vyskytující u některých bakterií, které jsou součástí startérových kultur nejčastěji používaných při výrobě fermentovaných potravin. Tento enzym oxiduje biogenní aminy na aldehydy, peroxid vodíku a amoniak (Capozzi et al., 2012; Naila et al., 2010; Alvarez et al., 2014). Mechanismus odbourání tyraminu je znázorněn na Obr. 4. Schopnost degradace biogenních aminů byla zjištěna u řady bakteriálních rodů, mezi ně patří např. *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Pediococcus*, *Rhodococcus* a *Arthrobacter* (Leuschner et al., 1998; Herrero-Fresno et al., 2012; Callejón et al., 2014; Alvarez et al., 2014). Pro aktivitu aminooxidázy je důležitá přítomnost kyslíku.

Negativní vliv na odbourávání biogenních aminů má působení glukózy, chloridu sodného, nízké teploty a pH (Leuschner et al., 1998).



Obr. 4 Degradace tyraminu enzymem aminooxidázou (upraveno podle Cooper, 1997)

Leuschner et al. (1998) prokázali schopnost některých bakterií izolovaných z potravin degradovat biogenní aminy *in vitro*. Dokázali, že *Brevibacterium linens* je schopný snížit hladinu histaminu o 70 % a tyraminu o 55 % během povrchového zrání sýra. Ve své práci také studovali *Micrococcus varians* za účelem odstranění tyraminu a histaminu během zrání uzenin. Dapkevicius et al. (2000) zkoumali schopnost kmenů bakterií mléčného kvašení izolovaných z fermentované rybí pasty degradovat histamin. Aktivita aminooxidázy byla prokázána u kmenů *Lactobacillus sakei* (dříve *Lactobacillus sakei*) a *Lactobacillus curvatus* (dříve *Lactobacillus curvatus*). Množství histaminu bylo sníženo o 40–60 %. Martuscelli et al. (2000) zjistili, že 21 z 26 kmenů *Staphylococcus xylosus* snížily hladinu histaminu a tyraminu ve fosfátovém pufru. Bakterie *Staphylococcus xylosus* byla schopná také redukovat množství biogenních aminů v Myelchi-jeot (solená a fermentovaná ančovička). *Staphylococcus xylosus* degradoval histamin o 38 % a tyramin o 4 %. Celková hladina biogenního aminu byla snížena o 16 % (Mah et al., 2009c). García-Ruiz et al. (2011) a Capozzi et al. (2012) zjistili, že některé bakterie mléčného kvašení z vína patřící do rodu *Lactobacillus* a *Pediococcus* byly schopny degradovat histamin, tyramin a putrescin v kultivačních médiích. Tři kmeny *Bacillus subtilis*, které byly kultivovány v Luria-Bertani bujónu, snížili koncentraci histaminu a tyraminu. Degradace histaminu se pohybovala v rozmezí 19–48 %, degradace tyraminu v rozmezí 26–33 % (Eom et al., 2015). Z čínského rýžového vína byl izolován kmen *Lactiplantibacillus plantarum* (dříve *Lactobacillus plantarum*), který redukoval množství tyraminu, histaminu, tryptaminu, kadaverinu,

3 METODY STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ

Ke stanovení biogenních aminů lze využít řadu analytických metod, jako například tenkovrstvou chromatografií (TLC), plynovou chromatografií (GC), iontově-výměnnou chromatografií (IEC), kapilární zónovou elektroforézu (CZE) a zejména pak vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Tenkovrstvá chromatografie slouží díky své jednoduchosti a nenáročnosti pouze pro rychlé orientační stanovení biogenních aminů (Křížek a Hlavatá, 1995; Ordóñez et al., 2016; Önal, 2007).

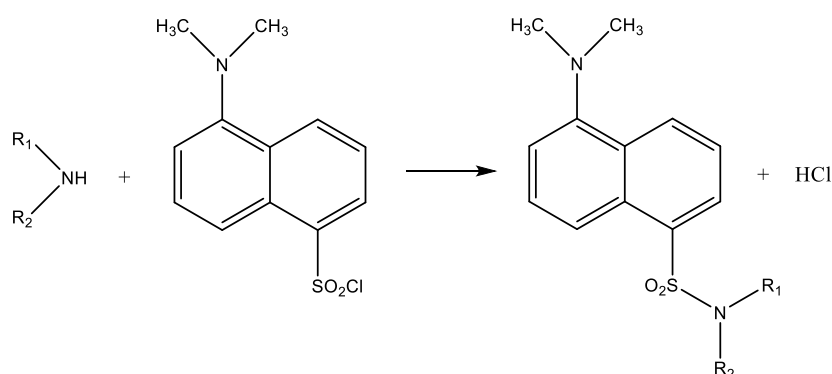
Další možností, jak stanovit biogenní aminy, je metoda ELISA, která se používá ke kvantitativnímu stanovení různých antigenů. Vyznačuje se vysokou přesností a citlivostí, ale je časově náročnější a dražší, proto se jedná o méně často využívanou metodu (Ordóñez et al., 2016; Kodíček, 2007).

Pro stanovení přítomnosti mikroorganismů produkujících biogenní aminy lze využít metodu polymerázové řetězové reakce (PCR). Tato molekulárně biologická metoda je schopna detekovat enzym dekarboxylázu, která je odpovědná za jejich tvorbu. Pomocí PCR nemůžeme určit kvantitativní množství biogenních aminů, ale lze při včasné detekci zabránit jejich tvorbě a hromadění v potravinách (Smit et al., 2008).

3.1 Vysoce účinná kapalinová chromatografie

Nejpoužívanější metodou pro stanovení biogenních aminů je HPLC. Před samotným stanovením se vzorek nejprve homogenizuje, poté následuje extrakce kyselinou chloristou nebo trichloroctovou. Po centrifugaci je požadovaný objem vzorku zalkalizován. Biogenní aminy tak mohou reagovat s derivatizačním činidlem. Deriváty jsou poté extrahovány do vhodného organického rozpouštědla a stanovovány na HPLC (Křížek a Hlavatá, 1995). Biogenní aminy nelze přímo detekovat v UV/VIS oblasti a ani fluorimetricky, neboť mají nedostatek chromoforů v molekule, a proto je před detekcí nutná derivatizace (Mantoanelli et al., 2020; Ordóñez et al., 2016). Derivatizace může být předkolonová nebo postkolonová. Při předkolonové derivatizaci dochází k derivatizační reakci před nadávkováním vzorků do přístroje, zatímco u postkolonové je reaktor umístěn mezi kolonu a detektor. Jako derivatizační činidlo při předkolonové derivatizaci se nejčastěji používá dansylchlorid nebo benzoylchlorid. Dansylchlorid reaguje s primární i sekundární aminoskupinou, dokonce i s terciární za vybraných experimentálních podmínek (Obr. 6). Vzniklé deriváty jsou vysoce stabilní a dobře detekovatelné UV/VIS a také fluorescenčním detektorem.

Postkolonová derivatice se provádí nejčastěji s o-ftaldialdehydem, který se používá kvůli své nestabilitě společně s N-acylcysteinem nebo s merkptoethanolem. O-ftaldialdehyd reaguje oproti dansylchloridu pouze s primární aminoskupinou (Hernández-Borges et al., 2007; Ordóñez et al. 2016; Önal, 2007).



Obr. 6 Vznik dansyl-derivátu (upraveno podle Komárek et al., 1989)

3.2 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónovou elektroforézu řadíme mezi elektromigrační separační metody. Princip spočívá v separaci molekul na základě rozdílné elektroforetické rychlosti nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli (Kašička, 1997). Tato metoda vyniká především velkou účinností separace, malou spotřebou činidel a vysokou rychlostí analýzy, což umožňuje analyzovat velké množství vzorků za krátkou dobu. Před vlastní analýzou je stejně jako u chromatografických metod nutná derivatizace. Nejčastěji se používá předkolonová derivatizace dansylchloridem (Papageorgiou et al., 2018a; Ordóñez et al., 2016). Při kapilární zónové elektroforéze se biogenní aminy detekují konduktometricky, amperometricky nebo také elektrochemiluminiscencí. Dále se používá laserová fluorescenční detekce, nepřímá UV detekce nebo se stanovují pomocí hmotnostního spektrometru (Li et al., 2014; Chiu et al., 2006).

3.3 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie není pro stanovení biogenních aminů tak běžně používána jako kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza. Před analýzou je nutné provést

derivatizaci, aby došlo k zvýšení těkavosti a ke snížení polariry biogenních aminů. Jako derivatizační činidla se používají izobutylchlormravenčan a o-heptafluorbutyryl. Plynová chromatografie se nejčastěji používá ve spojení s hmotnostní spektrometrem (Papageorgiou et al., 2018b; Smit et al., 2008).

4 CHARAKTERISTIKA A SLOŽENÍ KRAVSKÉHO MLÉKA

Mléko je bílý tekutý sekret samic savců, jehož úlohou je zabezpečit výživu novorozeného mláděte. V této diplomové práci bylo mléko použito jako médium pro kultivaci bakterie *Lactocaseibacillus casei*. Mléko je používáno jako výchozí surovina při výrobě fermentovaných mléčných výrobků, jako jsou sýry a kysané mléčné výrobky, ve kterých se mohou vyskytovat ve vyšším množství biogenní aminy. V samotném mléce je však obsah biogenních aminů minimální (Buňka et al., 2013; Linares et al., 2011).

Některé složky mléka jsou syntetizovány v buňkách mléčné žlázy a další pocházejí přímo z krve samice. Složení a vlastnosti kravského mléka ovlivňuje řada faktorů. Mezi ně patří například plemeno skotu, aktuální zdravotní stav dojnice, fáze laktace, způsob chovu, výživa a frekvence dojení. Kravské mléko obsahuje průměrně (v % hmotnostních) 86–88 % vody a 12–14 % sušiny. Dále obsahuje dusíkaté látky, tuk, laktózu, vitamíny, minerální látky a enzymy (Buňka et al., 2013; Šnirc et al., 2015). Jejich průměrné zastoupení v sušině je uvedeno v Tab. 1.

Tab. 1 Průměrné složení sušiny kravského mléka (upraveno podle Buňka et al., 2013)

| Složky mléka | Množství [hmotnostní %] |
|-----------------|-------------------------|
| Dusíkaté látky | 3,1–3,8 |
| Tuk | 3,5–5,5 |
| Laktóza | 4,5–5,0 |
| Minerální látky | 0,7 |

4.1 Bílkoviny

Bílkoviny jsou jednou z nejdůležitějších složek mléka, které určují jeho fyzikálně-chemické vlastnosti. Až 98 % přijatých mléčných bílkovin se využívá na výstavbu organismu a zabezpečení jeho fyziologických funkcí. Mají vysokou nutriční hodnotu, dobrou stravitelnost a vysoký obsah esenciálních aminokyselin (Šnirc et al., 2015). Čisté bílkoviny tvoří 90–95 % z celkového obsahu dusíkatých látek. Zbývající část připadá ostatním dusíkatým látkám, ke kterým řadíme například amoniak, kreatin, lipoproteiny, kyselinu močovou, močovinu a enzymy.

Mléčné bílkoviny dělíme na kaseinové a syrovátkové (sérové) proteiny. Tyto bílkoviny mají odlišné vlastnosti. Kaseinové bílkoviny se při pH 4,6 a teplotě 30 °C sráží, zatímco

syrovátkové bílkoviny nikoli. Zůstávají v roztoku a následně přechází do syrovátky. U kravského mléka je poměr kaseinových a syrovátkových bílkovin přibližně 4:1 (Buňka et al., 2013; Guetouache et al., 2014).

4.1.1 Kaseinové bílkoviny

Kaseinové bílkoviny tvoří cca 80 % čistých bílkovin v mléce. Kaseiny jsou fosforylované, tudíž se z chemického hlediska jedná o fosfoproteiny. Mléko obsahuje čtyři typy kaseinů: α_{s1} -kasein, α_{s2} -kasein, β -kasein a κ -kasein. Jednotlivé frakce kaseinu se agregují a tvoří tak komplexy, které nazýváme micelami (Singh et al., 2014; Šnirc et al., 2015). Frakce α_{s1} -kasein, α_{s2} -kasein a β -kasein se s vápenatými ionty sráží. κ -kasein netvoří s vápenatými ionty sraženinu, stabilizuje a chrání kaseinové micely před vysrážením v přítomnosti vápníku. κ -kasein se od ostatních frakcí liší svou strukturou, jedná se totiž o glykoprotein (Buňka et al., 2013; Gajdůšek, 2003).

4.1.2 Syrovátkové bílkoviny

Syrovátkové bílkoviny jsou globulární, hydrofobní proteiny, které snadno podléhají denaturaci, tudíž jsou schopny na sebe vázat velké množství vody, a tím zlepšují strukturu a vlastnosti některých potravinových výrobků. Jak už bylo zmíněno při pH 4,6 se nesrážejí a zůstávají tak v koloidním roztoku. Obsahují zvýšenou hladinu sirných aminokyselin a neobsahují fosfor (Šnirc et al., 2015; Buňka et al., 2013). Mezi syrovátkové bílkoviny řadíme β -laktoglobulin, α -laktalbumin, sérový albumin, imunoglobuliny, laktoferin a proteózo-peptony (Guetouache et al., 2014; Buňka et al., 2013).

β -laktoglobulin a α -laktalbumin tvoří téměř 80 % syrovátkových bílkovin. Samotný β -laktoglobulin tvoří kolem 50 %. α -laktalbumin je důležitý pro syntézu laktózy. Imunoglobuliny jsou obsaženy hlavně v mlezivu a zajišťují přenos imunity z matky na mládě (Damodaran et al., 2017). Obsah sérového albuminu se zvyšuje při zánětlivých reakcích. Laktoferin má bakteriostatické a antioxidační účinky (Buňka et al., 2013).

4.1.3 Srážení kaseinových micel

Srážení kaseinových micel je proces, při kterém dochází k destabilizaci micel, jejich srážení a následné agregaci za vzniku gelu. Toho se využívá například při výrobě sýrů a kysaných mléčných výrobků. Srážení může být vyvoláno okyselením mléka (kyselé srážení) nebo působením enzymů (enzymatické neboli sladké srážení).

Kyselé srážení je způsobeno snížením pH mléka na hodnotu izoelektrického bodu kaseinu (pH = 4,6). pH lze snížit přidáním samotné kyseliny, nejčastěji kyseliny mléčné, nebo pomocí čistých mlékařských kultur, které metabolizují laktózu na kyselinu mléčnou.

K enzymatickému (sladkému) srážení dochází působením tzv. syřidla, které obsahuje proteolytické enzymy. Mezi nejčastěji používané enzymy patří chymozin. Proces sladkého srážení je rozdělen do dvou fází. V primární (enzymatické) fázi je po přidavku chymozinu degradován κ -kasein, který má za úkol stabilizovat micely. Během sekundární (koagulační) fáze dochází ke srážení kaseinových micel za účasti vápenatých iontů a jejich spojování do trojrozměrné struktury (gelu) (Buňka et al., 2013; Troch et al., 2017).

4.2 Tuk

Mléko obsahuje asi 3–5 % tuku. Hlavní složkou mléčného tuku jsou triacylglyceroly, které tvoří 96–98 % z celkového množství mléčného tuku. V menší míře se pak vyskytují diacylglyceroly, monoacylglyceroly, volné mastné kyseliny, polární lipidy, steroly, ve stopovém množství také vitaminy rozpustné v tucích (A, D, E a K) a β -karoten (Damodaran et al., 2017). Triacylglyceroly jsou tvořeny glycerolem, na kterém jsou pomocí esterové vazby vázány mastné kyseliny. Složení mastných kyselin je ovlivňováno plemenem, složením krmiva, stadiem laktace a také ročním obdobím (Eskin et al., 2013). Nasycené mastné kyseliny tvoří asi 70 % mastných kyselin, monoenoové kyseliny 20–25 % a polyenoové 2–5 % (Buňka et al., 2013; Damodaran et al., 2017).

Mléčný tuk se vyskytuje ve formě tukových kuliček, které jsou obklopené dvouvrstvou fosfolipidovou membránou, na níž jsou zakotvené proteiny, cholesterol, cerebrozidy, sfingomyelin a fosfatidylserin. Membrána stabilizuje triacylglyceroly a chrání je před lipolýzou (Buňka et al., 2013; Damodaran et al., 2017; Griffiths, 2010).

4.3 Laktóza

Laktóza je disacharid tvořený z D-galaktózy a D-glukózy, které jsou vázány pomocí glykosidické vazby. Laktóza, nazývána také jako mléčný cukr, je syntetizována přímo v mléčné žláze a dodává mléku sladkou chuť. Mléčný cukr má důležitou roli ve výživě novorozenců, pro které je zdrojem energie. Bakterie mléčného kvašení fermentují laktózu na kyselinu mléčnou. Tento proces fermentace se využívá při výrobě kysaných mléčných výrobků a sýrů. Při působení vyšších teplot podléhá laktóza Maillardovým reakcím, což vede

ke změně barvy, chuti, vůně a ztrátě výživových hodnot (Griffiths, 2010; Buňka et al., 2013; Šnirc et al., 2015).

Kromě laktózy obsahuje mléko také stopové množství monosacharidů (asi 10 mg/l) a oligosacharidů (100 mg/l) (Šnirc et al., 2015).

4.4 Vitamíny

Mléko obsahuje v dostatečných koncentracích všechny vitamíny potřebné pro růst mláďat, a také je výborným zdrojem vitamínů ve výživě lidí. Obsah jednotlivých vitamínů závisí na stádiu laktace, výživě, ročním období, genetice a zdravotnímu stavu dojnice. Vitamíny působí v organismu především jako koenzymy, antioxidanty anebo jako prekurzory hormonů. Z chemického hlediska se jedná o organické molekuly, které dělíme na základě rozpustnosti na rozpustné ve vodě a rozpustné v tucích (Šnirc et al., 2015; Buňka et al., 2013). Množství jednotlivých vitamínů a jejich dělení na základě rozpustnosti je uvedeno v Tab. 2.

Tab. 2 Obvyklý obsah vitamínů v mléce (upraveno podle McSweeney&Fox, 2009)

| Vitamíny | | Obsah [mg/l] | Rozpustnost |
|----------------------|-----------------|---------------|-----------------------|
| Název | Označení | | |
| Tiamin | B ₁ | 0,20–0,80 | Rozpustné ve vodě |
| Riboflavin | B ₂ | 0,52–2,50 | |
| Niacin | B ₃ | 0,47–2,00 | |
| Pyridoxin | B ₆ | 0,11–1,90 | |
| Kobalamin | B ₁₂ | 0,003–0,038 | |
| Kyselina pantotenová | B ₅ | 0,60–4,90 | |
| Kyselina askorbová | C | 5,0–27,5 | Rozpustné v tucích |
| Retinol | A | 0,1–1,0 | |
| Cholekarciferol | D | 0,0001–0,0012 | |
| Tokoferoly | E | 0,20–1,84 | |

Mezi nejvíce zastoupené vitamíny v mléce patří vitamín A, C, E a vitamíny skupiny B. Vitamín A hraje důležitou roli ve správném fungování imunitního systému. Je důležitý pro růst kostí, rozmnožování a dobrý zrak. Vitamíny C a E působí v organismu jako antioxidanty. Z vitamínů skupiny B jsou nejvíce zastoupeny vitamíny B₂ a B₅. Vitamín B₂ je kofaktor enzymů účastnících se metabolismu glukózy, aminokyselin a mastných kyselin. Vitamín B₅ je součástí koenzymu A, který má důležitou úlohu v metabolismu mastných kyselin, uvolňování energie z tuků, cukrů a proteinů (Šnirc et al., 2015; Haug et al., 2007).

4.5 Minerální látky

Minerální látky se mohou v mléce vyskytovat v roztoku, ve formě koloidů nebo mohou být vázány na ostatní složky mléka. Obsah minerálních látek se obvykle pohybuje kolem 0,7 %. Minerální látky se do mléka dostávají z krve. V organismu se podílí na udržování osmotických a acidobazických rovnováh (Gajdůšek, 2003; Buňka et al., 2013). Hrají také důležitou roli ve struktuře a stabilitě kaseinových micel (Gaucheron, 2005). Mléko obsahuje především vápník, fosfor, sodík, draslík, chlor a hořčík (Buňka et al., 2013). Obsah minerálních látek v mléce je uveden v Tab. 3.

Tab. 3 Zastoupení minerálních látek v mléce (upraveno podle Fox & McSweeney, 1998)

| Prvek | Obsah v mléce [mg/l] |
|---------|----------------------|
| Sodík | 350–900 |
| Draslík | 1100–1700 |
| Chlor | 900–1100 |
| Vápník | 1100–1300 |
| Hořčík | 90–140 |
| Fosfor | 900–1000 |

4.6 Enzymy

Enzymy slouží jako biokatalyzátory. Snižují aktivační energii a tím urychlují průběh reakcí. V mléce se vyskytuje velké množství enzymů. Kromě nativních enzymů (endogenních) můžeme v mléce najít také exogenní enzymy, které se do mléka dostávají z kontaminující mikroflóry nebo jsou přidány během zpracování mléka technologickými postupy. Některé enzymy mohou být vázané na povrchu tukových kuliček, jiné zase na kaseinové micely. Při vyšších teplotách dochází k denaturaci a inaktivaci enzymů (Šnirc et al., 2015; Gajdůšek, 2003).

V mléce se nachází asi 60 přirozených enzymů, které mohou pocházet z krve dojníc, somatických buněk nebo mléčné žlázy. Prvním objeveným a izolovaným enzymem byla **laktoperoxidáza** (EC 1.11.1.7). Slouží jako obranný systém mléčné žlázy. Katalyzuje totiž rozklad peroxidu vodíku za uvolnění vodíku, který je následně předán vhodnému akceptoru. Laktoperoxidáza je velmi odolná vůči působení vysokých teplot. Na základě její přítomnosti se stanovuje správné provedení vysoké pasterace (Damodaran et al., 2017; Buňka et al., 2013). V mléce se dále vyskytuje **alkalická fosfatáza** (EC 3.1.3.1), která se využívá také jako indikátor účinnosti pasterace. Dalším enzymem v mléce je **plasmin** (EC 3.4.21.7). Ten

degraduje bílkoviny a peptidy štěpením peptidové vazby na lyzinových a argininových zbytcích. Mezi nejznámější enzymy v mléce řadíme také **lipázy** (EC 3.1.1.-), které hydrolyzují triacylglyceroly na mastné kyseliny a glycerol. Způsobují tak hydrolytické žluknutí mléka (Griffiths, 2010; Buňka et al., 2013).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

V teoretické části byla popsána charakteristika biogenních aminů, jejich tvorba a toxicita. Dále byly uvedeny možnosti redukce biogenních aminů a způsoby jejich stanovení. Byly také zmíněny bakterie, které jsou schopny degradovat biogenní aminy v potravinách. Stručně bylo popsáno složení a charakteristika mléka, které bylo v této diplomové práci použito jako kultivační médium.

Cílem praktické části byla kultivace bakteriálního kmene *Lacticaseibacillus casei* (dříve *Lactobacillus casei*) **CCDM 198**. Dále byl sledován vliv technologických parametrů (pH, teplota) na degradační schopnost tohoto kmene v reálné potravine (mléce). Redukce biogenních aminů byla stanovována pomocí metody HPLC.

6 MATERIÁL A METODIKA

6.1 Použité mikroorganismy

V diplomové práci byla sledována degradační aktivita kmene *Lacticaseibacillus casei* (dříve *Lactobacillus casei*) CCDM 198, který byl získán ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů Laktoflora (CCDM).

6.2 Sledované faktory

Byl sledován vliv různých faktorů na schopnost redukce biogenních aminů kmenem *Lactocaseibacillus casei*. Prvním faktorem byla teplota: 11 °C, 23 °C a 30 °C. Dalším faktorem bylo pH: $7 \pm 0,2$; $6,2 \pm 0,2$ a $5,4 \pm 0,2$.

6.3 Použité roztoky

Při přípravě roztoků se pracovalo za sterilních podmínek v laminárním boxu s předem vysterilizovanými pomůckami.

6.3.1 Koncentrovaný roztok biogenních aminů 4 g/l

Koncentrovaný roztok biogenních aminů byl připraven navážením 0,4 g jednotlivých biogenních aminů a jejich rozpuštěním v 100 ml destilované vody.

Použité biogenní aminy (vše Sigma-Aldrich, USA):

- Tyramin
- Putrescin (1,4-diaminobutan)
- Kadaverin (dihydrochlorid)
- Histamin (dihydrochlorid)
- Fenylethylamin (hydrochlorid)

6.3.2 Příprava roztoku mléka s biogenními aminy o koncentraci 0,2 g/l

K 475 ml mléka (odstředěné 0,5 % Progolaktos) bylo přidáno 25 ml koncentrovaného roztoku biogenních aminů. Takto byly připraveny tři roztoky, u kterých bylo pomocí HCl (PENTA, ČR) upraveno pH na jednotlivé hodnoty, tj. $7 \pm 0,2$; $6,2 \pm 0,2$ a $5,4 \pm 0,2$. Poté byly roztoky rozděleny po 7 ml do skleněných zkumavek.

6.4 Příprava a odběr vzorků

Testovaný kmen byl asepticky převeden pomocí sterilní kličky z tuhé půdy do zkumavek s MRS bujónem (Merck, Německo) a anaerobně kultivován přes noc při teplotě 37 °C. Po kultivaci byla připravena zředěná kultura tak, aby hodnota zákalu odpovídala stupni 0,5 dle McFarlanda. Z takto připravené kultury bylo sterilně pipetováno 50 µl do všech zkumavek obsahujících roztok mléka s biogenními aminy.

Jednotlivé zkumavky byly kultivovány při teplotě 11, 23 a 30 °C. Odběry vzorků byly prováděny v různé časy podle teploty (viz. Tab. 5). V každém čase byly provedeny odběry ve 3 paralelních zkumavkách. Kontrolní vzorky, které obsahovaly pouze mléko s roztokem biogenních aminů bez přidané kultury, byly ve 2 paralelních zkumavkách pro každou teplotu.

Vzorky byly přepipetovány do eppendorfových zkumavek a centrifugovány (4600 otáček/min, 7 minut). Po centrifugaci bylo odebráno 650 µl supernatantu do dvou eppendorfových zkumavek a přidáno 650 µl kyseliny chloristé (Merck, Německo) o koncentraci 1,2 mol/l. Následně byly vzorky zamraženy a připraveny na derivatizaci.

Tab. 4 Jednotlivé odběrové časy při daných teplotách

| Teplota | Odběrové časy | | | | | | | | |
|---------|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 11 °C | 0 hod | 2 dny | 4 dny | 6 dnů | 8 dnů | 10 dnů | 12 dnů | 14 dnů |
| 23 °C | 0 hod | 12 hod | 24 hod | 30 hod | 36 hod | 48 hod | 72 hod | 96 hod | - |
| 30 °C | 0 hod | 8 hod | 12 hod | 24 hod | 28 hod | 32 hod | 36 hod | 48 hod | 72 hod |

6.5 Derivatizace

Vnitřní standard o objemu 100 µl (1,7-heptandiamin (Sigma-Aldrich, USA) o koncentraci 500 mg/l) byl napipetován do derivatizační nádoby. K vnitřnímu standardu byl přidán 1 ml vzorku a 1,5 ml karbonátového pufru (pH 11,1 – 11,2). Do derivatizační nádoby byly odpipetovány 2 ml dansylchloridu (Sigma-Aldrich, USA), jehož koncentrace činila 5 g/l v acetonu. Derivatizační nádoby byly zadělány víčkem a následně byly třepány v temnu po dobu 20 hodin. Po uplynutí této doby bylo ke vzorku napipetováno 200 µl prolinu (Merck, Německo) o koncentraci 0,1 g/ml v destilované vodě. Po přidání prolinu byly

nádobky se vzorkem opět třepány. Po hodině třepání byly přidány do derivatizační nádobky 3 ml heptanu (Sigma-Aldrich, USA). Po důkladném uzavření nádobek byly vzorky opět třepány tentokrát ručně po dobu 5 minut. Po ustálení došlo k oddělení jednotlivých vrstev. Z vrchní heptanové vrstvy byl odpipetován do vialky 1 ml, který byl následně odpařen pod proudem dusíku při teplotě 65 °C. K suchému odparku ve vialce byl přidán 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich, USA). Takto připravené vzorky byly zamrazeny při -18 °C do doby analýzy.

6.6 Chromatografické stanovení biogenních aminů

Před samotnou analýzou byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 µm. Následně byly vzorky nadávkovány do chromatografického přístroje. Pro separaci biogenních aminů byla využita gradientová eluce (10% acetonitril ve vodě/acetonitril) na koloně Agilent Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 s parametry 50 x 3,0 mm, s velikostí částic 1,8 µm (Agilent, Paolo Alto, USA). Při analýze byl použit průtok kolonou 0,450 ml/min a teplota 30 °C. Pro stanovení byl použit detektor diodového pole (DAD) (vlnová délka 254 nm). Chromatogramy byly vyhodnoceny pomocí softwaru Agilent OpenLab Data Analysis.

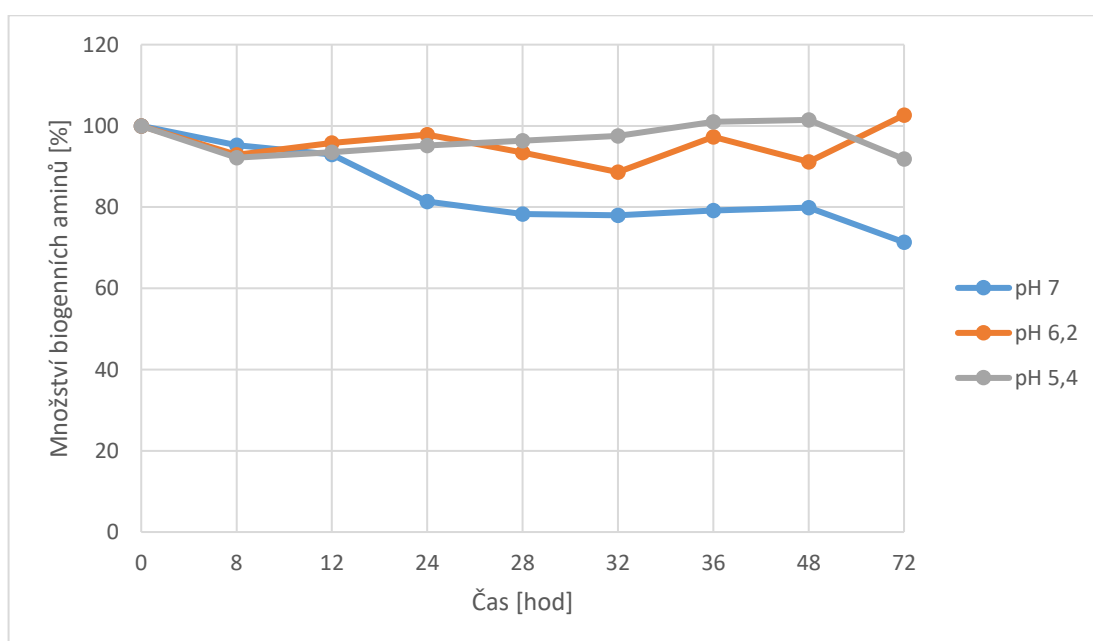
7 VÝSLEDKY A VYHODNOCENÍ

Během kultivace kmene *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 byla sledována jeho schopnost redukovat množství biogenních aminů v mléce za různých růstových podmínek. Byly pozorovány úbytky biogenních aminů fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu. Kultivace byla prováděna při různé teplotě (30 °C, 23 °C, 11 °C) a různém pH (7,0; 6,2; 5,4). Jednotlivé odběrové časy se lišily na základě teploty (uvedeno v Tab. 5 v kapitole 6.5).

7.1 Degradace biogenních aminů při teplotě 30 °C

Degradace fenylethylaminu při teplotě 30 °C a různém pH

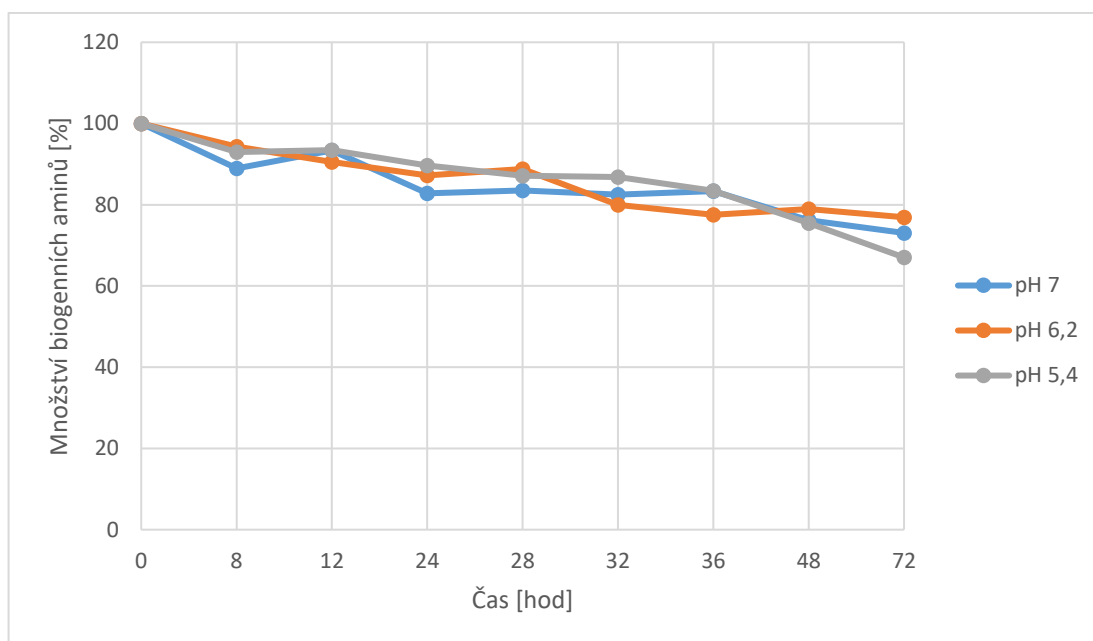
Schopnost degradace fenylethylaminu testovaným kmenem je zobrazena na Obr. 7. Nejvyšší úbytek fenylethylaminu byl při pH 7, kdy již po 28 hodinách došlo k poklesu o 22 % a po 72 hodinách dokonce o 29 %. Z obrázku lze pozorovat, že během kultivace při pH 6,2 nedocházelo k významným rozdílům koncentrace během kultivace. K výraznějšímu úbytku došlo v 32. hodině na 89 % z původní koncentrace, poté koncentrace fenylethylaminu opět vzrostla na 103 %. V médiu o pH 5,4 byl zaznamenán pokles po 8 hodinách o 8 %. Následně docházelo k pomalému nárůstu až na původní koncentraci. Po 72 hodinách obsah fenylethylaminu opět klesl na 92 %.



Obr. 7 Degradace fenylethylaminu při 30 °C a různém pH

Degradace putrescinu při teplotě 30 °C a různém pH

Při degradaci putrescinu při 30 °C (Obr. 8) byl zaznamenán podobný postupný úbytek koncentrace u všech studovaných hodnot pH, kdy nejvyšší degradace byla při pH 5,4. Po 72 hodinách byla hladina putrescinu při pH 7 na 73 %, při pH 6,2 na 77 % a při pH 5,4 na 67 % z původního množství. Při pH 7 byl obsah putrescinu po 8 hodinách nižší o 11 %. Poté došlo k mírnému výkyvu ve 12. hodině, kdy došlo k nárůstu z 89 % na 93 %. Ve 24. hodině byl pozorován opět pokles na 83 %. Toto množství bylo konstantní až do 36. hodiny. Následoval úbytek koncentrace putrescinu až na 73 %.

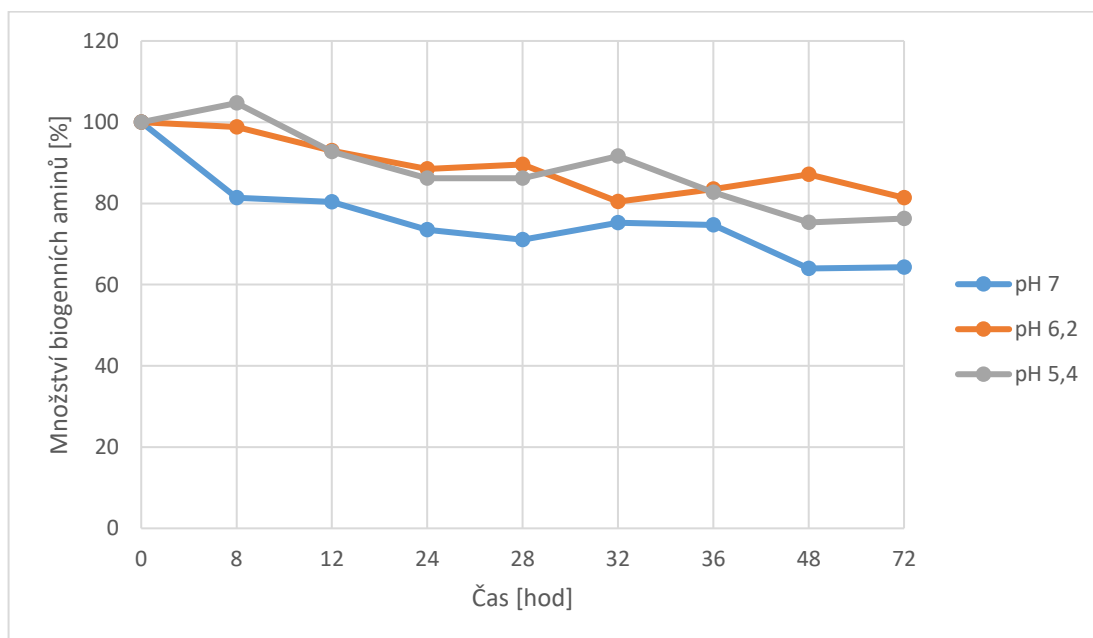


Obr. 8 Degradace putrescinu při 30 °C a různém pH

Degradace kadaverinu při teplotě 30 °C a různém pH

Degradace kadaverinu při teplotě 30 °C a daných hodnotách pH je znázorněna na Obr. 9. Nejvýraznější degradace kadaverinu byla pozorována při pH 7. Již po 8 hodinách se koncentrace snížila o 19 % a po 28 hodinách dokonce o 29 %. Nejvyšší úbytek byl zjištěn v 48. hodině, obsah kadaverinu činil 64 % z původního množství. V mléce o pH 6,2 byl pokles po 12 hodinách o 8 %, po dalších 12 hodinách o další 3 %. Nejnižší množství kadaverinu bylo zaznamenáno po 32 hodinách, kdy byl obsah na 80 % z původní koncentrace. Během kultivace při pH 5,2 lze pozorovat nejprve zvýšení obsahu o 5 %, poté

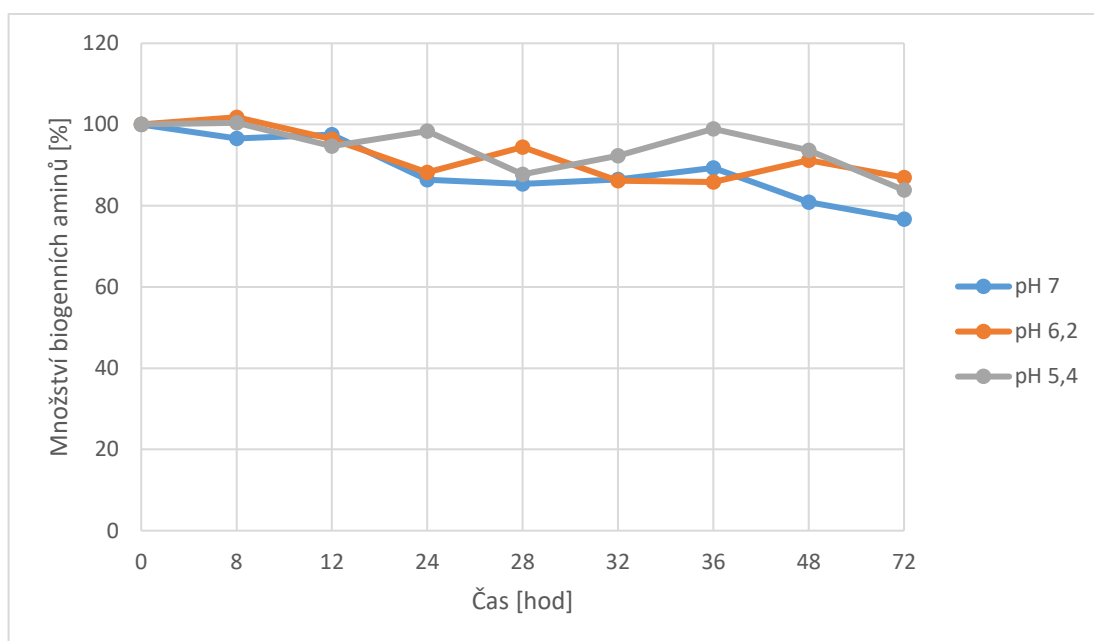
docházelo k postupné degradaci, až na menší výkyv v 32. hodině. Na konci kultivace (po 72 hodinách) byl kadaverin redukován na 76 %.



Obr. 9 Degradace kadaverinu při 30 °C a různém pH

Degradace histaminu při teplotě 30 °C a různém pH

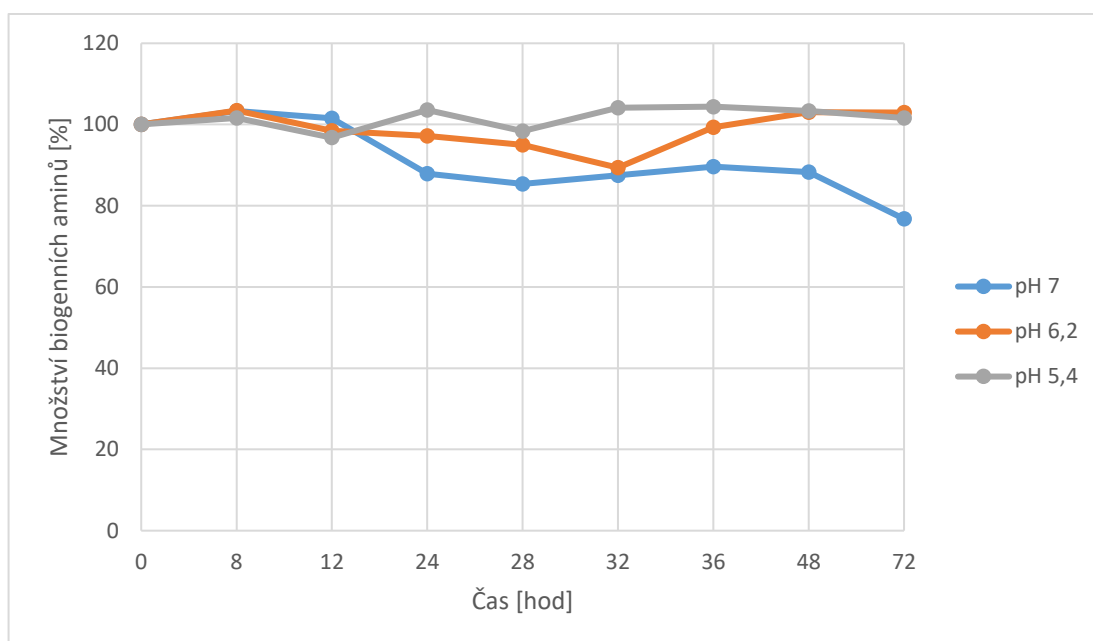
Na Obr. 10 je zobrazena degradace histaminu při 30 °C v mléce o různém pH. Nejnižší hodnoty byly naměřeny při pH 7. K výraznějšímu poklesu došlo ve 24. hodině o 14 %. Množství histaminu pak bylo až do 32. hodiny téměř konstantní. Poté koncentrace mírně vzrostla. Po 72 hodinách byl obsah histaminu na 77 % vůči původní koncentraci. U pH 6,2 byl zaznamenán největší pokles v 32.–36. hodině, kdy byl histamin redukován přibližně o 14 %. Během kultivace při pH 5,4 probíhala degradace nerovnoměrně. Ve 28. hodině byla koncentrace snížena o 12 %. Následně docházelo k nárůstu téměř až na původní množství. Od 36. hodiny byl histamin opět degradován a na konci kultivace (po 72 hodinách) jeho obsah činil 84 %.



Obr. 10 Degradace histaminu při 30 °C a různém pH

Degradace tyraminu při teplotě 30 °C a různém pH

Jako u předchozích případů s výjimkou putrescinu, probíhala degradace tyraminu (Obr. 11) nejlépe při pH 7. Po 28 hodinách byla zaznamenána redukce tyraminu o 15 %. Z grafu lze pozorovat, že během 32.–36. hodiny došlo k mírnému zvýšení množství tyraminu na 90 %. Po 48 hodinách kultivace koncentrace klesla o 2 % a po 72 hodinách dokonce o dalších 11 %. U degradace tyraminu při pH 6,2 došlo k nejvýraznějšímu snížení jeho množství po 32 hodinách. Tyramin byl v tomto čase redukován o 11 %. Poté opět následovalo zvyšování jeho koncentrace až na 103 %. V mléce o pH 5,4 nedocházelo k výrazným změnám.

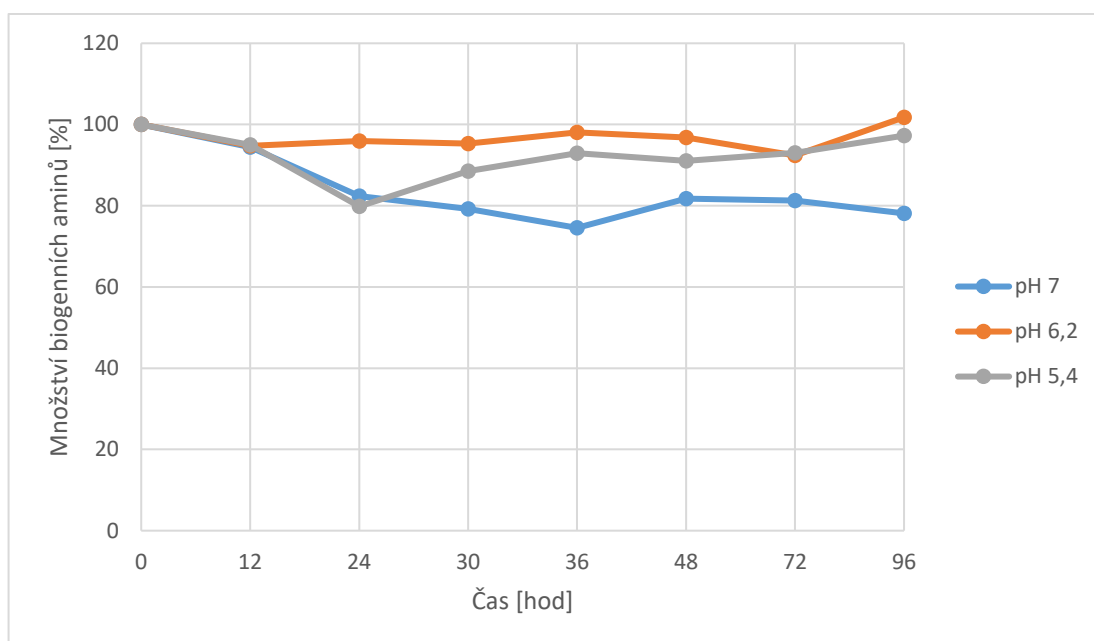


Obr. 11 Degradace tyraminu při 30 °C a různém pH

7.2 Degradace biogenních aminů při teplotě 23 °C

Degradace fenylethylaminu při teplotě 23 °C a různém pH

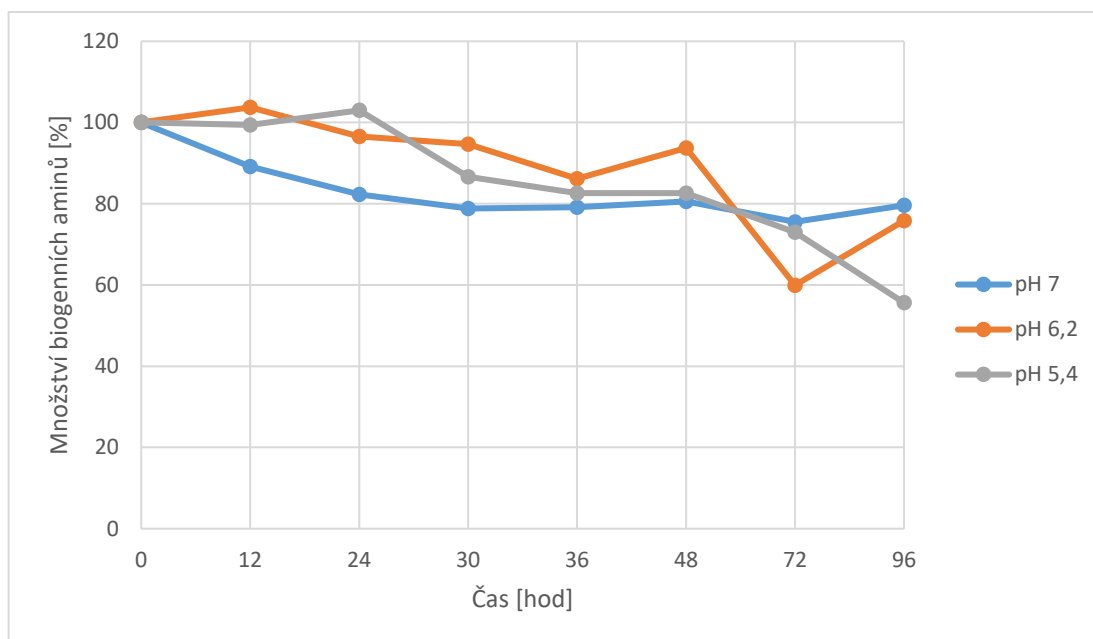
Obr. 12 znázorňuje degradaci fenylethylaminu testovaným kmenem při 23 °C a daných hodnotách pH. Nejvyšší schopnost redukce byla pozorována u kultivace při pH 7. Během 36 hodin došlo k poklesu až na 75 % z původní koncentrace. Posléze byl zaznamenán nárůst o 7 %. Na konci kultivace (po 96 hodinách) množství kleslo na 78 %. Při pH 6,2 nedocházelo k výrazným změnám, nejnižší obsah fenylethylaminu byl v 72. hodině 92 %. Během kultivace při pH 5,4 byla koncentrace snížena na 80 %. Poté se množství fenylethylaminu zvýšilo až na 97 %.



Obr. 12 Degradace fenylethylaminu při teplotě 23 °C a různém pH

Degradace putrescinu při teplotě 23 °C a různém pH

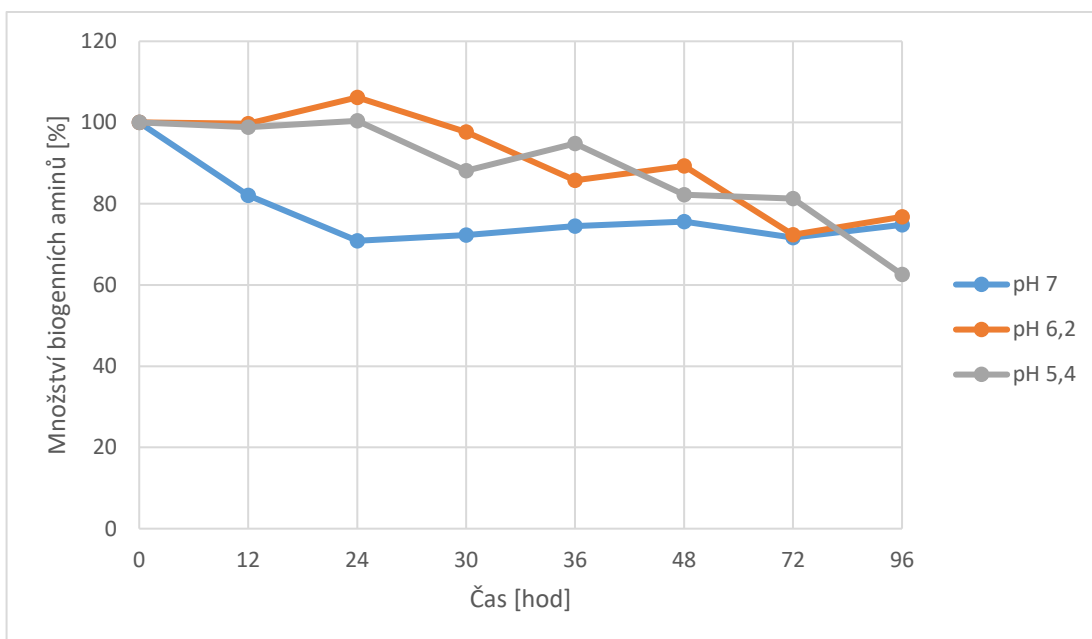
Z Obr. 13 je zřejmé, že schopnost testovaného kmene redukovat množství putrescinu při 23 °C byla nejvýraznější při pH 5,4, kdy jeho koncentrace činila v 96. hodině 56 %. V mléce o pH 6,2 došlo nejprve ke zvýšení množství o 4 %, následně docházelo k postupné degradaci. Po 36 hodinách hladina putrescinu činila 86 %, následoval nárůst o 8 % a poté byl pozorován během 24 hodin pokles na hodnotu 60 %. U mléka s neutrálním pH nebyly zjištěny tak výrazné úbytky jako u pH 5,4 a 6,2. Po 30 hodinách kultivace bylo zaznamenáno snížení množství na 79 %, kdy tato koncentrace aminu byla téměř konstantní až do 72. hodiny (76 %).



Obr. 13 Degradace putrescinu při teplotě 23 °C a různém pH

Degradace kadaverinu při teplotě 23 °C a různém pH

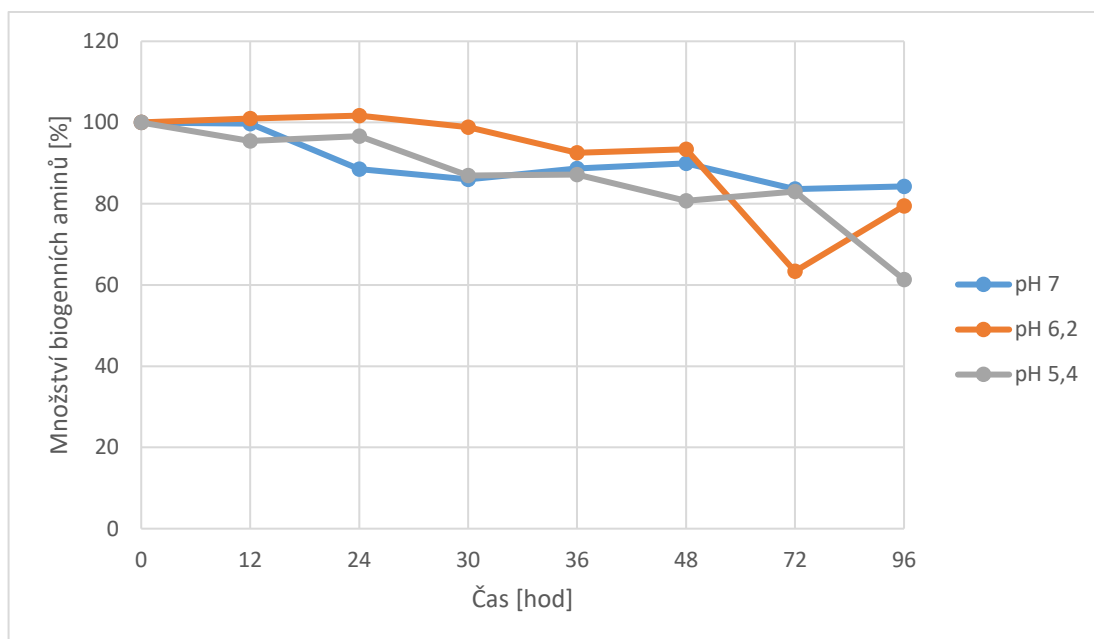
Degradace kadaverinu při 23 °C a daných hodnotách pH je znázorněna na Obr. 14. Z uvedeného grafu lze pozorovat, že nejrychlejší degradace proběhla v mléce o neutrálním pH. Tento pokles nastal během 24 hodin. Obsah kadaverinu ve 24. hodině činil 71 % z původního množství. Až do konce kultivace nedocházelo při tomto pH k výraznějším změnám. Na rozdíl od toho byl v mléce o pH 6,2 ve 24. hodině zaznamenán nárůst koncentrace o 6 %. Posléze však docházelo k redukci kadaverinu. Nejnižší hodnota při pH 6,2 byla naměřena po 72. hodinách kultivace. Množství kadaverinu bylo v tomto odběrovém čase sníženo na 72 %. Do 24. hodiny při nejnižším pH nebyla zjištěna skoro žádná změna v koncentraci. Až po 30 hodinách kultivace množství kleslo o 12 %. Během dalších 6 hodin došlo ke zvýšení obsahu o 7 %. Od 36. hodiny byl pozorován pokles koncentrace až na hodnotu 63 %.



Obr. 14 Degradace kadaverinu při teplotě 23 °C a různém pH

Degradace histaminu při teplotě 23 °C a různém pH

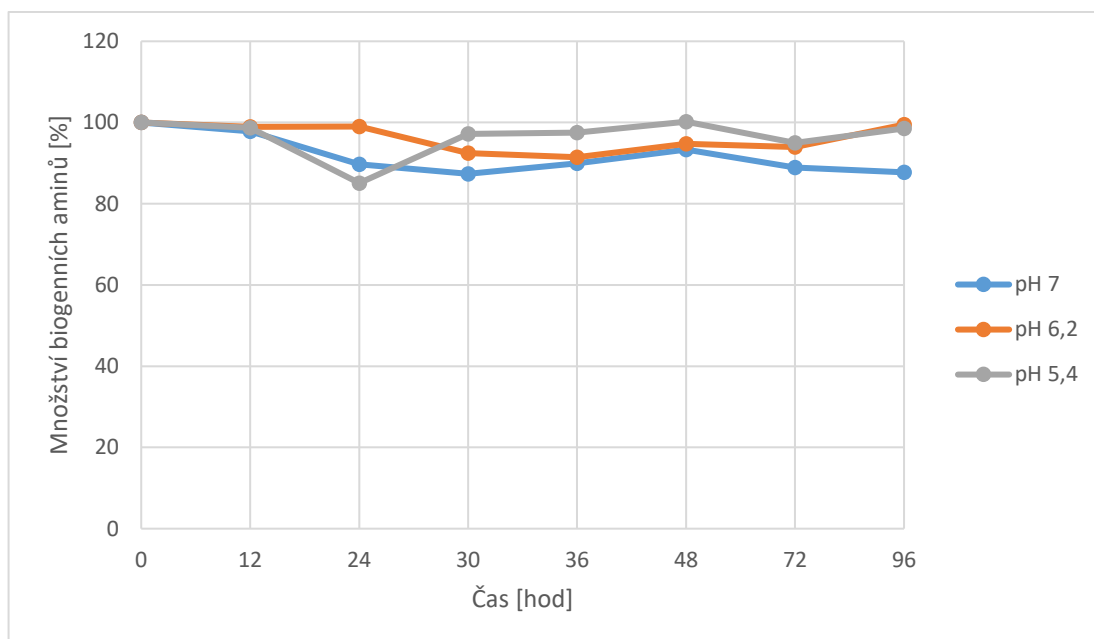
Podobně jako u degradace putrescinu a kadaverinu při teplotě 23 °C byl pozorován nejvýraznější úbytek histaminu při nejnižším pH (Obr. 15). Na konci kultivace (po 96 hodinách) jeho koncentrace činila 61 %. U pH 6,2 od začátku kultivace až do 30. hodiny nebyla zjištěna žádná významná redukce. Výraznější degradace nastala až od 48. hodiny, v 72. hodině byl obsah snížen na 63 %. Během posledních 24 hodin kultivace byl zaznamenán podobně jako ostatních biogenních aminů, které byly kultivovány při teplotě 23 °C, nárůst koncentrace. Nejméně významná degradace byla zjištěna při pH 7, během které došlo k poklesu o 16 %, a to až v posledních dvou odběrových časech.



Obr. 15 Degradace histaminu při teplotě 23 °C a různém pH

Degradace tyraminu při teplotě 23 °C a různém pH

Při degradaci tyraminu (Obr. 16) nebyla pozorována významná změna v koncentraci jako u předešlých biogenních aminů. Nejnižší hodnota byla zjištěna při pH 5,4 již po 24 hodinách, množství tyraminu bylo v tomto čase 85 % vůči původnímu množství. Poté docházelo k nárůstu až na počáteční koncentraci. Při pH 6,2 byla hladina tyraminu během prvních 24 hodin kultivace konstantní. Po 36 hodinách došlo k poklesu pouze o 9 %. Následně až do konce kultivace docházelo k nárůstu až na původní množství, podobně jako u pH 5,4. V mléce o pH 7 byla naměřena největší změna koncentrace v 30. hodině. Hladina tyraminu klesla o 13 %.

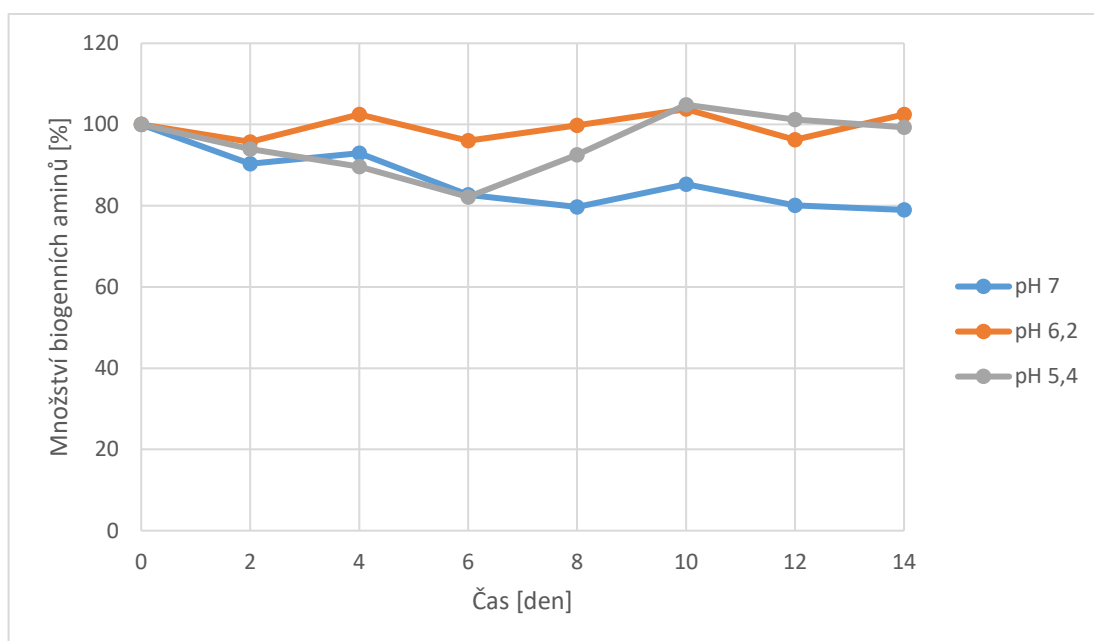


Obr. 16 Degradace tyraminu při teplotě 23 °C a různém pH

7.3 Degradace biogenních aminů při teplotě 11 °C

Degradace fenylethylaminu při teplotě 11 °C a různém pH

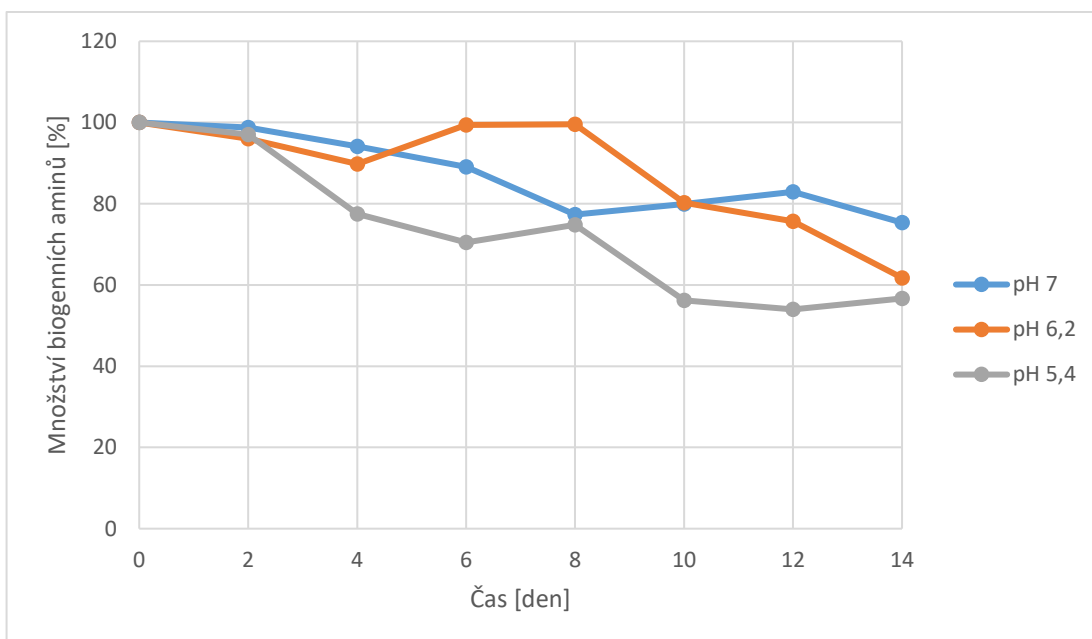
Schopnost testovaného kmene redukovat množství fenylethylaminu při 11 °C a různém pH je znázorněna na Obr. 17. Výraznější degradace byla zjištěna při neutrálním pH, kdy po 8 dnech byla koncentrace snížena o 20 %. Po dalších 2 dnech došlo k mírnému nárůstu o 5 %. Nejnižší koncentrace byla stanovena po 14 dnech kultivace, kdy hladina fenylethylaminu byla rovna 79 % z původního množství. Během kultivace při pH 6,2 nedocházelo k výraznějším změnám. V mléce s nejnižším pH byl zaznamenán úbytek o 18 % již po 6 dnech kultivace. Během dalších čtyř dnů došlo ke skokovému nárůstu dokonce až na 105 %. Na konci kultivace (po 14 dnech) bylo dosaženo opět hranice 100 %.



Obr. 17 Degradace fenylethylaminu při teplotě 11 °C a různém pH

Degradace putrescinu při teplotě 11 °C a různém pH

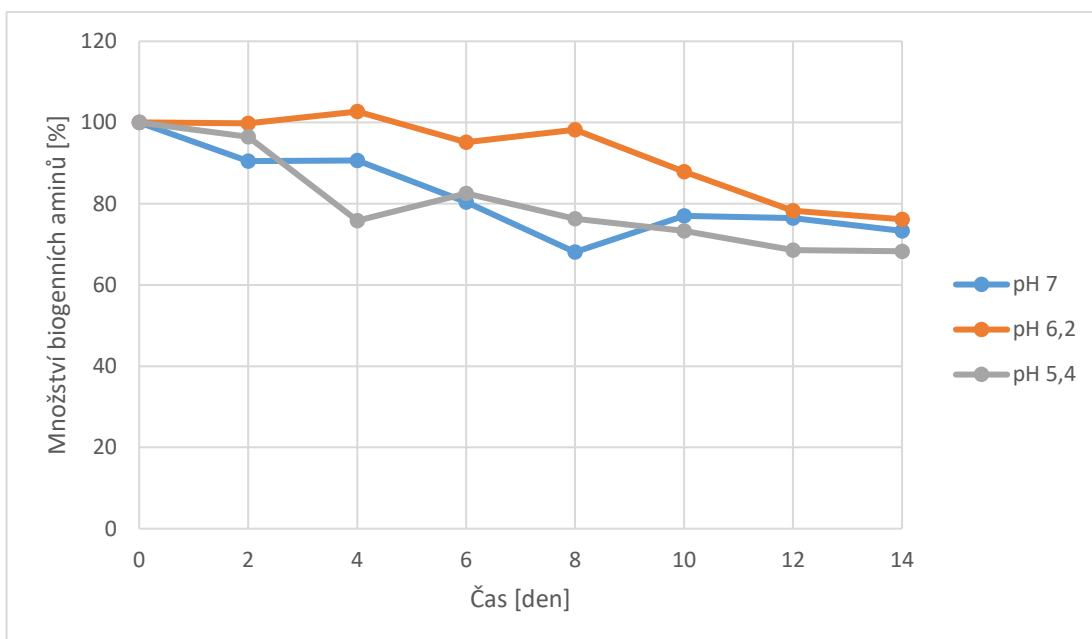
Během redukce putrescinu (Obr. 18) došlo poprvé k poklesu o více než 40 % a to u kultivace při pH 5,4. Po 4 dnech byla koncentrace snížena o 23 % a po 6 dnech dokonce o 30 % z původní hodnoty. Poté byl pozorován mírný nárůst o 5 %. Mezi 8. a 10. dnem kultivace došlo k poklesu na 56 % z původního obsahu. Za další 2 dny bylo dosaženo nejnižšího množství, které činilo 54 %. Při pH 6,2 byl zaznamenán po 4 dnech nejdříve úbytek o 10 %. Posléze následovalo zvyšování koncentrace až na původní množství. Tento obsah byl mezi 8. a 10. dnem konstantní. Následně docházelo až do konce kultivace k redukci až na hladinu 62 %. Kultivace při neutrálním pH nevykazovala takové úbytky jako u předešlých dvou pH. Redukce měla klesající charakter až do 8 dne, kdy hodnota klesla až na 77 %. Během dalších 4 dnů se koncentrace zvýšila o 6 % a následně byl zaznamenán úbytek na hladinu 75 %.



Obr. 18 Degradace putrescinu při teplotě 11 °C a různém pH

Degradace kadaverinu při teplotě 11 °C a různém pH

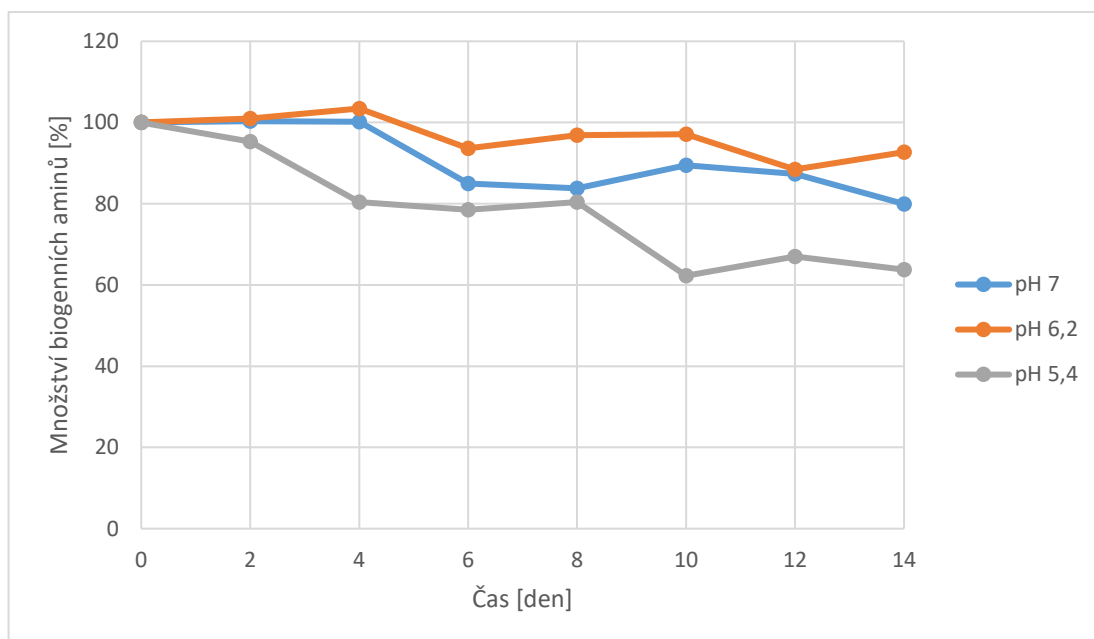
Redukce kadaverinu (Obr. 19) za dané teploty probíhala nejlépe v mléce o pH 7 a pH 5,4. Během kultivace při pH 7 bylo zjištěno nejnižší množství po 8 hodinách, v tento čas byla koncentrace kadaverinu 68 %. Po 10 hodinách byl pozorován mírný nárůst o 9 %. Následně docházelo opět k redukci kadaverinu, jehož obsah na konci kultivace (po 14 dnech) byl 73 %. Při pH 5,4 došlo k poklesu již během 4 dnů, kdy hladina kadaverinu klesla na 76 %. Po dalších 2 dnech byl zjištěn nárůst o 7 %. Poté měla degradace opět klesající charakter. Po 10 dnech byla naměřena koncentrace 73 % a po 14 dnech dokonce 66 %. Redukce byla zjištěna i při pH 6,2, ovšem během prvních 8 dnů v menší míře ve srovnání s ostatními hodnotami pH. Po 10 dnech inkubace byl zjištěn úbytek o 12 %, po 12 dnech byla koncentrace 78 % a po 14 dnech byla pokořena hranice 76 %.



Obr. 19 Degradace kadaverinu při teplotě 11 °C a různém pH

Degradace histaminu při teplotě 11 °C a různém pH

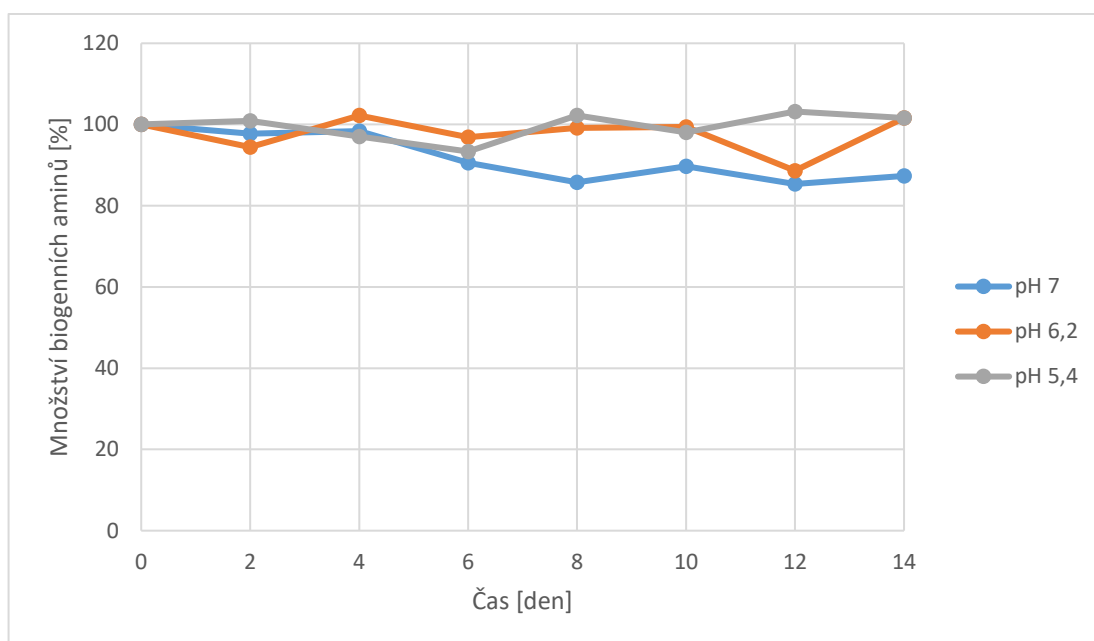
Podobně jako u putrescinu byla degradace histaminu (Obr. 20) nejvýraznější při pH 5,4. Již po 4 dnech došlo ke snížení koncentrace na 80 %. Během dalších 4 dnů byla hladina histaminu téměř konstantní. Další úbytek nastal mezi 8. a 10. dnem, kdy obsah histaminu činil 62 %. Při redukci v mléce s pH 6,2 byla naměřena nejnižší koncentrace až po 12 dnech, kdy byla hodnota na 88 % z původní hodnoty. Během kultivace s neutrálním pH nebyla pozorována po dobu 4 dnů žádná změna. Až mezi 4. a 6. dnem došlo k úbytku o 16 %. Po 2 dnech byl ale zjištěn mírný nárůst o 5 %. Následně docházelo opět ke snižování množství až na konečnou koncentraci 80 %.



Obr. 20 Degradace histaminu při teplotě 11 °C a různém pH

Degradace tyraminu při teplotě 11 °C a různém pH

U degradace tyraminu při 11 °C (Obr. 21) nedocházelo k tak výrazným změnám jako u předešlých biogenních aminů. Největší redukce byla pozorována při pH 7, kdy po 8 dnech byl obsah na 86 % vůči původnímu množství a po 12 dnech na 85 %. Při pH 6,2 byl pozorován výraznější úbytek až po 12 dnech kultivace. Hladina tyraminu v tomto odběrovém čase klesla na hodnotu 89 %. U kultivace s nejnižším pH nebyly pozorovány významné rozdíly tyraminu v jednotlivých časech. Pouze po 6 dnech inkubace došlo k poklesu o 7 %. V dalších odběrových časech byla koncentrace již jen nad zmíněnou hodnotou.



Obr. 21 Degradace tyraminu při teplotě 11 °C a různém pH

8 DISKUZE

Biogenní aminy jsou nežádoucí látky, vyskytující se především ve fermentovaných potravinách (sýrech, pivu, vínu, masných a rybích výrobcích). Při nahromadění biogenních aminů v organismu může dojít k řadě nežádoucích zdravotních problémů, a proto je důležité kontrolovat jejich obsah a zabránit jejich akumulaci v potravinách. Jako dobré řešení se zdá použití bakterií, které degradují již vytvořené biogenní aminy (Naila et al., 2010; Alvarez et al., 2014).

Tento předpoklad byl ověřován v mé diplomové práci, ve které byl zkoumán kmen *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198. Bylo testováno, zda je tento kmen schopen degradovat biogenní aminy v mléce. Mléko bylo použito jako kultivační médium, neboť je základní surovinou pro výrobu fermentovaných mléčných produktů, které mohou obsahovat velké množství biogenních aminů. Mléko je vhodné médium pro námi testovaný kmen, neboť obsahuje dostatek živin, které jsou potřebné k jeho růstu. Také byl sledován vliv pH mléka (7,0; 6,2; 5,4) a kultivační teploty (30 °C, 23 °C, 11 °C) na redukci biogenních aminů. Zvolené pH mléka má simulovat změny pH, ke kterým dochází během fermentačních procesů.

Při kultivaci o teplotě 30 °C byla zjištěna nejlepší degradace u většiny testovaných biogenních aminů při pH 7. Největší úbytek byl dosažen u kadaverinu, kdy došlo během 48 hodin k poklesu o 36 %. Fenylethylamin byl degradován o 29 % až na konci kultivace (po 72 hodinách). U histaminu a tyraminu bylo naměřeno nejnižší množství také až na konci kultivace. Obsah histaminu i tyraminu byl snížen o 23 %. Výjimkou byl putrescin, který byl nejvíce redukován při pH 5,4. Putrescin byl při tomto pH redukován o 33 % a při pH 7 o 27 %.

Nejvýraznější úbytky při kultivační teplotě 23 °C byly pozorovány u putrescinu, histaminu a kadaverinu při pH 5,4. Největší degradace byla zaznamenána až na konci kultivace (po 96 hodinách), kdy koncentrace klesla u putrescinu o 44 %, u histaminu o 39 % a u kadaverinu o 37 %. Schopnost degradace testovaného kmene při této teplotě byla u fenylethylaminu výraznější při pH 7. Po 36 hodinách kultivace byl obsah snížen o 24 %. Při pH 5,4 byl zjištěn úbytek o 20 %. Tyramin byl degradován v menší míře než ostatní biogenní aminy při této teplotě, při kultivaci došlo k poklesu o 15 %.

Během kultivace při teplotě 11 °C byl podobně jako při teplotě 23 °C nejlépe redukován putrescin, histamin a kadaverin při pH 5,4. Nejvýraznější redukce byla prokázána u putrescinu, jeho koncentrace byla snížena dokonce o 46 % během 12 dnů. K takovému úbytku nedošlo u žádného jiného biogenního aminu ani při jiných růstových podmínkách. Pokles histaminu při tomto pH činil po 10 dnech 38 % a kadaverinu po 14 dnech 32 %. Toto množství kadaverinu bylo zjištěno i při pH 7. Fenylethylamin a tyramin byl nejlépe degradován podobně jako při teplotě 23 °C při pH 7. Úbytek fenylethylaminu byl 21 % a tyraminu pouze 15 %.

V porovnání s diplomovou prací Beneše (2020), který kultivoval kmen *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v MRS bujónu, byla degradace v mléce nižší. V jeho práci byla koncentrace putrescinu snížena o 66 %, kadaverinu o 60 % a histaminu o 51 %. To potvrzuje studie Pištěková et al. (2020), ve které bylo zjištěno, že obsah histaminu, tyraminu, kadaverinu a putrescinu byl po 48 hodinách kultivace o 3–6 % vyšší v mléce než v MRS bujónu. Podobné zjištění publikoval ve své studii García-Ruiz et al. (2011), která se zabývala kultivací kmene *Lacticaseibacillus casei* a sledováním jeho degradační schopností v médiu a ve víně. *Lacticaseibacillus casei* IFI-CA 52 degradoval v médiu histamin o 54 %, tyramin o 55 % a putrescin o 65 %. Ve víně byly pozorovány menší úbytky v koncentraci, u histaminu došlo k poklesu o 16 %, u tyraminu o 15 % a u putrescinu o 8 %.

Existuje další řada studií, ve kterých byly zkoumány bakterie, které odbourávají biogenní aminy v potravinách. Ve studii Herrero-Fresno et al. (2012) bylo izolováno 17 kmenů *Lacticaseibacillus casei*, u všech byla potvrzena schopnost degradovat histamin a tyramin v bujónu. U dvou kmenů *L. casei*, které vykazovaly nejvýraznější redukci, byl dále hodnocen jejich potenciál snižovat obsah biogenních aminů během výroby modelových sýrů. Byla prokázána degradace až o 40 %. Cílem studie Adámek et al. (2021) bylo snížit množství biogenních aminů v sýru holandského typu. Při výrobě sýru přidal do startérové kultury kmeny *Lacticaseibacillus casei* a *Lactiplantibacillus plantarum*. Nejnižší koncentrace biogenních aminů byly stanoveny u sýru, do kterého byl přidán kmen *L. casei* CCDM 198. Po 28 dnech zrání došlo k degradaci o 32 %, po 56 dnech o 37 % a po 84 dnech o 32 %. Nejvýrazněji byl redukován fenylethylamin a tyramin. Fadda et al. (2001) zjistil, že bakterie kmene *Lactobacillus* izolované z klobás degradují tyramin. Největší aktivita tyraminoxidázy byla prokázána u *Lacticaseibacillus casei* CRL705 (98% degradace) a CRL678 (93 %), a také u *Lactiplantibacillus plantarum* CRL681 (69 %) a CRL682 (60 %). Ve studii Capozzi

et al. (2012) bylo testováno 26 kmenů *Lactiplantibacillus plantarum*, které byly izolovány z červeného vína, na schopnost redukovat obsah putrescinu a tyraminu v médiu. Nejvýraznější degradace byla zaznamenána u kmene *L. plantarum* NDT 09 (úbytek tyraminu o 22,12 %) a u kmene *L. plantarum* NDT 16 (úbytek putrescinu o 31,09 %). Callejón et al. (2014) se také zabýval degradací biogenních aminů bakteriemi mléčného kvašení, které byly izolovány z vín. U kmene *Lactiplantibacillus plantarum* byla zjištěna redukce v rozmezí 13–30 % u histaminu, 18–30 % u tyraminu a 26–41 % u putrescinu během jednoho týdne. Kmenu *Lactiplantibacillus plantarum* se také věnoval Niu et al. (2019), kdy ve své studii izoloval bakterie z čínského rýžového vína. *L. plantarum* CAU 3823 vykazoval největší potenciál pro degradaci biogenních aminů v MRS bujónu. Dokázal snížit koncentraci tryptaminu o 56 %, fenylethylaminu o 41 %, putrescinu o 42 %, kadaverinu o 43 %, tyraminu o 40 % a histaminu o 45 %. Ve studii Lee et al. (2016) byl použit kmen *Lactiplantibacillus plantarum* D-103 jako startérová kultura do vzorků miso (fementovaná pasta ze sójových bobů). Během fermentace došlo k celkové degradaci biogenních aminů o 27 %. Samotný histamin byl redukován dokonce o 58 %. Rabie et al. (2011) zkoumal, jak se změní obsah biogenních aminů v kysaném zelí, do kterého byly přidány bakterie kmene *Lactiplantibacillus plantarum* 2142, *Lacticaseibacillus casei* 2763 a *Latilactobacillus curvatus* 2771. Po 45 dnech skladování byl zjištěn obsah putrescinu 10krát nižší oproti kontrole. Množství histaminu a tyraminu bylo oproti kontrole minimální. Dapkevicius et al. (2000) zaznamenal schopnost degradace histaminu (50–54 %) v rybí siláži kmenem *Latilactobacillus sakei*.

Ze získaných výsledků vyplývá, že mléko bylo vhodným kultivačním médiem pro kmen *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198. Došlo k redukcí množství všech biogenních aminů. Nejvýraznější degradace byla pozorována u putrescinu, kadaverinu a histaminu. Bylo tedy dokázáno, že námi testovány kmen může být potencionálně využit pro zvýšení bezpečnosti mléčných produktů.

ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala kultivací kmene *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 a ověřením, zda je tento kmen schopen redukovat množství biogenních aminů (konkrétně fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu) v mléce. Byl sledován také vliv různých růstových podmínek na degradační schopnost tohoto kmene.

- pH mléka – 7,0; 6,2 a 5,4
- kultivační teplota – 30 °C, 23 °C a 11 °C

Bylo dokázáno, že testovaný kmen je schopný redukovat všechny studované biogenní aminy v mléce. Nejvýraznější degradace byla zjištěna u putrescinu, u kterého byl zaznamenán největší úbytek po 12 dnech o 46 % při pH 5,4 a teplotě 11 °C. Za těchto podmínek byl významně redukován také kadaverin a histamin. Koncentrace kadaverinu byla snížena o 32 % (po 14 dnech) a histaminu o 38 % (po 10 dnech). Výrazná degradace u těchto tří aminů byla pozorována také při pH 5,4 a teplotě 23 °C. Zde byl naměřen po 96 hodinách pokles putrescinu o 44 %, histaminu o 39 % a kadaverinu o 37 %. Degradální schopnost testovaného kmene byla prokázána také u fenylethylaminu a tyraminu, u kterých probíhala redukce nejlépe při pH 7 a teplotě 30 °C. Fenylethylaminu byl za těchto podmínek po 72 hodinách redukován o 29 % a tyramin o 23 %.

Na základě získaných výsledků této práce lze konstatovat, že kmen *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 je schopen výrazně snižovat množství biogenních aminů v mléce. Mohl by tedy být používán při výrobě mléčných produktů. Zabraňoval by tak hromadění biogenních aminů v potravinách a negativním dopadům na lidské zdraví.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ADÁMEK, R., PACHLOVÁ, V., SALEK, R. N., IRENA NĚMEČKOVÁ, I., BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L. Reduction of biogenic amine content in Dutch-type cheese as affected by the applied adjunct culture. *LWT - Food Science and Technology*. 2021, 152, 112397.
- ALVAREZ, M. A., MORENO-ARRIBAS, M. 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 and Technology*. 2014, 39(2), 146–155.
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science and Technology*. 1995, 6(10), 341–346.
- BENEŠ, Š. *Možnosti redukce obsahu biogenních aminů vybranými bakteriemi rodu Lactobacillus*. Zlín, 2020. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie potravin.
- BENKERROUM, N. Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016, 15(4), 801–826.
- BOVER-CID, S., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M. C. Changes in biogenic amine and polyamine contents in slightly fermented sausages manufactured with and without sugar. *Meat Science*. 2001, 57(2), 215–221.
- BOZKURT, H., ERKMEN, O. Effects of temperature, humidity and additives on the formation of biogenic amines in sucuk during ripening and storage periods. *Food Science nad Technology International*. 2004, 10(1), 21–28.
- BUŇKA, F., PACHLOVÁ, V., BUŇKOVÁ, L., ČERNÍKOVÁ, M. *Mlékárenská technologie I*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2013.
- BUŇKOVÁ, L., BUDINSKÝ, P., ADAMCOVÁ, G. Monitoring výskytu biogenních aminů ve fermentovaných mléčných výrobcích v ČR. *Mlékařské listy*. 2012, 134, 1–3.
- BURDYCHOVÁ, R. The influence of probiotic strain *L. casei* 01 on biogenic amines concentrations in fermented sausages Herkules. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2009, 57(5), 41–48.
- CALLEJÓN, S., SENDRA, R., FERRER, S., PARDO, I. Cloning and characterization of a new laccase from *Lactobacillus plantarum* J16 CECT 8944 catalyzing biogenic amines degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, 100, 3113–3124.

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*. 2014, 98(1), 185–198.

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*. 2012, 3, 1–6.

COOPER, R. A. On the amine oxidases of *Klebsiella aerogenes* strain W70. *FEMS Microbiology Letters*. 1997, 146, 85– 89.

DAMODARAN, S., PARKIN, K. L. *Fennema's Food Chemistry (5th Edition)*. CRC Press, 2017.

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

DE LAS RIVAS, B., MARCOBAL, Á., MUÑOZ, R. Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines. *FEMS Microbiology Letters*. 2005, 244(2), 367–372.

DEL RIO, L., REDRUELLO, B., LINARES D. M., LADERO, V., FERNANDEZ, M., MARTIN, M. C., RUAS-MADIEDO, P., ALVAREZ, M. A. The dietary biogenic amines tyramine and histamine show synergistic toxicity towards intestinal cells in culture. *Food Chemistry*. 2017, 218, 249–255.

DOEUN, D., DAVAATSEREN, M., CHUNG, M. S. Biogenic amines in foods. *Food Science and Biotechnology*. 2017, 26, 1463–1474.

EMBORG, J., LAURSEN, B. G., DALGAARD, P. Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2°C - effect of vacuum- and modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 2005, 101(3), 263–279.

EOM, J. S., SEO, B.Y., CHOI, H. S. Biogenic amine degradation by *Bacillus species* isolated from traditional fermented soybean food and detection of decarboxylase-related genes. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015, 25, 1523–1531.

- ESKIN, N. A. M., SHAHIDI, F. *Biochemistry of Foods* (3rd Edition). Elsevier, 2013.
- FADDA, S., VIGNOLO, G., OLIVER, G. Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and Kocuria strains. *Biotechnology Letters*. 2001, 23, 2015–2019.
- FOX, P. F., McSWEENEY, P. L. H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. London: Blackie Academic & Professional, 1998.
- GAJDŮŠEK, S. *Laktologie*. Brno: Mendlova zemědělská a lesnická univerzita, 2003.
- GARCÍA-RUIZ, A., GONZÁLEZ-ROMPINELLI, E. M., BARTOLOMÉ, B., MORENO-ARRIBAS, M. V. Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, 148(2), 115–120.
- GARDINI, F., ÖZOGUL, Y., SUZZI, G., TABANELLI, G., ÖZOGUL, F. Technological Factors Affecting Biogenic Amine Content in Foods: A Review. *Frontiers in Microbiology*. 2016, 7(1218).
- GAUCHERON, F. The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development*. 2005, 45, 473–483.
- GRIFFITHS, M. W. *Improving the Safety and Quality of Milk, Volume 1 - Milk Production and Processing*. Woodhead Publishing, 2010.
- GUETOUCHE, M., GUESSAS, B., MEDJEKAL, S. Composition and nutritional value of raw milk. *Biological Sciences and Pharmaceutical Research*. 2014, 2(10), 115–122.
- HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*. 1994, 5(2), 42–49.
- HAUG, A., HØSTMARK A. T., HARSTAD, O. M. Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids in Health and Disease*. 2007, 6(25), 1–16.
- HERNÁNDEZ-BORGES, J., D’ORAZIO, G., ATURKI, Z., FANALI, S. Nano-liquid chromatography analysis of dansylated biogenic amines in wines. *Journal of Chromatography. A*. 2007, 1147, 192–199.

- HERRERO-FRESNO, A., MARTÍNEZ, N., SÁNCHEZ-LLANA, E., DÍAZ, M., FERNANDÉZ, M., MARTIN, M.C., LADERO, V., ALVAREZ MIGUEL, A. *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International Journal of Food Microbiology*. 2012, 157(2), 297–304.
- CHIU, T. C., LIN, Y. W., HUANG, Y. F., CHANG, H. T. Analysis of biologically active amines by CE. *Electrophoresis*. 2006, 27, 23.
- CHONG, C. Y., BAKAR, F. A., RUSSLY, A. R., JAMILAH, B., MAHYUDIN, N. A. The effects of food processing on biogenic amines formation. *International Food Research Journal*. 2011, 18(3), 867–876.
- JANUSZ, G., PAWLIK, A., ŚWIDERSKA-BUREK, U., POLAK, J., SULEJ, J., JAROSZ-WILKOŁAZKA, A., PASZCZYŃSKI, A. Laccase properties, physiological functions, and evolution. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21.
- KAŠIČKA, V. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické Listy*. 1997, 91, 326–329.
- KODÍČEK, M. *Elisa*. In: Biochemické pojmy: výkladový slovník [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007.
- KOHAJDOVÁ, Z., KAROVIČOVÁ, J. Biogénne aminy v potravinách. *Potravinárstvo*. 2008, 2(1), 30–49.
- KOMÁREK, K., FRANC, J., CHURÁČEK, J. *Reakční chromatografie v organické analýze*. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1989.
- KŘÍŽEK, M. A HLAVATÁ, V. Stanovení vybraných biogenních aminů v pivu. *Kvasný průmysl*. 1995, 41.
- LATORRE-MORATALLA, M. L., BOVER-CID, S., AYMERICH, T., MARCOS, B., VIDAL-CAROU, M. C., GARRIGA, M. Aminogenesis control in fermented sausages manufactured with pressurized meat batter and starter culture. *Meat Science*. 2007, 75(3), 460–469.
- LEE, Y. C., LIN, C. SAINT, LIU, F. L., HUANG, T. C., TSAI, Y. H. Degradation of histamine by *Bacillus polymyxa* isolated from salted fish products. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2015, 23, 836–844.

LEE, Y. CH, KUNG, H. F., HUANG, Y. L., WU, CH. H., HUANG, Y. R., TSAI, Y. H. Reduction of Biogenic Amines during Miso Fermentation by *Lactobacillus plantarum* as a Starter Culture. *Journal of Food Protection*. 2016, 79(9), 1556–1561.

LEUSCHNER, R. G., HEIDEL, M., HAMMES, W. P. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 1998, 39, 1–10.

LI, W., PAN, Y., LIU, Y., ZHANG, X., YE, J., CHU, Q. Simultaneous Determination of Eight Typical Biogenic Amines by CZE with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection. *Chromatographia*. 2014, 77, 287–292.

LINARES, D. M., DEL RIO, B., LADERO, V., MARTÍNEZ, N., FERNÁNDEZ, M., MARTÍN, M. C., ÁLVAREZ, M. A. Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in Microbiology*. 2012, 3(180).

LINARES, D. M., MARTÍN, M. C., LADERO, V., ALVAREZ, M. A., FERNÁNDEZ, M. Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011, 51(7), 691–703.

LOIZZO, M. R., MENICHINI, F., PICCI, N., PUOCI, F., SPIZZIRRI, U. G., RESTUCCIA, D. Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese. *Trends in Food Science & Technology*. 2013, 30(1), 38–55.

LORENCOVÁ, E., BUŇKOVÁ, L., MATOULKOVÁ, D., DRÁB, V., PLEVA, P., KUBÁŇ, V., BUŇKA, F. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *International Journal of Food Science and Technology*. 2012, 47(10), 2086–2091.

MAH, J. H., HWANG, H. J. Effects of food additives on biogenic amine formation in Myeolchi-jeot, a salted and fermented anchovy (*Engraulis japonicus*). *Food Chemistry*. 2009a, 114(1), 168–173.

MAH, J. H., HWANG, H. J. Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. *Food Control*. 2009c, 20(9), 796–801.

MAH, J. H., KIM, Y. J., HWANG, H. J. Inhibitory effects of garlic and other spices on biogenic amine production in Myeolchi-jeot, Korean salted and fermented anchovy product. *Food Control*. 2009b, 20(5), 449–454.

MANTOANELLI, J. O. F., GONÇALVES, L. M., PEREIRA, E. A. Dansyl Chloride as a Derivatizing Agent for the Analysis of Biogenic Amines by CZE-UV. *Chromatographia*. 2020, 83, 767–778.

MARTUSCELLI, M., CRUDELE, M.A., GARDINI, F., SUZZI, G. Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. *Letters in Applied Microbiology*. 2000, 31, 228–232.

McSWEENEY, P. L. H., FOX, P. F. *Advanced Dairy Chemistry, Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents*. New York: Springer Science, 2009.

MENDES, R., SILVA, H. A., NUNES, M. L. AND EMPIS, J. M. A. Deteriorative changes during ice storage of irradiated blue jack mackerel. *Journal of Food Biochemistry*. 2000, 24(2), 89–105.

MIN, J. S., LEE, S., JANG, A., JO, C., LEE, M. Control of microorganisms and reduction of biogenic amines in chicken breast and thigh by irradiation and organic acids. *Poultry Science*. 2007, 86(9), 2034–2041.

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(7).

Nařízení Komise (ES) 1441/2007 ze dne 5. prosince 2007 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. In: *EUR – Lex* [European Union law].

NEI, D., KAWASAKI, S., INATSU, Y., YAMAMOTO, K., SATOMI, M. Effectiveness of gamma irradiation in the inactivation of histamine-producing bacteria. *Food Control*. 2012, 28(1), 143–146.

NIU, T., LI, X., GUO, Y., MA, Y. Identification of a Lactic Acid Bacteria to Degrade Biogenic Amines in Chinese Rice Wine and Its Enzymatic Mechanism. *Foods*. 2019, 8(8), 312.

NOVELLA-RODRIGUEZ, S., VECIANA-NOGUES, M. T., SALDO, J., VIDAL-CAROU, M. C. Effects of high hydrostatic pressure treatments on biogenic amine contents in goat cheeses during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50(25), 7288–7292.

ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. 2007, 103, 475–1486.

ORDÓÑEZ, J. L., TRONCOSO, A. M., GARCÍA-PARRILLA, M. D. C., CALLEJÓN, R. M. Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages – A review. *Analytica Chimica Acta*. 2016, 939, 10–25.

ÖZOGUL, F., ÖZOGUL, Y. Biogenic amine content and biogenic amine quality indices of sardines (*Sardina pilchardus*) stored in modified atmosphere packaging and vacuum packaging. *Food Chemistry*. 2006, 99(3), 574–578.

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*. 2018a, 98, 128–142.

PAPAGEORGIOU, M., LAMBROPOULOU, D., MORRISON, C., NAMIEŚNIK, J., PŁOTKA-WASYLKA, J. Direct solid phase microextraction combined with gas chromatography – Mass spectrometry for the determination of biogenic amines in wine. *Talanta*. 2018, 183, 276–282.

PETERS, L. J., KOVACIC, J. P. Histamine: metabolism, physiology, and pathophysiology with applications in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2009, 19(4), 311–328.

PIŠTĚKOVÁ, H., JANČOVÁ, P., BERČÍKOVÁ, L., BUŇKA, F., SOKOLOVÁ, I., ŠOPÍK, T., MARŠÁLKOVÁ, K., PACHECO DE AMARAL, O. M. R., BUŇKOVÁ, L. Application of qPCR for multicopper oxidase gene (MCO) in biogenic amines degradation by *Lactobacillus casei*. *Food Microbiology*. 2020, 91, 103550.

RABIE, M. A., SILIHA, H. I., EL-SAYDY, S. M., EL-BADAWY, A. A., XAVIER MALCATA, F. Effect of γ -irradiation upon biogenic amine formation in blue cheese during storage. *International Dairy Journal*. 2011, 21(5), 373–376.

RABIE, M. A., SILIHA, H., EL-SAIDY, S., EL-BADAWY, A. A., MALCATA, F. X. Effects of γ -irradiation upon biogenic amine formation in Egyptian ripened sausages during storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2010, 11(4), 661–665.

RABIE, M. A., SILIHA, H., EL-SAIDY, S., EL-BADAWY, A. A., MALCATA, F. X. Reduced biogenic amine contents in *sauerkraut* via addition of selected lactic acid bacteria. *Food Chemistry*. 2011, 129, 1778–1782.

RUIZ-CAPILLAS, C., JIMÉNEZ COLMENERO, F., CARRASCOSA, A. V., MUÑOZ, R. Biogenic amine production in Spanish dry-cured “chorizo” sausage treated with high-pressure and kept in chilled storage. *Meat Science*. 2007, 77(3), 365–371.

SANTOS, M. H. S. Biogenic amines: Their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, 29(2–3), 213–231.

SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 1996, 29(7), 675–690.

SMIT, A. Y., DU TOIT, W. J., DU TOIT, M. Biogenic Amines in Wine: Understanding the Headache. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 2008, 29, 2.

ŠNIRC, J., GOLIAN, J., HERIAN, K., BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., ČANIGOVÁ, M. *Mlieko a mliečne výrobky. I. diel, Štruktúra, bioaktívne zložky a spracovanie mlieka*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2015.

TAPINGKAE, W., TANASUPAWAT, S., PARKIN, K. L., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W. Degradation of histamine by extremely halophilic archaea isolated from high salt-fermented fishery products. *Enzyme nad Microbial Technology*. 2010, 46(2), 92–99.

TEN BRINK, B., DAMINK, B., JOOSTEN, H. M. L. J., HUIS IN 'T VELD, J. H. J. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1990, 11(1), 73–84.

TITTARELLI, F., PERPETUINI, G., DI GIANVITO, P., TOFALO, R. Biogenic amines producing and degrading bacteria: A snapshot from raw ewes' cheese. *Lwt*. 2019, 101, 1–9.

TRAYLOR, J., MATHEW, D. *Histamine Toxicity* [online]. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2020.

TROCH, T., LEFÉBURE, E., BAETEN, V., COLINET, F., GENGLER, N., SINDIC, M. Cow milk coagulation: process description, variation factors and evaluation methodologies. A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 2017, 21(4), 276–287.

WÓJCIK, W., ŁUKASIEWICZ, M., PUPPEL, K. Biogenic amines: formation, action and toxicity – a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2021, 101(7), 2634–2640.

WUNDERLICOVÁ, L., BUŇKOVÁ, L., KOUTNÝ, M., JANČOVÁ, P., BUŇKA, F. Formation, Degradation, and Detoxification of Putrescine by Foodborne Bacteria: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2014, 13(5), 1012–1030.

YUECEL, U., UEREN, A. Biogenic amines in Turkish type pickled cabbage: effects of salt and citric acid concentration. *Acta Alimentaria*. 2008, 37(1), 115–22.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|------|---|
| BA | Biogenní aminy |
| DAO | Diaminooxidáza |
| MAO | Monoaminooxidáza |
| HHP | Vysoký hydrostatický tlak |
| TLC | Tenkvrstvá chromatografie |
| GC | Plynová chromatografie |
| IEC | Iontově-výměnná chromatografie |
| CZE | Kapilární zónová elektroforéza |
| HPLC | Vysoce účinná kapalinová chromatografie |
| PCR | Polymerázová řetězová reakce |
| DAD | Detektor diodového pole |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|--|----|
| Obr. 1 Strukturní vzorce biogenních aminů (Chong et al., 2011)..... | 13 |
| Obr. 2 Syntéza biogenních aminů histaminu, tyraminu, tryptaminu, 2-fenylethylaminu a kadaverinu (Kohajdová et al., 2008)..... | 15 |
| Obr. 3 Syntéza putrescinu, sperminu a spermidinu (Kohajdová et al., 2008) | 16 |
| Obr. 4 Degradace tyraminu enzymem aminooxidázou (upraveno podle Cooper, 1997) ... | 22 |
| Obr. 5 Degradace histaminu enzymem histamindehydrogenázou (upraveno podle Lee et al., 2015)..... | 23 |
| Obr. 6 Vznik dansyl-derivátu (upraveno podle Komárek et al., 1989)..... | 25 |
| Obr. 7 Degradace fenylethylaminu při 30 °C a různém pH..... | 38 |
| Obr. 8 Degradace putrescinu při 30 °C a různém pH | 39 |
| Obr. 9 Degradace kadaverinu při 30 °C a různém pH | 40 |
| Obr. 10 Degradace histaminu při 30 °C a různém pH | 41 |
| Obr. 11 Degradace tyraminu při 30 °C a různém pH | 42 |
| Obr. 12 Degradace fenylethylaminu při teplotě 23 °C a různém pH..... | 43 |
| Obr. 13 Degradace putrescinu při teplotě 23 °C a různém pH | 44 |
| Obr. 14 Degradace kadaverinu při teplotě 23 °C a různém pH | 45 |
| Obr. 15 Degradace histaminu při teplotě 23 °C a různém pH | 46 |
| Obr. 16 Degradace tyraminu při teplotě 23 °C a různém pH..... | 47 |
| Obr. 17 Degradace fenylethylaminu při teplotě 11 °C a různém pH..... | 48 |
| Obr. 18 Degradace putrescinu při teplotě 11 °C a různém pH | 49 |
| Obr. 19 Degradace kadaverinu při teplotě 11 °C a různém pH | 50 |
| Obr. 20 Degradace histaminu při teplotě 11 °C a různém pH | 51 |
| Obr. 21 Degradace tyraminu při teplotě 11 °C a různém pH..... | 52 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|--|----|
| Tab. 1 Průměrné složení sušiny kravského mléka (upraveno podle Buňka et al., 2013).... | 27 |
| Tab. 2 Obvyklý obsah vitamínů v mléce (upraveno podle McSweeney&Fox, 2009)..... | 30 |
| Tab. 3 Zastoupení minerálních látek v mléce (upraveno podle Fox & McSweeney, 1998) | 31 |
| Tab. 4 Jednotlivé odběrové časy při daných teplotách | 36 |