

Vliv vnějších faktorů na dekarboxylázovou aktivitu *Lactobacillus curvatus in vitro* a v mléce

Bc. Michal Rybenský, DiS.

Diplomová práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Michal Rybenský, DiS.**
Osobní číslo: **T12394**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Vliv vnějších faktorů na dekarboxylázovou aktivitu
Lactobacillus curvatus in vitro a v mléce**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika a vznik biogenních aminů.
2. Vnější faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů.
3. Metody stanovení biogenních aminů.
4. Taxonomické zařazení, charakteristika, význam a využití bakterie *Lactobacillus curvatus* v potravinářství.

II. Praktická část

1. Sledování vybraných faktorů (teploty, pH, přidavku NaCl a laktózy) na produkci biogenních aminů u *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* v podmínkách in vitro
2. Sledování vybraných faktorů (teploty, pH, přidavku NaCl a aminokyselin) na produkci biogenních aminů u *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* v mléce
3. Zpracování výsledků a jejich diskuse.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] PRIYADARSHANI, W.M.D., RAKSHIT, S.K., 2011. Screening selected strains of probiotic lactic acid bacteria for their ability to produce biogenic amines (histamine and tyramine), *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 2062-2069.
- [2] MARCOBAL, Á., MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J., MORENO-ARRIBAS, M.V., MUNOZ, R. 2006. A multifactorial design for studying factors influencing growth and tyramine production of the lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* CECT 4669 and *Enterococcus faecium* BIFI-58. *Research in Microbiology*, 157, 417-424.
- [3] LINARES, D.M., MARTÍN, M., LADERO, V., AIVAREZ, M. A., FERNÁNDEZ, M., 2011. Biogenic amines in dairy products, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 691-703.
- [4] LORENCOVÁ, E., BUŇKOVÁ, L., MATOULKOVÁ, D., DRÁB, V., PLEVA, P., KUBÁŇ, V., BUŇKA, F., 2012. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 2086-2091.
- [5] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., POLLAKOVÁ, E., PODEŠVOVÁ, T., DRÁB, V. 2011. The effect of lactose, NaCl and an aero/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 147, 112-119.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

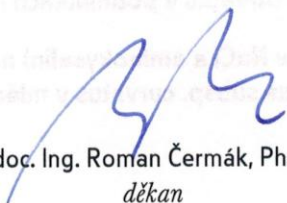
Datum zadání diplomové práce:

10. ledna 2014

Termín odevzdání diplomové práce:

25. dubna 2014

Ve Zlíně dne 3. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




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

Příjmení a jméno: RYBENSKÝ MICHAL

Obor: THEVP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 23. 4. 2014

Rybenský

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Diplomová práce byla zaměřena na prozkoumání dekarboxylázové aktivity bakterií *Lactobacillus curvatus*. Teoretická část práce obsahuje charakteristiku biogenních aminů, včetně jejich významu, toxických účinků a výskytu v potravinách. Dále se zabývá vnějšími faktory ovlivňujícími produkci biogenních aminů a metodami jejich stanovení. V závěru teoretické části je věnována pozornost charakteristice rodu *Lactobacillus* a jeho významu v potravinářství.

V praktické části byly aplikovány vybrané faktory (pH, obsah NaCl, obsah laktózy a teplota kultivace) ovlivňující růst bakterie *Lactobacillus curvatus* a její produkci biogenních aminů. Produkce biogenních aminů byla analyzována pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detekcí po derivatizaci danzylchloridem. Testovaná bakterie produkovala pouze tyramin a spermin. Tyramin byl produkován v koncentracích 1,33 až 52,28 mg/l, kdy nejvyšší koncentrace tyraminu bylo dosaženo při iniciačním pH 6,8 v kombinaci s 4,80 % (w/v) laktózy, bez přídavku NaCl a teplotě kultivace při 37 °C. Produkce sperminu byla v průběhu kultivace kolísavá a nejvyšší množství bylo stanoveno při teplotě kultivace 10 °C v podmínkách *in vitro* bez přídavku NaCl a laktózy.

Klíčová slova: biogenní aminy, *Lactobacillus curvatus*, dekarboxylázová aktivita, HPLC, danzylchlorid, tyramin, spermin

ABSTRACT

This thesis was focused on the examination of decarboxylase activity of bacteria *Lactobacillus curvatus*. Theoretical part of the thesis contains characterization of biogenic amines, with their significance, toxic effects and their occurrence in food. It also deals with external factors influencing the production of biogenic amines and methods of their determination. In the end of theoretical part, its paid attention to the characteristics of the genus *Lactobacillus* and its importance in the food industry.

In the practical part of the thesis, selected factors were applied (pH, NaCl content, lactose content and cultivation temperature) to affect the growth of bacteria *Lactobacillus curvatus* and its production of biogenic amines. The production of biogenic amines was analysed by high performance liquid chromatography with UV/VIS detection after derivatization with dansyl chloride. The tested bacteria produced only tyramine and spermine. Tyramine was produced in concentrations from 1,33 to 52,28 mg/l, where the highest concentration of tyramine was achieved by initiating pH 6,8 in combination with 4,80 % (w/v) lactose, without the addition of NaCl, and cultured at a temperature 37 °C. Production of spermine was fluctuating during cultivation, and the highest rate was determined at 10 °C, culturing *in vitro* without the addition of NaCl and lactose.

Keywords: biogenic amines, *Lactobacillus curvatus*, decarboxylase activity, HPLC, dansylchloride, tyramine, spermine

Velice rád bych tímto způsobem poděkoval vedoucí mé diplomové práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a optimizmus při řešení všech problémů. Rád bych poděkoval i Ing. Evě Lorencové za trpělivost a cenné připomínky k praktické části mé práce. Dále bych chtěl poděkovat Ing. et Ing. Ludmile Zálešákové za její přívětivost, ochotu a pomoc v laboratoři.

Velké poděkování patří také mé přítelkyni Monice Svačinové za trpělivost a podporu během psaní diplomové práce.

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

OBSAH

ÚVOD	12
I TEORETICKÁ ČÁST	13
1 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ	14
1.1 STRUKTURA A VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ	14
1.1.1 Monoaminy – tyramin a histamin	17
1.1.2 Diaminy – kadaverin a putrescin.....	17
1.1.3 Polyaminy – spermidin a spermin	17
1.2 TOXICITA BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ	18
1.3 LEGISLATIVA	18
1.4 FYZIOLOGICKÝ VÝZNAM	19
1.5 VÝSKYT V POTRAVINÁCH	19
1.5.1 Fermentované potraviny.....	20
1.5.2 Nefermentované potraviny.....	21
2 VNĚJŠÍ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU BIOGENNÍCH AMINŮ	22
2.1 VLIV PH	22
2.2 VLIV TEPLoty	22
2.3 VLIV KONCENTRACE NaCl	23
2.4 VLIV PŘÍTOMNOSTI KYSLÍKU	23
2.5 PŘÍTOMNOST SACHARIDŮ A DALŠÍCH FAKTORŮ	24
3 METODY STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	25
3.1 CHROMATOGRafICKÉ METODY	25
3.1.1 Tenkovrstevná chromatografie (TLC).....	25
3.1.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	26
3.1.3 Ionově výměnná chromatografie.....	26
3.1.4 Plynová chromatografie	27
3.2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE.....	27
3.3 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA	28
3.3.1 Zónová kapilární elektroforéza	28
3.3.2 Micelární elektrokinetická chromatografie	28
3.4 IMUNO-ENZYMATICKE METODY	29
4 ROD LACTOBACILLUS	30

4.1	CHARAKTERISTIKA RODU <i>LACTOBACILLUS</i>	30
4.2	TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ RODU <i>LACTOBACILLUS</i>	30
4.3	MORFOLOGIE.....	32
4.4	FYZIOLOGICKÉ VLASTNOSTI	32
4.5	VÝSKYT.....	35
4.6	VÝZNAM A VYUŽITÍ V POTRAVINÁŘSTVÍ.....	35
4.7	<i>LACTOBACILLUS CURVATUS</i>	36
II	PRAKTICKÁ ČÁST	37
5	CIL PRÁCE	38
6	MATERIÁL A METODIKA	39
6.1	POUŽITÁ KULTURA A JEJÍ POMNOŽENÍ.....	39
6.2	KULTIVAČNÍ MÉDIA A ROZTOKY	39
6.2.1	MRS agar.....	39
6.2.2	MRS bujón s aminokyselinami	39
6.2.3	Modifikovaný bujón MRS	40
6.2.4	Fyziologický roztok.....	41
6.2.5	Mléko	41
6.3	TEPLOTY KULTIVACE A ODBĚROVÝ ČAS	42
6.4	MĚŘENÍ OPTICKÉ HUSTOTY, CPM A pH.....	42
6.5	PŘEDDERIVATIZAČNÍ ÚPRAVA VZORKŮ A DERIVATIZACE	42
6.6	VLASTNÍ CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ.....	43
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	44
7.1	PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ V PODMÍNKÁCH <i>IN VITRO</i>	44
7.1.1	Produkce tyraminu při kultivační teplotě 37 °C.....	44
7.1.2	Produkce sperminu při kultivační teplotě 37 °C	50
7.1.3	Měření nárůstu buněk při teplotě 37 °C	50
7.1.4	Stanovení pH kultivačního média po kultivaci při 37 °C	52
7.1.5	Produkce tyraminu při kultivační teplotě 10 °C.....	53
7.1.6	Produkce sperminu při kultivační teplotě 10 °C	58
7.1.7	Měření nárůstu buněk během kultivaci při 10 °C	58
7.1.8	Stanovení pH kultivačního média po kultivaci při 10 °C	60
7.2	PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ V MLÉCE.....	61
7.2.1	Produkce biogenních aminů při 37 °C	61
7.2.1.1	Stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM)	63
7.2.1.2	Stanovení pH kultivačního média.....	63
7.2.2	Produkce biogenních aminů při 10 °C	64
7.2.2.1	Stanovení celkového počtu mikroorganismů.....	66
7.2.2.2	Stanovení pH kultivačního média.....	66
7.3	SOUHRNNÁ DISKUZE.....	67
	ZÁVĚR	71
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	72

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	81
SEZNAM OBRÁZKŮ	83
SEZNAM TABULEK.....	86
SEZNAM PŘÍLOH.....	87

ÚVOD

V současné době je v souvislosti s výrobou, zpracováním či skladováním potravin kladen důraz na kvalitu, bezpečnost a zdravotní nezávadnost výrobků. Nežádoucí látky se do potravin mohou dostat z vnějšího prostředí nebo vznikají přímo v potravine činností nejrůznějších mikroorganismů. Prakticky všechny potraviny, které obsahují proteiny nebo volné aminokyseliny, a kde jsou přítomny MO s dekarboxylázovou aktivitou, umožňují tvorbu biogenních aminů.

Biogenní aminy jsou dusíkaté sloučeniny, v malém množství nepostradatelné pro živé organismy. V lidském organismu mají řadu nezbytných funkcí, jsou důležité pro růst, stavbu a metabolismus každého orgánu v těle.

Vysoká koncentrace BA naopak vyvolává nežádoucí vazoaktivní a psychoaktivní účinky, například změny krevního tlaku, nevolnost, zvracení, alergické reakce, dýchací potíže, bolesti hlavy, anafylaktický šok a další.

Decarboxylázová činnost bakterií může být ovlivněna některými vnějšími faktory. Nejdůležitějšími faktory jsou pH prostředí, koncentrace NaCl, přítomnost zkvasitelných sacharidů, optimální teplota, aero/anaerobní prostředí, přítomnost růstových faktorů a jiné.

Problematikou vzniku a potlačení biogenních aminů se zabývá mnoho studií, které by v budoucnu mohly pozitivně ovlivnit například technologii výroby potravin, sensorické vlastnosti potravin, a tím i zdraví člověka.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ



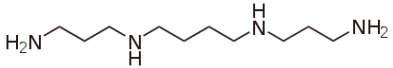
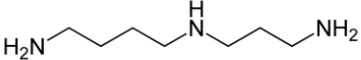
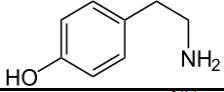
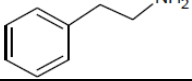
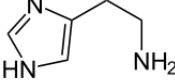
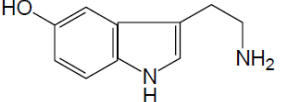
Biogenní aminy (BA) jsou organické nízkomolekulární dusíkaté báze, které jsou syntetizovány mikrobiálním, rostlinným a živočišným metabolismem. V současné době známe přibližně 40 BA. Mezi nejznámější patří histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, tryptamin, fenyletylamin, spermin a spermidin. V potravinách a nápojích vznikají pomocí enzymů ze surovin nebo jsou tvořeny mikrobiální dekarboxylací aminokyselin. Mohou být použity jako ukazatele stupně čerstvosti nebo kažení potravin, obecně lze BA považovat za indikátory kvality potravin (Santos, 1996; Fialová a kol., 2013)

1.1 Struktura a vznik biogenních aminů

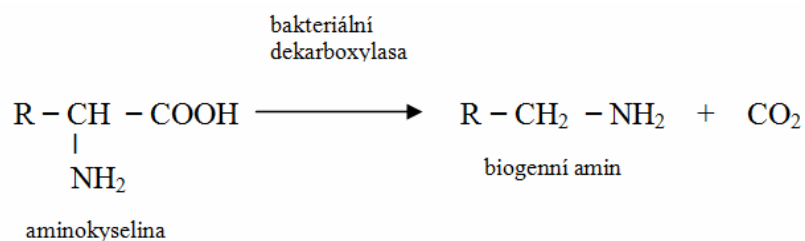
Podle chemické struktury (Tabulka 1) se biogenní aminy dělí na:

- alifatické (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin)
- aromatické (tyramin, fenyletylamin)
- heterocyklické (histamin, tryptamin) (Mayer a kol., 2010)

Tabulka 1: Systematický název a chem. struktura vybraní zástupci BA (Önal a kol., 2013).

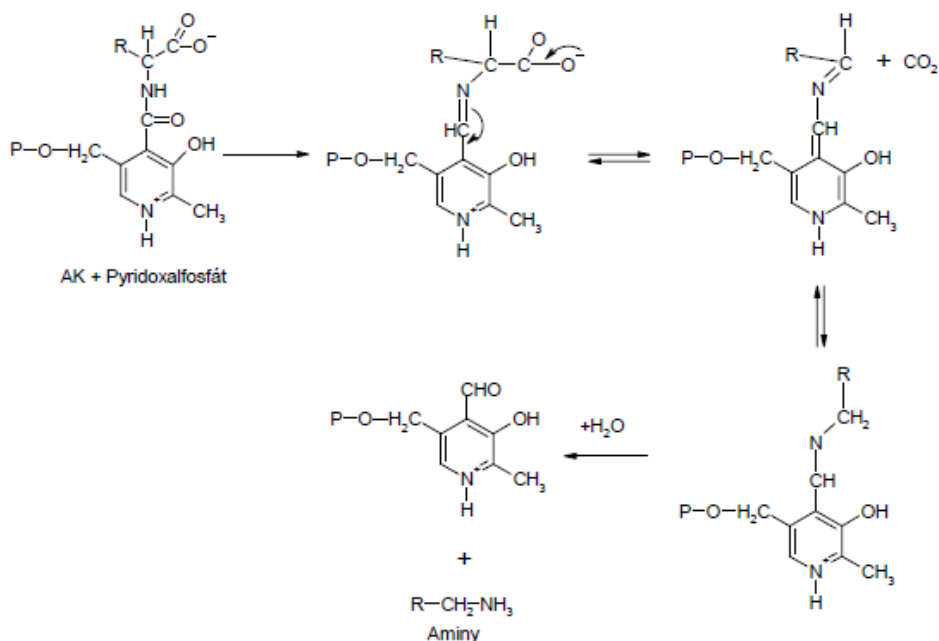
Název triviální	Název systematický	Chemická struktura	Strukturní vzorec
putrescin	butan-1,4-diamin	alifatické	
kadaverin	pentan-1,5-diamin	alifatické	
spermin	N,N'-bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin	alifatické	
spermidin	N-(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin	alifatické	
tyramin	4-(2-aminoethyl)fenol	aromatické	
fenyletylamin	2-fenyletylamin	aromatické	
histamin	2-(1H-imidazol-5-yl)etylamin	heterocyklické	
tryptamin	2-(1H-indol-3-yl)etylamin	heterocyklické	

Biogenní aminy vznikají především dekarboxylací aminokyselin pomocí dekarboxyláz produkovaných mikroorganismy (Obrázek 1, 3) nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů (Santos, 1996). Pro vznik BA je důležitá řada enzymů ze skupiny EC 4.1.1. (třída dekarboxyláz) (Černý a kol., 2009). Tyto enzymy jsou rozdílné pro různé druhy MO. Bakteriální dekarboxylázy jsou většinou specificky zaměřeny na určité aminokyseliny, především L – formy (Greif a kol., 2006). Těmito dekarboxylázami jsou vybaveny četné druhy proteolytických bakterií, ale také řada druhů bakterií mléčného kvašení (Smělá a kol., 2003).

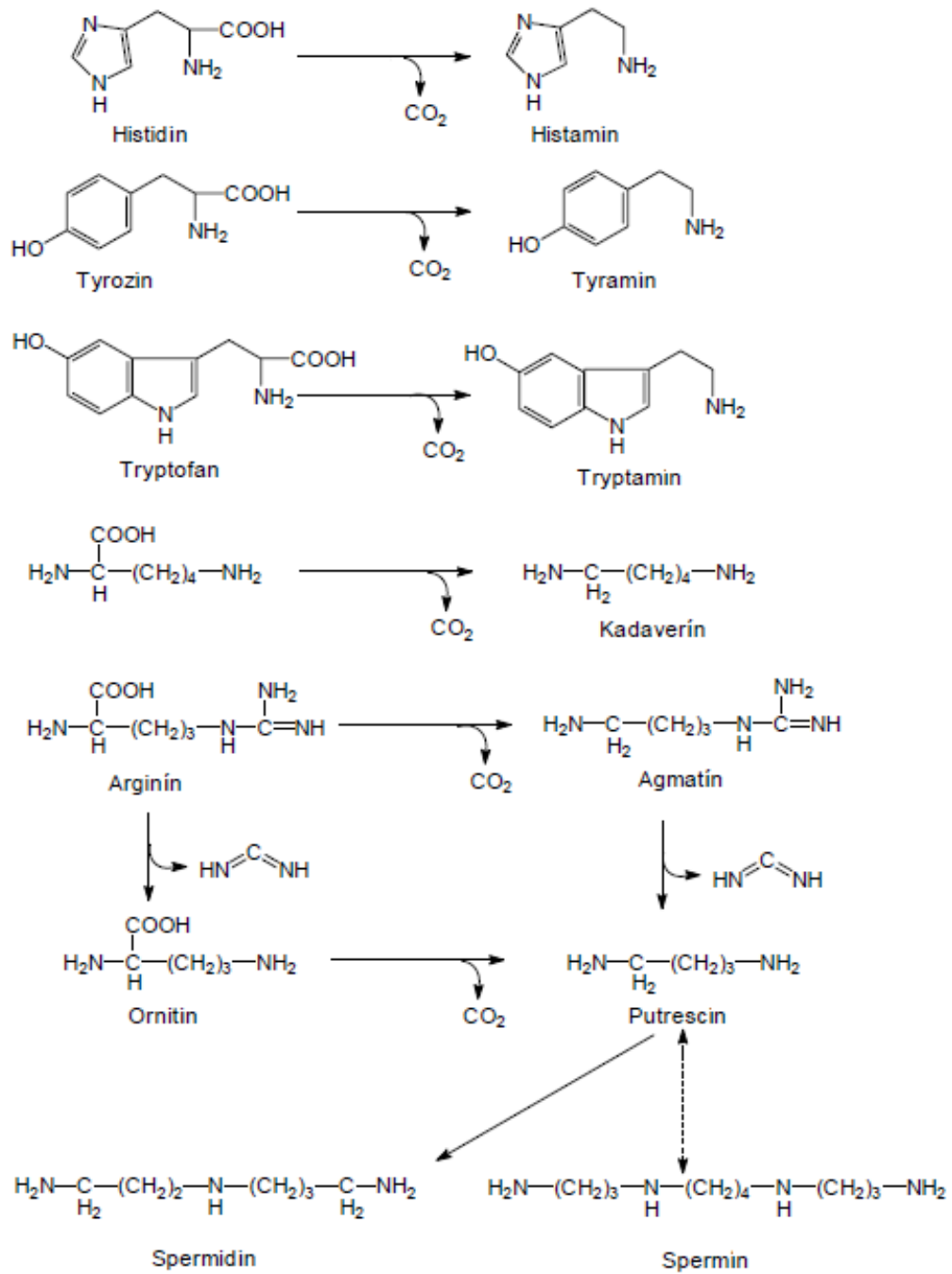


Obrázek 1: Vznik biogenního aminu z aminokyseliny (Hudcová, 2012).

Reakcí aminoskupiny α -aminokyseliny s karbonylovou skupinou prostetické skupiny enzymu vznikají přechodné iminosloučeniny nazývané jako Schiffovy báze. Tyto sloučeniny jsou stabilizovány danými kofaktory. Jako kofaktor se reakce zúčastňuje pyruvoylový zbytek nebo pyridoxalfosfát. Vytvořená nová Schiffova báze je dekarboxylována a eliminací vody vzniká daný amin (viz Obrázek 2) (Shalaby, 1996).



Obrázek 2: Dekarboxylace L-aminokyselin přes pyridoxalfosfát (Kohajdová a kol., 2008).



Obrázek 3: Nejčastěji se vyskytující biogenní aminy v potravinách a jejich vznik (Kohajdová a kol., 2008)

1.1.1 Monoaminy – tyramin a histamin

Dekarboxylace tyrozinu některými bakteriemi mléčného kvašení vede k nežádoucí přítomnosti tyraminu ve fermentovaných potravinách. Tyramin je nejčastější biogenní amin přítomný v sýrech a je také běžně se vyskytující i v jiných fermentovaných potravinách a nápojích (Fernández a kol., 2006). Mnoho bakterií mléčného kvašení v potravinách tvoří z tyrozinu tyramin. Tyto bakterie patří do rodů *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus* nebo *Carnobacterium* (Lucas a kol., 2003).

Histamin je obsažen v žírných buňkách a bazofilích a jeho biologické účinky jsou obvykle znát pouze při uvolnění ve velkém množství v průběhu alergické nebo dalších reakcí. Histamin se váže na receptory buněčných membrán v respiračním, kardiovaskulárním, gastrointestinálním a imunologickém systému a kůži. Existují tři typy receptorů H₁, H₂ a H₃. Histamin způsobuje dilataci periferních cév, kapilár a tepen, což vede k hypotenzi, návalům horka a bolestem hlavy (Karovičová a Kohajdová, 2003).

1.1.2 Diaminy – kadaverin a putrescin

Kadaverin i putrescin se řadí mezi diaminy a podle chemické struktury mezi alifatické aminy. Zvýšené koncentrace kadaverinu a putrescinu lze pozorovat při kažení potravin (Pircher a kol., 2007). Tyto diaminy nejsou toxické jako takové, ale mohou zvýšit toxicitu aromatických aminů (např. tyraminu) tím, že blokují jejich detoxikaci nebo zvyšují jejich absorpci (Bover Cid a kol., 2008).

1.1.3 Polyaminy – spermidin a spermin

Spermidin a spermin se řadí mezi alifatické polyaminy. Oba jsou nepostradatelné složky živých buněk, dále jsou důležité pro regulaci funkce nukleových kyselin a syntézu bílkovin a pravděpodobně také ke stabilizaci membrán (Santos, 1996). Polyaminy se zřejmě podílejí i na růstu a množení buněk. To se může příznivě projevat například při hojení ran nebo nepříznivě pro nežádoucí růst nádorů (Smělá a kol., 2003).

1.2 Toxicita biogenních aminů a polyaminů

Některé biogenní aminy, jako jsou histamin, tyramin a putrescin, jsou nezbytné pro mnoho fyziologických funkcí u člověka a zvířat, neboť v živých organizmech vykazují významnou biologickou aktivitu. Pro zdravého člověka běžná množství těchto metabolitů v potravinách a nápojích (cca < 100 mg/kg) nepředstavují významnější riziko, protože jsou metabolizovány v lidském střevním traktu činností detoxikačních enzymů (Santos, 1996).

Konzumace potravin obsahujících vysoké koncentrace může mít toxické účinky (Santos, 1996; Halász a kol., 1994). Toxická dávka pro histamin je 70 – 100 mg/kg, pro tyramin 20 – 80 mg/kg. Celkový obsah tyraminu, putrescinu, kadaverinu a histaminu by neměl v dané potravíně překročit 900 mg/kg (Černý a kol., 2009). Vysoká množství BA mohou vyvolat nežádoucí psychoaktivní a vazoaktivní účinky, například kolísání krevního tlaku, bolesti hlavy, nevolnost, zvracení, dýchací potíže, anafylaktický šok a jiné (Mayer a kol., 2010).

Nejznámější potravinové intoxikace způsobené biogenními aminy se vztahují na histamin a tyramin (Santos, 1996, Deepika a kol., 2011), zejména co se týče konzumace sýrů nebo ryb (Santos, 1996, Shalaby, 1996; Černý a kol., 2009). Na druhé straně je třeba vzít v úvahu, že sekundární aminy, jako jsou putrescin a kadaverin, mohou reagovat s dusitany a tvořit heterocyklické karcinogenní nitrosaminy (Santos, 1996).

Některé aminy mohou mít přímý nebo nepřímý vliv na lidský kardiovaskulární a nervový systém. Další aminy, kadaverin a putrescin, hrají důležitou roli v potravinové intoxikaci, protože mohou zesilovat toxicitu tyraminu a histaminu (Mayer a kol., 2010).

1.3 Legislativa

V poslední době je věnována velká pozornost sledování výskytu biogenních aminů v různých potravinách a nápojích. Legislativně je stanoven pouze obsah histaminu v rybách a rybích výrobcích a to Nařízením komise (ES) č. 2073/2005. Pro produkty rybolovu a některé druhy ryb je povolený limit 100 – 200 mg/kg. Pro produkty rybolovu a ryby s vysokým obsahem histidinu, které byly ošetřeny enzymatickým zráním v láku, je povolený limit 200-400 mg/kg (Nařízením komise (ES) č. 2073/2005).

1.4 Fyziologický význam

Kromě jejich biologické role jako zdroje dusíku a prekurzorů pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů, jsou aminy také důležité jako komponenty aroma potravin. Polyaminy (putrescin, spermidin, spermin) jsou nepostradatelnými složkami všech živých buněk. V rostlinách se putrescin a polyaminy spermidin a spermin podílejí na řadě fyziologických procesů, jako je buněčné dělení, kvetení, růst ovoce, reakce na stres a stárnutí. Polyaminy jsou důležité pro růst, stavbu a metabolismus každého orgánu v těle (Karovičová a Kohajdová, 2003; Santos, 1996).

Polyaminy jsou nezbytné pro udržení vysoké metabolické aktivity normálně fungujícího imunologického systému ve střevech. Spermin a spermidin se rovněž podílí na vývoji střevní tkáně. I když každá buňka má určitou schopnost syntetizovat polyaminy, zdá se, že tělo také spoléhá na stálou dodávku polyaminů z potravy, z nichž většina není uchovávána ve střevní tkáni, ale je rozdělena do různých orgánů v těle (Santos, 1996).

Některé třídy aminů, katecholaminy, indolaminy a histamin, plní důležité metabolické funkce u lidí, a to zejména v nervovém systému a kontrole krevního tlaku. Fenyletylamin a tyramin jsou příčinou zvýšení krevního tlaku, naopak histamin krevní tlak snižuje (Santos, 1996).

1.5 Výskyt v potravinách

Biogenní aminy jsou obvykle přítomné v živých organizmech, v nefermentovaných potravinách, například v rybách a rybích produktech, v masu, mléku, vejcích, ovoci, zelenině, ořechách. Ve fermentovaných potravinách se vyskytují například v sýrech, sojových produktech a dále pak v pivu, vínu, čokoládě (Deepika a kol., 2011; Santos, 1996; Fialová a kol., 2013; Shalaby, 1996). Prakticky u všech potravin, které obsahují proteiny nebo volné aminokyseliny, a kde jsou přítomny MO s dekarboxylázovou aktivitou, lze očekávat, že tyto podmínky budou umožňovat tvorbu biogenních aminů. Celkové množství různých vytvořených aminů silně závisí na povaze potravin a na přítomných mikroorganizmech (Santos, 1996). Na množství biogenních aminů ve vybraných potravinách poukazuje Ercan a kol., 2013 (Tabulka 2).

Tabulka 2: Obsah histaminu, tyraminu, kadaverinu a putrescinu ve vybraných potravinách (Ercan a kol., 2013)

	Histamin	Tyramin	Kadaverin	Putrescin
Obsah [mg/kg]				
Ryby a rybí výrobky				
Tuňák (konzervovaný)	20 000,0	-	4 440,0	2 000,0
Fermentovaná rybí pasta	640,0	376,0	35,0	-
Čerstvá ryba	209,0	61,8	-	-
Mléčné výrobky				
Mléko	-	-	0,013	-
Sýr Terrincho	15,6	15,6	349,7	217,8
Masné výrobky				
Klobása Salchichon	7,3	280,5	11,7	5,5
Šunka	114,0	104,0	64,0	97,0
Trvanlivý salám	286,0	1500,0		396,0
Fermentované nápoje				
Pivo	3,0	3,6	1,3	7,6
Jablečný mošt	6,9	4,1	-	12,3
Víno	3,3	-	3,3	-
Portské víno	2,3	2,6	0,1	11,9

1.5.1 Fermentované potraviny

Z fermentovaných mléčných výrobků jsou nejvíce sledované přírodní sýry (Buňková a kol., 2012). Sýr obsahuje bílkoviny, enzymy, kofaktory, vodu, sůl a bakterie, a proto představuje ideální prostředí pro tvorbu biogenních aminů (Karovičová a Kohajdová, 2003). V sýrech dochází během zrání k proteolýze, která vede k hromadění volných aminokyselin. Tyto aminokyseliny mohou být přeměněny na biogenní aminy. Hlavními biogenními aminy v sýrech jsou tyramin, histamin, kadaverin, putrescin a tryptamin (Mayer a kol., 2010). V jogurtech, tvarohu a nezrajících sýrech bývá množství BA nízké (maximálně desítky mg/kg) a vyšší množství by se mohlo nacházet v případě mikrobiální kontaminace nebo kažení (Buňková a kol., 2012).

Alkoholické nápoje (pivo, víno) představují další kategorii fermentovaných produktů, ve kterých se vyskytují biogenní aminy. Ve víně bylo zjištěno více než 20 různých biogenních aminů (Zorníková, 2012). Ve víně mohou být přítomny BA ze tří zdrojů, jednak v moštu, nebo jsou tvořeny kvasinkami, případně bakteriemi zapojenými do jablečno-mléčného kva-

šení. Převažující BA ve víně jsou histamin, tyramin, putrescin a β -fenylalanin (Karovičová a Kohajdová, 2003).

V sýrech se pohybuje množství BA kolem 5 – 4500 mg/kg, ve víně 5 – 130 mg/l, pivo 2,8 – 13 mg/l a zelí 110 – 300 mg/kg (Karovičová a Kohajdová, 2003).

U sýrů vyrobených z kravského a ovčího mléka je nejčastěji detekovaný BA tyramin v množství 7,2 – 207,1 mg/kg, druhým detekovaným BA byl kadaverin v množství 7,0 – 149,0 mg/kg. Dále putrescin v množství 12,2 – 229,5 mg/kg (Buňková a kol., 2012).

V majonéze a tatarské omáčce je množství BA na velmi nízké úrovni, kde obsah tyraminu u majonézy je 2,26 mg/kg, u tatarské omáčky 1,22 mg/kg (Fialová a kol., 2013).

Fermentované masné výrobky obsahují také biogenní aminy, které mohou tvořit starterové kultury nebo mikroorganismy zpracovávané suroviny. V některých případech mohou tyto výrobky obsahovat i 100 až 1000 mg/kg histaminu (Velíšek, 1999).

1.5.2 Nefermentované potraviny

Svalovina ryby rodu *Scomber* (makrela) obsahuje vysoké množství volného histidinu, který může být mikroorganismy přeměněn na histamin. U tuňáka a dalších druhů ryb čeledi *Scombridae* a *Clupeidae* bylo zjištěno, že obsahují vysoké hladiny histaminu, a to například v důsledku nedostatečného zpracování a skladování. Zápach, který za normálních okolností signalizuje rozklad, může být snížen nebo eliminován tepelným zpracováním, a proto je histamin užitečným indikátorem rozkladu v makrelovitých rybách i u některých dalších ryb (Karovičová a Kohajdová, 2003).

Čerstvé a zpracované vepřové maso obsahuje vysoké hladiny adrenalinu, spermidinu a sperminu, ale nízké hladiny noradrenalinu, putrescinu, histaminu, kadaverinu a tyraminu. Velké množství kadaverinu přítomného v hovězím masu bývá často spojeno s vyšším výskytem bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* (Karovičová a Kohajdová, 2003). Čerstvé vepřové maso např. obsahuje do 7 mg/kg kadaverinu a putrescinu, zatímco zkažené maso i více než 60 mg/kg (Velíšek, 1999).

V ovoci a zelenině je nejvíce zastoupen tyramin (např. v banánech a grepfruitech) a v menším množství další biogenní aminy (Velíšek, 1999). V některých rostlinách lze nalézt deriváty biogenních aminů řazených mezi protoalkaloidy (Velíšek, 1999).

2 VNĚJŠÍ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU BIOGENNÍCH AMINŮ

Akumulace biogenních aminů v potravinách vyžaduje přítomnost mikroorganismů, které produkují specifické aminokyselinové dekarboxylázy. Dostupnost aminokyselin a dalších faktorů jako je teplota, pH, aktivita vody (a_w), redox potenciál a koncentrace NaCl mají vliv na syntézu těchto enzymů a jejich činnosti. Dekarboxylázové enzymy bakterií jim mohou pomoci přežít a růst v kyselém prostředí (Fernández a kol., 2006).

2.1 Vliv pH

Hodnota pH patří k důležitým faktorům ovlivňujícím dekarboxylázovou aktivitu. Známe dva protichůdné mechanismy působení pH. Zvýšením kyselosti prostředí dochází k inhibici růstu MO na jedné straně a na straně druhé nízké pH stimuluje bakterie k vyšší produkci zásaditých biogenních aminů jako jejich obranného mechanismu proti kyselému prostředí. Je proto velmi důležité najít rovnovážný stav mezi těmito mechanismy (EFSA, 2011). Při neutrálním a alkalickém pH jsou enzymy neaktivní, což znamená, že pH hraje důležitou roli při tvorbě biogenních aminů (Fernández a kol., 2006). Dekarboxylázová aktivita je silnější v kyselém prostředí při pH 4 – 5,5. V tomto prostředí bakterie tvoří více dekarboxylázy jako součást jejich ochranného mechanismu (Kohajdová a kol., 2008).

Například při výrobě suchých salámů se používá glukono- δ -lakton, který způsobuje snížení pH v uzeninách, což zvyšuje dekarboxylázovou aktivitu bakterií (Karovičová a Kohajdová, 2003).

2.2 Vliv teploty

Teplota významně ovlivňuje enzymatickou aktivitu mikroorganismů a tím i vznik biogenních aminů (Kalhotka a kol., 2011). Vyšší teplota zpravidla umocňuje proteolytické a dekarboxylační reakce, což se projeví zvýšenou tvorbou BA. Vlivem nízkých teplot dochází k potlačení mikrobiálního růstu a snížení enzymové aktivity. Následkem je minimální kumulace biogenních aminů v potravinách (EFSA, 2011). Optimální teplota pro růst většiny MO vybavených dekarboxylázami je 20 - 37 °C, nízké teploty jejich růst zpomalují, až zastavují (Kohajdová a kol., 2008). Například kmeny *Bacillus licheniformis* s vysokou dekarboxylační aktivitou reakcí s AMK při teplotě 6 °C již BA netvoří (Doseděl a kol.,

2009). Produkce BA se snižuje při teplotě pod 5 °C nebo nad 40 °C, kdy dochází k inhibici růstu těchto bakterií (EFSA, 2011). Obecně je známo, že produkce biogenních aminů je úměrná teplotě a době skladování (Kalhotka a kol., 2011).

2.3 Vliv koncentrace NaCl

Chemické látky přidávané během výroby do potravin také ovlivňují produkci BA. Při mikrobiálním rozmnožování hraje důležitou roli vodní aktivita. Nižší koncentrace NaCl tvorbu BA spíše podporuje, vyšší koncentrace chloridu sodného výrazně snižuje kumulaci biogenních aminů. Přítomnost chloridu sodného aktivuje tyrozin-dekarboxylázovou aktivitu a inhibuje aktivitu histidin-dekarboxyláz. U *Lactobacillus buchneri* je tvorba histaminu při 3,5% obsahu NaCl částečně inhibována a 5,0% obsah NaCl jeho tvorbu zastaví. I obsah dusitanu sodného aktivuje tyrozin-dekarboxylázovou činnost (Karovičová a Kohajdová, 2003; Kohajdová a kol., 2008).

Enterobacter aerogenes tvoří v bujónu GTY (glukóza, trypton, kvasniční hydrolyzát) nejvíce kadaverinu a histaminu při koncentraci NaCl 3,0 % a *Enterobacter cloacae* tvoří pouze putrescin z ornitinu při koncentraci NaCl 0,5 % a pH 6. Postupné zvyšování koncentrace NaCl v intervalu od 0,6 – 3,0 % působí příznivě na aktivitu enzymů *Enterobacter aerogenes*. Koncentrace NaCl 5,0 – 7,0 % zcela inhibuje L-ornitin-dekarboxylázu (Greif a kol., 2006).

2.4 Vliv přítomnosti kyslíku

Přísun kyslíku má pravděpodobně také významný vliv na syntézu biogenních aminů. Každému mikroorganismu vyhovují jiné podmínky pro růst a stejně tak i pro tvorbu biogenních aminů. Například *Enterobacter cloacae* produkuje asi poloviční množství putrescinu v anaerobních podmínkách oproti aerobním a *Klebsiella pneumoniae* syntetizuje za anaerobních podmínek podstatně méně kadaverinu, ale získává schopnost produkovat putrescin (Karovičová a Kohajdová, 2003). *Lactococcus lactis* produkuje za anaerobních podmínek vyšší množství tyraminu než za aerobních podmínek (Buňková, 2010). Podmínky snižující redox potenciál stimulují produkci histaminu a histidin-dekarboxylázy jsou v přítomnosti kyslíku inaktivovány nebo zničeny (Karovičová a Kohajdová, 2003).

2.5 Přítomnost sacharidů a dalších faktorů

Přítomnost zkvasitelných sacharidů, jako je D-glukóza, zvyšuje růst i dekarboxylázovou činnost bakterií. Obsah D-glukózy v rozmezí 0,5 až 2,0 % je považován za optimální, zatímco úroveň přesahující 3,0 % zabraňuje tvorbě enzymů (Karovičová a Kohajdová, 2003).

Mezi další faktory ovlivňující vznik BA patří přítomnost růstových faktorů, růstová fáze buněk, chemické látky, například etanol, fenolické sloučeniny nebo SO₂ (Buňková a kol., 2010).

3 METODY STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ

Stanovení biogenních aminů je důležité jak z hlediska kvality potravin, tak z hlediska potenciální toxicity pro člověka. Pro stanovení biogenních aminů existuje několik technik. Jedná se např. o tenkovrstevnou chromatografii (TLC), plynovou chromatografii (GC), kapilární elektroforézu (CE) nebo vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) (Smělá a kol., 2003). Další možností je využití molekulárních metod, jako např. PCR nebo imuno-enzymatických metod (ELISA). Blíže jsou tyto metody popsány v následujících kapitolách.

3.1 Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou nejpřesnější metody pro stanovení biogenních aminů (Chang, 2012). Podstatou chromatografie je distribuce složek směsi mezi dvěma fázemi, mezi mobilní a stacionární. Většina biogenních aminů vyskytujících se v potravinách má nízkou UV absorpci a jsou často přítomny v nízkých koncentracích. Jejich stanovení pomocí spektrofotometrie je obtížné, proto se často používá označení pomocí fluorescence ke zvýšení citlivosti a selektivity. Existuje mnoho různých typů činidel pro derivatizaci (o-ftaldialdehyd (OPA), 9-fluorenyl metylchlorformiát (FMOC), 5-furoylchinolin-3-karboxaldehyd (FQ) 6-aminochinoly-N-hydroxysukcinimidyl karbamát (AQC), fenylisotiokyanát ester (PITC), danzylchlorid (DNS - Cl)) a další (Guoliang a kol., 2014).

3.1.1 Tenkovrstevná chromatografie (TLC)

Tenkovrstevná chromatografie je jednoduchá, levná a rychlá metoda ke stanovení biogenních aminů. Používá se jako alternativa k HPLC (Romano a kol., 2012). Provádí se na tenké vrstvě sorbentu (celulóza, silikagel) naneseného na vhodné podložce (sklo, kovová fólie). Detekce se provádí pomocí činidla, které po styku se vzorkem vytvoří barevnou sloučeninu, nebo se používají vrstvy upravené fluorescenční látkou, která fluoreskuje pod UV světlem (Káš a kol., 2005).

Tato metoda nevyžaduje žádné speciální zařízení, avšak výsledky mohou být méně přesné. Pro stanovení biogenních aminů po derivatizaci se používá směs chloroform-dietyleter-trietylamin v poměru 6:4:1 a následně chloroform-trietylamin v poměru 6:1 (Önal a kol., 2006). Romano a kol. (2012) použili ke stanovení směs chloroform-trietylamin (4:1).

3.1.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Kapalinová chromatografie je složitější než chromatografie plynová a nevýhodná v tom, že všechny děje v kondenzovaných fázích jsou pomalejší a složitější než ve fázi plynné. Výhodou ovšem je to, že komplex technik, které dohromady tvoří celek kapalinové chromatografie, umožňuje dělit přinejmenším 80 % všech známých látek a složitost systému umožňuje ladit podmínky separace změnami stacionární i mobilní fáze (Štulík a kol., 2004).

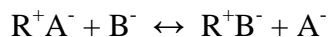
Nejčastěji používaná metoda pro stanovení biogenních aminů je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Stanovovaný analyt je nutné před detekcí derivatizovat z důvodu chybějícího chromoforu. Derivatizace se provádí před nástřikem na kolonu (pre-kolonová) nebo až po výstupu z kolony (post-kolonová). Často používanými činidly k derivatizaci jsou danzylchlorid a *o*-ftalaldehyd (Burdychová a Dohnal, 2007; Buňka a kol., 2013). Reakce *o*-ftalaldehydu probíhá téměř okamžitě při pokojové teplotě v alkalickém pH v přítomnosti 2-merkptoetanolu (Kelly a kol., 2010). Tyto deriváty jsou však nestabilní, a proto byla navržena lepší stabilní kombinace OPA-NAC (N-acetyl-L-cystein) pro stanovení biogenních aminů v hroznech, vínu a medu (Kelly a kol., 2010). Sekundární aminy (spermin a spermidin) nereagují s ftalaldehydem, proto se stanovují pouze po derivatizaci danzylchloridem (Smělá a kol., 2003). Další možností je použití dabzylchloridu. Dabzylchlorid reaguje s primárními i sekundárními aminy, vytváří stabilní deriváty a umožňuje citlivou detekci (Kelly a kol., 2010). Nevýhodou je ale dlouhá doba derivatizace a použití amoniaku k odstranění rušivých vedlejších produktů (De Mey a kol., 2012)

K detekci se používají převážně detektory UV-VIS (spektrofotometricky při 254 nm) (Chang, 2012; Buňka a kol., 2013) a fluorescenční detektory (Marcobal a kol., 2005).

V poslední době se používá ke stanovení biogenních aminů i kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS), která je velmi specifická a citlivá. Nevýhodou je vysoká cena přístrojů a vyšší úroveň technických dovedností (Kelly a kol., 2010).

3.1.3 Iontově výměnná chromatografie

Ionexová chromatografie je určena pro separaci látek nesoucí náboj. Ionty, které jsou elektrostaticky vázány k pevnému a chemicky inertnímu nosiči, se reverzibilně vyměňují za ionty z roztoku (Káš a kol., 2005).



Základem separace látek je fakt, že afinita iontů k ionexu není stejná, ale závisí na velikosti náboje, na poloměru hydratovaného iontu a na dalších vlivech. Látky, nesoucí stejný náboj jako má ionex, se na ionexu nezachytí. Desorpce látek se provádí změnou složení elučního pufru, a to buď změnou pH nebo iontovou silou roztoku (Káš a kol., 2005).

Ke stanovení biogenních aminů byl použit analyzátor aminokyselin s iontoměničovou kolonou, post-kolonovou derivatizací ninhydrinem a spektrofotometrickou detekcí při 570 nm (Csómos a Sarkadi, 2002; Rabie a kol., 2011). Cinquina a kol. (2004) stanovili biogenní aminy pomocí ionexové chromatografie s konduktometrickou detekcí. Je však možné použít i detektory, které nevyžadují derivatizaci vzorku (pulzní amperometrické detekce (PAD) a integrovaná pulzní amperometrická detekce (IPAD) (Cinquina a kol., 2004).

3.1.4 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je jednoduchá, procesy v plynné fázi jsou rychlé, systém není příliš vzdálen ideálnímu chování a je tedy relativně snadné dospět k teoretickým modelům a interpretovat výsledky měření. Je však omezena na látky, které lze bez rozkladu a za přijatelných experimentálních podmínek převést do plynné fáze - to není více než asi 30 % známých látek (Štulík a kol., 2006).

Plynová chromatografie se pro stanovení biogenních aminů příliš nepoužívá pro její obtížnost. Před vlastním stanovením se musí biogenní aminy derivatizovat, aby se staly dostatečně těkavými. Derivatizace zvyšuje citlivost a selektivitu (Křížek a Pelikánová, 1998).

3.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je významná metoda, která je rychlá, citlivá a jednoduchá. Kromě toho jsou molekulární metody schopny zjistit potenciální tvorbu biogenních aminů v potravinách ještě před tím, než je amin produkován. Nevýhodou PCR je detekce neživotaschopných buněk. Schopnost rozlišovat mezi životaschopnými a neživými organismy je důležitá při použití PCR v potravinářském závodě pro posouzení rizika akumulace biogenních aminů (Landete a kol., 2007).

Princip PCR je detekce genu kódujícího příslušnou dekarboxylázu. Alternativou tradiční PCR je real-time PCR, kdy je možné průběžné sledování procesu amplifikace. Navíc jsou tyto metody méně časově náročné (Landete a kol., 2007).

3.3 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je účinná analytická separační metoda, která umožňuje separaci, identifikaci a kvantifikaci nabitých iontů i neutrálních molekul, neboť zahrnuje několik elektroforetických technik lišících se svým separačním mechanismem (Štulík a kol., 2006).

3.3.1 Zónová kapilární elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza je elektroforetická technika, jejíž separační mechanismus je založen výhradně na rozdílných elektroforetických pohyblivostech analyzovaných iontů (Štulík a kol., 2004).

Swann a kol. (2010) použili pro stanovení biogenních aminů kapilární elektroforézu s detektorem diodového pole. Kvasnička a Voldřich (2006) použili elektroforetický analyzátor s fluorovaným kopolymerem etylen-propylenem (FEP) a kontaktním vodivostním detektorem. Li a kol. (2014) zase stanovili biogenní aminy pomocí kapilární zónové elektroforézy s kapacitně vázaným bezkontaktním vodivostním detektorem.

3.3.2 Micelární elektrokinetická chromatografie

Micelární elektrokinetické chromatografie je elektromigrační metoda sloužící především pro analýzu neutrálních molekul hydrofilní i hydrofobní povahy. Je založena na přidavku tenzidu, který při nadkritické micelární koncentraci vytváří v separačním médiu nabité micely, jež umožňují separaci neutrálních molekul v kapilární elektroforéze na principu rozdílné distribuce mezi pseudostacionární (micelární) a vodnou fází. (Štulík a kol., 2006).

Rodriguez a kol. (1996) stanovili biogenní aminy pomocí micelární elektrokinetické chromatografie s fluorescenční detekcí. Optimální separaci dosáhli boritanovým pufrům s dodecylsíránem sodným (SDS). Detekce byla provedena po derivatizaci s fluorescein isotiokyanátem (FITC).

Malinowska a kol. (2012) zjistili, že nejlepší separace většiny biogenních aminů bylo dosaženo při složení mobilní fáze 0,02 M SDS – acetonitril (4:1 v/v).

Feng a kol. (2008) vyvinuli novou metodu micelární elektrokinetické chromatografie s multifotonovou excitační fluorescenční detekcí a úspěšně stanovili 6 biogenních aminů. Ty byly derivatizovány pomocí fluorescein isotiokyanátu (FITC).

3.4 Imuno-enzymatické metody

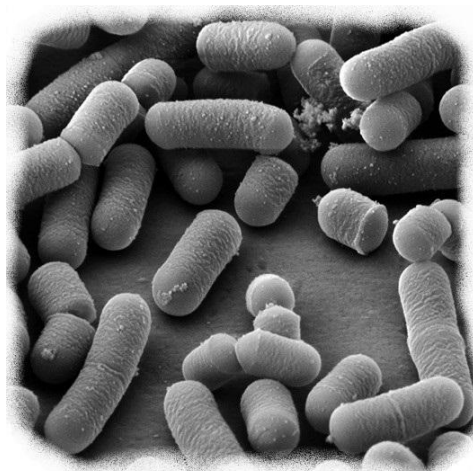
Imuno-enzymatické metody jsou založeny na interakci mezi antigenem a protilátkou *in vitro*. Mezi jejich přednosti patří vysoká specifita interakce antigen – protilátka (protilátka váže jen ten antigen, který vyvolal její vznik) a vysoká citlivost některých imunometod. Heterogenní enzymová imunoanalýza neboli ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) je metoda používající enzymy jako značky. Kvantifikace představuje měření změny absorbance (popř. fluorescence, chemiluminiscence) reakčního roztoku, kterou způsobil vzniklý produkt enzymové reakce. Nejčastěji se používají peroxidázy a alkalické fosfatázy (Káš a kol., 2005). Koncentrace produktu je úměrná koncentraci antigenu nebo protilátky ve vzorku.

Existuje mnoho komerčních sad pro stanovení histaminu. Reakce je například založena na oxidaci histaminu rekombinantní histamin-dehydrogenázou. Barevná změna je detekována při 450 nm (Hungerford a kol., 2011). Pro stanovení histaminu byla použita přímá kompetitivní ELISA (Marcobal a kol., 2005, Hungerford a kol., 2011). Pro zastavení enzymové reakce se použilo 0,5 M HCl a detekce byla provedena pomocí absorbance při vlnové délce 450 nm (Marcobal a kol., 2005).

4 ROD LACTOBACILLUS

4.1 Charakteristika rodu *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* je poměrně různorodý a skládá se z několika různých druhů (více než 80) s malými shodnostmi. Společným taxonomickým znakem je jejich tyčinkovitý tvar (Obrázek 4) a jejich schopnost produkovat kyselinu mléčnou. Z tohoto důvodu se řadí se bakterie mléčného kvašení (Hutkins, 2006; Robinson a kol., 2000). Laktobacily neprodukují katalázu, která katalyzuje rozklad peroxidu vodíku (Klaban, 2005).

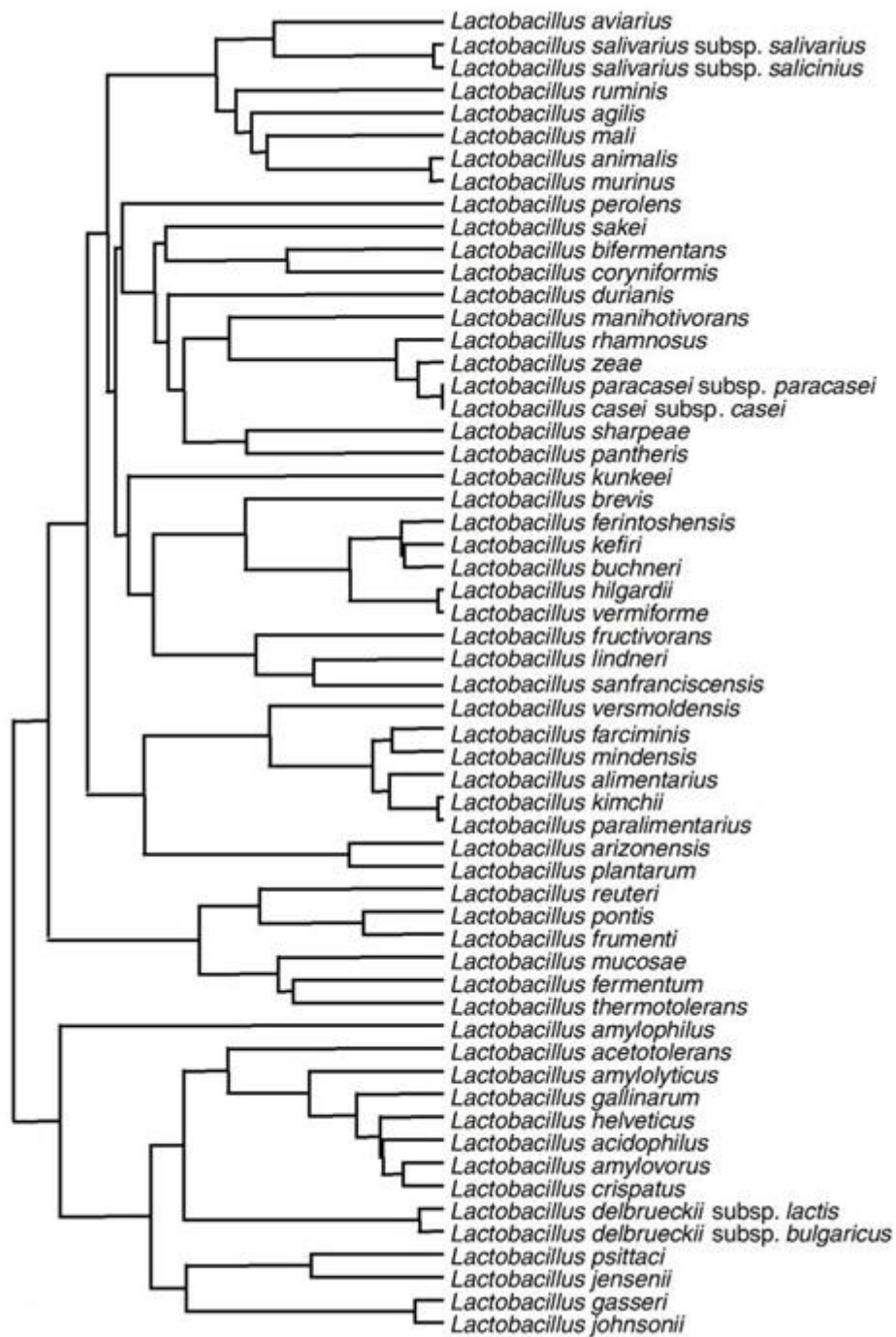


Obrázek 4: *Lactobacillus plantarum*
(REM galerie).

4.2 Taxonomické zařazení rodu *Lactobacillus*

Taxonomicky se rod *Lactobacillus* řadí do domény *Bacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales* a čeledi *Lactobacillaceae* (Felis a Dellaglio, 2007).

Na obrázku 5 jsou uvedeny některé druhy z tohoto rodu, které jsou fylogeneticky uspořádány na základě sekvenční analýzy (Hutkins, 2006).



Obrázek 5: Fylogeneze rodu *Lactobacillus* na základě sekvenční analýzy 16S rRNA (Hutkins, 2006).

4.3 Morfologie

Laktobacily jsou grampozitivní bakterie a netvoří spory. Buňky jsou obvykle tyčinkovitého tvaru v rozmezí velikosti 0,5-1,2 x 1-10 μm . Za určitých růstových podmínek mohou vypadat téměř jako koky.

Existují druhy, které mají tyčinky poměrně krátké (1,5 μm), zatímco jiné mají více než 5 μm na délku (některé z nich až 10 μm). Mohou mít štíhlý, zakřivený nebo ohnutý vzhled. Kolonie na agarových plotnách bývají také variabilní. Některé kmeny produkují velké kulaté kolonie a některé produkují malé nebo nepravidelné kolonie (Robinson a kol., 2000).

4.4 Fyziologické vlastnosti

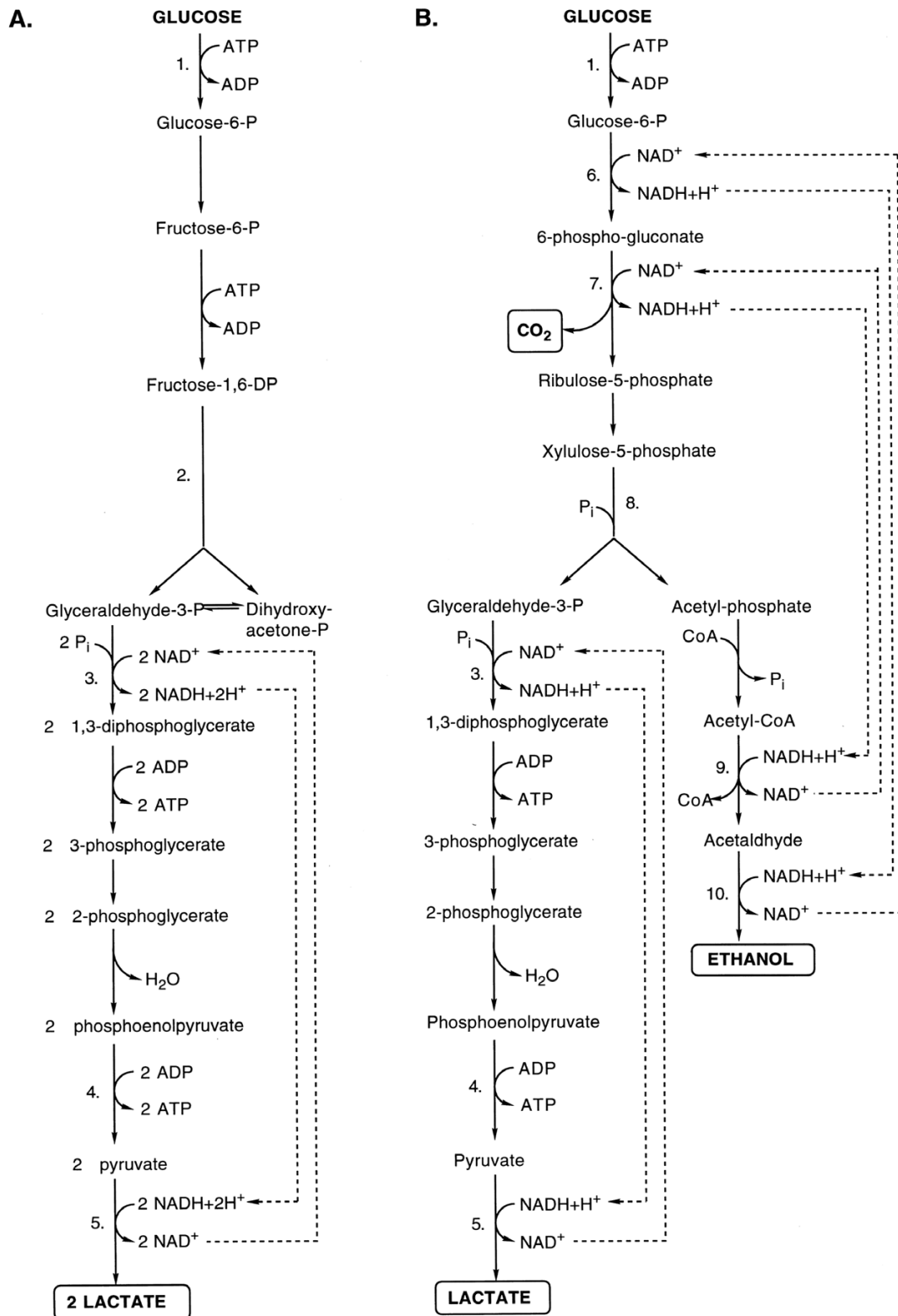
Laktobacily jsou fakultativně anaerobní, rostou špatně v aerobním prostředí, ale jejich růst je podpořen 5% obsahem oxidu uhličitého v prostředí. Jsou auxotrofní a rostou nejlépe v bohatém komplexním prostředí. Jejich optimální teplota růstu je 30 - 40 °C, ale mohou růst i v rozsahu 5 – 53 °C. Jsou také acidofilní s optimálním růstem v pH 5,5 - 5,8, ale obecně platí, že mohou růst i při pH < 5 (Robinson a kol., 2000; Sedláček, 2007).

Laktobacily se podle metabolismu dělí do tří skupin uvedených v tabulce 3. Jsou to obligátně homofermentativní druhy, fakultativně heterofermentativní druhy a obligátně heterofermentativní druhy (Robinson a kol., 2000; Hutkins, 2006).

Mezi homofermentativní laktobacily patří *L. delbrueckii*, *L. leichmannii* a *L. acidophilus*. Příkladem heterofermentativních laktobacilů je *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. casei* a *L. buchneri*. I když všechny produkují kyselinu mléčnou jako hlavní konečný produkt, liší se v isomerní směsi. Některé produkují výhradně L(+) kyselinu mléčnou a mezi ně patří *L. salivarius* a *L. casei*. Jiné, například *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *L. jensenii* produkují jen D(-) kyselinu mléčnou a *L. acidophilus* a *L. helveticus* produkují směs L(+) a D(-) kyseliny mléčné. Dalším významným kritériem pro rozlišení laktobacilů je produkce plynu ze zdrojů uhlíku, včetně glukózy a glukonátu. Dále je zde velká míra rozmanitosti ve schopnosti různých laktobacilů zkvašovat pentózové cukry, včetně ribózy a xylózy (Robinson a kol., 2000). Homofermentativní a heterofermentativní metabolismus bakterií rodu *Lactobacillus* je uvedený na obrázku 6.

Tabulka 3: Skupiny laktobacilů a jejich vlastnosti (Salminen a kol., 2004).

Vlastnost	skupina I - obligátně homofermentativní	skupina II - fakultativně heterofermentativní	skupina III - obligátně heterofermentativní
Fermentace pentóz	-	+	+
Tvorba CO ₂ z glukózy	-	-	+
Tvorba CO ₂ z glukonátu	-	+	+
FDP aldoláza	+	+	-
Fosfoketoláza	-	+	+
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>
	<i>L. bulgaricus</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. buchneri</i>
	<i>L. helveticus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. salivarius</i>	<i>L. sake</i>	<i>L. reuteri</i>



Obrázek 6: Metabolismus bakterií *Lactobacillus*, (A) homofermentativní – glykolýza/EMP dráha, (B) heterofermentativní – 6-fosfoglukonát/fosfoketolázová dráha (Salmiinen a kol., 2004)

4.5 Výskyt

V přírodě se laktobacily vyskytují na mnoha místech. Výjimkou jsou velmi extrémní podmínky. Některé druhy se běžně vyskytují na rostlinách a v rostlinných materiálech, dále pak v mléčných a masných výrobcích, v džusu, kvašených nápojích a v obilných výrobcích. Jejich přítomnost ve zvířecím a lidském gastrointestinálního traktu (stejně jako v žaludku, ústech a pochvě) vedla k návrhu, který získal značnou vědeckou podporu, že tyto bakterie mají širokou "probiotickou aktivitu". V potravinách se podílejí na mnoha důležitých fermentacích, ale také často i na kažení fermentovaných a nefermentovaných potravin (Hutkins, 2006; Robinson a kol., 2000; Görner a Valík, 2004).

4.6 Význam a využití v potravinářství

Vzhledem k rozmanitosti metabolických vlastností vykazovaných zástupci rodu *Lactobacillus*, tyto bakterie ve fermentovaných výrobcích přispívají k jejich konzervaci a chuti. Laktobacily jsou přidávány záměrně jako starterové kultury, nebo se podílejí na fermentaci v důsledku jejich přirozené přítomnosti ve výchozích substrátech. Řada mléčných výrobků se vyrábí za použití laktobacilů a to buď samostatně, nebo v kombinaci s dalšími bakteriemi mléčného kvašení. *L. acidophilus* se například používá při výrobě acidofilního mléka. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* v kombinaci se *Streptococcus thermophilus* se používá k výrobě jogurtu a rovnováha mezi těmito dvěma mikroorganismy mohou mít vliv na kvalitu výrobku (Robinson a kol., 2000; Šilhánková, 2008).

U zeleniny se laktobacily využívají pro výrobu kysaných okurek, oliv a zelí. Zástupci rodu *Lactobacillus* jsou přírodními kontaminanty vyskytující se na zeleniny a zaujímají své místo v procesu kvašení zeleniny, jakož i řada dalších mikroorganismů (Robinson a kol., 2000).

Laktobacily hrají zásadní roli také při pečení chleba a v těchto produktech byla identifikována řada specifických kmenů. Mezi typické druhy laktobacilů uvedené v kynutém pečivu patří *L. acidophilus*, *L. farciminis*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. brevis*, *L. sanfrancisco* a *L. fermentum*. Původní laktobacily jsou schopny do značné míry překonat jinou znečišťující mikroflóru. Během procesu fermentace se kyselina mléčná hromadí na úroveň blíží se 1 % s produkcí malého množství kyseliny

octové. Počet bakterií mléčného kvašení může dosáhnout až 10^7 CFU/g (Robinson a kol., 2000).

4.7 *Lactobacillus curvatus*

Lactobacillus curvatus je fakultativně heterofermentativní bakterie mléčného kvašení, která se obyčejně vyskytuje v masných výrobcích. Roste i při nízkých teplotách blíží se bodu mrazu (Görner a Valík, 2004). Představuje jednu z hlavních populací spojených s fermentovanými masnými výrobky, vakuově baleným chlazeným masem a v menší míře s rybami a drůbežními výrobky. Byl například izolován ze zkaženého lososa uzeného studeným kouřem. *L. curvatus* se používá jako startovací kultura pro čerstvé a zpracované maso a ryby. Tento druh fylogeneticky blíže souvisí s *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus fuchuensis* a *Lactobacillus graminis*. Tyto druhy se také převážně vyskytují v masných výrobcích. *Lactobacillus curvatus* tvoří bakteriocin, konkrétně curvacin A, curvacin 13 a curvacin FS47 (Xiraphy a kol., 2006; Ahmadova a kol., 2013; Hebert a kol., 2011).

Lactobacillus curvatus subsp. *curvatus* má buňky ve tvaru tyčinek fazolovitě zakřivených se zaoblenými konci a vyskytujících se v párech nebo v krátkých řetězcích. Některé kmeny jsou pohyblivé, ale ztrácí svou pohyblivost při subkultivaci. Většina kmenů roste v rozmezí od 4 do 40 °C. Při 45 °C nebyl růst zaznamenán. Většina kmenů produkuje kyselinu z amygdalinu, celobiózy, sacharózy a trehalózy. Několik kmenů produkuje kyselinu z laktózy a salicinu. Naopak ji nevyrábí z arabinózy, glukonátu, inositolu, mannitolu, melezitózy, melibiózy, rafinózy, rhamnózy, sorbitolu a xylózy. Většina kmenů neroste v přítomnosti 10% NaCl a neprodukuje acetoin z glukózy (Torriani a kol., 1996).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CIL PRÁCE

Cílem této práce bylo zmapování kinetiky produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 v podmínkách *in vitro* a v mléce v závislosti na vnějších podmínkách:

- pH 5; 6 a 7
- přídavek NaCl v koncentracích 0; 1 a 2 % (w/v)
- přídavek laktózy v koncentracích 0,00; 0,25; 0,50 a 1,00 % (w/v)
- teplota kultivace 37 a 10 °C

Dále vliv vnějších podmínek na růstové chování bakterií *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 a změnu pH v průběhu kultivace. Produkce biogenních aminů byla stanovena pomocí RP-HPLC s UV/VIS detekcí po derivatizaci danzylchloridem.

6 MATERIÁL A METODIKA

6.1 Použitá kultura a její pomnožení

Vliv vnějších podmínek na dekarboxylázovou aktivitu byl sledován u kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9. Tento kmen byl izolován z výroby sýrů (holanského typu) a byl získán z Výzkumného ústavu mlékárenského, pobočky v Táboře (sbírka Laktoflora).

6.2 Kultivační média a roztoky

Veškeré použité chemikálie pro přípravu byly od společností Sigma-Aldrich, Merck a Lach-Ner.

6.2.1 MRS agar

Připravená půda byla sterilovaná v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut a poté rozlita do Petriho misek. Následně byla použita k rozizolování kultury a pro stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM) v mléku.

Složení kultivačního média MRS agar je uvedené v tabulce 4.

Tabulka 4: Složení kultivačního média MRS agar.

Složka	Množství [g/l]
MRS Broth	52,2
Agar	15,0

6.2.2 MRS bujón s aminokyselinami

Připravený bujón na pomnožování testovaného kmene byl rozlit po 7 ml do zkumavek a po uzavření sterilován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Složení kultivačního média MRS bujónu s aminokyselinami (AMK) je uvedené v tabulce 5.

Tabulka 5: Složení kultivačního média MRS bujón s 0,3 % AMK.

Složka	Množství [g/l]
MRS Broth	52,2
Tyrozín	3,0
Lyzin	3,0
Arginin	3,0
Ornitin	3,0

6.2.3 Modifikovaný bujón MRS

Dekarboxylázová aktivita byla u *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 zjišťována pomocí kultivace v modifikovaném bujónu MRS, který obsahoval 4 aminokyseliny (tyrozín, lyzín, arginin a ornitin) jako prekurzory příslušných biogenních aminů. Tyto aminokyseliny byly přidány v koncentraci 0,3 % (w/v). Složení použitého MRS bujónu je uvedeno v tabulce 6. Následně bylo provedeno 36 kombinací - pro experiment I. byl přidán:

- NaCl (0,0; 1,0 a 2,0 % (w/v))
- laktóza (0,00; 0,25; 0,50 a 1,00 % (w/v))
- HCl, NaOH pro úpravu pH (5,0; 6,0 a 7,0 ± 0,2)

Počet testovaných vzorků modifikovaného bujónu MRS byl 2016 a z toho 288 bylo vzorků kontrolních (bez zaočkovaných bakterií).

Při II. experimentu byl sledován vliv vnějších faktorů na produkci BA testovaným kmenem v podmínkách *in vitro* se zvýšeným obsahem laktózy, která je analogická s obsahem laktózy v nezkašeném mléce. Zde byl ke kultivačnímu médiu přidán:

- NaCl (0,0; 1,0 a 2,0 % (w/v))
- laktóza (4,80 % (w/v))
- HCl, NaOH pro úpravu pH (6,8 ± 0,2)

Počet testovaných vzorků modifikovaného bujónu MRS byl 156 a z toho 12 bylo vzorků kontrolních (bez zaočkovaných bakterií).

Po úpravě byl bujón rozpipetován do zkumavek po 5 ml a sterilován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut a uložen v chladničce.

Tabulka 6: Složení modifikovaného kultivačního média MRS.

Složka	Množství [g/l]
Pepton	10,00
Beef extrakt	10,00
Yeast extrakt	5,00
Tween 80	1,00
Hydrogencitronan amonný	2,00
Octan sodný	5,00
Síran hořečnatý	0,10
Síran manganatý	0,05
Hydrogenfosforečnan didraselný	2,00
Tyrosin	3,00
Lyzin	3,00
Arginin	3,00
Ornitin	3,00

6.2.4 Fyziologický roztok

Fyziologický roztok byl připraven pro ředění zaočkovaného mléka po kultivaci. Na přípravu byl použit chlorid sodný v množství 8,5 g/l. Takto připravený roztok byl rozpipetován do zkumavek po 4,5 ml a následně po opatření zátkou sterilován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

6.2.5 Mléko

Na přípravu 1000 ml mléka bylo potřeba 50 g sušeného odstředěné mléka (Moravia Lacto a.s., Jihlava). Do připraveného mléka byly přidány v koncentraci 0,3 % (w/v) 4 aminokyseliny (tyrosin, lyzin, arginin, ornitin) jako prekurzory příslušných biogenních aminů. Následně bylo připraveno 9 kombinací média: byl přidán chlorid sodný (0; 1 a 2 % (w/v)) a upraveno pH (5,0; 6,0 a 7,0 ± 0,2). Dále bylo připraveno 32 vzorků mléka a 32 vzorků mléka s přídavkem 0,3 % (w/v) aminokyselin (tyrosin, lyzin, arginin, ornitin).

Počet testovaných vzorků mléka byl 440 a z toho 12 bylo vzorků kontrolních (bez zaočkovaných bakterií).

Po úpravě bylo mléko rozpipetováno do zkumavek po 5 ml a sterilováno v autoklávu při 110 °C po dobu 10 minut a uloženo v chladničce.

6.3 Teploty kultivace a odběrový čas

Kultura z MRS agaru byla přeočkována do 7 ml MRS bujónu s AMK a kultivována 48 hodin při 30 °C. Poté bylo přeočkováno 100 µl do 7 ml MRS bujónu s AMK a kultivována při stejné teplotě opět 48 hodin. Následně bylo přeočkováno 250 µl do potřebného množství zkumavek se 7 ml MRS bujónu s AMK. Po 24 hodinách kultivace byly 50 µl takto připravené kultury zaočkovány veškeré vzorky.

Vzorky se zaočkováním kmenem *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 byly kultivovány při teplotách 37 ± 1 °C a 10 ± 1 °C. Při teplotě 37 °C byly vzorky pro analýzy odebírány po 2; 4; 6; 8; 10; 12; 24 a 48 hodinách a při teplotě 10 °C byly odebírány po 1; 2; 3; 6; 8; 10; 13 a 15 dnech kultivace.

6.4 Měření optické hustoty, CPM a pH

Pro stanovení bakteriální biomasy v bujónu bylo z kultivovaných zkumavek při každém odběru odpipetováno 200 µl do příslušné jamky mikrotitrační destičky a byla změřena optická hustota při vlnové délce 655 nm v přístroji Benchmark. V případě vzorků mléka nebylo vhodné použití optické hustoty pro tvorbu růstových křivek testovaného kmene, kvůli přítomnosti mnoha chromoforických skupin a vysokému zákalu, proto byla použita plotnová metoda stanovení CPM na živné půdě MRS.

Po odstředění vzorků a odpipetování 750 µl na derivatizaci bylo v každém supernatantu změřeno pH.

6.5 Předderivatizační úprava vzorků a derivatizace

MRS bujón po kultivaci testované bakterie byl zcentrifugován při 6000 ot./min po dobu 15 minut. Získaný supernatant byl odpipetován po 750 µl do eppendorfkových zkumavek, zakonzervován a extrahován v poměru 1:1 (v/v) kyselinou chloristou ($c = 1,2$ mol/l, Merck) a uložen v mrazicím zařízení při teplotách pod -18 °C.

Derivatizace upravených vzorků byla provedena dle návodu dostupného v laboratoři Ústavu technologie potravin:

K upraveným vzorkům bylo přidáno 100 µl 1,7-heptadiaminu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) v koncentraci 500 mg/l jako interního standardu. Z této směsi byl odpipetován 1 ml

do derivatizační nádoby. Do vzorků v derivatizačních nádobkách bylo přidáno 1,5 ml uhličitánového pufru s pH 11,0 – 11,1 a 2 ml čerstvě připraveného roztoku danzylchloridu o koncentraci 5 g/l v acetonu (Merck). Derivatizační nádoby byly dobře uzavřeny a dány třepat 20 hodin v temnu. Následně bylo do každého vzorku přidáno 200 µl roztoku prolinu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) čímž se zastavila derivatizační reakce. Směs s prolinem se třepala další hodinu. Danzylderiváty byly extrahovány ručním vytřepáním (3 minuty) do 3 ml heptanu (Sigma-Aldrich). Poté byl z derivatizačních nádobek do vialek odpipetován 1 ml heptanové vrstvy a odpařen do sucha při teplotě 60 ± 2 °C pod proudem dusíku. Suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a vzorky se uchovávaly do doby analýzy v mrazicím zařízení při teplotách pod -18 °C.

6.6 Vlastní chromatografické stanovení

Před vlastní analýzou byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 µm a nanoseny na kolonu (Zorbax ECLIPSE Plus C18, 50 mm x 3 mm, pórovitost 1,8 µm, průtok 0,45 ml/min) s chromatografickým systémem (binární pumpa a autosampler Agilent Technologies 1260 Infinity, USA) s degaserem, s UV/VIS-DAD detektorem ($\lambda = 254$ nm) a termostatem (Agilent Technologies, USA) a promývány gradientově mobilní fází uvedenou v tabulce 7.

Tabulka 7: Gradientový eluční program HPLC

čas [min]	10% acetonitril [%]	100% acetonitril [%]
0,0	41	59
0,1	41	59
1,9	37	63
3,5	18	82
4,0	0	100
9,5	0	100
11,5	41	59
15,5	41	59

Výsledky byly hodnoceny pomocí softwaru CLARITY. Byla stanovena produkce tryptaminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích byla stanovena produkce biogenních aminů (tryptaminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu) kmenem *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9. Tvorba BA byla sledována při různém složení modifikovaného kultivačního média obsahujícího 0,3 % (w/v) ornitinu, argininu, tyrozinu a lyzinu. Produkce BA byla sledována *in vitro* za působení těchto vnějších faktorů: pH 5,0; 6,0 a 7,0 ± 0,2, koncentrace NaCl 0,0; 1,0; 2,0 % (w/v), koncentrace laktózy 0,00; 0,25; 0,50; 1,00 % (w/v). Dále bylo použito médium s vyšším obsahem laktózy (4,8 % (w/v)) a pH 6,8, které je analogické s obsahem laktózy v nezkašeném mléce. Byla měřena i změna pH a hodnoty optické hustoty.

Tento kmen byl rovněž testován i v mléce za působení těchto vnějších faktorů: pH 5,0; 6,0 a 7,0 ± 0,2 a koncentrace NaCl 0,0; 1,0; 2,0 % (w/v). Byla sledována produkce výše uvedených biogenních aminů, změna pH a celkový počet mikroorganismů (CPM). Tyto faktory byly sledovány v obou případech při teplotách 37 a 10 °C.

Testovány byly všechny kombinace uvedených faktorů ve třech opakováních. Získané hodnoty produkce biogenních aminů byly zprůměrovány a vyhodnoceny ve formě grafů.

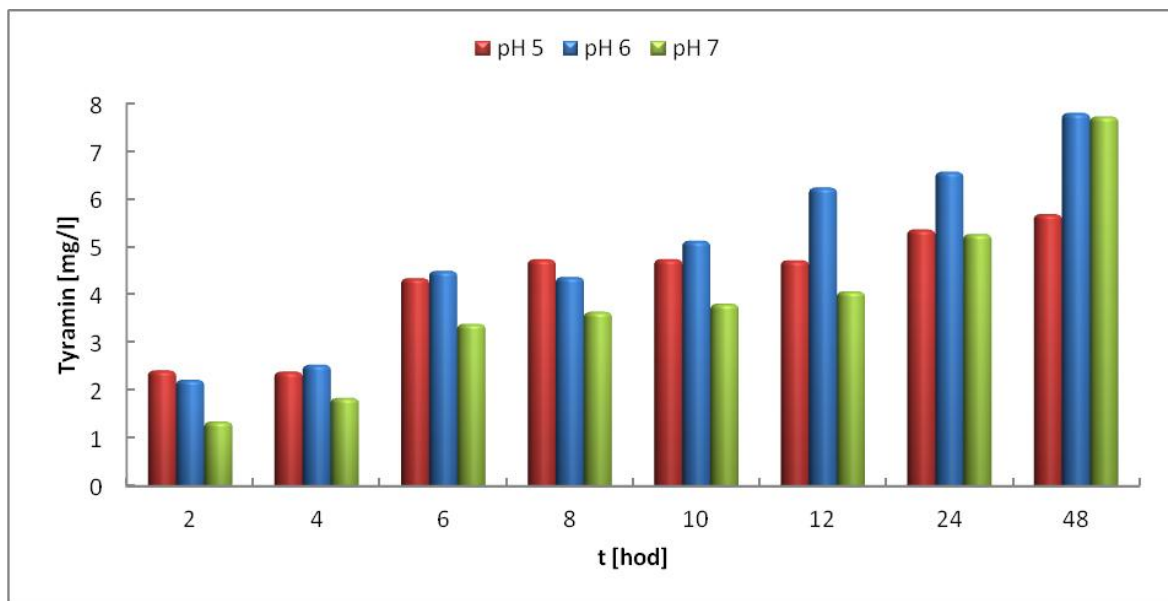
7.1 Produkce biogenních aminů v podmínkách *in vitro*

Dekarboxylázová aktivita sledovaného kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 nebyla příliš výrazná. Testovaný kmen produkoval pouze tyramin za všech sledovaných podmínek a dále spermin, který měl spíše kolísavou produkci. Ostatní BA nebyly detekovány nebo se vyskytovaly v minimálních množstvích.

7.1.1 Produkce tyraminu při kultivační teplotě 37 °C

Vliv pH

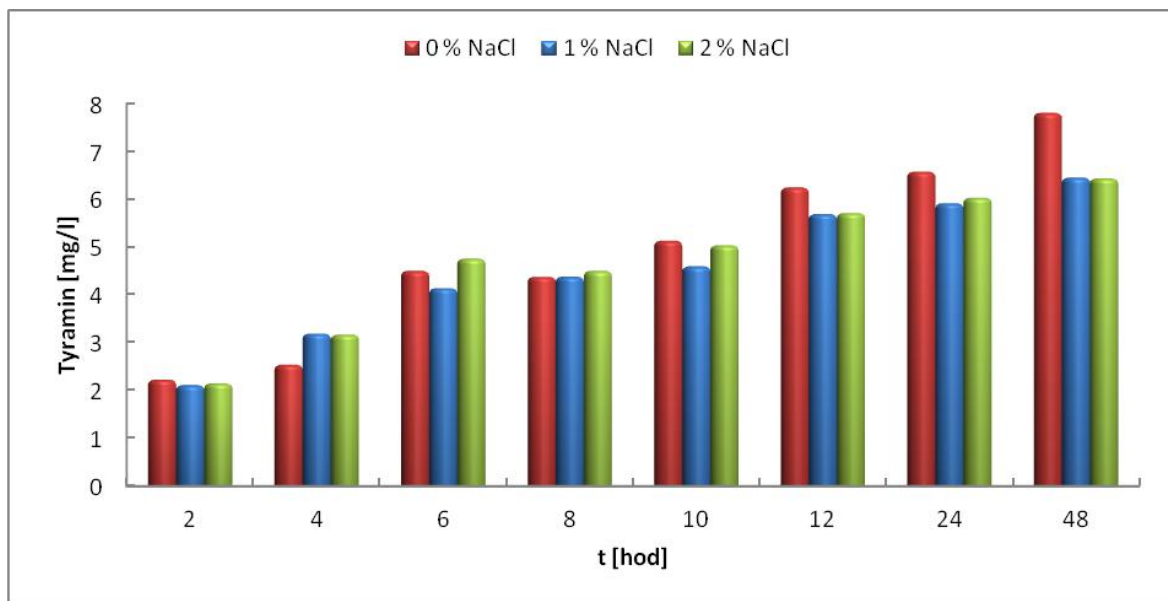
Na produkci tyraminu u *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* nemělo pH významnější vliv. Více tyraminu ($7,81 \pm 0,66$ mg/l) bylo detekováno po 48 hodinách kultivace v médiu s iniciačním pH $6,0 \pm 0,2$. O něco méně testovaný kmen tvořil tyramin ($7,74 \pm 0,57$ mg/l) v médiu s iniciačním pH $7,0 \pm 0,2$ a nejméně pak s pH $5,0 \pm 0,2$ ($5,69 \pm 1,06$ mg/l), jak je patrné z obrázku 7.



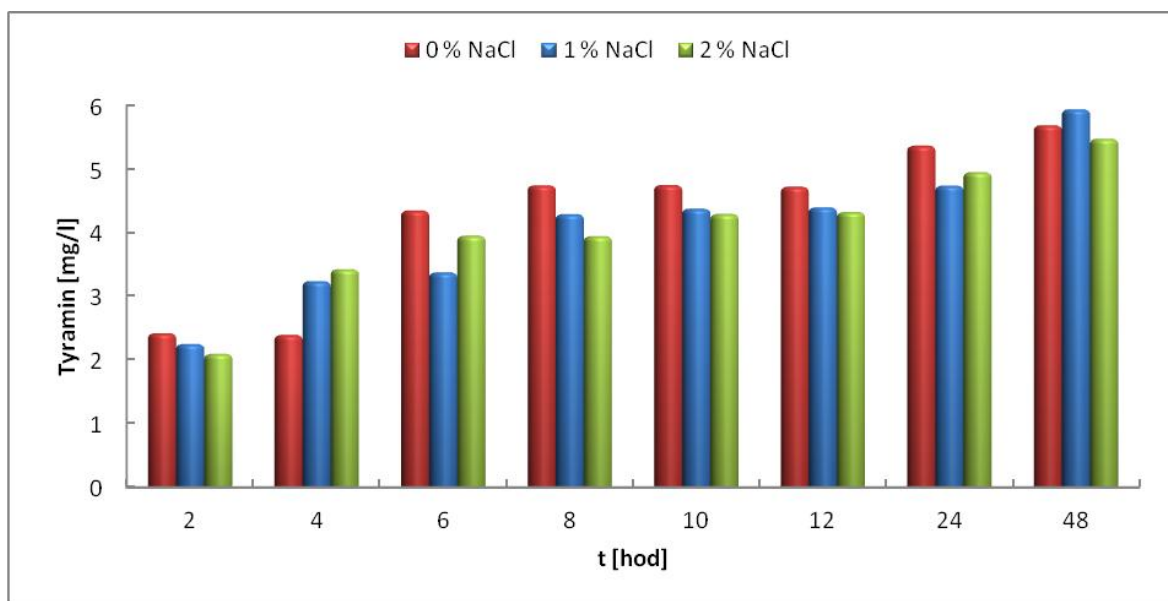
Obrázek 7: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 37 °C bez přídavku laktózy a NaCl.

Vliv NaCl

Bez přídavku laktózy byla nejvyšší produkce tyraminu ($7,81 \pm 0,66$ mg/l) při iniciačním pH $6,0 \pm 0,2$ za podmínek bez přídavku NaCl. Zvýšený obsah NaCl měl částečně od 10. hodiny kultivace inhibiční účinek, jak je patrné na obrázku 8. Podobná kinetika produkce byla i při iniciačním pH $7,0 \pm 0,2$. Obrázek 9 ukazuje vývoj produkce při iniciačním pH $5,0 \pm 0,2$, kde od 6. hodiny kultivace produkce tyraminu už výrazně nestoupala a nejvyšší detekované množství tyraminu ($5,94 \pm 0,62$ mg/l) po 48 hodinách kultivace bylo stanoveno v supernatantu po kultivaci při koncentraci 1 % NaCl (w/v) v růstovém prostředí.



Obrázek 8: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 37 °C bez přídavku laktózy a pH 6.

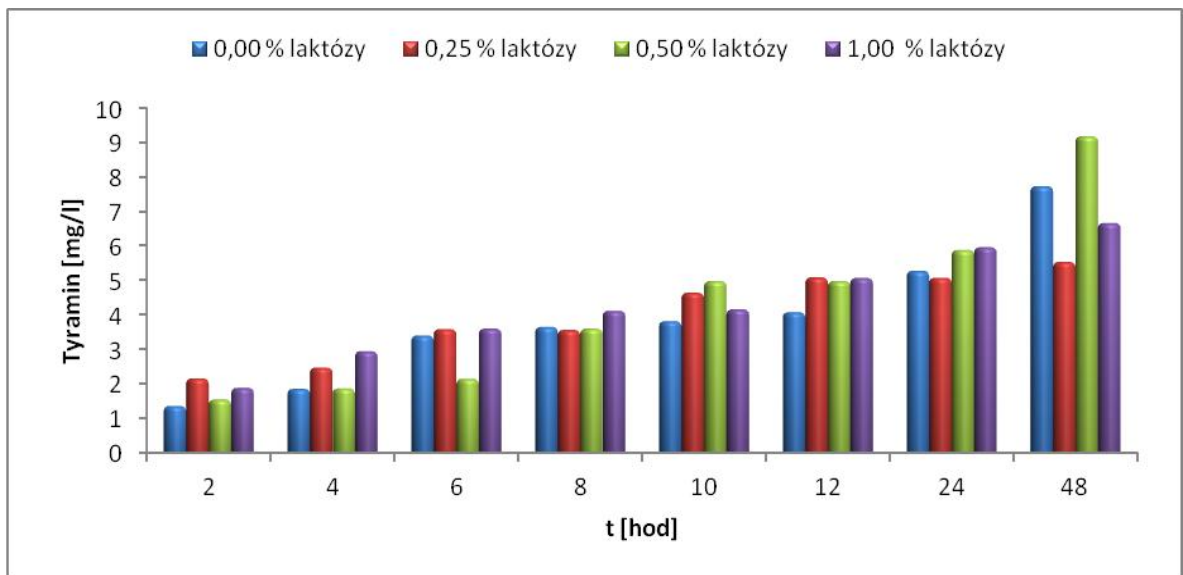


Obrázek 9: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 37 °C bez přídavku laktózy a pH 5.

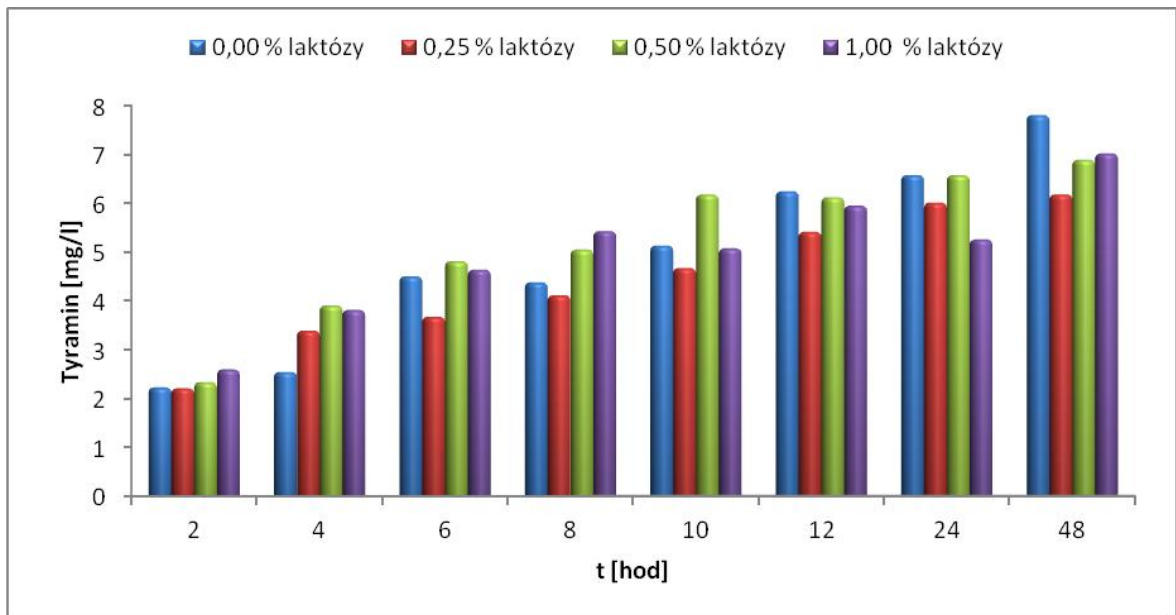
Vliv laktózy

Přídavek laktózy měl na produkci TYR v rámci testovaných faktorů významnější vliv. Během kultivace při vyšší teplotě (37 °C) byla nejvyšší produkce tyraminu ($9,18 \pm 0,77$ mg/l) po 48 hodinách kultivace u pH $7,0 \pm 0,2$ za podmínek s přídavkem 0,50 % (w/v) laktózy

(Obrázek 10). V případě pH $6,0 \pm 0,2$ bylo v kulturačním médiu stanoveno nejvíce tyraminu od 12. do 48 hodiny kultivace (až $7,81 \pm 0,66$ mg/l) bez přídavku laktózy (Obrázek 11) a při iniciačním pH $5,0 \pm 0,2$ byla od 6. do 24. hodiny kultivace produkce tyraminu vyšší v médiu bez přídavku laktózy a po 48 hodinách byla produkce přibližně stejná jako s přídavkem 1,00 % (w/v) laktózy ($5,75 \pm 0,45$ mg/l).

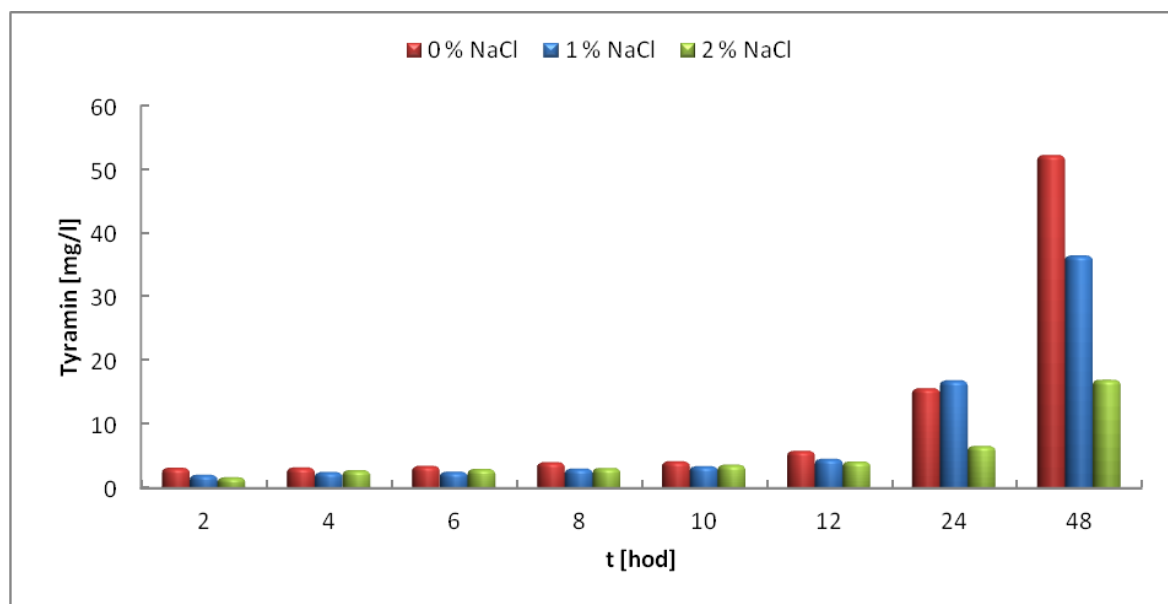


Obrázek 10: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 37 °C bez přídavku NaCl a pH 7.



Obrázek 11: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 37 °C bez přídavku NaCl a pH 6.

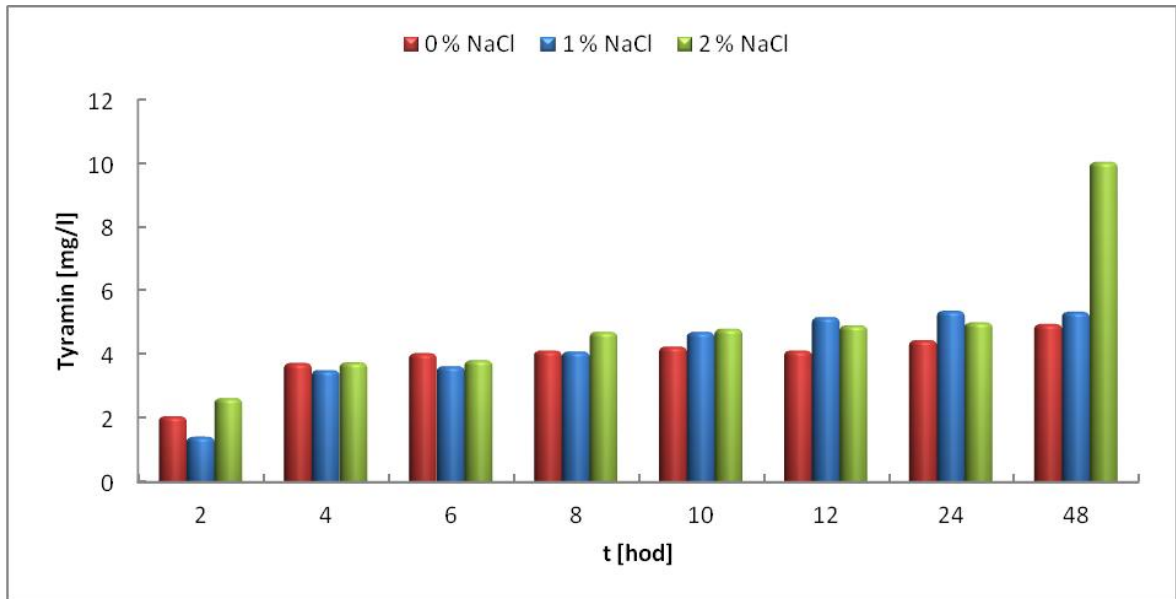
Produkce tyraminu byla ovlivněna přidavkem zkvasitelného cukru (laktózy) a to poměrně výrazným způsobem. Zřejmý nárůst produkce je zvláště viditelný při přidavku laktózy v koncentraci, která je analogická s teoretickým obsahem laktózy v mléce (4,80 % w/v). V tomto případě byla produkce až $52,28 \pm 0,18$ mg/l, jak je patrné z obrázku 12.



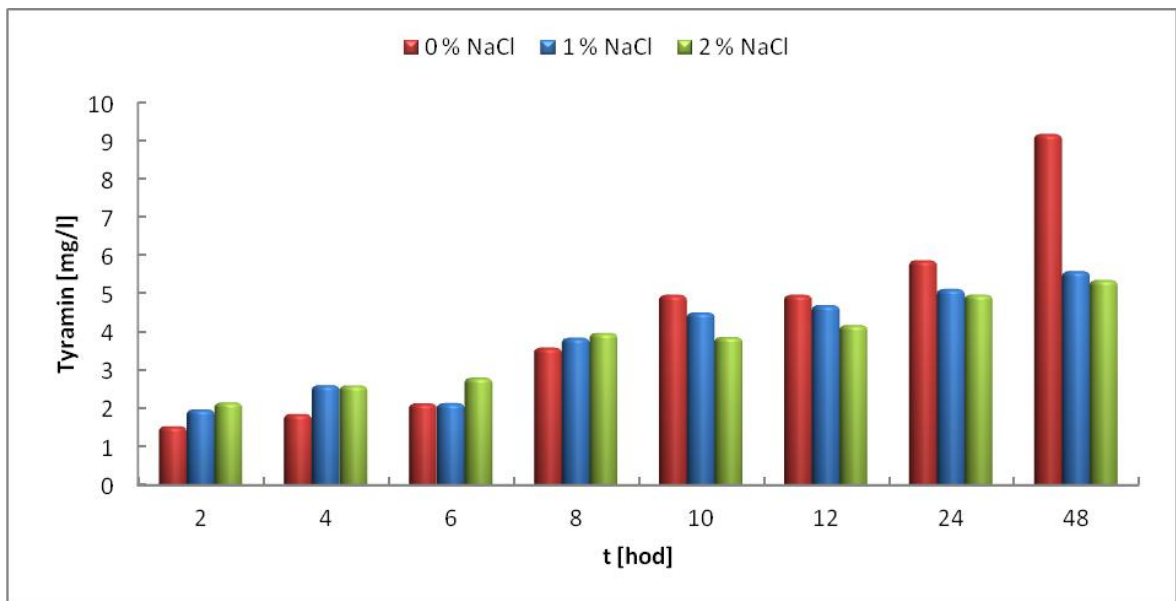
Obrázek 12: Vliv koncentrace NaCl na produkci tyraminu kmenem *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 při pH 6,8 s přidavkem 4,80 % (w/v) laktózy – 37 °C

Vliv kombinace faktorů

Nejvýraznější dekarboxylázová aktivita kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 byla detekována v kultivačním médiu s iniciačním pH $5,0 \pm 0,2$, přidavkem 0,25 % (w/v) laktózy a 2,0 % (w/v) NaCl. Za posledních 24 hodin kultivace se množství vyprodukovaného tyraminu zvedlo dvojnásobně až na $10,05 \pm 0,39$ mg/l (Obrázek 13). Obdobná kinetika produkce tyraminu byla při stejné kombinaci faktorů při iniciačním pH $6,0 \pm 0,2$. V tomto případě se za posledních 24 hodin kultivace zvedlo již jen o třetinu na $8,61 \pm 0,32$ mg/l. U média s obsahem 0,50 % (w/v) laktózy a iniciačního pH $7,0 \pm 0,2$ byly pro zvýšenou produkci tyraminu od 10. hodiny kultivace vhodnější prostředí bez přítomnosti NaCl a bylo detekováno množství $9,18 \pm 0,77$ mg/l (Obrázek 14). Při žádné jiné kombinaci faktorů nebylo detekováno množství vyšší než 8 mg/l.



Obrázek 13: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 37 °C, 0,25 % (w/v) obsahu laktózy a pH 5.



Obrázek 14: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 37 °C, 0,50 % (w/v) obsahu laktózy a pH 7.

7.1.2 Produkce sperminu při kultivační teplotě 37 °C

Kmen *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 produkoval kromě již zmíněného tyraminu také spermin. Produkce sperminu byla po celou dobu kultivace kolísavá. Nejvyšší množství sperminu ($19,72 \pm 1,77$ mg/l) bylo stanoveno překvapivě v kultivačním médiu s iniciačním pH 7 bez přídavku laktózy a NaCl. Maximální detekované množství při působení různých faktorů je uvedeno v tabulce 8.

Tabulka 8: Maximální detekované množství sperminu při 37 °C.

laktóza/NaCl [% (w/v)]	pH 5	pH 6	pH 7
	spermin [mg/l]		
0,00/0	$1,62 \pm 0,29$	$11,94 \pm 1,54$	$19,72 \pm 1,77$
0,00/1	*ND	$7,72 \pm 0,61$	$11,33 \pm 0,33$
0,00/2	$4,20 \pm 0,06$	$10,46 \pm 0,62$	$13,97 \pm 1,24$
0,25/0	*ND	$8,49 \pm 0,34$	$6,97 \pm 0,47$
0,25/1	*ND	$6,56 \pm 0,40$	$4,45 \pm 0,15$
0,25/2	$6,95 \pm 0,50$	$11,83 \pm 0,64$	$5,71 \pm 0,66$
0,50/0	*ND	$14,02 \pm 0,54$	$8,23 \pm 0,70$
0,50/1	*ND	$6,02 \pm 0,01$	$1,71 \pm 0,57$
0,50/2	$2,61 \pm 0,93$	$5,84 \pm 0,78$	*ND
1,00/0	*ND	$8,79 \pm 0,50$	$10,03 \pm 1,13$
1,00/1	$5,20 \pm 0,22$	$5,56 \pm 1,03$	$11,81 \pm 1,37$
1,00/2	$7,83 \pm 1,05$	$11,18 \pm 0,74$	$10,20 \pm 0,73$

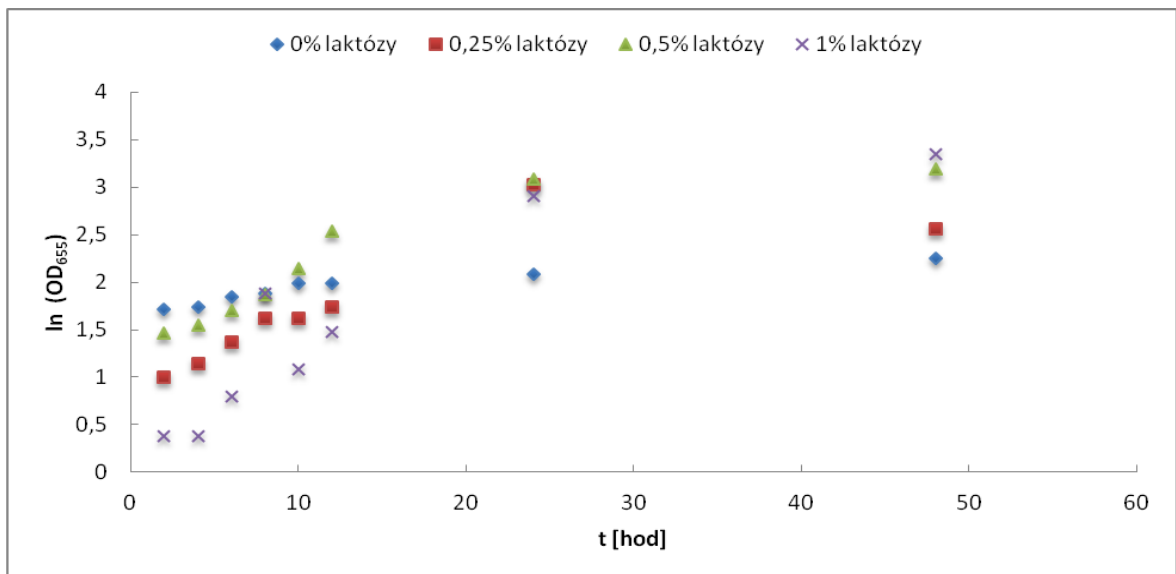
*ND – nebyl detekován

7.1.3 Měření nárůstu buněk při teplotě 37 °C

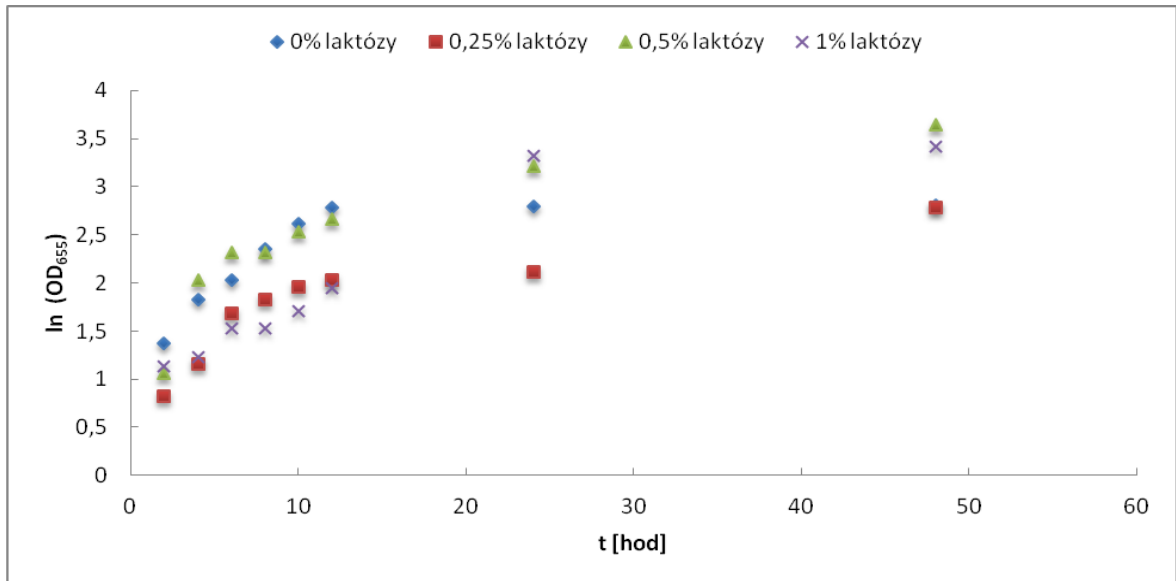
Měřením optické hustoty bakteriální suspenze byl sledován růst testovaného kmene v závislosti na vybraných faktorech prostředí. V průběhu kultivace byl zaznamenán postupný nárůst bakteriální biomasy. Ze tří testovaných hodnot pH bylo nejvyšších hodnot dosaženo při iniciačním pH $5,0 \pm 0,2$ v kultivačním médiu s přídavkem 1,00 % (w/v) laktózy a 1,0 % (w/v) NaCl, kde bylo dosaženo hodnoty 3,76. Nejmenší hodnota optické hustoty (2,26) byla zaznamenána v médiu při iniciačním pH $6,0 \pm 0,2$ bez přídavku soli i laktózy (Obrázek 15).

Na obrázcích 15 – 17 je zřejmé, že v kultivačním médiu při pH $6,0 \pm 0,2$ bylo docíleno nejvyššího nárůstu buněk bez obsahu NaCl v prostředí s přídavkem 1,00 % (w/v) laktózy.

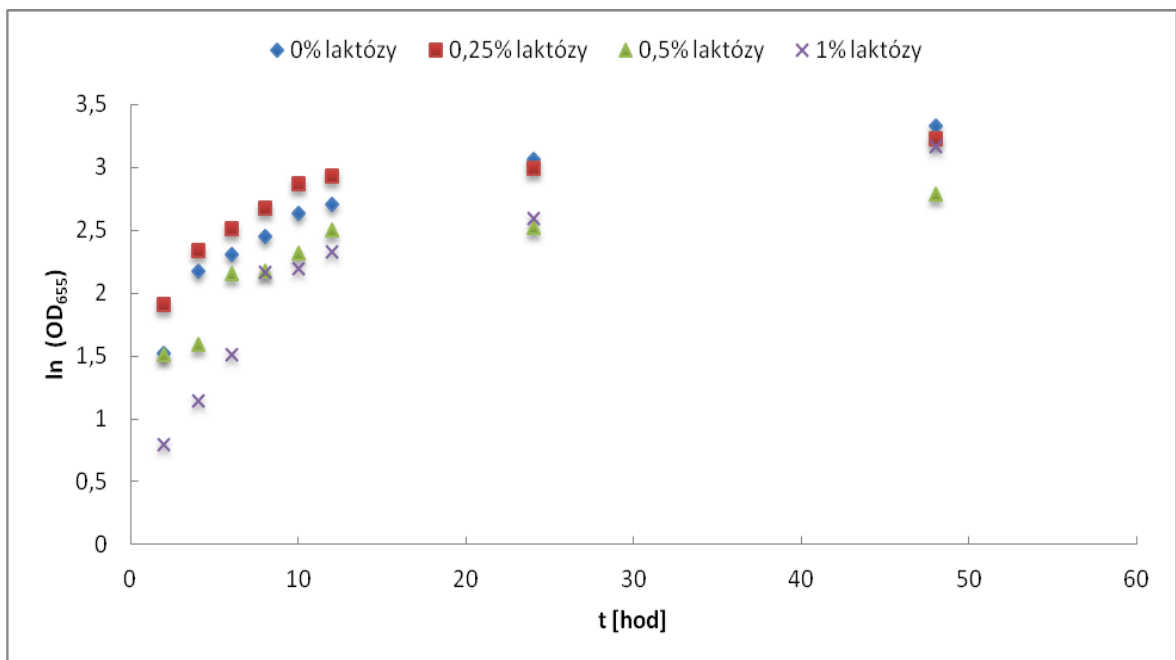
Ve vzorcích, které obsahovaly 1,0 % (w/v) NaCl, byl nejvyšší nárůst buněk patrný již při snížené koncentraci laktózy 0,50 % (w/v) a při přidavku 2,0 % (w/v) NaCl byl nárůst nejvyšší ve vzorcích bez laktózy. Z těchto hodnot vyplývá, že rozvoj testovaného kmene byl ovlivněn koncentrací soli a laktózy v růstovém prostředí. V prostředí s vyšší koncentrací laktózy byl jeho růst podpořen v kombinaci s nižší koncentrací soli a naopak v prostředí s vyšší koncentrací soli byl růst podpořen v kombinaci s nižší koncentrací laktózy. Tato kombinace koncentrací osmoaktivních látek se zdá být výhodná pro růst *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9.



Obrázek 15: Vliv přidavku laktózy na růst *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 37 °C, pH 6.



Obrázek 16: Vliv přidavku laktózy a 1 % (w/v) NaCl na růst *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 37 °C, pH 6.



Obrázek 17: Vliv přidavku laktózy a 2 % (w/v) NaCl na růst *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 37 °C, pH 6.

7.1.4 Stanovení pH kultivačního média po kultivaci při 37 °C

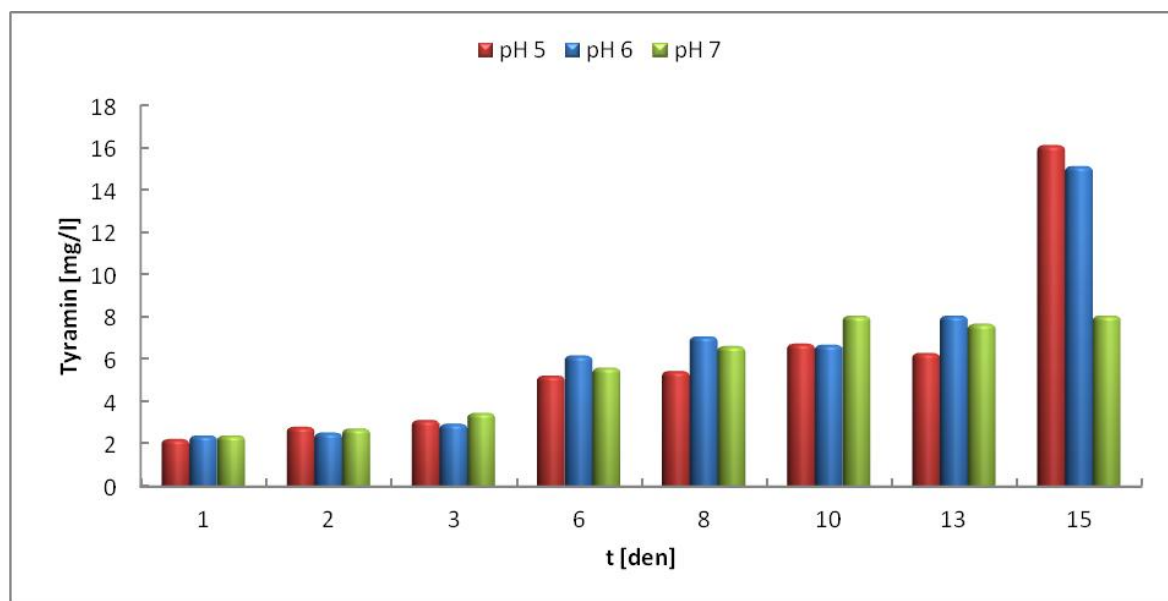
Dalším sledovaným parametrem byly změny pH kultivačních médií po kultivaci testovaného kmene. Během kultivace došlo v důsledku pomnožení testovaného kmene pravděpo-

dobně ke zvýšení produkce kyseliny mléčné a tím i ke změně pH (Příloha I). V případě kultivační teploty 37 °C docházelo pouze k poklesu pH. S rostoucí koncentrací laktózy docházelo k vyššímu poklesu pH. Výraznější pokles byl pravděpodobně způsoben zvýšenou produkcí kyseliny mléčné díky vyššímu množství přítomných zkvasitelných sacharidů. Nejvyšší změna tedy nastala při 1,00 % (w/v) koncentraci laktózy. Koncentrace soli taktéž ovlivnila vývoj pH, při již zmíněném 1,00 % (w/v) přídavku laktózy při pH 7,0 ± 0,2 byl největší pokles zaznamenán u vzorků bez přídavku soli, což naznačuje, že v prostředí s přídavkem NaCl byl částečně inhibován růst bakterií a fermentace laktózy.

7.1.5 Produkce tyraminu při kultivační teplotě 10 °C

Vliv pH

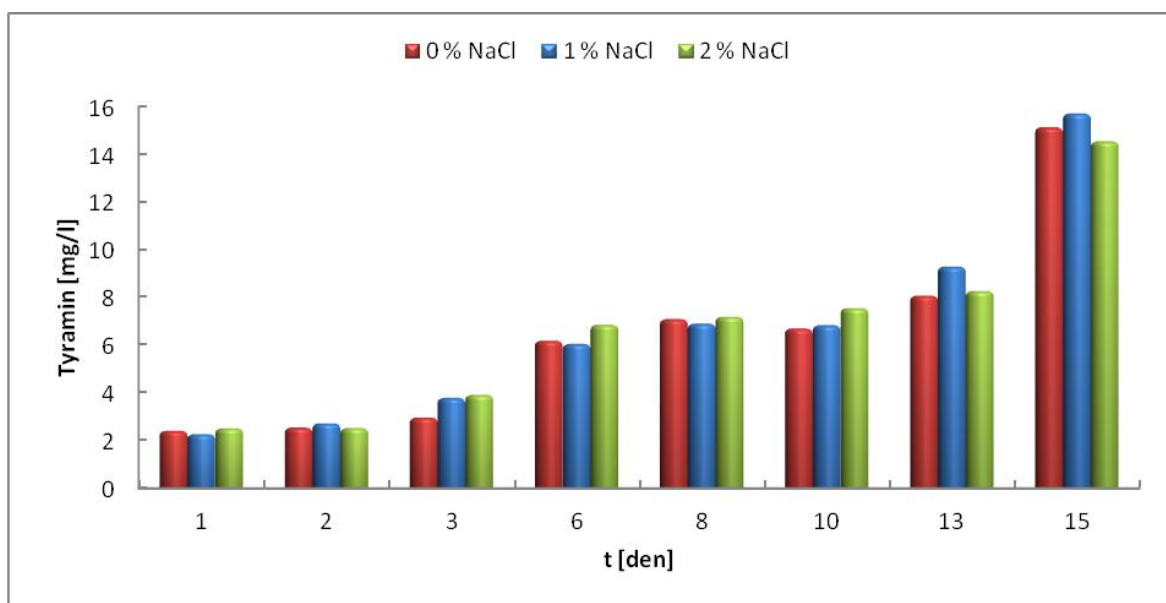
Při 10 °C mělo pH na produkci tyraminu výraznější vliv. Vyšší produkce tyraminu byla detekována po 15 dnech kultivace při iniciačním pH 5,0 ± 0,2, kdy bylo vyprodukováno 16,13 ± 1,83 mg/l tyraminu. Při iniciačním pH 6,0 ± 0,2 bylo dosaženo o něco málo nižší produkce 15,14 ± 1,38 mg/l. Testovaný kmen nejméně produkoval tyramin při iniciačním pH 7,0 ± 0,2, kdy toto množství od 6. dne do 15. dne kultivace výrazně nestouplo (Obrázek 18).



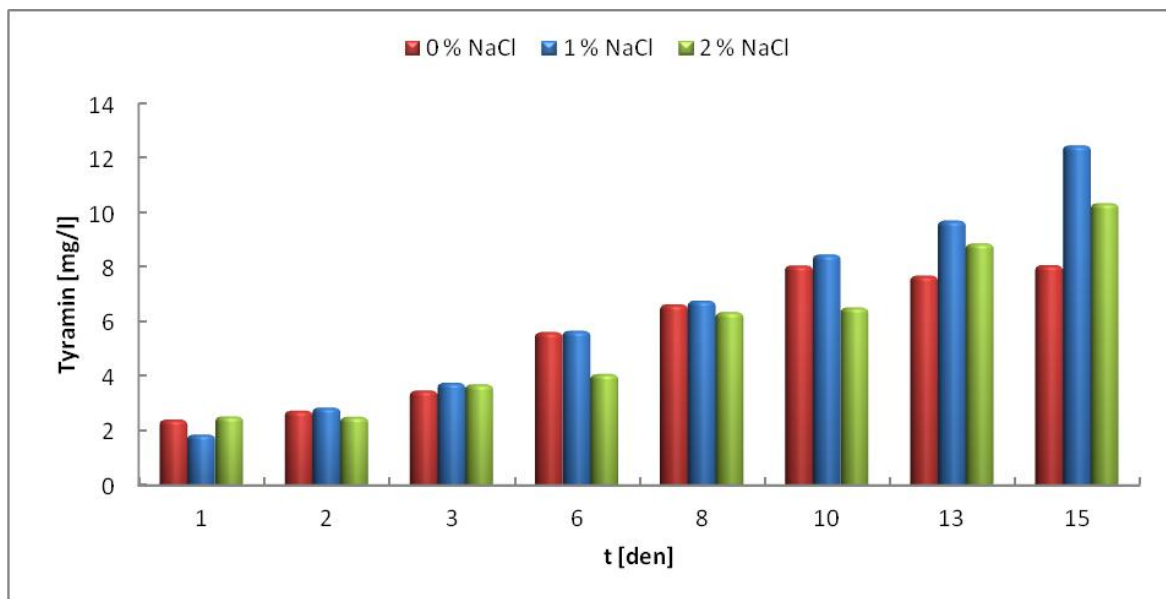
Obrázek 18: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 10 °C bez přídavku laktózy a NaCl.

Vliv soli

Bez přídavku laktózy byla nejvyšší produkce tyraminu ($16,13 \pm 1,83$ mg/l) při iniciačním pH $5,0 \pm 0,2$ za podmínek bez přídavku NaCl. Do 13. dne kultivace byl převažující obsah tyraminu ve vzorcích s přídavkem 2,0 % (w/v) NaCl, ale v posledních 2 dnech kultivace se obsah tyraminu výrazně zvýšil v médiu bez přídavku NaCl (Příloha III). Obrázek 19 ukazuje vývoj produkce tyraminu při iniciačním pH $6,0 \pm 0,2$, kde je zřejmé, že vliv přídavku NaCl prakticky neměl významný vliv na tvorbu tyraminu. Při pH $7,0 \pm 0,2$ množství tyraminu v médiu bez přídavku NaCl postupně vzrůstalo do 10. dne kultivace a následně se toto množství už výrazněji neměnilo do 15. dne kultivace. V médiu s přídavkem 1,0 % (w/v) NaCl množství konstantně vzrůstalo až do 15. dne kultivace, kdy bylo stanoveno $12,47 \pm 0,03$ mg/l. Obdobně tomu bylo i u kultivačního média s přídavkem 2,0 % (w/v) NaCl, avšak s o něco nižší produkcí a konečným množstvím vyprodukovaného tyraminu $10,35 \pm 0,09$ mg/l.



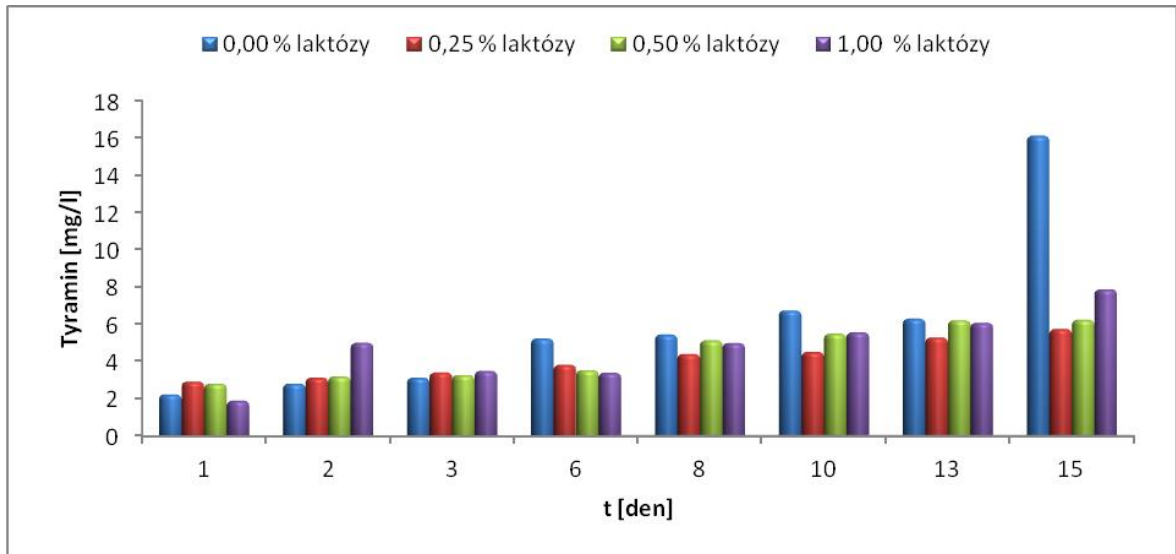
Obrázek 19: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 10 °C bez obsahu laktózy a pH 6.



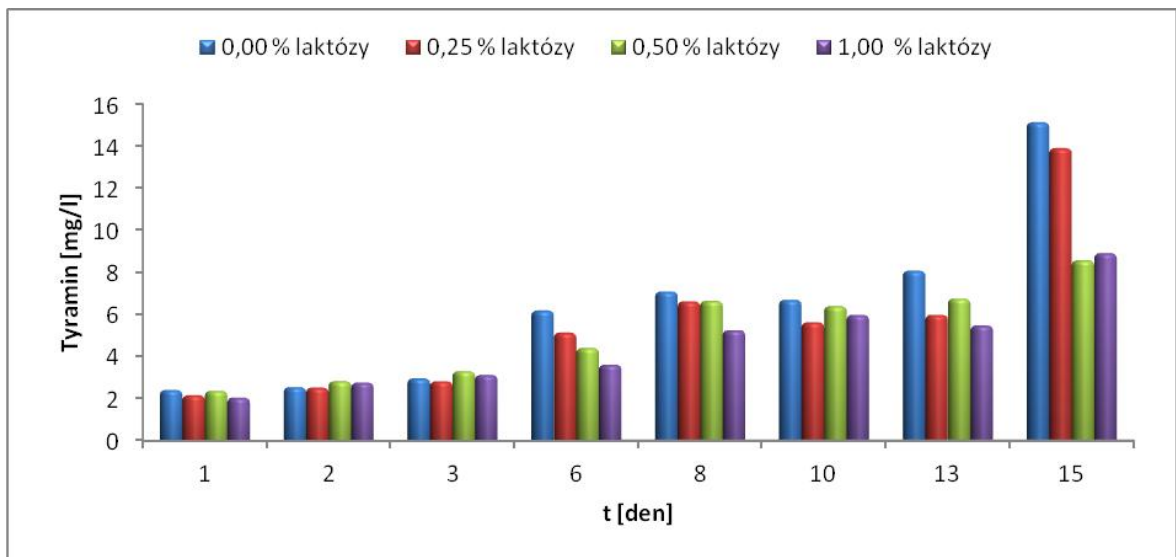
Obrázek 20: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 10 °C bez obsahu laktózy a pH 7.

Vliv laktózy

V supernatantu získaném po kultivaci testovaného kmene při nižší teplotě 10 °C byla stanovena nejvyšší produkce tyraminu při iniciačním pH $5,0 \pm 0,2$ za podmínek, kdy nebyla do kultivačního prostředí přidána laktóza ($16,13 \pm 1,83$ mg/l) a nejnižší množství tyraminu ($5,76 \pm 0,18$ mg/l) bylo detekováno při iniciačním pH $5,0 \pm 0,2$ s přídatkem 0,25 % (w/v) laktózy po 15 dnech kultivace (Obrázek 21). Při pH $6,0 \pm 0,2$ mělo na produkci tyraminu od 6. dne kultivace výraznější vliv prostředí bez přídatku laktózy ($15,14 \pm 1,38$ mg/l) a v posledním odběrovém čase měl výrazný vliv i přídatek 0,25 % (w/v) laktózy ($13,91 \pm 0,88$ mg/l) (Obrázek 22). Jako v předešlých dvou případech, tak i při iniciačním pH $7,0 \pm 0,2$ byla nejvyšší produkce zaznamenána v kultivačním médiu bez přídatku laktózy (Příloha III). Nárůst produkce tyraminu při přídatku laktózy v koncentraci, která je analogická s teoretickým obsahem laktózy v mléce (4,8 % w/v), se příliš nelišil od přídatku 1,00 % (w/v) laktózy v kultivačním médiu. Nejvyšší produkce byla $8,82 \pm 0,28$ mg/l.



Obrázek 21: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 10 °C bez přídavku NaCl a pH 5.

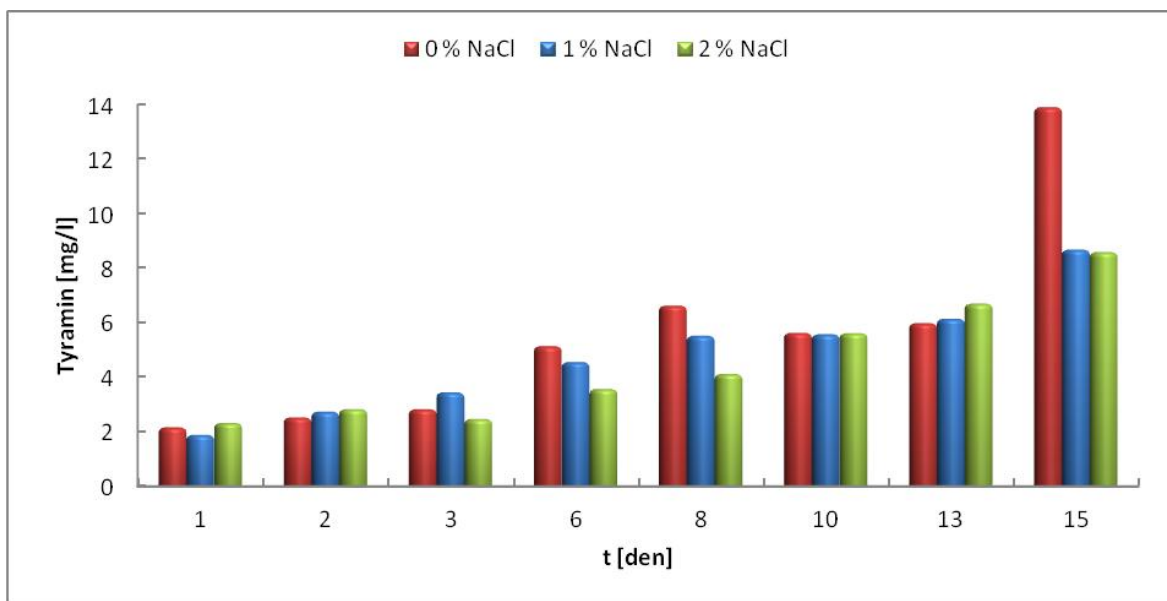


Obrázek 22: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 10 °C bez přídavku NaCl a pH 6.

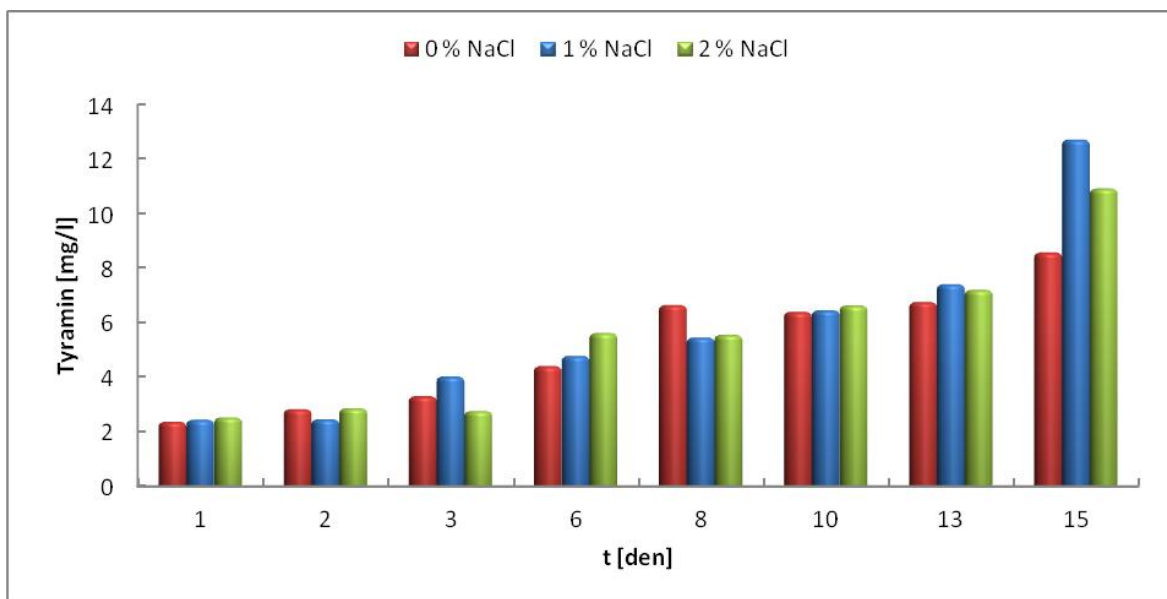
Vliv kombinace faktorů

Nejvýraznější dekarboxylázová aktivita kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 byla detekována v kultivačním médiu s iniciačním pH $5,0 \pm 0,2$ bez přídavku laktózy a NaCl v médiu (Obrázek 21). Významná kinetika produkce tyraminu byla i při inici-

ačným pH $6,0 \pm 0,2$ a to v prostředí s 0,25 až 1,00 % (w/v) laktózy. Výraznější produkce byla zaznamenána od 6. dne kultivace a maximální po 15. dni, kdy při nižší koncentraci laktózy bylo detekováno více tyraminu ($13,91 \pm 0,88$ mg/l) v kultivačním médiu bez přídavku NaCl (Obrázek 23) a naopak při vyšší koncentraci laktózy v prostředí bylo stanoveno vyšší množství tyraminu (12,89 – 13,19 mg/l) v kultivačním médiu s přídavkem NaCl (Obrázek 24).



Obrázek 23: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 10 °C s přídavkem 0,25 % (w/v) laktózy a pH 6.



Obrázek 24: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 10 °C s přídavkem 1,00 % (w/v) laktózy a pH 6.

7.1.6 Produkce sperminu při kultivační teplotě 10 °C

Produkce sperminu byla při kultivační teplotě 10 ± 1 °C rovněž po celou dobu kultivace kolísavá. Nejvyšší množství sperminu ($55,69 \pm 4,62$ mg/l) bylo stanoveno v kultivačním médiu s iniciačním pH $5,0 \pm 0,2$ bez přídavku laktózy a NaCl. Maximální detekované množství v závislosti na různých faktorech je uvedeno v tabulce 9.

Tabulka 9: Maximální detekované množství sperminu při 10 °C.

laktóza/NaCl [% (w/v)]	pH 5	pH 6	pH 7
	spermin [mg/l]		
0,00/0	$55,69 \pm 4,62$	$37,33 \pm 2,90$	$38,43 \pm 0,09$
0,00/1	$31,67 \pm 1,12$	$35,18 \pm 2,49$	$30,56 \pm 0,22$
0,00/2	$36,81 \pm 3,62$	$29,79 \pm 0,50$	$12,68 \pm 0,14$
0,25/0	$1,69 \pm 0,23$	$49,04 \pm 4,84$	$34,96 \pm 3,03$
0,25/1	$7,09 \pm 0,49$	$7,20 \pm 0,74$	$23,08 \pm 2,11$
0,25/2	$14,03 \pm 0,90$	$4,61 \pm 0,26$	$23,95 \pm 1,32$
0,50/0	$3,72 \pm 0,01$	$10,27 \pm 0,02$	$39,06 \pm 2,64$
0,50/1	$3,25 \pm 0,19$	$3,61 \pm 0,40$	$31,24 \pm 2,26$
0,50/2	*ND	*ND	$22,06 \pm 0,97$
1,00/0	$6,39 \pm 0,27$	$7,73 \pm 0,38$	$50,20 \pm 1,24$
1,00/1	$11,37 \pm 1,04$	$2,94 \pm 0,03$	$35,34 \pm 3,64$
1,00/2	$8,91 \pm 0,19$	$10,31 \pm 0,49$	$36,39 \pm 3,30$

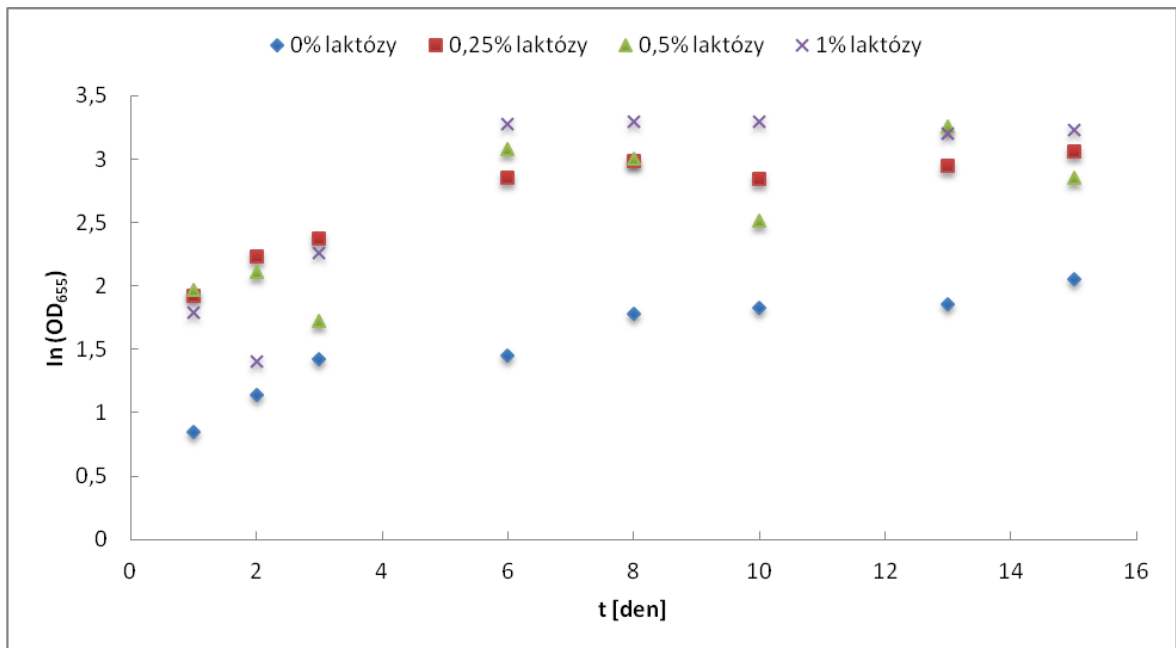
*ND – nebyl detekován

7.1.7 Měření nárůstu buněk během kultivaci při 10 °C

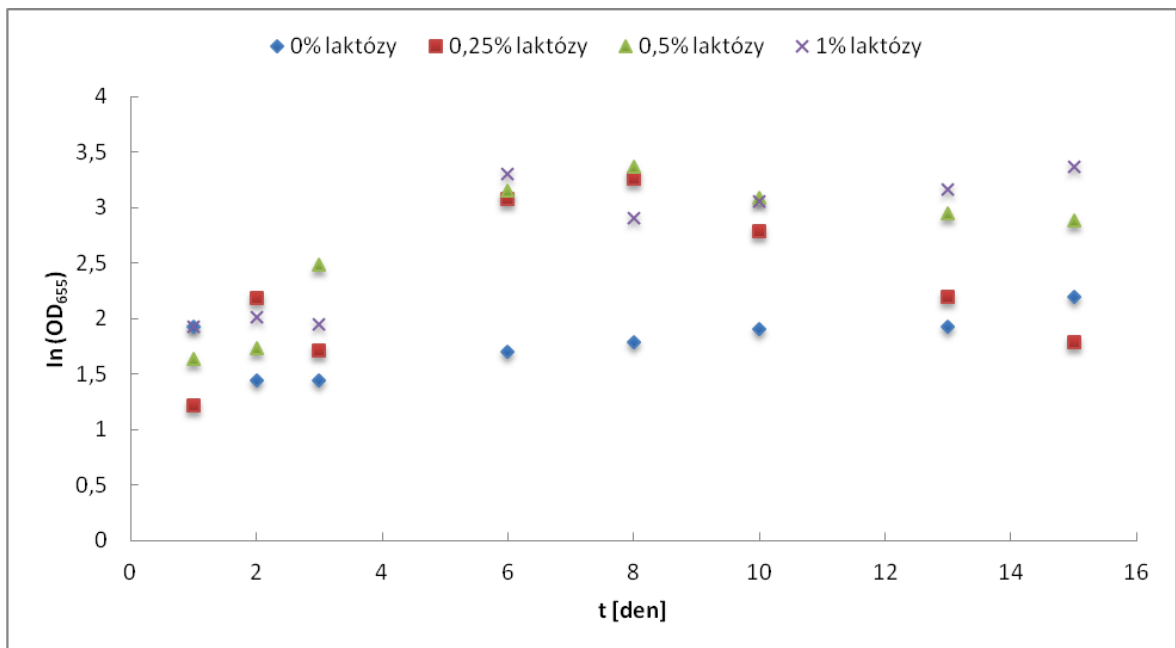
V průběhu kultivace byl zaznamenán postupný nárůst bakteriální biomasy. Ze tří testovaných hodnot pH bylo nejvyšších hodnot dosaženo při iniciačním pH $6,0 \pm 0,2$ v kultivačním médiu s přídavkem 0,50 % (w/v) laktózy a 1,0 % (w/v) NaCl po 8 dnech kultivace a s přídavkem 1,00 % (w/v) laktózy a 1,0 % (w/v) NaCl po 15 dnech kultivace, kde bylo dosaženo hodnot 3,364. Nejmenší hodnoty optické hustoty byly zaznamenány v médiu bez přídavku laktózy při všech iniciačních pH. (Obrázek 25 - 27).

Na obrázcích 25 – 27 je zřejmé, že v kultivačním médiu s přídavkem 0,25 až 1,00 % (w/v) laktózy a pH $6,0 \pm 0,2$ došlo k maximálnímu nárůstu bakteriální biomasy do 6. až 8. dne kultivace a následně už nedocházelo k nárůstu a množství se spíše snižovalo nebo mělo

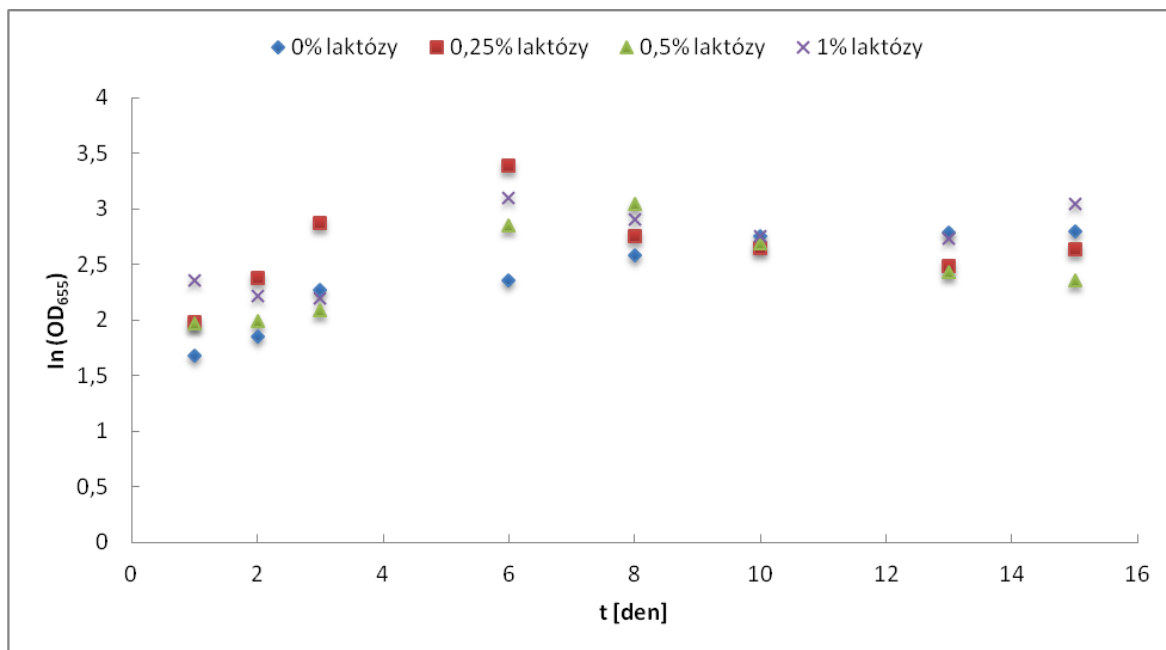
konstantní charakter. Výjimkou bylo médium bez přídavku laktózy, kdy byl zaznamenán postupný nárůst biomasy až k 15. dni kultivace.



Obrázek 25: Vliv přídavku laktózy na růst *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 10 °C, pH 6.



Obrázek 26: Vliv přídavku laktózy a 1 % (w/v) NaCl na růst *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 10 °C, pH 6.



Obrázek 27: Vliv přidavku laktózy a 2 % (w/v) NaCl na růst *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 10 °C, pH 6.

7.1.8 Stanovení pH kultivačního média po kultivaci při 10 °C

Nejvyšší pokles pH při kultivační teplotě 10 °C byl u přidavku 1,00 % (w/v) laktózy a 2,0 % (w/v) soli. Se zvyšujícím se iniciačním pH a zvyšující se koncentrací laktózy docházelo k většímu poklesu pH. Při nejnižším sledovaném iniciačním pH byl maximální pokles zhruba o 0,5 a při nejvyšším iniciačním pH až o 1,7 po 15 dnech kultivace (Příloha I). U koncentrace laktózy 0,50 % (w/v) byl pokles v průměru o pH 0,5, zatímco při koncentraci laktózy 0,25 % (w/v) se pH po 15 dnech kultivace mírně zvýšilo průměrně o pH 0,15, což by se dalo považovat i za výkyv pH média. Ve vzorcích bez přítomnosti laktózy nedocházelo po celou dobu kultivace k žádné výraznější změně pH.

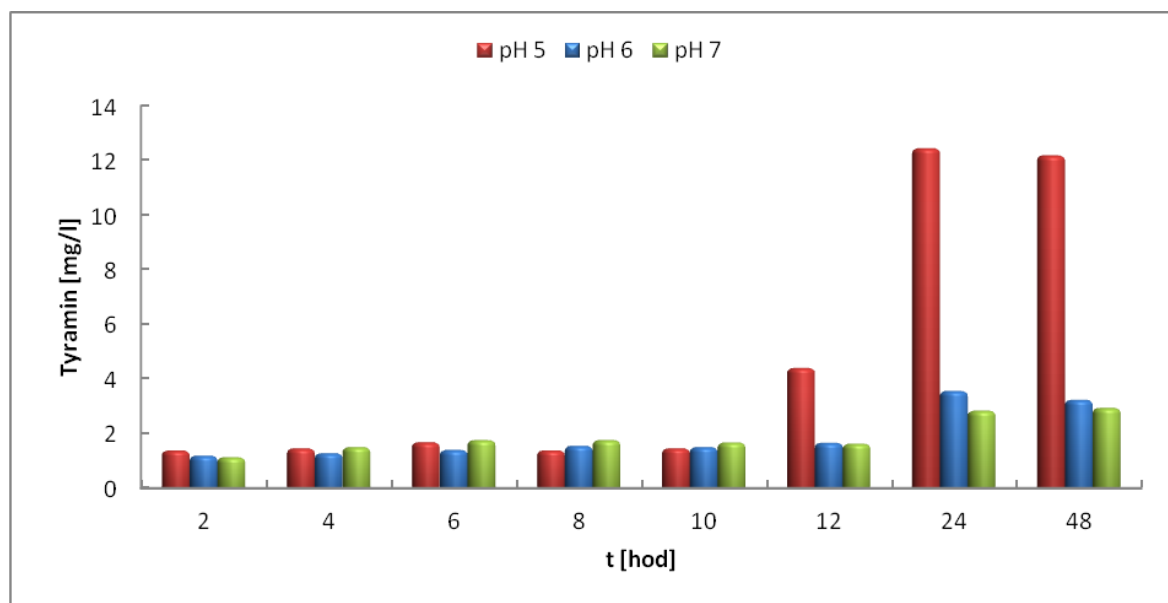
7.2 Produkce biogenních aminů v mléce

Z testovaných biogenních aminů byl v mléce stanoven pouze tyramin, ostatní BA byly zastoupeny minoritně nebo nebyly vůbec detekovány.

7.2.1 Produkce biogenních aminů při 37 °C

Vliv pH

Při iniciačním pH $5,0 \pm 0,2$ se produkce tyraminu do 10. hodiny kultivace pohybovala pod hodnotou 1,5 mg/l a po 12. hodině kultivace došlo k nárůstu tyraminu, který dosáhl maximální hodnoty ($12,45 \pm 0,07$ mg/l) po 24 hodinách kultivace. Nejnižší produkce ($4,75 \pm 0,90$ mg/l) byla při pH $6,0 \pm 0,2$ a pH $7,0 \pm 0,2$, kdy se produkce tyraminu výrazně nezvyšovala v průběhu celé kultivace, jak je patrné z obrázku 28.

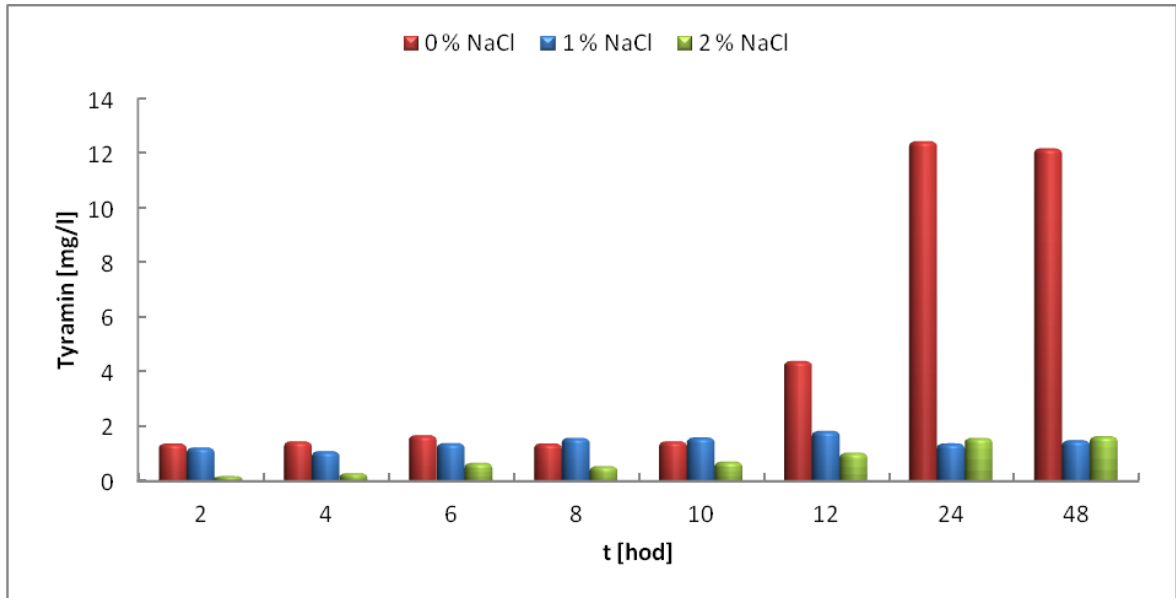


Obrázek 28: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 v mléce v závislosti na pH při 37 °C.

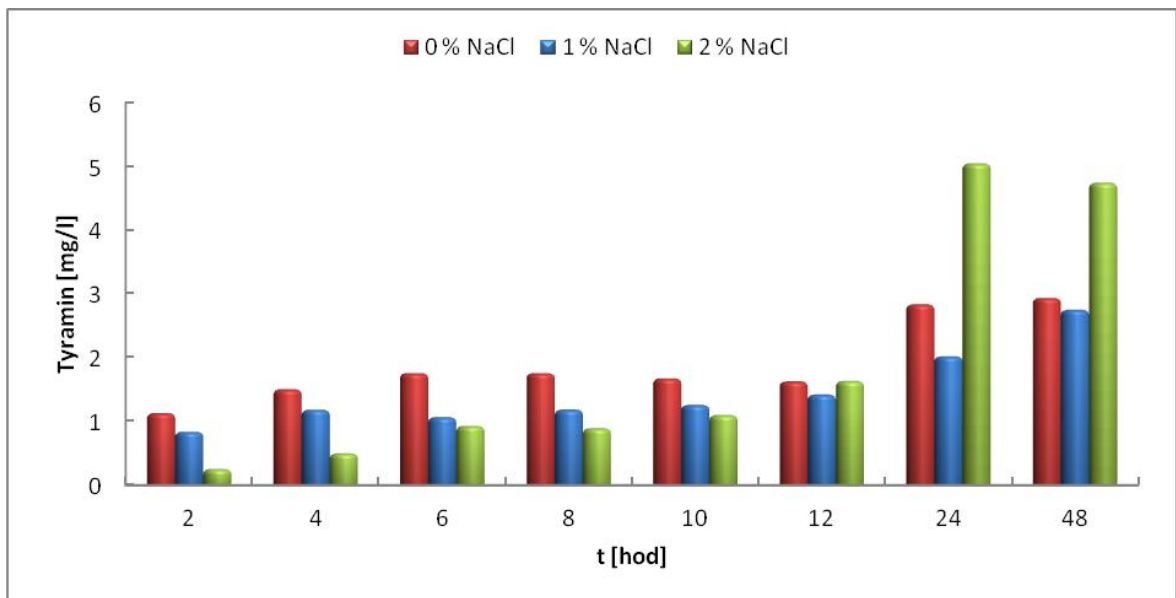
Vliv NaCl

Přídavek chloridu sodného měl u iniciačního pH $5,0 \pm 0,2$ negativní vliv na tvorbu tyraminu, což se projevilo nízkou tvorbou (1,65 – 1,84 mg/l). Naproti tomu ve vzorcích bez přídavku NaCl bylo vyprodukováno až $12,45 \pm 0,07$ mg/l (Obrázek 29). Kmen *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 tvořil tyramin do 12. hodiny kultivace v množství nepř-

sahující 2 mg/l a vyšší množství tyraminu bylo vyprodukováno až po 24 hodinách, kdy při iniciačním pH $6,0 \pm 0,2$ bylo nejvíce tyraminu přítomno v médiu bez přídavku NaCl (Příloha IV) a při iniciačním pH $7,0 \pm 0,2$ s přídavkem 2 % (w/v) NaCl (Obrázek 30).



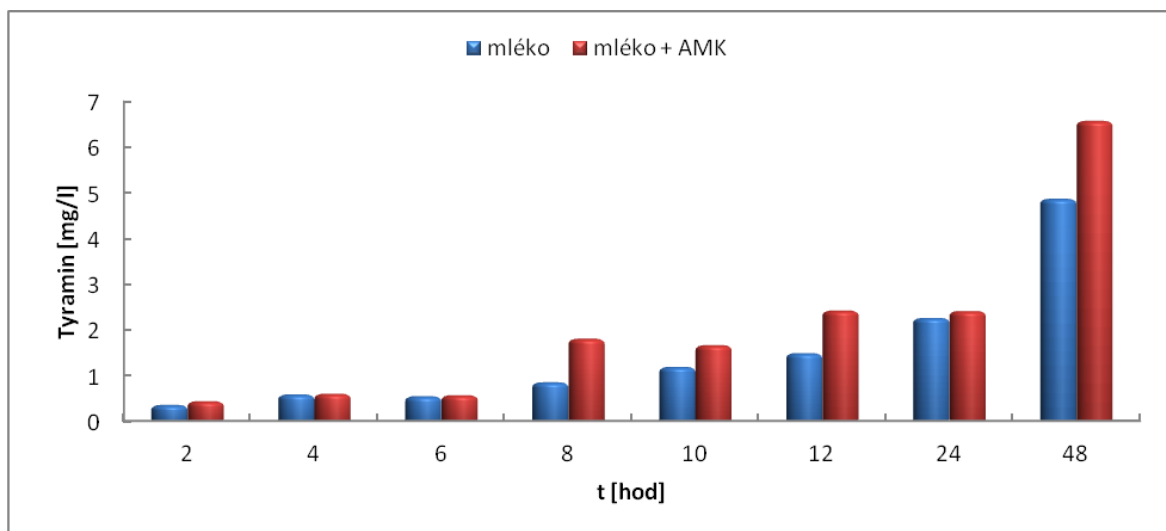
Obrázek 29: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 v mléce v závislosti na přídavku NaCl při 37 °C a pH 5.



Obrázek 30: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 v mléce v závislosti na přídavku NaCl při 37 °C a pH 7.

Vliv přidavku aminokyselin

Vyšší tvorba tyraminu byla podpořena přidavkem 0,3 % (w/v) tyrozinu do mléka. V mléce bez přidavku aminokyseliny bylo stanoveno po 48 hodinách kultivace $4,87 \pm 0,22$ mg/l a mléce s tyrozinem $6,58 \pm 1,12$ mg/l (Obrázek 31).



Obrázek 31: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 v mléce v závislosti na přidavku aminokyselin při 37 °C.

7.2.1.1 Stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM)

V případě vzorků mléka nebylo vhodné použití optické hustoty pro tvorbu růstových křivek testovaného kmene kvůli přítomnosti mnoha chromoforických skupin a vysokému zákalu, proto byla použita plotnová metoda stanovení CPM na živné půdě MRS. CPM byl stanoven pouze v neupraveném mléce, mléce s přidavkem 0,3 % (w/v) aminokyselin a mléce s přidavkem 1,0 % (w/v) NaCl. Nejvyšší nárůst bakterií byl zaznamenán ve vzorcích neupraveného mléka a nejnižší naopak v mléce s přidavkem 1,0 % (w/v) NaCl.

7.2.1.2 Stanovení pH kultivačního média

V souvislosti s produkcí biogenních aminů bylo měřeno i pH supernatantu (Příloha II). Ve vzorcích s iniciačním pH $5,0 \pm 0,2$ neměla koncentrace NaCl vliv na změnu pH v médiu. Ve všech vzorcích kleslo pH o 0,5. Naopak při iniciačním pH $6,0 \pm 0,2$ došlo u vzorků s přidavkem NaCl nejprve k poklesu pH a následně po 12. hodinách kultivace k nárůstu až

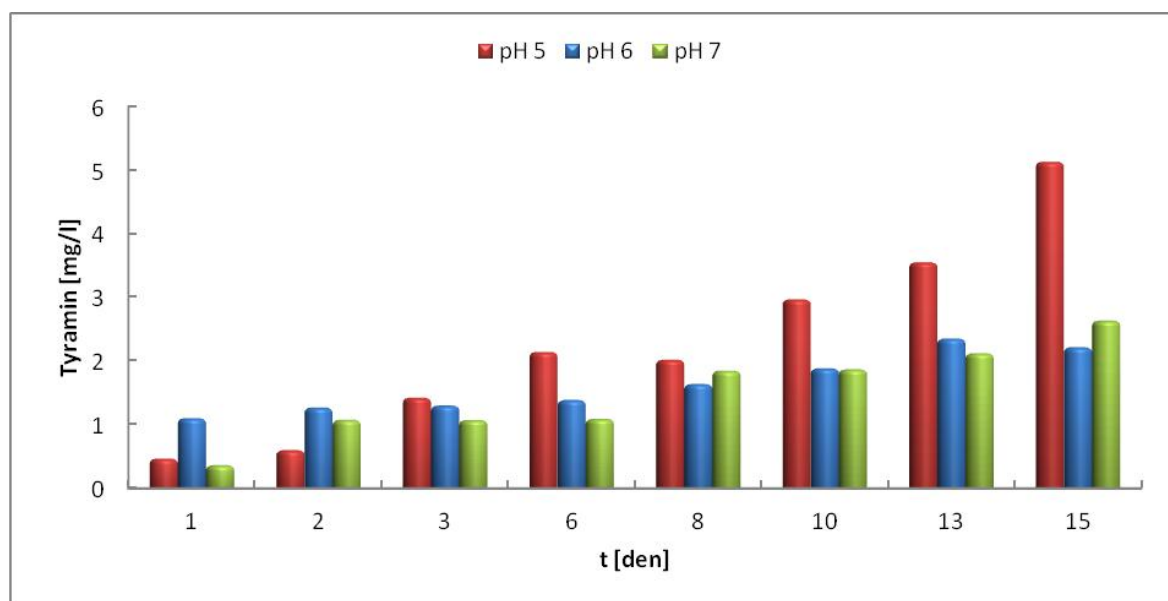
na hodnoty pH 6,09 a 6,24. V důsledku poklesu pH mohlo dojít k podpoře bakteriálních dekarboxyláz a tím i zvýšení produkce zásaditých biogenních aminů, což vedlo k opětovnému nárůstu pH. Při iniciačním pH $7,0 \pm 0,2$ vyšší koncentrace NaCl způsobila vyšší pokles pH média.

U vzorků mléka obsahující přidané aminokyseliny byl zaznamenán pokles na pH 6,14 a následně nárůst pH na hodnotu 6,44 a u vzorků mléka bez přidaných aminokyselin pH postupně klesalo až na 5,85.

7.2.2 Produkce biogenních aminů při 10 °C

Vliv pH

Při 10 °C mělo pH na produkci tyraminu také významný vliv. Vyšší produkce tyraminu byla detekována už od 3. dne kultivace při iniciačním pH $5,0 \pm 0,2$. Maximální množství tyraminu po 15 dnech kultivace bylo $5,13 \pm 0,42$ mg/l. Při iniciačním pH $6,0 \pm 0,2$ a pH $7,0 \pm 0,2$ bylo dosaženo zhruba poloviční množství (2,22 – 2,64 mg/l) (Obrázek 32).

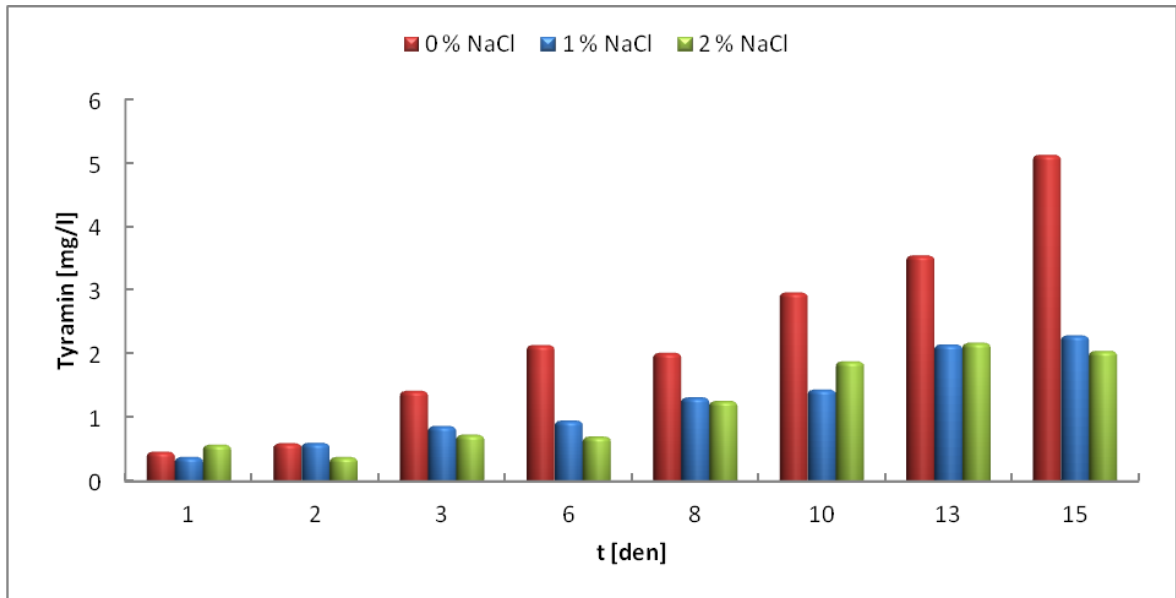


Obrázek 32: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 v mléce v závislosti na pH při 10 °C.

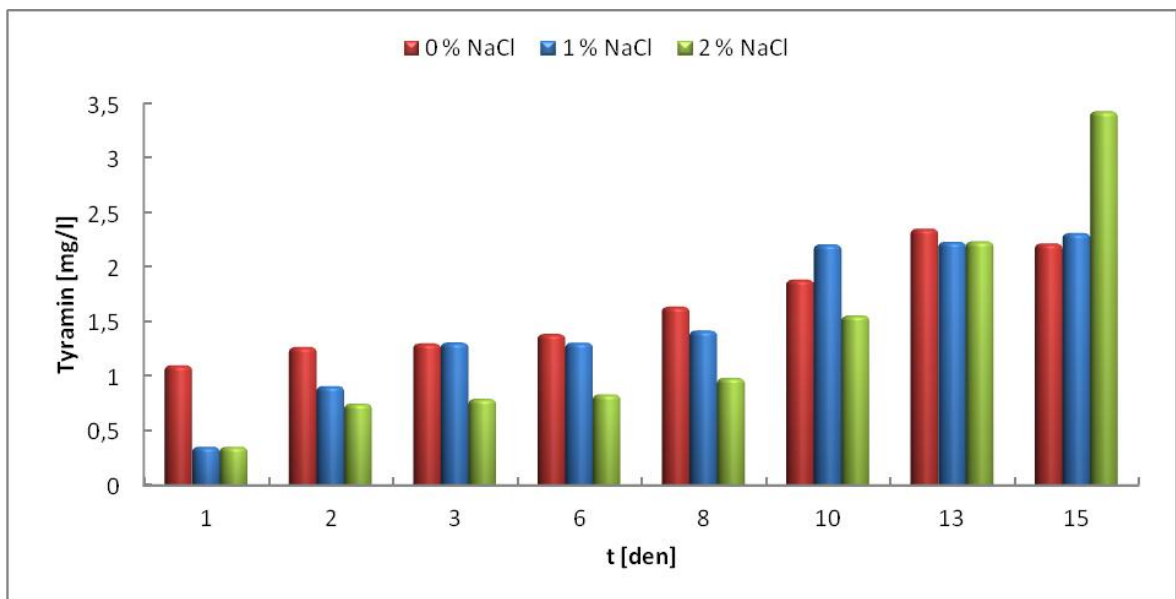
Vliv NaCl

Přídavek chloridu sodného je dalším faktorem, který ovlivnil produkci tyraminu v mléce. Obrázky 33 – 35 ukazují, že nejvyšší produkce tyraminu v mléce ($5,13 \pm 0,42$ mg/l) byla

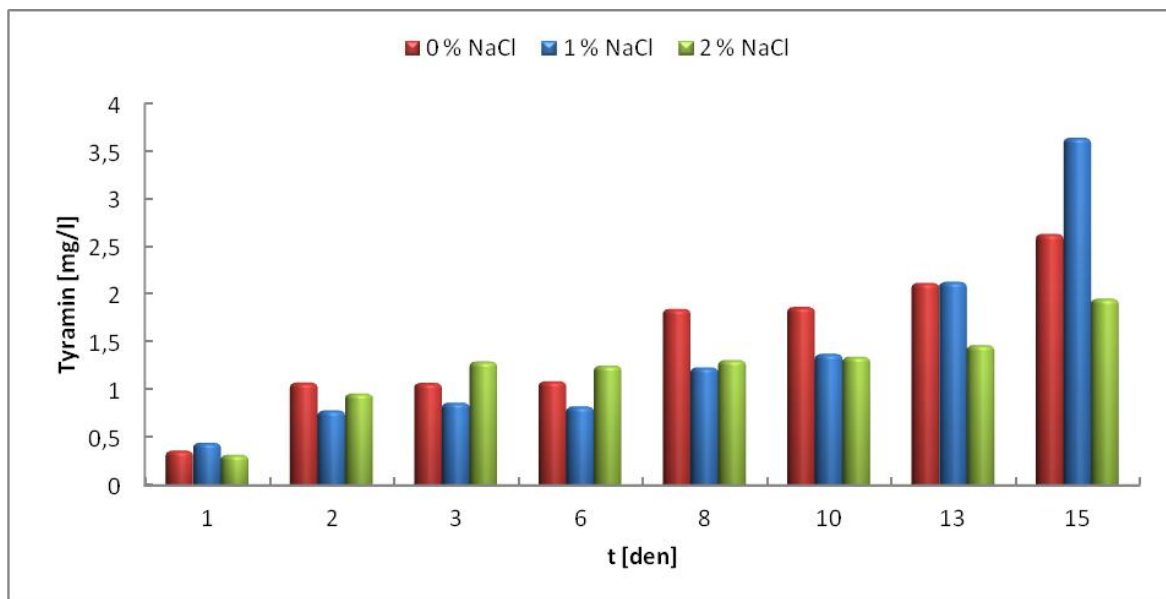
zaznamenána při počátečním pH $5,0 \pm 0,2$ v kultivačním médiu bez přídavku NaCl. Při pH $6,0 \pm 0,2$ bylo po 15 dnech kultivace stanoveno nejvíce tyraminu ($3,64 \pm 0,25$ mg/l) při aplikované koncentraci soli 2,0 % (w/v) a při pH 7 zase u 1,0 % (w/v) soli ($3,43 \pm 0,33$ mg/l).



Obrázek 33: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 v mléce v závislosti na přídavku NaCl při 10 °C a pH 5.



Obrázek 34: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 v mléce v závislosti na přídavku NaCl při 10 °C a pH 6.



Obrázek 35: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 v mléce v závislosti na přidavku NaCl při 10 °C a pH 7.

Vliv přidavku aminokyselin

Vyšší tvorba tyraminu byla podpořena i přidavkem 0,3 % (w/v) tyrozinu do mléka. V mléce bez přidavku aminokyseliny bylo stanoveno po 15 dnech kultivace $1,33 \pm 0,08$ mg/l a mléce s tyrozinem $2,18 \pm 0,06$ mg/l (Příloha IV).

7.2.2.1 Stanovení celkového počtu mikroorganismů

Nejvyšší nárůst bakterií při 10 °C byl stanoven po 6 dnech kultivace ve vzorcích neupraveného mléka, kdy v dalších dnech kultivace došlo k mírnému poklesu počtu mikroorganismů. Nižší nárůst testovaného kmene byl pozorován ve vzorcích mléka s přidavkem 0,3 % (w/v) aminokyselin a mléka s přidavkem 1,0 % (w/v) NaCl, kdy růstové křivky měly velmi podobný charakter.

7.2.2.2 Stanovení pH kultivačního média

Při měření nebyl stanoven žádný vzorek, ve kterém by došlo k nárůstu pH v průběhu kultivace. Nejvyšší pokles pH při 10 °C byl u počátečního pH $7,0 \pm 0,2$ a přidavku soli 2,0 % (w/v), kdy pH kleslo až na $6,17 \pm 0,01$. Nejnižší pokles byl u počátečního pH $5,0 \pm 0,2$, v tomto případě pH kleslo na 4,5. Dá se tedy říci, že se zvyšujícím se počá-

tečním pH byl pokles vyšší. Vliv NaCl na změnu pH byl také patrný. S vyšším přidavkem NaCl došlo k nižšímu poklesu pH.

7.3 Souhrnná diskuze

Vzniku biogenních aminů je v současné době věnována nemalá pozornost. Tyto nízkomolekulární bazické dusíkaté látky mají v organismu člověka významné fyziologické funkce, například jako prekurzory hormonů nebo nukleových kyselin. Avšak jejich vysoké množství v potravinách vede k alimentárním intoxikacím. Proto je jejich obsah sledován a zároveň je sledována vhodnost použití kmenů starterových a probiotických mikroorganismů a jejich dekarboxylázová aktivita.

Tato práce byla zaměřena na sledování faktorů vnějšího prostředí (různé koncentrace laktózy a NaCl, rozdílné počáteční pH a teplota kultivace), které mohou ovlivňovat dekarboxylázovou aktivitu kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9. Práce se soustředila na produkci biogenních aminů v podmínkách *in vitro*, kde byl sledován vliv přídatku laktózy v koncentracích 0 – 1 % (w/v), chloridu sodného v koncentracích 0 – 2 % (w/v), vliv pH a kultivační teploty. Dále byly tyto faktory (přídavek 0 – 2 % (w/v) NaCl, přídavek 0,3 % AMK, pH a teplota) sledovány i v odstředěném mléce.

Faktory a jejich úrovně byly voleny tak, aby se přiblížily podmínkám technologického procesu výroby přírodních sýrů. Testovaný kmen byl izolován z výroby sýrů eidamského typu, proto byl kultivován při teplotě 10 ± 1 °C, která se využívá během technologického procesu zrání přírodních sýrů (Buňková a kol. 2010). Druhá kultivační teplota byla zvolena tak, aby odpovídala teplotě gastrointestinálního traktu člověka.

Produkce biogenních aminů je omezena dostupnými aminokyselinami v prostředí, proto bylo kultivační médium obohaceno přídavkem 0,3 % (w/v) aminokyselin (arginin, lyzin, ornitin, tyrozin), které jsou prekurzory pro sledované biogenní aminy.

Jedním z nejvýznamnějších faktorů ovlivňujícím dekarboxylázovou aktivitu je pH. Hodnoty pH byly měřeny ve všech odběrových časech a měnily se v důsledku zkvašování laktózy a produkce biogenních aminů v souvislosti nárůstu testovaného kmene. Snižování pH může podpořit přítomnost sacharidů, v tomto případě použitá laktóza. Existují různé názory na produkci biogenních aminů v závislosti na pH. Jedním z nich je fakt, že v kyselém prostředí se mikroorganismy brání těmto nevhodným podmínkám tím, že produkují zásadité bio-

genní aminy, aby docílily optimálního pH (Spano, 2010). Naopak jiné studie dokazují, že právě nízké pH prostředí zajišťuje nízkou produkci biogenních aminů (Bover-Cid a kol., 2008).

V této práci bylo měřeno pH v průběhu kultivace a výsledky ukazují, že docházelo převážně k poklesu pH. Nejvýraznější vliv pH byl zjištěn v případě produkce tyraminu, kdy nejvyšší hodnoty bylo dosaženo převážně v kultivačním médiu s nejnižším iniciačním pH 5 a to jak *in vitro*, tak u mléka. Výjimkou byla kultivace při 37 °C v podmínkách *in vitro*, kdy vyšších hodnot bylo dosaženo při pH 6 a 7. Morreno-Aribas a kol. (1999) ve své studii uvádí, že optimální dekarboxylázová aktivita u *Lactobacillus brevis* je při pH 5,0. Zabývali se vlivem pH v rozmezí 2,0 až 9,0 při konstantní koncentraci substrátu. Tyrozin-dekarboxyláza byla aktivní v rozmezí pH 3,0 až 7,0 s optimálním pH 5,0.

Dalším sledovaným faktorem byl vliv NaCl. Nejvyšší produkce tyraminu *in vitro* při 37 °C bylo dosaženo při pH 5 a 6 v kultivačním médiu, které kombinovalo přídavek 0,25 % (w/v) laktózy a 2,0 % chloridu sodného. Tato kombinace se zdála být pro produkci tyraminu nejvýhodnější. Při kultivaci při 10 °C byla nejvyšší tvorba tyraminu ve vzorcích obsahujících přídavek NaCl, při iniciačním pH 5,0 byla do 13. dne kultivace převažující produkce s přídavkem 2,0 % (w/v) NaCl. Podobně tomu bylo i při pH 7,0, kdy bylo nejvíce tyraminu stanoveno ve vzorcích s 1% (w/v) přídavkem NaCl a o něco méně pak s 2% (w/v) přídavkem NaCl. Buňková a kol. (2010) prokázali, že 3 z 5 testovaných kmenů (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946) produkovaly tyramin v prostředí s 0 – 2 % (w/v) soli a zbývající 2 kmeny (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 a CCDM 1004) produkovaly tyramin jen v přítomnosti 2 % (w/v) NaCl. Koncentrace soli 2 % odpovídá obsahu NaCl v mnoha typech přírodních sýrů. Podobné výsledky zjistili i Greif a kol. (2006), kteří zkoumali dekarboxylázovou aktivitu vybraných kmenů rodu *Enterobacter*. Zjistili, že více kadaverinu a histaminu vznikalo v prostředí s 1,2 až 3,0 % (w/v) NaCl než v prostředí s přídavkem 0,2 % (w/v) NaCl. Zvýšení koncentrace soli na 4,5 a 6,8 % (w/v) NaCl vedlo ke snížení produkce biogenních aminů. Pleva a kol. (2012) také zkoumali vliv přídavku chloridu sodného a zjistili, že znatelný rozdíl v produkci tyraminu u *Enterococcus faecium* byl při koncentracích do 3,0 % (w/v) a nad 3,0 % (w/v) NaCl. Koncentrace 6 % (w/v) NaCl výrazně inhibovala produkci tyraminu. Pereira a kol. (2009) přišli s hypotézou, že Na⁺ ionty, které se podílejí na regulaci intracelulárního pH mají zásadní roli v tyrozin-dekarboxylázové

dráže. Na^+ ionty jsou důležité pro Na^+/H^+ antiportový systém, protože se vymění za H^+ ionty, které jsou odstraněny z buněk. Tímto jevem lze vysvětlit zvýšenou produkci tyraminu v prostředí s chloridem sodným.

V případě mléka byl vliv NaCl výraznější. Při obou kultivačních teplotách bylo vyšší produkce dosaženo ve vzorcích bez přídavku NaCl . Obsažený NaCl působil při iniciačním pH 5,0 inhibičně na produkci tyraminu. Avšak při pH 6,0 a 7,0 bylo stanoveno vyšší množství tyraminu v mléce s přídavkem NaCl .

Množství laktózy v koncentracích 0,00; 0,25; 0,50 a 1,00 % (w/v) bylo přidáno z důvodu podpory růstu bakterií a případné podpory produkce biogenních aminů. Nejvyšší nárůst bakterií byl zaznamenán při přídavku 0,50 a 1,00 % (w/v) laktózy do kultivačního média a naopak nejnižší byl v prostředí bez laktózy. Nejvyšší produkce tyraminu při kultivační teplotě 37 °C byla zaznamenána převážně bez přídavku laktózy v médiu. Při počátečním pH 7,0 kultivačního média byla nejvyšší produkce při přídavku 0,50 % (w/v) laktózy. Zřejmý nárůst produkce je zvláště viditelný při přídavku laktózy v koncentraci, která je analogická s teoretickým obsahem laktózy v mléce (4,80 %) při 37 °C teploty kultivace. V tomto prostředí byla produkce zdaleka nejvyšší ($52,28 \pm 0,18$ mg/l). Naproti tomu při teplotě kultivace 10 °C, bylo stanovené množství tyraminu přibližně stejné jak v případě koncentrace laktózy 1 % (w/v). Nejvyšší stanovené množství tyraminu bylo při teplotě 10 °C bez přítomnosti laktózy. Buňková a kol. (2010) zjistili, že u testovaných kmenů bakterií rodu *Lactococcus* koncentrace přidané laktózy 0,25 až 1,00 % (w/v) neměla vliv na produkci biogenních aminů. Vyšší přídavek 3,0 % (w/v) laktózy však způsobuje inhibici syntézy dekarboxyláz (Karovičová a Kohajdová, 2005). Vliv různých koncentrací laktózy na produkci biogenních aminů nebyl do současné doby podrobněji popsán a vysvětlen.

Tvorba biogenních aminů je ovlivněna také teplotou a dobou kultivace bakterií. Kalhotka a kol. (2011) studovali vliv teploty a doby kultivace na dekarboxylázovou aktivitu u *Bacillus licheniformis* a zjistili, že kultivací při 6 °C nebyla ani u jednoho z testovaných izolátů zjištěna dekarboxylázová aktivita. Nejvyšší produkce biogenních aminů byla zjištěna při nejvyšší testované kultivační teplotě 37 °C a dekarboxylázová aktivita rostla přímo úměrně s růstem teploty kultivace. Teplota tedy významně ovlivňuje enzymatickou aktivitu mikroorganismů a tím i vznik biogenních aminů. Produkce biogenních aminů byla v diplomové práci při 37 °C v prostředí *in vitro* méně výrazná než při teplotě 10 °C a nejvyšší hodnoty se pohybovaly v rozmezí 8,61 – 10,05 mg/l. Vůbec nejvyšší množství tyraminu bylo zjiště-

no při kultivační teplotě 10 °C a pH 5, kde bylo detekováno $16,13 \pm 1,83$ mg/l tyraminu v kultivačním médiu bez přídavku soli a laktózy. Produkce tyraminu v mléce byla naopak vyšší při kultivační teplotě 37 °C.

Produkce sperminu byla překvapivě vysoká. Nejvyšší množství sperminu ($55,69 \pm 4,62$ mg/l) bylo v kultivačním médiu bez přídavku NaCl a laktózy při iniciačním pH 5. Žádná studie se v současné době nezabývala studiem produkce sperminu u bakterií rodu *Lactobacillus*, avšak spermin byl v menším množství stanoven u *Lactobacillus* i *Lactococcus* společně s dalšími BA. Kuley a kol., (2012) stanovili u *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* spermin v množství 8,78 mg/l a Mangia a kol., (2013) detekovali u *Lactobacillus curvatus* 5,2 mg/l sperminu.

Obecně se dá shrnout, že výše popsané vnější faktory mají vliv na produkci biogenních aminů. Množství vyprodukovaného tyraminu a sperminu kmenem *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 bylo stanoveno v desítkách mg/l. Toto množství, s výjimkou pacientů užívajících léky na inhibici detoxikačního enzymu MAO (monoaminoxidázy), není pro lidské zdraví nebezpečné. Příjem tyraminu přesahující 6 mg se považuje pro tyto pacienty za nebezpečný (Kalač a kol., 2002). Legislativa ČR udává množství pouze pro histamin v rybách a produktech z ryb. Obsah biogenních aminů by měl být z tohoto důvodu v potravinách sledován, aby nedošlo k případným alimentárním intoxikacím.

Rovněž je vhodné dbát správnosti hygienické praxe v průběhu technologie výroby potravin, protože případná kontaminační mikroflóra může mít vysokou dekarboxylázovou aktivitu. Avšak nejen kontaminace může být příčinou výskytu biogenních aminů v potravinách. Některé kmeny starterových i probiotických kultur mohou znamenat značné riziko při výrobě potravin z pohledu tvorby biogenních amin, proto je vhodné testovat tyto kmeny na tvorbu biogenních aminů a zvolit pouze ty, u kterých je dekarboxylázová aktivita velmi nízká nebo žádná.

ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na zmapování kinetiky produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 v podmínkách *in vitro* a v mléce v závislosti na vnějších faktorech. Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích byl sledován vliv pH (5 - 7), koncentrace NaCl (0,0; 1,0 a 2,0 % w/v), koncentrace laktózy (0,00; 0,25; 0,50, 1,00 a 4,80 % w/v) a teploty kultivace (37 a 10 °C) na produkci biogenních aminů testovaného kmene.

Shrnutí zjištěných výsledků:

- U kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 byla zjištěna produkce tyraminu a sperminu.
- Tyramin byl produkován ve všech variantách kultivačního média a s délkou kultivace se koncentrace zvyšovala. Produkce sperminu byla kolísavá a v některých případech nebyl detekován.
- Ve většině případů kultivace v podmínkách *in vitro* byla zaznamenána vyšší produkce tyraminu při iniciačním pH 6.
- Nejvyšší vyprodukované množství tyraminu ($52,28 \pm 0,18$ mg/l) bylo dosaženo při iniciačním pH 6,8 v kombinaci s 4,80 % (w/v) laktózy, bez přídavku NaCl a teploty kultivace 37 °C.
- Nejvyšší detekované množství tyraminu ($16,13 \pm 1,83$ mg/l) při kultivační teplotě 10 °C bylo v kultivačním médiu iniciačním pH 5, bez NaCl a laktózy.
- Nejvyšší množství sperminu ($55,69 \pm 4,62$ mg/l) bylo stanoveno při teplotě kultivace 10 °C a při kultivační teplotě 37 °C bylo stanoveno $19,72 \pm 1,77$ mg/l v podmínkách *in vitro* bez přídavku NaCl a laktózy.
- V mléku byla výrazná dekarboxylázová aktivita pouze při iniciačním pH 5 a bez přídavku NaCl, kdy testovaný kmen vyprodukoval ($12,45 \pm 0,07$ mg/l) tyraminu.

V bujónu i mléce byla produkce BA poměrně nízká, avšak je otázka, jak se bude kmen chovat v případě déle zrajícího sýra.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AHMADOVA, Aynur, Svetoslav Dimitrov TODOROV, Imen HADJI-SFAXI, Yvan CHOISSET, Hanitra RABESONA, Soumaya MESSAOUDI, Akif KULIYEV, Bernadette DORA GOMBOSSY DE MELO FRANCO, Jean-Marc CHOBERT a Thomas HAERTLÉ. Antimicrobial and antifungal activities of *Lactobacillus curvatus* strain isolated from homemade Azerbaijani cheese. *Anaerobe*. 2013, vol. 20, s. 42-49. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2013.01.003.

ALMEIDA, C., J.O. FERNANDES a S.C. CUNHA. A novel dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) gas chromatography-mass spectrometry (GC–MS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer. *Food Control*. 2012, vol. 25, issue 1, s. 380-388. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.10.052.

BEDIA ERIM, F. Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2013, vol. 52, s. 239-247. DOI: 10.1016/j.trac.2013.05.018.

BOVER CID, Sara, M. Jesús MIGUÉLEZ-ARRIZADO, Biserka BECKER, Wilhelm H. HOLZAPFEL a M. Carmen VIDAL-CAROU. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiology*. 2008, vol. 25, issue 2, s. 269-277. DOI: 10.1016/j.fm.2007.10.013.

BUŇKA, František, Pavel BUDINSKÝ, Blanka ZIMÁKOVÁ, Marek MERHAUT, Radka FLASAROVÁ, Vendula PACHLOVÁ, Vlastimil KUBÁŇ a Leona BUŇKOVÁ. Biogenic amines occurrence in fish meat sampled from restaurants in region of Czech Republic. *Food Control*. 2013, vol. 31, issue 1, s. 49-52. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.09.044.

BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Eva POLLAKOVÁ, Tereza PODEŠVOVÁ, Vladimír DRÁB a Stanislav KRÁČMAR. Vliv aerobního/anaerobního prostředí na dekarboxylázovou aktivitu vybraných bakterií mléčného kvašení. *Potravinářstvo*. 2010, roč. 4, č. 2, 5 - 7.

BUŇKOVÁ, Leona, Kateřina HUDCOVÁ, Pavel BUDINSKÝ, Eva LORENCOVÁ, Helena VELICHOVÁ a František BUŇKA. Sledování kvality farmářských sýrů. *Mlékařské listy*. 2012, č. 133.

BUŇKOVÁ, Leona, Pavel BUDINSKÝ, Gabriela ADAMCOVÁ, Pavel PLEVA a František BUŇKA. Monitoring výskytu biogenních aminů ve fermentovaných mléčných výrobcích v ČR. *Mlékařské listy*. 2012, č. 134.

BURDYCHOVÁ, Radka a Vlastimil DOHNAL. Využití HPLC ke stanovení produktu exprese genu pro mikrobiální tyrozindekarboxylasu. *Chemické Listy*. 2007, č. 101, 907 - 910.

CINQUINA, A.L, A CALÌ, F LONGO, L. De SANTIS, A SEVERONI a F ABBALLE. Determination of biogenic amines in fish tissues by ion-exchange chromatography with conductivity detection. *Journal of Chromatography A*. 2004, vol. 1032, 1-2, s. 73-77. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.01.013.

CSOMÓS, E. a L. SIMON-SARKADI. Characterisation of Tokaj wines based on free amino acids and biogenic amines using ion-exchange chromatography. *Chromatographia*. 2002, vol. 56, issue 1, S185-S188. DOI: 10.1007/BF02494136.

ČERNÝ, V., E. KVASNIČKOVÁ, Š. HAVLÍKOVÁ a L. KALHOTKA. Výskyt mikroorganismů s dekarboxylační aktivitou v sýrech. *Mlékařské listy*. 2009, č. 116.

DADÁKOVÁ, Eva, Martin KŘÍŽEK a Tamara PELIKÁNOVÁ. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. 2009, vol. 116, issue 1, s. 365-370. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.02.018.

DE MEY, E., G. DRABIK-MARKIEWICZ, H. DE MAERE, M.-C. PEETERS, G. DERDELINCKX, H. PAELINCK a T. KOWALSKA. Dabsyl derivatisation as an alternative for dansylation in the detection of biogenic amines in fermented meat products by reversed phase high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. 2012, vol. 130, issue 4, s. 1017-1023. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.07.124.

DEEPIKA PRIYADARSHANI, Wadu Mesthri a Sudip K. RAKSHIT. Screening selected strains of probiotic lactic acid bacteria for their ability to produce biogenic amines (histamine and tyramine). *International Journal of Food Science*. 2011, vol. 46, issue 10, s. 2062-2069. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2011.02717.x.

DOSEDĚL, L., L. KALHOTKA, M. VYLETĚLOVÁ a M. NĚMCOVÁ. Vliv teploty a času na dekarboxylázovou aktivitu *Bacillus licheniformis* z drůbežích brojlerů. In: *Sborník příspěvků z II. Konference studentské vědecké a odborné činnosti*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2009, s. 9.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* 2011;9(10):2393. [93 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2393.

ERCAN, Songül Şahin, Hüseyin BOZKURT a Çiğdem SOYSAL. Significance of Biogenic Amines in Foods and Their Reduction Methods. *Journal of Food Science and Engineering*. 2013, č. 3, 395 - 410.

ERKKILÄ, S; SUIHKO, M L; EEROLA, S; PETÄJÄ, E; MATTILA-SANDHOLM, T. Dry Sausage Fermented by *Lactobacillus rhamnosus* Strains. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 64, no. 1-2 s. 205-210. ISSN 0168-1605

EU. Nařízení komise (ES) 2073/2005. In *Úřední věstník Evropské unie*. 2005, L 338, s. 1-26.

FELIS, Giovanna E. a Franco DELLAGLIO. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr. Issues Intestinal Microbiol*. 2007, č. 8, 44 - 61.

FENG, Xiaojun, Sheng CHEN, Youzhi XU, Wei DU, Qingming LUO a Bi-Feng LIU. Separation and determination of biogenic amines in fish using MEKC with novel multiphoton excitation fluorescence detection. *Journal of Separation Science*. 2008, vol. 31, issue 5, s. 824-828. DOI: 10.1002/jssc.200700514.

FERNÁNDEZ, María, Daniel M. LINARES, Ana RODRÍGUEZ a Miguel A. ALVAREZ. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007-1-9, vol. 73, issue 6, s. 1400-1406. DOI: 10.1007/s00253-006-0596-y.

FIALOVÁ, Jana, Jana CHUMCHALOVÁ, Kamila MÍKOVÁ, Mária GREIFOVÁ a Gabriel GREIF. Výskyt rodu *Lactobacillus* a biogenních aminů v laboratorně vyrobené majonéze a tatarské omáčce. *Chemické Listy*. 2013, č. 107, 308 - 312.

GARDINI, Fausto, Maria MARTUSCELLI, Marisa Carmela CARUSO, Fernanda GALGANO, Maria Antonietta CRUDELE, Fabio FAVATI, Maria Elisabetta GUERZONI a Giovanna SUZZI. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 64, 1-2, s. 105-117. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00445-1.

GÖRNER, Fridrich a Ľubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967-0649-7.

GREIF, G., M. GREIFOVÁ, J. KAROVIČOVÁ. Effects of NaCl Concentration and Initial pH Value on Biogenic Amine Formation Dynamics by *Enterobacter* subsp. Bacteria in Model Conditions. *Journal of Food and Nutrition Research*. Vol. 45, No. 1, 2006, s. 21-29.

HALÁSZ, Anna, Ágnes BARÁTH, Livia SIMON-SARKADI a Wilhelm HOLZAPFEL. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science*. 1994, vol. 5, issue 2, s. 42-49. DOI: 10.1016/0924-2244(94)90070-1.

HEBERT, E. M., L. SAAVEDRA, M. P. TARANTO, F. MOZZI, C. MAGNI, M. E. F. NADER, G. FONT DE VALDEZ, F. SESMA, G. VIGNOLO a R. R. RAYA. Genome Sequence of the Bacteriocin-Producing *Lactobacillus curvatus* Strain CRL705. *Journal of Bacteriology*. 2011-12-29, vol. 194, issue 2, s. 538-539. DOI: 10.1128/JB.06416-11.

HUDCOVÁ, Kateřina. *Stanovení biogenních aminů v produktech živočišného původu z farmářské produkce*. UTB Zlín, 2012. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.

HUNGERFORD, James a Wen-Hsin WU. Comparison study of three rapid test kits for histamine in fish: BiooScientific MaxSignal enzymatic assay, Neogen Veratox ELISA, and the Neogen Reveal Histamine Screening test. *Food Control*. 2012, vol. 25, issue 2, s. 448-457. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.11.007.

HUTKINS, Robert W. *Microbiology and technology of fermented foods*. 1st ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2006, xi, 473 p. ISBN 978-081-3800-189.

CHANG, Mi a Hae Choon CHANG. Development of a screening method for biogenic amine producing *Bacillus* subsp. *International Journal of Food Microbiology*. 2012, vol. 153, issue 3, s. 269-274. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.008.

KALÁČ, Pavel; ŠAVEL, Jan; KŘÍŽEK, Martin; PELIKÁNOVÁ, Tamara; PROKOPOVÁ, Marie. Biogenic Amine Formation in Bottled Beer. *Food Chemistry*. 2002, vol. 79, no. 4 s. 431-434. ISSN:0308-8146.

KALHOTKA, Libor, Michaela NĚMCOVÁ, Marcela VYLETĚLOVÁ a Šárka HAVLÍKOVÁ. Dekarboxylázová aktivita *Bacillus licheniformis* a její ovlivnění teplotou a dobou kultivace. *Mlékařské listy*. 2011, č. 124.

KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. 2003. Biogenic amines in food. In *Chemical Papers*, vol. 59, 2003, no. 1, p. 70-79.

KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-708-0586-2.

KELLY, Mary T., Alain BLAISE a Michel LARROQUE. Rapid automated high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of amino acids and biogenic amines in wine, fruit and honey. *Journal of Chromatography A*. 2010, vol. 1217, issue 47, s. 7385-7392. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.09.047.

KLABAN, Vladimír. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. vyd. Praha: Galén, 2005, 654 s. ISBN 80-726-2341-9.

KOHAJDOVÁ, Z., J. KAROVIČOVÁ a G. GREIF. Biogénne amíny v potravinách. *Potravinárstvo*. 2008, roč. 2, č. 1, 30 - 49.

KOHAJDOVÁ, Zlatica a Jolana KAROVIČOVÁ. Biogénne amíny - vznik, metódy stanovenia a výskyt v potravinách. *Bulletin potravinárskeho výskumu*. 2001, roč. 40, č. 2, 75 - 89.

KŘÍŽEK, Martin a Tamara PELIKÁNOVÁ. Determination of seven biogenic amines in foods by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1998, vol. 815, issue 2, s. 243-250. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00464-6.

KULEY, Esmeray, Esra BALIKCI, İlyas ÖZOĞUL, Saadet GÖKDOGAN a Fatih ÖZOĞUL. Stimulation of Cadaverine Production by Foodborne Pathogens in the Presence of *Lactobacillus*, *Lactococcus*, and *Streptococcus* spp. *Journal of Food Science*. 2012, vol. 77, issue 12, M650-M658. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02825.x.

KVASNIČKA, František a Michal VOLDŘICH. Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection. *Journal of Chromatography A*. 2006, vol. 1103, issue 1, s. 145-149. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.11.005.

LANDETE, José María, Blanca DE LAS RIVAS, Angela MARCOBAL a Rosario MUÑOZ. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on

foods. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, vol. 117, issue 3, s. 258-269. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.05.001.

LANGE, Jana, Kathleen THOMAS a Christine WITTMANN. Comparison of a capillary electrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. *Journal of Chromatography B*. 2002, vol. 779, issue 2, s. 229-239. DOI: 10.1016/S1570-0232(02)00372-0.

LI, Guoliang, Lihua DONG, Aihong WANG, Wenli WANG, Na HU a Jinmao YOU. Simultaneous determination of biogenic amines and estrogens in foodstuff by an improved HPLC method combining with fluorescence labeling. *LWT - Food Science and Technology*. 2014, vol. 55, issue 1, s. 355-361. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.06.028.

LI, Wenli, Yali PAN, Yan LIU, Xiaoli ZHANG, Jiannong YE a Qingcui CHU. Simultaneous Determination of Eight Typical Biogenic Amines by CZE with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection. *Chromatographia*. 2014, vol. 77, 3-4, s. 287-292. DOI: 10.1007/s10337-013-2595-3.

LORENCOVÁ, Eva, Leona BUŇKOVÁ, Pavel PLEVA, Vladimír DRÁB, Vlastimil KUBÁŇ a František BUŇKA. Selected factors influencing the ability of *Bifidobacterium* to form biogenic amines. *International Journal of Food Science*. 2013. DOI: 10.1111/ijfs.12427.

LUCAS, Patrick, José LANDETE, Monika COTON, Emmanuel COTON a Aline LONVAUD-FUNEL. The tyrosine decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809: characterization and conservation in tyramine-producing bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2003, vol. 229, issue 1, s. 65-71. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00787-0.

MALINOWSKA, Irena a Katarzyna E. STĘPNIK. Analysis of Some Biogenic Amines by Micellar Liquid Chromatography. *Chromatography Research International*. 2012, vol. 2012, s. 1-8. DOI: 10.1155/2012/713273.

MARCOBAL, A., M.C. POLO, P.J. MARTÍN-ÁLVAREZ a M.V. MORENO-ARRIBAS. Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines. *Food Research International*. 2005, vol. 38, issue 4, s. 387-394. DOI: 10.1016/j.foodres.2004.10.008.

MAYER, H.K., G. FIECHTER a E. FISCHER. A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese. *Journal of Chromatography A*. 2010, vol. 1217, issue 19, s. 3251-3257. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.09.027.

ÖNAL, Armağan, Serife Evrim Kepekci TEKKELI a Cem ÖNAL. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. 2013, vol. 138, issue 1, s. 509-515. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.10.056.

ÖNAL, Armağan. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. 2007, vol. 103, issue 4, s. 1475-1486. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.08.028.

PEREIRA, C I; MATOS, D; SAN ROMÃO, M V; CRESPO, M T Barreto. Dual Role for the Tyrosine Decarboxylation Pathway in *Enterococcus faecium* E17: Response to an Acid Challenge and Generation of a Proton Motive Force. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, vol. 75, no. 2 s. 345-352. ISSN:1098-5336.

PIRCHER, Anita, Friedrich BAUER a Peter PAULSEN. Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *European Food Research and Technology*. 2007-9-18, vol. 226, 1-2, s. 225-231. DOI: 10.1007/s00217-006-0530-7.

RABIE, Mohamed A., Soher ELSAIDY, Ahmed-Adel EL-BADAWY, Hassan SILIHA a F. Xavier MALCATA. Biogenic Amine Contents in Selected Egyptian Fermented Foods as Determined by Ion-Exchange Chromatography. *Journal of Food Protection*. 2011-04-01, vol. 74, issue 4, s. 681-685. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-10-257.

REM Galerie. In: *Botanik - Ultrastrukturforschung* [online]. [cit. 2014-03-22]. Dostupné z: http://ultrastruktur.bio.lmu.de/de/forschung/rem1/re_galerie/lactobacillus.html

ROBINSON, R, Carl A BATT a P PATEL. *Encyclopedia of food microbiology*. San Diego: Academic Press, c2000, 3 v. ISBN 01222707383.

RODRIGUEZ, I., H.K. LEE a S.F.Y. LI. Separation of biogenic amines by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1996, vol. 745, 1-2, s. 255-262. DOI: 10.1016/0021-9673(96)00422-0.

ROMANO, Andrea, Hervé KLEBANOWSKI, Stéphane LA GUERCHE, Luciano BENEDEUCE, Giuseppe SPANO, Marie-Laure MURAT a Patrick LUCAS. Determination

of biogenic amines in wine by thin-layer chromatography/densitometry. *Food Chemistry*. 2012, vol. 135, issue 3, s. 1392-1396. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.06.022.

SALMINEN, Seppo, Atte von WRIGHT a Arthur OUWEHAND. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. 3rd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, c2004, 633 p. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 139. ISBN 08-247-5332-1.

SANTOS, M.H.Silla. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, vol. 29, 2-3, s. 213-231. DOI: 10.1016/0168-1605(95)00032-1.

SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270 s. ISBN 80-210-4207-9.

SHALABY, Ali R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 1996, vol. 29, issue 7, s. 675-690. DOI: 10.1016/S0963-9969(96)00066-X.

SMĚLÁ, Dana, Pavla PECHOVÁ, Tomáš KOMPRDA, Bořivoj KLEJDUS a Vlastimil KUBÁŇ. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické Listy*. 2004, č. 98, 432 - 437.

SWANN, L.M., S.L. FORBES a S.W. LEWIS. A capillary electrophoresis method for the determination of selected biogenic amines and amino acids in mammalian decomposition fluid. *Talanta*. 2010-06-15, vol. 81, 4-5, s. 1697-1702. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.03.025.

ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008, 363 s. ISBN 978-80-200-1703-1.

ŠTULÍK, Karel a kol. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 264 s. ISBN 80-246-0852-9.

ŠTULÍK, Karel a kol. *Vysokoučinné analytické separace biologicky aktivních látek*. Praha, 2006, 114 s.

TANG, Tao, Tianyu SHI, Kun QIAN, Pingliang LI, Jianqiang LI a Yongsong CAO. Determination of biogenic amines in beer with pre-column derivatization by high performance

liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2009, vol. 877, 5-6, s. 507-512. DOI: 10.1016/j.jchromb.2008.12.064.

TORRIANI, S., C. A. VAN REENEN, G. KLEIN, G. REUTER, F. DELLAGLIO a L. M. T. DICKS. *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* subsp. nov. and *Lactobacillus curvatus* subsp. *melibiosus* subsp. nov. and *Lactobacillus sake* subsp. *sake* subsp. nov. and *Lactobacillus sake* subsp. *carneus* subsp. nov., New Subspecies of *Lactobacillus curvatus* Abo-Elnaga and Kandler 1965 and *Lactobacillus sake* Katagiri, Kitahara, and Fukami 1934 (Klein a kol. 1996, Emended Descriptions), Respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1996-10-01, vol. 46, issue 4, s. 1158-1163. DOI: 10.1099/00207713-46-4-1158.

VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999, 342 s. ISBN 80-902-3912-9.

XIRAPHI, Nia, Marina GEORGALAKI, Gonzalez Van DRIESSCHE, Bart DEVREESE, Jozef Van BEEUMEN, Effie TSAKALIDOU, John METAXOPOULOS a Eleftherios H. DROSINOS. Purification and characterization of curvaticin L442, a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* L442. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2006-4-24, vol. 89, issue 1, s. 19-26. DOI: 10.1007/s10482-005-9004-3.

ZORNÍKOVÁ, Gabriela. Biogenní aminy v potravinách. In: *ChemPoint* [online]. 2012 [cit. 2014-03-14]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/biogenni-aminy-v-potravinach>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BA	Biogenní aminy
CO ₂	Oxid uhličitý
MO	Mikroorganismy
ES	Evropské společenství
a _w	Aktivita vody
AMK	Aminokyseliny
GTY	Glukóza, trypton, kvasniční hydrolyzát
SO ₂	Oxid siřičitý
TLC	Tenkvrstevná chromatografie
GC	Plynová chromatografie
CE	Kapilární elektroforéza
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
PCR	Polymerázová řetězová reakce
ELISA	Imuno-enzymatická metoda
OPA	<i>o</i> -ftaldialdehyd
FMOC	9-fluorenyl metylchlorformiát
FQ	5-furoylchinolin-3-karboxaldehyd
AQC	6-aminochinolyl-N-hydroxysukcinimidyl karbamát
PITC	Fenylisotiokyanát
DNS - Cl	Danzylchlorid
NAC	N-acetyl-L-cystein
UV-VIS	Spektrofotometrický detektor
MS	Hmotnostní spektrometr
PAD	Pulzní amperometrická detekce

IPAD	Integrovaná pulzní amperometrická detekce
FEP	Fluorovaný kopolymer etylen-propylen
SDS	Dodecylsíránem sodným
FITC	Fluorescein isotiokyanát
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
FDP	Fruktóza-1,6-bisfosfát
ATP	Adenosintrifosfát
ADP	Adenosindifosfát
NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinukleotid
CoA	Koenzym A
NaCl	Chlorid sodný
CFU	Celkový počet mikroorganismů
CPM	Celkový počet mikroorganismů
RP-HPLC	Chromatografie s reverzními fázemi
MRS	Mangův, Rogosův a Sharpův agar
DAD	Detektor diodového pole
TYR	Tyramin
MAO	Monoaminoxidázy
Lak	Laktóza
M	Mléko
A	Mléko s aminokyselinami

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Vznik biogenního aminu z aminokyseliny (Hudcová, 2012).....	15
Obrázek 2: Dekarboxylace L-aminokyselin přes pyridoxalfostát (Kohajdová a kol., 2008).....	15
Obrázek 3: Nejčastěji se vyskytující biogenní aminy v potravinách a jejich vznik (Kohajdová a kol., 2008).....	16
Obrázek 4: <i>Lactobacillus plantarum</i> (REM galerie).	30
Obrázek 5: Fylogeneze rodu <i>Lactobacillus</i> na základě sekvenční analýzy 16S rRNA (Hutkins, 2006).....	31
Obrázek 6: Metabolismus bakterií <i>Lactobacillus</i> , (A) homofermentativní – glykolýza/EMP dráha, (B) heterofermentativní – 6-fosfoglukonát/fosfoketolázová dráha (Salminen a kol., 2004).....	34
Obrázek 7: Kinetika produkce TYR během kultivace <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 <i>in vitro</i> při 37 °C bez přídavku laktózy a NaCl.....	45
Obrázek 8: Kinetika produkce TYR během kultivace <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 <i>in vitro</i> při 37 °C bez přídavku laktózy a pH 6.	46
Obrázek 9: Kinetika produkce TYR během kultivace <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 <i>in vitro</i> při 37 °C bez přídavku laktózy a pH 5.	46
Obrázek 10: Kinetika produkce TYR během kultivace <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 <i>in vitro</i> při 37 °C bez přídavku NaCl a pH 7.....	47
Obrázek 11: Kinetika produkce TYR během kultivace <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 <i>in vitro</i> při 37 °C bez přídavku NaCl a pH 6.....	47
Obrázek 12: Vliv koncentrace NaCl na produkci tyraminu kmenem <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 při pH 6,8 s přídavkem 4,80 % (w/v) laktózy – 37 °C.....	48
Obrázek 13: Kinetika produkce TYR během kultivace <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 <i>in vitro</i> při 37 °C, 0,25 % (w/v) obsahu laktózy a pH 5.	49
Obrázek 14: Kinetika produkce TYR během kultivace <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 <i>in vitro</i> při 37 °C, 0,50 % (w/v) obsahu laktózy a pH 7.	49
Obrázek 15: Vliv přídavku laktózy na růst <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 <i>in vitro</i> při 37 °C, pH 6.	51

Obrázek 16: Vliv přidavku laktózy a 1 % (w/v) NaCl na růst <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 <i>in vitro</i> při 37 °C, pH 6.....	52
Obrázek 17: Vliv přidavku laktózy a 2 % (w/v) NaCl na růst <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 <i>in vitro</i> při 37 °C, pH 6.....	52
Obrázek 18: Kinetika produkce TYR během kultivace <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 <i>in vitro</i> při 10 °C bez přidavku laktózy a NaCl.....	53
Obrázek 19: Kinetika produkce TYR během kultivace <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 <i>in vitro</i> při 10 °C bez obsahu laktózy a pH 6.	54
Obrázek 20: Kinetika produkce TYR během kultivace <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 <i>in vitro</i> při 10 °C bez obsahu laktózy a pH 7.	55
Obrázek 21: Kinetika produkce TYR během kultivace <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 <i>in vitro</i> při 10 °C bez přidavku NaCl a pH 5.....	56
Obrázek 22: Kinetika produkce TYR během kultivace <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 <i>in vitro</i> při 10 °C bez přidavku NaCl a pH 6.....	56
Obrázek 23: Kinetika produkce TYR během kultivace <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 <i>in vitro</i> při 10 °C s přidavkem 0,25 % (w/v) laktózy a pH 6.....	57
Obrázek 24: Kinetika produkce TYR během kultivace <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 <i>in vitro</i> při 10 °C s přidavkem 1,00 % (w/v) laktózy a pH 6.....	57
Obrázek 25: Vliv přidavku laktózy na růst <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 <i>in vitro</i> při 10 °C, pH 6.	59
Obrázek 26: Vliv přidavku laktózy a 1 % (w/v) NaCl na růst <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 <i>in vitro</i> při 10 °C, pH 6.....	59
Obrázek 27: Vliv přidavku laktózy a 2 % (w/v) NaCl na růst <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 <i>in vitro</i> při 10 °C, pH 6.....	60
Obrázek 28: Kinetika produkce TYR během kultivace <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 v mléce v závislosti na pH při 37 °C.....	61
Obrázek 29: Kinetika produkce TYR během kultivace <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 v mléce v závislosti na přidavku NaCl při 37 °C a pH 5.	62
Obrázek 30: Kinetika produkce TYR během kultivace <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 v mléce v závislosti na přidavku NaCl při 37 °C a pH 7.	62
Obrázek 31: Kinetika produkce TYR během kultivace <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> 10127-9 v mléce v závislosti na přidavku aminokyselin při 37 °C.....	63

- Obrázek 32: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 v mléce v závislosti na pH při 10 °C..... 64
- Obrázek 33: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 v mléce v závislosti na přidavku NaCl při 10 °C a pH 5. 65
- Obrázek 34: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 v mléce v závislosti na přidavku NaCl při 10 °C a pH 6. 65
- Obrázek 35: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 v mléce v závislosti na přidavku NaCl při 10 °C a pH 7. 66
- Obrázek 36: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 10 °C bez obsahu laktózy a pH 5. 92
- Obrázek 37: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 10 °C bez přidavku NaCl a pH 7..... 92
- Obrázek 38: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 v mléce v závislosti na přidavku NaCl při 37 °C a pH 6. 93
- Obrázek 39: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 v mléce v závislosti na přidavku aminokyselin při 10 °C..... 93

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Systematický název a chem. struktura vybraní zástupci BA (Önal a kol., 2013).....	14
Tabulka 2: Obsah histaminu, tyraminu, kadaverinu a putrescinu ve vybraných potravinách (Ercan a kol., 2013)	20
Tabulka 3: Skupiny laktobacilů a jejich vlastnosti (Salminen a kol., 2004).....	33
Tabulka 4: Složení kultivačního média MRS agar.	39
Tabulka 5: Složení kultivačního média MRS bujón s 0,3 % AMK.....	40
Tabulka 6: Složení modifikovaného kultivačního média MRS.....	41
Tabulka 7: Gradientový eluční program HPLC	43
Tabulka 8: Maximální detekované množství sperminu při 37 °C.	50
Tabulka 9: Maximální detekované množství sperminu při 10 °C.	58
Tabulka 10: Naměřené hodnoty pH v podmínkách <i>in vitro</i> při iniciačním pH 5,0 ± 0,2 a teplotě kultivace 37 °C (Lak/NaCl/pH).	88
Tabulka 11: Naměřené hodnoty pH v podmínkách <i>in vitro</i> při iniciačním pH 6,0 ± 0,2 a teplotě kultivace 37 °C (Lak/NaCl/pH).	88
Tabulka 12: Naměřené hodnoty pH v podmínkách <i>in vitro</i> při iniciačním pH 7,0 ± 0,2 a teplotě kultivace 37 °C (Lak/NaCl/pH).	89
Tabulka 13: Naměřené hodnoty pH v podmínkách <i>in vitro</i> při iniciačním pH 5,0 ± 0,2 a teplotě kultivace 10 °C (Lak/NaCl/pH).	89
Tabulka 14: Naměřené hodnoty pH v podmínkách <i>in vitro</i> při iniciačním pH 6,0 ± 0,2 a teplotě kultivace 10 °C (Lak/NaCl/pH).	90
Tabulka 15: Naměřené hodnoty pH v podmínkách <i>in vitro</i> při iniciačním pH 7,0 ± 0,2 a teplotě kultivace 10 °C (Lak/NaCl/pH).	90
Tabulka 16: Naměřené hodnoty pH v mléku při teplotě kultivace 37 °C (NaCl/pH).....	91
Tabulka 17: Naměřené hodnoty pH v mléku při teplotě kultivace 10 °C (NaCl/pH).....	91

SEZNAM PŘÍLOH

P I: NAMĚŘENÉ HODNOTY PH V PODMÍNKÁCH *IN VITRO*

P II: NAMĚŘENÉ HODNOTY PH V MLÉKU

P III: KINETIKA PRODUKCE TYRAMINU *IN VITRO*

P IV: KINETIKA PRODUKCE TYRAMINU V MLÉKU

PI: NAMĚŘENÉ HODNOTY PH V PODMÍNKÁCH *IN VITRO*

Tabulka 10: Naměřené hodnoty pH v podmínkách *in vitro* při iniciačním pH $5,0 \pm 0,2$ a teplotě kultivace 37 °C (Lak/NaCl/pH).

t [h]	0/0/5	0/1/5	0/2/5	0,25/0/5	0,25/1/5	0,25/2/5	0,5/0/5	0,5/1/5	0,5/2/5	1/0/5	1/1/5	1/2/5
kontrola	5,12	5,05	5,06	5,11	5,05	5,07	5,11	5,05	5,05	5,09	5,07	5,05
2	5,10	5,03	5,03	5,09	5,04	5,07	5,09	5,03	5,03	5,07	5,05	5,03
4	5,08	5,01	5,01	5,06	5,01	5,04	5,05	5,00	5,01	5,04	5,01	5,01
6	5,08	5,00	5,01	5,06	5,00	5,03	5,05	4,99	5,00	5,05	5,00	4,99
8	5,05	4,99	4,99	5,04	4,98	5,00	5,01	4,96	4,98	5,01	4,98	4,99
10	5,04	4,97	4,96	4,98	4,93	4,98	4,96	4,91	4,95	4,95	4,92	4,94
12	5,07	5,02	5,01	4,99	4,94	5,00	4,99	4,91	4,98	4,94	4,90	4,95
24	5,06	5,00	4,99	4,65	4,64	4,65	4,60	4,35	4,44	4,42	4,33	4,39
48	5,09	5,02	5,01	4,84	4,77	4,77	4,39	4,42	4,42	4,31	4,23	4,29

Tabulka 11: Naměřené hodnoty pH v podmínkách *in vitro* při iniciačním pH $6,0 \pm 0,2$ a teplotě kultivace 37 °C (Lak/NaCl/pH).

t [h]	0/0/6	0/1/6	0/2/6	0,25/0/6	0,25/1/6	0,25/2/6	0,5/0/6	0,5/1/6	0,5/2/6	1/0/6	1/1/6	1/2/6
kontrola	6,06	6,06	6,07	6,05	5,99	5,98	6,00	5,99	5,98	6,01	6,00	5,99
2	6,00	6,00	6,03	6,00	5,91	5,92	5,95	5,92	5,94	5,93	5,97	5,93
4	5,95	5,97	6,00	5,97	5,88	5,90	5,93	5,97	5,93	5,93	5,97	5,92
6	5,92	5,93	6,00	5,91	5,87	5,89	5,89	5,86	5,92	5,86	5,92	5,91
8	5,91	5,91	6,03	5,81	5,83	5,89	5,73	5,84	5,93	5,75	5,90	5,90
10	5,89	5,90	5,99	5,69	5,71	5,85	5,50	5,82	5,89	5,48	5,86	5,90
12	5,93	5,95	6,03	5,44	5,69	5,90	5,23	5,42	5,92	5,11	5,70	5,92
24	5,97	5,98	6,02	5,24	5,13	5,83	4,86	4,80	5,83	4,42	4,65	5,84
48	6,03	5,99	6,04	5,26	5,25	5,22	4,93	4,92	5,15	4,46	4,47	4,88

Tabulka 12: Naměřené hodnoty pH v podmínkách *in vitro* při iniciačním pH $7,0 \pm 0,2$ a teplotě kultivace $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lak/NaCl/pH).

t [h]	0/0/7	0/1/7	0/2/7	0,25/0/7	0,25/1/7	0,25/2/7	0,5/0/7	0,5/1/6	0,5/2/7	1/0/7	1/1/7	1/2/7
kontrola	7,13	7,12	7,10	6,98	6,95	6,95	7,01	7,00	6,98	7,01	6,99	7,00
2	7,07	7,10	7,08	6,91	6,92	6,92	7,00	6,99	6,97	6,98	6,99	7,01
4	7,01	7,08	7,08	6,84	6,91	6,90	6,92	6,94	6,97	6,91	6,98	6,97
6	6,95	7,04	7,04	6,75	6,88	6,90	6,84	6,89	6,96	6,84	6,96	6,95
8	6,95	7,10	7,06	6,47	6,85	6,91	6,45	6,81	6,92	6,36	6,93	7,00
10	6,91	7,02	7,04	6,46	6,83	6,90	6,29	6,61	6,93	5,86	6,93	6,88
12	6,96	7,05	7,02	6,23	6,81	6,91	6,55	6,77	6,92	6,45	6,94	6,94
24	6,99	7,07	7,07	5,80	6,86	6,89	5,40	6,86	6,92	5,87	6,91	6,92
48	6,99	7,02	7,06	6,52	6,82	6,86	5,57	6,84	6,90	5,12	6,90	6,87

Tabulka 13: Naměřené hodnoty pH v podmínkách *in vitro* při iniciačním pH $5,0 \pm 0,2$ a teplotě kultivace $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lak/NaCl/pH).

t [den]	0/0/5	0/1/5	0/2/5	0,25/0/5	0,25/1/5	0,25/2/5	0,5/0/5	0,5/1/5	0,5/2/5	1/0/5	1/1/5	1/2/5
kontrola	5,08	5,03	5,00	4,95	4,94	4,93	4,94	4,92	4,96	4,97	4,92	4,90
1	5,00	4,97	4,95	4,89	4,92	4,90	4,90	4,89	4,90	4,97	4,92	4,90
2	4,98	4,94	4,91	4,87	4,85	4,86	4,86	4,85	4,85	4,91	4,84	4,86
3	4,98	4,95	4,93	4,86	4,89	4,88	4,89	4,87	4,88	4,91	4,89	4,87
6	5,05	4,99	4,97	4,83	4,91	4,85	4,84	4,72	4,75	4,83	4,78	4,66
8	4,95	4,93	4,91	4,80	4,85	4,83	4,80	4,74	4,73	4,80	4,73	4,76
10	4,98	4,96	4,95	4,92	4,96	4,93	4,75	4,68	4,66	4,76	4,67	4,75
13	4,96	4,92	4,97	4,98	5,02	5,04	4,77	4,56	4,57	4,65	4,65	4,42
15	5,02	4,95	4,94	4,98	5,05	5,03	4,76	4,58	4,61	4,58	4,50	4,40

Tabulka 14: Naměřené hodnoty pH v podmínkách *in vitro* při iniciačním pH $6,0 \pm 0,2$ a teplotě kultivace $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lak/NaCl/pH).

t [den]	0/0/6	0/1/6	0/2/6	0,25/0/6	0,25/1/6	0,25/2/6	0,5/0/6	0,5/1/6	0,5/2/6	1/0/6	1/1/6	1/2/6
kontrola	5,95	5,99	6,00	5,98	5,95	5,99	6,01	6,00	5,99	6,02	5,98	5,95
1	5,79	5,87	5,96	5,78	5,78	5,87	5,84	5,81	5,89	5,85	5,84	5,88
2	5,82	5,80	5,86	5,67	5,48	5,80	5,49	5,67	5,71	5,79	5,63	5,80
3	5,80	5,89	5,89	5,42	5,59	5,55	5,70	5,34	5,77	5,51	5,74	5,68
6	5,86	5,85	5,84	5,97	5,95	5,79	5,36	5,28	5,19	4,96	4,86	4,93
8	5,71	5,88	5,89	5,94	5,91	5,94	5,39	5,35	5,28	4,82	4,64	4,82
10	5,84	5,94	5,91	6,09	6,08	6,08	5,41	5,36	5,30	4,79	4,68	4,79
13	5,78	5,94	5,95	6,13	6,16	6,12	5,42	5,34	5,27	4,71	4,66	4,72
15	5,80	5,83	5,93	6,14	6,18	6,07	5,42	5,35	5,24	4,69	4,64	4,62

Tabulka 15: Naměřené hodnoty pH v podmínkách *in vitro* při iniciačním pH $7,0 \pm 0,2$ a teplotě kultivace $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lak/NaCl/pH).

t [den]	0/0/7	0/1/7	0/2/7	0,25/0/7	0,25/1/7	0,25/2/7	0,5/0/7	0,5/1/6	0,5/2/7	1/0/7	1/1/7	1/2/7
kontrola	7,06	7,01	6,97	7,02	7,01	6,99	7,02	6,97	6,98	7,03	6,97	6,97
1	6,89	6,89	6,84	6,78	6,76	6,83	6,75	6,77	6,77	6,81	6,75	6,83
2	6,86	6,84	6,85	6,69	6,78	6,70	6,77	6,65	6,73	6,66	6,69	6,66
3	6,84	6,79	6,75	6,08	6,20	6,13	5,73	5,64	5,60	5,60	5,65	5,78
6	6,85	6,80	6,74	6,60	6,44	6,61	6,05	6,15	6,01	5,49	5,40	5,41
8	6,80	6,78	6,74	6,60	6,68	6,77	6,27	6,25	6,30	5,57	5,49	5,57
10	6,87	6,84	6,80	6,92	7,14	7,30	6,45	6,44	6,39	5,45	5,37	5,36
13	6,87	6,83	6,79	7,04	7,09	7,21	6,30	6,31	6,24	5,41	5,35	5,35
15	6,86	6,80	6,79	7,02	7,28	7,28	6,32	6,29	6,24	5,39	5,28	5,27

P II: NAMĚŘENÉ HODNOTY PH V MLÉKU

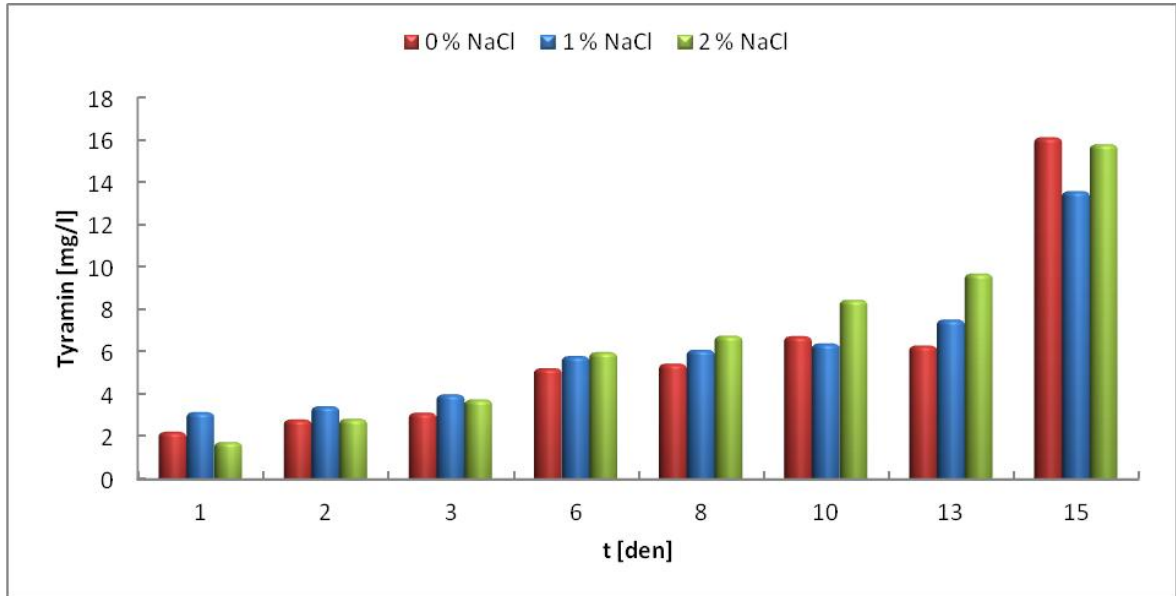
Tabulka 16: Naměřené hodnoty pH v mléku při teplotě kultivace 37 °C (NaCl/pH).

t [h]	0/5	1/5	2/5	0/6	1/6	2/6	0/7	1/7	2/7	A	M
kontrola	5,08	5,05	5,01	6,00	6,02	6,02	7,00	6,98	7,08	6,57	6,76
2	5,05	5,01	4,97	5,96	5,63	5,96	6,66	6,64	6,68	6,46	6,62
4	4,98	4,98	4,93	5,87	5,52	5,93	6,66	6,58	6,63	6,37	6,55
6	4,89	4,90	4,89	5,82	5,51	5,86	6,54	6,49	6,53	6,30	6,41
8	4,80	4,92	4,86	5,75	5,47	5,79	6,49	6,42	6,49	6,28	6,37
10	4,85	4,89	4,83	5,69	5,38	5,79	6,46	6,39	6,49	6,19	6,27
12	4,82	4,84	4,85	5,65	5,33	5,75	6,40	6,38	6,41	6,14	6,25
24	4,70	4,75	4,71	5,54	6,09	5,59	6,99	6,32	6,27	6,33	5,94
48	4,50	4,50	4,49	5,35	5,59	6,24	6,92	6,82	6,07	6,44	5,85

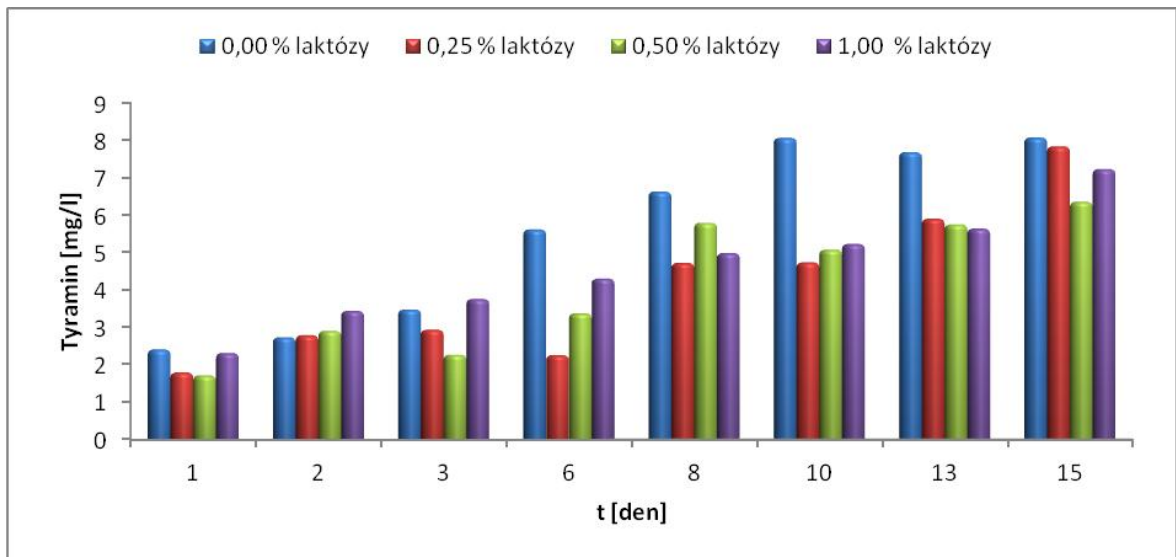
Tabulka 17: Naměřené hodnoty pH v mléku při teplotě kultivace 10 °C (NaCl/pH).

t [den]	0/5	1/5	2/5	0/6	1/6	2/6	0/7	1/7	2/7	A	M
kontrola	5,07	5,06	5,02	6,05	6,05	6,03	6,96	6,97	6,96	6,63	6,85
1	4,88	4,89	4,86	5,83	5,90	5,86	6,70	6,75	6,77	6,36	6,49
2	4,89	4,84	4,81	5,81	5,81	5,80	6,70	6,71	6,68	6,41	6,55
3	4,83	4,81	4,79	5,79	5,81	5,76	6,65	6,68	6,62	6,39	6,52
6	4,67	4,65	4,64	5,66	5,74	5,65	6,60	6,54	6,46	6,17	6,38
8	4,63	4,59	4,58	5,61	5,61	5,62	6,53	6,46	6,45	6,20	6,30
10	4,72	4,65	4,60	5,58	5,54	5,50	6,54	6,46	6,36	6,14	6,32
13	4,58	4,52	4,54	5,55	5,50	5,46	6,57	6,36	6,31	6,11	6,12
15	4,52	4,51	4,54	5,52	5,48	5,41	6,59	6,26	6,17	6,05	6,06

P III: KINETIKA PRODUKCE TYRAMINU *IN VITRO*

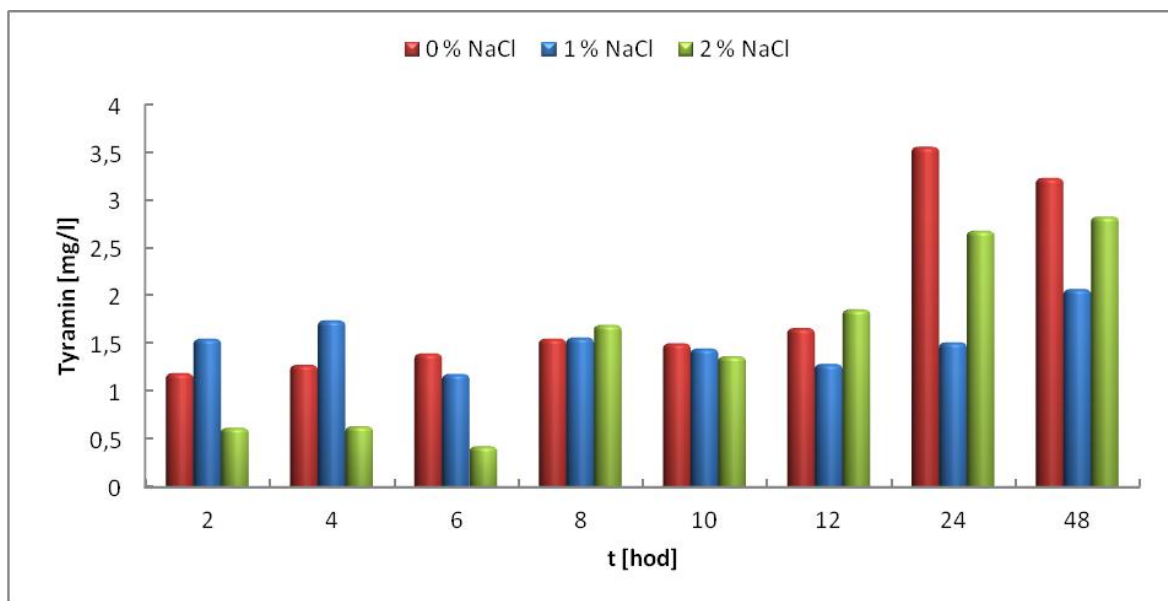


Obrázek 36: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 10 °C bez obsahu laktózy a pH 5.

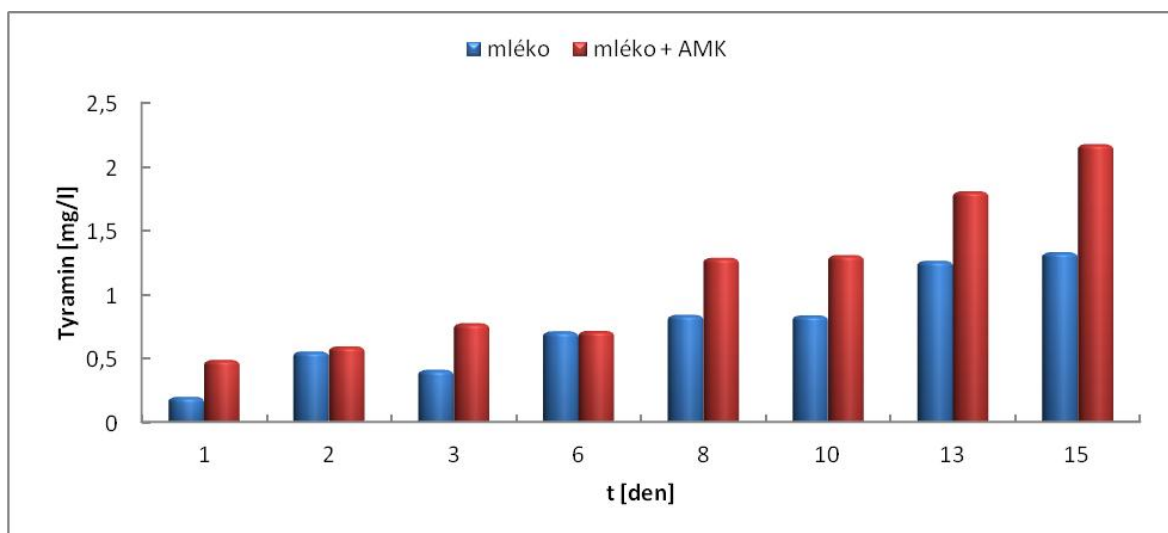


Obrázek 37: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 *in vitro* při 10 °C bez přídavku NaCl a pH 7.

P IV: KINETIKA PRODUKCE TYRAMINU V MLÉKU



Obrázek 38: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 v mléce v závislosti na přídatku NaCl při 37 °C a pH 6.



Obrázek 39: Kinetika produkce TYR během kultivace *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 10127-9 v mléce v závislosti na přídatku aminokyselin při 10 °C.