

Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu vybraných bakteriálních kontaminant piva

Bc. Iveta Mahovská

Diplomová práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Iveta Mahovská**
Osobní číslo: **T13728**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu
vybraných bakteriálních kontaminantů piva**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Dekarboxylázová aktivita a faktory ovlivňující produkci biogenních aminů mikroorganismy.
2. Výskyt biogenních aminů v pivu, zdroje a vznik biogenních aminů v procesu výroby piva.
3. Původci biogenních aminů v pivu.

II. Praktická část

1. Vliv vybraných faktorů na produkci biogenních aminů u dekarboxyláza pozitivních kmenů.
2. Stanovení produkce biogenních aminů pomocí RP-HPLC.
3. Statistické vyhodnocení dat, formulace závěrů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] **BASAŘOVÁ G., J. ŠAVEL, P. BASAŘ a T. LEJSEK**, 2010. Pivovarství – Teorie a praxe výroby piva, VŠCHT PRAHA. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [2] **DADÁKOVÁ E., P. KRÍŽEK a T. PELIKÁNOVÁ**, 2009. Determination of biogenic amines in food using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). Food Chemistry, vol. 116, s. 365-370. ISSN: 0308-8146.
- [3] **KALAČ Pavel a Martin Krížek**, 2003. A review of biogenic amines and polyamines in beer. Journal of the Institute of Brewing, vol. 109 iss. 2, s. 123-128. ISSN: 2050-0416.
Dostupné také z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.2003.tb00141.x/pdf>.
- [4] **KALAČ P., J. ŠAVEL, M. KRÍŽEK, T. PELIKÁNOVÁ a M. PROKOPOVÁ**, 2002., Biogenic amine formation in bottled beer. Food Chemistry, vol. 79, s. 431-434. ISSN: 0308-8146.
Dostupné také z: <http://kch.zf.jcu.cz/vyzkum/publikace/separaty/2002-0434.pdf>.
- [5] **KAROVIČOVÁ Jolana a Zlatica KOHAJDOVÁ**, 2005. Biogenic amines in food. Chemical Papers, vol. 59, iss. 1, s. 70-79. ISBN: 1336-9075. Dostupné také z: http://www.chempap.org/file_access.php?file=591a70.pdf.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Eva Lorencová
Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

2. února 2015

Termín odevzdání diplomové práce:

22. dubna 2015

Ve Zlíně dne 2. února 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




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

Příjmení a jméno: IVETA MAHOVSKÁ

Obor: TP

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

Ve Zlíně 22. 4. 2015

Mahovská

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 nevydělčně 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 díla vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího 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 přihlíží k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá vybranými faktory, které ovlivňují dekarboxylázovou aktivitu bakterií mléčného kvašení, izolovaných jako kontaminanty z procesu výroby piva. V rámci praktické části této práce byl uskutečněn skrínig produkce biogenních aminů (BA) u kmenů *Lactobacillus brevis* a *Lb. plantarum* za podmínek *in vitro*. U kmene *Lb. brevis* RIBM 2-20 byla navíc sledována kinetika produkce BA.

Byl pozorován vliv hořkých chmelových látek, přísadků etanolu, pH a kultivační teploty na množství vyprodukovaných BA.

Stanovení BA v supernatantech po kultivaci zkoušených kmenů bylo prováděno pomocí HPLC a UV detekce (po předkolonové derivatizaci dansylchloridem).

Jedenáct z 23 testovaných kmenů produkovalo hlavně tyramin (10-350 mg/l). Produkce tyraminu *Lb. brevis* RIBM 2-20 nebyla zcela inhibována testovanými kombinacemi faktorů (maximální zkoušená koncentrace směsi izo-alfa-hořkých látek 30 mg/l a 4 % (v/v) etanolu). Nejvyšší množství tyraminu, které byl schopen tento kmen uvolnit do kultivačního média, bylo téměř 2 g/l. Dle dostupné literatury mohou být zástupci *Lb. brevis* zodpovědní za zvýšené koncentrace BA v pivu. Přítomnost vyšších koncentrací tyraminu v pivu může prokazatelně ohrozit zdraví konzumenta.

Klíčová slova: biogenní aminy, *Lactobacillus*, pivo, hořké kyseliny, etanol

ABSTRACT

This diploma thesis is dealing with the selected factors influencing the decarboxylase activity of lactic acid bacteria isolated in beer production process. In the practical part of this work the screening of the ability of *Lb. brevis* and *Lb. plantarum* strains was realized at *in vitro* conditions. In addition, the monitoring of kinetics of BA production in *Lb. brevis* RIBM 2-20 was carried out.

The influence of ethanol, hop bitter substances, pH value and cultivation temperature on the concentration of produced BA was observed.

The determination of BA was realized in media after the cultivation of tested strains by the means of HPLC and UV detection (after pre-column derivatisation with dansylchloride).

Eleven from 23 tested strains produced in most of cases tyramine (10-350mg/l). Tyramine production of *Lb. brevis* RIBM 2-20 was not completely inhibited by the tested levels of the factors (maximal tested concentrations: 30 mg/l mixture of iso alpha bitter acids; the addition of 4 % (v/v) ethanol). The highest detected tyramine concentration was almost 2 g/l. According to available literature, representatives of *Lb. brevis* can be responsible for the increased BA concentrations in beer. The presence of higher tyramine concentrations can probably endanger consumer health.

Keywords: biogenic amines, *Lactobacillus*, beer, bitter acids, ethanol

Touto cestou bych chtěla poděkovat paní Ing. Evě Lorencové za její pomoc, trpělivost a cenné rady v průběhu zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem laborantkám z laboratoří mikrobiologie a také laborantkám na U3 za příjemné pracovní prostředí, zejména paní Ing. Ludmile Zálešákové za její pomoc se zpracováním vzorků.

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

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	13
1 DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA MIKROORGANIZMŮ	14
1.1 PROCES BAKTERIÁLNÍ DEKARBOXYLACE AMINOKYSELIN	14
1.2 VYBRANÉ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITU BAKTERIÍ	16
1.2.1 Dostupnost substrátu	17
1.2.2 Teplota.....	17
1.2.3 pH.....	18
1.2.4 Aktivita vody.....	18
1.2.5 Přítomnost solí	19
1.2.6 Etanol	19
1.2.7 Hořké látky.....	20
1.2.8 Přítomnost kyslíku	20
2 SRUKTURA BIOGENNÍCH AMINŮ A JEJICH FYZIOLOGICKÉ FUNKCE	21
2.1 STRUKTURA BIOGENNÍCH AMINŮ	21
2.2 FYZIOLOGICKÉ FUNKCE BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ	22
2.3 TOXIKOLOGICKÉ ÚČINKY VYBRANÝCH BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ	23
2.3.1 Histamin	24
2.3.2 Tyramin	25
2.3.3 Tryptamin.....	26
2.3.4 Kadaverin	26
2.3.5 Putrescin, spermidin a spermin	27
3 BIOGENNÍ AMINY, JEJICH VÝZNAM VE FERMENTOVANÝCH NÁPOJÍCH A POTRAVINÁCH	28
3.1 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ V PRŮBĚHU VÝROBY PIVA	29
3.1.1 Vliv základních surovin na obsah biogenních aminů v pivu	29
3.1.2 Vliv technologie výroby na obsah biogenních aminů v pivu.....	29
3.1.3 Obsah biogenních aminů v lahvovém pivu.....	31
3.1.4 Mikroorganismy ve výrobě piva a jejich aminogenní potenciál.....	31
3.2 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ VE VÍNĚ	33
3.3 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ VE FERMENTOVANÝCH MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH A SÝRECH	34
3.4 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ VE FERMENTOVANÝCH SALÁMECH A KLOBÁSÁCH.....	35
3.5 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ V OSTATNÍCH VYBRANÝCH FERMENTOVANÝCH POTRAVINÁCH	36
II PRAKTICKÁ ČÁST	37
4 CÍL PRÁCE	38
5 MATERIÁL A METODIKA	39

5.1	ZAŘÍZENÍ, PŘÍSTROJE A POMŮCKY	39
5.2	CHEMIKÁLIE A POMOCNÉ LÁTKY	39
5.3	TESTOVANÉ MIKROORGANIZMY	40
5.4	DEKARBOXYLAČNÍ MÉDIA.....	40
5.5	SKRÍNING PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ VYBRANÝMI KMENY LAKTOBACILŮ	41
5.5.1	Příprava dekarboxylačních médií a podmínky kultivace	42
5.5.2	Odběr vzorků.....	43
5.6	SLEDOVÁNÍ KINETIKY PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ VYBRANÝM KMENEM <i>LACTOBACILLUS BREVIS</i> RIBM 2-20.....	44
5.6.1	Příprava inokula	45
5.6.2	Příprava dekarboxylačních médií.....	45
5.6.3	Odběr vzorků.....	45
5.6.4	Stanovení celkového počtu mikroorganismů.....	45
5.6.5	Měření pH kultivačního média.....	46
5.7	STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ	46
6	VÝSLEDKY	47
6.1	SKRÍNING PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ VYBRANÝMI KMENY LAKTOBACILŮ	47
6.2	KINETIKA PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ KMENEM <i>LACTOBACILLUS BREVIS</i> RIBM 2-20.....	50
7	DISKUZE	59
	ZÁVĚR	63
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	65
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	75
	SEZNAM OBRÁZKŮ	76
	SEZNAM TABULEK.....	78
	SEZNAM PŘÍLOH.....	79

ÚVOD

Přítomnost biogenních aminů a polyaminů ve fermentovaných potravinách a alkoholických nápojích je důležitá hlavně z toxikologického hlediska. Vysoké koncentrace těchto látek mohou vést ke zdravotním problémům spotřebitelů. Přesné metody stanovení, znalost vzniku sloučenin a způsoby, jak minimalizovat jejich množství, jsou důležité pro potravinářský a nápojový průmysl (Kalač a Křížek, 2003, s. 123).

Mnoho mikroorganismů má schopnost produkovat biogenní aminy, mezi ně patří grampozitivní a gramnegativní bakterie různých rodů a druhů. Dekarboxylázová aktivita je však spíše charakterizována na úrovni kmene. Kromě bakterií vykazují dekarboxylázovou aktivitu i kvasinky, které mají potenciál pro produkci alifatických aminů, jako je např. putrescin a kadaverin (Linares et al., 2011, s. 693).

Bakterie mléčného kvašení jsou ubikvitní mikroorganizmy. Obecně jsou považovány za bezpečné. Někteří zástupci bakterií mléčného kvašení jsou však schopni v rámci své metabolické aktivity tvořit biogenní aminy. Z těchto důvodů si bakterie mléčného kvašení zaslouží pozornost. Jejich aminogenní aktivita by měla být sledována (Arena a Manca de Nadra, 2001, s. 158).

Lactobacillus brevis je nejčastější kontaminantou v pivovarech. Vzhledem k častému výskytu a biologické rozmanitosti je nutné rozlišovat kmeny na základě adaptace k prostředí. Také je nutné provádět testování různých druhů pív, které se liší v použitých sladovaných obilovinách, způsobem fermentace mladiny, v obsahu etanolu a hořkých látek tak, aby bylo možné zabránit kontaminaci nebo omezit rozvoj kontaminující mikroflóry (Preissler, Behr a Vogel, 2010, s. 399).

Tato práce byla zaměřena na aktuální problematiku v oblasti dekarboxylázové aktivity mikroorganismů izolovaných z procesu výroby piva.

Byl proveden prvotní skrínig produkce biogenních aminů u 23 kmenů rodu *Lactobacillus* (zástupci *Lb. brevis* a *Lb. plantarum*) v bujónu MRS bez a s úpravou specifických faktorů (přídavek hořkých látek a etanolu, úprava pH). Dále bylo prováděno testování citlivosti vybraného kmene *Lb. brevis* RIBM 2-20 vůči různým koncentracím etanolu a přítomnosti hořkých látek za podmínek dvou různých kultivačních teplot. Vedle studia kinetiky produkce biogenních aminů, která byla ovlivněna zkoušeným rozsahem faktorů, byl v médiu kromě produkce sledován vývoj pH a nárůst sledovaného kmene.

Kmeny testovaných laktobacilů byl v rámci skríningu produkován nejhojněji tyramin. Pro účely sledování kinetiky tvorby biogenních aminů byl vybrán a komentován právě tento toxikologicky velmi významný biogenní amin.

Interference tyraminu a etanolu může mít negativní vliv na zdraví spotřebitele (Linares et al., 2011, s. 691- 692). Zvláště, pokud by množství tyraminu v pivu dosahovalo koncentrací, které je schopen kmen *Lb. brevis* RIBM 2-20 do růstového prostředí za daných podmínek uvolnit.

Je však nutné uvědomit si, že testování probíhalo za podmínek *in vitro*. V reálném systému by mohly množství vyprodukovaných biogenních aminů ovlivnit další relevantní faktory, jako je např. přítomnost kvasinek a CO₂.

Legislativní limit pro obsah biogenních aminů v pivu není v České republice stanoven. Výrobci tedy nejsou nuceni sledovat jejich koncentrace ve svých výrobcích. Vzhledem ke zdravotním rizikům, které vyplývají z vyššího příjmu biogenních aminů stravou (zvláště pro citlivé jedince), by však výrobci měli iniciativně, bez tlaku vytvořeného konkrétními limity maximálního přípustného obsahu biogenních aminů, vzorky svých výrobků analyzovat a hlavně se v celém procesu výroby snažit snižovat riziko kumulace těchto substancí.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA MIKROORGANISMŮ

Dekarboxylace aminokyselin, jako je histidin, tyrozin a ornitin, vede k tvorbě odpovídajících biogenních aminů (BA) – histaminu, tyraminu a putrescinu (Garai et al., 2007, 474). Tvorba BA v potravinách převážně souvisí s mikrobiální aktivitou. Typickými zástupci dekarboxylázopozitivní mikroflóry jsou zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* a *Micrococcaceae*, zástupci bakteriálních rodů *Pseudomonas*, *Enterococcus* a některé bakterie mléčného kvašení (BMK) (Loret, Deloyer, Dandrifosse, 2005, s. 519).

Schopnost dekarboxylace aminokyselin byla pozorována u mnoha druhů BMK. Řada kmenů BMK je často využívána jako startérové kultury v mlékárenském nebo masném průmyslu. Testování dekarboxylázové aktivity BMK a jejich schopnosti zvyšovat hladiny BA v potravinách může poskytnout užitečné informace pro výrobce potravin (Lorencová et al., 2012, s. 2087).

Mezi bakterie disponující značnou dekarboxylázovou aktivitou lze zařadit některé kmeny laktobacilů. Konkrétně u *Lactobacillus brevis* bylo zjištěno, že většina kmenů disponuje výraznou tyrozindekarboxylázovou aktivitou (Marcobal et al., 2006, s. 418).

Volné aminokyseliny, ze kterých BA vznikají, se vyskytují buď přirozeně v potravinách, nebo mohou vznikat proteolýzou. Mikrobiální kmeny s vysokou proteolytickou aktivitou potenciálně tedy zvyšují riziko vzniku BA v potravinách (Karovičová a Kohajdová, 2003, s. 71).

Aktivita dekarboxyláz je vyšší v kyselém prostředí, přičemž optimální hodnota pH je mezi 4,0 a 5,5. Nízké pH prostředí navíc indukuje syntézu těchto enzymů, jako součást obranných mechanismů proti kyselému prostředí a potenciálnímu překyselení buňky (Juneja a Sofos, 2010, s. 253).

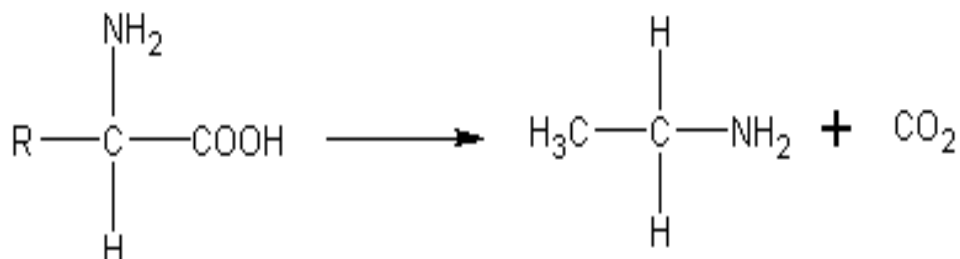
1.1 Proces bakteriální dekarboxylace aminokyselin

Tvorba BA procesem dekarboxylace může probíhat dvěma základními mechanismy.

První mechanismus je založen na aktivitě kofaktoru dekarboxyláz, pyridoxal-5-fosfátu. Aktivní místo enzymu je v tomto případě vytvořeno pomocí funkčních skupin pyridoxal fosfátu, který je v procesu vzniku BA připojen na Schiffovu bázi vazbou na aminoskupinu lyzylu. Karbonylová skupina pyridoxalfosfátu reaguje s aminoskupinou za vzniku

meziproduktů Schiffovy báze, které se poté dekarboxylují za vzniku odpovídajících aminů (Juneja a Sofos, 2010, s. 249).

Druhý mechanismus využívá místo pyridoxalfosfátu pyruvoylový zbytek. Pyruvoylová skupina je kovalentně vázána na aminoskupinu enzymu a působí podobným způsobem jako pyridoxalfosfát (Juneja a Sofos, 2010, s. 249).



Obr. 1: Základní schéma dekarboxylace aminokyselin (Převzato a upraveno dle Kalač a Křížek, 2002, s. 12)

Decarboxylační reakce probíhají za katalýzy enzymů ze skupiny hydroláz, dekarboxyláz. Přeměnu tyrozinu na tyramin katalyzuje enzym tyrozindekarboxyláza. Histidindekarboxyláza je nezbytná pro přeměnu histidinu na histamin. Arginindekarboxyláza je důležitá pro přeměnu na agmatin a ornitindekarboxyláza pro putrescin atd. (Medina et al., 2003, s. 25; Silla-Santos, 1996, s. 215).

Histidindekarboxylázy spadají do dvou různých kategorií. Do první patří histidindekarboxylázy eukaryotických buněk a gramnegativních bakterií, které používají jako ko-faktor pyridoxalfosfát. Do druhé spadají histidindekarboxylázy grampozitivních bakterií, které používají kovalentně vázanou pyruvoylovou skupinu jako prostetickou skupinu (Linares et al., 2011, s. 694).

BMK prokazatelně disponují tyrozindekarboxylázovou aktivitou (Linares et al., 2011, s. 694). Lorencová et al. (2011, s. 4) provedla skrining produkce BA *in vitro* u 73 kmenů BMK a bifidobakterií (zástupci *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus* a *Bifidobacterium*), kdy byl u převážné většiny testovaných kmenů v růstovém prostředí detekován tyramin v různých koncentracích (2-1000 mg/l). Mezi další producenty patří zástupci *Carnobacterium* a *Lactococcus* (Suzzi a Gardini, 2003, s. 42). Burdychová a Dohnal (2008, s. 25) také souhlasně uvádějí produkci tyraminu u některých probiotických kmenů *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Enterococcus* při kultivaci v dekarboxylačním médiu. Produkci BA laktobacily a bifidobakteriemi potvrdila také Lorencová et al. (2012, s. 2090). Priyadarshani a Rakshit (2011, s. 2067) prokázali aktivitu

tyrozindekarboxylázy u dvou probiotických kmenů *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Syntéza některých BA nemusí probíhat jedním reakčním krokem. Například u *Escherichia coli* a většiny zástupců rodu *Pseudomonas* je putrescin syntetizován dvěma způsoby. První způsob zahrnuje dekarboxylaci ornitinu pomocí ornitindekarboxylázy přímo na putrescin. Druhý způsob je složitější, zahrnuje nejprve přeměnu argininu dekarboxylací na agmatin, který je následně přeměněn na putrescin a močovinu za katalýzy agmatinureohydrolázy (Shah a Swiatlo, 2008, s. 5).

Tvorby sperminu se účastní sperminsyntáza a vysoce specifická aminopropyltransferáza. Může také vznikat za účasti sperminoxidázy a flavinadenindinukleotidu (Kusano et al., 2008, s. 379).

Aktivita tryptofandekarboxylázy byla pozorována u některých kmenů *Lactobacillus*. Arginindekarboxylázy, lyzindekarboxylázy a ornitindekarboxylázy jsou prozatím nejvíce prostudované dekarboxylázy. Lze je rozdělit na degradační a biosyntetické. Degradační jsou indukovány různými podmínkami, jako je nízká tenze kyslíku, vysoká kyselost prostředí a vysoká koncentrace příslušných substrátů aminokyselin. Biosyntetické jsou konstitutivně vyráběny v nízkém množství při běžných kultivačních podmínkách a jejich role je katalyzovat první krok syntézy polyaminů potřebných pro funkci ribozomů a růst buňky (Linares et al., 2011, 695).

Tyrozindekarboxylázy jsou mimo jiné schopny využívat fenylalanin jako substrát pro tvorbu β -fenyletylaminu, avšak častější je přeměna pomocí fenylalanindekarboxylázy. Tyrozindekarboxyláza může tedy být také odpovědná za zvýšený obsah β -fenyletylaminu, který byl detekován v některých mléčných výrobcích (Marcobal et al., 2006, s. 144).

Další možnost vzniku BA je aminace a transaminace aldehydů a ketonů. Tento způsob vzniku však není v rámci bakteriálního metabolismu preferován (Silla-Santos, 1996, s. 213).

1.2 Vybrané faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu bakterií

Dekarboxylázová aktivita může být ovlivněna různými faktory, které mohou v konečném důsledku podpořit nebo zabránit kumulaci BA v potravinách. Dostupnost substrátu, teplota, pH a koncentrace solí ovlivňuje tvorbu BA. U některých bakterií je pro dekarboxylaci limitující přítomnost pyridoxalfosfát (Özogul a Özogul, 2007, s. 385; Buňková

et al., 2011, s. 975). Nezbytná je však přítomnost dekarboxylázapozitivní mikroflóry (Linares et al., 2012, s. 2; Karovičová a Kohajdová, 2003, s. 71)

Vzhledem k tomu, že jsou BA tvořeny za účasti bakteriálních dekarboxyláz lze očekávat, že faktory, které ovlivňují růst bakterií, ovlivní i jejich enzymatickou činnost (Karovičová a Kohajdová, 2003, s. 71).

1.2.1 Dostupnost substrátu

Koncentrace dostupných volných aminokyselin je důležitá pro tvorbu BA. Aminokyseliny představují jednak prekurzory pro vznik BA, ale také slouží jako substrát pro růst mikroorganismů. Volné aminokyseliny se mohou nacházet v samotných potravinách nebo jsou tvořeny, jak již bylo zmíněno výše, v rámci proteolýzy. Bakterie disponující vysokou proteolytickou aktivitou zvyšují koncentraci volných aminokyselin a tím stimulují tvorbu BA (Juneja a Sofos, 2010, s. 205).

Fernández et al. (2007, s. 1403) sledovali ve své studii vliv přidavku různých koncentrací tyrozinu na produkci tyraminu. Zjistili, že v nepřítomnosti prekurzoru tyrozinu nebyl tyramin detekován.

1.2.2 Teplota

Tvorba BA je rozhodujícím způsobem ovlivněna teplotou. Teplota mezi 20 °C a 37 °C je optimální pro růst většiny bakterií, které disponují dekarboxylázami (Karovičová a Kohajdová, 2003, s. 71). Naopak při nízkých teplotách je omezen rozvoj dekarboxylázapozitivní mikroflóry, dekarboxylázové aktivity a následně i vyprodukované množství BA (Kim et al., 2002, s. 1523; Lehane and Olley, 2000, s. 5).

Při mrazírenských teplotách je většina dekarboxyláz nestabilní. Například histidin-dekarboxyláza se stává neaktivní po osmi až patnácti dnech při teplotě -20 °C. Obecně tedy platí, že skladování surovin a potravin za takto nízkých teplot nepřeje tvorbě BA (Juneja a Sofos, 2010, s. 252).

Zotta et al. (2013, s. 850) při sledování vlivu teploty na růst *Lactobacillus plantarum* zjistili, že při snížení kultivační teploty o 10 °C, z 35 °C na 25 °C, došlo ke zpomalení růstu (a tím pádem i dekarboxylázové aktivity) u testovaného kmene až o 42 %. Buňková et al. (2011, s. 117) sledovali vliv různých faktorů na aktivitu tyrozindekarboxylázy u *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Potvrdili, že při testování vlivu faktorů (například přídavek NaCl) má rozhodující význam teplota. Snížení

kultivační teploty o 10 °C způsobilo výrazný pokles dekarboxylázové aktivity sledovaných kmenů.

1.2.3 pH

Kyselé prostředí je pro tvorbu BA příhodné. Samotná syntéza dekarboxyláz je indukována v kyselém prostředí. Dekarboxylázy jsou navíc neaktivní při neutrálním a alkalickém pH (Fernández et al., 2007, s. 1400).

Prudká acidifikace, například přidáním glukono- δ -laktonu, může však způsobit snížení koncentrace BA. Snížení pH růstového prostředí zejména u zástupců z čeledi *Enterobacteriaceae*, má za následek zpomalení růstu a tím i produkce BA (Suzzi, 2003, s. 48). Naopak u BMK, které jsou acidotolerantní, dochází při mírném snížení pH ke zvýšení produkce. Pokud dojde k výraznému snížení pH, sníží se počet mikroorganismů. Snížení počtu mikroorganismů může, ale nemusí způsobit snížení celkových vyprodukovaných množství BA, protože produkce BA je u jednotlivých kmenů variabilní (Linares et al., 2012, s. 6).

1.2.4 Aktivita vody

Voda je nepostradatelnou složkou potřebnou pro bakteriální růst (Brown, 2014, s. 39). V prostředí s nízkým obsahem vody dochází k omezení bakteriálního růstu, k omezení dekarboxylázové aktivity a výsledného obsahu BA v prostředí (Juneja a Sofos, 2010, s. 253; Křížek a Kalač, 1998, s. 157-158).

Rozvoj bakterií nepodporují potraviny, které disponují nízkým obsahem vody, s vodní aktivitou (a_w) pod 0,85. Vysoký obsah vody mají například potraviny, jako jsou mléko, maso, zelenina a ovoce. Odolnější vůči mikrobiální kontaminaci a růstu mikroorganismů jsou ořechy, sušené mléko, sušené luštěniny a sušené ovoce (Brown, 2014, s. 39). U většiny potravin se a_w pohybuje mezi 0,95-0,99, což je prostředí, které umožňuje růst velkého množství mikroorganismů. Minimální a_w potřebná pro růst většiny mikroorganismů je 0,90. U potravin s nižší hodnotou a_w dochází k růstu xerotolerantních plísní a vysoce odolných prokaryot (Grant, 2004, s. 1256). Optimální a_w pro probiotické kultury se pohybuje v rozmezí 0,99-0,94 (Champagne, Raymond a Simon, 2012, s. 745).

1.2.5 Přítomnost solí

Obsah solí má také významný vliv na produkci BA (Juneja a Sofos, 2010, s. 252). Vysoká koncentrace rozpuštěných látek (například chlorid sodný) a obecně procesy, které zvyšují osmotický tlak v buňkách (fermentace), v mnoha případech snižují i a_w (kapitola 1.2.4.) a tím omezují tvorbu BA v potravinách (Silla Santos, 2010, s. 253).

Koncentrace 5 % (w/w) chloridu sodného v růstovém prostředí způsobuje výrazné snížení produkce BA (Gardini et al., 2001, s. 114). Buňková et al. (2011, s. 117) ve své studii uvádí, že při koncentraci chloridu sodného 2 % (w/w) byly všechny kmeny schopny produkce BA. Při koncentraci 3,5 % (w/w) chloridu sodného byla produkce histaminu u *Lactobacillus buchneri* částečně inhibována a při koncentraci 5,0 % (w/w) byla tvorba histaminu úplně zastavena (Buňková et al., 2011, s. 117).

Potravinářská přídatná látka jako sorban draselný, která se běžně přidává do potravin jako konzervant, může být rovněž použita k omezení produkce BA v potravinách (Özogula Özogul, 2007, s. 385).

1.2.6 Etanol

Etanol v nízkých koncentracích (okolo 4 % (v/v)) působí pozitivně na dekarboxylázovou aktivitu (Kalač a Křížek, 2003, s. 123-125). Glória a Izquierdo-Pulido (1999, s. 132-134) sledovali obsah BA v brazilských pivech s různou koncentrací etanolu. Koncentrace BA, zejména agmatinu a putrescinu, byla u piv s vyšším obsahem etanolu významněji. Z toho lze usoudit, že malé přídavky etanolu podporují dekarboxylázovou aktivitu enzymů.

Mazzoli et al. (2009, s. 87- 89) zkoumali ve své studii vliv etanolu na obsah BA v červeném víně. Zjistili, že koncentrace 13 % (v/v) působila letálně u vybraných kmenů *Lactobacillus hilgardii* a zároveň nebyl přítomen sledovaný histamin. Koncentrace 9 % (v/v) etanolu však nezabránila růstu a produkci histaminu i přes vysokou citlivost *L. hilgardii* k etanolu. Casadei et al. (2001, s. 132-133) zjistili, že *Lactobacillus delbrueckii* má vysokou toleranci k etanolu a dokáže bez problémů růst v přítomnosti 0,5-4,4 % (v/v) etanolu. G-Alegría et al. (2004, s. 58-59) zkoumali vliv etanolu na růst *Lb. plantarum*. Při teplotě 10 °C a koncentraci etanolu 12 % (v/v) byl kmen zcela inhibován. Při 18 °C při koncentracích 7 %, 12 % a 13 % (v/v) etanolu došlo k výraznému inhibičnímu účinku, ale růst nebyl zcela potlačen.

1.2.7 Hořké látky

Hořké látky, které se nacházejí v pivu v izo-formě a jsou odpovědné za typickou hořkou chuť a aroma piva, vykazují antimikrobní účinky. Hořké látky působí zejména proti grampozitivním bakteriím a některým houbám. Účinek bývá bakteriostatický až baktericidní v závislosti na koncentraci a délce expozice (Matoulková, Kubizniaková a Sigler, 2012, s. 337).

Podle Simpsona (1993, s. 1042) jsou právě izo- α -kyseliny a jejich deriváty odpovědné za antimikrobiální působení. V přítomnosti těchto látek dochází ke zvýšení propustnosti lipidových dvojvrstev biologických membrán pro protony. Kyselost uvnitř buňky je nižší, což způsobí disociaci izo- α -kyselin v cytoplazmě na anionty a protony. Dochází také k narušení transportních procesů, které posléze vedou k narušení příjmu živin až hladovění buněk (Matoulková, Kubizniaková a Sigler, 2012, s. 337).

Kern, Vogel a Behr (2014, s. 22-23) sledovali vliv hořkých látek v pivu na růst a kultivaci *Lactobacillus brevis*. U 17 testovaných kmenů prokázali toleranci k izo- α -hořkým látkám. *Lb. brevis* je schopný přežít i při vyšších koncentracích hořkých látek a nedochází k potlačení dekarboxylázové aktivity (Kern, Vogel a Behr, 2014, s. 23).

1.2.8 Přítomnost kyslíku

Velké množství mikroorganismů vyžaduje pro svůj růst přítomnost molekulárního kyslíku. Vysoké koncentrace kyslíku jsou toxické pouze pro anaerobní bakterie (Stolp, 1988, s. 22). Přítomnost kyslíku má také zásadní vliv na produkci BA (Silla-Santos, 1996, s. 221).

Vliv odnímání kyslíku na produkci BA je viditelný u balení v modifikované atmosféře. Při kombinaci kyslíku, dusíku a oxidu uhlíkatého, kdy převažujícím plynem je dusík, dochází k výraznému potlačení dekarboxylázové aktivity. Snížení dekarboxylázové aktivity je způsobeno zejména inhibicí aerobní mikroflóry z povrchových vrstev potraviny (Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013, s. 405; Juneja a Sofos, 2010, s. 253).

Buňková et al. (2011, s. 118) ve své studii sledovala vliv aerobního a anaerobního prostředí na produkci tyraminu u laktokoků. U všech testovaných kmenů v rámci zmíněné studie byla potvrzena vyšší produkce tyraminu v anaerobních podmínkách.

2 SRUKTURA BIOGENNÍCH AMINŮ A JEJICH FYZIOLOGICKÉ FUNKCE

2.1 Struktura biogenních aminů

Podle chemické struktury jsou BA rozděleny na alifatické (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatické (tyramin, fenyletylamin), heterocyklické (histamin, tryptamin). Někteří autoři zařazují kadaverin, putrescin, spermin a spermidin mezi polyaminy (Karovičová a Kohajdová, 2003, s. 70).

BA lze také rozdělit podle počtu alkylových a arylových skupin a to na primární, sekundární a terciální (Roginski, Fuquay a Fox, 2003, s. 820-830).

BA vznikají dekarboxylací volných aminokyselin. Jednotlivé aminokyseliny představují prekurzory pro vznik odpovídajících BA (Tab. 1).

Tab. 1: Prekurzory pro vznik vybraných biogenních aminů a polyaminů (Silla-Santos, 1996, s. 214)

PREKURZOR	BIOGENNÍ AMIN/ POLYAMIN
histidin	histamin
tyrozin	tyramin
tryptofan	tryptamin
lyzin	kadaverin
ornitin	putrescin
arginin	spermin, spermidin

Mezi fyziologicky významné BA patří tyramin (4-(2-aminoetyl)fenol), histamin (2-(1H-imidazol-5-yl)etanamin), tryptamin (2-(1H-indol-3-yl)etanamin) a serotonin (3-(2-aminoetyl)-1H-indol-5-ol). Fenyletylamin (2-fenyletanamin) lze zařadit do skupiny arylalkylaminů, což jsou deriváty nasycených uhlovodíků (Newton, 2007, s. 94; Roginski, Fuquay a Fox, 2003, s. 820-830). Putrescin (1,4-diaminobutan), spermidin (N-[3-aminopropyl]-1,4-diaminobutan) a spermin (N,N'-bis-[3-aminopropyl]-1,4-diaminobutan) tvoří skupinu polykationtových aminů, které jsou označovány jako fyziologické polyami-

ny. Vzhledem k jejich specifickým fyziologickým funkcím v eukaryotických buňkách jsou nyní oddělovány jako zvláštní skupina (Kalač a Krausová, 2005, s. 220). Jedná se o polykationtové molekuly, které se skládají z uhlovodíkových řetězců a většího množství aminoskupin (Shah a Swiatlo, 2008, s. 4). U *E. coli* a ostatních prokaryot je absorpce a využití polyaminů závislé na energii, protože jednotlivé transportní dráhy jsou u různých polyaminů odlišně energeticky náročné. Obsah polyaminů v buňkách je regulován biosyntézou, degradací a transportem (Igarashi a Kashiwagi, 1999, s. 633).

2.2 Fyziologické funkce biogenních aminů a polyaminů

BA jsou produkovány rostlinami, zvířaty i mikroorganismy v rámci běžného metabolismu, kdy plní určité fyziologické funkce. V eukaryotických buňkách je syntéza BA významná, jelikož tyto sloučeniny slouží jako prekurzory pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů (Linares et al., 2011, s. 691- 692).

Histamin, tryptamin, fenyletylamin a tyramin jsou řazeny mezi biologicky aktivní aminy, které mají významné fyziologické účinky, s psychoaktivními nebo vazoaktivními účinky. Psychoaktivní aminy působí na nervové přenašeče, čímž ovlivňují nervový systém. Vazoaktivní aminy působí na systém cévní (Shalaby, 1996, s. 676).

Přítomnost polyaminů, je důležitá pro růst a proliferaci buněk. Podílí se také na normální funkci střev. Dále pak jsou důležité antioxidační účinky polyaminů, zejména spermidinu a sperminu, které přispívají ke zpomalení procesu stárnutí buněk (Kalač, 2009, s. 66).

Velmi důležitá je i funkce intracelulárních polyaminů (spermidin a spermin). Tyto polyaminy lze primárně nalézt jako komplexy s ribonukleovou kyselinou (RNA) a hořčnatými kationty, kdy tyto komplexy stabilizují vyšší struktury (sekundární, terciární). Polyaminy se také navazují na ribozomy, zvyšují přesnost využití kodonu při syntéze bílkovin a usnadňují čtení mediátorové RNA během translace (Shah a Swiatlo, 2008, s. 8; Adámková a Petřivalský, 2012, s. 167).

Díky tvorbě BA je možné získat energii elektrogenním transportem aminokyselin, případně pomocí antiportu. Tato funkce je důležitá zejména pro BMK, které při nedostatku adenosin trifosfátu získaného z dýchacího řetězce využívají právě tuto energii (Linares et al., 2011, s. 692).

2.3 Toxikologické účinky vybraných biogenních aminů a polyaminů

BA mohou být chápány jako ve vyšších koncentracích toxické látky, které jsou označovány za původce alimentárních onemocnění právě proto, že jsou schopny iniciovat různé farmakologické reakce (Shalaby, 1996, s. 675). Při příjmu vysokých koncentrací mohou způsobit bolesti hlavy, dýchací potíže, bušení srdce, hypertenzi nebo hypotenzi a některá alergická onemocnění (Yücel a Üren, 2008, s. 115).

Obecně se za toxickou koncentraci u histaminu považuje množství nad 100 mg/kg, u tyraminu (pro zdravé jedince, bez přítomnosti ostatních interferujících látek) dokonce nad 1080 mg/kg. Tryptamin a některé polyaminy (putrescin a kadaverin) jsou toxické v koncentraci nad 2 mg/kg tělesné hmotnosti. Spermidin a spermin pak způsobují zdravotní komplikace při koncentracích nad 600 mg/kg (Ercan, Bozkurt a Soysal, 2013, s. 397).

Travicí trakt savců disponuje detoxikačním systémem, který je schopen metabolizovat obvyklý příjem BA. Za normálních podmínek jsou BA vstřebávány z potravy a rychle degradovány působením aminooxidáz (Karovičová a Kohajdová, 2003, s. 71-72).

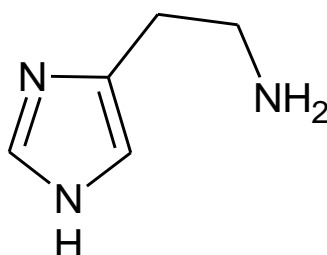
Detoxikační systém se skládá z enzymů monoaminoxidázy (MAO, EC 1.5.3.11), diaminoxidázy (DAO, EC 1.4.3.6) a polyaminoxidázy (PAO, EC 1.5.3.11). Polyaminy jsou acetylovány a teprve poté dochází k oxidaci pomocí DAO a PAO. Významnější než PAO jsou MAO a DAO, které působí ve střevním epitelu a způsobují přítomnost oxidačních produktů BA v krevním oběhu. Koncové metabolity degradačních reakcí jsou poté snadno vylučovány močí (Juneja a Sofos, 2010, s. 260; Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 31).

Při vysoké koncentraci BA v lidském organismu je proces detoxikace narušen a BA se v těle hromadí (Karovičová a Kohajdová, 2003, s. 71-72; Juneja a Sofos, 2010, s. 260). Možnost zdravotních komplikací je častější a závažnější u jedinců, kteří se hůře detoxikují díky genetickým predispozicím. U citlivějších jedinců dochází snadněji k inhibici aktivity aminooxidáz působením exogenních faktorů (Juneja a Sofos, 2010, s. 260). Vyšší riziko předávkování lze také předpokládat u jedinců se zažívacími problémy, protože je aktivita aminooxidáz ve střevech u těchto jedinců obvykle nižší. Dále může být výskyt zdravotních komplikací způsobených BA častější u lidí s dýchacími problémy, u jedinců trpících hypertenzí nebo deficitem vitamínu B12. Jako inhibitory MAO a DAO působí některé druhy farmak, např. psychofarmaka snižují aktivitu MAO (Juneja a Sofos, 2010, s. 260).

Interferovat s detoxikačním systémem může i etanol (Ancín-Azpilicueta et al., 2008, s. 257- 275).

Zkoumána je také potenciální role BA a polyaminů jako prekurzorů pro vznik karcinogenních sloučenin, jelikož vlivem vysokých teplot dochází u většiny ke vzniku sekundárních metabolitů. Tyto metabolity jsou schopny reagovat s dusitany za vzniku nitrosaminů (Jejuna a Sofos, 2010, s. 263).

2.3.1 Histamin



Obr. 2: Histamin (převzato a upraveno dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249)

Histamin je u všech savců přirozeně se vyskytující látka (Landete et al., 2008, s. 697). Vyšší koncentrace působí toxicky. Mezi nejčastější alimentární otravy, které způsobují BA, patří právě intoxikace histaminem (Karovičová a Kohajdová, 2003, s. 71-72).

Histamin je přítomen v různých potravinách. Se zvýšeným výskytem histaminu se můžeme setkat např. ve vzorcích syrových ryb, vína, sýrů, fermentovaných masných a rybích produktů. Ve fermentovaných výrobcích, jako je víno, sýr a rybí omáčky je vytvářen zvláště za účasti BMK (Takahashi et al., 2003, s. 2568). Ve studii Křížka a Hlavatého (1995, s. 268) byla potvrzena přítomnost histaminu i ve světlých pivech. Koncentrace se v této studii pohybovala však do 7 mg/l.

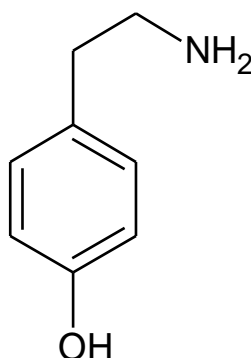
BA histamin je podstatný pro mnoho fyziologických pochodů. Podílí se v těle zejména na regulaci sekrece HCl a plní úlohu neurotransmiteru v centrální nervové soustavě (CNS) (Martínková, 2014, s. 221).

Fyziologické účinky histaminu jsou obvykle jasně patrné v případech, kdy se uvolňuje ve velkém množství vlivem alergických reakcí. Histamin účinkuje prostřednictvím vazby na receptory buněčné membrány respiračního, kardiovaskulárního, gastrointestinálního, hematologického, imunologického systému a kůže. Způsobuje dilataci periferních cév, což způsobuje kopřivku, akutní hypotenzi, návaly horka a bolest hlavy (Landete et al., 2008, s. 697).

U citlivých jedinců může koncentrace 5 mg histaminu na 100 g potravin vyvolat zdravotní komplikace. Obecně se uvádí, že je rizikovost výskytu otrav při koncentraci 8-40 mg/100 g nízká, při 40-100 mg/100 g střední, a při koncentraci nad 100 mg/100 g je riziko vysoké (Juneja a Sofos, 2010, s. 262).

Potraviny vykazující vysokou koncentraci histaminu mohou vyvolávat scombroid syndrom, což jsou příznaky vyvolané toxickými účinky histaminu na organismus. Vysoký obsah tohoto aminu a možný prekurzor vzniku tohoto syndromu jsou zejména ryby, některé druhy sýrů a vín (Bělohlávková a Fuchs, 2005, s. 231). Otrava histaminem se projevuje řadou syndromů, mezi které patří kožní projevy (vyrážky, kopřivka, edém, lokalizované záněty), gastrointestinální (nevolnost, zvracení, průjem, břišní křeče), hemodynamické (hypotenze) a neurologické (bolest hlavy, bušení srdce, mravenčení, pálení a svědění). V těžkých případech se přidružují respirační problémy (Juneja a Sofos, 2010, s. 260).

2.3.2 Tyramin



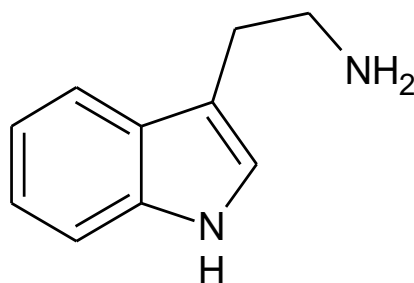
Obr. 3: Tyramin (převzato a upraveno dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249)

Produkce tyraminu získala v poslední době zvláštní pozornost právě z důvodů vysokého výskytu ve fermentovaných potravinách. Protože se jedná o silný vazokonstriktor, ve vysokých koncentracích způsobuje hypertenzi, migrény, v nejzávažnějších případech může způsobit krvácení do mozku, nebo selhání srdce (Kuley a Özogul, 2011, s. 1163). Tyramin může způsobovat tzv. „cheese reaction“, která působí negativně na kardiovaskulární systém, kdy dochází k hypertenzní krizi doprovázené bolestmi hlavy a v akutních případech může docházet až ke krvácení do mozku. Hypertenzní krize se dále projevuje nevolností, ztuhlostí krku, bušením srdce, pocením, zmateností a v krajních případech může zapříčinit mrtvici a smrt (Offermanns a Rosenthal, 2008, s. 787; Juneja a Sofos, 2010, s. 261).

Dávka 6 mg představuje riziko jen pro pacienty s léčbou antidepresivy nebo u pacientů, kterým jsou podávány inhibitory monoaminoxidáz (Kuley a Özogul, 2011, s. 1163). Inhibitory MAO se běžně používají k léčbě psychických poruch, proto je u těchto pacientů vyšší riziko výskytu zdravotních komplikací (Juneja a Sofos, 2010, s. 261).

Produkce tyraminu byla prokázána u některých kmenů laktobacilů. Mezi ně patří *Lb. buchneri*, *Lb. alimentarius*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus*, *Lb. farciminis*, *Lb. bavaricus*, *Lb. reuteri* a *Lb. sakei* (Juneja a Sofos, 2010, s. 251). Buňková et al. (2009, s. 537) prokázali produkci u tří kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a tří kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

2.3.3 Tryptamin



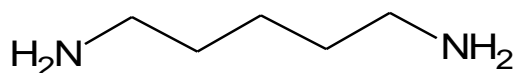
Obr. 4: Tryptamin (převzato a upraveno dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249)

Tryptamin je monoamin, který se přirozeně vyskytuje v buňkách rostlin a hub (Corkery et al., 2012, s. 259). Öner et al. (2004, s. 458) prokázali přítomnost tryptaminu v nízkých koncentracích od 0,3 do 40,4 mg/kg ve vybraných typech sýrů z Tulum.

Produkce tryptaminu byla prokázána u *Lactobacillus brevis* a také u kultury *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* (Konings, Kuipers a Huis in 't Veld, 1999, s. 235).

Křížek a Hlavatá (1995, s. 268) ve své studii potvrdili přítomnost tryptaminu ve světlém desetiprocentním pivu. Obsah tryptaminu byl však nízký, pohyboval se do 2 mg/l.

2.3.4 Kadaverin



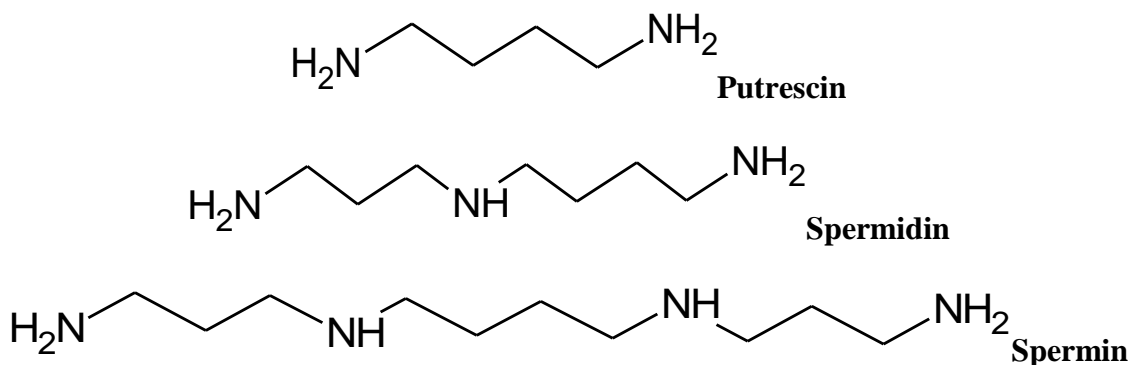
Obr. 5: Kadaverin (převzato a upraveno dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249)

Kadaverin (1,5-diaminopentan) vzniká během dekarboxylace lyzinu, za katalýzy lyzindekarboxylázy, kterou disponují některé bakterie a mykoplazmata (Hawel et al., 1994, s. 7412).

Kadaverin je polyamin, který z toxikologického hlediska nevzbuzuje velkou pozornost. Zatím u něj totiž nebyla prokázána žádná významná role v lidském těle. U rostlin jsou většinou koncentrace kadaverinu nízké až zanedbatelné (Verpoorte a Alfermann, 2000, s. 211).

Přítomnost kadaverinu ve světlých pivech potvrdili svou studií Křížek a Hlavatá (1995, s. 268). Analyzovaná piva obsahovala až 36 mg/l kadaverinu.

2.3.5 Putrescin, spermidin a spermin



Obr. 6: Putrescin, spermidin a spermin (převzato a upraveno dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249)

I přes potřebu polyaminů během fyziologických pochodů je známo, že mohou mít ve vysokých koncentracích nežádoucí účinky. Polyaminy v nadbytečném množství pravděpodobně narušují buněčný metabolismus, včetně proteosyntézy (Pegg, 2013, s. 1785).

Spermin vykazuje několikanásobně vyšší toxicitu než spermidin (Pegg, 2013, s. 1785). Akutní orální toxicita některých polyaminů je v rozmezí 600-2000 mg/kg, kdy 600 mg/kg potravin je limitní obsah pro spermidin a spermin, 2000 mg/kg je limit pro obsah putrescinu (Kalač, 2014, s. 29).

3 BIOGENNÍ AMINY, JEJICH VÝZNAM VE FERMENTOVANÝCH NÁPOJÍCH A POTRAVINÁCH

BA mohou být v potravinách přítomny v různých koncentracích. Důvodem této variability jsou odlišné podmínky vzniku. Vznik BA ovlivňuje nejen přítomnost dekarboxyláz pozitivní mikroflóry, ale také faktory, které přímo působí na rozvoj mikroorganismů a na jejich dekarboxylázovou aktivitu (Silla Santos, 1996, s. 252).

Potraviny, vzhledem k jejich odlišnému složení, mohou být zdrojem vysokých koncentrací BA. Mezi potraviny, které mohou být zdroji vyššího příjmu BA, můžeme zařadit hlavně fermentované potraviny, které díky svému pH představují ideální prostředí pro kumulaci BA (Linares et al., 2012, s. 1).

Vysoké koncentrace BA jsou možným ukazatelem nesprávné technologie výroby, případně špatných výrobních postupů (Mazzoli et al., 2009, s. 81).

Histamin, putrescin, kadaverin a tyramin lze nalézt zejména ve zkažených potravinách (například zkažených rybách) nebo ve fermentovaných potravinách (sýrech, klobásách, alkoholických nápojích) (Mazzoli et al., 2009, s. 81; Linares et al., 2012, s. 2).

Tyramin se nachází zejména ve výrobcích z ryb a ve fermentovaných výrobcích, přičemž neovlivňuje sensorické vlastnosti potravin (Coton, 2009, s. 52). Přítomnost tyraminu ve světlých pivech potvrdili ve své studii Křížek a Hlavatá (1995, s. 268). Tyramin zde byl přítomen v koncentracích do 25 mg/l.

U čokolády a fermentovaných výrobků ze sóji bývá obsah BA nižší, pohybuje se zpravidla v rozmezí 10-30 mg/kg. Naopak u masných výrobků a sýrů se pohybuje od 200 do 1500 mg/kg, kdy je koncentrace BA závislá také na hygieně provozu (Mazzoli et al., 2009, s. 81).

Víno a pivo také patří mezi ověřené zdroje BA. Ve vínech se celkový obsah BA většinou pohybuje od několika mg/l až do 50 mg/l (Kohajdová a Karovičová, 2008, s. 30-31). Obsah BA v pivu je ze zdravotního hlediska významný, zejména kvůli synergickému působení etanolu a detoxikačního systému (Kalač a Křížek, 2003, s. 123). U spontánně kvašeného piva obecně dosahuje tyramin koncentrace nad 20 mg/l a koncentrace histaminu do 10 mg/l (Loret, Deloyer a Dandrifosse, 2005, s. 523-524).

3.1 Vznik biogenních aminů v průběhu výroby piva

Vzhledem ke svému složení je pivo nevhodné a poměrně nepřátelské prostředí pro rozvoj většiny mikroorganismů. Koncentrace etanolu se pohybuje od 0,5 % do 10 % (v/v). Obvykle se pohybuje kolem 4-5 % (v/v). Pivo představuje kyselé prostředí s rozsahem pH od 3,8 do 4,7. Toto pH není mnoho mikroorganismů schopno tolerovat. Navíc poměrně vysoká koncentrace oxidu uhličitého (přibližně 0,5 % w/w) a snížená přítomnost aktivního kyslíku (< 0,1 ppm) dělá z piva spíše anaerobní prostředí (Sakamoto a Konings, 2003, s. 107). Mikroorganismy schopné přežít tyto podmínky jsou tedy acidotolerantní, rezistentní vůči působení etanolu, anaerobní nebo fakultativně anaerobní. Mezi takové patří zejména BMK a některé kvasinky (Basařová et al., 2010, s. 323-327).

U piva má pH důležitý význam. Ovlivňuje stabilitu chuťových vlastností piva a hořkost piva. V neposlední řadě má také vliv na mikrobiologickou stabilitu a tím i na dekarboxylázovou aktivitu (Choi et al., 2012, s. 768).

Celková koncentrace BA v lahvovém pivu je významně ovlivněna technologií výroby piva. Obsah histaminu je dobrým ukazatelem pro hygienické podmínky skladování ječmene, sladu a obecně pivovarnictví, protože přítomný histamin v produktu nepochází ve většině případů ze surovin (Halász et al., 1999, s. 418).

3.1.1 Vliv základních surovin na obsah biogenních aminů v pivu

Vliv na obsah BA v pivu mají jednoznačně použité odrůdy ječmene, proces sladování, pivovarská technologie, použité pivovarské kvasnice i bakteriální kontaminace. Všechny tyto faktory již byly zkoumány (Kalač a Křížek, 2003, s. 125).

Halász, Baráth a Holzapfel (1999, s. 420-421) zjistili, že pokud byl prokázán obsah BA u ječmene a z tohoto ječmene vzniklého sladu, může být tento obsah následně zachován i v mladině. Autoři studie ve sladu stanovili významné množství putrescinu (do 21 mg/l) a agmatinu (až 71 mg/l). Koncentrace BA následně významně klesá po proběhnutí fermentace mladiny (Halász, Baráth a Holzapfel, 1999, s. 420).

3.1.2 Vliv technologie výroby na obsah biogenních aminů v pivu

Obsah BA závisí také na samotné technologii výroby piva (Glória a Izquierdo-Pulido, 1999, s. 130).

Ke snížení množství putrescinu a agmatinu dochází během rmutování sladu. Produkce tyraminu, histaminu a kadaverinu byla pak pozorována během vlastní fermentace mla-

diny (Halász, Baráth a Holzapfel, 1999, s. 418-420). Ve studii Kalače a Křížka (2003, s. 125), která se zabývala kvasinkami spodního kvašení *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum*, nebylo prokázáno, že by produkovaly tyramin a histamin během fermentace. Za producenty BA v pivu byly označeny zejména kmeny BMK (Kalač a Křížek, 2003, s. 125).

Obsah BA je ovlivňován způsobem fermentace mladiny (Tab. 2). Podle Kalače a Křížka (2003, s. 124) spontánně kvašená belgická piva a svrchně kvašená piva vykazují nejvyšší koncentrace tyraminu a histaminu. Tato piva tedy představují vysoké toxikologické riziko zejména u pacientů léčenými inhibitory monoaminoxidáz.

Pro studium jsou zejména významná množství histaminu a tyraminu, které ohrožují zdraví konzumentů (Loret, Deloyer, Dandrifosse, 2005, s. 520).

Tab. 2: Obsah některých biogenních aminů (mg/l) u vybraných druhů piva (převzato a upraveno dle Izquierdo-Pulido et al., 1996, s. 3161)

TYP FERMENTACE	TYP PIVA	AGM*	PUT*	TYR*
Svrchně kvašená piva	Stout a porter	9,8	3,8	4,1
	Kvasnicový ležák	7,0	4,8	10,3
	Kriek	2,2	4,5	22,5
Spodně kvašená piva	Lager	10,2	4,1	4,9
	Pils	13,3	5,1	5,6
	Bock	12,9	5,5	3,6
Spontánně kvašená piva	Lambic a Gueuze	8,9	6,4	21,3

*AGM- agmatin, PUT- putrescin, TYR- tyramin.

Výsledky studií, které se zabývají analýzou obsahu BA v pivech belgické produkce, se značně liší (Dumont et al., 1992; Mietz a Karmas, 1977; Izquierdo-Pulid et al., 1996). Je to dáno zřejmě právě odlišným vedením fermentačního procesu a hygienických podmínek výroby.

V pivovaru mohou být specifické kontaminující organizmy definovány jako jakékoliv organizmy, které nebyly záměrně přidávány a které jsou schopny přežít a množit se v prostředí. Jsou schopny se pomnožovat v mladině, během kvašení mladiny a piva, po fil-

traci piva a v pivu baleném (Jespersen a Jakobsen, 1996, s. 140). Mezi bakterie izolované během fermentace piva s významnou produkcí tyraminu patří zejména zástupci rodu *Pediococcus*, zejména *Pediococcus damnosus*. Jako kontaminanty piva jsou dále označovány zástupci rodu *Lactobacillus*, např. *Lb. frigidus*, *Lb. brevissimilis* a *Lb. brevis* (Kalač a Křížek, 2003, s. 126).

3.1.3 Obsah biogenních aminů v lahvovém pivu

Obsah BA v lahvových pivech se zvyšuje s délkou skladování. Nejvýznamnějším BA, který bývá v lahvových pivech detekován, je tyramin (Kalač, Hlavatá a Křížek, 1997, s. 214). Přítomnost tyraminu, histaminu a kadaverinu v lahvovém pivu způsobují především kontaminující BMK (Ercan a Soysal, 2013, s. 401). Podobný obsah BA bývá detekován u alkoholických i nealkoholických piv (Kalač a Křížek, 2003, s. 124).

Kalač et al. (2002, s. 434) svou studií potvrdili výskyt tyraminu a histaminu v lahvovém pivu. Tyto BA byly tvořeny především laktobacily, které přežívají nedostatečnou pasteraci piva. Zvýšená hladina BA může být způsobena kontaminací BMK během výroby, zejména kontaminovanými kvasinkami, které mohou být pro výrobu piva opakovaně používány (Kalač et al., 2002, s. 434).

Buňka et al. (2012, s. 215) monitorovali obsah BA v českých pivech. Zjistili, že téměř 25 % testovaných alkoholických piv obsahovalo více než 100 mg/l BA a polyaminů, zejména tyraminu, putrescinu a kadaverinu. Přibližně u 6 % testovaných vzorků byl obsah vyšší než 200 mg/l. Romero et al. (2003, s. 163) sledovali vliv způsobu zpracování na tvorbu BA ve Španělských pivech. Ve všech vzorcích potvrdili přítomnost putrescinu, kadaverinu a tyraminu v rozmezí 2,9-31,7 mg/l.

3.1.4 Mikroorganismy ve výrobě piva a jejich aminogenní potenciál

Pivovarská výroba využívá při kvašení a dokvašování piva řízenou činnost pivovarských kulturních kvasinek. Kromě nich se při výrobě uplatňují v různém rozsahu další mikroorganismy, které se většinou pokládají za nežádoucí (Basařová et al., 2010, s. 310).

V pivovarské výrobě mají význam jen některé běžně se vyskytující bakterie. Mezi ně patří octové bakterie (rody *Acetobacter*, *Gluconobacter*), BMK (*Lactobacillus* a *Pediococcus*), tzv. mladinové bakterie (většinou z čeledi *Enterobacteriaceae*), dále rody *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* a v zahraničních pivech také *Zymomonas* (Basařová et al., 2010, s. 319).

Tab. 3: Bakterie způsobující kontaminaci piva (převzato a upraveno dle Jespersen a Jakobsen, 1996, s. 139)

	TYČINKY	KOKY
GRAMPOZITIVNÍ BAKTERIE	Rod <i>Lactobacillus</i>	Rod <i>Pediococcus</i>
	<i>Lb. brevis</i>	<i>P. damnosus</i>
	<i>Lb. brevisimilis</i>	<i>P. dextrinicus</i>
	<i>Lb. buchneri</i>	
	<i>Lb. casei</i>	
	<i>Lb. coryneformis</i>	Rod <i>Micrococcus</i>
	<i>Lb. curvatus</i>	<i>M. kristinae</i>
	<i>Lb. lindneri</i>	
	<i>Lb. plantarum</i>	
GRAMNEGATIVNÍ BAKTERIE	rod <i>Pectinatus</i>	rod <i>Megasphaera</i>
	<i>P. cerevisiiphilus</i>	<i>M. cerevisiae</i>
	<i>P. frisingensis</i>	
	rod <i>Selenomonas</i>	Rod <i>Zymomonas</i>
	<i>S. lactificex</i>	<i>Z. mobilis</i>
	rod <i>Zymophilus</i>	
	<i>Z. raffinovorans</i>	

Pro pivovarský průmysl jsou bakterie způsobující kažení piva problémem, se kterým pivovary bojují již po staletí. Patří mezi ně některé BMK (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri* a *Pediococcus damnosus*) a zástupci několika druhů gramnegativních bakterií, například *Pectinatus cerevisiiphilus*, *Pectinatus frisingensis* a *Megasphaera cerevisiae* (Tab. 3). Tyto bakterie mohou znehodnocovat pivo zákalem, zvyšováním kyselosti a produkcí dalších nežádoucích látek, jako je např. diacetyl a sirovodík (Sakamoto a Konings, 2003, s. 105).

Grampozitivní bakterie jsou obecně považovány za nejnebezpečnější organizmy způsobující kažení piva v moderních pivovarech. Především se jedná o laktobacily: *Lb. brevis*, *Lb. lindneri*, *Lb. curvatus*, *Lb. casei*, *Lb. buchneri*, *Lb. coryneformis*, *Lb. plantarum* a *Lb. brevisimilis*. Z pediokoků jsou to zvláště *P. damnosus*, *P. inopinatus* a *P. dextrinicus* (Jespersen a Jakobsen, 1996, s. 139). Také *Pediococcus claussenii* je běžnou kontaminantou piva. Zástupci tohoto druhu navíc mohou produkovat exopolysacharidy, díky kterým jsou ve formě biofilmu odolnější vůči působení etanolu a hořkých kyselin (Pittet et al., 2011, s. 1271).

Mezi gramnegativní striktně anaerobní bakterie, které jsou schopné kontaminovat pivo, náleží např. *Pectinatus cerevisiiphilus*, *Pectinatus frisingensis* a *Selenomonas lactificifex*. Mezi další potenciální kontaminanty způsobující kažení piva patří *Zymophilus raffinivorans*, *Megasphaera cerevisiae* (považovaný za nejčastější kontaminant piv s nízkým obsahem alkoholu) a *Zymomonas mobilis* (Jespersen a Jakobsen, 1996, s. 139).

Zabránění nežádoucí kontaminace je možné vysokým stupněm hygieny provozu a dodržováním technologických postupů, mezi které patří zejména dodržování teplot během celého procesu výroby piva (Kalač a Křížek, 2003, s. 126).

Například praní kvasinek pomocí kyseliny fosforečné se zdá být efektivní způsob, jak snížit počet pediokoků a následně redukovat obsah tyraminu v pivu (Kalač a Křížek, 2003, s. 126).

3.2 Vznik biogenních aminů ve víně

Víno, stejně jako výše uvedené pivo, může obsahovat BA. Na tvorbě BA ve víně se podílí hlavně zástupci BMK (Mazzoli, 2009, s. 81).

Sledování obsahu BA ve víně je uskutečňováno ze dvou důvodů. Jedním z nich je toxikologické hledisko. Druhým důvodem je vztah mezi obsahem BA a kvalitou hroznů, které jsou používány při výrobě vína a hygienické podmínky v průběhu zpracování hroznů (Ertan Anli a Bayram, 2009, s. 93). Při použití nekvalitní vstupní suroviny lze totiž předpokládat vysoký obsah BA v konečném výrobku.

Celková koncentrace BA ve víně se pohybuje od několika miligramů na litr do 50 mg/l. Rozdílné množství BA v různých druzích vín může být způsobena různým technologickým procesem, způsobem skladování, kvalitou vstupních surovin a možnou kontaminací vinařského provozu (Beneduce et al., 2010, s. 574). Přítomnost BA se zvyšuje po

jablečno-mléčném kvašení. Červená vína tedy obsahují zpravidla vyšší množství BA než bílá vína, protože zde ve větší míře probíhá jablečno-mléčné kvašení (Ertan Anli a Bayram, 2009, s. 93).

Mezi nejčastěji obsažené BA obsažené ve víně patří zejména histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, spermin, spermidin. Sporadicky bývá obsažen i agmatin, tryptamin a serotonin (Ancín-Azpilicueta et al., 2008, s. 257).

3.3 Vznik biogenních aminů ve fermentovaných mléčných výrobcích a sýrech

Obsah BA a polyaminů v mléce a jogurtech je většinou velmi nízký. Jejich koncentrace však může dosahovat vysokých hodnot zejména u vyzrálých typů sýrů (Kalač a Krausová, 2005, s. 227). Výskyt a koncentrace BA je rozdílná u jednotlivých typů sýrů, ale liší se také v rámci jednotlivých výrobních procesů. Tvorba může být ovlivněna přítomností mikroorganismů v mléce (non-startéry), způsobem ošetření mléka během zpracování (účinnost pasterace, mikrofiltrace), délkou a podmínkami procesu zrání (Novella-Rodríguez et al., 2003, s. 750; Komprda et al., 2008, s. 3).

Mezi fermentované mléčné výrobky, které obsahují významnější množství BA, patří například kefir (Özdestan a Üren, 2010, s. 102). Özdestan a Üren (2010, s. 106) zjistili, že sledované vzorky kefirů obsahovaly až 12,8 mg/l tyraminu a celkový obsah BA v analyzovaných vzorcích se pohyboval mezi 2,4 až 35,2 mg/l. Buňková et al. (2013, s. 550) potvrdili, že v kysaných mléčných výrobcích je obsah BA mnohonásobně nižší v porovnání se sýry. Zjistili ale, že množství BA u kysaných mléčných výrobků (jogurty, smetany, acidofilní mléka, kefíry, a další) v některých případech dosahuje až 29 mg/kg (Buňková et al., 2013, s. 550).

Sýry mohou být bohatým zdrojem BA (Spano et al., 2010, s. 92). Výroby sýrů se účastní mikroorganismy (starterové kultury, non-starterové kultury, případně kontaminující mikroorganismy). Sýry zároveň svým pH a koncentrací prekurzorů představují ideální prostředí pro dekarboxylázovou aktivitu. Z těchto důvodů koncentrace BA v některých druzích sýrů mohou přesahovat koncentraci 200 mg/kg (Linares et al., 2012, s. 2). Mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou mohou patřit mezi starterové kultury nebo kontaminující mikroflóru pocházející z mléka. Do výsledného produktu se dostávají také během samotné výroby sýru (Burdychová a Komprda, 2007, s. 149).

Hlavními BA, které se vyskytují v sýrech, jsou tyramin, histamin, kadaverin, putrescin a tryptamin (Mayer, Fiechter a Fischer, 2010, s. 3251). Nejčastěji vyskytujícím se BA, kumulovaným během zrání sýrů, je tyramin (Burdychová a Komprda, 2007, s. 153).

3.4 Vznik biogenních aminů ve fermentovaných salámech a klobásách

Fermentované masné výrobky se připravují z vybraného syrového masa a dalších surovin, které jsou plněny do střev, nechají se fermentovat a zrát. Startovací kulturou bývají zástupci BMK, zejména homofermentativní laktobacily a pediokoky (Leroy, 2006, s. 270).

V těchto výrobcích jsou hlavními producenty BA zástupci BMK. Jedná se hlavně o tyramin a histamin, které při dávkách 50-100 mg vyvolávají zdravotní komplikace (Komprda, 2010, s. 870). BA mohou také pocházet z použitého masa, kde bývá přítomen spermidin a spermin, v menších koncentracích také putrescin (Suzzi, 2003, s. 42).

Problémy s přítomností BA jsou zejména u tradičních masných výrobků, jelikož mnohdy využívají spontánní fermentaci. Tento způsob výroby potenciálně zvyšuje možnou přítomnost BA (Latorre-Moratalla, 2008, s. 913). Tvorba BA je tedy závislá na typu startovací kultury a její schopnosti syntetizovat BA z volných aminokyselin (Linares et al., 2011, s. 691-692). Ergönül a Kundakçı (2010, s. 55) zjistili, že při použití startovacích kultur *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus acidophilus* dochází během skladování ke zvýšení koncentrace putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu. Mezi faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu v masných výrobcích patří pH, teplota, přídavek chloridu sodného a ostatních aditiv, například sulfid sodný (konzervační látka v masných výrobcích) a jednoduché cukry (Suzzi a Gardini, 2003, s. 47-49).

Hernández-Jover et al. (1997, s. 2098) zjišťovali obsah BA v mase a masných výrobcích (chorizo, šunka, fermentovaný salám a mortadela). Obsah spermidinu byl do 14 mg/kg, obsah sperminu do 62 mg/l. Obsah tyraminu, histaminu, putrescinu a kadaverinu se lišil i mezi jednotlivými vzorky. Vařené produkty obsahovaly obecně méně než 10 mg/kg BA a minimálně 40 % zrajících výrobků vykazovalo produkci nad 300 mg/kg BA.

3.5 Vznik biogenních aminů v ostatních vybraných fermentovaných potravinech

Kysané zelí připravované mléčným kysáním je populární a hojně konzumovaná zelenina v mnoha zemích v Evropě. I v této pochoutce je možné se setkat s BA. Většinou je v mléčně kysaném zelí přítomna vysoká hladina tyraminu a putrescinu (Kalač, 2005, s. 229).

Byla prokázána přítomnost BA ve vzorcích mléčně kysaného zelí, které bylo zakoupeno v tržní síti. Zde byl zjištěn výskyt putrescinu v koncentraci 100-200 mg/kg, histaminu 42-52 mg/kg, kadaverinu 53-71 mg/kg, spermidinu 3-8 mg/kg a sperminu 1-2 mg/kg (Halász, Baráth a Holzapfel, 1999, s. 435). Na tato fakta navázali ve své studii Halász, Baráth a Holzapfel (1999, s. 437), kteří sledovali produkci u zástupců *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus curvatus*. Zjistili, že u *L. plantarum* dochází při vyšších koncentracích soli v nálevu k potlačení růstu a u *L. curvatus* je obsah BA závislý na koncentraci inokula (CFU/ml). Ve vzorcích zelí byly detekovány BA tyramin a agmatin v koncentracích do 10 mg/l (Halász, Baráth a Holzapfel, 1999, s. 437).

Kim a Kim (2014, s. 406) zkoumali schopnost produkce tyraminu v kimchi u 230 bakteriálních izolátů. Produkci tohoto BA prokázali pouze u 14 izolátů (zástupci *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Leuconostoc mesenteroides* a *Staphylococcus hominis*).

Dále mohou být zdrojem BA fermentované výrobky ze sóji. Byun a Mah (2012, s. 219) zjišťovali přítomnost BA v sojové pastě miso. Přítomnost BA prokázali u všech 22 testovaných vzorků, kdy testované vzorky obsahovaly do 6 mg/kg fenyletylaminu, putrescin do koncentrace 7,5 mg/kg, tyramin do 5,5 mg/kg a histamin do 3 mg/kg.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem praktické části bylo sledovat vliv vybraných faktorů na produkci BA u dekarboxylázapozitivních kmenů.

Dílčím cílem bylo provést primární skrínig produkce BA *in vitro* u vybraných kmenů BMK, které byly izolovány během procesu výroby piva. V rámci prvotního skrínigu bylo úkolem zjistit:

- zda testované kmeny vykazují dekarboxylázovou aktivitu,
- zda jsou citlivé vůči působení izo- α -hořkých látek a etanolu.

Pro naplnění cíle bylo dále uskutečněno sledování kinetiky produkce BA u kmene *Lactobacillus brevis* RIBM 2-20 za podmínek *in vitro*, kdy byl současně sledován vliv vybraných faktorů na růst a dekarboxylázovou aktivitu. Byly testovány následující faktory:

- teplota (10 a 30 °C)
- přídavek etanolu (0-4 % (v/v))
- přídavek směsi izo- α -hořkých kyselin (0-30 mg/l).

Obsah BA ve vzorcích supernatantů získaných po kultivaci kmenů byl stanoven po derivaci dansylchloridem RP-HPLC s UV detekcí.

5 MATERIÁL A METODIKA

5.1 Zařízení, přístroje a pomůcky

Analytické váhy, A&D GH-200 EC, Mettler Toledo, ČR

Autokláv 135 S, H+P VARIOKLAV (H+P Labortechnik AG), Německo

Automatické mikropipety, Biohit a Nichyrio, Finsko

Biologický termostat BT 120, Laboratorní přístroje Praha, ČR

Box laminární BIO IIA, typ Biohazard TELSTAR, ČR

Digitální váha, KB800-2- Kern & Sohn GmbH, Německo

Fotometr TECAN Sunrise TW/TC, USA

Horkovzdušná sušárna, Memmert, Německo

Chladnička, Elektrolux, Švédsko

Laboratorní plasty: špičky automatických pipet, ependorfkové mikrozkuřavky

Laboratorní sklo

Laboratorní třepačka Kavalier LT2, Votice, ČR

Odstředivka EBA 20, Hettich ZENTRIFUGEN, Německo

pH metr EUTECH INSTRUMENTS pH510, Nizozemsko

Vortex Heidolph, Reax top, Německo

5.2 Chemikálie a pomocné látky

1,7-heptandiamin Sigma-Aldrich, USA

Aceton, Sigma-Aldrich, USA

Acetonitril, Sigma-Aldrich, USA

Aminokyseliny, histin, ornitin, arginin, lyzin, tyrozin, fenylamin; Sigma-Aldrich, USA

Dansylchlorid Merck, Německo

Dusík v tlakové nádobě, Linde, ČR

Heptan, Sigma-Aldrich, USA

Hydrogenuhlíčan sodný a uhličitán sodný bezvodý, Merck, Německo

Chlorid sodný NaCl, LachNer, ČR

Kyselina chloristá, Merck, Německo

Kyselina chlorovodíková, Merck, Německo

L-Prolin, Merck, Německo

5.3 Testované mikroorganismy

Při prvotním skrínungu bylo použito celkem 23 kmenů BMK (18 kmenů *Lb. brevis* a 5 kmenů *Lb. plantarum*). Jednalo se o izoláty z procesu výroby piva, které byly poskytnuty Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským v Praze (Research Institute of Brewing and Malting, RIBM).

Pro následné sledování kinetiky produkce BA a vlivu změněných kultivačních podmínek na vyprodukovaná množství BA *in vitro* byl použit k bližšímu zkoumání kmen *Lactobacillus brevis* RIBM 2-20.

5.4 Dekarboxylační média

Pro kultivaci bakterií v rámci prvotního skrínungu byl použit MRS broth (MRS; HiMedia) ve dvou variantách. První varianta představovala médium s přidavkem 0,3 % (w/v) aminokyselin (histidin, arginin, ornitin, lyzin, tyrozin), které sloužily jako prekurzory vzniku BA. Tento bujón také sloužil pro předkultivaci (pomnožení kultury před inokulací).

Druhá varianta připraveného média byla s přidavkem 0,3 (w/v) aminokyselin, 4 % (v/v) etanolu a 20 mg/l α -hořkých kyselin. Tyto koncentrace odpovídaly výčepnímu pivu. Obsah etanolu ve výčepních pivech se běžně totiž pohybuje okolo 4 % (v/v) a α -hořké kyseliny bývají přítomny v koncentraci 20-25 mg/l (Basařová et al., 2010, s. 561-562).

U obou variant médií bylo pH upraveno na $4,8 \pm 0,2$.

Následné sledování kinetiky produkce BA bylo ovlivněno následujícími testovnými faktory: etanol v koncentraci 0; 2; 3; 4 % (v/v) a izo- α -hořké kyseliny (izoextrakt chmelových látek, YC iso; Yakimachief, USA) o koncentracích 0; 5; 10; 20; 30 mg/l. Vliv faktorů na produkci BA byl sledován samostatně a ve vzájemných kombinacích. Do média pro sledování kinetiky produkce BA byl přidán pouze tyrozin, opět v koncentraci 0,3 % (v/v).

Pro uchování bakterií a pro stanovení celkového počtu mikroorganismů byl použit MRS agar (pH 4,8±0,2). Po smísení a dokonalém rozmíchání s deionizovanou vodou byla připravená média vždy autoklávována při 121°C po dobu 15 minut.

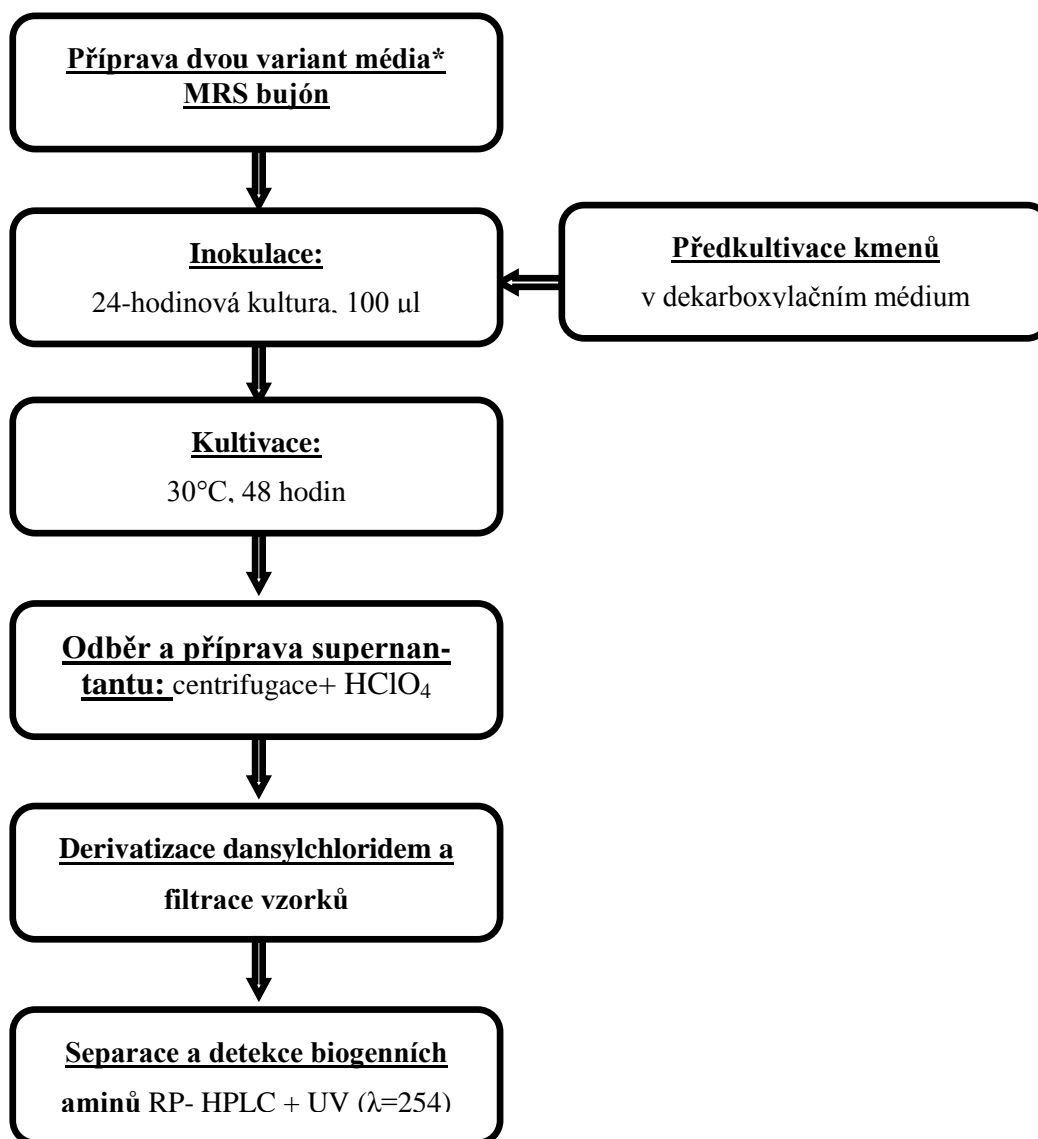
Použitá média:

<u>MRS bujón (pH 4,8±0,2)</u>	MRS broth (MRS; HiMedia)	52,2 g
	Deionizovaná voda (Aqua osmotic)	1000,0 ml
<u>MRS agar (pH 4,8±0,2)</u>	MRS broth (MRS; HiMedia)	52,2 g
	Agar agar	15,0 g
	Deionizovaná voda (Aqua osmotic)	1000,0 ml

5.5 Skríníng produkce biogenních aminů vybranými kmeny laktobacilů

Během skríníngu byla nejprve zmapována produkce BA u 23 vybraných kmenů laktobacilů v médiu MRS s přísávkou aminokyselin. V druhé části skríníngu byly kmeny předkultivovány v médiu s faktory (etanol, pH, hořké látky) a zjištěna citlivost vůči etanolu a izo- α -hořkým látkám (Obr. 7).

Čistota kmenů byla ověřena křížovým rozděrem a mikroskopicky (Gramovo barvení a mikroskopování fixovaných preparátů).



Obr. 7: Metodika skrínungu dekarboxylázové aktivity in vitro. * Varianta I: MRS bujón s 0,3 % (w/v) aminokyselin, Varianta II: MRS bujón s 0,3 % (w/v) aminokyselin, 4,0 % (v/v) etanolu a 20 mg/l směs izo- α -hořkých látek.

5.5.1 Příprava dekarboxylačních médií a podmínky kultivace

Bylo připraveno médium MRS broth. Před sterilizací bylo upraveno pH bujónu na $4,8 \pm 0,2$ přidávkem HCl (6 mol/l) a do zkumavek bylo odpipetováno 7 ml. Poté proběhla sterilizace v autoklávu. Následně byla u 2. varianty upravena koncentrace etanolu a směsi izo- α -hořkých kyselin. Připravená živná média byla očkována 100 µl bakteriální suspenze. Každý izolát byl inokulován v pěti opakováních. Nezaočkovaná živná média sloužila jako

kontrola (pro odečtení již v médiu obsažených BA). Inokulovaná média byla kultivována při 30 °C po dobu 48 hodin. Následně byl uskutečněn odběr vzorků a analýza.

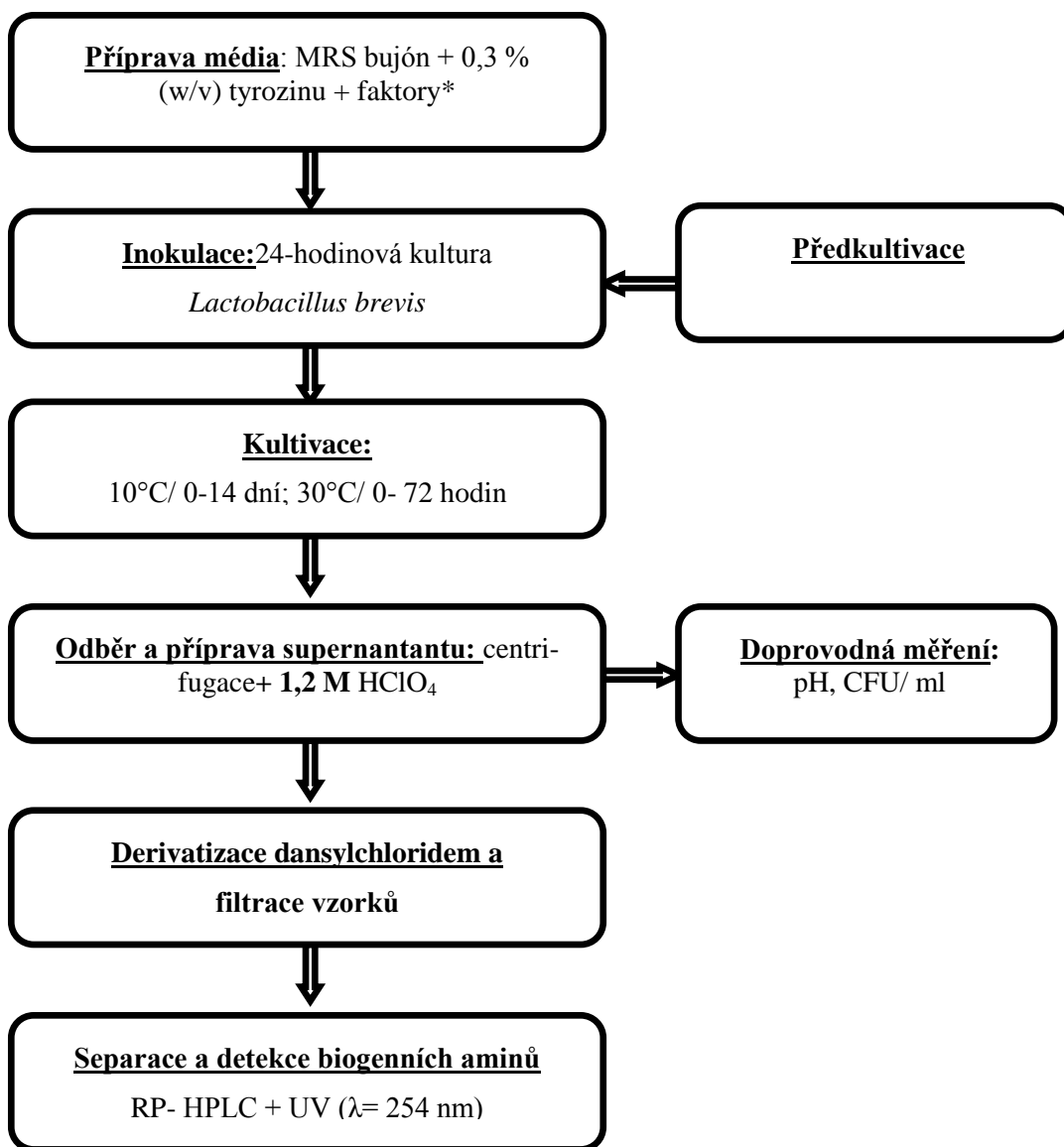
5.5.2 Odběr vzorků

Odběr vzorků byl proveden po 48 hodinách při 30 °C. Následovala centrifugace v odstředivce (3 421x g; 22±1 °C; 20 minut; EBA 20, Hettich). Ze supernatantu bylo odebráno 750 µl. Toto množství bylo 1:1 zředěno 1,2M roztokem kyseliny chloristé.

Odebrané vzorky byly skladovány při -18°C a následně podrobeny derivatizaci a vlastnímu stanovení BA.

5.6 Sledování kinetiky produkce biogenních aminů vybraným kmenem *Lactobacillus brevis* RIBM 2-20

Na základě prvotního skríníngu byl pro sledování kinetiky produkce BA zvolen kmen *Lb. brevis* RIBM 2-20 (Obr. 8).



Obr. 8: Metodika sledování kinetiky produkce biogenních aminů kmenem *Lb. brevis* RIBM 2-20 ovlivněné testovaným rozsahem faktorů; * přidavek etanolu, hořkých látek a úprava pH

5.6.1 Příprava inokula

Zvolený kmen *Lactobacillus brevis* RIBM 2-20 byl nejprve několikrát překultivován v bujónu MRS o stejném složení, jako mělo pokusné médium. Takto připravený, adaptovaný kmen byl použit pro inokulaci. Dekarboxylační média byla inokulována 100 μ l 24-hodinové bakteriální suspenze.

5.6.2 Příprava dekarboxylačních médií

Produkce BA byla sledována v závislosti na teplotě (10 ± 1 °C; 30 ± 1 °C), koncentraci etanolu v médiu (0; 2; 3; 4 % (v/v)) a přítomnosti izo- α -hořkých kyselin (0; 5; 10; 20; 30 mg/l). Celkem bylo připraveno 20 kombinací testovaných faktorů, které byly kultivovány při dvou výše uvedených teplotách.

Před sterilizací bylo upraveno pH na $5,2\pm 0,2$ (odpovídající pH mladiny) a do jednotlivých zkumavek bylo nadávkováno 7 ml média. Takto připravená živná média byla podrobena sterilizaci v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Do každé zkumavky bylo po vychladnutí média pipetováno dané množství etanolu a izo- α -hořkých kyselin. Roztok izo- α -hořkých kyselin byl před samotnou aplikací přefiltrován přes filtr s porozitou 0,22 μ m. Pro každou variantu a odběrový čas byly připraveny celkem tři opakování a jedna kontrola.

5.6.3 Odběr vzorků

Odběr vzorků byl proveden vždy ve stanoveném čase. Při teplotě 10 ± 1 °C bylo provedeno celkem 6 odběrů: v čase 0 (po zaočkování), 1., 2., 7., 9., 12. a 15. den kultivace. Při kultivační teplotě 30 ± 1 °C byl proveden počáteční odběr v čase 0 a následně byly prováděny odběry po 4, 8, 12, 24, 48 a 72 hodinách kultivace.

Odběr a příprava vzorků pro derivatizaci probíhala stejně jako při prvotním skríningu, viz kapitola 6.1.3.

5.6.4 Stanovení celkového počtu mikroorganismů

V čase odběru byl zjišťován celkový počet mikroorganismů resp. počet kolonií tvořících jednotek na jeden ml (CFU/ml). Suspenze kmene *Lb. brevis* RIBM 2-20 byla v čase odběru naředěna a v objemu 0,1 ml vyočkována na MRS agar. Byla provedena kultivace po dobu 24 hodin při teplotě 30°C. Následně byl zjištěn počet kolonií a vypočten celkový počet mikroorganismů (CFU/ml).

5.6.5 Měření pH kultivačního média

Měření pH bylo prováděno po odběru u každé zkumavky pomocí pH-metru s kombinovanou skleněnou elektrodou. Před každým měřením byl pH metr kalibrován a u každé zkumavky (varianty kombinace faktorů) bylo provedeno měření celkem třikrát.

5.7 Stanovení obsahu biogenních aminů

Produkce vybraných BA (kadaverin, CAD; histamin, HIS; putrescin, PUT; tyramin, TYR; spermidin, SPD; spermin, SPN) byla sledována po předkolonové derivatizaci dansylchloridem podle Dadákové, Křížka a Pelikánové (2009, s. 366-367), s následnou separací a detekcí BA na reverzních fázích vysokoúčinné kapalinové chromatografie (RP-HPLC) s UV detekcí ($\lambda = 254$ nm).

Z každého vzorku v ependorfkové mikrozkuhavce byl odpipetován 1 ml do derivatizačních vialek. Ke vzorku bylo přidáno 100 μ l vnitřního standardu (1,7-heptandiamin), 1,5 ml karbonátového pufru s pH 11,1-11,2 a 2 ml připraveného dansylchloridu o koncentraci 5 g/l v acetonu. Poté následovalo 20-ti hodinové třepání v temnu. Po uplynutí doby bylo do derivatizačních nádob napipetováno 200 μ l prolinu a vzorky byly třepány. Po hodině byly ke směsi přidány 3 ml heptanu a vzorky byly 3 minuty intenzivně ručně protřepávány. Po třepání byl odebrán 1 ml z vrchní heptanové vrstvy, obsahující deriváty BA, do 1,5 ml vialek. Heptan byl odpařen při 60°C pod inertním plynem (dusíkem). Odparek byl rozpuštěn v 1,5 ml acetonitrilu. Derivatizované vzorky byly před vlastním stanovením filtrovány (porozita filtru 0,22 μ m) a následně nanášeny na kolonu, kde proběhla separace BA (Agilent Zorbax Eclipse C18 s parametry 50 x 3,0 mm, 1,8 μ m, Agilent Technologies; chromatografický systém s binární pumpou, odplyňovačem, UV/VIS-DAD detektorem, termostatem kolon, Agilent Technologies; autosamplerm LabAlliance SHLA84000).

6 VÝSLEDKY

6.1 Skríníng produkce biogenních aminů vybranými kmeny laktobacilů

V obou variantách médií byl během skríníngu detekován zejména tyramin. U některých kmenů *Lb. brevis* (např. *Lb. brevis* RIBM 2-34 a *Lb. brevis* RIBM 2-36) byl detekován i spermin v zanedbatelném a kolísavém množství (do 8,0 mg/l), a proto nebude jeho přítomnost dále v textu diplomové práce rozebírána.

Tab. 4: Výsledky stanovení tyraminu v MRS bujónu a MRS s faktory

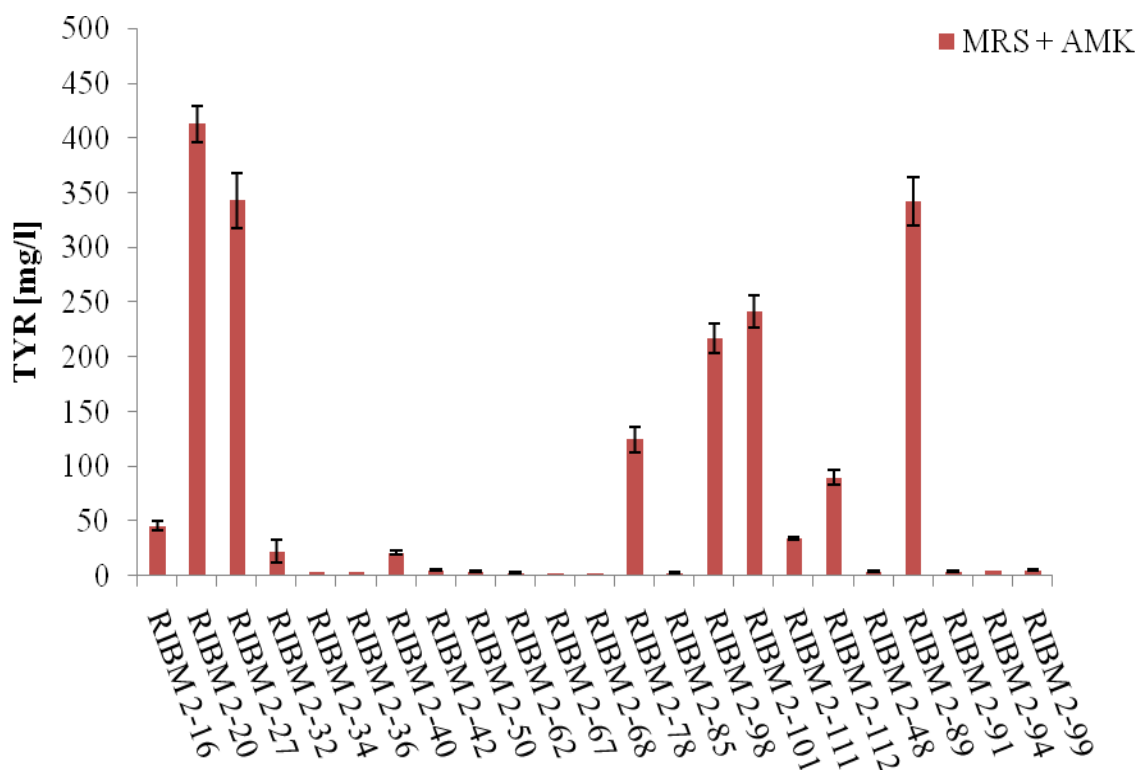
Mikroorganismus	N	MRS bujón	MRS s faktory
		TYR */**/***/****	TYR
<i>Lactobacillus brevis</i>	18	8/5/5/0	15/2/1/0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	5	3/0/1/0	5/0/0/0

*2-10 mg/l; ** 10-100 mg/l; *** 100-1000 mg/l; **** 1000 a více mg/l; N...celkový počet testovaných kmenů

Kmeny *Lactobacillus brevis* (RIBM 2-16; 2-20; 2-27; 2-32; 2-34; 2-36; 2-40; 2-42; 2-50; 2-62; 2-67; 2-68; 2-78; 2-85; 2-98; 2-101; 2-111; 2-112) a *Lactobacillus plantarum* (RIBM 2-48; 2-89; 2-91; 2-94; 2-99) disponovaly dekarboxylázovou aktivitou a produkovaly BA. Na Obr. 9 a v Tab. 5 lze vidět, že jednotlivé kmeny produkovaly tyramin v různé koncentraci. Vyšší produkce byla obecně zaznamenána ve faktory neupraveném bujónu MRS (Obr. 9). Z celkem 18 kmenů *Lb. brevis* produkovalo v tomto médiu 10 kmenů tyramin v koncentraci nad 10,0 mg/l, zbývajících 8 kmenů produkovalo 2,0-10,0 mg/l tyraminu. Nejvyšší produkce byla zaznamenána u *Lb. brevis* RIBM 2-20 ($412,6 \pm 16,1$ mg/l). V rámci testovaných kmenů *Lb. plantarum* produkoval tyramin v koncentraci nad 10,0 mg/l pouze kmen *Lb. plantarum* RIBM 2-89 ($342,1 \pm 22,3$ mg/l), ostatní izoláty produkovaly 2,0-10,0 mg/l tyraminu.

Vliv sledovaných faktorů (přídavek etanolu a hořkých látek) v rámci skríníngu ve variantě média II byl výrazný (Tab. 5). Vlivem etanolu a hořkých látek došlo k výraznému potlačení dekarboxylázové aktivity u většiny kmenů. U *Lb. brevis* produkovaly tyramin pouze dva kmeny tyramin v koncentraci nad 10,0 mg/l (*Lb. brevis* RIBM 2-27, $10,3 \pm 0,9$ mg/l; *Lb. brevis* RIBM 2-32, $11,7 \pm 0,8$) a jediný kmen *Lb. brevis* RIBM 2-20 produkoval tyramin v koncentraci nad 100 mg/l ($408,7 \pm 23,8$ mg/l). Zbýlých 15 izolátů produkovalo

tyramin v množství do 10,0 mg/l. Všechny izoláty *Lb. plantarum* v prostředí modifikovaného média MRS vyprodukovaly tyramin v množství 2,0-10,0 mg/l.



Obr. 9: Produkce tyraminu (TYR) při 30 °C v MRS s přidavkem 0,3 % (w/v) aminokyselin (AMK) vybranými kmeny *Lb. plantarum* (RIBM 2-48; 2-89; 2-91; 2-94; 2-99) a *Lb. brevis* (ostatní kmeny).

Tab. 5: Výsledky stanovení obsahu tyraminu (TYR) vyprodukovaného vybranými kmeny *Lb. brevis* a *Lb. plantarum* v médiu MRS s faktory

Mikroorganismus	TYR [mg/l]
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-16	4,3±0,3
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-20	508,7±23,8
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-27	10,3±0,9
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-32	11,7±0,5
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-34	3,7±0,1
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-36	4,0±0,2
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-40	5,9±0,5
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-42	3,5±0,2
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-50	2,6±0,2
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-62	2,4±0,1
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-67	2,6±0,2
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-68	3,5±0,2
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-78	6,5±0,4
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-85	2,3±0,1
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-98	4,0±0,1
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-101	7,7±0,5
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-111	2,1±0,1
<i>Lactobacillus brevis</i> RIBM 2-112	33,0±2,5
<i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-48	4,2±0,2
<i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-89	3,4±0,1
<i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-91	4,0±0,2
<i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-94	2,1±0,1
<i>Lactobacillus plantarum</i> RIBM 2-99	2,5±0,1

6.2 Kinetika produkce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus brevis* RIBM 2-20

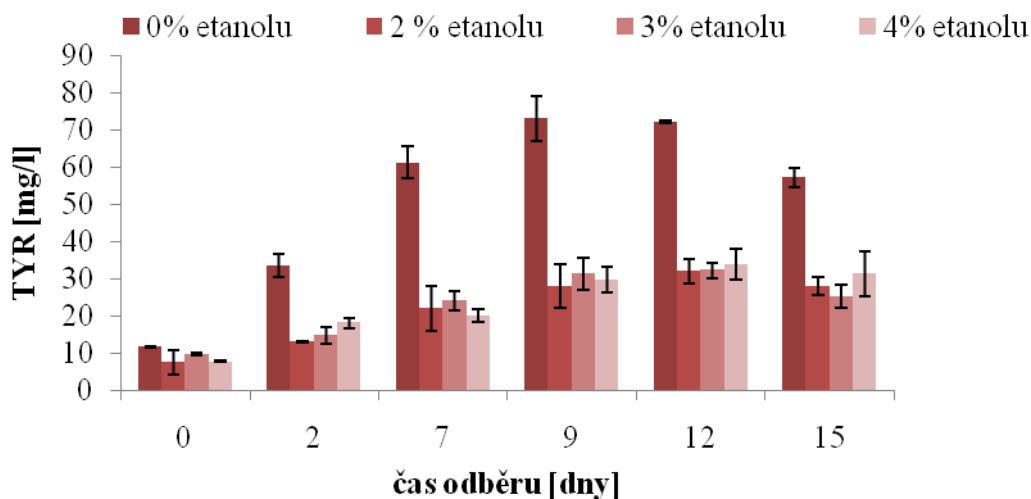
Na základě prvotního skrínungu byl pro další část experimentu vybrán kmen *Lactobacillus brevis* RIBM 2-20, který je schopen produkce významných množství tyraminu. Při sledování vlivu různých kombinací faktorů na produkci tyraminu byl obsah po 72 h kultivace při 30 ± 1 °C až 1800 mg/l (nejvyšší obsah při 0 % (v/v) etanolu a 10 mg/l hořkých látek) a po 15-ti denní kultivaci při 10 ± 1 °C až 58 mg/l (nejvyšší koncentrace při 0 % (v/v) etanolu a 0 mg/l hořkých látek).

Významný vliv na produkci tyraminu mělo pH a samotný růst kmene *Lb. brevis* RIBM 2-20. Pro sledování kinetiky produkce tyraminu byla zvolena úprava pH kultivačního média na $5,2 \pm 0,2$ proto, aby byla maximálně podpořena činnost tyrozindekarboxylázy. Během kultivace při 10 °C došlo ve většině dekarboxylačních médií (kombinací faktorů) k mírnému poklesu pH (Příloha P III, Obr. 2-3). Během prvních dvou dnů kultivace byla hodnota pH kultivačního prostředí podobná. Při koncentraci 30 mg/l hořkých látek nebyl pokles pH tak výrazný jako u ostatních kombinací. Zvýšení pH ke konci kultivace mohlo být způsobeno kumulací tyraminu. Při 30 °C docházelo během celé doby kultivace ke snižování pH (Příloha P III, Obr. 1-2). Vyšší teplota podporovala růst a fermentační aktivitu *Lb. brevis* RIBM 2-20 (Příloha P I).

Z Obr. 1-3 (Příloha P II) je patrné, že obsah etanolu 0-4 % (v/v) nemá výrazný vliv na růst *Lb. brevis* RIBM 2-20. Přídavek 20 a 30 mg/l hořkých látek prodloužil dobu nutnou pro adaptaci vůči prostředí u testovaného kmene *Lb. brevis* RIBM 2-20 a způsobil výrazné zpomalení růstu během exponenciální fáze (viz trend růstových křivek). Při koncentraci 30 mg/l a 0-4 % (v/v) etanolu došlo k výraznému zpomalení růstu ve srovnání s ostatními kombinacemi faktorů. Při teplotě 30 °C byla doba nutná k adaptaci kmene zkrácena na minimum s výrazným nástupem exponenciální fáze (Příloha P I, Obr. 1-6). Růst kmene *Lb. brevis* RIBM 2-20 byl částečně inhibován při koncentraci 20 a 30 mg/l hořkých látek (Příloha P I, Obr. 5-6). Teplota 30 °C byla optimální pro *Lb. brevis* RIBM 2-20 a přídavky nízkých koncentrací etanolu a hořkých látek působily podpůrně na tvorbu tyraminu. Z tohoto důvodu bylo možné pozorovat u koncentrací 0-10 mg/l hořkých látek obdobné růstové křivky (Příloha P I).

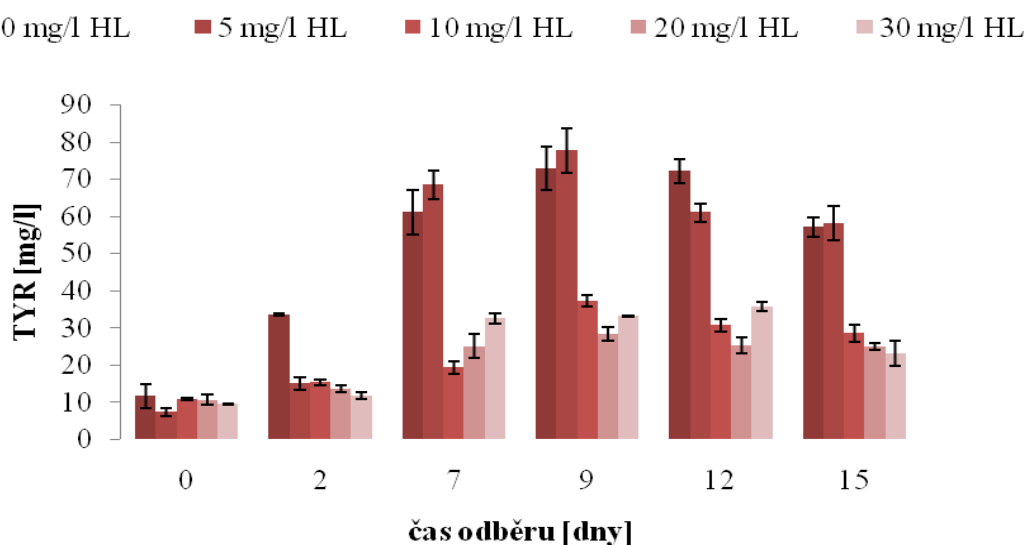
Koncentrace tyraminu v MRS bujónu bez úprav (pouze s přídavkem tyrozinu) při 10 °C rostla (Obr. 10) a tento trend byl pozorován až do 9. dne kultivace ($73,0 \pm 5,9$ mg/l).

Od tohoto dne došlo k poklesu obsahu tyraminu v testovaném médiu. Ze sledování vlivu etanolu na produkci tyraminu při kultivační teplotě 10 ± 1 °C (Obr. 10) bylo patrné, že všechny použité koncentrace etanolu v porovnání s médiem bez přídavku etanolu potlačovaly tvorbu tyraminu *Lb. brevis* RIBM 2-20.



Obr. 10: Produkce tyraminu (TYR) kmenem *Lb. brevis* RIBM 2-20 během kultivace 10 °C v médiu MRS s 0-4 % (v/v) etanolu.

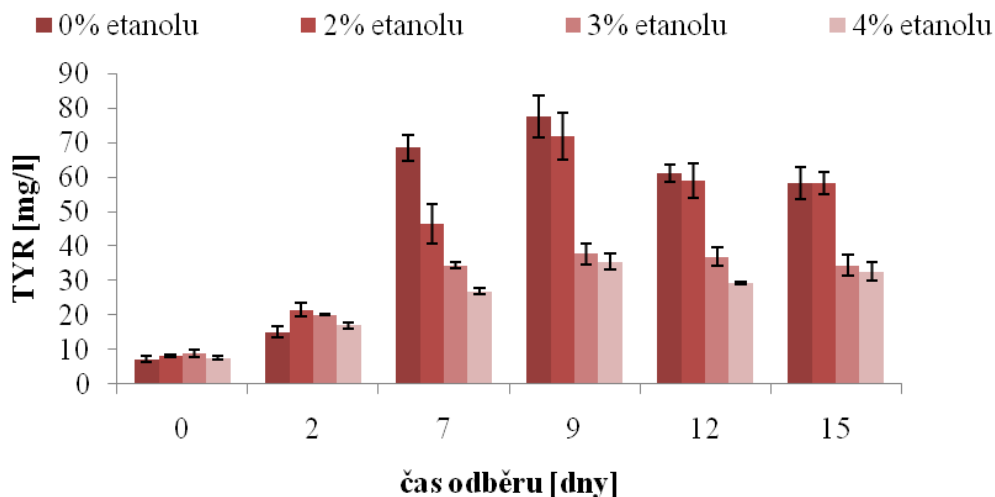
Po 15-ti denní kultivaci při 10 °C dosahoval při různých koncentracích etanolu (Obr. 10) v růstovém prostředí testovaného kmene obsah tyraminu odlišných hodnot: 2 % (v/v) etanolu $28,1 \pm 2,7$ mg/l; 3 % (v/v) etanolu $25,3 \pm 2,1$ mg/l; 4 % (v/v) etanolu $<31,3 \pm 2,1$ mg/l. Konečný obsah tyraminu po 15 dnech kultivace byl nižší než koncentrace, které dosáhl 9. případně 12. den kultivace. Rozdíl v kumulaci tyraminu mezi médii s jednotlivými koncentracemi etanolu nebyl výrazný.



Obr. 11: Produkce tyraminu (TYR) kmenem *Lb. brevis* RIBM 2-20 během kultivace 10 °C v médiu s MRS a 0-30 mg/l hořkých látek (HL).

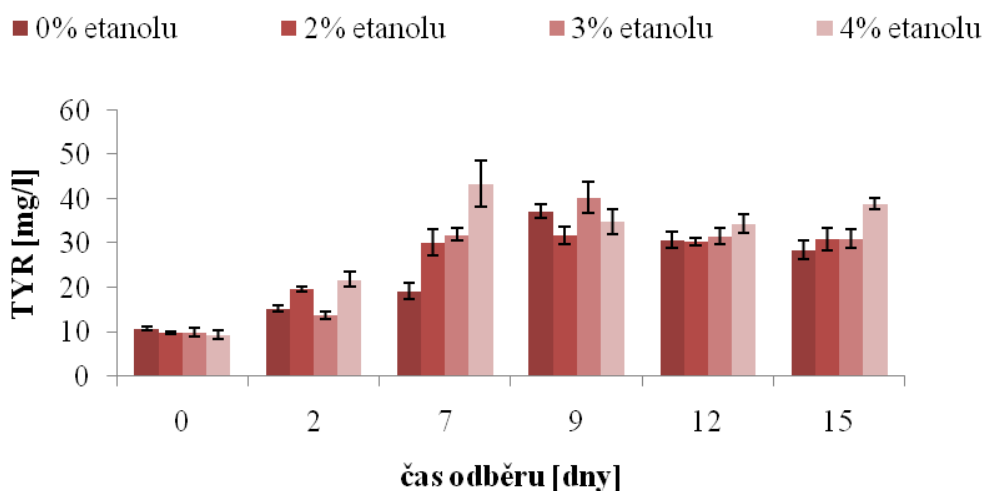
Dalším sledovaným faktorem byl vliv hořkých látek na produkci tyraminu (Obr. 11). Výraznější produkce v porovnání s MRS s přidavkem etanolu byla zaznamenána při přidavku 5 mg/l, kdy po 15 dnech kultivace koncentrace tyraminu dosahovala $58,2 \pm 4,7$ mg/l. Z grafu (Obr. 11) bylo patrné, že při vyšších koncentracích hořkých látek (10-30 mg/l) docházelo ke snížení produkce tyraminu.

Při kultivaci v médiu s přidavkem 5 mg/l hořkých látek v kombinaci s různými koncentracemi etanolu (Obr. 12) dosahovala produkce tyraminu po 15 dnech kultivace následujících hodnot: 0 % (v/v) etanolu $58,2 \pm 4,7$ mg/l; 2 % (v/v) etanolu $28,2 \pm 2,3$ mg/l; 3 % (v/v) etanolu $34,4 \pm 3,1$ mg/l; 4 % (v/v) etanolu $32,6 \pm 2,7$ mg/l. Nejvyšší produkce byla opět zaznamenána po 9. dni kultivace. Při 0 % a 2 % (v/v) etanolu byla produkce v průběhu kultivace tyraminu obdobná (do 78 mg/l) a při koncentracích 3 % a 4 % (v/v) etanolu byla produkce výrazně nižší (do 38 mg/l).



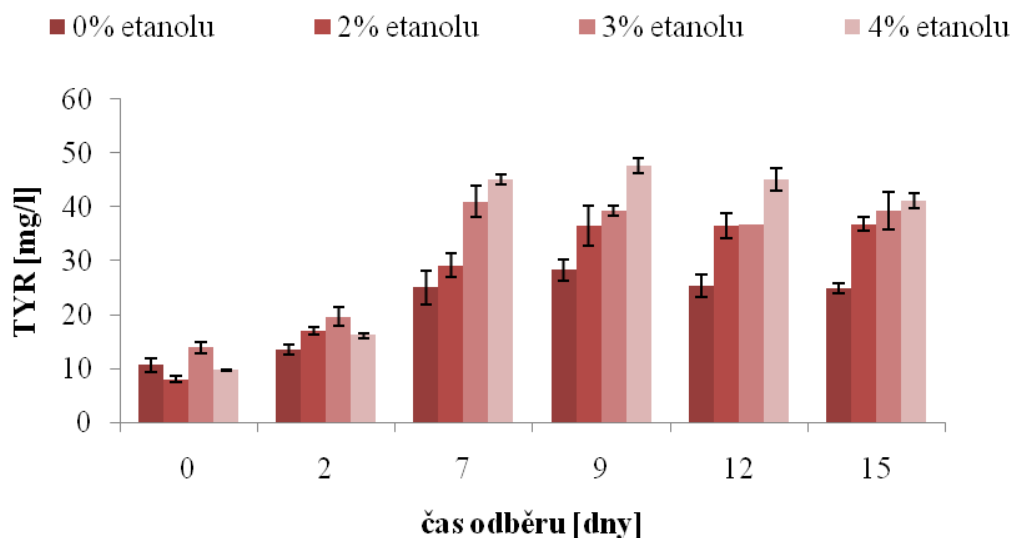
Obr. 12: Produkce tyraminu (TYR) kmenem *Lb. brevis* RIBM 2-20 při kultivační teplotě 10 °C v médiu MRS s 0-4 % (v/v) etanolu a 5 mg/l hořkých látek.

Po kultivaci při teplotě 10 °C, přidavku 10 mg/l hořkých látek a 0-4 % (v/v) etanolu (Obr. 13) byl obsah tyraminu v rozmezí 28-39 mg/l. U všech koncentrací etanolu s hořkými látkami měla produkce tyraminu rostoucí charakter.



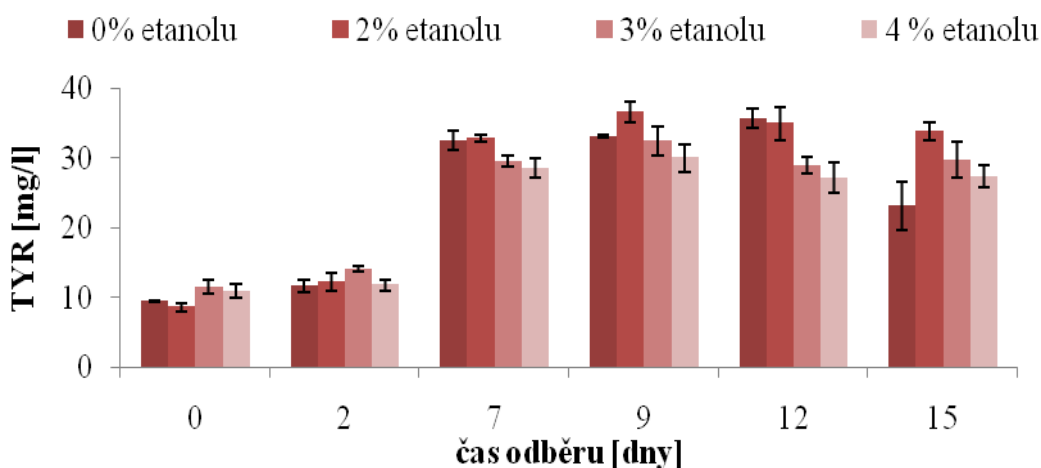
Obr. 13: Produkce tyraminu (TYR) kmenem *Lb. brevis* RIBM 2-20 při 10 °C; v médiu MRS s 0-4 % (v/v) etanolu a 10 mg/l hořkých látek.

Při kombinaci 20 mg/l hořkých látek s 0-4 % (v/v) etanolu (Obr. 14) v růstovém prostředí byla produkce tyraminu po 15-ti denní kultivaci v rozmezí 24-40 mg/l. Výrazná produkce tyraminu byla zaznamenána od 7. dne kultivace. Po dosažení maxima zůstával tyramin v přibližně stejné koncentraci až do posledního odběru.



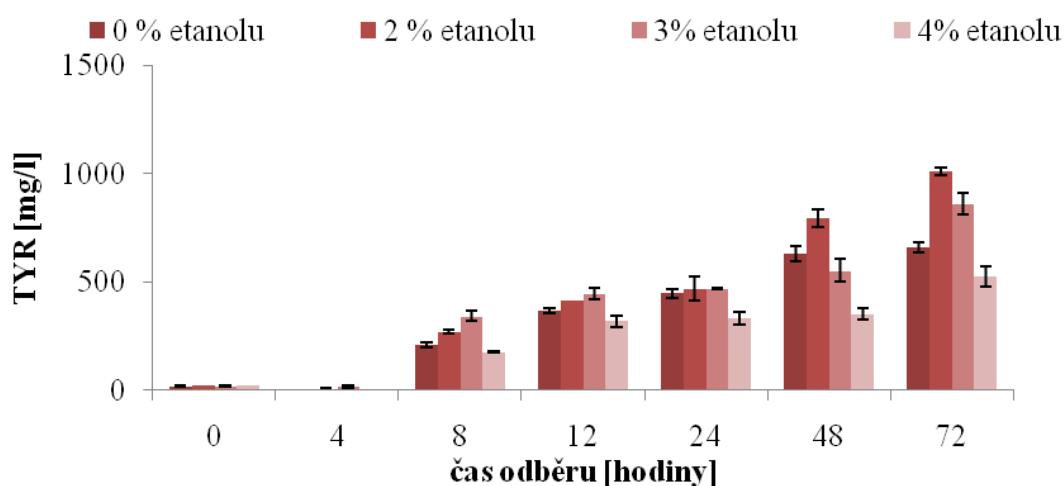
Obr. 14: Produkce tyraminu (TYR) kmenem *Lb. brevis* RIBM 2-20 v MRS s přidavky 20 mg/l hořkých látek (HL) a 0-4 % (v/v) etanolu při 10 °C.

Po 15-ti dnech kultivace v médiu, které obsahovalo 30 mg/l hořkých látek a 0-4 % (v/v) etanolu (Obr. 15), dosahoval obsah tyraminu v supernatantech po kultivaci *Lb. brevis* RIBM 2-20 následujících hodnot: u 0 % (v/v) etanolu 23,1±1,5 mg/l; 2 % (v/v) etanolu 33,9±1,4 mg/l; 3 % (v/v) etanolu 29,8±2,5 mg/l; 4 % (v/v) etanolu 27,4±1,6 mg/l. Během kultivace *Lb. brevis* RIBM 2-20 v médiu s přidavky 30 mg/l hořkých látek a 0-4 % (v/v) etanolu při 10 °C mohl být pozorován postupný nárůst obsahu tyraminu za všech testovaných kombinací.



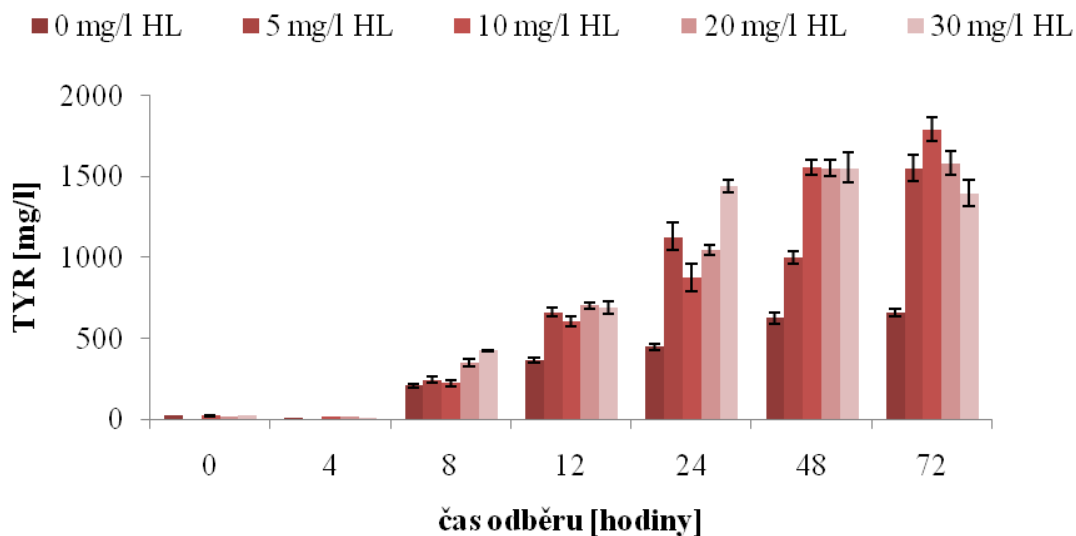
Obr. 15: Produkce tyraminu (TYR) kmenem *Lb. brevis* při 10 °C v MRS s přidavky 30 mg/l hořkých látek a 0-3 % (v/v) etanolu.

Při 30 °C dosahovala produkce tyraminu vysokých hodnot již po 8 hodinách kultivace u všech kombinací faktorů (> 168 mg/l média). Produkce tyraminu v médiu MRS bez přídavku faktorů (Obr. 16) měla rostoucí charakter po celou dobu kultivace narozdíl od vzorků kultivovaných při 10±1 °C. Již po 8 hodinách kultivace došlo k výrazné produkci tyraminu (210,3±10,9 mg/l) a po 72 hodinách dosahoval tyramin koncentrace 658,5±22,9 mg/l.



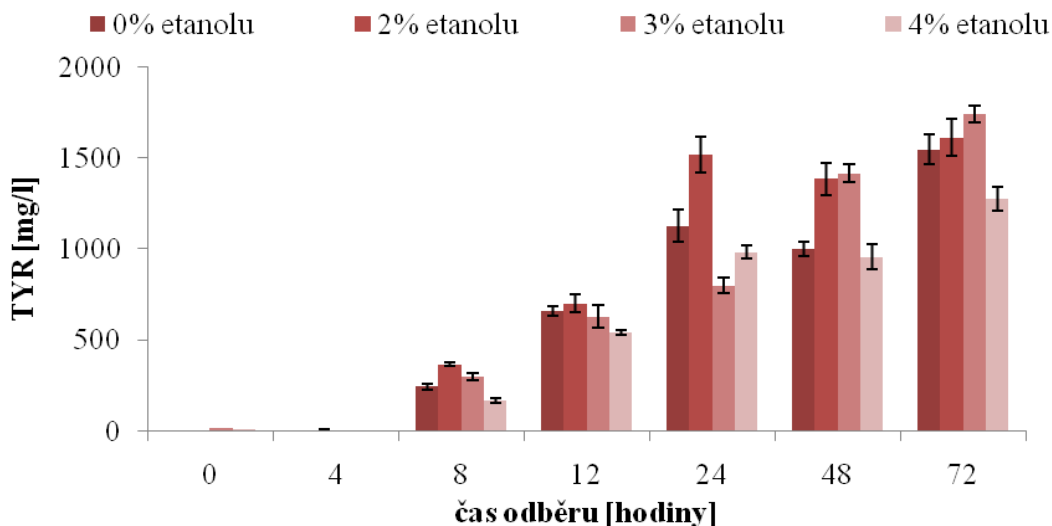
Obr. 16: Produkce tyraminu (TYR) kmenem *Lb. brevis* RIBM 2-20 během kultivace 30 °C v médiu MRS s 0-4 % (v/v) etanolu.

Po 72 hodinách kultivace za přídavku různých koncentrací etanolu (Obr. 16) dosahovala koncentrace tyraminu výrazně vyšších hodnot než při kultivační teplotě 10 °C. Detekované koncentrace tyraminu byly v rozmezí 520-1010 mg/l a nejvyšší obsah tyraminu byl zaznamenán v médiu MRS s přídavkem 2 % (v/v) etanolu (1010,4±16,8 mg/l).



Obr. 17: Produkce tyraminu (TYR) kmenem *Lb. brevis* RIBM 2-20 během kultivace 30 °C v médiu s MRS a 0-30 mg/l hořkých látek (HL).

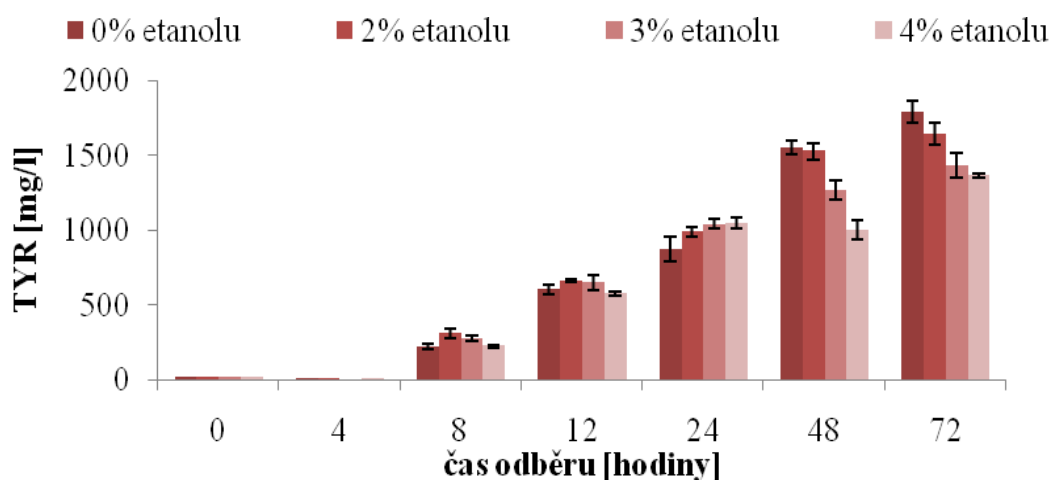
Vliv přidavku hořkých látek při 30 °C je patrný na Obr. 17. Přídavek hořkých látek způsobil zvýšení produkce tyraminu kmenem *Lb. brevis* RIBM 2-20 ve srovnání s živným médiem bez jejich přidavku. U médií s vyšší koncentrací hořkých látek (20 a 30 mg/l) došlo po 72 hodinách kultivace k poklesu produkce tyraminu.



Obr. 18: Produkce tyraminu kmenem *Lb. brevis* při 30 °C v MRS s přidavky 5 mg/l hořkých látek a 0-4 % (v/v) etanolu.

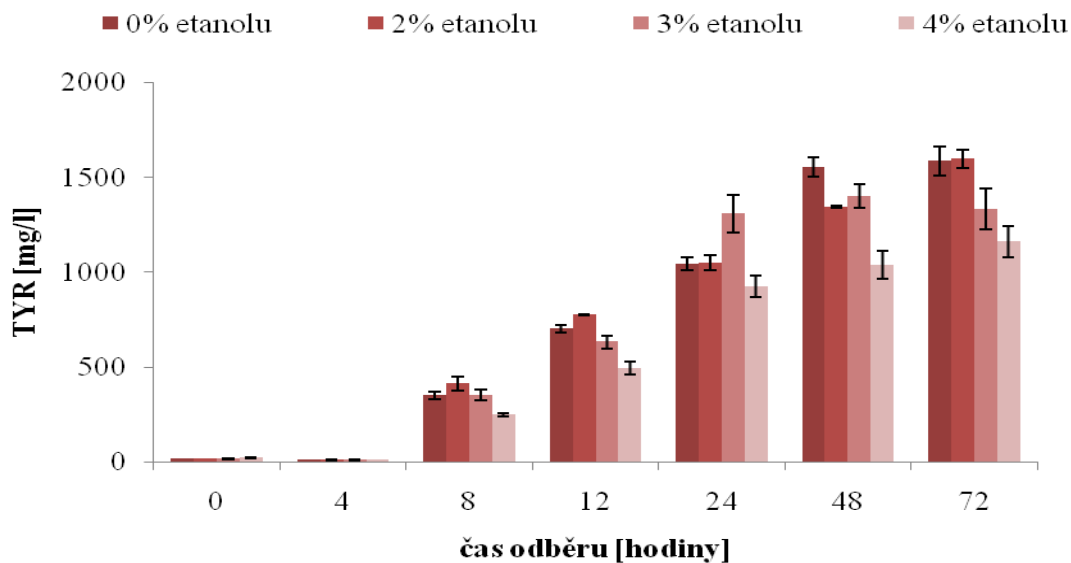
Jak je vidět z Obr. 18, produkce tyraminu nebyla výrazněji potlačena při 5 mg/l hořkých látek v prostředí žádnou testovanou koncentrací etanolu. V médiu s 4% (v/v) přídávkem etanolu však mohlo být pozorováno inhibiční působení.

Koncentrace 10 mg/l hořkých látek v kombinaci s etanolem (Obr. 19) vykazovala významný vliv na produkci tyraminu tetovaným kmenem. S rostoucím přídávkem etanolu klesala koncentrace vytvořeného tyraminu (0 % (v/v) etanolu 1792,4±70,0 mg/l; 4 % (v/v) etanolu 1366,6±15,0 mg/l).



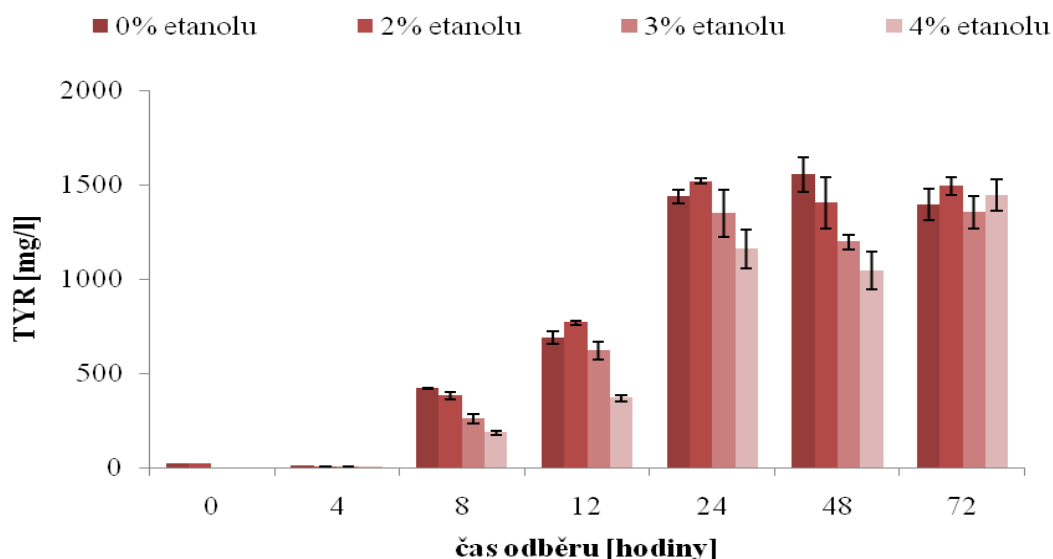
Obr. 19: Porovnání produkce tyraminu (TYR) kmenem *Lb. brevis* při 30 °C v MRS s přídávky 10 mg/l hořkých látek a 0-4 % (v/v) etanolu.

Při přídávku 20 mg/l hořkých látek a etanolu do růstového prostředí *Lb. brevis* RIBM 2-20, obdobně jako v předchozí kombinaci faktorů, docházelo během kultivace ke kumulaci tyraminu (Obr. 20). Po 72 hodinách byly hodnoty tyraminu následující: 0 % (v/v) etanolu 1584,5±75,8 mg/l; 2 % (v/v) etanolu 1597,2±48,7 mg/l; 3 % (v/v) etanolu 1332,5±108,8 mg/l, 4 % (v/v) etanolu 1160,4±84,4 mg/l. Při koncentracích 3 % a 4 % (v/v) etanolu došlo k mírnému snížení obsahu tyraminu, klesala tedy aktivita tyrozindekarboxylázy. Od 8. hodiny kultivace docházelo ve všech kombinacích k produkci tyraminu nad 250 mg/l (Obr. 20).



Obr. 20: Produkce tyraminu kmenem *Lb. brevis* při 30 °C v MRS s přidavky 20 mg/l hořkých látek a 0-4 % (v/v) etanolu

Poslední sledovanou kombinací faktorů v rámci kultivace při 30 °C, byla kombinace přidavku 30 mg/l hořkých látek a 0-4 % (v/v) etanolu (Obr. 21). Ve všech médiích obsah tyraminu po 72 hodinách kultivace kmene *Lb. brevis* RIBM 2-20 >1300 mg/l. Jednalo se o zajímavou skutečnost, kdy mohla být pozorována vysoká odolnost kmene vůči působení vyšší koncentrace hořkých látek s různou koncentrací etanolu (0-4 % (v/v)).



Obr. 21: Produkce tyraminu (TYR) kmenem *Lb. brevis* při 30 °C v MRS s přidavky 30 mg/l hořkých látek a 0-4 % (v/v) etanolu

7 DISKUZE

Monitoring výskytu BA není v současné době v alkoholických nápojích legislativně nařízen. Koncentrace BA v pívu a víně jsou zanedbatelné v porovnání se sýry (do 50 mg/l). I tato množství mohou způsobovat zdravotní komplikace, protože dochází k interferenci mezi etanolem a detoxikačním systémem, který zajišťuje odbourávání BA (Kohajdová a Karovičová, 2008, s. 30-31). Nejčastěji zastoupeným BA v pívu jsou tyramin a histamin (Loret, Deloyer a Dandrifosse, 2005, s. 520).

Nízké koncentrace BA mohou způsobovat u citlivých jedinců zdravotní komplikace, proto většina autorů ve svých studiích navrhuje limit pro histamin v alkoholických nápojích do 2 mg/l a pro součet dalších BA bez histaminu (hlavně tyraminu a fenyletylaminu) do 100 mg/l (Silla Santos, 1996, s. 251).

Obsah BA v pivech je problematika, která je intenzivně zkoumána mnoho let. Existuje mnoho českých (např. Kalač a Křížek, 2003; Buňka et al., 2012; Kalač, Hlavatá a Křížek, 1997) i zahraničních studií zabývajících se obsahem BA a polyaminů v pívu (např. Glória a Izquierdo-Pulido, 1999; Deasy et al., 2011; Iijima et al., 2005; a další). Analýzou obsahu BA v pivech se zabývaly i některé diplomové práce. Václavek (2014, s. 59-65) ve své diplomové práci detekoval obsah kadaverinu, putrescinu, tyraminu a spermidinu v odebraných vzorcích meziproductů při výrobě piva a ve finálních výrobcích. Čechová (2012, s. 44) stanovila u 33 různých lehkých a výčepních piv obsah BA v rozmezí 4,8-224,3 mg/l. U 30 z testovaných vzorků prokázala obsah tyraminu v množství do 20 mg/l. U všech vzorků piv dále zjistila vyšší obsah BA na konci skladování (po uplynutí data použitelnosti).

V rámci této diplomové práce byl sledován vliv vybraných faktorů na produkci BA u vybraných kmenů BMK. Testované kmeny byly kontaminanty z procesu výroby piva. Nejvíce zastoupenými kmeny v prvotním skríningu byly kmeny *Lb. brevis*. Zástupci *Lb. brevis* jsou označovány za původce zvýšených koncentrací BA v pívu (Kern, Vogel a Behr, 2014, s. 23). Nárůst laktobacilů v pívu, zejména *Lb. brevis* a *Lb. plantarum*, znehodnocuje konečný produkt nejen tvorbou BA ale ostatních sensoricky aktivních látek (Deasy et al., 2011, s. 2157).

Skrínig i sledování kinetiky produkce BA (u kmene *Lb. brevis* RIBM 2-20) probíhalo za podmínek *in vitro*. Jedná se o prvotní experimenty, které mají poukázat schop-

nost hořkých chmelových látek a etanolu ovlivňovat produkci BA. Do budoucna bude pozorování realizováno v prostředí sladiny, mladiny a mladého piva.

Nejhojněji produkovaným BA zkoušenými kmeny byl tyramin. Ostatní BA (spermin) byly detekovány v nízkých koncentracích (do 8 mg/l).

Produkce tyraminu *in vitro* během prvotního skrínungu byla prokázána v obou variantách média (varianta I: MRS bujón s 0,3 % (w/v) aminokyselin, varianta II: MRS bujón s 0,3 % (w/v) aminokyselin, 4,0 % (v/v) etanolu a 20 mg/l směs izo- α -hořkých látek). Produkce byla následně potvrzena během sledování kinety produkce tyraminu při různých kultivačních podmínkách.

Během skrínungu v médiu MRS s přidavkem 0,3 % (w/v) aminokyselin byly některé kmeny *Lb. brevis* (RIBM 2-27; RIBM 2-20; RIBM 2-78; a další) a kmen *Lb. plantarum* RIBM 2-89 schopny produkce tyraminu v koncentraci nad 100 mg/l (Obr. 9). Celkem 5 kmenů produkovalo tyramin v množství nad 200 mg/l. Toto množství lze považovat za toxikologicky významné množství. Bover-Cid a Holzapfel (1999, s. 39) potvrdili ve své studii tyrozindekarboxylázovou aktivitu u tří druhů laktobacilů (*Lb. curvatus*, *Lb. brevis* a *Lb. buchneri*). Množství tyraminu zjištěných po čtyřdenní kultivaci při 37 °C bylo v některých případech mnohonásobně vyšší. Koncentrace tyraminu detekované v médiu po kultivaci vybraných kmenů se pohybovala v rozsahu 302-7641 mg/l.

Na základě informací uvedených v dostupné literatuře, které se týkají inhibičního působení hořkých látek na růst mikroorganismů (např. Simpson, 1993; Kern, Vogel a Behr, 2014), by mohlo být očekáváno potlačení rozvoje laktobacilů a produkce tyraminu. Testována byla v rámci skrínungu kombinace 20 mg/l hořkých látek a 4 % (v/v) etanolu, protože tyto koncentrace se vyskytují běžně ve výčepním pivu (Basařová et al., 2010, s. 561-562). Přídavek etanolu a hořkých látek způsobil výrazné snížení dekarboxylázové aktivity u většiny izolátů testovaných v rámci prvotního skrínungu. Pouze *Lb. brevis* RIBM 2-20 vykazoval vyšší produkci ($508,7 \pm 23,8$ mg/l) než při kultivaci v první variantě média ($412,6 \pm 16,1$ mg/l). U ostatních kmenů došlo až k desetinásobnému snížení obsahu tyraminu (Tab. 5).

Během sledování kinetiky produkce tyraminu bylo zjištěno mnoho zajímavých faktů. Při kultivační teplotě 10 °C měl přídavek etanolu vliv na růst *Lb. brevis* RIBM 2-20 (Příloha II, Obr. 1). Přídavek etanolu při 10 °C potlačoval růst mikroflóry, významně však neovlivnil celkově vyprodukovaná množství tyraminu (Obr. 11).

Naopak při kultivační teplotě 30 °C došlo přidavkem etanolu v koncentraci 2 a 3 % (v/v) ke zvýšení obsahu tyraminu. Pouze při koncentraci 4 % (v/v) etanolu došlo k mírnému snížení produkce, která byla i přesto značná (177,3±2,2 mg/l). K obdobným výsledkům dospěli i Glória a Izquierdo-Pulido (1999, s. 132-134), kteří prokázali, že obsah BA (agmatinu a putrescinu) byl u piv s vyšším obsahem etanolu vyšší. Moreno-Arribas a Lonvaud-Fuel (1999, s. 59) uvádí, že u izolátů *Lb. brevis* z vína nedošlo k inhibici produkce tyraminu ani při 10 % (v/v) etanolu.

Dalším sledovaným faktorem byl přídavek hořkých (chmelových) látek. U kmene *Lb. brevis* RIBM 2-20 byla zjištěna vysoká odolnost vůči působení izo- α -hořkých kyselin. Tento poznatek potvrzují Kern, Vogel a Behr (2014, s. 18), kteří zjistili u 17 kmenů *Lb. brevis* toleranci vůči izo- α -hořkým kyselinám a jejich růst v pivech pšeničných a typu pils. Zvyšující se koncentrace přídavků hořkých látek během studia kinetiky produkce tyraminu způsobila, zejména při teplotě 30°C, zvýšení produkce tyraminu. Tento závěr byl překvapujícím zjištěním, jelikož hořké látky obecně vykazují antimikrobní účinek a měly by tedy omezit růst bakterií, které jsou s těmito látkami ve styku (Matoulková, Kubizniaková a Sigler, 2012, s. 337). Použitý kmen *Lb. brevis* RIBM 2-20 má pravděpodobně vysokou toleranci vůči hořkým látkám a v dané koncentraci tyto látky neovlivnily jeho růst.

Vliv hořkých látek na růst a produkci tyraminu byl při 10 °C a koncentraci 0-5 mg/l hořkých látek minimální (Obr. 12, Příloha II, Obr. 6). U ostatních koncentrací hořkých látek (10; 20; 30 mg/l) byl růst a tím i obsah tyraminu výrazně omezen. Produkce tyraminu v tomto rozsahu nepřesahovala 50 mg/l (Obr. 12-15). Kultivace při 30 °C se stejnou kombinací faktorů zvýšila produkci tyraminu na dvojnásobek v porovnání s médiem MRS bez faktorů (Obr. 17-20).

Citlivost vůči hořkým látkám, etanolu, ale i růst v médiu MRS byl výrazně odlišný při různých kultivačních teplotách – 10 °C a 30°C. Z toho vyplývá, že vliv na produkci tyraminu u testovaného kmene *Lb. brevis* RIBM 2-20 měla hlavně teplota. Při porovnání růstových křivek i grafů produkce tyraminu (Příloha I-II, Obr. 11-23) lze bez váhání říct, že při vyšší kultivační teplotě došlo u kmene *Lb. brevis* RIBM 2-20 k výraznému podpoření růstu a zvýšení produkce tyraminu. Výzkum autorů Casadei et al. (2001, s. 132) ukazuje, že při nízkých teplotách jsou bakterie rodu *Lactobacillus* citlivější vůči etanolu než při vyšší teplotě. Tento argument koresponduje s našimi výsledky, kdy při nízké teplotě docházelo k výraznějšímu ovlivnění produkce tyraminu. Snížení koncentrace tyraminu

mohlo být teoreticky způsobeno vyčerpáním živin s následným využitím tyraminu z kultivačního média (Buňková et al., 2011, s. 117).

Výrazně ovlivňovaly růst a produkci tyraminu některé kombinace etanolu a hořkých látek. Růst byl výrazně ovlivněn při obou kultivačních teplotách kombinací 30 mg/l hořkých látek a 0-4 % (v/v) etanolu (Příloha I, Obr. 5; Příloha II, Obr. 5). Při těchto kombinacích došlo k prodloužení lag fáze a viditelnému snížení růstu populace.

Nejvyšší obsah tyraminu, kterého bylo dosaženo po 48 hodinách kultivace ($1554,7 \pm 70,0$ mg/l) při kultivační teplotě 30 °C, byl naměřen v médiu MRS s přidavkem 10 mg/l hořkých látek a bez přidavku etanolu. Naopak nejnižší produkce ($350,4 \pm 27,1$ mg/l) byla zaznamenána v médiu MRS s přidavkem 4 % (v/v) etanolu a 0 mg/l hořkých látek. Při kultivační teplotě 10 °C byl obsah tyraminu po 48 hodinách v rozmezí 11,6-21,7 mg/l, kdy nejvyšší koncentrace tyraminu byly při kombinacích 2 % (v/v) etanolu a 5 mg/l hořkých látek, 4 % (v/v) etanolu a 10 mg/l hořkých látek.

Při teplotě 30 °C byla produkce tyraminu sice výrazně ovlivněna sledovanými faktory, ale dosažené koncentrace tyraminu v prostředí byli přesto vysoké. Teoreticky mohl být tento jev způsoben tím, že hořké látky mohly snížit etanolový stres a produkty metabolismu (např. kyselina mléčná) mohly zároveň reagovat s hořkými látkami (Sigler a Matoulková, 2011, s. 7-8). Následně nedocházelo působením hořkých látek k narušování buněčných stěn bakterií. Tento efekt mohl být také podpořen tím, že byl kmen *Lb. brevis* RIBM 2-20 před začátkem experimentu opakovaně kultivován v prostředí s hořkými chmleovými látkami.

Množství tyraminu, které bylo vyprodukováno za podmínek *in vitro* testovaným kmenem *Lb. brevis* RIBM 2-20 při kultivační teplotě 30 °C v médiu s přidavkem 10 mg/l hořkých látek a 0 % (v/v) etanolu ($1792,4 \pm 70,0$ mg/l), by mohlo způsobit zdravotní komplikace. Pro pacienty s léčbou antidepresivy nebo u pacientů, kterým jsou podávány inhibitory monoaminoxidáz, představuje riziko již 6 mg/kg hmotnosti (Kuley a Özogul, 2011, s. 1163). Například u 60 kg vážícího člověka by při 30 °C přesáhly tyto koncentrace všechny kombinace médií MRS obsahující 5-30 mg/l s 0-4 % (v/v) etanolu. Daná koncentrace by byla dodržena pouze při 10 °C u všech testovaných kombinací. Lze předpokládat, že pokud by bylo pivo vyráběno a skladováno při nízkých teplotách, nebyla by kumulace tyraminu podporována.

ZÁVĚR

Produkce BA v pivech je nežádoucím jevem, protože etanol obsažený v pivě a detoxikační systém se navzájem ovlivňují. Z tohoto důvodu není doporučen příjem psychofarmak, která obsahují inhibitory monoaminoxidáz, spolu s etanolem. Při nedodržení tohoto doporučení by s největší pravděpodobností došlo k rozsáhlému potlačení detoxikačního systému a v tomto případě by mohly i nízké koncentrace BA způsobovat zdravotní komplikace. V rámci této diplomové práce byla sledována produkce BA vybranými kmeny *Lb. brevis* a *Lb. plantarum* za podmínek *in vitro*. Dále byla sledována kinetika produkce BA kmenem *Lb. brevis* RIBM 2-20. Ve skríningu produkce BA u souboru 23 kmenů laktobacilů i kinetiky produkce *Lb. brevis* RIBM 2-20 bylo pozorováno působení faktorů (přídavek etanolu a hořkých látek), které ovlivňují růst mikroorganismů a celkovou produkci BA. Na základě výsledků praktické části diplomové práce lze konstatovat následující:

- U vybraných kmenů *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus plantarum* byla během skríningu prokázána schopnost produkce tyraminu. Tyramin byl produkován ve všech kombinacích testovaných médií. Produkce ostatních BA byla kolísavá a ve většině případů nebyly detekovány.
- Skrínink byl prováděn ve dvou variantách médií, kdy druhá varianta obsahovala přídavek etanolu a hořkých látek.
- Vliv přídavku těchto látek byl znatelný, kdy docházelo k inhibici dekarboxylázové aktivity. Výjimkou byl kmen *Lb. brevis* RIBM 2-20, kdy nebyla produkce tyraminu přídavky hořkých látek a etanolu omezena (varianta I: $412,6 \pm 16,1$ mg/l; varianty II: $408,7 \pm 23,8$ mg/l).
- V rámci sledování kinetiky produkce tyraminu kmenem *Lb. brevis* RIBM 2-20 byl sledován vliv přídavků různých koncentrací etanolu, hořkých látek a teploty kultivace.
- Celou dobu kultivace bylo pH u všech médií v rozmezí 4,5-5,5. Toto pH bylo optimální pro činnost dekarboxyláz.
- Nejvyšší detekované množství tyraminu ($1792,4 \pm 70,0$ mg/l) bylo prokázáno v médiu MRS s přídavkem 10 mg/l izo- α -hořkých kyselin a 0 % (v/v) etanolu při kultivační teplotě 30 °C.

- Nejnižší stanovené množství tyraminu ($23,1 \pm 1,5$ mg/l) bylo zjištěno v médiu MRS při kultivační teplotě 10 °C s přidavkem 30 mg/l izo- α -hořkých kyselin a 0% (v/v) etanolu.

Tyramin byl v analyzovaných supernatantech přítomen v toxikologicky významných koncentracích. Zejména při kultivační teplotě 30 °C dosahovaly až 1800 mg/l.

Kdyby byl kmen *Lb. brevis* RIBM 2-20 schopen výše uvedené koncentrace tyraminu uvolnit do prostředí piva, mohl by ohrozit zdravotní nezávadnost piva a významně ovlivnit zdravotní stav spotřebitele.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ANCÍN-AZPILICUETA, C., A. GONZÁLEZ-MARCO a N. JIMÉNEZ-MORENO. Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008, roč. 48, s. 257-275. ISSN: 1040-8398.

ANLI, Ertan a Mustafa BAYRAM. Ochratoxin A in wines. *Food Reviews International*. 2009, roč. 25, s. 214-232. ISSN: 8755-9129.

ARENA, M.E. a M.C. MANCA DE NADRA. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology*. 2001, roč. 90, s. 158-162. ISSN: 1364-5072.

BASAŘOVÁ G. et al. *Pivovarství - Teorie a praxe výroby piva*. 1. vydání. Praha: VŠCHT, 2010. 863 s. ISBN 978-80-7080-734-7.

BARTKIENE, E. et al. Solid state fermentation with lactic acid bacteria to improve the nutritional quality of lupin and soya bean. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015, roč. 95, s. 1336-1342. ISSN: 0022-5142.

BENEDUCE, L. et al. Biogenic amine in wines. *Annals of Microbiology*. 2010, roč. 60, s. 573-578. ISSN: 1590-4261.

BOVER-CID, Sara a Wilhelm Heinrich HOLZAPFEL. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, roč. 53, s. 33-41. ISSN: 0168-1605.

BROWN, Amy. *Understanding food: principles and preparation*. 5. vydání. Stamford, USA: Cengage Learning, 2014. 622 s. ISBN 978-113-3607-151.

BUŇKA, F. et al. Content of biogenic amines and polyamines in beers from the Czech Republic. *Journal of the Institute of Brewing*. 2012, roč. 118, s. 213-216. ISSN: 0046-9750.

BUŇKOVÁ, L. et al. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*. 2009, roč. 229, s. 533- 538. ISSN: 1438-2377.

BUŇKOVÁ, L. et al. 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*. 2011, roč. 147, s. 112-119. ISSN: 0168-1605.

BUŇKOVÁ, L. et al. Monitoring of biogenic amines in cheeses manufactured at small-scale farms and in fermented dairy products in the Czech Republic. *Food Chemistry*. 2013, roč. 141, s. 548-551. ISSN: 0308-8146.

BURDYCHOVÁ, R. a V. DOHNAL. Screening of probiotic cultures intended for processing of fermented foods for their ability to produce biogenic amines. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2014, roč. 56, s. 25-30. ISSN: 1211-8516.

BURDYCHOVA, Radka a Tomáš KOMPRDA. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS microbiology letters*. 2007, roč. 276, s. 149-155. ISSN: 0378-1097.

BYUN, Bo Young a Jae-Hyung MAH. Occurrence of biogenic amines in Miso, Japanese traditional fermented soybean paste. *Journal of Food Science*. 2012, roč. 77, s. 216-223. ISSN: 0022-1147.

CASADEI, M. A. et al. Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, roč. 63, s. 125-134. ISSN: 0168-1605.

CHAMPAGNE, C. P., RAYMOND Y. a J. P. SIMON. Effect of water activity and protective solutes on growth and subsequent survival to air-drying of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, roč. 95, s. 745-756. ISSN: 0175-7598.

CHOI et al. Physicochemical properties and determination of biogenic amines in korean microbrewery beer products. *Journal of Food Biochemistry*. 2012, roč. 36, s. 27-39. ISSN: 0145-8884.

CORKERY, John M. et al. The recreational tryptamine 5-MeO-DALT (N,N-diallyl-5-methoxytryptamine): A Brief Review. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2012, roč. 39, s. 259-262. ISSN: 0278-5846.

COTON, E. a M. COTON. Evidence of horizontal transfer as origin of strain to strain variation of the tyramine production trait in *Lactobacillus brevis*. *Food Microbiology*. 2009, roč. 26, s. 52-57. ISSN: 0740-0020.

ČECHOVÁ, M. *Monitoring obsahu biogenních aminů v lahvových pivech v ČR*. Zlín, 2012. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, fakulta technologická, Ústav analýzy a chemie potravin. Vedoucí diplomové práce Helena Velichová.

DADÁKOVÁ, E., KŘÍŽEK M. A T. PELIKÁNOVÁ. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. 2009, roč. 116, s. 365-370. ISSN: 0308-8146.

DEASY, T. et al. Isolation of a virulent *Lactobacillus brevis* phage and its application in the control of beer spoilage. *Journal of Food Protection*. 2011, roč. 74, s. 2157-2161. ISSN: 0362-028x.

ERCAN, S. S., BOZKURT, H. a C. SOYSAL. Significance fo biogenic amines in food and their reduction methods. *Journal of Food Science*. 2013, roč. 3, s. 395-410. ISSN: 2159-5828.

ERGÖNÜL, Bülent a Akif KUNDAKÇI. Microbiological attributes and biogenic amine content of probiotic Turkish fermented sausage. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 2011, roč. 6, s. 49-56. ISSN: 1661-5751.

FERNÁNDEZ, M. et al. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, roč. 73, s. 1400- 1406. ISSN: 0175-7598.

G-ALEGRÍA, E. et al. High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS microbiology letters*. 2004, roč. 230, s. 53-61. ISSN: 0378-1097.

GARAI, G. et al. Biogenic amines in natural ciders. *Journal of Food Protection*. 2006, roč. 69, s. 3006-3012. ISSN: 1718-6671.

GARAI, G. et al. Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. *Letters in Applied Microbiology*. 2007, roč. 45, s. 473- 478. ISSN: 0266-8254.

GLÓRIA, M. Beatriz A. a Maria IZQUIERDO-PULIDO. Levels and significance of biogenic amines in brazilian beers. *Journal of Food Composition and Analysis*. 1999, roč. 12, s. 129-136. ISSN: 0889-1575.

GRANT, W. D. Life at low water activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2004, roč. 359, s. 1249-1267. ISSN: 0962-8436.

HALÁSZ, A., Ágnes BARÁTH a Wilhelm H. HOLZAPFEL. The influence of starter culture selection on sauerkraut fermentation. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*. 1999, roč. 208, s. 434-438. ISSN: 1431-4649.

HAWEL, L. et al. Biosynthesis and selective export of 1,5-diaminopentane (cadaverine) in mycoplasma-free cultured mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1994, roč. 269, s. 7412–7418. ISSN: 92521-0121.

HAYES, P.R. *Food microbiology and hygiene: organisms, habitats, activities*. 2. vydání. London: Chapman, 1995. 308 s. ISBN 04-125-3980-2.

HERNÁNDEZ-JOVER, T. et al. Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997, roč. 45, s. 2098-2102. ISSN: 0021-8561.

IGARASHI, K. a K. KASHIWAGI. Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochemical Journal*. 1999, roč. 344, s. 633-642. ISSN: 0264-6021.

JESPERSEN, L. a M. JAKOBSEN. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, roč. 33, s. 139-155. ISSN: 0168-1605.

JUNEJA, Vijay K a John Nikolaos SOFOS. *Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions*. Washington, DC: ASM Press, 2009, 512 s. ISBN 978-1-55581-459-5.

KALAČ, Pavel a Martin KŘÍŽEK. Biogenní aminy a polyaminy v potravinách. *Výživa a potravinářství*. 2002, roč. 57, s. 12-13. ISSN: 1211-846x.

KALAČ, P. et al. Biogenic amine formation in bottled beer. *Food chemistry*. 2002, roč. 79, s. 431-434. ISSN: 0308-8146.

KALAČ, Pavel a Petra KRAUSOVÁ. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*. 2005, roč. 90, s. 219-230. ISSN: 0308-8146.

KALAČ, Pavel a Martin KŘÍŽEK. A Review of biogenic amines and polyamines in beer. *Journal of The Institute of Brewing*. 2003, roč. 109, s. 123-128. ISSN: 0046-9750.

KALAČ, Pavel. Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005–mid 2013. *Food Chemistry*. 2014, roč. 161, s. 27-39. ISSN: 0308-8146.

KAROVIČOVÁ, J., Z. KOHAJDOVÁ a Livia Simon SARKADI. Biogenic Amines in Food. *Chemical Information*. 2005, roč. 36, s. 321-361. DOI: 10.1002/9780470430101.ch3b.

KERN, Carola C., Rudi F. VOGEL a Jürgen BEHR. Differentiation of *Lactobacillus brevis* strains using Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry with respect to their beer spoilage potential. *Food Microbiology*. 2014, roč. 40, s. 18-24. ISSN: 0740-0020.

KIM, S. H. et al. Histamine production by *Morganella morganii* in mackerel, albacore, mahimahi, and salmon at various storage temperatures. *Journal of Food Science*. 2002, roč. 67, s. 1522-1528. ISSN: 0022-1147.

KIM, Min-Ju a Keun-Sung KIM. Tyramine production among lactic acid bacteria and other species isolated from kimchi. *LWT - Food Science and Technology*. 2014, roč. 56, s. 406-413. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.11.001.

KOHAJDOVÁ, Z., J. KAROVIČOVÁ a G. GREIF. Biogénne aminy v potravinách. *Potravinárstvo*. 2008, roč. 2, s. 30–49. ISSN: 1337-0960.

KOMPRDA, T. et al. Biogenic amine content in sterilised and pasteurised long-term stored processed cheese. *Czech Journal of Food Science*. 2005, roč. 23, s. 209-216. ISSN: 1212-1800.

KOMPRDA, T. et al. Tyramine production in Dutch-type semi-hard cheese from two different producers. *Food Microbiology*. 2008, roč. 25, s. 219-227. ISSN: 0740-0020.

KOMPRDA, T. et al., 2010. Tyrosine-and histidine-decarboxylase positive lactic acid bacteria and enterococci in dry fermented sausages. *Meat science*. 2010, roč. 86, s. 870-877. ISSN: 0309-1740.

KONINGS, W. N., KUIPERS, O. a J. H. J. HUIS IN 'T VELD. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. 1. vydání. Veldhoven: Springer, 1999. 411 s. ISBN: 978-0792359531.

KŘÍŽEK, M. a V. HLAVATÁ. Stanovení vybraných biogenních aminů v pivu. *Kvasný průmysl*. 1995, roč. 41, s. 265- 268. ISSN: 0023-5830.

KŘÍŽEK, M. a P. KALÁČ. Biogenní aminy v potravinách a jejich role ve výživě. *Czech Journal of Food Science*. 1998, roč. 16, s. 151-159. ISSN: 0862-8653.

KULEY, Esmeray a Fatih ÖZOGUL. Synergistic and antagonistic effect of lactic acid bacteria on tyramine production by food-borne pathogenic bacteria in tyrosine decarboxylase broth. *Food Chemistry*. 2011, roč. 127, s. 1163-1168. ISSN: 0308-8146.

KUSANO, T. et al. Polyamines: Essential factors for growth and survival. *Planta*. 2008, roč. 228, s. 367- 381. ISSN: 0032-0935.

LANDETE, J. M., FERRER, S., PARDO, L. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food control*. 2007, roč. 18, s. 1569-1574. ISSN: 0956-7135.

LANDETE, J. M. et al. Updated molecular knowledge about histamine biosynthesis by bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008, roč. 48, s. 697- 714. ISSN: 1040-8398.

LATORRE-MORATALLA, M. L., et al. Biogenic amines in traditional fermented sausages produced in selected European countries. *Food Chemistry*. 2008, roč. 107, s. 912-921. ISSN: 0308-8146.

LAVIZZARI, T. et al. Occurrence of biogenic amines and polyamines in spinach and changes during storage under refrigeration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, roč. 55, s. 9514-9519. ISSN: 0021-8561.

LEHANE, L. a J. OLLEY. Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*. 2000, roč. 58, s. 1-37. ISSN: 0168-1605.

LEROY, F., VERLUYTEN, J., VUYST, L.D. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2006, roč. 106, s. 270- 285. ISSN: 0168-1605.

LINARES, D. M. et al. Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011, roč. 51, s. 691- 703. ISSN: 1040-8398.

LINARES, D. M. et al. Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in Microbiology*. 2012, roč. 3, s. 1- 10. ISSN: 1664-302X.

LORENCOVÁ, E. et al. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *International Journal of Food Science and Technology*. 2012, roč. 47, s. 2086- 2091. ISSN 0950-5423.

LORET, S., DELOYER, P., DANDRIFOSSE, G. Levels of biogenic amines as measure of the quality of the beer fermentation process: Data from Belgian samples. *Food Chemistry*. 2005, roč. 89, s. 519- 525. ISSN 0308-8146.

LUCAS, Patrick a Aline LONVAUD-FUNEL. Purification and partial gene sequence of the tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809. *FEMS Microbiology Letters*. 2002, roč. 211, s. 85-89. ISSN:0378-1097.

MARCOBAL, A. et al. 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*. 2006, roč. 157, s. 417- 424. ISSN: 0923-2508.

MARCOBAL, A. et al. First genetic characterization of a bacterial beta-phenylethylamine biosynthetic enzyme in *Enterococcus faecium* RM58. *FEMS Microbiology Letters*. 2006, roč. 258, s. 144- 149. ISSN: 0378-1097.

MATOULKOVÁ, D. Beer-spoiling ability of lactic acid bacteria and its relation with genes horA, horC and hitA. *Kvasný průmysl*. 2012, roč. 58, s. 336- 342.

MARTÍNKOVÁ, Jiřina. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 2. vydání. Praha: Grada, 2014. 379 s. ISBN: 978-802-4713-564.

MAYER, H. K., FIECHTER G. a E. FISCHER. A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese. *Journal of Chromatography A*. 2010, roč. 1217, s. 3251-3257. ISSN: 0021-9673.

MAZZOLI, R. et al. Influence of ethanol, malate and arginine on histamine production of *Lactobacillus hilgardii* isolated from an Italian red wine. *Amino acids*. 2009, roč. 36, s. 81-89. ISSN: 0939-4451.

MEDINA, M. Á. et al. Biogenic amines and polyamines: Similar biochemistry for different physiological missions and biomedical applications. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2003, roč. 38, s. 23-59. ISSN: 1040-9238.

MORENO-ARRIBAS, Mária Victoria a Aline LONVAUD-FUNEL. Tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. brevis* ATCC 367. *FEMS Microbiology Letters*. 1999, roč. 180, s. 55-60. ISSN: 1574-6968.

NEHLIG, Edited by Astrid a A ALFERMANN. *Coffee, Tea, Chocolate, and the Brain*. 1. vydání. London: CRC Press, 2004, 286 s. ISBN 02-036-1885-8.

NOVELLA-RODRÍGUEZ, S., et al. Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. *Food Chemistry and Toxicology*. 2003, roč. 68, s. 750- 755. ISSN: 0022-1147.

OFFERMANN, S. a W. ROSENTHAL, 2008. *Encyclopedia of molecular pharmacology*. 2. vydání. New York: Springer, 2008, 1505 s. ISBN 978-354-0389-217.

ÖZGÜL, Özgül a Ali ÜREN, 2010. Biogenic amine content of kefir: a fermented dairy product. *European Food Research and Technology*. 2010, roč. 231, s. 101- 107. ISSN: 1438-2377.

ÖZOGUL, Fatih a Yesim ÖZOGUL. The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures. *European Food Research and Technology*. 2007, roč. 225, s. 385-394. ISSN: 1438-2477.

PEGG, Anthony E. a Anthony MICHAEL. Spermine synthase. *Cellular and Molecular Life Science*. 2010, roč. 67, s. 113-121. ISSN: 1420-682X.

PEGG, Anthony E. Toxicity of polyamines and their metabolic products. *Chemical Research in Toxicology*. 2013, roč. 26, s. 1782-1800. ISSN: 0893-228x.

PEGG, Anthony E. The function of spermine. *IUBMB Life*. 2014, roč. 66, s. 8-18. ISSN: 1521-6543.

PREISLER, P., BEHR, J. a R. F. VOGEL. Detection of Beer-spoilage *Lactobacillus brevis* strains by reduction of Resazurin. *Journal of the Institute of Brewing*. 2010, roč. 116, s. 399-404. ISSN: 0046-9750.

PRIYADARSHANI, D., W. MESTHRI, a S. 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 and Technology*. 2011, roč. 46, s. 2062-2069. ISSN 0168-1605.

RACE, S. *Change your diet and change your life: food intolerance and food allergy handbook*. 2. vydání. Saltburn-by-the-Sea: Tigmor Books, 2012. 308 s. ISBN: 978-190-7119-088.

ROGINSKI, H., J. W. FUQUAY a P. FOX. *Encyclopedia of dairy sciences*. 4. vydání, New York: Academic Press, 2003. 4170 s. ISBN: 01-222-7235-8.

SAKAMOTO, K. a W. N. KONINGS. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, roč. 89, s. 105-124. ISSN: 0168-1605.

SANTOS, W. et al. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence/or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. *Food Chemistry*. 2003, roč. 81, s. 595-606. ISSN: 0308-8146.

SCHELP, E. et al. pH-induced structural changes regulate histidine decarboxylase activity in *Lactobacillus* 30a. *Journal of Molecular Biology*. 2001, roč. 306, s. 727-732. ISSN: 0022-2836.

SHAH, Pratik a Edwin SWIATLO. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Molecular Microbiology*. 2008, roč. 68, s. 4-16. ISSN: 0950-382X.

SIGLER, K. a D. MATOULKOVÁ. Pivovarské kvasinky a reakce na stres. *Kvasný průmysl*. 2011, roč. 57, s. 7-8. ISSN: 0023-5830.

SILLA-SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, roč. 29, s. 213-231. ISSN: 0168-1605.

SIMPSON, W. J. Ionophoric action of trans-isohumulone on *Lactobacillus brevis*. *Journal of General Microbiology*. 1993, roč. 139, s. 1041-1045. ISSN: 0022-1287.

STOLP, H. *Microbial ecology: organisms, habitats, activities*. 1. vydání. New York: Cambridge University Press, 1988. 308 s. ISBN: 05-212-7636-5

SUZZI, G. a F. GARDINI. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, roč. 8, s. 41-54. ISSN: 0168-1605.

SÝKOROVÁ, M. *Skríning dekarboxylázové aktivity u vybraných probiotických bakterií*. Zlín, 2013. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, fakulta technologická, Ústav analýzy a chemie potravin. Vedoucí diplomové práce Eva Lorencová.

TAKAHASHI, H. et al. Cloning and sequencing of the histidine decarboxylase genes of gram-negative, histamine-producing bacteria and their application in detection and identification of these organisms in fish. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, roč. 69, s. 2568-2579. ISSN: 0099-2240.

TIPNIS, U.R a G.-Y HE. Mechanism of polyamine toxicity in cultured cardiac myocytes. *Toxicology in Vitro*. 1998, roč. 12, s. 233-240. ISSN: 0887-2333.

VÁCLAVEK, J. *Vývoj obsahu biogenních aminů v průběhu výroby vybraných vzorků pív*. Zlín, 2014. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, fakulta technologická, Ústav analýzy a chemie potravin. Vedoucí diplomové práce Vendula Pachlová.

VERPOORTE, R. a A. ALFERMANN. *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. 2. vydání. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers. 2000. s. 286. ISBN: 07-923-6360-4.

YÜCEL, U. a A. ÜREN. Biogenic amines in turkish type pickled cabbage: effects of salt and citric acid concentration. *Acta Alimentaria*. 2008, roč. 37, s. 115-122. ISSN: 0139-3006.

ZOTTA, T. et al. Temperature and respiration affect the growth and stress resistance of *Lactobacillus plantarum* C17. *Journal of Applied Microbiology*. 2013, roč. 115, s. 848-858. ISSN: 1364-5072.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

a_w	Aktivita vody
AGM	Agmatin
AMK	Aminokyselina
BA	Biogenní aminy
BMK	Bakterie mléčného kvašení
CAD	Kadaverin
CNS	Centrální nervový systém
DAO	Diaminooxidáza
HCl	Kyselina chlorovodíková
HIS	Histamin
HL	Hořké látky
MAO	Monoaminooxidáza
PAO	Polyaminooxidáza
PUT	Putrescin
RNA	Ribonukleová kyselina
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích
SPD	Spermidin
SPN	Spermin
TYR	Tyramin

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Základní schéma dekarboxylace aminokyselin (Převzato a upraveno dle Kalač a Křížek, 2002, s. 12)</i>	15
<i>Obr. 2: Histamin (převzato a upraveno dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249).....</i>	24
<i>Obr. 3: Tyramin (převzato a upraveno dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249).....</i>	25
<i>Obr. 4: Tryptamin (převzato a upraveno dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249).....</i>	26
<i>Obr. 5: Kadaverin (převzato a upraveno dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249)</i>	26
<i>Obr. 6: Putrescin, spermidin a spermin (převzato a upraveno dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249).....</i>	27
<i>Obr. 7: Metodika skríníngu dekarboxylázové aktivity in vitro. * Varianta I: MRS bujón s 0,3 % (w/v) aminokyselin, Varianta II: MRS bujón s 0,3 % (w/v) aminokyselin, 4,0 % (v/v) etanolu a 20 mg/l směs izo-α-hořkých látek.</i>	42
<i>Obr. 8: Metodika sledování kinetiky produkce biogeních aminů kmenem <i>Lb. brevis</i> RIBM 2-20 ovlivněné testovaným rozsahem faktorů; * přidavek etanolu, hořkých látek a úprava pH</i>	44
<i>Obr. 9: Produkce tyraminu (TYR) při 30 °C v MRS s přidavkem 0,3 % (w/v) aminokyselin (AMK) vybranými kmeny <i>Lb. plantarum</i> (RIBM 2-48; 2-89; 2-91; 2-94; 2-99) a <i>Lb. brevis</i> (ostatní kmeny).....</i>	48
<i>Obr. 10: Produkce tyraminu (TYR) kmenem <i>Lb. brevis</i> RIBM 2-20 během kultivace 10 °C v médiu MRS s 0-4 % (v/v) etanolu.</i>	51
<i>Obr. 11: Produkce tyraminu (TYR) kmenem <i>Lb. brevis</i> RIBM 2-20 během kultivace 10 °C v médiu s MRS a 0-30 mg/l hořkých látek (HL).</i>	52
<i>Obr. 12: Produkce tyraminu (TYR) kmenem <i>Lb. brevis</i> RIBM 2-20 při kultivační teplotě 10 °C v médiu MRS s 0-4 % (v/v) etanolu a 5 mg/l hořkých látek.</i>	53
<i>Obr. 13: Produkce tyraminu (TYR) kmenem <i>Lb. brevis</i> RIBM 2-20 při 10 °C; v médiu MRS s 0-4 % (v/v) etanolu a 10 mg/l hořkých látek.</i>	53
<i>Obr. 14: Produkce tyraminu (TYR) kmenem <i>Lb. brevis</i> RIBM 2-20 v MRS s přidavky 20 mg/l hořkých látek (HL) a 0-4 % (v/v) etanolu při 10 °C.....</i>	54
<i>Obr. 15: Produkce tyraminu (TYR) kmenem <i>Lb. brevis</i> při 10 °C v MRS s přidavky 30 mg/l hořkých látek a 0-3 % (v/v) etanolu.</i>	54
<i>Obr. 16: Produkce tyraminu (TYR) kmenem <i>Lb. brevis</i> RIBM 2-20 během kultivace 30 °C v médiu MRS s 0-4 % (v/v) etanolu.</i>	55

<i>Obr. 17: Produkce tyraminu (TYR) kmenem Lb. brevis RIBM 2-20 během kultivace 30 °C v médiu s MRS a 0-30 mg/l hořkých látek (HL).</i>	56
<i>Obr. 18: Produkce tyraminu kmenem Lb. brevis při 30 °C v MRS s přísávkou 5 mg/l hořkých látek a 0-4 % (v/v) etanolu.</i>	56
<i>Obr. 19: Porovnání produkce tyraminu (TYR) kmenem Lb. brevis při 30 °C v MRS s přísávkou 10 mg/l hořkých látek a 0-4 % (v/v) etanolu.</i>	57
<i>Obr. 20: Produkce tyraminu kmenem Lb. brevis při 30 °C v MRS s přísávkou 20 mg/l hořkých látek a 0-4 % (v/v) etanolu</i>	58
<i>Obr. 21: Produkce tyraminu (TYR) kmenem Lb. brevis při 30 °C v MRS s přísávkou 30 mg/l hořkých látek a 0-4 % (v/v) etanolu</i>	58

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Prekurzory pro vznik vybraných biogenních aminů a polyaminů (Silla-Santos, 1996, s. 214)	21
Tab. 2: Obsah některých biogenních aminů (mg/l) u vybraných druhů piva (převzato a upraveno dle Izquierdo-Pulido et al., 1996, s. 3161).....	30
Tab. 3: Bakterie způsobující kontaminaci piva (převzato a upraveno dle Jespersen a Jakobsen, 1996, s. 139)	32
Tab. 4: Výsledky stanovení tyraminu v MRS bujónu a MRS s faktory	47
Tab. 5: Výsledky stanovení obsahu tyraminu (TYR) vyprodukovaného vybranými kmeny <i>Lb. brevis</i> a <i>Lb. plantarum</i> v médiu MRS s faktory	49

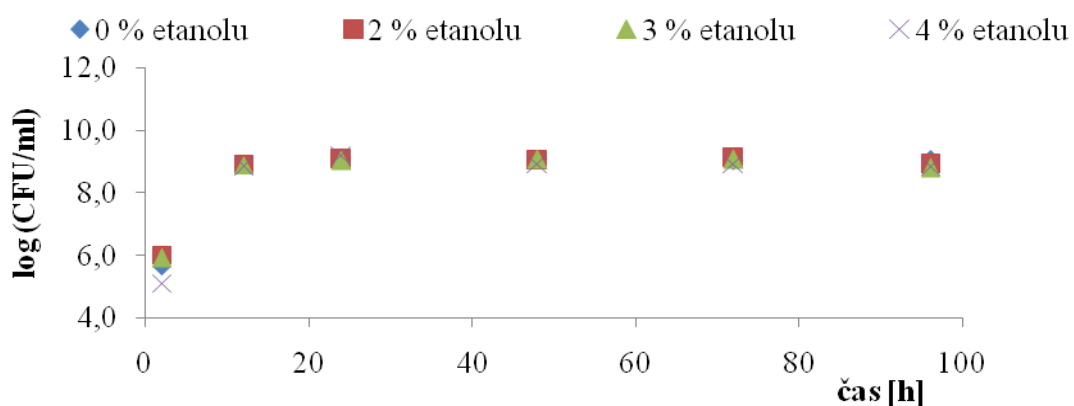
SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Růstové křivky *Lb. brevis* RIBM 2-20 při kultivační teplotě 30 °C

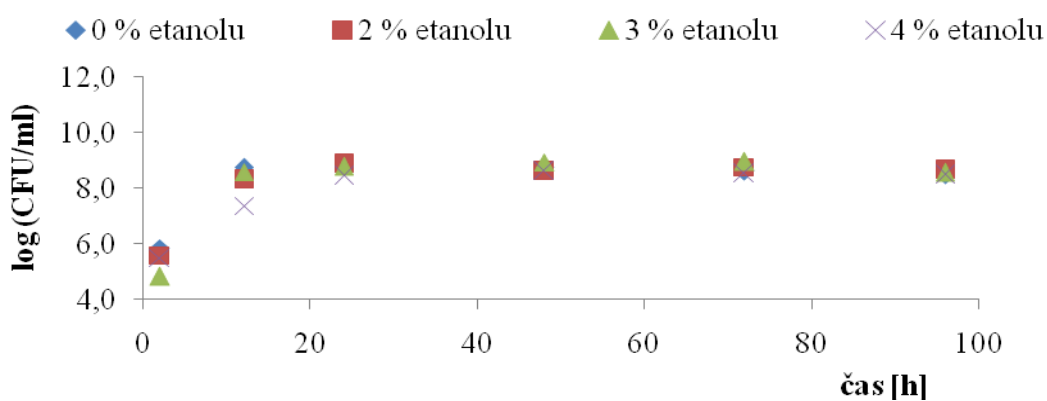
Příloha P II: Růstové křivky *Lb. brevis* RIBM 2-20 při kultivační teplotě 10 °C

Příloha P III: Vývoj pH během kultivace *Lb. brevis* RIBM 2-20 při 30 °C a 10 °C

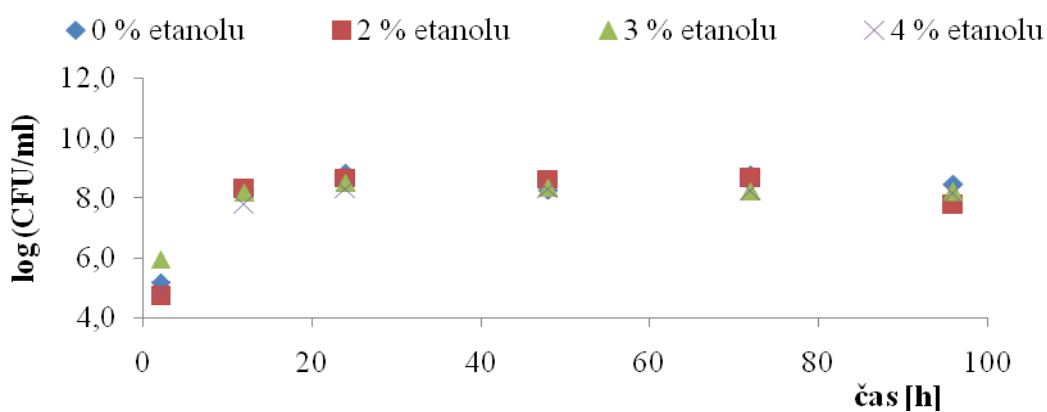
PŘÍLOHA P I: RŮSTOVÉ KŘIVKY *Lb. BREVIS* RIBM 2-20 PŘI KULTIVAČNÍ TEPLOTĚ 30 °C



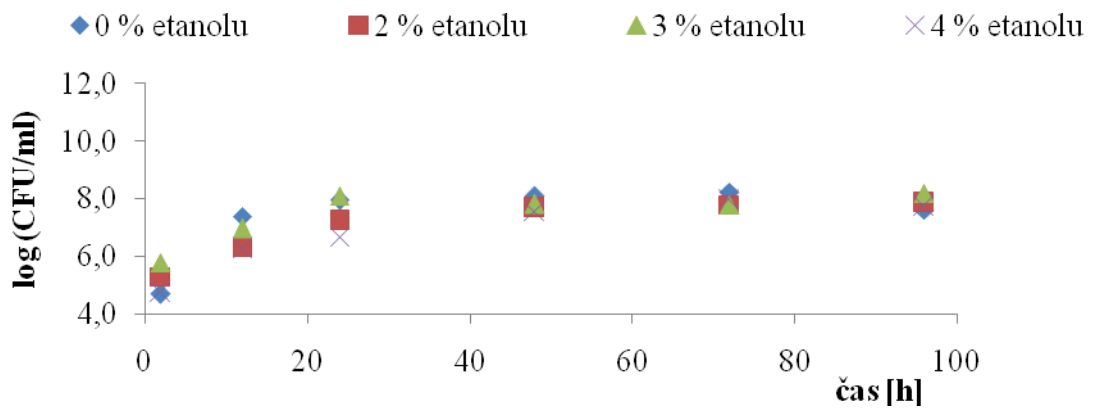
Obr. 1: Růstové křivky *Lb. brevis* RIBM 2-20 v médiu MRS s 0-4 % (v/v) etanolu při 30 °C.



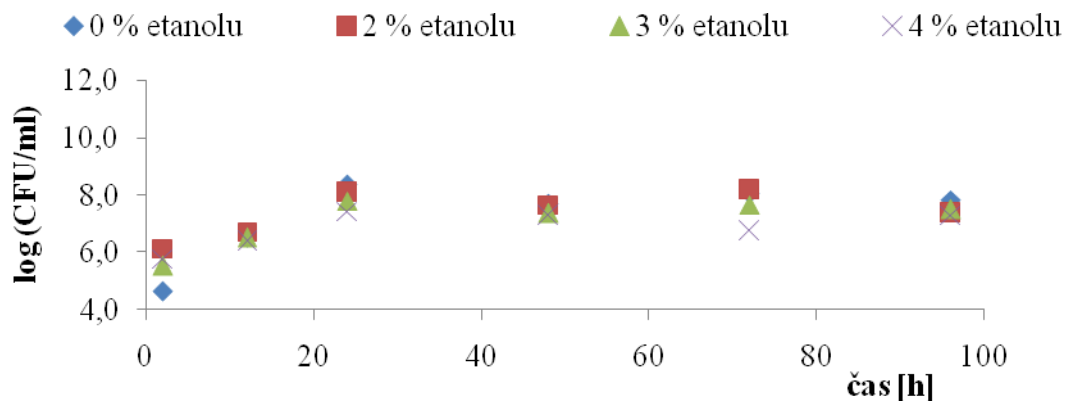
Obr. 2: Růstové křivky *Lb. brevis* RIBM 2-20 v médiu MRS s přidavkem 5 mg/l hořkých látek a 0-4 % (v/v) etanolu při 30 °C.



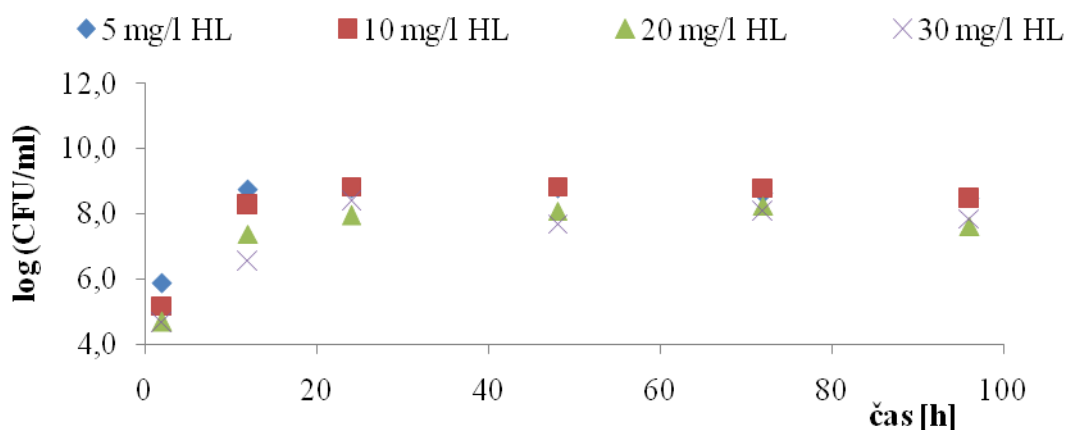
Obr. 3: Růstové křivky *Lb. brevis* RIBM 2-20 v médiu MRS s přidavkem 10 mg/l hořkých látek a 0-4 % (v/v) etanolu při 30 °C.



Obr. 4: Růstové křivky *Lb. brevis* RIBM 2-20 v médiu MRS s přidavkem 20 mg/l hořkých látek a 0-4 % (v/v) etanolu při 30 °C.

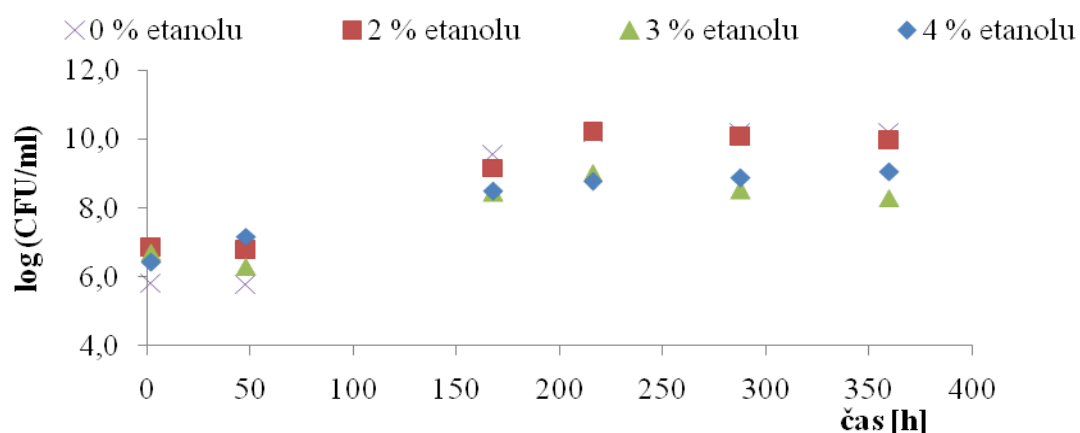


Obr. 5: Růstové křivky *Lb. brevis* RIBM 2-20 v médiu MRS s přidavkem 30 mg/l hořkých látek a 0-4 % (v/v) etanolu při 30 °C

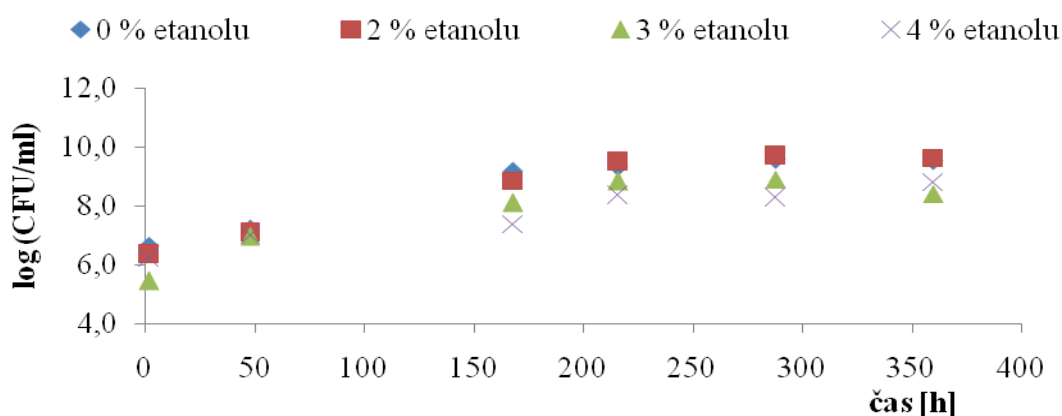


Obr. 6: Růstové křivky *Lb. brevis* RIBM 2-20 v médiu MRS s přidavkem 0-30 mg/l hořkých látek (HL) při 30 °C.

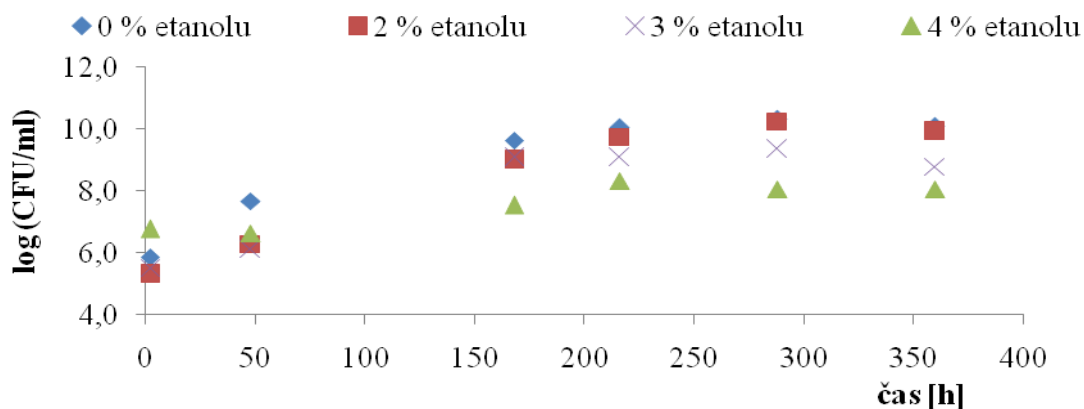
PŘÍLOHA P II: RŮSTOVÉ KŘIVKY *Lb. BREVIS* RIBM 2-20 PŘI KULTIVAČNÍ TEPLOTĚ 10 °C



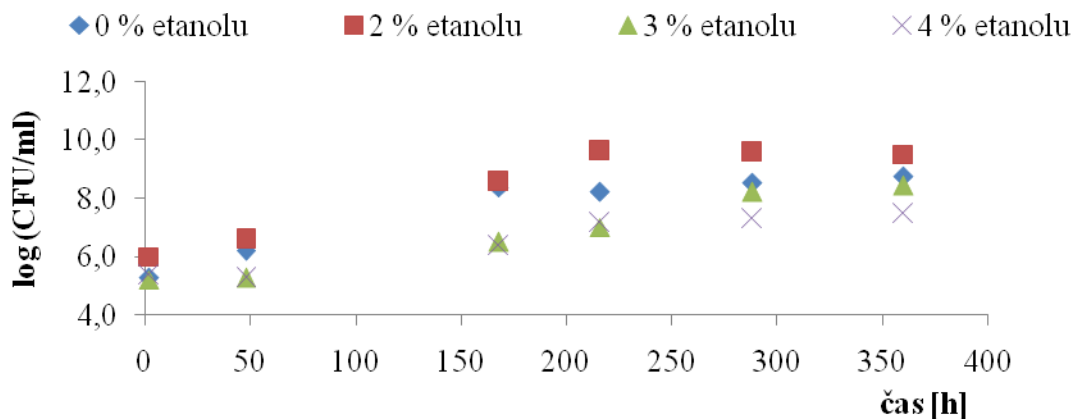
Obr. 1: Růstové křivky *Lb. brevis* RIBM 2-20 v médiu MRS s 0-4 % (v/v) etanolu při 10 °C.



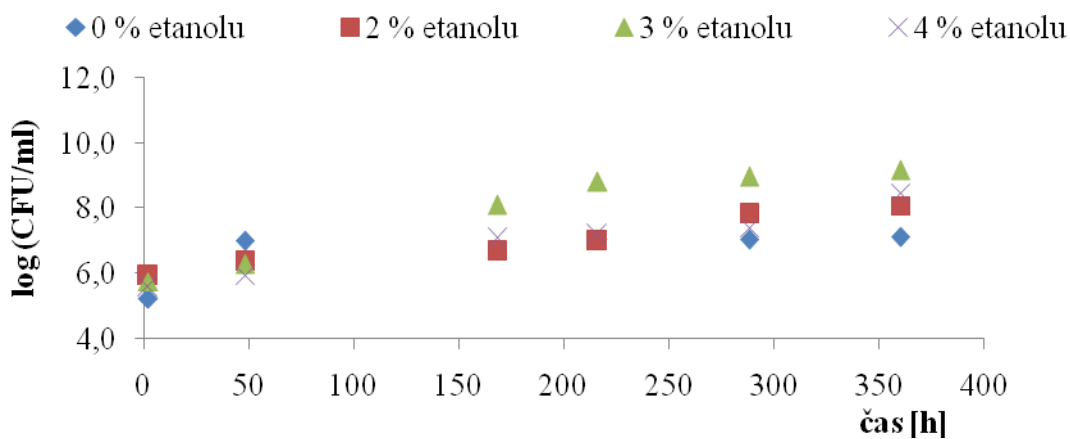
Obr. 2: Růstové křivky *Lb. brevis* RIBM 2-20 v médiu MRS s přidavkem 5 mg/l hořkých látek a 0-4 % (v/v) etanolu při 10 °C.



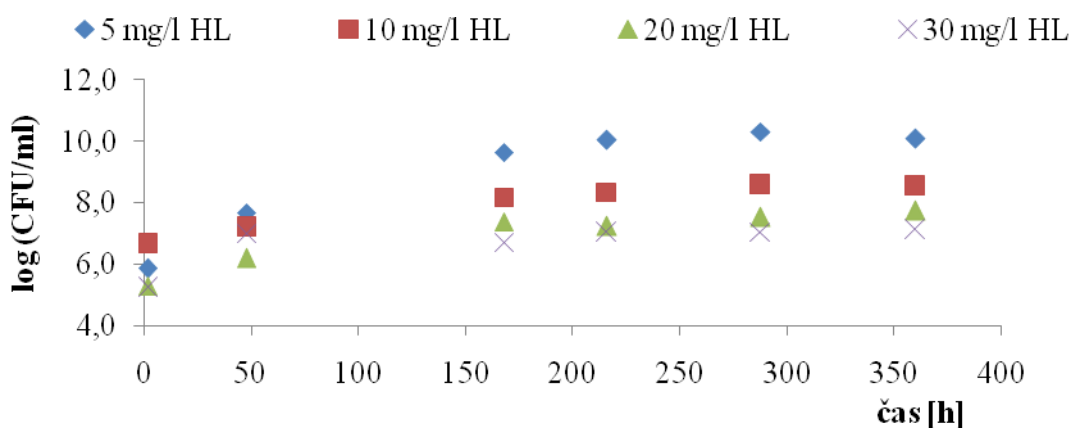
Obr. 3: Růstové křivky *Lb. brevis* RIBM 2-20 v médiu MRS s přidavkem 10 mg/l hořkých látek a 0-4 % (v/v) etanolu při 10 °C.



Obr. 4: Růstové křivky *Lb. brevis* RIBM 2-20 v médiu MRS s přidavkem 20 mg/l hořkých látek a 0-4 % (v/v) etanolu při 10 °C.

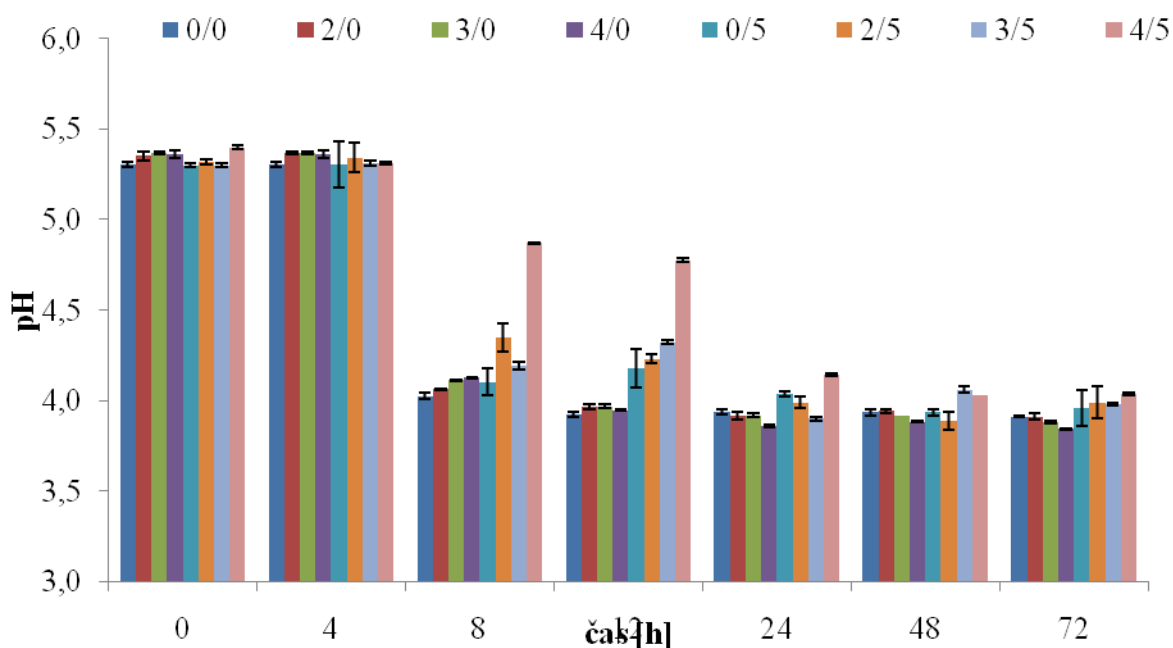


Obr. 5: Růstové křivky *Lb. brevis* RIBM 2-20 v médiu MRS s přidavkem 30 mg/l hořkých látek a 0-4 % (v/v) etanolu při 10 °C.

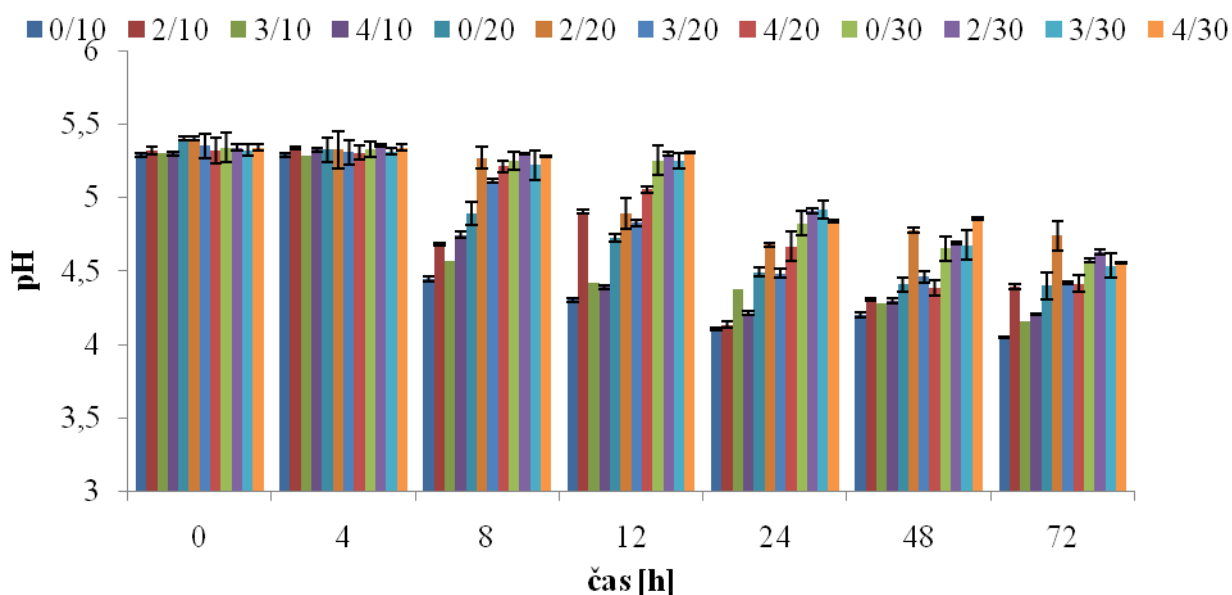


Obr. 6: Růstové křivky *Lb. brevis* RIBM 2-20 v médiu MRS s přidavkem 0-30 mg/l hořkých látek (HL) při 10 °C.

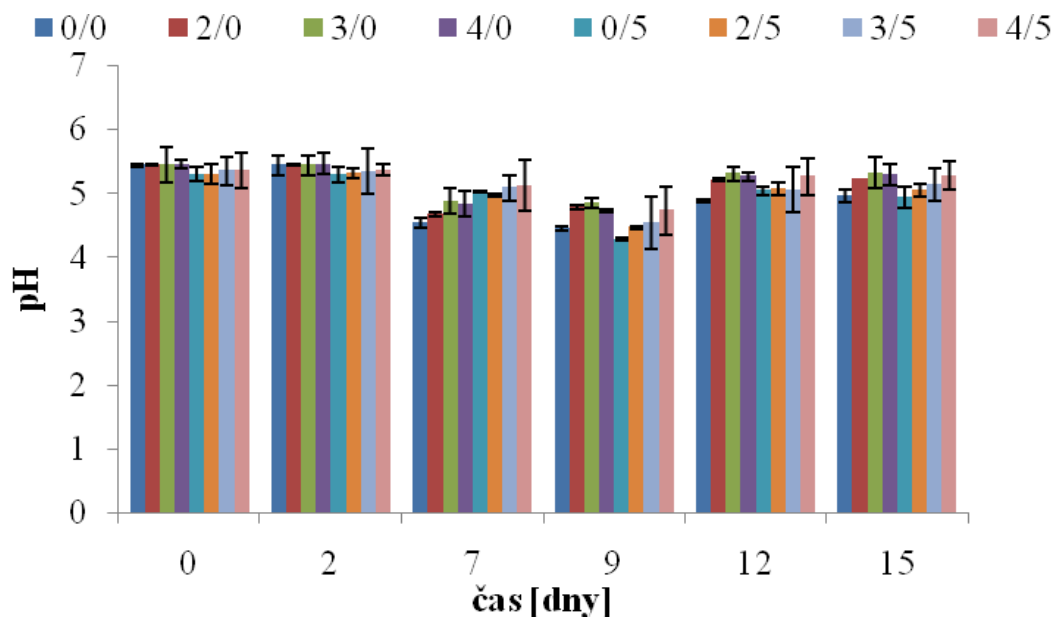
PŘÍLOHA P III: VÝVOJ PH BĚHEM KULTIVACE *Lb. BREVIS* RIBM 2-20 PŘI 30 °C A 10 °C



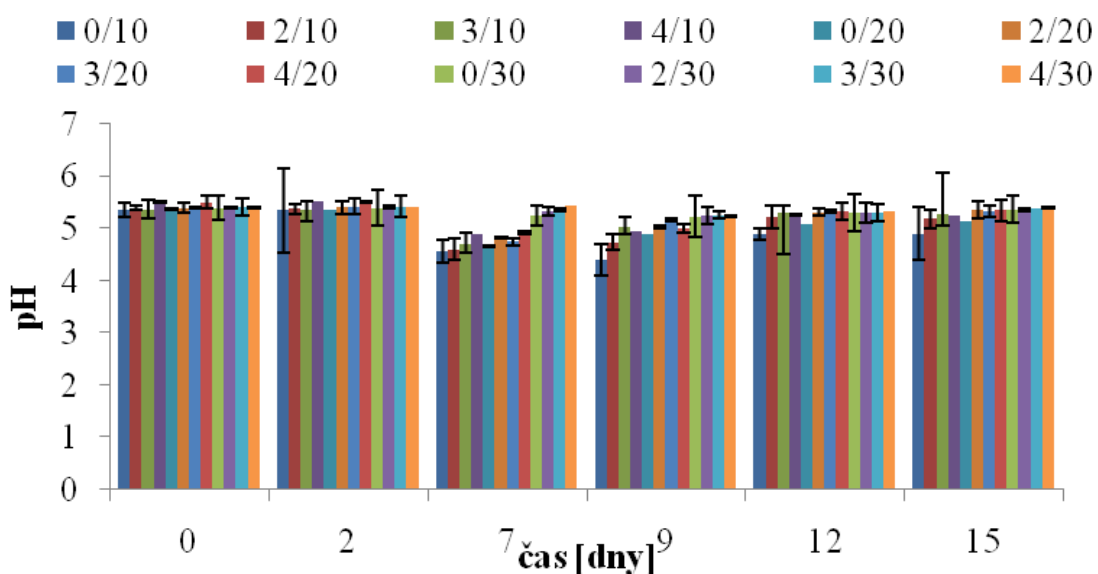
Obr. 1: Vývoj pH kultivačního prostředí *Lb. brevis* RIBM 2-20 bez/s přidavky etanolu (0-4 % (v/v)) a hořkých látek (0-5 mg/l) při 30 °C; př. 3/0 3 % etanolu, 0 mg/l hořkých látek.



Obr. 2: Vývoj pH kultivačního prostředí *Lb. brevis* RIBM 2-20 bez/ s přidavky etanolu (0-4 % (v/v)) a hořkých látek (10-30 mg/l) při 30 °C; př. 0/10 0 % etanolu, 10 mg/l hořkých látek.



Obr. 3: Vývoj pH kultivačního prostředí *Lb. brevis* RIBM 2-20 bez/s přidavky etanolu (0-4 % (v/v)) a hořkých látek (0-5 mg/l) při 10 °C; př. 3/0 3 % etanolu, 0 mg/l hořkých látek.



Obr. 4: Vývoj pH kultivačního prostředí *Lb. brevis* RIBM 2-20 bez/ s přidavky etanolu (0-4 % (v/v)) a hořkých látek (10-30 mg/l) při 10 °C; př. 0/10 0 % etanolu, 10 mg/l hořkých látek.