

Možnosti redukce obsahu biogenních aminů vybranými bakteriemi rodu *Lactobacillus*

Bc. Štěpán Beneš

Diplomová práce
2020



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Štěpán Beneš**
Osobní číslo: **T18367**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **Kombinovaná**
Téma práce: **Možnosti redukce obsahu biogenních aminů vybranými bakteriemi rodu *Lactobacillus***

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

1. Biogenní aminy
2. Biogenní aminy vyskytující se v potravinách
3. Možnosti snížení obsahu biogenních aminů
4. Faktory ovlivňující růst mikroorganismů

II. Praktická část

1. Kultivace vybraných bakterií rodu *Lactobacillus* v závislosti na různých podmínkách prostředí
2. HPLC stanovení obsahu biogenních aminů v bujónu po kultivaci vybraných bakterií *Lactobacillus*
3. Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin 2. Rozš. a přeprac. 3. vyd.* Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [2] SANTOS, M. H. Silla. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1996, 29(2-3), 213-231. DOI: 10.1016/0168-1605(95)00032-1. ISSN 01681605.
- [3] NAILA, Aishath, Steve FLINT, Graham FLETCHER, Phil BREMER a Gerrit MEERDINK. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science* [online]. 2010, 75 (7), R139-R150. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x. ISSN 00221147.
- [4] HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., SIMON-SAKARDI L., HOLZAPFEL W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science Technology*. 42-49, 1994, vol 5. ISSN: 09242244.
- [5] Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně.

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **17. února 2020**
Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. RNDr. Iva Burešová, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 17. února 2020

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Diplomová práce rozvíjí původní bakalářskou práci zaměřenou na degradaci biogenních aminů bakteriemi využívanými v mlékárenství. Díky zjištěným poznatkům došlo k vytipování kmene *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198, který vykazoval nejvyšší degradační schopnost a se kterým byly provedeny experimenty v rámci této diplomové práce.

U daného kmene byla pozorována degradace fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu v závislosti na různých růstových podmínkách (pH, čas, dostupnost živin, koncentrace aminů, teplota) s cílem stanovit ideální podmínky pro degradaci biogenních aminů tímto kmenem.

Experimentem bylo zjištěno, že nejvýrazněji byly kmenem *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198 degradovány histamin, putrescin a kadaverin. U všech tří aminů došlo k maximálním úbytkům v médiu o pH 6,2 s nižším obsahem živin při jejich koncentraci 0,2 g/l a při kultivační teplotě 30 °C. Putrescin byl za těchto podmínek degradován o 66 %, kadaverin o 60 % a histamin o 51 %.

Klíčová slova: biogenní aminy, degradace, růstové faktory, *Lactobacillus casei*

ABSTRACT

The diploma thesis develops the original bachelor's thesis focused on the degradation of biogenic amines by bacteria used in dairy production. Thanks to the findings, the strain *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198, which showed the highest degradation activity, was chosen for experiments in this thesis.

Degradation of phenylethylamine, putrescine, cadaverine, histamine and tyramine was observed for the tested strain depending on different growth conditions (pH, time, nutrient availability, amine concentration, temperature) to determine ideal conditions for the degradation of biogenic amines by this strain.

The experiment showed that the strain *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198 degraded histamine, putrescine and cadaverine the most. For all three amines, there were maximum decreases in the medium of pH 6,2 with a lower concentration of nutrients at their concentration 0,2 g/l and during cultivation temperature of 30 °C. Putrescine was degraded by 66 %, cadaverine by 60 % and histamine by 51 % under these conditions.

Keywords: biogenic amines, degradation, growth factors, *Lactobacillus casei*

Upřímně bych chtěl poděkovat vedoucí mé diplomové práce paní doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za vedení, trpělivost, ochotu, čas, pomoc a velmi cenné připomínky, které mi napomohly se zpracováním této práce. Dále bych chtěl poděkovat paní Mgr. Lucii Berčíkové za její čas a výpomoc při zpracovávání praktické části, ale také za její ochotu, vstřícnost a velmi užitečné rady. Mé velké díky patří také všem dalším pracovníkům Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí za pomoc a rady při realizaci praktické části diplomové práce.

Velké poděkování také patří mé rodině za podporu a pomoc během celého studia.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 BIOGENNÍ AMINY.....	12
1.1 KLASIFIKACE BIOGENNÍCH AMINŮ.....	12
1.2 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ	13
1.3 VÝZNAM A FUNKCE BIOGENNÍCH AMINŮ	15
1.4 TOXICITA BIOGENNÍCH AMINŮ	16
1.5 STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	18
1.6 PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ BAKTERIEMI	19
2 BIOGENNÍ AMINY VYSKYTUJÍCÍ SE V POTRAVINÁCH.....	21
2.1 RYBY.....	21
2.2 SÝRY A DALŠÍ MLÉČNÉ VÝROBKY.....	22
2.3 MASO A MASNÉ VÝROBKY.....	22
2.4 OVOCE A ZELENINA	23
2.5 FERMENTOVANÁ ZELENINA.....	24
2.6 ALKOHOLICKÉ NÁPOJE	25
2.6.1 Víno.....	25
2.6.2 Pivo	26
2.6.3 Cider – kvašený jablečný mošt	27
3 MOŽNOSTI ŘÍZENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH.....	28
3.1 METODY ZPOŽDUJÍCÍ A INHIBUJÍCÍ AKUMULACI BIOGENNÍCH AMINŮ	28
3.1.1 Správné hygienické postupy	29
3.1.2 Konzervační a přídatné látky	29
3.1.3 Vysoký hydrostatický tlak.....	30
3.1.4 Metoda ozařování.....	31
3.1.5 Způsob balení potravin.....	32
3.1.6 Solení potravin	32
3.1.7 Další faktory a metody působící na formulaci biogenních aminů	33
3.2 VYUŽITÍ STARTÉROVÝCH MIKROORGANISMŮ PRO ŘÍZENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	33
3.2.1 Využití kmenů s nízkou nebo nulovou dekarboxylační aktivitou.....	34
3.2.2 Degradace a oxidace vytvořených biogenních aminů.....	34
3.2.3 Přídavek enzymů oxidujících biogenní aminy	36
4 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ RŮST MIKROORGANISMŮ A VÝVOJ BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH	37
4.1 OBSAH ŽIVIN	38
4.2 KYSELOST – PH.....	39
4.3 TEPLOTA	40
4.4 VODNÍ AKTIVITA	41
4.5 REDOXNÍ POTENCIÁL.....	42
4.6 SLOŽENÍ ATMOSFÉRY	43
II PRAKTICKÁ ČÁST	45

5	CÍL PRÁCE	46
6	MATERIÁL A METODY	47
6.1	POUŽITÉ MIKROORGANIZMY	47
6.2	SLEDOVANÉ FAKTORY	47
6.3	KULTIVAČNÍ MÉDIA	47
6.3.1	20x koncentrovaný roztok biogenních aminů	47
6.3.2	MRS bujón s koncentrací biogenních aminů 0,2 g/l	48
6.3.3	MRS bujón s koncentrací biogenních aminů 0,4 g/l	48
6.3.4	½ MRS bujón s koncentrací biogenních aminů 0,2 g/l	48
6.3.5	½ MRS bujón s koncentrací biogenních aminů 0,4 g/l	48
6.4	PŘÍPRAVA A ODBĚR VZORKŮ	48
6.5	DERIVATIZACE VZORKŮ	49
6.6	CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	50
7	VÝSLEDKY A VYHODNOCENÍ	51
7.1	CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ REDUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ KMENEM <i>LACTOBACILLUS CASEI</i> SUBSP. <i>CASEI</i> CCDM 198 ZA SLEDOVANÝCH PODMÍNEK	51
7.1.1	Degradace biogenních aminů o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v úplném médiu	52
7.1.2	Degradace biogenních aminů o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v úplném médiu	55
7.1.3	Degradace biogenních aminů o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v úplném médiu	58
7.1.4	Degradace biogenních aminů o koncentraci 0,4 g/l při 30 °C v úplném médiu	59
7.1.5	Degradace biogenních aminů o koncentraci 0,4 g/l při 23 °C v úplném médiu	62
7.1.6	Degradace biogenních aminů o koncentraci 0,4 g/l při 11 °C v úplném médiu	66
7.1.7	Degradace biogenních aminů o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v médiu s nižším obsahem živin	69
7.1.8	Degradace biogenních aminů o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v médiu s nižším obsahem živin	74
7.1.9	Degradace biogenních aminů o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v médiu s nižším obsahem živin	75
8	DISKUZE	78
	ZÁVĚR	85
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	86
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	95
	SEZNAM OBRÁZKŮ	96
	SEZNAM TABULEK	98
	SEZNAM PŘÍLOH	99

ÚVOD

Biogenní aminy jsou dusíkaté sloučeniny organického původu, jež mají vysokou biologickou aktivitu a řadu fyziologických vlastností. Vyskytují se jak v rostlinných, tak v živočišných organizmech, kde mají řadu významných funkcí. Nejčastějším způsobem jejich syntézy je dekarboxylace volných aminokyselin pomocí specifických enzymů nazývaných dekarboxylázy. Konkrétním případem tohoto mechanismu je například odštěpení oxidu uhličitého z aminokyseliny histidinu za vzniku biogenního aminu histaminu.

Aminy jsou v určitém množství pro živé organizmy nezbytné. Slouží zejména jako zdroje dusíku, prekurzorů nukleových kyselin, hormonů, alkaloidů a proteinů, ale také se účastní mnoha metabolických procesů v živých organizmech. Pokud však dojde k příjmu biogenních aminů v nadměrné koncentraci, mohou být strůjcem řady nežádoucích zdravotních problémů a stávají se pro organismus toxické. Takové stavy mohou být doprovázeny bolestí hlavy, vysokým krevním tlakem, zvracením, průjmami nebo dokonce poruchami centrální nervové soustavy (CNS). Těmto zdravotním problémům je třeba zabránit, a proto dochází k řadě výzkumů s cílem negativní účinky biogenních aminů a zejména histaminu zvrátit.

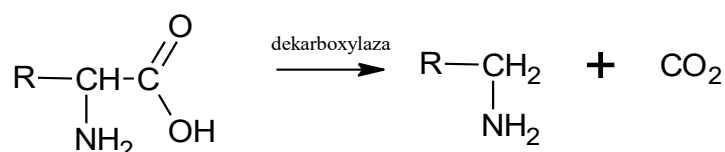
V malém množství jsou aminy součástí téměř všech potravin nebo z nich mohou vznikat při procesu trávení. Jejich zvýšené množství bývá obecně kumulováno ve fermentovaných potravinách (mléčné výrobky, masné výrobky, nápoje), v nichž dochází k jejich produkci pomocí mikroorganismů zodpovědných za fermentaci těchto potravin. Naopak u potravin, jako je čerstvé maso a ryby, bývá zvýšená koncentrace aminů známkou jejich kažení a je tedy používána jako ukazatel kvality čerstvých surovin.

Z důvodu již zmíněných toxických účinků je potřeba kontrolovat a omezovat tvorbu biogenních aminů v potravinách. Některé způsoby jsou založeny na ošetřování a konzervaci potravin ozařováním, vysokým tlakem nebo balení ve speciální atmosféře. Díky těmto činnostem často dochází ke zpomalení produkce biogenních aminů v konkrétních potravinách. Jiné metody jsou založeny na odstraňování již vytvořených aminů. Nejčastěji bývá využíváno aplikace bakterií, které disponují enzymy aminooxidázami, a ty jsou schopny vzniklé biogenní aminy oxidovat na méně toxické sloučeniny. Tento způsob je při uvážení optimálních růstových podmínek pro degradaci velmi významný a může zabraňovat nežádoucím zdravotním problémům.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy (BA) jsou netěkavé, organické, dusíkaté látky o nízké molekulové hmotnosti. Jedná se o skupinu alifatických, aromatických nebo heterocyklických bází odvozených nejčastěji od aminokyselin, které vykazují různé biologické účinky. Biologicky aktivní aminy vznikají převážně dekarboxylací aminokyselin, působením enzymů dekarboxyláz (viz. obr. 1). Mimo jiné mohou také vznikat aminací, či transaminací aldehydů a ketonů, díky enzymům transaminázám [1,2,3].



Obr. 1. Dekarboxylace aminokyselin [2]

Biogenní aminy mohou být vytvářeny přirozenou metabolickou aktivitou u lidí, zvířat, rostlin, ale zejména mikroorganismů. Některé aminy mají vliv na cévní a nervový systém lidského organismu. Tzv. endogenní biogenní aminy jsou jako produkty metabolismu v nízkých koncentracích přirozenou složkou prakticky všech potravin. Exogenní aminy vznikají v potravinách jako důsledek mikrobiální kontaminace a při kvasných procesech. Bakterie způsobující kažení potravin disponují velkým množstvím enzymů, jež jsou zodpovědné za dekarboxylaci aminokyselin [2,3,4].

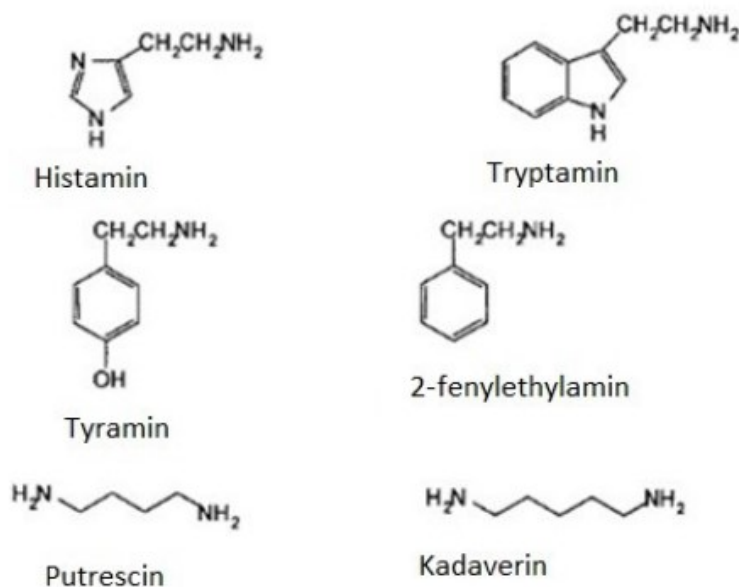
Mezi nejrozšířenější biogenní aminy v potravinách patří histamin, tyramin, 2-fenylethylamin, kadaverin, spermin, spermidin a putrescin. Mají důležitou fyziologickou funkci, ale pokud se v organismu vyskytují v příliš vysoké koncentraci, mohou mít negativní, až toxický účinek. Jsou zdrojem prekurzorů pro syntézu hormonů, dusíku, nukleových kyselin a proteinů [1,5,6].

1.1 Klasifikace biogenních aminů

Biogenní aminy jsou dusíkaté, bazické sloučeniny s různou biologickou aktivitou, které mohou být klasifikovány na základě počtu aminových skupin, chemické struktury, biosyntézy nebo fyziologické funkce. Podle počtu aminoskupin se aminy dělí na monoaminy (tyramin, fenylethylamin), diaminy (histamin, tryptamin, putrescin, kadaverin) nebo polyaminy (spermin, spermidin). Na základě chemické struktury se nejčastěji vyskytující biogenní aminy dělí do několika skupin [3]:

- Aromatické aminy – tyramin a fenylethylamin
- Heterocyklické aminy – histamin a tryptamin
- Alifatické aminy – kadaverin, putrescin, spermin a spermidin

Podle způsobu syntézy jsou rovněž děleny na přírodní a biogenní. Přírodní aminy vznikají během biosyntézy *de-novo* a je zapotřebí jejich prekurzorů. Posledním nejčastěji využívaným způsobem klasifikace je rozdělení na základě fyziologické funkce, a to na biogenní aminy a polyaminy. Polyaminy hrají důležitou roli v období růstu, zatímco biogenní aminy jsou neuro- a vazoaktivní. Na obrázku 2 jsou zobrazeny chemické struktury běžných biogenních aminů [3,7,8,9].



Obr. 2. Chemická struktura nejběžnějších biogenních aminů [5]

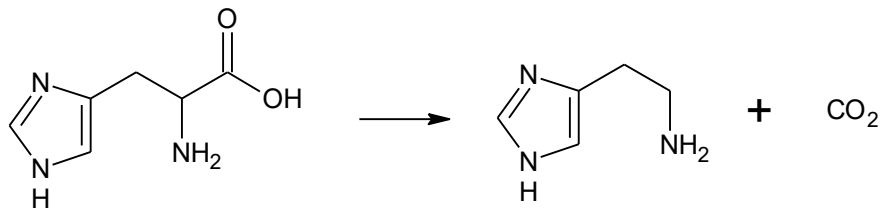
1.2 Vznik biogenních aminů

Biogenní aminy jsou syntetizovány a degradovány zvířaty, rostlinami a mikroorganismy, a proto se vyskytují ve významné části potravinářských výrobků. Při vzniku aminů v potravinách přichází v úvahu tři možné způsoby: dekarboxylace, aminace aldehydů a ketonů nebo odbourání vazeb s obsahem dusíku. Nejčastějším způsobem syntézy aminů je dekarboxylace prekurzorových aminokyselin. Předpoklady pro tvorbu aminů v potravinách tímto způsobem jsou dostupnost volných aminokyselin, vysoké teploty zpracování, přítomnost dekarboxyláza-pozitivních mikroorganismů a vhodné podmínky pro růst a aktivitu těchto mikroorganismů. Jako prekurzory mohou být také využívány aminokyseliny uvolňované z bílkovin výsledkem proteolytické aktivity, či tepelné

denaturace. Syntéza biogenních aminů mikroorganismy probíhá v cytoplazmě a následně jsou produkty pomocí aktivního transportu dopraveny mimo buňky. Obecně dochází k transportu prekurzorové aminokyseliny do cytoplazmy pomocí specifického proteinu výměnou za vzniklý biogenní amin, který je dopraven vně buňky [3,7,8,9,10].

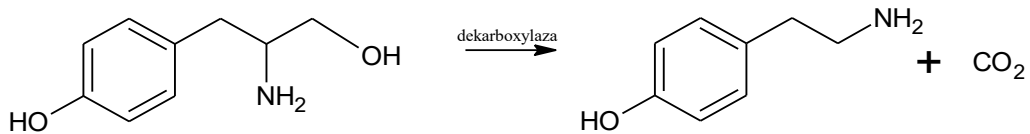
Prekurzory hlavních biogenních aminů vyskytujících se v potravinách [3,11]:

- Histidin → histamin



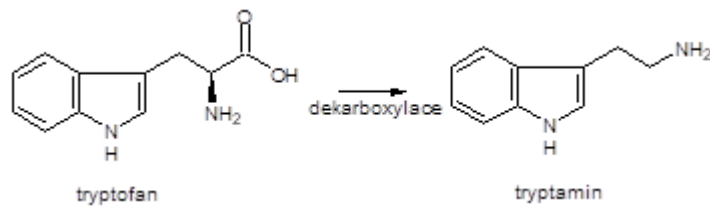
Obr. 3. Dekarboxylace histidinu za vzniku histaminu [9]

- Tyrozin → tyramin



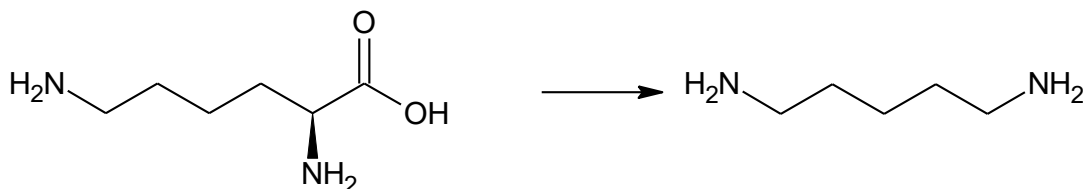
Obr. 4. Dekarboxylace tyrozinu za vzniku tyraminu [11]

- Tryptofan → tryptamin



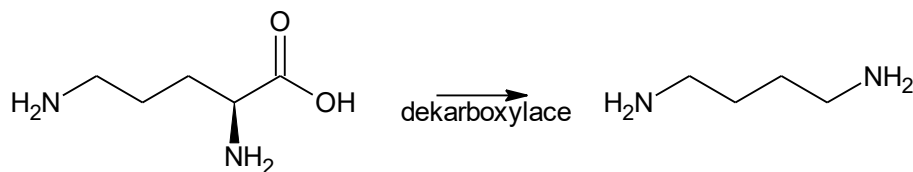
Obr. 5. Dekarboxylace tryptofanu na tryptamin [11]

- Lyzin → kadaverin



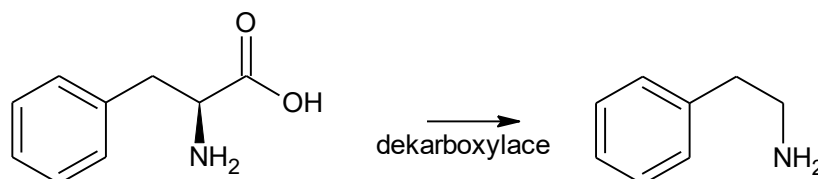
Obr. 6. Dekarboxylace lyzinu [11]

- Ornitin → putrescin



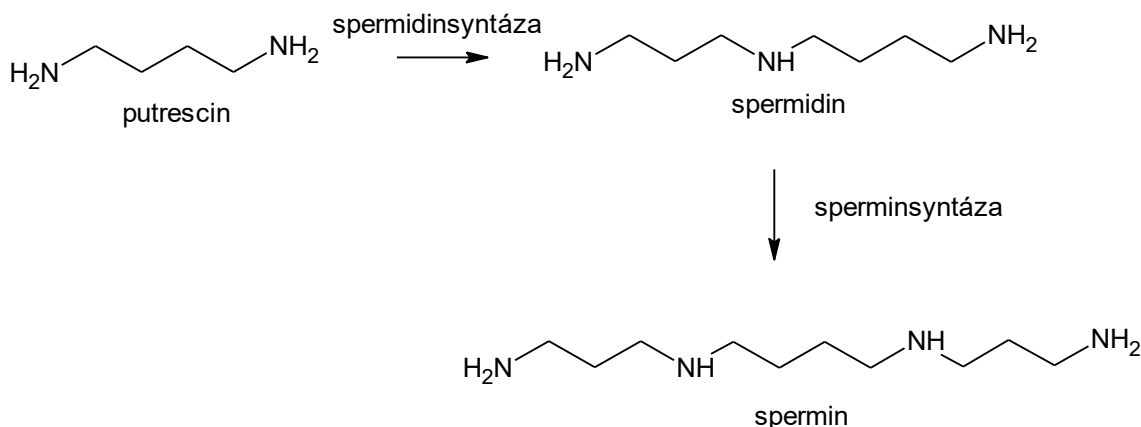
Obr. 7. Dekarboxylace ornitinu za vzniku putrescinu [11]

- Fenylalanin → fenylethylamin



Obr. 8. Dekarboxylace fenylalaninu za vzniku 2-fenylethylaminu [11]

- Putrescin → spermin, spermidin



Obr. 9. Syntéza spermidinu a sperminu [11]

1.3 Význam a funkce biogenních aminů

Biogenní aminy jsou vytvářené, metabolizované a za určitých podmínek hromaděné během látkové přeměny u člověka, zvířat, rostlin a mikroorganismů. Účastní se a také ovlivňují řadu metabolických procesů (regulace tělesné teploty, příjem potravy, zvyšování krevního tlaku, ...). Kromě jejich biologické úlohy jako zdroje dusíku, prekurzorů nukleových kyselin, hormonů, alkaloidů a proteinů, jsou aminy důležitou složkou potravinářských aromatických látek a prekurzory pro syntézu karcinogenních látek N-nitrososloučenin. Polyaminy (putrescin, spermin a spermidin) jsou důležitou součástí všech živých buněk, kde jsou nezbytné pro jejich růst. Největší potřeba polyaminů je u rychle rostoucích tkání. Každá

buňka je schopna syntetizovat polyaminy, ale toto množství není pro organismus dostačující, a proto je potřeba polyaminy přijímat rovněž ve stravě [3,8,9].

Významově BA můžeme obecně rozdělit do tří skupin na psychoaktivní, neuroaktivní a vazoaktivní. Psychoaktivní aminy, jako je histamin, působí na nervový systém v centrální nervové soustavě. Vazoaktivní aminy působí přímo, či nepřímo, na cévní soustavu. Například tyramin, tryptamin a fenylethylamin způsobují zvýšení krevního tlaku zúžením cév a zvýšení srdeční frekvence spolu se srdečními kontrakcemi [8,11].

Konkrétní význam jednotlivých biogenních aminů je vzhledem k jejich rozmanitosti velmi odlišný. Histamin je silná biologicky aktivní látka, která může v těle vyvolat mnoho reakcí. Žírné buňky a bazofily obsahují velké množství histaminu umístěného ve speciálních granulích. Účinky histaminu se však projeví až díky tzv. alergické reakci, při níž dojde k uvolnění histaminu do krevního řečiště. Histamin může rovněž vykazovat hypotenzní účinky, tzn. snižovat krevní tlak. Může přímo stimulovat srdce, způsobit kontrakci nebo relaxaci extravaskulárního hladkého svalstva, řídit sekreci žaludeční kyseliny a zprostředkovat primární a okamžité příznaky alergické reakce. Fenylethylamin a tyramin způsobují zvýšení krevního tlaku, tyramin je absorbován do nadledvin a způsobuje masivní uvolňování noradrenalinu. Tyramin má rovněž významný antioxidační účinek, který se zvyšuje s jeho koncentrací. Tryptamin spolu s fenylethylaminem mohou inhibovat a stimulovat uvolňování katecholaminů a serotoninu. Zavádění tryptaminu může rovněž způsobit uvolňování prostaglandinu a jiných vazoaktivních látek do systémového oběhu. Putrescin a kadaverin byly identifikovány jako potenciátory, které mohou zesilovat toxicitu histaminu. Biogenní aminy, jako jsou putrescin, kadaverin, spermin a spermidin jsou schopny vylučovat volné radikály a inhibovat oxidaci polyenových masných kyselin, tento účinek navíc koreluje s počtem aminoskupin obsažených v těchto polyaminech. Polyaminy jsou nezbytnou součástí celého života buněk, kde hrají zásadní roli v metabolismu, růstu a diferenciaci. Mají různé elektrostatické vlastnosti. Interakcemi s makromolekulami, zejména DNA, RNA a proteiny, se podílí na regulaci a stimulaci jejich syntézy. Polyaminy rovněž stabilizují strukturu tRNA, pomáhají kondenzovat DNA, kovalentně modifikují proteiny a stimulují rychlost transkripce [3,8,9].

1.4 Toxicita biogenních aminů

Zdraví jedinci mohou metabolizovat přítomné aminy v potravinách oxidací nebo acetylací. Biogenní aminy jsou oxidovány monoaminoxidázami (MAO) a diaminoxidázami (DAO),

zatímco polyaminy jsou obvykle acetylovány a až poté oxidovány polyaminoxidázami (PAO). Aminy v potravinách proto většinou nepředstavují jakékoli zdravotní riziko. Mohou však nastat problémy pokud jsou přijímány v nadměrném množství, když je přirozený mechanismus jejich katabolizmu v organismu geneticky nedostatečný nebo narušený některými chorobami [8,12].

Jednotlivci s respiračními a koronárními problémy, hypertenzí nebo s nedostatky vitamínu B12 jsou více ohroženi, protože jsou citlivější již k nižšímu množství biogenních aminů. Muži s gastrointestinálními problémy (gastritida, Crohnova choroba, žaludeční vředy) jsou rovněž více ohroženi, jelikož aktivita oxidáz v jejich střevech je obvykle nižší, než u zdravých jedinců. Pacienti užívající léky, které jsou inhibitory MAO, DAO a PAO aktivity jsou také ohroženi, vzhledem ke schopnosti léků zpomalovat, či zastavovat katabolizmus aminů. Tyto inhibitory se používají k léčbě stresových onemocnění, deprese, Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby nebo plicní tuberkulózy. Přirozeným inhibitorem oxidáz je také alkohol [8,12,13,14].

Potenciálně nejtoxičtější jsou z biogenních aminů histamin a tyramin. Histamin je považován za původce několika typů otrav z potravin, nejčastěji bývá spojován se zkaženými rybami skombroidního typu a s některými sýry. Toxické účinky histaminu byly pozorovány především při konzumaci zkažených, či rozložených ryb tmavého masa, patřících do čeledi *Scombroidae*, jako jsou makrela a tuňák. Otravy však mohou způsobovat také jiné skupiny ryb, jako jsou například sardinky, sledě, mečouni a další, u nichž byly rovněž zaznamenány incidenty s histaminem. Navíc u ryb uložených v chladu může množství histaminu podpořit přítomnost psychrotrofních bakterií schopných jeho produkce. Koncentrace histaminu v rozložených částech ryb může být až 500 mg/kg, liší se však v různých partiích. U ryb bývá častým problémem jejich dlouhodobé skladování a tedy jejich kažení, což je spojeno se zvýšenou produkcí biogenních aminů. Důležité je, že pokud dojde k vytvoření histaminu a dalších aminů, nelze je již inhibovat vařením, mražením, či konzervováním. Pokud je tedy histamin v rybě přítomen, nepomůže k jeho inaktivaci ani následný správný postup vaření nebo mražení. Histamin je navíc jediný biogenní amin, který podléhá právním předpisům u některých druhů ryb s horní hranicí 100 mg/kg (Nařízení Komise 2073/2005). Vedle ryb je další rizikovou potravinou starší (dlouho zrající) čedar a některé sýry švýcarského typu. Příjem potravin se zvýšeným obsahem histaminu může vést k jeho vstupu do systémového oběhu a způsobit nepříznivé zdravotní účinky [13,15,16,17].

Tab. 1. Toxické účinky histaminu [5,8,15]

Biogenní amin	Potravina	Příznaky
Histamin	<ul style="list-style-type: none"> • Scombroidní ryby: makrela, tuňák, • Ostatní ryby: sardinky, sled' • Sýr: gouda, švýcarský, čedar 	<p>Gastrointestinální: nevolnost, křeče v břiše, zvracení, průjem,</p> <p>Neurologické: pulsující bolest hlavy, pálení v krku, svědění, slabý puls, závratě, brnění, mravenčení</p> <p>Hemodynamické: hypotenze, dilatace kapilár</p> <p>Kožní: vyrážka, kopřivka, lokalizovaný zánět</p> <p>Vzácné případy: udušení, těžké respirační potíže</p>

Toxicita tyraminu se může projevovat podobnými účinky jako u histaminu, například bolestí hlavy, horečkou, zvýšeným krevním tlakem, zvracením, pocením, slzením, dušností a zdrojem bývají nejčastěji některé druhy sýrů, pivo nebo víno. Pro tyramin je toxická dávka asi okolo 20-80 mg/kg potraviny. U putrescinu, sperminu, spermidinu a kadaverinu dosud nebyly zjištěny žádné negativní zdravotní účinky, ale mohou reagovat s dusitanem za vzniku karcinogenních N-nitrosoaminů a také bývají považovány za ukazatele kažení potravin. Bylo prokázáno, že tryptamin má negativní účinky na zdraví projevující se zvýšením krevního tlaku. Stanovení jednotlivé toxické dávky biogenních aminů je velmi obtížné, jelikož je silně závislá na účinnosti detoxikačních mechanismů každého jedince [8,13,15].

1.5 Stanovení biogenních aminů

Pro analýzu BA v potravinách byly vyvinuty různé metody, jako například tenkovrstvá chromatografie, plynová chromatografie, kapilární elektroforéza a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Vzorky musí být nejdříve předčištěny, nejčastěji extrakcí z potravinové matrice pomocí vhodného extrakčního činidla. U masa a masných výrobků jsou zdánlivě nejúčinnější činidla kyselina trichloroctová, chloristá, chlorovodíková, či methanol. Tenkovrstvá chromatografie je jednoduchá, nevyžaduje speciální vybavení, není příliš časově náročná, ale bohužel nepodává dostatečně přesné výsledky, proto není často

využívána. Plynová chromatografie se pro biogenní aminy rovněž příliš nevyužívá. Nejvyžívanější metodou pro stanovení a kvantifikaci aminů je HPLC s předchozí derivatizací. Vzhledem k nedostatku chromoforů v nativních molekulách se pro většinu derivatizačních postupů používají například dansyl, dansylchlorid, benzoylchlorid nebo oftalaldehyd. Oftalaldehyd může snadno reagovat s primárními aminoskupinami během přibližně 30 sekund v přítomnosti redukčních činidel (N-acetylcystein), deriváty však nejsou příliš stabilní. Dansyl a dansylchlorid reagují s oběma primárními i sekundárními aminoskupinami a poskytují tak stabilní deriváty. Nejčastějším činidlem pro derivatizaci je dansylchlorid. Pro detekci těchto konečných produktů se využívají fluorescenční, ultrafialové a elektrochemické detektory [5,13].

1.6 Produkce biogenních aminů bakteriemi

V potravinách se biogenní aminy tvoří především důsledkem mikrobiální dekarboxylace aminokyselin. Tvorba aminů v potravinách je podmíněna dostupností volných aminokyselin, přítomností mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou a také vhodnými podmínkami pro růst a metabolismus těchto mikroorganismů. Bylo zjištěno, že nejvyšší aktivita dekarboxyláz je během stacionární fáze růstu mikroorganismů. Nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím množství aminů je teplota. Volné aminokyseliny se buď vyskytují v potravinách jako takové nebo mohou být uvolňovány proteolýzou bílkovin během zpracovávání. Mikroorganismy produkující dekarboxylázy jsou součástí přidružených mikrobiot nebo jsou do potravin zavedeny kontaminací před, během, či po výrobě. I když nejsou aminokyselinové dekarboxylázy mezi bakteriemi příliš rozšířeny, existují druhy jednotlivých rodů bakterií, jež těmito enzymy disponují. Mezi tyto rody můžeme zařadit *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Phobobacterium* a rody bakterií mléčného kvašení, např. *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus*, které jsou schopny dekarboxylace jedné, či více aminokyselin. U fermentovaných potravin a nápojů velmi často ovlivňují produkci biogenních aminů startérové kultury, které se během fermentace využívají. Bakterie mléčného kvašení jsou tedy mnohdy odpovědné za tvorbu biogenních aminů ve fermentovaných výrobcích [3,18,19,20].

Obsah biogenních aminů v potravinách je široce zkoumán a testován vzhledem k jejich nepříznivým zdravotním účinkům. Mezi jejich hladinami v potravinách rostlinného a živočišného původu existují značné rozdíly. Potravin y původem z rostlin obsahují vyšší

množství putrescinu, spermidinu a sperminu, ale podstatně nižší množství histaminu vzhledem k potravinám živočišným. Obecně lze tedy rostlinné potraviny považovat vzhledem k výskytu biogenních aminů za méně rizikové, zatímco potraviny vyrobené za pomoci mikrobiální fermentace, poměrně rizikové [18].

Mikroorganismy jako *Morganella morganii* (*Proteus morganii*), určité kmeny *Klebsiella pneumoniae* a několik kmenů *Hafnia alvei*, jsou významní producenti histaminu a jsou důležití v mikrobiální kontaminaci rybích produktů. Testováním bylo zjištěno, že mleté hovězí maso naočkované kmenem bakterie *Morganella morganii* obsahovalo histamin o koncentraci 595 pg/g, zatímco maso bez *M. morganii* obsahovalo 8,26 pg/g histaminu. Světélkující bakterie rodu *Photobacterium* jsou také možnou příčinou vzniku histaminu. Tyto mikroorganismy jsou halofilní a mohou být jak mezofilní, tak i psychofilní. Existují spekulace, že psychofilní bakterie *Photobacterium phosphoreum* může být primárně zodpovědná za produkci histaminu ve skombroidních rybách skladovaných při nízké teplotě. U *Escherichia coli* a *Pseudomonas* spp. byla detekována tyrozin- a histidin-dekarboxylázová aktivita. *Enterococcus faecalis* bývá velmi často spojován s vysokým obsahem tyraminu v sýru typu čedar. *Staphylococcus* spp., *Vibrio* spp. a *Pseudomonas* spp. byly označeny jako bakterie produkující histamin ve fermentovaných rybách. Z masa a masných výrobků byly také izolovány bakterie mléčného kvašení schopné produkovat biogenní aminy, například *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus curvatus*, nebo *Lactobacillus hilgardii*. Za laboratorních podmínek byla ve vhodném médiu zjištěna schopnost některých kmenů rodu *Proteus* a *Pseudomonas* produkovat tyramin. Nedávné výzkumy naznačily, že bakterie *Pediococcus cerevisiae*, účastnící se malolaktické fermentace může být v některých vínech považována za producenta histaminu. Během kvašení belgického piva bylo zjištěno, že koncentrace kadaverinu, putrescinu a sperminu kolísají v závislosti na vývoji různých druhů kvasinek, které mohou produkovat nebo využívat biogenní aminy svým metabolismem. V případě fermentovaných potravin a nápojů startovací kultury přímo, či nepřímo ovlivňují produkci biogenních aminů. Vhodná kritéria výběru pro použití jednotlivých bakterií jako startovacích kultur by měla zahrnovat analýzu schopnosti produkce aminů [3,19,20,21].

2 BIOGENNÍ AMINY VYSKYTUJÍCÍ SE V POTRAVINÁCH

Prakticky ve všech typech potravin obsahujících proteiny nebo volné aminokyseliny, a u nichž můžeme předpokládat podmínky umožňující mikrobiologickou a biochemickou aktivitu, lze očekávat přítomnost biogenních aminů. Jejich celkové množství závisí na druhu, povaze a původu jednotlivé potraviny a také na přítomnosti daného mikroorganismu. Každopádně může docházet k jejich změnám v průběhu výroby, zpracování, fermentace, či skladování. Biogenní aminy jsou však odolné vůči tepelnému opracování, jehož se využívá při zpracování potravin. Na základě této skutečnosti jsou považovány za vhodné ukazatele čerstvosti, kažení a stupně kvality čerstvých a zpracovaných potravinářských výrobků. Poukazují tedy na kvalitu použitých surovin a také na dodržování hygienických podmínek během výroby a zpracování. Biogenní aminy můžeme najít ve značné části potravin, jak jsou maso a masné výrobky, ryby a výrobky z nich, mléko a mléčné výrobky, ovoce, zelenina, pivo, čokoláda a další [3,7,9].

2.1 Ryby

U ryb se přirozeně vyskytuje určité množství biogenních aminů. Za normálních fyziologických podmínek je v rybí svalovině vysoké množství sperminu a spermidinu a nízké hladiny histaminu a putrescinu. Koncentrace jednotlivých aminů jsou závislé na mnoha faktorech, jako jsou druh ryby, genetika, fyziologický stav, pohlaví, prostředí a dalších. Existuje však skupina tzv. skombroidních ryb, které jsou náchylné ke zvýšené tvorbě histaminu, a to z důvodu velkého množství volného histidinu, jež je prekurzorem pro tvorbu histaminu. Tato skupina je tedy nejčastěji spojována s incidenty intoxikace histaminem. Histidin bývá v rybí svalovině katabolizován dvěma způsoby. Deaminace aminokyseliny za cílem získání kyseliny urokanové nebo histidinová dekarboxylace za vzniku histaminu. Za normálních fyziologických podmínek je primární cestou deaminace histidinu, ale za určitých okolností, jako je bakteriální kontaminace, může převažovat dekarboxylační aktivita. Mezi ryby s vysokým obsahem histaminu se považují rozložené ryby s tmavou svalovinou, zejména tuňák, makrela, mečoun, sardinka a sled'. Kromě histaminu je u těchto skupin také charakteristická přítomnost i dalších biogenních aminů, což může intoxikace histaminem podporovat. Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících koncentraci biogenních aminů u ryb, je mikroflóra, jež se na nich vyskytuje. U některých bakterií bylo zjištěno, že pro svůj optimální růst produkují putrescin a kadaverin, jež se následně spojují s peptidoglykanem jejich buněčné stěny. Bylo provedeno několik studií, které potvrdily, že

produkce biogenních aminů je podpořena nedodržováním a zneužíváním požadovaných teplot uchovávání ryb [3,8,15,16].

2.2 Sýry a další mléčné výrobky

Obecně je výskyt biogenních aminů v mléce a mléčných výrobcích nízký, až na sýry. Po rybách je sýr další nejčastěji spojovanou potravinou s histaminovou otravou a nesnášenlivostí biogenních aminů. Sýr je také jedním ze základních zdrojů výživy schopný způsobovat migrénu u dětí i dospívajících v důsledku přítomnosti biogenních aminů ve vyšších koncentracích. Běžně se v kravském mléce vyskytují převážně polyaminy. Převládající je spermin (asi 34 %), následuje putrescin (asi 17 %), dále spermidin (asi 15 %) a fenylethylamin se serotoninem, u nichž byl zjištěn obsah okolo 15-16 % z celkového množství biogenních aminů. U jogurtů a dalších produktů vyráběných z pasterovaného mléka je množství biogenních aminů podstatně nižší. Z mléčných výrobků jsou náchylnější k akumulaci aminů zejména fermentované výrobky, nejčastěji zrající sýry, u nichž můžeme očekávat zvýšenou koncentraci zejména tyraminu. Zde většinou tyramin, putrescin a kadaverin překračují hranici 100 mg/kg. Navíc u některých sýrů vyrobených z ovčího a kozího mléka, byla zjištěna koncentrace tyraminu až okolo 1000 mg/kg. Množství aminů se může lišit u stejných typů, dokonce u stejného výrobku, například při porovnání mezi kůrkou a středem sýra bude hodnota odlišná. U sýrů vyrobených ze syrového mléka jsou hladiny aminů převážně vyšší než u sýrů vyrobených z mléka pasterovaného. Koncentrace biogenních aminů se tedy u sýrů může značně lišit a závisí na mnoha faktorech, včetně teploty skladování, doby zrání, technologie zrání a mikrobiální populace. Také bylo zjištěno, že omývání povrchu zrajících sýrů během zrání způsobuje snížení hladiny histaminu, tyraminu a polyaminů [8,14,15,16].

2.3 Maso a masné výrobky

Biogenní aminy jsou přírodní složky mnoha potravin, a to včetně masa. Maso je velmi citlivé na chemické a fyzikální změny během skladování čerstvého masa a během procesu zpracování na masné výrobky. Protože jsou biogenní aminy produkty mikrobiální aktivity a jsou poměrně odolné vůči tepelnému zpracování, jsou považovány za index kvality čerstvého a zpracovaného masa. Navíc také poukazují na kvalitu použitého materiálu a na hygienické podmínky převládající během jeho zpracování. Vysoká hladina biogenních

aminů u nefermentovaných potravin naznačuje nežádoucí účinky mikrobiální aktivity [3,6,8,16].

Přirozeně se v maso vyskytují spermin, spermidin a putrescin. Čerstvé a zpracované vepřové maso obsahuje vysoké hladiny adrenalinu, sperminu a spermidinu a naopak nízké hladiny noradrenalinu, putrescinu, kadaverinu, tyraminu a histaminu. Výskyt aminů byl zaznamenán také po vaření. Hladiny byly srovnatelné ve vařeném i nevařeném vepřovém a hovězím maso. U prsního a stehenního kuřecího masa byly zjištěny vysoké hladiny sperminu, spermidinu a stopy putrescinu a kadaverinu ihned po porážce. Spermin byl převládajícím aminem kuřecího masa, kdy tvořil až 70% z celkového množství aminů. Ve stehnech byly navíc stanoveny nižší koncentrace histaminu. U hovězího masa byl převládajícím aminem rovněž spermin, následovaný spermidinem. V některých partiích byl zjištěn nižší obsah histaminu. Histamin byl také stanoven u masa ovčího. Doba skladování masa má výrazný vliv na biogenní aminy, tím že zvyšuje jejich obsahy [3,7,8].

Vařené masné výrobky, jako jsou šunka a mortadela, vykazovaly prevalenci sperminu nad spermidinem, podobně jako u masa čerstvého. Koncentrace však byly podstatně nižší, v důsledku naředění čerstvého masa ostatními složkami použitými při výrobě. Nejběžnějším zdrojem biogenních aminů jsou však fermentované masné výrobky, zejména trvanlivé fermentované klobásy. Během fermentace, zrání a skladování suchých fermentovaných uzenin, nastávají vhodné podmínky pro zvýhodnění aktivity mikroorganismů nesoucích enzymy dekarboxylázy, a tedy i akumulaci BA. Kromě přítomnosti mikroorganismů, je akumulace ovlivněna řadou faktorů, jako je surovinové složení (maso), velikost klobás, přísady (sůl, sacharidy, dusitany), doba fermentace a podmínky skladování. Hlavní producenti biogenních aminů u fermentovaných masných výrobků jsou bakterie mléčného kvašení, které se používají jako startérové mikroorganismy (*Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*). U suchých fermentovaných výrobků byl převažující tyramin, následovaný putrescinem. Přítomny byly také fenylethylamin a tryptamin, ty se ale vyskytovaly v nižších koncentracích [3,6,8,18].

2.4 Ovoce a zelenina

Nejdůležitějším aminem u této skupiny je putrescin, který je přítomen téměř u všech rostlin. Spolu s putrescinem se často vyskytují také polyaminy spermin a spermidin, jelikož putrescin je pro zmíněné polyaminy prekurzorem. Polyaminy jsou pro rostliny velice důležité, protože hrají klíčovou roli v procesech, jako jsou růst kořenů, somatická

embryogeneze, kontrola intracelulárního pH, vývoj květu a samotného ovoce, reakce na abiotický stres, osmotický šok, sucho a další. Navíc jsou tyto aminy schopny vychytávat volné radikály. Ovoce, jako jsou pomeranče, maliny, citrony, grapefruity, černý rybíz, jahody nebo hrozny obsahují různé biogenní aminy v různých koncentracích. Vysoké hladiny aminů byly pozorovány v pomerančové šťávě (noradrenalin, tryptamin), rajčatech (tyramin, tryptamin, histamin), banánu (tyramin, noradrenalin, tryptamin, serotonin), švestkách (tyramin, noradrenalin) a špenátových listech (histamin). Přírozenou součástí kakaových bobů je fenylethylamin, který se tedy rovněž vyskytuje v čokoládě a cukrovinkách obsahujících čokoládu. Vysoké hladiny fenylethylaminu byly také pozorovány u některých druhů hub a v černém a bílém pepři. Histamin a kadaverin byly stanoveny v karagananu z mořských řas [3,8,22].

2.5 Fermentovaná zelenina

Tento druh zeleniny se často připravuje v domácnostech, ale také průmyslově. Jedná se zejména o zelí, okurky, zelený pepř, červenou řepu, květák, rajče nebo cibuli. Fermentační proces může být prováděn spontánně, kdy kvašení řídí přirozená mikroflóra bakterií mléčného kvašení zeleniny nebo řízeně pomocí startérových mikroorganismů (nejčastěji *Lactobacillus*)[3,18].

Typickým příkladem fermentované zeleniny je kysané zelí, které obsahuje znatelné množství mikroorganismů a lze tedy u něj předpokládat výskyt biogenních aminů. Zelí je v mnoha evropských zemích velice populární vzhledem ke svým sensorickým vlastnostem a nutriční hodnotě. Mezi mikroorganismy přispívající k fermentaci zelí patří zejména *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus*, a *Enterococcus*. Obsah biogenních aminů v zelí je ovlivněn odrůdou zelí, podmínkami při kvašení (teplota, změny pH, přístup kyslíku), startérovými mikroorganismy a bakteriální kontaminací. Hlavní aminy, které zde nalezneme, jsou putrescin, který se hromadí v solném nálevu, dále histamin, tyramin a kadaverin. V některých případech byl zjištěn obsah histaminu v rozmezí od 5 – 20 mg/100 g zelí. Během sledování akumulace aminů při spontánní fermentaci čínského zelí byl zjištěn obsah putrescinu okolo 45 mg/kg, kadaverinu 35 mg/kg a tyraminu 38 mg/kg. Bylo také potvrzeno, že po zaočkování zelí startéry došlo ke snížení obsahu biogenních aminů. Mezi tuto skupinu potravin můžeme dále zařadit fermentované sójové výrobky, jako jsou miso, natto, tofu, sufu, tempeh nebo sójová omáčka. Miso a sójová omáčka obsahují nejvíce tyraminu a histaminu. V některých fermentovaných

výrobci, například sufu a toshi byly stanoveny vysoké hladiny biogenních aminů, dokonce i nad 100 mg/100 g. Tyramin byl také nalezen ve fermentovaných solených černých fazolích (45 mg/kg) a v krevetové omáčce (24 mg/100 g). V tabulce 2 jsou znázorněny hodnoty biogenních aminů zjištěny u jednotlivých fermentovaných zeleninových výrobků [3,8,16,18].

Tab. 2. Obsah biogenních aminů ve fermentované zelenině [16]

Fermentovaná zelenina	Přítomný amin	Množství (mg/100 g)
Kysané zelí	Histamin	0,7 – 20,0
	Tyramin	2,0 – 9,5
	Kadaverin	0,3 – 3,0
	Putrescin	0,1 – 4,0
Solené černé fazole	Tyramin	45,0
Krevetová omáčka	Tyramin	24,5
Sójová omáčka	Histamin	0,0 – 274
	Tyramin	0,0 – 466
	Tryptamin	0,0 – 93,0

2.6 Alkoholické nápoje

Jedná se o další kategorii fermentovaných potravinářských výrobků, které někdy obsahují značné množství biogenních aminů. U alkoholických výrobků patří aminy mezi hlavní faktory určující jejich kvalitu. Vysoké hladiny mohou způsobit, že produkt není vhodný pro užívání z toxikologického hlediska. Aminy však mohou být také významné v oblasti aroma a chuti. Ve fermentovaných produktech jsou hlavní sledované aminy tyramin a histamin [8,18].

2.6.1 Víno

U vína je známo, že obsahuje hodně biologicky aktivních sloučenin. Jejich množství a složení závisí na druhu hroznů, jejich zralosti, podnebí a půdě ve vinařské oblasti. Aminokyseliny představují hlavní substrát pro syntézu biogenních aminů ve víně. Biogenní aminy primárně vznikají během a po spontánní malolaktické fermentaci dekarboxylací prekurzorových aminokyselin. Provedené průzkumy vína dokázaly, že vinařská technologie má větší vliv na tvorbu biogenních aminů než zeměpisný původ, odrůda hroznů a ročník. Hodnota pH má také výrazný vliv, čím vyšší pH tím vyšší bude obsah biogenních aminů ve víně. V některých chladnějších a deštivějších ročních obdobích byl zjištěn nižší obsah aminů v hroznech. Bílá vína obecně obsahují nižší hladiny aminů, zatímco červená vyšší. Obecně

se uvádí, že vína obsahují méně než 10 mg aminů na 1 litr. Dominantní BA ve vínech jsou ornithin, putrescin a tyramin. Je známo, že bakterie rodů *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Oenococcus* jsou zapojeny do tvorby BA ve víně. Různé kmeny *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus buchneri* a *Lactobacillus brevis* produkují různé druhy BA. *Leuconostoc mesenteroides* má vysoký potenciál na produkci tyraminu nebo ornithinu v tomto fermentovaném nápoji. U určitých červených vín byl zaznamenán vyšší obsah histaminu. Z tohoto důvodu bylo v některých evropských státech, které ovlivňují dovoz a vývoz vína, zavedeno doporučení ohledně přijatelného množství histaminu ve víně. Maximální doporučená hranice byla určena na 10 mg/l [8,16,18,23].

2.6.2 Pivo

Pivo je charakterizováno jako alkoholický nápoj vyrobený ze surovin obsahujících škrob, který slouží jako zdroj maltózy a glukózy a ty jsou fermentovány pivovarnickými kvasinkami. Piva mohou být rozdělena na dva typy, dle způsobu kvašení. První je svrchní kvašení, kdy se kvasinky na konci fermentace vznášejí a druhé spodní kvašení, kdy kvasinky na konci fermentace sedimentují. Kromě *Saccharomyces cerevisiae* (svrchní kvašení) a *Saccharomyces carlsbergensis* (spodní fermentace), se do kvašení zapojují různé divoké kvasinky spolu s některými BMK, zejména u speciálních druhů. Agmatin a putrescin byly detekovány jako převládající biogenní aminy v pivech. Obsah BA v pivu je ovlivněn mnoha faktory, jako jsou odrůda ječmene používaná při vaření, sladovací technologie, zpracování mladiny a podmínky během fermentace. Přítomnost vyššího množství histaminu a tyraminu je spojována s mikrobiální kontaminací během vaření piva (především během kvašení) a byla zaznamenána u některých piv. Během kvašení může dojít ke kontaminaci mladiny bakteriemi mléčného kvašení s dekarboxylázovou aktivitou a tedy k tvorbě zejména tyraminu a histaminu. Na rozdíl od toho putrescin, agmatin, spermin a spermidin jsou považovány za přirozené složky piva a vznikají ve sladu, zatímco tyramin a fenylethylamin jsou přítomny v chmelu. U vzorků polských piv byl stanoven celkový obsah biogenních aminů okolo 17 mg/l, z toho byl nejvíce zastoupen spermin, poté spermidin a putrescin. Putrescin a agmatin byly převládající aminy nalezeny u vzorků belgického piva, přítomnost putrescinu byla navíc daleko vyšší u piva kvašeného spontánně, než u jiných typů kvašení. U vzorků portugalského piva byly převažující putrescin a tyramin. Některá piva měla vyšší obsah histaminu. Švédská piva obsahovala až 5 mg/l histaminu, dánská v některých případech až 15 mg/l a francouzská až 20 mg/l [3,8,16,18,24].

2.6.3 Cider – kvašený jablečný mošt

Cider je alkoholický nápoj vyrobený z jablečné šťávy, která se konzumuje po minimálně 3 měsíční fermentační době. V závislosti na přídavku cukru a CO₂ se dělí na cidery šumivé a přírodní. Během zpracování přírodního moštu dochází ke dvěma typům spontánního kvašení. Jedná se o alkoholové a malolaktické kvašení, jež je zprostředkováno přirozenými kvasinkami a bakteriemi mléčného kvašení, které nejsou očkovány jako startéry. Nejhojnější rody bakterií mléčného kvašení v jablečném moštu byly *Lactobacillus* a *Oenococcus*. Některé kmeny z těchto rodů byly identifikovány jako producenti biogenních aminů, zejména *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus diolivorans* a *Oenococcus oeni* jako producenti histaminu a *L. diolivorans* a *O. oeni* jako producenti tyraminu. Kmeny *L. collinoides*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus mali*, *Leuconostoc mesenteroides*, a *O. oeni* izolované z francouzských jablek, byly identifikovány jako potenciální producenti putrescinu. Některé jablečné mošty byly testovány v závislosti na jejich původu. Průměrný celkový obsah biogenních aminů u španělských moštů byl 19 mg/l a u moštů francouzských okolo 6,5 mg/l. Tabulka 3 znázorňuje výskyt aminů v daných nápojích [18,25,26,27].

Tab. 3. Biogenní aminy v alkoholických nápojích [16]

Nápoj	Přítomný amin	Množství (mg/l)
Americké červené víno	Histamin	0,2 – 15,5
	Kadaverin	4,0 – 47,0
	Putrescin	0,6 – 5,5
Americké bílé víno	Histamin	0,2 – 11,4
	Kadaverin	3,2 – 108,3
	Putrescin	0,7 – 11,7
Evropské červené víno	Histamin	0,0 – 30,0
	Tyramin	0,07 – 25,4
Evropské bílé víno	Histamin	0,0 – 20,0
	Tyramin	0,1 – 6,5
Americké pivo	Putrescin	3,7 – 7,1
	Tyramin	1,0 – 16,3
Kanadské pivo	Histamin	4,8 – 5,4
	Tyramin	11,7 – 17,6
Evropské pivo	Histamin	2,6 – 20,0
	Kadaverin	0,0 – 55,2
	Putrescin	2,6 – 6,6

3 MOŽNOSTI ŘÍZENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH

S ohledem na známá, či potenciální zdravotní rizika způsobena vysokou koncentrací biogenních aminů vznikají různé postupy a metody s cílem snížit tyto úrovně aminů v potravinách na co nejnižší hodnoty. Velmi důležitou operací je zlepšení hygienických podmínek během výroby a skladování potravin. Kromě správných hygienických postupů byla zavedena další opatření, jako jsou inhibice růstu mikroorganismů produkujících biogenní aminy, snížení proteolytické aktivity u fermentovaných výrobků, přídavek enzymů aminooxidáz nebo použití vhodné startovací kultury. Jedním ze základních faktorů působících a využívajících se pro inhibici aminů je teplota. Jejich tvorba klesá při nízkých teplotách, a to díky inhibici mikrobiálního růstu a enzymatické aktivity. Tvorba biogenních aminů tedy může být v potravinách kontrolována přísným dodržáním chladírenského řetězce. U potravin, které již obsahují vysoké hladiny aminů, dojde dodržováním nízkých teplot pouze ke stabilizaci této hladiny, nikoliv k jejímu snížení. Významnou metodou je také zmrazování, jež je dokonce účinnější než chlazení a také je hojně využíváno. Bohužel, ne vždy lze řídit tvorbu biogenních aminů pomocí snížené teploty, protože se objevují také mikroorganismy schopny jejich produkce i při teplotách okolo 5 °C. Z tohoto důvodu se začaly jako kontrolní opatření využívat nové metody zahrnující aplikace vysokých hydrostatických tlaků, ozařování, balení v modifikované atmosféře a použití potravinářských přídatných látek jako konzervantů. Jednotlivé metody bývají rozděleny do dvou skupin na metody zpožďující akumulaci biogenních aminů a metody redukující již vytvořené aminy [1,10,28].

3.1 Metody zpožďující a inhibující akumulaci biogenních aminů

Tyto metody bývají někdy označovány taky jako sekundární kontrolní opatření pro zabránění a zpomalování tvorby biogenních aminů v potravinách. Tyto metody pouze zpomalují akumulaci jednotlivých aminů v potravinách. Jsou založeny na principu inhibice bakterií, které jsou zodpovědné za tvorbu biogenních aminů, a tím pádem i na zpomalení akumulace jednotlivých aminů. Tyto metody zahrnují ošetření vysokým hydrostatickým tlakem, ozařování, balení v modifikované atmosféře, přídavky konzervačních látek, chlazení, zmrazování nebo různé způsoby tepelného ošetření [1,10].

3.1.1 Správné hygienické postupy

Zlepšení hygienických podmínek v celém výrobním řetězci může výrazně pomoci dosáhnout významného snížení biogenních aminů u různých potravin, a to zejména u mléčných výrobků. Toho lze dosáhnout pouze zavedením kvalitních programů a ověřování. Hygienické postupy a podmínky musí být dodrženy u všech fází produkce suroviny i potraviny, tedy od farem, až po konečné spotřebitele. Řada potravin, jako je maso a mléko, obsahuje kromě prospěšné mikroflóry také řadu kontaminujících mikroorganismů způsobujících jejich kažení. Může se jednat o různé mezofilní, psychrotrofní a psychrofilní mikroorganismy, které jsou navíc schopny produkovat různé biogenní aminy z různých substrátů. Čím jsou jejich počty v potravine vyšší, tím vyšší obsah aminů lze v potravine očekávat. Dobrá hygiena při primárním získávání surovin je nezbytná pro zajištění bezpečné úrovně biogenních aminů v produktech, ale pokud není podpořena správnou hygienou během výroby, není dostatečná k zajištění bezpečné úrovně biogenních aminů v konečných produktech [10].

3.1.2 Konzervační a přídatné látky

Přídatné látky a konzervanty jsou schopny snížit produkci biogenních aminů, a to tak, že inhibují růst jednotlivých mikroorganismů zodpovědných za jejich tvorbu. Kyseliny citronová, jablečná a jantarová inhibují dekarboxylázovou aktivitu a výslednou produkci histaminu. Bylo zjištěno, že kyselina citronová v kombinaci s chloridem sodným dokáže způsobit mírné snížení hladin aminů během fermentace nakládaného zelí. Masné výrobky, a to zejména klobásy obsahující sorban draselný vykazují výrazné zpomalení akumulace biogenních aminů. Další významnou konzervační látkou je dusitan sodný využívaný u uzených masných výrobků, který rovněž dokáže inhibovat tvorbu biogenních aminů. Cukr a glycin jsou taktéž schopny snížit aminotvornou aktivitu mikroorganismů [1,29].

V koření se přirozeně vyskytují specifické inhibiční látky. Tyto látky zahrnují například kurkumin (kurkuma), kapsaicin (červený pepř) a piperin (černý pepř). Nevýhodou u těchto látek je však značná ztráta jejich účinnosti, ke které dochází při vaření. Z výše uvedených sloučenin je nejvíce tepelně odolný kapsaicin, který je ale dosti štiplavý a vzrušuje primární smyslové receptory. Některé další složky koření, jako je thymol mohou navíc působit antioxidačně. U zázvoru, česneku, zelené cibule, papriky, hřebíčku a skořice bylo prokázáno, že zpomalují akumulaci biogenních aminů. Zázvor navíc působí pozitivně na lidský organizmus snižováním krevního tlaku a používá se pro léčbu hypertenzí. Ethanolové

extrakty z koření, šalvěje, hřebíčku a skořice také zpomalují hromadění biogenních aminů a jejich účinek je navíc zesílen přidavkem chloridu sodného [1,30,31].

Tvorba histaminu bakterií *Morganella morganii* a *Klebsiella pneumoniae* byla zpožděna v přítomnosti 0,5 % sorbanu draselného. *Bacillus licheniformis* je rovněž producentem biogenních aminů. Bylo prokázáno, že v přítomnosti 10% glycinu došlo k významné redukci putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu a spermidinu vytvořených touto bakterií. Mnoho studií prokázalo inhibiční účinky přídatných a konzervačních látek na akumulaci biogenních aminů, ale pravdou je, že v některých situacích mohou tyto látky tvorbu biogenních aminů také podporovat. Potravinářské přídatné látky a konzervanty by tedy měly být důkladně prostudovány vzhledem ke schopnosti zpomalování akumulace aminů a jejich pozitivní účinek by měl být testován v různých potravinových systémech [1,30].

3.1.3 Vysoký hydrostatický tlak

Ošetření vysokým hydrostatickým tlakem je metoda konzervace, při níž se nevyužívá tepelného záhřevu, jako u většiny konzervačních metod. Při daném ošetření dochází ke smrtelnému porušení buněčné membrány mikroorganismů nebo denaturaci enzymů. Velkou výhodou je vedle prodloužení životnosti také zachování originálních vlastností a chuti. Metoda se využívá zejména pro konzervaci ovocných pomazánek, ústřic, šunek, sýrů, zelí nebo ryb. Pokud se vysoký tlak aplikuje na suroviny nebo konečné produkty fermentace, může docházet ke snížení počtu mikroorganismů, a tedy i obsahu biogenních aminů. Například když byl vysoký tlak (200 MPa) použit na surovinu pro výrobu fermentovaných klobás, inhiboval růst enterobakterií a současně zpomalil hromadění putrescinu a kadaverinu. Ošetření vysokým hydrostatickým tlakem může být úspěšně použito k inaktivaci mikrobiálních kontaminantů v sýrech vyráběných ze syrového, tepelně neošetřeného mléka [1,29,32,33].

Důležitým parametrem při ošetřování je velikost aplikovaného tlaku. Například při zrání sýra byl při nízkotlakém ošetření 50 MPa pozorován rostoucí obsah biogenních aminů, ale při ošetření tlakem 400 MPa byl zaznamenán mírný pokles hladiny aminů. Ošetření fermentovaných klobás vysokým tlakem (350 MPa/15 min) redukuje populaci bakterií mléčného kvašení (o cca. 20 %) a také hladiny kadaverinu (12,5 %), putrescinu (8,7 %) a tyraminu (17 %) během 160 denního chladírenského skladování vzhledem k neošetřeným klobásám. Byla také zpracována studie porovnávající rozdíl v tvorbě biogenních aminů u mléka ošetřeného vysokým tlakem (500 MPa, 15 min) a tepelně ošetřeného mléka.

Výsledné hladiny byly srovnatelné u obou typů ošetření. Celkově existují pouze omezené informace o účinnosti působení vysokého tlaku na množství biogenních aminů prostřednictvím ošetření surovin. Studie navíc podávají důkazy o snížené, ale i zvýšené tvorbě biogenních aminů v důsledku ošetřování vysokým tlakem. Je možné, že toto ošetření ovlivňuje enzymy i bakterie zodpovědné za syntézu biogenních aminů [1,29,34,35].

3.1.4 Metoda ozařování

Ozařování je další metoda fyzikálního ošetření využívající se v oblasti konzervace potravin s cílem zajištění bezpečnosti a prodloužení trvanlivosti potravin a zároveň snižuje použití chemických konzervačních látek. Může také regulovat tvorbu biogenních aminů v potravinách, a to principem radiolýzy vytvořených aminů nebo inhibicí růstu mikroorganismů schopných jejich produkce. Radiolytická degradace byla pozorována u modelového systému, kdy bylo dosaženo úbytku až 95 % všech aminů. Pro objektivní posouzení účinnosti ozařování však musí dojít k důkladnému zkoumání v jednotlivých potravinových systémech, jelikož vysoké dávky mohou ovlivnit smyslovou kvalitu těchto potravin. Pro ozařování potravin byly povoleny různé dávky γ záření v závislosti na povaze potraviny, cílových mikroorganismech a na cílech ošetření (prodloužení použitelnosti, odstranění kontaminantů, atd.). Ošetření ozářením se využívá pro prodloužení trvanlivosti mnoha potravin, jako jsou hovězí a vepřové maso, klobásy, drůbež a ryby [1,10,36].

Biogenní aminy vytvořené bakterií *Bacillus cereus* v mletém hovězím a vepřovém masu po 24 hodinové kultivaci při 4 °C byly po ošetření γ zářením redukovány. U vepřových klobás bylo také zjištěno snížení obsahu biogenních aminů po ošetření γ zářením. Existují však důkazy, že za určitých podmínek nedochází po ozařování ke snížení obsahu některých aminů, ale naopak ke zvyšování hladiny jiných biogenních aminů. Například biogenní aminy v syrovém kuřecím masu byly použitím záření redukovány, ale některé hladiny aminů (histaminu, sperminu, spermidinu) byly zvýšeny. To může být vysvětleno tím, že záření způsobuje změnu struktury a fyziologických vlastností enzymů zodpovědných za tvorbu biogenních aminů. Mezi spotřebiteli však panuje neochota konzumovat ozařované potraviny vzhledem k nedůvěře v jejich bezpečnost. Dalším problémem je fakt, že pro vhodnou účinnost ozařování musí být většinou použity vyšší dávky záření, což je spojováno s chuťovými změnami ošetřovaných potravin [1,10,36].

3.1.5 Způsob balení potravin

Jedná se o způsob konzervace potravin založený na principu změny plynného prostředí, obklopujícího danou balenou potravinu. Tento postup může způsobit zpomalení produkce biogenních aminů díky inhibici mikroorganismů, či enzymů odpovídajících za jejich produkci. Bylo popsáno, že enzym histidindekarboxyláza je účinnější v nepřítomnosti kyslíku, kdežto histamináza, enzym rozkládající (oxidující) histamin, je účinný pouze v přítomnosti kyslíku. Jak anaerobní, tak aerobní mikroorganismy jsou schopny produkovat, ale také degradovat, biogenní aminy, proto je velmi obtížné stanovit rovnováhu, která bude řídit mikrobiální růst a enzymovou aktivitu [1,29].

Existují důkazy o snížené produkci biogenních aminů prostřednictvím balení. Jedná se zejména o vakuové balení (losos), balení v modifikované atmosféře (ryby, klobásy) a tzv. aktivní balení prostřednictvím aktivních obalů. Tyto aktivní obaly obsahují různé absorbenty plynu (kyslík, oxid uhličitý), které zabraňují styku plynů s povrchem potravin. Nejdéle prodlužuje trvanlivost potravin balení v modifikované atmosféře, poté vakuové balení a nejkratší trvanlivost mají potraviny balené v běžné atmosféře. Produkce histaminu u skladovaného tuňáka byla kontrolována balením v ochranné atmosféře s využitím směsi plynů o složení 40 % oxidu uhličitého a 60 % kyslíku. Tato metoda pomohla řídit hladiny histaminu inhibicí psychrotrofních mikroorganismů schopných jeho produkce. Další studie prokázala synergický účinek na zpomalování produkce histaminu při využití plynu o složení 40 % oxidu uhličitého a 60 % dusíku. Těchto poznatků je možno využít především u ryb skombroidního typu, u nichž velmi často dochází k problémům se zmiňovaným histaminem [1,22,29].

Jiné typy balení (např. vakuové) bývají v některých případech účinnější vzhledem k regulaci biogenních aminů než balení v modifikované atmosféře, avšak každý typ obalu má odlišný vliv na výskyt a produkci jednotlivých biogenních aminů. Ze všech způsobů balení se nejlépe jeví balení v modifikované atmosféře, jež aktivně inhibuje produkci aminů zejména inhibicí mikroorganismů. Úspěch inhibice ale do značné míry závisí na typu mikroflóry a podmínkách vnějšího prostředí, jako jsou teplota a složení plynů v obalu [1,22,29].

3.1.6 Solení potravin

Solení a přidavek chloridu sodného (kuchyňské soli) do potravin může být dalším z faktorů ovlivňujících kumulaci biogenních aminů v potravinách. Bylo provedeno mnoho studií pozorujících vliv vyššího přídatku chloridu sodného, například u fermentovaných klobás

z vepřového masa. Ve výrobcích byl sledován rozdíl v hladinách aminů po přidání soli 6 a 3 %. U klobás s přidáním 6 % byl stanoven významně vyšší úbytek BA. Obvyklá formulace pro zmíněné produkty obvykle obsahuje mezi 4 - 4,5 % NaCl. Vyšší obsah soli vykazoval snížení hladiny kadaverinu až o 83 %, putrescinu o 43 %, tyraminu o 28 % a fenylethylaminu až o 98 %. Odlišný obsah soli bývá volen na základě různorodosti přítomné mikroflóry a její schopnosti produkovat dané aminy. Další studie zjistila, že vysokým obsahem soli lze kontrolovat tvorbu biogenních aminů v sýrech typu feta a v mletém masu. Také byly pozorovány změny ve formování aminů u sušených nasolených sardinek. Obsah soli v konečných produktech se pohyboval mezi 10 - 16 %. Bylo zjištěno, že přítomné bakterie produkovaly pouze putrescin a kadaverin. Výhodou bylo zjištění, že po technologickém procesu nebyly nalezeny v produktech žádné známky histaminu. Tradičně se sůl také využívá pro kontrolu růstu patogenů během fermentace a zrání mléčných výrobků a zabránění tak potenciální otravě [29,37].

3.1.7 Další faktory a metody působící na formulaci biogenních aminů

Mnoho dalších fyzikálně-chemických faktorů, jako je pH, teplota nebo čas může působit na růst mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou. Vhodnou kombinací a kontrolou těchto faktorů lze inhibovat mikroflóru produkující aminy, a tedy i zabránit, či zpomalit jejich akumulaci. Další metodou, která může pomoci při řízení množství biogenních aminů v potravinách, je mikrobiální modelování. Tato metoda pracuje na principu modelováním konkrétních podmínek (pH, teplot, čas) pro jednotlivé skupiny mikroorganismů ve specifických potravinách. Jednotlivé modely mohou ve výsledku pomoci omezovat tvorbu biogenních aminů [1,37].

3.2 Využití startérových mikroorganismů pro řízení biogenních aminů

Během produkce fermentovaných potravin jsou využívány mikroorganismy neboli startérové kultury pro urychlení procesu fermentace, zajištění lepší skladovatelnosti a pro dosažení žádoucích vlastností, jako jsou např. vlastnosti texturní a organoleptické. Tyto jednotlivé mikroorganismy mohou svými vlastnostmi regulovat hladiny biogenních aminů. Obvykle bývají používány komerčně dostupné kultury různých kmenů bakterií mléčného kvašení, stafylokoků a mikrokoků. Tyto komerční kmeny se běžně využívají při výrobě fermentovaných masných výrobků díky jejich lipolytické a proteolytické aktivitě.

Rovnováha mezi vytvořenými a degradovanými aminy ovlivňuje jejich hladinu v potravinách [1,28,29].

Tvorba biogenních aminů během fermentačního procesu může být ovládána a řízena dvěma způsoby. První možností je využití amino-negativních startérových mikroorganismů nebo kmenů s nízkou dekarboxylační aktivitou a tedy i nízkou konečnou hladinou vyprodukovaných biogenních aminů. Druhou variantou je zvolení kmenů disponujícími enzymy aminooxidázami a tedy schopností oxidovat biogenní aminy, například na aldehydy. Tyto bakterie vyžadují optimální růstové podmínky, aby dominovaly nad bakteriemi produkujícími biogenní aminy a jinou kontaminující mikroflórou [1,29].

3.2.1 Využití kmenů s nízkou nebo nulovou dekarboxylační aktivitou

U typických fermentovaných potravin, jako jsou klobásy, sýry, víno, zelí a jiná kvašená zelenina, byl sledován účinek startérových kultur na biogenní aminy. Zjistilo se, že řada kultur má negativní dekarboxylázovou aktivitu. Mezi bakterie s negativní dekarboxylázovou aktivitou můžeme zařadit *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* využívající se jako startéry pro výrobu sýra, dále *Staphylococcus xylosus* a *Lactobacillus curvatus* zpomalující tvorbu putrescinu a kadaverinu během zrání fermentovaných klobás, nebo bakterie *S. carnosus* a *S. xylosus* využívané u fermentovaných masných výrobků pro potlačení tvorby biogenních aminů. Možností je také využití smíšených startérových kultur, které mohou navzájem vytvářet synergický účinek při regulaci biogenních aminů a navíc také při inhibici růstu nežádoucí mikroflóry. Například smíšená kultura složená z *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *S. xylosus* a *Lactobacillus casei* úspěšně inhibovala tvorbu aminů a růst kontaminující mikroflóry u fermentovaných výrobků z ryb [1,28,29].

3.2.2 Degradace a oxidace vytvořených biogenních aminů

Jak již bylo zmíněno, řízení obsahu aminů pomocí startérů může být zprostředkováno pomocí dekarboxyláza negativních kmenů nebo využitím oxidujících mikroorganismů. Bylo již popsáno mnoho metod pro inhibici a zpomalování kumulace biogenních aminů, ale pro samotnou degradaci vytvořených aminů je k dispozici pouze několik málo metod. Tyto metody zahrnují požadavek použití mikroorganismů schopných oxidace biogenních aminů nebo využití konkrétních enzymů s danou schopností (například diaminooxidázy) [1,29].

V případě využití oxidujících kultur dochází k jejich přidavku do potraviny v různých fázích výroby nebo nejčastěji před fermentací jako přídavné (sekundární) kultury. Mezi tyto kultury můžeme zařadit zejména *Kocuria varians*, *Natrinema gari*, *Brevibacterium linens*, *Vergibacillus* sp., *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus* a *S. xylosum*. *Kocuria varians* disponuje enzymem tyraminoxidázou a je schopna degradovat tyramin během fermentace masných výrobků. *Natrinema gari* je extrémně halofilní archeum izolované z ančoviček a je schopno degradovat histamin i při vysokých koncentracích chloridu sodného. Optimální podmínky pro jeho degradaci byly při pH 6,5 a 8,3 a při teplotách 40 a 55 °C v médiu s koncentrací soli od 0,2 % až 0,3 %. Tyto poznatky však byly zjištěny pouze za laboratorních podmínek a výzkum v konkrétních potravinách nebyl proveden. *Brevibacterium linen* bylo schopno snížit množství histaminu o 70 % a tyraminu o 55 % během povrchového zrání sýra. *S. xylosum* degradoval 38 % histaminu a 4,4 % tyraminu ve fosfátovém pufru. Následně byl použit jako startovací kultura u sušených fermentovaných ančoviček, kde snížil celkovou koncentraci biogenních aminů o 16 % vzhledem ke kontrolnímu vzorku. Další studií byly nalezeny dva kmeny *L. casei* vykazující nejvyšší aktivitu tyraminoxidázy, kdy došlo k 93 a 98% degradaci a dva kmeny *L. plantarum*, které degradovaly aminy o 60 a 69 % po 96 hodinové kultivaci v pufrovém systému. Čtyři izoláty *L. sakei* degradovaly histamin o 20 – 56 % po 30 hodinové kultivaci v modelových systémech. Smíšená startovací kultura složená z *Lactobacillus farciminis* a *Staphylococcus saprophyticus* byla naočkována do fermentovaných uzenin a významně pomohla snížit hladiny histaminu, tyraminu, kadaverinu a putrescinu ve srovnání se vzorkem inokulovaným kulturou složenou z *Pediococcus pentosaceus* a *Staphylococcus xylosum*. Další směsná startérová kultura složená z *Lactobacillus plantarum* spolu s *Kocuria varians* byla účinnější při snižování celkové koncentrace biogenních aminů než kultura skládající se pouze z kmene *Lactobacillus plantarum* u polofermentovaných salámů [1,28,29,37].

Přestože vykazuje použití startérových kultur na degradaci a kontrolu biogenních aminů pozitivní vliv, ne vždy to však bývá efektivní v reálném výrobním procesu. Ve fermentovaných produktech je startovací kultura nejdůležitější faktor ovlivňující hladiny biogenních aminů. Kromě ní jsou velmi důležité taky fyzikálně chemické faktory zahrnující čerstvou surovinu, pH, aktivitu vody, teplotu skladování a použité přísady. Tyto parametry by měly být důkladně prozkoumány a zvoleny pro optimální fermentační proces a minimální produkci biogenních aminů [29].

3.2.3 Přídavek enzymů oxidujících biogenní aminy

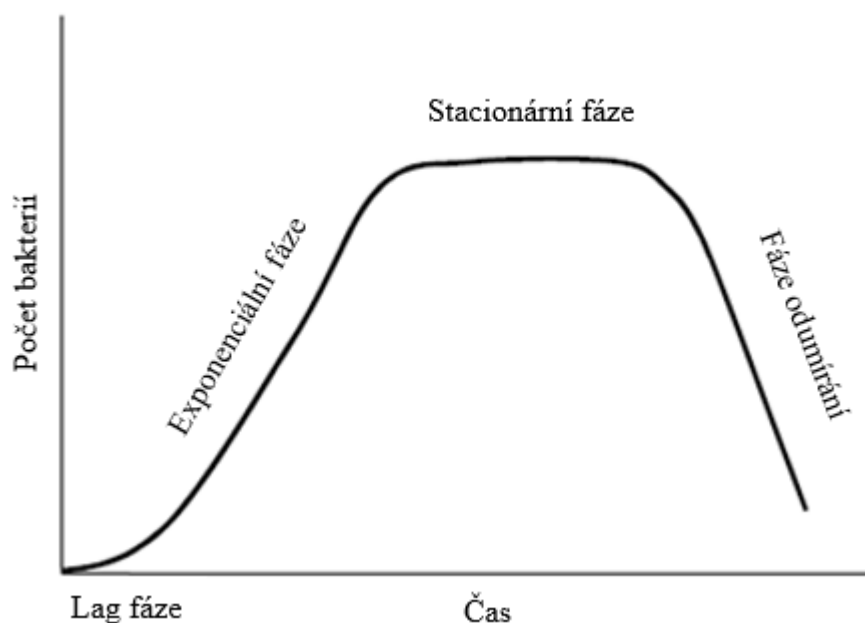
Vedle využití oxidujících mikroorganismů jako startérů může být samostatná degradace zprostředkována také přidavkem konkrétních enzymů do potraviny. Tyto enzymy, nejčastěji diaminooxidázy (DAO) bývají izolovány z některých mikroorganismů. Aktivita DAO na biogenní aminy byla sledována ve fosfátovém pufru a v rybí pastě. DAO degradoval histamin přibližně o 40 % v rybí pastě při teplotě 30 °C vzhledem ke kontrolnímu vzorku. Optimální teplota pro aktivitu DAO je 37 °C. Pro stanovení účinnosti DAO při degradaci biogenních aminů je potřeba prozkoumat jeho aktivitu v různých potravinových maticích [1].

Použitím bakterií s oxidační aktivitou nebo jednotlivých enzymů snižujících hladiny biogenních aminů v potravinách jsou potenciálním kontrolním opatřením tam, kde je obtížné regulovat hladiny aminů pomocí tradičních metod, a kde je třeba eliminovat již vytvořené aminy [1].

4 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ RŮST MIKROORGANISMŮ A VÝVOJ BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH

Mikrobiální růst je autokatalytický proces, jenž nenastane bez přítomnosti alespoň jedné životaschopné buňky. Rychlost růstu bakteriálních buněk se poté zvyšuje s rostoucím množstvím životaschopné biomasy. Z bakteriální buňky vznikají dělením dvě buňky dceřiné, za určitý čas (t). Za určitou dobu zdvojení se tedy mateřská buňka rozdělí na dvě buňky dceřiné a po uplynutí další doby zdvojení budou přítomny čtyři buňky. Po uplynutí další doby zdvojení již bude přítomno osm buněk atd., s každým časem zdvojení se tedy zdvojnásobí také počet buněk [38,39].

Růst jednotlivých mikroorganismů v potravinách je charakterizován pomocí růstové křivky mikroorganismů (obr. 10). Tato křivka je nejčastěji znázorněna jako závislost logaritmu počtu bakteriálních buněk (na jednotku objemu potravin) na čase a zobrazuje vzestup a pád mikrobiálních populací [40,41].



Obr. 10. Růstová křivka mikroorganismů [41]

Růstová křivka je rozdělena do několika fází. V první, tzv. lag fázi, nedochází k patrnému zvyšování počtu buněk, někdy dokonce dochází k jejich mírnému poklesu. Inokulum se přizpůsobuje novému prostředí, syntetizuje enzymy potřebné pro dané prostředí. Následuje fáze exponenciální, neboli logaritmická, během níž dochází k nepřetržitému zvyšování počtu bakteriálních buněk dle jednoduché růstové rovnice. Růst bakterií je v této fázi nejrychlejší.

Pomocí sklonu křivky v této fázi lze odvodit specifickou rychlost růstu mikroorganismů, která je však závislá na jednotlivých faktorech. Exponenciální fáze je ukončena důsledkem změn v kultivačním médiu, kdy dochází k vyčerpání klíčových živin, či hromadění inhibičních metabolitů a kultura přechází do fáze stacionární. Ve stacionární fázi je počet buněk konstantní. Nakonec dochází k tzv. fázi odumírání, během níž se počet buněk snižuje rychleji, než se zvyšuje [40,41].

Znalost jednotlivých faktorů, které podporují nebo inhibují růst mikroorganismů, je velmi důležitá pro porozumění principům kažení a konzervace potravin. Kombinací jednotlivých faktorů dochází ke konzervaci a ochraně potravin před mikroorganismy. Biogenní aminy vznikají především díky bakteriální dekarboxylační aktivitě, která je nejvyšší při vhodných růstových podmínkách. Faktory zpomalující nebo zabraňující růstu mikroorganismů, tedy zaručí i pokles jejich enzymatické aktivity a inhibici tvorby aminů. Kontrola tvorby biogenních aminů je tedy zaměřena především na kontrolu růstu bakterií schopných jejich produkce [3,29,39,41].

4.1 Obsah živin

Mikroorganismy mohou stejně jako člověk používat potraviny jako zdroj živin pro buněčnou syntézu a tvorbu energie. Z živin tedy využívají chemické prvky, které slouží pro syntézu, molekul nezbytných pro růst a tvorbu mikrobiální biomasy, a substrát, sloužící jako zdroj energie. Živiny zahrnují uhlovodíky, proteiny, lipidy, další organické sloučeniny, minerální látky a vitaminy. Potraviny bohaté na bílkoviny, jako jsou maso, mléko nebo vejce, jsou tedy ideálním zdrojem živin pro většinu potravinářských patogenů. Mikroorganismy používají pro syntézu buněčných struktur C a N, v závislosti na jejich rozdílných výživových požadavcích [38,40].

Při tvorbě aminů v potravinách hraje zásadní roli koncentrace volných aminokyselin, které jsou jejich prekurzory. Zmíněné aminokyseliny se mohou v potravinách vyskytovat jako takové nebo vznikají proteolytickou enzymatickou aktivitou. Bakterie s proteolytickou aktivitou mohou potenciálně podporovat tvorbu BA. Dekarboxylace aminokyselin také závisí na koncentraci produkovaného aminu nebo přítomnosti dalších biogenních aminů [42].

4.2 Kyselost – pH

Vnitřní pH buněk je udržováno na hodnotách okolo 7,0, kdy funguje metabolismus nejlépe. Kyselost a zásaditost prostředí má výrazný vliv na aktivitu a stabilitu makromolekul, jako jsou enzymy. Pokud jsou mikrobiální buňky vystaveny extrémním hodnotám pH, dochází k poškození buněčných membrán. H^+ a OH^- ionty pronikají do buněk, kde způsobují denaturaci enzymů a nukleových kyselin a tedy tzv. buněčnou smrt. Hodnota pH ovlivňuje nejen rychlost růstu mikroorganismů, ale také schopnost přežití během skladování, zahřívání, sušení a dalších typů zpracování [38,39,43].

Každý organismus má svůj specifický rozsah požadavků a tolerance na hodnoty pH, některé jsou schopny růst ve více kyselém prostředí a jiné ne. Většina mikroorganismů však může růst v širokém rozmezí pH. Obecně bakterie nebudou dobře růst při hodnotách nižších než 4,6. Schopnost růstu a přežití se u bakterií uvádí v rozmezí 4,6 – 9,0. Optimální je však rozsah 6,6 – 7,5, kdy se rozmnožují nejrychleji. Existují však rody, či druhy, které mohou růst i mimo tento rozsah. Typickou výjimkou jsou bakterie produkující kyseliny v důsledku jejich energetického metabolismu. Příkladem jsou bakterie mléčného a octového kvašení, které optimálně rostou při hodnotách pH 5,0 – 6,0 a jsou pro své schopnosti velmi důležité v potravinářském průmyslu. Bakteriální patogeny obvykle nemohou růst při pH nižším než 4,0. Kvasinky a plísně jsou obecně méně citlivé než bakterie a jsou schopné růst v širším rozmezí pH, a to od 2,0 – 9,0, přičemž většina upřednostňuje pH 4,0 – 6,0 [38,41,44].

Potraviny se dají obecně rozdělit na vysoce kyselé, jejichž pH je nižší než 4,6 a méně kyselé, mající hodnotu nad 4,6. Tato hodnota byla vybrána z důvodu dolní meze pro růst mezofilní bakterie *Clostridium botulinum*. Potraviny s pH vyšším než 4,6 musí být buď chlazeny, nebo podrobeny tepelnému účinku, zajišťující likvidaci spor této bakterie. Různé potraviny mají tendenci se kazit různými způsoby. Například potraviny bohaté na uhlovodíky většinou podléhají kyselé hydrolyze během kažení, díky snižování pH se také snižuje riziko výskytu patogenních mikroorganismů. Tohoto principu se využívá při fermentaci mléčných a masných výrobků. Naopak potraviny bohaté na bílkoviny mají tendenci zvyšovat pH, když se kazí, což z nich činí méně bezpečné potraviny, vzhledem k nárůstu pH do oblasti, kde může růst více patogenů [38,39,44].

Hodnota pH je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících tvorbu biogenních aminů v potravinách. Bylo dokázáno, že produkce aminů bakteriemi je obranný mechanismus vedoucí k potlačení dopadů kyselého prostředí. Aktivita dekarboxyláz je tedy v kyselém

prostředí obvykle vyšší a optimum se uvádí okolo pH 4,0 – 5,5. Snížením pH může dojít ke zpomalení růstu mezofilních aerobních mikroorganismů a tím ke snížení tvorby biogenních aminů [3,42].

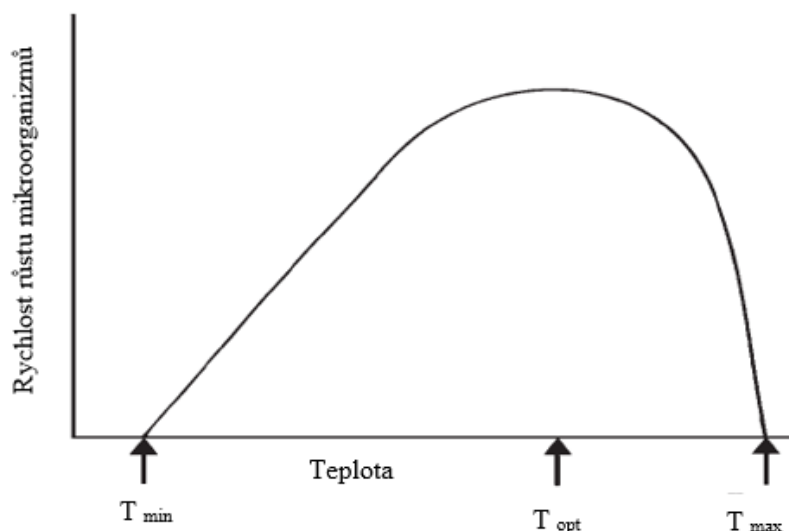
4.3 Teplota

Vzhledem k tomu, že teplota ovlivňuje enzymatické reakce, hraje velmi důležitou roli v procesu podporování a prevence mikrobiálního růstu. Každý organismus vykazuje minimální, maximální a optimální teplotu, při které je schopen růst charakteristickou rychlostí (viz. obr. 11). Každá z těchto teplot je charakteristická pro daný organismus, přičemž jsou do značné míry ovlivněny dalšími faktory prostředí, jako je pH, aktivita vody nebo dostupnost živin. Mikroorganismy lze klasifikovat do několika fyziologických skupin, na základě jejich optimálních teplot a rozmezí teplot, při nichž jsou schopny se rozmnožovat [38,44].

- Termofilní mikroorganismy s optimální teplotou růstu okolo 55 °C a rozmezím růstu mezi 30 – 75 °C.
- Mezofilní mikroorganismy s optimem okolo 35 °C a rozmezím růstu mezi 10 – 45 °C.
- Psychrotrofní mikroorganismy s optimální teplotou růstu okolo 20 – 30 °C a rozsahem 0 – 40 °C.
- Psychrofilní mikroorganismy s optimem okolo 15 °C a schopností růstu mezi hodnotami -5 – 20 °C [39,40,43].

Při teplotách vyšších než optimum buňky rychle umírají. Nižší teploty vedou rovněž k buněčné smrti, ale pomalejší. Využitím těchto znalostí tedy může dojít k eliminaci, či podpoře růstu mikroorganismů. Teplota, při níž jsou potraviny uchovávány, má značný vliv na rychlost a rozsah mikrobiálních změn. Teplota a čas jejího působení, jsou nejdůležitějšími faktory ovlivňující růst bakterií v potravinách. Tepelné zpracování (pasterizace a sterilizace) eliminuje kontaminující mikroflóru prostřednictvím působení tepla po konkrétní časové období. Chlazení potravin může zabránit kažení kontrolou růstu termofilů a mezofilů. Problém je, že většina patogenů je schopna růst i při chladírenských teplotách a proto je tedy ochrana pouze chlazením nedostačující. Většina patogenních bakterií může růst při teplotách 5 – 60 °C, tento rozsah se označuje jako nebezpečná teplotní zóna [38,41].

Z hlediska potravinářské mikrobiologie mají největší význam mezofilní a psychrotrofní mikroorganismy. Mezi mezofily lze zařadit řadu potravinářských patogenů, jako například *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* nebo *Clostridium perfringens* [38].



Obr. 11. Závislost teploty na rychlosti růstu mikroorganismů [38]

Skladovací teplota má zásadní vliv na produkci biogenních aminů. Několik studií poukazuje na to, že obsah aminů závisí na teplotě a prodlužujícím se čase. Chladírenské teploty jsou ve většině případů schopny zajistit zamezení tvorby BA. Bohužel však existují určité kmeny bakterií, které jsou schopny růst i při chladírenských teplotách a produkovat tak malé množství BA, zejména histaminu. Naopak za mrazírenských podmínek je většina dekarboxyláz nestabilní. Obecně platí, že zmrazené potraviny znevýhodňují syntézu BA. Například histidindekarboxyláza se stává neaktivní po 8 – 15 dnech skladování při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hladiny BA v potravinách nelze ovlivnit tepelným ošetřením (např. vařením), s výjimkou sperminu, jehož koncentrace se během ošetření může snižovat [3,42].

4.4 Vodní aktivita

Aktivita vody (a_w) je měřítkem množství volně dostupné vody v potravine. Lze ji vyjádřit jako poměr tlaku vodní páry nad potravinou k tlaku vodní páry čisté vody při stejné teplotě. Rovnovážnou relativní vlhkost lze převést na a_w vydělením 100. Po teplotě je obsah volné vody asi další nejdůležitější parametr a požadavek pro růst daných mikroorganismů. Z toho vyplývá, že mikroby vyžadují přítomnost volné vody pro udržení schopnosti růstu a metabolismu. Potraviny s nízkým obsahem vody tedy nepodporují růst mikroorganismů.

Většina známých bakterií nebude růst při $a_w < 0,95$, ale najdou se i skupiny schopny překonat hodnoty okolo 0,75. Naopak plísně jsou značně tolerantnější. U některých z nich byl zaznamenán růst i při aktivitě vody 0,60. Většina patogenních bakterií a bakterií způsobujících kažení potravin však neporoste při hodnotách a_w menších než 0,85. Aby došlo k omezení, či zabránění mikrobiálního růstu, musí dojít u jednotlivých potravin ke snížení vodní aktivity. To může být způsobeno přidáním rozpustných látek, iontů, zmrazením nebo sušením daných potravin [38,39,45].

Každá potravina má jiný obsah volné vody. Například čerstvé maso o a_w okolo 0,99 má ideální podmínky pro růst širokého spektra mikroorganismů a může tedy podléhat rychlé zkáze. U masa se jako ochrana nejčastěji používá sušení nebo balení v ochranné atmosféře, kdy nízký tlak kyslíku dokáže potlačit růst mikrobů i při vyšších hodnotách aktivity vody. Potraviny, jako jsou džemy a parmazán (a_w 0,60 – 0,85) budou vykazovat růst plísní, bakterií však ne. Naopak mléko o aktivitě 0,98 – 0,99 může být spojováno s bakteriemi způsobujícími otravy z jídla [38,39,44].

Vysoké koncentrace rozpuštěných látek (například chloridu sodného) a procesy vedoucí ke snižování množství využitelné vody (například sušení), vedou k inhibici tvorby biogenních aminů zejména proto, že nízká aktivita vody zpomaluje růst bakterií schopných jejich produkce. Byla zpracována studie potvrzující, že při 3,5 – 5,5 % NaCl byla potlačena produkce histaminu u bakterií *Klebsiella pneumoniae* a *Morganella morganii*, zatímco při nižších koncentracích nikoli. Další studie zkoumající produkci histaminu a tyraminu bakterií *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* potvrdila, že při koncentraci NaCl 2,0 % byla syntéza těchto aminů výrazně nižší, než v potravinách bez přídavku NaCl [42].

4.5 Redoxní potenciál

Redoxní potenciál, který bývá také označován jako oxidačně-redukční potenciál neboli Eh, je další z faktorů ovlivňujících mikrobiální růst. Tento potenciál je výsledkem oxidačně-redukční reakce, během níž dochází k přenosu elektronů mezi atomy a molekulami. Aerobní mikroorganismy vyžadují pozitivní redoxní potenciál, tedy aby byla potravina v oxidovaném stavu, zatímco anaeroby vyžadují potenciál negativní, tedy stav redukovaný. Navíc je potřeba poznamenat, že přítomnost kyslíku není zásadní požadavek pro oxidačně-redukční reakce, nejdůležitější je schopnost ostatních sloučenin přijímat elektrony. V živých buňkách jsou přenosové reakce vodíku a elektronů základním rysem řetězce přenosu elektronů a generování energie oxidační fosforylací. Účinek Eh na mikrobiální růst se

projevuje jako prodloužení počáteční lag fáze. Pokud jsou různé redoxní páry v rovnováze, je upřednostňován oxidovaný stav a tendence přijímat elektrony a vytvářet tak pozitivní potenciál. Odlišné potraviny mají rozdílný redoxní potenciál a ten pak ovlivňuje růst daných mikroorganismů na konkrétní potravině. Potraviny rostlinného původu mají obvykle redoxní potenciál +300 – 400 mV, čímž se podporuje růst aerobních bakterií a plísní. Maso a masné výrobky mají obvykle potenciál okolo -200 mV, a proto jsou s tímto typem potraviny spojeny anaerobní bakterie [39,44,45].

Přítomnost kyslíku má rovněž významný vliv na produkci biogenních aminů. Například bakterie *Enterobacter cloacae* produkuje zhruba poloviční množství putrescinu za anaerobních podmínek při srovnání s podmínkami aerobními. *Klebsiella pneumoniae* produkuje za anaerobních podmínek menší množství kadaverinu, ale naopak získává vyšší schopnost produkovat putrescin. Na druhé straně se uvádí, že snižování redoxního potenciálu vede ke stimulaci tvorby histaminu a předpokládá se tedy, že histidin-dekarboxylázová aktivita bývá inaktivována v přítomnosti kyslíku [3,20].

4.6 Složení atmosféry

Kyslík tvoří asi 21 % zemské atmosféry a je nejdůležitějším plynem v oblasti kontaktu s potravinami. Jeho přítomnost a vliv na redoxní potenciál jsou důležitými aspekty v souvislosti s mikrobiálním růstem a vůbec s rychlostí mikrobiálního růstu. Každý mikroorganismus má specifické požadavky na přítomnost kyslíku a oxidu uhličitého a díky tomu bývají nejčastěji rozdělovány do tří skupin na aerobní, anaerobní a fakultativně anaerobní mikroorganismy. Aeroby vyžadují pro svůj růst přítomnost kyslíku, anaeroby naopak nikoliv a fakultativní anaeroby jsou schopny růst s kyslíkem i bez něj. Změnou atmosféry v zabalené potravině tedy může docházet ke kontrole růstu jednotlivých mikroorganismů. Při regulaci složení atmosféry okolo potraviny se nejčastěji využívá technik vakuového balení a balení v modifikované atmosféře. Principem vakuového balení je odstranění přítomného kyslíku z okolí potraviny. Tím dochází k inhibici růstu aerobních mikroorganismů, ale tyto podmínky stále umožňují růst anaerobů, jako je například *C. botulinum*. Balení v modifikované atmosféře umožňuje výrobcům zvolit atmosféru v obalu pomocí různých kombinací a tedy koncentrací kyslíku, oxidu uhličitého a dusíku v závislosti na typu produktu a předpokládaném výskytu mikroorganismů. Většina takto balených potravin má různé koncentrace oxidu uhličitého a dusíku, vzhledem k inhibičnímu působení zejména oxidu uhličitého na mikrobiální růst. Jeho účinek však nepůsobí na

všechny mikroorganismy stejně. Nejcitlivější jsou plísně a gramnegativní bakterie, naopak značně odolnější jsou grampozitivní bakterie a některé kvasinky. Inhibiční účinek CO₂ roste s klesající teplotou, pravděpodobně z důvodu jeho lepší rozpustnosti při nižších teplotách. Dlouhodobým vystavením CO₂ bývají některé mikroorganismy usmrcovány, ale obvykle je tento účinek pouze bakteriostatický [38,39,44].

Složení atmosféry v okolí potraviny zabalené do obalu má významný vliv na syntézu biogenních aminů. Bylo zjištěno, že u bakterie *Morganella morganii* došlo vlivem atmosféry obsahující 80 % CO₂ k inhibici histidin-dekarboxylázové aktivity [3]. (složení atmosféry vzhledem k BA je také uvedeno v kapitole 3.1.5)

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části diplomové práce bylo charakterizovat biogenní aminy, jejich dělení, vznik, biologické účinky a toxicitu. Dále byly popsány jednotlivé potraviny, jež jsou na výskyt biogenních aminů náchylné ale zejména jednotlivé metody kontroly a řízení aminů ve zmíněných potravinách.

V praktické části byl sledován jeden kmen rodu *Lactobacillus*, který byl vybrán na základě výzkumu, prováděném při mé bakalářské práci. Tento kmen vykazuje největší schopnost degradace biogenních aminů.

Cílem tedy bylo pozorovat schopnost daného kmene redukovat hladiny biogenních aminů za různých růstových podmínek:

- Teplota
- pH
- Obsah živin
- Koncentrace BA
- Čas

Zmíněná schopnost degradace byla stanovena pomocí metody HPLC.

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Použité mikroorganismy

Na základě bakalářské práce byl zvolen a sledován kmen *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198, který projevoval největší schopnost degradovat přítomné biogenní aminy. Kmen byl získán ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů Laktoflora (CCDM).

6.2 Sledované faktory

Během výzkumu byl sledován vliv různých růstových faktorů na schopnost redukce obsahu biogenních aminů kmenem *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198 (viz tab. 4)

Tab. 4. Sledované růstové faktory

Teplota	pH	Kultivační médium	Koncentrace BA
11 °C	5,4 ± 0,2	MRS	0,2 g/l
23 °C	6,2 ± 0,2	MRS/2 (médium se sníženým obsahem živin)	0,4 g/l
30 °C	7,0 ± 0,2	-	-

6.3 Kultivační média

6.3.1 20x koncentrovaný roztok biogenních aminů

Koncentrovaný roztok biogenních aminů byl připraven navážením jednotlivých aminů (vše Sigma-Aldrich) a jejich rozpuštěním v 1000 ml vody.

- Tyramin (4-(2-aminoethyl)fenol) 4 g
- Histamin (dihydrochlorid) 4 g
- Putrescin (1,4-diaminobutan) 4 g
- Kadaverin (1,5-diaminopentan) 4 g
- Fenylethylamin (hydrochlorid) 4 g

6.3.2 MRS bujón s koncentrací biogenních aminů 0,2 g/l

Bujón byl připraven navážením 27,6 g živné půdy MRS broth (Merck, Darmstadt, SRN) a jejím rozpuštěním v roztoku, který vznikl smísením 475 ml vody a 25 ml 20x koncentrovaného roztoku biogenních aminů.

6.3.3 MRS bujón s koncentrací biogenních aminů 0,4 g/l

Bujón byl připraven navážením 27,6 g živné půdy MRS broth (Merck, Darmstadt, SRN) a jejím rozpuštěním v roztoku, který vznikl smísením 450 ml vody a 50 ml 20x koncentrovaného roztoku biogenních aminů.

6.3.4 ½ MRS bujón s koncentrací biogenních aminů 0,2 g/l

Médium bylo připraveno stejným způsobem jako MRS bujón s výjimkou navážky MRS broth (Merck), která byla snížena o polovinu, tj. 13,8 g.

6.3.5 ½ MRS bujón s koncentrací biogenních aminů 0,4 g/l

Médium bylo připraveno stejným způsobem jako MRS bujón s výjimkou navážky MRS broth (Merck), která byla snížena o polovinu, tj. 13,8 g.

Všechna připravená média s biogenními aminy byla rozdělena na tři díly. U každého ze tří dílů bylo pomocí koncentrované HCl (Lach-Ner) upraveno pH na jednotlivé testované hodnoty, tj. $5,4 \pm 0,2$; $6,2 \pm 0,2$ a $7,0 \pm 0,2$. Poté byla média rozplněna do skleněných zkumavek po 7 ml a sterilizována.

6.4 Příprava a odběr vzorků

Testovaný kmen byl asepticky, pomocí sterilní kličky přenesen z tuhé půdy do zkumavky s MRS a anaerobně kultivován 24 hodin (přes noc) při teplotě 37 °C. Po uplynutí této doby byla kultura naředěna na ODN 0,5 (stupnice dle McFarlanda). Z takto připravené kultury bylo sterilně pipetováno 50 µl do jednotlivých zkumavek všech variant živných médií.

Degradace biogenních aminů u daného kmene byla pozorována při teplotách 11, 23 a 30 °C, kdy pro každou teplotu byly zvoleny jiné odběrové časy (viz. tab. 5). V každém jednotlivém odběrovém čase byly provedeny odběry ve 3 paralelních zkumavkách. Kontrolní vzorky bez zaočkovaného kmene byly ve 2 paralelních zkumavkách (při každé teplotě).

Vzorky byly centrifugovány (4600 otáček/min., 7 minut) a z každé zkumavky bylo odebráno do dvou eppendorfkových mikrozkušavek 650 μ l supernatantu a přidáno 650 μ l kyseliny chloristé (Sigma-Aldrich) o koncentraci 1,2 mol/l. Takto připravené vzorky byly zamrazeny při -80 °C a připraveny pro následnou derivatizaci.

Tab. 5. Odběrové časy experimentu

Teplota	Jednotlivé odběrové časy při dané teplotě								
30 °C	0 hod	8 hod	12 hod	24 hod	28 hod	32 hod	36 hod	48 hod	72 hod
23 °C	0 hod	12 hod	24 hod	30 hod	36 hod	48 hod	72 hod	96 hod	-
11 °C	0 hod	2 dny	4 dny	6 dnů	8 dnů	10 dnů	12 dnů	14 dnů	-

6.5 Derivatizace vzorků

Ke každému vzorku supernatantu bylo přidáno 100 μ l 1,7-heptandiaminu (Sigma-Aldrich) o koncentraci 500 mg/l jako interního standardu. Následně byl 1 ml vzorku pipetován do derivatizační nádoby a přidáno 1,5 ml karbonátového pufru o pH 11,1 - 11,2. Ke vzorku byly přidány 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu (Sigma-Aldrich) o koncentraci 5 g/l v acetonu (Merck, Darmstadt, SRN). Derivatizační nádoba byla dobře uzavřena a nechala se třepat v temnu 20 hodin. Poté bylo ke vzorku přidáno 200 μ l prolinu (Sigma-Aldrich) a vzorky byly opakovaně třepány další hodinu. Následně byly ke vzorku přidány 3 ml heptanu (Merck) a po pečlivém uzavření byly vzorky třepány 3 minuty ručně. Poté byl odpipetován 1 ml heptanové vrstvy do vialky. Obsah vialky byl odpařen při teplotě 60 °C do sucha pod proudem dusíku a suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich). Vialky byly uchovávány v mrazícím zařízení při teplotách -18 °C do doby analýzy.

6.6 Chromatografické stanovení biogenních aminů

Bezprostředně před analýzou byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkové filtry s porozitou 0,22 μm .

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

Program gradientové eluce, kterým probíhala separace dansylderivátů biogenních aminů, je znázorněn v tabulce 6.

Tab. 6. Gradientový eluční program pro HPLC

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

7 VÝSLEDKY A VYHODNOCENÍ

7.1 Chromatografické stanovení redukce biogenních aminů kmenem *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198 za sledovaných podmínek

Degradace, tedy schopnost daného kmene redukovat obsah biogenních aminů, byla pozorována během různých růstových podmínek. Z konkrétních biogenních aminů byly pozorovány úbytky fenylethylaminu, kadaverinu, putrescinu, histaminu a tyraminu. Mezi jednotlivé růstové faktory patřily teplota (11, 23 a 30 °C), pH (7,0; 6,2 a 5,4), množství živin (MRS a MRS/2), koncentrace přidávaných aminů (0,2 a 0,4 g/l) a čas (jednotlivé odběrové časy jsou uvedeny v tabulce č. 5, v kapitole 6.4). Samotná degradace byla vyhodnocována porovnáním s kontrolou, což bylo příslušné živné médium (MRS, MRS/2) s biogenními aminy, jež nebylo zaočkováno daným kmenem *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198. Konkrétní výsledky, kdy během dané kombinace testovaných podmínek došlo k úbytku biogenních aminů u všech tří testovaných hodnot pH méně, než o 20 % jsou uvedeny v příloze PI. Jednalo se konkrétně o biogenní aminy za těchto podmínek:

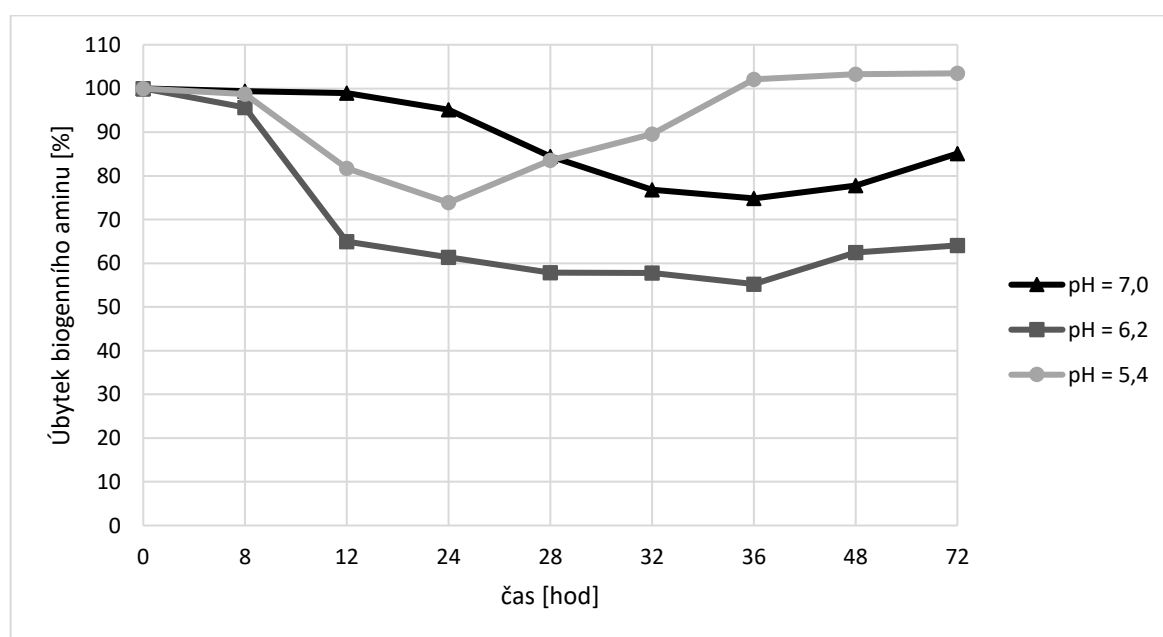
- Fenylethylamin o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v MRS
- Tyramin o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v MRS
- Fenylethylamin o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v MRS
- Tyramin o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v MRS
- Fenylethylamin o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v MRS
- Putrescin o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v MRS
- Kadaverin o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v MRS
- Tyramin o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v MRS
- Kadaverin o koncentraci 0,4 g/l při 30 °C v MRS
- Tyramin o koncentraci 0,4 g/l při 30 °C v MRS
- Histamin o koncentraci 0,4 g/l, při 23 °C v MRS
- Fenylethylamin o koncentraci 0,4 g/l při 11 °C v MRS
- Tyramin o koncentraci 0,4 g/l při 11 °C v MRS
- Fenylethylamin o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v médiu s nižším obsahem živin
- Putrescin o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v médiu s nižším obsahem živin
- Kadaverin o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v médiu s nižším obsahem živin

- Tyramin o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v médiu s nižším obsahem živin
- Fenylethylamin o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v médiu s nižším obsahem živin
- Tyramin o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v médiu s nižším obsahem živin

7.1.1 Degradace biogenních aminů o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v úplném médiu

Degradace putrescinu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C a různém pH

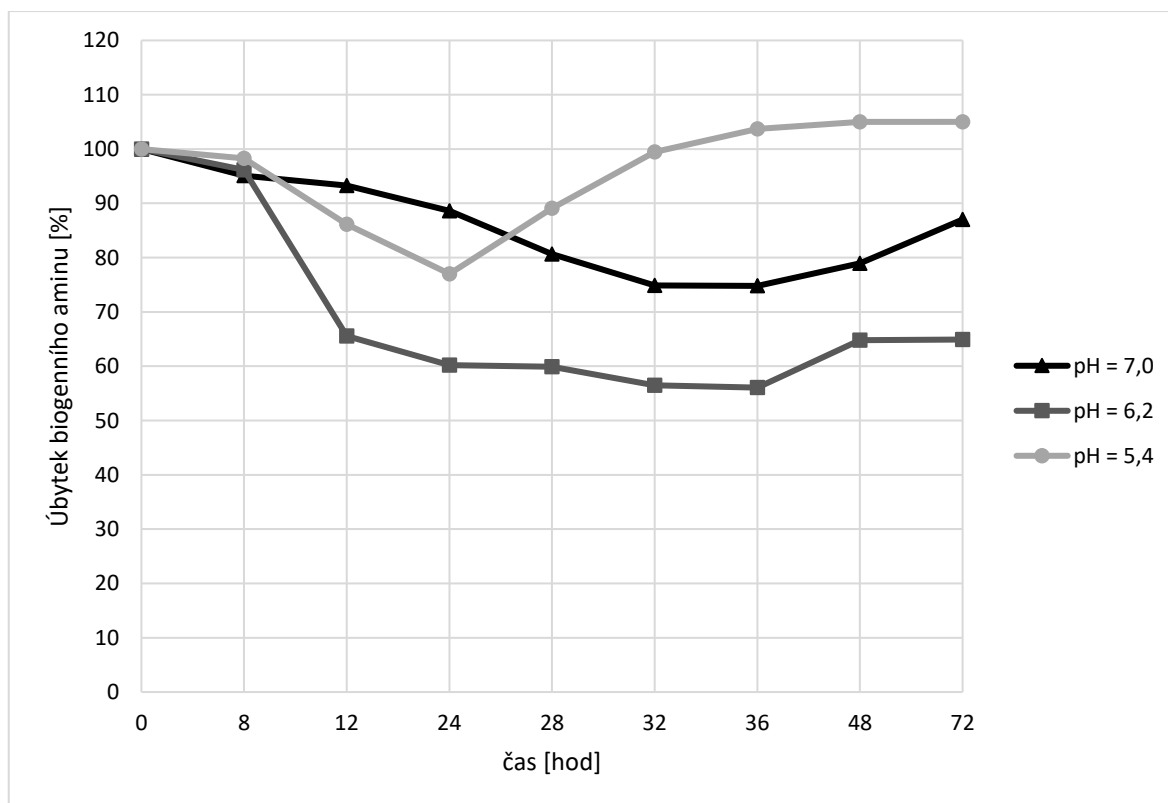
Obrázek 12 znázorňuje schopnost testovaného kmene degradovat putrescin při 30 °C a daných hodnotách pH. Nejvyšší schopnost redukce byla zaznamenána v médiu o pH 6,2 kdy došlo k úbytku putrescinu o více než 40 % a to po 36 hodinách kultivace. V dalších dvou odběrových časech koncentrace mírně vzrostly, ale tyto hodnoty jsou poměrně nepatrné. Zajímavý je pokles mezi 8 a 12 hodinou, kdy došlo k úbytku až o 35 %. Vzhledem k ostatním hodnotám pH, lze tedy říci, že hodnota pH 6,2 měla na degradaci putrescinu daným kmenem nejvyšší vliv. V médiu o pH 7,0 byl kmen schopen redukovat množství putrescinu na hladinu okolo 78 % a nejvyšší úbytek při tomto pH byl rovněž zaznamenán po 36 hodinách. Následný mírný nárůst koncentrace byl taktéž minimální. U nejnižšího testovaného pH byl pozorován pokles mezi 8 a 12 hodinou o 20 % z původního množství. Za dalších 12 hodin koncentrace ještě klesla o dalších cca 10 %, ale v konečných odběrových časech byl obsah putrescinu navyšován, a již po 36 hodinách byl více než o 2 % vyšší než původní přidávané množství. To může být vysvětleno netolerancí kmene ke kombinaci faktorů, jež nemusely být výhodné. Největší problém pravděpodobně představovala nízká hodnota pH.



Obr. 12. *Lbc. casei* – degradace putrescinu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v MRS

Degradace kadaverinu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C a různém pH

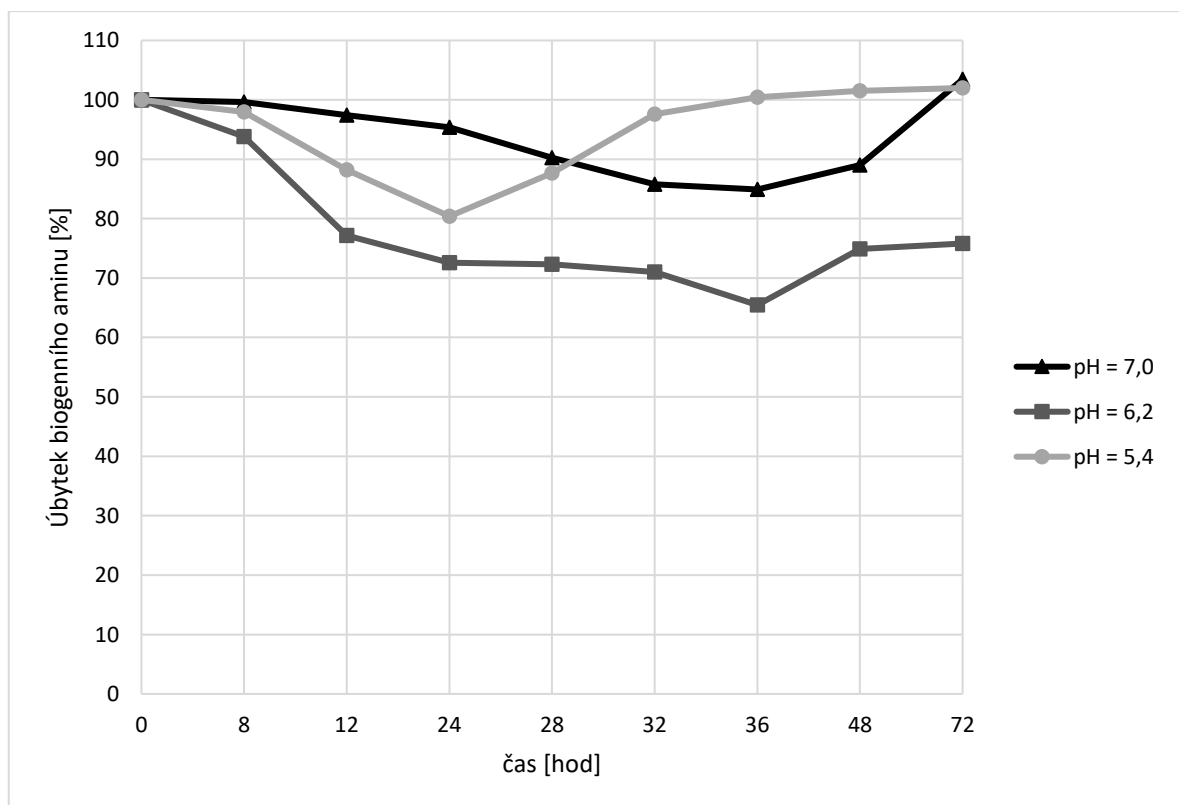
Podobně jako u putrescinu probíhala degradace i u kadaverinu (obr. 13). V médiu o pH 7,0 docházelo k mírným úbytkům už od počátku. Za 24 hodin byla koncentrace kadaverinu nižší přibližně o 10 % vzhledem k původní hodnotě. V dalších odběrových časech byla naměřena nižší množství, ale ta se také nesnižovala příliš velkou rychlostí. Pokles pokračoval až do 36 hodiny, kdy došlo k úbytku na hodnotu okolo 75 %. Nejvyšší degradace byla zaznamenána v médiu o pH 6,2, podobně jako v předchozím případě u putrescinu. Již od počátku byly patrné výraznější změny, kdy došlo mezi 8 a 12 hodinou k poklesu z 95 % na 65 %, to je redukce až o 30 %. Úbytek pokračoval i v následujících odběrových časech, ale měl pouze pozvolný a mírný pokles. Kmen tedy významně redukoval obsah kadaverinu při tomto pH a teplotě 30 °C již za velmi krátkou dobu. Maximální úbytek byl zjištěn po 36 hodinách, když byl původní obsah kadaverinu redukován až na hodnoty okolo 57 %. Nejméně významný byl pokles koncentrace aminu při pH 5,4. Po 8 hodinách byl zjištěn úbytek pouze o 1 %, ale po 12 hodinách už o dalších 13 %. Po 24 hodinách došlo k poklesu na hodnotu 78 %, to však byla nejnižší hladina a v dalších časech docházelo pouze k nárůstu a tedy možné produkci kadaverinu. Už po 32 hodinách byly zjištěny hodnoty rovnající se původním a po 48 a 72 hodinách byly hodnoty ještě o 5 % vyšší.



Obr. 13. Lbc. casei – degradace kadaverinu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v MRS

Degradace histaminu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C a různém pH

Na obrázku 14 je znázorněna degradace histaminu při 30 °C a daných pH hodnotách. V médiu o pH 7,0 jeví kmen pozvolnou schopnost redukce histaminu. Docházelo k mírnému úbytku a to po 8 hodinách o 1 %, po 12 hodinách o cca 3 %, po 28 hodinách na hodnotu 90 %, až na hodnotu 85 % zaznamenanou po 36 hodinách kultivace. Tyto hodnoty, tedy úbytek o pouhých 15 %, byly zjištěny jako nejvyšší pro toto neutrální pH. Podobně jako v předchozích případech u kadaverinu a putrescinu, byla nejvyšší degradace pozorována v médiích o pH 6,2. Hned z počátku došlo k poklesu histaminu, po 8 hodinách o 5 % a po dalších 4 hodinách byl zaznamenán výrazný skok až na hodnotu okolo 78 % z původního množství. V dalších třech časech byl pokles mírný, když došlo k redukci pouze na 72%. Po 36 hodinách došlo ještě k degradaci o dalších 5 %, tedy na hodnotu přibližně 65 % z původního množství. Tato hodnota byla maximální a k další redukci množství histaminu v ostatních odběrových časech nedocházelo. Naopak byl zjištěn mírný nárůst. U médií s nejnižším testovaným pH došlo po prvních 24 hodinách k poklesu histaminu na koncentraci menší o 20 % než v kontrolním médiu. Tato hodnota byla rovněž nejnižší zaznamenaná a maximální degradace byla tedy pozorována už za 24 hodin. V následujících časech byl zjištěn nárůst koncentrace histaminu a konečné hodnoty přesahovaly hranici 100 %.

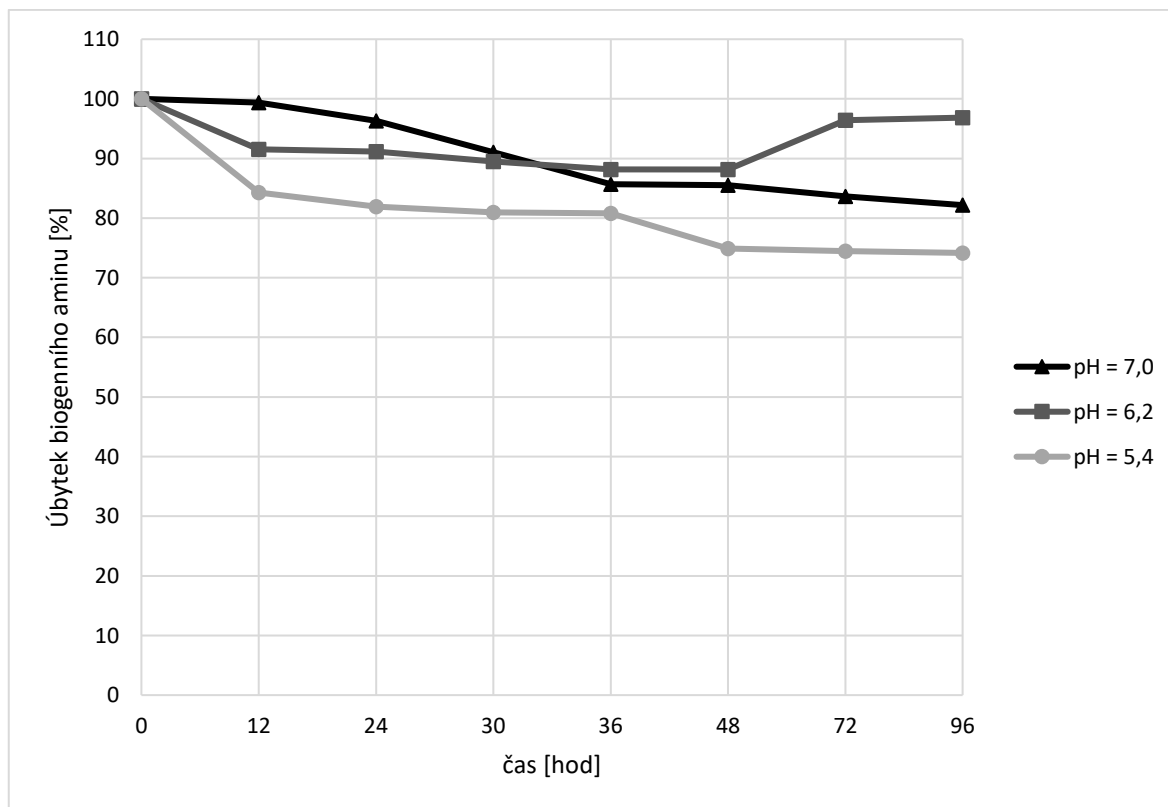


Obr. 14. *Lbc. casei* – degradace histaminu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v MRS

7.1.2 Degradace biogenních aminů o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v úplném médiu

Degradace putrescinu o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C a různém pH

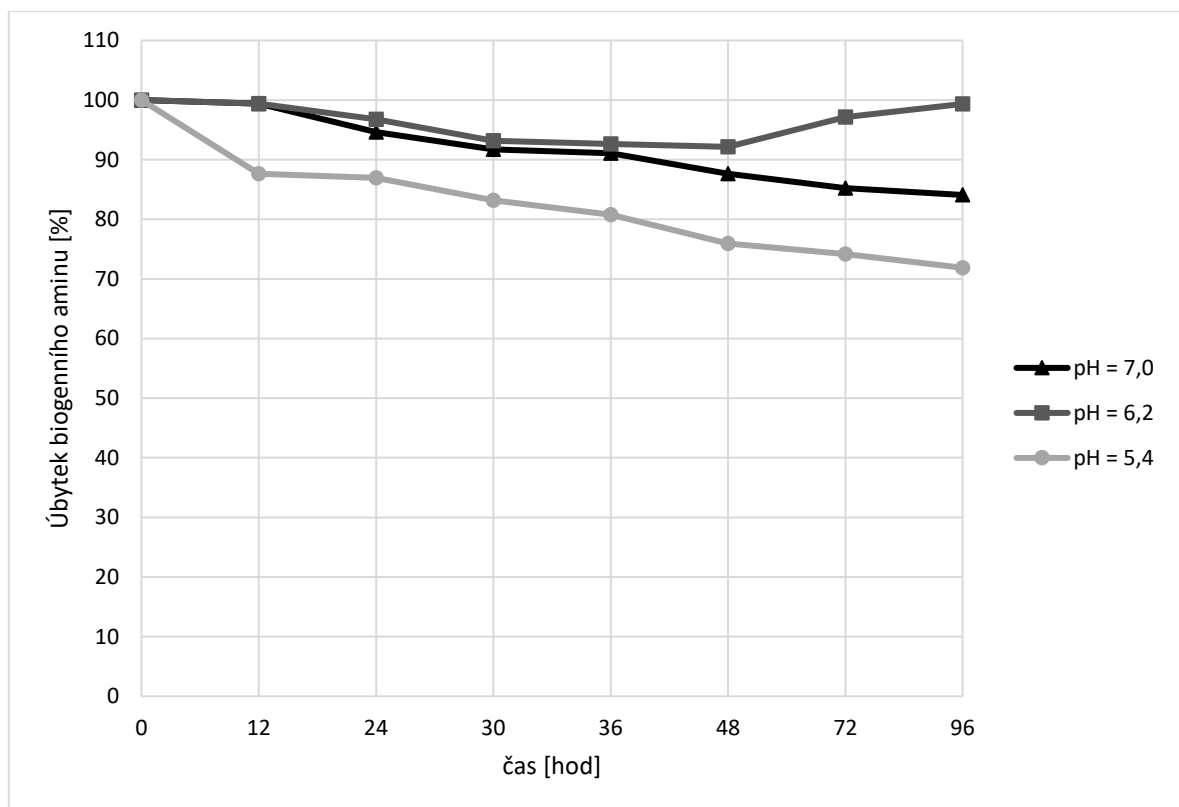
U putrescinu se nižší teplota kultivace projevila pozvolnějším úbytkem při všech testovaných pH hodnotách. Rozdílem oproti předchozí teplotě bylo to, že k největší redukci docházelo při nejnižším pH, tedy 5,4. V médiu o pH 7,0 byl pokles velmi mírný (obr. 15). Po 12 hodinách nebyl zaznamenán téměř žádný úbytek, po 24 hodinách pouze o 2 % a po 30 hodinách o 10 %. Nejnižší koncentrace byla stanovena v poslední testovaný čas, tedy po 96 hodinách, kdy došlo k degradaci na hodnotu 82 % z původních 100 %. Je tedy možné, že by se i v dalších potenciálních časových odběrech úbytek navyšoval. Médium s hodnotou pH 6,2 ukazovalo nejnižší schopnost redukce putrescinu kmenem. Po prvních 12 hodinách došlo k poklesu o 8 % a maximální úbytek byl zjištěn pouze o 10 % a to po 48 hodinách kultivace. Následné hodnoty se zvyšovaly a v posledním odběrovém čase se blížily 100 %. Nejvyšší úbytek byl zaznamenán u média s pH 5,4. Po prvních 12 hodinách došlo k redukci na hodnotu přibližně 83 %. V následných třech odběrových časech k výraznému úbytku nedošlo a koncentrace se držely v blízkosti 80 %. V koncových časech pokleslo množství putrescinu o dalších 7 % a po 96 hodinách bylo stanoveno okolo 76 % ze 100 %.



Obr. 15. *Lbc. casei* – degradace putrescinu o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v MRS

Degradace kadaverinu o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C a různém pH

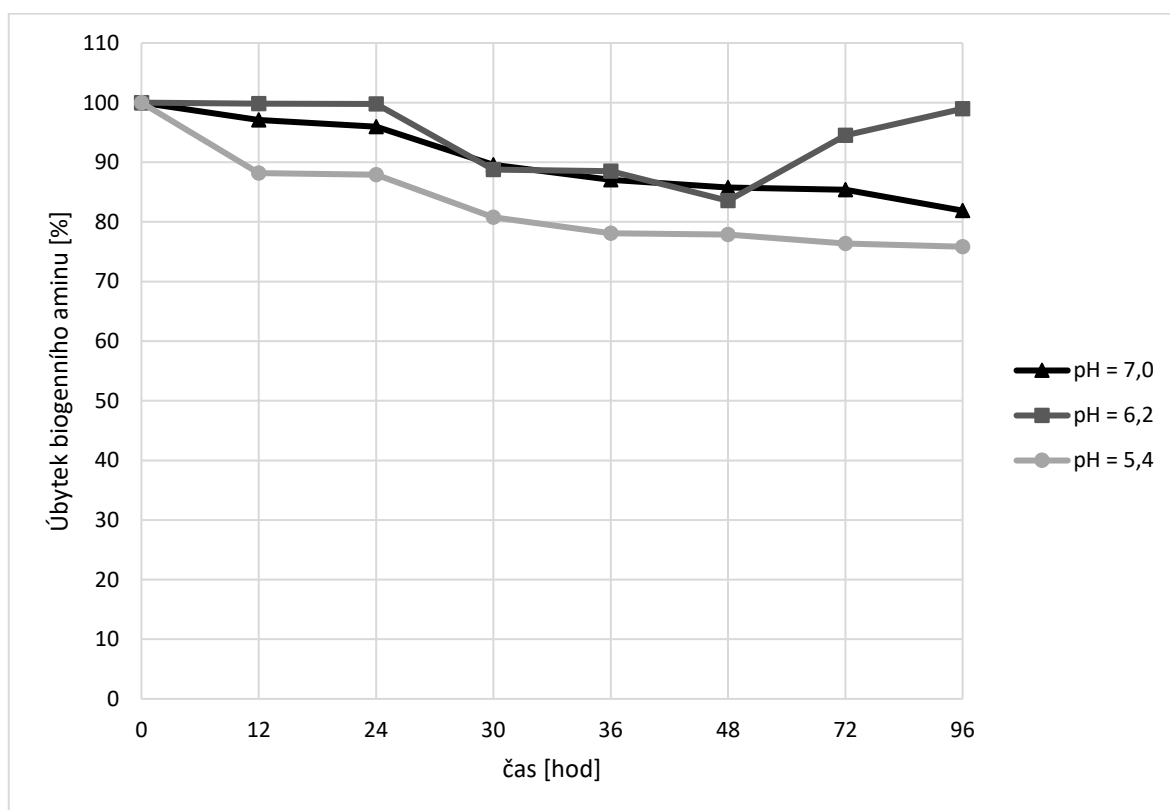
Na obrázku 16 je zobrazena schopnost degradace kadaverinu kmenem *Lbc. casei* subsp. *casei* CCDM 198. Je patrné, že kadaverin byl rovněž redukován nejvíce v médiu o pH 5,4, podobně jako při nejvyšší testované teplotě. V médiu s nejvyšším pH (7,0) byl kadaverin degradován nízkou rychlostí. Po 12 hodinách k úbytku téměř nedošlo, ale v dalších časech koncentrace pomalu klesala. Například po 30 a 36 hodinách hodnoty klesly na přibližných 90 %, a po dalších 12 hodinách na 88 % z původního přidávaného množství. Největší úbytek byl zjištěn v posledním odběrovém čase, kdy došlo k poklesu koncentrace kadaverinu o cca 17 %. Je možné, že obdobně by docházelo k pomalému úbytku i s dalším rostoucím časem. V médiu o pH 6,2 byl kadaverin redukován o něco hůře. Po 36. hodinu byla degradace téměř totožná, a tedy srovnatelná s médiem o pH 7,0. Po 48 hodinách již došlo pouze k minimálnímu snížení koncentrace putrescinu a maximální úbytek byl tedy zaznamenán po 48 hodinách, a to o pouze 10 %. Nejvíce byl kadaverin redukován v médiu s pH 5,4. Již po prvních 12 hodinách došlo k poklesu o 12 %. V následných časech odběru byla intenzita degradace nižší, ale množství kadaverinu se vždy snižovalo. Po 36 hodinách bylo dosaženo 80 % a následně po 48 a 72 hodinách byl úbytek ještě o cca 5 % vyšší. Nejvyšší redukce byla zjištěna po 96 hodinách, kdy došlo k úbytku až o 30 % z původního množství.



Obr. 16. *Lbc. casei* – degradace kadaverinu o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v MRS

Degradace histaminu o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C a různém pH

Degradace histaminu (obr. 17) probíhala podobně jako u ostatních biogenních aminů za stejných růstových podmínek. V médiu o pH 7,0 docházelo k pozvolnému snižování množství histaminu. Po 24 hodinách došlo k úbytku o 5 % a po dalších 6 hodinách se množství snížilo ještě o 5 %. Následoval mírný postupný pokles až na hodnotu 80 % v čase 96 hodin. Tento úbytek byl nejvyšší. Křivka pro hodnoty pH 6,2 měla podobný tvar jako předchozí. V prvních dvou časech však nedošlo k úbytku histaminu a jeho koncentrace byla konstantní. Po 30 a 36 hodinách, jako v předchozím případě, došlo ke snížení až 10 % dostupného histaminu. Po 48 hodinách poklesla koncentrace ještě o dalších 5 %, tedy na 85 %, což byla minimální zjištěná hodnota. Nejvýraznější úbytek byl při těchto testovaných podmínkách zjištěn v médiu s nejnižším pH, tedy 5,4. Hned po 12 hodinách byl histamin redukován na přibližně 89 % a tato hodnota byla téměř stejná i po 24 hodinách. Následně došlo k poklesu na 80 %. V ostatních časech již nedošlo k příliš výrazné degradaci, ale pokles koncentrace byl stále zaznamenán. Tendence klesat byla viditelná až do doby 96 hodin, kdy byla naměřena hodnota odpovídající úbytku histaminu asi o 25 %.



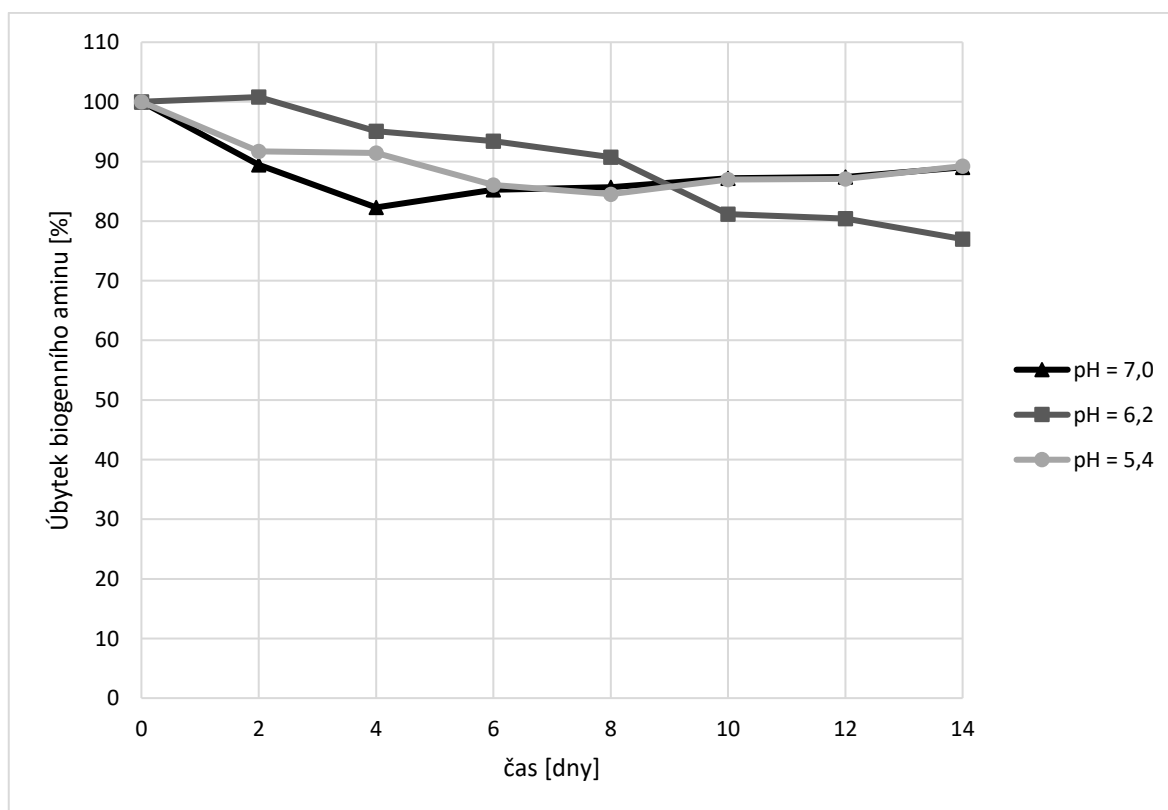
Obr. 17. Lbc. casei – degradace histaminu o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v MRS

7.1.3 Degradace biogenních aminů o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v úplném médiu

Během těchto kultivačních podmínek došlo k úbytku vyššímu než 20 % pouze u histaminu, ostatní biogenní aminy tedy nebudou vyhodnoceny v této podkapitole, výsledky budou uvedeny v příloze PI.

Degradace histaminu o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C a různém pH

Degradace histaminu sice byla v jednom případě vyšší než 20 %, ale obecně nebyla příliš výrazná. V médiu o pH 7,0 došlo po 2 dnech k redukci histaminu o 10 % a po dalších 2 dnech jeho koncentrace klesla až těsně nad 80 % (obr. 18). Následné odběry prokázaly mírný nárůst histaminu, kdy po 14 dnech byla zjištěna hodnota okolo 90 % z původního množství. Podobný průběh jako v médiu o pH 7,0 byl zaznamenán i v médiu o pH 5,4. Po 2 a 4 dnech byly sice naměřeny stejné hodnoty, okolo 90 %, ale hodnoty v dalších časech byly téměř totožné s hodnotami kultivačního média o pH 7,0. Nejvyšší úbytek byl zaznamenán při pH 6,2. Tato křivka byla charakteristická postupným klesáním během celého experimentu. Po 2 dnech sice k úbytku nedošlo, ale následně po 8 dnech, byl histamin redukován o 10 %. Po dalších 2 dnech došlo k úbytku na 80 %, což bylo množství totožné s množstvím po 12 dnech. Nejvyšší úbytek byl stanoven po 14 dnech, a to o přibližně 23 %.

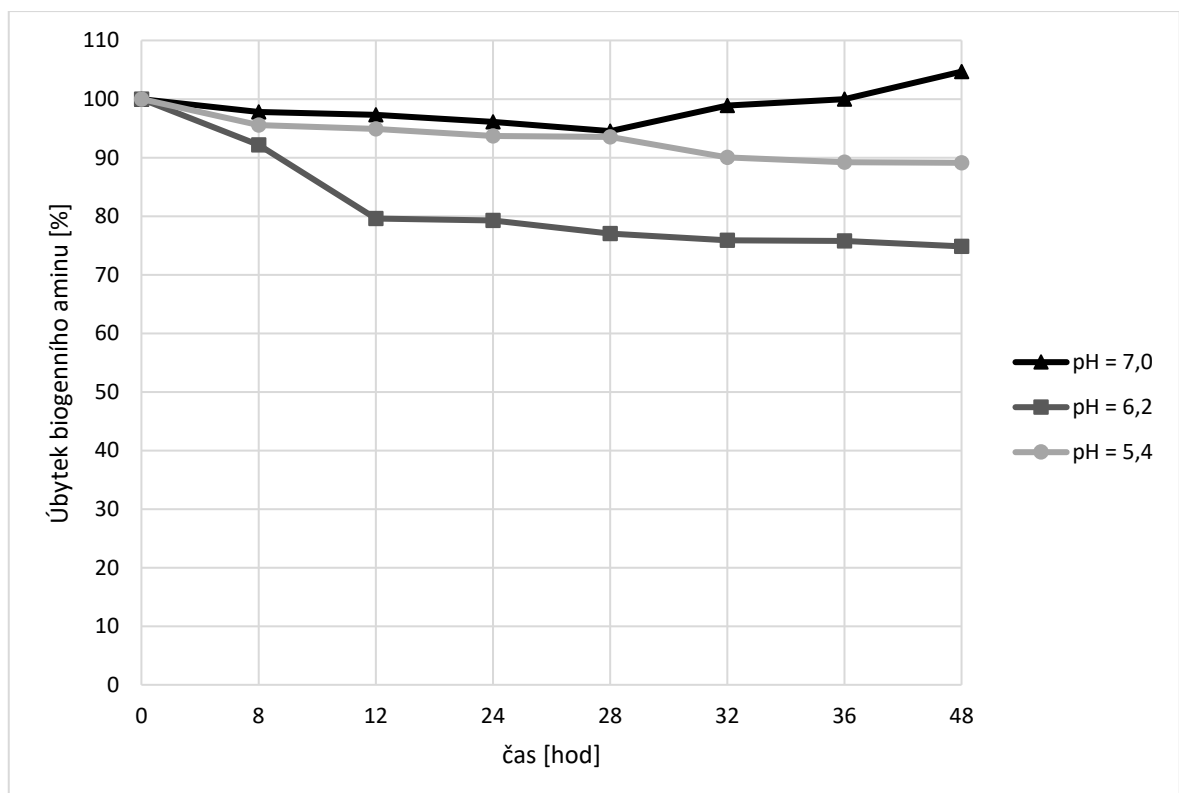


Obr. 18. *Lbc. casei* – degradace histaminu o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v MRS

7.1.4 Degradace biogenních aminů o koncentraci 0,4 g/l při 30 °C v úplném médiu

Degradace fenylethylaminu o koncentraci 0,4 g/l při 30 °C a různém pH

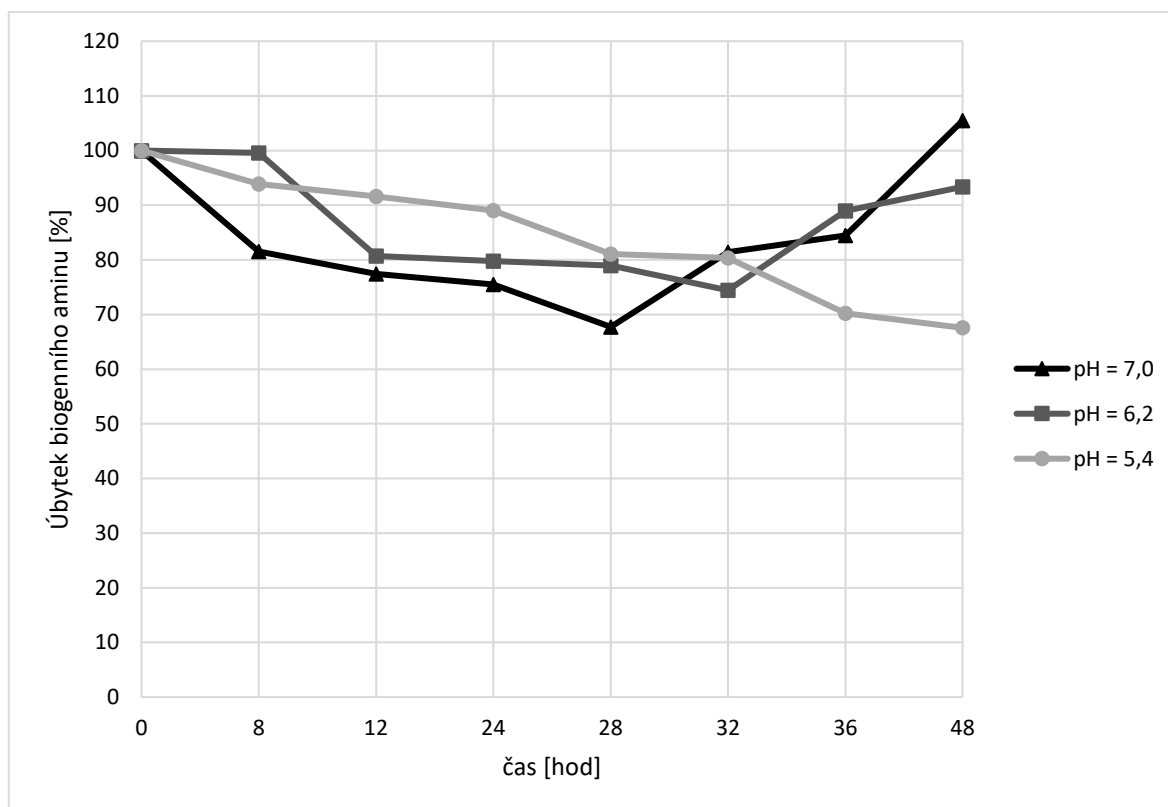
Obrázek 19 zobrazuje degradaci fenylethylaminu testovaným kmenem. Je patrné, že degradace nebyla příliš vysoká a k výrazným úbytkům nedocházelo. V médiu o pH 7,0 byla redukce nejméně významná. Po 8, 12 a 24 hodinách došlo k mírnému úbytku fenylethylaminu, méně než o 5 %. Po 28 hodinách bylo dosaženo minimální naměřené hodnoty, což bylo pouze 95 % z původního množství. Následně koncentrace rostla a po 48 hodinách dokonce dosáhla hodnot vyšších než 100 %. V živném médiu s aminem o pH 5,4 byla situace zpočátku velmi podobná a v čase po 28 hodinách dokonce téměř totožná. Rozdíl byl však v dalších časech, kdy po 32 hodinách koncentrace klesla na 90 % a tato hodnota byla konstantní až do posledního měřicího času. Je tedy dost pravděpodobné, že k dalšímu úbytku by s rostoucím časem nedocházelo a tyto podmínky nejsou pro kmen k degradaci fenylethylaminu ideální. Největší redukce vykazoval kmen v médiu o pH 6,2, kdy po 8 hodinách došlo k poklesu tohoto aminu téměř o 10 % a již za následující 4 hodiny o dalších 10 %. Kultivace 24 hodin ukázala stejné hodnoty jako předchozí čas, tedy úbytek na 80 %. V následujících odběrech došlo pouze k mírnému snížení hladiny fenylethylaminu na 75 % po 48 hodinách.



Obr. 19. *Lbc. casei* – degradace fenylethylaminu o koncentraci 0,4 g/l při 30 °C v MRS

Degradace putrescinu o koncentraci 0,4 g/l při 30 °C a různém pH

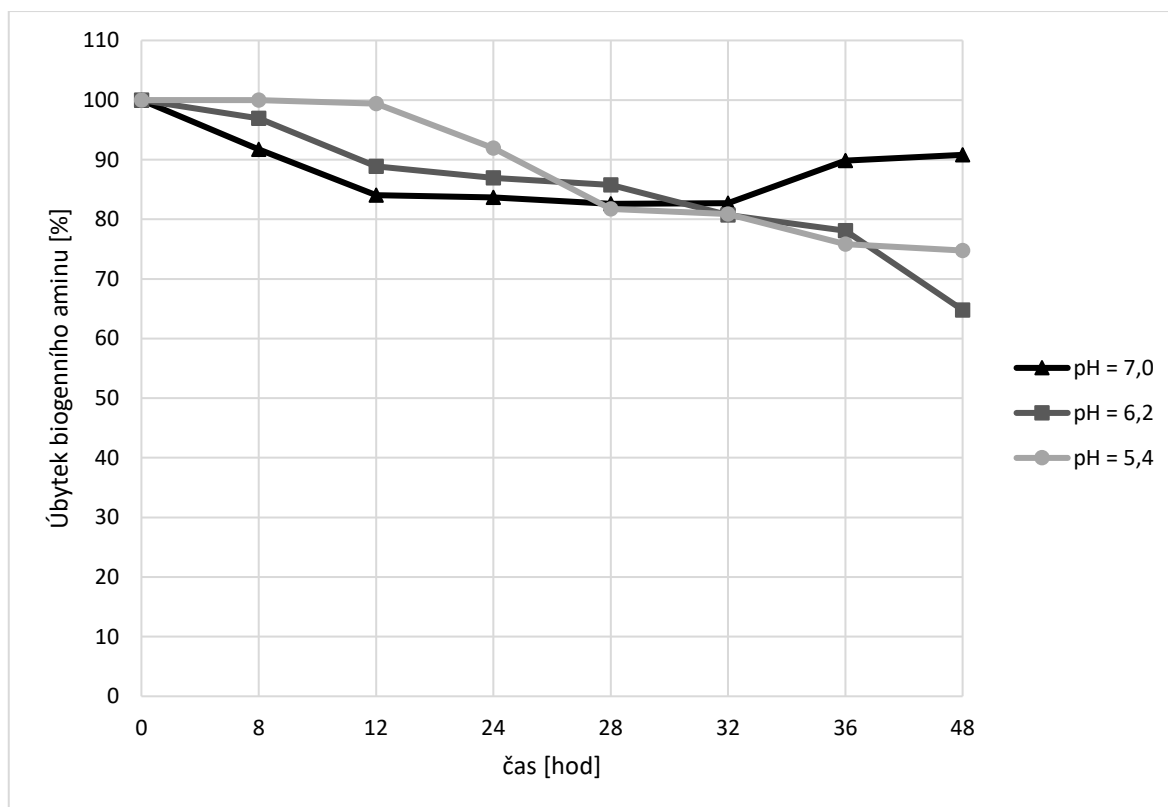
Degradace putrescinu v médiu o pH 7,0 jevíla už od počátku docela značnou rychlost, když po prvních 8 hodinách došlo k jeho poklesu na 80 % (obr. 20). Poté se po 12 a 24 hodinách hodnoty pohybovaly okolo 75 % z původního přidávaného množství. V čase 28 hodin byl naměřen největší úbytek při pH 7,0. V tomto čase koncentrace putrescinu klesla cca o 32 %. Následně k úbytku nedocházelo, naopak byly zjištěny postupně se zvyšující koncentrace a v posledním čase 48 hodin byl stanoven nadbytek putrescinu asi o 5 % vyšší než původní množství. V médiu o pH 6,2 nebyl v prvním odběrovém čase zaznamenán úbytek. Následně, tedy po 12 hodinách došlo k redukci až o 20 %. Tato koncentrace putrescinu se téměř neměnila po dobu 32 hodin, kdy došlo ještě k dalšímu poklesu o 6 %. Nejvyšší degradaci vykazovalo živné médium s nejnižším testovaným pH (5,4). V tomto prostředí zpočátku docházelo k degradaci nízkou rychlostí, která se postupně zvyšovala. Po 8 hodinách došlo k redukci o 6 %, po 12 hodinách o další 3 % a po 24 hodinách byla dosažena hranice 90 %. Zajímavý byl skok mezi 24 a 28 hodinou, kdy došlo k poklesu o 10 % a mezi 32 a 36 hodinou o dalších 10 %. Maximální degradace byla zjištěna po 48 hodinách, z grafu je patrné, že by se úbytek aminu mohl i dále zvyšovat s časem.



Obr. 20. *Lbc. casei* – degradace putrescinu o koncentraci 0,4 g/l při 30 °C v MRS

Degradace histaminu o koncentraci 0,4 g/l při 30 °C a různém pH

Obrázek 21 ukazuje schopnost kmene degradovat histamin při 30 °C. V médiu o pH 7,0 nebyla redukce příliš vysoká a k výrazným úbytkům nedocházelo, nebyly dosaženy ani úbytky 20 %. Po 8 hodinách se koncentrace snížila o 10 % a po dalších 4 hodinách o následujících 8 %. V dalších časech až po 32 hodinu byla hladina histaminu konstantní a v posledních časech dokonce vzrostla. V médiu o pH 6,2 byla stanovena mnohem významnější schopnost degradace a také byly naměřeny nejnižší hodnoty, na které byl kmen schopen histamin redukovat. Po 12 hodinách množství kleslo o 10 % a po 28 hodinách o dalších 5 %. Po 32 hodinách bylo množství histaminu na hranici 80 % z původního množství a 4 hodiny poté byla hranice 80 % pokořena. Mezi 36 a 48 hodinou byl stanoven významný pokles, kdy došlo k úbytku ze 79 % přibližně na hodnotu 64 %, a tedy k poklesu až o 15 procent. Je možné, že v následných potenciálních odběrech by hladiny klesaly i nadále podobnou rychlostí, ale toto je potřeba ověřit v konkrétních případech. V médiu o pH 5,4 nebyly po 8 ani 12 hodinách zaznamenány změny v koncentraci histaminu, ty nastaly až v pozdějších časech. Po 28 hodinách byla koncentrace nižší asi o 18 % vzhledem k počátku a po 36 hodinách byla nižší ještě o dalších 5 %. Nejvyšší úbytek u tohoto pH byl po 48 hodinách a činil asi 25 %.

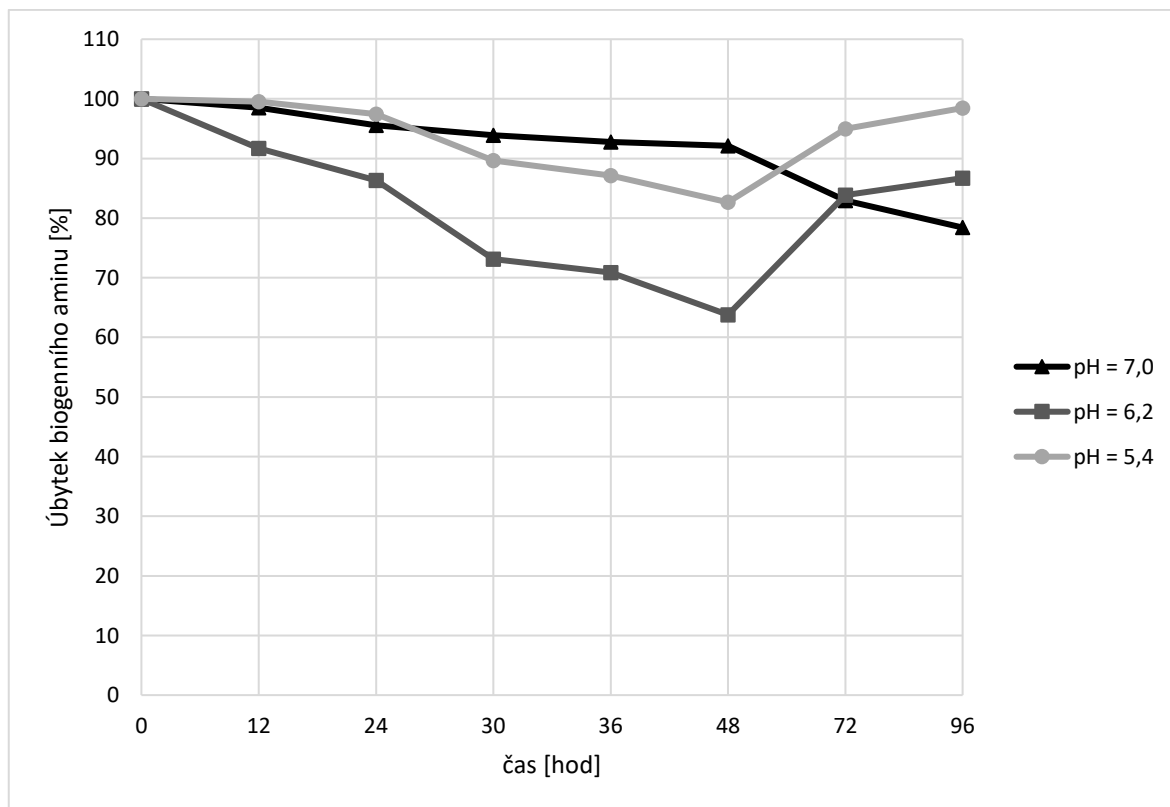


Obr. 21. *Lbc. casei* – degradace histaminu o koncentraci 0,4 g/l při 30 °C v MRS

7.1.5 Degradace biogenních aminů o koncentraci 0,4 g/l při 23 °C v úplném médiu

Degradace fenylethylaminu o koncentraci 0,4 g/l při 23 °C a různém pH

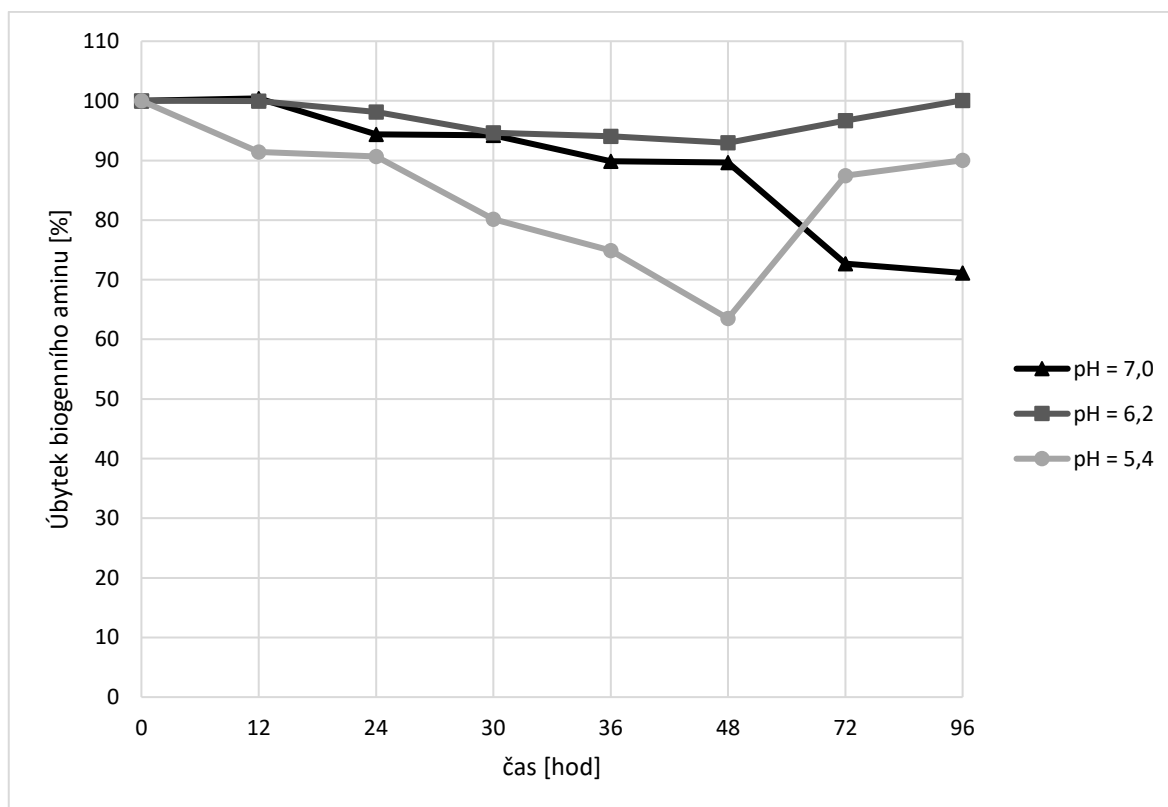
Při teplotě 23 °C vykazoval testovaný kmen nejlepší schopnost degradace v médiu o pH 6,2 (obr. 22). Médium o neutrálním pH se od počátku experimentu jeví jako nejméně vhodné pro redukci fenylethylaminu. Po 12 hodinách nebyly patrné žádné změny a po 24 hodinách byl zjištěn pouze úbytek o 5 %. Po 48 hodinách bylo množství aminu asi 91 %. Ve dvou posledních časech poklesla koncentrace na 82 %, respektive na 78 %, což byla zároveň nejnižší hodnota pro tuto variantu média. V médiu o pH 6,2 došlo k redukci hned po 12 hodinách, a to asi na 92 %. Pokles pokračoval i dále a největší skok byl zaznamenán mezi 24. a 30. hodinou, kdy se koncentrace snížila o 13 %. Po 36 hodinách byla dosažena hranice 70 % a nejnižší hodnota byla zjištěna 63 % po 48 hodinách kultivace. V médiu s nejnižším pH byl pozorován mírnější pokles, v prvních dvou časech srovnatelný s médiem o pH 7,0. Po 30 hodinách dále došlo k úbytku o 10 %, tedy na 90 % z původního přidávaného množství. Největší úbytek byl, stejně jako u předchozího média, zaznamenán po 48 hodinách a činil asi 19 %. Po 72 hodinách došlo k nárůstu a koncentrace rostla i nadále. Na konci měření se hladiny fenylethylaminu pohybovaly těsně pod hranicí 100 %.



Obr. 22. *Lbc. casei* – degradace fenylethylaminu o koncentraci 0,4 g/l při 23 °C v MRS

Degradace putrescinu o koncentraci 0,4 g/l při 23 °C a různém pH

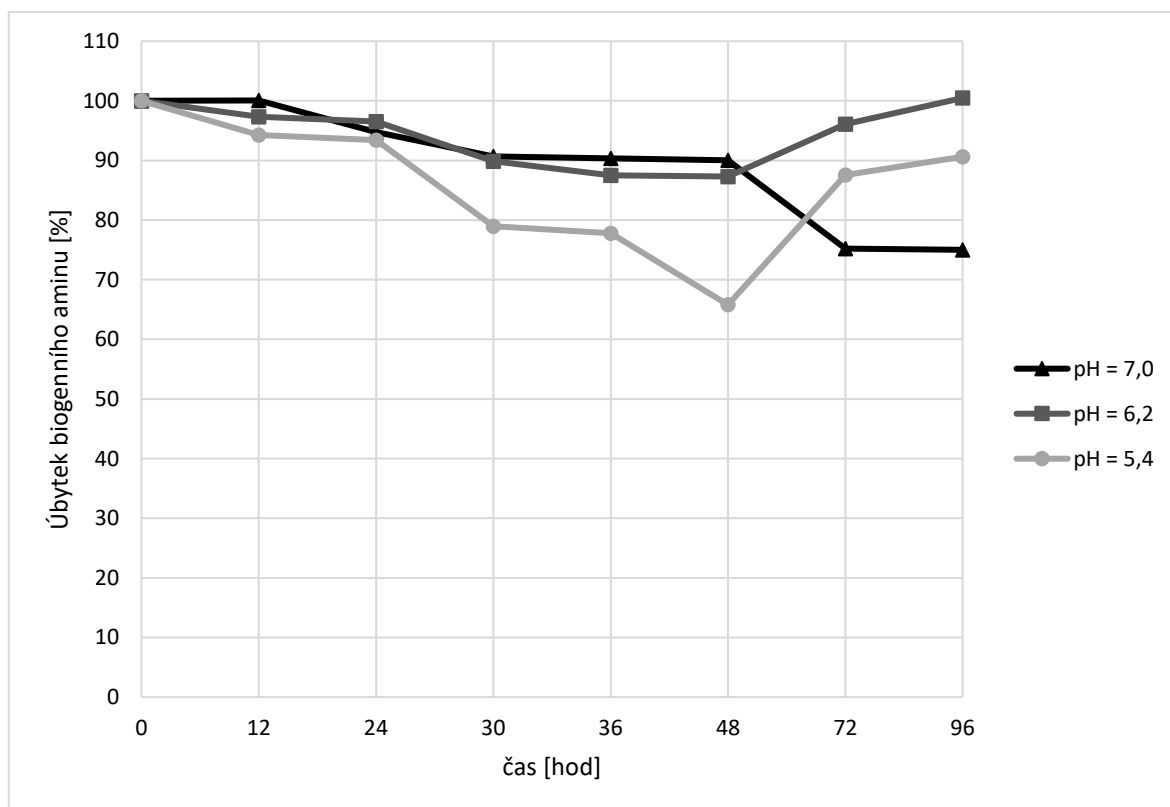
Na obrázku 23 je zobrazena schopnost degradace putrescinu testovaným kmenem při daných podmínkách. Za těchto podmínek byly pozorovány nejvýraznější úbytky v médiu s nejnižším testovaným pH, tedy 5,4. V médiu o pH 7,0 docházelo zpočátku k mírnému snižování koncentrace putrescinu. Během prvních 12 hodin byla hodnota konstantní a ke snižování došlo až po 24 hodinách, a to o 8 %. V následném čase byla hodnota koncentrace stejná a pokles na 90 % byl zjištěn i po 36 hodinách. Nejvýraznější změna byla v tomto médiu zaznamenána mezi 48. a 72. hodinou kdy došlo k poklesu z 90 % na přibližně 72 %. Následně došlo ke snížení na cca 70 %, a to po 96 hodinách. Nejméně výrazná degradace byla zjištěna v médiu o pH 6,2. Zde docházelo k redukci putrescinu pouze o 8 %, a to po 48 hodinách kultivace. Následně výsledky poukázaly na zvyšující se koncentraci v posledních odběrových časech. Nejvýraznější úbytek byl zaznamenán v médiu o pH 5,4, kdy docházelo k degradaci už od počátku a poměrně značnou rychlostí. Po 24 hodinách se koncentrace snížila o 10 % a už po 30 hodinách dokonce o celkových 20 %. Tendence klesat byla zachována i nadále, po 36 hodinách byly naměřeny hladiny okolo 75 % z původního množství. Nejvyšší pokles byl stanoven po 48 hodinách na cca 62 %.



Obr. 23. *Lbc. casei* – degradace putrescinu o koncentraci 0,4 g/l při 23 °C v MRS

Degradace kadaverinu o koncentraci 0,4 g/l při 23 °C a různém pH

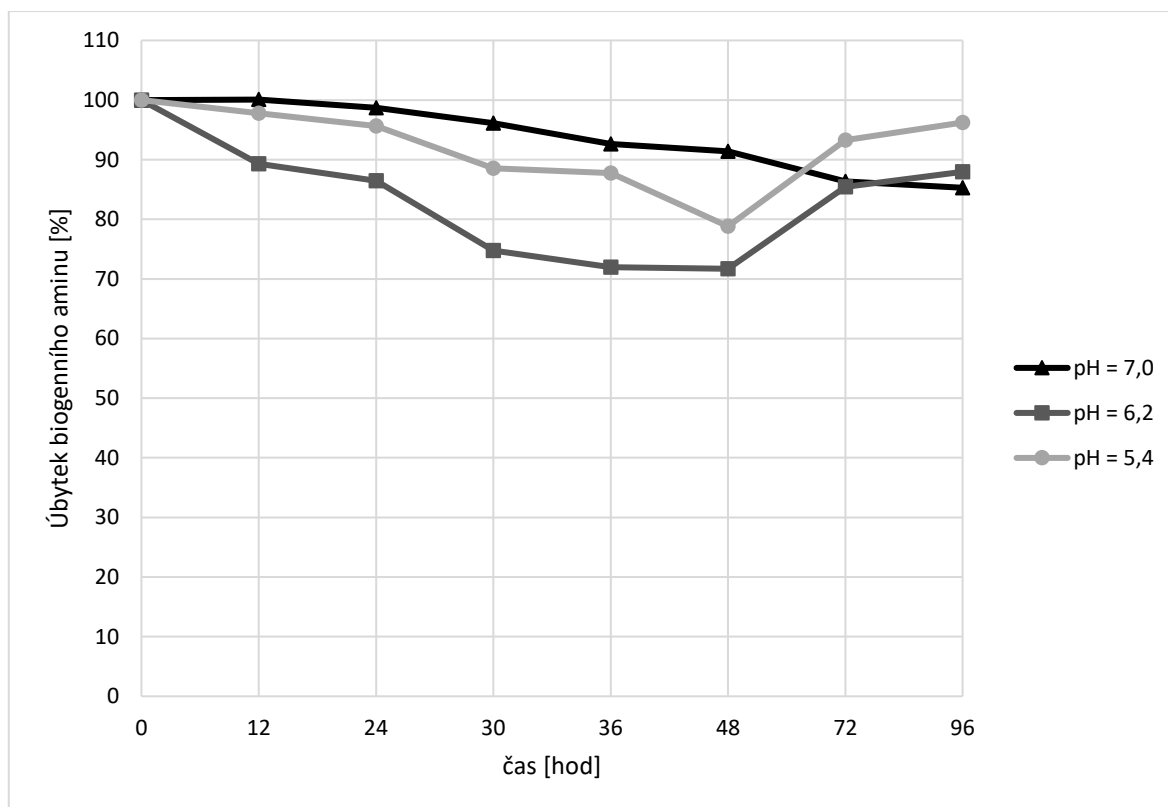
Degradace kadaverinu kmenem *Lbc. casei* subsp. *casei* CCDM 198 za těchto růstových podmínek měla podobný průběh, jako tomu bylo u putrescinu (obr. 24). V médiu o pH 7,0 v prvním čase došlo k minimálnímu úbytku a následně po 24 hodinách pouze o dalších 5 %. Po 30 hodinách byla dosažena hranice 90 % z původních 100 % a tato hodnota byla konstantní i pro inkubaci trvajících 36 a 48 hodin. Významný úbytek byl zaznamenán mezi 48. a 72. hodinou, kdy došlo k poklesu o dalších 16 %. Tato hodnota byla obdobná také v posledním měření. K úbytkům v médiu o pH 6,2 docházelo výrazněji než u putrescinu, ale také se nejednalo o významnější hodnoty. Po 24 hodinách byla hladina kadaverinu na cca 95 %, po 30 hodinách to bylo 90 %, a po 36 hodinách asi 87 %. Tato hodnota je považována za nejnižší, jelikož po 48 hodinách bylo stanoveno téměř stejné množství kadaverinu. Nejvýrazněji se degradace projevila u nejméně kyselého média. Zde bylo po 12 hodinách dosaženo úbytku o 5 % a o dalších 12 hodin později pouze o další 2 %. Výrazný však byl pokles mezi 24. a 30. hodinou, kdy došlo k poklesu z 93 % na 79 %. Následný pokles po 36 hodinách je zanedbatelný, ale po 48 byla koncentrace kadaverinu rovna přibližně 65 % vzhledem k původnímu přidávanému množství.



Obr. 24. *Lbc. casei* – degradace kadaverinu o koncentraci 0,4 g/l při 23 °C v MRS

Degradace tyraminu o koncentraci 0,4 g/l při 23 °C a různém pH

Při daných podmínkách byla u tyraminu poprvé zaznamenána redukce vyšší než o 20 % alespoň u jednoho testovaného pH. Během kultivace v médiu o pH 7,0 docházelo k pozvolným a velmi mírným úbytkům (obr. 25). V prvních dvou odběrových časech téměř nešlo rozpoznat rozdíly. Po 36 hodinách byla hladina tyraminu asi na 91 % z původní koncentrace a po 72 hodinách byla pokořena hranice 90 %, a to až na 85 %. Nejnižší koncentrace byla stanovena v poslední odběrový čas 96 hodin a byla rovna asi 84 % té původní. Nejvýraznější redukce byla zjištěna v médiu o pH 6,2. Po prvních 12 hodinách došlo ke snížení množství tyraminu o 10 % a za následujících 12 hodin o další 3 %. Mezi odběrem po 24 a 30 hodinách byl zaznamenán nejvyšší pokles, a to z 87 % na asi 73 %. Tento pokles byl nejvýraznější a činil 14 %. V dalších časech byl úbytek minimální a přiblížil se 70 %. V médiu o pH 5,4 docházelo k degradaci nízkou rychlostí, zejména zpočátku. Po 12 hodinách došlo k mírnému úbytku o 2 % a po 24 hodinách asi o celkových 5 %. V čase 30 hodin klesla koncentrace tyraminu pod 90 % a v čase 36 hodin to bylo konkrétně 88 %. Následoval největší skok ze zmíněných 88 % na hodnotu 79 %. Výraznějších změn bohužel dosaženo nebylo a koncentrace tyraminu dále rostla, téměř až ke 100 %.

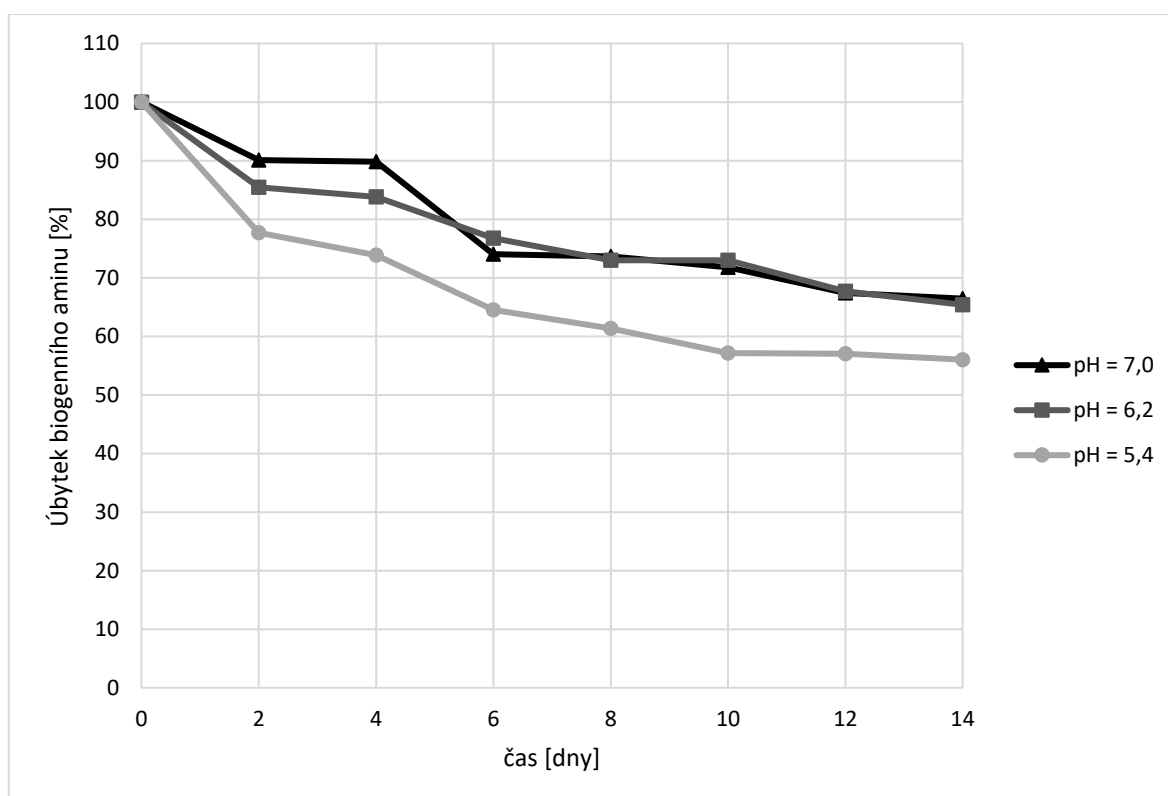


Obr. 25. *Lbc. casei* – degradace tyraminu o koncentraci 0,4 g/l při 23 °C v MRS

7.1.6 Degradace biogenních aminů o koncentraci 0,4 g/l při 11 °C v úplném médiu

Degradace putrescinu o koncentraci 0,4 g/l při 11 °C a různém pH

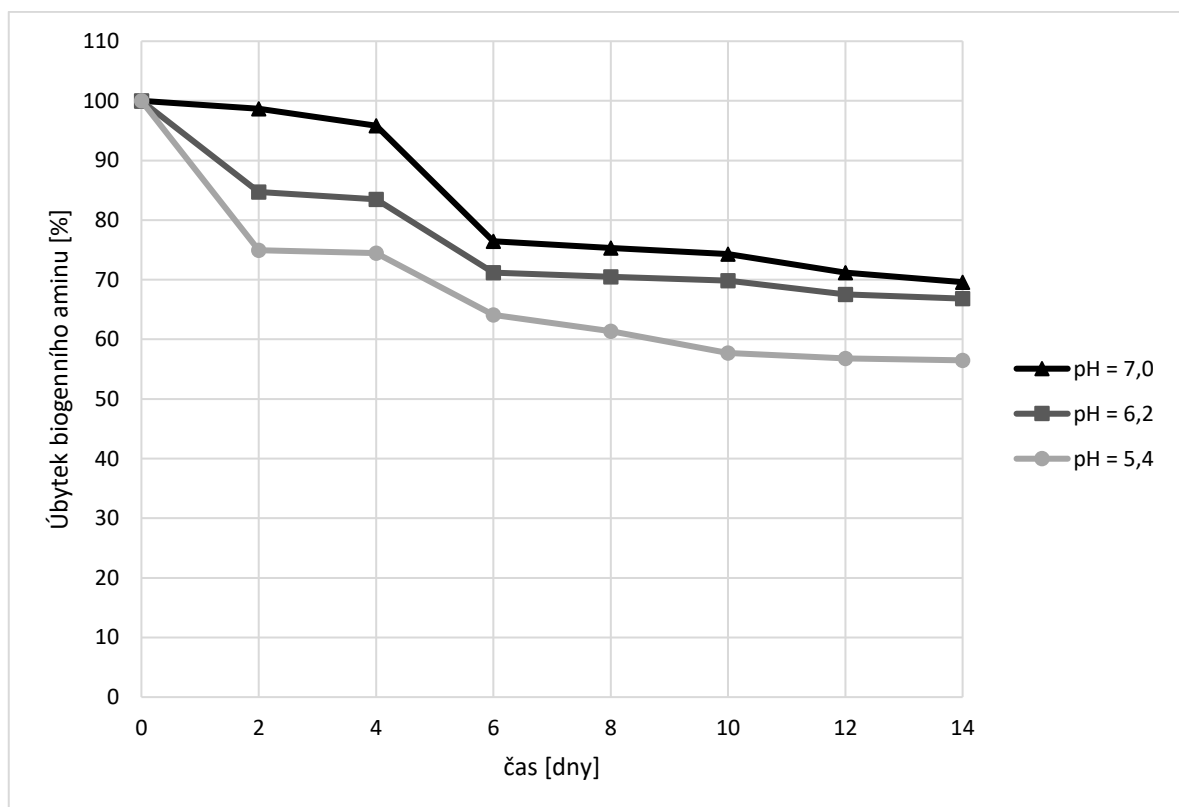
Degradace putrescinu při 11 °C vykazovala klesající charakter. Nejvíce kmenu vyhovovalo médium o pH 5,4 (obr. 26). Médium o pH 7,0 jevílo úbytek již po 2 dnech kultivace a došlo k poklesu o rovných 10 %. Následující 2 dny došlo pouze k mírnému snížení koncentrace putrescinu. Velmi výrazný skok byl zaznamenán mezi 4 a 6 dny, kdy došlo k redukci až 18 % množství putrescinu. Následný pokles již byl pouze mírný, ale koncentrace se neustále snižovala. V posledním časovém odběru po 14 dnech byla naměřena hodnota 65 % z původního množství putrescinu. Médium o pH 6,2 vykazovalo podobný charakter snižování jako prostředí neutrální, kdy již po 2 dnech došlo k redukci téměř 15 % putrescinu. Následovalo však zpomalení a zmírnění degradace, ale rovněž ke snižování docházelo. Poslední 4 odběrové časy byly vzhledem k degradaci téměř totožné s hodnotami v médiu o neutrálním pH, po 14 dnech byla koncentrace putrescinu rovněž na 65 %. Nejvíce byl redukován amin v médiu o pH 5,4. Už po 2 dnech došlo k poklesu až o 22 % a po 6 dnech až o 37 %. Po 10 dnech byla překročena hranice 60 % a úbytek tedy přesáhl 40 %. Po 14 dnech byla koncentrace putrescinu přibližně na 55 % z původního množství, což jsou velmi významné hodnoty degradace.



Obr. 26. *Lbc. casei* – degradace putrescinu o koncentraci 0,4 g/l při 11 °C v MRS

Degradace kadaverinu o koncentraci 0,4 g/l při 11 °C a různém pH

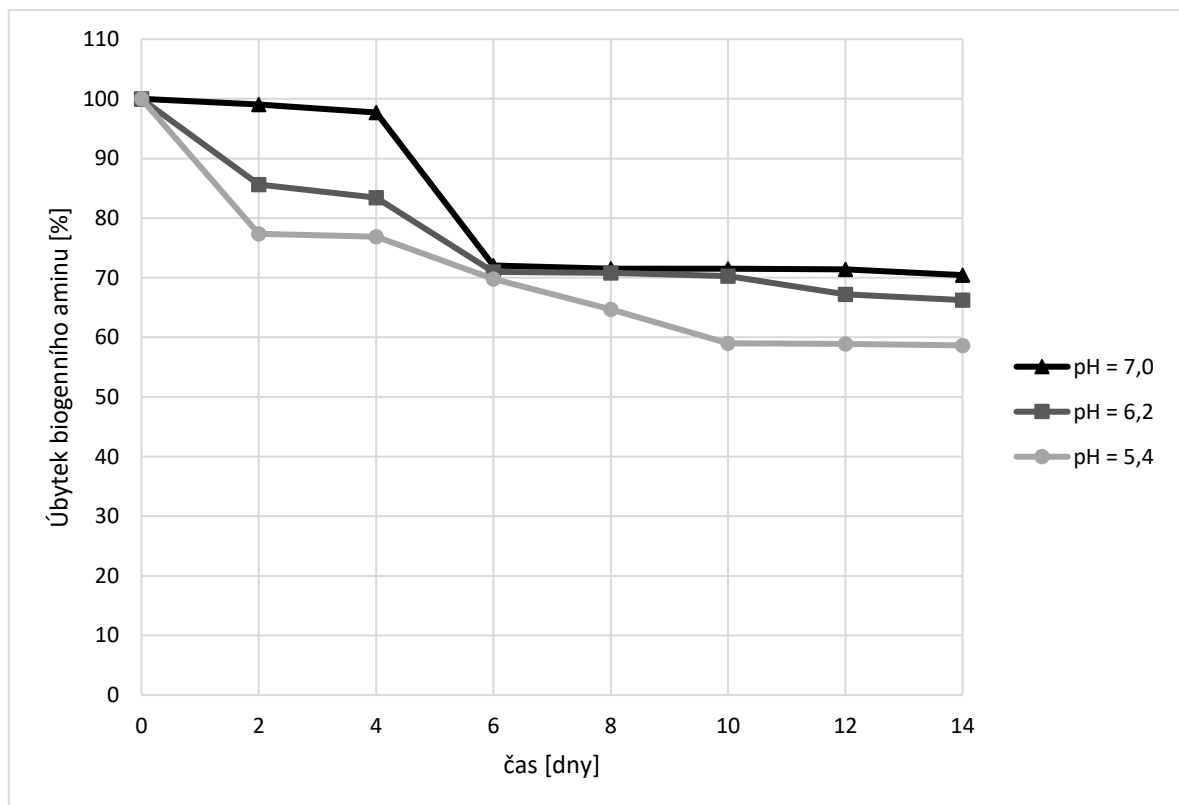
Na obrázku 27 je znázorněna degradace kadaverinu při třech testovaných pH. Všechny křivky mají podobný průběh, kdy u všech došlo k výraznému poklesu mezi 4. a 6. dnem a následně k úbytkům docházelo jen pozvolna. V médiu o neutrálním pH měl testovaný kmen poměrně pomalý start, kdy po 4 dnech byla hladina kadaverinu asi na 96 %. Poté došlo ke zmíněnému výraznému skoku až na 76 %. Následovalo mírné snižování koncentrace po každých dvou dnech a výsledkem bylo dosažení 70% hranice po 14 dnech. V médiu o pH 6,2 byly patrné výraznější úbytky kadaverinu. Už po 2 dnech došlo k poklesu o 15 % a další velký pokles byl pozorován mezi 4. a 6. dnem, rovněž o 15 %. Od tohoto času se snižovaly koncentrace kadaverinu pouze pozvolně a po 14 dnech bylo stanoveno konečné množství kadaverinu cca 67 %, to znamená celkový úbytek až o 33 % z původního množství. Nejvyšší úbytek byl naměřen v médiu o pH 5,4. Již po 2 dnech poklesla koncentrace aminu o celých 25 %, což je velmi významný úbytek. Následně bylo po 6 dnech zjištěno 63 % kadaverinu z původního množství. Osmý den bylo dosaženo přibližně 61 % a po 10 dnech byla koncentrace tohoto aminu snížena dokonce o cca 42 %. 14. den kultivace prokázal degradaci až 44 % kadaverinu.



Obr. 27. *Lbc. casei* – degradace kadaverinu o koncentraci 0,4 g/l při 11 °C v MRS

Degradace histaminu o koncentraci 0,4 g/l při 11 °C a různém pH

Další významná degradace byla zjištěna u histaminu při nízké teplotě kultivace (11 °C). Tato degradace měla velmi podobný průběh jako u předchozího aminu. V médiu o pH 7,0 nedošlo po 2 ani 4 dnech k výraznému úbytku, ale po 6 dnech koncentrace histaminu klesla až na hranici 70 % (obr. 28). V dalších časech nebyl úbytek méně významný. Po 14 dnech kultivace bylo dosaženo maximálně 30% úbytku a vzhledem ke tvaru křivky by už v dalších potenciálních odběrech k výrazné redukci nejspíš nedocházelo. Médium o pH 6,2 jevílo výraznější úbytek již od počátku, když hned po 2 dnech došlo k redukcí 15 % množství histaminu. Následně došlo k dalšímu výraznému poklesu, po 6 dnech až na hodnotu 70 %. Na tuto hodnotu poukazovaly i odběry po 8 a 10 dnech a nakonec byla ve 14. dni naměřena hladina cca 66 % z původního množství. Stejně jako u předchozího aminu nejvyšší poklesy koncentrace vykazovalo médium s nejnižším pH. Již v prvním odběrovém čase byl histamin redukován o cca 23 %. Dva dny poté byla koncentrace nižší pouze o 2 %, ale následně se rychlost poklesu zvýšila. Po 6 dnech byl histamin redukován na 70 %, po 8 dnech na 64 % a v 10. dni na 60 %. V posledních dvou odběrech rychlost poklesla a finální hodnota byla asi 59 %.

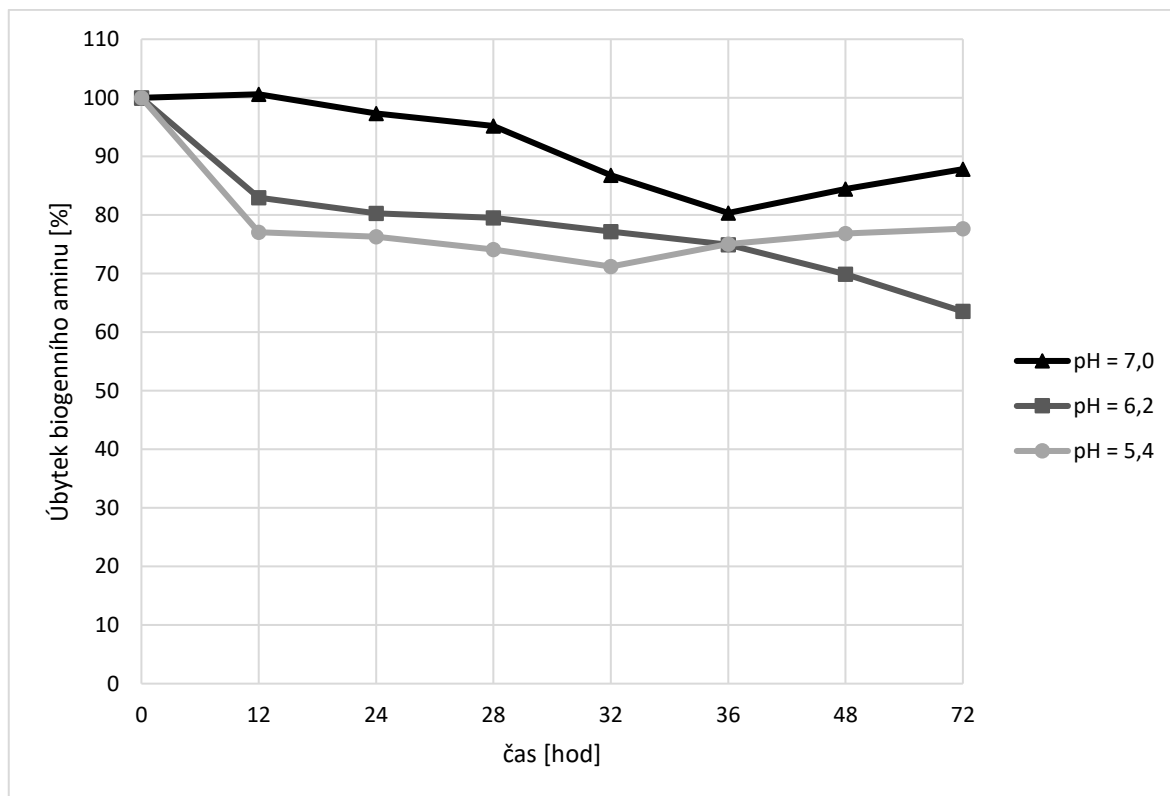


Obr. 28. *Lbc. casei* – degradace histaminu o koncentraci 0,4 g/l při 11 °C v MRS

7.1.7 Degradace biogenních aminů o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v médiu s nižším obsahem živin

Degradace fenylethylaminu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C a různém pH

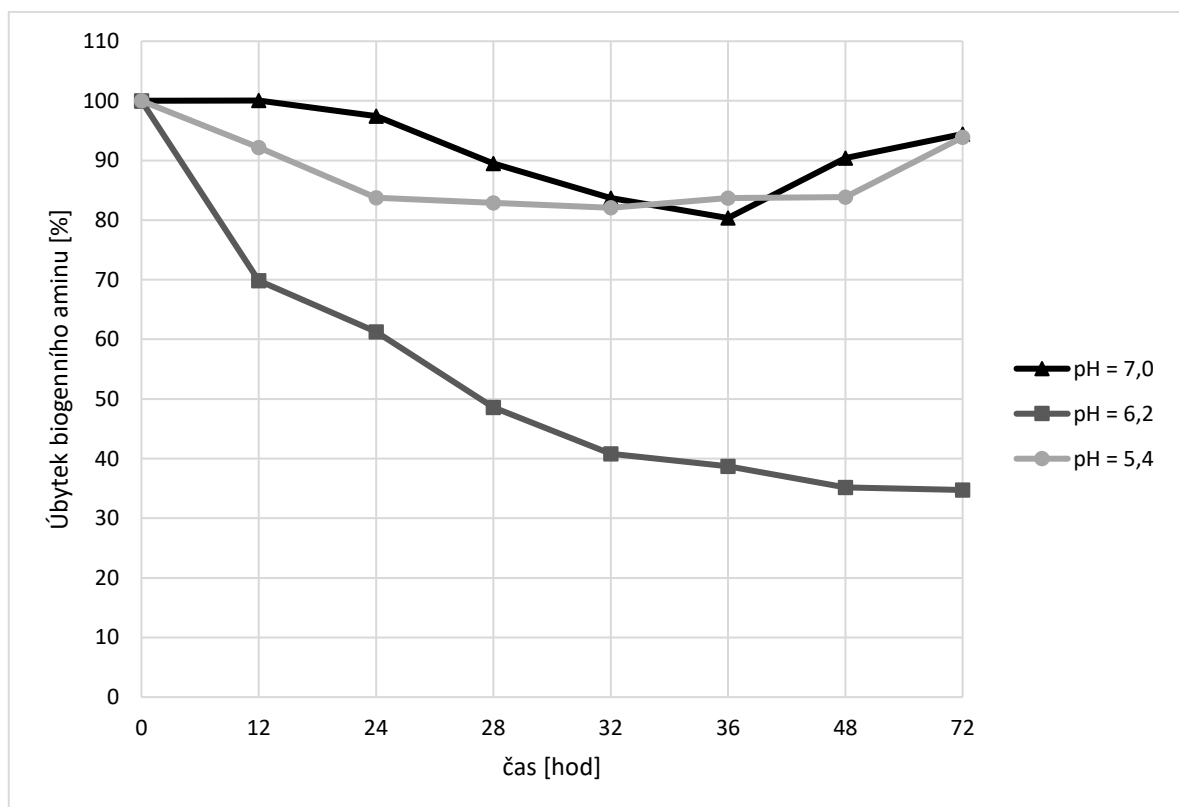
V následujících experimentech byl sledován úbytek biogenních aminů v médiích s nižší koncentrací živin. I přesto, že fenylethylamin nebyl během experimentu příliš degradován, tyto podmínky se jeví jako nejvýhodnější pro jeho snížení (obr. 29). V médiu o pH 7,0 byl tento amin redukován velmi pomalu. Po 12 hodinách byla koncentrace totožná s původní a redukce byla zahájena až po 24 hodinách. Po 28 hodinách byl úbytek pouze 5 % a ve 32. hodině byla překročena hranice 90 %. Nejvyšší úbytek byl v médiu o neutrálním pH zjištěn po 36 hodinách, konkrétně na 80 %. Nejvyšší úbytek byl stanoven v médiu o pH 6,2. Po 12 hodinách došlo k redukci aminu na přibližně 82 %. Rychlost degradace se poté snížila až po dosažení 36. hodiny a hladiny fenylethylaminu na 75 %. Následně byly stanoveny vyšší úbytky, kdy po 48 hodinách byl zaznamenán pokles koncentrace o 30 % a po 72 hodinách až o 38 %. Zvýšení degradační aktivity v posledních časech poukazuje na potenciální snižování koncentrace i s dalším prodlužujícím se časem. Médium o pH 5,4 jeví také významné hodnoty a nejvyšší úbytek byl zaznamenán o 29 % po 32 hodinách.



Obr. 29. *Lbc. casei* – degradace fenylethylaminu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v médiu s nižším obsahem živin

Degradace putrescinu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C a různém pH

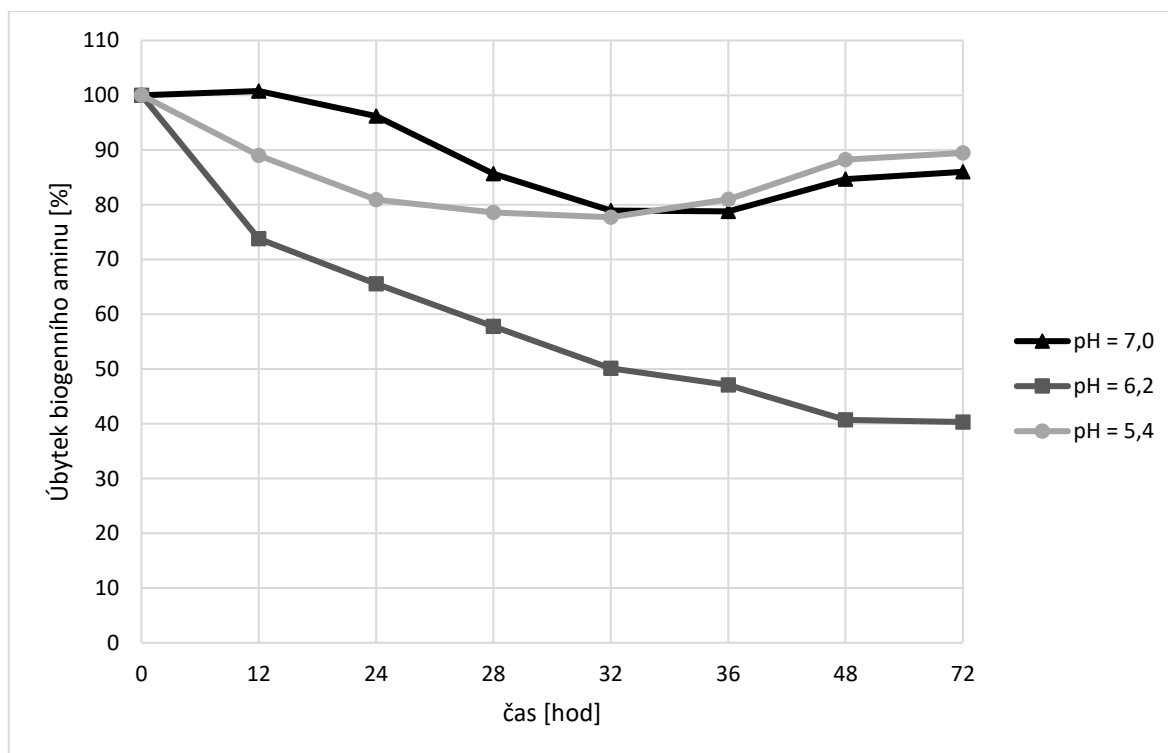
Během těchto růstových podmínek byl zaznamenán nejvyšší úbytek putrescinu a konkrétně i největší úbytek ze všech biogenních aminů za všech testovaných podmínek. Vypadá to, že poloviční koncentrace živin byla zásadním faktorem působícím pozitivně na degradaci. Ovšem i kombinace ostatních podmínek hrála značnou roli. V médiu o neutrálním pH docházelo v počátečních odběrových časech pouze k nízkým úbytkům a například po 28 hodinách byla koncentrace putrescinu asi na 90 % (obr. 30). Maximálně bylo dosaženo 80% koncentrace, a to konkrétně po 36 hodinách. V médiu o nejnižším pH také příliš nedocházelo k degradaci. Po 24 hodinách byl úbytek asi 16 % a nejvyšší byl zjištěn již po 32 hodinách a činil asi 19 %. Médium o pH 6,2 v kombinaci s ostatními podmínkami mělo zásadní vliv na degradaci putrescinu. Již po prvním odběru poklesla koncentrace až na 70 % a po 24 hodinách téměř na hladinu 60 %. Velmi významný a výrazný skok byl zaznamenán už o 4 hodiny později a konkrétně pod hranici 50 % z původního množství. Degradace pokračovala i nadále, když ve 32. hodině byl úbytek už skoro 60 % a po dalších čtyřech hodinách více než 60 %. V posledním odběrovém čase 72 hodin bylo naměřeno přibližně 34 % koncentrace putrescinu z původního množství, což odpovídalo úbytku až o 66 %.



Obr. 30. *Lbc. casei* – degradace putrescinu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v médiu s nižším obsahem živin

Degradace kadaverinu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C a různém pH

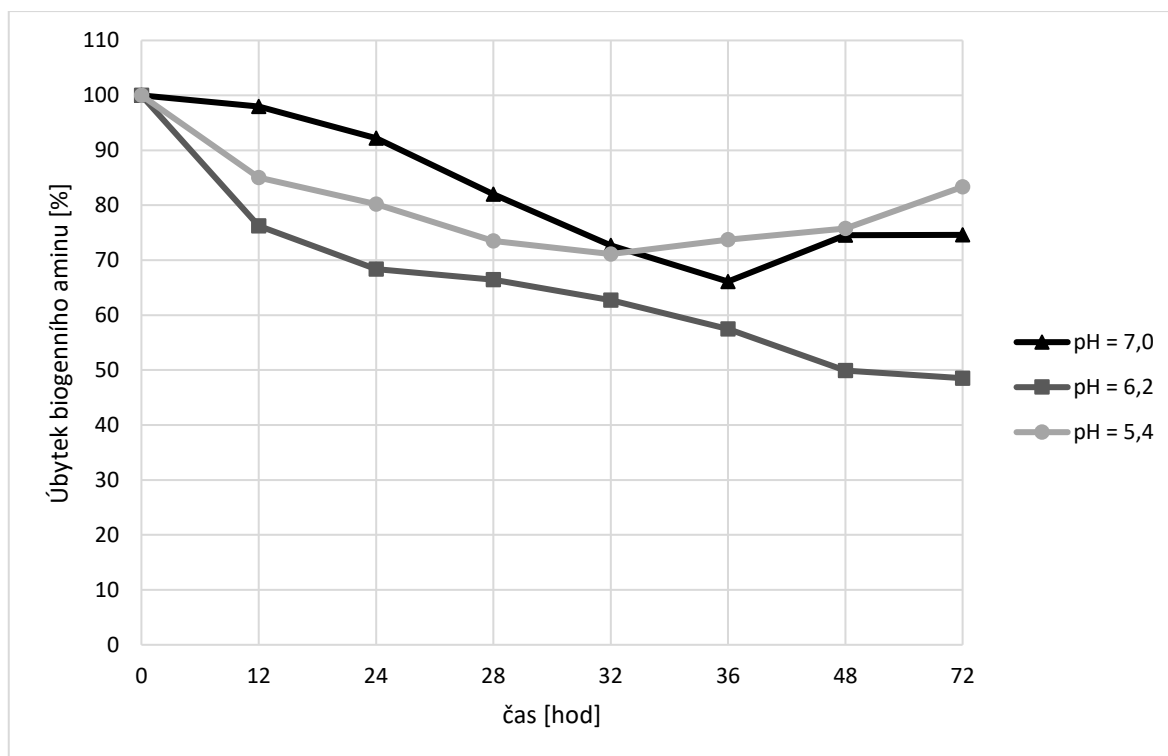
Na obrázku 31 je znázorněna degradace kadaverinu při daných podmínkách, které podobně jako u putrescinu přispěly k významné degradaci. Podobně jako v předchozím případě neprobíhala výrazná degradace v médiu o pH 7,0 ani 5,4. V médiu o neutrálním pH byla inhibice patrná později, kdy k redukci kadaverinu došlo až po 24 hodinách a to na 96 %. Následoval výraznější pokles až na hodnotu 85 % a poté dokonce na hodnoty nižší než 80 %, a to konkrétně na 79 %. Hodnota 79 % byla naměřena také po 36 hodinách a k dalšímu úbytku v médiu o tomto pH nedošlo. V médiu o pH 5,4 byl pozorován prudší nástup a k degradaci došlo už po 12 hodinách, a to na 90 %. 12 hodin poté byl pokles dohromady dvojnásobný, ale následně došlo k úbytku jen o další 2 % a nejnižší hodnota byla stanovena již ve 32. hodině. Podobně jako u putrescinu byl nejvýznamnější pokles pozorován v médiu o pH 6,2. Hned po 12 hodinách byl úbytek přibližně 28 % a po 24 hodinách už asi 35 %. Hranice 60 % z celku byla dosažena už po 28 hodinách a ve 32. hodině byla hladina dokonce na 50 %. 4 hodiny poté poklesla koncentrace kadaverinu o další 2 % a po 48 hodinách byla naměřena hodnota odpovídající asi 40 % koncentraci z původního přidávaného množství. Tato hodnota byla totožná i v poslední odběrový čas a maximální degradace tedy byla na 40 %, to znamená úbytek až 60 % množství kadaverinu.



Obr. 31. Lbc. casei – degradace kadaverinu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v médiu s nižším obsahem živin

Degradace histaminu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C a různém pH

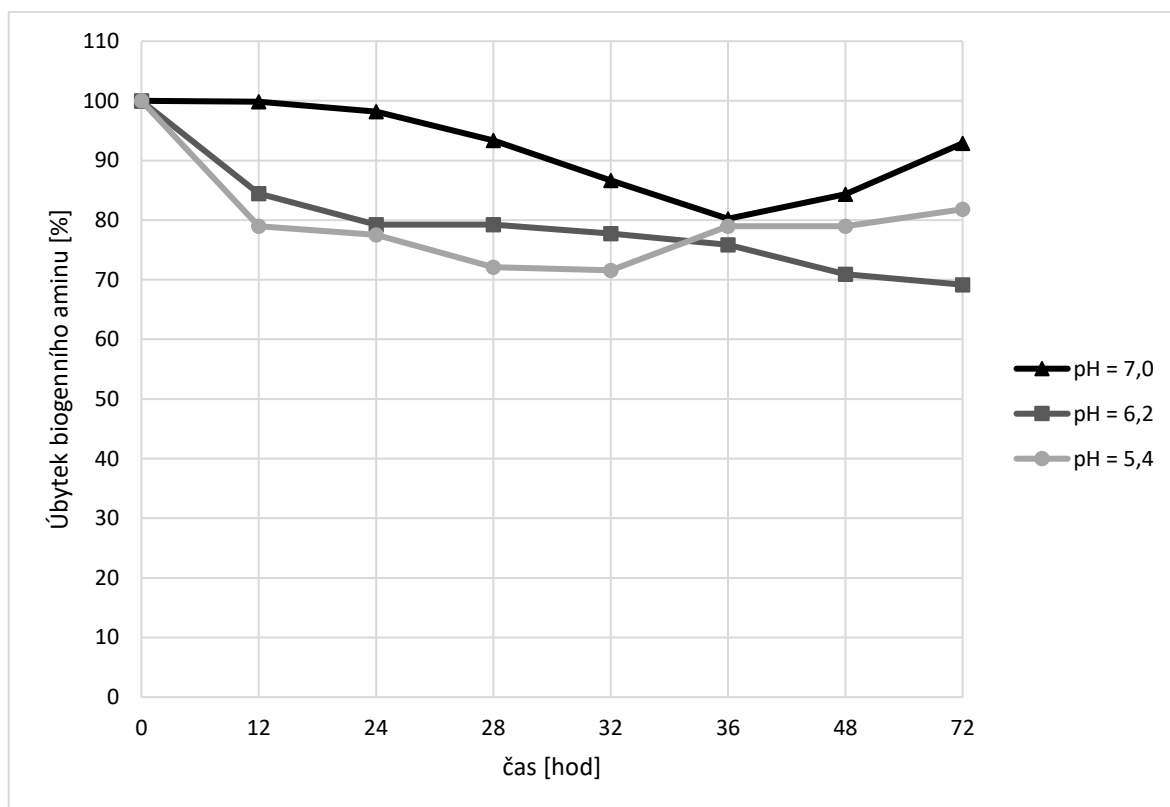
Stejně jako u ostatních biogenních aminů, došlo i u histaminu během těchto podmínek k nejvyšší aktivitě degradačních enzymů. Už od počátku bylo pozorováno snižování koncentrace u všech testovaných médií (obr. 32). V médiu o pH 7,0 docházelo téměř ke stejnoměrnému úbytku od 12. hodiny až po 36. hodinu. Po 24 hodinách došlo k poklesu na hladinu 91 % a po 28 hodinách na přibližně 80 %. Čtyři hodiny poté byl úbytek už 30 % a ve 36. hodině byl naměřen maximální pokles o celkových 35 %. Vyšší rychlost úbytku na počátku byla zjištěna v médiu o nejnižší hodnotě pH, tedy 5,4. Již po prvních 12 hodinách byl zaznamenán pokles koncentrace o 15 % a po 24 hodinách už o 20 %. Od 28. hodiny se však rychlost degradace histaminu snížila a mezi 28. a 32. hodinou byl zaznamenán úbytek pouze 2 % a výsledná nejnižší hodnota tedy byla 71 %. Podobně jako v předchozích případech byl histamin nejlépe degradován v médiu o pH 6,2. Ihned po 12 hodinách došlo k poklesu na hladinu 75 % a 12 hodin poté až na 70 %. 32 hodinová kultivace poukazovala na degradaci blízkou se k hranici 60 % z původního množství a po 36 hodinách byla hranice 60 % pokořena. Následné hodnoty byly ještě nižší, konkrétně po 48 hodinách byl úbytek už 50 %. Nejvyšší redukce však byla stanovena po 72 hodinách, kdy byl úbytek histaminu až 51 %, což lze považovat za velmi významnou degradaci.



Obr. 32. *Lbc. casei* – degradace histaminu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v médiu s nižším obsahem živin

Degradace tyraminu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C a různém pH

Podobně jako u ostatních biogenních aminů byl při těchto testovaných podmínkách zaznamenán největší úbytek tyraminu (obr. 33), i když nebyl tak markantní. Nejpomalejší start degradace byl stanoven v živném médiu o neutrálním pH. Zde došlo k prvnímu snížení koncentrace až po 24 hodinách a pouze o 2 %. Čtyři hodiny poté byla dosažena hodnota 92 % a o další 4 hodiny později 87 %. Nejvyšší úbytek, konkrétně na 80 % byl stanoven již po 36 hodinách a v následujících odběrových časech měl tendenci stoupat směrem k původní hodnotě. V médiu o pH 6,2 bylo hned po 12 hodinách dosaženo výrazného poklesu množství tyraminu až o 15 %. Následovalo další snížení až na hranici 80 %. V dalších 8 hodinách však degradace stagnovala a množství aminu se od 24 hodiny téměř nelišilo. Po 36 hodinách byl zaznamenán další mírný úbytek, dohromady o 23 % a ve 48. hodině byl téměř dosažen úbytek 30 %. Hranice 70 % však byla pokořena až v poslední experimentální čas, kdy došlo poklesu koncentrace tyraminu na celkových 69 %. Druhý nejvyšší úbytek byl pozorován v médiu s hodnotou pH 5,4, v němž už po 12 hodinách došlo k degradaci až 21 % tyraminu. Po 28 hodinách byla koncentrace přibližně na 71 % stejně jako po 32 hodinách a to bylo minimální zjištěné množství v tomto médiu. Maximální úbytek byl tedy 29 %.



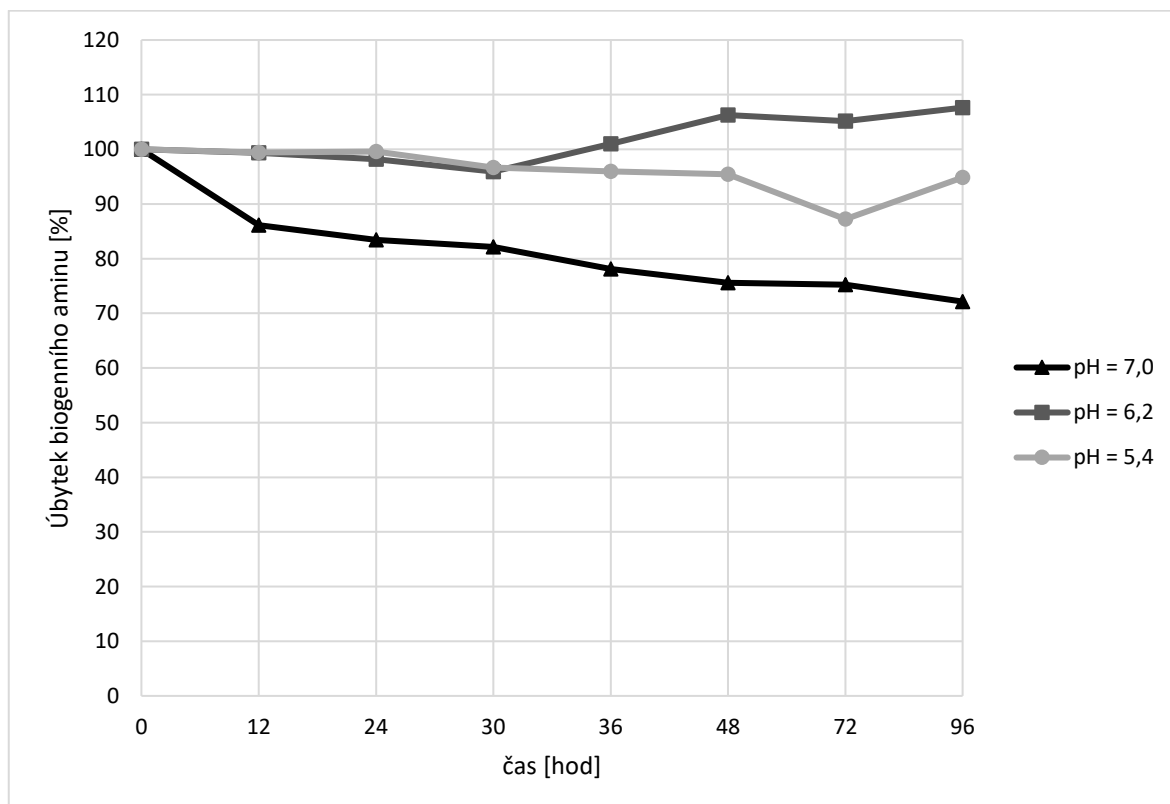
Obr. 33. *Lbc. casei* – degradace tyraminu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v médiu s nižším obsahem živin

7.1.8 Degradace biogenních aminů o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v médiu s nižším obsahem živin

Při těchto testovaných podmínkách nedocházelo k výraznějším změnám v koncentraci jednotlivých biogenních aminů. K úbytku většímu než 20 % došlo pouze v jednom případě, u histaminu. Z tohoto důvodu jsou ostatní výsledky uvedeny pouze v příloze PI.

Degradace histaminu o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C a různém pH

Histamin byl výrazněji degradován pouze v médiu o pH 7,0 (obr. 34), což nebylo v předchozích případech patrné. Během kultivace v živném médiu o pH 6,2 došlo maximálně k úbytku 5 %, a to už po 30 hodinách. V médiu o nejnižším pH byl maximální úbytek o něco větší, konkrétně 12 % po 72 hodinách. V médiu o neutrálním pH docházelo výjimečně k nejvyšší degradaci, když hned po 12 hodinách byla koncentrace histaminu snížena na přibližně 85 %. Poté však došlo ke zpomalení rychlosti degradace, ale k zastavení nedošlo. Po 24 hodinách hladina klesla o další 2 % a po 36 hodinách byla dosažena a pokořena hranice 80 %. Po 48 hodinách byl úbytek už 25 %, stejně jako po 72 hodinách. Nejnižší hladina byla naměřena až v posledním odběrovém čase, tedy po kultivaci 96 hodin na hodnotu asi 71 %.

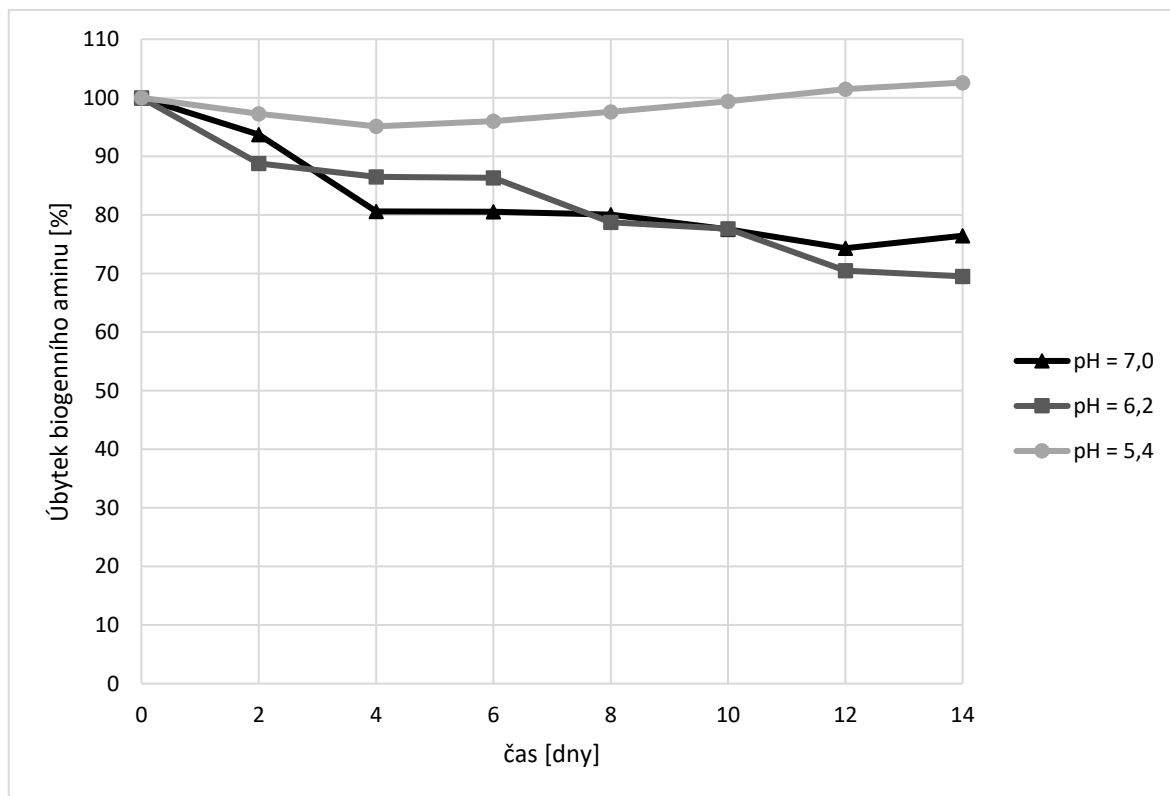


Obr. 34. *Lbc. casei* – degradace histaminu o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v médiu s nižším obsahem živin

7.1.9 Degradace biogenních aminů o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v médiu s nižším obsahem živin

Degradace putrescinu o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C a různém pH

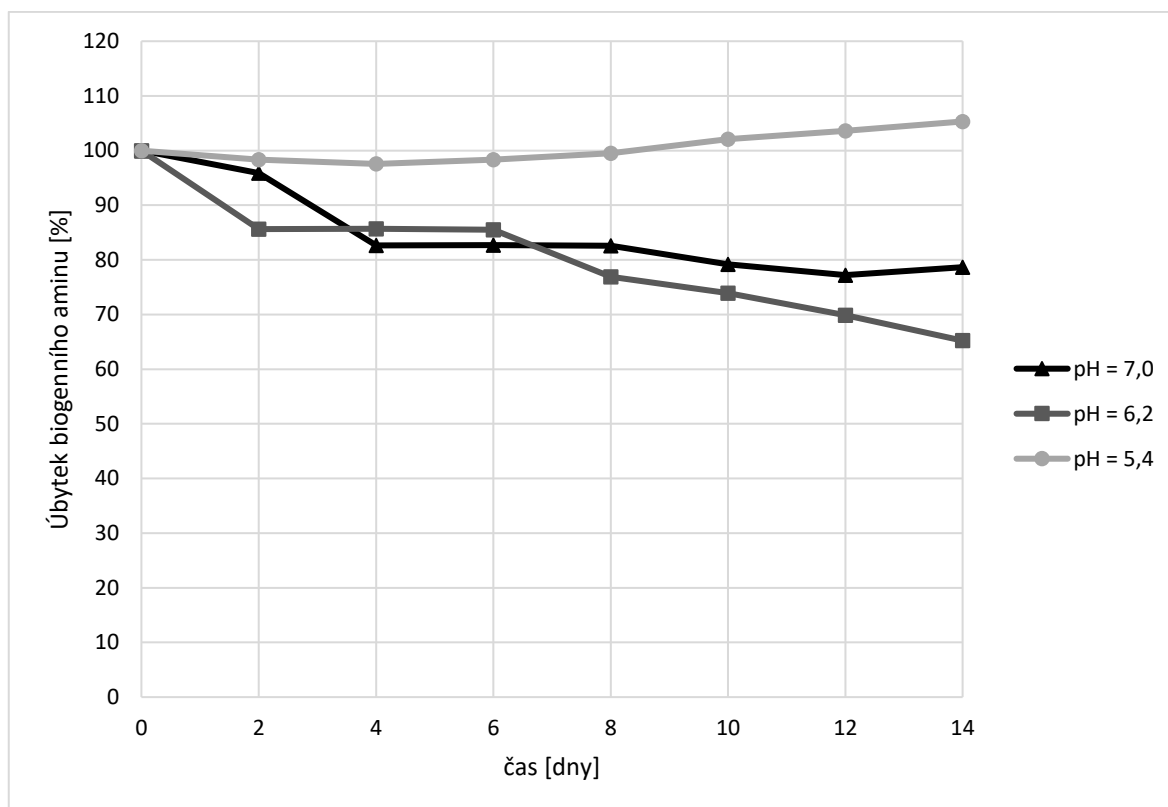
Během testovaných podmínek této poslední skupiny byla zaznamenána degradace vyšší než 20 % pouze u tří biogenních aminů a jedním z nich byl putrescin (obr. 35). Médium s nejnižší hodnotou pH nejevilo téměř žádný úbytek, nejvíce pouze 5 % a proto nebude více diskutováno. Výraznější redukce putrescinu než v prvním případě byla zjištěna v médiu o pH 7,0, kdy po 2 dnech kultivace došlo k poklesu jeho koncentrace na 95 %. Následně po dalších 2 dnech došlo k výrazné redukci, dokonce až na 80 %. Další 4 dny degradace stagnovala a množství putrescinu bylo téměř konstantní. Po 10 dnech byla překročena hranice 80 %, konkrétně na 78 % a 2 dny poté byl úbytek roven 25 % z původního celkového množství. Tato hodnota úbytku byla rovněž maximální a v posledním odběrovém čase nebyla překročena. O něco méně výrazně byl putrescin degradován v médiu o pH 6,2, v němž už po 2 dnech došlo k redukci na hladinu 89 %. Následoval mírný pokles na 87 a poté 86 %. Po 8 dnech byla dále naměřena koncentrace odpovídající přibližně 79 % a po 10 dnech 77 %. Nejvyšší úbytek byl však 30 %, konkrétně v posledním odběrovém čase 14 dnů.



Obr. 35. *Lbc. casei* – degradace putrescinu o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v médiu s nižším obsahem živin

Degradace kadaverinu o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C a různém pH

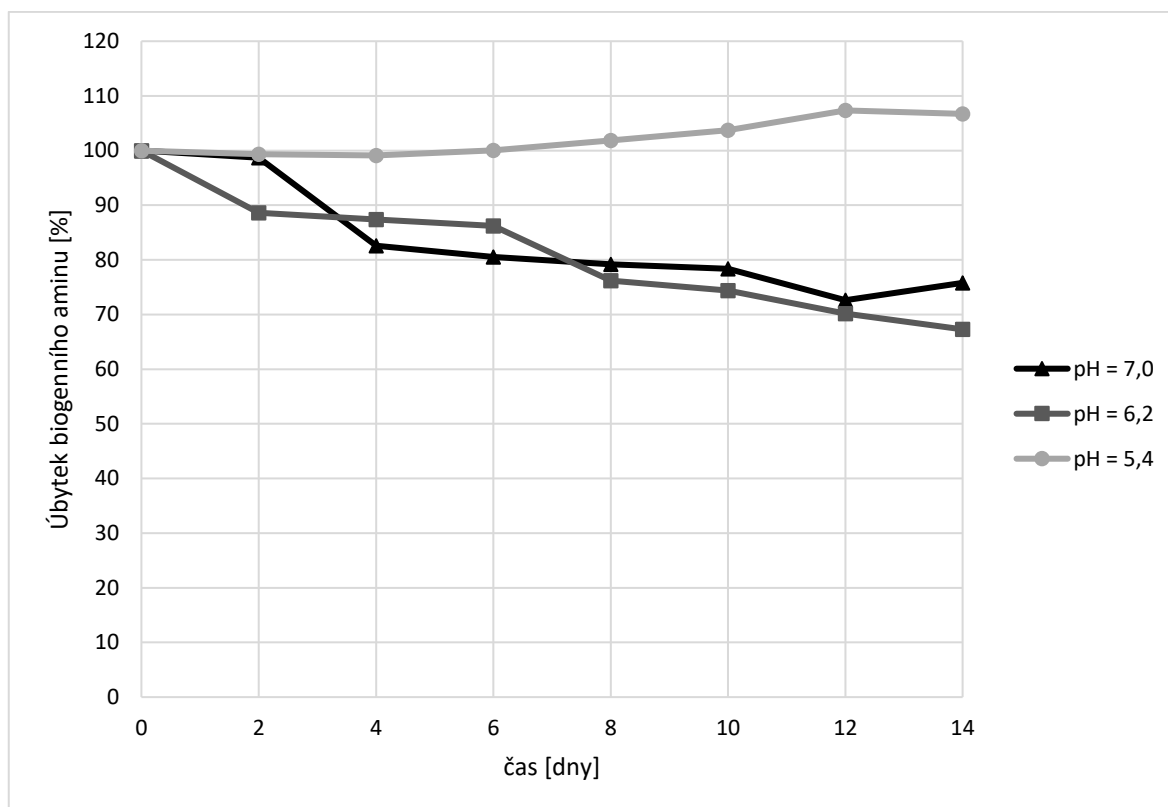
Podobně jako u předchozího putrescinu i zde médium o nejnižším pH nevykazovalo významnější vliv na degradaci kadaverinu (obr. 36), když nejvyšší úbytek nebyl ani 2 %. Médium s neutrální hodnotou pH vykazovalo výraznější a vyšší schopnost degradovat kadaverin, i když po 2 dnech došlo k úbytku pouze 3 %. Pozdější odběry však poukazyvaly na významnější hodnoty. Mezi 2. a 4. dnem došlo k poklesu koncentrace putrescinu o 15 % za pouhé 2 dny. Po dobu dalších 4 dnů však došlo k zastavení redukce a množství aminu bylo po 6 i 8 dnech rovno přibližně stejnému množství, tedy 82 %. Kultivace po 10 dnech prokázala pokles putrescinu pod 80 % a nejvyšší úbytek byl naměřen po 12 dnech, kdy došlo k poklesu koncentrace putrescinu dohromady asi o 23 %. Nejnižší naměřené množství tohoto aminu vzhledem k původnímu přídatku, bylo stanoveno v médiu o pH 6,2. Už v prvním odběrovém čase byl zaznamenán úbytek až o 15 %. Následné dva odběry prokázaly konstantní obsah putrescinu vzhledem k prvnímu odběru a k dalšímu úbytku došlo až po 8 dnech, kdy se koncentrace snížila na 77 %. Po dalších 2 dnech došlo k redukcí až na přibližných 74 % a po celkových 12 dnech byla dosažena hranice 70 %. Maximální úbytek byl naměřen po 14 dnech a činil dokonce 35 %, i přes poměrně nízké teploty kultivace.



Obr. 36. *Lbc. casei* – degradace kadaverinu o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v médiu s nižším obsahem živin

Degradace histaminu o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C a různém pH

Posledním biogenním aminem hodným k vyhodnocení byl histamin během těchto testovaných podmínek (obr. 37). Jak u předchozích dvou případů, i u histaminu nedošlo v médiu o pH 5,4 prakticky k žádné degradaci a od 8. dne byl zaznamenán dokonce nárůst jeho koncentrace. Vzhledem k těmto skutečnostem je jeho podrobnější rozbor při tomto pH poněkud zbytečný. V médiu o neutrálním pH nedošlo po 2 dnech k výraznému úbytku, ale o 2 dny později koncentrace poklesla až na celkových 81 %, což byl úbytek téměř 20 % během 2 dnů. Následně bylo po 6 dnech dosaženo hranice 80 % a po 8 dnech byla tato hodnota překročena asi o 1 %. O další 1 % se koncentrace histaminu snížila po 10 dnech a maximální snížení bylo stanoveno po 12 dnech, kdy došlo k celkovému úbytku přibližně 28 %. Podobně jako u předchozích dvou vyhodnocení, nejvýraznější hodnoty degradace vykazovala kultivace v živném médiu o pH 6,2. Zde došlo k poklesu koncentrace po 2 dnech už o 11 % a po 4 dnech byla koncentrace ještě o 1 % nižší. Po 6 dnech pak byla naměřena hodnota koncentrace odpovídající 86 % z původního množství. Mezi 6. a 8. dnem došlo k značnému poklesu z 86 % na 76 % a po 10 dnech bylo dosaženo 75 %. Úbytek pokračoval i nadále a maximum bylo celkem o 32 % méně než na začátku a to v posledním odběru.



Obr. 37. *Lbc. casei* – degradace histaminu o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v médiu s nižším obsahem živin

8 DISKUZE

Biogenní aminy jsou jednoduché dusíkaté sloučeniny, organického původu, vytvářené především dekarboxylací aminokyselin nebo aminací aldehydů a ketonů. Mají nízkou molekulovou hmotnost a bývají syntetizovány mikrobiálními, živočišnými a rostlinnými metabolickými procesy. Aminy se také účastní řady biologických procesů a jsou velmi významné vzhledem ke svým biologickým a fyziologickým vlastnostem. Jsou zdroji dusíku a prekurzorů pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů, které se vyskytují ve všech organizmech. Aminy také patří mezi ukazatele bakteriálního kažení a jejich výskyt je sledován především u potravin [1,3,8].

Biogenní aminy se vyskytují prakticky ve všech potravinách, jež obsahují proteiny nebo volné aminokyseliny a které umožňují podmínky pro biochemickou nebo mikrobiologickou aktivitu. Jejich celkové množství však závisí na povaze daných potravin a dostupných mikroorganizmech. Toto široké spektrum zahrnuje téměř veškerou škálu potravin a aminy se tedy bez některých málo výjimek vyskytují ve všech dostupných typech potravin. Obecně platí, že výskyt biogenních aminů je vyšší u skupiny fermentovaných potravin. U těchto potravin dochází během technologického procesu výroby k fermentaci, využitím specifických mikroorganismů. Tyto mikroorganismy mohou disponovat enzymy dekarboxylázami, které přítomné aminokyseliny přetvářejí na biogenní aminy. Pro fermentační proces se nejčastěji využívají bakterie mléčného kvašení, zejména rody *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* a *Pediococcus*. Mezi tyto rizikovější potraviny patří fermentovaná zelenina, fermentované masné a mléčné výrobky, fermentované rybí výrobky nebo nápoje a alkoholické výrobky. Vedle fermentovaných potravin jsou z hlediska biogenních aminů ohroženy zejména ryby skombroidního typu, jež mají kvůli vysokému množství histidinu predispozici pro zvýšenou tvorbu histaminu [1,3,7,16].

Jak již bylo řečeno, biogenní aminy jsou důležité pro organizmy z řady biologických a fyziologických funkcí. Jejich příjem ve vysoké koncentraci však bývá toxický a může docházet k řadě nežádoucích a velmi nebezpečných zdravotních problémů. Tyto problémy bývají doprovázeny nevolností, hypertenzí, zvracením, pocením, migrénou nebo dýchacími potížemi. Zdraví jedinci metabolizují biogenní aminy přijímané z potravin pomocí oxidace, působením specifických enzymů (MAO, DAO nebo PAO). V běžných případech nepředstavují biogenní aminy výrazné zdravotní riziko, ale vyskytují se případy, kdy jsou přijímány v nadměrném množství. Další problém může nastat v případě, kdy je přirozený

mechanismus jejich odbourávání nedostatečný, či narušený některými chorobami. Tyto případy zahrnují jedince s respiračními, koronárními a gastrointestinálními problémy, hypertenzí nebo při nedostatku vitamínu B12 v organizmu, kdy je přirozeně citlivost k biogenním aminům vyšší. Častým problémem také bývá konzumace léků snižující aktivitu oxidujících enzymů, které se nejčastěji užívají k léčbě stresových onemocnění, deprese nebo Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby. Silným inhibitorem oxidáz je také alkohol [8,12,13,14].

Nejtoxičtějším biogenním aminem je histamin a dále tyramin. Jak již bylo řečeno, intoxikace histaminem bývá nejčastěji spojována zejména s rybami a dále sýry. Jako jediný amin podléhá legislativním předpisům, kdy je jeho horní hranice stanovena na 100 mg/kg u některých druhů ryb. Toxické účinky tyraminu se projevují podobně jako u histaminu. Ostatní aminy nejsou příliš toxické, ale mohou za určitých podmínek reagovat s dusitanem za vzniku karcinogenních N-nitrosoaminů. Častým problémem při detoxikaci biogenních aminů bývá fakt, že část kapacity potřebné pro detoxikaci histaminu a tyraminu odčerpávají putrescin a kadaverin, které samy o sobě nejsou až tolik rizikové, ale jejich obsah v řadě potravin bývá značný [8,11,13,15].

Vzhledem k rizikům, které aminy představují a přinášejí, je potřeba jejich obsah v potravinách řídit a kontrolovat, tak aby bylo zabráněno výskytu těchto nežádoucích zdravotních problémů. Kumulaci a výskyt biogenních aminů ovlivňuje řada faktorů a díky jejich správnému stanovení a kontrole může být obsah aminů v potravinách regulován. Jedná se o takzvané zpomalování kumulace a vzniku biogenních aminů inhibicí mikroorganismů způsobujících jejich tvorbu. Tyto metody jsou založeny na působení vysokého hydrostatického tlaku, použití potravinářských a konzervačních látek, tepelného ošetření, balení ve speciální atmosféře nebo ozařování. Další variantou řízení aminů je redukce a degradace již vytvořeného množství. U těchto metod je potřeba přítomnosti specifických enzymů schopných vytvořené aminy oxidovat. Možností je aplikace konkrétních enzymů nebo využití speciálních druhů bakterií, schopných takto vytvořené biogenní aminy degradovat [1,10,29].

Nebezpečí a rizika spojená s biogenními aminy bývají velmi závažná a dosti diskutovatelná, a proto je potřeba určit ideální a spolehlivou metodu pro jejich kontrolu a řízení. Bylo zpracováno mnoho studií zabývajících se tímto problémem, ve kterých autoři testovali různé podmínky a způsoby řízení jednotlivých aminů. Mnoho z nich se zabývá enzymy aminooxidázami, které jsou schopny vytvořené biogenní aminy rozkládat na méně toxické

metabolity. Často se studie zaměřují na využití jednotlivých mikroorganismů, jež těmito enzymy disponují, konkrétně některé kmeny bakterií mléčného kvašení, jako jsou například *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* nebo *Pediococcus acidilacti*, které jsou schopny oxidovat nejnebezpečnější histamin a tyramin. Na základě těchto znalostí mohou být mikroorganismy do potravin přidávány jako startérové kultury u fermentovaných potravin nebo v průběhu výroby a tím redukovat množství biogenních aminů [46,47].

Diplomová práce vychází z výsledků předchozí bakalářské práce, v níž bylo studováno široké spektrum bakterií využívaných v mlékárenství na schopnost degradace biogenních aminů. Konkrétně se jednalo o rody *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Brevibacterium*, *Micrococcus* a *Kocuria* v kultivačních médiích MRS, MRSC, MPB (masopeptonový bujón) a v nutričně neúplných (polovičních) médiích. V původní práci bylo zachyceno hned několik kmenů, jež byly schopny degradovat přidávané biogenní aminy. Studie prokázala výraznou degradaci u kmene *Pediococcus* sp. CCDM 395, kdy bakterie dokázala redukovat množství histaminu po 24 hodinách v optimálním médiu na hodnotu 72 % a po 48 hodinách až na hodnotu 59 %. V optimálním médiu se také významně projevil kmen *Brevibacterium linens* CCDM 1010, který redukoval obsah putrescinu a kadaverinu po 24 hodinách až na hodnotu 62 % z původní koncentrace. Kromě optimálního média bylo také testováno nutričně neúplné médium (poloviční koncentrace živin), a to z důvodu předpokladu vyšší schopnosti kmenů redukovat obsah biogenních aminů. Je možné, že při nedostatečném obsahu živin v médiu jsou bakterie nuceny využívat biogenní aminy ve vyšší míře, konkrétně jako zdroj energie a živin. V polovičním médiu byl velmi dobře kmenem *Lactobacillus plantarum* CCDM 188 redukován obsah histaminu, který jej po 24 hodinové kultivaci degradoval až o 40 %. Vůbec největší úbytek aminů vykazoval kmen *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198 po kultivaci v ochuzeném živném médiu, ve kterém byla redukce výrazně vyšší než u optimálního média. Histamin, putrescin a kadaverin byly degradovány po 24 hodinách o více než 50 % a fenylethylamin a tyramin o celých 45 % [48].

Díky tomuto zjištění je problematika diplomové práce zaměřena na stanovení ideálních růstových podmínek pro degradaci biogenních aminů kmenem *Lbc. casei* subsp. *casei* CCDM 198, který jevil v původním experimentu nejvyšší schopnost jejich redukce. Daný kmen se stal předmětem studie a byl dále testován. Hlavním cílem tedy bylo rozvíjet původní výzkum tak, že zvolený kmen byl testován v souvislosti s různými růstovými faktory, aby mohly být stanoveny ideální podmínky pro největší aminooxidační aktivitu tohoto zvoleného kmene.

V experimentu byla ověřována schopnost degradovat biogenní aminy kmenem *Lbc. casei* subsp. *casei* CCDM 198, využívaným v mlékárenském průmyslu, metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Z biogenních aminů byly testovány konkrétně fenylethylamin, putrescin, kadaverin, histamin a tyramin. Daný úbytek byl porovnáván s kontrolou, což bylo živné médium (MRS nebo MRS/2) s biogenními aminy bez zaočkovaného kmene. Jednotlivá testovaná kritéria (kombinace růstových faktorů) sledována během experimentu lze prakticky rozdělit do tří skupin. Skupiny se vzájemně lišily koncentrací jednotlivých aminů (0,2 a 0,4 g/l) a živného média (MRS a MRS/2). U každé skupiny byla ověřována degradace jednotlivých přidávaných aminů při třech různých teplotách (30, 23 a 11 °C) a pro každou teplotu byla u každého aminu sledována degradace při třech různých hodnotách pH (7,0; 6,2 a 5,4). Jednotlivé hodnoty pH byly navíc ověřovány v postupujícím čase, konkrétně v minimálně 7 odběrových časech, které byly pro jednotlivé teploty odlišné. Dohromady tedy došlo k vyhodnocování každého biogenního aminu devět krát a pokaždé se jednalo o jinou kombinaci růstových faktorů.

Pro první skupinu pozorovaných faktorů byla stanovena koncentrace jednotlivých aminů 0,2 g/l a živné médium bylo optimální, tedy o koncentraci předepsané výrobcem (MRS). Zde byla výraznější degradace biogenních aminů stanovena pouze po kultivaci při 30 °C. Během kultivace při teplotách 23 a 11 °C nebyl zaznamenán výraznější pokles koncentrace jednotlivých aminů, konkrétně nedocházelo k úbytkům větším než 30 %. Při 30 °C došlo k výraznějším úbytkům putrescinu, kadaverinu a histaminu, kdy ve všech případech byla redukce největší během kultivace v médiu o pH 6,2. Putrescin byl za těchto podmínek degradován značnou rychlostí už od počátku, když už po 12 hodinách kultivace došlo k poklesu původní koncentrace na hladinu okolo 65 %. Největší úbytek byl naměřen po 36 hodinách inkubace a v konečném výsledku činil asi 45 % z původního množství přidávaného k médiu. Kadaverin byl kmenem také výrazně degradován. Maximální snížení jeho koncentrace bylo zaznamenáno rovněž po 36 hodinách a úbytek se rovnal 43 %. I histamin byl významně redukován, avšak k poklesu pod hranici 60 % nedošlo. Již z počátku došlo po 12 hodinách k poklesu koncentrace histaminu na 78 % a po 28 hodinách o dalších 8 %. Nejnižší hodnoty byly naměřeny po 36 hodinách kultivace a nejvíce byl tedy histamin degradován o 35 %.

V druhé skupině byla koncentrace živného média totožná, ale koncentrace biogenních aminů byla zvýšena na 0,4 g/l. Paradoxně byly aminy během těchto podmínek degradovány nejlépe při nejnižší teplotě kultivace 11 °C, konkrétně nejvíce se jednalo o putrescin, kadaverin

a histamin. Putrescin byl během těchto podmínek nejvíce redukován v médiu o pH 5,4. Už po 2 dnech došlo k jeho poklesu až o 22 % a po 6 dnech až o 37 %. Po 14 dnech byla koncentrace putrescinu přibližně na 55 % z původního množství. Kadaverin byl degradován podobně, když bylo ideální pH stanoveno rovněž u média s pH 5,4. Po 8 dnech byl zjištěn pokles koncentrace téměř o 40 % a v posledním odběrovém čase byla prokázána degradace kadaverinu celkem o 44 %. I poslední histamin byl nejvíce redukován v médiu s nejnižším pH. K maximálnímu úbytku došlo po 14 dnech na hodnoty okolo 59 % z původního množství, což odpovídá degradaci o 41 %.

Vůbec nejlepší podmínky pro degradaci biogenních aminů byly prokázány u poslední skupiny faktorů, která byla charakterizována koncentrací jednotlivých aminů 0,2 g/l a koncentrace živného média byla snížena na polovinu. U takto sestavených podmínek došlo k nejvýraznější degradaci všech aminů vzhledem k ostatním pozorovaným kombinacím faktorů a konkrétně to bylo po kultivaci při teplotě 30 °C. U fenylethylaminu a tyraminu nebyla redukce až tak výrazná, když došlo k maximálním úbytkům o 38 a 31 % v médiu o pH 6,2, ale zbylé tři aminy vykazovaly velmi významné poklesy. Ve všech třech případech bylo dokázáno, že ideální podmínky degradace kombinující teplotu 30 °C, poloviční koncentraci živin a obsah biogenních aminů 0,2 g/l, byly nejvíce podpořeny při pH 6,2. U putrescinu během těchto podmínek došlo k největšímu úbytku ze všech měření v průběhu experimentu. Už po 12 hodinách jeho koncentrace poklesla na 70 % a po 24 hodinách už na 60 %. Úbytek vzrůstal i v ostatních odběrových časech a nakonec bylo po 72 hodinách dosaženo celkového úbytku až 66 % z původního množství. Kadaverin byl v polovičním médiu rovněž výborně redukován, když už po 12 hodinách došlo k poklesu jeho koncentrace asi o 28 %. Nejnižší koncentrace kadaverinu byla taktéž zjištěna v posledním odběrovém čase a celkový úbytek byl podobný jako u putrescinu, konkrétně 60 %. Redukce histaminu rozhodně nebyla zanedbatelná. Tendence poklesu jeho koncentrace byla dodržena ve všech postupných časech odběru a maximální úbytek v konečném měření byl 51 %. Koncentrace těchto tří aminů během těchto podmínek postupně klesala v průběhu celé křivky a je možné, že i v dalších potenciálních časech by tomu tak bylo i nadále.

Výsledky, kterých bylo v průběhu experimentu dosaženo, potvrdily předpoklady, že při poloviční koncentraci živin v médiu, bylo dosaženo lepší degradace, podobně jako v bakalářské práci [48]. I když původní experiment probíhal za odlišných podmínek (pH = 6,5 a vyšší koncentrace aminů), lze předpokládat, že zmiňovaná koncentrace živného média hrála nejvýznamnější roli v obou případech, tedy i u výzkumu

v rámci diplomové práce. U této navazující práce byla navíc redukce podpořena o něco nižším pH a delším časem kultivace.

Určení těchto optimálních podmínek pro degradaci biogenních aminů kmenem *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198 nabízí možnost využití tohoto kmene v potravinářství, zejména při výrobě rizikových potravin, kde je pravděpodobnost jejich tvoření vysoká. Například do fermentovaných potravin mohou být využívány především jako startérové mikroorganismy nebo během výroby. Výsledky tohoto experimentu potvrdily výraznou schopnost degradace vytipovaného kmene a byly také stanoveny ideální podmínky pro maximální podporu této aminooxidační schopnosti.

Mnoho autorů publikovalo studie prováděné v přímé reakci na problémy způsobené biogenními aminy v potravinách. Studie Herrero-Fresno a kol. popisuje izolaci 17 kmenů *Lactobacillus casei*, z nichž všechny kmeny byly schopny redukovat obsah histaminu a tyraminu [49]. Callejón a kol. se zabývali sledováním enzymové degradace biogenních aminů některých bakterií mléčného kvašení, které byly izolovány z vína. Kmeny jako *Lactobacillus plantarum*, *Lbc. brevis*, *Lbc. hilgardii* byly aktivní zejména vůči nejnebezpečnějšímu histaminu a tyraminu. I degradace putrescinu byla ve studii potvrzena, nejvíce pomocí kmene *Lactobacillus plantarum* J16, který jej redukoval až o 40 % za jeden týden [46]. Bakterie *Lbc. plantarum* byla schopna redukovat množství biogenních aminů u fermentovaných klobás z rybiho masa během procesu fermentace. Konkrétně se jednalo o kmen *Lbc. plantarum* ZY-40, který degradoval putrescin a kadaverin o více než 70 % [50]. V další studii Callejón a kol. byl identifikován a charakterizován enzym primárně působící na putrescin, jež produkoval kmen *Kocuria varians* LTH 1540. Tento enzym byl schopen oxidovat diaminy putrescin a kadaverin [51]. I další autoři jako Leuschner, Heidel a Hammes zkoumali určité mikroorganismy vzhledem ke schopnosti degradovat histamin a tyramin. Zjistili, že z 64 kmenů bakterií mléčného kvašení bylo 27 kmenů schopno degradovat histamin a jeden tyramin. Dále testovali 32 kmenů bakterie *Brevibacterium linens* a až 21 z těchto kmenů projevilo histamin- a tyramin-oxidázovou aktivitu. Mezi testovanými mikroorganismy byly také kmeny bakterie *Micrococcus* spp. a *Kocuria* spp. 17 kmenů ze 44 mělo degradační schopnost a nejvyšší byla zjištěna u kmene *Kocuria varians* LTH 1540 [52]. Předmětem studií nemusí být pouze bakterie, jinou možností jsou například mikroskopické houby. Například Cueva a kol. izolovali 44 kmenů hub z vína, z nichž všechny jevily schopnost redukovat množství histaminu, tyraminu a putrescinu. Nejvyšší

kapacitu vykazovaly druhy *Penicillium citrinum*, *Alternaria* sp., *Phoma* sp. a *Ulocladium chartarum* [53].

Výsledky zpracovaných experimentů a výše zmíněných studií zabývajících se degradací biogenních aminů poukazují na to, že degradační aktivita mikroorganismů není rodově ani druhově specifická, ale záleží na schopnostech a vlastnostech jednotlivých kmenů. Specifita je tedy na kmenové úrovni. Experiment provedený v rámci diplomové práce navíc dokazuje, že kromě predispozice jednotlivých kmenů jsou velmi důležité i podmínky, během kterých jsou dané kmeny schopny růst a metabolizovat. Výzkum tuto skutečnost jasně potvrdil, když vytipovaný kmen s degradační aktivitou během některých nevyhovujících podmínek biogenní aminy téměř neredukoval (viz. Příloha PI) a v jiných případech degradoval aminy o více než 60 % (poloviční živné médium, koncentrace BA 0,2 g/l, teplota 30 °C a pH 6,2). Správné zvolení růstových podmínek je zásadní kritérium, které je potřeba dodržet a následně může dojít k získání důležitých a daleko výraznějších výsledků. Za ideální podmínky pro redukcí biogenních aminů kmenem *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198 byly tedy experimentem stanoveny: poloviční živné médium, koncentrace BA 0,2 g/l, teplota 30 °C a pH 6,2.

Degradační aktivita kmene *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198 byla sledována v podmínkách *in vitro*, které se bohužel mohou od reálných situací a potravin lišit. Pokud by v reálných vzorcích došlo k dodržení nejvhodnějších podmínek, které byly stanoveny experimentem, mohl by být předpokládán podobný průběh jako v podmínkách *in vitro*. Uvedené výsledky je potřeba ověřit přidávkem do modelově vytvořených potravin za dodržení těchto definovaných podmínek. Navíc bude potřeba ověřit potenciální negativní vlastnosti tohoto kmene. Pokud by došlo k potvrzení a ověření těchto výsledků, bude možné pokračovat v další fázi výzkumu, kdy bude možné přidávat degradující kmen do potravin přímo v potravinářských provozech s cílem co nejvíce redukovat riziko výskytu těchto často nebezpečných látek v potravinách.

ZÁVĚR

Diplomová práce rozvíjela původní téma, které bylo zpracovááno v rámci práce bakalářské o dva roky dříve [48]. Vzhledem k výsledkům tohoto experimentu byl vybrán jediný testovaný subjekt, konkrétně kmen *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198 využívaný v mlékárenství jako startovací kultura. Kmen byl získán ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů (CCDM).

U tohoto testovaného jedince byla ověřována degradace biogenních aminů během různých růstových faktorů. Při experimentu byly vzájemně kombinovány tyto podmínky spolu s postupujícím časem:

- Koncentrace jednotlivých aminů – 0,2 a 0,4 g/l
- Koncentrace živného média – optimální a poloviční koncentrace média
- Teplota – 11, 23 a 30 °C
- pH – 5,4; 6,2 a 7,0

Ve vyhodnocených datech byly zaznamenány výrazné hodnoty úbytků jednotlivých aminů, ale nejdůležitější a nejvýznamnější úbytek byl zjištěn zejména po kultivaci v živném médiu s polovičním obsahem živin a za dopomoci dalších podmínek:

- Putrescin o koncentraci 0,2 g/l, poloviční živné médium, teplota 30 °C a pH 6,2
 - Celkový úbytek až o 66 %
- Kadaverin o koncentraci 0,2 g/l, poloviční živné médium, teplota 30 °C a pH 6,2
 - Celkový úbytek až o 60 %
- Histamin o koncentraci 0,2 g/l, poloviční živné médium, teplota 30 °C a pH 6,2
 - Celkový úbytek až o 51 %

Degradační schopnost kmene byla potvrzena také v optimálním živném médiu MRS. V těchto případech se redukce projevila nejvýrazněji:

- Putrescin o koncentraci 0,4 g/l, optimální živné médium, teplota 11 °C a pH 5,4
 - Celkový úbytek až o 45 %
- Kadaverin o koncentraci 0,4 g/l, optimální živné médium, teplota 11 °C a pH 5,4
 - Celkový úbytek až o 44 %
- Histamin o koncentraci 0,4 g/l, optimální živné médium, teplota 11 °C a pH 5,4
 - Celkový úbytek až o 41 %

Významná degradace tyraminu a fenylethylaminu nebyla během experimentu potvrzena.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] NAILA, A., FLINT, S., FLETCHER, G., BREMER, P., MEERDINK, G. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science* [online]. 2010, 75(7), R139-R150 [cit. 2019-08-10]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x>
- [2] ŠÍCHO, V., VODRÁŽKA, Z., KRÁLOVÁ, B. *Potravinářská biochemie: ... učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické. 2., dopln. a přeprac. vyd.* Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1981.
- [3] SANTOS, M. H. S. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1996, 29(2-3), 213-231 [cit. 2019-08-10]. DOI: 10.1016/0168-1605(95)00032-1. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168160595000321>
- [4] NOVELLA-RODRÍGUEZ, S., VECIANA-NOGUÉS, M. T., VIDAL-CAROU, M. C. Biogenic Amines and Polyamines in Milks and Cheeses by Ion-Pair High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2000, 48(11), 5117-5123 [cit. 2019-08-10]. DOI: 10.1021/jf0002084. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0002084>
- [5] ÖNAL, A. Current analytical methods for determination of biogenic amines in foods. *Food chemistry*. 103: 1475-1486. 2006. ISSN: 03088146
- [6] TORRIANI, S., SUZZI, G. *Biogenic Amines in Fermented Foods*. [online]. 1. Frontiers Media, 2015 [cit. 2019-08-10]. ISBN 9782889195930. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/researchtopic/512/biogenic-amines-in-fermented-foods>
- [7] NOLLET, L. M. L., TOLDRÁ, F. *Safety Analysis of Foods of Animal Origin* [online]. 1. Hoboken: CRC Press, 2010 [cit. 2019-08-10]. ISBN 978-143-9848-197. Dostupné z: <http://www.crcnet-base.com.proxy.k.utb.cz/doi/abs/10.1201/EBK1439848173-14>
- [8] HUI, Y. H. *Handbook of food science, technology, and engineering* [online]. Boca Raton: Taylor, 2006 [cit. 2019-08-10]. Food science and technology (Taylor, 148. ISBN 978-0-8493-9847-6. Dostupné z: <http://www.crcnet-base.com.proxy.k.utb.cz/doi/abs/10.1201/b15995-15>

- [9] KOHAJDOVÁ, Z., KAROVIČOVÁ, J., GREIF, G. 2008. Biogénne amíny v potravinách. In *Potravinářstvo* [online]. 2. únor 2008, roč. 2, č. 1 [cit. 2019-08-12]. s. 30 - 49. Dostupné z: ISSN 1337-0960.
- [10] BENKERROUM, N. Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2016, 15(4), 801-826 [cit. 2019-08-12]. DOI: 10.1111/1541-4337.12212. ISSN 15414337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12212>.
- [11] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin 2. Rozš. a přeprac. 3. vyd.* Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [12] NOLLET, L. M. L., TOLDRÁ, F. *Handbook of food analysis* [online]. Third edition. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor, [2015] [cit. 2019-08-15]. ISBN 978-1-4665-5654-6. Dostupné z: <http://www.crcnet-base.com.proxy.k.utb.cz/doi/abs/10.1201/b18668-56>
- [13] KERRY, J. P., KERRY, J. F. *Processed Meats - Improving Safety, Nutrition and Quality* [online]. Woodhead Publishing, 2011 [cit. 2019-08-12]. ISBN 978-0-85-709294-6. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpPMISNQ04/viewerType:toc//root_slug:processed-meats-improving/url_slug:biogenic-amines-bas?b-q=biogenic%20amines&b-subscription=true&b-group-by=true&b-sort-on=default&b-content-type=all_references&include_synonyms=no&issue_id=kt00946JZ1&hierarchy=
- [14] LAWLEY, R., CURTIS, L., DAVIS, J. *The food safety hazard guidebook* [online]. 2nd ed. Cambridge: RSC, c2012 [cit. 2019-08-12]. ISBN 978-1-84973-381-6. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpFSHGE005/viewerType:toc//root_slug:food-safety-hazard-guidebook/url_slug:biogenic-amines?b-q=biogenic%20amines&b-subscription=true&b-group-by=true&b-sort-on=default&b-content-type=all_references&include_synonyms=no&issue_id=kt00ABGB02&hierarchy=
- [15] KOTZEKIDOU, P. *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods* [online]. Elsevier, 2016 [cit. 2019-07-02]. ISBN 978-0-12-802008-1. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpFHTREF0A/viewerType:toc//root_slug:food-hygiene-toxicology/url_slug:biogenic-amines?b-q=biogenic%20amines&b-subscription=true&b-group-by=true&b-sort-on=default&b-

- content-type=all_references&include_synonyms=no&issue_id=kt01104U91&hierarchy=
- [16] DĄBROWSKI, W. M., SIKORSKI, Z. E. *Toxins in Food* [online]. 1. London: CRC Press, 2004 [cit. 2017-07-25]. ISBN 978-020-3502-358. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com.proxy.k.utb.cz/doi/abs/10.1201/9780203502358.ch6>
- [17] Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. In: *EUR – Lex* [European Union law], [online]. [cit. 2019-08-26]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX:32005R2073>
- [18] FRIAS, J. *Fermented foods in health and disease prevention* [online]. Boston, MA: Elsevier, 2016 [cit. 2019-08-26]. ISBN 978-0-12-802309-9. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpFFHDP00D/viewerType:toc//root_slug:fermented-foods-in-health/url_slug:microbial-production?b-q=biogenic%20amines%20in%20food&b-subscription=true&b-group-by=true&b-sort-on=default&b-content-type=all_references&include_synonyms=no&issue_id=kt0112U1U1
- [19] FERNANDES, R. *Microbiology Handbook - Meat Products* [online]. 2nd. Royal Society of Chemistry, 2009 [cit. 2020-04-09]. ISBN 978-1-62198-173-2. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpMHMPE002/viewerType:toc//root_slug:microbiology-handbook-meat
- [20] HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., SIMON-SAKARDI L., HOLZAPFEL W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*. 42-49, 1994, vol 5. ISSN: 09242244
- [21] VECIANA-NOGUÉS, M. T., BOVER-CID, S., MARINÉ-FONT, A., VIDAL-CAROU, M. C. Biogenic amine production by *Morganella morganii* and *Klebsiella oxytoca* in tuna. *European Food Research and Technology* [online]. 2004, 218(3), 284-288 [cit. 2019-08-13]. DOI: 10.1007/s00217-003-0860-7. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-003-0860-7>
- [22] SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* [online]. 1996, 29(7), 675-690 [cit. 2019-08-13]. DOI: 10.1016/S0963-9969(96)00066-X. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399699600066X>
- [23] HERNÁNDEZ-ORTE, P., LAPEÑA, A. C., PEÑA-GALLEGO, A. Biogenic amine determination in wine fermented in oak barrels: Factors affecting formation. *Food*

- Research International* [online]. 2008, 41(7), 697-706 [cit. 2019-08-23]. DOI: 10.1016/j.foodres.2008.05.002. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996908000963>
- [24] HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., HOLZAPFEL, W. H. The biogenic amine content of beer; the effect of barley, malting and brewing on amine concentration. *Zeitschrift fur Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* [online]. 1999, 208(5-6), 418-423 [cit. 2019-08-23]. DOI: 10.1007/s002170050440. ISSN 1431-4649. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002170050440>
- [25] GARAI, G., DUEÑAS, M. T., IRASTORZA, A., MORENO-ARRIBAS, M. V. Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2007, 45(5), 473-478 [cit. 2019-08-23]. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02207.x. ISSN 0266-8254. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2007.02207.x>
- [26] COTON, M., ROMANO, A., SPANO, G. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiology* [online]. 2010, 27(8), 1078-1085 [cit. 2019-08-23]. DOI: 10.1016/j.fm.2010.07.012. ISSN 07400020. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002010001875>
- [27] LADERO, V., COTON, M., FERNÁNDEZ, M., BURON, N., MARTÍN, M. C., GUICHARD, H., COTON, E., ALVAREZ, M. A. Biogenic amines content in Spanish and French natural ciders: Application of qPCR for quantitative detection of biogenic amine-producers. *Food Microbiology* [online]. 2011, 28(3), 554-561 [cit. 2019-08-23]. DOI: 10.1016/j.fm.2010.11.005. ISSN 07400020. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S074000201000287X>
- [28] ALVAREZ, M. A., MORENO-ARRIBAS, M. V. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science* [online]. 2014, 39(2), 146-155 [cit. 2019-09-01]. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.07.007. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224414001599>
- [29] CHONG, C. Y., BAKAR, F. A., RUSSLY, A. R., JAMILAH, B., MAHYUDIN, N. A. The Effects of Food Processing on Biogenic Amines Formation. *International Food Research Journal*. 2011, vol. 18, no. 3. ISSN:1985-4668.

- [30] MAH, J. H., KIM, Y. J., HWANG, H. J. Inhibitory effects of garlic and other spices on biogenic amine production in Myeolchi-jeot, Korean salted and fermented anchovy product. *Food Control* [online]. 2009, 20(5), 449-454 [cit. 2019-09-01]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.07.006. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713508001783>
- [31] CAI, L., LIU, S., SUN, L., WANG, Y., JI, H., LI, J. Application of tea polyphenols in combination with 6-gingerol on shrimp paste of during storage: biogenic amines formation and quality determination. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2015, 6 [cit. 2019-09-01]. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00981. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.00981/abstract>
- [32] CALZADA, J., DEL OLMO, A., PICÓN, A., GAYA, P., NUÑEZ, M. Reducing Biogenic-Amine-Producing Bacteria, Decarboxylase Activity, and Biogenic Amines in Raw Milk Cheese by High-Pressure Treatments. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2013, 79(4), 1277-1283 [cit. 2019-09-01]. DOI: 10.1128/AEM.03368-12. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.03368-12>
- [33] KRŽÍŽEK, M., MATĚJKOVÁ, K., DADÁKOVÁ, E., ŠPIČKA, J., VÁCHA, F., VRCHOTOVÁ, N. Changes in the Content of Biogenic Amines and Fatty Acids in High Pressure-Processed Carp Flesh (*Cyprinus carpio*). *Journal of Food Protection* [online]. 2015, 78(8), 1592-1596 [cit. 2019-09-13]. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-15-041. ISSN 0362-028X. Dostupné z: <http://jfoodprotection.org/doi/10.4315/0362-028X.JFP-15-041>
- [34] NOVELLA-RODRÍGUEZ, S., VECIANA-NOGUÉS, M. T., SALDO, J., VIDAL-CAROU, M. C. Effects of High Hydrostatic Pressure Treatments on Biogenic Amine Contents in Goat Cheeses during Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2002, 50(25), 7288-7292 [cit. 2019-08-28]. DOI: 10.1021/jf025665u. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf025665u>
- [35] RUIZ-CAPILLAS, C., JIMÉNEZ-COLMENERO, F., CARRASCOSA, A. V., MUÑOZ, R. Biogenic amine production in Spanish dry-cured “chorizo” sausage treated with high-pressure and kept in chilled storage. *Meat Science* [online]. 2007, 77(3), 365-371 [cit. 2019-08-28]. DOI: 10.1016/j.meatsci.2007.03.027. ISSN

03091740. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174007001179>
- [36] NEL, D., KAWASAKI, S., INATSU, Y., YAMAMOTO, K., SATOMI, M. Effectiveness of gamma irradiation in the inactivation of histamine-producing bacteria. *Food Control* [online]. 2012, 28(1), 143-146 [cit. 2019-09-13]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.05.006. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713512002290>
- [37] LINARES, D. M., DEL-RÍO, B., LADERO, V., MARTÍNEZ, N., FERNÁNDEZ, M., MARTÍN, M. C., ÁLVAREZ, M. A. Factors Influencing Biogenic Amines Accumulation in Dairy Products. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2012, 3 [cit. 2019-09-30]. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00180. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00180/abstract>
- [38] ADAMS, M. R., MOSS, M. O. *Food microbiology* [online]. 3rd ed. Cambridge, UK: RSC Publishing, c2008 [cit. 2019-09-02]. ISBN 08-540-4284-9. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpFME00011/viewerType:toc//root_slug:food-microbiology-3rd/url_slug:factors-affecting-growth?=&issue_id=kpFME00011&hierarchy=
- [39] WAREING, P., FELICITY, S., RHEA, F. *Micro-Facts - The Working Companion for Food Microbiologists* [online]. 7 th. Royal Society of Chemistry, 2010 [cit. 2019-09-02]. ISBN 978-1-62198-175-6. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpMFTWCFM1/viewerType:toc//root_slug:micro-facts-working-companion/url_slug:factors-affecting-growth?=&issue_id=kpMFTWCFM1
- [40] CHEREMISINOFF, N. P. *Biotechnology for waste and wastewater treatment: Refrigeration* [online]. Inch-pound ed. Westwood, N.J.: Noyes Publications, 1996 [cit. 2019-11-25]. ISBN 978-0-8155-1409-1. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpBWWT0002/cid:kt003VLSB3/viewerType:khtml//root_slug:biotechnology-waste-wastewater/url_slug:factors-affecting-growth?b-q=factors%20affecting%20microbial%20growth&sort_on=default&b-subscription=true&b-group-by=true&page=6&b-sort-on=default&b-content-type=all_references&include_synonyms=no&view=collapsed&zoom=1&q=factors%20affecting%20microbial%20growth

- [41] DEVAHASTIN, S. *Physicochemical aspects of food engineering and processing* [online]. Boca Raton, FL: CRC Press, c2011 [cit. 2019-09-02]. ISBN 978-142-0082-418. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpPAFEP00P/viewerType:toc//root_slug:physicochemical-aspects/url_slug:factors-affecting-microbial?b-q=factors%20affecting%20growth%20of%20microorganisms&b-subscription=true&b-group-by=true&b-sort-on=default&b-content-type=all_references&include_synonyms=no&issue_id=kt011NT2K9&hierarchy=
- [42] JUNEJA, V. K., SOFOS, J. N. *Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions* [online]. Washington, DC: ASM Press, c2010 [cit. 2020-04-11]. ISBN 978-155-5814-595. Dostupné z: http://files.albath-alzra-y.webnode.fr/200000406-0429105256/Pathogens_and_Toxins_in_Food_155581459X.pdf
- [43] PASSMAN, F. J. *Fuel and fuel system microbiology-- fundamentals, diagnosis, and contamination control* [online]. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2003 [cit. 2019-09-25]. ISBN 978-0-8031-3357-0. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpFFSMFDCA/cid:kt004G02W1/viewerType:khtml//root_slug:fuel-fuel-system-microbiology/url_slug:factors-affecting-microbial?b-q=factors%20affecting%20microbial%20growth&sort_on=default&b-subscription=true&b-group-by=true&page=1&b-sort-on=default&b-content-type=all_references&include_synonyms=no&view=collapsed&zoom=1&q=factors%20affecting%20microbial%20growth
- [44] LAWRIE, R. A., LEDWARD, D. A. *Lawrie's Meat Science* [online]. 7 th. Woodhead Publishing, 2006 [cit. 2019-09-02]. ISBN 978-1-84-569161-5. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpLMSE0004/viewerType:toc//root_slug:lawries-meat-science/url_slug:factors-affecting-growth?b-q=factors%20affecting%20growth%20of%20microorganisms&b-subscription=true&b-group-by=true&b-sort-on=default&b-content-type=all_references&include_synonyms=no&issue_id=kt006QHT46&hierarchy=
- [45] REDDY, C. A. *Methods for general and molecular microbiology* [online]. 3rd ed. Washington, D.C.: ASM Press, c2007 [cit. 2019-09-25]. ISBN 978-1-55581-223-2. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpMGMME001/viewerType:toc//root_slug:methods-general-molecular/url_slug:methods-for-general

- and-molecular-microbiology-3rd-edition?b-q=factors%20affecting%20micro-bial%20growth&b-subscription=true&b-group-by=true&b-sort-on=default&b-content-type=all_references&include_synonyms=no
- [46] CALLEJÓN, S., SENDRA, R., FERRER, S., PARDO, I. Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2014, 98(1), 185-198 [cit. 2019-11-23]. DOI: 10.1007/s00253-013-4829-6. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-013-4829-6>
- [47] LEE, Y. CH., LIN, CH. S., LIU, F. L., HUANG, T. CH., TSAI, Y. H. Degradation of histamine by *Bacillus polymyxa* isolated from salted fish products. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2015, 23(4), 836-844. DOI: 10.1016/j.jfda.2015.02.003. ISSN 10219498.
- [48] BENEŠ, Š. *Skrining vybraných bakterií využívaných v mlékárenství na schopnost degradace biogenních aminů*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2018, 94 s. (102 863 znaků). Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/42050>. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav technologie potravin. Vedoucí práce Buňková, Leona.
- [49] HERRERO-FRESNO, A., MARTÍNEZ, N., SÁNCHEZ-LLANA, E., DÍAZ, M., FERNANDÉZ, M., MARTIN, M. C., LADERO, V., ALVAREZ MIGUEL, A. *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2012, 157(2), 297-304 [cit. 2019-09-25]. DOI: 10.1016/j.ijfood-micro.2012.06.002. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816051200284X>
- [50] ZHANG, Q., LIN, S., NIE, X. Reduction of biogenic amine accumulation in silver carp sausage by an amine-negative *Lactobacillus plantarum*. *Food Control* [online]. 2013, 32(2), 496-500 [cit. 2019-09-25]. DOI: 10.1016/j.food-cont.2013.01.029. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713513000443>
- [51] CALLEJÓN, S., SENDRA, R., FERRER, S., PARDO, I. Ability of *Kocuria varians* LTH 1540 To Degrade Putrescine: Identification and Characterization of a Novel Amine Oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2015, 63(16),

- 4170-4178 [cit. 2020-01-12]. DOI: 10.1021/jf5026967. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf5026967>
- [52] LEUSCHNER, R. G., HEIDEL, M., HAMMES, V. P. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1998, 39(1-2), 1-10 [cit. 2020-01-12]. DOI: 10.1016/S0168-1605(97)00109-8. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160597001098>
- [53] CUEVA, C., GARCÍA-RUIZ, A., GONZÁLEZ-ROMPINELLI, E., BARTOLOME, B., MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J., SALAZAR, O., VINCENTE, M. F., BILLS, G. F., MORENO-ARRIBAS, M. V. Degradation of biogenic amines by vineyard ecosystem fungi. Potential use in winemaking. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2012, 112(4), 672-682 [cit. 2019-10-25]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05243.x. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2012.05243.x>
- [54] BUŇKOVÁ, L., PUREVDORJ, K., BENEŠ, Š., BERČÍKOVÁ, L., DLABAJOVÁ, A., PLEVA, P., BUŇKA, F. Potravinářsky významné mikroorganismy a jejich schopnost degradace biogenních aminů. In: Sborník 28. kongresu Československé společnosti mikrobiologické, 18.-21.9.2019, Tatranské Matliare, Slovensko, s. 93. ISBN 978-80-973411-0-7.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BA	Biogenní aminy
MAO	Monoaminooxidázy
DAO	Diaminooxidázy
PAO	Polyaminooxidázy
Eh	Oxidačně-redukční potenciál
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MRS	Kultivační půda pro Laktobacily o optimální koncentraci (připravena dle výrobce)
MRS/2	Kultivační půda pro Laktobacily o poloviční koncentraci (o snížené koncentraci živin na polovinu)

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Dekarboxylace aminokyselin [2]</i>	12
<i>Obr. 2. Chemická struktura nejběžnějších biogenních aminů [5]</i>	13
<i>Obr. 3. Dekarboxylace histidinu za vzniku histaminu [9]</i>	14
<i>Obr. 4. Dekarboxylace tyrozinu za vzniku tyraminu [11]</i>	14
<i>Obr. 5. Dekarboxylace tryptofanu na tryptamin [11]</i>	14
<i>Obr. 6. Dekarboxylace lyzinu [11]</i>	14
<i>Obr. 7. Dekarboxylace ornitinu za vzniku putrescinu [11]</i>	15
<i>Obr. 8. Dekarboxylace fenylalaninu za vzniku 2-fenylethylaminu [11]</i>	15
<i>Obr. 9. Syntéza spermidinu a sperminu [11]</i>	15
<i>Obr. 10. Růstová křivka mikroorganismů [41]</i>	37
<i>Obr. 11. Závislost teploty na rychlosti růstu mikroorganismů [38]</i>	41
<i>Obr. 12. Lbc. casei – degradace putrescinu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v MRS</i> .52	
<i>Obr. 13. Lbc. casei – degradace kadaverinu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v MRS</i> 53	
<i>Obr. 14. Lbc. casei – degradace histaminu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v MRS</i> ...54	
<i>Obr. 15. Lbc. casei – degradace putrescinu o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v MRS</i> .55	
<i>Obr. 16. Lbc. casei – degradace kadaverinu o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v MRS</i> 56	
<i>Obr. 17. Lbc. casei – degradace histaminu o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v MRS</i> ...57	
<i>Obr. 18. Lbc. casei – degradace histaminu o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v MRS</i> ...58	
<i>Obr. 19. Lbc. casei – degradace fenylethylaminu o koncentraci 0,4 g/l při 30 °C v MRS</i>	59
<i>Obr. 20. Lbc. casei – degradace putrescinu o koncentraci 0,4 g/l při 30 °C v MRS</i> .60	
<i>Obr. 21. Lbc. casei – degradace histaminu o koncentraci 0,4 g/l při 30 °C v MRS</i> ...61	
<i>Obr. 22. Lbc. casei – degradace fenylethylaminu o koncentraci 0,4 g/l při 23 °C v MRS</i>	62
<i>Obr. 23. Lbc. casei – degradace putrescinu o koncentraci 0,4 g/l při 23 °C v MRS</i> .63	
<i>Obr. 24. Lbc. casei – degradace kadaverinu o koncentraci 0,4 g/l při 23 °C v MRS</i> 64	
<i>Obr. 25. Lbc. casei – degradace tyraminu o koncentraci 0,4 g/l při 23 °C v MRS</i>65	
<i>Obr. 26. Lbc. casei – degradace putrescinu o koncentraci 0,4 g/l při 11 °C v MRS</i> .66	
<i>Obr. 27. Lbc. casei – degradace kadaverinu o koncentraci 0,4 g/l při 11 °C v MRS</i> 67	
<i>Obr. 28. Lbc. casei – degradace histaminu o koncentraci 0,4 g/l při 11 °C v MRS</i> ...68	
<i>Obr. 29. Lbc. casei – degradace fenylethylaminu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C</i> <i>v médiu s nižším obsahem živin</i>	69

<i>Obr. 30. Lbc. casei – degradace putrescinu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v médiu s nižším obsahem živin</i>	<i>70</i>
<i>Obr. 31. Lbc. casei – degradace kadaverinu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v médiu s nižším obsahem živin</i>	<i>71</i>
<i>Obr. 32. Lbc. casei – degradace histaminu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v médiu s nižším obsahem živin</i>	<i>72</i>
<i>Obr. 33. Lbc. casei – degradace tyraminu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v médiu s nižším obsahem živin</i>	<i>73</i>
<i>Obr. 34. Lbc. casei – degradace histaminu o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v médiu s nižším obsahem živin</i>	<i>74</i>
<i>Obr. 35. Lbc. casei – degradace putrescinu o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v médiu s nižším obsahem živin</i>	<i>75</i>
<i>Obr. 36. Lbc. casei – degradace kadaverinu o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v médiu s nižším obsahem živin</i>	<i>76</i>
<i>Obr. 37. Lbc. casei – degradace histaminu o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v médiu s nižším obsahem živin</i>	<i>77</i>

SEZNAM TABULEK

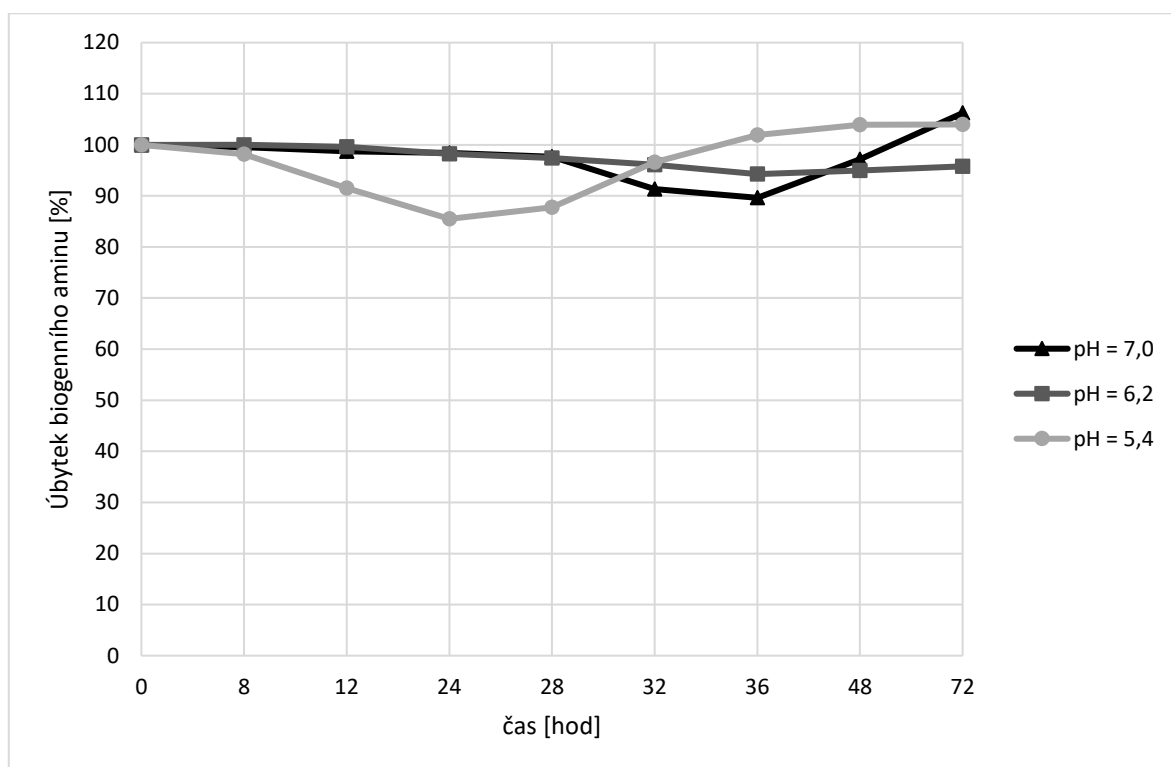
<i>Tab. 1. Toxické účinky histaminu [5,8,15]</i>	18
<i>Tab. 2. Obsah biogenních aminů ve fermentované zelenině [16]</i>	25
<i>Tab. 3. Biogenní aminy v alkoholických nápojích [16]</i>	27
<i>Tab. 4. Sledované růstové faktory.....</i>	47
<i>Tab. 5. Odběrové časy experimentu.....</i>	49
<i>Tab. 6. Gradientový eluční program pro HPLC.....</i>	50

SEZNAM PŘÍLOH

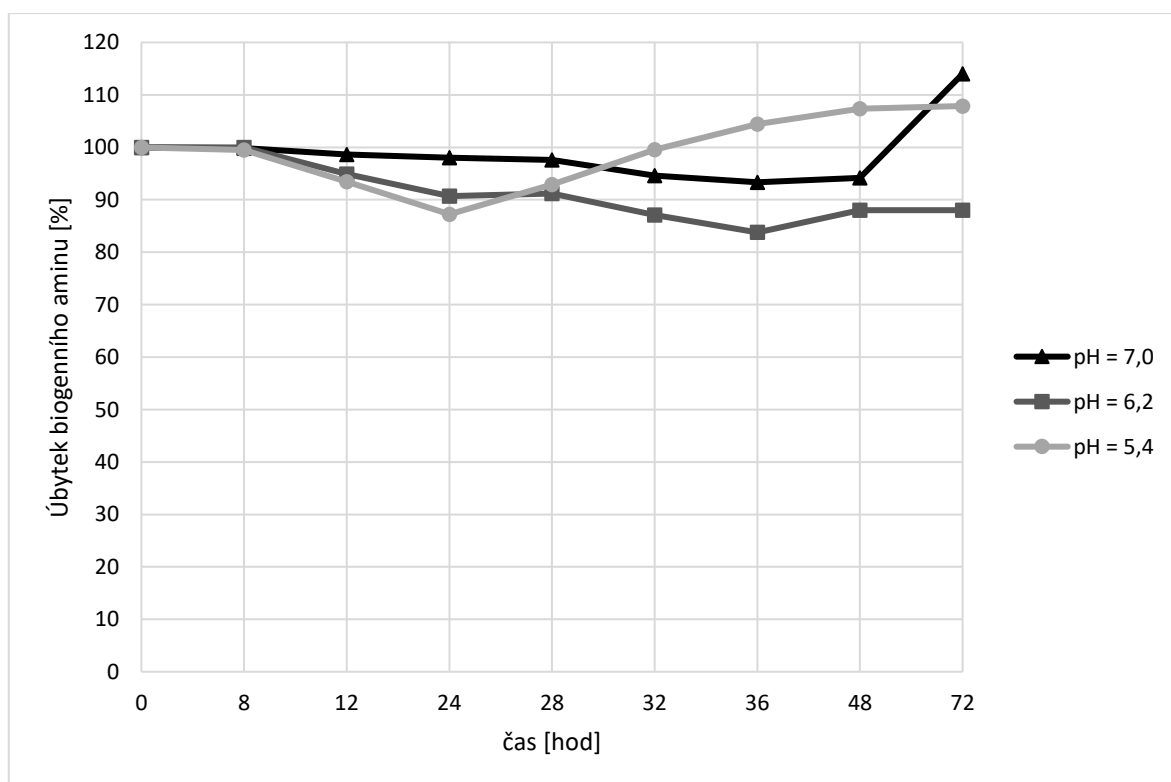
PŘÍLOHA PI: NÍZKÁ DEGRADAČNÍ SCHOPNOST TESTOVANÉHO KMENE PŘI
DANÝCH PODMÍNKÁCH

PŘÍLOHA PII: PŘÍSPĚVEK NA KONFERENCI - 28. KONGRES ČESKOSLOVENSKEJ
SPOLOČNOSTI MIKROBIOLOGICKEJ [54]

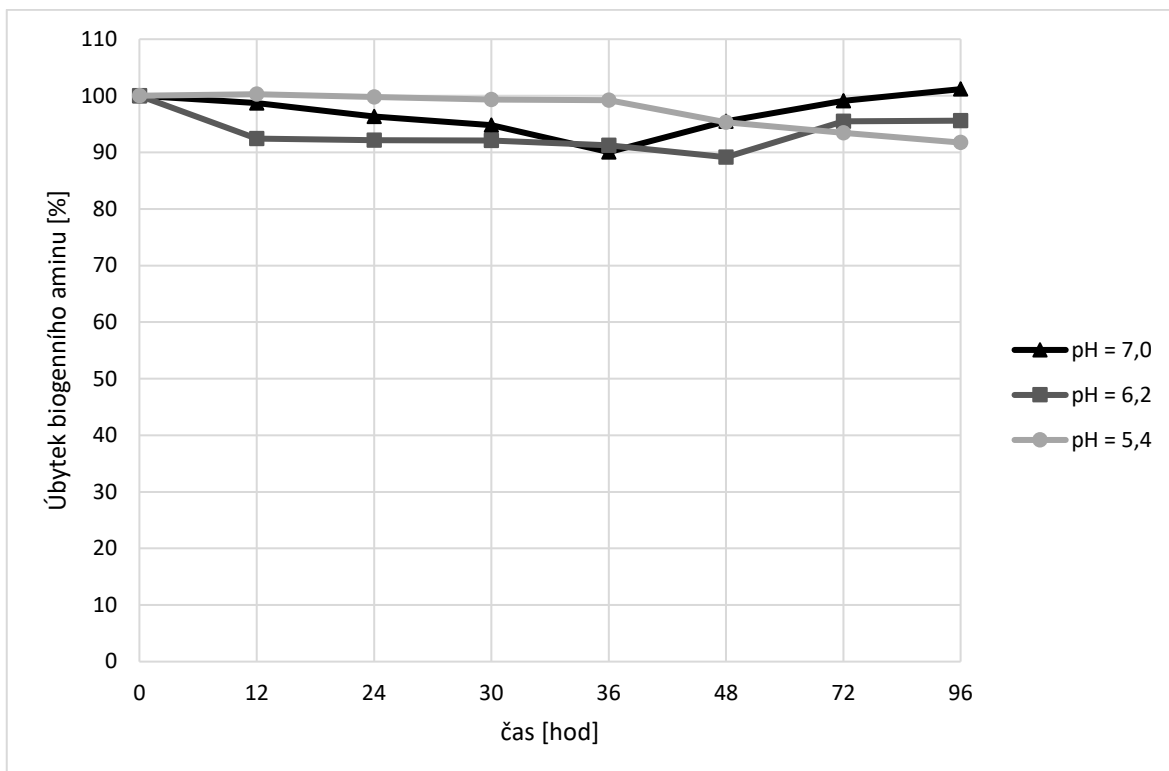
PŘÍLOHA PI: NÍZKÁ DEGRADAČNÍ SCHOPNOST TESTOVANÉHO KMENE PŘI DANÝCH PODMÍNKÁCH



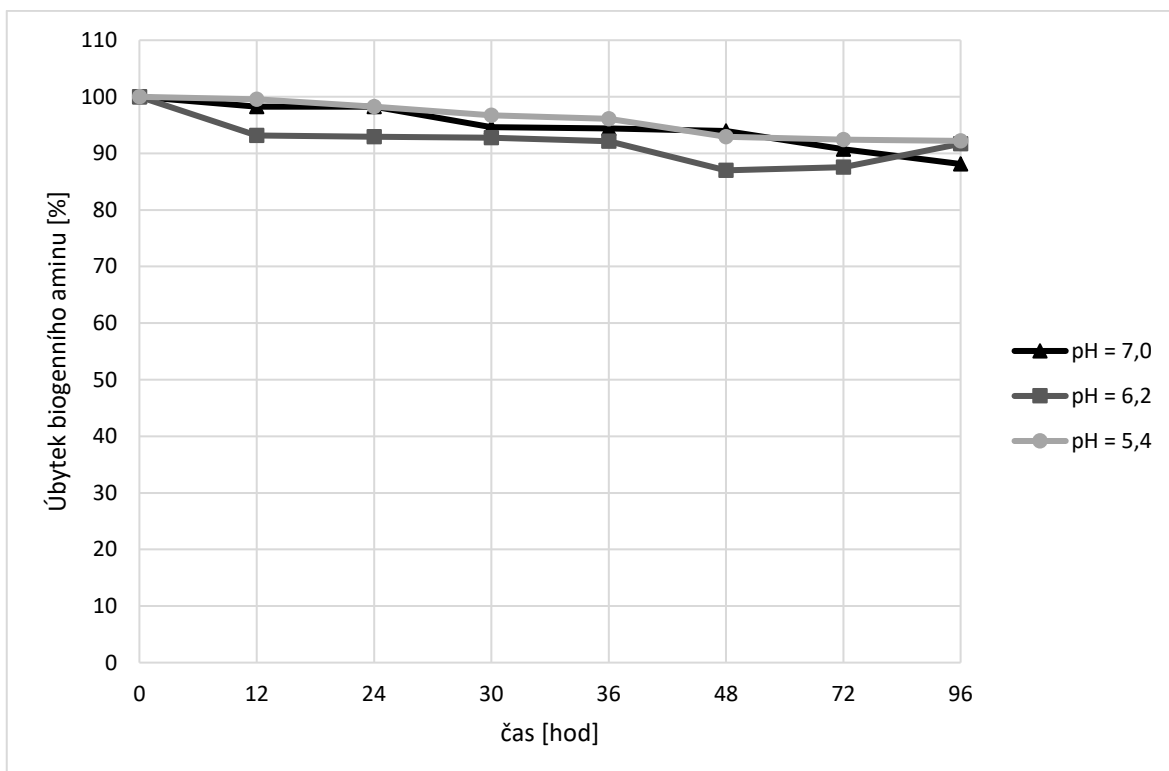
Lbc. casei – degradace fenylethylaminu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v MRS



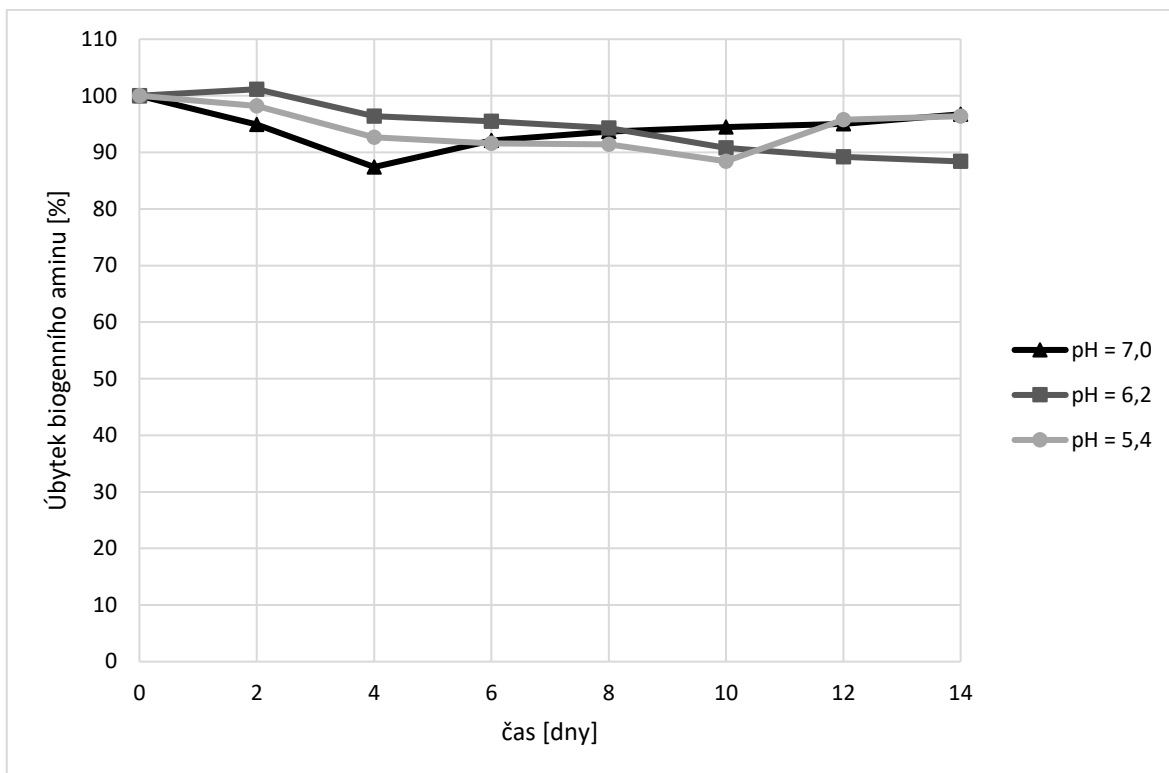
Lbc. casei – degradace tyraminu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v MRS



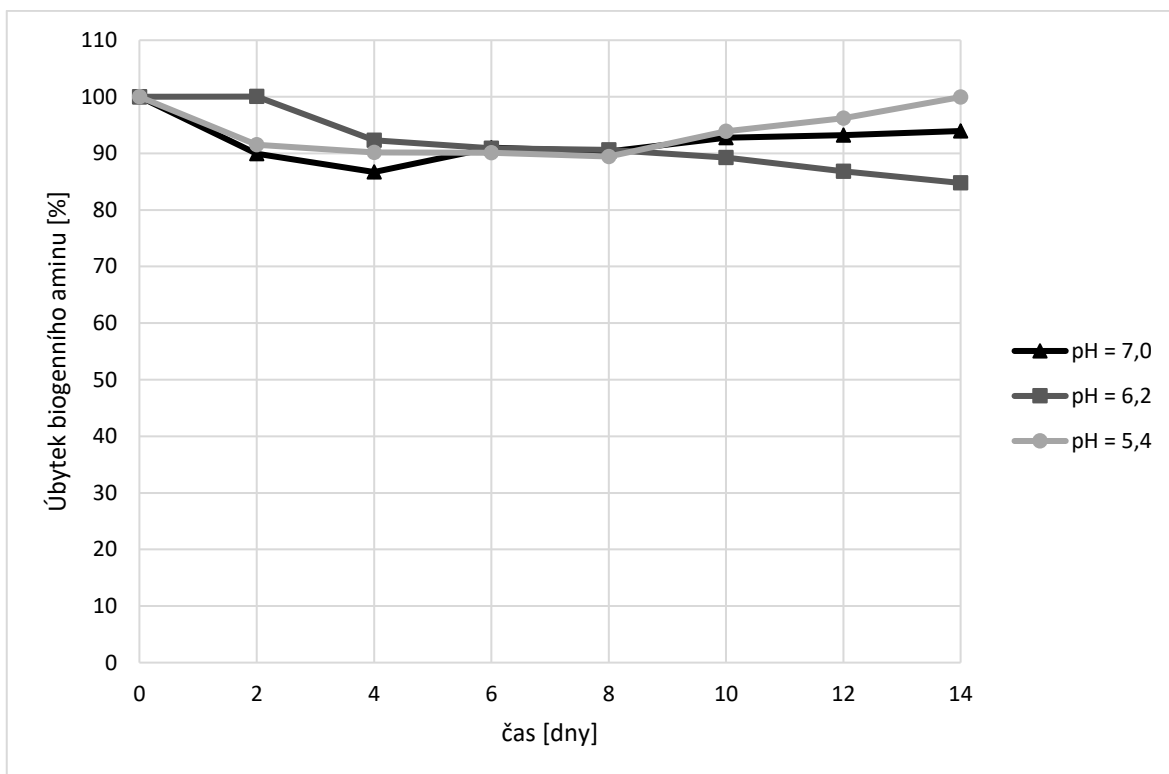
Lbc. casei – degradace fenylethylaminu o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v MRS



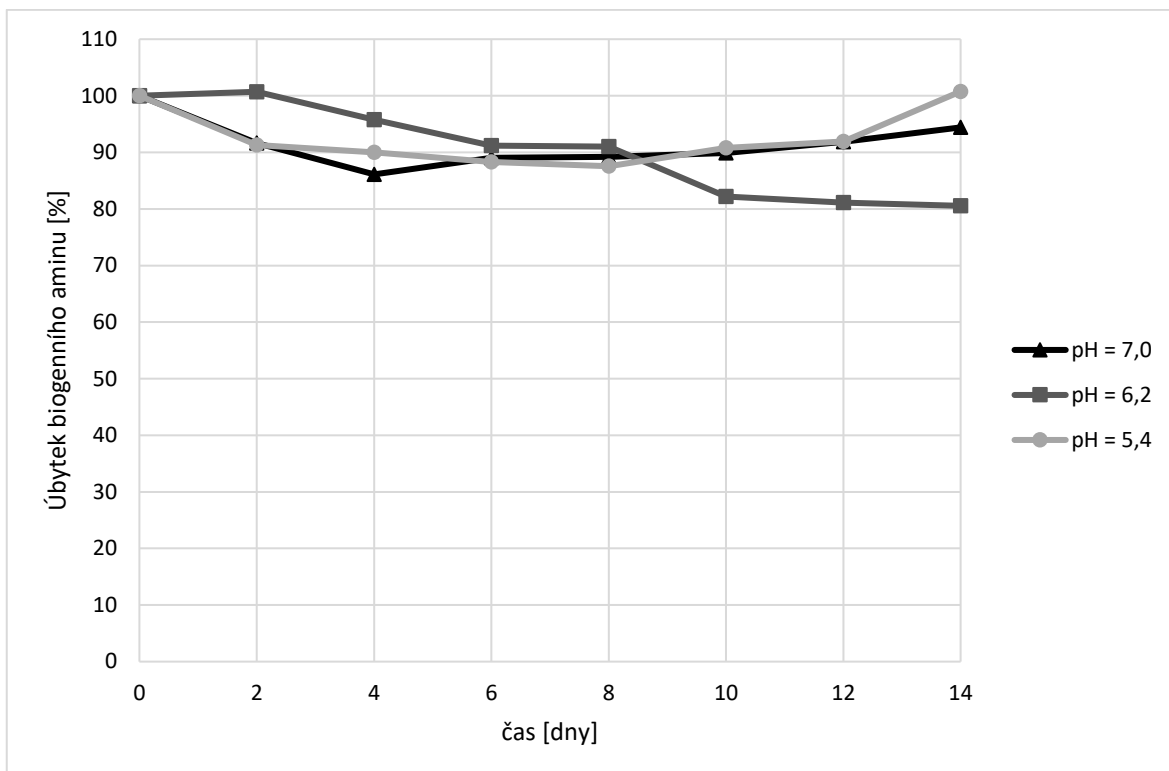
Lbc. casei – degradace tyraminu o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v MRS



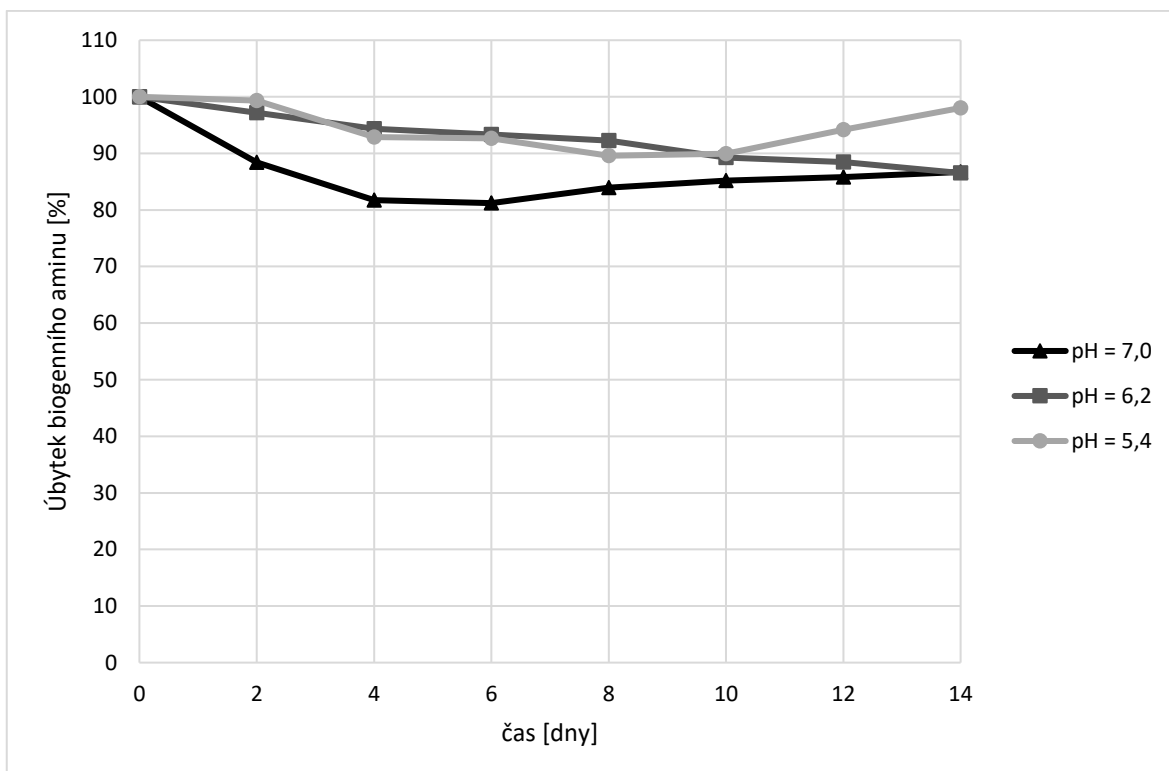
Lbc. casei – degradace fenylethylaminu o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v MRS



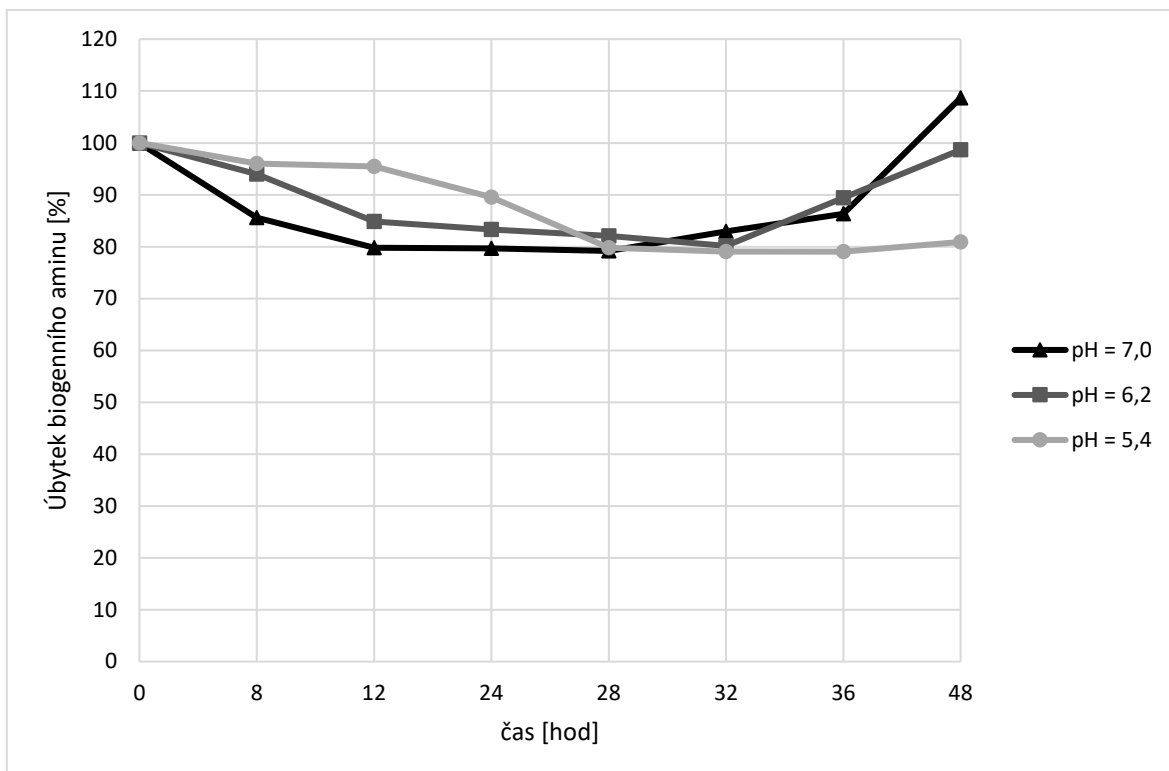
Lbc. casei – degradace putrescinu o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v MRS



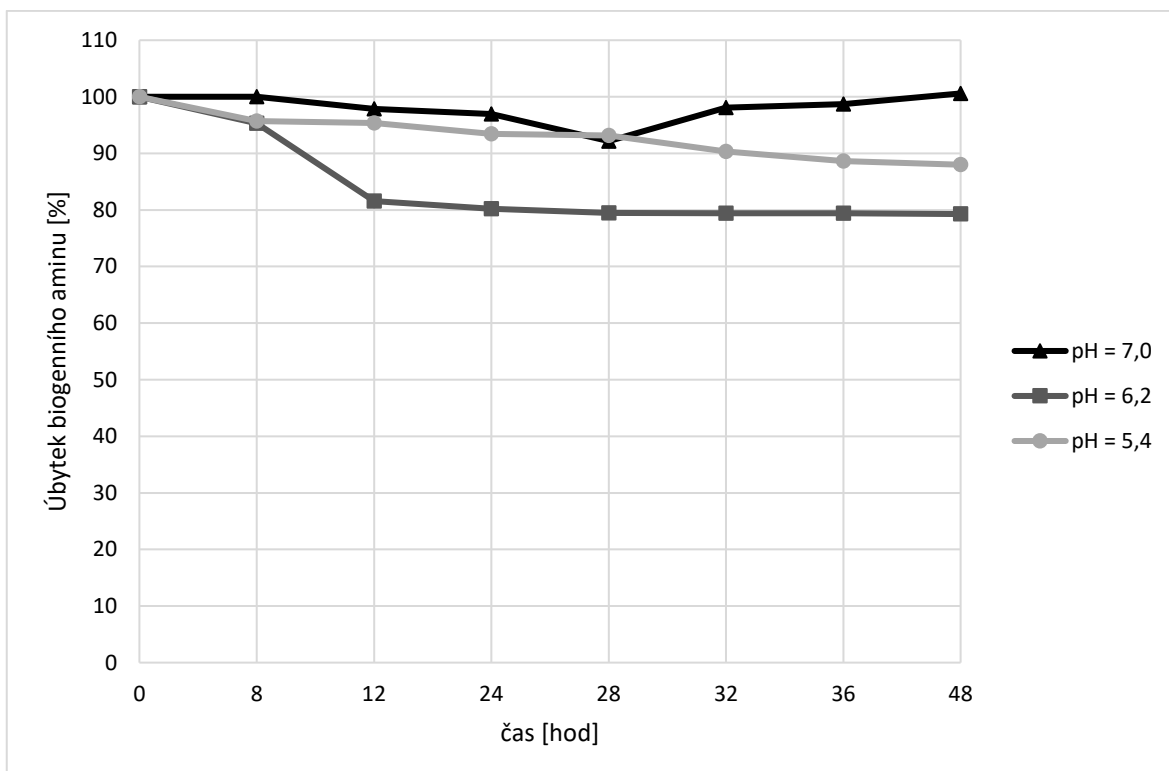
Lbc. casei – degradace kadaverinu o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v MRS



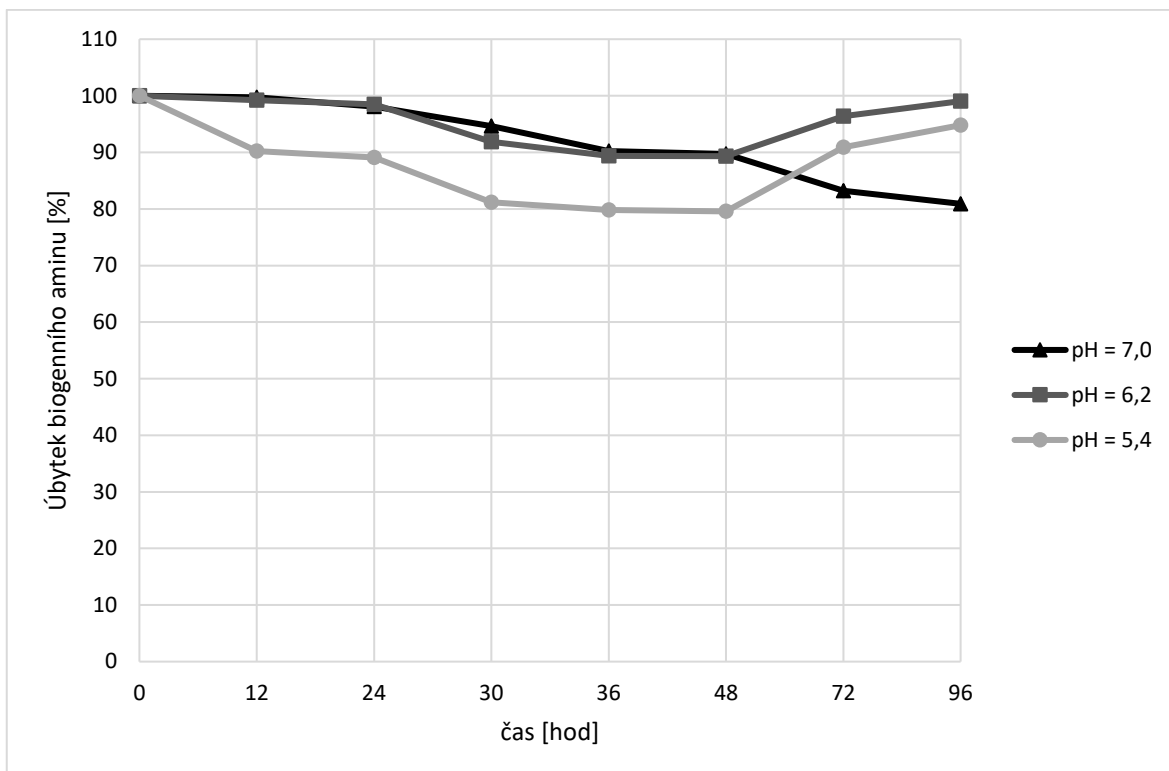
Lbc. casei – degradace tyraminu o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v MRS



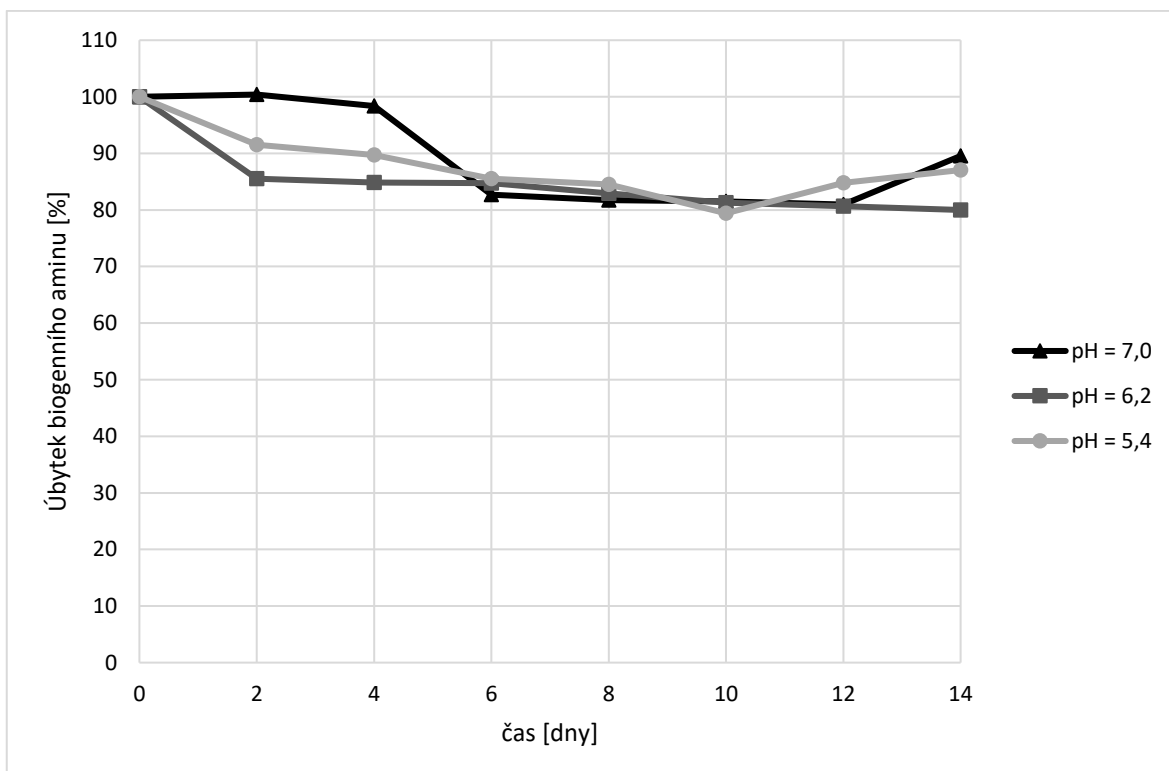
Lbc. casei – degradace kadaverinu o koncentraci 0,4 g/l při 30 °C v MRS



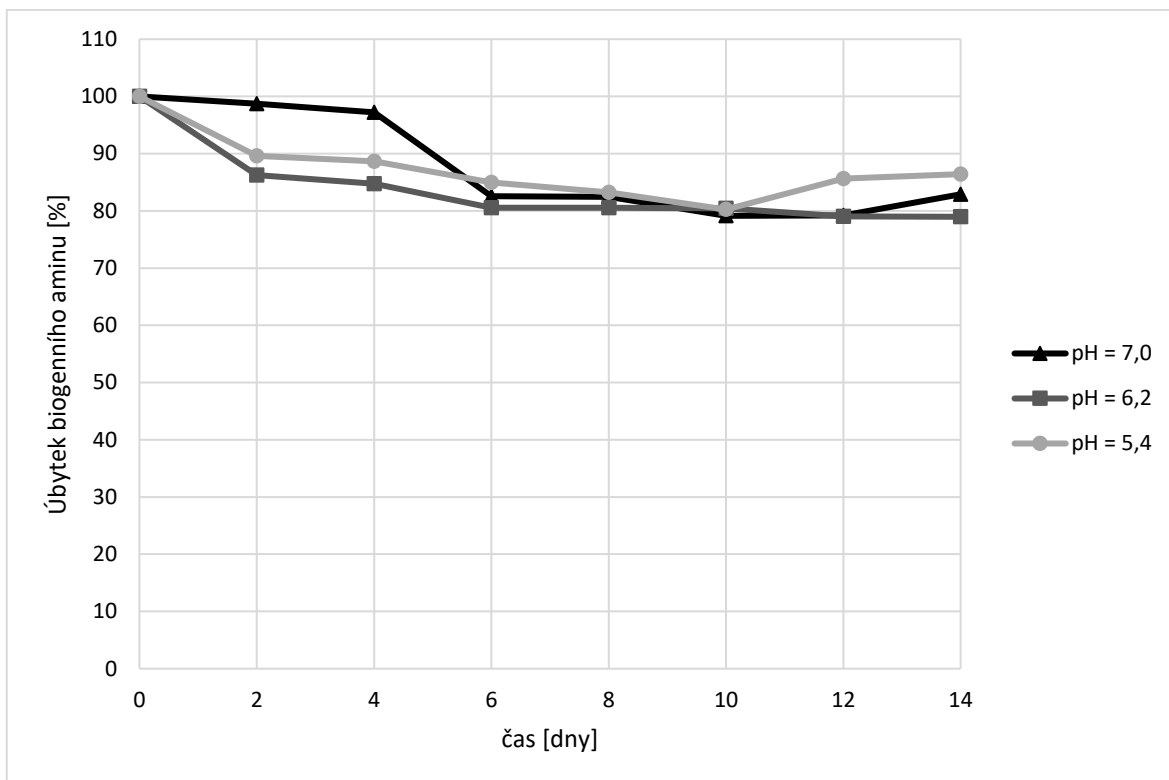
Lbc. casei – degradace tyraminu o koncentraci 0,4 g/l při 30 °C v MRS



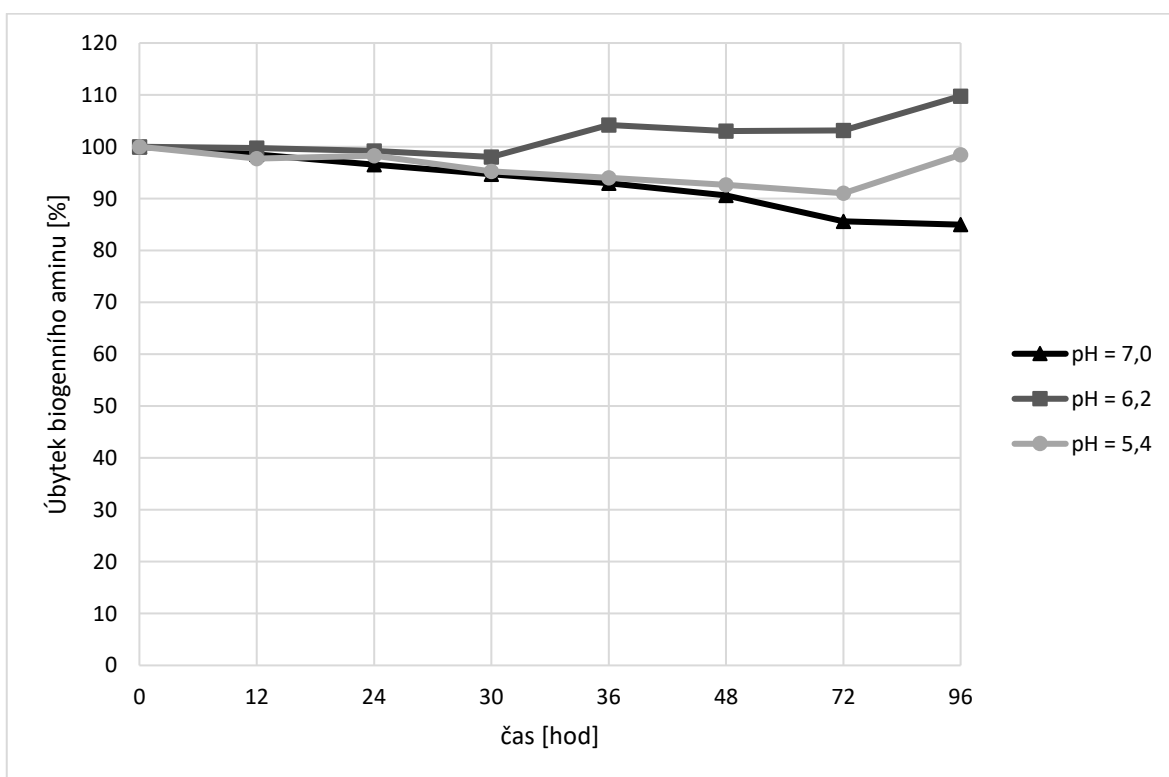
Lbc. casei – degradace histaminu o koncentraci 0,4 g/l při 23 °C v MRS



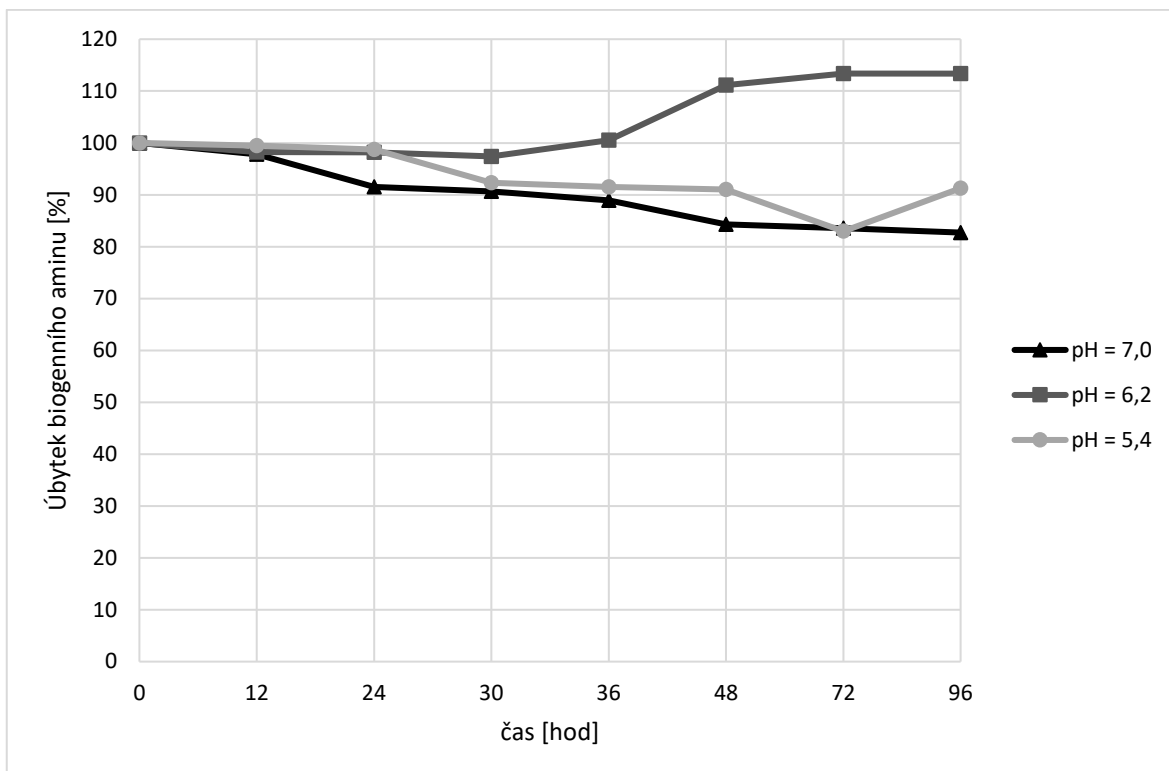
Lbc. casei – degradace fenylethylaminu o koncentraci 0,4 g/l při 11 °C v MRS



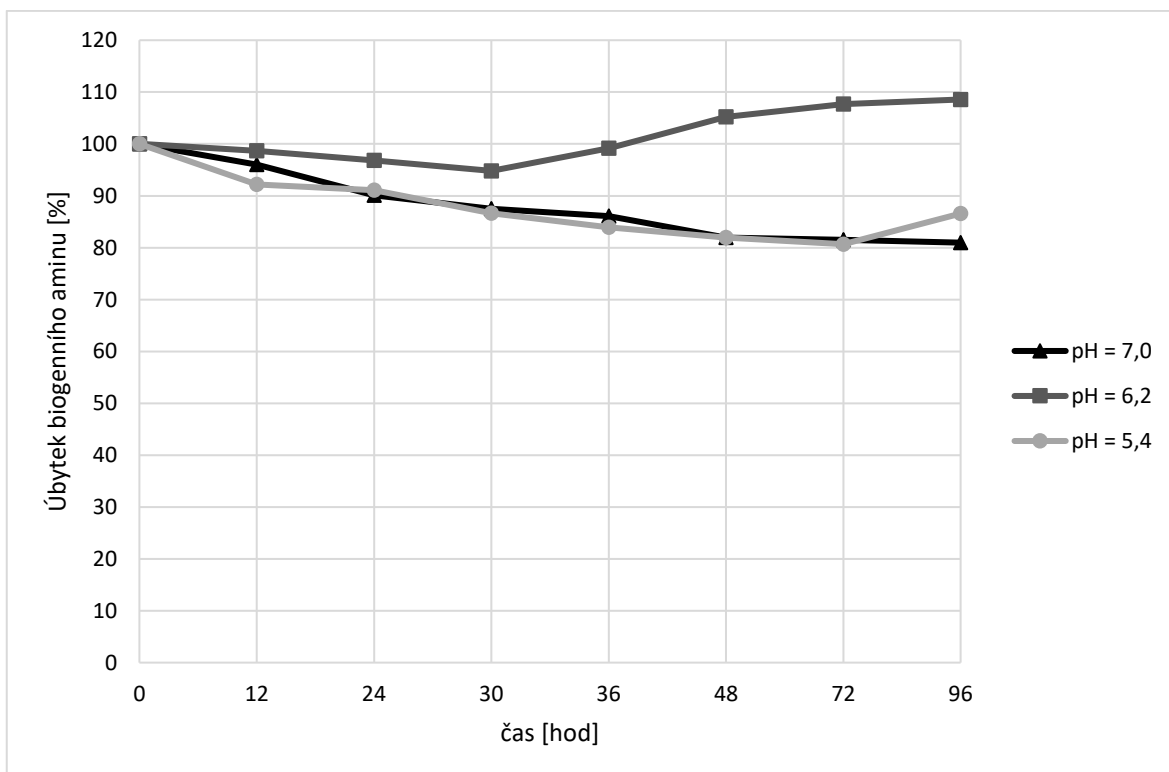
Lbc. casei – degradace tyraminu o koncentraci 0,4 g/l při 11 °C v MRS



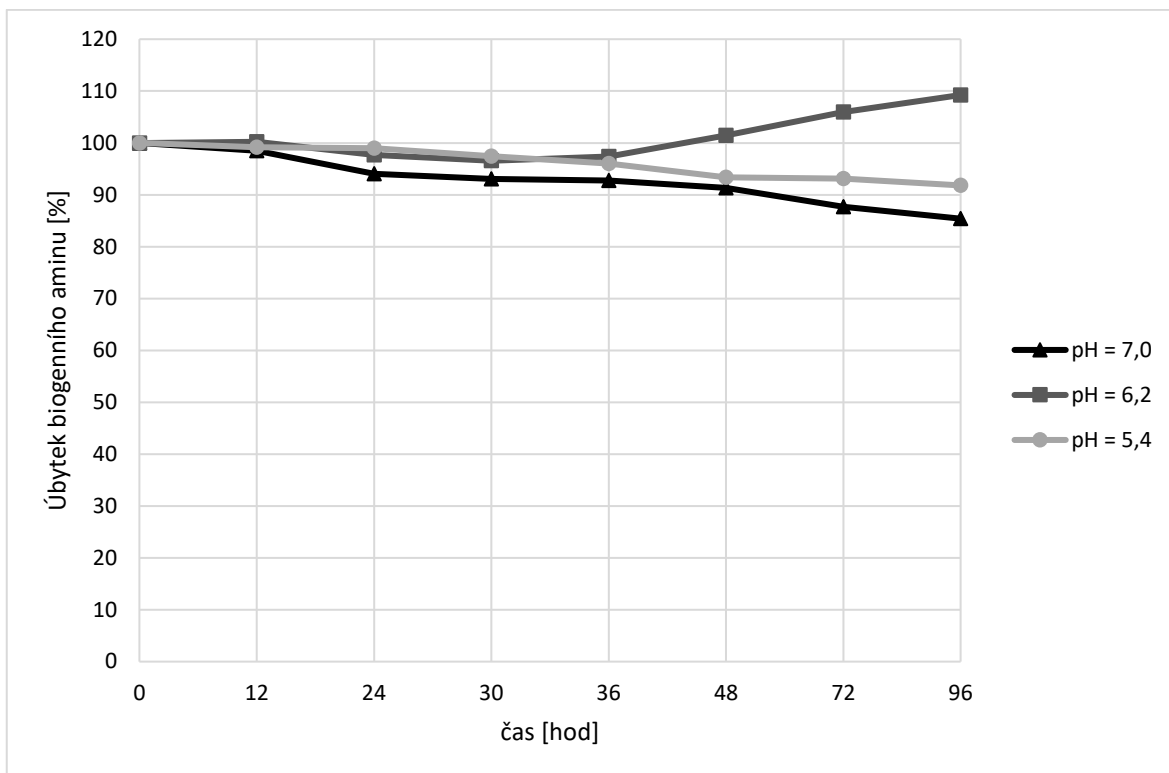
Lbc. casei – degradace fenylethylaminu o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v médiu s nižším obsahem živin



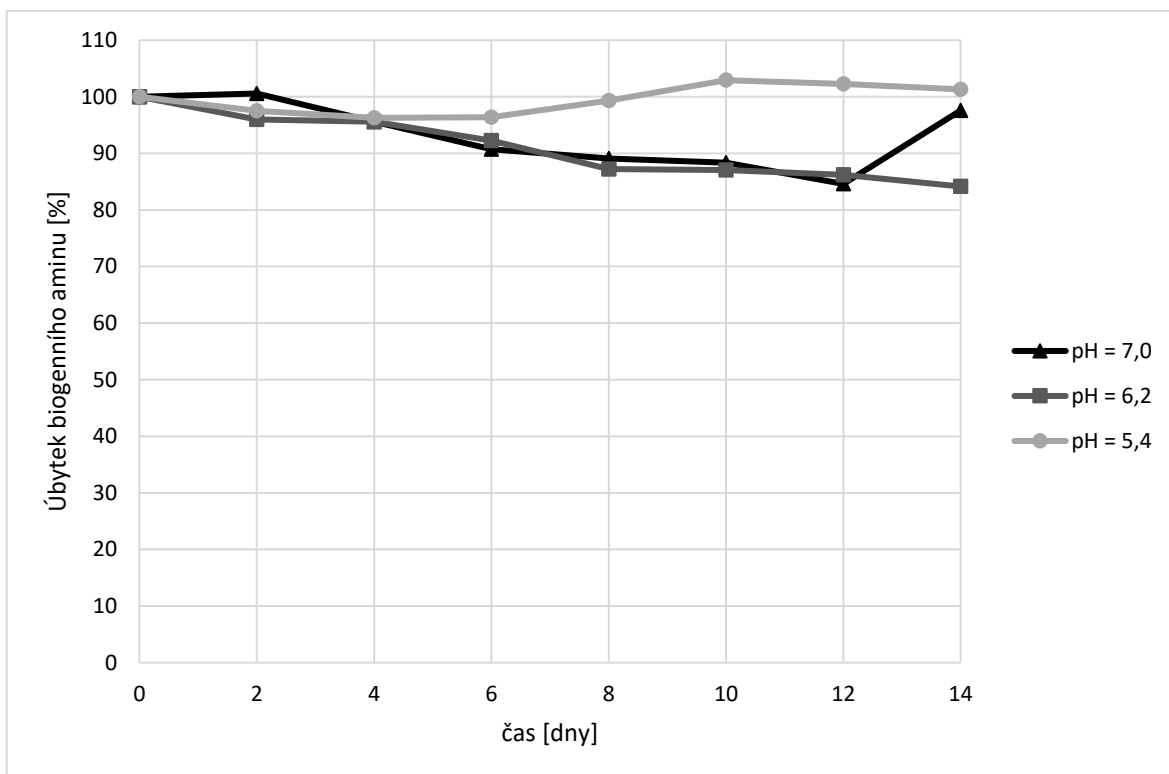
Lbc. casei – degradace putrescinu o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v médiu s nižším obsahem živin



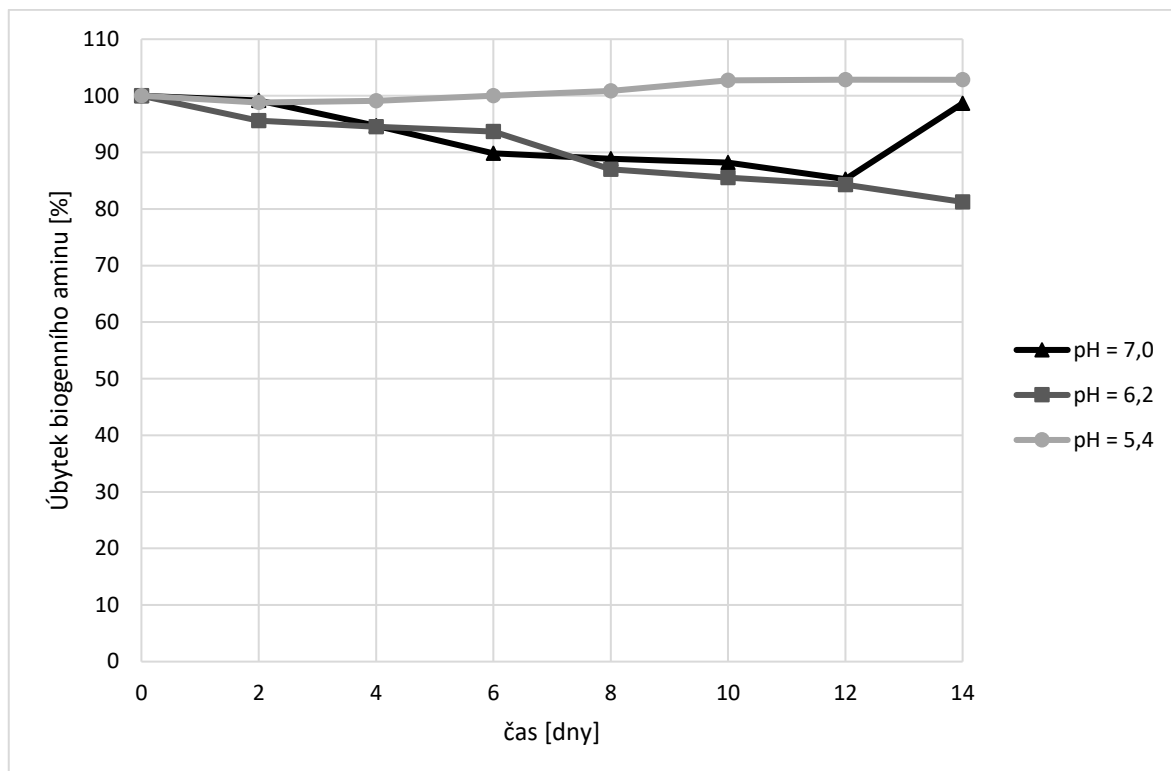
Lbc. casei – degradace kadaverinu o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v médiu s nižším obsahem živin



Lbc. casei – degradace tyraminu o koncentraci 0,2 g/l při 23 °C v médiu s nižším obsahem živin



Lbc. casei – degradace fenylethylaminu o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v médiu s nižším obsahem živin



Lbc. casei – degradace tyraminu o koncentraci 0,2 g/l při 11 °C v médiu s nižším obsahem živin

PŘÍLOHA PII: PŘÍSPĚVEK NA KONFERENCI - 28. KONGRES ČESKOSLOVENSKEJ SPOLOČNOSTI MIKROBIOLOGICKEJ [54]



FOOD-IMPORTANT MICROORGANISMS AND THEIR ABILITY TO DEGRADE BIOGENIC AMINES

Buňková Leona¹, Purevdorj Khatantuul¹, Beneš Štěpán¹,
Berčíková Lucie¹, Dlabajová Andrea¹, Pleva Pavel¹,
Buňka František²



¹ Department of Environmental Protection Engineering, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, Czech Republic, bunkova@utb.cz

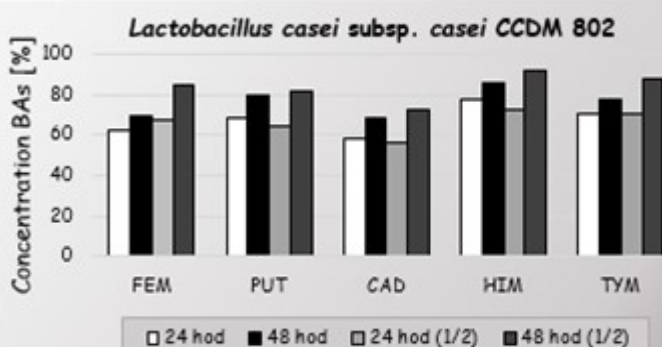
² Department of Food Technology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, Czech Republic

Introduction

Biogenic amines are low-molecular weight nitrogen compounds that are produced by decarboxylation of corresponding amino acids. They occur in all foods that contain proteins or free amino acids and excessive intake of biogenic amines can have a negative effect on human health. For this reason, it is important to find ways to reduce their content in foodstuffs. One way is degradation by enzymes that degrade biogenic amines to less toxic or non-toxic products.

The aim of this work

was to verify the ability of 54 selected bacterial strains of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Brevibacterium*, *Micrococcus* and *Kocuria* to used in the dairy industry to degrade biogenic amines.



Materials and methodology

Bacterial strains obtained from CCDM were 24 hour and 48 hour cultivated with BAs.

Three independent extractions of BAs were carried out using 0.6M perchloric acid solution (1:1).

BAs were detected using HPLC (RP-HPLC/UV; $\lambda=254$ nm) after derivatization with dansylchloride. In the same way, samples after cultivation in half-nutrient medium were analyzed.

Conclusion

A different ability to degrade BAs by the individual strains was found depending on the time of cultivation and on the preference of the nutrient content (the full culture medium or the half-nutrient culture medium).

The highest ability to reduce the amount of BAs compared to other tested degraders was showed by *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198, that decreased the content of putrescine, cadaverine and histamine by more than 50% after 24 hour cultivation in the half-nutrient culture medium.

This study was supported by the project IGA/FT/2019/011 from the Internal Grant of Tomas Bata University in Zlín and by the project QK1710156 from National Agency for Agricultural Research (NAZV).