

Produkce biogenních aminů bakteriemi izolovanými z masných výrobků a produktů studené kuchyně

Khatantuul Purevdorj

Bakalářská práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie a mikrobiologie potravin
akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Khatantuul PUREVDORJ**
Osobní číslo: **T08358**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Produkce biogenních aminů bakteriemi izolovanými z masných výrobků a produktů studené kuchyně**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

- 1. Charakterizace produktů dekarboxylačních reakcí aminokyselin v potravinách.**
- 2. Mikroorganismy s významnou dekarboxylázovou aktivitou.**
- 3. Zastoupení a význam těchto mikroorganismů v potravinách.**

II. Praktická část

- 1. Záchyt a morfologická charakterizace vybraných skupin mikroorganismů v masných výrobcích a výrobcích studené kuchyně.**
- 2. Otestování bakterií na dekarboxylázovou aktivitu.**
- 3. Formulace závěrů na základě získaných výsledků.**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] Bover-Cid, S. and Holzapfel, W.H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 53: 33-41. 1999.
- [2] Davídek, J., Janíček, G., Pokorný, J. *Chemie potravin*. Praha : SNTL, 1983.
- [3] Halász, A., Baráth, Á, Simon-Sarkadi, L. and Holzapfel, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci Technol.* 5: 42-49. 1994.
- [4] Silla Santos, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29: 213-231. 1996.
- [5] Šilhánková L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha: Academia, 2004.
- [6] Velíšek, J. *Chemie potravin III*. Tábor : OSSIS, 1999. ISBN 80-902391-5-3.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce:

11. února 2011

Termín odevzdání bakalářské práce:

30. května 2011

Ve Zlíně dne 12. dubna 2011



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Jan Hrabě, Ph.D.
ředitel ústavu

Přijetí a jméno: PUREVDORJ KHATANTUUL

Obor: QHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 30.5.2011



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Cílem bakalářské práce bylo studium produkce biogenních aminů (histaminu, tyraminu, kadaverinu, putrescinu, spermidinu, sperminu, agmatinu a fenyletylaminu) bakteriemi izolovanými z masných výrobků, produktů studené kuchyně a pitné vody. Celkem bylo izolováno 69 bakterií. Z vybraných masných výrobků bylo izolováno 21 bakterií, z lahůdek 24 bakterií a z pitné vody 24 bakterií. Produkce biogenních aminů byla u těchto bakterií zjišťována pomocí kultivační metody a iontově-výměnné chromatografie. U žádné z testovaných bakterií nebyla zjištěna schopnost produkce histaminu, spermidinu, sperminu a agmatinu. U bakterií izolovaných z masných výrobků byla detekována produkce fenyletylaminu. Schopnost produkce tyraminu byla zjištěna u 1 izolátu. Největšími producenti putrescinu a kadaverinu byly bakterie izolované z pitné vody. U bakterií izolovaných z lahůdek nebyla zjištěna schopnost produkce stanovovaných biogenních aminů.

Klíčová slova: biogenní aminy, iontově-výměnná chromatografie, kultivační metoda

ABSTRACT

The aim of this work was to explore the production of biogenic amines (histamine, tyramine, cadaverine, putrescine, spermidine, spermine, agmatine and phenylethylamine) on bacteria isolated from meat products, delicatessen products and drinking water. A total of 69 bacteria were isolated. From meat products were isolated 21 bacteria, 24 isolates were from selected delicatessens and from drinking water 24 bacteria. Production of biogenic amines in these bacteria were investigated by cultivation methods and ion-exchange chromatography. None of the tested bacteria produced histamine, spermidine, spermine and agmatine. In bacteria isolated from meat products were detected production of phenylethylamine. The ability of tyramine production was detected in 1 isolate. The highest producers of putrescine and cadaverine were bacteria isolated from drinking water. Bacteria isolated from the delicatessen was found unable to produce the determined biogenic amines.

Keywords: biogenic amines, ion exchange chromatography, cultivation method

Děkuji paní doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za poskytnuté rady a odborné vedení při tvorbě této bakalářské práce.

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

OBSAH

OBSAH	8
ÚVOD	10
1 DEKARBOXYLAČNÍ ČINNOST	12
1.1 BIOGENNÍ AMINY	12
1.1.1 Charakterizace biogenních aminů	12
1.1.2 Vznik biogenních aminů	14
1.1.3 Výskyt biogenních aminů v potravinách	15
1.1.3.1 Ryby a výrobky z ryb.....	16
1.1.3.2 Maso a masné výrobky.....	17
1.1.3.3 Sýry	17
1.1.3.4 Potravin y rostlinného původu	18
1.1.3.5 Fermentované nápoje	18
1.1.4 Toxický účinek biogenních aminů	20
1.1.5 Detoxikace biogenních aminů	20
2 MIKROORGANIZMY S VÝZNAMNOU DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITOU	21
2.1 ČELEĎ <i>ENTEROBACTERIACEAE</i>	22
2.1.1 Přehled a základní charakteristika bakterií z čeledi <i>Enterobacteriaceae</i> podléjících se na tvorbě biogenních aminů	22
2.2 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	25
2.2.1 Rod <i>Lactobacillus</i>	26
2.2.2 Rod <i>Lactococcus</i>	27
2.2.3 Rod <i>Leuconostoc</i>	27
2.2.4 Rod <i>Enterococcus</i>	28
2.3 OSTATNÍ MIKROORGANIZMY PRODUKUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY	29
3 CÍLE PRÁCE	31
4 MATERIÁL A METODY	32
4.1 KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	32
4.2 ODBĚR VZORKŮ	32
4.3 CHARAKTERIZACE IZOLOVANÝCH BAKTERIÍ.....	33
4.3.1 Morfologie kolonií	33
4.3.2 Gramovo barvení.....	33
4.3.3 Důkaz produkce katalázy	34
4.3.4 Oxidázový test.....	34

4.4	STANOVENÍ DEKARBOXYLÁZOVÉ AKTIVITY BAKTERIÍ KULTIVAČNÍ METODOU	34
4.4.1	Příprava dekarboxylačního média	34
4.4.2	Zjišťování produkce biogenních aminů v dekarboxylačním médiu	35
4.5	STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ IONTOVĚ-VÝMĚNNOU CHROMATOGRafiÍ	35
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	36
5.1	CHARAKTERIZACE IZOLOVANÝCH BAKTERIÍ	36
5.2	DETEKCE BA KULTIVAČNÍ METODOU	37
5.3	DETEKCE BA POMOCÍ IONTOVĚ-VÝMĚNNÉ CHROMATOGRafIE	40
	ZÁVĚR	45
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	46
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	52
	SEZNAM OBRÁZKŮ	53
	SEZNAM TABULEK	54
	SEZNAM PŘÍLOH	55

ÚVOD

Bezpečnost potravin může být ohrožována mnohými riziky biologického, fyzikálního nebo chemického původu. Mezi často sledované kontaminanty potravin patří v poslední době i biogenní aminy [1].

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární organické báze, které vykazují biologickou aktivitu. Jsou produkty běžné metabolické aktivity zvířat, rostlin i mikroorganismů. Biogenní aminy jsou pro člověka nepostradatelné, avšak ve vysokých koncentracích se mohou projevit jako látky psychoaktivní a vasoaktivní. Nejmarkantnější symptomy konzumace vysokých dávek biogenních aminů jsou zvracení, dýchací potíže, pocení, bušení srdce, hypotenze nebo hypertenze a migrény [2].

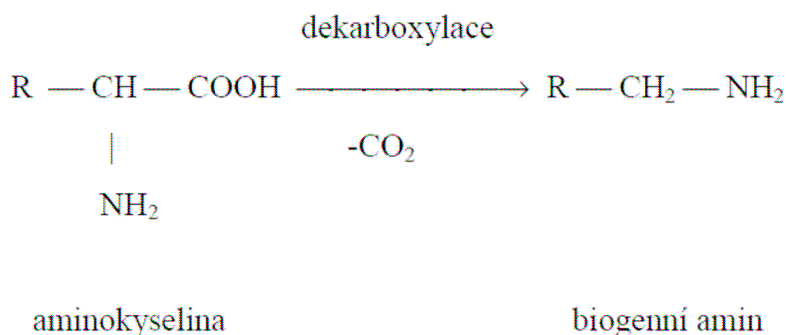
V potravinách biogenní aminy vznikají především dekarboxylací přirozených aminokyselin působením dekarboxyláz, kterými jsou vybaveny četné druhy hnilobných bakterií, ale také řada druhů bakterií mléčného kvašení [2]. Dále vznikají při výrobě, zrání a skladování fermentovaných potravin např. sýrů, ryb, masných výrobků, vína, piva, kyselého zelí a výrobků ze sóji [3]. Vysoké koncentrace biogenních aminů se vyskytují u potravin v pokročilém stupni kažení. Biogenní aminy se tak stávají jedním z ukazatelů kvality potravin [4]. Jakmile se biogenní aminy vytvoří, je obtížné je ničit pasterací nebo varem. Tvorba biogenních aminů by se proto měla přísně sledovat v surovině i ve výrobním prostředí s odpovídající inhibicí mikroorganismů způsobujících kažení.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 DEKARBOXYLAČNÍ ČINNOST

Dekarboxylace je chemická reakce, při níž dochází k odštěpování oxidu uhličitého ze substrátu (obr. 1) [5]. Tyto reakce jsou katalyzované specifickými dekarboxylázami, z nichž mnohé obsahují jako kofaktor pyridoxalfosfát [6]. Pyridinový kruh usnadňuje průběh reakcí díky aromatickému charakteru a schopnosti odtahovat elektrony z C_α uhlíku substrátu a stabilizovat Schiffovu bázi vzniklou po navázání substrátu. Tím dojde k nezbytné destabilizaci vazeb vycházejících z C_α uhlíku [7].

Dekarboxylací aminokyselin vznikají aminy, které mají většinou významné fyziologické účinky a proto je také označujeme jako biogenní aminy. U živočichů slouží dekarboxylace k výrobě dalších důležitých biogenních aminů, které pak slouží k výstavbě koenzymů, vitaminů, hormonů [6].



Obr. 1 – Dekarboxylace aminokyselin [8]

1.1 Biogenní aminy

1.1.1 Charakterizace biogenních aminů

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární bazické dusíkaté sloučeniny, které vznikají převážně dekarboxylací aminokyselin nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů [9] (zdroj 1). Jsou významnými sloučeninami, které se vyskytují v živých organizmech jako metabolické meziprodukty a produkty, které vykazují biologickou aktivitu [10].

Na základě chemické struktury je možno biologicky aktivní aminy rozdělit do několika skupin [9]:

- alifatické (putrescin – PUT, kadaverin – CAD, spermin – SPM, spermidin – SPD),
- aromatické (tyramin – TYR, 2-fenyletylamin – PEA),
- heterocyklické (histamin – HIS, tryptamin – TRY),
- polyaminy (putrescin – PUT, spermidin – SPD, spermin – SPM).

Biogenní aminy je možné také klasifikovat jako polyaminy a biogenní aminy. Přirozenými producenti polyaminů jsou zvířata, rostliny a mikroorganismy. Do této skupiny se řadí spermidin, spermin a diaminy putrescin, kadaverin a agmatin [11]. Podílejí se na důležitých fyziologických procesech, jsou důležité v procesech růstu a podílejí se na diferenciaci buněk a stabilizaci membrán [12]. Někteří zástupci biogenních aminů mají v organismu člověka důležité fyziologické funkce. Slouží jako prekurzory některých hormonů (např. 2-fenyletylamin), alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů. Mohou i přímo fungovat jako hormony (histamin). Ve vysokých, respektive nadbytečných, dávkách mohou biogenní aminy mít pro lidský organizmus toxické účinky [13].

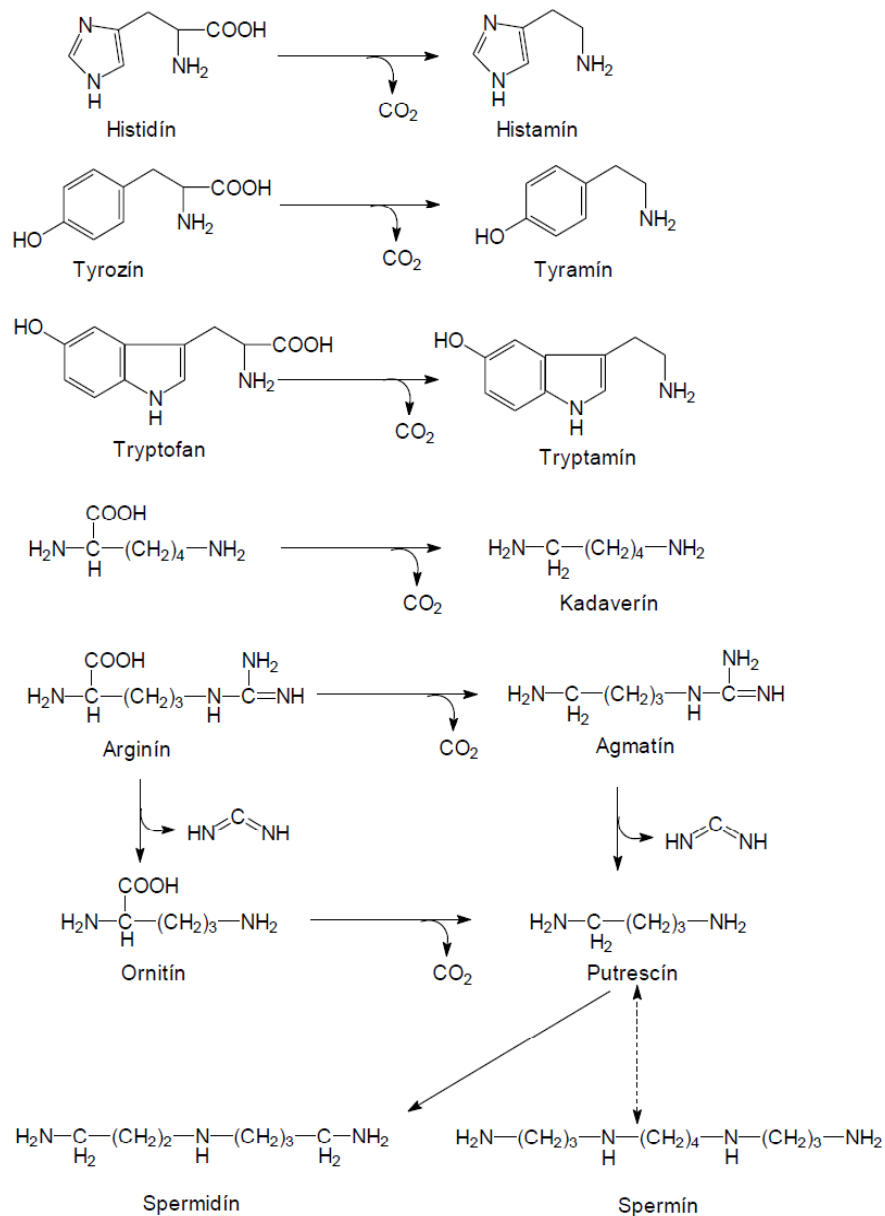
Mezi nejvýznamější biogenní aminy lze zařadit:

- putrescin (tetrametylendiamin) a kadaverin (pentametylendiamin) – vytvářejí se při kažení (hnutí) masa a jsou často nazývány jako mrtvolné jedy nebo ptomainy [14],
- tyramin – lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak a kontrakce hladkého svalstva [15],
- 2-fenyletylamin – hormon a alkaloid skupiny amfetaminů [16],
- histamin – v centrální nervové soustavě působí jako neurotransmitter, vliv na krevní tlak a sekreci žaludeční šťávy [15],
- tryptamin – lokální tkáňový a rostlinný hormon, vliv na krevní tlak, vliv na peristaltiku střev, psychické funkce [15],
- spermin – esenciální růstový faktor některých bakterií, u některých virů je spojen s nukleovými kyselinami [17],
- spermidin – polyamin vyskytující se ve spermatu, kvasinkách, hovězím pankreatu a dalších tkáních [17],
- dopamin – působí jako neurotransmitter v CNS i v periférní nervové soustavě [17],
- serotonin – významný neurotransmitter, v CNS se účastní především procesů, které se podílejí na vzniku nálad [18].

1.1.2 Vznik biogenních aminů

Nejčastěji biogenní aminy vznikají dekarboxylací přirozených aminokyselin působením bakteriálních dekarboxyláz (obr. 2). Dekarboxylací argininu vzniká agmatin a ornitin. Putrescin vzniká dekarboxylací ornitinu, kadaverin z lyzinu, histamin z histidinu, 2-fenyletylamin z fenylalaninu, tyramin z tyrozinu a tryptamin z tryptofanu [19]. Hormon serotonin vzniká z tryptaminu. Z putrescinu vzniká metylací S-adenosylmetioninem spermidin a dále spermin. Z DOPA vzniká dopamin (působením dihydroxyfenylalanindekarboxylázy) [15].

Tvorba biogenních aminů bakteriemi může být ovlivněna mnohými vnějšími faktory, které mohou ovlivňovat zejména kinetiku dekarboxylázových reakcí. Mezi vnější faktory, které ovlivňují tvorbu biogenních aminů u bakterií, patří teplota a pH prostředí, dostupnost zdrojů uhlíku (např. glukózy), aero-/anaerobióza, přítomnost růstových faktorů, růstová fáze buněk, koncentrace NaCl (vodní aktivita) aj. Kromě těchto zmíněných faktorů mohou produkci biogenních aminů ovlivňovat další chemické látky, např. etanol, některé sacharidy, fenolické sloučeniny nebo oxid siřičitý [10].



Obr. 2 – Dekarboxylace aminokyselin za tvorby biogenních aminů [20]

1.1.3 Výskyt biogenních aminů v potravinách

Výskyt biologických aktivních aminů lze očekávat v potravinách obsahujících bílkoviny anebo volné aminokyseliny, zvláště pokud poskytují vhodné podmínky pro biochemickou aktivitu přítomných mikroorganismů [21].

Biogenní aminy se vyskytují se ve fermentovaných potravinách, např. ve fermentovaných salámech, v sýrech, pivu, vínu a kysaném zelí. V potravinách připravených fermentační cestou jsou BA jejich pravidelnou a často i přirozenou součástí. U nefermentovaných potravin jsou BA především indikátorem nežádoucí mikrobiální činnosti. V případě skladování potravin může být obsah BA ukazatelem jakosti vstupní suroviny a úrovně hygieny během výrobního procesu a skladování [22]. V zelenině, ovoci a houbách při nevhodném skladování produkují BA především endogenní dekarboxylázy [15]. Nejběžnější biogenní aminy vyskytující se v potravinách jsou histamin, tyramin, kadaverin, spermin, spermidin, putrescin, 2-fenyletylamin a tryptamin [23].

1.1.3.1 Ryby a výrobky z ryb

Obsah biogenních aminů v čerstvých rybách je velmi nízký a jejich výskyt je spojený s kažením ryb. Z tohoto důvodu slouží BA jako indikátory kvality ryb a výrobků z ryb. Ve zkaženém rybím masě bývají detekovány zejména putrescin, kadaverin, histamin, spermidin a spermin [20].

Množství BA v rybách závisí na počtu a druhu přítomných mikroorganismů, druhu a kvalitě syrových ryb a na podmínkách zpracování a skladování [24]. Při skladování ryb při teplotách kolem 0 °C a nižších jsou BA produkovány v téměř zanedbatelném množství. Při vyšších skladovacích teplotách je přítomnou mikroflórou dekarboxylován hlavně histidin a tkáň zejména makrelovitých ryb (např. tuňák a makrela) mohou obsahovat až 3000 mg/kg (makrela) nebo dokonce 8000 mg/kg histaminu (tuňák). Také ostatní BA jako je tyramin, kadaverin, putrescin a další vznikají v relativně vysokém množství [15].

Na hodnocení kvality rybího masa byl zaveden tzv. index kvality, který je definovaný jako [25]:

$$\text{index kvality (BAI)} = \frac{(\text{mg/kg histamin} + \text{mg/kg putrescín} + \text{mg/kg kadaverín})}{(1 + \text{mg/kg spermín} + \text{mg/kg spermidín})}$$

Obr. 3 – Vzorec výpočtu indexu kvality rybího masa [20]

Při hodnotě BAI < 1 je kvalita považována za výbornou, při BAI > 10 za velmi špatnou [25].

1.1.3.2 *Maso a masné výrobky*

Maso a nefermentované masné výrobky zpravidla nepředstavují z hlediska obsahu BA zdravotní rizika. Nejrozšířenější BA vyskytující se v maso a masných výrobcích jsou tyramin, kadaverin, putrescin a také histamin. Ve významném množství se v čerstvém maso vyskytují spermidin a spermin [26].

Při skladování masa se zvyšuje vlivem enzymové aktivity přítomné mikroflóry obsah BA a množství některých z nich mohou indikovat čerstvost masa [15]. Zatímco obsah tyraminu, putrescinu a kadaverinu se obvykle zvyšuje během skladování masa, obsah spermidinu a sperminu se snižuje nebo se nemění. Také teplota skladování má vliv na obsah BA v maso. Vepřové maso skladované při teplotě 30 °C a vyšší obsahuje zpravidla větší množství BA než vepřové maso skladované při teplotě 4 °C [19]. Hladina putrescinu se nejčastěji zvyšuje s průběhem kažení masa, obsah kadaverinu se výrazně zvyšuje v posledních fázích kažení [11]. Čerstvé vepřové maso obsahuje zhruba do 7 mg/kg kadaverinu a putrescinu, zatímco zkažené maso 60 mg/kg a více [15].

Fermentované salámy jsou výrobky, které vytvářejí vhodné podmínky pro tvorbu biogenních aminů. Na začátku fermentace se vyskytují zejména kadaverin a histamin, ke konci je to putrescin a tyramin. Kromě těchto BA se může v konečném výrobku vyskytovat tryptamin, 2-fenyletylamin, spermin a spermidin [20].

1.1.3.3 *Sýry*

Vedle ryb jsou sýry nejčastěji uváděnou potravinou spojovanou s intoxikací BA. Na rozdíl od jiných potravin sýry tvoří biologicky a biochemicky dynamický systém, který se neustále mění [27]. Proto sýry představují ideální prostředí pro tvorbu BA a mohou tedy obsahovat i významná množství biogenních aminů [28]. BA se vytvářejí v průběhu zrání sýrů a pak i v období skladování [11]. Množství BA se liší nejen mezi různé druhy sýrů, ale také v rámci stejného typu [27].

Nejdůležitější biogenní aminy vyskytující se v sýrech jsou tyramin, histamin, putrescin, kadaverin, tryptamin a 2-fenyletylamin [19]. Bylo zjištěno, že dominantní BA v sýru Beyaz (turecký sýr vyrobený z nepasterovaného ovčího mléka) jsou putrescin, kadaverin a tyramin. V sýrech Feta a Domiati byl jako dominantní zjištěn tyramin. V tureckých sýrech Milalic, Otlu a Örgü bylo zjištěno vyšší množství 2-fenyletylaminu, kadaverinu, tyraminu a spermidinu [29].

Mikrobiologická kvalita mléka je jedním z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují tvorbu BA v sýrech [11]. V provozech s nedostatečnou hygienickou úrovní dochází při zrání sýrů k výrazné tvorbě BA vlivem kontaminující mikroflóry [15]. Dále je tvorba BA a aminokyselin přímo ovlivněna dekarboxylázovou aktivitou, pH a koncentrací solí. Nepřímo je pak ovlivněna vodní aktivitou, teplotou skladování a dobou skladování [29].

1.1.3.4 Potraviny rostlinného původu

Biogenní aminy se jako přirozená součást vyskytují také v potravinách rostlinného původu [15]. Ve šťávách, džusech a v limonádách z pomerančů, malin, citrónů, grapefrutů, mandarinek, jahod a hroznů byly zjištěny BA v různých koncentracích. Tyto ovocné džusy obsahovaly především putrescin. Jahodový džus obsahoval vysokou koncentraci tyraminu (66,66 mg/l) [19].

Vysoké koncentrace BA byly také detekovány v pomerančovém džusu (noradrenalin, tryptamin), rajčatech (tyramin, tryptamin, histamin), banánech (tyramin, noradrenalin, tryptamin, serotonin), švestkách (tyramin, noradrenalin) a špenátu (histamin). Přirozenou složkou kakaových bobů je 2-fenyletylamin a proto se také vyskytuje v čokoládě, výrobcích a cukrovinkách z čokolády [9].

1.1.3.5 Fermentované nápoje

Pivo se běžně řadí mezi potraviny a nápoje, které mohou u některých konzumentů způsobovat zdravotní problémy, a to z důvodu přítomnosti biogenních aminů. U některých pacientů, kteří užívají léky inhibující detoxikační enzym monoaminoxidázu, může dojít k náhlému zvýšení krevního tlaku. Je známo, že k uvedenému nežádoucímu účinku došlo po konzumaci běžného i nealkoholického piva a účinky byly způsobeny tyraminem [30].

Tvorbou biogenních aminů v lahvovém pivu se zabývali výzkumníci na Jihočeské univerzitě v Českých Budějovicích ve spolupráci s Budějovickým Budvarem, přičemž zjistili, že značné množství tyraminu a histaminu se tvoří v lahvovém pivu působením mléčných bakterií, především kontaminujících laktobacilů, schopných přežít nedostatečnou pasteraci. K tvorbě aminů však dochází i v plechovkách a sudech. Zvýšené množství aminů lze očekávat u piva kontaminovaného mléčnými bakteriemi během výroby, při nedostatečné eliminaci bakterií při filtraci a jejich nedostatečné inaktivaci při pasteraci. Koncentrace aminů lze tak využít jako indikátor mikrobiálního stavu při výrobě piva. Vysoký obsah aminů se může vyskytnout u některých piv, při jejichž výrobě byla použita pšenice, neboť

mléčné bakterie jsou součástí fermentační mikroflóry. Zdroje bakterií produkujících biogenní aminy mohou být i kontaminované kvasinky používané při výrobě piva [30].

Obsah BA ve víně značně kolísá a je závislý na použitých surovinách a způsobu zpracování [20]. BA mohou být přítomny již v moštu, pouze putrescin i v hroznech (což je často spojeno s deficitem draslíku). Určitý vliv na obsah má i stupeň vyzrálosti hroznů. Ve vínech ale vznikají převážně v průběhu fermentace (hlavně putrescin) a u červených vín ještě i během malolaktické fermentace a to činností mikroorganismů mléčného kvašení (především spontánní mikroflóry). Jejich obsah významně ovlivňuje také způsob vinifikace hroznů, hygiena rmutu i samotného vína, v menší míře pak odrůda, poloha nebo klima. Vznikají také během zrání vína. Významnými faktory ovlivňující produkci BA ve vínech jsou také pH a obsah SO_2 [31]. V největším množství se ve víně vyskytuje histamin, tyramin, putrescin a kadaverin [20].

1.1.4 Toxický účinek biogenních aminů

Příjem potravin obsahujících vysoké koncentrace BA může u citlivých osob vyvolat alimentární intoxikaci. Mezi toxikologicky nejvýznamnější biogenní aminy patří tyramin a histamin. Otrava histaminem je často spojovaná s konzumací makrelovitých ryb (sardinky, tuňák, makrely) a sýrů (Gouda, Čedar) [19]. Je to celosvětový problém, který je hlášen v řadě zemí. Toxický účinek histaminu se projeví tehdy, když dojde k interakci histaminu s receptory (H_1 , H_2 a H_3) buněčných membrán nacházejících se v kardiovaskulárním systému a sekrečních žlázách. Histamin způsobuje dilataci krevních kapilár a cév, což vede k hypotenzi a způsobuje bolesti hlavy. Kontrakce hladkého svalstva střeva zprostředkované H_1 receptory vyvolává průjem, křeče a zvracení. Vylučování žaludečních šťáv je regulované histaminem prostřednictvím H_2 receptorů umístěných na stěnách buněk [32].

Tyramin zvyšuje krevní tlak, způsobuje u rizikových konzumentů migrenózní bolesti hlavy, popř. krvácení do mozku a selhání srdce [33]. Polyaminy (putrescin, spermidin, spermin, kadaverin, agmatin) mohou reagovat s dusitany a vytvářet karcinogenní nitrosaminy [23].

Toxické dávky BA je obtížné stanovit. Velmi záleží na individuálních rozdílech mezi lidmi, zastoupení jednotlivých BA v potravine, množství konzumované potraviny a přítomnosti jiných potencujících složek, jakými jsou například alkohol nebo léky [34].

1.1.5 Detoxikace biogenních aminů

Normální příjem BA je metabolizován ve střevním traktu velmi výkonným detoxikačním systémem založeným na aktivitě enzymů monoaminoxidázy (MAO), diaminoxidázy (DAO) a histidinmetyltransferázy (HMT). Při nadměrném příjmu BA potravou však detoxikační kapacita tohoto systému nemusí stačit [34].

U jedinců s chorobami trávicího traktu (gastritida, žaludeční vředy) je aktivita aminooxidáz nižší než u zdravých jedinců. U nemocných lidí, kteří užívají léky s inhibičními účinky na MAO a DAO jako jsou antihistaminika, léky na tuberkulózu a antidepresiva, je změněný metabolismus BA. To vede k jejich hromadění v těle a může vést k vážným zdravotním poruchám [20].

2 MIKROORGANIZMY S VÝZNAMNOU DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITOU

Řada bakteriálních druhů včetně bakterií mléčného kvašení jsou schopny dekarboxylace jedné či více aminokyselin. Jedná se zejména o rody *Bacillus*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Photobacterium*, a bakterie mléčného kvašení, např. *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus* [9]. Přehled některých zástupců bakteriálních rodů produkujících BA udává Tabulka 1. Produkce biogenních aminů je vlastnost specifická spíše pro určité kmeny bakterií než vlastnost typická pro daný druh, takže různé kmeny téhož druhu se mohou lišit v produkci biogenních aminů [1].

Tab. I – Významné mikroorganismy produkující BA [15]

Potravina	Mikroorganismy	Produkované aminy
ryby	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i>	histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, agmatin, spermin, spermidin
sýry	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Bacillus macerans</i> , <i>Propionibacterium sp.</i>	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin
maso a masné výrobky	<i>Pediococcus sp.</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Streptococcus sp.</i> , <i>Micrococcus sp.</i> , čeled' <i>Enterobacteriaceae</i>	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, fenyletylamin, tryptamin
fermentovaná zelenina	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus sp.</i>	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, fenyletylamin, tryptamin
fermentované produkty ze sóji	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Trichosporon beigllii</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin

2.1 Čeleď *Enterobacteriaceae*

Bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* jsou obecně považovány za mikroorganismy s vysokou dekarboxylázovou aktivitou, především ve vztahu k tvorbě histaminu, kadaverinu a putrescinu [32]. Tato čeleď zahrnuje gramnegativní nesporulující fakultativně anaerobní tyčinkovité bakterie rodů *Enterobacter*, *Escherichia*, *Schigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Serratia*, *Proteus*, *Hafnia*, *Yersinia*, *Morganella*, *Tatumella*, *Edwardsiella*, *Kluyvera* a další. Většina těchto rodů roste na základních kultivačních půdách bez růstových faktorů za přístupu vzduchu, mají respiratorní a fermentativní metabolismus. Fermentují sacharidy na kyseliny často i s tvorbou plynu [35].

Nejvýznamnějšími producenty histaminu jsou *Morganella (Proteus) morganii*, *Klebsiella pneumoniae* a některé kmeny druhu *Hafnia alvei*. Tyto mikroorganismy izolované z ryb produkují významné množství histaminu a mohou způsobovat otravu histaminem. V rybím mase je histamin dále produkován bakteriemi *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea sp.*, *Pantoea agglomerans* a *Morganella psychrotolerans* [19], [32].

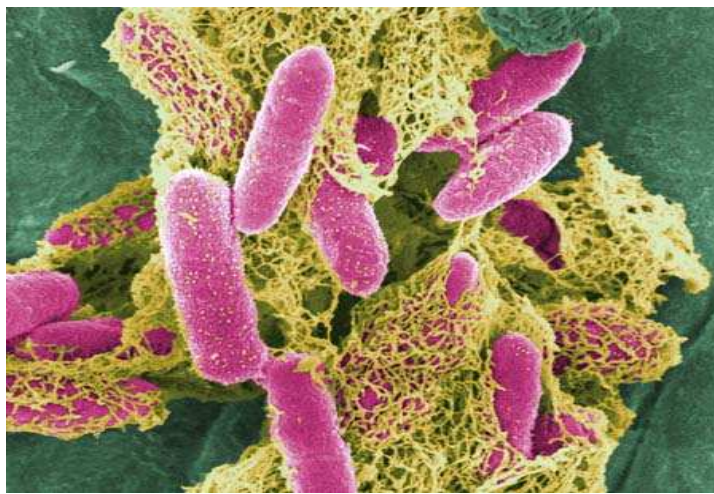
V mléce a sýrech byla identifikována řada zástupců *Enterobacteriaceae*, jako je *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia spp.*, *Citrobacter freundii* nebo *Proteus* schopných produkovat kadaverin a putrescin ve vysoké míře [11], [32].

2.1.1 Přehled a základní charakteristika bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* podílejících se na tvorbě biogenních aminů

Rod *Escherichia*

Příslušníci rodu zkvašují *Escherichia* laktózu za tvorby kyseliny mléčné, kyseliny octové a plynů CO₂ a H₂. Typovým druhem je *Escherichia coli*, nejprozkoumanější organismus na zeměkouli (obr. 4). Tato bakterie žije jako komenzál tlustého střeva člověka a teplokrevných živočichů [35].

V potravinářství a vodárenství je *Escherichia coli* využívána jako indikátorový mikroorganismus sanitace a zachování a dodržování hygienických podmínek. Vysoký obsah v potravinách a surovinách způsobuje kažení, při výrobě sýrů způsobuje tzv. časné duření sýrů. *Escherichia coli* je fakultativní patogen, zejména u oslabených jedinců [36].



Obr. 4 – *Escherichia coli* [37]

Rod *Enterobacter*

Tento rod představují gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky. Jejich optimální teplota růstu je 30 až 37 °C. Vyskytuje se ve střevním traktu, rostlinách, sekundárně i v mléce. Účastní se kažení potravin, patří do skupiny koliformních mikroorganismů, zkvašuje sacharidy za vzniku CO₂ a H₂. Nejvýznamnější jsou druhy *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea agglomerans* (dříve *Enterobacter agglomerans*) [36].

Rod *Citrobacter*

Rod *Citrobacter* představuje gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky vyskytující se jednotlivě nebo v párech. Optimální teplota růstu je 37 °C. Vyskytuje se v trávicím traktu člověka i zvířat. Významným druhem vyskytujícím se v potravinách je *Citrobacter freundii* [36].

Rod *Klebsiella*

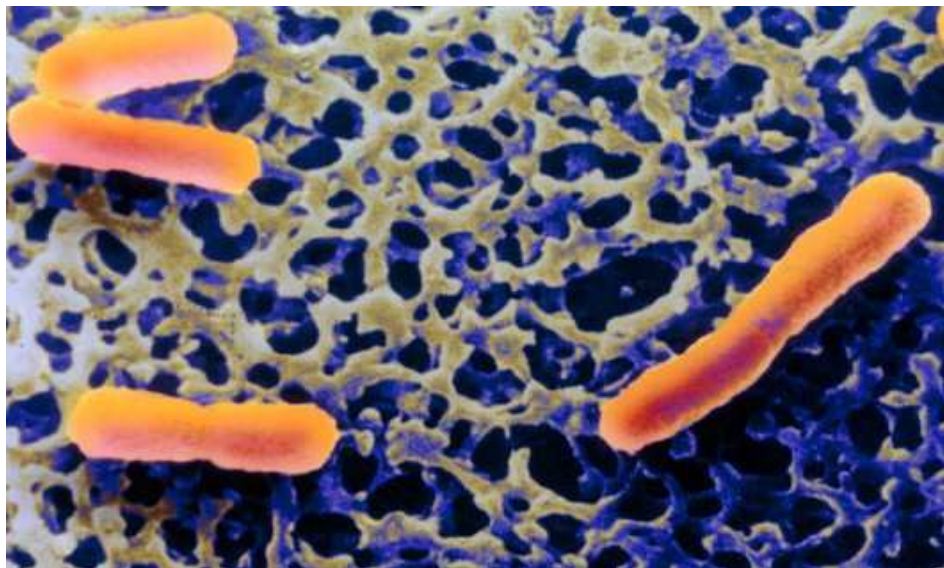
Tento rod představují gramnegativní tyčinky vyskytující se jednotlivě nebo v řetězcích. Optimální teplota růstu je 37 °C. Vyskytuje se v trávicím traktu člověka i zvířat. Nejvýznamnější druhy jsou *Klebsiella pneumoniae* a *Klebsiella oxytoca* [36].

Rod *Proteus*

Jde o gramnegativní pohyblivé tyčinky. Optimum růstu má při 37 °C, v potravinách roste i při pokojové teplotě. Ne polotuhých médiích se vyznačuje plazivým růstem. Nachází se v půdě, vodě a v trávicím traktu. Způsobuje kažení bílkovinných potravin (hnití). Způsobuje infekce močových cest a vyskytuje se zejména v nemocničním prostředí. Mezi nejvýznamnější druhy patří *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Proteus myxofaciens* [36].

Rod *Shigella*

Jedná se o gramnegativní tyčinky, jejichž optimum růstu je 37 °C. V potravinách roste i při pokojové teplotě. Nachází se ve výkalech nemocných lidí a bacilonosičů, ve vodě a potravinách. Jsou patogenní pouze pro lidi. Nejvýznamnější druhy jsou *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* (obr. 5) a *Shigella boydii* [36].



Obr. 5 – *Shigella flexneri* [38]

2.2 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou častými producenty biogenních aminů. Schopnost dekarboxylace tyrozinu byla pozorována u mnohých zástupců rodů *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, dekarboxylace tryptofanu u *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*. Produkce putrescinu byla zjištěna u rodu *Lactobacillus* a produkce histaminu u *Lactobacillus*, *Oenococcus* a *Pediococcus* [1].

Bakterie mléčného kvašení tvoří velkou skupinu nepohyblivých nesporelujících katalázanegativních mikroaerofilních až fakultativně aerobních grampozitivních koků a tyčinek. Název této skupiny bakterií je odvozen od jejich schopnosti fermentovat sacharidy na kyselinu mléčnou (homofermentace) jako hlavní výsledný produkt [35].

Taxonomie BMK je provázena velkými změnami. Jedná se o velmi heterogenní skupinu, do které patří rody *Abiotrophia*, *Aerococcus*, *Agitococcus*, *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Alloicoccus*, *Atopobacter*, *Atopococcus*, *Atopostipes*, *Carnobacterium*, *Desemzia*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Eremococcus*, *Globicatella*, *Granulicatella*, *Ignavigranum*, *Isobaculum*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Lactovum*, *Leuconostoc*, *Marinilactibacillus*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Trichococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* [39].

BMK tvoří součást bakteriálního osídlení respiračního systému a dominantní část mikroflóry trávicího a urogenitálního traktu člověka i zvířat. Jsou rovněž významnou složkou mikroflóry potravin (mléčné výrobky, fermentované maso a zelenina, těsto, nápoje). Výběrem vhodných tzv. startovacích kultur (*Pediococcus*, *Lactobacillus*) při výrobě fermentovaných produktů lze zajistit jejich požadované příznivé organoleptické vlastnosti (chuť, vůni apod.). BMK vykazují silný inhibiční efekt proti růstu a produkci toxinů ostatních přítomných bakterií. Těchto vlastností se využívá ke zvýšení trvanlivosti a zdravotní nezávadnosti potravin [40].

2.2.1 Rod *Lactobacillus*

Laktobacily jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní nepohyblivé tyčinky (obr. 6). Hlavním metabolitem fermentace sacharidů je kyselina mléčná, ale také kyselina octová, etanol a CO₂ [36].

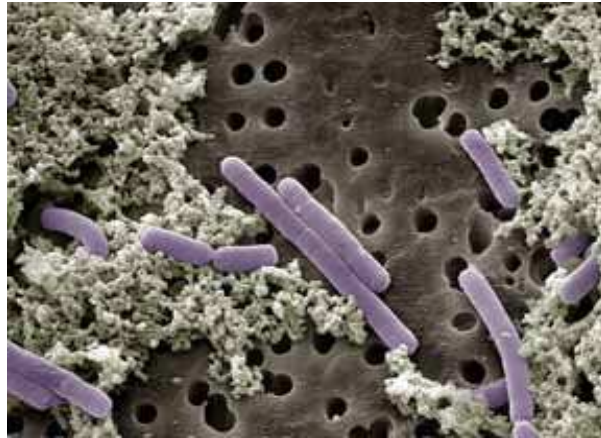
Rod *Lactobacillus* je v přírodě velmi rozšířen. Jeho druhy se vyskytují v mléce, kde vyvolávají přirozené kysání. Dále se vyskytují v ústech a trávicím traktu savců, na travinách, obilí i jiných rostlinách a v půdě [36].

Laktobacily mají významnou úlohu v mlékárenském a konzervářském průmyslu. Spolu se streptokoky, pediokoky, mikrokoky a specifickými stafylokoky jsou součástí startérých kultur ve fermentovaných masných výrobcích. Některé druhy způsobují nežádoucí kontaminaci vína, piva a uzenin [36], [41].

Laktobacily se dělí na obligátně homofermentativní, fakultativně heterofermentativní a obligátně heterofermentativní. Obligátně homofermentativní laktobacily fermentují glukózu na kyselinu mléčnou. Optimum růstu je při 30 – 45 °C. Používají se jako čisté zákysové kultury (jogurty, acidofilní mléko, tvaroh, sýr). Jedná se o *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *L. delbrueckii* subsp. *lactis* [36].

Fakultativně heterofermentativní laktobacily fermentují hexózy většinou na kyselinu mléčnou. Jejich optimum růstu je při 28 – 32 °C. Uplatňují se v mlékárenském a konzervářském průmyslu. Do této skupiny patří *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *L. casei* subsp. *pseudopantarum*, *L. alimentarium*, *L. sake* a další [36].

Obligátně heterofermentativní laktobacily fermentují hexózy na kyselinu mléčnou, octovou, etanol a CO₂. Jejich optimum růstu je při 28 – 32 °C. Způsobují kažení potravin. Jedná se o *Lactobacillus buchneri*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. candleri*, *L. kefir* a další [36].



Obr. 6 – *Lactobacillus casei* [42]

2.2.2 Rod *Lactococcus*

Tento rod představují grampozitivní fakultativně anaerobní koky sdružující se v párech nebo v kratších řetězcích. Jejich optimální růstová teplota je 30 °C. Fermentují glukózu, laktózu a maltózu na kyselinu mléčnou. Vyskytují se v rostlinných materiálech a ve fermentovaných mléčných produktech. Tvoří součást čistých mlékárenských kultur na výrobu zakysaných mlék, zakysaných smetan a všech druhů sýrů. Mezi nejvýznamnější zástupce lze zařadit *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* [36].

2.2.3 Rod *Leuconostoc*

Rod *Leuconostoc* představují grampozitivní fakultativně anaerobní koky. Zkvašuje sacharidy na kyselinu mléčnou, etanol a CO₂. Tvoří kulovité až čočkovité buňky spojené po dvou nebo do řetězků. Některé druhy vytvářejí značné množství slizu polysacharidové (dextranové) povahy. Sliz tvoří především *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, jehož přítomnost může působit potíže v droždářství (aglutinace droždí) i ve slazených minerálních vodách (rosolovatění). *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* se naopak používá pro průmyslovou výrobu dextranů pro lékařské účely. *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* se uplatňuje jako součást máselařské kultury, neboť dodává máslu příjemné aroma [41].

2.2.4 Rod *Enterococcus*

Tento rod představují grampozitivní aerotolerantní koky. Jsou odolné vůči vyšším koncentracím solí v potravinách a přežívají při nižších pasteračních a termizačních teplotách. Původní stanoviště tohoto rodu je gastrointestinální trakt člověka a živočichů. Sekundárně se vyskytuje v mléce, mléčných produktech a potravinách s vyšším obsahem solí. Je stálou součástí mikroflóry sýrů (mikroflóra pocházející z mléka), syrových fermentovaných klobás, šunky a rostlinných potravin. Je indikátorem fekálního znečištění pitných vod a sanitace mlékárenských provozů. Nejvýznamnější druhy jsou *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E.s avium*, *E.s gallinarum* a *E. durans* [36].

2.3 Ostatní mikroorganismy produkující biogenní aminy

Mezi další mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou můžeme zařadit rody *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* a *Pseudomonas*. Některé druhy rodu *Micrococcus* a *Staphylococcus* izolované z ryb jsou schopny produkovat histamin, putrescin a kadaverin. *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus capitis* jsou silnými producenty histaminu v solených ančovičkách. Dále v rybím mase produkují histamin některé druhy rodu *Bacillus* např. *Bacillus coagulans*, *Bacillus megaterium* a *Bacillus pumilus*. *Bacillus megaterium* může také produkovat putrescin a kadaverin a *Bacillus coagulans* spermidin [32].

Z fermentovaných rostlinných produktů byla izolována řada bakterií schopných produkovat biogenní aminy. V tradiční japonské pastě Miso (fermentovaná vyzrálá pasta ze sójových bobů, rýže, pšeničné nebo ječné mouky) produkovaly histamin *Staphylococcus pasteurii*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus megaterium*. V jiném japonském produktu ze sóji byl histamin produkován izoláty *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus pasteurii* a *Staphylococcus capitis* [11].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍLE PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo studium tvorby biogenních aminů bakteriemi izolovanými z masných výrobků, produktů studené kuchyně a pitné vody.

Pro dosažení cílů bylo třeba:

- vypracovat rešerši týkající se problematiky biogenních aminů, bakterií s významnou dekarboxylázovou aktivitou,
- stručně popsat význam a zastoupení bakterií s dekarboxylázovou aktivitou v potravinách.

Pro vypracování praktické části bakalářské práce bylo nutné naplnit tyto dílčí cíle:

- záchyt a morfologická charakterizace vybraných skupin bakterií v masných výrobcích a výrobcích studené kuchyně,
- otestovat bakterie na dekarboxylázovou aktivitu,
- na základě získaných výsledků zformulovat závěr.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Kultivační média

Masopeptonový bujón (MPB)

Masový výtazek (HiMedia, Bombai, Indie)	3,0 g
Pepton (HiMedia)	5,0 g
NaCl (LachNer, Neratovice, ČR)	3,0 g
Destilovaná voda	1000 ml

Příprava půdy: Jednotlivé složky byly naváženy a rozpuštěny v 1000 ml destilované vody. Poté bylo pH upraveno na 6,8 – 7. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C za 15 minut.

Plate Count Agar (PCA; HiMedia)

Enzymatický hydrolyzát kaseinu	5,0 g
Kvasniční extrakt	2,5 g
G-glukosa	1,0 g
Agar	15,0 g
Destilovaná voda	1000 ml

Příprava půdy: Jednotlivé složky byly naváženy a rozpuštěny v 1000 ml destilované vody. Poté bylo pH upraveno na 7. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C za 15 minut. Takto připravená půda byla rozlita na Petriho misky.

4.2 Odběr vzorků

Bakterie zkoumané na produkci biogenních aminů byly izolovány ze salámů Vysočina, Herkules a Poličan; z lahůdek Pařížský salát a Parmská pomazánka, které byly zakoupeny v obchodní síti České republiky. Část bakterií byla izolována z pitné vody odebrané ze studny v Holešově (využívané k individuálnímu zásobování vodou v domácnosti). Z masných výrobků, lahůdek a vody bylo získáno celkem 69 izolátů bakterií.

Odběr vzorků byl proveden vždy sterilními odběrovými lžícemi do sterilních sáčků. Obsah sáčku byl homogenizován s fyziologickým roztokem v poměru 1:9 ve stomacheru po dobu pěti minut. Následně bylo podle potřeby provedeno desítkové ředění. Z příslušného ředění bylo 0,1 ml inokula naočkováno roztěrem na PCA.

Z kolonií vyrostlých na Petriho miskách byly vybrány bakterie s rozdílnými makroskopickými morfologickými znaky a bylo jim přiřazeno pořadové číslo. Poté byly jednotlivé kmeny izolovány křížovým roztěrem na půdě PCA. Zaočkované Petriho misky byly kultivovány při 30 °C po dobu 24 hodin.

4.3 Charakterizace izolovaných bakterií

4.3.1 Morfologie kolonií

Makroskopické morfologické znaky

Makroskopické morfologické znaky jsou patrné okem a ukazují na způsob růstu mikroorganismů na tuhých kultivačních půdách. U izolovaných bakteriálních kolonií byly zjišťovány na půdě PCA následující znaky [43]:

- velikost kolonií,
- povrch kolonií,
- profil kolonií,
- okraj kolonií,
- barva kolonií.

4.3.2 Gramovo barvení

Princip barvení podle Grama

Gramovo barvení je jednou s nejdůležitějších barvicích diagnostických metod využívaných při základním určování rodů a druhů bakterií. Jedná se o barvení fixovaného preparátu a následné moření buněk roztokem jódu. Vzniká komplex barvivo – jód – složky buněčné stěny, který lze z buněk některých rodů a druhů mikroorganismů vyplavit etanolem nebo acetonem. Příslušné druhy jsou označovány jako gramnegativní (G^-), jejich buněčné stěny jsou pro mikroskopická pozorování dobarvovány karbolfuchsinem nebo safraninem. Pokud barevný komplex zůstává v buněčných stěnách zachycen, označujeme organizmy jako grampozitivní (G^+).

Gramovo barvení bylo provedeno u preparátů fixovaných teplem podle postupu Koutoučkové a Jandové [43].

4.3.3 Důkaz produkce katalázy

Některé bakterie mají schopnost produkovat enzym katalázu, který rozkládá peroxid vodíku na vodu a molekulární kyslík. Anaerobní bakterie většinou tento enzym netvoří. Na podložní sklo byl kápnut 3% peroxid vodíku a do něho se pomocí kličky rozetře část bakteriální kolonie z Petriho misky. Pozitivní reakce se projevila uvolňováním bublinek kyslíku bezprostředně po přidání kultury [43].

4.3.4 Oxidázový test

Cytochromoxidáza je enzym, který se podílí na oxidativních procesech v buňce. Je přítomen u všech aerobních bakterií s respiračním metabolismem. Podstatou testu je reakce derivátů p-fenylendiaminu se železem obsaženým v cytochromových respiračních komplexech. Přítomnost cytochromoxidázy je detekována barevnými reakcemi pomocí příslušných činidel. Testovaná kultura byla nanesena sterilní kličkou na proužek papíru, který byl nasycen činidlem. Je-li test pozitivní, vznikne během 10ti sekund tmavě fialové zbarvení (Wursterová modř [43]).

4.4 Stanovení dekarboxylázové aktivity bakterií kultivační metodou

V případě zjišťování dekarboxylázové aktivity testovaných kmenů bylo použito dekarboxylační médium, které obsahovalo příslušné aminokyseliny (arginin, ornitin, lyzin, tryptofan, histidin, tyrozin) v koncentraci 1,0 % (w/v) a pH indikátor (bromkresolovou červeně). Kmeny byly kultivovány 30 ± 1 °C po dobu 24 hodin.

4.4.1 Příprava dekarboxylačního média

Aminokyseliny arginin, histidin, lyzin, ornitin, tyrozin a tryptofan byly získány ze Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Veškeré další chemikálie pro přípravu dekarboxylačního média byly získány rovněž ze Sigma Aldrich.

Složení dekarboxylačního média

Pepton	0,5 g
Yeast extrakt	0,3 g
Bromkresolpurpur 0,2% v 50% alkoholu	1 ml
Příslušná L-aminokyselina	0,75 g
Destilovaná voda	150 ml
pH	5 – 5,3

Příprava média: Bylo naváženo příslušné množství jednotlivých složek půdy a vše bylo rozpuštěno ve 150 ml destilované vody. pH roztoku bylo upraveno na 5 – 5,3; pH indikátor bromkresolpurpur byl přidán až nakonec. Následně bylo 5,0 ml média autoklávováno v uzavřených zkumavkách (121 °C 15 min).

4.4.2 Zjišťování produkce biogenních aminů v dekarboxylačním médiu

Produkce biogenních aminů byla sledována v mikrotitračních destičkách. Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150 µl dekarboxylačního média obohaceného o příslušnou aminokyselinu a 5 µl 24 hodinové suspenze daného mikroorganismu. Poté byly všechny jamky zakápnuty 1 kapkou parafínového oleje pro vytvoření anaerobního prostředí. Destičky byly vloženy do sáčku a kultivovány při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin. Pozitivní reakce se projevovala změnou barvy média z oranžovohnědé na fialovou.

4.5 Stanovení biogenních aminů iontově-výměnnou chromatografií

Produkce 8 biogenních aminů (histaminu, fenyletylaminu, tyraminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu) byla zjišťována pomocí iontově-výměnné chromatografie (Automatický analyzátor aminokyselin AAA400, Ingos Praha, Česká republika). Stanovená byla provedeny podle prací Hlobilové [44] a Buňkové et al (2010) [1].

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Z vybraných masných výrobků (salám Vysočina, Herkules a Poličan), produktů studené kuchyně (Pařížský salát a Parmská pomazánka) a z vody ze studny bylo izolováno celkem 69 kmenů bakterií. Z toho 4 izoláty pocházely ze salámu Vysočina, 7 ze salámu Herkules, 10 ze salámu Poličan, 15 z Pařížského salátu, 9 z Parmské pomazánky a 24 z vody. Tyto izoláty byly blíže charakterizovány metodami dostupnými v laboratoři mikrobiologie Ústavu technologie a mikrobiologie potravin a následně byly a testovány na produkci biogenních aminů pomocí kultivační metody a iontově-výměnné chromatografie.

5.1 Charakterizace izolovaných bakterií

Makroskopické morfologické znaky

Z výsledků uvedených v Příloze I, vyplývá, že izoláty pocházející ze salámů Vysočina, Herkules a Poličan tvořily kolonie velikosti 1 – 8 mm s převážně lesklým hladkým povrchem, většinou s plochým profilem, převážně s hladkými nebo zvlněnými okraji a bílé, mléčně nažloutlé, mléčně žluté nebo mléčně bílé barvy.

Bakterie izolované z Pařížského salátu tvořily kolonie velikosti 2 – 4 mm s převážně lesklým povrchem, s plochým nebo vypouklým profilem, většinou s hladkým nebo vroubkovaným okrajem a převážně bílé nebo mléčně bílé, popřípadě nažloutlé barvy. Oproti tomu kolonie bakterií izolovaných z Parmské pomazánky byly drobnější (1 – 2 mm) s převážně matným povrchem a hladkým okrajem, s profilem plochým nebo vypouklým a převážně s mléčně bílým zbarvením.

Bakterie izolované z vody tvořily kolonie velikosti 1 – 5 mm s lesklým nebo matným povrchem, převážně s plochým profilem, většinou s hladkým nebo zvlněným okrajem a žluté, fialové, mléčně žluté, mléčně bílé barvy.

Výsledky Gramova barvení a vybraných biochemických testů

Výsledky Gramova barvení jsou uvedeny v Příloze II. Z celkem 21 izolátů získaných z výše uvedených salámů bylo:

- 18 gram pozitivních katalázapozitivních a oxidázanegativních koků,
- 1 gram pozitivní katalázanegativní oxidázanegativní kokotyčinka,
- 1 gram pozitivní katalázapozitivní oxidázanegativní kokotyčinka,
- 1 gram negativní katalázapozitivní oxidázapozitivní kokotyčinka tvořící řetízky.

Z výše uvedených lahůdek bylo izolováno 12 gram pozitivních koků, 4 gram pozitivní kokotyčinky, 2 gram negativní koky, 5 gram negativních kokotyčinek a 1 gram negativní tyčinka. Schopnost produkce katalázy byla zjištěna u 20 izolátů a schopnost produkce oxidázy u 4 izolátů.

Z pitné vody bylo izolováno 11 gram negativních tyčinek, 8 gram negativních kokotyčinek, 2 gram pozitivní tyčinky, 2 gram pozitivní kokotyčinky a 1 gram pozitivní kok. 20 izolátů bylo schopno produkovat katalázu a 8 bylo pozitivních na produkci oxidázy.

5.2 Detekce BA kultivační metodou

Schopnost dekarboxylace 6 aminokyselin (histidinu, argininu, ornitinu, lyzinu, tryptofanu a tyrozinu) byla u izolovaných bakterií zjišťována nejprve skriningovou kultivační metodou, a to po 48 hodinové kultivaci bakterií v dekarboxylačním médiu. Pozitivní reakce se projevila změnou zbarvení kultivačního média z hnědožlutého na fialové. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách II, III a IV.

Tab. II – Dekarboxylace aminokyselin bakteriemi izolovaných z vybraných masných výrobků

Č. izolátu	Vzorek	Dekarboxylace aminokyselin					
		HIS	ARG	ORN	LYS	TRP	TYR
1	salám Vysočina	-	+	-	-	-	-
2	salám Vysočina	-	+	+	+	-	+
3	salám Vysočina	-	+	+	-	-	+
4	salám Vysočina	-	+	-	-	-	-
5	salám Herkules	-	+	+	+	-	+
6	salám Herkules	-	+	+	+	-	+
7	salám Herkules	-	+	+	+	-	+
8	salám Herkules	-	+	+	+	-	+
9	salám Herkules	-	+	+	+	-	+
10	salám Herkules	-	+	+	+	-	+
11	salám Herkules	-	+	+	-	-	+
12	salám Poličan	-	+	+	+	-	-
13	salám Poličan	-	+	+	+	-	+
14	salám Poličan	-	+	+	+	-	+
15	salám Poličan	-	+	+	+	-	+
16	salám Poličan	-	+	+	+	-	+
17	salám Poličan	-	+	+	+	-	+
18	salám Poličan	-	+	-	-	-	-
19	salám Poličan	-	+	+	+	-	+
20	salám Poličan	-	+	+	+	-	+
21	salám Poličan	-	+	+	+	-	+

HIS – histidin, ARG – arginin, ORN – ornitin, LYS – lyzin, TRP – tryptofan, TYR – tyrozin

Změna zbarvení dekarboxylačního kultivačního média obsahujícího aminokyselinu arginin byla pozorována u všech bakterií izolovaných z výše uvedených salámů. Naopak schopnost dekarboxylace histidinu a tryptofanu nebyla pozorována u žádné z izolovaných bakterií. Schopnost dekarboxylace ornitinu, lyzinu a tyrozin byla zjištěna u více než poloviny testovaných bakterií.

Tab. III - Dekarboxylace aminokyselin bakteriemi izolovaných z vybraných lahůdek

Č. izo- látu	Vzorek	Dekarboxylace aminokyselin					
		HIS	ARG	ORN	LYS	TRP	TYR
22	Pařížský salát	-	-	-	-	-	-
23	Pařížský salát	-	-	-	-	-	-
24	Pařížský salát	-	-	-	-	-	-
25	Pařížský salát	-	-	-	-	-	-
26	Pařížský salát	-	-	-	-	-	-
27	Pařížský salát	-	-	+	-	-	-
28	Pařížský salát	-	-	-	-	-	-
29	Pařížský salát	-	-	-	-	-	-
30	Pařížský salát	-	-	-	-	-	-
31	Pařížský salát	-	-	-	-	-	-
32	Pařížský salát	-	-	+	-	-	-
33	Pařížský salát	-	-	+	-	-	-
34	Pařížský salát	-	-	+	-	-	-
35	Pařížský salát	-	-	-	-	-	-
36	Pařížský salát	-	-	-	-	-	-
37	Parmská pomazánka	-	-	-	-	-	-
38	Parmská pomazánka	-	-	-	-	-	-
39	Parmská pomazánka	-	-	-	-	-	-
40	Parmská pomazánka	-	-	-	-	-	-
41	Parmská pomazánka	-	-	-	-	-	-
42	Parmská pomazánka	-	-	-	-	-	-
43	Parmská pomazánka	-	-	-	-	-	-
44	Parmská pomazánka	-	-	-	-	-	-
45	Parmská pomazánka	-	-	-	-	-	-

HIS – histidin, ARG – arginin, ORN – ornitin, LYS – lyzin, TRP – tryptofan, TYR – tyrozin

Z výsledků uvedených v tabulce III vyplývá, že u žádné z testovaných bakterií nebyla kultivační metodou zjištěna dekarboxylace histidinu, argininu, lyzinu, tryptofanu a tyrozinu. Změna zbarvení dekarboxylačního kultivačního média obsahujícího aminokyselinu ornitin byla pozorována u 4 izolátů.

Schopnost dekarboxylace argininu byla pozorována u 9 bakterií izolovaných z pitné vody (tab. IV). Naopak schopnost dekarboxylace histidinu, lyzinu, tryptofanu a tyrozinu nebyla zjištěna u testovaných bakterií s výjimkou 1 izolátu (izolát 47) schopného dekarboxylace histidinu, argininu, ornitinu, lyzinu a tryptofanu. U 8 izolátů byla pozorována dekarboxylace ornitinu.

Tab. IV - Dekarboxylace aminokyselin bakteriemi izolovaných z pitné vody

Č. izolátu	Vzorek	Dekarboxylace aminokyselin					
		HIS	ARG	ORN	LYS	TRP	TYR
46	Pitná voda	-	+	+	-	-	-
47	Pitná voda	+	+	+	+	+	-
48	Pitná voda	-	+	-	-	-	-
49	Pitná voda	-	-	-	-	-	-
50	Pitná voda	-	+	-	-	-	-
51	Pitná voda	-	+	+	-	-	-
52	Pitná voda	-	-	-	-	-	-
53	Pitná voda	-	-	-	-	-	-
54	Pitná voda	-	-	-	-	-	-
55	Pitná voda	-	-	-	-	-	-
56	Pitná voda	-	-	+	-	-	-
57	Pitná voda	-	-	+	-	-	-
58	Pitná voda	-	-	+	-	-	-
59	Pitná voda	-	-	-	-	-	-
60	Pitná voda	-	-	-	-	-	-
61	Pitná voda	-	+	+	-	-	-
62	Pitná voda	-	-	-	-	-	-
63	Pitná voda	-	-	-	-	-	-
64	Pitná voda	-	-	-	-	-	-
65	Pitná voda	-	+	-	-	-	-
66	Pitná voda	-	-	-	-	-	-
67	Pitná voda	-	-	-	-	-	-
68	Pitná voda	-	+	-	-	-	-
69	Pitná voda	-	+	+	-	-	-

HIS – histidin, ARG – arginin, ORN – ornitin, LYS – lizin, TRP – tryptofan, TYR – tyrozin

Detekce biogenních aminů pomocí kultivační metody může být nepřesná, což je jednou z nevýhod této metody. Důvodem jsou falešně pozitivní výsledky způsobené tvorbou jiných alkalických produktů, které pravděpodobně způsobily změnu barvy pH indikátoru v dekarboxylačním médiu [1]. K falešně pozitivním reakcím doházelo především v dekarboxylačním médiu obsahující aminokyseliny arginin a tyrozin. Za další možnou nevýhodu této metody lze považovat neschopnost zachytit malé množství produkovaných biogenních aminů.

Využitím dekarboxylačních médií pro prvotní skríníng produkce biogenních aminů se zabývali i další autoři. Zaman et al [45] se zabývali produkcí 3 biogenních aminů (histaminu, putrescinu a kadaverinu) bakteriemi izolovaných z rybí omáčky. Schopnost produkce alespoň jednoho ze zmíněných biogenních aminů byla zjištěna u všech izolovaných bakterií.

5.3 Detekce BA pomocí iontově-výměnné chromatografie

Produkce 8 biogenních aminů (histaminu, tyraminu, putrescinu, kadaverinu, spermidinu, sperminu, fenyletylaminu a agmatinu) byla zjišťována pomocí metody iontově-výměnné chromatografie (IEC). Výsledky jsou shrnuty v tabulkách V, VI a VII. U žádné z testovaných bakterií nebyla metodou IEC zjištěna produkce histaminu, spermidinu, sperminu a agmatinu.

Tab. V – Detekce produkce BA bakteriemi izolovaných z vybraných masných výrobků metodou IEC

Č. izolátu	Vzorek	Analyzované biogenní aminy ^A							
		HIS ^A	TYR	PUT	CAD	SPM	SPD	PEA	AG
1	salám Vysočina	ND	3,2 ± 0,1	0,5 ± 0,0	ND	ND	ND	5,5 ± 0,3	ND
2	salám Vysočina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	salám Vysočina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	salám Vysočina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	salám Herkules	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	salám Herkules	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	salám Herkules	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,7 ± 0,1	ND
8	salám Herkules	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	salám Herkules	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	salám Herkules	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11	salám Herkules	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	salám Poličan	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	salám Poličan	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,9 ± 0,1	ND
14	salám Poličan	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15	salám Poličan	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	salám Poličan	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,3 ± 0,1	ND
17	salám Poličan	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	salám Poličan	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,7 ± 0,1	ND
19	salám Poličan	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	salám Poličan	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21	salám Poličan	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,2 ± 0,1	ND

^A – produkce vyjádřená v mg/l ± směrodatná odchylka

HIS – histamin, TYR – tyramin, PUT – putrescin, CAD – kadaverin, SPM – spermin, SPD – spermidin, PEA – fenyletylamin, AG – agmatin

ND – biogenní amin nebyl detekován

Bakterie izolované z výše uvedených salámů nejvíce produkovaly fenyletylamin. Nejvyšší množství fenyletylaminu ($5,5 \pm 0,3$ mg/l) bylo zjištěno u izolátu 1 vykultivovaného ze salámu Vysočina, nejmenší pak u izolátu 7 získaného ze salámu Herkules ($1,7 \pm 0,1$ mg/l). Bakterie izolované ze salámu Poličan produkovaly fenyletylamin v rozmezí 1,9 – 2,7 mg/l kultivačního média. Kmen 1 izolovaný ze salámu Vysočina produkoval mimo fenyletylamin také tyramin a putrescin. Detekované množství

těchto biogenních aminů bylo poměrně nízké ($3,2 \pm 0,1$ mg/l v případě tyraminu a $0,5 \pm 0,0$ mg/l putrescinu).

Tab. VI - Detekce produkce BA bakteriemi izolovaných z vybraných lahůdek metodou IEC

Č. izolátu	Vzorek	Analyzované biogenní aminy ^A							
		HIS ^A	TYR	PUT	CAD	SPM	SPD	PEA	AG
22	Pařížský salát	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
23	Pařížský salát	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24	Pařížský salát	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
25	Pařížský salát	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
26	Pařížský salát	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
27	Pařížský salát	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
28	Pařížský salát	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
29	Pařížský salát	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
30	Pařížský salát	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
31	Pařížský salát	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
32	Pařížský salát	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
33	Pařížský salát	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
34	Pařížský salát	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
35	Pařížský salát	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
36	Pařížský salát	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
37	Parmská pomazánka	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
38	Parmská pomazánka	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
39	Parmská pomazánka	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
40	Parmská pomazánka	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
41	Parmská pomazánka	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
42	Parmská pomazánka	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
43	Parmská pomazánka	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
44	Parmská pomazánka	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
45	Parmská pomazánka	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

HIS – histamin, TYR – tyramin, PUT – putrescin, CAD – kadaverin, SPM – spermin, SPD – spermidin, PEA – fenyletylamin, AG – agmatin
 ND – biogenní amin nebyl detekován

U bakterií, které byly izolovány z vybraných lahůdek nebyla metodou ionto-
 vě-výměnné chromatografie zjištěna produkce žádného z testovaných biogenních ami-
 nů (tab. VI).

V případě bakterií izolovaných z pitné vody byla zjištěna produkce putrescinu a ka-
 daverinu. Ostatní biogenní aminy nebyly v živném médiu po kultivaci bakterií detekovány.
 Schopnost produkce putrescinu byla zjištěna u 14 izolátů a schopnost produkce kadaverinu
 u 8 izolátů. Putrescin byl produkován v množství 2,9 – 44,8 mg./l a kadaverin v množství
 1,1 – 83,0 mg/l.

Tab. VII - Detekce produkce BA bakteriemi izolovaných z pitné vody metodou IEC

Č. izolátu	Vzorek	Analyzované biogenní aminy ^A							
		HIS ^A	TYR	PUT	CAD	SPM	SPD	PEA	AG
46	Pitná voda	ND	ND	6,4 ± 0,1	ND	ND	ND	ND	ND
47	Pitná voda	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
48	Pitná voda	ND	ND	4,3 ± 0,1	ND	ND	ND	ND	ND
49	Pitná voda	ND	ND	12,8 ± 0,3	ND	ND	ND	ND	ND
50	Pitná voda	ND	ND	11,1 ± 0,4	ND	ND	ND	ND	ND
51	Pitná voda	ND	ND	2,9 ± 0,1	ND	ND	ND	ND	ND
52	Pitná voda	ND	ND	11,8 ± 0,2	55,7 ± 1,8	ND	ND	ND	ND
53	Pitná voda	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
54	Pitná voda	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
55	Pitná voda	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
56	Pitná voda	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
57	Pitná voda	ND	ND	5,6 ± 0,0	1,1 ± 0,0	ND	ND	ND	ND
58	Pitná voda	ND	ND	11,3 ± 0,1	2,5 ± 0,1	ND	ND	ND	ND
59	Pitná voda	ND	ND	44,8 ± 2,1	83,0 ± 0,7	ND	ND	ND	ND
60	Pitná voda	ND	ND	8,9 ± 0,1	4,2 ± 0,2	ND	ND	ND	ND
61	Pitná voda	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
62	Pitná voda	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
63	Pitná voda	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
64	Pitná voda	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
65	Pitná voda	ND	ND	11,8 ± 0,4	ND	ND	ND	ND	ND
66	Pitná voda	ND	ND	5,2 ± 0,0	5,7 ± 0,1	ND	ND	ND	ND
67	Pitná voda	ND	ND	14,4 ± 0,1	1,9 ± 0,0	ND	ND	ND	ND
68	Pitná voda	ND	ND	12,0 ± 0,1	10,3 ± 0,2	ND	ND	ND	ND
69	Pitná voda	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^A – produkce vyjádřená v mg/l ± směrodatná odchylka

HIS – histamin, TYR – tyramin, PUT – putrescin, CAD – kadaverin, SPM – spermin, SPD – spermidin, PEA – fenyletylamin, AG – agmatin

ND – biogenní amin nebyl detekován

Detekcí biogenních aminů pomocí chromatografických metod se zabývali i další autoři. Bover-Cid et al [46] se zabývali dekarboxylázovou aktivitou bakterií izolovaných z fermentovaných párků z vepřového masa. Z 66 testovaných kmenů bakterií mléčného kvašení bylo schopných produkce tyraminu ve významném množství 21 izolátů rodu *Lactobacillus* a 16 izolátů rodu *Enterococcus*. Dále byla u těchto izolátů také zjištěna schopnost produkce fenyletylaminu, tryptaminu, kadaverinu a putrescinu. Produkce histaminu nebyla u testovaných bakterií mléčného kvašení detekována.

Studiem produkce biogenních aminů bakteriemi izolovaných z povrchu drůbeže se zabývali Buňková et al [21]. Z celkového počtu 98 testovaných izolátů byla zjištěna produkce alespoň 1 biogenního aminu u 49 izolátů. Žádný z testovaných kmenů neprodukoval histamin, spermin ani spermidin. Nejčastěji produkovaným biogenním aminem byl putrescin, jehož produkce byla zjištěna u celkem 35 testovaných kmenů gramnegativních bakterií

a 1 gram pozitivního izolátu v rozmezí 2,00 – 109,80 mg/l. Více jak třetina (37,5 %) všech testovaných kmenů produkovala kadaverin. Dále byla zjištěna produkce tyraminu a agmatinu.

Dekarboxylázovou aktivitou bakterií izolovaných z masa, fermentovaných salámů a sýrů se zabývali Pircher et al [47]. Z těchto potravin bylo izolováno celkem 149 bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, 162 bakterií rodu *Lactobacillus*, 89 bakterií rodu *Leuconostoc* a 137 bakterií rodu *Enterococcus*. U těchto izolátů byla zjišťována produkce histaminu, putrescinu, kadaverinu a tyraminu. 147 izolátů čeledi *Enterobacteriaceae* bylo schopných produkce kadaverinu a putrescinu v množství vyšší než 100 mg/l kultivačního média. Ostatní biogenní aminy byly produkovány v množství menší než 10 mg/l. Naopak schopnost produkce těchto biogenních aminů (histaminu, tyraminu) ve významném množství byla zjištěna u izolátů rodu *Lactobacillus* a *Leuconostoc*. Bakterie rodu *Enterococcus* produkovaly nejvíce tyramin. Schopnost produkce tyraminu v množství 100 – 1000 mg/l byla detekována u 47,9 % kmenů *Enterococcus faecalis* a 59,7 % kmenů *Enterococcus faecium*.

Lavizzari et al [48] se zaměřili na produkci 3 biogenních aminů (histaminu, kadaverinu a putrescinu) bakteriemi čeledí *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonadaceae*, které byly izolovány ze špenátových listů. Z celkového počtu 364 testovaných izolátů byla zjištěna produkce kadaverinu u 240 izolátů, produkce putrescinu u 208 izolátů a produkce histaminu u 196 izolátů. Hlavními producenty histaminu byli *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* a *Morganella morganii*. Významné množství putrescinu bylo produkováno také bakteriemi *Enterobacter amnigenus* a *Enterobacter cloacae*. Za hlavní producenty kadaverinu byly označeny bakterie *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens* a *Stenotrophomonas maltophilia*.

Při srovnání metod použitých na detekci biogenních aminů produkovánými bakteriemi izolovaných z masných výrobků, produktů studené kuchyně a vody, se jeví kultivační metoda s použitím dekarboxylačních médií s příslušnou aminokyselinou a pH indikátorem jako méně vhodná. Tato metoda je sice technicky i materiálně nenáročná, avšak v případě kadaverin a putrescin produkujejících bakterií nebyly zachyceny některé izoláty (48, 49, 50, 52, 59, 60, 65, 66, 67, 68), u kterých byla později pomocí iontově-výměnné chromatografie prokázána produkce těchto biogenních aminů. Naopak u mnohých výsledků byla pozorována falešně pozitivní reakce hlavně v případě dekarboxylace aminokyselin argininu a tyrozinu.

Nebezpečí falešně pozitivních určení produkce biogenních aminů již publikovali Buňková et al [1], kteří tuto falešně pozitivní reakci vysvětlují tím, že kultivované bakterie mohou produkovat látky s alkalickou reakcí (jiné než biogenní aminy), čímž se ruší účinky testu, který je založen na barevné změně pH indikátoru.

Zvýšený zájem o stanovení koncentrací a zastoupení jednotlivých biogenních aminů v potravinách vyplývá z prohlubujících se poznatků o jejich biologickém působení na člověka. Biogenní aminy jsou pro člověka nepostradatelné, avšak ve vysokých koncentracích se mohou projevit jako látky psychoaktivní a vasoaktivní [2]. Psychoaktivní aminy působí jako přenašeči v centrálním nervovém systému. Vasoaktivní aminy působí přímo nebo nepřímo na vaskulární systém. Nejzřetelnější symptomy konzumace vysokých dávek biogenních aminů jsou zvracení, dýchací potíže, pocení, bušení srdce, hypotenze nebo hypertenze a migrény [15].

Sledování biogenních aminů v potravinách je tedy důležité jednak z hlediska ovlivnění zdravotní nezávadnosti a jednak z hlediska možnosti posoudit kvalitu potravin. V současnosti se touto problematikou zabývá řada vědeckých týmů, které svým výzkumem neustále prohlubují znalosti a přinášejí nové informace o biogenních aminech.

ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na studium produkce biogenních aminů bakteriemi izolovanými z masných výrobků (salámy Vysočina, Herkules a Poličan), z produktů studené kuchyně (Pařížský salát a Parmská pomazánka) a z pitné vody. Bylo izolováno celkem 69 bakterií. Pomocí skrínigové kultivační metody a iontově-výměnné chromatografie byla prověřována produkce histaminu, tyraminu, putrescinu, kadaverinu, spermidinu, sperminu, fenyletylaminu a agmatinu.

Zjištěné výsledky lze shrnout do následujících bodů:

- U žádné z testovaných bakterií nebyla kultivační metodou zjištěna schopnost dekarboxylace histidinu a tryptofanu s výjimkou 1 izolátu schopného dekarboxylace obou aminkokyselin.
- Kultivační metodou byla schopnost dekarboxylace argininu a ornitinu zjištěna u 30 izolátů (43 %) a schopnost dekarboxylace lyzinu a tyrozinu byla zjištěna u 17 izolátů (25 %).
- U žádné z testovaných bakterií nebyla metodou IEC zjištěna produkce histaminu, spermidinu, sperminu a agmatinu.
- Z celkového počtu 69 izolovaných bakterií produkovalo putrescin 15 izolátů (22 %), kadaverin 8 izolátů (12 %), fenyletylamin 6 izolátů (9%) a tyramin 1 izolát (1 %).
- Použité metody ukázaly rozdílné výsledky, přesnější a průkaznější je iontově-výměnná chromatografie. U kultivační metody byly zjištěny falešně pozitivní výsledky.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BUŇKOVÁ, L.; BUŇKA, F.; DRÁB, V.; HLOBILOVÁ, M.; KRÁČMAR, S. *Komparace různých metod detekce dekarboxylázové aktivity u bakterií mléčného kvašení*. Potravinářstvo, roč. 4, 2010, s. 372-380. ISSN 1337-0960.
- [2] KOMPRDA, T.; KLEJDUS, B.; KUBÁŇ, V.; PECHOVÁ, P.; SMĚLÁ, D. *Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování*. Chemické listy, roč. 98, 2004, s. 432-437. ISSN 1213-7103.
- [3] DRAČKOVÁ, M.; JANDOVÁ, T.; STANDARTOVÁ, E.; KORDIOVSKÁ, P.; BORKOVCOVÁ, I.; JANŠTOVÁ, B.; NAVRÁTILOVÁ, P.; VORLOVÁ, L. *Stanovení obsahu polyaminů v tvarůžcích pomocí blízké infračervené reflektanční spektrometrie*. Acta fytotechnica et zootechnica, roč. 12, 2009, s. 121-126. ISSN 1336-9245.
- [4] KORDIOVSKÁ, P.; VORLOVÁ, L.; KARPÍŠKOVÁ, R.; LUKÁŠOVÁ, J. *Potencial risk of biogenic amine fermentation in carp muscle (Cyprinus carpio)* [online] [cit. 2011-05-08]. Dostupný z WWW:
http://www.toxi.szm.com/Rf2004/031_Kordiovska.pdf
- [5] KODÍČEK, M. *Biochemické pojmy - výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT, 2004 [cit. 2011-05-08]. Dostupný z WWW:
http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/ebook.obsah.htm
- [6] HOZA, I.; KRAMÁŘOVÁ, D. *Potravinářská biochemie III*. 1 vyd. Zlín: UTB, 2008. 123 s. ISBN 978-80-7318-396-7.
- [7] KRÁLOVÁ, B.; MARKOVÁ, M. *Pyridoxalfosfát – katalyzátor přeměn aminokyseliny*. Chemické listy, roč. 98, 2004, s. 102-107. ISSN 1213-7103.
- [8] *Obrázek* [online] [cit. 2011-05-08]. Dostupný z WWW:
<http://biochemie.wz.cz/aminokyseliny.html>
- [9] SILLA SANTOS, H. M. *Biogenic amines: their importance in foods*. International Journal of Food Microbiology, roč. 29, 1996, s. 213-231. ISSN 0168-1605.

- [10] BUŇKOVÁ, L.; BUŇKA, F.; POLLAKOVÁ, E.; PODEŠVOVÁ, T.; DRÁB, V.; KRÁČMAR, S. *Vliv aerobního/anaerobního prostředí na dekarboxylázovou aktivitu vybraných bakterií mléčného kvašení*. *Potravinářstvo*, roč. 4, 2010, s. 5-7. ISSN 1337-0960.
- [11] ROIG-SAGUÉS, X. A.; RUIZ-CAPILLAS, C.; ESPINOSA, D.; HERNÁNDEZ, M. *The decarboxylating bacteria present in foodstuffs and the effect of emerging technologies on their formation*. – In: Dandriofosse, G. [eds.], *Biological aspects of biogenic amines, polyamines and conjugates*. India: Transworld Research Network, 2009. ISBN 978-81-7895-249-9.
- [12] KVASNIČKOVÁ A. *Bioaktivní aminy v zelené a pražené kávě* [online]. [cit. 2011-05-08]. Dostupný z WWW:
<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=149&ch=13&typ=1&val=18051>
- [13] BURDYCHOVÁ, R. *Zástupci startovacích kultur mohou tvořit biogenní aminy* [online]. [cit. 2011-05-08]. Dostupný z WWW:
<http://www.gate2biotech.cz/zastupci-startovacich-kultur-mohou-tvorit-biogenni-aminy/>
- [14] PEČ, P.; PEČOVÁ D. *Učebnice středoškolské chemie a biochemie*. 1 vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2001. 518 s. ISBN 80-7182-034-2.
- [15] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. 1. vyd. Tábor: Osis, 1999. 368 s. ISBN 80-902391-5-3.
- [16] *2-fenyletylamin* [online] [cit. 2011-05-08]. Dostupný z WWW:
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Fenylethylamin>
- [17] VOKURKA, M. *Velký lékařský slovník*. 8. vyd. Praha: Maxdorf, 2009. 1144 s. ISBN 978-80-7345-166-0.
- [18] MARTÍNKOVÁ, J. *Farmakologie – pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2007. 380 s. ISBN 978-80-247-1356-4.
- [19] SHALABY, R. A. *Significance of biogenic amines to food safety and human health*. *Food Research International*, roč. 29, 1996, s. 675-690. ISSN 0963-9969.
- [20] GREIF, G.; KAROVIČOVÁ, J.; KOHAJDOVÁ, Z. *Biogénne aminy v potravinách*. *Potravinářstvo*, roč. 2, 2008, s. 30-49. ISSN 1337-0960.

- [21] BUŇKOVÁ, L.; BUŇKA, F.; LUKEŠOVÁ, P.; MRKVIČKA, V.; DOLEŽALOVÁ, M.; KRÁČMAR, S. *Produkce biogenních aminů bakteriemi izolovanými z povrchu drůbeže*. Potravinářstvo, roč. 3, 2009, s. 7-11. ISSN 1337-0960.
- [22] BORKOVCOVÁ, I.; STANDAROVÁ, E.; VORLOVÁ, L. *Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě* [online]. [cit. 2011-05-08]. Dostupný z WWW: <http://web.vetweb.cz/projekt/clanek.asp?pid=2&cid=5760>
- [23] NAILA, A.; FLINT, S.; FLETCHER, G.; BREMER, P.; MEERDINK, G. *Control of biogenic amines in food – existing a emerging approaches*. Journal of Food Science, roč. 75, 2010, s. 139-150. ISSN 0022-1147.
- [24] PACHECO-AGUILAR, R.; LUGO-SÁNCHEZ, E. M.; VILLEGAS-OZUNA, E. R.; ROBLES-BURGUEÑO, R. *Histamine quantification in Monterey sardine muscle and canned products from Northwestern Mexico*. Journal of Food Composition and Analysis, roč. 11, 1998, s. 188-195. ISSN 0889-1575.
- [25] MOHAMED, R.; SIMON-SARKADI, S.; HASSAN, S.; SOHER, E.; AHMED-ADEL, E. B. *Changes in free amino acids and biogenic amines of Egyptian salted-fermented fish (Feseekh) during ripening and storage*. Food Chemistry, roč. 115, 2009, s. 635-638. ISSN 0308-8146.
- [26] DOLATOWSKI, J. Z.; STADNIK, J. *Biogenic amines in meat and fermented meat products*. Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria; roč. 9, 2010, s. 251-263. ISSN 1889-9594.
- [27] REJCHRTOVÁ, E.; ZEMÁNEK, L.; SLÁDKOVÁ, P.; KOMPRDA, T. *The biogenic amines content of cheese ripening under the smear during production* [online]. [cit. 2011-05-08]. Dostupný z WWW: http://web2.mendelu.cz/af_291_mendelnet/mendelnet2010/articles/18_rejchrtova_347.pdf
- [28] GLÓRIA, A. B. M.; KALÁČ, P. *Biogenic amines in cheeses, wines, beers and sauerkraut*. – In: Dandrifosse, G. [eds.], Biological aspects of biogenic amines, polyamines and conjugates. India: Transworld Research Network, 2009. s. 267-309. ISBN 978-81-7895-249-9.

- [29] COSCUN, H.; EKICI, K.; SIENKIEWICZ. *A review: Histamine formation and its control in cheese*. Journal of Food Technology, roč. 3, 2005, s. 60-63. ISSN 9993-6036.
- [30] KVASNIČKOVÁ, A. *Biogenní aminy v pivu mohou představovat pro některé konzumenty zdravotní riziko* [online]. [cit. 2011-05-08]. Dostupný z WWW: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/%5CIndex.aspx?ch=552&typ=1&val=75723&ids=0>
- [31] OTRŘÍŠAL, P.; STÁVEK, J. *Je nutné bát se biogenních aminů ve vínech ?* [online]. [cit. 2011-05-08]. Dostupný z WWW: <http://www.enolog.cz/je-nutne-bat-se-biogennich-aminu-ve-vinech>
- [32] ZAMAN, Z. M. *A review: Microbiological, physicochemical and health impact of high level of biogenic amines in fish sauce*. American Journal of Applied Sciences, roč. 6, 2009, s. 1199-1211. ISSN 1546-9239.
- [33] SLÁDKOVÁ, P.; PETIROVÁ, E.; KOMPRDA, T.; DOHNAL, V.; KALÁB, J. *Vybrané faktory ovlivňující obsah biogenních aminů ve fermentovaných masných výrobcích* [online] [cit. 2011-05-08]. Dostupný z WWW: http://web2.mendelu.cz/af_291_mendelnet/mendelnet08agro/files/articles/techpot_sladkova.pdf
- [34] ÖNAL, A. *A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods*. Food Chemistry, roč. 103, 2007, s. 1475-1486. ISSN 0308-8146.
- [35] ČERNÍKOVÁ, M.; VAŇÁTKOVÁ, Z. *Praktická cvičení z potravinářské mikrobiologie*. 1. vyd. Zlín: UTB, 2010. 134 s. ISBN 978-80-7318-749-1.
- [36] ANONYM. *Potravinářská mikrobiologie I – Mikroorganismy v potravinářství* [online]. UTB ve Zlíně, Technologická fakulta. [cit. 2011-05-08]. Dostupný z WWW: <http://utb.cepac.cz/Screens/Explorer.aspx?id=7>
- [37] *Obrázek* [online] [cit. 2011-05-08]. Dostupný z WWW: <http://philosophyofscienceportal.blogspot.com/2010/06/e-coli-in-dem-thar-plastic-bagsegads.html>
- [38] *Obrázek* [online] [cit. 2011-05-08]. Dostupný z WWW: <http://www.sciencephoto.com/media/11539/enlarge>

- [39] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [40] ŠTEGNEROVÁ, H.; NÁPRAVNÍKOVÁ, E.; STEINHAUSEROVÁ, I.; ŠVEC, P. *Identifikace bakterií mléčného kvašení v mase baleném v podmínkách ochranné atmosféry* [online]. [cit. 2011-05-08]. Dostupný z WWW: http://www.vetweb.cz/Identifikace-bakterii-mlecneho-kvaseni-v-mase-balenem-v-podminkach-ochranné-atmosféry__s1496x53017.html
- [41] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. 361 s. ISBN 80-85605-71-6.
- [42] *Obrázek* [online] [cit. 2011-05-08]. Dostupný z WWW: <http://bioweb.usu.edu/microscopy/Research.htm>
- [43] JANDOVÁ, B.; KOTOUČKOVÁ, L. *Praktikum z mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita, 1996. 64 s. ISBN 80-210-1374-5.
- [44] HLOBILOVÁ, M. *Srovnání metod pro detekci biogenních aminů u bakterií mléčného kvašení*. Zlín, 2008. 96 s. Diplomová práce na Technologické fakultě Univerzity Tomáše Bati. Vedoucí práce Leona Buňková.
- [45] ZAMAN, Z. M.; BAKAR, A. F.; SELAMAT, J.; BAKAR, J. *Occurrence of biogenic amines and amines degrading bacteria in fish sauce*. Czech Journal of Food Sciences, roč. 28, 2010, s. 440-449. ISSN 1212-1800.
- [46] BOVER-CID, S.; HUGAS, M.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VIDAL-CAROU, C. M. *Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages*. International Journal of Food Microbiology, roč. 66, 2001, s. 185-189. ISSN 0168-1605.
- [47] PIRCHER, A.; BAUER, F.; PAULSEN, P. *Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses*. European Food Research and Technology, roč. 226, 2007, s. 225-231. ISSN 1438-2385.

- [48] LAVIZZARI, T.; BRECCIA, M.; BOVER-CID, S.; VIDAL-CAROU, M. C.; VECIANA-NOGUES, M. T. *Histamine, cadaverine, and putrescine produced in vitro by Enterobacteriaceae and Pseudomonadaceae isolated from spinach*. Journal of Food Protection, roč. 73, 2010, s. 385-389. ISSN 0362-028X.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BA	Biogenní aminy
BMK	Bakterie mléčného kvašení
CO ₂	Oxid uhličitý
CNS	Centrální nervová soustava
DAO	Diaminooxidáza
G ⁻	Gramnegativní bakterie
G ⁺	Grampozitivní bakterie
H ₂	Vodík
HMT	Histidinmetyltransferázy
IEC	Iontově-výměnná chromatografie
MAO	Monoaminooxidáza
NaCl	Chlorid sodný
PCA	Plate Count Agar
SO ₂	Oxid siřičitý
(w/v)	Hmotnostní zlomek

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 – Dekarboxylace aminokyselin [8]	12
Obr. 2 – Dekarboxylace aminokyselin za tvorby biogenních aminů [20]	15
Obr. 3 – Vzorec výpočtu indexu kvality rybího masa [20].....	16
Obr. 4 - <i>Escherichia coli</i> [37]	23
Obr. 5 – <i>Shigella flexneri</i> [38]	24
Obr. 6 – <i>Lactobacillus casei</i> [42].....	27

SEZNAM TABULEK

Tab. I – Významné mikroorganismy produkující BA [15].....	21
Tab. II – Dekarboxylace aminokyselin bakteriemi izolovaných z vybraných masných výrobků	37
Tab. III - Dekarboxylace aminokyselin bakteriemi izolovaných z vybraných lahůdek	38
Tab. IV - Dekarboxylace aminokyselin bakteriemi izolovaných z pitné vody	39
Tab. V – Detekce produkce BA bakteriemi izolovaných z vybraných masných výrobků metodou IEC	40
Tab. VI - Detekce produkce BA bakteriemi izolovaných z vybraných lahůdek metodou IEC	41
Tab. VII - Detekce produkce BA bakteriemi izolovaných z pitné vody metodou IEC.....	42

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA I: Makroskopické morfologické znaky izolovaných bakterií

PŘÍLOHA II: Výsledky Gramova barvení a vybraných biochemických testů

PŘÍLOHA I: MAKROSKOPICKÉ MORFOLOGICKÉ ZNAKY IZOLOVANÝCH BAKTERIÍ

Č. izolátu	Vzorek	Makroskopické morfologické znaky kolonií				
		Velikost	Povrch	Profil	Okraj	Barva
1	salám Vysočina	4 mm	lesklý	plochý	vroubkovaný	mléčně nažloutlá
2	salám Vysočina	4 mm	lesklý	plochý	zvlněný	bílá
3	salám Vysočina	6 mm	lesklý	plochý	hladký	mléčně žlutá
4	salám Vysočina	3 mm	lesklý	plochý	hladký	mléčně žlutá
5	salám Herkules	5 mm	matný	plochý	zvlněný	bílá
6	salám Herkules	4 mm	lesklý	plochý	zubatý	bílá
7	salám Herkules	4 mm	lesklý	plochý	zubatý	bílá
8	salám Herkules	4 mm	lesklý	vypouklý	hladký	bílá
9	salám Herkules	7 mm	lesklý	plochý	zvlněný	bílá
10	salám Herkules	6 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
11	salám Herkules	8 mm	matný	plochý	vrásčitý	mléčně nažloutlá
12	salám Poličan	5 mm	lesklý	plochý	hladký	mléčně bílá
13	salám Poličan	4 mm	lesklý	plochý	vrásčitý	mléčně bílá
14	salám Poličan	4 mm	lesklý	plochý	zvlněný	mléčně bílá
15	salám Poličan	5 mm	lesklý	plochý	zvlněný	mléčně bílá
16	salám Poličan	4 mm	lesklý	plochý	zvlněný	mléčně bílá
17	salám Poličan	3 mm	lesklý	vypouklý	hladký	bílá
18	salám Poličan	1 mm	matný	plochý	hladký	bílá
19	salám Poličan	3 mm	lesklý	vypouklý	hladký	bílá
20	salám Poličan	4 mm	lesklý	plochý	vrásčitý	bílá
21	salám Poličan	3 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá

Č. izolátu	Vzorek	Makroskopické morfologické znaky kolonií				
		Velikost	Povrch	Profil	Okraj	Barva
22	Pařížský salát	3 mm	lesklý	plochý	hladký	mléčně bílá
23	Pařížský salát	2 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
24	Pařížský salát	2 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
25	Pařížský salát	2 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
26	Pařížský salát	3 mm	lesklý	plochý	vroubkovaný	bílá
27	Pařížský salát	3 mm	lesklý	vypouklý	zvlněný	mléčně bílá
28	Pařížský salát	2 mm	lesklý	vypouklý	vroubkovaný	bílá
29	Pařížský salát	3 mm	matný	plochý	vroubkovaný	bílá
30	Pařížský salát	3 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
31	Pařížský salát	3 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
32	Pařížský salát	3 mm	lesklý	vypouklý	hladký	mléčně bílá
33	Pařížský salát	2 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
34	Pařížský salát	4 mm	lesklý	plochý	hladký	mléčně bílá
35	Pařížský salát	3 mm	lesklý	plochý	hladký	nažloutlá
36	Pařížský salát	4 mm	lesklý	plochý	hladký	nažloutlá
37	Parmská pomazánka	1 mm	matný	plochý	hladký	mléčně bílá
38	Parmská pomazánka	1 mm	matný	plochý	hladký	mléčně bílá
39	Parmská pomazánka	1 mm	matný	plochý	hladký	mléčně bílá
40	Parmská pomazánka	1 mm	matný	plochý	hladký	mléčně bílá
41	Parmská pomazánka	1 mm	lesklý	vypouklý	hladký	mléčně bílá
42	Parmská pomazánka	1 mm	matný	vypouklý	hladký	mléčně bílá
43	Parmská pomazánka	1 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
44	Parmská pomazánka	1 mm	matný	vypouklý	hladký	mléčně bílá
45	Parmská pomazánka	2 mm	lesklý	plochý	vroubkovaný	mléčně bílá

Č. izolátu	Vzorek	Makroskopické morfologické znaky kolonií				
		Velikost	Povrch	Profil	Okraj	Barva
46	Pitná voda	3 mm	lesklý	plochý	zvlněný	mléčně žlutá
47	Pitná voda	1 mm	matný	plochý	zubatý	mléčně bílá
48	Pitná voda	4 mm	lesklý	plochý	hladký	mléčně žlutá
49	Pitná voda	1 mm	lesklý	plochý	hladký	mléčně žlutá
50	Pitná voda	3 mm	lesklý	plochý	vrásčitý	mléčně žlutá
51	Pitná voda	2 mm	lesklý	plochý	zvlněný	fialová
52	Pitná voda	3 mm	matný	plochý	hladký	mléčně žlutá
53	Pitná voda	4 mm	matný	plochý	zubatý	mléčně žlutá
54	Pitná voda	5 mm	matný	plochý	hladký	žlutá
55	Pitná voda	4 mm	lesklý	vypouklý	hladký	mléčně žlutá
56	Pitná voda	4 mm	lesklý	plochý	zvlněný	žlutá
57	Pitná voda	3 mm	lesklý	plochý	hladký	mléčně žlutá
58	Pitná voda	4 mm	lesklý	plochý	vroubkovaný	žlutá
59	Pitná voda	1 mm	matný	plochý	hladký	nažloutlá
60	Pitná voda	3 mm	lesklý	plochý	hladký	mléčně žlutá
61	Pitná voda	1 mm	lesklý	vypouklý	hladký	mléčně bílá
62	Pitná voda	2 mm	matný	plochý	hladký	mléčně bílá
63	Pitná voda	3 mm	lesklý	vypouklý	hladký	žlutá
64	Pitná voda	3 mm	lesklý	plochý	hladký	žlutá
65	Pitná voda	4 mm	lesklý	vypouklý	hladký	mléčně bílá
66	Pitná voda	2 mm	lesklý	plochý	hladký	oranžovo-žlutá
67	Pitná voda	4 mm	lesklý	vypouklý	hladký	mléčně bílá
68	Pitná voda	3 mm	lesklý	plochý	hladký	žlutá
69	Pitná voda	3 mm	lesklý	plochý	zvlněný	bílá

PŘÍLOHA II: VÝSLEKDY GRAMOVA BARVENÍ A VYBRANÝCH BIOCHEMICKÝCH TESTŮ

Č. izolátu	Vzorek	Gramovo barvení	Tvar buňky	Biochemické testy	
				Kataláza	Oxidáza
1	salám Vysočina	G ⁻	kokotyčinky tvořící řetízky	+	+
2	salám Vysočina	G ⁺	koky	+	-
3	salám Vysočina	G ⁺	koky	+	-
4	salám Vysočina	G ⁺	koky	+	-
5	salám Herkules	G ⁺	koky	+	-
6	salám Herkules	G ⁺	koky	+	-
7	salám Herkules	G ⁺	koky	+	-
8	salám Herkules	G ⁺	koky	+	-
9	salám Herkules	G ⁺	koky	+	-
10	salám Herkules	G ⁺	koky	+	-
11	salám Herkules	G ⁺	koky	+	-
12	salám Poličan	G ⁺	koky	+	-
13	salám Poličan	G ⁺	koky	+	-
14	salám Poličan	G ⁺	koky	+	-
15	salám Poličan	G ⁺	koky	+	-
16	salám Poličan	G ⁺	koky	+	-
17	salám Poličan	G ⁺	koky	+	-
18	salám Poličan	G ⁺	kokotyčinky	-	-
19	salám Poličan	G ⁺	koky	+	-
20	salám Poličan	G ⁺	kokotyčinky	+	-
21	salám Poličan	G ⁺	koky	+	-

Č. izolátu	Vzorek	Gramovo barvení	Tvar buňky	Biochemické testy	
				Kataláza	Oxidáza
22	Pařížský salát	G ⁻	koky	+	-
23	Pařížský salát	G ⁺	diplokoky	+	-
24	Pařížský salát	G ⁺	diplokoky	+	-
25	Pařížský salát	G ⁺	koky	+	-
26	Pařížský salát	G ⁺	koky	+	-
27	Pařížský salát	G ⁻	kokotyčinky	+	-
28	Pařížský salát	G ⁻	kokotyčinky	+	+
29	Pařížský salát	G ⁻	kokotyčinky tvořící řetízky	+	-
30	Pařížský salát	G ⁺	diplokoky	+	-
31	Pařížský salát	G ⁺	diplokoky	+	-
32	Pařížský salát	G ⁻	kokotyčinky	+	+
33	Pařížský salát	G ⁻	koky	+	+
34	Pařížský salát	G ⁻	kokotyčinky	+	-
35	Pařížský salát	G ⁺	diplokoky	+	-
36	Pařížský salát	G ⁻	tyčinky	+	+
37	Parmská pomazánka	G ⁺	kokotyčinky	-	-

			tvořící řetízky		
38	Parmská pomazánka	G ⁺	kokotyčinky	-	-
39	Parmská pomazánka	G ⁺	kokotyčinky	-	-
40	Parmská pomazánka	G ⁺	kokotyčinky	-	-
41	Parmská pomazánka	G ⁺	koky ve shlu- cích	+	-
42	Parmská pomazánka	G ⁺	koky ve shlu- cích	+	-
43	Parmská pomazánka	G ⁺	koky tvořící řetízky	+	-
44	Parmská pomazánka	G ⁺	koky ve shlu- cích	+	-
45	Parmská pomazánka	G ⁺	koky	+	-

Č. izolátu	Vzorek	Gramovo barvení	Tvar buňky	Biochemické testy	
				Kataláza	Oxidáza
46	Pitná voda	G ⁻	tyčinky	+	+
47	Pitná voda	G ⁺	tyčinky	-	+
48	Pitná voda	G ⁻	tyčinky	-	-
49	Pitná voda	G ⁻	tyčinky	+	+
50	Pitná voda	G ⁻	kokotyčinky	+	+
51	Pitná voda	G ⁻	tyčinky	+	-
52	Pitná voda	G ⁻	tyčinky	+	+
53	Pitná voda	G ⁻	kokotyčinky	-	+
54	Pitná voda	G ⁻	tyčinky	+	+
55	Pitná voda	G ⁻	tyčinky	+	+
56	Pitná voda	G ⁻	kokotyčinky	+	-
57	Pitná voda	G ⁺	tyčinky	+	-
58	Pitná voda	G ⁻	kokotyčinky	+	-
59	Pitná voda	G ⁺	kokotyčinky	+	-
60	Pitná voda	G ⁻	kokotyčinky	+	-
61	Pitná voda	G ⁺	koky	+	-
62	Pitná voda	G ⁺	kokotyčinky	-	-
63	Pitná voda	G ⁻	tyčinky	+	-
64	Pitná voda	G ⁻	tyčinky	+	-
65	Pitná voda	G ⁻	tyčinky	+	-
66	Pitná voda	G ⁻	kokotyčinky	+	-
67	Pitná voda	G ⁻	tyčinky	+	-
68	Pitná voda	G ⁻	kokotyčinky	+	-
69	Pitná voda	G ⁻	kokotyčinky	+	-