Dekarboxylázová aktivita vybraných probiotických bakterií

Nikola Georgová

Bakalářská práce
2013

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Nikola GEORGOVÁ**
Osobní číslo:	**T10148**
Studijní program:	**B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**
Forma studia:	**prezenční**
Téma práce:	**Dekarboxylázová aktivita vybraných probiotických bakterií**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. **Charakteristika, vznik biogenních aminů a faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu bakterií.**
2. **Přítomnost a původci biogenních aminů ve fermentovaných potravinách (startérové, non-startérové, kontaminující mikroorganizmy) a účinky zvýšených koncentrací biogenních aminů na lidské zdraví.**
3. **Charakteristika probiotických bakterií, pozitivní účinky na lidské zdraví a potenciální dekarboxylázová aktivita.**

II. Praktická část

1. **Stanovení produkce biogenních aminů metodou RP-HPLC.**
2. **Skrining dekarboxylázové aktivity vybraných probiotických bakterií.**
3. **Zpracování výsledků a formulace závěrů.**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] LINARES, D.M., MARTÍN, M.C., LADERO, V., ALVAREZ, M.A., FERNÁNDEZ, M. Biogenic Amines in Dairy Products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2011,vol. 51, iss. 7, s. 691-703. ISSN: 1040-8398.
[2] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., HLOBILOVÁ, M., VAŇÁTKOVÁ, Z.,NOVÁKOVÁ D., DRÁB, V. Tyramine Production of Technological Important Strains of Lactobacillus, Lactococcus and Streptococcus. European Food Research and Technology. 2009, vol. 229, s. 533-538. ISSN: 1438-2377.
[3] KAROVIČOVÁ, J. a Z. KOHAJDOVÁ. Biogenic Amines in Food. Chemical Papers. 2005, vol. 59, iss.1, s. 70-79. ISSN: 0366-6352.
[4] MOZZI, F., RAYA, R.R. VIGNOLO, G.M. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. USA : Blackwell Publishing, 2010. ISBN:978-0-813-81583-1.
[5] SILLA-SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. International Journal of Food Microbiology. 1996, vol. 29, iss. 2-3, s. 213-231. ISSN: 0168-1605.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Eva Lorencová**
Ústav technologie potravin

Datum zadání bakalářské práce: **18. února 2013**

Termín odevzdání bakalářské práce: **24. května 2013**

Ve Zlíně dne 18. února 2013

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: GEORGOVÁ NIKOLA Obor: TVTKD

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 15.5.2013 Georgová

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá dekarboxylázovou aktivitou vybraných probiotických bakterií. Produkci biogenních aminů těmito skupinami mikroorganizmů lze chápat jako protiklad k jejich pozitivním dieteticko-léčebným účinkům. Proto je nutné tuto problematiku sledovat a testovat i faktory (přídavek aminokyselin, NaCl, sacharidů, pH, teplota), které by mohly dekarboxylázovou aktivitu významně ovlivnit. V rámci této práce byla monitorována kinetika produkce a růst vybraného kmene rodu *Bifidobacterium* ovlivněného zmíněnými faktory v rámci 36-ti hodinové kultivace za podmínek *in vitro*. K analýze supernatantů získaných po kultivaci *B. animalis* ssp. *lactis* CCDM 239 bylo použito metody RP-HPLC s předkolonovou derivatizací dansylchloridem a UV detekcí při 254 nm. Byla zjištěna zanedbatelná produkce tyraminu, která se pohybovala do 10 $mg.l^{-1}$. Uvedené množství by mohlo způsobit komplikace pouze u velmi oslabených a/nebo farmakologicky léčených jedinců.

Klíčová slova: biogenní aminy, kultivační podmínky, probiotické bakterie, *Bifidobacterium*

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with decarboxylase activity in selected probiotic bacteria. Biogenic amine production by this group of microorganisms could be considered opposite to their beneficial dietary effect. Therefore, it is neccessary to investigate this issue deeply and also test the factors which could affect the decarboxylase activity. In the frame of this work the kinetics of biogenic amine production and growth behavior affected by mentioned factors in selected bifidobacterial strain during 36 hours at *in vitro* conditions were observed.

RP-HPLC after pre-column derivatisation by dansyl chloride and UV detection at the wavelength of 254 nm in supernatants harvested after the cultivation of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 239 were applied. It was found out that mentioned bacteria were able to produce just insignificant amounts of tyramine (<10 $mg.l^{-1}$), which could endanger only very weakened and/or pharmacologically treated individuals.

Keywords: biogenic amines, cultivation conditions, probiotic bacteria, *Bifidobacterium*

Mé velké díky patří vedoucí práce Ing. Evě Lorencové, za její rady, cenné připomínky, věnovaný čas, praktickou pomoc, ochotu a poskytnuté materiály. Také bych chtěla poděkovat celé své rodině a svým blízkým, za jejich morální podporu a trpělivost během celého studia.

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

OBSAH

ÚVOD **11**
I TEORETICKÁ ČÁST **12**
1 BIOGENNÍ AMINY A JEJICH CHARAKTERISTIKA **13**
1.1 CHARAKTERISTIKA AMINŮ 13
1.2 CHARAKTERISTIKA A STRUKTURA BIOGENNÍCH AMINŮ 13
1.3 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ 15
1.3.1 Účast pyridoxal-5-fosfátu 16
1.3.2 Vznik tyraminu 17
1.4 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ DEKARBOXYLACI AMINOKYSELIN 18
1.4.1 pH 18
1.4.2 Teplota 18
1.4.3 Koncentrace NaCl 19
1.4.4 Vodní aktivita 19
1.4.5 Přítomnost O_2 20
1.4.6 Vliv cukrů 20
1.4.7 Další faktory ovlivňující dekarboxylázovou činnost 20
1.5 VÝZNAM BIOGENNÍCH AMINŮ V ORGANIZMU ČLOVĚKA 21
1.5.1 Histaminová otrava 21
1.5.2 Otrava tyraminem 21
2 BIOGENNÍ AMINY V POTRAVINÁCH **24**
2.1 MIKROORGANIZMY VYKAZUJÍCÍ DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITU 24
2.2 FERMENTACE SACHARIDŮ U BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ A BIFIDOBAKTERIÍ 25
2.2.1 Homofermentativní mléčné kvašení 26
2.2.2 Heterofermentativní mléčné kvašení 26
2.2.3 Fosfofruktoketolázová dráha 26
2.3 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ VE FERMENTOVANÝCH VÝROBCÍCH A PŮVODCI JEJICH VZNIKU 28
2.3.1 Mléko 29
2.3.2 Sýry 29
2.3.3 Jogurt 31
2.3.4 Kefír 31
2.3.5 Fermentované masné výrobky 31
2.3.6 Maso 31
2.3.7 Fermentované salámy 32
3 ZÁSTUPCI PROBIOTICKÉ MIKROFLÓRY **33**
3.1 STARTÉROVÉ KULTURY 33
3.2 ROD *BIFIDOBACTERIUM* 33
3.3 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ 35
3.3.1 Rod *Lactobacillus* 35
3.4 METODY STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ 35
II PRAKTICKÁ ČÁST **37**
4 CÍL **38**

5 MATERIÁL A METODIKA 39
5.1 PŘÍPRAVA DEKARBOXYLAČNÍHO MÉDIA 39
5.2 PŘÍPRAVA BAKTERIÁLNÍ SUSPENZE *BIFIDOBACTERIUM* 40
5.3 OPTICKÁ DENZITA 40
5.4 PŘÍPRAVA VZORKŮ K DERIVATIZACI 41
5.5 POSTUP DERIVATIZACE 41
5.6 CHROMATOMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ VE VZORKU 41
6 VYHODNOCENÍ 42
6.1 KINETIKA PRODUKCE TYRAMINU 42
6.2 RŮSTOVÉ KŘIVKY TYRAMINU 44
7 DISKUZE 47
ZÁVĚR 50
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 51
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 58
SEZNAM OBRÁZKŮ 59
SEZNAM TABULEK 60
SEZNAM PŘÍLOH 61

ÚVOD

Biogenní aminy jsou látky, které vznikají dekarboxylací volných aminokyselin. Jsou přirozenou součástí potravin. V těle lidí a zvířat plní důležité fyziologické funkce. Hrají důležitou roli v růstu a proliferaci buněk, působí jako přenašeči neuronových vzruchů v centrálním nervovém systému a jsou nezbytné pro tvorbu dalších významných látek. Ve vyšších koncentracích však mohou působit toxicky. Účastní se navíc některých patologických procesů probíhajících v lidském těle, jako jsou zánětlivé a alergické reakce [7].

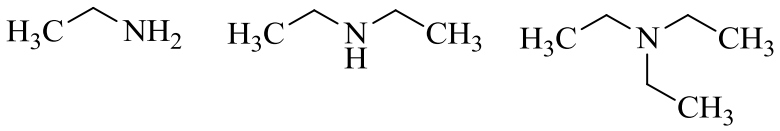
Hlavním cílem této bakalářské práce bylo objasnit metabolizmus a schopnost produkce biogenních aminů rodem *Bifidobacterium*. V rámci experimentální části bylo sledováno působení vnějších faktorů na růstové chování a potenciální dekarboxylázovou aktivitu (přídavek aminokyselin, laktózy, NaCl). Někteří zástupci rodu *Bifidobacterium* jsou považováni za probiotika, mající pozitivní vliv na zdraví člověka. Avšak i v rámci probiotických kultur můžeme najít zástupce dekarboxyláza pozitivní mikroflóry. I když množství biogenních aminů vyprodukovaných těmito mikroorganizmy nejsou vysoká, mohou přispět k celkovému množství biogenních aminů ve výrobcích a ohrozit tak zdraví konzumentů. Zkoumaný probiotický sbírkový kmen *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 239 produkoval za podmínek *in vitro* zanedbatelná množství biogenních aminů a lze tedy hypoteticky tvrdit, že by při reálné aplikaci převážil jeho pozitivní probiotický efekt. Tato práce rovněž přispívá k objasnění části metabolizmu bifidobakterií, které nejsou, na rozdíl od laktobacilů, dostatečně prozkoumány.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY A JEJICH CHARAKTERISTIKA

1.1 Charakteristika aminů

Aminy je možno považovat za deriváty amoniaku, ve kterých je atom vodíku nahrazen alkylovou nebo arylovou skupinou. Podle toho, zda došlo k nahrazení jednoho, dvou nebo všech tří vodíkových atomů, rozeznáváme primární, sekundární a terciární aminy viz Obr. 1. Náhradou všech atomů v amoniovém iontu lze odvodit kvartérní amoniovou sůl [1].



Obr. 1. Primární, sekundární a terciární amin [2]

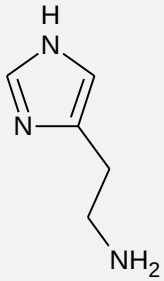
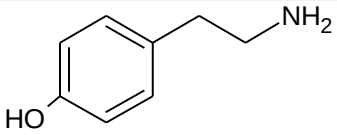
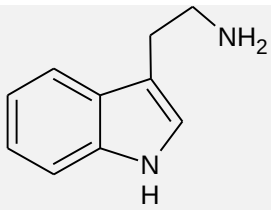
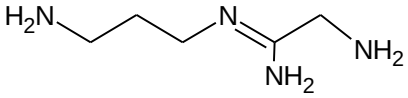
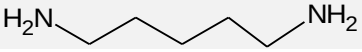
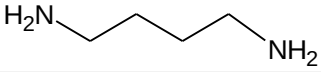
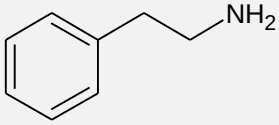
Mezi aminy patří celá řada významných organických sloučenin, které jsou při vyšších koncentracích toxické a řada z nich je i karcinogenní. Aminy můžeme najít také jako alkaloidy např. strychnin, morfin, nikotin a chinin [1, 2, 3]. Mezi nejběžnější zástupce, se kterými se můžeme v potravinách setkat, jsou histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, tryptamin, spermin a spermidin [4].

1.2 Charakteristika a struktura biogenních aminů

Biogenní aminy (BA) jsou látky, které jsou známy již více než 100 let. V roce 1903 nesly název „ptoaminy“, což souhrnně označovalo jedovaté látky. BA jsou skupinou alifatických, aromatických nebo heterocyklických bází odvozených od aminokyselin, které vykazují různé biologické účinky a funkce v živočišných tkáních a rostlinných pletivech [7].

Vyskytují se prakticky ve všech potravinách jako běžné produkty metabolizmu. Ve větším množství se nacházejí ve fermentovaných výrobcích (např. sýry, trvanlivé salámy, pivo, víno, kysané zelí aj.), kde vznikají mikrobiální činností. Působením kontaminující mikroflóry vznikají hlavně v rybách a v mase během skladování. Vysoké koncentrace BA se vyskytují v potravinách v pokročilém stupni kažení, v zelenině, ovoci a houbách při nevhodném skladování [4]. Mezi nejběžnější BA vyskytující se v potravinách patří histamin, tyramin, kadaverin, β-fenyletylamin, spermin, spermidin, putrescin, tryptamin a agmatin viz Tab. 1 [4].

Tab. 1. Struktura biogenních aminů [9]

Název BA	Klasifikace	Počet aminových skupin	Chemický vzorec
Histamin	heterocyklické	monoamin	
Tyramin	aromatické	monoamin	
Tryptamin	heterocyklické	monoamin	
Agmatin	alifatické	diamin	
Kadaverin	alifatické	diamin	
Putrescin	alifatické	diamin	
Fenyletylamin	aromatické	monoamin	

Podle počtu aminových skupin můžeme BA rozdělit na monoaminy (tyramin, fenyletylamin), diaminy (putrescin, kadaverin) a polyaminy (spermin, spermidin) [8].

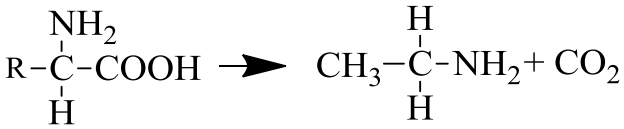
Polyaminy jsou tvořeny syntézou *de novo* a jsou zapojeny do důležitých fyziologických procesů. Podílejí se na stabilizaci buněčné membrány a buněčné proliferaci, protože jsou zapojeny v DNA, RNA a syntéze bílkovin. Z tohoto důvodu jsou považovány za důležité mikrokomponenty v období intenzivního růstu tkání. U osob s nádorovým onemocněním by měl být přísun polyaminů minimalizován [9].

1.3 Vznik biogenních aminů

BA vznikají z aminokyselin působením dekarboxyláz nebo z aminokyselin a karbonylových sloučenin (aldehydů a ketonů) působením transamináz [7, 10]. BA jsou produkovány v rámci metabolické činnosti rostlin, zvířat a mikroorganizmů [11].

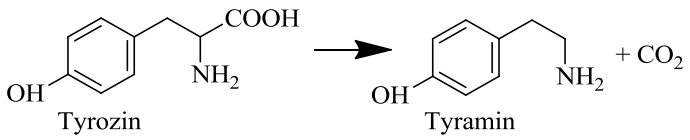
Tzv. endogenní BA jsou jako produkty metabolizmu v nízkých koncentracích přirozenou složkou prakticky všech potravin. Exogenní BA vznikají v potravinách jako důsledek mikrobiální kontaminace, zvláště při kvasných procesech [7].

Dekarboxylace probíhá odstraněním α-karboxylové skupiny za vzniku nového odpovídajícího aminu (Obr. 2) [6]. Kofaktorem dekarboxyláz je pyridoxal-5-fosfát [7].

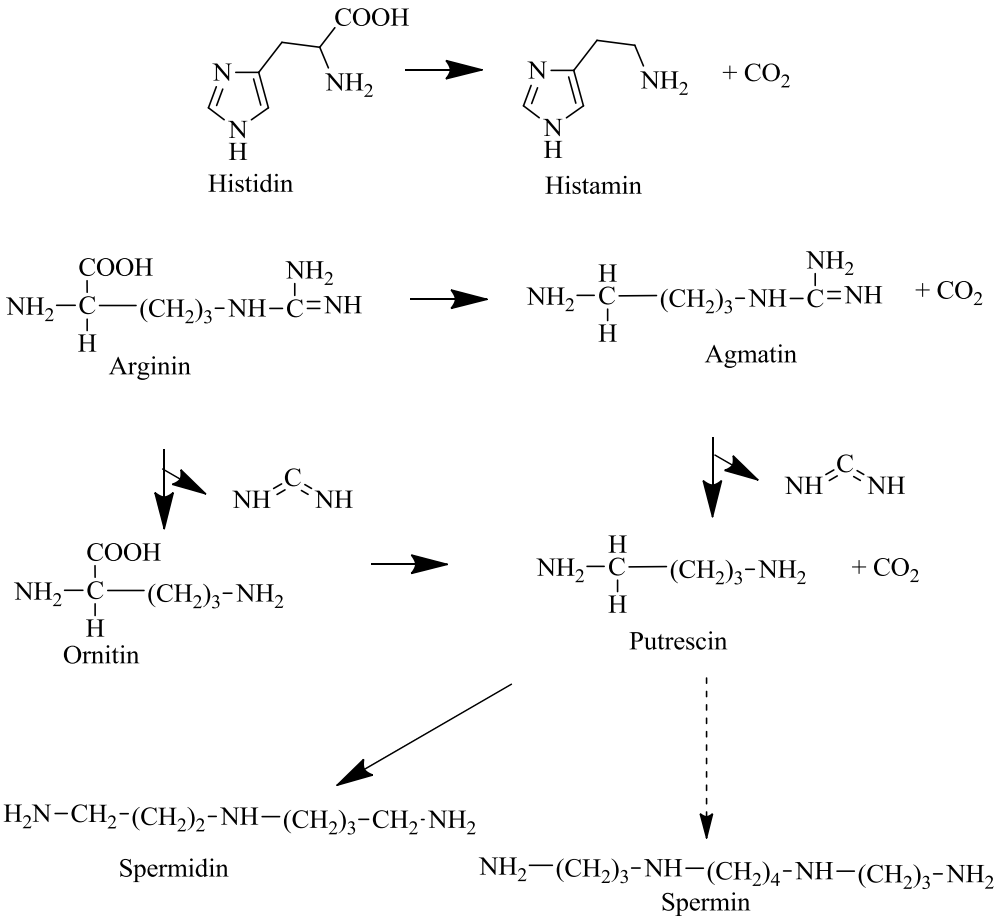


Obr. 2. Dekarboxylace aminokyselin [7]

Z argininu vzniká agmatin, nebo může vstupovat do ornitinového cyklu, pomocí něhož může vzniknout následnou dekarboxylací putrescin. Spermin vzniká metylací spermidinu, které se účastní S - adenozylmethionin. Z lyzinu se bakteriální aktivitou *lyzindekarboxylázy* stává kadaverin a z histidinu působením *histidindekarboxylázy* vzniká histamin. Dekarboxylací tyrozinu je tvořen za pomocí *tyrozindekarboxylázy* tyramin (viz Obr. 3) a jeho následnou oxidací vzniká oktopamin, který funguje jako neurotransmiter [12, 13]. Z fenylalaninu je generován za pomocí *fenylalanindekarboxylázy* β-fenyletylamin. Dekarboxylací tryptofanu *tryptofandekarboxylázou* vzniká tryptamin, ze kterého je následnou oxidací tvořen serotonin (další neurotransmiter) [6, 7].



Obr. 3. Vznik tyraminu [50]



Obr. 4. Vznik histaminu, agmatinu, putrescinu, spermidinu a sperminu [50]

Předpoklady pro tvorbu BA mikroorganizmy jsou následující:

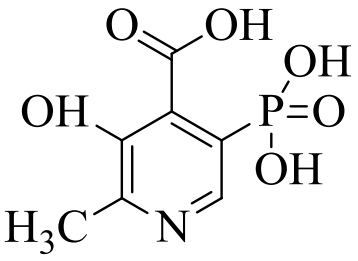
- přítomnost volných aminokyselin v potravině
- přítomnost mikroorganizmů s dekarboxylázovou aktivitou
- příznivé podmínky pro růst mikroorganizmů a dekarboxylační činnost [8, 14].

1.3.1 Účast pyridoxal-5-fosfátu

Pyridoxal-5-fosfát je kofaktorem enzymů dekarboxyláz. Rozeznáváme 2 mechanizmy dekarboxylace: dekarboxylaci závisející na pyridoxal-5-fosfátu a dekarboxylaci na něm nezávislé. Pyridoxal-5-fosfát (PLP) zapojený v Schiffově bázi se váže na aminoskupinu lyzylového zbytku do aktivního místa enzymu (viz Obr. 5). Karbonylová skupina PLP reaguje s aminokyselinami za vzniku výše zmíněných Schiffových bází, které následně podstupují dekarboxylační reakci na odpovídající BA [6].

Dekarboxylace bez účasti PLP vyžaduje pyruvoylové zbytky místo PLP. Tato pyruvoylová skupina je kovalentně vázána k aminoskupině fenylalaninového zbytku na enzymu a je odvozena ze serinového zbytku. Na aktivním proenzymu pyruvoylový zbytek působí podobně jako PLP při dekarboxylaci [6].

Další součástí dekarboxylace je antiport vnitřní membrány využívaný k doručení aminokyselinového substrátu do buňky a k vyloučení dekarboxylovaného produktu z cytoplazmy [16].



Obr. 5. Pyridoxal-5-fosfát [17]

1.3.2 Vznik tyraminu

Mnoho bakterií, včetně bakterií mléčného kvašení (BMK), které jsou spojeny s fermentací potravin, jsou schopné tvořit BA [15]. Konkrétně jsou to zástupci rodu *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus* [15, 19]. Mezi mikroorganizmy s tyrozindekarboxylázovou aktivitou patří bakterie rodu *Bacillus, Citrobacter, Clostridium, Escherichia, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Shigella* a také mnoho příslušníků čeledi *Enterobacteriaceae* [19].

Buňková et al. (2009) uvádí, že u testované skupiny laktokoků byla produkce tyraminu zaznamenána ve třech kmenech *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a ve 3 kmenech *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris,* také u jednoho kmene *Streptococcus thermophilus* a v jednom kmeni *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* [20]. Jejich schopnost produkovat BA, speciálně tyramin, se projevuje především v sýrech a fermentovaných uzeninách. Pro enterokoky je optimální teplota produkce BA okolo 25-37 °C a při hodnotách pH 5-7 [15].

Výzkum Priyadarshani a Rakshit (2011) poukázal na skutečnost, že i probiotické mikroorganizmy *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus bulgaricus* jsou schopné produkce BA a je třeba dekarboxylázovou aktivitu sledovat i u těchto (jinak pro zdraví přínosných) bakterií [21].

1.4 Faktory ovlivňující dekarboxylaci aminokyselin

Kinetiku produkce BA ovlivňuje řada vnějších faktorů, mezi něž např. patří: růst a počet mikroorganizmů schopných tvorby BA, pH, teplota prostředí, aerobní/anaerobní prostředí, dostupnost uhlíku (např. glukóza), přítomnost rostoucích faktorů, koncentrace NaCl, vodní aktivita atd. [23].

1.4.1 pH

Hodnota pH je jeden z nejdůležitějších faktorů ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu. Růst mikroorganizmů i jejich biochemická činnost jsou silně ovlivněny koncentrací vodíkových iontů v prostředí. Každý mikrobní druh se rozmnožuje pouze v určitém rozmezí pH [14, 24].

Nízké pH má významný vliv na produkci BA. V kyselém prostředí je činnost dekarboxylázy podporována. V prostředí s neutrálním a alkalickým pH mohou být BA rovněž produkovány, avšak pouze za předpokladu, že bakterie, které je produkují, dokážou prostředí dostatečně okyselit [25, 30]. Optimální pH pro dekarboxylační enzymy se pohybuje okolo pH 4,0-5,5 [14].

Rychlý pokles pH prostředí může množství BA redukovat nebo dokonce vést i ke zpomalení růstu jejich producentů [26]. Bakterie rodu *Bifidobacterium*, zejména jeho probiotické druhy, jsou schopny tolerovat velmi nízké pH (až pH 3), které odpovídá pH žaludečních šťáv [15].

1.4.2 Teplota

Teplota vnějšího prostředí je jedním z hlavních faktorů, které ovlivňují rychlost rozmnožování mikroorganizmů i samotnou životaschopnost. U každého mikroorganizmu rozeznáváme tři základní teploty: minimální teplotu, tj. nejnižší teplotu, při které se daný druh rozmnožuje ještě zjistitelnou rychlostí; optimální teplotu, při níž se rozmnožuje nejrychlejší rychlostí a maximální teplotu, tj. nejvyšší teplotu, při které je se schopen mikroorganizmus ještě rozmnožovat [24].

Stanovení minimální teploty je obtížné, neboť s klesající teplotou klesá postupně i rychlost rozmnožování. Zatímco optimální teplota je obvykle asi o 30 °C vyšší než teplota minimální určitého mikroorganizmu. Rozdíl mezi optimální a maximální teplotou určitého mikroorganizmu obecně činí 5-10 °C. To znamená, že při zvýšení teploty nad optimální teplotu dochází k prudkému poklesu rychlosti rozmnožování a nakonec jeho zastavení. Další zvýšení teploty může vést až k usmrcení buněk [24].

Teplota mezi 20-37 °C je optimální pro růst většiny bakterií obsahující dekarboxylázy. Přičemž nízké teploty jejich růst zpomalují a klesá tak logicky i produkce BA [4, 24].

Jako prevenci proti tvorbě BA používáme zmrazování, které je účinnější než chlazení. Vysoké teploty mohou být také použity k prodloužení trvanlivosti a zajištění zdravotní nezávadnosti potravin z hlediska rozvoje dekarboxyláza pozitivní mikroflóry [4].

1.4.3 Koncentrace NaCl

Koncentrace NaCl silně ovlivňuje tvorbu BA v médiu. Značný vliv na rozmnožování mikroorganizmů má kolísání poměru sůl/voda během skladování a výroby potravin [26].

Se zvyšováním koncentrace NaCl dochází většinou k poklesu koncentrace nahromaděných BA, zatímco proteolytická aktivita se zvyšuje při střední koncentraci soli. Tato skutečnost poukazuje na fakt, že vztah mezi proteolytickou aktivitou a koncentrací NaCl je zřejmě nezávislý [28]. Přidání soli do kultivačního prostředí může být prospěšné a to z důvodu dodání sodných iontů, jenž se podílejí na regulaci intracelulárního pH a mají esenciální roli v tyrozindekarboxylázové aktivitě. Vyměňují se s vodíkovými ionty (Na^+ dovnitř a H^+ ven z buňky), a proto jsou důležité pro antiportový systém [23].
Množství 3,5 % (w/v) NaCl vede k inhibici produkce histaminu a při 0,5 % (w/v) je jeho tvorba v *Lactobacillus buchneri* zastavena úplně [27].

1.4.4 Vodní aktivita

Veškeré chemické reakce v živé buňce probíhají ve vodním prostředí, a proto zde voda musí být přítomna v dostatečném množství (nejlépe v kapalném stavu) [24].

Potřeba vody může být u mikroorganizmů kvantitativně vyjádřena rozmezím vodních aktivit prostředí, při nichž se dané mikroorganizmy mohou rozmnožovat. Vodní aktivita ($a_{H2O,}$ a_w) určitého roztoku se rovná poměru tlaku vodních par nad tímto roztokem ku tlaku vodních par nad destilovanou vodou za jinak stejných podmínek [24].

Většina bakterií je schopna se rozmnožovat v živném prostředí o a_{H2O} v rozmezí 0,99-0,93. Některé bakterie se však rozmnožují pouze za nízké a_{H2O} (0,65-0,63), které panují např. při vysokých koncentracích chloridu sodného (20-30% w/v) [24].

Z chemikálií se pro snížení vodní aktivity v potravinách nejčastěji používá sacharóza o konečné koncentraci 50-70 % (w/v) (kandované ovoce, sirupy), nebo chlorid sodný o konečné koncentraci 10-15 % (w/v) (solené maso, ryby, zelenina, houby) [24].

1.4.5 Přítomnost O_2

Anaerobní, fakultativně anaerobní i aerobní mikroorganizmy jsou schopny produkovat BA. Anaerobní prostředí podporuje dekarboxylaci a vznik BA [7, 29].

BMK fermentují sacharidy za fakultativně anaerobních podmínek. Pro většinu BMK není vzdušný kyslík toxický, rostou proto i za přítomnosti vzduchu (jsou aerotolerantní, mikroaerofilní nebo fakultativně anaerobní). Probiotické bifidobakterie jsou však striktně anaerobní a rostou optimálně v atmosféře s 10 % CO_2. Při přípravě speciálních kysaných nápojů (probiotické jogurty a nápoje) se právě používají anaerobní bifidobakterie např. *Bifidobacterium longum* BB536 [10].

1.4.6 Vliv cukrů

Optimální množství glukózy pro růst organizmů je 0,50-2,00 % (w/v). Obsah 3,00 % (w/v) způsobuje inhibici syntézy dekarboxyláz [27]. Vliv laktózy na produkci BA není v dostupné literatuře dostatečně popsán. Buňková et al. (2011) uvádí, že u bakterií rodu *Lactococcus* koncentrace přidané laktózy 0,25-1,00 % (w/v) neměla vliv na produkci BA. Pokud ale nebyla laktóza přítomna při kultivaci, byla produkce BA omezena [23].

Vysoký obsah mono- a disacharidů je fermentován BMK za vzniku zvláště kyseliny mléčné a jiných organických kyselin, které pak ovlivňují pH. Metabolizmus těchto sacharidů v BMK je uveden dále v textu [10].

1.4.7 Další faktory ovlivňující dekarboxylázovou činnost

Na dekarboxylázovou aktivitu má také vliv přítomnost pyridoxalfosfátu. Pokud je přítomen, je automaticky využíván. Dále také je nutná přítomnost množství aminokyselin, bez kterých by vlastně dekarboxylace nemohla začít [10].

1.5 Význam biogenních aminů v organizmu člověka

BA se přirozeně vyskytují v lidském těle. Jejich nedostatek může vést k různým poruchám, stejně tak i jejich nadbytek může ohrozit zdraví jedince. Za běžných podmínek pro člověka neznamenají žádné nebezpečí [30]. Po konzumaci malého množství kontaminované potraviny nenastávají komplikace, protože malá množství mohou být metabolizována ve střevech, kde je přítomen relativně výkonný detoxifikační systém, který je založen na aktivitě enzymů monoaminooxidázy (MAO), diaminooxidázy (DAO) a histidinmetyltransferázy (HMT). To ale neplatí pro požití většího množství BA, které může vést k alergiím, ke zvýšení sekreci žaludeční kyseliny, zvýšení srdeční aktivity, k migrénám, trachykardii. Mohou mít efekt na nervový a vaskulární systém a další [9, 16, 30, 31].

Potravinová alergie je reakce organizmu na konzumaci všední stravy, která je dána imunitními mechanizmy v organizmu. Lze ji očekávat v každém věku a je zjišťována u cca 8-10 % dětí a 3 % dospělých [32].

1.5.1 Histaminová otrava

Histamin se běžně vyskytuje v lidském těle. Ve vysokých koncentracích se objevuje i v potravinách [6]. Intoxikace histaminem je známá jako histaminová otrava a zahrnuje několik příznaků, které jsou popsány níže v tabulkách (viz. Tab. 2 a Tab. 3) [6, 31].
Ve fermentovaných jídlech je akceptovatelné množství histaminu přibližně okolo 100-800 $mg.kg^{-1}$ [21].

1.5.2 Otrava tyraminem

Tyramin reaguje s inhibitory MAO, které vedou k hypertenzní krizi a dietou indukované migréně [4, 6].

Ve fermentovaných jídlech je akceptovatelné množství tyraminu přibližně 50-100 $mg.kg^{-1}$. Na druhou stranu přísun tyraminu v obvyklých dávkách může vyvolat nepříznivé účinky u jedinců léčených psychofarmaky, které inhibují správnou funkci MAO [21].

Tab. 2. Přehled biogenních aminů a jejich farmakologický efekt [6]

BA	Farmakologický efekt
Histamin	Osvobozuje adrenalin a noradrenalin Vliv na vylučování žaludečních šťáv Vzrušuje stěny hladkého svalstva dělohy, střev, dýchací soustavy Stimuluje smyslové a motorické neurony
Tyramin	Zvyšuje srdeční výkon Periferní vazokonstrikce Ovlivňuje slinění a slzení Zvyšuje dýchání Zvyšuje hladinu cukru v krvi Uvolňuje noradrenalin ze sympatického nervového systému Způsobuje migrénu
Putrescin a kadaverin	Hypotenze Bradykardie Křeče žvýkacího svalstva Paréza končetin Zvyšuje toxicitu jiných aminů
β-fenyletylamin	Uvolňuje noradrenalin ze sympatického nervového systému Zvyšuje krevní tlak Způsobuje migrény

Tab. 3. Přehled biogenních aminů a nemoci, které způsobují [6]

BA	Onemocnění
Histamin	Rakovina (kůže), oxidační stres, alergie, schizofrenie, imunoterapie
Serotonin	Deprese, schizofrenie, Parkinson, Alzheimer, stavy úzkosti, migrény, obezita, encefalopatie, inhibice krevních destiček
Dopamin	Alzheimer, Parkinson, schizofrenie
Tyramin	migrény, hypertenze, schizofrenie, Parkinson, deprese
Tryptamin	deprese, schizofrenie, jaterní encefalitída
Polyaminy	ischémie, svalová dystrofie, epilepsie, Alzheimer, psoriáza, cystická fibróza, rakovina
Adrenalin	Hyperaktivita
Noradrenalin	Alzheimer, schizofrenie, post-traumatický stres,

Další funkce, kterou mají BA, je funkce neurotransmiterů. Neurotransmitery jsou nízkomolekulární chemické látky vznikající v nervové soustavě živočichů a slouží k přenášení

vzruchů [3]. BA známé jako neurotransmitery jsou katecholaminy, indolaminy a imidazolaminy. Mezi nejdůležitější katecholaminy řadíme dopamin, epiferin, norepiferin. Nedostatek nebo nadbytek těchto aminů v lidském mozku je zodpovědný za neurologické poruchy [33].

2 BIOGENNÍ AMINY V POTRAVINÁCH

2.1 Mikroorganizmy vykazující dekarboxylázovou aktivitu

Mnoho mikroorganizmů má schopnost produkovat BA včetně grampozitivních a gramnegativních bakterií různých rodů a druhů. Současně je tato schopnost považována za kmenovou charakteristiku. Přítomnost BA v potravinách je nežádoucí a je způsobena především mikrobiální aktivitou [14, 16].

Bylo nalezeno mnoho druhů mikroorganizmů vykazující dekarboxylázovou aktivitu (Tab. 4). Mezi bakterie schopné produkovat BA patří také BMK, jejichž nejznámější zástupci jsou: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus* a *Leuconostoc*. Mezi dekarboxyláza pozitivní mikroflóru pak typicky patří zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*, kmeny rodů: *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella* a *Shigella*, také zástupci čeledi *Micrococcaceae* jako: *Micrococcus* a *Kocuria* [19, 28].

Tab. 4. Mikroorganizmy produkující BA [34]

BA	Typ	Produkující mikroorganizmus
Histamin	gramnegativní	*Enterobacteriaceae* (např. *Morganella morganii*)
	grampozitivní	*Lactobacillus buchneri, Lactobacillus curvatus, Lactobacillus helveticus, Streptococcus thermophilus*
Tyramin	gramnegativní	-
	grampozitivní	*Enterococcus casseliflavus, Enterococcus durans, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Enterococcus hirae, Lactobacillus brevis, Lactobacillus curvatus, Streptococcus thermophilus*
Putrescin	gramnegativní	*Enterobacteriaceae* (např. *Proteus*)
	grampozitivní	*Enterococcus faecalis, Enterococcus hirae, Lactobacillus brevis, Lactobacillus curvatus, Lactococcus lactis*
Kadaverin	gramnegativní	*Enterobacteriaceae, (*např. *Morganella morganii*), *Pseudomonas putida, Halomonas* sp.
	grampozitivní	-
Tryptamin	gramnegativní	*Morganella morganii , Proteus, Serratia*
	grampozitivní	-
Fenyletylamin	gramnegativní	*Halomonas, Serratia*
	grampozitivní	*Enterococcus*

2.2 Fermentace sacharidů u bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií

Fermentace je metabolický proces, ve kterém jsou sacharidy a jejich příbuzné látky částečně oxidovány za vydání energie bez přítomnosti vnějších elektronových akceptorů [35]. Při tomto procesu se tvoří ATP. Jde o hydrogenaci, při níž je vodík předáván na NAD^+ za uvolnění CO_2 [59]. Konečnými elektronovými akceptory jsou organické látky produko-

vané přímo z rozložených sacharidů, které jsou dále redukovány. V důsledku zmíněného procesu se uvolňuje málo energie [35]. Fermentace jsou tedy nevýhodné, protože jednoduché organické látky mají vysokou energetickou hladinu [59]. Charakteristické pro BMK jsou dvě hlavní cesty kvašení cukrů: homofermentativní a heterofermentativní [35].

2.2.1 Homofermentativní mléčné kvašení

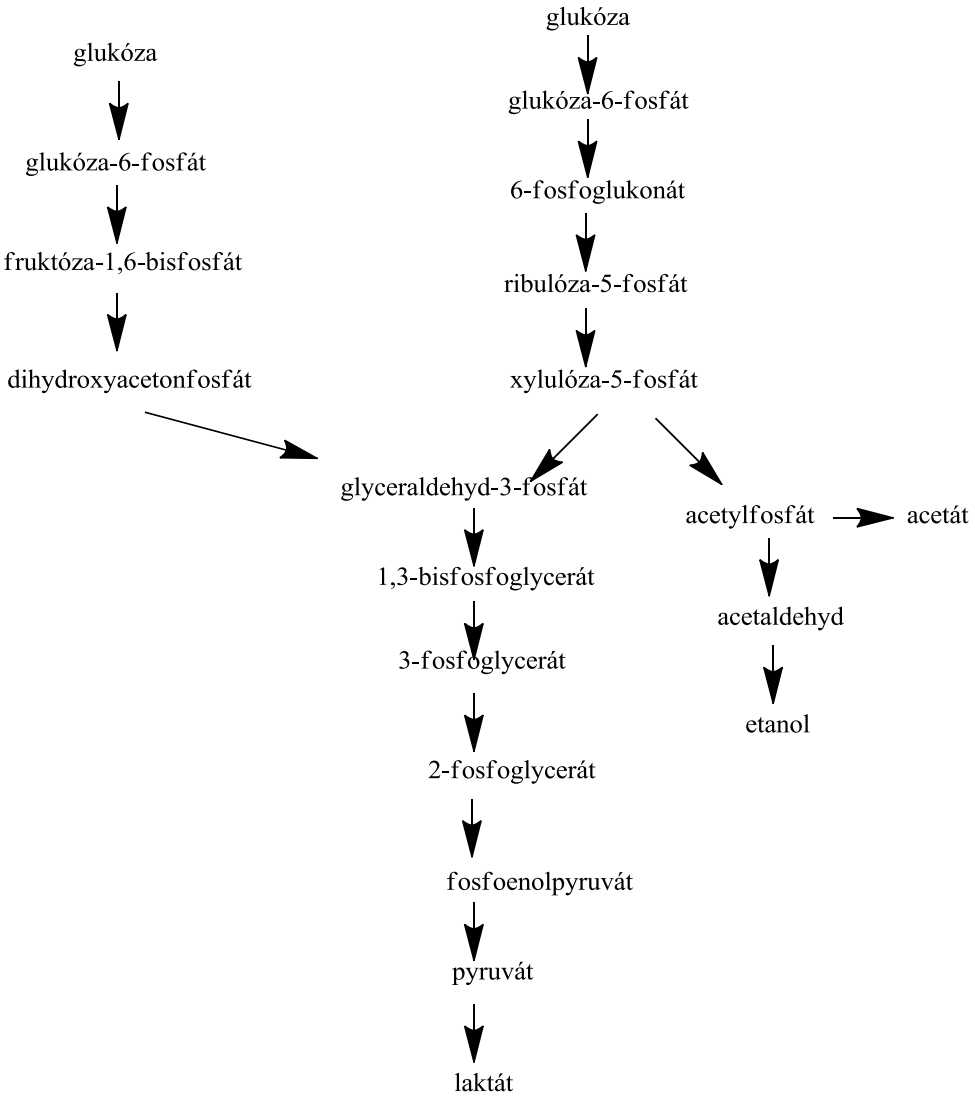
Homofermentativní mikroorganizmy jsou schopny extrahovat dvakrát více energie z dané glukózy než heterofermentativní. Někteří z nich produkují za pomocí pentóz kyselinu octovou a mléčnou (Obr. 6) [35]. Mezi homofermentativní BMK patří zástupci rodů *Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus, Enterococcus* a některé druhy *Lactobacillus* [22]. Homofermentativní BMK produkují laktát prakticky jako jediný produkt fermentace glukózy [15].

2.2.2 Heterofermentativní mléčné kvašení

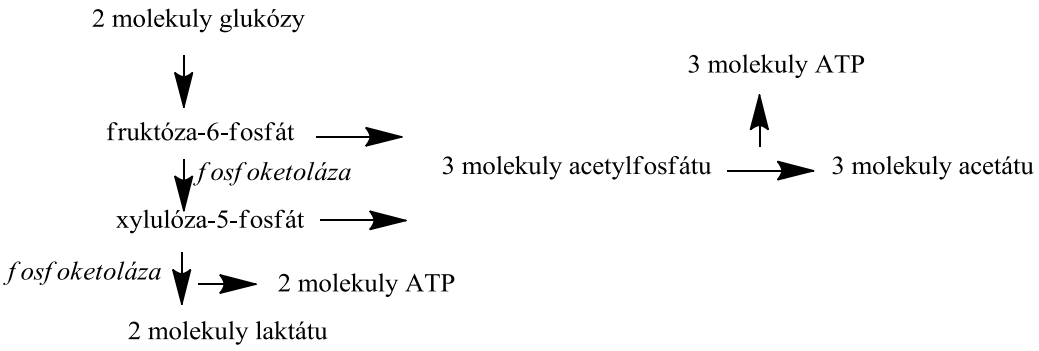
Heterofermentativní BMK štěpí hexózy za pomocí fosfoketolázové dráhy (viz Obr. 6). Postrádají základní enzymy glykolytické dráhy - aldolázy [36]. Za pomocí fosfoketolázové dráhy provádí heterofermentaci BMK jako např. *Leuconostoc*, *Oenococcus* a zástupci rodu *Lactobacillus* [22]. Fermentace pentóz (xylulóza a ribóza) vede k tvorbě pyruvátu a acetylfosfátu. Ty jsou následně přeměněny na laktát a acetát (Obr. 6) [22]. Na jednu molekulu hexózy připadá přibližně výnos energie 2 molekuly ATP a ekvimolární množství laktátu, acetátu, etanolu a CO_2 [36, 60].

2.2.3 Fosfofruktoketolázová dráha

Bakterie rodu *Bifidobacterium* mají jiný mechanizmus heterofermantitivního kvašení než BMK. Nicméně také využívají fosfoketolázovou dráhu (viz Obr. 7). Těmto bakteriím chybí aldoláza i glukóza-6-dehydrogenáza, ale obsahují dvě aktivní fosfoketolázy. První katalyzuje štěpení fruktózu-6-fosfát na erytróza-4-fosfát a druhá vznik acetylfosfátu z xylulóza-5-fosfát. Glyceraldehyd je přes glykolýzu přeměněn kyselinou pyrohroznovou na kyselinu mléčnou a acetylfosfát přechází na kyselinu octovou (z 2 molů glukózy vznikají 3 moly acetátu a dva moly laktátu). Tento proces je energeticky výhodnější než heterofermentativní kvašení, protože ze dvou molekul hexózy vzniká 5 molekul ATP [60].



Obr. 6. Homofermentativní (vlevo) a heterofermentativní cesta (vpravo) [22]



Obr. 7. Metabolizmus bifidobakterií (fosfofruktoketolázová dráha) [5]

2.3 Výskyt biogenních aminů ve fermentovaných výrobcích a původci jejich vzniku

Fermentované výrobky jsou takové, které jsou záměrně „infikovány“ bezpečnými požívatelnými mikroorganizmy, jejichž enzymy (hlavně amylázy, proteázy a lipázy) hydrolyzují polysacharidy, proteiny, lipidy a tím dodávají potravinám žádanou chuť a vůni [37].

Většina fermentovaných výrobků se liší ve vlastnostech jako je nutriční hodnota, funkčnost, ekonomická hodnota a organoleptické vlastnosti [36].

Během přípravy fermentovaných výrobků můžeme očekávat přítomnost mnoha druhů mikroorganizmů, z nichž některé jsou schopny produkovat BA. Ve většině výrobků, ve kterých roste počet BMK, je obsaženo značné množství putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu [14]. S fermentovanými potravinami se musí zacházet velmi opatrně. Nejdůležitějším krokem při výrobě fermentovaných potravin je konzervace. Příkladem konzervace je přítomnost specializovaných kultur v potravinách, které obsahují organizmy produkující specifické antibakteriální látky, které díky konzervaci mohou být skladovány v potravinách a přitom jsou i nadále bezpečné [36]. Fermentované potraviny patří mezi potravinářské produkty, které mohou způsobovat intoxikaci prostřednictvím obsažených BA [34].

V současnosti je trendem používat při výrobě fermentovaných potravin probiotické kultury. Ty mohou mít funkci startérových kultur a do výrobků jsou hlavně přidávány pro dosažení pozitivního účinku na lidské zdraví. Probiotika jsou definována jako živé mikroorganizmy přítomné v potravě, které po požití v určitém množství příznivě ovlivňují složení a rovnováhu střevní mikroflóry, a tím i celkové zdraví člověka. Bohužel i zástupci probiotických kultur patří mezi potencionální producenty BA, a je proto nutné prověřovat je na schopnost jejich tvorby [39].

Kultury probiotických bakterií musí splňovat následující požadavky. Musí být:

- humánního původu,
- schopné přežít průchod trávicím traktem,
- schopné v místě působení (ve střevě) se množit a nesmí být toxické či patogenní [39].

Produkty mléčné fermentace klasifikujeme dle závislosti na vlastnostech mléčné mikroflóry na mezofilní, termofilní, probiotické (nebo terapeutické). Příklady zmíněných výrobků jsou následující:

- mezofilní- např. podmáslí, šlehačka;
- termofilní- např. jogurt, acidofilní podmáslí;
- probiotické- např. yakult, acidofilní mléko, bio jogurty [38].

Ve většině fermentovaných mléčných produktů klesá hodnota pH okolo 4,6 což způsobuje negativní dopad na životaschopnost a množení BMK [40].

2.3.1 Mléko

Nejčastějším producentem BA v mléce jsou gramnegativní bakterie, hlavně zástupci čeledi *Enterobacteriaceae,* které v mléce produkují zejména histamin, putrescin a kadaverin [34].

Samotné mléko není významným zdrojem BA (Tab. 5) [16]. Ve studii Silla-Santos et al. (2003) byla detekována v mléce zanedbatelná množství sperminu (40,4 $\mu g.ml^{-1}$), spermidinu (36,25 $\mu g.ml^{-1}$) a putrescinu (13,2 $\mu g.ml^{-1}$). U sperminu a spermidinu není zcela jasné, jestli jsou produkovány mikroorganizmy nebo mají endogenní původ [34, 41]. V poslední době se vyrábějí fermentovaná mléka, ve kterých jsou zahrnuté probiotické mikroorganizmy [43]. Šíření bifidobakterií v mléce je pomalý ve srovnání s BMK využívanými v kultivovaných mléčných výrobcích [42].

Mikroorganizmy s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou jsou přirozenou součástí mléka, které se používá k výrobě sýrů. Proto je důležitá hygienická kvalita mléka, která je pozorně sledována [41].

2.3.2 Sýry

Sýry patří mezi fermentované potraviny, které definujeme jako mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny kaseinu z mléka působením syřidla nebo jiných koagulačních činidel, prokysáním a oddělením podílu syrovátky. Jsou známy po celém světě díky své rozmanitosti, textuře a chuti [44, 45].

Hlavní producenti BA v sýrech jsou BMK a také mnoho dalších mikroorganizmů (grampozitivních i gramnegativních) [8, 34].

Nejznámější BA vyskytující se v sýrech díky mikrobiální aktivitě jsou: tyramin, histamin, kadaverin, putrescin (viz. Tab. 5.) [46]. Gramnegativní mikroorganizmy mohou v sýru zvyšovat koncentraci putrescinu a kadaverinu, *Clostridium* může produkovat histamin, tyramin a tryptamin a některé druhy bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* produkují histamin, tyramin, putrescin, kadaverin a fenyletylamin [41].

Sýry jsou ideálním prostředím pro produkci BA, protože nejsou sterilní a proteolýza kaseinu zajišťuje dostupnost volných aminokyselin, což jsou prekurzory pro vznik BA (viz Tab. 5) [34]. Zabudování bifidobakterií do sýrů závisí na vybraných kmenech, na aktivitě BMK, na složení, na druhu sýra a na podmínkách zpracování a zrání [42]. Přítomnost aminů v sýrech závisí na druhu sýru, věku a mikroflóře (původní flóře, startovacích mikroorganizmech, kontaminujících mikroorganizmech) [47].

Tab. 5. BA vyskytující se v mléčných výrobcích [16]

Produkt	**Biogenní aminy [mg.kg^{-1}]**				
	Histamin	Tyramin	Putrescin	Spermidin	Spermin
Mléko				0,1	0,86
Tvaroh	0,98	2	3,38	1,82	0,89
Syrovátka	0,28	0,65		0,24	
Jogurt	13				
Nezrající sýry ze syrového mléka	110,8	233,33	38,75		
Nezrající sýry z pasterizovaného mléka	0-60,2	22,02			
Tvrdé sýry ze syrového mléka	0-510,2	453,77	0-176,32		
Tvrdé sýry z pasterizovaného mléka	0-65,45	301,06	0-175,39		
Modré sýry ze syrového mléka	0-1041,81	1051,98	0-875,8		
Modré sýry z pasterizovaného mléka	0-127,02	526,63	0-237,56		
Idiazabal		238	103,3		
Feta	84,6	246	193		
Terrincho sýr	15,6	216,68	217,84		
Semicotto Caprino	1,8	3,2	9	1,4	0,2
Polotvrdý italský	378,12	373,45	286,51		

2.3.3 Jogurt

Jogurt je fermentovaný mléčný produkt, který se obvykle vyrábí z pasterizovaného mléka [40]. Je produkován kyselým srážením mléka prostřednictvím jogurtových termofilních kultur, které jsou tvořeny vybranými kmeny *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* v poměru 1:1 [35]. Díky jeho vysoké titrační kyselosti (a nízkému pH) představuje jogurt nevhodné prostředí pro rozvoj patogenů [45]. Hodnota pH většiny komerčních produktů se pohybuje v rozmezích okolo 3,7-4,3. Avšak optimální hodnota pH pro bifidobakterie se pohybuje okolo 6,5-7, jejich růst je inhibinován již při pH 5, proto se pH jogurtu musí stále udržovat okolo 4,6, jinak by množství bifidobakterií značně klesl [42].

2.3.4 Kefír

Kefír obsahuje širokou škálu mikroorganizmů, patří mezi ně: *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris, Lactococcus lactis* ssp. *lactis, Lactobacillus kefir, Lactobacillus kefiranofaciens, Lactobacillus brevis, Lactobacillus acidophilus, Leuconostoc* spp., *Acetobacter* spp., *Kluyveromyces* spp. a *Saccharomyces* spp., *Candida* spp. [43]. Özdestan a Üren (2010) ve svém výzkumu zjistili, že se v kefíru objevují BA a to zejména tyramin v množství mezi 2,4 až 35,2 $mg.l^{-1}$ [34].

2.3.5 Fermentované masné výrobky

Fermentace je tradiční konzervační technika, která poskytuje relativně stabilní masné výrobky s typickými senzorickými vlastnostmi. Tento děj je typický pro uzeniny, ve kterých se nachází mleté maso společně s různými ingrediencemi jako je sůl, cukr, koření, urychlovače tuhnutí aj. [49].

2.3.6 Maso

Maso a masné výrobky jsou známé pro relativně častý výskyt BA. Mezi nejrozšířenější BA, které jsou obsaženy v masných výrobcích, patří tyramin, kadaverin, putrescin a histamin. Spermin se vyskytuje u teplokrevných zvířat a spermidin se v mase vyskytuje zřídka. Některé aminy, zvláště tyramin, putrescin a kadaverin se vytvářejí již během skladování [28].

Čerstvé a zpracované vepřové maso obsahuje vysoké hladiny adrenalinu, spermidinu a sperminu, nízký obsah noradrenalinu, putrescinu, histaminu, kadaverinu a tyraminu. Vel-

ké množství kadaverinu v hovězím mase bylo spojováno se silnou kontaminací bakteriemi čeledi *Enterobacteriaceae*. Vysoká produkce tyraminu v uzeninách může být spojována také s kontaminací BMK. Výskyt BA ve fermentovaných uzeninách může mít tedy původ z kontaminované suroviny nebo ze samotného procesu fermentace. Například bakterie *Carnobacterium divergens* byla zodpovědná za vznik tyraminu ve vakuově zabaleném mase. Vznik putrescinu a kadaverinu zase byl zapříčiněn díky zástupcům čeledi *Enterobacteriaceae* nebo rodu *Pseudomonas* [27].

2.3.7 Fermentované salámy

Tab. 6. Výskyt BA ve fermentovaných salámech [50]

Fermentovaný salám	Histamin	Tyramin	Kadaverin	Putrescin	Spermidin	Spermin
			[mg.kg^{-1}]			
Belgický	4,1	36,8	2,5	15,1	x	x
Finský	54	88	50	79	4	31
Ruský	89	110	10	93	5	33
Dánský	9	54	180	130	7	37
Egyptský	5,3	14	19	39	2,3	1,8
Poličan	17,5	89	6	54	2,5	2
Chorizo	2,2	282,3	20,1	60,4	x	x
Fuet	28,5	190,7	18,9	71,6	x	x

x....nebyl detekován obsah BA

Větší množství aminů se tvoří v salámech o větším průměru a vyšší koncentrace BA nalezneme spíše uvnitř salámu než na okraji (Tab. 6). Nižší obsah vody v důsledku intenzivnějšího sušícího procesu přispívá ke snížení dekarboxylázové aktivitě mikroorganizmů tvořící BA [50].

V dnešní době se můžeme setkat se snahou využít i uzeniny jako médium pro doručení probiotik do organizmu člověka. Uzeniny by měly být ve stavu, který podporuje přežití probiotických bakteriálních kmenů a musí být vyrobeny tak, aby probiotické bakteriální kmeny vykazovaly blahodárné účinky. Lze předpokládat, že jakékoliv snížení pH (pH<5) dlouhodobé zrání (>1 měsíc), sušení nebo nadměrné teplo má potenciál k poškození nebo usmrcení probiotických bakterií [51].

3 ZÁSTUPCI PROBIOTICKÉ MIKROFLÓRY

3.1 Startérové kultury

V potravinářském průmyslu se v dnešní době, místo přirozeně přítomné mikroflóry, využívají sestavené startérové kultury se specifickými vlastnostmi, aby bylo dosaženo standardního finálního produktu [34]. Mezi bakterie užívané jako startérové kultury při přípravě fermentovaných mléčných výrobků náleží zejména BMK, ale nejen BMK mohou být používány při výrobě těchto výrobků. Jako kultury jsou aplikovány např. i kmeny *Propionibacterium shermanii* a probiotické *Bifidobacterium* spp. Dále jsou pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků využity bakterie *Brevibacterium linens* a různé druhy plísní (konkrétně *Penicillium*) [57].

Základními BMK jsou laktokoky, laktobacily a streptokoky [34]. V dnešní době je trend používat při výrobě fermentovaných potravin probiotické kultury. Ty mohou mít funkci startovacích kultur a do výrobků jsou přidávány pro dosažení pozitivního účinku na lidské zdraví [39]. Bifidobakterie jsou přidávány do probiotických potravin a jsou důležitou součástí startérových kultur jogurtů a jiných mléčných výrobků [36]. Druhy *Bifidobacterium bifidum* (*Bifidobacterium* dále jen *B.*), *B. infantis* a *B. longum* jsou často nezbytnou součástí zákysových kultur při výrobě mléčných kysaných nápojů [58].
Žádoucí vlastnosti startérových kultur pro výrobu fermentovaných mléčných produktů jsou následující: kontrolovaná produkce mléčné kyseliny, krátká lag-fáze, fágová rezistence, jejich jednoduchá výroba, stabilita a konzistence, tvorba požadované chuti a textury a produkt bez nežádoucích příchutí [36].

3.2 Rod *Bifidobacterium*

Rod *Bifidobacterium* byl poprvé izolován a popsán v letech 1899-1900. Objevitel bifidobakterií byl Tissier, který jako první popsal jejich morfologii a pojmenoval je jako *Bacillus bifidus*. Rod *Bifidobacterium* náleží do kmene *Actinobacteria*, třídy *Actinobacteria*, podtřídy *Actinobacteridae*, do řádu *Bifidobacteriales* a rodiny *Bifidobacteriaceae*. Do této rodiny patří i ostatní rody jako jsou: *Aeriscardovia, Falcivibrio, Gardnerella, Parascardovia* a *Scardovia* [52].

Bifidobakterie jsou obecně charakterizovány jako grampozitivní, plyny netvořící, striktně anaerobní, nesporogenní, nepohyblivé a kataláza negativní bakterie [53]. Tolerance kyslíkové závislosti se může lišit kmen od kmene, např. zástupci druhů *B. infantis, B. breve*

a *B. longum* jsou schopné růstu i za aerobních podmínek [42]. Jsou chemoorganotrofní, vyskytují se v lidském i zvířecím těle. Jsou izolovány zejména z výkalů, z bachoru skotů, lidské vagíny, zubního kazu a střeva včel [52].

Bifidobakterie, jak již bylo zmíněno v kapitole o fermentacích (podkapitola 2.2.3), produkují kyselinu mléčnou a octovou v poměru 2:3 [40]. Kyselina octová má silnější antagonistický účinek na nevítané gramnegativní bakterie, než má kyselina mléčná [10]. Různé enzymatické schopnosti bifidobakterií a náročnost na kultivační prostředí ztěžují výběr jednotlivých medií pro všechny druhy. V mléku rostou bifidobakterie velmi špatně, a to z důvodu nedostatků krátkých peptidů a volných mastných kyselin. Některé bifidobakterie vykazují lepší nárůst, když je mléko obohaceno o hydrolyzát kaseinu nebo kvasnicové extrakty. Ačkoliv mnoho bifidobakterií nejsou typicky acidofilní, mnoho kmenů přežívá pH hodnotu okolo 4 a méně [40].

Rod *Bifidobacterium* je často považován za BMK. Ačkoliv sdílí některé z jejich typických vlastností, je po fylogenetické stránce nepříbuzný a používá jedinečný způsob kvašení sacharidů [15]. Charakteristickým enzymem sacharidového metabolizmu bifidobakterií je fruktóza-6-fosfát fosfoketoláza (EC 4.1.2.22). Tento enzym je specifický pro bifidobakterie a není přítomen v BMK [15]. I když bifidobakterie mají fermentativní metabolizmus, nejsou využívány samostatně pro výrobě jakéhokoliv fermentovaného produktu. Lze je nalézt ve většině surových potravinových surovin. Díky probiotickým schopnostem jsou přidávány do jogurtů a dalších mléčných výrobků [36]. K dnešnímu dni rod *Bifidobacterium* obsahuje 47 druhů [65].

Bifidobakterie produkují vitamíny, enzymy (které se mohou účastnit trávení) a krátké mastné kyseliny. Např. při podávání antibiotika klindamycinu, které způsobuje zácpu, může podávání fermentovaného mléka s *B. longum* a *Lactobacillus acidophilus* zlepšit gastrointestální potíže. Další studie prokázala, že při používání erytromycinu současně s *B. longum* dochází k rovněž významnému omezení hmotnosti stolice a její frekvence [54].

Je známé, že míra prospívajících mikroorganizmů v lidském střevě hraje důležitou roli v podpoře a uchování lidského zdraví. Patří mezi ně bifidobakteriální druhy fylogeneticky významných skupin s charakteristickými vlastnostmi, jako jsou biochemické a probiotické vlastnosti. *B. animalis* a *B. lactis* vykazují vysokou úroveň imunomodulační aktivity, jakož i toleranci vůči žaludeční kyselině a žlučovým kyselinám [55].

3.3 Bakterie mléčného kvašení

BMK je heterogenní skupina grampozitivních bakterií, které jsou nesporulující, kataláza negativní a fakultativně anaerobní. Mezi typické BMK patří rody: *Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus, Oenococcus*, *Enterococcus* a *Leuconostoc*. Dle biochemického hlediska je rozdělujeme na homofermentativní a heterofermentativní (viz kapitola 2.2.1 a 2.2.2). Vyskytují se ubikvitně. Některé druhy jsou využívány k přípravě fermentovaných potravin jako startérové kultury. BMK jsou také důležité pro správnou fyziologickou funkci lidského i zvířecího organizmu, zvláště pak působí v intestinálním traktu [22].

3.3.1 Rod *Lactobacillus*

Lactobacily jsou grampozitivní, kataláza negativní, nesporulující mikroorganizmy s nízkým obsahem G+C (v DNA 32-55 %). Rostou při pH 5,5-6,2. Je to druhově velmi početný rod, jehož některé druhy jsou aplikovány jako probiotika, nebo běžně ve fermentovaných potravinách jako součást startérové kultury, kdy mají antibakteriální efekt. Nachází se v ústní dutině, trávicím traktu, vagíně, v rostlinných silážích [61].

Rod *Lactobacillus* se podle metabolizmu hexóz podrobněji dělí na 3 skupiny. Homofermentativní lactobacily fermentují hexózu na mléčnou kyselinu za pomocí Embden-Meyerhofovy dráhy, nefermentují pentózy nebo glukonát. Fakultativně heterofermentující lactobacily fermentují hexózy za vzniku kyseliny mléčné, etanolu, acetátu. Pentózy jsou fermentovány díky fosfoketolázové dráze. Obligátně heterofermentativní lactobacily fermentují hexózu na kyselinu mléčnou, acetát nebo etanol a oxid uhličitý, přičemž využívají fosfoketolázovou dráhu. Produkují peptidázy, proteinázy, aminopeptidázy atd. [40].

3.4 Metody stanovení biogenních aminů

Důvodem, proč kontrolovat množství aminů v potravinách je, jak již bylo mnohokrát zmíněno, jejich toxicita. Dalším důvodem je pak použití přítomnosti BA jako indikátorů jakosti potravin [9].

Ke stanovení BA můžeme využívat metody chemicko-analytické, nebo metody biologické. Mezi chemicko-analytické metody můžeme zařadit vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, plynovou chromatografii, tenkovrstvou chromatografii a kapilární elektroforézu. Do biologických metod patří kultivační metoda, kdy se používají média s indikátory pH (pouze orientační metoda, dává falešně pozitivní i negativní výsledky) [56, 63].

Potenciál tvorby BA bakteriemi lze stanovit pomocí molekulárně biologické metody. Tato metoda, ale rovněž částečně patří mezi analytické, protože namnožená část DNA podstupuje separaci na elektroforéze [56].

V praxi je nejčastěji využívána vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích s fluorescenční nebo UV detekcí po derivatizaci (dansylaci, benzoylaci nebo derivatizaci reakcí s 9-fluorometyl chloroformátem, N-hydroxysukcinimidyl-6-chinolyl karbamátem, nebo o-ftaldialdehydem) [56].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL

Cílem teoretické části bylo zaměřit se na problematiku produkce biogenních aminů mikroorganizmy užívanými v průmyslu výroby potravin. Byla vytvořena literární rešerše, která zahrnovala charakteristiku a vznik biogenních aminů, faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu, přítomnost biogenních aminů ve fermentovaných potravinách a účinky zvýšených koncentrací biogenních aminů na lidské zdraví. Dále byl charakterizován metabolizmus probiotických bakterií, jejich pozitivní účinky na lidské zdraví a jejich potenciální dekarboxylázová aktivita.

Cílem praktické části bylo sledování vlivů kombinací vnějších faktorů (přídavek laktózy a NaCl) na dekarboxylázovou aktivitu probiotického kmene *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 239, který byl získán ze Sbírky mlékárenských mikroorganizmů Laktoflóra.

Testované rozsahy koncentrací přidaných látek (faktorů) byly následující:

- NaCl v koncentracích 0,00; 1,00; 2,00 % (w/v);
- Laktózu v koncentraci 0,25; 0,50; 1,00 % (w/v).

Dále byla v rámci praktické části sledována kinetika produkce BA v rámci 36 hodin kultivace a ovlivnění růstového chování výše uvedenými vnějšími vlivy pomocí měření optické denzity bakteriální suspenze v daných odběrových časech. Použitou analytickou metodou byla RP-HPLC s předklonovou derivatizací dansylchloridem a UV detekcí při 254 nm.

Probiotika nejsou běžně označována za producenty BA, avšak se připouští, že by mohly přispívat k celkovému obsahu BA ve výrobcích.

Na základě provedených testů bude možné vyvodit doporučení v oblasti technologické praxe a aplikace zmíněné probiotické kultury zaměřené na označení podmínek, za kterých je dekarboxylázová aktivita podporována. Současně tato práce přispěje k objasnění části metabolizmu bifidobakterií, které ještě nejsou zdaleka tak dokonale prozkoumány jako např. laktobacily.

5 MATERIÁL A METODIKA

Produkce BA byla zkoumána za podmínek *in vitro* u kmene *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 239 (dále *Bifidobacterium lactis* CCDM 239) ze Sbírky mlékárenských mikroorganizmů Laktoflora® (Cultures Collection of Dairy Microorganism; CCDM).

5.1 Příprava dekarboxylačního média

Jako kultivační médium byl použit modifikovaný bujón MRS broth *Lactobacillus* (HiMedia, Indie, Mumbai). Základní složky této půdy jsou:

Proteozový pepton……..10,00 $g.l^{-1}$

Hovězí extrakt…….10,00 $g.l^{-1}$

Kvasniční extrakt……..5,00 $g.l^{-1}$

Dextróza……..20,00 $g.l^{-1}$

Polysorbát 80……1,00 $g.l^{-1}$

Citran amonný……..2,00 $g.l^{-1}$

Octan sodný……..5,00 $g.l^{-1}$

Síran hořečnatý…….0,10 $g.l^{-1}$

Síran manganatý……0,05 $g.l^{-1}$

Hydrogenfosforečnan draselný……..2,00 $g.l^{-1}$

Bylo připraveno 55,15 g média *Lactobacillus* MRS Broth. Do takto připraveného média byly přidány aminokyseliny arginin, tyrozin, ornitin, lyzin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) v koncentraci 0,3 % (w/v) jako prekurzory pro tvorbu BA. Rovněž byly přidány odpovídající kombinace sledovaných faktorů (viz kapitola 5.2). Takto připravené médium bylo rozpuštěno v 1 000 ml vody. Bylo upraveno pH média na 4,5 (optimální pH pro dekarboxylázovou aktivitu). Médium bylo následně rozplněno do zkumavek o objemu 7 ml a sterilizováno v autoklávu při 121 ± 1 °C po dobu 15 minut. Před zaočkováním byl do média navíc přidán sterilní roztok cysteinu pro podporu redox-potenciálu do cílové koncentrace 0,1 % (w/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

5.2 Příprava bakteriální suspenze *Bifidobacterium*

Sledovaný kmen byl uchováván na pevném agaru MRS broth *Lactobacillus* s přídavkem agaru (Agar Agar, Type I; HiMedia, Indie, Mumbai). Čistota kultury byla ověřena křížovým roztěrem a po Gramově barvení mikroskopicky pod imerzním objektivem při zvětšení 100x.

Následně byla odebrána jedna typická kolonie, která byla pomnožena v dekarboxylačním médiu odpovídajícího složení. To představovalo modifikované médium obsahující aminokyseliny (viz kapitola 5.1) a testované faktory v následujících koncentracích a vzájemných kombinacích:

- NaCl v koncentracích 0,00; 1,00; 2,00 % (w/v);
- Laktózu v koncentraci 0,25; 0,50; 1,00 % (w/v).

Přídavek laktózy a soli, resp. jejich koncentrace faktorů byly voleny tak, aby se co nejvíce přibližovaly reálným podmínkám v mléce a výrobcích, ve kterých by mohla být kultura použita.

Následovala kultivace za anaerobních podmínek při 37 °C 24 hodin. Touto čerstvou kulturou byly zaočkovány zkumavky s dekarboxylačními médii s odpovídajícími kombinacemi a koncentracemi sledovaných faktorů, a to vždy ve trojím opakování (n=27) pro každý odběrový čas (9 časů). Pro korekci obsahu biogenních aminů v kultivačním médiu byla vždy jedna zkumavka ponechána bez inokulace a použita jako negativní kontrola (n=9). Zvolené časy odběru vzorků byly následující: 0 hodin= čas zaočkování, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 30 a 36 hodin. Celkový počet vzorků v rámci celého experimentu byl n=324.

V rámci experimentu byly sledovány vlivy kombinací faktorů na růstové chování a kinetiku produkce biogenních aminů testovaným probiotickým bifidobakteriálním kmenem.

5.3 Optická denzita

Kultura byla v dekarboxylačních médiích kultivována při teplotě 37 ± 1 °C. Ve dvouhodinových intervalech byly po dobu 36 hodin odebírány vzorky na detekci biogenních aminů a stejně tak byl sledován nárůst kolonií kmene *B. lactis* CCDM 239 pomocí změny optické denzity bakteriální suspenze. Změna optické denzity byla měřena na přístroji Benchmark Microplate Reader (BIO-RAD, UK) při vlnové délce 655 nm.

Bakteriální suspenze byla po promíchání rozpipetována v množství 200 µl do jamek mikrotitrační destičky. Optická denzita nezaočkovaného média byla použita jako kontrola a odečtena od hodnot bakteriálních suspenzí. Korigované průměry optické denzity byly sestaveny po odečtení slepých vzorků (nezaočkované médium) od reálných. Růstové křivky byly znázorněny v grafech jako závislost přirozeného logaritmu optické denzity na čase.

5.4 Příprava vzorků k derivatizaci

Po kultivaci testovaných bakterií byl odstraněn parafín a suspenze byla centrifugována (4000 otáček za minutu, 22 ± 1 ° C, 15 minut). Získaný supernatant byl naředěn v poměru 1:1 (v/v) kyselinou chloristou (c = 1,2 $mol.l^{-1}$). Takto nachystaný vzorek byl podroben derivatizaci.

5.5 Postup derivatizace

Produkce BA (tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu a kadaverinu) byla stanovována s pomocí kapalinové chromatografie (HPLC). Ke vzorku (1 ml kyselého hydrolyzátu supernatantu) bylo přidáno 100 µl interního standardu 1,7-heptandiaminu o koncentraci 500 $mg.l^{-1}$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a 1,5 ml uhličitanového pufru s 2 ml dansylchloridu (o koncentraci 5 $g.l^{-1}$). Takto připravená směs se v temnu třepala 20 hodin. Následně byl aplikován roztok prolinu 200 µl (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) v koncentraci (100 $g.l^{-1}$), čímž byla zastavena derivatizační reakce. Dansylderiváty biogenních aminů byly extrahovány vytřepáním do 3 ml heptanu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Jeden mililitr heptanové vrstvy byl odebrán a odpařen pod dusíkem při teplotě 60 ± 2 °C. Odpařený pelet byl následně rozpuštěn v 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a podroben vysokoúčinné kapalinové chromatografii na reverzních fázích.

5.6 Chromatomatografické stanovení biogenních aminů ve vzorku

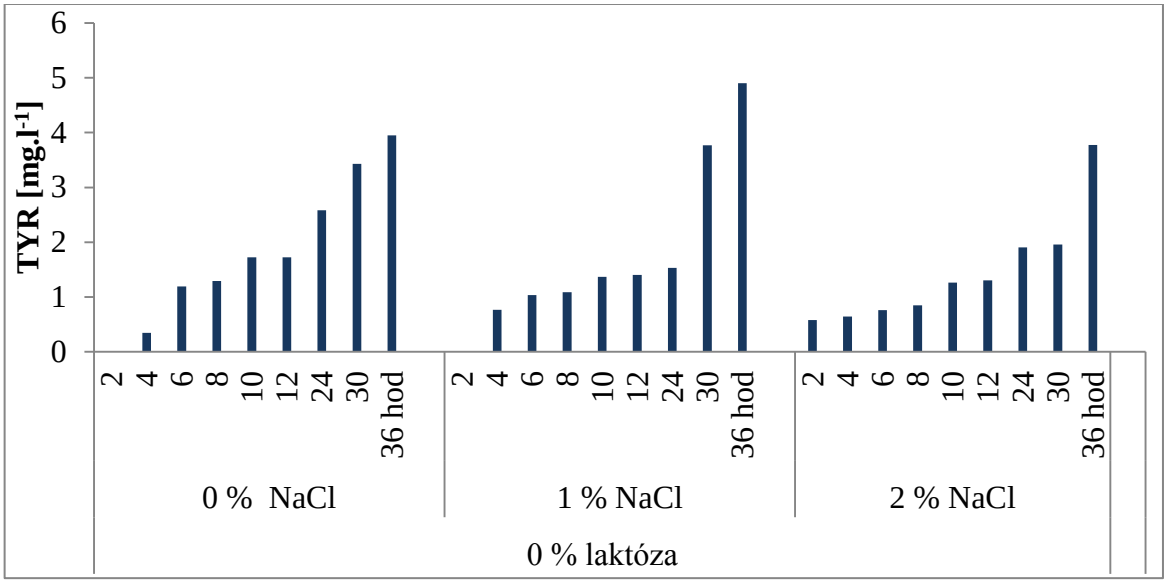
Derivatizované vzorky byly zfiltrovány (porozita 0,22 µm) a aplikovány na kolonu (Agilent Zorbax Eclipse C18, 50 x 3.0 mm, 1,8 µl; Agilent USA) s chromatografickým systémem (binární pumpa a autosampler Agilet Technologies 1260 Infinity, USA), odplynovačem, UV / VIS-DAD detektorem (λ = 254 nm) a kolonovým termostatem (Agilent Technologies, USA).

6 VYHODNOCENÍ

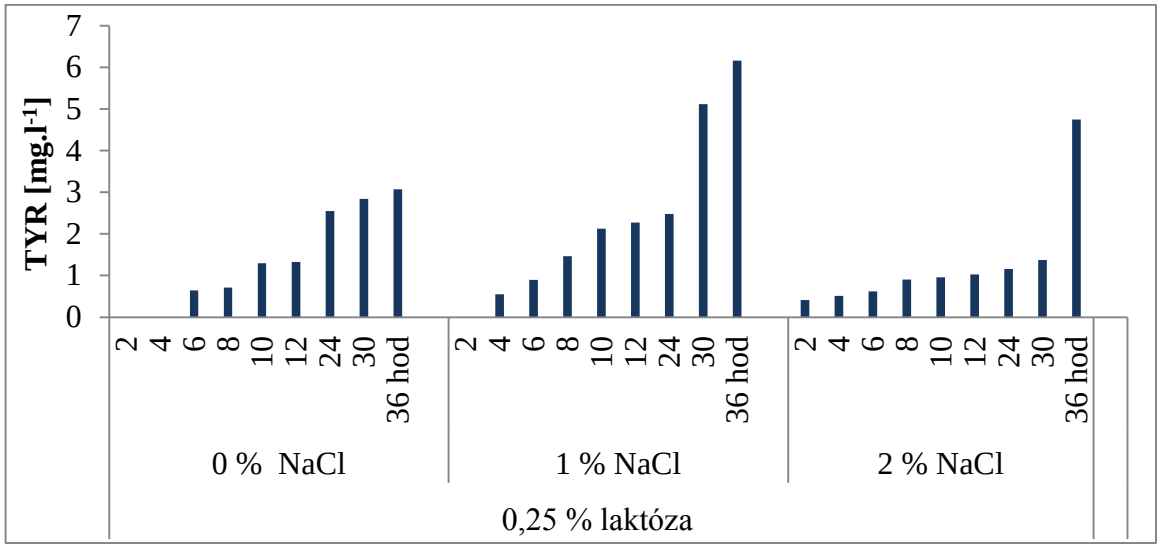
6.1 Kinetika produkce tyraminu

V médiu po kultivaci testovaného kmene *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 239 byl detekován pouze tyramin a to v maximálních množstvích do 10 $mg.l^{-1}$.

V médiu bez přídavku soli bylo maximální vyprodukované množství tyraminu okolo 4 $mg.l^{-1}$ a nárůst jeho obsahu v dekarboxylačním médiu byl pozvolný. Při obohacení média o 1 % (w/v) NaCl rostla produkce tyraminu mírně do 24. hodiny, poté došlo ke skokovému zvýšení jeho produkce až k hodnotě 5 $mg.l^{-1}$. Zřejmě z důvodů delší lag-fáze a potřebné doby na aktivaci enzymového systému kultury. Produkce tyraminu v médiu s 2% (w/v) koncentrací NaCl byla opět pozvolná a k nárůstu obsahu došlo až v 36. hodině, kdy byly vyprodukovány 4 $mg.l^{-1}$. Je pravděpodobné, že při delší kultivaci by došlo k dalšímu nárůstu obsahu.

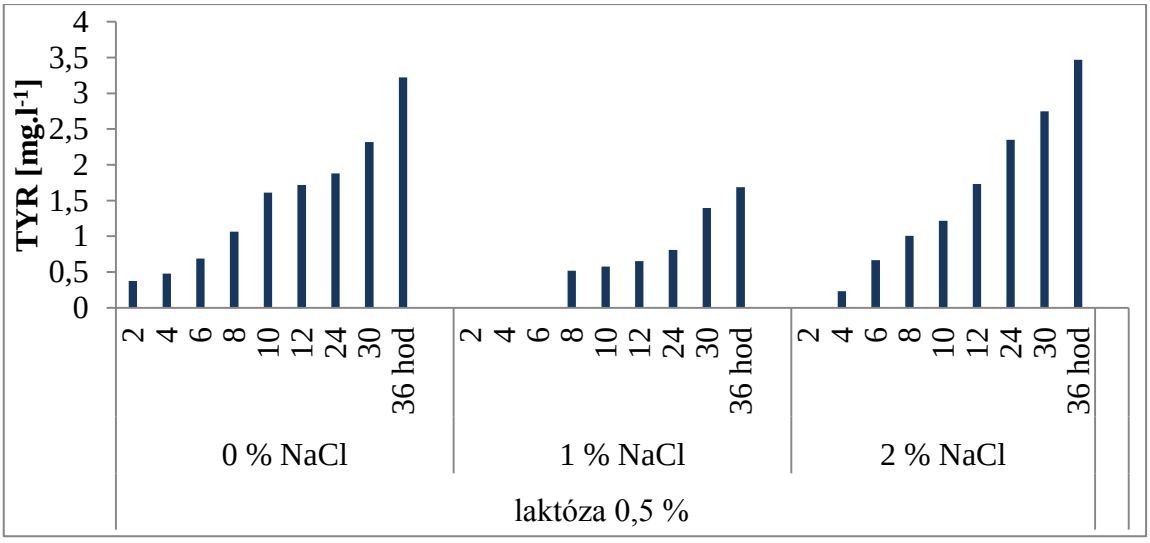


Obr. 8. Grafické znázornění produkce tyraminu během 36 hodin kultivace B. animalis ssp. *lactis CCDM 239 s přídavkem 0 % laktózy a 0 %, 1 % a 2 % NaCl do růstového prostředí*



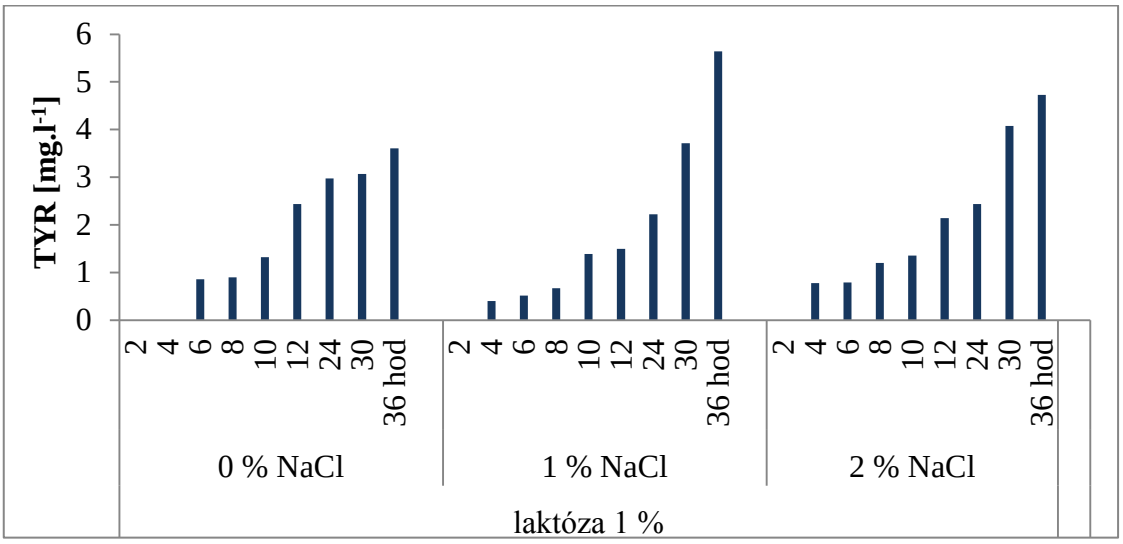
Obr. 9. Grafické znázornění produkce tyraminu během 36 hodin kultivace B. animalis ssp. *lactis CCDM 239 s přídavkem 0,25 % laktózy a 0 %, 1 % a 2 % NaCl do růstového prostředí*

V médiu obohaceném o 0,25 % (w/v) laktózy a 0 % (w/v) NaCl byla produkce tyraminu velmi nízká, bylo dosaženo hodnot okolo 3 $mg.l^{-1}$. Při zvýšení NaCl na 1 % (w/v) byla produkce zvýšena na 6 $mg.l^{-1}$. S dalším navýšením koncentrace NaCl na 2 % (w/v) byla produkce snížena na hodnotu 5 $mg.l^{-1}$. Trend nárůstu byl obdobný jako v předešlém případě.



Obr. 10. Grafické znázornění produkce tyraminu během 36 hodin kultivace B. animalis ssp. *lactis CCDM 239 s přídavkem 0,5 % laktózy a 0 %, 1 % a 2 % NaCl do růstového prostředí*

V médiu s 0,5 % (w/v) laktózy byla produkce tyraminu nízká. V případě kombinace obsahu laktózy s 0 % (w/v) a 2 % (w/v) NaCl se pohybovala do 3,5 $mg.l^{-1}$ a v případě 1 % (w/v) NaCl pouze do 2 $mg.l^{-1}$. Nárůst obsahu BA byl opět mírný a větší produkce bylo dosaženo vždy ve finální fázi kultivace.



Obr. 11. Grafické znázornění produkce tyraminu po 36 hodinách s přídavkem 1 % laktózy a 0 %, 1 % a 2 % NaCl

Produkce tyraminu při přídavku 1 % (w/v) laktózy byla u 0 % (w/v) NaCl přibližně 4 $mg.l^{-1}$, u 1 % (w/v) NaCl dosahovala hodnot až 6 $mg.l^{-1}$ a u 2 % (w/v) NaCl bylo vyprodukováno 5 $mg.l^{-1}$. Trend produkce byl pozvolný a nedocházelo k žádným velkým skokům kromě 1 % (w/v) koncentrace NaCl.

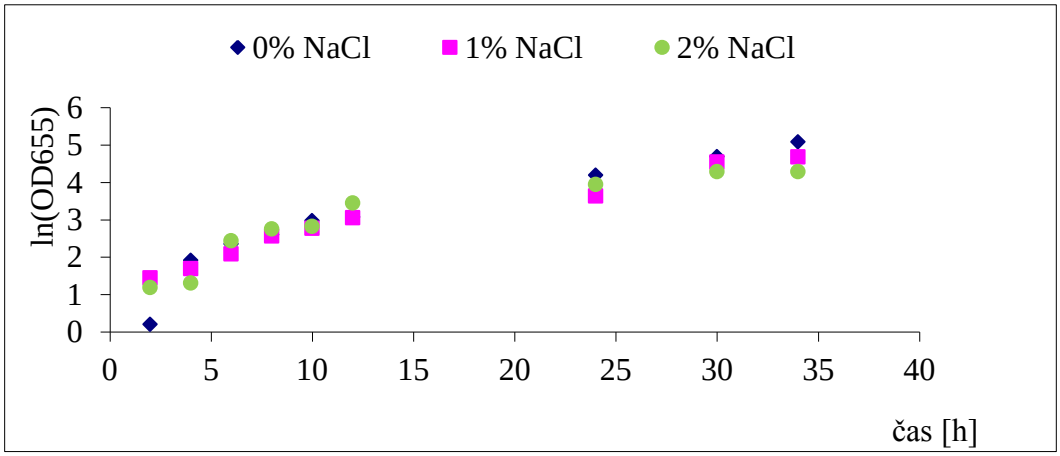
6.2 Růstové křivky tyraminu

Měřením optické denzity buněk (při vlnové délce 655 nm, OD655) byl zjišťován vliv vybraných faktorů na růst sledovaného kmene bifidobakterií. Do 30. hodiny byl pozorován většinou největší nárůst optické denzity. Po zbytku času kultivace byl nárůst už neměnný. Největší hodnoty optické denzity suspenze vykazovalo médium bez přídavku laktózy, viz Obr. 12. Nejmenší hodnoty zákalu suspenze ukazovalo médium obohacené o 1,0 % (w/v) laktózy a 0; 1,0 a 2,0 % (w/v) NaCl, viz Obr. 15. Z těchto výsledků tedy vyplývá, že laktóza paradoxně mírně potlačovala, nebo spíše nepodporovala růst testovaného kmene, jak by mohlo být očekáváno.

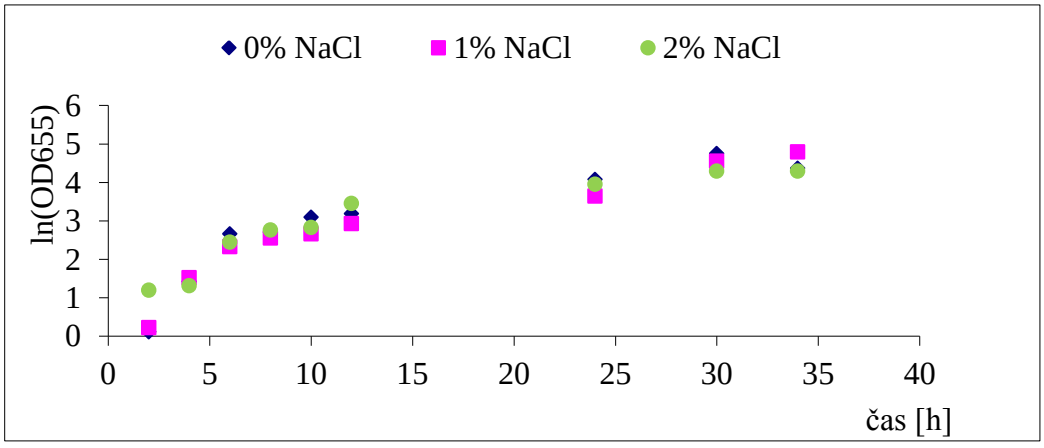
Ani 2% (w/v) koncentrace NaCl nezpůsobila výraznější inhibici růstu u testovaného kmene, viz Obr. 12. Došlo k nepatrnému prodloužení lag-fáze a pouze k mírnému potlačení růstu. Maximální dosažené hodnoty optické denzity byly pak pozorovány v médiu bez přídavku NaCl po 36 hodinách kultivace. Již u 0,25% (w/v) přídavku laktózy (viz Obr. 13) v kombinaci NaCl (jak lze vyčíst z růstových křivek) měl přídavek lehce inhibiční účinky na růst. Opět nebyla pozorována významnější elongace lag-fáze.

Až při přídavku 0,5 a 1 % (w/v) laktózy v kombinaci se solí (viz Obr. 14, Obr. 15) došlo k prodloužení lag-fáze. Samotný nárůst byl však v konečném důsledku překvapivě spolupůsobením faktorů podporován.

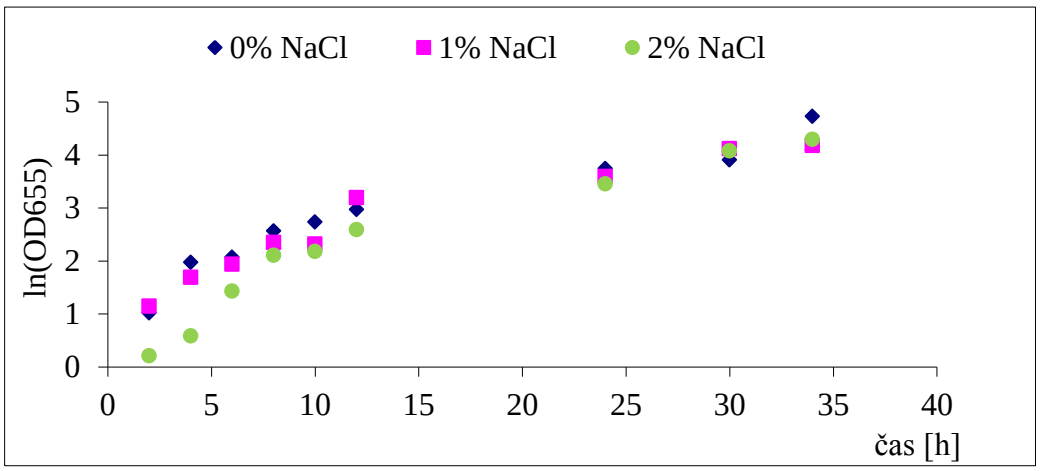
Pozitivní vliv laktózy na růst kmene bez současného přídavku soli (0 % (w/v)) nebyl sledován.



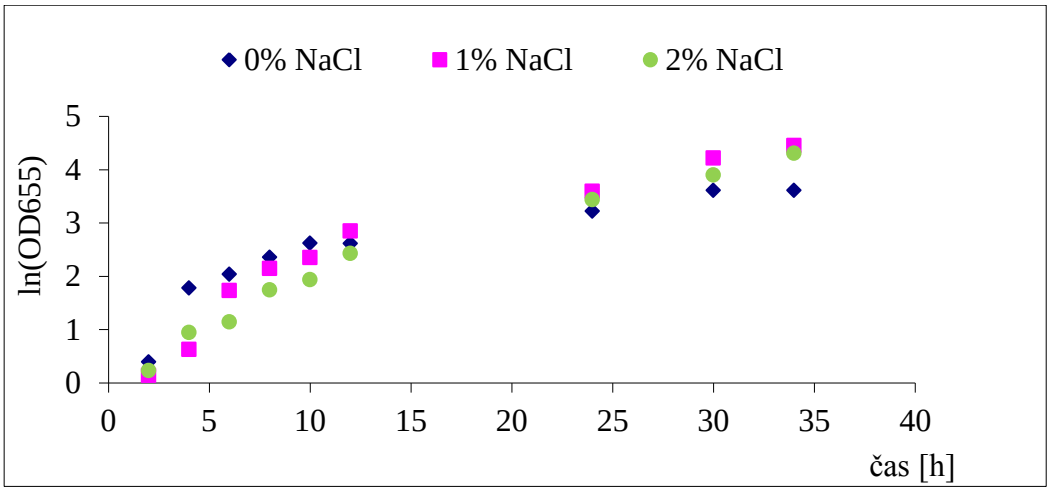
Obr. 12. Růstová křivka Bifidobacterium animalis ssp. *lactis CCDM 239 s přídavkem NaCl do růstového média*



Obr. 13. Růstová křivka Bifidobacterium animalis ssp. *lactis CCDM 239 s přídavkem NaCl a 0,25 % (w/v) laktózy do růstového média*



Obr. 14. Růstová křivka Bifidobacterium animalis ssp. *lactis CCDM 239 s přídavkem NaCl a 0,5 % (w/v) laktózy do růstového média*



Obr. 15. Růstová křivka Bifidobacterium animalis ssp. *lactis CCDM 239 s přídavkem NaCl a 1,0 % (w/v) laktózy do růstového média*

7 DISKUZE

Experimentální část této bakalářské práce byla zaměřena na sledování růstu a kinetiku produkce BA (v našem případě pouze tyraminu) probiotickým kmenem *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 239. Problematika vlivu faktorů na růst a produkci biogenních aminů probiotickými kmeny není v současnosti stále prozkoumána. Dostupná literatura nezahrnuje studie, které by se týkaly dekarboxylázové aktivity kmenů s dieteticko-léčebným účinkem. Proto byla záměrně vybrána tato probiotická bakterie, abychom zjistily, jestli je schopna produkovat BA.

V rámci praktické části této bakalářské práce byl zkoumán vliv koncentrací NaCl (0%, 1%, 2% (w/v)) a přídavku laktózy (0,25%, 0,50%, 1% (w/v)) na kinetiku produkce BA a růstové chování kmene *Bifidobacterium lactis* CCDM 239.

Protože jsou probiotické bifidobakterie striktně anaerobní [10], byl testovaný kmen kultivován pod vysokým sloupcem hladiny růstového média (7 ml) s přídavkem cysteinu, který anaerobní podmínky ještě více podpořil. Důvodem byla snaha zajistit růst a tím pádem i optimální enzymatickou (dekarboxylázovou aktivitu) zkoušené kultury.

Do média byly přidány volné aminokyseliny v koncentraci 0,3 % (w/v). Důvodem bylo poskytnutí prekurzorů pro vznik biogenních aminů [7]. Kombinace těchto faktorů ve zmíněných koncentracích a hodnotách byly voleny tak, aby imitovaly podmínky reálného prostředí, ve kterém jsou probiotické bakterie aplikovány (podmínky v mléčných výrobcích).

Bifidobakterie nemají extracelulární proteolytické vlastnosti, ale je u nich přítomen peptidolytický metabolizmus. V mléce je jejich počet nízký, jelikož potřebují dostatek růstových faktorů, aby dosáhly požadovaného počtu. Tyto požadavky na růstové prostředí jsou často označovány jako „bifidus faktor“. Látky, které podporují růst, jsou např. dextrin, α-laktalbumin, β-laktoglobulin, kvasničný extrakt, treonin, cystein, pepton, κ-kasein, maltóza a hydrolyzáty kaseinu, D-glukózamin, α-etyl-N-acetyl-D-glukózamin, N-N-diacetylchitobióza, N-karboetoxy-D-glukózamin, N-acetylglukózamin, N-acetyllaktoamin a N-acetylneuraminová kyselina [62].

Hodnota pH kultivačního média (které bylo upraveno na pH 4,5) je pro bifidobakterie vyhovující. Dokážou totiž tolerovat velmi nízké pH až okolo 3 (pH žaludečních šťáv) [15]. Ve většině fermentovaných mléčných výrobků se hodnota pH pohybuje okolo 3,7-4,3 [42].

V poslední době se probiotické bakterie využívají také při výrobě fermentovaných masných výrobků [51]. Zvolené pH je navíc optimální pro činnost dekarboxyláz [14].

Teplota 37 °C byla vybrána záměrně, protože představuje běžnou teplotu lidského těla, kde probiotické bakterie osidlují gastrointestinální trakt [24]. Dlouhodobá konzumace kysaných výrobků snižuje koncentraci hnilobných bakterií v gastrointestinálním traktu. Tímto se snižuje počet nežádoucích metabolitů, jako jsou toxické enzymy, které jsou hnilobnými bakteriemi produkovány. Pokud jsou probiotické bakterie dodávány v dostatečném množství, mají schopnost příznivého účinku i prevence. Pozitivním způsobem ovlivňují klinické projevy některých onemocnění, produkují vitamíny, pozitivně ovlivňují imunitní systém [64].

Pokud bylo přidáno NaCl do média, produkce tyraminu mírně vzrostla. Tento efekt je pravděpodobně způsoben dodáním sodných iontů, které se podílejí na regulaci intracelulárního pH a hrají důležitou roli v tyrozindekarboxylázové aktivitě. Sodné ionty se vyměňují s vodíkovými (Na^+ dovnitř a H^+ ven z buňky), z těchto důvodů jsou důležité pro antiportový systém [23].

Největší množství tyraminu bylo detekováno ve vzorcích dekarboxylačního média s 0,25 % (w/v) laktózy v kombinaci s 1 % (w/v) NaCl. Nejméně tyraminu kmen vyprodukoval při 0,5% (w/v) obsahu laktózy a 1% (w/v) koncentraci NaCl. Největší produkce byla (pravidelně a nezávisle na testovaných faktorech) zaznamenána v třicátě hodině kultivace.

Z grafů je patrné, že 1% (w/v) přídavek NaCl ovlivňoval produkci tyraminu více než ostatní koncentrace. Zatímco rozdílné koncentrace laktózy produkci tyraminu do takové míry neovlivnily. Ve studii Buňkové et al. (2011) bylo zjištěno, že kmeny *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* CCDM 48 a CCDM 1004 produkovaly tyramin jen při 2% (w/v) koncentraci NaCl v růstovém prostředí. Zbylé v rámci studie zkoumané mikroorganizmy *Lactobacillus lactis* ssp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946 a *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* CCDM 141 produkovaly tyramin při všech testovaných koncentracích NaCl (0 %, 1 % a 2 % (w/v)). Stejně tak testované kmeny *Enterococcus* produkovaly více kadaverinu a histaminu v prostředí s 1,2-3,0 % (w/v) NaCl, než v prostředí 0,2 % (w/v) NaCl [23].

Vliv laktózy na produkci BA probiotickými bakteriemi není v dostupné literatuře dostatečně zdokumentován, ale můžeme jej v krajní nouzi analogicky porovnávat s vlivem glukózy. Optimální množství glukózy pro růst organizmů je 0,5-2 % (w/v). Tříprocentní obsah způsobuje inhibici syntézy dekarboxyláz [27]. Proto byl volen testovaný rozsah laktózy

v rozmezí od 0,25-1,0 % (w/v) přídavku. V rámci testovaných koncentrací pak nejlépe produkci podpořil přídavek 0,25 % (w/v) laktózy, přičemž inhibičně (jak na růst, tak na produkci tyraminu) působila 0,5% (w/v) koncentrace laktózy. Ve studii Buňkové et al. (2011) je dále uvedeno, že u testovaných kmenů bakterií rodu *Lactococcus* koncentrace přidané laktózy 0,25-1 % (w/v) neměla vliv na produkci BA. Pokud ale nebyla laktóza přítomna při kultivaci, byla produkce BA omezena [23].

Laktóza je tepelným záhřevem převedena na laktulózu, která je považována za bifidobakteriemi vyhledávaný nutrient. Laktulóza, cenné prebiotikum, nemůže být absorbována tenkým střevem, což v konečném důsledku znamená, že prochází až do tlustého střeva, kde je rychle bifidobakteriemi fermentována na kyselinu mléčnou i octovou. Pokusy *in vitro* a *in vivo* později dokázaly, že laktulóza pozitivně stimuluje růst žádoucí střevní mikroflóry, hlavně bifidobakterií a lactobacilů, přičemž potlačuje růst nežádoucích alkalifilních proteolytických bakterií [18].

Na základě výsledkové části této bakalářské práce lze obecně konstatovat, že produkce BA kopíruje růstovou křivku až s pětihodinovým zpožděním. Důvodem může být adaptační fáze růstu, lag-fáze, ve které si mikroorganizmus zvyká na nové podmínky a připravuje se k růstu v dekarboxylačním médiu, které bylo testovanými faktory upraveno. Na lag-fázi navazuje exponenciální fáze, ve které dochází k prudké aktivaci enzymové aktivity, růstu a množení [59].

ZÁVĚR

Byl sledován vliv vnějších faktorů (přídavek NaCl a laktózy, přídavek volných aminokyselin, optimálního pH a teploty) na růstové chování a dekarboxylázovou aktivitu kmene *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 239 za podmínek *in vitro*.

Na základě získaných výsledků lze formulovat následující závěry:

- Nejvýhodnější podmínky pro tvorbu tyraminu byly při přídavku 0,25 % (w/v) laktózy v kombinaci s 1% (w/v) NaCl.
- Nejméně výhodná kombinace faktorů byla pak paradoxně 0,5 % (w/v) laktózy v kombinaci s 1 % (w/v) NaCl.
- Samostatný přídavek nejvyšší testované koncentrace soli (2% w/v) nezpůsobil totální inhibici. Tudíž i při této koncentraci je *Bifidobacterium* schopné nezměněného růstu. Současný přídavek soli a laktózy pak působil pozitivně jak na růst, tak nepatrně zvýšil produkci tyraminu.
- Samostatný přídavek laktózy nepůsobil jako inhibitor ani jako akcelerátor produkce tyraminu v žádné z testovaných koncentrací.
- Produkce tyraminu zkoušeným kmenem po 36 hodinách kultivace v dekarboxylačním médiu byla nízká (6 $mg.l^{-1}$) a samostatně toxikologicky nevýznamná (pokud se nejedná o oslabené jedince, nebo jedince léčené psychofarmaky).
- Teoreticky lze uvažovat nad tím, že mohou bifidobakterie do jisté míry přispívat k celkovému množství BA v potravinách a zvyšovat tak riziko intoxikace, avšak jejich probiotický účinek prokazatelně převažuje nad touto potenciálně negativní činností.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] SVOBODA, J. *Organická chemie I.* Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005, 291 s. ISBN 80-708-0561-7.

[2] VÍCHA, R.: *Aminy* [online]. [cit. 02-08-2012]. Dostupný z WWW: http://www.chemie .utb.cz/rvicha/SOC/supportfiles/DOCS/aminy01.doc

[3] Inovace studia molekulární a buněčné biologie. *Chemie pro biology 2* [online]. 2012 [cit. 2013-05-15]. Dostupné z: http://inovace-mbb.upol.cz/files/vyukovy-portal/chemie_pro_biology_2/lrr-chpb2_12.pdf

[4] NAILA, A., S. FLINT, G. FLETCHER, P. BREMER a G. MEERDINK. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science*. 2010, roč. 75, č. 7, R139-R150. ISSN 1750-3841.

[5] Structural Clarification of Enzyme Contributing to Efficient Metabolism of *Bifidobacteria*. *SPring-8* [online]. 2010 [cit. 2013-05-20]. Dostupné z: http://www.spring8.or.jp/en/news_publications/press_release/2010/101029

[6] SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 1996, roč. 29, č. 7, s. 675-690. ISSN 0963-9969.

[7] VELÍŠEK, J. a J. HAJŠLOVÁ. Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 623 s. ISBN 978-80-86659-17-6.

[8] SPANO, G., P. RUSSO, A. LONVAUD-FUNEL, P. LUCAS, H. ALEXANDRE, C. GRANDVALET, E. COTON, M. COTON, L. BARNAVON, B. BACH, F. RATTRAY, A. BUNTE, C. MAGNI, V. LADERO, M. ALVAREZ, M. FERNÁNDEZ, P. LOPEZ, P. F. DE PALENCIA, A. CORBI, H. TRIP a J. S. LOLKEMA. Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2010, roč. 64, č. 3, s. 95-100. ISSN 0954-3007.

[9] ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. 2007, roč. 103, č. 4, s. 1476, 1477, 1478. ISSN 0308-8146.

[10] GÖRNER, F. a Ľ. VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívatín: princípy mikrobiológie požívatín, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zá-*

rodky sú prenášané požívatinami. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, s. 78, 80, 129, 130, 158. ISBN 80-967-0649-7.

[11] ZORNÍKOVÁ, G. *Biogenní aminy v potravinách* [online]. Mendelova univerzita v Brně, 2012 [cit. 2013-03-05]. Dostupné z: http://www.chempoint.cz/biogenni-aminy-v-potravinach

[12] ROEDER, T. Octopamine in invertebrates. *Progress in Neurobiology*. 1999, roč. 59, č. 5, s. 533-561. ISSN 0301-0082.

[13] SZPI varuje před doplňkem stravy pro sportovce BSN Thermonex foundation 120 cps. *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]. 2011 [cit. 2013-05-06]. Dostupné z: http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1031258&docType=ART&nid=11845

[14] SANTOS, M. H. S. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, roč. 29, č. 2-3, s. 213-231. ISSN 0168-1605.

[15] SALMINEN, S. a A. VON WRIGHT. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3. dopl. vyd. New York: Marcel Dekker, 2004, 21, 33, 234 s. ISBN 08-247-5332-1.

[16] LINARES, D. M., M. C. MARTÍN, V. LADERO, M. A. ALVAREZ a M. FERNÁNDEZ. Biogenic Amines in Dairy Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011, roč. 51, č. 7, s. 691-703. ISSN 1549-7852.

[17] STRYER, L. *Biochemie*. 2. vyd. Heidelberg [u.a.]: Spektrum Akad. Verl, 1994. xxxvii, 521 s. ISBN 38-602-5005-1.

[18] BOHAČENKO, I., J. PINKROVÁ, J. PEROUTKOVÁ a M. PECHAČOVÁ. Fermentace směsí laktosy a laktulosy kmenem *Lactobacillus acidophilus*. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2007 [cit. 2013-05-20]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_11_911-915.pdf

[19] BURDYCHOVÁ, R. a V. DOHNAL. Využití HPLC ke stanovení produktu exprese genu pro mikrobiální tyrosindekarboxylasu. *Chemické Listy*. 2007, roč. 101, č. 11, s. 907-910. ISSN 1213-7103.

[20] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, M. HLOBILOVÁ, Z. VAŇÁTKOVÁ, D. NOVÁKOVÁ a V. DRÁB. Tyramine production of technological important stra-

ins of *Lactobacillus, Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*. 2009, roč. 229, č. 3, s. 533-538. ISSN 1438-2385.

[21] DEEPIKA PRIYADARSHANI, W. M. a S. K. RAKSHIT. Screening selected strains of probiotic lactic acid bacteria for their ability to produce biogenic amines (histamine and tyramine). *International Journal of Food Science*. 2011, roč. 46, č. 10, s. 2062-2069. ISSN 1365-2621.

[22] MOZZI, F. *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*. 1. vyd. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2010, 3, 4, 5, 6, 7, 19 s. ISBN 08-138-1583-5.

[23] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, E. POLLAKOVÁ, T. PODEŠVOVÁ a V. DRÁB. The effect of lactose, NaCl and an aero/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, roč. 147, č. 2, s. 112-119. ISSN 0168-1605.

[24] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 165, 166, 167, 175, 176 s. ISBN 80-200-1024-6.

[25] FERNÁNDEZ, M., D. M. LINARES, A. RODRÍGUEZ a M. A. ALVAREZ. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, roč. 73, č. 6, s. 1400-1406. ISSN 1432-0614.

[26] GARDINI, F., M. MARTUSCELLI, M. C. CARUSO, F. GALGANO, M. A. CRUDELE, F. FAVATI, M. E. GUERZONI a G. SUZZI. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, roč. 64, č. 1-2, s. 105-117. ISSN 0168-1605.

[27] KAROVIČOVÁ, J. a Z. KOHAJDOVÁ. Biogenic Amines in Food. *Chemical Papers*. 2005, roč. 59, č. 1, s. 70-79. ISSN 1336-9075.

[28] STADNIK, J. a Z. J. DOLATOWSKI. Biogenic amines in meat and fermented products. *ACTA Scientiarum Polonorum*. 2010, roč. 3, č. 9, s. 251-263. ISSN 1889-9594.

[29] KOMPRDA, T. *Obecná hygiena potravin*. Dotisk 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007, 145 s. ISBN 978-80-7375-059-6.

[30] HALÁSZ, A., Á. BARÁTH, L. SIMON-SARKADI a W. HOLZAPFEL. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science*. 1994, roč. 5, č. 2, s. 42-49. ISSN 0924-2244.

[31] PAPAVERGOU, E. J., I. N. SAVVAIDIS a Ioannis A. AMBROSIADIS. Levels of biogenic amines in retail market fermented meat products. *Food Chemistry*. 2012, roč. 135, č. 4, s. 2750-2755. ISSN 0308-8146.

[32] RUJNER, J. a B. A. CICHAŃSKA. *Bezlepková a bezmléčná dieta*. Vyd. 1. Brno: Computer Press, 2006, s. 29. Zdraví pro každého (Computer Press). ISBN 80-251-0775-2.

[33] TAHIRA F. a A. A. FAROOQUI, Tahira Farooqui and Akhlaq A.editors. *Biogenic amines: pharmacological, neurochemical and molecular aspects in the CNS*. New York: Nova Biomedical Books, 2010, s. 4, 5. ISBN 16-087-6625-X.

[34] LINARES, D. M., B. DEL RÍO, V. LADERO, N. MARTÍNEZ, M. FERNÁNDEZ, M. C. MARTÍN a M. A. ÁLVAREZ. Factors Influencing Biogenic Amines Accumulation in Dairy Products. *Frontiers in Microbiology*. 2012, roč. 3, č. 5, s. 1-10. ISSN 1664-302X.

[35] JAY, J. M. *Modern food microbiology*. 7th ed. New York: Springer, 2005, s 150, 152, 153, 155, 160, 165, 188. ISBN 03-872-3180-3.

[36] HUTKINS, R. W. *Microbiology and technology of fermented foods*. 1st ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2006, xi, s. 12, 37, 45, 74. IFT Press series. ISBN 978-081-3800-189.

[37] SINGH, V. P., V. PATHAK a A. K. VERMA. Fermented Meat Products: Organoleptic Qualities and Biogenic Amines-a Review. *American Journal of Food Technology*. 2012, roč. 7, č. 5, s. 278-288. DOI: 10.3923/ajft.2012.278.288, ISSN 1557-458X.

[38] FERNANDES, R. *Flavouring in food - a legal perspective: international and global markets outside the European Union*. 3. ed. Leatherhead, UK: Leatherhead Food International, 2008, s. 77. ISBN 19-052-2462-1.

[39] SLÁDKOVÁ, P., T. KOMPRDA a R. BURDYCHOVÁ. Screening of starter and probiotic cultures intended for processing of fermented meat products for their ability to produce biogenic amines. *Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně* [online]. 2007 [cit. 2013-05-15]. Dostupné z: http://mnet.mendelu.cz/mendelnet07agro/articles/tp/sladkova.pdf

[40] MARTH, E. H. a J. L. STEELE. *Applied dairy microbiology*. 2. vyd. New York, NY [u.a.]: Marcel Dekker, 2001, s. 155, 158, 159, 307, 317. ISBN 08-247-0536-X.

[41] SANTOS, W. C., M. R. SOUZA, M. M. O. P. CERQUEIRA a M. B. A. GLÓRIA. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. *Food Chemistry*. 2003, roř. 81, č. 4, s. 595-606 ISSN 0308-8146.

[42] BOYLSTON, T. D., C. G. VINDEROLA, H. B. GHODDUSI a J. A. REINHEIMER. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal*. 2004, roč. 14, č. 5, s. 375-387. ISSN 0958-6946.

[43] TAMIME, A. Y. *Probiotic dairy products*. Oxford: Blackwell Publishing, 2005, xvi, s 44, 46. ISBN 14-051-2124-6.

[44] GOMES DA CRUZ, A., F. C. ALONSO BURITI, C. H. BATISTA DE SOUZA, J. A. FONSECA FARIA a S. M. ISAY SAAD. Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science & Technology*. 2009, roč. 20, č. 8, s. 344-354. ISSN 0924-2244.

[45] ADAMS, M. M. a M. O. MOSS. *Food microbiology*. 3. vyd. Cambridge: RSC Publishing, c2008, xiv, s 326, 330, 343. ISBN 978-085-4042-845.

[46] NOVELLA-RODRÍGUEZ, S., M. T. VECIANA-NOGUS, A. X. ROIG-SAGUS, A. J. TRUJILLO-MESA a M. C. VIDAL-CAROU. Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat cheeses from pasteurized and raw milk. *Journal of Dairy Research*. 1999, roč. 71, č. 2, s. 245-252. ISSN 1469-7629.

[47] INNOCENTE, N., M. MARINO, G. MARCHESINI a M. BIASUTTI. Presence of biogenic amines in a traditional salted Italian cheese. *International Journal of Dairy Technology*. 2009, roč. 62, č. 2, s. 154-160. ISSN 1471-0307.

[48] SHIMAKAWA, Y., S. MATSUBARA, N. YUKI, M. IKEDA a F. ISHIKAWA. Evaluation of *Bifidobacterium breve* strain Yakult-fermented soymilk as a probiotic food. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, roč. 81, č. 2, s. 131-136. ISSN 0168-1605.

[49] LATORRE-MORATALLA, M. L., T. VECIANA-NOGUÉS, S. BOVER-CID, M. GARRIGA, T. AYMERICH, E. ZANARDI, A. IANIERI, M. J. FRAQUEZA, L. PATARATA, E. H. DROSINOS, A. LAUKOVÁ, R. TALON a M. C. VIDAL-CAROU. Biogenic amines in traditional fermented sausages produced in selected European countries. *Food Chemistry*. 2008, roč. 107, č. 2, s. 912-921. ISSN 0308-8146.

[50] KOHAJDOVÁ, Z., J. KAROVIČOVÁ a G. GREIF. Biogenné aminy v potravinách. *Potravinárstvo*. 2008, roč. 2, č. 1, s. 40-42. ISSN 1337-0960.

[51] FARNWORTH, E. R. *Handbook of fermented functional foods*. 2nd ed. London: Taylor, 2008, s. 299, 300. ISBN 14-200-5326-4.

[52] FELIS, G. E. a F. DELLAGLIO. Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 2007, roč. 8, č. 1, s. 44-61. ISSN 1467-3037.

[53] GOMES, A. M. P. a F. X. MALCATA. *Bifidobacterium* subsp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*. 1999, roč. 10, č. 4-5, s. 139-157. ISSN 0924-2244.

[54] CHARALAMPOPOULOS, D. a R.A. RASTALL. *Prebiotics and probiotics science and technology*. New York, NY: Springer, 2009, s. 826. ISBN 03-877-9059-4.

[55] KIM, J. F., H. JEONG, D. S. YU, S.-H. CHOI, C. - G. HUR, M. - S. PARK, S. H. YOON, D. - W. KIM, G. E. JI, H. - S. PARK a T. K. OH. Genome Sequence of the Probiotic Bacterium *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* AD011. *Journal of Bacteriology*. 2009, roč. 191, č. 2, s. 678-679. ISSN 1098-5530.

[56] SMĚLÁ, D., P. PECHOVÁ, T. KOMPRDA, B. KLEJDUS a V. KUBAN. Chromatographic Determination of Biogenic Amines in Meat Products During Fermentation and Long-Term Storage. *Chemické Listy*. 2004, roč. 98, č. 7, s. 432-437. ISSN 1213-7103.

[57] MULLAN, W. M. A. Microbiology of starter cultures. *Dairy Science* [online]. 2001 [cit. 2013-05-15]. Dostupné z: http://www.dairyscience.info/cheese-starters/49-cheese-starters.html

[58] ZADRAŽIL, K. *Mlékařství: (přednášky)*. Vyd. 1. Praha: ISV, 2002, s. 127. Živočišná výroba (Česká zemědělská univerzita). ISBN 80-866-4215-1.

[59] BUŇKOVÁ, L. a M. DOLEŽALOVÁ. *Obecná mikrobiologie*. Vyd. 2., nezměn. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010, 190 s. ISBN 978-80-7318-973-0.

[60] ROSYPAL, S., K. HOĎÁK, T. MARTINEC, M. KOCUR. *Obecná bakteriologie*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1981, s. 150, 151, 152, 153, 154. ISBN 14-549-81.

[61] Taxonomie rodu Lactobacillus. ŠVEC, Pavel. *CSSM Taxonomie Lactobacillus 2005* [online]. 2005 [cit. 2013-05-15]. Dostupné z: http://www.sci.muni.cz/ccm/downl/public/CSSM%20Taxonomie%20Lactobacillus%202005.pdf

[62] MAXA, V., RADA, V., 2002. Význam bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení pro výživu a zdraví, 2. vydání, Praha: ÚZPI. 40 s. ISBN 80-85120-57-7.

[63] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, M. HLOBILOVÁ, Z. VAŇÁTKOVÁ, D. NOVÁKOVÁ a V. DRÁB. Tyramine production of technological important strain of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*. Berlin: Springer-Verlag, 2009, roč. 229, s. 533-538. ISSN:1438-2377.

[64] KEJMAROVÁ, M., J. DRBOHLAV, A. ŠALAKOVÁ a G. KUNOVÁ. Stanovení odolnosti vybraných kmenů laktobacilů vůči modelovým podmínkám trávicího traktu. *Mlékařské listy: zpravodaj*. Praha.: Výzkumný ústav mlékárenský, 2010, č. 122, s. 9-12. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2010/122_s._ix-xii.pdf

[65] EUZÉBY, J.P. Genus *Bifidobacterium*. *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* [online]. [cit. 2013-05-22]. Dostupné z: http://www.bacterio.cict.fr/b/bifidobacterium.html

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BA	Biogenní aminy.
PLP	Pyridoxal-5-fosfát.
TDC	Tyrozindekarboxylázové.
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyfenylalanin.
BMK	Bakterie mléčného kvašení.
MAO	Monoaminooxidáza.
DAO	Diaminooxidáza.
HMT	Histidinmetyltransferáza.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Primární, sekundární a terciární amin [2] 13
Obr. 2. Dekarboxylace aminokyselin [7] 15
Obr. 3. Vznik tyraminu [50] 15
Obr. 4. Vznik histaminu, agmatinu, putrescinu, spermidinu a sperminu [50] 16
Obr. 5. Pyridoxal-5-fosfát [17] 17
Obr. 6. Homofermentativní (vlevo) a heterofermentativní cesta (vpravo) [22] 27
Obr. 7. Metabolizmus bifidobakterií (fosfofruktoketolázová dráha) [5] 27
Obr. 8. Grafické znázornění produkce tyraminu během 36 hodin kultivace B. animalis ssp. *lactis CCDM 239 s přídavkem 0 % laktózy a 0 %, 1 % a 2 % NaCl do růstového prostředí* 42
Obr. 9. Grafické znázornění produkce tyraminu během 36 hodin kultivace B. animalis ssp. *lactis CCDM 239 s přídavkem 0,25 % laktózy a 0 %, 1 % a 2 % NaCl do růstového prostředí* 43
Obr. 10. Grafické znázornění produkce tyraminu během 36 hodin kultivace B. animalis ssp. *lactis CCDM 239 s přídavkem 0,5 % laktózy a 0 %, 1 % a 2 % NaCl do růstového prostředí* 43
Obr. 11. Grafické znázornění produkce tyraminu po 36 hodinách s přídavkem 1 % laktózy a 0 %, 1 % a 2 % NaCl 44
Obr. 12. Růstová křivka Bifidobacterium animalis ssp. *lactis CCDM 239 s přídavkem NaCl do růstového média* 45
Obr. 13. Růstová křivka Bifidobacterium animalis ssp. *lactis CCDM 239 s přídavkem NaCl a 0,25 % (w/v) laktózy do růstového média* 45
Obr. 14. Růstová křivka Bifidobacterium animalis ssp. *lactis CCDM 239 s přídavkem NaCl a 0,5 % (w/v) laktózy do růstového média* 46
Obr. 15. Růstová křivka Bifidobacterium animalis ssp. *lactis CCDM 239 s přídavkem NaCl a 1,0 % (w/v) laktózy do růstového média* 46

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Struktura biogenních aminů [9] 14
Tab. 2. Přehled biogenních aminů a jejich farmakologický efekt [6] 22
Tab. 3. Přehled biogenních aminů a nemoci, které způsobují [6] 22
Tab. 4. Mikroorganizmy produkující BA [34] 25
Tab. 5. BA vyskytující se v mléčných výrobcích [16] 30
Tab. 6. Výskyt BA ve fermentovaných salámech [50] 32

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA PI: CD-ROM