

Izolace mikroorganismů degradujících biogenní aminy

Bc. Lucie Vítková

Diplomová práce
2015/2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Vítková**
Osobní číslo: **T14802**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Izolace mikroorganismů degradujících biogenní aminy**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Biogenní aminy – vlastnosti, význam, produkce.
2. Mikroorganismy degradující biogenní aminy – vlastnosti, využití.
3. Možnosti snížení výskytu biogenních aminů v potravinách a nápojích.

II. Praktická část

1. Izolace mikroorganismů degradujících biogenní aminy z různých potravinových matric.
2. Schopnost degradace vybraných biogenních aminů v závislosti na vnějších podmínkách.
3. Charakterizace a identifikace mikroorganismů schopných degradovat biogenní aminy.
4. Zpracování výsledků a vyvození doporučení a závěrů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

- [1] ALVAREZ, M. A., MORENO-ARRIBAS, M. V. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science & Technology*, 2014, 39, s. 146-155. ISSN 0924-2244.
- [2] 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 (7), s. 691-703. ISSN: 1549-7852.
- [3] FAROOQUI, A. A., FAROOQUI, T. Biogenic amines: pharmacological, neurochemical and molecular aspects in the CNS. New York, Nova Science Publishers, 2010, 415 s. ISBN 978-1-60876-625-3.
- [4] ROIG-SAGUÉS, A. X., RUIZ-CAPILLAS, C., ESPINOSA, D., HERNÁNDEZ, M. The decarboxylating bacteria present in food-stuffs and the effect of emerging technologies on their formation. *Biological Aspects of Biogenic Amines, Polyamines and Conjugates*, 2009, 30 s. ISBN 978-81-7895-249-9.
- [5] DAPKEVICIUS, M. L. N. et al. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 57, s. 107-114. ISSN 0168-1605.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

2. února 2016

Termín odevzdání diplomové práce:

20. dubna 2016

Ve Zlíně dne 2. února 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



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

Příjmení a jméno: VÍTKOVÁ LUCIE

Obor: TECHNOLOGIE POTRAVIN

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 obhajoby¹⁾;
- 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. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ 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 § 60³⁾ 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 12.5.2016



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Použití mikroorganismů schopných degradace biogenních aminů nebo enzymů způsobujících jejich oxidaci, nabízí další příležitost, jak snížit hladiny aminů v potravinách v případech, kde je obtížné kontrolovat jejich produkci. V praktické části diplomové práce bylo izolováno z potravin a následně identifikováno pomocí metody MALDI-TOF MS 44 degradérů biogenních aminů. U 7 vybraných izolátů byla zkoumána kinetika degradace biogenních aminů v podmínkách *in vitro*. Nejvyšší degradace byla zaznamenána u *Bacillus subtilis*, u kterého byl dále sledován vliv vnějších faktorů na degradační aktivitu. Testované kombinace faktorů (iniciační pH média, teplota kultivace a provzdušňování média) významně neovlivnily degradační aktivitu, došlo k poklesu všech sledovaných biogenních aminů, které byly poníženy o 65 až 85 %. V dalším experimentu byl proveden pilotní screening degradace pomocí diaminooxidázy.

Klíčová slova: biogenní aminy, degradace, diaminooxidáza, izolace, *Bacillus subtilis*

ABSTRACT

Use of microorganisms able to degradation of biogenic amines or biogenic amines oxidizing enzymes, offers another opportunity to reduce their levels in the foods, in cases where is difficult to control their production. In the practical part of thesis were isolated 44 microorganisms with degradation activity of biogenic amines. Isolated degraders were identified by MALDI-TOF mass spectrometry. From the isolated degraders were selected seven isolates with which has been continued in the experiment. It was monitored degradation of 6 biogenic amines in time. The highest degradation activity was noted with isolate *Bacillus subtilis*, for which was examined the effect of selected factors on the degradation activity. The tested combinations of factors (pH of medium, temperature and aeration of culture medium) significantly did not affect the degradation activity. All of biogenic amines were degraded by 65 to 85%. In another experiment was done a pilot screening of degradation biogenic amines by diamine oxidase.

Keywords: biogenic amines, degradation, diamine oxidase, isolation, *Bacillus subtilis*

Poděkování

Ráda bych na tomto místě upřímně poděkovala mé školitelce, doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a vstřícný přístup při zpracování této práce a také za čas a podporu, který mi věnovala během celého studia. Zároveň také děkuji paní laborantce Bc. Veronice Kučabové a Ing. et Ing. Ludmile Zálešákové za velkou ochotu, pomoc a vytvoření příjemného prostředí v laboratořích. Rovněž bych chtěla velmi poděkovat mé rodině za podporu, kterou mi při studiu poskytla.

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.....	13
1.1 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI	13
1.2 VZNIK A ROZDĚLENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ.....	15
1.3 VÝZNAM BIOGENNÍCH AMINŮ V ORGANIZMU	15
1.4 TOXICITA BIOGENNÍCH AMINŮ	16
1.4.1 Detoxifikační systém.....	17
1.5 BIOGENNÍ AMINY V POTRAVINÁCH.....	18
1.5.1 Výskyt v potravinách	19
1.5.1.1 Ovoce a zelenina.....	19
1.5.1.2 Fermentované nápoje.....	20
1.5.1.3 Maso a masné výrobky	21
1.5.1.4 Mléko a mléčné výrobky	21
1.5.2 Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů.....	22
1.5.2.1 pH.....	22
1.5.2.2 Teplota	22
1.5.2.3 Dostupnost kyslíku	22
1.5.2.4 Zkvasitelné cukry a sůl	23
1.5.3 Mikroorganismy produkující biogenní aminy	23
1.5.4 Analýza biogenních aminů v potravinách.....	24
2 MOŽNOSTI SNÍŽENÍ VÝSKYTU BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH A NÁPOJÍCH.....	25
2.1 STARTÉROVÉ KULTURY	25
2.2 DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH A NÁPOJÍCH	26
2.3 OZAŘOVÁNÍ IONIZUJÍCÍM ZÁŘENÍM	27
2.4 OŠETŘENÍ VYSOKÝM TLAKEM	27
2.5 BALENÍ.....	28
2.6 PREDIKTIVNÍ MIKROBIOLOGICKÉ MODELY	28
2.7 POTRAVINÁŘSKÝ PŘÍDATNÉ LÁTKY.....	28
3 MIKROORGANIZMY DEGRADUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY.....	30
3.1 BAKTERIE.....	30
3.1.1 Rod <i>Bacillus</i>	30
3.1.2 Rod <i>Brevibacterium</i>	30
3.1.3 Rod <i>Lactobacillus</i>	31
3.1.4 Rod <i>Micrococcus</i>	31
3.1.5 Rod <i>Staphylococcus</i>	31
3.1.6 Rod <i>Halomonas</i>	31
3.1.7 Ostatní bakterie	32
3.2 KVASINKY.....	32
3.3 PLÍSNĚ.....	32
II PRAKTICKÁ ČÁST	33
4 CÍL PRÁCE	34

5	MATERIÁLÝ A METODIKA.....	35
5.1	DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA SBÍRKOVÝCH MLÉKÁRENSKÝCH KULTUR	35
5.1.1	Použité mikroorganismy	35
5.1.2	Přístroje a pomůcky.....	36
5.1.3	Příprava kultivačních médií a roztoků	36
5.1.4	Příprava a odběr vzorků pro analýzu	38
5.1.5	Chromatografické stanovení biogenních aminů.....	38
5.1.5.1	Derivatizace dansylchloridem.....	38
5.1.5.2	Chromatografické stanovení biogenních aminů	38
5.2	DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ PŮSOBENÍM ENZYMU DIAMINOXIDÁZY	39
5.2.1	Přístroje a pomůcky.....	39
5.2.2	Použité roztoky a chemikálie	39
5.2.3	Příprava a odběr vzorků pro analýzu	40
5.2.4	Chromatografické stanovení degradace biogenních aminů	40
5.3	IZOLACE A IDENTIFIKACE DEGRADÉRŮ Z RŮZNÝCH POTRAVINOVÝCH MATRIC	40
5.3.1	Popis vzorků.....	40
5.3.2	Přístroje a pomůcky.....	41
5.3.3	Příprava kultivačních médií a roztoků	41
5.3.4	Příprava a odběr vzorků potravin pro izolaci degradujících mikroorganismů	44
5.3.5	Identifikace izolovaných degradérů	44
5.3.5.1	Identifikace metodou MALDI-TOF MS.....	44
5.3.5.2	Identifikace sekvenováním produktů PCR – genu 16S rRNA	45
5.3.6	Chromatografické stanovení úbytku biogenních aminů izolovanými degradéry	46
5.4	DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ V ZÁVISLOSTI NA VNĚJŠÍCH PODMÍNKÁCH U VYBRANÉHO IZOLOVANÉHO DEGRADÉRA	47
5.4.1	Použité mikroorganismy	47
5.4.2	Příprava kultivačních médií a roztoků	47
5.4.3	Příprava a odběr vzorků pro analýzu	47
5.4.4	Chromatografické stanovení degradace biogenních aminů	48
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	49
6.1	DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA SBÍRKOVÝCH MLÉKÁRENSKÝCH KULTUR	49
6.2	DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ PŮSOBENÍM ENZYMU DIAMINOXIDÁZY	52
6.3	IZOLACE A IDENTIFIKACE DEGRADÉRŮ Z RŮZNÝCH POTRAVINOVÝCH MATRIC	53
6.3.1	Identifikace metodou MALDI-TOF MS	53
6.3.2	Identifikace sekvenováním produktů PCR – genu pro 16S rRNA.....	54
6.4	CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ ÚBYTKU BIOGENNÍCH AMINŮ IZOLOVANÝMI DEGRADÉRY	58
6.5	DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ V ZÁVISLOSTI NA VNĚJŠÍCH PODMÍNKÁCH U VYBRANÉHO IZOLOVANÉHO DEGRADÉRA	60
6.6	SOUHRNNÁ DISKUZE	65
	ZÁVĚR	70
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	71
	SEZNAM OBRÁZKŮ	80
	SEZNAM TABULEK.....	81

SEZNAM PŘÍLOH.....	82
---------------------------	-----------

ÚVOD

Biologicky aktivní aminy nebo též biogenní aminy jsou organické báze s nízkou molekulovou hmotností, které se vyznačují rozsáhlou biologickou aktivitou. Vznikají během normálních metabolických procesů a plní řadu důležitých fyziologických funkcí u všech živých organismů. Jsou známy již po staletí a stále přitahují značný zájem v potravinářském, biomedicínském a environmentálním výzkumu.

Dnešní společnost stále více dává přednost vysoce kvalitním produktům, a jakékoli otázky týkající se bezpečnosti potravin mají značný dopad na chování spotřebitelů a oficiální politiku.

Vzhledem k tomu, že konzumace potravin s vysokým obsahem biogenních aminů může mít za následek projevení jejich toxických účinků pro organismus, byla v posledních letech provedena řada studií s cílem posoudit a objasnit přítomnost těchto nežádoucích sloučenin. Na základě toho lze konstatovat, že je potřeba zabránit jejich vzniku a hromadění v potravinách, protože poté, co jsou jednou vytvořeny, je velice obtížné jejich odstranění. I když by se potravinářský průmysl měl snažit poskytovat produkty s množstvím biogenních aminů tak nízkým, jak je to možné, výsledky ukazují, že jejich celkový obsah se různí v závislosti na povaze potraviny, účastnících se mikroorganismů a působením komplexních environmentálních podmínek. V případech, kdy nelze jejich vzniku a hromadění zabránit preventivními opatřeními, lze biogenní aminy potenciálně degradovat mikroorganismy s amin-oxidační aktivitou anebo přímým působením oxidačních enzymů. Dovolím si zdůraznit potenciálně, neboť u každého takového degradéra je nutné prozkoumat zda neovlivňuje potravinu nežádoucím způsobem – změnou sensorických vlastností, dekarboxylázovou aktivitou, produkcí toxinů apod. (Fernandes a Gloria, 2015, s. 301; Rai a Bai, 2015; Restuccia et al., 2014; Ruiz-Capillas a Jiménez-Colmenero, 2004).

Praktická část diplomové práce je rozdělena na několik dílčích experimentů. V prvním z nich je cílem prozkoumat dekarboxylázovou aktivitu sbírkových mlékářenských kultur. Dalším cílem je prozkoumat degradaci biogenních aminů přímým působením diaminoxidázy. V třetím experimentu je cílem izolovat z potravin mikroorganismy schopné degradovat biogenní aminy a u těchto vybraných degradérů provést studium kinetiky degradace aminů a prozkoumat vnější faktory, které degradaci ovlivňují.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

Biologicky aktivní aminy, známé zkráceně jako biogenní aminy, jsou dusíkaté, nízkomolekulární organické sloučeniny bazického charakteru (Vidal-Carou, Latorre-Moratalla a Bover-Cid, 2010, s. 400; Nuñez, del Olmo a Calzada, 2016, s. 416). Tyto sloučeniny vznikají dekarboxylací aminokyselin anebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů během metabolických procesů (Rai a Bai, 2015, s. 149; Silla Santos, 1996, s. 213). Metabolickou činností mohou být syntetizovány a degradovány u lidí, zvířat, rostlin a také mikroorganismů. V důsledku této mikrobiální aktivity je možné biogenní aminy nalézt v široké škále potravin (Vidal-Carou, Latorre-Moratalla a Bover-Cid, 2010, s. 400).

1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Molekulová hmotnost biogenních aminů je nízká, pohybuje se v rozmezích od 88,15 do 202,34 g·mol⁻¹.

Při pokojové teplotě jsou aminy tekuté, sirupovité kapaliny anebo tvoří krystaly. Teploty varu se pohybují v rozmezí od 128 °C do 210 °C a body tání od 9 °C do 280 °C (Fernandes a Gloria, 2015, s. 304). Seznam biogenních aminů, jejich vzorců a molekulové hmotnosti uvádí tabulka 1.

Tabulka 1: Triviální a chemický název, molekulová hmotnost, sumární a strukturální vzorec vybraných biogenních aminů (Fernandes a Gloria, 2015, s. 302, 303).

Biogenní amin	Sumární vzorec	Molekulová hmotnost [g·mol ⁻¹]	Chemický název	Strukturální vzorec
Agmatin	C ₅ H ₁₄ N ₄	130,19	4-(aminobutyl) guanidine; 1-amino-4-guanidobutan	
Fenyletylamin	C ₈ H ₁₁ N	121,18	benzen etanolamin	
Histamin	C ₅ H ₉ N ₃	111,15	1H-imidazol-4- etanamin; 2-(4-imidazolyl)- etylamin	
Kadaverin	C ₅ H ₁₄ N ₂	102,18	1,5-pentandiamin; pentametylendiamin	
Putrescin	C ₄ H ₁₂ N ₂	88,15	1,4-butan-diamin; tetrametylendiamin	
Spermin	C ₁₀ H ₁₉ N ₃	202,34	<i>N,N'</i> -Bis(3- aminopropyl)-1,4- diaminobutan	
Spermidin	C ₇ H ₁₉ N ₃	145,24	<i>N</i> -(3-aminopropyl)- 1,4-butan-diamin	
Tryptamin	C ₁₀ H ₁₂ N ₂	160,21	1H-indole-3- etanamin; 3-(2-aminoetyl) indol	
Tyramin	C ₈ H ₁₁ NO	137,18	4-(2- aminoetyl)fenol; 2-p-hydroxy fenyl ethyl-amine	

1.2 Vznik a rozdělení biogenních aminů

Odstraněním alfa-karboxylové skupiny z prekurzoru, tj. aminokyseliny, vzniká její odpovídající biogenní amin. Většina biogenních aminů je pojmenována podle aminokyseliny, ze které vznikla – histamin vzniká alfa-dekarboxylací histidinu. Stejným principem vzniká fenyletylamin, tryptamin, a tyramin z fenylalaninu, tryptofanu a tyrozinu. Výjimku tvoří kadaverin, který je syntetizován z lyzinu a putrescin, který je tvořen dekarboxylací ornitinu nebo dekarboxylací argininu s následnou deaminací produktu (Rai a Bai, 2015, s. 149).

Biogenní aminy lze rozdělit do několika skupin. Podle chemické struktury na aromatické (tyramin a fenyletylamin), alifatické (putrescin, kadaverin, spermin a spermidin) a heterocyklické (histamin a tryptamin). Dále podle počtu aminoskupin na monoaminy (fenyletylamin a tyramin), diaminy (histamin, kadaverin, a putrescin) a polyaminy (spermin, spermidin a agmatin) (Restuccia et al., 2014, s. 53; Rai a Bai, 2015, s. 149; Tofalo et al., 2016, s. 424). Jiní autoři polyaminy nezařazují jako podskupinu biogenních aminů, ale jako oddělenou zvláštní skupinu biologicky nebo fyziologicky aktivních látek, a to zejména vzhledem k jejich rozdílné specifické roli v eukaryotické buňce. Do této kategorie polyaminů se řadí putrescin, spermin a spermidin (Kalač, 2014, s. 28).

V závislosti na jejich syntéze lze dále biogenní aminy rozdělit podle biogenního anebo endogenního (též přírodního) původu. První rozdělení na biogenní původ vyplývá z činnosti enzymů dekarboxyláz, které jsou převážně bakteriálního původu a působí na přítomné aminokyseliny. Zde patří tyramin, fenyletylamin, histamin, tryptamin, kadaverin, putrescin a agmatin. Takzvané endogenní anebo také přírodní aminy, jsou tvořeny v důsledku intracelulárního metabolického procesu v živých buňkách. Do této kategorie jsou řazeny alifatické polyaminy spermin a spermidin, případně i putrescin jako prekurzor těchto polyaminů (Vidal-Carou, Latorre-Moratalla a Bover-Cid, 2010, s. 400).

1.3 Význam biogenních aminů v organismu

Tyto biologicky aktivní sloučeniny mají specifickou fyziologickou roli v prokaryotickém i eukaryotickém organismu. Kromě jiného jsou zdrojem dusíku a prekurzory pro syntézu proteinů, nukleových kyselin, alkaloidů a hormonů (Nuñez, del Olmo a Calzada, 2016, s. 416).

U mikroorganismů se biogenní aminy podílí na tvorbě energie skrz proton-motivní sílu, dále mají význam pro ochranu buňky před kyselým prostředím, osmotickým a oxidačním stresem a také se podílí na regulaci DNA. U rostlin se biogenní aminy účastní na buněčném dělení, květu, vývoji ovoce, stabilizaci membrány a také ochraně před hmyzem a býložravci (Nuñez, del Olmo a Calzada, 2016, s. 416).

U lidí a zvířat mají vliv na řadu procesů v organismu, jako je například regulace tělesné teploty, regulace krevního tlaku, příjem výživy a objem žaludku (Rai a Bai, 2015, s. 151). Biogenní aminy regulují také mentální funkce, včetně nálady, poznávání, emocí, učení a paměti (Farooqui a Farooqui, 2010, s. 379).

Histamin se tvoří a ukládá v žírných buňkách, bazofilních a eozinofilních granulocytech a v histamin obsahujících neuronech. Tento biogenní amin působí jako neuropřenašeč a lokální hormon, který se podílí na žaludeční sekreci, buněčném růstu, upravuje srdeční činnost, tělesnou teplotu, kontrakci hladkého svalstva, cirkadiánní rytmus, příjem potravy, paměť a imunitní odezvu. Tyramin působí také jako neuropřenašeč, dále způsobuje vazokonstrikci a zvyšuje hladinu glukózy v krvi. Tryptamin uvolňuje serotonin, ovlivňuje chování a příjem jídla. Kadaverin a putrescin se podílí na regulaci genové exprese, stabilizaci membrán a buněčném růstu. Fenyletylamin je také neuropřenašečem a stimulantem v centrální nervové soustavě, uvolňuje dopamin, serotonin a norepinefrin. Přírodní polyaminy jsou nepostradatelnými složkami živých buněk, kde se účastní stabilizaci buněčné membrány a buněčné proliferaci a diferenciaci, protože se podílí na regulaci genové exprese, syntéze bílkovin, buněčném růstu a vývoji embrya (Nuñez, del Olmo a Calzada, 2016, s. 416; Rai a Bai, 2015, s. 151). Polyaminy, vytvořené jak endogenně, tak přijaté z potravy, lze pozorovat v rychle se dělících buňkách, jako je nádorová tkáň. Polyaminy nespouštějí rakovinu, ale urychlují nádorový růst (Kalač, 2014, s. 28) a proto je důležité ve stravě pacienta s rakovinou jejich množství kontrolovat (Rai a Bai, 2015, s. 151).

1.4 Toxicita biogenních aminů

V důsledku neúčinné detoxikace biogenních aminů v organismu se snadno absorbují a dostávají do krevního oběhu, což vede k projevu jejich toxických účinků. Mezi viditelné příznaky patří nevolnost, návaly horka, červená vyrážka, dýchací potíže, zvracení, pocení, bušení srdce, hypotenze nebo hypertenze a migréna (Rai a Bai, 2015, s. 152).

Nejvýznamnější intoxikace způsobené biogenními aminy se vztahují k histaminu (Silla Santos, 1996, s. 223). Otrava histaminem je způsobená požitím potravy, která obsahuje neobvykle vysoké hladiny tohoto biogenního aminu. Ryby čeledi *Scombridae* a *Scomberesocidae* bývají častými příčinami takových intoxikací (Shalaby, 1996, s. 677), právě odtud je odvozen název skombrotoxikóza pro otravu histaminem (Hungerford, 2010, s. 231). Tkáně těchto ryb obsahují vysoké množství volného histidinu, který je činností přítomných mikroorganismů přeměněn na histamin (Halász et al., 1994, s. 45). Další známá intoxikace způsobená tyraminem se označuje jako reakce na sýr (cheese reaction) (Mohedano et al., 2015, s. 274).

Biogenní aminy jsou také schopné reagovat s dusitany za vzniku potenciálně karcinogenních nitrosaminů (Shalaby, 1996, s. 678).

1.4.1 Detoxifikační systém

Za normálních fyziologických podmínek jsou malá množství přijatých exogenních biogenních aminů, přirozeně se vyskytujících v potravinách, metabolizována na fyziologicky méně aktivní produkty rozkladu. Tento proces katalyzují specifické enzymy, které se většinou nachází ve střevech, ale také v játrech, plicích, krevních destičkách, žaludku, ledvinách a slezině. Mezi tyto enzymy se řadí monoaminoxidáza A a B, diaminoxidáza a polyaminoxidáza, které katalyzují oxidativní deaminaci biogenních aminů za vzniku aldehydů, peroxidu vodíku a amoniaku (Rai a Bai, 2015, s. 152; Silla Santos, 1996, s. 223).

Nicméně po příjmu vysokých dávek biogenních aminů z potravin není tento detoxifikační systém schopen dostatečně všechny odstranit. Jejich vysoký příjem z potravin proto může v organismu způsobit výrazné farmakologické a toxické účinky. Riziko toxického účinku je vyšší pro pacienty užívající léky inhibující enzymy, které jsou zodpovědné za fungování detoxifikačního systému. Mezi tyto inhibitory aminoxidáz se řadí léky proti bolesti, antidepresiva a léky používané pro léčbu Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby. Proto je důležité se při užívání těchto léků vyhnout potravinám, u kterých hrozí vyšší výskyt biogenních aminů (Mohedano et al., 2015, s. 274; Rai a Bai, 2015, s. 152; Silla Santos, 1996, s. 223).

Detoxifikační systém negativně ovlivňuje také řada jiných látek. Příkladem mohou být etanol a acetaldehyd, které zvyšují riziko toxického účinku biogenních aminů tím, že podporují jejich prostoupení přes střevní stěnu (Rai a Bai, 2015, s. 151-152). Dále tabákový kouř snižuje hladiny monoaminoxidázy až o 40 % a spolu s dalšími složkami přítom-

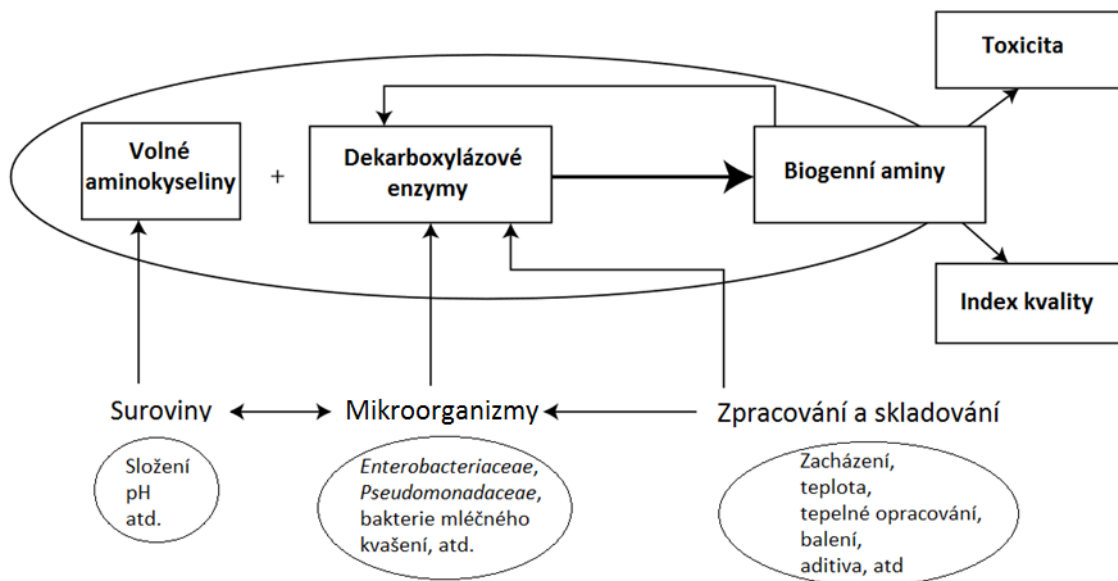
nými v cigaretě zvyšují riziko intoxikace (Restuccia et al., 2014; s. 56; Tofalo et al., 2016, s. 428).

1.5 Biogenní aminy v potravinách

Biogenní aminy jsou sloučeniny, které se běžně vyskytují v potravinách a nápojích. Mezi nejvýznamnější a nejčastěji se vyskytující aminy se řadí histamin, putrescin, kadaverin, tyramin, tryptamin, fenyletylamin, spermin a spermidin. Vznikají dekarboxylací volných aminokyselin vyskytujících se v potravinách. Za tuto dekarboxylázovou aktivitu jsou zodpovědné přítomné mikroorganismy, respektive jejich dekarboxylázové enzymy (Suzzi a Torriani, 2015; s. 4; Ruiz-Capillas a Nollet, 2016, s. 675).

Vznik biogenních aminů v potravinách je možný pouze tehdy, jsou-li realizovány tři základní podmínky – dostupnost volných aminokyselin (prekurzorů), přítomnost mikroorganismů, které jsou schopné produkovat dekarboxylázy, a existence vhodných podmínek, které umožní bakteriální růst, bakteriální aktivitu, dekarboxylaci a syntézu (Restuccia et al., 2014, s. 58; Ruiz-Capillas a Nollet, 2016, s. 675).

Tvorba biogenních aminů v potravinách je multifaktoriální jev, na který mají vliv procesy při zpracování potravin, složení surovin, přítomné mikroorganismy, ať už kontaminující nebo záměrně použité, a podmínky skladování (Restuccia et al., 2014, s. 58). Schéma produkce biogenních aminů a faktory, které jejich produkci v potravinách ovlivňují, znázorňuje obrázek 1. Jednotlivé faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů v potravinách jsou popsány v následující podkapitole, stejně jako mikroorganismy zodpovědné za jejich produkci, výskyt u konkrétních druhů potravin a stručná charakteristika jejich stanovení.



Obrázek 1: Schéma vzniku biogenních aminů a faktory, které jejich produkci v potravinách ovlivňují (upraveno podle Ruiz-Capillas a Jiménez-Colmenero, 2004, s. 494; Ruiz-Capillas a Jiménez-Colmenero, 2009, s. 676).

Biogenní aminy jsou odolné vůči tepelnému ošetření použitému při výrobě potravin, a proto lze považovat množství biogenních aminů v potravinách za dobrý ukazatel čerstvosti, popřípadě kažení, odráží také kvalitu použitých surovin a hygienické podmínky převládající během zpracování (Beatriz a Gloria, 2005, s. 17).

1.5.1 Výskyt v potravinách

1.5.1.1 Ovoce a zelenina

Polyaminy spermin a spermidin se přirozeně vyskytují v celé rostlinné říši, společně s jejich prekurzorem putrescinem. Polyaminy jsou důležité pro normální vývoj a mohou být využity jako organický zdroj dusíku. Většina ovoce a zeleniny obsahuje jen malé množství polyaminů, řádově několik mg na 100 g čerstvé suroviny, nejvyšším množstvím se vyznačuje sója a čekanka. Zvýšené množství polyaminů způsobují stresové podmínky, příkladem je minerální deficit, působení kyselin, herbicidů, ozónu, osmotický šok, rozdíly nadmořské výšky a poškození mrazem (Beatriz a Gloria, 2005, s. 17-19; Moret et al., 2005, s. 356).

Kromě polyaminů se mohou vyskytovat v ovoci a zelenině také jiné biogenní aminy, mezi nimi fenyletylamin, histamin, kadaverin a agmatin. Některé z nich mohou mít ochrannou funkci odrazující predátory (Beatriz a Gloria, 2005, s. 17). Nicméně výsledky z několika studií potvrdily, že obsah biogenních aminů u čerstvé zeleniny nepředstavuje zdravotní riziko pro zdravé spotřebitele (Moret et al., 2005, s. 356; Kalač, Švecová a Pelikánová, 2002, s. 351).

Fermentovaná zelenina (kysané zelí, kimčchi, fermentované sójové výrobky atd.) může obsahovat vyšší množství putrescinu, který se zvláště hromadí v láku, histaminu, tyraminu a kadaverinu. Takto zpracovaná zelenina obsahuje obvykle více biogenních aminů ve srovnání s čerstvými surovinami v důsledku činnosti dekarboxylázy pozitivních mikroorganismů (ať už startérových kultur nebo kontaminujících mikroorganismů) (Beatriz a Gloria, 2005, s. 22; Nuñez, del Olmo a Calzada, 2016, s. 421).

1.5.1.2 Fermentované nápoje

Hlavní biogenní aminy vyskytující se ve víně jsou putrescin, histamin, tyramin a kadaverin. Jejich množství se pohybuje v širokém rozmezí od jednotek $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ až po $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Variabilitu v obsahu biogenních aminů ve víně lze vysvětlit rozdílem v procesu výroby, době a podmínkách skladování, kvalitě suroviny a možné mikrobiální kontaminaci (Beneduce et al., 2010, s. 573-574). Bakteriím mléčného kvašení, účastnících se jablečno-mléčného kvašení, je přisuzován největší podíl na produkci biogenních aminů ve vínech, zejména tyraminu a histaminu (Beatriz a Gloria, 2005, s. 23). Červená vína se obvykle vyznačují vyšším celkovým množstvím biogenních aminů. Je velmi obtížné vyrobit víno bez jakéhokoliv biogenního aminu, které si udrží své sensorické vlastnosti. Nicméně lze řídit kritické technologické faktory – použití kvalitních hroznů, omezení dusíkatých hnojiv, volba bakterií mléčného kvašení s nízkou dekarboxylázovou aktivitou, které umožní produkci vín s jejich nízkou úrovní (Anlı a Bayram, 2008, s. 93, 95; Ancín-Azpilicueta, González-Marco a Jiménez-Moreno, 2008, s. 271).

Putrescin, spermidin, spermin a agmatin lze považovat za přirozenou složku piva primárně pocházející ze sladu, ale histamin, tyramin a kadaverin značí nežádoucí činnost kontaminujících bakterií během vaření piva (Kalač a Křížek, 2003, s. 123). V alkoholických nápojích za obecně toxickou dávku je považováno $8 \text{ až } 20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ histaminu a $25 \text{ až } 40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ tyraminu (Beneduce et al., 2010, s. 574).

Studie zabývající se stanovením biogenních aminů v několika druzích octů (jablečný, balzamikový, vinný), uvádí celkový obsah v rozmezí od 23,35 do 1445,2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Tato koncentrace biogenních aminů v octech byla nižší, než zjištěná ve vínech – použité suroviny. Výsledky naznačují, že během octového kvašení biogenní aminy nejsou produkovány nebo jsou dokonce degradovány (Ordóñez et al., 2013, s. 2713, 2719).

1.5.1.3 Maso a masné výrobky

U potravin bohatých na bílkoviny a vystavených podmínkám, které umožňují bakteriální růst a aktivitu (skladování, zrání, fermentace), lze očekávat, že dojde k hromadění určitého množství biogenních aminů (Vidal-Carou, Latorre-Moratalla a Bover-Cid, 2010, s. 402).

Vysoké hladiny biogenních aminů v nefermentovaných masných výrobcích naznačují nežádoucí mikrobiální aktivitu. Maso a masné výrobky mohou obsahovat tyramin, kadaverin, putrescin, spermin a spermidin (Dabrowski a Sikorski, 2004). Koncentrace některých biogenních aminů (tyramin, putrescin a kadaverin) se obvykle zvyšuje během zpracování a skladování masa a masných výrobků, zatímco u jiných (spermidin a spermin) se snižuje nebo jejich množství zůstává konstantní (Ruiz-Capillas a Jiménez-Colmenero, 2004, s. 492).

Nejčastěji se vyskytující biogenní amin u fermentovaných masných výrobků je tyramin, po něm následuje putrescin, nicméně jejich obsah široce kolísá. Literatura uvádí průměrný obsah tyraminu 140 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Proteolytické reakce probíhající v průběhu zrání zvyšují koncentraci prekurzorů – aminokyselin. Doba zrání a jeho teplota je kritickým faktorem, který určuje množství produkováných biogenních aminů (Vidal-Carou, Latorre-Moratalla a Bover-Cid, 2010, s. 403; Beatriz a Gloria, 2005, s. 29).

1.5.1.4 Mléko a mléčné výrobky

Obecně lze říci, že mléko a nefermentované mléčné výrobky mají nízké hladiny biogenních aminů, z toho převažují polyaminy, které jsou přirozenou složkou mléka (Beatriz a Gloria, 2005, s. 25).

Pokud jde o fermentované mléčné výrobky, sýr je hlavním rizikovým produktem s potenciálně škodlivou úrovní biogenních aminů. Konkrétně lze zde především nalézt tyramin, histamin a putrescin. Sýr představuje ideální matici pro tvorbu biogenních aminů, protože výroba není sterilní a proteolýza kaseinu zajišťuje výbornou dostupnost aminoky-

selin pro dekarboxylázové enzymy, proto koncentrace biogenních aminů může dosáhnout u sýrů až $2000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Kromě sýru je kefir další fermentovaný mléčný výrobek, u kterého se mohou vyskytovat vyšší hladiny biogenních aminů. Studie uvádí jejich celkový obsah mezi $2,4$ až $35,2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, přičemž tyramin opět převažuje (Linares et al., 2011, s. 691; Linares et al., 2012, s. 46-47).

1.5.2 Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů

Tvorba biogenních aminů je multifaktoriální jev, kombinované působení těchto faktorů je to, co především určuje jejich výslednou koncentraci. Faktory ovlivňující surovinu (složení potravin, pH, manipulační podmínky atd.) mající vliv na zdroj substrátu (dostupnost volných aminokyselin), vytváří také reakční prostředí pro přítomné dekarboxylázové enzymy, které jsou úzce spjaty s mikrobiologickým aspektem (bakteriální druh a kmen, bakteriální růst, atd.). Faktory jsou na sobě vzájemně závislé a dále je ovlivňují technologické procesy spojené s konkrétním druhem potraviny, skladovací podmínky atd. (Restuccia et al., 2014, s. 58).

1.5.2.1 pH

Koncentrace vodíkových iontů ovlivňuje, v některých případech i inhibuje, mikrobiální populaci. Dekarboxylázová aktivita je vyšší v kyselém prostředí, při optimálním pH 4 až 5. Nízké pH stimuluje produkci a má vliv na aktivitu dekarboxylázových enzymů, produkce zásaditých biogenních aminů tak slouží jako obrana proti kyselému prostředí (Restuccia et al., 2014, s. 60).

1.5.2.2 Teplota

Tvorba biogenních aminů je závislá na teplotě, při nízkých teplotách se produkce výrazně snižuje prostřednictvím inhibice mikroorganismů a snížení aktivity enzymů. Nicméně ne vždy je možné ovládat produkci biogenních aminů pouze díky teplotě, protože některé bakterie produkují biogenní aminy i při teplotách nižších než $5 \text{ }^\circ\text{C}$ (Naila et al., 2010, s. 140).

1.5.2.3 Dostupnost kyslíku

Vakuové balení nebo balení v ochranné atmosféře, které se běžně používá k prodloužení trvanlivost potravin, s sebou nese změny úrovně kyslíku a tím ovlivňuje růst ně-

kterých mikroorganismů, které mohou mít vliv na produkci biogenních aminů (Restuccia et al., 2014, s. 61).

1.5.2.4 Zkvasitelné cukry a sůl

Přítomnost zkvasitelných sacharidů, jako je glukóza, může podpořit růst i dekarboxylázovou aktivitu bakterií. Optimální koncentrace glukózy pro tvorbu dekarboxyláz je od 0,5 % do 2 %, zatímco koncentrace nad 3 % syntézu inhibuje (Silla Santos, 1996, s. 219).

Přítomnost chloridu sodného aktivuje tyrozin-dekarboxylázovou aktivitu a zároveň inhibuje histidin-dekarboxylázovou aktivitu (Restuccia et al., 2014, s. 61).

1.5.3 Mikroorganismy produkující biogenní aminy

Kromě bakterií mléčného kvašení, které produkují biogenní aminy v průběhu malolaktické fermentace, také některé druhy kvasinek, jako *Saccharomyces cerevisiae* a *Brettanomyces bruxellensis*, jsou zodpovědné za tvorbu biogenních aminů ve víně (Anlı a Bayram, 2008, s. 93).

Gramnegativní bakterie (především *Enterobacteriaceae*), které mohou být přítomny v mléku, jsou schopny produkovat histamin, putrescin a kadaverin. Hlavní producenti biogenních aminů v sýrech jsou převážně bakterie mléčného kvašení, zařazené do rodů *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* a *Streptococcus* (Linares et al., 2012, s. 46). Také některé druhy kvasinek byly popsány jako producenti aminů (putrescinu a kadaverinu). Několik kmenů *Debaryomyces hansenii* a *Yarrowia lipolytica*, izolovaných ze sýru, je schopno produkovat histamin a tyramin (Linares et al., 2012, s. 47).

Nejvyšší histidin-dekarboxylázovou aktivitou v rybím mase se vyznačují *Morganella morgani*, *Klebsiella pneumoniae* a *Hafnia alvei*, přičemž mohou produkovat více než 500 mg·kg⁻¹ histaminu, zejména v závislosti na teplotě skladování. Produkce histaminu v rybím mase byla popsána také u mnoho dalších mikroorganismů – *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia fonticola*, *Serratia liquefaciens*, *Citrobacter freundii*, *Vibrio alginolyticus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Photobacterium phosphoreum*, *Photobacterium damsela* a *Raoultella planticola* (Ruiz-Capillas a Jiménez-Colmenero, 2009, s. 839).

1.5.4 Analýza biogenních aminů v potravinách

Stanovení biogenních aminů v potravinách je analytickou výzvou vzhledem k rozmanitosti jejich chemických struktur, jejich vysoké polaritě, možné interakci se složkami potravin, složitosti matric potravin, také se vyznačují nízkou těkavostí, nedostatkem chromoforu a nevykazují silnou fluorescenci (Fernandes a Gloria, 2015, s. 301).

Postup pro stanovení biogenních aminů v potravinách má obecně několik fází, zahrnují extrakci, čištění, koncentraci, derivatizaci, separaci a kvantifikaci. Běžně používaná je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s fluorescenční nebo ultrafialovou detekcí před nebo po kolonové derivatizaci aminů. Lze také využít chromatografii na tenké vrstvě (TLC), kapilární elektroforézu (CE) a plynovou chromatografii (GC) s několika detekčními systémy (Bobba et al., 2015, s. 638; Fernandes a Gloria, 2015, s. 302).

2 MOŽNOSTI SNÍŽENÍ VÝSKYTU BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH A NÁPOJÍCH

V současné době je kladen velký důraz na bezpečnost a kvalitu potravin. Technologické a vědecké snahy jsou zaměřeny na minimalizaci rizika spojeného s nebezpečím zdraví škodlivých složek potravin. Je třeba zabránit hromadění biogenních aminů v potravinách, protože poté, co jsou jednou vytvořeny, je výrazně obtížné u většiny potravin použít metody, které jejich koncentraci opět sníží. Takové nově se objevující metody mohou zahrnovat použití amin-negativních (neprodukujících) anebo amin-oxidujících (degradujících) mikroorganismů a použití enzymů k oxidaci biogenních aminů. Další metody, které sníží možnost výskytu biogenních aminů v potravinách a nápojích, jsou obalové techniky, výběr startérových kultur, ošetření vysokým hydrostatickým tlakem, zářením a přidávek potravinářských přídatných látek (Naila et al., 2010, s. 140; Rai a Bai, 2015, s. 157).

2.1 Startérové kultury

Výběr startérových kultur v procesu fermentace má významný vliv na celkový obsah biogenních aminů. Startéry používané pro výrobu fermentovaných potravin by měly být buď amin-negativní (nejsou schopné dekarboxylace aminokyselin za vzniku biogenních aminů) nebo amin oxidační (oxidují biogenní aminy na aldehyd, peroxid vodíku, a amoniak). Tyto mikroorganismy vyžadují optimální růstové podmínky, aby mohly dominovat nad biogenní aminy produkující mikroflórou (Naila et al., 2010, s. 146; Restuccia et al., 2014, s. 63-64).

Několik studií hodnotilo použití komerčních a experimentálních startérových kultur pro snížení produkce biogenních aminů v průběhu fermentace masných výrobků (Latorre-Moratalla et al., 2012, s. 3). Řada z nich prokázala příznivý účinek startérových kultur pro snižování biogenních aminů. Například Gonzalez-Fernandez et al. (2003, s. 283) zjistil, že použití startérové kultury – dekarboxyláza negativní bakterie mléčného kvašení, vedlo k rychlému poklesu pH u masové směsi, to bylo navíc podpořeno přidávkem glukózy v rozmezí 0,5 – 1 %. Výsledkem kombinovaného působení těchto faktorů bylo snížení hladiny biogenních aminů v konečném výrobku.

Při aplikaci vhodných technologických podmínek podporujících vybrané startéry a použití surovin s dobrou hygienickou jakostí lze vyrobit fermentované uzeniny téměř bez biogenních aminů (Bover-Cid, Izquierdo-Pulido a Vidal-Carou, 2000, s. 1556).

2.2 Degradace biogenních aminů v potravinách a nápojích

Použití enzymů, jako je diaminooxidáza, které degradují biogenní aminy, a bakterií, které disponují tímto enzymem, jsou jediným možným způsobem rozkladu již vzniklých biogenních aminů v potravinách. Ani působení vysokých teplot nesníží jejich obsah, jedná se o látky termostabilní (Naila et al., 2010, s. 140).

Bylo provedeno několik studií zabývajících se izolací mikroorganismů schopných degradovat biogenní aminy. Řada z těchto výzkumů se zabývá také aplikací degradérů do potravin, často fermentovaných, jakožto možný způsob snížení koncentrace především histaminu. Nicméně některé potravinářské výrobky omezují podmínky růstu bakterií a enzymovou aktivitu nízkým pH, vysokou teplotou nebo vysokým obsahem soli (Lee et al., 2015, s. 837). Navíc tato degradace biogenních aminů je prakticky omezena na působení aerobních mikroorganismů, které mají omezené použití právě při výrobě fermentovaných potravin (Leuschner, Heidel a Hammes, 1998, s. 8).

Studie zaměřená na snížení obsahu biogenních aminů ve slaných fermentovaných ančovičkách popisuje degradaci aminů pomocí *Staphylococcus xylosus* jako ochranné kultury. *Staphylococcus xylosus* 0538 kromě výrazné degradace histaminu (snížení o 38 % za 24 hodin v podmínkách *in vitro*) také produkuje bakteriocinům podobné inhibiční látky, které vykazují silnou aktivitu proti přítomným producentům biogenních aminů. Proto byl *S. xylosus* použit jako startérová kultura a aplikován na dozrávání konečného produktu, přičemž celková produkce biogenních aminů byla snížena o 16 % ve srovnání s kontrolou (Mah a Hwang, 2009, s. 797-798). Inokulace fermentovaných uzenin *Staphylococcus epidermidis* R11 vedlo v další studii ke snížení histaminu na konci doby zrání o 60 % (Wang et al., 2015, s. 400). *Staphylococcus carnosus* FS1 může být případně využit ke snížení histaminu v potravinách s vysokým obsah soli. Nejvyšší množství histaminu bylo degradováno při pH 6, obsahu soli 9 % a teplotě 40 °C (Zaman et al., 2014, s. 58).

Optimální podmínky pro degradaci histaminu v rybí omáče byly pozorovány při použití bioreaktoru s imobilizovanými buňkami *Natrinema gari* BCC 24369, přítomnost 10 % znehybněných buněk po dobu 2 hodin degradovaly 24 % histaminu (Chaikaew et al., 2015, s. 977).

Dapkevicius et al. (2000, s. 107-114) se pokusili snížit obsah histaminu v krmivu – silážované rybí kaši o pH 4,5 použitím diaminooxidázy. Vlivem nízkého pH produktu, byl

pokus neúspěšný, což omezuje aplikaci tohoto enzymu na krmivo, potažmo potraviny s vyšší hodnotou pH, aby nedošlo k denaturaci použitého enzymu.

Cueva et al. (2012, s. 676-681) zkoumali degradaci biogenních aminů ve vínu pomocí enzymatického extraktu získaného filtrací *Penicillium citrinum*. V této studii se podařilo výrazně snížit množství histaminu, tyraminu a zejména putrescinu v červeném vínu. Navíc tento enzymatický extrakt neovlivnil sensorické vlastnosti finálního produktu.

Konečné množství biogenních aminů v potravinách a nápojích závisí na rovnováze mezi produkovaným a degradovaným množstvím, tj. mezi dekarboxylázovou a amin-oxidační aktivitou mikroorganismů (Gardini et al., 2002, s. 281).

2.3 Ozařování ionizujícím zářením

Ozařování potravin se používá k prodloužení trvanlivosti a zajištění bezpečnosti potravin. Záření má smrtící účinky na přítomnou mikroflóru, potencionální producenty biogenních aminů (Naila et al., 2010, s. 143).

Kim et al. (2004, s. 405) zkoumali účinky ozařování na devět biogenních aminů, které byly rozpuštěny v destilované vodě. Použité gama záření indukuje jejich radiolytickou degradaci a při experimentu došlo k významnému snížení množství putrescinu, spermidinu a sperminu ve vzorcích ozářených dávkou stejnou nebo vyšší než 5 kGy. Při dávce záření 20 kGy bylo pozorováno celkové 95% snížení biogenních aminů. Nicméně aplikace do potravin vyžaduje další výzkum, neboť vysoká dávka záření může mít negativní vliv na sensorické vlastnosti a dokonce některé studie uvádí, že ozáření v některých případech množství biogenních aminů zvýšilo (Naila et al., 2010, s. 143).

2.4 Ošetření vysokým tlakem

Ošetření vysokým tlakem je technologie založená na použití tlaků až 900 MPa. Takto vysoký tlak má baktericidní účinek a navíc významně neovlivňuje sensorické a nutriční vlastnosti potravin (Roig-Sagués et al., 2009, s. 20).

Některé studie hodnotily účinek vysokého tlaku na tvorbu biogenních aminů. Většina z nich sledovala vliv na mořské plody, maso a mléčné výrobky. V několika případech mělo ošetření vysokým tlakem redukční vliv na tvorbu biogenních aminů prostřednictvím inhibice dekarboxylázové mikroflóry (Roig-Sagués et al., 2009, s. 20).

Nicméně některé průzkumy také uvádí zvýšenou koncentraci biogenních aminů po ošetření vysokým tlakem (Restuccia et al., 2014, s. 63).

2.5 Balení

Balení v modifikované atmosféře, vakuové a aktivní balení (to využívá různé lapače plynu např. O₂, CO₂) může zpomalit produkci biogenních aminů prostřednictvím inhibice dekarboxyláza pozitivní mikroflóry nebo enzymů produkujících aminy (Rai a Bai, 2015, s. 158). Nicméně produkovat biogenní aminy mohou jak aerobní, tak i anaerobní mikroorganismy, a proto např. vakuové balení, které inhibuje aerobní mikroflóru, neomezí produkci aminů mikroflóry anaerobní. Enzymy oxidující biogenní aminy jsou účinné pouze za přítomnosti kyslíku, proto modifikací atmosféry při balení lze jejich aktivitu ovlivnit (Naila et al., 2010, s. 144).

2.6 Prediktivní mikrobiologické modely

Prediktivní mikrobiologie potravin kombinuje prvky mikrobiologie, matematiky a statistiky a vyvíjí modely, které popisují a předvídají růst či pokles mikrobů za stanovených podmínek (Whiting, 1995, s. 467).

Teplota, čas a pH prostředí ovlivňuje produkci biogenních aminů, na základě toho mohly být pro jednotlivé mikrobiální druhy v konkrétních druzích potravin navrženy modely podmínek k omezení produkce aminů. V současné době jsou k dispozici modely pro bakterie *Morganella psychrotolerans* a *Morganella morganii* produkující biogenní aminy v rybách a pro *Enterococcus faecalis* EF37 v masných výrobcích (Naila et al., 2010, s. 146).

V případě *Enterococcus faecalis* EF37 byl obsah soli nejvíce určujícím faktorem na akumulaci tyraminu a fenyletylaminu. Aktivita tyrozin-dekarboxylázy se snížila při koncentraci NaCl větší než 2 %. Teplota a glukóza měla zanedbatelné účinky na akumulaci tyraminu. Zvýšená aktivita tyrozin-dekarboxylázy byla také pozorována se zvýšením teploty (Gardini et al., 2008, s. 2740).

2.7 Potravinářský přídatné látky

Bakteriální růst a následný vznik biogenních aminů může být inhibován použitím vhodných potravinářských přídatných látek. Pozitivní vliv na snížení obsahu aminů v potravinách byl zjištěn u kyseliny citrónové (mírný pokles BA v průběhu fermentace kysaného zelí), glycinu (snížil celkové množství BA o 63 % – 73 % v kvašených ančovičkách),

dusitanu sodného (snížil produkci tyraminu a kadaverinu u masných výrobků), glukono-delta-laktonu (výrazně snížil obsah histaminu a putrescinu v mase) (Rai a Bai, 2015, s. 159).

Přírozně se vyskytující inhibiční látky (kurkumin v kurkumě, kapsaicin v paprice a piperin v pepři) v koření také inhibují vznik biogenních aminů. Stejně účinky má řada bylin např. tymián, oregano, skořice, hřebíček (Naila et al., 2010, s. 142).

3 MIKROORGANIZMY DEGRADUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY

V této kapitole je uveden přehled mikroorganismů a jejich stručná charakteristika, u kterých byla prokázána schopnost degradovat biogenní aminy.

3.1 Bakterie

Obecně je degradační aktivita u bakterií považována za kmenově, než druhově, specifickou (Zaman et al., 2010, s. 447).

3.1.1 Rod *Bacillus*

Zástupci rodu *Bacillus* jsou grampozitivní, aerobní anebo fakultativně anaerobní, sporulující v přírodě velmi rozšířené tyčinky. Spory se vyznačují vysokou odolností k nepříznivým podmínkám, zejména vysokým teplotám. Tento rod zahrnuje mnoho druhů, které v potravinách způsobují alimentární otravy (např. *B. cereus*) a také některé zodpovědné za jejich kažení (např. *B. coagulans*) (Ray a Bhunia, 2014, s. 25).

Mah a Hwang (2009, s. 798) popisují degradaci histaminu u některých kmenů *Bacillus coagulans*. Izoláty z rybí omáčky *Bacillus* sp. LMG 21002 a *Bacillus megaterium* KL-197 taktéž vykazovaly histamin degradující aktivitu (Kim a Kim, 2006, s. 120). V jiné studii byla zjištěna schopnost degradovat histamin, putrescin a kadaverin u *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus humi* (Zaman et al., 2010, s. 445). *Bacillus polymyxa* D05-1 byl schopen v médiu za 24 hodin degradovat až 100 % histaminu, o něco nižší degradační aktivita byla pozorována u *Bacillus licheniformis* a *Bacillus cereus* (Lee et al., 2015, s. 841).

3.1.2 Rod *Brevibacterium*

Rod *Brevibacterium* zahrnuje grampozitivní, nesporulující, aerobní, nepravidelné tyčinky (Ray a Bhunia, 2014, s. 26).

U dvou kmenů *Brevibacterium linens*, které se využívají jako mazová kultura při výrobě sýrů, byla zjištěna degradační aktivita histaminu a tyraminu (Leuschner a Hammes, 1998a, s. 874).

3.1.3 Rod *Lactobacillus*

Z potravinářského i biotechnologického hlediska významné bakterie rodu *Lactobacillus* jsou grampozitivní, nesporulující, fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní tyčinky, občasně koky. Produktem při fermentaci sacharidů je kyselina mléčná, dále také v případě heterofermentativní fermentace etanol a oxid uhličitý (Ray a Bhunia, 2014, s. 26; Šilhánková, 2008, s. 273-275).

Capozzi et al. (2012, s. 4) izolovali v průběhu malolaktické fermentace dva kmeny *Lactobacillus plantarum* schopné degradovat putrescin a tyramin. *Lactobacillus sakei* a *Lactobacillus curvatus* degradoval histamin (Dapkevicius et al., 2000, s. 112).

3.1.4 Rod *Micrococcus*

Grampozitivní koky rodu *Micrococcus* se vyznačují aerobním metabolismem, buňky jsou schopny růst v 5% přítomnosti NaCl (Šilhánková, 2008, s. 265).

Leuschner a Hammes (1998, s. 289) uvádí, že *Kocuria varians* (*Micrococcus varians*) LTH 1540 snížil výrazné množství tyraminu během zrání fermentovaných uzenin.

3.1.5 Rod *Staphylococcus*

Mezi rod *Staphylococcus* se řadí grampozitivní fakultativně anaerobní koky, které jsou schopny růst v 10% koncentraci NaCl (Šilhánková, 2008, s. 267).

Martuscelli et al. (2000) ve své studii pozorovali, že *Staphylococcus xylosus* měl vysokou schopnost rozkládat histamin v systému pufru. Některé kmeny degradovaly až 100 % histaminu, jiné byly schopné degradovat i tyramin (Martuscelli et al., 2000, s. 231). Aktivitou *Staphylococcus xylosus* bylo také zjištěno snížení histaminu a tyraminu v solených a fermentovaných ančovičkách (Mah a Hwang, 2009, s. 798). U izolátů *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus intermedius* a *Staphylococcus condimentis* z rybí omáčky byla pozorována schopnost degradovat histamin, putrescin a kadaverin (Zaman et al., 2010, s. 445). *Staphylococcus epidermidis* R11 degrduje histamin (Wang et al., 2015, s. 400).

3.1.6 Rod *Halomonas*

Rod *Halomonas* představuje gramnegativní, halotolerantní, aerobní tyčinky. *Halomonas shantousis* izolovaný z fermentované rybí omáčky má schopnost degradace biogen-

ních aminů (Jiang et al., 2014, s. 1073). *Halomonas marisflava* degraduje histamin (Kim a Kim, 2006, s. 120).

3.1.7 Ostatní bakterie

Arthrobacter sp. R45S, *Rummeliibacillus stabekisii*, *Agrobacterium tumefaciens* vykazovaly histamin degradující aktivitu (Kim a Kim, 2006, s. 120; Lee et al., 2015, s. 841).

3.2 Kvasinky

Kvasinky se řadí mezi eukaryotní mikroorganismy náležící mezi houby (*Fungi*). Jejich název je odvozen od schopnosti většiny z nich zkvašovat monosacharidy a některé disacharidy na etanol a oxid uhličitý (Šilhánková, 2008, s. 57). Některé kvasinky se využívají při výrobě potravin, ale některé mohou způsobovat také jejich kažení. Nejvýznamnějším zástupcem je rod *Saccharomyces*, jeho využití lze např. nalézt při výrobě piva, vína, lihovin, enzymů (Ray a Bhunia, 2014, s. 26, 126).

Bäumlisberger et al. (2015, s. 845-846) pozorovali u některých kmenů *Debaryomyces hansenii* a *Yarrowia lipolytica* schopnost degradovat biogenní aminy. Nejúčinnější byl kmen *Debaryomyces hansenii* H525, fenyletylamin a tyramin zcela degradoval.

3.3 Plísně

Plísně mohou růst v potravinách i v takových podmínkách (např. nízké pH a aktivita vody), ve kterých bakterie nemohou. Řadu z nich lze v potravinách nalézt a často jsou zodpovědné za kažení, navíc mohou také produkovat nežádoucí mykotoxiny. Nicméně některé plísně se běžně využívají při výrobě potravin (Ray a Bhunia, 2014, s. 25).

Vysoký potenciál degradace histaminu, tyraminu a putrescinu byl zjištěn u *Alternaria* sp., *Eurotiales nigrum*, *Pleosporales citrinum*, *Phoma* sp. a *Ulocladium chartarum*, které se podařilo izolovat z vinné révy (Cueva et al., 2012, s. 676). Schopnost degradace biogenních aminů byla také pozorována u *Aspergillus oryzae* CECT 2094, *Penicillium citrinum* CECT 20782 a *Penicillium roqueforti* CECT 2905 (Cueva et al., 2012, s. 674, 675).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cíle diplomové práce:

- Vytvořit literární rešerši, která podává výchozí informace pro zpracování praktické části práce.
- Prozkoumat dekarboxylázovou aktivitu sbírkových mlékárenských kultur s dieteticko-léčebnými účinky, protože mnozí zástupci probiotických kultur mohou patřit mezi potenciální producenty biogenních aminů.
- Degradovat biogenní aminy pomocí enzymu diaminooxidázy.
- Izolovat mikroorganismy degradující biogenní aminy z různých potravinových matric.
- Charakterizovat a identifikovat mikroorganismy schopné degradovat biogenní aminy.
- U vybraných izolovaných mikroorganismů sledovat schopnost degradace biogenních aminů v závislosti na vnějších podmínkách.
- Zpracovat výsledky a vyvodit doporučení a závěry.

Naplňování všech cílů probíhalo tedy ve čtyřech experimentech. Experiment I představoval skrínig dekarboxylázové aktivity sbírkových mlékárenských kultur. V experimentu II se pozorovala degradace biogenních aminů působením enzymu diaminooxidázy. Jednalo se o pilotní experiment, ve kterém bylo cílem zhodnotit funkčnost tohoto enzymu v modelovém systému. Experiment III představoval izolaci a následnou identifikaci degradérů z různých potravinových matric a experiment IV zkoumal kinetiku degradace biogenních aminů v závislosti na vnějších podmínkách u izolovaného degradéra *Bacillus subtilis*.

5 MATERIÁLÝ A METODIKA

5.1 Dekarboxylázová aktivita sbírkových mlékárenských kultur

5.1.1 Použité mikroorganismy

Schopnost produkce biogenních aminů byla zkoumána u vybraných mlékárenských kultur (viz. tabulka 2), které byly získány ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů Laktoflora, Tábor.

Tabulka 2: Seznam použitých kultur

Číslo vzorku	Sbírkový mikroorganismus	Typ kultivačního média
1	<i>Lbc. helveticus</i> CCDM 125	MRSC
2	<i>Lbc. helveticus</i> CCDM 447	MRSC
3	<i>Streptococcus thermophilus</i> CCDM 129	M17
4	<i>Lbc. helveticus</i> CCDM 122	MRSC
5	<i>Lbc. rhamnosus</i> CCDM 150	MRSC+C
6	<i>Lactococcus lactis</i> susp. <i>lactis</i> CCDM 416	M17
7	<i>Lactococcus lactis</i> susp. <i>lactis</i> CCDM 731	M17
8	<i>Enterococcus faecium</i> CCDM 922	MRSC
9	<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 182	MRSC
10	<i>Lbc. rhamnosus</i> CCDM 821	MRSC
11	<i>Lbc. acidophilus</i> CCDM 151	MRSC
12	<i>Lbc. helveticus</i> CCDM 98	MRSC
13	<i>Propionibacterium</i> sp. CCDM 160	YELG
14	<i>Propionibacterium</i> sp. CCDM 164	YELG
15	<i>Lbc. helveticus</i> CCDM 468	MRSC
16	<i>Lbc. delbrueckii</i> CCDM 237	MRSC*
17	<i>Lbc. helveticus</i> CCDM 850	MRSC
18	<i>Lactococcus lactis</i> susp. <i>lactis</i> CCDM 74	M17
19	<i>Lbc. animalis</i> CCDM 663	MRSC+C
20	<i>Lbc. helveticus</i> CCDM 153a	MRSC
21	<i>Staphylococcus</i> CCDM 153b	MRSC
22	<i>Lactococcus lactis</i> susp. <i>cremoris</i> CCDM 421	M17
23	<i>Lbc. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CCDM 66	MRSC
24	<i>Lbc. helveticus</i> CCDM 92	MRSC
25	<i>Bifidobacterium</i> sp. CCDM 94	M17
26	<i>Lbc. helveticus</i> CCDM 121	MRSC
27	<i>Streptococcus thermophilus</i> CCDM 144	MRSC
28	<i>Lbc. fermentum</i> CCDM 154	MRS
29	<i>Lbc. bulgaricus</i> CCDM 767	MRSC

Pozn. – jednotlivá kultivační média a jejich charakteristika je uvedena dále v kapitole 5.1.3

5.1.2 Přístroje a pomůcky

- Váhy laboratorní Adventurere Pro (OHAUS)
- pH metr (EUTECH instruments)
- Sterilizátor H+P Varioklav 135S
- Inkubátor mikrobiologický (Memmert)
- Box laminární BIO IIA, Biohazard (TELSTAR)
- Centrifuga chlazená ROTANA 460R
- Termoblok Benchmark Digital HEAT BLOCK
- HPLC Agilent Technologies (sestava se skládá z binární pumpy a autosampleru La-bAlliance, DAD a detektoru Agilent Technologies 1260 Infinity a degaseru)
- Kolona Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD
- Laboratorní sklo a plasty

5.1.3 Příprava kultivačních médií a roztoků

Sbírkové kultury byly kultivovány dle doporučení výrobce v bujónech M17, YELG, MRSC, MRSC+C a MRSC*. Každý kmen byl kultivován v médiu podle tabulky 2.

Dekarboxylázová aktivita se posuzovala pomocí přidaných aminokyselin, které sloužily jako prekurzory pro jednotlivé biogenní aminy. Do všech kultivačních médií, ve kterých byla sledována dekarboxylázová aktivita, byly přidány aminokyseliny (lyzin, histidin, tyrozin, ornitin, arginin, fenylalanin a tryptofan) v koncentraci $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (každá z uvedených aminokyselin).

Kultivační médium MRS bylo připraveno navážením příslušného množství půdy (dle doporučení výrobce), 2 g každé aminokyseliny a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody. Kultivační médium M17 bylo připraveno navážením příslušného množství půdy (dle doporučení výrobce), 2 g každé aminokyseliny a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody.

U modifikovaných kultivačních médií MRSC, MRSC+C, MRSC* a YELG byly nejprve naváženy jednotlivé složky v množství uvedeném v tabulkách 3 – 6, které byly rozpuštěny v 1000 ml destilované vody.

Všechna připravená kultivační média byla rozpipetována po 7 ml do zkumavek a byla sterilizována v autoklávu ($121 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 minut).

Tabulka 3: Složení půdy MRSC

Složka	Množství [g]
MRS Broth	55,15
NaHCO ₃	2
Aminokyseliny – lyzin, histidin, tyrozin, ornitin, arginin, fenylalanin a tryptofan	2 (každá AMK)
Destilovaná voda	1000

Tabulka 4: Složení půdy MRSC+C

Složka	Množství [g]
MRS Broth	55,15
NaHCO ₃	2
Cystein	0,5
Aminokyseliny – lyzin, histidin, tyrozin, ornitin, arginin, fenylalanin a tryptofan	2 (každá AMK)
Destilovaná voda	1000

Tabulka 5: Složení půdy MRSC*

Složka	Množství [g]
MRS Broth	55,15
NaHCO ₃	2
Maltóza	5
Fruktóza	5
Aminokyseliny – lyzin, histidin, tyrozin, ornitin, arginin, fenylalanin a tryptofan	2 (každá AMK)
Destilovaná voda	1000

Tabulka 6: Složení půdy YELG

Složka	Množství
Kyselina mléčná (80%)	12,5 ml
Tryptan	10 g
Yeast extrakt	5 g
KH ₂ PO ₄	5 g
Glycerol (85%)	8 ml
Maggi	10 ml
Aminokyseliny – lyzin, histidin, tyrozin, ornitin, arginin, fenylalanin a tryptofan	2 (každá AMK)
Destilovaná voda	1000 ml
pH upraveno na 7	

5.1.4 Příprava a odběr vzorků pro analýzu

Varianty daných kultivačních médií byly zaočkovány 100 μl inokula. Inokulum bylo připraveno oživením zmražených kmenů v předepsaných kultivačních médiích, do kterých nebyly přidány aminokyseliny. Po oživení ještě následovalo vybuzení, kdy každý kmen byl dvakrát přeočkován a kultivován v bujónu s aminokyselinami. Dekarboxylázová aktivita pro každou kulturu se zjišťovala paralelně ve 3 zkumavkách. Kultivační podmínky byly voleny dle doporučení dodavatele testovaných kmenů (kultivační teplota 30 °C).

Po kultivaci byla živná média centrifugována (4500 otáček, 10 minut) a z každé zkumavky bylo odebráno 650 μl supernatantu a přidáno k 650 μl kyseliny chloristé (Merck) o koncentraci 1,2 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ do dvou eppendorfkových mikrozkušavek. Vzorky v mikrozkušavkách byly zamrazeny a připraveny pro následnou derivatizaci.

5.1.5 Chromatografické stanovení biogenních aminů

5.1.5.1 Derivatizace dansylchloridem

Derivatizace dansylchloridem byla provedena dle návodu v laboratoři Ústavu technologie potravin.

K upraveným vzorkům bylo přidáno 100 μl vnitřního standardu (1,7-heptandiamin v koncentraci 500 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Z této směsi bylo odpipetováno 1 ml do derivatizační nádoby, dále do derivatizačních nádobek bylo přidáno 1,5 ml karbonátového pufru o pH 11,0 – 11,1 a 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu o koncentraci 5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ v acetonu. Dobře uzavřené nádoby byly třepány v temnu po dobu 20 hodin. Poté se ke vzorkům přidalo 200 μl roztoku prolinu a vzorky se daly třepat na další hodinu. Po hodině třepání se ke vzorkům přidaly 3 ml heptanu a po uzavření nádobek se vzorky 3 minuty třepaly ručně. Následně bylo odpipetováno z derivatizačních nádobek 1 ml heptanové vrstvy do vialek. Pod proudem dusíku byl z vialek odpařen vzorek při teplotě 60 °C. Suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu. Do doby analýzy byly takto připravené vzorky uchovány v mrazícím zařízení při teplotách pod -18 °C.

5.1.5.2 Chromatografické stanovení biogenních aminů

Před analýzou byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 μm a dávkovány do chromatografického systému (přístroj HPLC Agilent Technologies) s kolonou Zorbax Eclipse plus RRHD C18 50 mm x 3,0 mm.

Program gradientové eluce, kterým probíhala separace dansylderivátu biogenních aminů, je znázorněn v tabulce 7. Detekce dansylderivátu biogenních aminů probíhala spektrofotometricky UV zářením o vlnové délce 254 nm (pomocí DAD detektoru Agilent Technologies 1260 Infinity).

Tabulka 7: Gradientový eluční program pro HPLC

Čas (min)	10% Acetonitril (%)	100% Acetonitril (%)
0,1	41	59
1,9	37	63
3,5	18	82
4,0	0	100
9,5	0	100
11,5	41	59
15,5	41	59

5.2 Degradace biogenních aminů působením enzymu diaminooxidázy

5.2.1 Přístroje a pomůcky

- Inkubátor mikrobiologický (Memmer)
- Mikropipeta (Biohit)
- Váhy laboratorní Adventurere Pro (OHAUS)
- HPLC Agilent Technologies (sestava se skládá z binární pumpy a autosampleru LabAlliance, DAD a detektoru Agilent Technologies 1260 Infinity a degaseru)
- Kolona Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD
- Laboratorní sklo a plasty

5.2.2 Použité roztoky a chemikálie

Pro výrobu zásobního roztoku putrescinu bylo ve 100 ml destilované vody rozpuštěno 88,15 mg putrescinu (Sigma-Aldrich). Ze zásobního roztoku byl připraven 10x zředěný roztok, kdy ve 100 ml destilované vody bylo rozpuštěno 100 µl zásobního roztoku putrescinu.

Zásobní roztok enzymu diaminooxidázy (Sigma-Aldrich) byl připraven navážením 0,5 g toho enzymu a rozpuštěním v 5 ml destilované vody (aktivita 1 ml ~ 5 U).

5.2.3 Příprava a odběr vzorků pro analýzu

Nejprve bylo 5 ml 10x koncentrovaného roztoku putrescinu zředěno 5 ml destilované vody a pH bylo pomocí HCl upraveno na hodnotu 7,2. Takto připravený roztok byl napipetován po 1 ml do eppendorfkových mikrozkušavek. Do každé mikrozkušavky byla přidána diaminooxidáza, do 5ti mikrozkušavek 500 μ l (odpovídá aktivitě 2,5 U) a do dalších 5ti mikrozkušavek 300 μ l (odpovídá aktivitě 1,5 U) připraveného zásobního roztoku enzymu.

Vzorky byly kultivovány při 37 °C. Odběry vzorků byly v intervalech 1, 2, 6, 24 a 48 hodin. Při každém odběru byl obsah mikrozkušavky rozdělen na polovinu a do každé byla přidána kyselina chloristá v poměru 1:1. Vzorky byly zamrazeny a připraveny pro následnou derivatizaci.

5.2.4 Chromatografické stanovení degradace biogenních aminů

Stanovení úbytku biogenních aminů bylo provedeno stejným postupem derivatizace a chromatografickým stanovením jako v kapitole 5.1.5.

5.3 Izolace a identifikace degradérů z různých potravinových matric

5.3.1 Popis vzorků

Izolace mikroorganismů degradujících biogenní aminy byla provedena u 360 vzorků potravin, jejich seznam je uveden v tabulce 8.

Tabulka 8: Seznam skupin a počty vzorků potravin, u kterých byla provedena izolace degradérů

Seznam vzorků potravin	
Sýry a tavené sýry	70
Mléko, smetana	9
Kysané mléčné výrobky	15
Čokoláda	12
Káva, čaj, koření	9
Ovocné pomazánky, kompoty, přesnídávky	8
Pivo	7
Masné výrobky	200
Ovoce, zelenina, ořechy	10
Ostatní	25
Celkem počet	365

5.3.2 Přístroje a pomůcky

- Stomacher Seward
- Vortex
- Sáčky do stomacheru

Další přístroje a pomůcky použity stejné jako v kapitole 5.1.2.

5.3.3 Příprava kultivačních médií a roztoků

Izolace bakterií degradujících biogenní aminy byla provedena v minerálním médiu. Nejprve byly připraveny zásobní roztoky, které byly potřebné pro jeho přípravu.

- Roztok pufru KH_2PO_4

Byl připraven navážením 9,07 g KH_2PO_4 a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody.

- Roztok pufru $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

Byl připraven navážením 23,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody.

- Roztok stopových prvků

Roztok stopových prvků byl připraven navážením příslušného množství dále zobrazených složek a rozpuštěných v 1000 ml destilované vody.

$\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,043 g

H_3BO_3 0,057 g

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,043 g

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 0,037 g

$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,025 g

$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,040 g

- Roztok $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Byl připraven navážením 10 g $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody.

- Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

Byl připraven navážením 3 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody.

- Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Byl připraven navážením 1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody.

- Roztok NaCl

Byl připraven navážením 50 g NaCl a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody.

- Roztok biogenních aminů

Roztok biogenních aminů byl připraven navážením příslušného množství biogenních aminů a jejich rozpuštěním v 1000 ml destilované vody, pH roztoku bylo upraveno pomocí HCl na 6,8.

Tyramin 2 g

Putrescin 2 g

Kadaverin 2 g

Histamin 2 g

Fenyletylamin 2 g

Tryptamin 2 g

- Minerální médium tekuté

Minerální médium tekuté bylo připraveno ve dvou variantách – s biogenními aminy a bez biogenních aminů. K přípravě minerálního média byly odměřeny připravené roztoky v uvedeném množství a doplněny do 1 litru destilovanou vodou. Médium bylo rozpipetováno po 5 ml do zkumavek a sterilizováno.

Roztok pufru KH_2PO_4 20 ml

Roztok pufru $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 80 ml

Roztok stopových prvků 2 ml

Roztok $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 10 ml

Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 10 ml

Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 10 ml

Roztok NaCl 10 ml

Roztok biogenních aminů 100 ml

- Minerální médium tuhé

Minerální médium tuhé má stejné složení jako výše popsané minerální médium tekuté, včetně přidaných biogenní aminů, navíc byl přidán agar v množství $12 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Po sterilizaci byly půdy rozlévány do sterilních Petriho misek.

- Fyziologický roztok

Fyziologický roztok byl připraven navážením 8,5 g NaCl a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody a poté byl sterilizován.

5.3.4 Příprava a odběr vzorků potravin pro izolaci degradujících mikroorganismů

Z každé potraviny bylo do sáčku sterilně odebráno 5 g vzorku, ke kterému bylo přidáno 45 ml sterilního fyziologického roztoku. Vzorky v sáčku byly homogenizovány ve stomacheru 5 minut. Poté bylo 10 μl této suspenze zaočkováno minerální médium v obou variantách – každým vzorkem tedy bylo zaočkováno minerální médium s biogenními aminy a také médium bez biogenních aminů.

Samotné minerální médium představuje minimální zdroj mikrobiogenních, makrobiogenních a stopových prvků potřebných pro životní pochody mikroorganismů. Varianta minerálního média s biogenními aminy má jako jediný zdroj uhlíku a dusíku právě biogenní aminy, které mohou přítomní degradéři využít.

Vzorky byly kultivovány při 30 °C a pokud byl zaznamenán patrný nárůst (zákal) ve zkumavce s minerálním médiem s biogenními aminy (odečty po 24, 48, 72 a 96 hodinách a týdně), byl vzorek přeočkován na tuhé minerální médium s biogenními aminy.

5.3.5 Identifikace izolovaných degradérů

5.3.5.1 *Identifikace metodou MALDI-TOF MS*

Mikroorganismy, které se podařilo izolovat dle postupu v kapitole 5.3.4, byly dále podrobeny identifikaci pomocí metody MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spectrometry – hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem). Identifikace vzorků byla

provedena na Slovenské poľnohospodárskej univerzite v Nitre, Fakulta biotechnológie a potravinárstva.

Z narostlých kultur na tuhém minerálním médiu byl proveden křížový roztěr pro získání čisté kultury. Po 24 hodinách kultivace při 30 °C byla kultura sterilně odebrána kličkou do sterilní eppendorfkové mikrozkušavky, do které bylo přidáno 150 µl sterilní destilované vody a 450 µl etanolu. Takto připravené vzorky byly odeslány na identifikaci.

5.3.5.2 Identifikace sekvenováním produktů PCR – genu 16S rRNA

U 6 vybraných degradérů byla navíc provedena identifikace molekulární metodou. Metoda spočívala v sekvenování produktů polymerázové řetězové reakce (PCR) – genu pro 16S rRNA.

Pro amplifikaci genu 16S rRNA byl použit kódující primer 341F (5'-CCTA CGGGAGGCAGCAG-3') a antikodující primer 907R (5'-CCGTCAATT CCTTTGAGTTT-3'). Pro přípravu reakční směsi pro specifickou amplifikaci genu bylo použito 10 µl komerčního kitu G2 Hot Start Green Master Mix (Roche, Německo), 800 nmol.l⁻¹ primeru 341F, 800 nmol.l⁻¹ primeru 907R a 1 µl izolované DNA daného vzorku. DNA byla izolována pomocí komerčního kitu Eurx dle návodu výrobce. Byla použita také negativní kontrola – stejné objemy kitu a primerů bez templátu DNA. Amplifikace probíhala v termocykléru dle předem nastaveného programu, viz. tabulka 9. Kontrola kvality DNA probíhala pomocí elektroforetické separace na 1% agarózovém gelu (1 hodina, 90 V). Připravené vzorky byly odeslány na sekvenaci, která byla provedena firmou SEQme s.r.o. (SEQme, Dlouhá 176, Dobříš). Porovnání získaných sekvencí bylo provedeno ve veřejně dostupném programu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Tabulka 9: Jednotlivé kroky amplifikace

	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Denaturace (horký start)	94	10 min	1
Amplifikace (připojení primerů, syntéza řetězce DNA)	94	30 s	35
	57	30 s	
	72	60 s	
Extenze	70	10 min	1

5.3.6 Chromatografické stanovení úbytku biogenních aminů izolovanými degradéry

U vybraných degradérů izolovaných z různých potravinových matric, viz. tabulka 10, byla zkoumána schopnost degradace biogenních aminů v čase v podmínkách *in vitro*. Tyto mikroorganismy se podařilo izolovat z přírodního zrajícího sýru typu gouda.

Tabulka 10: Vybrané izolované mikroorganismy schopné degradovat biogenní aminy

Označení vzorku	Identifikovaný mikroorganismus
1a	<i>Bacillus subtilis</i>
2c	<i>Bacillus altitudinis</i>
5a	<i>Acinetobacter pitii</i>
13b	<i>Bacillus pumilus</i>
14b	<i>Bacillus safensis</i>
16a	<i>Rhizobium radiobacter</i>
16b	<i>Enterobacter cloacae</i>

Zkumavky s minerálním médiem tekutým s biogenními aminy byly zaočkovány 100 μl předem připraveného inokula (24 hodin pomnožená kultura).

Po kultivaci při 30 °C (odběry po 0, 6, 12, 24, 36, 60 a 72 hodinách) byly vzorky centrifugovány (4500 otáček, 10 minut) a z každé zkumavky bylo odebráno 650 μl supernatantu do eppendorfkové mikrozkušavky, do které bylo přidáno 650 μl kyseliny chloristé (Merck) o koncentraci 1,2 mol $\cdot\text{l}^{-1}$. Vzorky v mikrozkušavkách byly zamrazeny.

Další stanovení úbytku biogenních aminů bylo provedeno stejným postupem derivatizace a chromatografickým stanovením jako v kapitole 5.1.5.

5.4 Degradace biogenních aminů v závislosti na vnějších podmínkách u vybraného izolovaného degradéra

5.4.1 Použité mikroorganismy

Kinetika degradace biogenních aminů v závislosti na vnějších podmínkách byla sledována u *Bacillus subtilis*, který byl izolován a následně identifikován z potravin výše uvedenými postupy, viz. kapitola 5.3.

Degradace biogenních aminů v minerálním médiu byla zkoumána pro různé hodnoty pH média, teploty kultivace a způsobu kultivace (klasická a na třepačkách).

5.4.2 Příprava kultivačních médií a roztoků

Bylo připraveno minerální médium tekuté s biogenními aminy (putrescin, fenyletylamin, histamin, kadaverin a tyramin) stejným postupem, který je uveden v kapitole 5.3.3. Před rozpipetováním do zkumavek po 5 ml bylo pomocí HCl a NaOH upraveno pH média. Byly připraveny čtyři varianty minerálního média – médium o pH 5, 6, 7 a 8.

5.4.3 Příprava a odběr vzorků pro analýzu

Zkumavky s minerálním médiem tekutým s biogenními aminy byly zaočkovány 100 μ l předem připraveného inokula (24 hodin pomnožená kultura).

Celkem bylo zaočkováno 360 zkumavek s minerálním médiem, z toho polovina byla kultivována klasicky a druhá polovina na třepačce – byly použity tři třepačky, které byly nastavené na stejnou rychlost (pro každou teplotu kultivace jedna). Degradace byla sledována ve třech různých teplotách (30, 23 a 10 °C).

- odběrové časy podle teploty kultivace byly následující:
při 30 °C po 6; 12; 24; 36; 48 hodinách
při 23 °C po 6; 12; 24; 48; 72 hodinách
při 10 °C po 12; 24; 48; 72; 96 hodinách

Odběry byly provedeny ve stanovených časech a kombinacích faktorů vždy ve 3 paralelních zkumavkách. Každý vzorek byl centrifugován (4500 otáček, 10 minut) a z každé zkumavky bylo odebráno do dvou eppendorfkových mikrozkušavek 650 μ l supernatantu a 650 μ l kyseliny chloristé (Merck) o koncentraci 1,2 mol·l⁻¹. Vzorky v mikrozkušavkách byly zamrazeny a připraveny pro následnou derivatizaci.

5.4.4 Chromatografické stanovení degradace biogenních aminů

Stanovení úbytku biogenních aminů bylo provedeno stejným postupem derivatizace a chromatografickým stanovením jako v kapitole 5.1.5.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Dekarboxylázová aktivita sbírkových mléčárenských kultur

V rámci prvního experimentu byl proveden skrínig tvorby biogenních aminů u 29 kmenů sbírkových mléčárenských kultur.

Z výsledků lze vyčíst (viz. tabulka 11) kolísavý charakter produkce biogenních aminů u jednotlivých mléčárenských kmenů. Žádná z testovaných kultur neprodukovala tryptamin a kromě jedné kultury (*Enterococcus faecium* CCDM 922) žádná neprodukovala spermin. Všechny 29 mléčárenských kultur produkovalo tyramin (od 6,2 do 1123,0 mg·l⁻¹) a spermidin (od 0,9 do 2,8 mg·l⁻¹). Fenyletylamin produkovalo 7 testovaných kmenů (od 2,2 do 265,2 mg·l⁻¹), putrescin 21 kmenů (od 1,0 do 8,3 mg·l⁻¹), kadaverin 3 kmeny (od 1,6 do 3,0 mg·l⁻¹) a histamin 19 kmenů (od 1,3 do 5,5 mg·l⁻¹). Výrazně nejvyšší produkcí biogenních aminů se vyznačoval *Enterococcus faecium* CCDM 922, součet všech vyprodukovaných biogenních aminů byl 1393,0 mg·l⁻¹.

Tabulka 11: Produkce biogenních aminů v mg·l⁻¹ (průměr ± směrodatná odchylka) u testovaných sbírkových kmenů

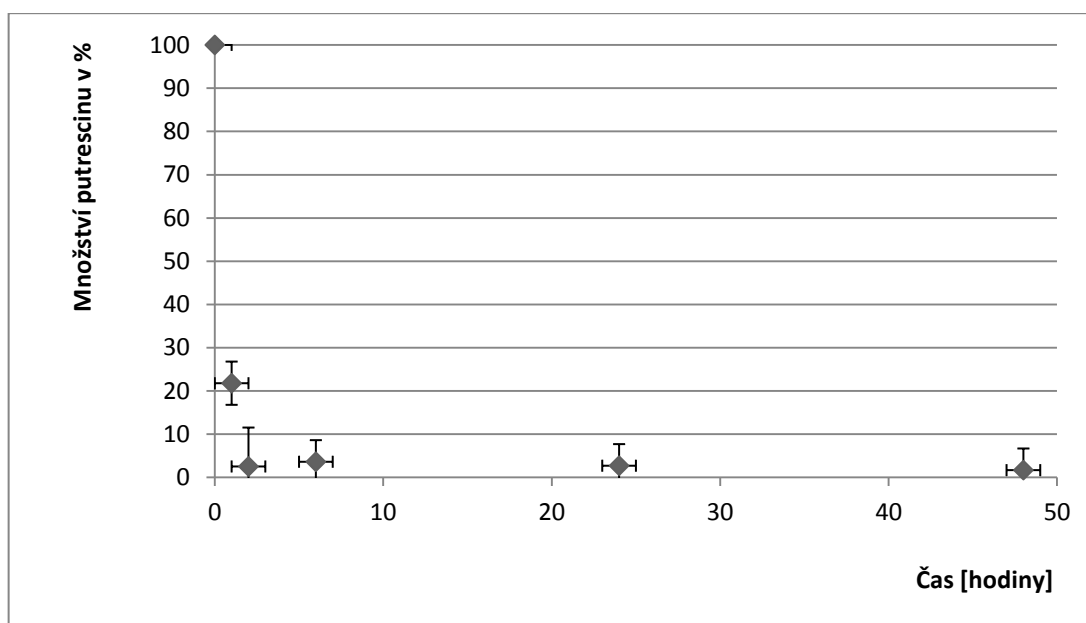
Označení kmene	PHE	PUT	CAD	HIM	TYR	SPD	Suma
<i>Lbc. helveticus</i> CCDM 125	ND	3,0±0,2	ND	3,9±0,2	15,6±1,1	1,6±0,1	24,1
<i>Lbc. helveticus</i> CCDM 447	ND	2,5±0,1	ND	5,5±0,2	19,0±0,8	1,4±0,1	28,4
<i>Streptococcus thermophilus</i> CCDM 129	ND	7,4±0,3	ND	1,3±0,1	23,4±1,2	1,8±0,1	33,9
<i>Lbc. helveticus</i> CCDM 122	4,4±0,1	ND	ND	5,0±0,3	17,8±1,0	1,0±0,0	28,2
<i>Lbc. rhamnosus</i> CCDM 150	4,3±0,2	3,5±0,2	ND	4,4±0,2	13,5±0,9	1,3±0,1	27,0
<i>Lactococcus lactis</i> susp. <i>lactis</i> CCDM 416	ND	8,3±0,6	ND	ND	19,2±0,8	1,2±0,1	28,7
<i>Lactococcus lactis</i> susp. <i>lactis</i> CCDM 731	ND	6,8±0,4	ND	ND	15,9±0,9	1,4±0,1	24,2
<i>Enterococcus faecium</i> CCDM 922	265,2±12,7	ND	ND	ND	1123,0±30,2	2,8±0,5	1393,0
<i>Lbc. plantarum</i> CCDM 182	ND	2,9±0,2	ND	ND	14,1±0,7	1,8±0,1	18,8
<i>Lbc. rhamnosus</i> CCDM 821	ND	3,5±0,2	ND	4,1±0,2	15,6±0,8	1,0±0,0	24,3
<i>Lbc. acidophilus</i> CCDM 151	ND	3,7±0,2	ND	2,7±0,1	17,5±0,9	0,9±0,0	24,8
<i>Lbc. helveticus</i> CCDM 98	ND	1,6±0,1	ND	ND	15,7±1,0	1,5±0,1	18,8
<i>Propionibacterium</i> sp. CCDM 160	ND	1,9±0,1	2,0±0,1	1,6±0,1	26,8±2,0	1,1±0,1	33,4
<i>Propionibacterium</i> sp. CCDM 164	ND	ND	ND	ND	25,6±0,9	1,0±0,1	26,6
<i>Lbc. helveticus</i> CCDM 468	ND	2,5±0,1	1,6±0,1	5,2±0,3	14,9±1,1	1,1±0,1	25,3
<i>Lbc. delbrueckii</i> CCDM 237	ND	ND	ND	4,8±0,2	19,2±1,0	1,1±0,1	25,1
<i>Lbc. helveticus</i> CCDM 850	ND	ND	ND	5,1±0,4	15,4±1,1	1,2±0,1	21,7
<i>Lactococcus lactis</i> susp. <i>lactis</i> CCDM 74	ND	6,2±0,3	ND	ND	15,1±0,5	1,4±0,1	22,7
<i>Lbc. animalis</i> CCDM 663	ND	2,0±0,1	ND	5,5±0,2	13,0±0,7	1,4±0,1	22,1
<i>Lbc. helveticus</i> CCDM 153a	3,5±0,2	2,3±0,1	ND	3,4±0,2	20,8±0,8	1,3±0,1	31,3
<i>Staphylococcus</i> CCDM 153b	8,4±0,7	2,5±0,1	ND	3,5±0,1	15,8±1,5	1,2±0,0	31,4
<i>Lactococcus lactis</i> susp. <i>cremoris</i> CCDM 421	ND	7,0±0,2	ND	3,4±0,1	13,4±0,7	2,2±0,1	26,0
<i>Lbc. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CCDM 66	ND	ND	ND	ND	7,2±0,4	2,1±0,1	9,3
<i>Lbc. helveticus</i> CCDM 92	ND	ND	3,0±0,2	ND	9,5±0,5	1,3±0,0	13,9
<i>Bifidobacterium</i> sp. CCDM 94	5,9±0,2	ND	ND	3,5±0,2	6,9±0,5	2,3±0,1	18,6

<i>Lbc. helveticus</i> CCDM 121	3,2±0,1	1,0±0,0	ND	3,1±0,1	6,9±0,2	1,4±0,1	15,6
<i>Streptococcus thermophilus</i> CCDM 144	ND	3,0±0,2	ND	ND	9,2±0,5	1,7±0,0	13,9
<i>Lbc. fermentum</i> CCDM 154	ND	2,3±0,0	ND	2,8±0,1	10,9±0,9	1,6±0,1	17,6
<i>Lbc. bulgaricus</i> CCDM 767	ND	2,5±0,1	ND	2,9±0,1	6,2±0,2	2,1±0,1	13,7

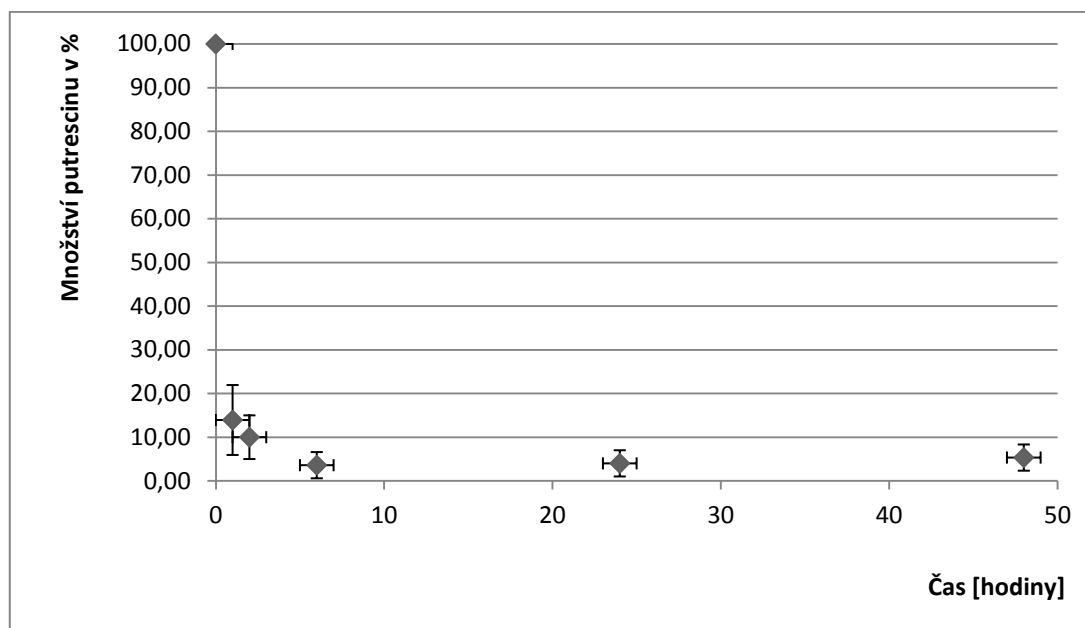
Vysvětlivky: PHE – fenyletylamin, PUT – putrescin, CAD –kadaverin, HIM – histamin, TYR – tyramin, SPD – spermidin, ND – nebylo detekováno

6.2 Degradace biogenních aminů působením enzymu diaminooxidázy

Cílem tohoto pilotního experimentu bylo sledovat degradaci putrescinu v čase pomocí enzymu diaminooxidázy s aktivitou 1,5 U a 2,5 U. Degradaci putrescinu působením diaminooxidázy s aktivitou 1,5 U znázorňuje obrázek 2, množství putrescinu se z $89 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ po 48 hodinách kultivace snížilo o 98,3 % na $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. V případě diaminooxidázy s aktivitou 2,5 U, kterou znázorňuje obrázek 3, byl zaznamenán úbytek putrescinu z původních $89 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ o 94,7 % na $4,7 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. V obou případech došlo už v první hodině k většinové degradaci putrescinu. Diaminooxidáza s aktivitou 1,5 U snížila množství putrescinu v první hodině z $89 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ na $19,4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a diaminooxidáza s aktivitou 2,5 U z $89 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ na $12,4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.



Obrázek 2: Degradace putrescinu působením diaminooxidázy (1,5 U)



Obrázek 3: Degradace putrescinu působením diaminooxidázy (2,5 U)

6.3 Izolace a identifikace degradérů z různých potravinových matric

6.3.1 Identifikace metodou MALDI-TOF MS

Z různých potravinových matric se podařilo celkem izolovat 44 mikroorganismů schopných degradovat biogenní aminy. Izolované kmeny byly identifikovány na Slovenské poľnohospodárskej univerzite v Nitre pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF na úrovni rodu a druhu. Výsledky identifikace jsou uvedeny v tabulce 12. Spolehlivost výsledné identifikace je znázorněna pomocí skóre, které se pohybuje v rozmezí 0 (žádná shoda) až 3 (maximální shoda). U zeleně zvýrazněných hodnot (hodnoty od 3 do 2) proběhla spolehlivá identifikace na úrovni druhu. U žlutě zvýrazněných hodnot (hodnoty od 1,9 do 1,7) byly mikroorganismy spolehlivě identifikovány na úrovni rodu.

Všechny izoláty se nepodařilo touto metodou úspěšně identifikovat, 6 izolovaných kmenů mělo hodnotu skóre nižší než 1,7. Příčina neshody výsledků s knihovnou hmotnostních spekter mohla být v kontaminaci vzorku jiným mikroorganizmem, nízké koncentraci mikroorganismů nebo nepřítomnosti daného spektra v knihovně (knihovny přednostně vytvářeny pro klinické izoláty).

Tabulka 12: Identifikace izolovaných mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS

Č. izo- látu	Organismus (nejlepší shoda)	Skóre	Č. izo- látu	Organismus (nejlepší shoda)	Skóre
1.	<i>Bacillus subtilis</i>	2,101	23.	<i>Bacillus pumilus</i>	1,775
2.	<i>Acinetobacter pittii</i>	2,356	24.	<i>Acinetobacter pittii</i>	2,397
3.	<i>Bacillus pumilus</i>	2,093	25.	<i>Rhizobium radiobacter</i>	2,375
4.	<i>Bacillus altitudinis</i>	1,814	26.	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,265
5.	<i>Acinetobacter pittii</i>	2,502	27.	<i>Serratia marcescens</i>	2,149
6.	<i>Acinetobacter pittii</i>	2,516	28.	<i>Serratia marcescens</i>	2,164
7.	<i>Acinetobacter pittii</i>	2,319	29.	<i>Serratia marcescens</i>	2,316
8.	<i>Acinetobacter pittii</i>	2,401	30.	<i>Serratia marcescens</i>	2,273
9.	<i>Bacillus subtilis</i>	1,818	31.	<i>Pseudomonas koreensis</i>	1,895
10.	<i>Bacillus subtilis</i>	1,928	32.	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,306
11.	<i>Acinetobacter pittii</i>	2,373	33.	<i>Serratia marcescens</i>	2,182
12.	<i>Bacillus subtilis</i>	2,263	34.	<i>Serratia marcescens</i>	2,186
13.	<i>Acinetobacter pittii</i>	2,32	35.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,254
14.	<i>Bacillus subtilis</i>	1,7	36.	<i>Escherichia coli</i>	1,868
15.	<i>Acinetobacter pittii</i>	2,271	37.	<i>Pseudomonas fulva</i>	2,017
16.	<i>Acinetobacter pittii</i>	1,957	38.	<i>Pseudomonas fulva</i>	1,929
17.	<i>Bacillus subtilis</i>	1,935	39.	<i>Serratia ureilytica</i>	2,114
18.	<i>Acinetobacter pittii</i>	2,372	40.	<i>Serratia marcescens</i>	2,047
19.	<i>Bacillus pumilus</i>	1,96	41.	<i>Pseudomonas koreensis</i>	1,802
20.	<i>Bacillus pumilus</i>	2,135	42.	<i>Serratia ureilytica</i>	1,77
21.	<i>Bacillus safensis</i>	1,84	43.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,238
22.	<i>Micrococcus luteus</i>	2,431	44.	<i>Serratia ureilytica</i>	2,132

6.3.2 Identifikace sekvenováním produktů PCR – genu pro 16S rRNA

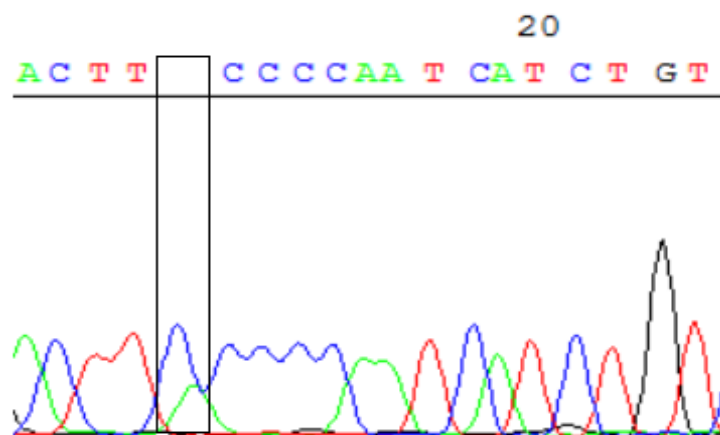
U 6 vybraných izolovaných degradérů byla provedena PCR za přítomnosti specifických primerů. Získané amplikony genu pro 16S rRNA byly sekvenovány na zakázku firmou SEQme s.r.o. Získané sekvence byly opraveny na základě posouzení chromatogramu v programu GATCViewer. Oprava sekvencí spočívala v doplnění, odstranění nebo výměně konkrétního nukleotidu, vybrané příklady takových oprav znázorňují obrázky 4–6. Opravy v sekvencích jsou barevně zvýrazněny, přeškrtnuté nukleotidy nebyly použity v

analýze z důvodu zhoršené kvality záznamu. Upravené sekvence byly zadány k porovnání v databázi sekvencí GenBank prostřednictvím programu BLAST. Výsledkem bylo 100 nejpodobnějších sekvencí s uvedenými procenty shody. Níže je pro každý vzorek vypsán jeden mikroorganismus s nejvyšší shodou se zadanou sekvencí.

- Izolát 1a – metodou MALDI-TOF MS identifikován jako *Bacillus subtilis*

Pořadí nukleotidů pro 16S rRNA:

GTACGACTTACCCCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCTAAAAGG
 TTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGT
 ACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGA
 TTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAAGTGAAGAACAGATT
 TGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGC
 ACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCT
 TCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAA
 CTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACAC
 GAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGACGTCC
 TATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCT
 TCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGA
 GTTTCAGTCTTTCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCA
 GCACTAAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGGCGTG
 GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTKTCGCTCCTCAGCGTC
 AGTTACAGASCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCKSKACGC



Obrázek 4: Část záznamu sekvence, ve které byly přidány 2 chybějící nukleotidy (C, A). Vysvětlivky: A – adenin, C – cytozin, G – guanin, T – tymin

Izolát 1a byl v programu BLAST identifikován jako *Bacillus subtilis*. Shoda sekvencí byla programem vypočítána na 99 % (identities 658/660).

- Izolát 2c – metodou MALDI-TOF MS identifikován jako *Bacillus altitudinis*

Pořadí nukleotidů pro 16S rRNA:

TTTACGACTTC C C C C A A T C A T C T G A C C C A C C T T C G G C G G C T G G C T C C A T A A A G G
 T T A C C T C A C C G A C T T C G G G T G T T A C A A A C T C T C G T G G T G T G A C G G G C G G T G T G T
 A C A A G G C C C G G G A A C G T A T T C A C C G C G G C A T G C T G A T C C G C G A T T A C T A G C G A
 T T C C A G C T T C A C G C A G T C G A G T T G C A G A C T G C G A T C C G A A C T G A G A A C A G A T T
 T A T G G G A T T G G C T A A A C C T T G C G G T C T C G C A G C C C T T T G T T C T G T C C A T T G T A G
 C A C G T G T G T A G C C C A G G T C A T A A S G G G C A T G A T G A T T T G A C S T C M T C C C C R C C T
 T C C T C C G G T T T G T C A C C A G S W G T C A C C G A A C A R T G C C C C G Y G A R T T G C T G G S G T
 T T T C G G A T A R K G G T T G C G C T T T G T T A K G G G A G A A T A A G T G C G A C A G T A A C T G C
 T C G C A C C T T G A C R G T A C C T W G C C M S A S T C C A C K G C T A A C Y A C G T G S C A A A C A G

Izolát 2c byl v programu BLAST identifikován jako *Bacillus pumilus*. Shoda sekvencí byla programem vypočítána na 99 % (identities 297/299).

- Izolát 5a – metodou MALDI-TOF MS identifikován jako *Acinetobacter pittii*

Pořadí nukleotidů pro 16S rRNA:

ETC A C C C C A A T C A T C T G T C C C A C C T T C G G C G G C T G G C T C C T A A A A G G T T A C C T C
 A C C G A C T T C G G T G T T A C A A A C T C T C G T G G T G T G A C G A G G C G C G T A G A T A G T A C
 A C A G G T A A C C G A G G A A C G T A T T C A C C T C G C A T G C T G A T C C G C A A T A T A C A A G C
 A A C G C C G C C T T C G C G C C A G A A A A Y T T G A A A A T C C C C T A G A G A A G A A G C T G C C T
 T G

Izolát 5a byl v programu BLAST identifikován jako *Bacillus subtilis*. Shoda sekvencí byla programem vypočítána na 91 % (identities 146/161).

- Vzorek 16a – metodou MALDI-TOF MS identifikován jako *Rhizobium radiobacter*

Pořadí nukleotidů pro 16S rRNA:

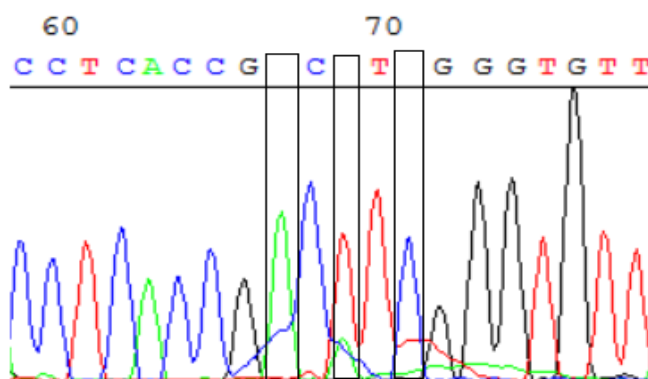
T A C C C C A G T C A T G A A T C A C A A A G A T G G T A A G C G C C C T C C C G A A G G T T A A G C T A
 C C T A C T T C T T T T G C A A C C A C T C C C A T G G T G T G A C G G G C G G T G T G T A C A A G G C C
 C G G G A A C G T A T T C A C C G T G G C A T T C T G A T C C A C G A T T A C T A G C G A T T C C G A C T T
 C A T G G A G T C G A G T T G C A G A C T C C A A T C C G G A C T A C G A C G C A C T T T A T G A G G T C
 C G C T T G C T C T C G C G A G G T C G C T T C T C T T T G T A T G C G C C A T T G T A R C A C G T G T G T
 A R C C C T A C T C C C A A A G G C C T G A G G A C G T A A C A G G G S A A T A T T G C A A A A G G G G T
 A T A A G C G T G A T

Izolát 16a byl v programu BLAST identifikován jako *Enterobacter hormaechei*. Shoda sekvencí byla programem vypočítána na 99 % (identities 274/277).

- Izolát 13b – metodou MALDI-TOF MS identifikován jako *Bacillus pumilus*

Pořadí nukleotidů pro 16S rRNA:

GGTACGACTTMCCCCAATCATSTGCCACCTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGT
TACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTA
CAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGAT
TCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTT
ATGGGATTGGCTAAACCTTGCGGTCTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGC
ACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCT
TCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAA
CTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACAC
GAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGAAAGCCC
TATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCT
TCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGA
GTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCA
GCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCA
GTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCA
TTTCACCGCTACACGTGGAATTCACACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCA
GTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGCTTCACATCAGACTTAAGG

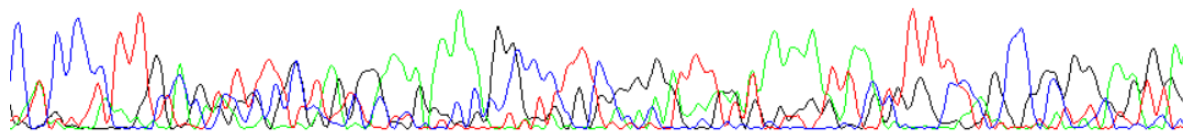
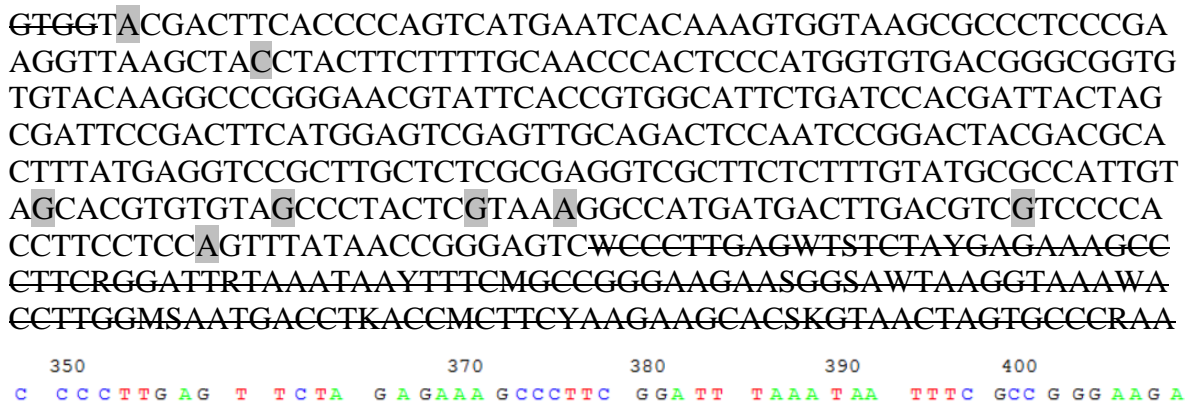


Obrázek 5: Část záznamu sekvence, ve které byly přidány 3 chybějící nukleotidy (A, T, C)

Izolát 13b byl v programu BLAST identifikován jako *Bacillus pumilus*. Shoda sekvencí byla programem vypočítána na 100 % (identities 791/791).

- Izolát 16b – metodou MALDI-TOF MS identifikován jako *Enterobacter cloacae*

Pořadí nukleotidů pro 16S rRNA:



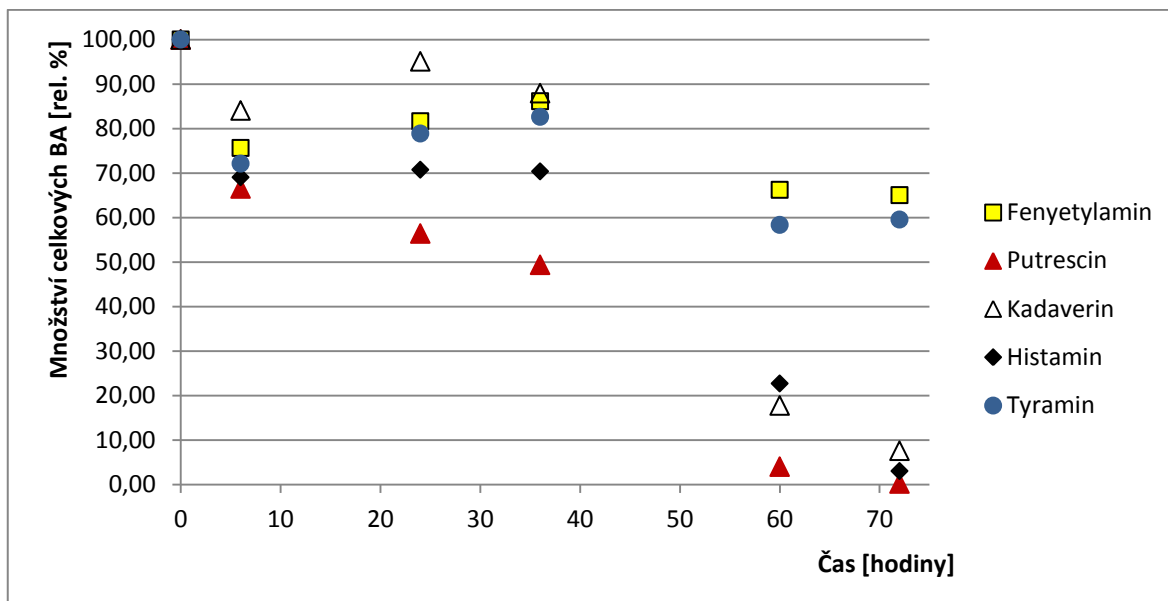
Obrázek 6: Část chromatogramu se zhoršenou kvalitou záznamu, proto od této části byla sekvence z analýzy dále vyřazena

Izolát 16b byl v programu BLAST identifikován jako *Enterobacter cloacae*. Shoda sekvencí byla programem vypočítána na 99 % (identities 339/344).

6.4 Chromatografické stanovení úbytku biogenních aminů izolovanými degradéry

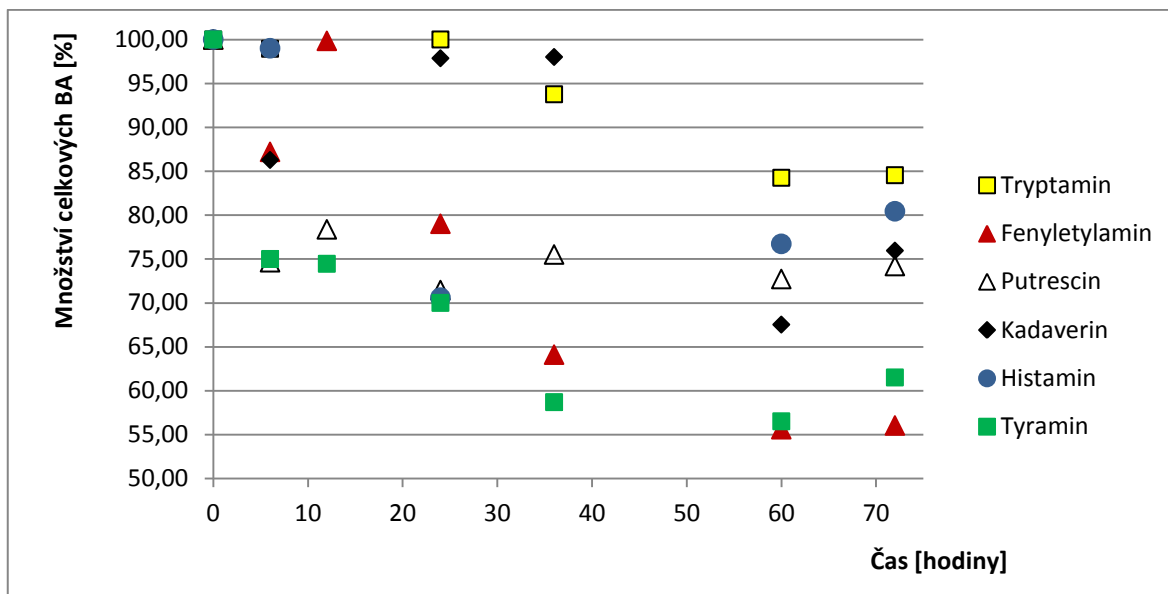
Z izolovaných mikroorganismů degradujících biogenní aminy bylo vybráno 7 degradérů (viz. kapitola 5.3.6), u kterých byla zkoumána degradace 6 biogenních aminů v čase v podmínkách *in vitro*.

Nejvyšší degradace biogenních aminů byla zaznamenána u *Bacillus subtilis* (izolát 1a), úbytek celkového množství biogenních aminů v průběhu 72 hodin znázorňuje obrázek 7. Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie byl pozorován výrazný úbytek putrescinu, který byl snížen o 100 % v porovnání s kontrolou (médium nezaočkované daným degradérem). Histamin byl degradován z 97 % a kadaverin z 92 %. V průběhu experimentu došlo k poklesu obsahu také u tyraminu, konkrétně o 40 %, fenyletylaminu o 35 % a tryptaminu o 13 %. Na základě pozitivních výsledků bylo s tímto degradérem pokračováno v dalším experimentu, viz. kapitola 6.5.



Obrázek 7: Degradace biogenních aminů v médiu – kmenem *Bacillus subtilis*

U zbylých testovaných 6 degradérů nebyla zaznamenána tak významná degradace biogenních aminů. Pro srovnání na obrázku 8 jsou uvedeny výsledky z tohoto pozorování pro jeden izolát, ostatní jsou shrnuty v příloze I. Obecně lze říci, že celkový úbytek biogenních aminů byl u všech vzorků pod 50 %. *Bacillus altitudinis*, *Acinetobacter pitii*, *Bacillus pumilus* a *Bacillus safensis* vykazovali nejvyšší degradační aktivitu pro tyramin. *Bacillus altitudinis* jeho množství snížil na 63,5 %, *Acinetobacter pitii* na 62,5 %, *Bacillus pumilus* na 63,8 % a *Bacillus safensis* na 65,7 %. *Rhizobium radiobacter* nejvíce degradoval fenyletylamin na 56,7 %, stejně jako *Enterobacter cloacae*, který množství fenyletylaminu snížil na 56,0 %.



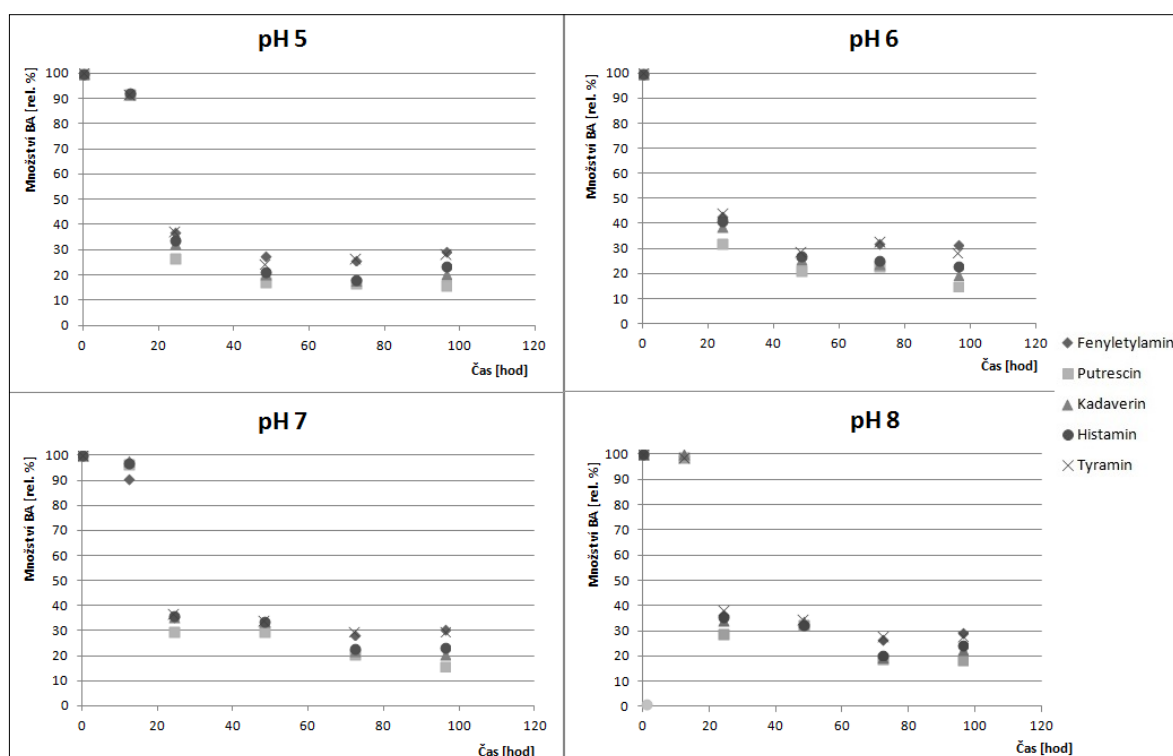
Obrázek 8: Degradace biogenních aminů v médiu – kmenem *Enterobacter cloacae*

6.5 Degradace biogenních aminů v závislosti na vnějších podmínkách u vybraného izolovaného degradéra

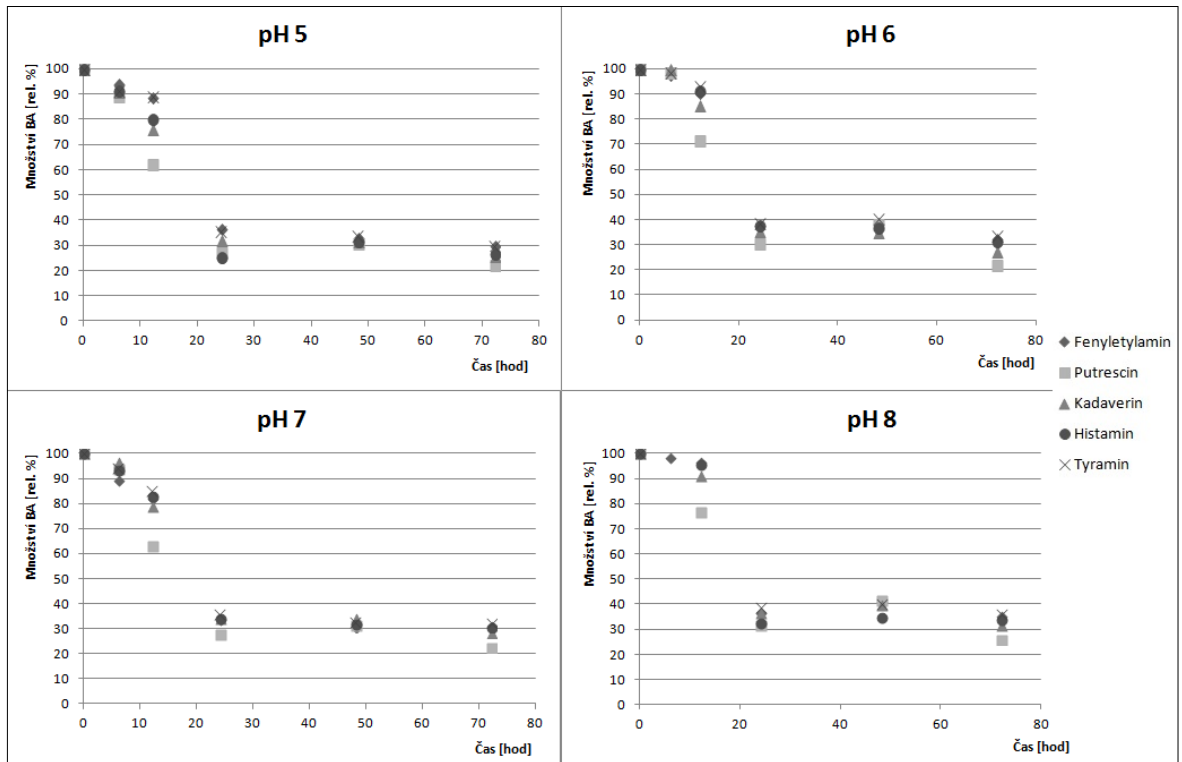
Schopnost degradace 5 biogenních aminů (putrescinu, fenyletylaminu, histaminu, kadaverinu a tyraminu) byla zjišťována za různých kultivačních podmínek u *Bacillus subtilis* pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Byl zkoumán zejména vliv pH média, teploty a způsobu kultivace (stacionární a „okysličování“ na třepačce) na degradační aktivitu v čase.

Výsledky z pozorování degradační aktivity u izolátu *Bacillus subtilis* při stacionární kultivaci jsou shrnuty na obrázcích 9–11. V každém obrázku jsou uvedeny 4 grafy (pro každé médium s odlišně upraveným iniciačním pH jeden graf) znázorňující procentuální úbytek sledovaných biogenních aminů pro danou teplotu kultivace. V průběhu experimentu došlo ke snížení obsahu všech sledovaných biogenních aminů. Z výsledků lze vyčíst, že k výraznému poklesu biogenních aminů došlo u kultivace při 8 °C po 24 hodinách od zaočkování, jejich množství kleslo během této doby na třetinové množství a dále se snižovalo pozvolna nebo se již neměnilo. Při 8 °C byl nejvíce degradován putrescin, při iniciačním pH média 5, 6 a 7 jeho množství kleslo po 96 hodinách na 15 %, naopak fenyletylamin byl degradován nejméně, po 96 hodinách bylo přítomno 30 % z původního množství. V případě kultivace při 23 °C došlo také k výraznému poklesu obsahu biogenních aminů po 24

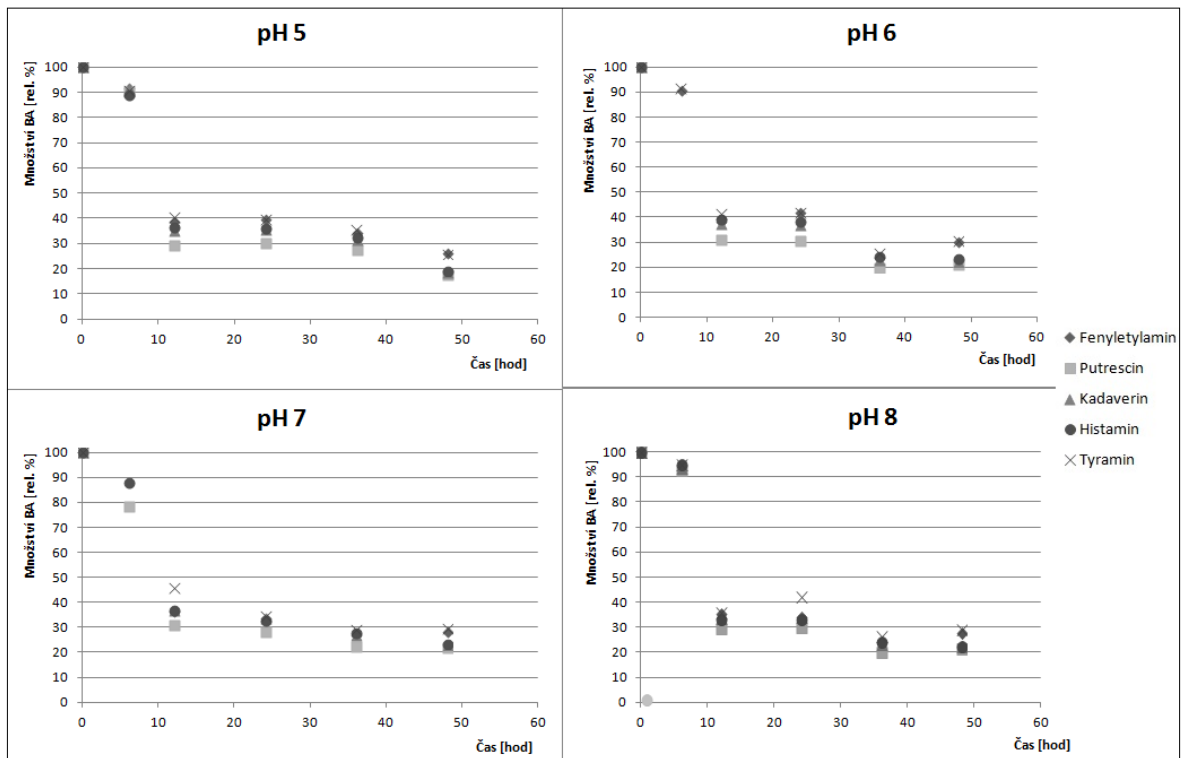
hodinách od zaočkování a jejich množství se také snížilo na třetinové množství. Po 72 hodinách kultivace došlo u všech 4 kombinací pH média k největšímu poklesu putrescinu, i když ne s velkým rozdílem oproti ostatním aminům. Při teplotě kultivace 30 °C byl pozorován výrazný pokles biogenních aminů už po 12 hodinách od zaočkování. Po 48 hodinách kultivace došlo k nejvyšší degradaci putrescinu, kadaverinu a histaminu o 80 %. Žádné z testovaných pH kultivačního média nemělo na degradační aktivitu výrazné inhibiční účinky, nicméně nelze také obecně určit, které pH degradační aktivitu naopak podporuje. Například při statické kultivaci, teplotě 23 °C a iniciačním pH média 5 byl tyramin po 72 hodinách degradován na 30 %, dále se jeho množství s rostoucím pH mírně zvyšovalo – při pH 6 a 7 na 33 % a při pH 8 na 36 %. Opačný jev byl pozorován při kultivaci na třepače a teplotě 8 °C, kde byl putrescin snížen na 16 % v průběhu 96 hodin při pH 5, při zvýšení pH na 7 kleslo jeho množství na 11 %. Při statické kultivaci a 8 °C pH média nemělo žádný vliv na degradaci u fenyletylaminu, který byl degradován na 30 % při pH 5 i 8.



Obrázek 9: Degradace biogenních aminů izolátem *Bacillus subtilis* při 8 °C v médiu s upraveným iniciačním pH 5, 6, 7 a 8 při statické kultivaci

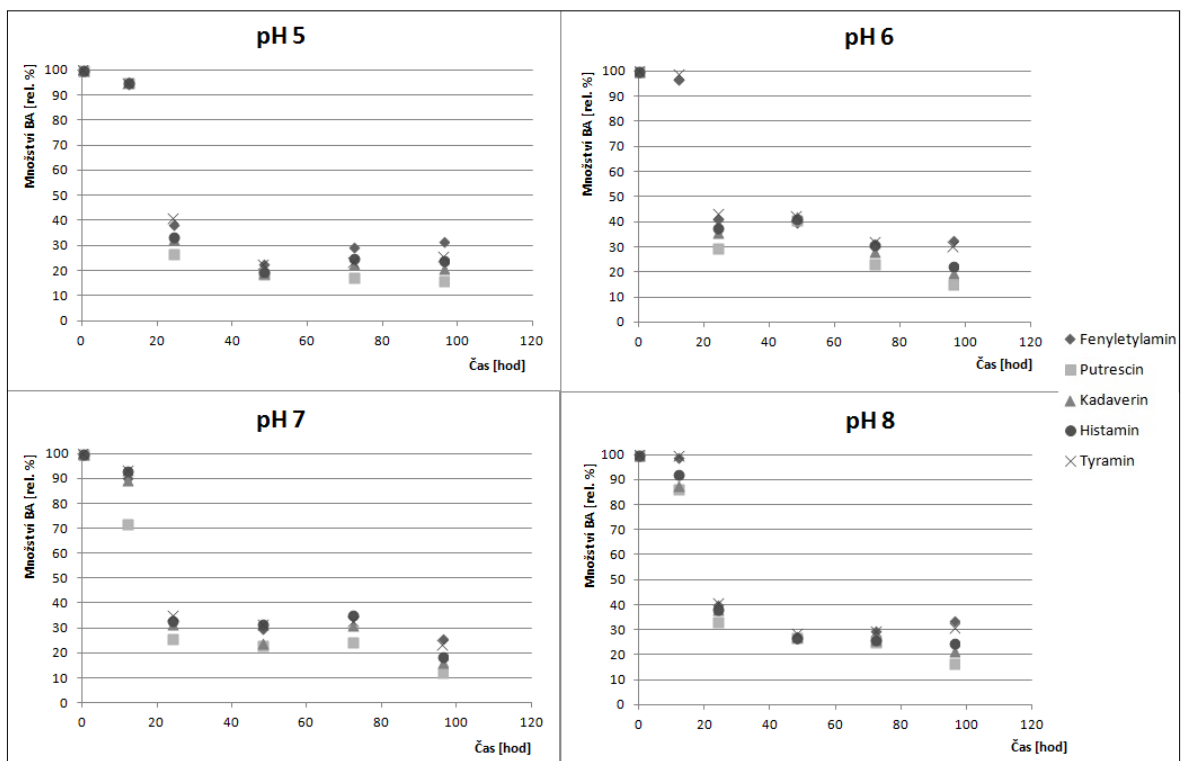


Obrázek 10: Degradace biogenních aminů izolátem *Bacillus subtilis* při 23 °C v médiu s upraveným iniciačním pH 5, 6, 7 a 8 při statické kultivaci

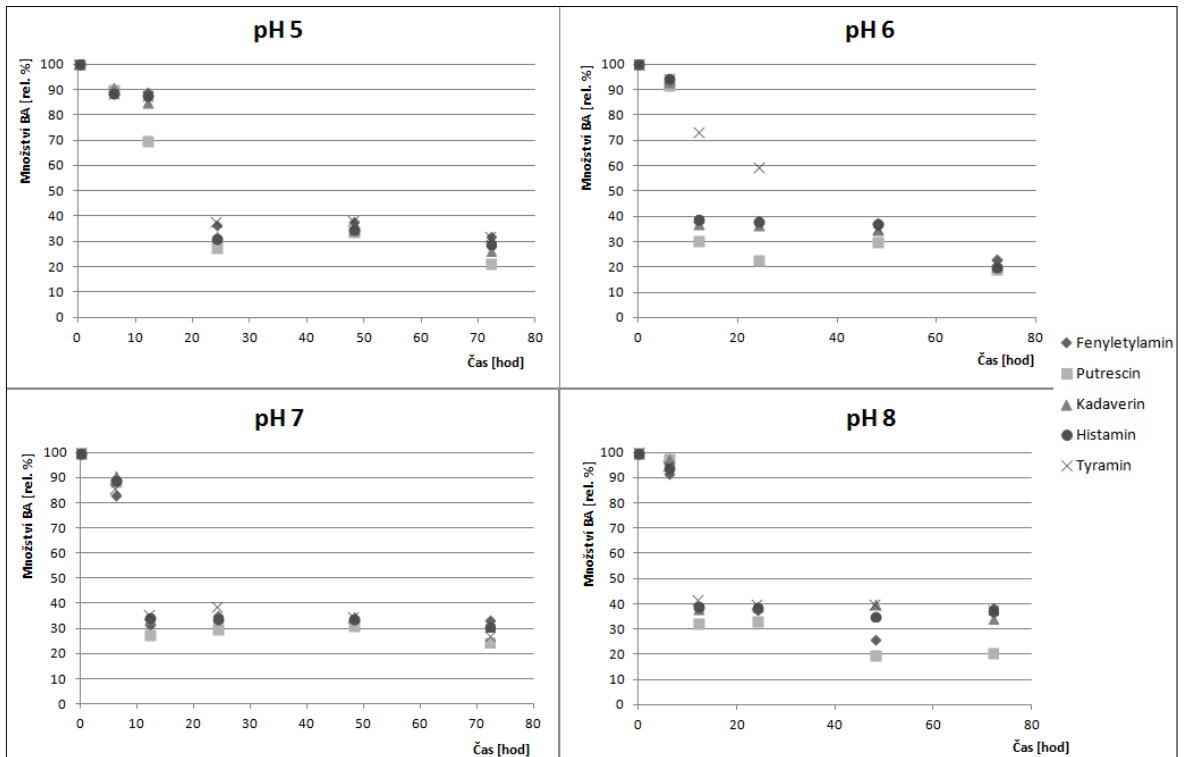


Obrázek 11: Degradace biogenních aminů izolátem *Bacillus subtilis* při 30 °C v médiu s upraveným iniciačním pH 5, 6, 7 a 8 při statické kultivaci

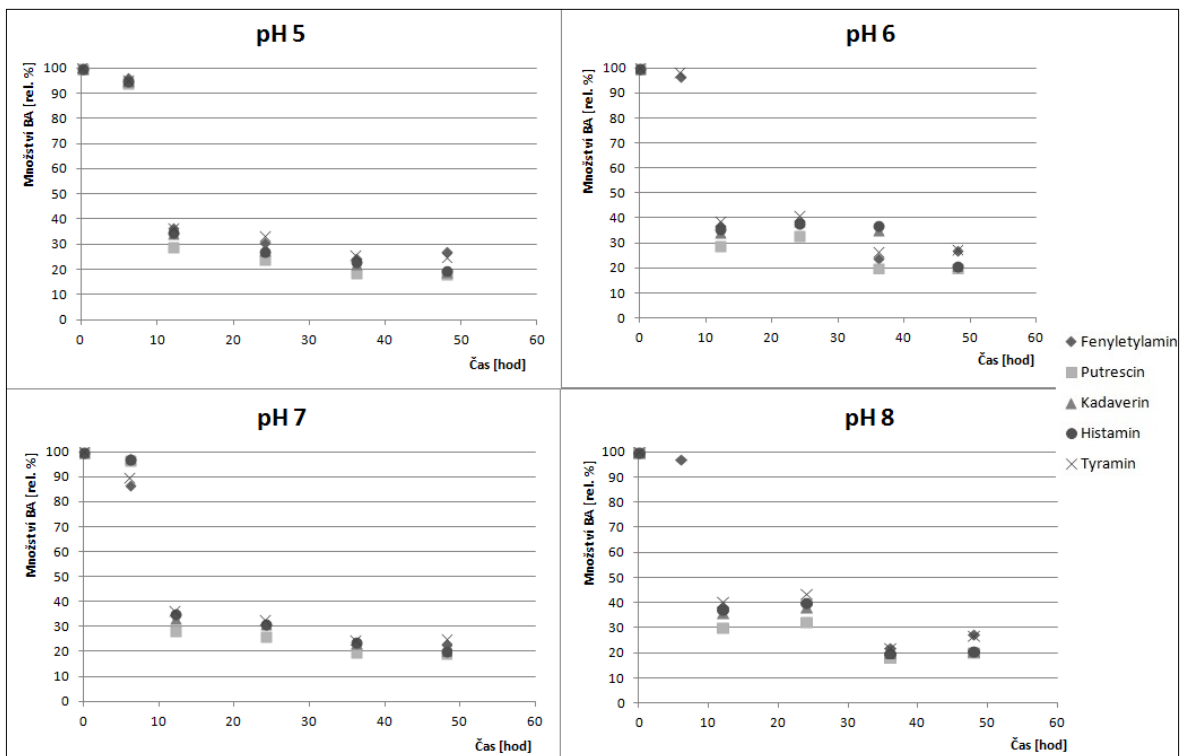
Dále byl v experimentu sledován také vliv okysličování kultivačního média v průběhu kultivace jeho protřepáváním na třepačce. Byly sledovány stejné kombinace faktorů, jako v případě výše uvedené kultivace statické. Výsledky z pozorování degradační aktivity při kultivaci na třepačce jsou uvedeny na obrázcích 12–14. Stejně jako v případě kultivace statické došlo ke snížení obsahu všech sledovaných biogenních aminů. Při 8 °C byl nejvíce degradován putrescin, při iniciačním pH média 7 jeho množství kleslo po 96 hodinách na 12 %, fenyletylamin byl degradován nejméně, po 96 hodinách jej bylo přítomno 33 % z původního množství. Při 23 °C došlo k nejvýraznější degradaci putrescinu a histaminu na 20 %, fenyletylamin byl opět degradován nejméně. Při 30 °C došlo po 48 hodinách od zaočkování k nejvyššímu snížení putrescinu, histaminu a kadaverinu na 20 %.



Obrázek 12: Degradace biogenních aminů izolátem *Bacillus subtilis* při 8 °C v médiu s upraveným iniciačním pH 5, 6, 7 a 8 při kultivaci na třepačce



Obrázek 13: Degradace biogenních aminů izolátem *Bacillus subtilis* při 23 °C v médiu s upraveným iniciačním pH 5, 6, 7 a 8 při kultivaci na třepačce



Obrázek 14: Degradace biogenních aminů izolátem *Bacillus subtilis* při 30 °C v médiu s upraveným iniciačním pH 5, 6, 7 a 8 při kultivaci na třepačce

6.6 Souhrnná diskuze

Vzhledem k negativnímu působení biogenních aminů na lidské zdraví je snahou v potravinářském průmyslu využívat probiotické mikroorganismy s co nejnižší dekarboxylázovou aktivitou. Probiotické kmeny se vyznačují pozitivními dieteticko-léčebnými účinky na lidské zdraví a produkce biogenních aminů patří rozhodně k protikladu takových účinků (Lorencová et al., 2012, s. 2089).

Probiotické kultury jsou schopné produkovat detekovatelná množství biogenních aminů, jak bylo také potvrzeno v prvním experimentu této práce. Před výběrem probiotických kmenů do potravinářského a mlékárenského průmyslu je tedy vhodné provést skríníng dekarboxylázové aktivity daného kmenu, neboť několik studií potvrdilo, že produkce biogenních aminů souvisí právě s kmenovou příslušností (Deepika a Rakshit, 2011, s. 2067).

V rámci skríníngu tvorby biogenních aminů u 29 sbírkových mlékárenských kultur byla zjištěna produkce tyraminu (od 6,2 do 1123,0 mg·l⁻¹) a spermidinu (od 0,9 do 2,8 mg·l⁻¹) u všech testovaných kmenů. V diplomové práci zaměřené na sledování dekarboxylázové aktivity vybraných probiotických bakterií, převážně rodu *Bifidobacterium*, byla také zaznamenána v obou kultivačních médiích (MRS a Wilkins-Chalgren) produkce tyraminu a dále také sperminu (Sýkorová, 2013, s. 56-57).

U většiny testovaných kmenů nebyla zjištěna produkce vyššího množství biogenních aminů, které by mohly negativně působit na zdravého člověka. Výjimku tvořil *Enterococcus faecium* CCDM 922, který vyprodukoval celkové množství biogenních aminů 1393,0 mg·l⁻¹, z toho 1123,0±30,2 mg·l⁻¹ tvořil tyramin. Obecně jsou množství tyraminu nad 1000 mg·kg⁻¹ považována za toxikologicky závažná a nebezpečná pro lidské zdraví (Nuñez, del Olmo a Calzada, 2016, s. 421).

V současné době existuje několik dalších navržených metod pro kontrolu produkce biogenních aminů v potravinách a nápojích. Většina z nich je zaměřena na inhibici přítomných dekarboxyláza-pozitivních mikroorganismů – ošetření vysokým tlakem, ionizujícím zářením, výběr obalové techniky, použití potravinářsky přídatných látek a řízení potravinové mikroflóry, tzn. výběr startérových kultur. Tyto metody mohou tvorbě biogenních aminů zabránit, případně ji zpomalit anebo snížit na přijatelnou úroveň, ale nemohou existující aminy odstranit. Alternativu nabízí využití mikroorganismů schopných metabolizovat biogenní aminy a tím tak jejich množství v potravinách snížit. Některé studie se zabýv-

vají hledáním těchto degradérů, kteří jsou vybaveni enzymy zodpovědnými za oxidaci biogenních aminů na aldehydy, peroxid vodíku a amoniak. Proto přímé použití aminooxidáz je další z možností snížení obsahu aminů (Mohedano et al., 2015, s. 291, 295; Naila et al., 2010, s. 140-141).

Cílem druhého experimentu bylo sledování degradace putrescinu v čase působením enzymu diaminooxidázy. V experimentu bylo použito množství diaminooxidázy odpovídající enzymové aktivitě 1,5 U a 2,5 U. V čase 0 byl obsah putrescinu 89 $\mu\text{g/l}$ (odpovídá přibližně 1 μmol), po první hodině kultivace se působením enzymu s aktivitou 1,5 U snížilo množství putrescinu na 21,7 %, v případě diaminooxidázy s aktivitou 2,5 U se množství putrescinu snížilo na 13,9 %. Výrobce diaminooxidázy uvádí, že 1 jednotka enzymu (1 unit) by měla oxidovat 1 μmol putrescinu za hodinu při pH 7,2 a teplotě 37 °C, z tohoto důvodu bylo většinové množství putrescinu při tomto pilotním pokusu degradováno již po první hodině kultivace za stanovených podmínek. Výsledky potvrzují úbytek putrescinu v čase, nicméně pro dané množství putrescinu by bylo dostačující menší množství diaminooxidázy, a proto výsledky mezi vzorky s enzymovou aktivitou 1,5 U a 2,5 U se výrazně neliší. Dapkevicius et al. (2000, s. 107-114) testovali chování diaminooxidáz v rybí siláži v různých podmínkách. Degradace pomocí tohoto enzymu byla úspěšná při všech testovaných teplotách (37, 22 a 15 °C), přičemž při 37 °C byla degradace 100%. Limitujícím faktorem bylo pH. Při pH 4,5 z důvodu denaturace enzymu nedošlo k výrazné degradaci.

Třetí experiment měl za cíl izolovat z různých potravinových matric mikroorganismy degradující biogenní aminy a následně u nich provést identifikaci. Princip izolace degradérů byl založen na kultivaci v definovaném minerálním živném médiu obohaceném o biogenní aminy, které představovaly jediný zdroj uhlíku a dusíku. V minerálním médiu proto mohly růst a množit se pouze ty bakterie, které měly schopnost utilizace biogenních aminů. Jejich identifikace byla provedena pomocí instrumentální fenotypové metody MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie a u vybraných izolovaných mikroorganismů byla také navíc provedena pro porovnání genotypová identifikace sekvenováním produktů PCR odpovídajících vybranému úseku genu pro 16S rRNA s využitím specifických primerů.

Mezi 44 degradéry, které se podařilo úspěšně identifikovat pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie, byli zástupci rodů *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* a *Escherichia*. Dále u 6 degradérů byla pro identifikaci použita část sekvence pro gen 16S rRNA. Tato sekvence byla porovnána s referenčními sekvencemi dostupnými ve veřejně dostupné databázi GenBank za

účelem identifikace daného mikroorganismu. Izolát označen jako 1a byl metodou MALDI-TOF MS i sekvenací identifikován jako *Bacillus subtilis*, stejně tak byl izolát 13b oběma metodami identifikován jako *Bacillus pumilus* a izolát 16b jako *Enterobacter cloacae*. Bohužel, ne vždy se tyto dvě metody v identifikaci plně shodly. Obě metody izolát 2c identifikovaly jako náležící do rodu *Bacillus*, ale v identifikaci druhu se lišily. Izolát 16a, který byl metodou MALDI-TOF MS identifikován jako *Rhizobium radiobacter*, byl v programu BLAST identifikován jako *Enterobacter hormaechei*. Izolát 5a metodou MALDI-TOF MS identifikován jako *Acinetobacter pittii*, byl v programu BLAST identifikován jako *Bacillus subtilis*. Lze tedy konstatovat, že identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS je ideální metoda pro skríníng velkého počtu izolátů, ale v případě nižší spolehlivosti identifikace je nutno výsledky ověřit jinou metodou identifikace nebo vhodnými doplňkovými testy (morfologické a biochemické charakteristiky).

Problematikou izolací degradérů biogenních aminů z potravin se zabývala také studie Leuschner, Heidel a Hammes (1998, s. 4), kterým se podařilo z potravin izolovat degradéry tyraminu a histaminu identifikované jako *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus pentosus*, *Pediococcus acidilactici*, *Rhodococcus* sp., *Arthrobacter* sp., *Micrococcus* sp., *Brevibacterium linens* a *Geotrichum candidum*. Zaman et al. (2010, s. 445) ve své studii izolovali ze vzorků rybích omáček bakterie, u kterých byla hodnocena degradační aktivita biogenních aminů. Kmeny rodů *Bacillus* a *Staphylococcus* izolované v této studii byly schopny degradovat jeden nebo i více biogenních aminů. Eom, Seo a Choi (2015, s. 1526) izolovali z fermentovaných sójových výrobků několik druhů rodu *Bacillus*, které výrazně degradovaly histamin a tyramin. V další studii u 17 izolátů získaných ze sýrů, byla zjištěna schopnost degradovat tyramin a histamin v podmínkách *in vitro*. Všechny izoláty byly identifikovány sekvenováním genu 16S rRNA do druhu *Lactobacillus casei* (Herrero-Fresno et al., 2012, s. 300). Osm histamin degradijících bakterií izolovaných ze solených rybích výrobků, bylo identifikováno jako *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus cereus*, *B. polymyxa*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* a *Rummeliibacillus stabekisii* (Lee et al., 2015, s. 840).

Dále v rámci toho experimentu byla u 7 vybraných izolátů sledována schopnost degradace biogenních aminů v čase v podmínkách *in vitro*. Izolát 1a, identifikovaný jako *Bacillus subtilis*, vykazoval nejvyšší degradační aktivitu biogenních aminů v porovnání s ostatními zkoumanými degradéry. Byla pozorována 100% degradace putrescinu, 97% degradace histaminu a 92% degradace kadaverinu, ostatní biogenní aminy byly degradovány

do 50 %. Ostatních 6 degradérů vykazovalo nižší degradační aktivitu. Všechny izoláty snížily množství přítomných biogenních aminů v bujónu o méně než 50 %. *Bacillus altitudinis*, *Acinetobacter pitii*, *Bacillus pumilus* a *Bacillus safensis* vykazovaly nejvyšší degradační aktivitu pro tyramin, *Rhizobium radiobacter* a *Enterobacter cloacae* nejvíce degradovaly fenyletylamin.

Stejně jako izolací degradérů z potravin se některé studie zabývaly sledováním kinetiky degradace biogenních aminů v čase. Lee et al. (2015, s. 838) ve své práci pozorovali také u *Bacillus subtilis* degradaci histaminu v bujónu a to o 74 % v průběhu 24 hodin, 100% degradaci histaminu vykazoval jiný izolovaný druh *B. polymyxa*. Jiná studie popsala u 4 druhů izolátů rodu *Bacillus* (mezi nimi také *B. subtilis*) degradaci histaminu od 27 do 60 %, putrescinu od 7 do 30 % a kadaverinu od 22 do 29 % za 24 hodin v podmínkách *in vitro* (Zaman et al., 2010, s. 445). V dalším výzkumu kmen *Staphylococcus xylosus* a dva kmeny *Bacillus coagulans* vykazovaly v porovnání s ostatními zkoumanými degradéry nejvyšší schopnost rozkládat histamin, který degradovaly z jeho počáteční koncentrace na 62 až 65 % během 24 hodin také v podmínkách *in vitro* (Mah a Hwang, 2009, s. 789).

Na základě skríningu degradační aktivity u 7 vybraných izolátů bylo s izolátem 1a *Bacillus subtilis* pokračováno v dalším experimentu, kde bylo cílem sledovat kinetiku degradace biogenních aminů v závislosti na vnějších podmínkách (kombinace testovaných faktorů – různé pH kultivačního média, teplota kultivace a vliv provzdušňování média v průběhu kultivace). Produkce biogenních aminů u dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů je silně ovlivněna teplotou prostředí, kdy nižší teplota zpomaluje jejich produkci a snižuje celkové vyprodukované množství biogenních aminů (Naila et al., 2010, s. 140). Při tomto experimentu nízká teplota prostředí (porovnána teplota kultivace 8, 23 a 30 °C) neměla výraznější vliv na degradační aktivitu testovaného izolátu, i přesto, že lze předpokládat sníženou degradační aktivitu se snižující se teplotou prostředí z důvodu teplotního optima pro druh *Bacillus subtilis*, který se pohybuje v rozmezí 30 – 37 °C. V některých případech naopak byla konečná degradační aktivita vyšší při nižší teplotě kultivace, např. při 8 °C a iniciačním pH média 6 bylo zbytkové množství putrescinu 15 %, kdežto při 30 °C bylo 20 %. Vyšší teplota kultivace (30 °C) měla ale vliv na rychlost degradace biogenních aminů, při této teplotě došlo ke snížení aminů na třetinové množství už po 12 hodinách od zaočkování, zatímco u 8 a 23 °C byl tento pokles zaznamenán až po 24 hodinách. Vliv teploty na aktivitu tyramin oxidázy sledovali ve své studii Leuschner, Heidel a Hammes (1998, s. 7), při teplotě 5 °C pozorovali její sníženou aktivitu, při 37 a 40 °C byla degrada-

ce nejvyšší a při 60 a 70 °C k žádné degradaci tyraminu nedošlo z důvodu denaturace tyramin-oxidázy. Dalším sledovaným faktorem v experimentu byla aerace média pomocí kultivace na třepačce (druh *Bacillus subtilis* vyžaduje v prostředí pro svůj růst kyslík). Obecně lze říci, že při provzdušňování média v průběhu kultivace došlo ke stejnému poklesu množství biogenních aminů v médiu v porovnání s kultivací statickou. Na základě zjištěných výsledků lze konstatovat, že testované kombinace faktorů (iniciační pH média, teplota kultivace a provzdušňování média) významně neovlivnily degradační aktivitu izolátu *Bacillus subtilis*. Při všech testovaných faktorech došlo úspěšně k poklesu sledovaných biogenních aminů, které byly poníženy o 65 až 85 %.

Ze získaných výsledků lze vyvodit závěr, že využitím izolovaných degradérů biogenních aminů by se mohlo potencionálně snížit množství těchto nežádoucích látek v potravinách v těch případech, kdy metody prevence dostatečně nebrání jejich vzniku. V praktické části práce, a také v řadě jiných výzkumných publikací, byly pozorovány pozitivní výsledky degradace u druhu *Bacillus subtilis*. Nicméně aplikace této sporotvorné bakterie do potravin s vyšším rizikem výskytu biogenních aminů by vyžadovala další výzkum, zejména zaměřený na negativní ovlivnění zdravotní nezávadnosti a sensorických vlastností potravin, do kterých by tento mikroorganismus byl aplikován. Přítomnost této sporotvorné bakterie v potravinách je obecně považována za nežádoucí, jednak proto, že se vyznačuje silným enzymatickým vybavením, například *B. coagulans* a *Geobacillus stearothermophilus* způsobují kažení potravin (zejména nekyselých konzerv) a navíc *Bacillus cereus* může být zodpovědný za alimentární otravy (Ray a Bhunia, 2014, s. 25). Je potřeba ale zmínit, že některé kmeny druhu *B. subtilis* se řadí mezi probiotika, které naopak mohou mít pozitivní účinek na lidské zdraví (Permpoonpattana et al., 2012, s. 127). Ouoba et al. (2004, s. 203-204) identifikoval také *B. subtilis* a *B. pumilus* jako potenciální startérové kultury pro výrobu afrických fermentovaných fazolí.

ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na biogenní aminy a možnosti jejich degradace. V rámci této problematiky byl proveden také experiment, který měl za cíl prozkoumat dekarboxylázovou aktivitu sbírkových mlékárenských kmenů s dieteticko-léčebnými účinky. Degradovat biogenní aminy je možné pomocí enzymů, jako je diaminooxidáza a také pomocí mikroorganismů, které tímto enzymem disponují. V rámci pilotního experimentu byla provedena degradace putrescinu pomocí diaminooxidázy. V dalším experimentu byly z potravin izolovány mikroorganismy degradující biogenní aminy, následně byly identifikovány a u vybraných izolátů byla sledována kinetika degradace v čase v podmínkách *in vitro*.

- mezi sbírkovými mlékárenskými kmeny lze nalézt dekarboxyláza pozitivní kmeny schopné produkce biogenních aminů. Nejvyšší produkcí biogenních aminů se vyznačoval *Enterococcus faecium* CCDM 922 (celková produkce $1393,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Ostatní testované kultury nevykazovaly tak vysokou aminogenní aktivitu,
- diaminooxidáza degradovala většinové množství putrescinu již po první hodině kultivace,
- byl potvrzen předpoklad nízkého zachytu degradérů biogenních aminů z potravin, z 365 vzorků potravin se podařilo izolovat a následně identifikovat 44 degradérů,
- stanovením úbytku biogenních aminů v čase metodou HPLC byla potvrzeno u všech 7 sledovaných izolátů schopnost degradace biogenních aminů v podmínkách *in vitro*,
- izolát identifikovaný jako *Bacillus subtilis* vykazoval nejvyšší degradační aktivitu biogenních aminů v porovnání s ostatními zkoumanými degradéry. Degradoval 100 % putrescinu, 97 % histaminu a 92 % kadaverinu,
- testované kombinace faktorů (iniciační pH média, teplota kultivace a provzdušňování média) významně neovlivnily degradační aktivitu izolátu *Bacillus subtilis*, byly degradovány všechny sledované biogenní aminy o 65 až 85 %.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALVAREZ, Miguel A. a Ma Victoria MORENO-ARRIBAS, 2014. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science*. **39**(2), 146-155. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.07.007. ISSN 09242244. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224414001599>

ANCÍN-AZPILICUETA, Carmen, Ana GONZÁLEZ-MARCO a Nerea JIMÉNEZ-MORENO, 2008. Current Knowledge about the Presence of Amines in Wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. **48**(3), 257-275 [cit. 2016-02-10]. DOI: 10.1080/10408390701289441. ISSN 10408398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408390701289441>

ANLI, R. Ertan a Mustafa BAYRAM, 2008. Biogenic Amines in Wines. *Food Reviews International* [online]. **25**(1), 86-102 [cit. 2016-02-10]. DOI: 10.1080/87559120802458552. ISSN 87559129. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/87559120802458552>

BÄUMLISBERGER, Mathias et al., 2015. The Potential of the Yeast *Debaryomyces hansenii* H525 to Degrade Biogenic Amines in Food. *Microorganisms* [online]. **3**(4), 839-850 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.3390/microorganisms3040839. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2076-2607/3/4/839/>

BEATRIZ, Maria a Abreu GLORIA, 2005. Bioactive Amines. *Handbook of food science, technology, and engineering* [online]. Boca Raton [cit. 2016-02-07]. DOI: 10.1201/b15995-15. ISSN 978-1-4665-0787-6. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b15995-15>

BENEDUCE, L. et al., 2010. Biogenic amine in wines. *Annals of Microbiology* [online]. **60**(4), 573-578 [cit. 2016-02-10]. DOI: 10.1007/s13213-010-0094-4. ISSN 15904261. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13213-010-0094-4>

BOBBA, Marco et al., 2015. Organic Bases. *Handbook of Food Analysis, Third Edition - Two Volume Set* [online]. CRC Press, , 637 [cit. 2016-02-07]. DOI: 10.1201/b18668-33. ISBN 978-1-4665-5654-6. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/b18668-33>

BOVER-CID, Sara, M. IZQUIERDO-PULIDO a M.C. VIDAL-CAROU, 2000. Mixed starter cultures to control biogenic amine production in dry fermented sausages. *Journal of Food Protection* [online]. **63**(11), 1556-1562 [cit. 2016-03-22]. ISSN 0362-028X.

CAPOZZI, Vittorio et al., 2012. Biogenic Amines Degradation by *Lactobacillus plantarum*: Toward a Potential Application in Wine. *Frontiers in Microbiology* [online]. **3**, - [cit. 2016-04-02]. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00122. ISSN 1664302x. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00122/abstract>

CUEVA, C. et al., 2012. Degradation of biogenic amines by vineyard ecosystem fungi. Potential use in winemaking. *Journal of Applied Microbiology* [online]. **112**(4), 672-682 [cit. 2016-04-01]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05243.x. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2012.05243.x>

DABROWSKI, Waldemar M. a Zdzislaw E. SIKORSKI, 2004. *Toxins in Food* [online]. London: CRC Press [cit. 2016-04-04]. ISBN 9780203502358.

DAPKEVICIUS, Maria L.N.Enes et al., 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **57**(1-2), 107-114 [cit. 2016-04-01]. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00238-5. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160500002385>

DEEPIKA PRIYADARSHANI, Wadu Mesthri a Sudip K. RAKSHIT, 2011. Screening selected strains of probiotic lactic acid bacteria for their ability to produce biogenic amines (histamine and tyramine). *International Journal of Food Science & Technology* [online]. **46**(10), 2062-2069 [cit. 2016-03-30]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2011.02717.x. ISSN 09505423. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2011.02717.x>

EOM, Jeong Seon, Bo Young SEO a Hye Sun CHOI, 2015. Biogenic Amine Degradation by *Bacillus* Species Isolated from Traditional Fermented Soybean Food and Detection of Decarboxylase-Related Genes. *Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. **25**(9), 1519-1527 [cit. 2016-04-24]. DOI: 10.4014/jmb.1506.06006. ISSN 10177825. Dostupné z: <http://www.jmb.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/jmb.1506.06006>

FAROOQUI, Akhlaq A a Tahira FAROOQUI, c2010. *Biogenic amines: pharmacological, neurochemical and molecular aspects in the CNS* [online]. New York: Nova Science Pub-

lishers [cit. 2016-02-06]. Pharmacology-research, safety testing, and regulation series. ISBN 978-1-61761-575-7.

FERNANDES, Christian a Maria GLORIA, 2015. Bioactive Amines. *Handbook of Food Analysis, Third Edition - Two Volume Set* [online]. CRC Press, , Vol II-301 [cit. 2016-02-06]. DOI: 10.1201/b18668-56. ISBN 978-1-4665-5654-6. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/b18668-56>

GARDINI, F. et al., 2008. Modeling the Aminogenic Potential of *Enterococcus faecalis* EF37 in Dry Fermented Sausages through Chemical and Molecular Approaches. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **74**(9), 2740-2750 [cit. 2016-03-23]. DOI: 10.1128/AEM.02267-07. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02267-07>

GARDINI, Fausto et al., 2002. Use of *Staphylococcus xylosum* as a starter culture in dried sausages: effect on the biogenic amine content. *Meat Science* [online]. **61**(3), 275-283 [cit. 2016-03-13]. DOI: 10.1016/S0309-1740(01)00193-0. ISSN 03091740. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174001001930>

GONZALEZ-FERNANDEZ, C. et al., 2003. Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in chorizo dry sausage. *Food Microbiology* [online]. **20**(3), 275-284 [cit. 2016-03-22]. DOI: 10.1016/S0740-0020(02)00157-0. ISSN 07400020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002002001570>

HALÁSZ, Anna et al., 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science* [online]. **5**(2), 42-49 [cit. 2015-12-29]. DOI: 10.1016/0924-2244(94)90070-1. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0924224494900701>

HERRERO-FRESNO, Ana et al., 2012. *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International Journal of Food Microbiology*. **157**(2), 297-304. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.002. ISSN 01681605. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816051200284X>

HUNGERFORD, James M., 2010. Scombroid poisoning: A review. *Toxicon* [online]. **56**(2), 231-243 [cit. 2015-12-29]. DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.02.006. ISSN 00410101. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010110000450>

CHAIKAEW, Siriporn et al., 2015. Fixed-bed degradation of histamine in fish sauce by immobilized whole cells of *Natrinema gari* BCC 24369. *Fisheries Science* [online]. **81**(5), 971-981 [cit. 2016-03-14]. DOI: 10.1007/s12562-015-0915-2. ISSN 0919-9268. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12562-015-0915-2>

JIANG, Wei et al., 2014. *Halomonas shantousis* sp. nov., a novel biogenic amines degrading bacterium isolated from Chinese fermented fish sauce. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. **106**(6), 1073-1080 [cit. 2016-04-02]. DOI: 10.1007/s10482-014-0275-4. ISSN 00036072. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10482-014-0275-4>

KALAC, Pavel a Martin KRÍZEK, 2003. A Review of Biogenic Amines and Polyamines in Beer. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. **109**(2), 123-128 [cit. 2016-02-12]. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2003.tb00141.x. ISSN 00469750. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.2003.tb00141.x>

KALAC, Pavel, 2014. Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005–mid 2013. *Food Chemistry* [online]. **161**, 27-39 [cit. 2015-12-27]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.03.102. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614005056>

KALAC, Pavel, Stanislava ŠVECOVÁ a Tamara PELIKÁNOVÁ, 2002. Levels of biogenic amines in typical vegetable products. *Food Chemistry* [online]. **77**(3), 349-351 [cit. 2016-02-10]. DOI: 10.1016/S0308-8146(01)00360-0. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814601003600>

KIM, Jae Hyun et al., 2004. Radiolysis of biogenic amines in model system by gamma irradiation. *Food Control* [online]. **15**(5), 405-408 [cit. 2016-03-20]. DOI: 10.1016/S0956-7135(03)00102-6. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713503001026>

KIM, Min-Woo a Young-Man KIM, 2006. Isolation and Identification of Histamine Degrading Bacteria from Kwamegi. *Journal of Life Science* [online]. **16**(1), 120-125 [cit. 2016-03-12]. DOI: 10.5352/JLS.2006.16.1.120. ISSN 12259918. Dostupné z: <http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=SMGHBM&py=2006&vnc=v16n1&sp=120>

KRÍZEK, Martin a Pavel KALAC, 1998. Biogenic amines in foods and their roles in human nutrition. *Czech Journal of Food Science* [online]. **1998**(16) [cit. 2015-12-28].

LATORRE-MORATALLA, M.L. et al., 2012. Control of Biogenic Amines in Fermented Sausages: Role of Starter Cultures. *Frontiers in Microbiology* [online]. **3**, - [cit. 2016-03-22]. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00169. ISSN 1664302x. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00169/abstract>

LEE, Yi-Chen et al., 2015. Degradation of histamine by *Bacillus polymyxa* isolated from salted fish products. *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. **23**(4), 836-844 [cit. 2016-03-14]. DOI: 10.1016/j.jfda.2015.02.003. ISSN 10219498. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949815000290>

LEUSCHNER, Renata G a Walter P HAMMES, 1998. Tyramine Degradation by *Micrococci* During Ripening of Fermented Sausage. *Meat Science* [online]. **49**(3), 289-296, [cit. 2016-04-02].

LEUSCHNER, Renata G, Martina HEIDEL a Walter P HAMMES, 1998. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **39**(1-2), 1-10 [cit. 2016-03-11]. DOI: 10.1016/S0168-1605(97)00109-8. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160597001098>

LEUSCHNER, Renata G. a Walter P. HAMMES, 1998a. Degradation of Histamine and Tyramine by *Brevibacterium linens* during Surface Ripening of Munster Cheese. *Journal of food protection* [online]. **61**(7), 874-878 [cit. 2016-04-02].

LINARES, Daniel M. et al., 2012. Factors Influencing Biogenic Amines Accumulation in Dairy Products. *Frontiers in Microbiology* [online]. **3**, - [cit. 2016-02-08]. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00180. ISSN 1664-302x. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00180/abstract>

LINARES, Daniel M. et al., 2011. Biogenic Amines in Dairy Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. **51**(7), 691-703 [cit. 2016-02-12]. DOI: 10.1080/10408398.2011.582813. ISSN 10408398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2011.582813>

LORENCOVÁ, Eva et al., 2012. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *International Journal of Food Science & Technology* [online]. **47**(10), 2086-2091 [cit. 2016-03-30]. DOI: 10.1111/j.1365-

2621.2012.03074.x. ISSN 09505423. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2012.03074.x>

MAH, Jae-Hyung a Han-Joon HWANG, 2009. Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. *Food Control* [online]. **20**(9), 796-801 [cit. 2016-03-12]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.10.005. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713508002843>

MARTUSCELLI, M. et al., 2000. Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. *Letters in Applied Microbiology* [online]. **31**(3), 228-232 [cit. 2016-03-13]. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.00796.x. ISSN 0266-8254. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2000.00796.x>

MOHEDANO, M.L. et al., 2015. Controlling the formation of biogenic amines in fermented foods. *Advances in Fermented Foods and Beverages* [online]. Elsevier, s. 273 [cit. 2016-03-19]. DOI: 10.1016/B978-1-78242-015-6.00012-8. ISBN 9781782420156. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781782420156000128>

MORET, Sabrina et al., 2005. A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. *Food Chemistry* [online]. **89**(3), 355-361 [cit. 2016-02-10]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.02.050. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814604002079>

NAILA, Aishath et al., 2010. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science*. **75**(7), R139-R150. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x. ISSN 00221147. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x>

NUÑEZ, M., A. DEL OLMO a J. CALZADA, 2016. Biogenic Amines. *Encyclopedia of Food and Health* [online]. Elsevier, 2015-11-17, , 416 [cit. 2015-11-17]. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00070-2. ISBN 9780123849533. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123849472000702>

ORDÓÑEZ, J.L. et al., 2013. A survey of biogenic amines in vinegars. *Food Chemistry* [online]. **141**(3), 2713-2719 [cit. 2016-02-10]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.05.087. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613006808>

OUOBA, Labia Irène Ivette et al., 2004. Genotyping of starter cultures of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) to produce Soumbala. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **90**(2), 197-205 [cit. 2016-04-24]. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00302-7. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160503003027>

PERMPOONPATTANA, P. et al., 2012. Evaluation of *Bacillus subtilis* strains as probiotics and their potential as a food ingredient. *Beneficial Microbes* [online]. **3**(2), 127-135 [cit. 2016-04-24]. DOI: 10.3920/BM2012.0002. ISSN 18762883. Dostupné z: <http://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/BM2012.0002>

RAI, V a Jamuna A BAI, 2015. *Beneficial microbes in fermented and functional foods*. Boca Raton: CRC Press, Taylor. ISBN 14-822-0662-5.

RAY, Bibek a Arun K BHUNIA, 2014. *Fundamental food microbiology*. Fifth edition. Boca Raton: CRS Press, Taylor & Francis Group, an informa business. ISBN 9781466564435.

RESTUCCIA, Donatella et al., 2014. Accumulation of Biogenic Amines in Foods: Hazard Identification and Control Options. *Microbial Food Safety and Preservation Techniques* [online]. CRC Press, 2015-11-17, , 53 [cit. 2015-11-17]. DOI: 10.1201/b17465-6. ISBN 978-1-4665-9306-0. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b17465-6>

ROIG-SAGUÉS, Artur X. et al., 2009. *The decarboxylating bacteria present in foodstuffs and the effect of emerging technologies on their formation* [online]. India: Transworld Research Network [cit. 2016-03-21]. ISBN 978-81-7895-249-9.

RUIZ-CAPILLAS, CLAUDIA a FRANCISCO JIMÉNEZ-COLMENERO, 2004. Biogenic Amines in Meat and Meat Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. **44**(7-8), 489-599 [cit. 2016-02-09]. DOI: 10.1080/10408690490489341. ISSN 10408398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408690490489341>

RUIZ-CAPILLAS, Claudia a Francisco JIMÉNEZ-COLMENERO, 2009. Biogenic Amines in Seafood Products. *Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis* [online]. CRC Press, s. 833 [cit. 2016-02-09]. DOI: 10.1201/9781420046359-c42. ISBN 9781420046335.

Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9781420046359-c42>

RUIZ-CAPILLAS, Claudia a Leo M NOLLET, 2016. *Flow injection analysis of food additives* [online]. Boca Raton: Taylor & Francis [cit. 2016-04-04]. ISBN 9781482218190.

SANTOS, M.H.Silla, 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. **29**(2-3), 213-231. DOI: 10.1016/0168-1605(95)00032-1. ISSN 01681605. Dostupné také z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168160595000321> SHALABY, Ali R., 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* [online]. **29**(7), 675-690 [cit. 2015-12-29]. DOI: 10.1016/S0963-9969(96)00066-X. ISSN 09639969. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399699600066X>

SUZZI, Giovanna a Sandra TORRIANI, 2015. Editorial: Biogenic amines in foods. *Frontiers in Microbiology* [online]. **6**, - [cit. 2015-12-29]. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00472. ISSN 1664-302x. Dostupné z:

http://www.frontiersin.org/Food_Microbiology/10.3389/fmicb.2015.00472/full

SÝKOROVÁ, Michaela, 2013. *Skríning dekarboxylázové aktivity u vybraných probiotických bakterií*. Diplomová práce.

ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila, 2008. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia. ISBN 9788020017031.

TOFALO, R. et al., 2016. Biogenic Amines: Toxicology and Health Effect. *Encyclopedia of Food and Health* [online]. Elsevier, 2015-11-17, , 424 [cit. 2015-11-17]. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00071-4. ISBN 9780123849533. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123849472000714>

VIDAL-CAROU, M, M LATORRE-MORATALLA a Sara BOVER-CID, 2010. Biogenic Amines. *Safety Analysis of Foods of Animal Origin*. CRC Press, , 399. DOI: 10.1201/EBK1439848173-14. ISBN 978-1-4398-4817-3. Dostupné také z: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/EBK1439848173-14>

WANG, Xin Hui et al., 2015. Evaluation of Key Factors Influencing Histamine Formation and Accumulation in Fermented Sausages. *Journal of Food Safety* [online]. **35**(3), 395-402 [cit. 2016-03-13]. DOI: 10.1111/jfs.12187. ISSN 01496085. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jfs.12187>

WHITING, Richard C., 1995. Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. **35**(6), 467-494 [cit. 2016-03-23]. DOI: 10.1080/10408399509527711. ISSN 10408398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408399509527711>

ZAMAN, Muhammad Zukhrufuz et al., 2010. Occurrence of Biogenic Amines and Amines Degrading Bacteria in Fish Sauce. *Czech J. Food Sci.* [online]. **5**(28), 440–449 [cit. 2016-03-12]. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/28359.pdf>

ZAMAN, Muhammad Zukhrufuz et al., 2014. Degradation of histamine by the halotolerant *Staphylococcus carnosus* FS19 isolate obtained from fish sauce. *Food Control* [online]. **40**, 58-63 [cit. 2016-03-14]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.11.031. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713513006130>

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Schéma vzniku biogenních aminů a faktory, které jejich produkci v potravinách ovlivňují (upraveno podle Ruiz-Capillas a Jiménez-Colmenero, 2004, s. 494; Ruiz-Capillas a Jiménez-Colmenero, 2009, s. 676).</i>	19
<i>Obrázek 2: Degradace putrescinu působením diaminooxidázy (1,5 U)</i>	52
<i>Obrázek 3: Degradace putrescinu působením diaminooxidázy (2,5 U)</i>	53
<i>Obrázek 4: Část záznamu sekvence, ve které byly přidány 2 chybějící nukleotidy (C, A). Vysvětlivky: A – adenin, C – cytozin, G – guanin, T – tymin</i>	55
<i>Obrázek 5: Část záznamu sekvence, ve které byly přidány 3 chybějící nukleotidy (A, T, C)</i>	57
<i>Obrázek 6: Část chromatogramu se zhoršenou kvalitou záznamu, proto od této části byla sekvence z analýzy dále vyřazena</i>	58
<i>Obrázek 7: Degradace biogenních aminů v médiu – kmenem Bacillus subtilis</i>	59
<i>Obrázek 8: Degradace biogenních aminů v médiu – kmenem Enterobacter cloacae</i>	60
<i>Obrázek 9: Degradace biogenních aminů izolátem Bacillus subtilis při 8 °C v médiu s upraveným iniciačním pH 5, 6, 7 a 8 při statické kultivaci</i>	61
<i>Obrázek 10: Degradace biogenních aminů izolátem Bacillus subtilis při 23 °C v médiu s upraveným iniciačním pH 5, 6, 7 a 8 při statické kultivaci</i>	62
<i>Obrázek 11: Degradace biogenních aminů izolátem Bacillus subtilis při 30 °C v médiu s upraveným iniciačním pH 5, 6, 7 a 8 při statické kultivaci</i>	62
<i>Obrázek 12: Degradace biogenních aminů izolátem Bacillus subtilis při 8 °C v médiu s upraveným iniciačním pH 5, 6, 7 a 8 při kultivaci na třepačce</i>	63
<i>Obrázek 13: Degradace biogenních aminů izolátem Bacillus subtilis při 23 °C v médiu s upraveným iniciačním pH 5, 6, 7 a 8 při kultivaci na třepačce</i>	64
<i>Obrázek 14: Degradace biogenních aminů izolátem Bacillus subtilis při 30 °C v médiu s upraveným iniciačním pH 5, 6, 7 a 8 při kultivaci na třepačce</i>	64

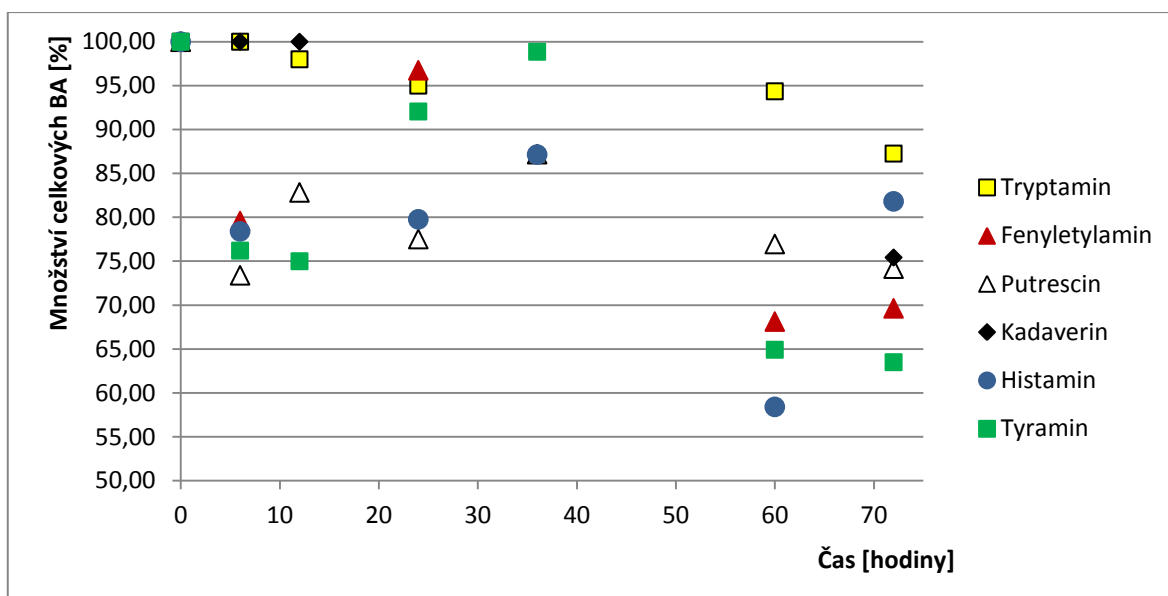
SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1:</i> Triviální a chemický název, molekulová hmotnost, sumární a strukturní vzorec vybraných biogenních aminů (Fernandes a Gloria, 2015, s. 302, 303).	14
<i>Tabulka 2:</i> Seznam použitých kultur	35
<i>Tabulka 3:</i> Složení půdy MRSC	37
<i>Tabulka 4:</i> Složení půdy MRSC+C	37
<i>Tabulka 5:</i> Složení půdy MRSC*	37
<i>Tabulka 6:</i> Složení půdy YELG	37
<i>Tabulka 7:</i> Gradientový eluční program pro HPLC	39
<i>Tabulka 8:</i> Seznam skupin a počty vzorků potravin, u kterých byla provedena izolace degradérů	41
<i>Tabulka 9:</i> Jednotlivé kroky amplifikace	45
<i>Tabulka 10:</i> Vybrané izolované mikroorganismy schopné degradovat biogenní aminy	46
<i>Tabulka 11:</i> Produkce biogenních aminů v $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (průměr \pm směrodatná odchylka) u testovaných sbírkových kmenů	50
<i>Tabulka 12:</i> Identifikace izolovaných mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS	54

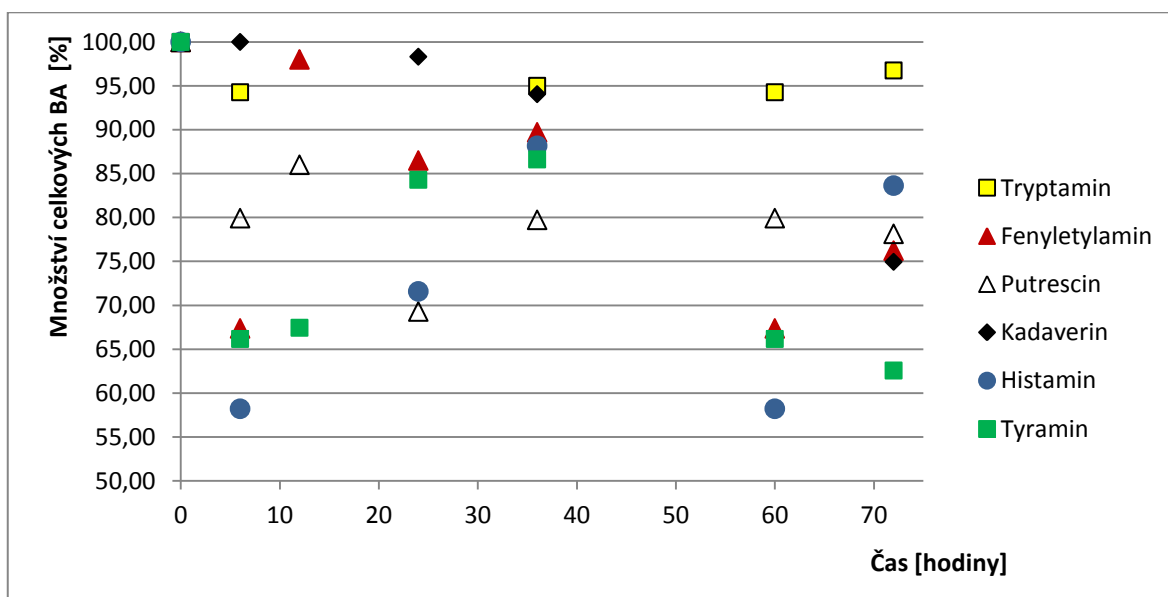
SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: KINETIKA DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ V PODMÍNKÁCH
IN VITRO

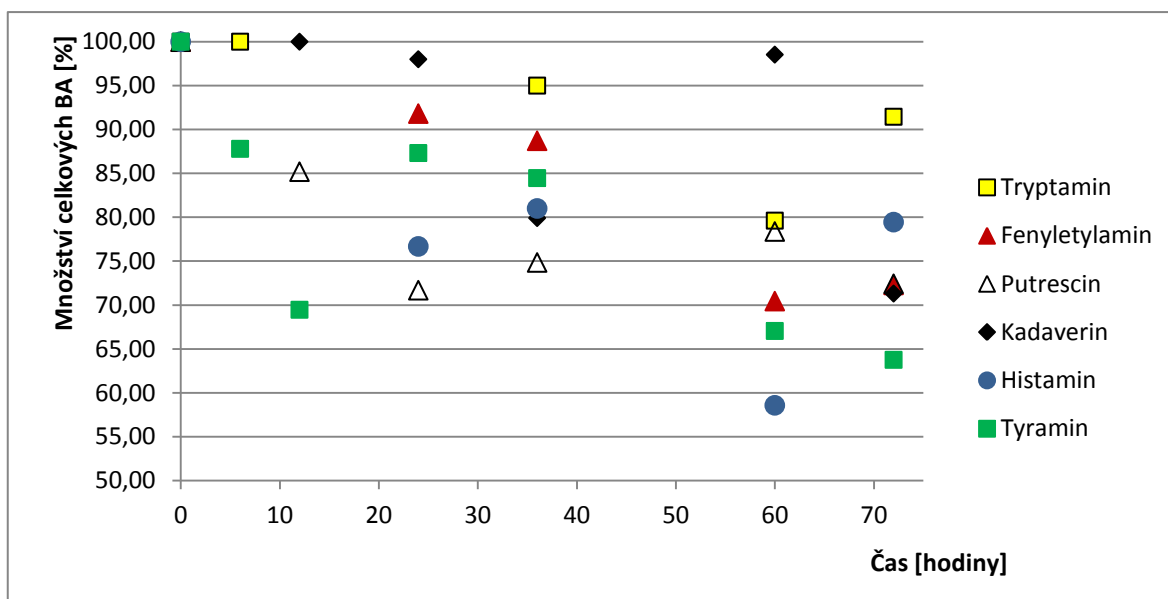
PŘÍLOHA P I: KINETIKA DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ V PODMÍNKÁCH *IN VITRO*



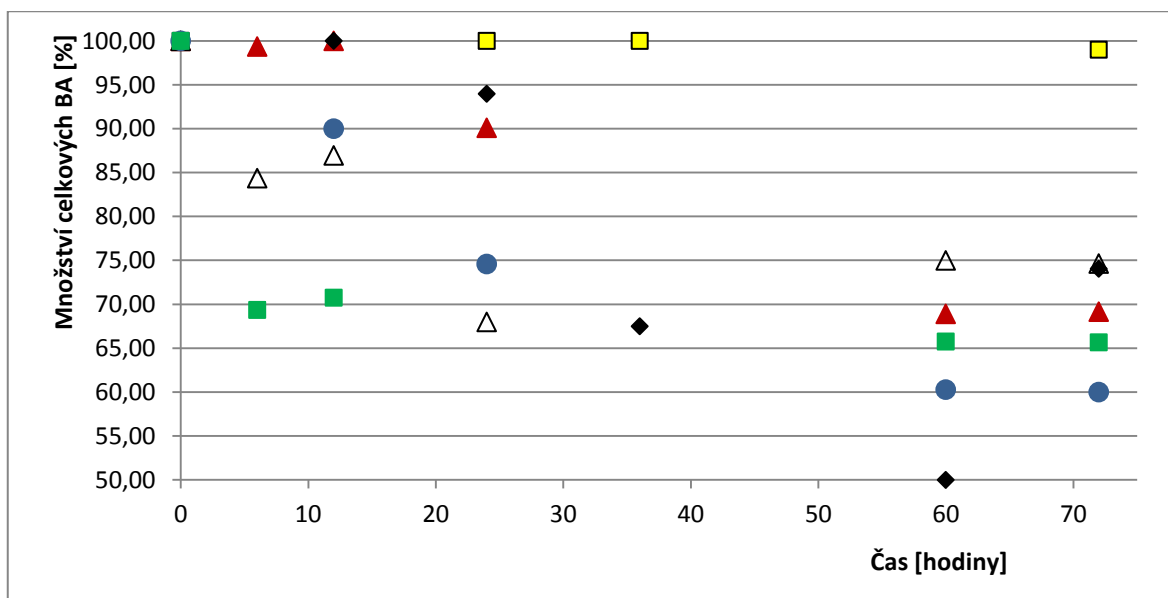
Degradace biogenních aminů v médiu – kmenem *Bacillus altitudinis*



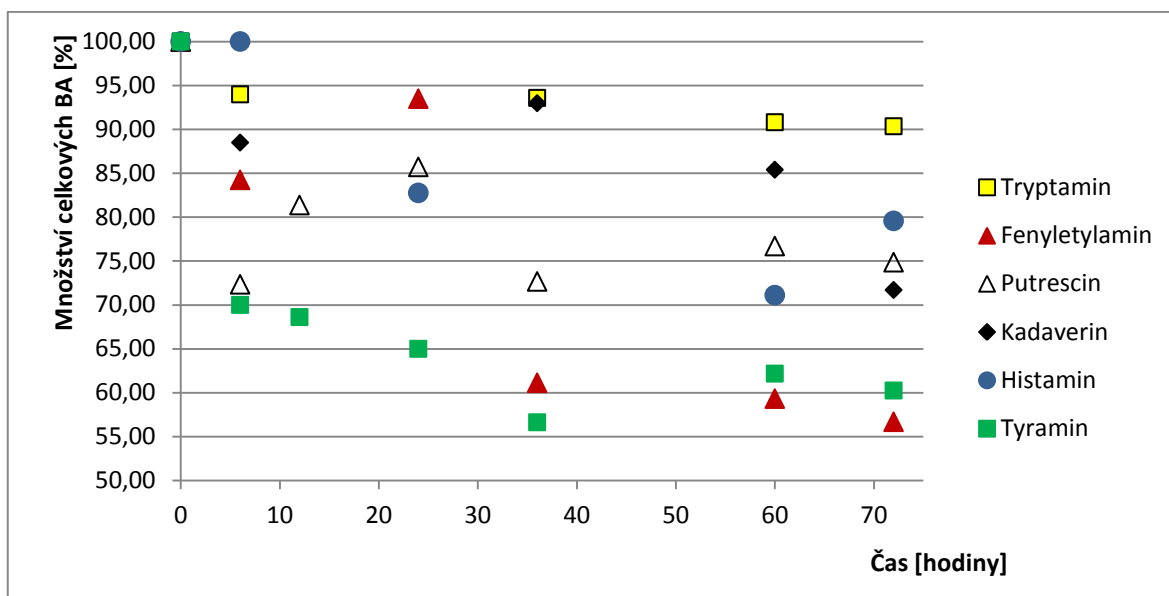
Degradace biogenních aminů v médiu – kmenem *Acinetobacter piti*



Degradace biogenních aminů v médiu – kmenem *Bacillus pumilus*



Degradace biogenních aminů v médiu – kmenem *Bacillus safensis*



Degradace biogenních aminů v médiu – kmenem *Rhizobium radiobacter*