

Možnosti snížení produkce biogenních aminů vybranými bakteriemi v podmínkách *in vitro*

Andrea Dlabajová

Bakalářská práce
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Andrea Dlabajová**
Osobní číslo: **T130234**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Možnosti snížení produkce biogenních aminů vybranými bakteriemi v podmínkách *in vitro***

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika a význam biogenních aminů.
2. Výskyt biogenních aminů v potravinách.
3. Možnosti redukce biogenních aminů v podmínkách *in vitro* a v potravinách.

II. Praktická část

1. Stanovení produkce biogenních aminů v kultivačním médiu s bakteriocinem.
2. Stanovení produkce biogenních aminů v kultivačním médiu po kultivaci bakterií produkujících bakteriocin.
3. Formulace závěrů na základě získaných výsledků.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] ALVAREZ, M. A., MORENO-ARRIBAS, M. V. The problem o biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. Trends Food Sci. Technol. 39: 146-155. 2014. ISSN 13645072.
- [2] FAVARO, L., LÚCIA, A., PENNA, B. et al. Bacteriocinogenic LAB from cheeses Application in biopreservation? Trends Food Sci. Technol. 41: 37-48. 2015. ISSN 09242244.
- [3] CAPOZZI, V., RUSSO, P., LADERO, V. et al. Biogenic amines degradation by Lactobacillus plantarum: toward a potential application in wine. Frontiers Microbiol. 3: Article 122: 1-6. 2012. ISSN 1664-302x.
- [4] CUEVA, C., GARCÍA-RUIZ, A., GONZÁLEZ-ROMPINELLI, E. et al. Degradation of biogenic amines by vineyard ecosystem fungi. Potential use in winemaking. J. Appl. Microbiol. 112: 672-682. 2012. ISSN 13645072.
- [5] LEUSCHNER, R.G., HEIDEL M., HAMMES W.P. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. Int. J. Food Microbiol. 39: 1-10. 1998. ISSN 01681605.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

2. února 2016

Termín odevzdání bakalářské práce:

4. května 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: DLABAJOVÁ ANDREA Obor: CHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 10.5.2016


.....

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). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

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

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

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá sledováním vlivu nisinu a protektivních bakterií na produkci biogenních aminů u vybraných bakterií. Teoretická část je zaměřena na biogenní aminy, jejich vznik, význam, výskyt, produkci a možnosti eliminace. Dále jsou popsány bakteriociny a jejich význam, výskyt, produkce a využití v potravinářství.

V praktické části této práce byla sledována produkce biogenních aminů v podmínkách *in vitro* u kmenů *Lactobacillus plantarum* P89, *Lb. brevis* P93, *Lb. plantarum* P96, *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* T3, *Lb. curvatus* T15, *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* T36 za přídavku nisinu a protektivních kultur *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 670, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 686, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 689, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 731, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 71, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 702. Produkce biogenních aminů byla analyzována po 24 a 48 hodinách kultivace pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí po předchozí derivatizaci dansylchloridem. Z výsledků je patrné, že přídavek bakteriocinu nebo protektivních kultur vedl ve většině případů k poklesu produkce biogenních aminů.

Klíčová slova: biogenní aminy, bakteriociny, protektivní kultury

ABSTRACT

This work deals with monitoring effect of nisin and protective cultures on production of biogenic amines in selected bacteria. The theoretical part is focused on biogenic amines, their characteristic, origin, producers and possibility of elimination. The following describes bacteriocins, their characteristic, producers and use in food processing.

In the practical part of this work was monitored production of biogenic amines *in vitro* on strains *Lactobacillus plantarum* P89, *Lb. brevis* P93, *Lb. plantarum* P96, *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* T3, *Lb. curvatus* T15, *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* T36 with nisin and protective cultures *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 670, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 686, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 689, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 731, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 71, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 702. Production of biogenic amines was analyzed by high performance liquid chromatography with UV detection after derivatization with dansylchloride. The results show that the addition of the bacteriocin or protective cultures resulted to a decrease in production of biogenic amines in the majority of cases.

Keywords: biogenic amines, bacteriocins, protective cultures

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Leoně Buňkové Ph.D. za odborné vedení, ochotu, čas, cenné rady, trpělivost a vstřícnost při konzultacích.

Také bych chtěla poděkovat laborantkám Bc. Veronice Kučabové, Ing. Ludmile Zálešákové a Lence Machálkové za ochotu a pomoc při zpracování praktické části této bakalářské práce. Poděkování patří i celé mé rodině za trpělivost a podporu při studiu.

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 BIOGENNÍ AMINY	13
1.1 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ	13
1.2 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ.....	14
1.3 VÝZNAM BIOGENNÍCH AMINŮ.....	15
1.3.1 Působení biogenních aminů na organismus	15
1.3.2 Toxické účinky	16
1.4 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ.....	16
1.4.1 Fermentované potraviny.....	17
1.4.1.1 Sýry	17
1.4.1.2 Alkoholické nápoje (víno, pivo)	17
1.4.2 Nefermentované potraviny	18
1.4.2.1 Maso.....	18
1.4.2.2 Potraviny rostlinného původu	18
1.5 LEGISLATIVNÍ LIMITY	19
1.6 PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ.....	19
1.7 MOŽNOSTI ELIMINACE BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH	20
1.7.1 Startérové kultury	21
1.7.2 Degradace biogenních aminů	22
2 BAKTERIOCINY	23
2.1 CHARAKTERISTIKA BAKTERIOCINŮ.....	23
2.2 VÝZNAM BAKTERIOCINŮ	23
2.3 PRODUKCE BAKTERIOCINŮ	24
2.3.1 Bakteriociny gramnegativních bakterií	24
2.3.1.1 Koliciny.....	24
2.3.1.2 Mikrociny.....	24
2.3.1.3 Pyociny.....	24
2.3.2 Bakteriociny grampozitivních bakterií	25
2.3.2.1 Nisin.....	26
II PRAKTICKÁ ČÁST	27
3 CÍL PRÁCE	28
4 MATERIÁL A METODY	29
4.1 POUŽITÉ MIKROORGANIZMY	29
4.1.1 Kmeny produkující biogenní aminy	29
4.1.2 Inhibiční kmeny produkující nisin	29
4.2 KULTIVAČNÍ MÉDIA A ROZTOKY	29
4.2.1 MRS bujón	30
4.2.2 Bujón M17	30

4.2.3	M17 a MRS Agar	30
4.2.4	Fyziologický roztok.....	30
4.2.5	Nisin	30
4.3	PŘÍPRAVA SUPERNATANTU KMENŮ PRODUKUJÍCÍCH NISIN.....	31
4.4	SLEDOVÁNÍ PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ V PŘÍTOMNOSTI BAKTERIOCINU NISINU NEBO INHIBIČNÍ KULTURY	31
4.5	DERIVATIZACE VZORKŮ	32
4.6	VLASTNÍ CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ.....	33
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	34
5.1	VLIV NISINU A PROTEKTIVNÍCH BAKTERIÍ NA PRODUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ U KMENE <i>LACTOBACILLUS CURVATUS</i> SUBSP. <i>CURVATUS</i> T3	34
5.2	VLIV NISINU A PROTEKTIVNÍCH BAKTERIÍ NA PRODUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ U KMENE <i>LACTOBACILLUS CURVATUS</i> T15	37
5.3	VLIV NISINU A PROTEKTIVNÍCH BAKTERIÍ NA PRODUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ U KMENE <i>LACTOBACILLUS CURVATUS</i> SUBSP. <i>CURVATUS</i> T36.....	39
5.4	VLIV NISINU A PROTEKTIVNÍCH BAKTERIÍ NA PRODUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ U KMENE <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> P89	42
5.5	VLIV NISINU A PROTEKTIVNÍCH BAKTERIÍ NA PRODUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ U KMENE <i>LACTOBACILLUS BREVIS</i> P93.....	45
5.6	VLIV NISINU A PROTEKTIVNÍCH BAKTERIÍ NA PRODUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ U KMENE <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> P96.....	48
5.7	DISKUZE.....	51
	ZÁVĚR	57
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	58
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	65
	SEZNAM OBRÁZKŮ	66
	SEZNAM TABULEK.....	67

ÚVOD

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární zásadité dusíkaté látky, které se vyskytují v buňkách rostlinných i živočišných tkání. Jejich výskyt je ale sledován především u potravin, kde jsou považovány za indikátory bakteriálního kažení. Jejich příjem ve vysokých koncentracích může mít negativní účinky na organismus, mezi které patří hypotenze, hypertenze, zvracení, bušení srdce, migrény a dýchací potíže. Z těchto důvodů v posledních dvou desetiletích značně zesílil zájem o výzkum podmínek jejich vzniku. Vyskytují se v potravinách, které obsahují proteiny nebo volné aminokyseliny. Biogenní aminy vznikají dekarboxylací těchto aminokyselin působením živých organismů za účasti enzymů dekarboxyláz.

Bakteriociny jsou látky peptidové povahy produkované velkým množstvím grampozitivních i gramnegativních bakterií v průběhu jejich růstového cyklu. Mají inhibiční účinek a působí převážně na úzké spektrum mikroorganismů. Jejich význam spočívá především v tom, že působí proti patogenním bakteriím nebo proti bakteriím, které se podílejí na kažení potravin. Tento předpoklad vede k rozvoji nových technologií, při kterých se bakteriociny využívají jako přírodní konzervační látky potlačující růst nežádoucích mikroorganismů a tím prodlužují trvanlivost potravin.

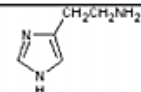
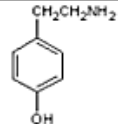
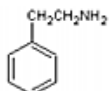
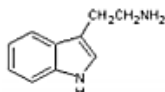
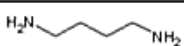
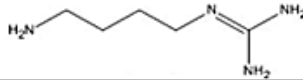
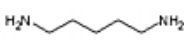
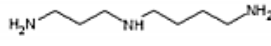

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

1.1 Charakteristika biogenních aminů

Biogenní aminy jsou zásadité dusíkaté sloučeniny vznikající dekarboxylací aminokyselin, aminací nebo transaminací aldehydů a ketonů. Jsou to organické báze o nízké molekulové hmotnosti vyskytující se v buňkách rostlinných a živočišných tkání. Mají důležitou fyziologickou funkci, ale v nadměrném množství mohou způsobovat nežádoucí až toxické účinky. Patří mezi ukazatele bakteriálního kažení a jejich výskyt je sledován především u potravin. V nízkých koncentracích jsou přirozenou součástí potravin, ale vysoké koncentrace jsou známkou pokročilého stupně kažení. Nejdůležitějšími biogenními aminy, vyskytujícími se v potravinách, jsou histamin, putrescin, kadaverin, tyramin, tryptamin, beta-fenyletylamin, spermin a spermidin [1]. Jejich strukturální vzorce, systematické a triviální názvy jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Strukturální vzorce a názvy vybraných biogenních aminů [1]

Strukturální vzorec	Triviální název – zkratka	Název systematický
	Histamin – HIM	2-(1H-imidazol-5-yl)etanamin
	Tyramin – TYM	4-(2-aminoetyl) fenol
	Fenyletylamin – PEA	2-fenyletanamin
	Tryptamin – TPM	2-(1H-indol-3-yl)etanamin
	Putrescin – PUT	butan-1,4-diamin
	Agmatin – AGM	1-(4-aminobutyl)guanidin
	Kadaverin – CAD	pentan-1,5-diamin
	Spermidin – SPD	N-(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin
	Spermin – SPN	N,N'-bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin

1.2 Vznik biogenních aminů

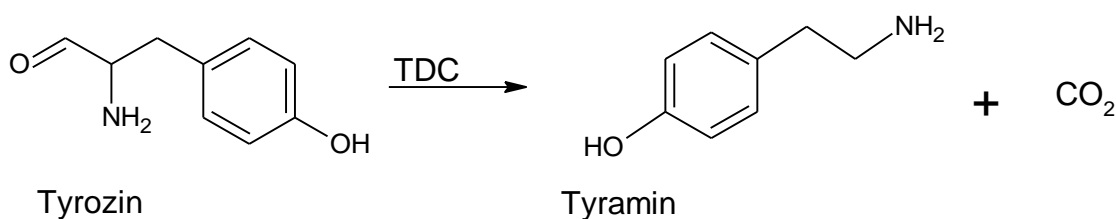
Biogenní aminy (BA) vznikají z aminokyselin dekarboxylací za účasti enzymů dekarboxyláz. Dekarboxylace je děj, při kterém se odbourává karboxylová skupina aminokyseliny. Dojde k odštěpení oxidu uhličitého z karboxylové skupiny za přítomnosti enzymu dekarboxylázy, vzniká bazický amin. Dekarboxylázy katalyzující přeměnu aminokyselin obsahují jako kofaktor pyridoxalfosfát, který se reakce přímo účastní. Další možný způsob vzniku je transaminace aldehydů a ketonů [4,5,6].

Jednotlivé aminokyseliny, ze kterých vznikají vybrané biogenní aminy, jsou uvedeny v tabulce č. 2. Obrázky 1,2 a 3 znázorňují reakce vzniku některých biogenních aminů [3].

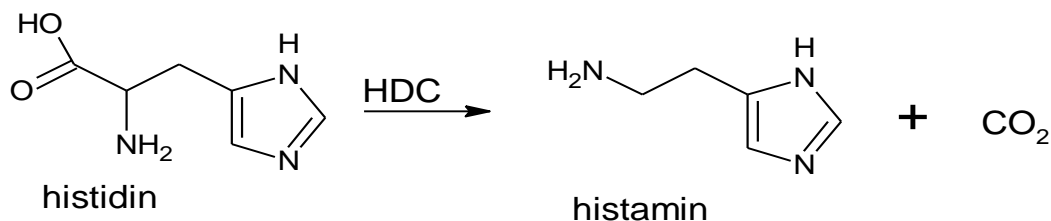
Tvorbu biogenních aminů v potravinách ovlivňuje také aktivita mikrobiálních dekarboxylačních enzymů. Tu ovlivňuje mnoho faktorů - teplota, doba skladování potravin, aktivita vody, pH, redoxní potenciál nebo obsah solí [4].

Tabulka 2. Biogenní aminy a jejich prekurzory [3]

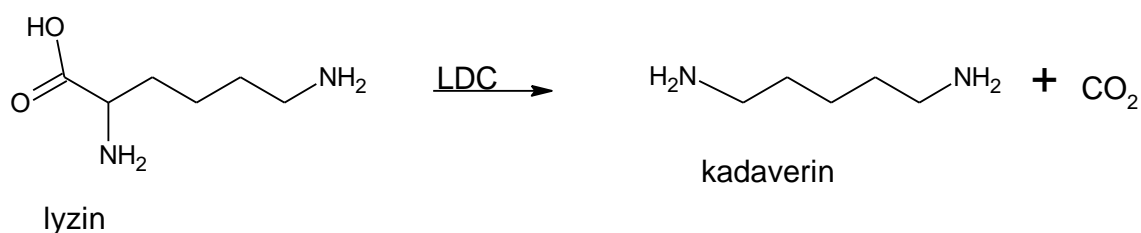
Biogenní amin	Původní aminokyselina
histamin	histidin
kadaverin	lyzin
putrescin	arginin, ornitin
agmatin	arginin
fenyletylamin	fenylalanin
tyramin	tyrozin
dopamin	3,4 - dihydroxyfenylalanin
tryptamin	tryptofan



Obrázek 1. Vznik tyraminu z aminokyseliny tyrozinu za přítomnosti enzymu tyrozindekarboxylázy (TDC) [3]



Obrázek 2. Vznik histaminu z aminokyseliny histidinu za přítomnosti enzymu histidindekarboxylázy (HDC) [3]



Obrázek 3. Vznik kadaverinu z aminokyseliny lyzinu za přítomnosti enzymu lyzindekarboxylázy (LDC) [3]

1.3 Význam biogenních aminů

V malých koncentracích jsou biogenní aminy nezbytnou součástí živočišných a rostlinných tkání a vykonávají řadu důležitých funkcí [7]. Jejich příjem ve vyšších koncentracích má ale na organismus negativní účinky. Při běžných podmínkách je organismus schopný přebytečné biogenní aminy odbourávat, tato schopnost je ale ovlivněna celou řadou faktorů. Například malé děti, jedinci se zhoršenou funkcí jater nebo jedinci, kteří užívají některé druhy léků, jako jsou antidepresiva a antiparkinsonika, mají sníženou schopnost detoxikace biogenních aminů. Mechanismus odbourávání může také ovlivňovat současný příjem alkoholu s nadměrným množstvím biogenních aminů. Detoxikační schopnost organismu je značně individuální [8].

1.3.1 Působení biogenních aminů na organismus

Biogenní aminy jsou zdrojem dusíku v biochemických reakcích, také působí jako prekurzory pro syntézu hormonů, nukleových kyselin, proteinů a alkaloidů. Polyaminy, mezi které patří putrescin, spermidin a spermin, mají vliv na regulaci buněčného růstu, diferenciaci buněk a metabolickou aktivitu střev [7].

Histamin ovlivňuje sekreci žaludečních šťáv a podílí se na anafylaktickém šoku a alergických reakcích. Také působí na krevní tlak, způsobuje jeho pokles, tzv. hypotenzi. Naopak tyramin krevní tlak zvyšuje, způsobuje tzv. hypertenzi. Mimo krevního tlaku má tyramin také vliv na kontrakci hladkého svalstva, je to lokální tkáňový hormon a prekurzor dopaminu. Tryptamin má vliv na peristaltiku střev a na psychické funkce [8, 9].

1.3.2 Toxické účinky

Histamin a tyramin patří k nejvíce toxickým biogenním aminům. Jejich škodlivé účinky mohou být zvýšeny i současným příjmem jiných biogenních aminů, zejména putrescinu a kadaverinu. Toxické účinky na organismus mohou mít ale také spermin, spermidin a fenyletylamin. Při nadměrném příjmu nebo snížené schopnosti detoxikace mohou způsobovat bolesti hlavy, migrény, bušení srdce, pocení, dýchací potíže, břišní křeče, zvracení, průjem, vyrážky. U sperminu a spermidinu je možný vznik N-nitrosaminů reakcí s kyselinou dusitou. N-nitrosaminům je připisována karcinogenita, mutagenita a teratogenita [7, 8].

1.4 Výskyt biogenních aminů

Biogenní aminy můžeme najít v různých typech potravin, zejména v potravinách bohatých na bílkoviny. Nízké koncentrace biogenních aminů jsou součástí řady potravin. Větší výskyt se předpokládá u fermentovaných potravin, na jejichž výrobě se podílejí mikroorganismy. Zvláště pokud potravina poskytuje vhodné prostředí pro jejich biochemickou aktivitu [10, 11]. Obsah biogenních aminů se mění ve velmi rozsáhlém rozmezí, proto není možné uvést průměrné hodnoty v konkrétním druhu potraviny. Obsah může kolísat v rozmezí až několika řádů. Biogenní aminy dávají potravinám typickou chuť zralých potravin a jsou prekurzory určitých aromatických sloučenin [12].

Pro vznik biogenních aminů v potravinách musí být splněny tři základní podmínky [5]:

1. Přítomnost aminokyselin v substrátu
2. Přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou
3. Vhodné podmínky pro růst a množení mikroorganismů.

1.4.1 Fermentované potraviny

U této skupiny potravin jsou biogenní aminy produkovány hlavně během fermentace a dozrávání. Radíme zde zralé sýry, fermentované alkoholické nápoje (víno, pivo), fermentovanou zeleninu, fermentované masné výrobky a ryby a rybí výrobky. Bakterie, které jsou zodpovědné za produkci BA u fermentovaných potravin, jsou zejména grampozitivní bakterie rodu *Lactobacillus*. Gramnegativní bakterie jsou většinou inhibovány samotným procesem fermentace [13].

1.4.1.1 Sýry

Velmi dobrým prostředím pro tvorbu biogenních aminů jsou sýry, a to z důvodu proteolýzy mléčných bílkovin při jejich zrání. Při proteolýze jsou mléčné bílkoviny rozkládány až na aminokyseliny. Dekarboxylací volných aminokyselin za činnosti bakteriálních dekarboxyláz mohou vznikat toxická množství biogenních aminů. Množství biogenních aminů v sýrech ovlivňuje řada faktorů, jako je například druh sýrů, doba zrání, pH, mikroflóra, koncentrace solí, teplota. V sýrech se nejčastěji vyskytuje histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, tryptamin a 2-fenyletylamin [14, 15].

1.4.1.2 Alkoholické nápoje (víno, pivo)

Přítomnost biogenních aminů ve víně je spojována s působením kvasinek při primární fermentaci, přítomností bakterií mléčného kvašení a jablečno-mléčným kvašením, které zajišťuje odkyselení vína. Častými biogenními aminy, které se vyskytují ve víně, jsou tyramin, putrescin, kadaverin, histamin a 2-fenyletylamin. Množství biogenních aminů se může lišit v závislosti na kvalitě použitých surovin, možné mikrobiální kontaminaci v průběhu výroby a době a podmínkách skladování [16, 17]. Celkový obsah biogenních aminů ve víně se může pohybovat od několika mg/l do zhruba 50 mg/l. Zatím nebyly legislativně stanoveny nejvyšší přípustné limity pro obsah biogenních aminů ve víně, ale horní hranice obsahu histaminu se doporučuje 2-10 mg/l. Jejich vyšší obsah může negativně ovlivnit kvalitu vína a způsobit možná zdravotní rizika pro spotřebitele [18, 19].

Obsah biogenních aminů v pivu závisí na množství mikroorganismů v mladině, typu sladu a jiných surovin, technologickém postupu výroby, mikrobiální kontaminaci během procesu výroby a podmínkách skladování [20]. Některé biogenní aminy, jako putrescin, agmatin, spermin a spermidin, mohou pocházet z původních surovin, jako je například slad. Jsou

proto běžnou součástí piva. Naopak histamin, tyramin a kadaverin ukazují na nežádoucí kontaminaci při procesu výroby. Nejvíce biogenních aminů v pivu se tvoří během hlavní fermentace, nejčastěji se tak tvoří tyramin, histamin a kadaverin. Nejběžnější je výskyt tyraminu [21].

1.4.2 Nefermentované potraviny

U této skupiny potravin vznikají biogenní aminy převážně působením hnilobných bakterií. Nejčastěji se vyskytují v mase, kde vznikají v důsledku nesprávného skladování. Biogenní aminy se nacházejí i v ovoci, zelenině a houbách v pokročilém stádiu kažení [12].

1.4.2.1 Maso

V mase jsou přirozeně přítomné biogenní aminy spermin a spermidin, v důsledku skladování se však mohou vyskytnout i jiné biogenní aminy, především tyramin, kadaverin, putrescin a histamin. Maso je velmi bohaté na bílkoviny a volné aminokyseliny, které fungují jako prekurzory pro tvorbu biogenních aminů. Jejich výskyt v mase je ovlivněn řadou faktorů, mezi které patří kvalita suroviny, správné a pečlivé ošetření při zpracování a dodržování vyhovujících hygienických podmínek [22].

U čerstvých ryb jsou biogenní aminy obsaženy ve velmi nízké koncentraci. V průběhu skladování, působením činnosti mikroorganismů, dochází k přeměně histidinu na histamin. Tento děj může být značně urychlen, pokud není rybí maso řádně skladováno. Histamin je z pohledu toxikologie považován za nejrizikovější biogenní amin v rybím mase. U ryb čeledi *Scombroidae* a *Scomberesoidae* se průměrný obsah histaminu pohybuje v koncentraci 1-15mg/100g rybího masa. Pokud ale nejsou dodrženy správné skladovací podmínky, koncentrace histaminu může převýšit hodnotu 100mg/100g rybího masa. Kromě histaminu může rybí maso obsahovat mnoho dalších biogenních aminů, jako jsou například putrescin a kadaverin [23, 24].

1.4.2.2 Potraviny rostlinného původu

V ovoci a zelenině se biogenní aminy nacházejí ve velmi malém množství, které zpravidla nemá negativní účinky pro organismus. Zvýšené hodnoty v těchto potravinách se můžou vyskytnout, pokud ovoce a zelenina nebyly řádně skladovány nebo s nimi bylo nesprávně manipulováno. Koncentrace biogenních aminů v ovoci a zelenině je také závislé na stupni

zralosti. Byly zjištěny rozdíly v koncentraci biogenních aminů mezi různě zralým ovocem stejného druhu. Nejčastěji se v ovoci a zelenině vyskytuje tyramin. Mezi další biogenní aminy, které se nacházejí v těchto potravinách, řadíme histamin, fenyletylamin a putrescin.

Určitá množství biogenních aminů se můžou vyskytovat i v potravinách jako jsou čokoláda, kakao, houby anebo třeba i koření [12, 17].

1.5 Legislativní limity

Legislativní limity jsou v různých zemích odlišné. V České republice je momentálně platná vyhláška 305/2004 Sb., která stanovuje druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách vydaná Ministerstvem zdravotnictví. Tato vyhláška uvádí přípustné množství histaminu v rybách a rybích výrobcích, které je stanoveno na 100 mg/l s povolením překročit tento limit o 100 % u dvou vzorků z devíti. Limitem histaminu v rybách a rybích výrobcích se zabývá i Nařízení komise (ES) č. 2073/2005, která ustanovila přípustné množství histaminu v produktech rybolovu na 100 mg/l a v produktech rybolovu, které bylo ošetřeno enzymatickým zráním v láku na 200 mg/l [25, 26].

1.6 Produkce biogenních aminů

Hlavní podmínkou pro tvorbu biogenních aminů v potravinách je přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou a vhodné podmínky pro jejich růst a množení. Množství a typ produkovaného biogenního aminu závisí na druhu mikroorganismu a potraviny, ve které se daný mikroorganismus nachází. Aktivita dekarboxylačních enzymů závisí na spoustě faktorů. Jedním z těchto faktorů je pH, dekarboxylačním mikroorganismům vyhovuje pH 4,0-5,5. Dalšími faktory jsou například složení média, teplota nebo růstová fáze mikroorganismu. Největší aktivita dekarboxylačních enzymů byla zjištěna ve stacionární fázi růstu. Také přítomnost solí má vliv na tvorbu biogenních aminů, chlorid sodný inhibuje jejich produkci. Množství biogenních aminů závisí i na době skladování potravin, čím déle je potravina skladována, tím více biogenních aminů se v ní zpravidla nachází [4, 27].

Dekarboxylázy aminokyselin nejsou u bakterií úplně obvyklé. Vyskytují se u rodů *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* a mléčných bakterií rodu *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Enterococcus*. Bakterie, které jsou schopny dekarboxylovat aminokyseliny a potraviny, ve kterých se mohou nacházet, jsou uvedeny v tabulce 3 [12].

Tabulka 3 Přítomnost biogenních aminů a bakterií, které je produkují, v potravinách [12]

Potraviny	Bakterie	Vytvářené aminy
Ryby	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Staphylococcus xylosum</i>	histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, agmatin, spermin, spermidin
Sýry	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Paenibacillus macerans</i> , <i>Propionibacterium</i> spp.	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, fenyletylamin, tryptamin
Maso a masné výrobky	rody <i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Micrococcus</i> , čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, fenyletylamin, tryptamin
Fermentovaná zelenina	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus</i> spp.	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin
Fermentované produkty ze sóje	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Trichosporon beigleri</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin

1.7 Možnosti eliminace biogenních aminů v potravinách

S ohledem na bezpečnost potravin a zdraví konzumenta je potřeba předejít hromadění biogenních aminů v potravinách. K jejich snížení nebo minimalizaci výskytu lze použít amin-negativní (neprodukující) nebo amin-oxidující (degradující) mikroorganismy nebo enzymy, které biogenní aminy oxidují. K dalším významným metodám patří výběr startérových kultur, obalových materiálů, ošetření vysokým hydrostatickým tlakem, ozáření nebo použití některých přídatných látek [28, 29].

1.7.1 Startérové kultury

Výběr vhodné startérové kultury je považován za jeden z neúčinnějších způsobů snížení koncentrace biogenních aminů v potravinách. Startérová kultura je komerční preparát obsahující živé mikroorganismy, které jsou používány při výrobě fermentovaných potravin, kde se využívá jejich metabolické aktivity. Odbourávají sacharidy na organické kyseliny a tím snižují pH, štěpí lipidy a bílkoviny, také redukuje dusičnany na dusitany. Díky startérovým kulturám se ve výrobku tvoří typické aroma a chuť. Nejčastěji startérové kultury obsahují bakterie mléčného kvašení, které tvoří [29]:

- kyselinu mléčnou ze sacharidů
- antimikrobní látky – bakteriociny
- látky aromatické a chuťové

Některé kmeny bakterií, které mohou být využívány při výrobě fermentovaných potravin jako startérové kultury, tvoří biogenní aminy. Proto je jedním z požadavků použití startérových kultur bez dekarboxylázové aktivity. Tyto kultury nejsou schopné dekarboxylovat aminokyseliny za vzniku biogenních aminů, jsou tzv. amin-negativní [13].

Existuje ale také skupina amin-oxidačních startérových kultur. Tyto kultury jsou schopné oxidovat biogenní aminy na aldehyd, peroxid vodíku a amoniak [29].

Mnohé studie potvrdily možnost snížení obsahu biogenních aminů v důsledku použití určité startérové kultury. Například k podstatnému snížení obsahu tyraminu došlo při použití *Kocuria varians* jako startérové kultury při výrobě fermentovaných uzenin. *Lactobacillus plantarum* účinně potlačoval produkci tyraminu, putrescinu a kadaverinu v kysaném zelí [29, 30, 31].

1.7.2 Degradace biogenních aminů

K degradaci již vzniklých biogenních aminů v potravinách lze využít enzymu aminooxidáza. Aminooxidáza může být izolována z orgánů prasat (játra, ledviny), z lidské placenty a krevní plazmy nebo ze samotných mikroorganismů [32]. K degradaci biogenních aminů lze přímo použít i bakterie, které tento enzym vytvářejí. Schopnost degradovat biogenní aminy za pomoci enzymu aminooxidázy byla prokázána u některých bakterií rodů [34]:

- *Bacillus*
- *Brevibacterium*
- *Lactobacillus*
- *Micrococcus*
- *Staphylococcus*
- *Halomonas*

Aktivita aminooxidačních enzymů bakterií závisí na různých faktorech. Mezi tyto faktory patří například koncentrace solí v potravině nebo teplota skladování [32].

Aktivitou grampozitivní fakultativně anaerobní bakterie *Staphylococcus xylosus* došlo ke snížení histaminu a tyraminu v solených a fermentovaných ančovičkách [33].

Studie, která byla provedena na rybí pastě Rihaakuru připravované z tuňáka, tradičním pokrmu maledivské kuchyně, prokázala degradaci histaminu z 30-50% za použití bakterií *Lactobacillus sakei* a *Vergibacillus halodonitrificans*. Podstatně lepšího výsledku při degradaci histaminu docílili použitím diaminooxidázy izolované z prasečích jater. Koncentrace histaminu při použití tohoto enzymu byla pod detekčním limitem (<0,1 ppm). V tomto případě bylo tedy pro vyšší účinnost výhodnější použít přímo enzym diaminooxidázu. Nejlepším řešením by ovšem bylo zabránit růstu mikroorganismů již u syrového masa při skladování. Nicméně tohle není vždy možné, protože Rihaakuru se vyrábí z ryb s nízkou kvalitou masa a často nejsou zajištěny vyhovující podmínky ke skladování [34].

2 BAKTERIOCINY

2.1 Charakteristika bakteriocinů

Velké množství grampozitivních i gramnegativních bakterií v průběhu jejich růstového cyklu produkuje látky peptidové povahy, tzv. bakteriociny. Tyto látky mají antimikrobiální povahu. Inhibiční účinek bakteriocinů působí převážně na úzké spektrum mikroorganismů, které jsou často rodově příbuzné. Tímto se odlišují od antibiotik, která mají širší spektrum účinnosti. Mimoto bakteriociny jsou syntetizovány v primární růstové fázi, ale antibiotika jsou obvykle sekundárními metabolity. Bakteriociny se vyznačují nízkou molekulovou hmotností, jsou tepelně stabilní a lepší antibakteriální účinek vykazují při nižším pH (<5). Můžeme je rozdělit na 4 základní třídy: [35]

Třída I.: lantibiotika (2-4 kDa)

Třída II.: nízkomolekulární bakteriociny (do 10 kDa)

Třída III.: vysokomolekulární bakteriociny (<30 kDa)

Třída IV.: komplexní bakteriociny

2.2 Význam bakteriocinů

Snahou potravinářského průmyslu je produkce potravin s dlouhou trvanlivostí, vhodnými nutričními a organoleptickými vlastnostmi. Spotřebitel preferuje potraviny, které byly vyrobeny šetrnými technologickými postupy a do kterých bylo přidáno co nejméně chemických přísad. Vzrostla poptávka po konzervačních látkách přírodního původu. Bakteriociny potlačují růst nežádoucích patogenních mikroorganismů v potravinách, ale současně jsou schopny nenarušit růst těch žádoucích. Tyto předpoklady přispěly k rozvoji nových technologií s využitím bakteriocinů k potlačení růstu nežádoucích mikroorganismů [36, 37].

2.3 Produkce bakteriocinů

2.3.1 Bakteriociny gramnegativních bakterií

Oproti bakteriocinům grampozitivních bakterií mají větší molekulovou hmotnost. Nejlépe prostudovanými bakteriociny, které produkují gramnegativní bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, jsou koliciny a mikrociny [35].

2.3.1.1 Koliciny

Koliciny jsou bakteriociny produkované kolicinogenními kmeny bakterie *Escherichia coli*. Jejich molekulová hmotnost je 25-80 kDa a jsou tedy podstatně větší než mikrociny. Koliciny jsou vysoce účinné látky, produkované buňkou při stresu, například při nízké hladině živin v prostředí. Působí proti bakteriím čeledi *Enterobacteriaceae*, jako například *Shigella dysenteriae*. Jejich inhibiční účinek působí přes specifické receptory v buněčné stěně. Podle letálního účinku můžeme koliciny rozdělit do 4 skupin [35, 36]:

- I. Koliciny, které depolarizují plazmatickou membránu
- II. Koliciny s DNA endonukleázovou aktivitou
- III. Koliciny, které blokují proteosyntézu
- IV. Koliciny, které degradují peptidoglykan

V současnosti je známo 34 kolicinů, z toho je popsáno jen 26 [35].

2.3.1.2 Mikrociny

Mikrociny mají molekulovou hmotnost do 10 kDa. Jsou vlastnostmi podobné kolicinům, ale mikrociny nepoškozují DNA. Jejich účinek spočívá v tvorbě pórů nebo přerušením potenciálu buněčné membrány. Působí převážně proti bakteriím z čeledi *Enterobacteriaceae* [35, 37].

2.3.1.3 Pyociny

Pyociny jsou z 90 % produkovány bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. Jsou popsány tři typy pyocinů a rod *Pseudomonas* obvykle produkuje více než jeden typ. Pyociny jsou kódovány na chromozomech, stejně tak jako imunitní proteiny, které chrání buňku před vlastním bakteriocinem [35].

2.3.2 Bakteriociny grampozitivních bakterií

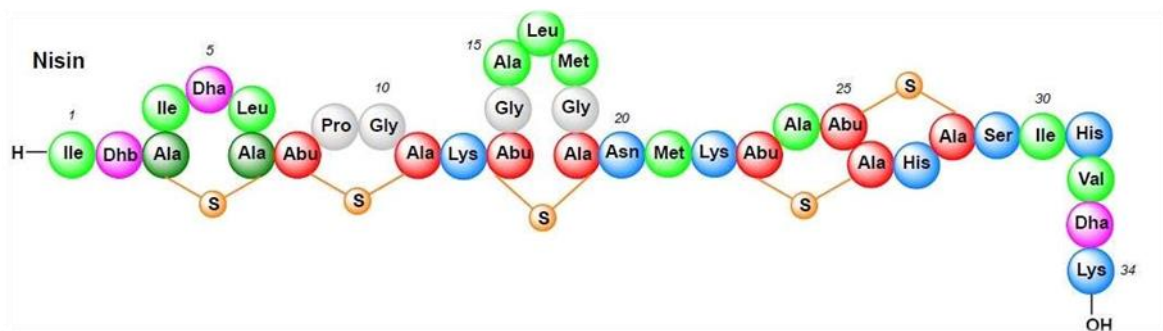
V posledních letech se bakteriociny grampozitivních bakterií dostaly do popředí zájmu z důvodu využití při konzervaci potravin. Jsou to ribozomálně syntetizované peptidy, obsahují 30 až 60 aminokyselin a většina z nich je tepelně stabilní. Tyto peptidy jsou v mnoha ohledech zcela odlišné od kolicinů a jiných bakteriocinů produkovaných gramnegativními bakteriemi. Byl popsán velký počet bakteriocinů produkovaných grampozitivními bakteriemi, ale ne mnoho jich bylo podrobně prozkoumáno. Antibakteriální účinek na citlivé buňky grampozitivních bakterií spočívá v destabilizaci funkcí membrány. Vybrané bakteriociny a bakterie, které tyto bakteriociny produkují, jsou uvedeny v tabulce 4 i s mikroorganismy, na které tyto bakteriociny inhibičně působí [36, 38].

Tabulka 4 Příklady bakteriocinů [35, 36, 38, 40]

Bakteriocin	Producenti	Inhibiční účinek
Nisin (E 234)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	bakterie mléčného kvašení, <i>Listeria</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i>
Lactacin 3147	<i>Lactococcus lactis</i> DPC3147	<i>Acetobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Listeria</i>
Leucocin H	<i>Leuconostoc</i> MF215B	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Carnobacterium</i> sp., <i>Lactococcus</i> sp., <i>Listeria</i> sp.,
Lactococcin G	<i>Lactococcus lactis</i> LMG 2081	bakterie mléčného kvašení, <i>Clostridium</i>
Enterocin 1071	<i>Enterococcus faecalis</i> BFE 1071, FAIR-E 309	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> , <i>Enterococcus durans</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i>
Lactacin F	<i>Lactobacillus johnsonii</i> VPI11088	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lb. amylovorus</i> , <i>Lb. crispatus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Plantaricin EF a JK	<i>Lactobacillus plantarum</i> C-11	<i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Carnobacterium</i>
Mutacin IV	<i>Streptococcus mutans</i> UA140	<i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>Str. sanguinis</i> , <i>Str. oralis</i> , <i>Str. gordonii</i> , <i>Str. mitis</i>

2.3.2.1 Nisin

Nisin je produkován některými bakteriemi mléčného kvašení, konkrétně zástupci rodu *Lactococcus*. Patří do I. třídy bakteriocinů, mezi lantibiotika. Skládá se z 34 aminokyselinových zbytků. Zatímco většina bakteriocinů se vyznačuje úzkým spektrem účinnosti, nisin je výjimkou a je považován za širokospektrální bakteriocin působící proti mnoha grampozitivním bakteriím. Gramnegativní bakterie jsou proti nisinu chráněny vnější membránou. Nisin se využívá v potravinářství jako konzervant s označením E234. Můžeme ho najít v pudincích ze semoliny a tapioky a v podobných výrobcích, ve zrajících sýrech, v tavených sýrech, v čerstvém sýru Mascarpone a v tekutých pasterizovaných vejcích [39, 40].



Obrázek 4 Nisin [50]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části této práce bylo charakterizovat biogenní aminy, popsat jejich význam, výskyt, produkci a možnosti eliminace, charakterizovat bakteriociny a také popsat jejich význam, výskyt, produkci a možnosti jejich využití.

Cílem praktické části bylo sledování vlivu bakteriocinů a bakterií tvořících bakteriociny na produkci biogenních aminů u mikroorganismů rodu *Lactobacillus*. Biogenní aminy byly stanoveny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV detekcí po předchozí derivatizaci danzylchloridem.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Použité mikroorganismy

4.1.1 Kmeny produkující biogenní aminy

Byly použity dekarboxyláza pozitivní bakteriální kultury izolované z piva, které byly získány z Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze. Dále byly použity kultury izolované ze sýrů ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů Laktoflora Tábor. Testované kmeny jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5 Testované kmeny produkující biogenní aminy

Izoláty z piva	Izoláty ze sýrů
<i>Lactobacillus plantarum</i> P89	<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> T3
<i>Lactobacillus brevis</i> P93	<i>Lactobacillus curvatus</i> T15
<i>Lactobacillus plantarum</i> P96	<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> T36

4.1.2 Inhibiční kmeny produkující nisin

Inhibiční kmeny produkující nisin byly izolovány ze sýrů a tyto izoláty byly získány z České sbírky mlékárenských mikroorganismů Laktoflora Tábor. Testované kmeny jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6 Inhibiční kmeny produkující nisin

Izoláty ze sýrů
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CCDM 670
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CCDM 686
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CCDM 689
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 731
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 71
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 702

4.2 Kultivační média a roztoky

Aminokyseliny a danzylchlorid byly pořízeny od společností Sigma-Aldrich – St. Louis USA a kultivační média od společnosti Merck – Darmstadt Německo.

4.2.1 MRS bujón

Pro kultivaci a sledování dekarboxylázové aktivity vybraných kmenů bakterií byla připravena tekutá živná půda MRS s přidavkem příslušných aminokyselin (tyrozin a arginin), které sloužily jako prekurzory příslušných biogenních aminů. Každá z aminokyselin byla navážena v koncentraci 0,3 % (w/v) a přidána k roztoku MRS Broth a deionizované vody. Takto připravená směs byla rozlita do zkumavek vždy po 7 ml. Po uzavření byly zkumavky sterilovány v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut.

4.2.2 Bujón M17

Bujón M17 byl použit pro kultivaci inhibičních kmenů rodu *Lactococcus*. Byl připraven obdobným způsobem jako bujón MRS, také s příslušným přidavkem aminokyselin (tyrozin a arginin) v koncentraci 0,3 % (w/v).

4.2.3 M17 a MRS Agar

M17 a MRS Agar byl použit pro stanovení počtu buněk. Bylo naváženo vypočítané množství živné půdy a rozpuštěno ve 400 ml vody společně s agarem. Roztok byl sterilován v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Sterilované půdy byly promíchány a za aseptických podmínek rozlity na Petriho misky.

4.2.4 Fyziologický roztok

Fyziologický roztok byl použit pro desítkové ředění vzorků. K přípravě byl použit chlorid sodný v koncentraci 8,5 g/l. Takto připravený roztok byl pipetován do zkumavek po 4,5 ml a sterilován v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

4.2.5 Nisin

Bylo naváženo 20 mg nisinu a rozpuštěno v 20 ml sterilní vody tak, aby výsledná koncentrace roztoku byla 1000 mg/l. Po rozpuštění byl roztok nisinu zfiltrován pomocí sterilního stříkačkového filtru o porozitě 0,22 µm. Takto připravený sterilní roztok byl pipetován po 1,5 ml do sterilních eppendorfkových zkumavek a zmrazen pro pozdější použití.

4.3 Příprava supernatantu kmenů produkujících nisin

Bylo odebráno 100 μl bakteriální suspenze rodu *Lactococcus* a naočkováno do příslušného kultivačního média M17 připraveného v plastových centrifugačních zkumavkách. Tyto zkumavky byly kultivovány při 30 °C po dobu 72 hodin a po kultivaci zcentrifugovány při 10 000g 15 minut. Získaný supernatant byl odebrán do 50 ml kádinky a bylo upraveno pH supernatantu na hodnotu $6,0 \pm 0,2$. Následně byl supernatant zfiltrován přes stříkačkový filtr o porozitě 0,22 μm .

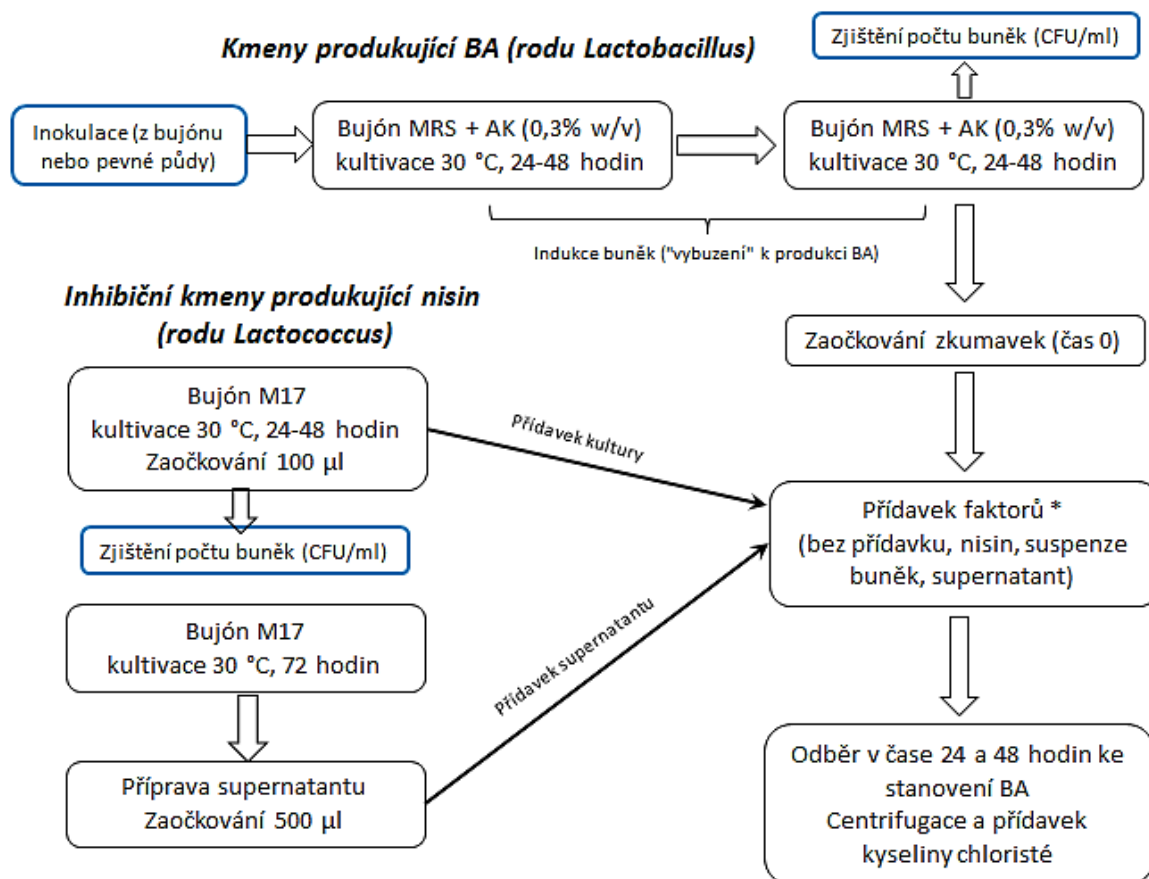
4.4 Sledování produkce biogenních aminů v přítomnosti bakteriocinu nisinu nebo inhibiční kultury

Bylo odebráno 100 μl bakteriální suspenze kmene produkujícího biogenní aminy a naočkováno do zkumavek s kultivačním médiem MRS s přidavkem aminokyselin. Zkumavky byly kultivovány 24 hodin při 30 °C. Tento postup byl opakován ještě jednou za účelem indukce buněk k produkci BA. Z těchto kultur bylo provedeno desítkové ředění pro zjištění CFU/ml. Ředění bylo provedeno na 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . Pro vlastní experiment bylo odebráno 100 μl bakteriální suspenze kmene produkujícího BA a naočkováno do kultivačního média MRS s aminokyselinami, ke kterému bylo přidáno:

- a) bez přidavku jakékoliv látky (kontrolní vzorky),
- b) nisin v celkové koncentraci 50 mg/l - k 7 ml média bylo přidáno 350 μl nisinu o koncentraci 1000 mg/l,
- c) supernatant, který byl získán po kultivaci inhibičního kmene - k 7 ml média bylo přidáno 500 μl supernatantu,
- d) kultura inhibičního kmene, která byla narostlá přes noc – k 7 ml média bylo přidáno 100 μl kultury.

Každý ze 4 faktorů se opakoval ve 3 zkumavkách a odběr byl proveden ve 2 časech: 24 a 48 hodin. Jeden faktor byl tedy u každého kmene sledován v 6 zkumavkách. Bylo testováno 6 kmenů produkujících biogenní aminy a 6 inhibičních kmenů produkujících nisin. Celkem bylo analyzováno 1728 vzorků. Všechny zaočkované zkumavky byly kultivovány při 30 °C. Po 24 a následně po 48 hodinách byly odebrány příslušné 3 zkumavky a odstře-

děny při 4600 ot/min při teplotě 15 °C po dobu 15 minut. Získaný supernatant byl rozdělen do dvou eppendorfkových zkumavek po 750 µl. K supernatantům byla přidána kyselina chloristá o koncentraci 1,2 mol/l v poměru 1:1 – k 750 µl supernatantu bylo přidáno 750 µl kyseliny chloristé. Vzorky byly zamrazeny a připraveny k derivatizaci. Schéma experimentu je znázorněno na obrázku 4.



Obrázek 5 Schéma přípravy vzorků

4.5 Derivatizace vzorků

Ke každému vzorku supernatantu bylo přidáno 100 µl 1,7-heptandiaminu (Sigma-Aldrich) v koncentraci 500 mg/l jako interního standardu. Následně byl 1 ml vzorku odpipetován do derivatizační nádobky a přidáno 1,5 ml karbonátového pufru s pH 11,1 – 11,2. Ke vzorku bylo přidáno 2 ml čerstvě připraveného roztoku danzylchloridu (Sigma-Aldrich) o kon-

centraci 5 g/l v acetonu (Merck). Derivatizační nádobka byla dobře uzavřena a nechala se třepat v temnu 20 hodin.

Po uplynutí potřebné doby třepání bylo ke vzorku přidáno 200 µl prolinu (Sigma-Aldrich), derivatizační nádobka byla dobře uzavřena a byla třepána další hodinu. Poté bylo ke vzorku přidáno 3 ml heptanu a 3 minuty bylo se vzorkem ručně třepáno. Následně bylo odpipetováno 1 ml heptanové vrstvy do šroubovací vialky. Obsah vialky byl odpařen při teplotě 60 °C do sucha pod proudem dusíku a suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich). Vialky byly uchovávány v mrazícím zařízení při teplotách -18 °C do doby analýzy.

4.6 Vlastní chromatografické stanovení

Bezprostředně před analýzou byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 µm a dávkovány do chromatografického systému. Výskyt biogenních aminů byl vyhodnocen pomocí mobilní a stacionární fáze na koloně Zorbax C18 RRHD s rozměry 3 x 50 mm a pórovitostí 1,8 µm. Průtok kolonou byl 0,45 ml/min. Stanovení bylo prováděno při teplotě 30 °C a vlnové délce 254 nm (UV/VIS-DAD detektorem). Výsledky obsahu biogenních aminů byly hodnoceny pomocí softwaru CLARITY [41].

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

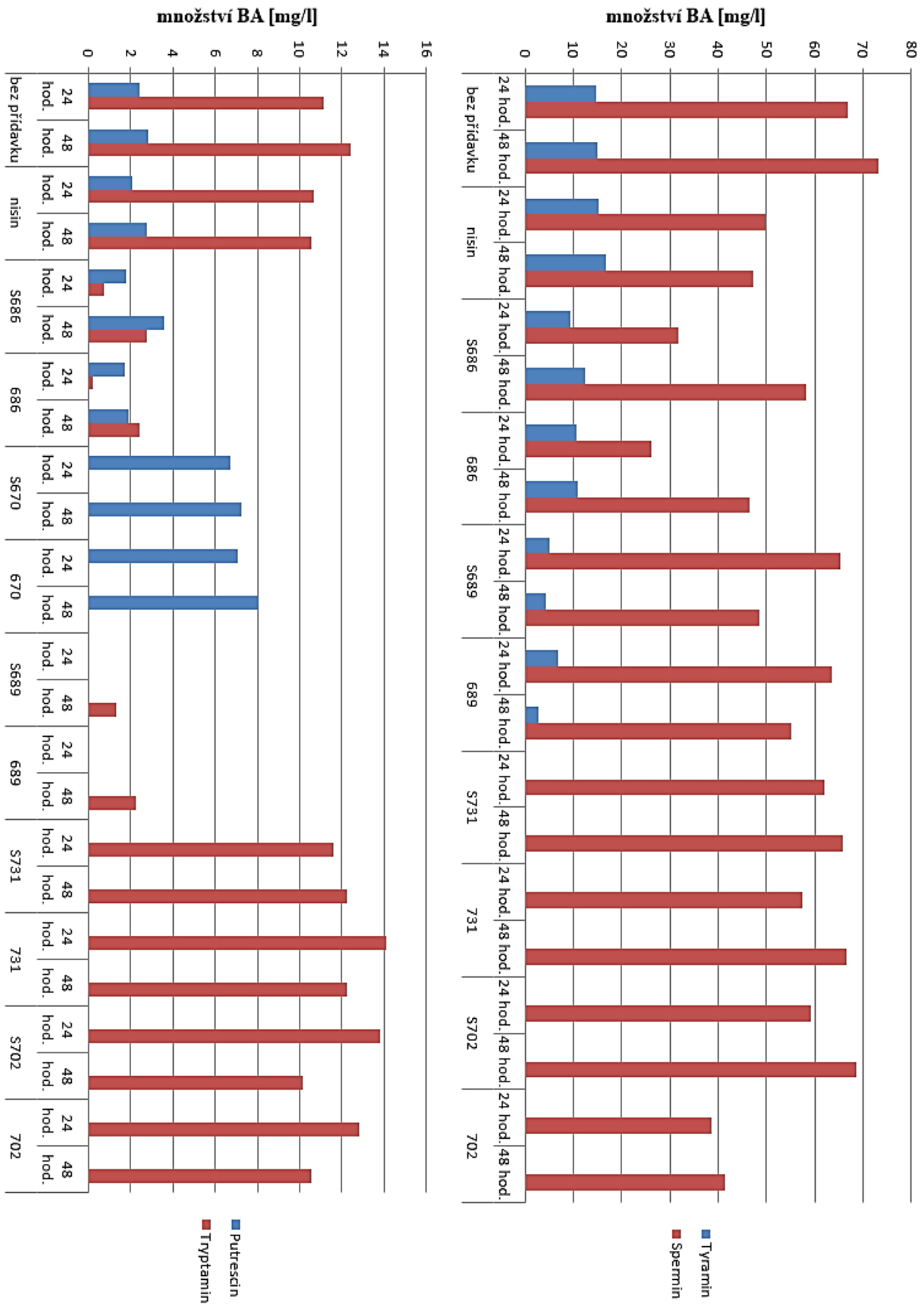
5.1 Vliv nisinu a protektivních bakterií na produkci biogenních aminů u kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T3

U sledovaného kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T3 byla pozorována produkce tyraminu, sperminu, putrescinu a tryptaminu. Produkované množství těchto biogenních aminů, s přidavkem nisinu a různých kmenů produkujících bakteriociny, je uvedeno na obrázku 6. U kontrolního média, bez přidavku nisinu nebo bakterií produkujících bakteriociny, byl po 24 hodinové kultivaci detekován tyramin v množství 14,7 mg/l a spermin v množství 66,8 mg/l. Po 48 hodinové kultivaci množství tyraminu vzrostlo o 2,2 % na 15,1 mg/l a množství sperminu o 9,7 % na hodnotu 73,3 mg/l. S přidavkem nisinu se snížil obsah sperminu, po 24 hodinové kultivaci byl obsah sperminu 49,9 mg/l (oproti kontrole snížen zhruba o čtvrtinu) a po 48 hodinové kultivaci 47,1 mg/l (oproti kontrole snížení na cca dvě třetiny). Obsah tyraminu se s přidavkem nisinu oproti kontrole výrazně nezměnil.

S přidavkem bakterií produkujících bakteriociny nebo jejich supernatantů došlo ve všech případech v kultivačním médiu k poklesu obsahu tyraminu i sperminu. S přidavkem supernatantu bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 686 (v obrázku 5 označeno jako S686) došlo po 24 hodinové kultivaci k poklesu tyraminu o 36,6 % a sperminu o 52,5 % oproti kontrole, po 48 hodinách kultivace došlo k poklesu tyraminu o 16,6 % a sperminu o cca pětinu. S přidavkem bakterie *L. lactis* CCDM 686 došlo k poklesu tyraminu po 24 hodinové kultivaci o 27,1 % a sperminu o 60,7 % oproti kontrole. Zároveň to byl největší zaznamenaný pokles sperminu produkovaného touto bakterií. Po 48 hodinové kultivaci se snížil obsah tyraminu o 28,3 % a obsah sperminu zhruba o třetinu. Největší pokles tyraminu byl detekován v bujónech po kultivaci s protektivní bakterií *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 689, a to o 82,1 % oproti kontrole. Spermin a tyramin nebyly vůbec detekovány v médiích po kultivaci produkčního kmene *Lb. curvatus* T3 s přidavkem protektivních kultur *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 670 a *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 71 a jejich supernatantů. Tyramin nebyl detekován také u vzorků s přidavkem supernatantu a kultury *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 731 (na obrázku 5 označeno jako S731 a 71) a *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 702 (na obrázku 5 označeno jako S702 a 702).

Produkce putrescinu byla u kontrolních vzorků bez přídavku bakteriocinu nebo protektivních kultur po 24 hodinové kultivaci 2,4 mg/l a tryptaminu 11,1 mg/l. Po 48 hodinové kultivaci došlo k navýšení putrescinu i tryptaminu (putrescinu o 17,9 % na hodnotu 2,8 mg/l a tryptaminu o 11,6 % na hodnotu 12,4 mg/l). S přídavkem nisinu došlo ke snížení obsahu putrescinu i tryptaminu oproti kontrole. Po 24 hodinách kultivace došlo ke snížení putrescinu o 13,3 % a snížení tryptaminu o 4,1 % oproti kontrole. Po 48 hodinách došlo ke snížení putrescinu o 2,5 % a snížení tryptaminu o 15,1 % oproti kontrole. S přídavkem supernatantu a kultury *L. lactis*. CCDM 686 došlo ke snížení vyprodukovaného tryptaminu u produkčního kmene *Lb. curvatus* T3 kultivovaného 24 hodin i 48 hodin. Obsah putrescin byl snížen u vzorků s přídavkem kultury v obou odběrových časech, také byl snížen u vzorků s přídavkem supernatantu po 24 hodinách, avšak po 48 hodinách kultivace došlo k navýšení oproti kontrole na hodnotu 3,6 mg/l. K navýšení obsahu putrescinu oproti kontrole došlo také u vzorků s přídavkem supernatantu a kultury *L. lactis*. CCDM 670 v obou časech. Naopak při přídavku dalších supernatantů a kultur (CCDM 689, CCDM 731, CCDM 71 a CCDM 702) putrescin nebyl detekován.

Tryptamin nebyl detekován, jestliže byl *Lb. curvatus* T3 kultivován s přídavkem kultur *L. lactis* CCDM 670 a *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 71 a jejich supernatantů. Tryptamin nebyl detekován také u vzorků kultivovaných 24 hodin s přídavkem supernatantu a kultury *L. lactis* CCDM 689. U vzorků kultivovaných 48 hodin byl obsah tryptaminu s přídavkem supernatantu této kultury výrazně snížen na hodnotu 1,3 mg/l, což je o 89,4 % méně oproti kontrole a s přídavkem kultury došlo po 48 hodinové kultivace rovněž k výraznému poklesu obsahu tohoto biogenního aminu (o 82,1 % oproti kontrole). K navýšení obsahu tryptaminu došlo u vzorků kultivovaných 24 hodin s přídavkem supernatantu *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 702 (o 29,9 % oproti kontrole) i s přídavkem samotné kultury (o 15,2 % oproti kontrole). Snížení bylo zaznamenáno až po 48 hodinové kultivaci, a to s přídavkem supernatantu o 18,4 % oproti kontrole a s přídavkem kultury o 14,9 %.

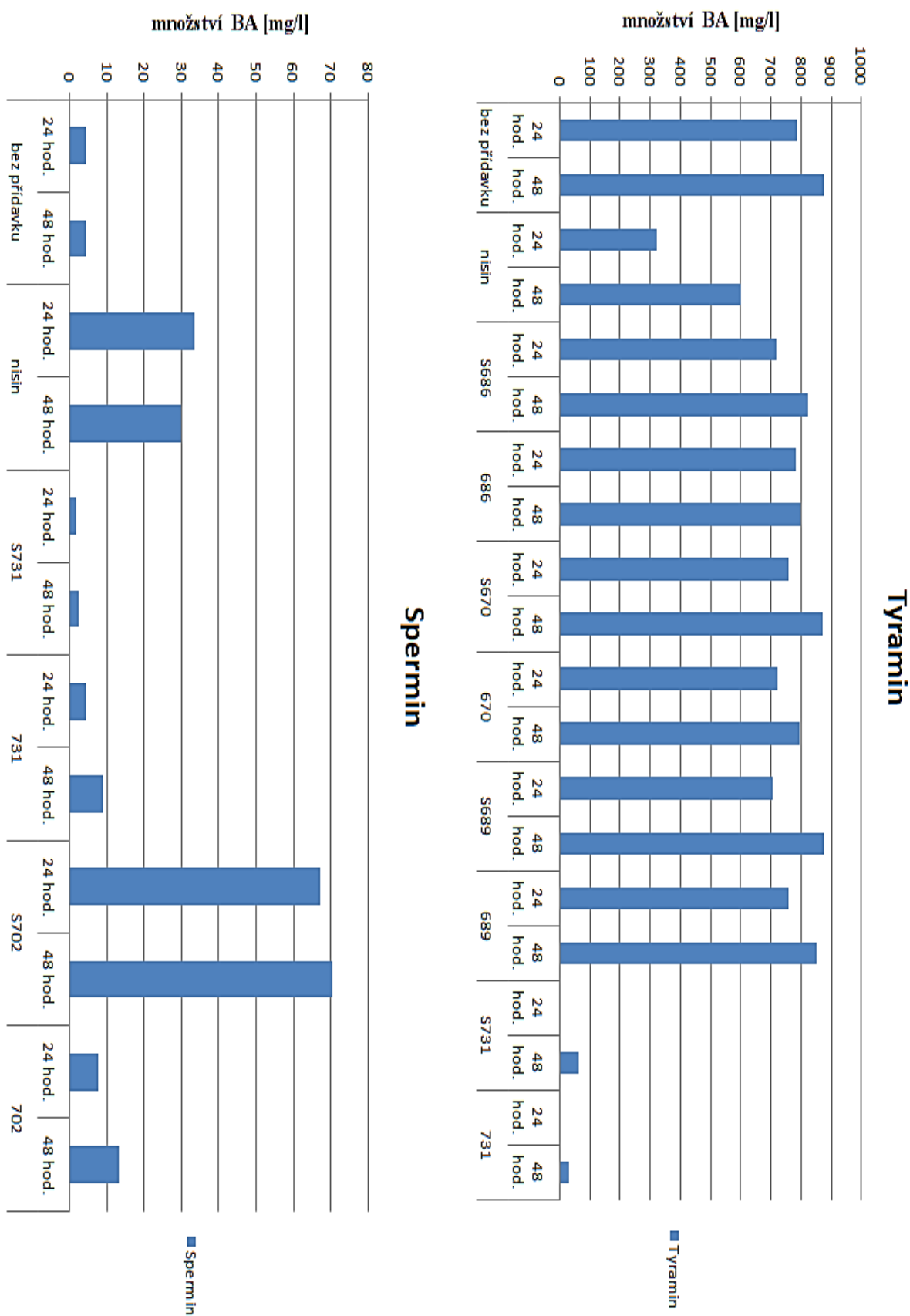


Obrázek 6 Produkce biogenních aminů u kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T3 v závislosti na přídavku nisinu a protektivních kultur

5.2 Vliv nisinu a protektivních bakterií na produkci biogenních aminů u kmene *Lactobacillus curvatus* T15

U sledovaného kmene *Lactobacillus curvatus* T15 byla pozorována produkce tyraminu a sperminu. Produkované množství těchto biogenních aminů, s přidavkem nisinu a různých kmenů produkujících bakteriociny, je uvedeno na obrázku 7. U kontrolního média, bez přidavku nisinu nebo bakterií produkujících bakteriociny, byl po 24 hodinové kultivaci detekován tyramin v množství 786,1 mg/l a spermin v množství 4,2 mg/l. Grafy na obrázku 6 jsou v odlišných měřítkách. Po 48 hodinové kultivaci množství tyraminu vzrostlo o 11,4 % na 875,9 mg/l a množství sperminu o 4,8 % na hodnotu 4,4 mg/l. S přidavkem nisinu se snížil obsah tyraminu (po 24 hodinové kultivaci o téměř 60 % a po 48 hodinové kultivaci o více než 30 %), ale výrazně vzrostl obsah sperminu.

S přidavkem bakterií produkujících bakteriociny nebo jejich supernatantů došlo ve všech případech v kultivačním médiu k poklesu obsahu tyraminu i sperminu s výjimkou přidavku supernatantu a kultury *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 702, kde bylo zaznamenáno zvýšení sperminu. Spermin nebyl detekován, jestliže byl *Lb. curvatus* T15 kultivován s přidavkem kultur *L. lactis*. CCDM 686, *L. lactis* CCDM 670, *L. lactis* CCDM 689 a *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 71 a jejich supernatantů. U kultivace *Lb. curvatus* T15 s přidavkem supernatantu a kultury *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 731 došlo k poklesu sperminu (u vzorků se supernatantem při 24 hodinové kultivaci o 55,7 %, po 48 hodinové kultivaci o 43,7 % a u vzorků s přidavkem kultury po 24 hodinové kultivaci o 53,3 %, po 48 hodinové kultivaci o 42,4 %). Tyramin nebyl detekován, jestliže byl *Lb. curvatus* T15 kultivován s přidavkem kultur *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 71 a *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 702. Během 24 hodinové kultivace *Lb. curvatus* T15 s přidavkem supernatantu a kultury *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 731 nebyl tyramin detekován, při 48 hodinové kultivaci došlo k poklesu u vzorků s přidavkem supernatantu o 92,6 % a u vzorků s přidavkem kultury o 96,5 % oproti kontrole. Při přidavku dalších supernatantů a kultur (CCDM 686, CCDM 670, CCDM 689) došlo k poklesu tyraminu o maximálně 10 %.



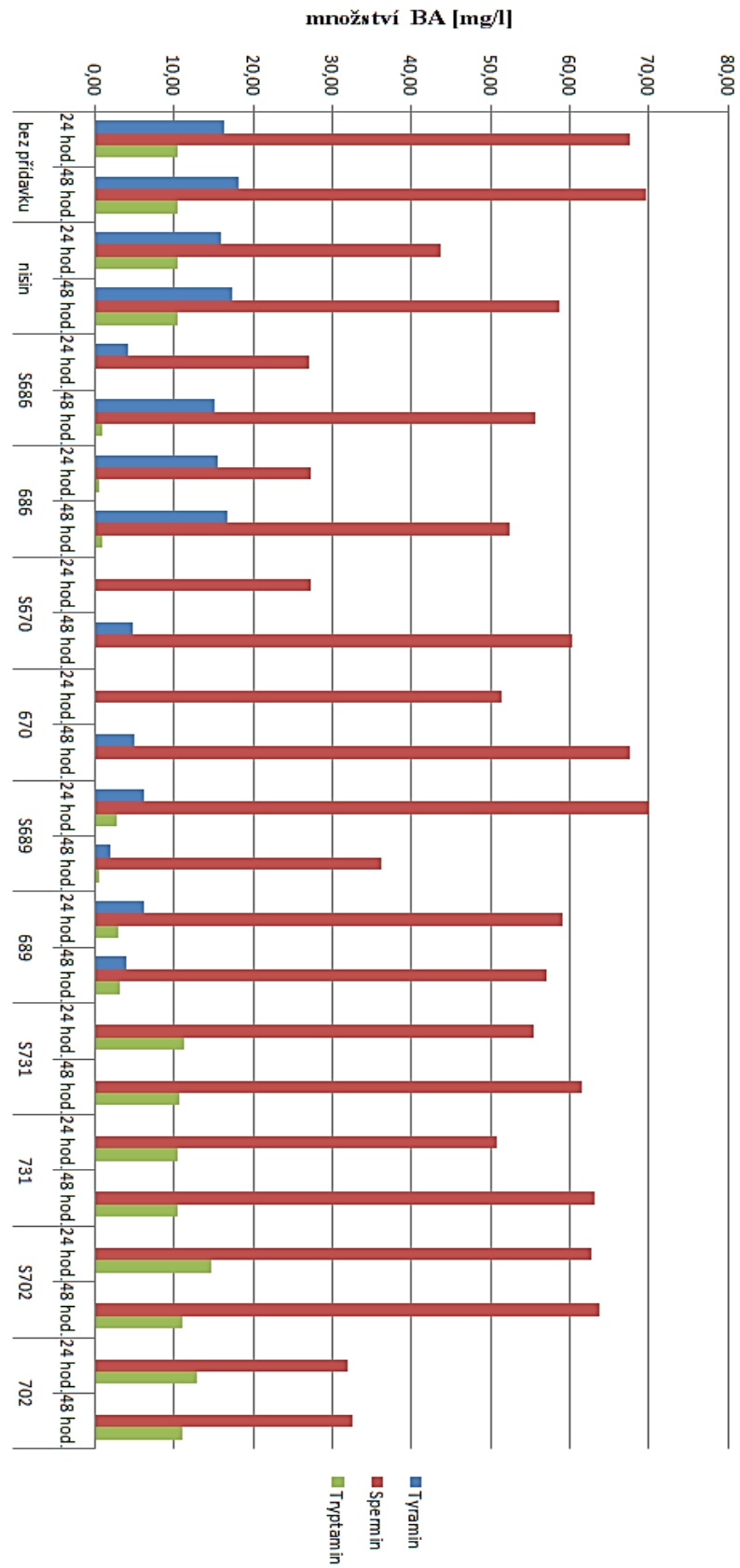
Obrázek 7 Produkce biogenních aminů u kmene *Lactobacillus curvatus* T15 v závislosti na přídavku nisinu a protektivních kultur

5.3 Vliv nisinu a protektivních bakterií na produkci biogenních aminů u kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T36

U kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T36 byla pozorována produkce tyraminu, sperminu a tryptaminu. Produkované množství těchto biogenních aminů, s přidavkem nisinu a různých kmenů produkujících bakteriociny, je uvedeno na obrázku 8. U kontrolního média, bez přidavku nisinu nebo bakterií produkujících bakteriociny, byl po 24 hodinové kultivaci detekován tyramin v množství 16,4 mg/l, spermin v množství 67,7 mg/l a tryptamin v množství 10,5 mg/l. Po 48 hodinové kultivaci množství tyraminu vzrostlo o 10,5 % na 18,1 mg/l, množství sperminu o 2,9 % na hodnotu 69,6 mg/l a množství tryptaminu o 0,2 % na 10,5 mg/l. S přidavkem nisinu se snížil obsah všech tří produkovaných biogenních aminů. Množství tyraminu se s přidavkem nisinu po 24 hodinové kultivaci snížilo oproti kontrole o 3,5 % na 15,8 mg/l a po 48 hodinové kultivaci o 4,7 % na 17,3 mg/l. Množství sperminu se s přidavkem nisinu po 24 hodinové kultivaci snížilo oproti kontrole o 35,5 % na 43,6 mg/l a po 48 hodinové kultivaci o 15,6 % na 58,7 mg/l. Množství tryptaminu se s přidavkem nisinu po 24 hodinové kultivaci snížilo minimálně, oproti kontrole o 0,5 % na 10,4 mg/l a po 48 hodinové kultivaci o 1,0 % na 10,3 mg/l.

S přidavkem bakterií produkujících bakteriociny nebo jejich supernatantů došlo ve všech případech v kultivačním médiu k poklesu obsahu tyraminu. Největší pokles množství tyraminu byl zaznamenán, jestliže byl *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* T36 kultivován s přidavkem kultur *L. lactis* CCDM 689 a *L. lactis* CCDM 670. U vzorků s přidavkem supernatantu kultury *L. lactis*. CCDM 689 došlo po 24 hodinové kultivaci k poklesu vyprodukovaného tyraminu o 62,7 % na 6,1 mg/l a po 48 hodinové kultivaci o 89,9 % na 1,8 mg/l. U vzorků s přidavkem kultury *L. lactis*. CCDM 689 po 24 hodinové kultivaci došlo k poklesu obsahu tyraminu o 62,9 % na 6,1 mg/l a po 48 hodinové kultivaci o 78,8 % na 3,8 mg/l. U vzorků kultivovaných 24 hodin s přidavkem kultury *L. lactis* CCDM 670 a jejího supernatantu tyramin nebyl detekován. Po 48 hodinové kultivaci s přidavkem supernatantu bylo množství tyraminu o 74,4 % nižší oproti kontrole, nižší množství tyraminu bylo také u vzorků s přidavkem kultury, a to o 72,5 %. Tyramin nebyl detekován, jestliže byl *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* T36 kultivován s přidavkem kultur *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 731, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 71, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 702 a jejich supernatantů (obrázek 7).

U vzorků s přidavkem bakterií produkujících bakteriociny nebo jejich supernatantů došlo také ve všech případech v kultivačním médiu k poklesu obsahu sperminu, pouze u vzorků kultivovaných 24 hodin s přidavkem supernatantu bakterie *L. lactis*. CCDM 689 došlo k mírnému zvýšení obsahu sperminu oproti kontrole. S přidavkem supernatantu bakterie *L. lactis*. CCDM 686 došlo po 24 hodinové kultivaci k poklesu sperminu o 60,1 %, tryptamin nebyl detekován, po 48 hodinách kultivace došlo k poklesu obsahu sperminu o 20,2 % a tryptaminu o 91,0 %. S přidavkem kultury *L. lactis*. CCDM 686 došlo po 24 hodinové kultivaci k poklesu množství vyprodukovaného sperminu o 59,8 %, tryptaminu o 95,6 % a po 48 hodinách kultivace došlo k poklesu sperminu o téměř čtvrtinu a tryptaminu o 91,6 %. S přidavkem supernatantu bakterie *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 731 došlo po 24 hodinové kultivaci k poklesu obsahu sperminu o 18,1 %, ale k mírnému navýšení množství tryptaminu (o 6,5 %), po 48 hodinách kultivace došlo k poklesu sperminu o 11,5 %, ale opět k mírnému zvýšení tryptaminu, a to o 1,1 %. S přidavkem kultury *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 731 došlo po 24 hodinové kultivaci k poklesu obsahu sperminu o 25,1 %, tryptaminu o 0,6 % a po 48 hodinách kultivace byl pozorován pokles množství sperminu o 9,4 % a tryptaminu o 0,3 %. Spermin a tryptamin nebyly detekovány, jestliže byl *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* T36 kultivován s přidavkem kultury *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 71 a jejího supernatantu. Tryptamin nebyl detekován ani při kultivaci za přidavku kultury *L. lactis* CCDM 670 a jejího supernatantu. Naopak se obsah tryptaminu zvyšoval, jestliže byl *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* T36 kultivován s přidavkem kultury *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 702, po 24 hodinové kultivaci se za přidavku supernatantu zvýšil obsah tryptaminu v kultivačním médiu o téměř 40 % a po 48 hodinové kultivaci o 4,7 % oproti kontrole, za přidavku kultury se po 24 hodinové kultivaci zvýšil obsah tryptaminu o 22,8 % a po 48 hodinové kultivaci o 4,9 %. Množství sperminu se snižovalo, jestliže byl *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* T36 kultivován s přidavkem kultury *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 702, po 24 hodinové kultivaci se za přidavku supernatantu snížil obsah sperminu o 7,3 % a po 48 hodinové kultivaci o 8,4 % oproti kontrole, za přidavku kultury se po 24 hodinové kultivaci snížil obsah sperminu o 52,8 % a po 48 hodinové kultivaci o 53,2 %.



Obrázek 8 Produkce biogenních aminů u kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T36 v závislosti na přídavku nisinu a protektivních kultur

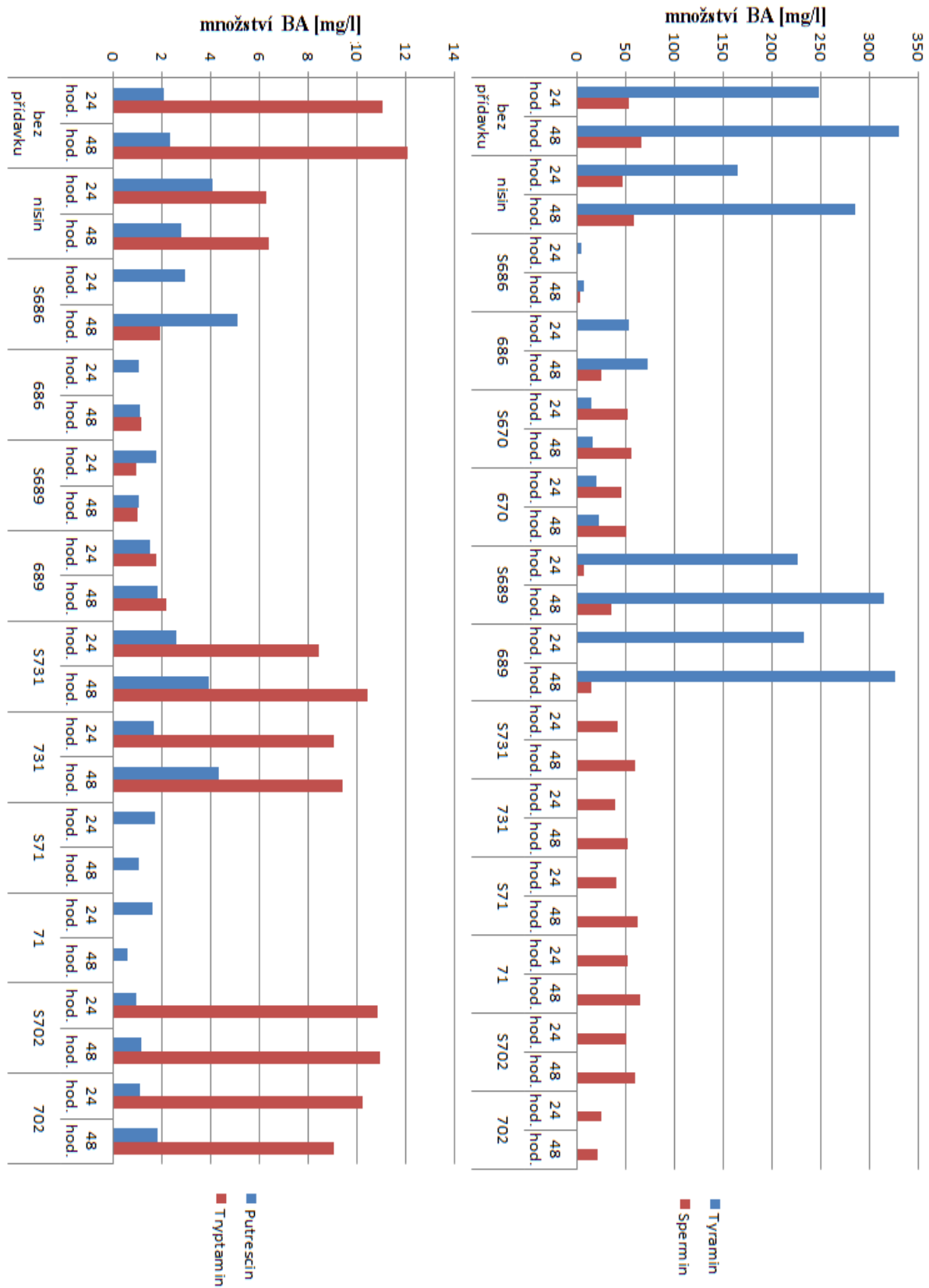
5.4 Vliv nisinu a protektivních bakterií na produkci biogenních aminů u kmene *Lactobacillus plantarum* P89

U sledovaného kmene *Lactobacillus plantarum* P89 byla pozorována produkce tyraminu, sperminu, putrescinu a tryptaminu. Produkovaná množství těchto biogenních aminů, s přidavkem nisinu a různých kmenů syntetizujících bakteriociny, jsou uvedena na obrázku 9. U kontrolního média, bez přidavku nisinu nebo bakterií produkujících bakteriociny, byl po 24 hodinové kultivaci detekován tyramin v množství 248,9 mg/l a spermin v množství 52,8 mg/l. Po 48 hodinové kultivaci množství tyraminu vzrostlo o cca třetinu na 331,1 mg/l a množství sperminu o cca třetinu na hodnotu 66,4 mg/l. S přidavkem nisinu se snížil obsah tyraminu i sperminu, po 24 hodinové kultivaci byl obsah tyraminu 164,7 mg/l (oproti kontrole snížen zhruba o třetinu) a po 48 hodinové kultivaci 285,9 mg/l (oproti kontrole snížení o 16,6 %). Obsah sperminu byl po 24 hodinové kultivaci 46,6 mg/l (oproti kontrole snížení o 11,8 %) a po 48 hodinové kultivaci 58,1 mg/l (oproti kontrole snížen o 12,6 %).

S přidavkem bakterií produkujících bakteriociny nebo jejich supernatantů došlo ve všech případech v kultivačním médiu k poklesu obsahu tyraminu i sperminu. S přidavkem supernatantu bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 686 (v obrázku 8 označeno jako S686) došlo po 24 hodinové kultivaci ke značnému poklesu vyprodukovaného tyraminu (o 98,1 % oproti kontrole), spermin nebyl detekován, po 48 hodinách kultivace došlo rovněž ke značnému poklesu obsahu tyraminu (o 98,1 %) a sperminu o 95,5 % oproti kontrole. S přidavkem bakterie *L. lactis* CCDM 686 došlo k poklesu množství tyraminu po 24 hodinové kultivaci o 78,4 % oproti kontrole, spermin nebyl detekován, po 48 hodinové kultivaci se snížil obsah tyraminu o 78,0 % a obsah sperminu o 61,8 % oproti kontrole. S přidavkem supernatantu bakterie *L. lactis* CCDM 670 (v obrázku 8 označeno jako S670) došlo po 24 hodinové kultivaci k poklesu tyraminu o 94,0 % a sperminu o 2,3 % oproti kontrole, po 48 hodinách kultivace došlo k výraznému poklesu obsahu tyraminu o 95,3 % a sperminu o 16,2 % oproti kontrole. S přidavkem bakterie *L. lactis* CCDM 686 došlo k poklesu tyraminu po 24 hodinové kultivaci o 92,2 % a sperminu o 14,0 % oproti kontrole, po 48 hodinové kultivaci se snížil obsah tyraminu o 93,3 % a obsah sperminu o 24,5 % oproti kontrole. Tyramin nebyl vůbec detekován v médiích po kultivaci produkčního kmene *Lactobacillus plantarum* P89 s přidavkem protektivních kultur *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 731, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 71, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 702 a jejich supernatantů.

U kontrolního média, bez přídavku nisinu nebo bakterií produkujících bakteriociny, byl po 24 hodinové kultivaci detekován putrescin v množství 2,1 mg/l a tryptamin v množství 11,0 mg/l. Po 48 hodinové kultivaci množství putrescinu vzrostlo o 14,1 % na 2,4 mg/l a množství tryptaminu o 9,7 % na hodnotu 12,1 mg/l. S přídavkem nisinu se snížil obsah tryptaminu, po 24 hodinové kultivaci byl obsah tryptaminu 6,3 mg/l (oproti kontrole snížen o 43,1 %) a po 48 hodinové kultivaci 6,4 mg/l (oproti kontrole snížení o 47,2 %). Obsah putrescinu byl po 24 hodinové kultivaci 4,1 mg/l (oproti kontrole zvýšení o 97,1 %) a po 48 hodinové kultivaci 2,8 mg/l (oproti kontrole zvýšení o 18,7 %).

S přídavkem supernatantu bakterie *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 686 došlo po 24 hodinové kultivaci k nárůstu obsahu putrescinu o 43,2 % oproti kontrole, tryptamin nebyl detekován, po 48 hodinách kultivace došlo ke zvýšení produkce putrescinu, a naopak ke snížení obsahu tryptaminu (o 84,1 % oproti kontrole). S přídavkem bakterie *L. lactis* CCDM 686 došlo k poklesu putrescinu po 24 hodinové kultivaci oproti kontrole téměř o polovinu, tryptamin nebyl detekován, po 48 hodinové kultivaci se snížil obsah putrescinu o 54,5 % a obsah tryptaminu o 90,7 % oproti kontrole. Putrescin a tryptamin nebyly detekovány v médiích po kultivaci produkčního kmene *Lb.plantarum* P89 s přídavkem protektivní kultury *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 670 a jejího supernatantu. Tryptamin nebyl detekován také u vzorků s přídavkem supernatantu a kultury *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 71, kde byla ale zjištěna produkce putrescinu. Po 24 hodinové kultivaci s přídavkem supernatantu byl obsah putrescinu 1,7 mg/l (snížení o 16,5 % oproti kontrole), po 48 hodinové kultivaci 1,0 mg/l (snížení o 56,3 % oproti kontrole). Po 24 hodinové kultivaci s přídavkem kultury byl obsah putrescinu 1,6 mg/l (snížení o cca čtvrtinu oproti kontrole), po 48 hodinové kultivaci byl obsah putrescinu na hranici detekčního limitu přístroje. U vzorků s přídavkem supernatantu kultury *L. lactis*. CCDM 689 došlo po 24 hodinové kultivaci k poklesu obsahu putrescinu o 15,1 % na 1,8 mg/l a tryptaminu o 91,5 % na 0,9 mg/l, po 48 hodinové kultivaci došlo k poklesu putrescinu o 56,4 % na 1,0 mg/l a tryptaminu o 91,9% na 0,9 mg/l. U vzorků s přídavkem kultury *L. lactis*. CCDM 689 po 24 hodinové kultivaci došlo k poklesu putrescinu o 27,0 % na 1,5 mg/l a tryptaminu o 83,9 % na 1,8 mg/l, u 48 hodinové kultivaci došlo k poklesu putrescinu o 22,0 % na 1,8 mg/l a tryptaminu o 82,1 % na 2,2 mg/l.



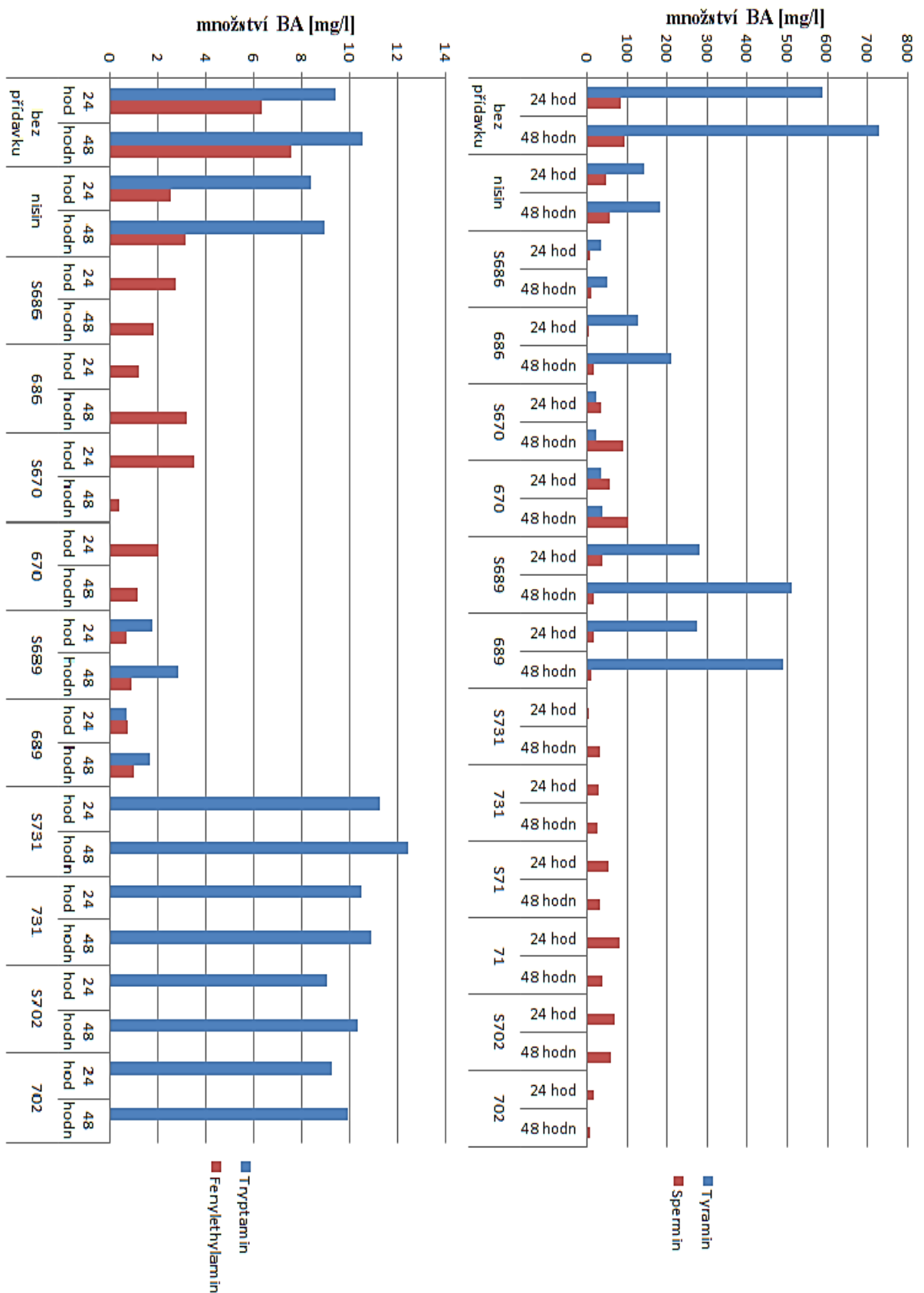
Obrázek 9 Produkce biogenních aminů u kmene *Lactobacillus plantarum* P89 v závislosti na přídavku nisinu a protektivních kultur

5.5 Vliv nisinu a protektivních bakterií na produkci biogenních aminů u kmene *Lactobacillus brevis* P93

U sledovaného kmene *Lactobacillus brevis* P93 byla pozorována produkce tyraminu, sperminu, tryptaminu a fenyetylaminu. Produkovaná množství těchto biogenních aminů, s přidavkem nisinu a různých kmenů produkujících bakteriociny, jsou uvedena na obrázku 10. U kontrolního média, bez přidavku nisinu nebo bakterií produkujících bakteriociny, byl po 24 hodinové kultivaci detekován tyramin v množství 588,5 mg/l a spermin v množství 82,9 mg/l. Po 48 hodinové kultivaci množství tyraminu vzrostlo o cca čtvrtinu na 727,9 mg/l a množství sperminu o 13,4 % na hodnotu 94,1 mg/l. S přidavkem nisinu se snížil obsah tyraminu i sperminu, po 24 hodinové kultivaci byl obsah tyraminu 143,5 mg/l (oproti kontrole snížení na čtvrtinu) a po 48 hodinové kultivaci 181,4 mg/l (oproti kontrole snížení o 75,1 %). Obsah sperminu byl po 24 hodinové kultivaci 46,5 mg/l (oproti kontrole snížení o 44,0 %) a po 48 hodinové kultivaci 57,1 mg/l (oproti kontrole snížen o 39,3 %).

S přidavkem supernatantu bakterie *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 686 došlo po 24 hodinové kultivaci ke snížení tyraminu o 94,3 % a sperminu o 91,5 % oproti kontrole, po 48 hodinách kultivace došlo ke snížení tyraminu o 93,1 % a sperminu o 90,1 % oproti kontrole. S přidavkem bakterie *L. lactis* CCDM 686 došlo k poklesu obsahu tyraminu po 24 hodinové kultivaci o 78,3 % a sperminu o 93,8 % oproti kontrole, po 48 hodinové kultivaci se snížil obsah tyraminu o 71,3 % a obsah sperminu o 81,3 % oproti kontrole. S přidavkem supernatantu bakterie *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 670 došlo po 24 hodinové kultivaci k výraznému snížení tyraminu (o 96,4 %) a sperminu o 58,8 % oproti kontrole, po 48 hodinách kultivace došlo k podobnému snížení tyraminu jako po 24 hodinové kultivaci (o 96,9 %) a sperminu o 3,7 % oproti kontrole. S přidavkem bakterie *L. lactis* CCDM 670 došlo k poklesu tyraminu po 24 hodinové kultivaci o 94,0 % a sperminu o 33,0 % oproti kontrole, po 48 hodinové kultivaci se snížil obsah tyraminu o 94,7 % a obsah sperminu se zvýšil o 9,9 % oproti kontrole. Tyramin nebyl detekován, jestliže byl *Lb. brevis* P93 kultivován s přidavkem kultur *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 731, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 71, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 702 a jejich supernatantů a množství vyprodukovaného sperminu bylo při kultivaci *Lb. brevis* P93 s těmito přidavky kultur a jejich supernatantů vždy sníženo. Největší snížení sperminu bylo zaznamenáno při 24 hodinové kultivaci *Lb. brevis* P93 s přidavkem supernatantu bakterie *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 731.

U kontrolního média, bez přídavku nisinu nebo bakterií produkujících bakteriociny, byl po 24 hodinové kultivaci detekován tryptamin v množství 9,4 mg/l a fenyletylamin v množství 6,4 mg/l. Po 48 hodinové kultivaci množství tryptaminu vzrostlo o 11,9 % na 10,6 mg/l a množství fenyletylaminu o 18,8 % na hodnotu 7,6 mg/l. S přídavkem nisinu se snížil obsah tryptaminu i fenyletylaminu, po 24 hodinové kultivaci byl obsah tryptaminu 8,4 mg/l (oproti kontrole snížen o 11,2 %) a po 48 hodinové kultivaci 8,9 mg/l (oproti kontrole snížení o 15,3 %). Obsah fenyletylaminu byl po 24 hodinové kultivaci 2,5 mg/l (oproti kontrole snížení o 60,5 %) a po 48 hodinové kultivaci 3,2 mg/l (oproti kontrole snížen o 58,3 %). Tryptamin nebyl detekován, jestliže byl *Lactobacillus brevis* P93 kultivován s přídavkem kultur *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* CCDM 686, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* CCDM 670, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 71 a jejich supernatantů. Fenyletylamin nebyl detekován, jestliže byl *Lb. brevis* P93 kultivován s přídavkem kultur *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 731, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 71, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 702 a jejich supernatantů. Významné snížení tryptaminu bylo zaznamenáno, jestli byl *Lb. brevis* P93 kultivován s přídavkem kultury *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* CCDM 689 a jejího supernatantu (o více než 70% oproti kontrole), menší snížení bylo zaznamenáno u vzorků s přídavkem kultury *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 702 a jejího supernatantu (o maximálně 6 % oproti kontrole). Naopak zvýšení tryptaminu bylo pozorováno, pokud byl *Lb. brevis* P93 kultivován s přídavkem kultury *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 731 a jejího supernatantu. S přídavkem bakterií produkujících bakteriociny nebo jejich supernatantů došlo ve všech případech v kultivačním médiu k poklesu obsahu fenyletylaminu. Největší pokles byl zaznamenán u vzorků s přídavkem kultury *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* CCDM 689 a jejího supernatantu, kdy došlo po 24 hodinové kultivaci vzorků s přídavkem supernatantu ke snížení obsahu fenyletylaminu o 88,9 % oproti kontrole, po 48 hodinách kultivace o 88,2 % oproti kontrole. S přídavkem kultury došlo k poklesu fenyletylaminu po 24 hodinové kultivaci o 88,8 % oproti kontrole, po 48 hodinové kultivaci o 86,8 % oproti kontrole.



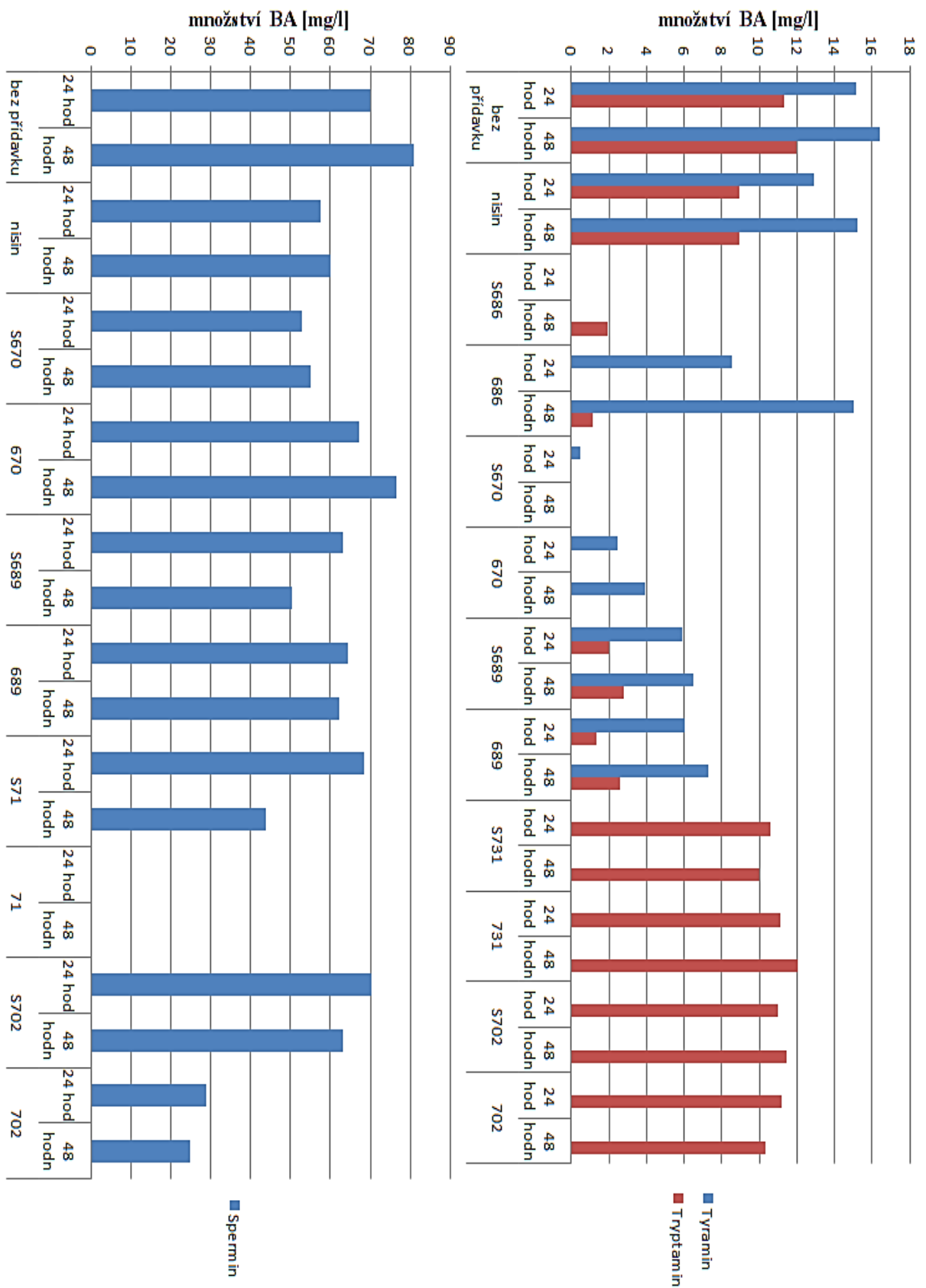
Obrázek 10 Produkce biogenních aminů u kmene *Lactobacillus brevis* P93 v závislosti na přídavku nisinu a protektivních kultur

5.6 Vliv nisinu a protektivních bakterií na produkci biogenních aminů u kmene *Lactobacillus plantarum* P96

U sledovaného kmene *Lactobacillus plantarum* P96 byla pozorována produkce tyraminu, sperminu a tryptaminu. Produkovaná množství těchto biogenních aminů, s přidavkem nisinu a různých kmenů produkujících bakteriociny, jsou uvedena na obrázku 11. U kontrolního média, bez přidavku nisinu nebo bakterií produkujících bakteriociny, byl po 24 hodinové kultivaci detekován tyramin v množství 15,2 mg/l, spermin v množství 70,6 mg/l a tryptamin v množství 11,3 mg/l. Po 48 hodinové kultivaci množství tyraminu vzrostlo o 7,9 % na 16,4 mg/l, množství sperminu o 15,5 % na hodnotu 80,9 mg/l a množství tryptaminu o 5,7 % na 11,9 mg/l. S přidavkem nisinu se oproti kontrole snížil obsah všech tří produkovaných biogenních aminů. Množství tyraminu se s přidavkem nisinu po 24 hodinové kultivaci snížilo oproti kontrole o 14,9 % na 12,9 mg/l a po 48 hodinové kultivaci o 7,1% na 15,2 mg/l. Množství sperminu se s přidavkem nisinu po 24 hodinové kultivaci snížilo oproti kontrole o 17,7 % na 57,6 mg/l a po 48 hodinové kultivaci o 25,8 % na 60,1 mg/l. Množství tryptaminu se s přidavkem nisinu po 24 hodinové kultivaci snížilo oproti kontrole o 21,1% na 8,9 mg/l a po 48 hodinové kultivaci zhruba o čtvrtinu na 8,9 mg/l.

Tyramin nebyl detekován, jestliže byl *Lactobacillus plantarum* P96 kultivován s přidavkem kultur *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 731, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 71, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 702 a jejich supernatantů a také s přidavkem supernatantu bakterie *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 686 v obou časech. Při kultivaci s kulturou *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 686 byl obsah tyraminu snížen při 24 hodinové kultivaci o 43,5 % a po 48 hodinové kultivaci o 8,4 % oproti kontrole. Tryptamin nebyl detekován, jestliže byl *Lb. plantarum* P96 kultivován s přidavkem kultur *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 670 a *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 71 a jejich supernatantů a spermin nebyl detekován u vzorků s přidavkem kultury *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 686 a jejího supernatantu a kultury *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 71. Největší pokles tyraminu byl zaznamenán u vzorků s přidavkem kultury *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 670 a jejího supernatantu, kdy po 24 hodinové kultivaci vzorků s přidavkem kultury došlo k výraznému poklesu obsahu tyraminu (o 96,6 % na hodnotu 0,5 mg/l) a po 48 hodinové kultivaci nebyl tyramin detekován. U vzorků s přidavkem supernatantu došlo k poklesu po 24 hodinové kultivaci

o 83,9 % na hodnotu 2,4 mg/l a po 48 hodinové kultivaci o 76,2 % na hodnotu 3,9 mg/l. Největší pokles tryptaminu byl zaznamenán, jestliže byl *Lb. plantarum* P96 kultivován s přidavkem kultury *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 686 a jejího supernatantu. Při 24 hodinové kultivaci vzorků s přidavkem supernatantu nebyl tryptamin detekován vůbec a při 48 hodinové kultivaci bylo zaznamenáno snížení o 83,9 % oproti kontrole na hodnotu 1,9 mg/l. Při 24 hodinové kultivaci vzorků s přidavkem kultury nebyl tryptamin opět detekován a při 48 hodinové kultivaci bylo zaznamenáno snížení o 90,5 % oproti kontrole na hodnotu 1,1 mg/l. Nejmenší pokles tryptaminu byl zaznamenán, jestliže byl *Lb. plantarum* P96 kultivován s přidavkem kultury *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 702 a jejího supernatantu. Při 24 hodinové kultivaci vzorků s přidavkem supernatantu byl tryptamin snížen pouze o 2,8 % oproti kontrole na hodnotu 11,00 mg/l a po 48 hodinové kultivaci o 4,5 % oproti kontrole na hodnotu 11,4 mg/l. Při 24 hodinové kultivaci vzorků s přidavkem kultury byl obsah tryptaminu snížen o 1,1 % oproti kontrole na hodnotu 11,2 mg/l a po 48 hodinové kultivaci o 13,7 % oproti kontrole na hodnotu 10,3 mg/l. S přidavkem bakterií produkujících bakteriociny nebo jejich supernatantů také došlo ve všech případech v kultivačním médiu k poklesu obsahu sperminu. Největší pokles sperminu byl zaznamenán, jestliže byl *Lb. plantarum* P96 kultivován s přidavkem kultury *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 731, v obou časech s přidavkem kultury i jejího supernatantu došlo k poklesu sperminu vždy o více než 99 %. Jestliže byl *Lb. plantarum* P96 kultivován s přidavkem supernatantu bakterie *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 689, došlo k poklesu obsahu sperminu po 24 hodinové kultivaci o 9,9 % oproti kontrole na hodnotu 63,1 mg/l, po 48 hodinové kultivaci o 37,6 % na hodnotu 50,5 mg/l a u vzorků kultivovaných 24 hodin s přidavkem samotné kultury o 8,3 % na hodnotu 64,2 mg/l, u 48 hodinové kultivace o 23,3 % na hodnotu 62,1 mg/l.



Obrázek 11 Produkce biogenních aminů u kmene *Lactobacillus plantarum* P96 v závislosti na přidavku nisinu a protektivních kultur

5.7 Diskuze

Detekcí dekarboxyláza-pozitivních mikroorganismů se zabývá mnoho studií. Produkce biogenních aminů je spojena s grampozitivními i gramnegativními bakteriemi a kvasinkami, často jsou producenti biogenních aminů bakterie mléčného kvašení (kmeny z rodů *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, atd.). Obvyklými producenty biogenních aminů jsou také gramnegativní bakterie kontaminující potraviny (z čeledi *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonas* spp.) V potravinách jsou biogenní aminy tvořeny z volných aminokyselin především díky dekarboxylázové aktivitě mikroorganismů. Přítomnost těchto dekarboxyláza-pozitivních mikroorganismů v potravinách je značným bezpečnostním problémem. Nízké koncentrace biogenních aminů nemají negativní vliv na lidský organizmus, protože jsou organizmem snadno metabolizovány, problém nastává při příjmu vyšších koncentrací v důsledku nekontrolovatelného růstu mikroorganismů v potravinách. Navíc detoxikace biogenních aminů je u lidského organismu značně individuální, její snížená schopnost může být způsobena mnoha faktory, mezi které patří například užívání některých léků (antihistamika, antidepresiva) nebo příjem alkoholu současně s vyšší koncentrací biogenních aminů [43, 44].

Na druhou stranu se už několik studií zabývá mikroorganismy, které jsou schopny degradovat biogenní aminy pomocí enzymu aminooxidázy, který vytvářejí. Mikroorganismy jsou schopné oxidovat biogenní aminy na aldehyd, peroxid vodíku a amoniak. Tyto produkty mohou být využity jako zdroj uhlíku nebo dusíku. Některé kmeny bakterií mléčného kvašení (např. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus acidilactici*), aktinobakterie (*Brevibacterium linens*, *Rhodococcus* spp., *Arthrobacter* spp.), archaea (*Na-trinema gari*, *Methanosarcina barkery*) nebo houby (*Candida* spp., *Penicillium citrinum*, *Alternaria* spp., *Phoma* spp.) jsou schopny degradovat histamin a tyramin, některé z nich mají také schopnost degradovat putrescin. Histamin a tyramin, stejně tak jako putrescin a kadaverin, mohou být degradovány koaguláza-negativními stafylokoky (např. *St. carnosus* nebo *St. xylosus*), jinými koky (*Kocuria varians*, *Micrococcus luteus*) nebo bacily (*B. polymyxa*, *B. subtilis*, *B. idriensis*). Mikroorganismy, které jsou schopny degradovat biogenní aminy, mohou produkovat histaminoxidázu, putrescinoxidázu, tyraminioxidázu metylaminoxidázu nebo monoaminooxidázu. Mikroorganismy, které jsou schopny degradace biogenních aminů, lze do potravin přidávat v průběhu zpracování nebo jako startérové kul-

tury ve fermentovaných potravinách, a tím snížit nebo úplně eliminovat biogenní aminy [45, 46].

Možnostem degradace biogenních aminů v potravinách by mělo být věnováno více pozornosti. Pouze několik prací se zabývá kontrolou biogenních aminů za pomoci nejrozličnějších mechanismů: inhibicí nebo snížením amin produkujících bakterií s použitím přírodních antimikrobiálních látek nebo jiných potravinářských aditiv a konzervačních látek, přidávkem mikroorganismů, které biogenní aminy využívají (degradují), aplikací specifických enzymů, omezením dostupnosti aminokyselin jako prekurzorů pro biogenní aminy, anebo použitím fyzikálních metod (hydrostatický tlak, záření) [47, 48].

V této práci byl sledován vliv nisinu a protektivních kultur na produkci biogenních aminů u 6 mikroorganismů rodu *Lactobacillus*, které byly izolovány z piva a přírodních sýrů.

Ze získaných výsledků je patrné, že všechny testované kmeny produkovaly tyramin a spermin v různém množství a s výjimkou kmene *Lactobacillus curvatus* T15 produkovaly všechny kmeny také tryptamin. U kmenů *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* T3 a *Lb. plantarum* P89 byla také, v malém množství oproti množství ostatních biogenních aminů, zaznamenána produkce putrescinu a u kmene *Lb. brevis* P93 byla zaznamenána i produkce fenyletylaminu. Největší množství tyraminu v případě kontrolních vzorků (kultivace bez přídavku nisinu nebo protektivní kultury) produkoval kmen *Lb. curvatus* T36. Naopak nejmenší množství tyraminu bylo detekováno u kmene *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* T3, rozdíl v produkci tyraminu u těchto dvou kmenů činil cca o 700 mg/l. Produkce sperminu se pohybovala u všech kmenů řádově v desítkách mg/l. Největší množství sperminu bylo detekováno v médiu po kultivaci bez přídavku nisinu nebo protektivní kultury u kmene *Lactobacillus brevis* P93, naopak nejmenší množství sperminu bylo zaznamenáno během kultivace kmene *Lactobacillus curvatus* T15. Z grafů na obrázcích ve výsledkové části práce je rovněž patrné, že po 48 hodinové kultivaci byl obsah všech detekovaných biogenních aminů vyšší než po 24 hodinové kultivaci. Nárůst množství vyprodukovaných aminů po 48 hodinové kultivaci byl oproti jednodenní kultivaci u všech biogenních aminů max. 30%.

S přidávkem nisinu docházelo zpravidla k poklesu produkce biogenních aminů oproti kontrole, což je v souladu se studií Tabanelli et al. [47], kteří rovněž zjistili nižší produkci bio-

genních aminů, pokud byl bakteriím produkujícím biogenní aminy aplikován bakteriocin. Největší pokles tyraminu byl zaznamenán v naší studii u vzorků s přidavkem nisinu u kmene *Lb. brevis* P93, pokles oproti kontrole v obou sledovaných časech byl cca 75%. Naopak mírné navýšení obsahu tyraminu bylo pozorováno u kmene *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* T3, v obou časech do 10 % oproti kontrole. Největší pokles sperminu u vzorků s přidavkem nisinu byl zaznamenán také u kmene *Lb. brevis* P93, pokles oproti kontrole byl po jednodenní i dvoudenní kultivaci o cca 40 %. Naopak značný nárůst sperminu byl pozorován u kmene *Lb. curvatus* T15. Největší pokles tryptaminu u vzorků s přidavkem nisinu byl zaznamenán u kmene *Lb. plantarum* P89, a to oproti kontrole o cca 45 % v obou odběrových časech. Množství vyprodukovaného putrescinu bylo sníženo u vzorků s přidavkem nisinu u kmene *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* T3 v obou sledovaných časech, ale mírně navýšen u kmene *Lactobacillus plantarum* P89. U kmene *Lb. brevis* P93, který jako jediný produkoval fenyletylamin, došlo po přidavku nisinu do kultivačního média ke snížení produkce tohoto biogenního aminu. Z výsledků je patrné, že délka kultivace laktobacilů v médiu s přidavkem nisinu neměla významnější vliv na snížení produkce biogenních aminů. Nisin byl do média přidán v koncentraci, která zcela neinhibovala bakterie produkující biogenní aminy, pouze jejich růst zpomalovala. Od počátku kultivace tak byly bakterie pravděpodobně vystaveny stresovým podmínkám, v důsledku kterých byl omezen jejich růst, metabolismus a také produkce biogenních aminů.

Protektivní kultura *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 686 a její supernatant snižovala produkci biogenních aminů oproti kontrole u všech testovaných kmenů s výjimkou putrescinu. Největší snížení biogenních aminů bylo zaznamenáno, jestliže byl kmen *Lactobacillus plantarum* P96 kultivován právě se supernatantem kultury *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 686. V tomto případě tyramin a spermin v obou časech a tryptamin u vzorků kultivovaných 24 hodin nebyly vůbec detekovány, u vzorků kultivovaných 48 hodin byl tryptamin snížen o cca 83 % oproti kontrole. K podobnému snížení sperminu a tryptaminu došlo, jestliže byl kmen *Lb. plantarum* P96 kultivován s přidavkem kultury *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 686.

S výjimkou putrescinu, produkovaného bakterií *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* T3, kde byl pozorován nárůst oproti kontrole, protektivní kultura *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 670 a její supernatant snižovala produkci biogenních aminů oproti kontrole u všech testovaných kmenů. Tyramin nebyl detekován vůbec, anebo došlo

k poklesu oproti kontrole o více než 90 %, výjimkou byla bakterie *Lb. curvatus* T15, kde pokles oproti kontrole činil max. 10 %. Jestliže byl do kultivačního média aplikován bakteriocin-produkující kmen *L. lactis* CCDM 670, nebyl u kmenů *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* T3 a *Lb. curvatus* T15 detekován spermin, u ostatních kmenů nebylo snížení tohoto aminu tak výrazné.

Díky přidavku protektivní kultury *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 689 a jejího supernatantu došlo ke snížení produkce všech biogenních aminů u všech testovaných kmenů. Největší snížení obsahu tyraminu bylo pozorováno díky přidavku kultury *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 689 a jejího supernatantu k bakterii *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* T36. Pokles množství tyraminu u vzorků s přidavkem supernatantu byl velmi podobný poklesu tyraminu u vzorků s přidavkem samotné kultury. S prodlužující se dobou kultivace koncentrace tyraminu ještě více klesala, tento trend byl pozorován i u snižování obsahu sperminu a putrescinu. Snížení fenyletylaminu bylo oproti kontrole vždy o cca 88 %, nebyla pozorována změna v čase ani změna při použití inhibiční kultury, tj. životaschopných buněk, či pouze příslušného supernatantu.

Po aplikaci protektivní kultury *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 731 a jejího supernatantu byla produkce tyraminu úplně inhibována u všech testovaných kultur s výjimkou 48 hodinové kultivace bakterie *Lb. curvatus* T15, kde však došlo ke snížení obsahu tohoto biogenního aminu o více než 90 %. Největší snížení produkce sperminu za přidavku kultury *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 731 a jejího supernatantu bylo zjištěno u kmene *Lactobacillus plantarum* P96, ve všech případech byl pokles větší než 99 %. Naopak ve většině případů došlo k nárůstu obsahu tryptaminu a to až o 26 % oproti kontrole. Nicméně detekovaná množství tryptaminu byla poměrně nízká, v mnohých případech nelze zcela vyloučit, že se jedná o chybu stanovení.

Při přidavku protektivní kultury *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 71 došlo k úplné inhibici produkce všech biogenních aminů u vzorků s kulturami *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* T3, *Lb. curvatus* T15 a *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* T36, k úplné inhibici tyraminu a tryptaminu u vzorků s kulturami *Lb. plantarum* P96, *Lb. brevis* P93 a *Lb. plantarum* P89 a k úplné inhibici fenyletylaminu u kmene *Lactobacillus brevis* P93. Obsah sperminu i putrescinu produkovaných kulturou *Lb. plantarum* P89 byl snížen díky přidavku protektivní kultury *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 71, spermin maximálně o 24 % a putrescin maximálně o 77 %. S prodlužující se dobou kultivace docházelo k většímu poklesu vyprodu-

kovaných aminů a samotná kultura byla ke snížení účinnější než její supernatant. Tento jev může být způsoben tím, že protektivní kmen produkoval bakteriocin ve vyšší koncentraci, než byla v samotném supernatantu. Navíc s prodlužující se dobou kultivace se pravděpodobně také zvyšovalo množství vyprodukovaného bakteriocinu.

Díky přidavku protektivní kultury *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 702 a jejího supernatantu došlo v médiu po kultivaci bakterií produkujících biogenní aminy k úplnému snížení obsahu tyraminu u všech testovaných kultur a k úplnému snížení obsahu fenyletylaminu produkovaného bakterií *Lactobacillus brevis* P93. U všech testovaných kultur došlo také ke snížení vyprodukovaného sperminu s výjimkou bakterie *Lb. curvatus* T15. Navýšení bylo pozorováno také u obsahu tryptaminu produkovaného bakterií *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T36. Obsah ostatních biogenních aminů u testovaných mikroorganismů se snižoval. Větší změna byla zaznamenána při použití samotné kultury, což ukazuje na to, že tato protektivní kultura působila na produkční kmene obdobným způsobem jako kultura *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 71.

Obecně lze říci, že přídavek nisinu nebo inhibičního kmene či jeho supernatantu má vliv na snížení produkce biogenních aminů. Záleží ale na konkrétním biogenním aminu a také, zda je použita inhibiční kultura nebo jen příslušný supernatant. Snížení obsahu biogenních aminů pomocí inhibiční kultury může mít několik důvodů. Inhibiční kultura může produkovat dostatečné množství nisinu, který má pozitivní vliv na snížení bakteriální populace, a tím i vyprodukovaných biogenních aminů. Dalším důvodem může být dispozice inhibičního kmene amin-oxidázou, která degraduje biogenní aminy.

Cappozzi et. al. [45] se zabývali studií degradace biogenních aminů *in vitro* za použití kmene *Lactobacillus plantarum* ve vínu. V této studii bylo analyzováno 26 kmenů *Lactobacillus plantarum* pro svou schopnost degradovat biogenní aminy běžně se vyskytující v průběhu kvašení vína. Zkumavky s MRS bujónem, obohaceným příslušnými aminokyselinami jako prekurzory biogenních aminů, byly zaočkovány degradačními kmeny *Lactobacillus plantarum* a ponechány 24 hodinové kultivaci. Obsah biogenních aminů byl stanoven pomocí HPLC. Dva kmene izolátů z červeného vína *Lb. plantarum* degradovaly putrescin a tyramin. Byl také potvrzen důkaz o tom, že schopnost degradovat biogenní aminy je specifická pro určitý druh i kmen [45].

Bover-Cid et. al. [41] prokázali snížení množství putrescinu, kadaverinu a tyraminu ve španělských salámech s použitím směsi startovacích kultur (*Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus carnosus* a *Staphylococcus xylosus*). Za použití této kultury složené z laktobacilů a koaguláza-negativních stafylokoků došlo k poklesu obsahu těchto biogenních aminů až o 90%. Snížení obsahu tyraminu, kadaverinu a histaminu za použití amin-negativní směsi složené ze stejných rodů bakterií (*Stafylococcus* a *Lactobacillus*) v salámech také pozorovali Maijala et. al. [41].

Wu et. al. [49] prokázali snížení obsahu biogenních aminů při výrobě kysaného zelí za použití kultur *Lactobacillus plantarum* a *Zygosacharomyces rouxii*. Snížená produkce biogenních aminů byla sledována na rozdíl množství biogenních aminů u kvašeného zelí bez přídavku kultur a u zelí s přídavkem výše uvedených kultur. Obsah biogenních aminů byl sledován po celou dobu výroby zelí. Po 8 dnech fermentace byla úroveň putrescinu 13x nižší než u spontánní fermentace bez přídavku kultur. Podobné výsledky byly získány i v případě kadaverinu a tyraminu [49].

ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na sledování vlivu bakteriocinů a bakterií tvořících bakteriociny na produkci biogenních aminů u mikroorganismů rodu *Lactobacillus* izolovaných z potravin (sýrů a piva).

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že:

- množství detekovaných BA bylo nižší u kontrolních vzorků (bez přídavku nisinu nebo protektivní kultury) odebraných 24h od začátku kultivace než u vzorků odebraných 48h od počátku kultivace,
- citlivost vůči působení nisinu a inhibiční kultury byla rozdílná v rámci druhu i kmene,
- přídavek nisinu nebo bakterií produkujících bakteriociny ve většině případů snižoval produkci BA oproti kontrole,
- všechny testované kmeny produkovaly tyramin a spermin,
- všechny testované kmeny s výjimkou kmene *Lactobacillus curvatus* T15 produkovaly také tryptamin,
- kmeny *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T3 a *Lb. plantarum* P89 produkovaly putrescin,
- časové intervaly odběrů u vzorků s přídavkem nisinu nebo bakterií produkujících bakteriociny neměly jednoznačný vliv na obsah biogenních aminů,
- přídavek kultury *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 71 měl největší inhibiční účinek na produkci sledovaných biogenních aminů,
- největší obsah tyraminu byl detekován u kontrolních vzorků kmene *Lactobacillus curvatus* T15 po 48 hodinové kultivaci v množství 875,95 mg/l,
- největší obsah sperminu byl detekován u kontrolních vzorků kmene *Lactobacillus brevis* P93 po 48 hodinové kultivaci v množství 94,10 mg/l,
- největší obsah tryptaminu byl detekován u kontrolních vzorků kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T3 po 48 hodinové kultivaci v množství 12,42 mg/l,
- u kmene *Lactobacillus brevis* P93 byla detekována produkce fenyletylaminu v maximálním množství 7,56 mg/l (kontrolní vzorky po 48 hodinové kultivaci).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] WUNDERLICOVÁ, Leona, Leona BUŇKOVÁ, Marek KOUTNÝ, Tomáš VALENTA a František BUŇKA. Novel touchdown-PCR method for the detection of putrescine producing Gram-negative bacteria in food products. *Food Microbiology*. 2013, **34**(2), 268-276. DOI: 10.1016/j.fm.2012.09.024. ISSN 07400020.
- [3] ADAMS, Martin R. *Fermentation and food safety*. Gaithersburg, Md: Aspen Publishers, 2001. ISBN 9780306482960.
- [4] HALÁSZ, Anna, Ágnes BARÁTH, Livia SIMON-SARKADI a Wilhelm HOLZAPFEL. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science*. 1994, **5**(2): 42-49. DOI: 10.1016/0924-2244(94)90070-1. ISSN 09242244.
- [5] ROMANO, Victor, Victor LADERO, Miguel A. ALVAREZ a Patrick M. LUCAS. Putrescine production via the ornithine decarboxylation pathway improves the acid stress survival of *Lactobacillus brevis* and is part of a horizontally transferred acid resistance locus. *International Journal of Food Microbiology*. 2014, **175**: 14-19. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.009. ISSN 01681605.
- [6] KOMPRDA, Tomáš. *Obecná hygiena potravin*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004. ISBN 80-7157-757-X.
- [7] NUÑEZ, M., A. DEL OLMO a J. CALZADA. Biogenic Amines. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, 2016, s. 416. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00070-2. ISBN 9780123849533.
- [8] TOFALO, R., G. PERPETUINI, M. SCHIRONE a G. SUZZI. Biogenic Amines: Toxicology and Health Effect. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, 2016, s. 424. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00071-4. ISBN 9780123849533.
- [9] SMAGIN, Gennady N., Dekun SONG, David P. BUDAC, Jessica A. WALLER, Yan LI, Alan L. PEHRSON a Connie SÁNCHEZ. Histamine may contribute to vortioxetine's procognitive effects; possibly through an orexigenic mechanism. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2016, **68**, 25-30. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2016.03.001. ISSN 02785846.
- [10] YANG, Shan-Shan, Ya-Nan YANG, Xue-Lin LI a Yan ZHANG. Determination of Biogenic Amines in Cheese by On-line Solid Phase Extraction Coupled with Capillary

High Performance Liquid Chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 2016, **44**(3), 396-402 [cit. 2016-04-30]. DOI: 10.1016/S1872-2040(16)60915-5. ISSN 18722040.

[11] LEROY, F. a L. DE VUYST. Fermented Foods: Fermented Meat Products. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, 2016, s. 656. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00283-X. ISBN 9780123849533.

[12] KALACĚ, Pavel a Martin KRĚŽEK. Biogenní aminy a polyaminy v potravinách a jejich vliv na lidské zdraví. *Potravinářská revue*, 2005, 2, 40-42.

[13] LEROY, F. a L. DE VUYST. Fermented Foods: Fermented Meat Products. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, 2016, s. 656. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00283-X. ISBN 9780123849533.

[14] YANG, Shan-Shan, Ya-Nan YANG, Xue-Lin LI a Yan ZHANG. Determination of Biogenic Amines in Cheese by On-line Solid Phase Extraction Coupled with Capillary High Performance Liquid Chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 2016, **44**(3), 396-402. DOI: 10.1016/S1872-2040(16)60915-5. ISSN 18722040.

[15] FLASAROVÁ, Radka, Vendula PACHLOVÁ, Leona BUŇKOVÁ, Anna MENŠÍKOVÁ, Nikola GEORGOVÁ, Vladimír DRÁB a František BUŇKA. Biogenic amine production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains in the model system of Dutch-type cheese. *Food Chemistry*. 2016, **194**, 68-75. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.07.069. ISSN 03088146.

[16] DE BORBA, Brian M. a Jeff S. ROHRER. Determination of biogenic amines in alcoholic beverages by ion chromatography with suppressed conductivity detection and integrated pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A*. 2007, **1155**(1), 22-30. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.01.114. ISSN 00219673.

[17] JAIN, Archana, Manju GUPTA a Krishna K. VERMA. Salting-out assisted liquid-liquid extraction for the determination of biogenic amines in fruit juices and alcoholic beverages after derivatization with 1-naphthylisothiocyanate and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2015, **1422**, 60-72. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.10.036. ISSN 00219673.

- [18] SONG, Nho-Eul, Hyoun-Suk CHO a Sang-Ho BAIK. Bacteria isolated from Korean black raspberry vinegar with low biogenic amine production in wine. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016, **47**(2), 452-460. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.01.016. ISSN 15178382.
- [19] MANETTA, Anna Chiara, Lorella DI GIUSEPPE, Rosanna TOFALO, Maria MARTUSCELLI, Maria SCHIRONE, Melania GIAMMARCO a Giovanna SUZZI. Evaluation of biogenic amines in wine: Determination by an improved HPLC-PDA method. *Food Control*. 2016, **62**, 351-356. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.11.009. ISSN 09567135.
- [20] DANIEL, Daniela, Vagner Bezerra DOS SANTOS, Denis Tadeu Rajh VIDAL a Claudimir Lucio DO LAGO. Determination of biogenic amines in beer and wine by capillary electrophoresis–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2015, **1416**, 121-128. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.08.065. ISSN 00219673.
- [21] ALMEIDA, C., J.O. FERNANDES a S.C. CUNHA. A novel dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer. *Food Control*. 2012, **25**(1), 380-388. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.10.052. ISSN 09567135.
- [22] PAPAVERGOU, Ekaterini J., Ioannis N. SAVVAIDIS a Ioannis A. AMBROSIADIS. Levels of biogenic amines in retail market fermented meat products. *Food Chemistry*. 2012, **135**(4), 2750-2755. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.07.049. ISSN 03088146
- [23] MAHMOUDI, Razzagh a Reza NORIAN. Occurrence of histamine in canned tuna fish from Iran. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 2014, **9**(2), 133-136. DOI: 10.1007/s00003-014-0863-2. ISSN 1661-5751.
- [24] ŠIMAT, Vida, Jelena MILETIĆ, Tanja BOGDANOVIĆ, Vedran POLJAK a Ivona MLADINEO. Role of biogenic amines in the post-mortem migration of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae Dujardin, 1845) larvae into fish fillets. *International Journal of Food Microbiology*. 2015, **214**, 179-186. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.008. ISSN 01681605.
- [25] Nařízení komise (ES) 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny
- [26] Vyhláška č. 305/2004 Sb. (platné znění) ze dne 6. května, kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách.

- [27] HENRÍQUEZ-AEDO, Karem, Daniel DURÁN, Apolinaria GARCIA, Martha B. HENGST a Mario ARANDA. Identification of biogenic amines-producing lactic acid bacteria isolated from spontaneous malolactic fermentation of Chilean red wines. *LWT - Food Science and Technology*. 2016, **68**, 183-189. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.12.003. ISSN 00236438.
- [28] XIE, Chong, Hu-hu WANG, Shao-lin DENG a Xing-Lian XU. The inhibition of cell-free supernatant of *Lactobacillus plantarum* on production of putrescine and cadaverine by four amine-positive bacteria in vitro. *LWT - Food Science and Technology*. 2016, **67**, 106-111. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.11.028. ISSN 00236438.
- [29] SCHILLING, Boris a Konrad LERCH. Amine oxidases from *Aspergillus niger*: identification of a novel flavin-dependent enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1995, **1243**(3), 529-537. DOI: 10.1016/0304-4165(94)00183-X. ISSN 03044165.
- [30] ZAMAN, Muhammad Zukhrufuz, Fatimah ABU BAKAR, S. JINAP a Jamilah BAKAR. Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, **145**(1), 84-91. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.031. ISSN 01681605.
- [31] SHUKLA, Shruti, Hae-Kyong PARK, Jong-Suk LEE, Jong-Kyu KIM a Myunghee KIM. Reduction of biogenic amines and aflatoxins in Doenjang samples fermented with various Meju as starter cultures. *Food Control*. 2014, **42**, 181-187. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.02.006. ISSN 09567135.
- [32] LEUSCHNER, Renata G, Martina HEIDEL a Walter P HAMMES. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 1998, **39**(1-2), 1-10. DOI: 10.1016/S0168-1605(97)00109-8. ISSN 01681605.
- [33] 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*. **20**(9), 796-801. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.10.005. ISSN 09567135.

- [34] NAILA, Aishath a Steve FLINT. Histamine Degradation by Diamine Oxidase, *Lactobacillus* and *Vergibacillus halodonitrificans* Nai18. *Journal of Food Processing & Technology*. 2012, **03**(06). DOI: 10.4172/2157-7110.1000158. ISSN 21577110.
- [35] KARPIŃSKI, T.M. a A.K. SZKARADKIEWICZ. Bacteriocins. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, 2016, s. 312 [cit. 2016-05-01]. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00053-2. ISBN 9780123849533.
- [36] CASABURI, Annalisa, Veronica DI MARTINO, Pasquale FERRANTI, Luca PICARIELLO a Francesco VILLANI. Technological properties and bacteriocins production by *Lactobacillus curvatus* 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture. *Food Control*. 2016, **59**, 31-45. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.05.016. ISSN 09567135.
- [37] ARRANZ, Rocío, Gabriela MERCADO, Jaime MARTÍN-BENITO, Rafael GIRALDO, Octavio MONASTERIO, Rosalba LAGOS a José M. VALPUESTA. Structural characterization of microcin E492 amyloid formation: Identification of the precursors. *Journal of Structural Biology*. 2012, **178**(1), 54-60. DOI: 10.1016/j.jsb.2012.02.015. ISSN 10478477.
- [38] TOMÉ, Elisabetta, Vera L. PEREIRA, Carla I. LOPES, Paul A. GIBBS a Paula C. TEIXEIRA. In vitro tests of suitability of bacteriocin-producing lactic acid bacteria, as potential biopreservation cultures in vacuum-packaged cold-smoked salmon. *Food Control*. 2008, **19**(5), 535-543. DOI: 10.1016/j.foodcont.2007.06.004. ISSN 09567135.
- [39] SENAN, Suja, Hussein Abd EL-AAL, Rajiv DAVE a Ashraf HASSAN. Production and stability of nisin in whey protein concentrate. *LWT - Food Science and Technology*. 2016, **71**, 125-129. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.03.031. ISSN 00236438.
- [40] KRIVOROTOVA, Tatjana, Andrejus CIRKOVAS, Sandra MACIULYTE, Ramune STANEVICIENE, Saulute BUDRIENE, Elena SERVIENE a Jolanta SEREIKAITĖ. Nisin-loaded pectin nanoparticles for food preservation. *Food Hydrocolloids*. 2016, **54**, 49-56. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.09.015. ISSN 0268005x.
- [41] BOVER CID, Sara, M. Jesús MIGUÉLEZ-ARRIZADO, Biserka BECKER, Wilhelm H. HOLZAPFEL a M. Carmen VIDAL-CAROU. Amino acid decarboxylation by Lacto-

bacillus curvatus CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiology*. 2008, **25**(2), 269-277. DOI: 10.1016/j.fm.2007.10.013. ISSN 07400020.

[42] BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Michaela HLOBILOVÁ, Zuzana VAŇÁTKOVÁ, Dana NOVÁKOVÁ a Vladimír DRÁB. Tyramine production of technological important strains of Lactobacillus, Lactococcus and Streptococcus. *European Food Research and Technology*. 2009, **229**(3), 533-538. DOI: 10.1007/s00217-009-1075-3. ISSN 1438-2377.

[43] BUŇKOVÁ, Leona, Jiří KREJČÍ, Rahula JANIŠ, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Pavlína VLTAVSKÁ, Lucie KULEDOVÁ a František BUŇKA. Influence of monoacylglycerols on growth inhibition of micromycetes in vitro and on bread. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2010, **112**(2), 173-179. DOI: 10.1002/ejlt.200900070. ISSN 14387697.

[44] ALVAREZ, Miguel A. a Ma Victoria MORENO-ARRIBAS. 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**(2), 146-155. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.07.007. ISSN 09242244.

[45] CALLEJÓN, S., R. SENDRA, S. FERRER a I. PARDO. Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014, **98**(1), 185-198. DOI: 10.1007/s00253-013-4829-6. ISSN 0175-7598.

[46] LEE, Yi-Chen, Chung-Saint LIN, Fang-Ling LIU, Tzou-Chi HUANG a Yung-Hsiang TSAI. Degradation of histamine by Bacillus polymyxa isolated from salted fish products. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2015, **23**(4), 836-844. DOI: 10.1016/j.jfda.2015.02.003. ISSN 10219498.

[47] TABANELLI, Giulia, Chiara MONTANARI, Eleonora BARGOSI, Rosalba LANCIOTTI, Veronica GATTO, Giovanna FELIS, Sandra TORRIANI a Fausto GARDINI. Control of tyramine and histamine accumulation by lactic acid bacteria using bacteriocin forming lactococci. *International Journal of Food Microbiology*. 2014, **190**, 14-23. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.023. ISSN 01681605.

[48] HERRERO-FRESNO, Ana, Noelia MARTÍNEZ, Esther SÁNCHEZ-LLANA, María DÍAZ, María FERNÁNDEZ, Maria Cruz MARTIN, Victor LADERO a Miguel A. ALVAREZ. Lactobacillus casei strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International Journal of Food Microbiology*. 2012, **157**(2), 297-304. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.002. ISSN 01681605.

[49] WU, Yunpeng, Cui ZHU, Zhuang CHEN, et al. Protective effects of Lactobacillus plantarum on epithelial barrier disruption caused by enterotoxigenic Escherichia coli in intestinal porcine epithelial cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2016, **172**, 55-63. DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.03.005. ISSN 01652427.

[50] CHATTERJEE, C., PAUL, M., XIE, L., VAN DER DONK, W. A. Biosynthesis and Mode of Action of Lantibiotics, *Chem. Rev.*, 105: 633–684. 2005.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BA Biogenní aminy

BMK Bakterie mléčného kvašení

HPLC Vysokoučinná kapalinová chromatografie

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Vznik tyraminu z aminokyseliny tyrozinu za přítomnosti enzymu tyrozindekarboxylázy (TDC) [3]	14
Obrázek 2. Vznik histaminu z aminokyseliny histidinu za přítomnosti enzymu histidindekarboxylázy (HDC) [3]	15
Obrázek 3. Vznik kadaverinu z aminokyseliny lyzinu za přítomnosti enzymu lyzindekarboxylázy (LDC) [3]	15
Obrázek 4 Nisin [50].....	26
Obrázek 5 Schéma přípravy vzorků.....	32
Obrázek 6 Produkce biogenních aminů u kmene <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> T3 v závislosti na přidavku nisinu a protektivních kultur	36
Obrázek 7 Produkce biogenních aminů u kmene <i>Lactobacillus curvatus</i> T15 v závislosti na přidavku nisinu a protektivních kultur	38
Obrázek 8 Produkce biogenních aminů u kmene <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> T36 v závislosti na přidavku nisinu a protektivních kultur	41
Obrázek 9 Produkce biogenních aminů u kmene <i>Lactobacillus plantarum</i> P89 v závislosti na přidavku nisinu a protektivních kultur	44
Obrázek 10 Produkce biogenních aminů u kmene <i>Lactobacillus brevis</i> P93 v závislosti na přidavku nisinu a protektivních kultur	47
Obrázek 11 Produkce biogenních aminů u kmene <i>Lactobacillus plantarum</i> P96 v závislosti na přidavku nisinu a protektivních kultur.....	50

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Strukturní vzorce a názvy vybraných biogenních aminů [1]	13
Tabulka 2. Biogenní aminy a jejich prekurzory [3]	14
Tabulka 3 Přítomnost biogenních aminů a bakterií, které je produkují, v potravinách [12]	20
Tabulka 4 Příklady bakteriocinů [35, 36, 38, 40]	25