

Izolace mikroorganismů degradujících biogenní aminy

Simona Káčerová

Bakalářská práce
2017

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Simona Káčerová**
Osobní číslo: **T14243**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

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

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizace biogenních aminů a jejich význam v potravinách.
2. Mikroorganismy degradující biogenní aminy – vlastnosti, využití.

II. Praktická část

1. Izolace mikroorganismů degradujících biogenní aminy z různých matric.
2. Ověření schopnosti degradace vybraných biogenních aminů izolovanými kmeny.
3. Zpracování výsledků a formulace závěrů.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] NAILA, A., FLINT, S., FLETCHER, G., BREMER, P., MEERDINK, G. Control of biogenic amines in food existing and emerging approaches. *Journal of Food Science*. 75.7: R139–R150. 2010. ISSN 17503841.
- [2] CALLEJÓN, S., SENDRA, R., FERRER, S., PARDO, I. Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98: 185–198. 2014. ISSN 1432–0614.
- [3] HERRERO-FRESNO, A., MARTÍNEZ, N., SÁNCHEZ-LLANA, E., DÍAZ, M., FERNÁNDEZ, M., MARTIN, M. C., LADERO, V., ALVAREZ, M. A. *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International Journal of Food Microbiology* 157.2: 297–304. 2012. ISSN 01681605.
- [4] CALLEJÓN, S., SENDRA, R., FERRER, S., PARDO, I. Ability of *Kocuria varians* LTH 1540 to degrade putrescine: identification and characterization of a novel amine oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63.16: 4170–4178. 2015. ISSN 1520–5118.
- [5] LEUSCHNER, R.G., HEIDEL M., HAMMES W.P. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 39: 1–10. 1998. ISSN 01681605.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

3. února 2017

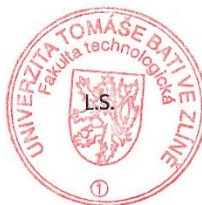
Termín odevzdání bakalářské práce:

28. dubna 2017

Ve Zlíně dne 3. února 2017



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



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

Příjmení a jméno: KÁČEROVÁ JINONÁ

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, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 15.5.2017

Káčerová

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 přihlíádne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Bakalářská práce je zaměřena na izolaci mikroorganismů degradujících biogenní aminy. Teoretická část se zabývá biogenními aminy, jejich vznikem, významem v potravinách a mikroorganismy schopných jejich degradace.

V praktické části této práce bylo izolováno a identifikováno pomocí metody MALDI-TOF MS 17 degradérů biogenních aminů. U všech izolátů byla také ověřována schopnost redukce vybraných biogenních aminů po 24 a 48 hodinové kultivaci v minerálním médiu s biogenními aminy a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí po předchozí derivatizaci dansylchloridem. Z výsledků je patrné, že nejlepším degradérem byl *Micrococcus lutes* KS15. Došlo k poklesu koncentrace všech sledovaných biogenních aminů nejméně o 70 % a nejlépe pak degradoval histamin, jehož konečná hodnota činila 5 % po 24 hodinách kultivace v minerálním médiu s biogenními aminy.

Klíčová slova: biogenní aminy, izolace mikroorganismů, degradace biogenních aminů, aminooxidáza

ABSTRACT

The thesis focuses on the isolation of biogenic amine-degrading microorganisms. The theoretical part is focused on biogenic amines, their origin, importance in food and microorganisms able to degrade them.

In the practical part of this work were isolated 17 microorganisms with degradation activity of biogenic amines. These microorganisms were identified by MALDI-TOF mass spectrometry. In the following experiment it was monitored degradation of selected biogenic amines after 24 and 48 hour growth in the mineral medium with biogenic amines and in the mineral medium with biogenic amines and glucose. The loss of biogenic amines was analyzed by the high performance liquid chromatography with UV detection after derivatization with dansylchloride. The results show that the best amine-degrading microorganism was *Micrococcus luteus* KS15. All of the biogenic amines were degraded by 70%. The lowest concentration was detected at histamine. The final value was 5% after 24 hour growth in the mineral medium with biogenic amines.

Keywords: biogenic amines, isolation of microorganisms, degradation of biogenic amines, amine oxidase

Upřímně bych chtěla velmi poděkovat vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, čas, trpělivost, a především za ochotu při zpracovávání této práce. Dále mé poděkování za pomoc a rady při zpracovávání části praktické patří laborantkám Bc. Veronice Kučabové, Ing. Olze Vlčkové a Ing. et Ing. Ludmile Zálešákové.

Mé velké poděkování patří ale především mé mamince a také mým blízkým přátelům za velkou podporu a trpělivost 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 CHARAKTERIZACE BIOGENNÍCH AMINŮ A JEJICH VÝZNAM V POTRAVINÁCH	13
1.1 BIOGENNÍ AMINY	13
1.1.1 Vznik biogenních aminů	14
1.1.2 Produkce biogenních aminů bakteriemi.....	15
1.2 VÝZNAM BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH.....	16
1.2.1 Problémy vznikající z přítomnosti biogenních aminů v potravinách.....	16
1.2.2 Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů	17
1.2.3 Fermentované potraviny.....	17
1.2.3.1 Sýry a mléčné výrobky	18
1.2.3.2 Maso a masné výrobky	18
1.2.3.3 Fermentovaná zelenina	18
1.2.3.4 Pivo	19
1.2.3.5 Víno	19
1.2.4 Nefermentované potraviny.....	19
1.2.4.1 Potraviny rostlinného původu.....	19
1.2.4.2 Ryby.....	19
2 MIKROORGANIZMY DEGRADUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY	21
2.1 BAKTERIE.....	21
2.1.1 Rod Bacillus	22
2.1.2 Rod Brevibacterium	22
2.1.3 Rod Lactobacillus.....	22
2.1.4 Rod Micrococcus	22
2.1.5 Rod Staphylococcus	22
2.1.6 Rod Pseudomonas	23
2.2 KVASINKY.....	23
2.3 PLÍSNĚ.....	23
II PRAKTICKÁ ČÁST	24
3 CÍL PRÁCE	25
4 MATERIÁL A METODY	26
4.1 IZOLACE MIKROORGANISMŮ DEGRADUJÍCÍCH BIOGENNÍ AMINY Z RŮZNÝCH POTRAVINOVÝCH MATRIC.....	26
4.1.1 Vzorky.....	26
4.1.2 Přístroje a pomůcky.....	26
4.1.3 Kultivační média a roztoky	27
4.1.4 Příprava a odběr vzorků z potravinových matric pro izolaci mikroorganismů degradujících biogenní aminy	29
4.1.5 Identifikace izolovaných mikroorganismů degradujících biogenní aminy.....	30
4.1.5.1 Identifikace metodou MALDI-TOF MS.....	30

4.2	OVĚŘENÍ SCHOPNOSTI DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ IZOLOVANÝMI KMENY	30
4.2.1	Použité mikroorganismy	30
4.2.2	Kultivační média a roztoky	30
4.2.3	Příprava a odběr vzorků pro analýzu	30
4.2.4	Derivatizace vzorků	31
4.2.5	Chromatografické stanovení biogenních aminů.....	31
5	VÝSLEDKY	32
5.1	IZOLACE A IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ DEGRADUJÍCÍCH BIOGENNÍ AMINY	32
5.2	CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ ÚBYTKU BA IZOLOVANÝMI MIKROORGANIZMY	33
5.2.1	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Acinetobacter pittii</i> KS01	34
5.2.2	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Pseudomonas proteolytica</i> KS02.....	35
5.2.3	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Pseudomonas fragi</i> KS03	36
5.2.4	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Pseudomonas fragi</i> KS04	37
5.2.5	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Pseudomonas fragi</i> KS05	38
5.2.6	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Citrobacter freundii</i> KS06	39
5.2.7	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Citrobacter freundii</i> KS07	40
5.2.8	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Enterobacter cloacae</i> KS08.....	41
5.2.9	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Enterobacter cloacae</i> KS09.....	42
5.2.10	Degradace biogenních aminů <i>Enterobacter cloacae</i> KS10	43
5.2.11	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Escherichia coli</i> KS11	44
5.2.12	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Escherichia coli</i> KS12	45
5.2.13	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Serratia liquefaciens</i> KS13	46
5.2.14	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Raoultella ornithinolytica</i> KS14.....	47
5.2.15	Degradace biogenních aminů kmenem <i>Micrococcus luteus</i> KS15.....	48
5.2.16	Degradace biogenních aminů kvasinkou <i>Yarrowia lipolytica</i> KS16	49
5.2.17	Degradace biogenních aminů kvasinkou <i>Candida guilliermondii</i> KS17	50
5.2.18	Srovnání degradace biogenních aminů izolovanými kmeny	51
6	DISKUZE	52
	ZÁVĚR	55
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	56
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	60
	SEZNAM OBRÁZKŮ	61
	SEZNAM TABULEK.....	63

ÚVOD

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární látky zásaditého charakteru s alifatickou, aromatickou nebo heterocyklickou strukturou. Mohou být tvořeny, ale i degradovány metabolickými procesy organismů. Obvykle jsou produkovány dekarboxylací aminokyselin. Některé biogenní aminy mají důležitou roli ve fyziologických funkcích organismů. Nachází se v různých druzích potravin, jako jsou například ryby, maso, sýry, zelenina, víno nebo pivo.

Pokud jsou biogenní aminy přijaty ve velkém množství, mohou způsobit řadu zdravotních problémů, například bolesti hlavy, zvýšení krevního tlaku, dýchací potíže, nevolnost, zvracení a další. Nejvíce problematický bývá histamin. Z uvedených důvodů byla provedena řada studií zabývajících se výskytem, a především redukcí těchto sloučenin v potravinách. Produkce biogenních aminů je závislá na mnoha faktorech. Závisí například na vhodné teplotě skladování, snížení zastoupení mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou, pH substrátu nebo také koncentraci soli.

Bylo zjištěno, že některé mikroorganismy jsou schopny produkovat enzymy degradující biogenní aminy. Aplikace enzymu diaminooxidázy, nebo bakterií obsahujících uvedený enzym, prokazatelně redukuje výskyt biogenních aminů a tím i snižuje potenciální zdravotní riziko u potravin.

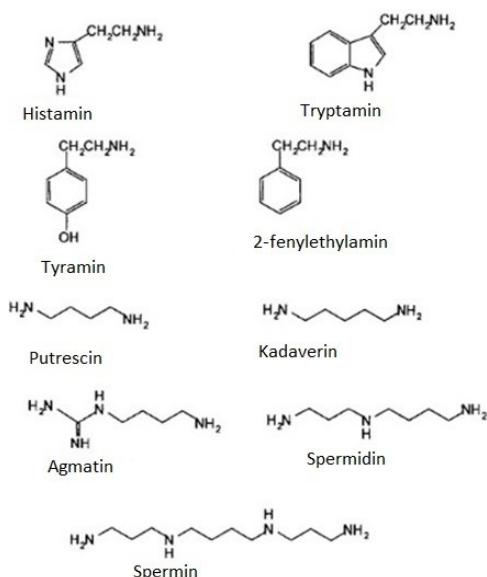
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERIZACE BIOGENNÍCH AMINŮ A JEJICH VÝZNAM V POTRAVINÁCH

1.1 Biogenní aminy

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární zásadité dusíkaté sloučeniny vznikající především dekarboxylací aminokyselin, ale také aminací a transaminací ketonů a aldehydů [1]. Vyznačují se nízkou molekulovou hmotností. Mohou být tvořeny i degradovány aktivitou mikrobiálního, rostlinného i živočišného metabolismu. Mají alifatickou (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatickou (tyramin, fenyletylamin), nebo heterocyklickou (histamin, tryptamin) strukturu [2, 3]. Obrázek 1 znázorňuje chemické struktury některých BA [3].

Malá množství biogenních aminů jsou v organizmech metabolizována bez jakýchkoliv dopadů na zdraví jedince. Aminy, jako jsou polyaminy, putrescin, spermidin, spermin, a také kadaverin jsou důležité ke správné funkci nukleových kyselin, proteosyntéze a pravděpodobně mají význam ve stabilizaci membrán. Avšak vysoká množství, která mohou být přijata potravinami, způsobují obvykle řadu zdravotních problémů, například bolesti hlavy, zvýšení krevního tlaku, nevolnost, zvracení a další. Mohou také hrát roli ve snižování jakosti a organoleptických vlastností některých potravin [1, 2].

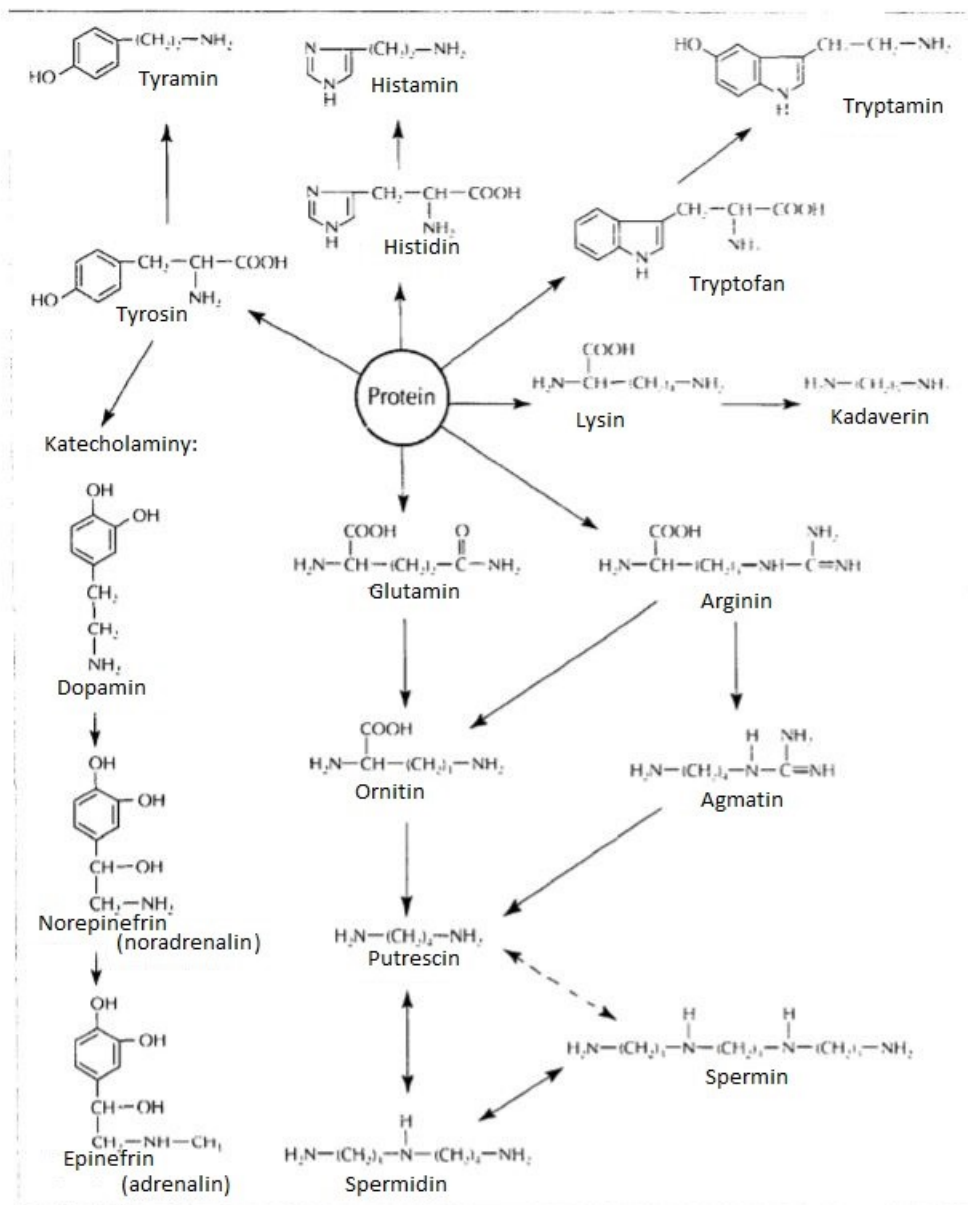


Obrázek 1: Chemické struktury některých biogenních aminů [3]

1.1.1 Vznik biogenních aminů

Biogenní aminy se tvoří v potravinách a nápojích mikrobiální dekarboxylací aminokyselin. Tvorba biogenních aminů pomocí mikrobiálních enzymů dekarboxyláz, závisí na specifickém bakteriálním kmenu, který je přítomen, dále na stupni dekarboxylázové aktivity a dostupnosti aminokyselin v substrátu. Dochází k odštěpení oxidu uhličitého z karboxylové skupiny. Bylo také zjištěno, že některé alifatické aminy mohou být tvořeny aminací aldehydů [1, 4].

Nejběžnější monoaminy, jako jsou histamin, tyramin, tryptamin a dále polyaminy, putrescin a kadaverin vznikají z příslušných aminokyselin, histidinu, tyrosinu, tryptofanu, ornitinu a lysinu. Spermidin a spermin vznikají z putrescinu [3]. Obrázek 2 interpretuje metabolické cesty vzniku biogenních aminů [5].



Obrázek 2: Metabolické cesty vzniku biogenních aminů [5]

1.1.2 Produkce biogenních aminů bakteriemi

Aminokyselinové dekarboxylázy nejsou až tolik rozšířeným enzymem mezi bakteriemi, ale druhy jako *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Photobacterium* a bakterie mléčného kvašení rodů *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* a *Streptococcus* jsou schopny dekarboxylace jedné nebo více aminokyselin [1].

Morganella morganii, některé kmeny *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia alvei*, *Staphylococcus* spp., *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp. jsou významní producenti histaminu v rybách a produktech z nich [1].

Bakterie mléčného kvašení produkující biogenní aminy, například *Lactobacillus brevis*, *Lb. buchnerii*, *Lb. curvatus*, *Lb. carnis*, *Lb. divergens* a *Lb. hilgardii*, byly izolovány z masa a masných produktů. V salámech byla zjištěna produkce histaminu gramnegativními bakteriemi *Pseudomonas fluorescens*, *Citrobacter freundii* a *Acinetobacter calcoaceticus var. anitratum*, a také několika grampozitivními bakteriemi zahrnující mikrokoky a stafylokoky.

Escherichia coli a *Pseudomonas spp.* se vyznačují schopností degradovat tyrosin a histidin. Bylo zjištěno, že *Enterococcus faecalis* vytváří v sýrech tyramin [1, 5].

Ve fermentovaných potravinách ze sóji byly identifikovány bakterie *Enterococcus faecium* a *Lactobacillus bulgaricus*, které produkují tyramin a jako bakterie vytvářející histamin byly zjištěny *Lactobacillus sp.* a *Lactobacillus sanfranciensis* [1].

Tyramin byl produkován v laboratorním mediu bakteriemi *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Proteus* a *Pseudomonas* [1].

1.2 Význam biogenních aminů v potravinách

Přítomnost biogenních aminů a polyaminů byla zaznamenána v různých druzích potravin, jako jsou například ryby, maso, sýr, zelenina, ovoce, ořechy, víno nebo také pivo. Prekurzory pro jejich vznik jsou volné aminokyseliny, které vznikají hydrolázou bílkovin. Celkové množství vzniklých aminů závisí především na vlastnostech dané potraviny a přítomnosti mikroorganismů. Nejčastěji nalezenými jsou pak histamin, tyramin, kadaverin, 2- fenyletylamin, spermin, spermidin, putrescin, tryptamin a agmatin. Kromě uvedených, byly v mase, masných produktech a rybách také nalezeny oktopamin a dopamin. Polyaminy, jako jsou kadaverin, agmatin, spermin a spermidin, se v potravinách nacházejí přirozeně a mají význam při růstu a diferenciaci buněk [1, 4].

1.2.1 Problémy vznikající z přítomnosti biogenních aminů v potravinách

Pokud se výše uvedené biogenní aminy v přítomnosti dusitanů změní na nitrosaminy, mohou mít potenciální karcinogenní účinky. Nitrosaminy vzniklé z polyaminů nemusí představovat zdravotní riziko. Jako toxické jsou považovány pouze tehdy, pokud jsou přijaty ve větším množství. Aromatické biogenní aminy, tyramin a 2- fenyletylamin vyvolávají migrény a hypertenzi. Tyramin, 2- fenyletylamin a putrescin mohou vyvolat selhání srdce nebo krvácení do mozku [4].

Histamin je fyziologicky nejdůležitější biogenní amin. Jedná se o látku s farmakologickou aktivitou (mediátor) a podílí se na patofyziologických procesech, jako jsou alergie a záněty.

Zdraví jedinci mají detoxikační systém, který je schopen degradovat přebytek histaminu na aldehydy, amoniak a peroxid vodíku. Přítomnost tyraminu a histaminu ve fermentovaných potravinách může způsobit zdravotní riziko zvláště u lidí, kteří užívají léky proti depresi. Tato medikace způsobuje snížení aktivity oxidativních enzymů mono-, di- a polyaminoxidázy [6, 7].

Byl proveden výzkum zabývající se toxicitou BA zaměřený na histamin. Míra intolerance závisí především na vlastnostech jedince. Předpokládá se, že koncentrace histaminu přijata v potravinách vyšší než $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ je zdraví nebezpečná. Další výzkum demonstruje výskyt symptomů u 50 % zdravých žen bez jakékoliv historie potravinové intolerance při požití množství 75 mg čistého histaminu [2].

1.2.2 Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů

Vznik biogenních aminů v potravinách mohou ovlivnit podmínky skladování, výrobní procesy, zastoupení mikrobiální populace s dekarboxylázovou aktivitou, vyhovující podmínky pro růst a rozmnožování mikroorganismů, kvalita surovin a dostupnost volných aminokyselin [4].

Bylo zjištěno, že výskyt histaminu v sýrech se vztahuje k několika faktorům, jako je pH substrátu, koncentrace soli a teplota. Vhodná teplota skladování je pravděpodobně nejdůležitější metodou prevence [1].

Mezi užitečné postupy pro kontrolu tvorby biogenních aminů patří například redukce mikrobiálního růstu prostřednictvím chlazení, hydrostatického tlaku, ozařování, kontrolované atmosféry balení nebo také přidání vhodných potravinových aditiv [8]. Použití startérových kultur bez potenciálu tvořit BA bylo navrženo jako jedno z nejlepších kontrolních opatření během tradiční výroby uzenin [9].

1.2.3 Fermentované potraviny

Při výrobě fermentovaných potravin lze očekávat přítomnost mnoha druhů mikroorganismů, z nichž některé jsou schopny produkovat biogenní aminy. U většiny produktů obsahujících bakterie mléčného kvašení bylo zaznamenáno značné množství putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu [1].

1.2.3.1 Sýry a mléčné výrobky

Producenti BA, jako jsou bakterie mléčného kvašení, nemusí být nutně patogenní. Mohou mít naopak pozitivní účinek na střevní mikroflóru. Nicméně výskyt BA v mléčných výrobcích byl dlouho přehlížen [10].

Při výrobě a zrání sýrů dochází k degradaci mléčné bílkoviny na peptidy, které jsou dále hydrolyzovány na volné aminokyseliny. Proces je způsoben bakteriemi mléčného kvašení spolu s dalšími mikroorganismy, ale také mléčnými enzymy a syřidlem. Volné aminokyseliny se stávají prekurzorem BA. Enterokoky a heterofermentativní laktobacily jsou považovány za hlavní producenty tyraminu a histaminu, ale i další BMK a některé gramnegativní bakterie mohou být rovněž producenti BA v sýrech [11]. Kadaverin, putrescin, tryptamin a fenyletylamin jsou dalšími BA přítomnými v různých typech sýrů [1].

1.2.3.2 Maso a masné výrobky

Nejvíce zastoupenými biogenními aminy v masu a masných výrobcích jsou tyramin, kadaverin, putrescin a také histamin. Jedinými vyskytujícími se BA ve větším množství v čerstvém masu jsou spermidin a spermin. Fermentované masné výrobky jsou potraviny, u kterých lze nalézt vyšší množství BA v důsledku použití nekvalitní suroviny, možné mikrobiologické kontaminace, ale mohou také přispět nevhodné podmínky při zpracování a skladování výrobků [14, 15].

1.2.3.3 Fermentovaná zelenina

Zelenina obsahuje významné množství minerálních látek, vitamínů, ale také antioxidantů, a proto se stává nenahraditelnou složkou lidské stravy. Podléhá bohužel často rychlé zkáze, a tak se určité druhy zeleniny konzervují pomocí fermentace. Jedním z nejznámějších druhů je fermentované zelí, v německy mluvících zemích známé jako *sauerkraut*. Produkt je bohatý na minerální látky, například vápník, fosfor, železo, sodík a draslík, ale také na vitamíny, jako je vitamin A, thiamin, riboflavin, niacin a vitamin C. Bylo prokázáno, že obsah vitamínů skupiny B a C je výrazně vyšší ve fermentované formě zelí než ve formě čerstvé. Fermentované zelí obsahuje vysoké množství volných aminokyselin, proto může dojít k jejich dekarboxylaci až na biogenní aminy. Nejvíce zastoupenými BA ve fermentovaném zelí jsou tyramin a putrescin, naopak histamin, tryptamin a spermin byly nalezeny ve značně nižších koncentracích [12, 13].

1.2.3.4 Pivo

V pivu se nejčastěji vyskytují BA, jako jsou tyramin, putrescin, kadaverin a histamin. Za jejich přítomnost, především v lahvovém pivu, mohou být zodpovědné bakterie mléčného kvašení, zvláště laktobacily, které přežily nedostatečnou pasteraci. Tvorba biogenních aminů může také záviset na použitých surovinách a jejich přirozeně přítomné mikroflóře [16].

1.2.3.5 Víno

Vznik biogenních aminů ve víně je zcela nevyhnutelný. BA vznikají působením mikroorganismů v různých fázích výroby a skladování vína. Koncentrace BA je nižší na konci ethanolového kvašení a zvyšuje se zejména při jablečno-mléčném kvašení [17].

Bylo identifikováno celkem 24 různých BA. Nejhojněji zastoupeným pak byl putrescin a nejnebezpečnějším histamin. V Evropě neexistují žádné předpisy omezující množství histaminu ve vínu. Kromě zdravotních rizik je vysoká koncentrace BA ve víně ukazatelem nekvalitního vína se sníženými organoleptickými vlastnostmi. Z takových důvodů bývají v některých zemích doporučovány maximální limity histaminu [18].

1.2.4 Nefermentované potraviny

1.2.4.1 Potraviny rostlinného původu

V nefermentovaných potravinách je vyšší přítomnost biogenních aminů významným ukazatelem nežádoucí mikrobiální aktivity. Nejčastěji přítomným biogenním aminem v ovoci a zelenině je tyramin. Byly také zaznamenány obsahy tryptaminu a histaminu. Běžná množství BA tvoří obvykle charakteristickou chuť a aroma [19].

Fenyletylamin je přirozenou složkou kakaových bobů, a proto se vyskytuje v čokoládě, čokoládových výrobcích a cukrovinkách obsahujících čokoládu. Některé druhy hub rovněž obsahují vysoké hladiny fenyletylaminu. V karagenanu z řas byl detekován histamin a kadaverin [1].

1.2.4.2 Ryby

Otrava histaminem je jednou z nejběžnějších intoxikací způsobenou při konzumaci ryb a výrobků z nich. Sloučenina je tepelně stabilní, tudíž se její hladina nemůže snížit vařením, konzervováním ani mražením [20].

Nejčastější příčinou vzniku histaminu je růst bakterií s dekarboxylázovou aktivitou. Tyto bakterie, přirozeně se vyskytující na žábrách a také ve střevech živých ryb, se začínají množit a růst ihned po smrti ryb. Nicméně velmi nízké teploty (-18 °C) mohou zastavit růst mikroorganismů a zabránit vzniku BA. Naopak teploty kolem 21 °C a vyšší, produkci BA obvykle zvětší [20].

2 MIKROORGANIZMY DEGRADUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY

Enzymy degradující biogenní aminy produkují také různé mikroorganismy. Byla provedena studie, díky které bylo zjištěno, že bakterie izolované z mléčných výrobků obecně postrádají aminooxidázu. Bakterie, u kterých byla zjištěna aktivita aminooxidázy, mají také tyrosin nebo histidin dekarboxylázu, a proto se stávají potenciálními producenty BA [2].

Aplikace diaminooxidázy (DAO) nebo bakterií obsahujících tento enzym snižuje obsah histaminu v potravinách. DAO byla izolována z mnoha zdrojů jako například z orgánů prasat (játra, ledviny), lidské placenty a krevní plazma, ale také z mikroorganismů včetně *Microbacterium lacticum* a *Arthrobacter crystallopoietes*. V sýrech byla zjištěna aktivita jak DAO, ale také dekarboxylázy. Nízký obsah aminů byl nalezen v sýrech, které obsahovaly více DAO. Naopak vyšší obsah BA byl nalezen ve výrobcích s větší aktivitou dekarboxylázy [7, 21].

Byla zaznamenána degradace tyraminu ve fermentovaných masných výrobcích, kdy byly inokulovány bakteriálním kmenem obsahujícím tyramin dekarboxylázu a kmenem druhým obsahujícím tyramin oxidázu. V přítomnosti tyramin oxidativní bakterie bylo celkové množství vytvořeného tyraminu sníženo na 40 % v porovnání s masným výrobkem inokulovaným bakterií s tyramin dekarboxylázovou aktivitou [6].

Rybí omáčka je velmi populární fermentovaný produkt v jihovýchodní Asii. Omáčka je považována za velmi důležitý zdroj bílkovin. Je připravována fermentací ryb se solí při určité teplotě 4-12 měsíců. Dříve nebyly využívány žádné startérové kultury, neboť fermentace probíhala pouze přirozeně přítomnou mikroflórou v syrovém mase. Nyní jsou startérové kultury využívány k urychlení procesu fermentace. Avšak byly zjištěny vysoké koncentrace BA jako například histaminu, putrescinu, kadaverinu a tyraminu. Schopnost mikroorganismů s aminooxidázou snižovat obsah BA v potravinách, zvláště fermentovaných, se stala velkým zájmem v posledních letech [22].

2.1 Bakterie

Některé kmeny bakterií jsou díky aminooxidáze schopny degradovat BA [2].

2.1.1 Rod *Bacillus*

Histamin oxidáza byla nalezena v bakterii *Bacillus amyloliquefaciens* FS05. Bakterie byla izolována z rybí omáčky pocházející ze severovýchodní Malajsie. Byla zjištěna schopnost degradovat histamin. Putrescin a histamin pak degraduje *Bacillus subtilis* [22].

2.1.2 Rod *Brevibacterium*

Bakterie *Brevibacterium linens* se přidává do potravin k úpravě aroma, ale využívá se také její schopnost degradovat histamin [7].

Byly použity tři různé kmeny *Brevibacterium linens* při zrání Munster sýru. V průběhu čtyřtýdenního zrání kmeny *B. linens* snížily obsah histaminu a tyraminu o 55 až 70 %. Bakterie *B. linens* LTH 456 a LTH 3686 degradovaly BA ve fosfátovém pufru obsahujícím 0,54 M histaminu a 0,58 M tyraminu při inkubaci za třepání při 30 °C. Naopak kmen *B. linens* LTH 3813 v pufracním systému neprokazoval žádné degradační schopnosti [25].

2.1.3 Rod *Lactobacillus*

Byla provedena studie, která prokázala dispozici všech zkoumaných kmenů *Lactobacillus sakei* (AGR 37, AGR 46, Lb 706) redukovat přítomnost histaminu o 50 % [26].

Lactobacillus plantarum dokáže degradovat putrescin a tyramin ve víně. Bakterie je vhodná k použití jako startér jablečného kvašení [27].

Některé kmeny *Lactobacillus casei* snižuje rovněž ve víně biogenní aminy jako jsou histamin, tyramin a putrescin [28].

2.1.4 Rod *Micrococcus*

U izolované aminooxidázy z bakterie *Kocuria varians* LTH 1540 (*Micrococcus varians*) byla prokázána dispozice degradovat putrescin [29]. Jiná studie dále ukazuje schopnost *Kocuria varians* degradovat tyramin během fermentace uzenin [30].

2.1.5 Rod *Staphylococcus*

Staphylococcus carnosus FS19 izolovaný z rybí omáčky degraduje histamin. Stává se tedy potenciálním nástrojem k redukci tohoto biogenního aminu v rybích produktech [31].

Staphylococcus xylosus ze sedmi zkoumaných potenciálních startérových kultur prokazoval nejlepší schopnost redukovat přítomnost histaminu, ale také tyraminu [32].

2.1.6 Rod *Pseudomonas*

Pseudomonas putida snižuje přítomnost tyramin a dopamin [33].

2.2 Kvasinky

Některé kměny *Debaryomyces hansenii* a *Yarrowia lipolytica* projevují schopnost degradace. Nejeftektivnější výsledek redukce širokého spektra BA byl zaznamenán u kvasinky *Debaryomyces hansenii* H525 [24].

Enzym methylaminoxidáza byl izolován a charakterizován v roce 1981 z kvasinky *Candida boidinii* [8]. Jeden z genů kódujících aminové oxidázy byl heterologně exprimován v *Saccharomyces cerevisiae* [23].

2.3 Plísně

Některé druhy plísní jsou schopny redukovat BA. Vláknnité houby mají vysokou sekreční schopnost enzymu, která byla komerčně využita. Enzymatické odstranění aminů může být bezpečný a ekonomický způsob, jak odstranit tyto sloučeniny z vína a jiných fermentovaných potravin. Několik druhů vláknitých hub produkuje aminooxidázy při použití aminů, jako jediný zdroj dusíku pro růst. Genom *Aspergillus niger* obsahuje šest genů kódujících aminové oxidázy [23]. Druhy jako *Penicillium citrinum*, *Alternaria sp.*, *Phoma sp.*, *Ulocladium chartarum* a *Epicoccum nigerum* dokáží degradovat alespoň dva různé hlavní aminy v mikrofermentativním systému [2].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části této bakalářské práce byla charakterizace biogenních aminů. Byl popsán jejich vznik, význam, výskyt a faktory ovlivňující jejich přítomnost v potravinách. Dalším účelem bylo popsat mikroorganismy degradující biogenní aminy, jejich vlastnosti a využití.

Cílem praktické části byla izolace mikroorganismů degradujících biogenní aminy z různých potravinových matric a ověření schopnosti degradace vybraných biogenních aminů izolovanými kmeny.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Izolace mikroorganismů degradujících biogenní aminy z různých potravinových matric

4.1.1 Vzorčky

Byla provedena izolace mikroorganismů degradujících biogenní aminy z 54 potravinových matric, jejichž seznam je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1: Skupiny potravin, ze kterých byla provedena izolace degradérů

Seznam vzorků potravin	
Sýry eidamského typu	5
Měkké sýry	5
Tvrdé sýry	1
Sýry vyrobené na ústavu technologie potravin	4
Kysané mléčné výrobky	5
Masné výrobky	25
Rybí výrobky	3
Lahůdkářské výrobky	4
Listové těsto	1
Ovocné pomazánky	1
Počet celkem	54

4.1.2 Přístroje a pomůcky

- Stomacher Seward
- Vortex
- Sáčky do stomacheru
- Laboratorní váhy Adventurere Pro (OHAUS)
- pH metr (EUTECH instruments)
- Sterilizátor H+P Varioklav 135S
- Mikrobiologický inkubátor (Memmert)
- Termoblok Benchmark Digital HEAT BLOCK
- Laboratorní třepačka LT2, KAVALIERGLASS, a. s., Sázava
- HPLC Agilent Technologies (sestava se skládá z binární pumpy a autosampleru La-bAlliance, DAD a detektoru Agilent Technologies 1260 Infinity a degaseru

- Kolona Zorbax Exlipse Plus C18 RRHD
- Laboratorní sklo a plasty

4.1.3 Kultivační média a roztoky

Degradéři byli izolováni v minerálním médiu. Byly připraveny roztoky nutné pro jeho přípravu.

o Roztok KH_2PO_4

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

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

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

o Roztok stopových prvků

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

$\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,043 g
H_3BO_3	0,057 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,043 g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,037 g
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,040 g

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

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

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

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

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

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

o Roztok NaCl

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

o Roztok biogenních aminů

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

Tyramin 2 g

Putrescin 2 g

Kadaverin 2 g

Histamin 2 g

Fenyletylamin 2 g

Tryptamin 2 g

o Minerální médium tekuté

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

Roztok pufru KH_2PO_4 20 ml

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

Roztok stopových prvků 2 ml

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

Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	10 ml
Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	10 ml
Roztok NaCl	10 ml
Roztok biogenních aminů	100 ml

o Minerální médium tuhé

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

o Fyziologický roztok

K přípravě fyziologického roztoku byl použit chlorid sodný rozpuštěním $8,5 \text{ g}$ v 1000 ml destilované vody. Roztok byl pipetován do zkumavek po $4,5 \text{ ml}$ a sterilován v autoklávu při teplotě $121 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 20 minut .

4.1.4 Příprava a odběr vzorků z potravinových matric pro izolaci mikroorganismů degradujících biogenní aminy

Z jednotlivých potravin byly do sáčku sterilně odebrány 3 g vzorku, ke kterým bylo přidáno 27 ml sterilního fyziologického roztoku. Vzorky v sáčku byly homogenizovány ve stomacheru po dobu 5 minut . Následovně bylo zaočkováno $100 \text{ } \mu\text{l}$ této suspenze do minerálního média s biogenními aminy a také v médiu bez biogenních aminů.

Minerální médium tvoří minimální zdroj mikrobiogenních, makrobiogenních a stopových prvků nutných pro životní funkce mikroorganismů. V minerálním médiu s biogenními aminy představují jako jediný zdroj uhlíku a dusíku právě biogenní aminy, které mikroorganismy schopné degradace dokáží využít.

Všechny vzorky byly kultivovány při $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a jakmile byl zaznamenán zákal (růst) ve zkumavce s minerálním médiem s biogenními aminy (odečty po $24, 48, 72$ a 96 hodinách), vzorek byl přeočkován na tuhé minerální médium s biogenními aminy.

4.1.5 Identifikace izolovaných mikroorganismů degradujících biogenní aminy

4.1.5.1 Identifikace metodou MALDI-TOF MS

Izolované mikroorganismy dle postupu v kapitole 4.1.4., byly dále identifikovány metodou MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spectrometry- hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem). Identifikace vzorků byla provedena na Slovenské poľnohospodárskej univerzite v Nitre, Fakulta biotechnológie a potravinárstva (prof. Kačániová).

Kultury narostlé na tuhém minerálním médiu byly přeočkovány pomocí křížového roztěru k získání čisté kultury. Po 24 hodinách kultivace při 30 °C byla kultura sterilně kličkou odebrána do sterilní eppendorfkové mikrozkušavky, do které bylo přidáno 150 µl sterilní destilované vody a 450 µl 96% etanolu. Připravené vzorky byly odeslány na identifikaci.

4.2 Ověření schopnosti degradace biogenních aminů izolovanými kmeny

4.2.1 Použité mikroorganismy

Byly použity mikroorganismy izolované z potravinových matric dle postupu v kapitole 5.3. Schopnost degradace biogenních aminů mikroorganismy byla zkoumána v minerálním médiu s biogenními aminy bez glukózy a s glukózou.

4.2.2 Kultivační média a roztoky

Bylo připraveno minerální médium s biogenními aminy (putrescin, fenyletylamin, histamin, kadaverin a tyramin) stejným postupem uvedeným v kapitole 4.1.3. a minerální médium s biogenními aminy a glukózou rozpuštěním 5 g glukózy v 1000 ml minerálního média s biogenními aminy. Média byla rozpipetována do zkumavek po 5 ml a sterilována.

4.2.3 Příprava a odběr vzorků pro analýzu

Kmeny byly pomnoženy ve 144 zkumavkách s minerálním médiem s biogenními aminy bez glukózy a 144 zkumavkách s minerálním médiem s biogenními aminy a glukózou.

Degradace byla sledována při teplotě 30 °C. Odběrové časy byly vždy po 24 a 48 hodinách.

Odběry byly provedeny ve stanovených časech vždy ve 2 paralelních zkumavkách. Vzorky byly centrifugovány (3600 otáček, 5 minut) a z každé zkumavky bylo odebráno do třech eppendorfkových mikrozkušavek 650 µl supernatantu a 650 µl kyseliny chloristé (Merck)

o koncentraci 1,2 mol/l. Takto připravené vzorky v mikrozkušavkách byly zamrazeny a připraveny pro následnou derivatizaci.

4.2.4 Derivatizace vzorků

K připraveným vzorkům supernatantu bylo přidáno 100 μ l vnitřního standardu 1,7-heptaindiaminu (Sigma-Aldrich) v koncentraci 500 mg/l. Dále bylo odpipetováno 1 ml vzorku do derivatizační nádoby a přidáno 1,5 ml karbonátového pufru s pH 11,1 – 11,2 a 2 ml čerstvě připraveného dansylchloridu o koncentraci 5 g/l v acetonu. Uzavřené nádoby byly třepány 20 hodin v temnu. Poté bylo ke vzorkům přidáno 200 μ l roztoku prolinu a vzorky byly třepány další hodinu. Následně byly ke vzorku přidány 3 ml heptanu a po pečlivém uzavření nádobek se vzorky třepaly 3 minuty ručně. Poté bylo odpipetováno 1 ml heptanové vrstvy do vialek. Obsah vialek byl odpařen při teplotě 60 °C do sucha pod proudem dusíku a suchý odparek zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich). Vialky byly zamrazeny na -18 °C do doby analýzy.

4.2.5 Chromatografické stanovení biogenních aminů

Vzorky před analýzou byly přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 μ m a dávkovány do chromatografického systému. Biogenní aminy byly hodnoceny pomocí mobilní a stacionární fáze na koloně Zorbax C18 RRHD s rozměry 50 x 3 mm s pórovitostí 1,8 μ m. Průtok kolonou byl 0,45 ml/min. Stanovení bylo prováděno při teplotě 30 °C a vlnové délce 254 nm (UV/VIS-DAD detektorem) [36].

5 VÝSLEDKY

5.1 Izolace a identifikace mikroorganismů degradujících biogenní aminy

Z 54 potravinových matric bylo izolováno celkem 18 degradérů. Kmeny byly identifikovány na Slovenské poľnohospodárskej univerzite v Nitre pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF na úrovni rodu a druhu. Tabulka 2 znázorňuje dosažené výsledky. Skóre v rozmezí 0 až 3 ukazuje spolehlivost výsledné identifikace. Nulová hodnota značí neshodu a hodnota 3 je naopak maximum. Identifikace na úrovni druhu byla spolehlivá u tmavě zvýrazněné hodnoty (od 3 do 2). Světle zvýrazněná hodnota (1,778) pak značí spolehlivou identifikaci na úrovni rodu.

Jeden mikroorganismus se nepodařilo touto metodou identifikovat. Příčinou mohla být kontaminace vzorku jiným mikroorganizmem, nízkou koncentrací mikroorganismu nebo nepřítomností daného spektra v knihovně (knihovny vytvářeny pro klinické izoláty).

Tabulka 2: Identifikace izolovaných mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS

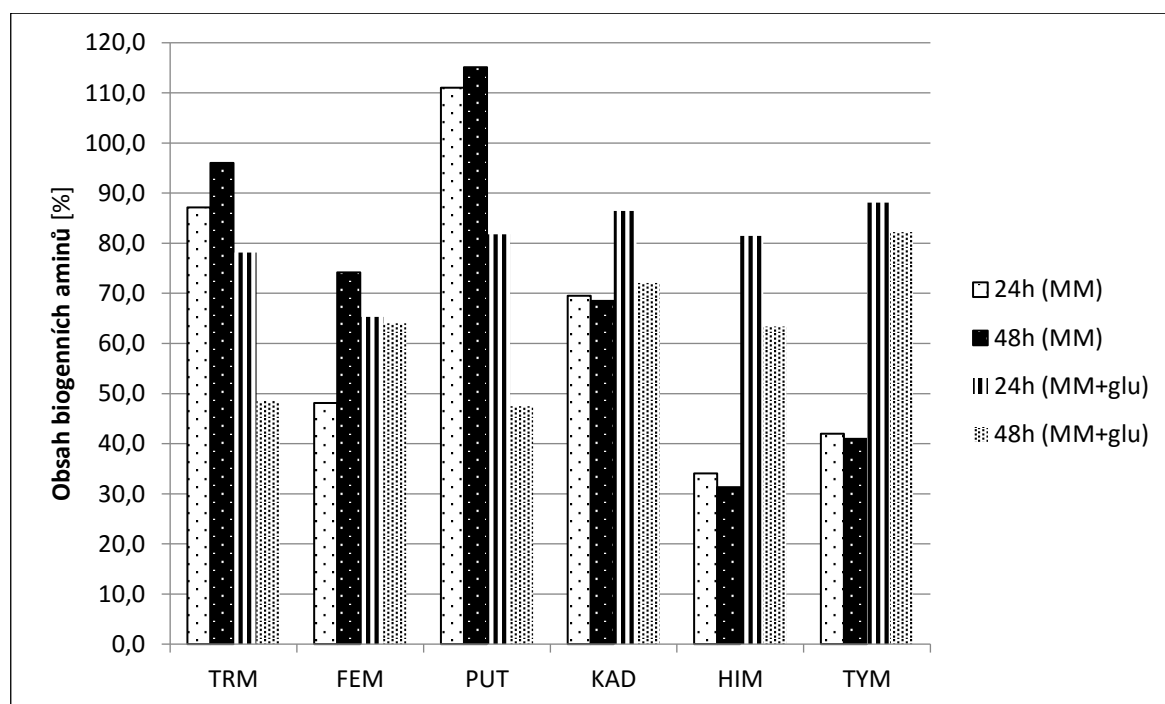
Číslo izolátu	Organismus (nejlepší shoda)	Skóre
1.	<i>Acinetobacter pittii</i>	2,321
2.	<i>Pseudomonas proteolytica</i>	2,352
3.	<i>Pseudomonas fragi</i>	2,266
4.	<i>Pseudomonas fragi</i>	2,22
5.	<i>Pseudomonas fragi</i>	2,127
6.	<i>Citrobacter freundii</i>	2,423
7.	<i>Citrobacter freundii</i>	2,278
8.	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,297
9.	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,268
10.	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,385
11.	<i>Escherichia coli</i>	2,195
12.	<i>Escherichia coli</i>	2,364
13.	<i>Escherichia coli</i>	2,195
14.	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,112
15.	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	2,231
16.	<i>Yarrowia lipolytica</i>	1,778
17.	<i>Candida guilliermondii</i>	2,229

5.2 Chromatografické stanovení úbytku BA izolovanými mikroorganismy

Byla zkoumána degradace 6 biogenních aminů (TRM- tryptamin, FEM- fenyletylamin, PUT- putrescin, KAD- kadaverin, HIM- histamin, TYM- tyramin) pomocí izolovaných degradérů v závislosti na čase (24 hodin, 48 hodin) a přídavku glukózy (viz. kapitola 4.2.3).

5.2.1 Degradace biogenních aminů kmenem *Acinetobacter pittii* KS01

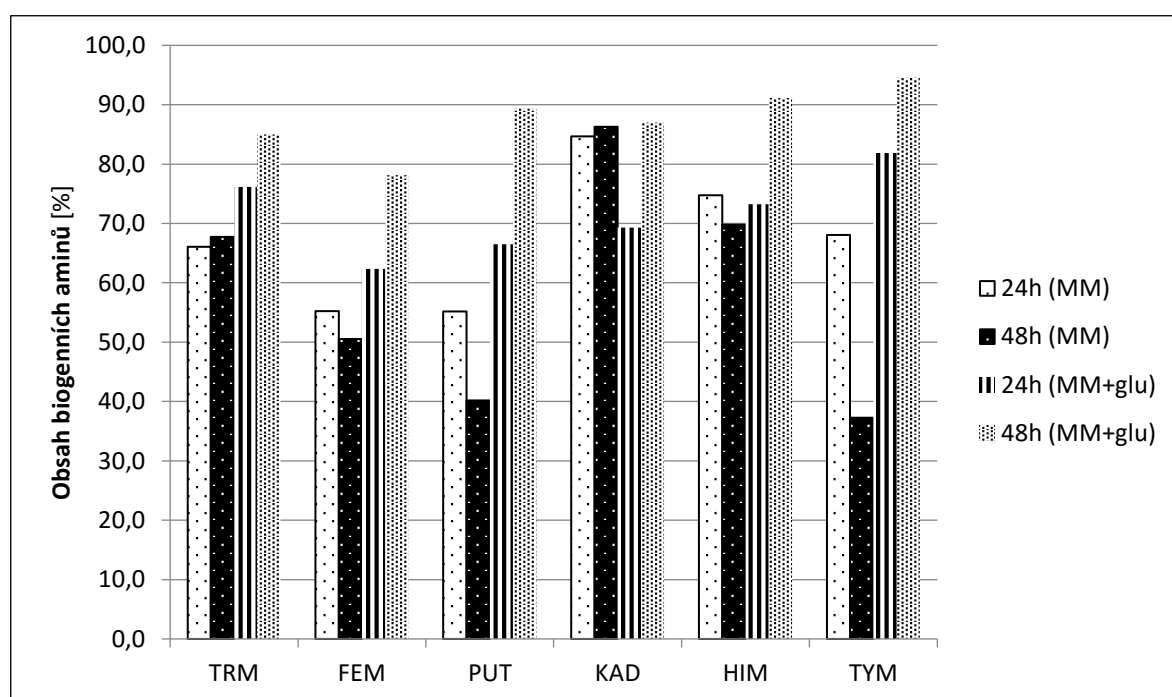
Byla sledována degradace BA kmenem *Acinetobacter pittii* KS01. Z obrázku 3 je patrný největší úbytek histaminu, který byl redukován o 65 % a tyraminu zredukovaného na 40 % již po 24 hodinách kultivace v minerálním médiu s biogenními aminy. Degradace v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou byla viditelně nižší. U histaminu došlo ke 20% úbytku po 24 hodinách a 35% úbytku po hodinách 48. Tyramin byl degradován pouze o 10 %. U tryptaminu a putrescinu byl zaznamenán poloviční úbytek v minerálním médiu s glukózou po 48 hodinové kultivaci. Nárůst detekovaného putrescinu v médiu bez glukózy mohl být způsoben kontaminací vzorku. Úbytek tryptaminu v minerálním médiu s biogenními aminy byl pouze 10% po 24 hodinách. Nejvýraznější degradace fenyletylaminu byla po 24 hodinách v minerálním médiu s biogenními aminy, a to o polovinu.



Obrázek 3: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem *Acinetobacter pittii* KS01

5.2.2 Degradace biogenních aminů kmenem *Pseudomonas proteolytica* KS02

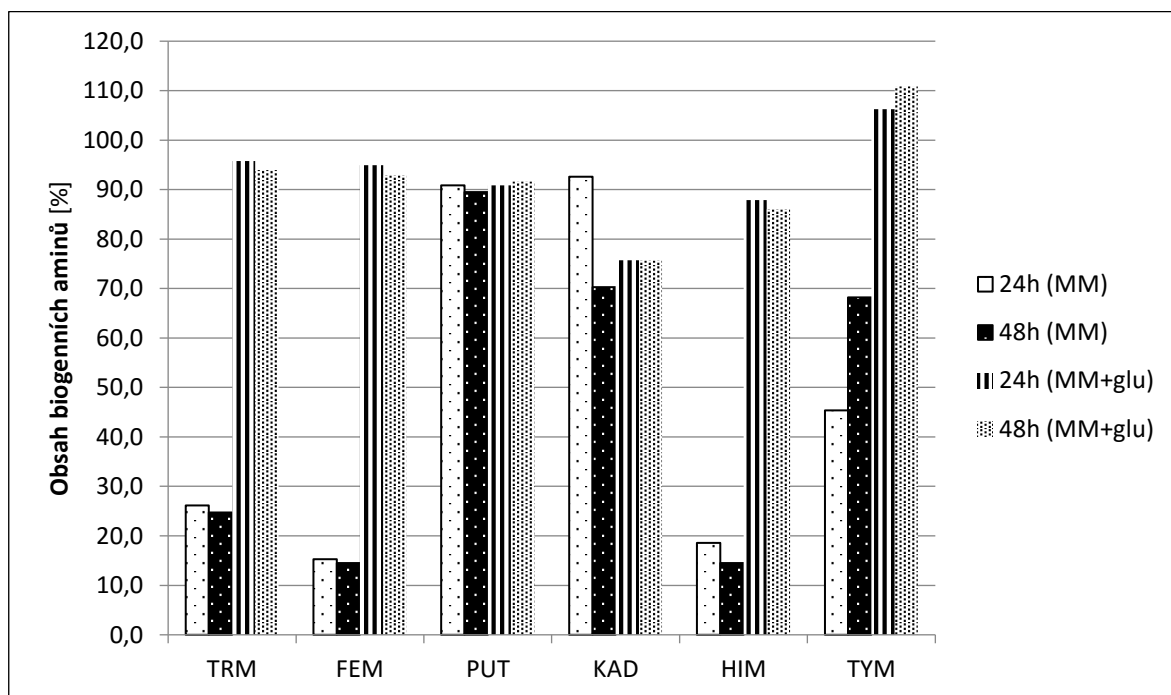
Z obrázku 4 je patrné, že zkoumaný kmen *Pseudomonas proteolytica* KS02 dokázal nejlépe degradovat putrescín a fenyletylamin v minerálním médiu bez glukózy. Po 24 hodinách došlo k 45% úbytku u obou z nich. U fenyletylaminu se koncentrace po 48 hodinách snížila o dalších 5 %, u putrescínu došlo ještě k 15% poklesu. Jistá degradace byla zaznamenána i v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou, fenyletylamin měl koncentraci 60 % a putrescín 70 % po 24 hodinové kultivaci. Koncentrace tyraminu klesla po kultivaci v minerálním médiu s biogenními aminy na 70 % po 24 hodinách, po dalších 24 hodinách byla již pouze 40 %.



Obrázek 4: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem *Pseudomonas proteolytica* KS02

5.2.3 Degradace biogenních aminů kmenem *Pseudomonas fragi* KS03

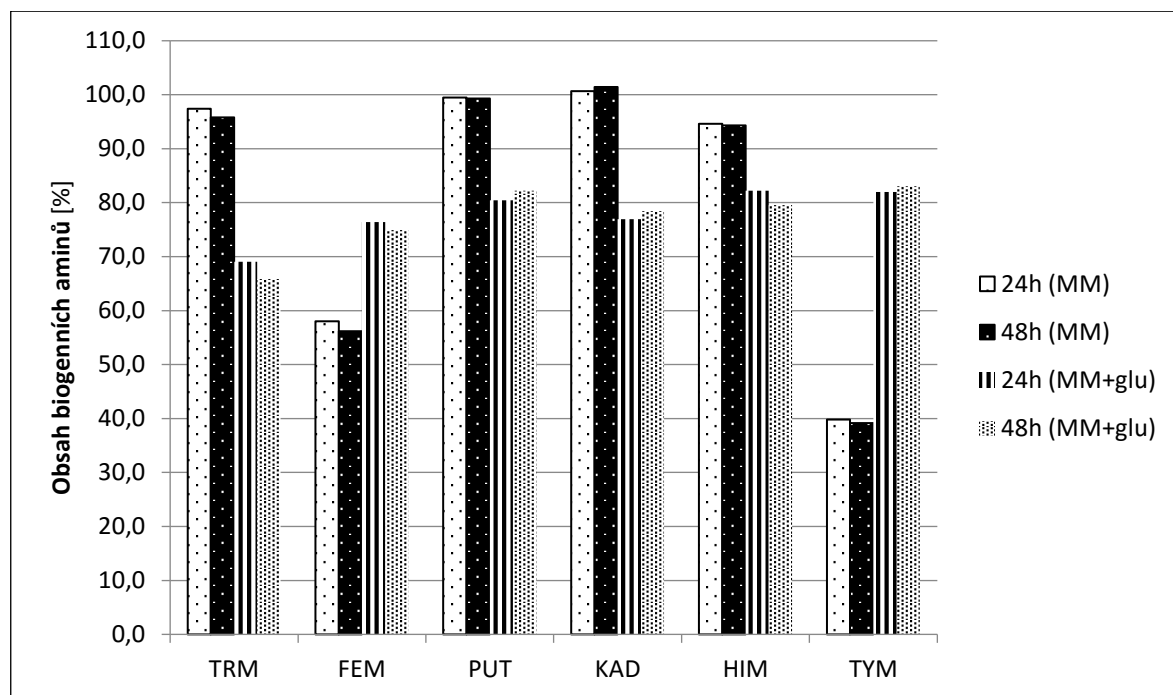
Obrázek 5 prezentuje schopnost degradace zkoumaného kmene *Pseudomonas fragi* KS03. Je patrné, že největší úbytek byl zjištěn právě u fenyletylaminu v minerálním médiu s biogenními aminy. Snížení činilo 85 % po 24 i 48 hodinách kultivace. Koncentrace fenyletylaminu v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou po 24 a 48 hodinové kultivaci byla 95 %. Je tedy očividné, že přidavek glukózy výrazně ovlivnil schopnost degradace tohoto biogenního aminu. Podobné výsledky byly zaznamenány u tryptaminu. Snížení koncentrace o 75 % v minerálním médiu s biogenními aminy po 24 a 48 hodinové kultivaci a minimální úbytek v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou. Rozklad histaminu o 80 % byl detekován již po 24 hodinách v minerálním médiu s biogenními aminy a o 85 % po 48 hodinách. Histamin byl redukován o 10 % v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou po 24 i 48 hodinách. Nejmenší schopnost kmene degradace byla pozorována u putrescinu. Ve všech minerálních médiích i časech došlo k poklesu pouze 10 %.



Obrázek 5: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem *Pseudomonas fragi* KS03

5.2.4 Degradace biogenních aminů kmenem *Pseudomonas fragi* KS04

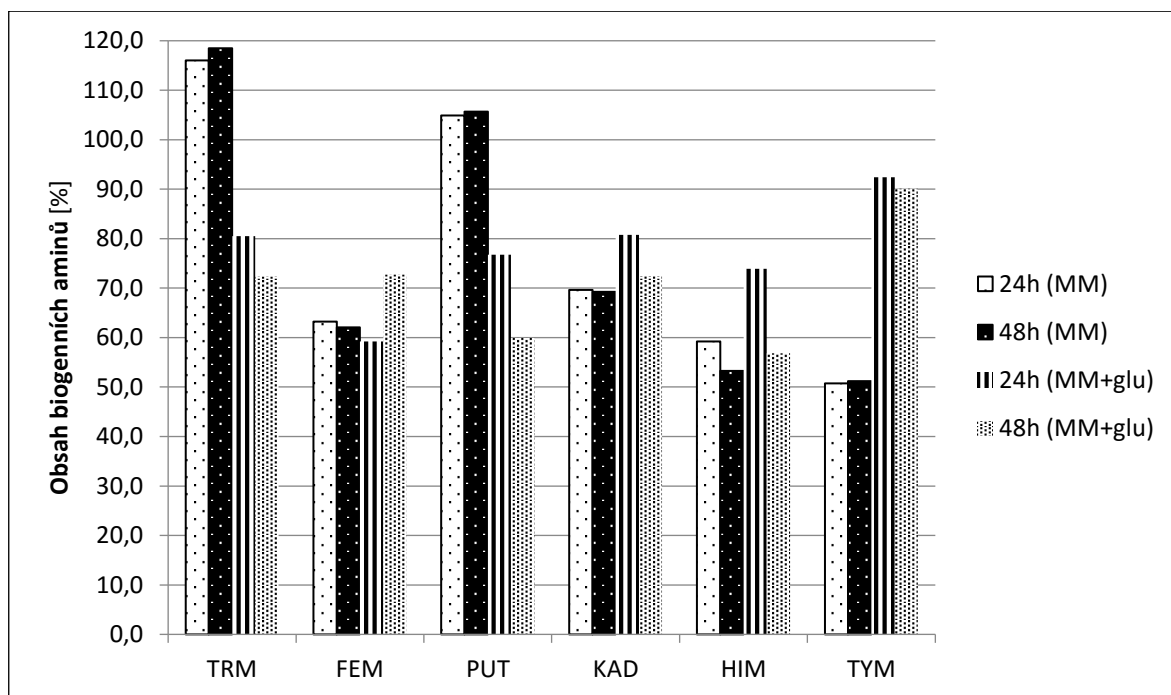
Pozorovaný kmen *Pseudomonas fragis* KS04 měl největší schopnost degradovat tyramin v minerálním médiu s biogenními aminy. Obrázek 6 znázorňuje 60% úbytek koncentrace po 24 i 48 hodinách. V minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou se snížila koncentrace tohoto aminu pouze o 20%. Úbytek putrescinu, kadaverinu a histaminu je srovnatelný. V minerálním médiu s biogenními aminy došlo k minimálnímu snížení. Pouze histamin vykazuje 5% úbytek po 24 i 48 hodinách. Z grafu je patrné, že pokles v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou byl u všech třech biogenních aminů 20% po 24 i 48 hodinách. Fenyletylamin v minerálním médiu s biogenními aminy byl redukován o 40% po 24 i 48 hodinách. Úbytek biogenního aminu v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou byl pouze 20% po 24 i 48 hodinách.



Obrázek 6: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem *Pseudomonas fragi* KS04

5.2.5 Degradace biogenních aminů kmenem *Pseudomonas fragi* KS05

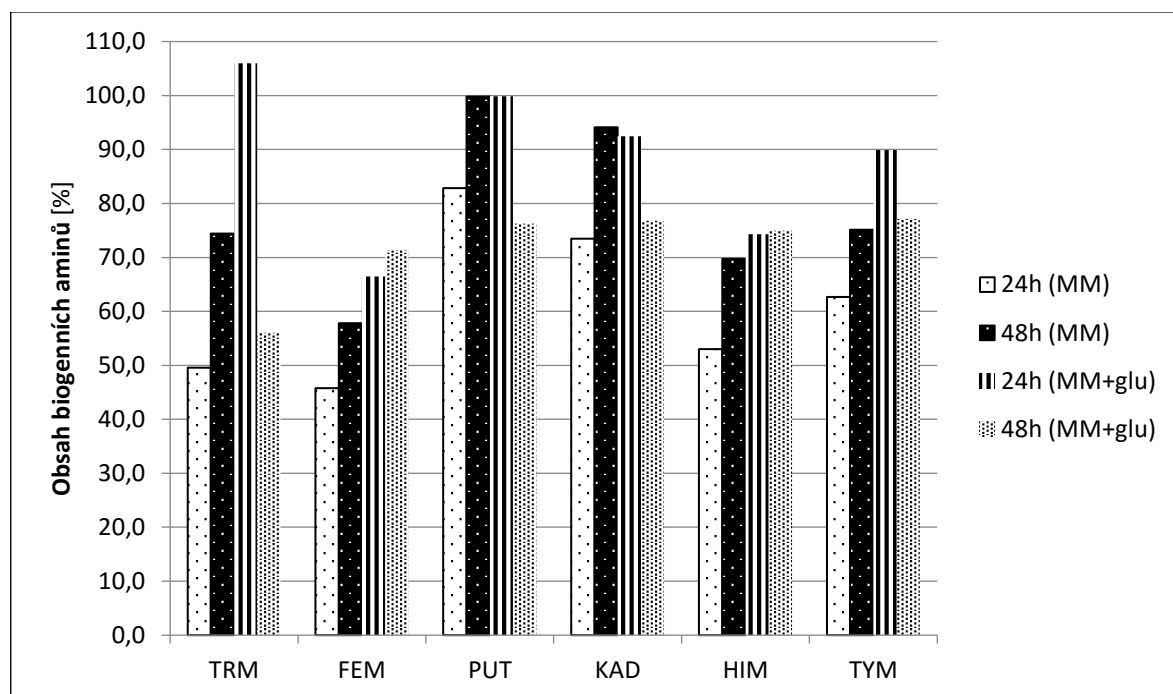
Byla sledována degradace BA kmene *Pseudomonas fragi* KS05. Na obrázku 7 je možno vidět, že hodnoty tryptaminu v minerálním médiu s biogenními aminy jsou vyšší než původní, což značí možnou kontaminaci. Naopak v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou byl pozorován úbytek o 20 % po 24 hodinách a 30% po 48 hodinách. Výraznější úbytek koncentrace byl pozorován u fenyletylaminu. V minerálním médiu s biogenními aminy byl po 24 a 48 hodinách pozorována výsledná koncentrace 60 % a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou po 24 hodinách rovněž 60 % a po 48 hodinách 70 %. Histamin byl redukován o 40 % v minerálním médiu s biogenními aminy po 24 hodinách a po 48 hodinách o jednu polovinu. V minerálním médiu s biogenními aminy s glukózou byl pozorován úbytek o 25 % po 24 hodinách a po 48 hodinách 40 %.



Obrázek 7: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem *Pseudomonas fragi* KS05

5.2.6 Degradace biogenních aminů kmenem *Citrobacter freundii* KS06

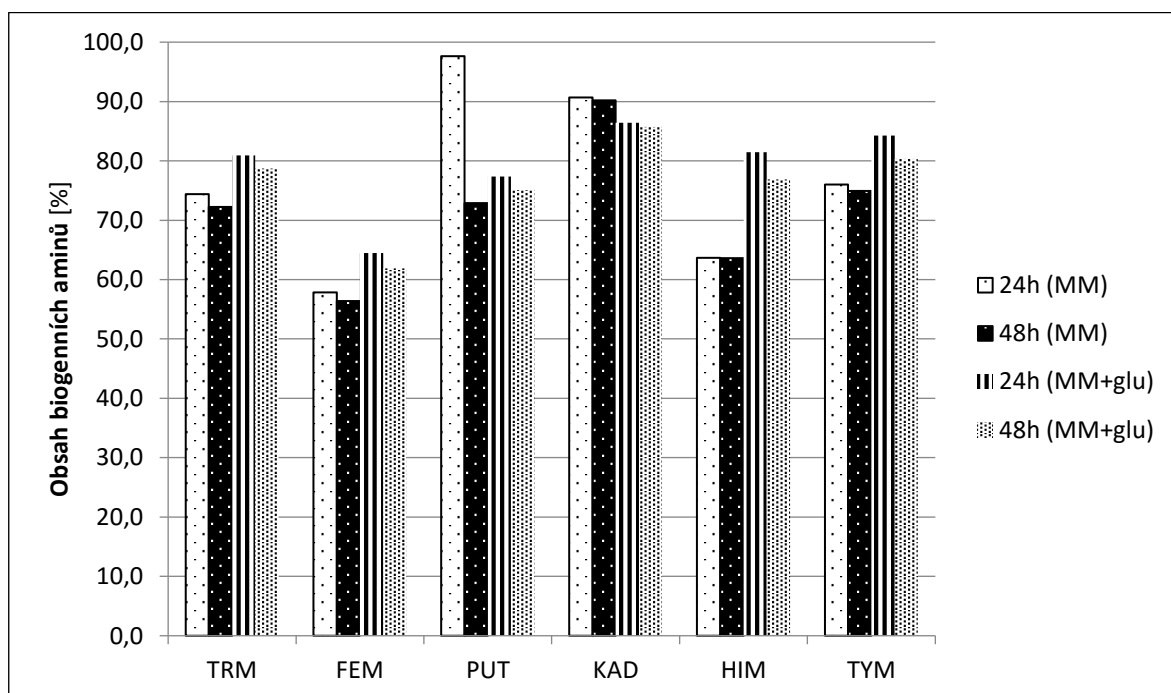
Na obrázku 8 je prezentován poloviční úbytek tryptaminu, fenyletylaminu a histaminu v minerálním médiu s biogenními aminy po 24 hodinách pomocí kmene *Citrobacter freundii* KS06. Vrůst hodnoty tyraminu po 24 hodinové kultivaci v minerálním médiu s biogenními aminy značí pravděpodobnou kontaminaci vzorku. Po 48 hodinové kultivaci ve stejném médiu totiž došlo ke 40% úbytku. Schopnost degradace fenyletylaminu a histaminu je patrná i v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou, úbytek činí zhruba 30 %. Kmen nevykazoval výraznější degradaci putrescinu a kadaverinu. Koncentrace putrescinu byla snížena o cca 20 % a kadaverinu o 25 % po 24 hodinách v minerálním médiu s biogenními aminy i v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou po 48 hodinách kultivace.



Obrázek 8: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem *Citrobacter freundii* KS06

5.2.7 Degradace biogenních aminů kmenem *Citrobacter freundii* KS07

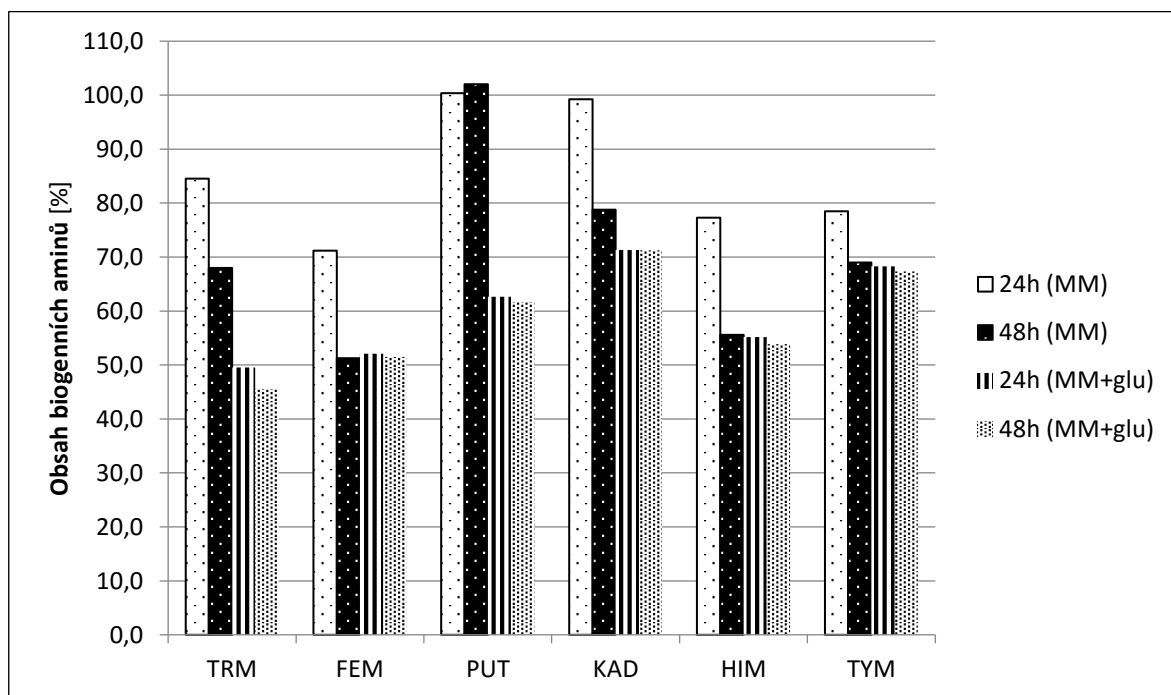
Zkoumaný kmen *Citrobacter freundii* KS07 nejlépe degradoval fenyletylamin. Jak je patrné z grafu na obrázku 9, výsledná koncentrace 60 % byla zaznamenána již po 24 hodinách kultivace v minerálním médiu s biogenními aminy a v minerálním s biogenními aminy a glukózou byl úbytek obdobný. Obsah histaminu se snížil o 1/3 v minerálním médiu s biogenními aminy po 24 hodinách. Putrescin byl degradován v minerálním médiu s biogenními aminy až po 48 hodinách a to o 30 %. Znamky úbytku tohoto aminu byly také 20% v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou.



Obrázek 9: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem *Citrobacter freundii* KS07

5.2.8 Degradace biogenních aminů kmenem *Enterobacter cloacae* KS08

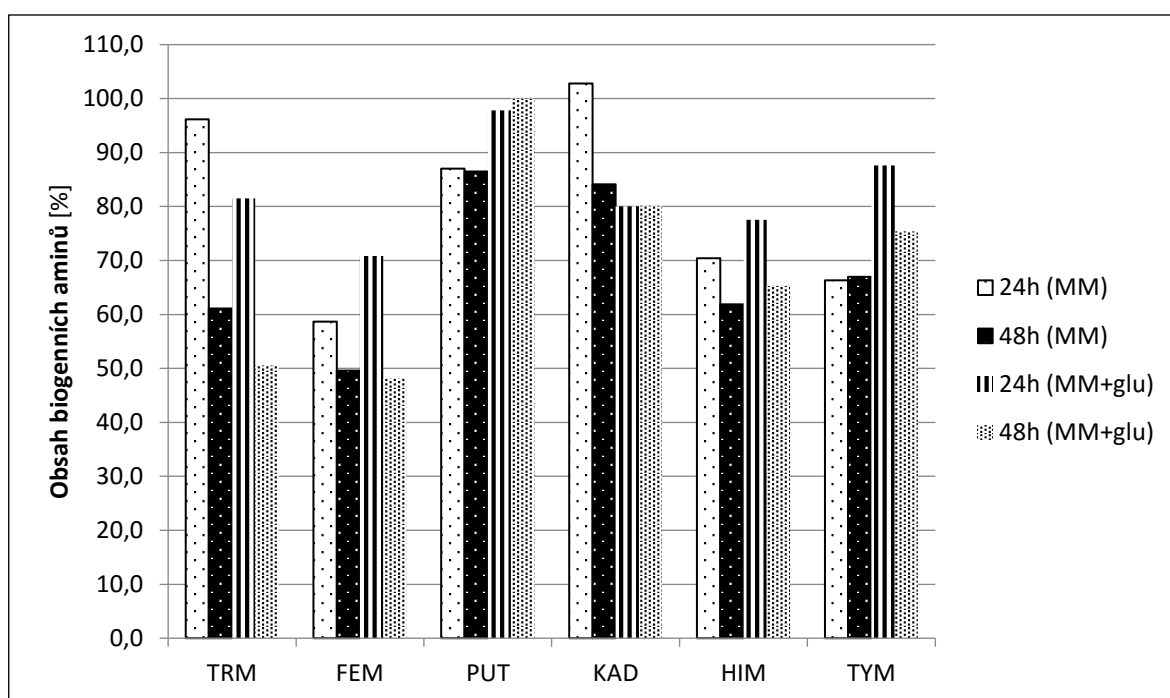
Sledovaná degradace biogenních aminů kmenem *Enterobacter cloacae* KS08 je znázorněna na obrázku 10. K největšímu úbytku tryptaminu, to o 50 % došlo v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou po 24 i 48 hodinách. Kmen degradoval biogenní amin v minerálním médiu s biogenními aminy bez glukózy pouze o 15 % po 24 hodinách a 30 % po 48 hodinách kultivace. Snížení koncentrace fentyletylaminu na 50 % bylo zaznamenáno v minerálním médiu s biogenními aminy po 48 hodinách a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou po 24 i 48 hodinách. Obdobné výsledky byly zjištěny u histaminu. Koncentrace putrescinu poklesla o 40 % pouze v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou po 24 a 48 hodinách kultivace. Mírné zvýšení tohoto aminu v minerálním médiu s biogenními aminy mohlo být způsobeno kontaminací vzorku. Úbytek tyraminu o 1/3 byl zaznamenán v minerálním médiu s biogenními aminy po 48 hodinách a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou po 24 i 48 hodinách.



Obrázek 10: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem *Enterobacter cloacae* KS08

5.2.9 Degradace biogenních aminů kmenem *Enterobacter cloacae* KS09

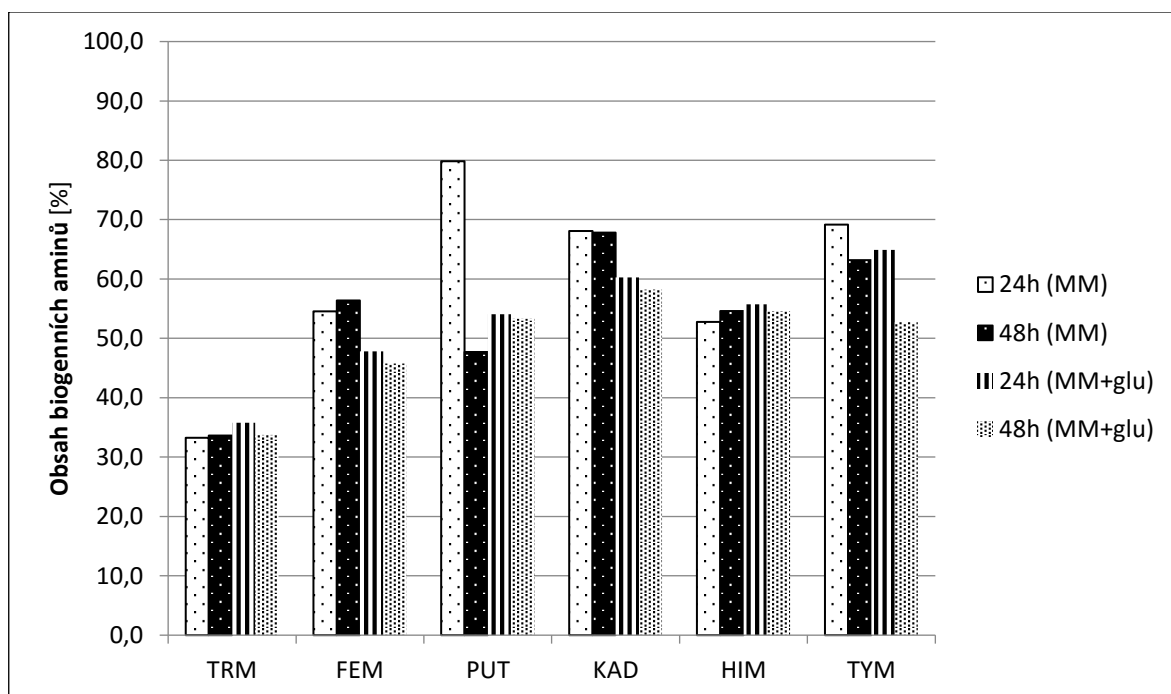
Testovaný kmen *Enterobacter cloacae* KS09 měl největší schopnost degradace fenyletylaminu. Na obrázku 11 je možno vyčíst z grafu, že v minerálním médiu s biogenními aminy došlo k poklesu koncentrace po 24 hodinách o 40 % a po 48 hodinách o polovinu původní hodnoty. V minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou byla koncentrace 70% po 24 hodinách a po 48 hodinách 50%. Úbytek koncentrace histaminu v minerálním médiu s biogenními aminy byla po 24 hodinách 30% a po 48 hodinách 40%. V minerálním médiu s biogenními aminy s glukózou došlo po 24 hodinách ke snížení hodnoty o 20 % a po 48 hodinách o 30 %. Snížení koncentrace putrescinu bylo pouze 10% po 24 i 48 hodinách v minerálním médiu s biogenními aminy. V minerálním médiu s biogenními aminy s glukózou došlo pouze k zanedbatelnému úbytku po 24 hodinách a po 48 hodinách byla hodnota stejná. U kadaverinu můžeme pozorovat menší nárůst v minerálním médiu s biogenními aminy, který byl pravděpodobně způsoben kontaminací vzorku. Avšak po 48 hodinách kultivace je již možné pozorovat úbytek o 20 %. V minerálním médiu s biogenními aminy s glukózou poklesla hodnota koncentrace taktéž o 20 %.



Obrázek 11: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem *Enterobacter cloacae* KS09

5.2.10 Degradace biogenních aminů *Enterobacter cloacae* KS10

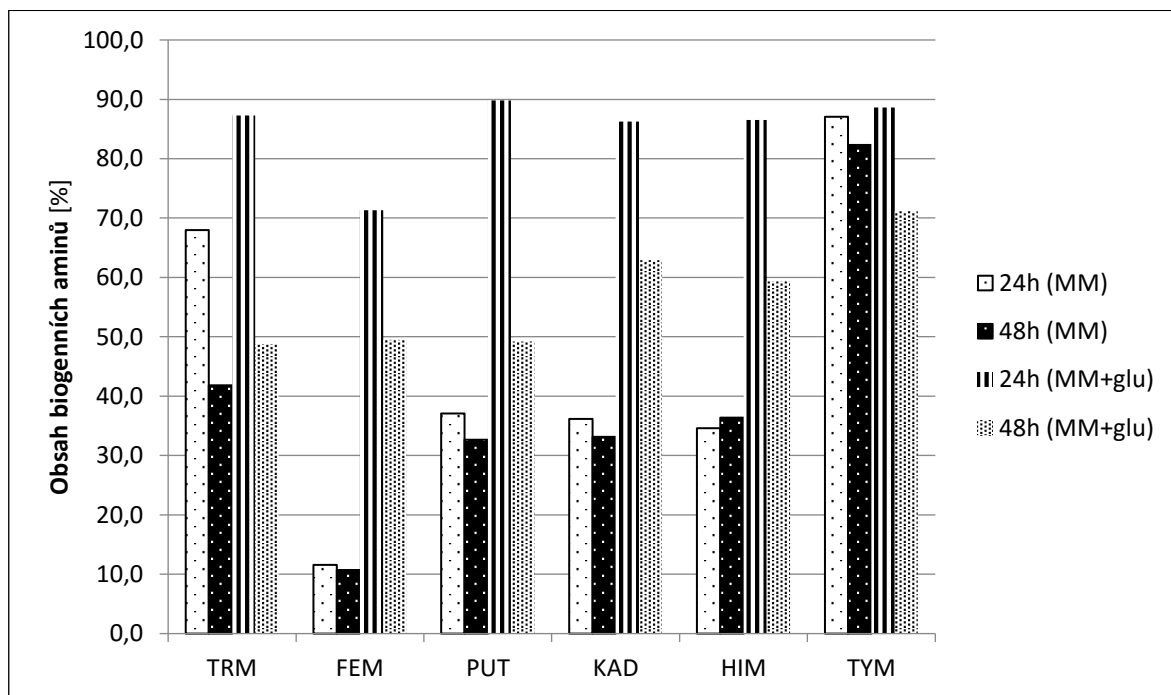
Zkoumaná degradace u kmene *Enterobacter cloacae* KS10 byla, jak je možné pozorovat v grafu na obrázku 12, nejúčinnější u tryptaminu. V obou kultivačních médiích, jak už v minerálním médiu s biogenními aminy a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou, byla konečná koncentrace biogenního aminu snížena na jednu třetinu. Obsah fenyletylaminu a histaminu byl srovnatelný. U obou se konečný obsah v kultivačních médiích i časem pohyboval kolem 50 %. Koncentrace tyraminu byla snížena v minerálním médiu s biogenními aminy po 24 hodinách na 70 %, po 48 hodinách na 75 % a v minerálním médiu s biogenními aminy s glukózou byla hodnota jednu třetinu nižší po 24 hodinách a téměř o polovinu po 48 hodinách.



Obrázek 12: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem *Enterobacter cloacae* KS10

5.2.11 Degradace biogenních aminů kmenem *Escherichia coli* KS11

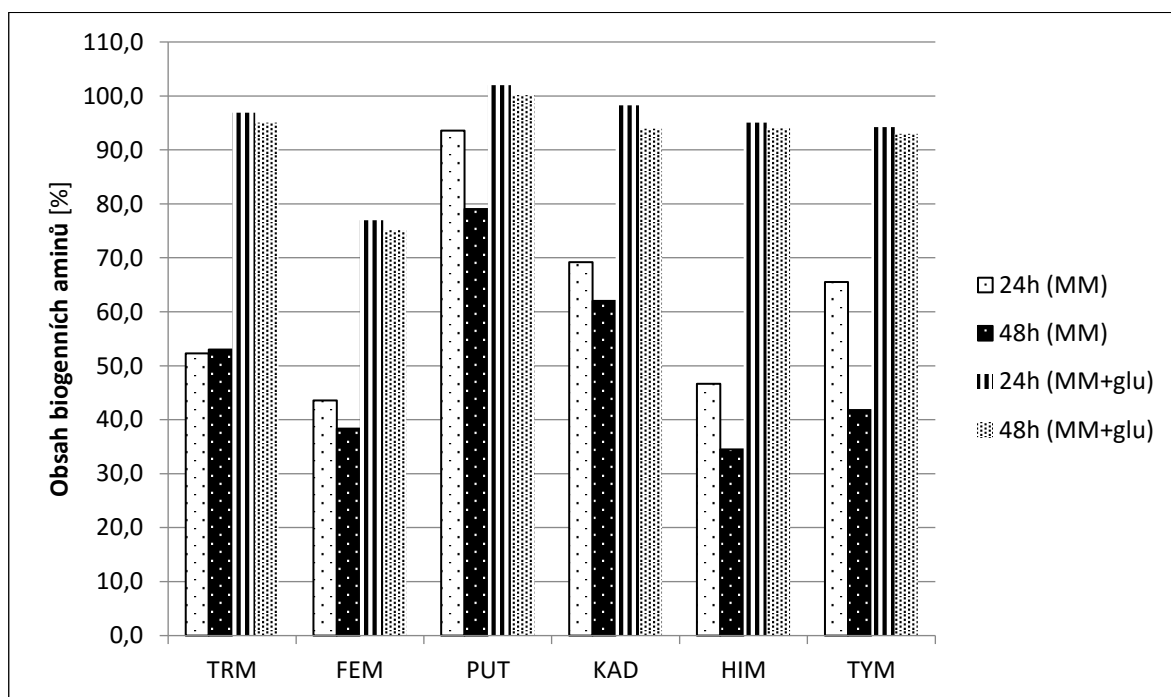
Testovaný kmen *Escherichia coli* KS11 vykazoval největší schopnost degradace fenyletylaminu. Z obrázku 13 je patrné, že po kultivaci v minerálním médiu s biogenními aminy byla jeho koncentrace snížena na jednu desetinu po 24 i 48 hodinách. Obsah v minerálním médiu s biogenními aminy s glukózou byl po 24 hodinách 70% a po 48 hodinách poloviční. Schopnost bakterie degradovat putrescin, kadaverin a histamin byla srovnatelná. V minerálním médiu s biogenními aminy mikroorganismus dokázal redukovat množství na 35 % po 24 i 48 hodinách kultivace. Koncentrace v minerálním médiu s biogenními aminy s glukózou byla po 24 hodinách 90 % a po 48 hodinách u putrescinu poloviční, kadaverinu a histaminu 60 %. Naopak nejnižší účinnost degradace byla pozorována u tyraminu. Jeho obsah byl v minerálním médiu s biogenními aminy po 24 i 48 hodinách 90% a v minerálním médiu s biogenními aminy s glukózou po 24 hodinách taktéž 90% a po 48 hodinách 70%.



Obrázek 13: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem *Escherichia coli* KS11

5.2.12 Degradace biogenních aminů kmenem *Escherichia coli* KS12

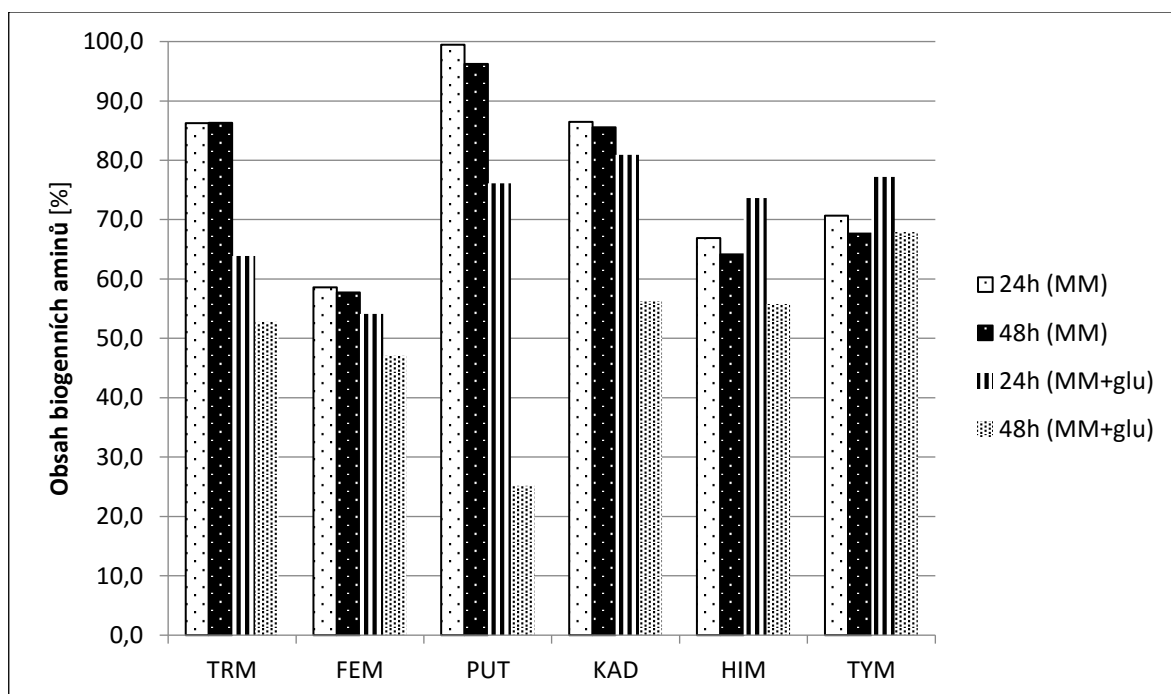
Schopnost degradace BA kmenem *Escherichia coli* KS12 je patrná na obrázku 14. Nejvíce snížená koncentrace byla u fenyletylaminu v minerálním médiu s biogenními aminy. Po 24 a 48 hodinách byla hodnota snížena o 60 %. Velmi snížená schopnost mikroorganismu degradovat biogenní aminy je viditelná v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou. Úbytek biogenních aminů v tomto médiu byl průměrně kolem 5 %. U putrescinu je patrný malý nárůst, jenž může být způsoben kontaminací. Jediným biogenním aminem, u kterého byl zaznamenán větší pokles koncentrace, je fenyletylamin. Činí 20 % po 24 i 48 hodinách. Histamin byl degradován v minerálním médiu s biogenními aminy na polovinu původní hodnoty již po 24 hodinách a po 48 hodinách na 35 %. Koncentrace tryptaminu byla snížena na poloviční hodnotu po 24 i 48 hodinách. Tyramin vykazoval menších hodnot po 48 hodinové kultivaci a to 40 %.



Obrázek 14: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem *Escherichia coli* KS12

5.2.13 Degradace biogenních aminů kmenem *Serratia liquefaciens* KS13

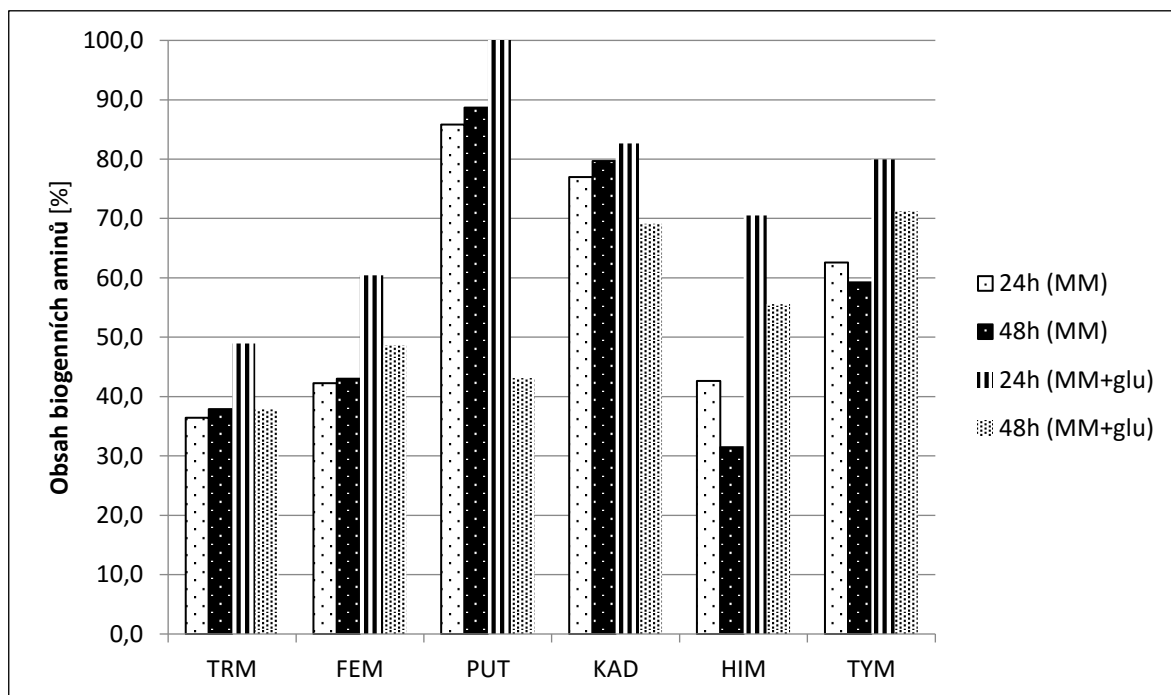
Sledovaná degradační schopnost kmene *Serratia liquefaciens* KS13 je znázorněna na obrázku 15. K největšímu úbytku koncentrace došlo u putrescinu v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou - o 75 % po 48 hodinách, po 24 hodinách byl obsah putrescinu snížen o 25 %. V minerálním médiu s biogenními aminy byl úbytek zanedbatelný. Dalším nejvíce degradovaným biogenním aminem byl fenyletylamin. Jeho koncentrace byla v minerálním médiu s biogenními aminy po 24 i 48 hodinách 60%. V minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou po 24 hodinách 55% a 48 hodinách 45%. Obsah tyraminu v minerálním médiu s biogenními aminy byl po 24 i 48 hodinách 70%. V minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou po 24 hodinách 80% a po 48 hodinách 70%.



Obrázek 15: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem *Serratia liquefaciens* KS13

5.2.14 Degradace biogenních aminů kmenem *Raoultella ornithinolytica* KS14

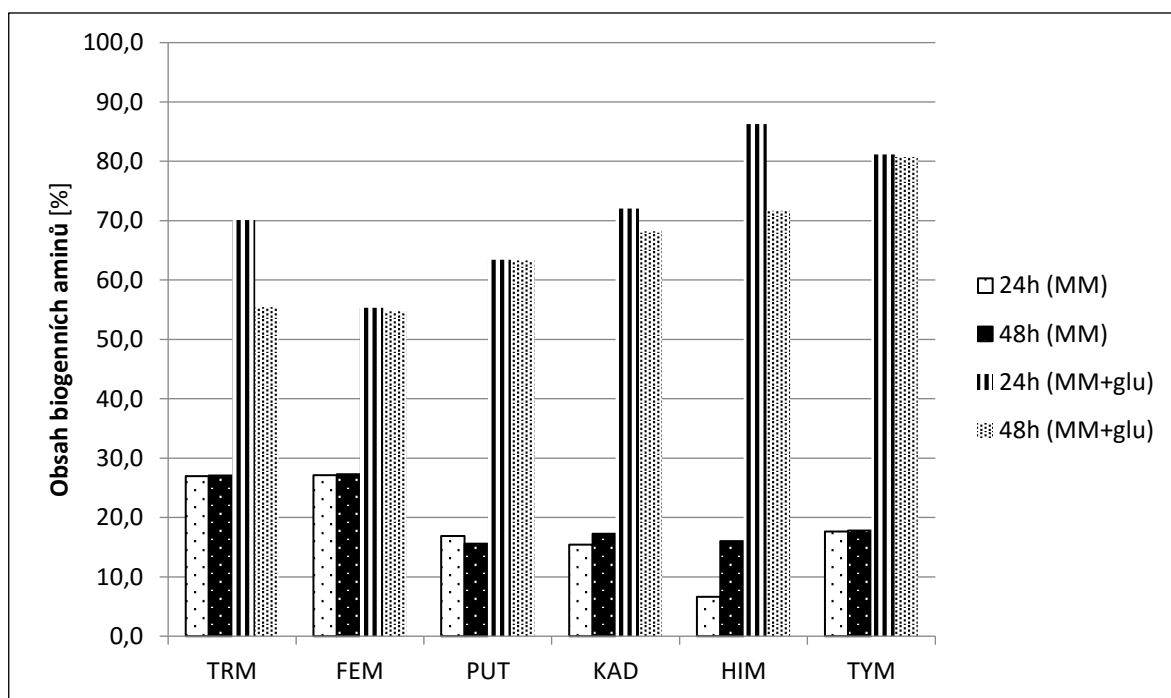
Obrázek 16 prezentuje degradaci biogenních aminů zkoumaným kmenem *Raoultella ornithinolytica* KS14. Zbývající koncentrace tryptaminu a fenyletylaminu v minerálním médiu s biogenními aminy byla 40 % po 24 i 48 hodinové kultivaci. V minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou došlo po 24 hodinách k poklesu koncentrace tryptaminu o polovinu a po 48 hodinách o 60 %, obsah fenyletylaminu byl snížen o 40 % po 24 hodinách a po 48 hodinách o polovinu. Histamin byl redukován v minerálním médiu s biogenními aminy po 24 hodinách na zbývající hodnotu 40 % a po 48 hodinách na 30 %. Degradace byla omezena v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou. Po 24 hodinách došlo k 30% úbytku biogenního aminu a po 48 hodinách k 55% snížení. Bakterie měla nízkou schopnost rozkládat putrescin. Z grafu je patrné, že po kultivaci v minerálním médiu s biogenními aminy po 24 i 48 hodinách došlo pouze k 10% snížení obsahu a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou po 24 hodinách byla koncentrace stejná, avšak po 48 hodinách činila konečná koncentrace hodnotu 40 %.



Obrázek 16: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem *Raoultella ornithinolytica* KS14

5.2.15 Degradace biogenních aminů kmenem *Micrococcus luteus* KS15

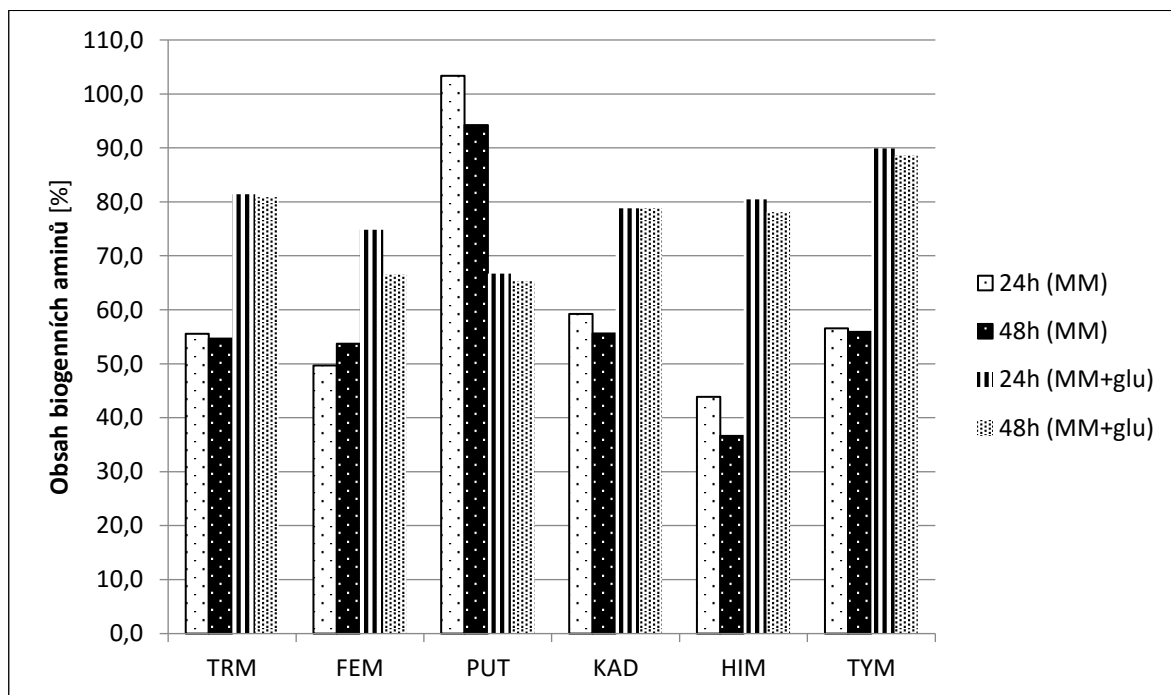
Obrázek 17 znázorňuje schopnost kmene *Micrococcus luteus* KS15 degradovat biogenní aminy. Koncentrace tryptaminu a fenyletylaminu v minerálním médiu s biogenními aminy byla v obou případech snížena na 30 % po 24 i 48 hodinách. Obsah tryptamin v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou byl po 24 hodinách 70%, po 48 hodinách ve stejném médiu byl 55% a stejná hodnota byla také u fenyletylaminu po obou dobách kultivace. Obsah putrescinu a kadaverinu byl snížen na 15 % v minerálním médiu s biogenními aminy po 24 i 48 hodinách. V minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou byl konečný obsah 60 % u putrescinu a 70 % u kadaverinu. Nejnižší koncentrace však byla u histaminu, která činila hodnotu 5 % po 24 hodinách v minerálním médiu s biogenními aminy. Po 48 hodinách byla koncentrace 15 %. V minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou byl obsah biogenního aminu značně vyšší. Po 24 hodinách byla hodnota 90% a po 48 hodinách 70%. Tyramin v minerálním médiu s biogenními aminy dosahoval 20% koncentrace po 24 i 48 hodinách kultivace a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou měl koncentraci 80 % po 24 i 48 hodinách.



Obrázek 17: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem *Micrococcus luteus* KS15

5.2.16 Degradace biogenních aminů kvasinkou *Yarrowia lipolytica* KS16

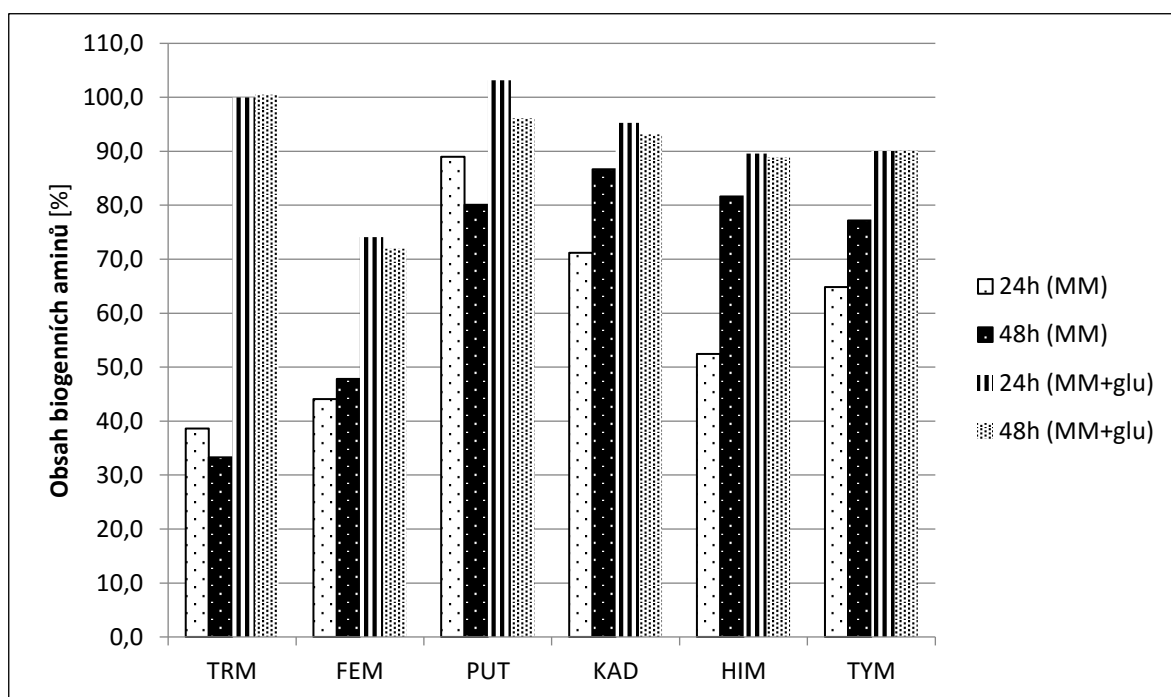
Byla sledována degradace biogenních aminů kvasinkou *Yarrowia lipolytica* KS16. Nejvyšší snížení koncentrace je vidět na obrázku 18 u histaminu. Bylo rozloženo 60 % tohoto aminu v minerálním médiu s biogenními aminy po 24 hodinách i 48 hodinách. V minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou došlo ke 20% poklesu po 24 i 48 hodinách. Výsledná koncentrace tryptaminu a fenyletylaminu byla srovnatelná. V minerálním médiu s biogenními aminy po 24 i 48 hodinách se snížila na polovinu. V minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou zůstalo 80 % tryptaminu po 24 i 48 hodinách a 75 % fenyletylaminu po 24 hodinách a 70 % po 48 hodinách. Došlo k mírnému nárůstu putrescinu v minerálním médiu s biogenními aminy po 24 hodinách. Zvýšení mohlo být způsobeno kontaminací vzorku. Byl však degradován v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou na výslednou koncentraci 70 % po 24 i 48 hodinách.



Obrázek 18: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kvasinkou *Yarrowia lipolytica* KS16

5.2.17 Degradace biogenních aminů kvasinkou *Candida guilliermondii* KS17

Schopnost kvasinky *Candida guilliermondii* KS17 degradovat tryptamin je patrná z obrázku 19. V minerálním médiu s biogenními aminy dokázala snížit obsah biogenního aminu o 60 % po 24 hodinách a 65 % po 48 hodinách. Obsah tryptaminu zůstal naopak v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou beze změny. Koncentrace fenyletylaminu byla snížena o 55 % v minerálním médiu s biogenními aminy po 24 a 48 hodinách. V minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou byl obsah nižší o 30 % po 24 i 48 hodinách. Histamin byl snížen o 30 % v minerálním médiu s biogenními aminy po 24 hodinách, po 48 hodinách o 20 % a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou o 10 %.



Obrázek 19: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kvasinkou *Candida guilliermondii* KS17

5.2.18 Srovnání degradace biogenních aminů izolovanými kmeny

Největší schopnost degradace tryptaminu měl kmen *Micrococcus luteus* KS15. V minerálním médiu s biogenními aminy došlo ke snížení výsledné koncentrace na 30 % po 24 i 48 hodinách. *Enterobacter cloacae* KS10 rovněž snížil výsledné množství biogenního aminu na 30 %, ale v obou minerálních médiích i kultivačních časech.

Fenyletylamin byl nejlépe rozložen kmenem *Escherichia coli* KS11 v minerálním médiu s biogenními aminy po 24 i 48 hodinách, a to na výsledný obsah jednu desetinu. *Micrococcus luteus* KS15 degradoval fenyletylamin ve stejném médiu i kultivačních časech na výslednou hodnotu 30 %.

Kmen *Serratia liquefaciens* KS13 snížil koncentraci putrescinu v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou na jednu čtvrtinu po 48 hodinách kultivace. *Micrococcus luteus* KS15 degradoval biogenní amin na 15 % po 24 i 48 hodinách v minerálním médiu s biogenními aminy.

Výsledná nejnižší koncentrace kadaverinu byla zaznamenána u kmenu *Escherichia coli* KS11 po kultivaci v minerálním médiu s biogenními aminy po 24 i 48 hodinách. Konečná hodnota činila 35 %. *Micrococcus luteus* KS15 snížil koncentraci aminu o 85 %.

Koncentrace histaminu byla snížena na výslednou hodnotu 35 % pomocí kmene *Acinetobacter pittii* KS01 a *Escherichia coli* KS11 po 24 hodinové kultivaci v minerálním médiu s biogenními aminy. *Micrococcus luteus* KS15 dokonce snížil výsledný obsah histaminu ve stejném médiu a kultivačním čase na 5 %.

Nejnižší výsledná koncentrace tyraminu byla vyhodnocena na 40 % po 24 hodinové kultivaci v minerálním médiu s biogenními aminy u kmene *Acinetobacter pittii* KS01. *Micrococcus luteus* KS15 snížil obsah biogenního aminu na 20 % ve stejném médiu jako u předchozího kmene, ale po kultivačním čase 24 i 48 hodin.

6 DISKUZE

Fermentované potraviny a nápoje mají velké predispozice k vysoké akumulaci biogenních aminů, které se stávají nežádoucími až nebezpečnými ke zdraví konzumentů. Jejich častými producenty jsou bakterie mléčného kvašení (kmeny rodů *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, atd.) a gramnegativní bakterie, které se stávají kontaminanty. Nutno ale podotknout, že nízké koncentrace BA plní důležitou metabolickou funkci v lidském organismu – zvláště v nervovém systému a kontrole krevního tlaku. Fenyyletylamin a tyramin způsobují zvýšení krevního tlaku, a naopak histamin jej snižuje. Histamin plní biologickou funkci, která slouží jako primární mediátor okamžitých příznaků zaznamenaných při alergických reakcích. Reakce jsou příkladem toxického potenciálu histaminu. Ačkoliv jiné biogenní aminy jsou mnohem méně toxické než histamin, sekundární aminy (agmatin, spermidin, spermin) mohou tvořit nitrosaminy reakcí s dusitanem a tvořit tak karcinogenní sloučeniny [2, 5].

Existuje mnoho faktorů ovlivňujících výskyt BA. Mikroorganismy způsobující jejich tvorbu mohou být inhibovány vysokým tlakem, použitím potravinářských přídatných látek, obalovým materiálem atd. Bohužel ne vždy je možné faktory ovlivnit snížením produkce BA. Navíc již vytvořené BA není možno odstranit. Příkladem jsou sýry vyrobené z tepelně neošetřeného mléka. Nicméně z důvodu negativního působení BA na lidský organismus se jejich detekcí zabývá mnoho studií. Na základě faktu, že aminooxidáza je zodpovědná za detoxikaci BA, byla zjištěna alternativa v podobě aplikace mikroorganismů obsahujících tento enzym [2].

Cílem prvního experimentu bylo izolovat mikroorganismy degradující biogenní aminy z různých potravinových matic a následně je identifikovat. Izolace byla provedena na základě kultivace v minerálním médiu obohaceném o biogenní aminy, které představovaly zdroj dusíku a uhlíku, a také v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou, kde zdroj uhlíku představovala právě glukóza. Identifikace byla provedena pomocí instrumentální fenotypové metody MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

Úspěšně identifikovaných mikroorganismů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie bylo 17, patřily mezi ně zástupci gramnegativních rodů *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Serratia*, *Raoutella*, grampozitivní *Micrococcus* a kvasinky rodů *Yarrowia* a *Candida*.

Izolací mikroorganismů degradujících biogenní aminy z potravinových matric se také zabývala řada studií. Byli izolováni degradéři z vína, například *Lactobacillus plantarum* J16 a *Pediococcus acidilactici* CECT 5930. Měli vysokou predispozici k degradaci putrescinu. Došlo až k 41 % snížení během 1 týdne. Některé kmeny *Lactobacillus sakei* a *Lactobacillus curvatus* izolované z makrelové pasty byly schopny degradace histaminu [18].

Dále se podařilo izolovat kvasinku *Geotrichum candidum* z Munster sýru, která dokázala po 12 dnech zrání snížit obsah tyraminu [25].

Byl proveden výzkum, kdy se podařilo izolovat několik různých kmenů degradujících tyramin a histamin z různých potravinových matric, například 33 kmenů *Lactobacillus plantarum*, 12 kmenů *Lactobacillus sakei*, čtyři kmeny *Lactobacillus pentosus*, dva kmeny *Lactobacillus faciminis*, jeden *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus mali* [6].

V rámci druhého experimentu bylo úkolem ověřit schopnosti degradace vybraných biogenních aminů izolovanými kmeny v minerálním médiu s biogenními aminy a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou. Nejlepším degradérem všech zkoumaných biogenních aminů byl *Micrococcus luteus* KS15. Snížil koncentraci BA nejméně o 70 % a nejvíce pak degradoval histamin, jehož konečná hodnota činila 5 % po 24 hodinách v minerálním médiu s biogenními aminy. Po 48 hodinách byla koncentrace 15 %. V minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou byl obsah biogenního aminu značně vyšší. Mikroorganismus se rovněž podařilo izolovat z vína ve studii Callejón a kol. [18], kteří zjistili schopnost degradace tyraminu. Dalším dobře degradujícím mikroorganizmem byl *Pseudomonas fragi* KS03. Jeho schopnost byla nejlepší v minerálním médiu s biogenními aminy po 24 i 48 hodinách. Tento kmen snížil koncentraci tryptaminu, fenyletylaminu a histaminu vždy o minimálně 3/4. Kmen *Escherichia coli* KS11 dokázal snížit koncentraci fenyletylaminu v minerálním médiu s biogenními aminy o 90 % a koncentraci putrescinu, kadaverinu a histaminu o 60 %. Zbylé kmeny mikroorganismů degradovaly biogenní aminy méně.

Byla provedena studie, při které byly izolovány kmeny *Staphylococcus carnosus* FS19 a *Bacillus amyloliquefaciens* FS05 z rybí omáčky. Vykazovaly aminooxidázovou aktivitu a byly použity jako startérové kultury. Dokázaly snížit koncentraci histaminu o 27,7 % a 15,4 %. Po 120 dnech fermentace byla celková koncentrace biogenních aminů nižší o 15,9 % a 12,5 % ve vzorcích v porovnání s těmi kontrolními [22].

Byla zkoumána schopnost kmene *Lactobacillus plantarum* ZY-40 redukovat akumulaci biogenních aminů během fermentace rybí klobásy. Inokulace uvedeným mikroorganizmem způsobila rapidní pokles pH a vznik volných aminokyselin, rovněž byl potlačen růst nežádoucích mikroorganismů kmene *Pseudomonas* a také enterobakterií. *Lactobacillus plantarum* ZY-40 byl schopný snížit koncentraci putrescinu a kadaverinu o více než 70 %, ale nezpůsobil změnu koncentrace tyraminu [34].

Dosažené výsledky nabízí potenciální možnosti využití mikroorganismů degradujících biogenní aminy v potravinářství. Schopnost degradérů je zvláště žádaná v oblastech, kde se tvorba BA nedá zastavit jinými preventivními faktory. Praktická část této práce, ale i některé další publikace dokazují pozitivní výsledky snižování obsahu BA u druhu *Micrococcus luteus*. Mikroorganismus je obligátně aerobní grampozitivní kok vyskytující se v různých prostředích, například ve vodě a půdě, ale také na lidské kůži, v mléčných i dalších živočišných produktech a v pivu [35]. Byla provedena studie, při které byla zjištěna antimikrobiální aktivita *Micrococcus luteus* proti patogenům, jako je například *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* a *Escherichia coli* [35]. Díky nízké okyselující aktivitě v médiu může být tento organismus využit v produktech, kde je žádoucí hodnota pH blízká neutrálnímu, například v některých mléčných výrobcích. Mohla by tedy být využita schopnost, jak už degradovat biogenní aminy, tak i snižovat koncentrace vyskytujících se patogenů.

ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na biogenní aminy a izolaci mikroorganismů degradujících tyto látky. V rámci praktické části se podařilo izolovat degradéry, následně je identifikovat a rovněž ověřit jejich schopnost snižování koncentrace BA.

Na základě dosažených výsledků lze uvést, že:

- z 54 potravinových matric bylo celkem izolováno 18 degradérů, což značí poměrně nízké zastoupení mikroorganismů degradujících biogenní aminy v potravinách. Minerální médium má nižší koncentraci živin, což může rovněž způsobit problémy s izolací,
- podařilo se identifikovat pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie 17 degradérů,
- stanovením úbytku koncentrace biogenních aminů metodou HPLC byla u všech 17 izolovaných mikroorganismů potvrzena schopnost degradace,
- jediný zdroj dusíku a uhlíku v minerálním médiu s biogenními aminy představovaly právě biogenní aminy,
- u jednotlivých izolátů byla zaznamenána rozdílná schopnost degradace BA,
- přídavek glukózy výrazně ovlivnil schopnost degradace biogenních aminů, protože plnil úlohu jediného zdroje uhlíku pro mikroorganismy, v médiu s glukózou byla u většiny kmenů zjištěna nižší schopnost degradace biogenních aminů
- izolát identifikovaný jako *Micrococcus luteus* KS15 vykazoval nejlepší schopnost snížení biogenních aminů, a to o 70 %, nejvíce pak degradoval histamin, jehož konečná hodnota činila 5 % po 24 hodinové kultivaci v minerálním médiu s biogenními aminy.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SANTON, M. S. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 29. 2-3: 213-231. 1996. ISSN: 01681605.
- [2] ALVAREZ, M. A., MORENO-ARRIBAS M. V. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Food Science and Technology*. 146-155. 2014. ISSN: 00236438
- [3] ÖNAL A., Current analytical methods for determination of biogenic amines in foods. *Food chemistry*. 103: 1475-1486. 2006. ISSN: 03088146
- [4] NAILA, A., FLINT, S. FLETCHER, G., BREMER, P., MEERDINK, G. Control of Biogenic Amines in Food—Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science.*, 75, no. 7 s. 139-150. 2010. ISSN:0022-1147
- [5] HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., SIMON-SAKARDI L., HOLZAPFEL W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*. 42-49, 1994, vol 5. ISSN: 09242244
- [6] LEUSCHNER, R. G; HEIDEL, M.; HAMMES, W. P. Histamine and Tyramine Degradation by Food Fermenting Microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 1998, vol. 39, no. 1 s. 1-10. ISSN:0168-1605.
- [7] NAILA, A., FLINT, S., FLETCHER, G.C., BREMER, P.J., MEERDINK, G., MORTON, R.H. Prediction of the Amount and Rate of Histamine Degradation by Diamine Oxidase (DAO). *Food Chemistry*. 2012, vol. 135, no. 4 s. 2650-2660. ISSN:0308-8146.
- [8] SUZZI, G; TORRIANI, S. Editorial: Biogenic Amines in Foods. *Frontiers in Microbiology*. 2015, vol. 6, no. MAY s. 472-473. ISSN:1664-302X.
- [9] TORRIANI, S.; SUZZI, G. Biogenic Amines in Fermented Foods. *Frontiers Media SA*. 2015. ISSN 1664-8714.
- [10] BENKERROUM, N. Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means: Biogenic Amines in Dairy Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016, vol. 15, no. 4 s. 801-826. ISSN:1541-4337.
- [11] CALZADA, J., OLMO, A. d., PICÓN, A., GAYA, P., NUÑEZ, M. Reducing Biogenic-Amine-Producing Bacteria, Decarboxylase Activity, and Biogenic Amines in Raw Milk

Cheese by High-Pressure Treatments. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, vol. 79, no. 4 s. 1277-1283. ISSN:0099-2240.

[12] RABIE, M. A., SILIHA, H., EL-SAIDY, S., EL-BADAWY, A. A., MALCATA, F. X. Reduced Biogenic Amine Contents in Sauerkraut Via Addition of Selected Lactic Acid Bacteria. *Food Chemistry*. 2011, vol. 129, no. 4 s. 1778-1782. ISSN:0308-8146.

[13] KALAČ, P.; ŠPIČKA, J.; KRÍŽEK, M.; PELIKÁNOVÁ, T. Changes in Biogenic Amine Concentrations During Sauerkraut Storage. *Food Chemistry*. 2000, vol. 69, no. 3 s. 309-314. ISSN:0308-8146.

[14] STADNIK, J.; DOLATOWSKI, Z.. Biogenic Amines in Meat and Fermented Meat Products. *Acta Scientiarum Polonorum : Technologia Alimentaria*. 2010, vol. 9, no. 3 s. 251-263. ISSN:1644-0730.

[15] BOVER-CID, S.; MIGUELEZ-ARRIZADO, M. J.; LUZ LATORRE MORATALLA, L.; VIDAL CAROU, M. Carmen. Freezing of Meat Raw Materials Affects Tyramine and Diamine Accumulation in Spontaneously Fermented Sausages. *Meat Science*. 2006, vol. 72, no. 1 s. 62-68. ISSN:0309-1740.

[16] KALAČ, P.; ŠAVEL, J.; KRÍŽEK, M.; PELIKÁNOVÁ, T.; PROKOPOVÁ, M. Biogenic Amine Formation in Bottled Beer. *Food Chemistry*. 2002, vol. 79, no. 4 s. 431-434. ISSN:0308-8146.

[17] GUO, Y.; YANG, Y.; PENG, Q.; HAN, Y. Biogenic Amines in Wine: A Review. *International Journal of Food Science & Technology*. 2015, vol. 50, no. 7 s. 1523-1532. ISSN:0950-5423.

[18] CALLEJÓN, S; SENDRA, R; FERRER, S; PARDO, I. Identification of a Novel Enzymatic Activity from Lactic Acid Bacteria Able to Degrade Biogenic Amines in Wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014, vol. 98, no. 1 s. 185-198. ISSN:0175-7598.

[19] MORET, S.; SMELA, D.; POPULIN, T.; CONTE, L. S .A. Survey on Free Biogenic Amine Content of Fresh and Preserved Vegetables. *Food Chemistry*. 2005, vol. 89, no. 3 s. 355-361. ISSN:0308-8146.

[20] VISCIANO, P., SCHIRONE, M; TOFALO, R; SUZZI, G. Histamine Poisoning and Control Measures in Fish and Fishery Products. *Frontiers in Microbiology*. 2014, vol. 5 s. 500-502. ISSN:1664-302X.

- [21] MONDOVÁ, B., ROTILIO, G., COSTA, M., FINAZZI-AGRÀ, A., CHIANCONE, E., HANSEN, R., BEINERT, H. Diamine Oxidase from Pig Kidney. *Journal of Biological Chemistry*. 1967, vol. 242, no. 61160. ISSN:0021-9258.
- [22] ZAMAN, M., Z., ABU BAKAR, F., JINAP, S., BAKAR, J. Novel Starter Cultures to Inhibit Biogenic Amines Accumulation During Fish Sauce Fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, vol. 145, no. 1 s. 84-91. ISSN:0168-1605
- [23] CUEVA, C., GARCÍA-RUIZ, A., GONZÁLEZ-ROMPINELLI, E., BARTOLOME, B., MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J., SALAZAR, O., VICENTE, M.F., BILLS, G.F., MORENO-ARRIBAS, M.V. Degradation of Biogenic Amines by Vineyard Ecosystem Fungi. Potential Use in Winemaking: Biogenic Amines Removal by Vineyard Ecosystem Fungi. *Journal of Applied Microbiology*. 2012, vol. 112, no. 4 s. 672-682. ISSN:1364-5072.
- [24] BÄUMLISBERGER, M., MOELLECKEN, U., KÖNIG, H., CLAUS, H. The Potential of the Yeast *Debaryomyces Hansenii* H525 to Degrade Biogenic Amines in Food. *Microorganisms*. 2015, vol. 3, no. 4 s. 839-850. ISSN:2076-2607.
- [25] LEUSCHNER, R. G. K., HAMMES, W. P. Degradation of Histamine and Tyramine by *Brevibacterium Linens* During Surface Ripening of Munster Cheese. *Journal of Food Protection*. 1998, vol. 61, no. 7 s. 874-878. ISSN: 0362-028X.
- [26] NAILA A., FLINT S., FLETCHER G. C., BREMER P., MEERDINK G. Histamine Degradation by Diamine Oxidase, *Lactobacillus* and *Vergibacillus halodonitrificans* Nail 18. *Food Process Technol*. 2012, vol. 3, no. 6 s. ISSN: 2157-7110
- [27] CAPOZZI, V., RUSSO, P., LADERO, V., FERNÁNDEZ, M., FIOCCO, D., ALVAREZ, M. A., GRIECO, F., SPANO, G. Biogenic Amines Degradation by *Lactobacillus Plantarum*: Toward a Potential Application in Wine. *Frontiers in Microbiology*. 2012, vol. 3 s. 122-127. ISSN:1664-302X.
- [28] HERRERO-FRESNO, A., MARTÍNEZ, N., SÁNCHEZ-LLANA, E., DÍAZ, M., FERNÁNDEZ, M., MARTIN, M. C., LADERO, V., ALVAREZ, M. A. *Lactobacillus Casei* Strains Isolated from Cheese Reduce Biogenic Amine Accumulation in an Experimental Model. *International Journal of Food Microbiology*. 2012, vol. 157, no. 2 s. 297-304. ISSN:0168-1605.

- [29] CALLEJÓN, S., SENDRA, R., FERRER, S., PARDO, I. Ability of *Kocuria varians* LTH 1540 to degrade putrescine: identification and characterization of a novel amine oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63.16: 4170-4178. 2015. ISSN 1520-5118.
- [30] LEUSCHNER, R.G.K; HAMMES, W.P. Tyramine Degradation by Micrococci During Ripening of Fermented Sausage. *Meat Science*. 1998, vol. 49, no. 3 s. 289-296. ISSN:0309-1740.
- [31] ZAMAN, M. Z., ABU BAKAR, F., SELAMAT, J., BAKAR, J., ANG, S. S., CHONG, C. Y. Degradation of Histamine by the Halotolerant *Staphylococcus Carnosus* FS19 Isolate Obtained from Fish Sauce. *Food Control*. 2014, vol. 40, no. 1 s. 58-63. ISSN:0956-7135.
- [32] MAH, J-H.; HWANG, H-J. Inhibition of Biogenic Amine Formation in a Salted and Fermented Anchovy by *Staphylococcus Xylosus* as a Protective Culture. *Food Control*. 2009, vol. 20, no. 9 s. 796-801. ISSN:0956-7135.
- [33] ARCOS, M., OLIVERA, E. R., ARIAS, S., NAHARRO, G., LUENGO, J. M. The 3,4-dihydroxyphenylacetic Acid Catabolon, a Catabolic Unit for Degradation of Biogenic Amines Tyramine and Dopamine in *Pseudomonas Putida* U. *Environmental Microbiology*. 2010, vol. 12, no. 6 s. 1684-1704. ISSN:1462-2912.
- [34] ZHANG, Q., LIN, S., NIE, X. Reduction of Biogenic Amine Accumulation in Silver Carp Sausage by an Amine-negative *Lactobacillus Plantarum*. *Food Control*. 2013, vol. 32, no. 2 s. 496-500. ISSN:0956-7135.
- [35] AKBAR, A., SITARA, U., ALI, I., MUHAMMAD, N., KHAN, SA. Isolation and Characterization of Biotechnologically Potent *Micrococcus Luteus* Strain from Environment. *Pakistan Journal of Zoology*. 2014, vol. 46, no. 4 s. 967-973. ISSN:0030-9923.
- [36] BOVER CID, S., MIGUÉLEZ-ARRIZADO, M. J., BECKER, Biserka; HOLZAPFEL, Wilhelm H; VIDAL-CAROU, M. Carmen. Amino Acid Decarboxylation by *Lactobacillus Curvatus* CTC273 Affected by the PH and Glucose Availability. *Food Microbiology*. 2008, vol. 25, no. 2 s. 269-277. ISSN:0740-0020.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BA Biogenní aminy.

BMK Bakterie mléčného kvašení.

DAO Diaminooxidáza.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Chemické struktury některých biogenních aminů [3].....	13
Obrázek 2: Metabolické cesty vzniku biogenních aminů [5]	15
Obrázek 3: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem <i>Acinetobacter pittii</i> KS01	34
Obrázek 4: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem <i>Pseudomonas proteolytica</i> KS02	35
Obrázek 5: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem <i>Pseudomonas fragi</i> KS03.....	36
Obrázek 6: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem <i>Pseudomonas fragi</i> KS04.....	37
Obrázek 7: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem <i>Pseudomonas fragi</i> KS05.....	38
Obrázek 8: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem <i>Citrobacter freundii</i> KS06	39
Obrázek 9: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem <i>Citrobacter freundii</i> KS07	40
Obrázek 10: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem <i>Enterobacter cloacae</i> KS08.....	41
Obrázek 11: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem <i>Enterobacter cloacae</i> KS09.....	42
Obrázek 12: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem <i>Enterobacter cloacae</i> KS10.....	43

Obrázek 13: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem <i>Escherichia coli</i> KS11	44
Obrázek 14: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem <i>Escherichia coli</i> KS12	45
Obrázek 15: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem <i>Serratia liquefaciens</i> KS13	46
Obrázek 16: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem <i>Raoultella ornithinolytica</i> KS14	47
Obrázek 17: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kmenem <i>Micrococcus luteus</i> KS15	48
Obrázek 18: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kvasinkou <i>Yarrowia lipolytica</i> KS16	49
Obrázek 19: Degradace biogenních aminů v minerálním médiu s biogenními aminy (MM) a v minerálním médiu s biogenními aminy a glukózou (MM+glu) kvasinkou <i>Candida guilliermondii</i> KS17	50

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Seznam jednotlivých skupin potravinových matric, u kterých byla provedena izolace degradérů	26
Tabulka 2: Identifikace izolovaných mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS	32