

Dekarboxylázová aktivita kmenů izolovaných z kefíru

Bc. Jitka Bláhová

Diplomová práce
2019

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jitka Bláhová**
Osobní číslo: **T17307**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Dekarboxylázová aktivita kmenů izolovaných z kefiru**

Zásady pro vypracování:

1. Teoretická část

1. Charakteristika a význam biogenních aminů.
2. Faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů.
3. Výskyt biogenních aminů v potravinách živočišného původu.
4. Technologie výroby kefirů.

2. Praktická část

1. Identifikace kmenů izolovaných z kefiru.
2. Skrining bakterií izolovaných z kefiru na dekarboxylázovou aktivitu.
3. Zpracování výsledků a formulace závěrů.

Rozsah diplomové práce:
Rozsah příloh:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

- [1] SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, vol. 29, p. 213–231.
- [2] LADERO, V., CALLES, M., FERNÁNDEZ, M., ALAVREZ, M. Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. *Current Nutrition and Food Science*, 2010, vol. 6, no. 2, p. 145–156.
- [4] GARDINI, F., ÖZOGUL, Y., SUZZI, G., TABANELLI, G., ÖZOGUL, F. Technological Factors Affecting Biogenic Amine Content in Foods: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 2016, vol. 7, p. 1–18.
- [5] SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 1996, vol. 29, p. 675–690.
- [6] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., HLOBILOVÁ, M., VANÁTKOVÁ, Z., NOVÁKOVÁ, D. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*, 2009, vol. 229, p. 533–538.
- [7] KALAČ, P. A P., KRAUSOVÁ. 2005. A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*, vol. 90, no. 1–2, p. 219–230.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Khatantuul Purevdorj**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **2. února 2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **3. května 2019**

Ve Zlíně dne 2. února 2019

LS.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Jiří Mlček, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit 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

.....

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 nevydávalečně 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 nahlázení 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).

⁹⁾ 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 jim 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

Cílem této diplomové práce bylo studium dekarboxylázové aktivity kmenů izolovaných ze 3 druhů kefirů a jejich kefirových zrn (mléčné kefir Manta a Flower a vodní kefir). U všech kmenů byly hodnoceny morfologické makroskopické znaky, dále bylo provedeno Gramovo barvení a vybrané biochemické testy za účelem ověřit mikrobiologickou čistotu izolátů. Jednotlivé kmene byly identifikovány metodou MALDI/TOF MS.

Celkem bylo testováno 171 kmenů, z toho bylo zastoupeno 13 kmenů z čeledi *Enterobacteriaceae*, 62 kmenů kvasinek a 96 kmenů z rodu *Lactobacillus*. Byla zkoumána produkce 8 biogenních aminů (tryptaminu, 2-fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu). Pro stanovení koncentrací biogenních aminů byla využita metoda HPLC – UV/VIS. Každý izolát byl analyzován 6krát a výsledky byly vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka v [mg/l].

U všech testovaných kmenů byla zjištěna produkce 2-fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu, tyraminu a sperminu. Schopnost produkce histaminu byla prokázána pouze u 10 izolátů. U žádného kmene nebyl detekován tryptamin ani spermidin.

Klíčová slova: kefir, kefirová zrna, biogenní aminy, MALDI/TOF MS, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

ABSTRACT

The aim of this thesis was to study the decarboxylase activity of strains isolated from 3 kinds of kefir and their kefir grains (milk kefir Manta and Flower and water kefir). All strains were evaluated for morphological macroscopic features, Gram staining and selected biochemical tests were performed to verify the microbiological purity of the isolates. Individual strains were identified by the MALDI/TOF MS method.

A total of 171 strains were tested, of which 13 strains of Enterobacteriaceae, 62 strains of yeast and 96 strains of Lactobacillus were represented. The production of 8 biogenic amines (tryptamine, 2-phenylethylamine, putrescine, cadaverine, histamine, tyramine, spermidine and spermine) was investigated. The HPLC - UV/VIS method was used to determine the concentrations of biogenic amines. Each isolate was analyzed 6 times and the results were expressed as mean \pm standard deviation in [mg/l].

All strains were found to produce 2-phenylethylamine, putrescine, cadaverine, tyramine and spermine. Only 10 isolates have been shown to produce histamine. No strain produced tyramine or spermidine.

Keywords: kefir, kefir grains, biogenic amines, MALDI/ TOF MS, high performance liquid chromatography

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych velmi ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Khatantuul Purevdorj za odborné vedení mé práce, ochotnost, trpělivost, její cenné rady a čas, který mi věnovala při konzultacích a také laborantkám Bc. Veronice Kučabové a Ing. Olze Vlčkové za jejich pomoc v laboratoři při praktické části diplomové práce. Děkuji také především své rodině za podporu během celého studia.

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

OBSAH

ÚVOD.....	11
I. TEORETICKÁ ČÁST	12
1 KEFÍR	13
1.1 CHARAKTERISTIKA KEFÍRU	13
1.2 KEFÍROVÁ ZRNA	14
1.3 TECHNOLOGIE VÝROBY KEFÍRŮ.....	16
1.3.1 Mléčný kefír	16
1.3.2 Vodní kefír	18
2 BIOGENNÍ AMINY.....	19
2.1 CHARAKTERISTIKA A ROZDĚLENÍ	19
2.2 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ	20
2.3 FUNKCE BIOGENNÍCH AMINŮ V ORGANISMU	21
2.4 TOXICITA BIOGENNÍCH AMINŮ	22
2.5 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH ŽIVOČIŠNÉHO PŮVODU.....	24
2.5.1 Mléko	24
2.5.2 Sýry	24
2.5.3 Jogurty.....	25
2.5.4 Kefíry	25
2.6 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU BIOGENNÍCH AMINŮ	25
2.6.1 Teplota.....	25
2.6.2 Koncentrace solí.....	26
2.6.3 pH.....	26
2.6.4 Přítomnost kyslíku	26
2.6.5 Přítomnost sacharidů.....	27
2.7 MOŽNOSTI REDUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ	27
2.7.1 Použití startérových kultur	27
2.7.2 Pasterizace.....	28
2.7.3 Degradace biogenních aminů s využitím aminooxidáz	28
3 MIKROORGANISMY S DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITOU	29
3.1 ČELEĎ <i>ENTEROBACTERIACEAE</i>	30
3.1.1 Rod <i>Escherichia</i>	30
3.1.2 Rod <i>Enterobacter</i>	30
3.1.3 Rod <i>Citrobacter</i>	31
3.1.4 Rod <i>Klebsiella</i>	31
3.1.5 Rod <i>Serratia</i>	31
3.1.6 Rod <i>Salmonella</i>	31
3.1.7 Rod <i>Proteus</i>	31
3.2 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	32
3.2.1 Rod <i>Lactobacillus</i>	32
3.2.2 Rod <i>Lactococcus</i>	33
3.2.3 Rod <i>Leuconostoc</i>	33

3.2.4	Rod <i>Enterococcus</i>	33
3.2.5	Rod <i>Oenococcus</i>	34
3.2.6	Rod <i>Pediococcus</i>	34
3.3	KVASINKY.....	34
II.	PRAKTICKÁ ČÁST	36
4	CÍLE PRÁCE	37
5	MATERIÁL A METODY	38
5.1	ZAŘÍZENÍ, PŘÍSTROJE A POMŮCKY	38
5.2	KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	38
5.3	POUŽITÉ MIKROORGANISMY.....	39
5.4	CHARAKTERISTIKA IZOLOVANÝCH KMENŮ	40
5.4.1	Morfologické makroskopické znaky	40
5.4.2	Gramovo barvení.....	40
5.4.3	KOH test.....	40
5.4.4	Test na průkaz katalázy	40
5.4.5	Oxidázový test.....	41
5.4.6	Identifikace kmenů metodou MALDI/TOF MS	41
5.5	STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ METODOU HPLC – UV/VIS.....	42
5.5.1	Příprava kultivačních médií pro zjištění produkce BA	42
5.5.2	Příprava vzorků na derivatizaci.....	42
5.5.3	Derivatizace vzorků	42
5.5.4	Vlastní chromatografické stanovení.....	43
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	44
6.1	CHARAKTERISTIKA IZOLOVANÝCH KMENŮ	44
6.2	IDENTIFIKACE KMENŮ METODOU MALDI/TOF MS	45
6.3	STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ METODOU HPLC – UV/VIS.....	50
6.3.1	Čeď <i>Enterobacteriaceae</i>	50
6.3.2	Kvasinky	54
6.3.3	Rod <i>Lactobacillus</i>	62
	ZÁVĚR	73
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	74
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	82
	SEZNAM OBRÁZKŮ	84
	SEZNAM TABULEK.....	85
	SEZNAM GRAFŮ	86
	SEZNAM PŘÍLOH.....	87

ÚVOD

Biogenní aminy patří mezi nízkomolekulární dusíkaté organické sloučeniny, které vznikají dekarboxylací aminokyselin. Pro lidský organismus jsou BA v malém množství nepostradatelné. V lidském těle mohou působit jako neurotransmitery v CNS, jsou důležitým zdrojem dusíku pro syntézu hormonů a nukleových kyselin a mohou také ovlivňovat krevní tlak na základě změny kontraktility cév. Ve vyšších koncentracích mohou mít negativní vliv na lidské zdraví. Mezi nežádoucí účinky při nadbytečném příjmu ve stravě nebo při nedostatečném odbourávání se řadí zejména bolesti hlavy a migrény, hypotenze nebo hypertenze, problémy s dýcháním, zvracení a kožní vyrážky.

V nízkých koncentracích jsou BA přirozeně obsaženy v různých potravinách. Ve vyšším množství pak mohou vznikat během zrání a skladování fermentovaných potravin (zejména např. v dlouho zrajících sýrech, uzeninách a fermentovaných mléčných výrobcích) v důsledku rozvoje ať už kontaminující mikroflóry nebo startérových kultur s dekarboxylázovou aktivitou.

Kefír je druh kvašeného nápoje, který má mnoho prospěšných účinků na lidský organismus. Podporuje imunitní systém, reguluje krevní tlak, má detoxikační schopnosti, příznivě ovlivňuje trávení a obsahuje velké množství vitamínů. Stal se populární po celém světě. Vzhledem ke skutečnosti, že se jedná o fermentovaný mléčný výrobek, lze tedy u kefiru předpokládat výskyt biogenních aminů. Z tohoto důvodu byla tato práce zaměřena na studium dekarboxylázové aktivity kmenů izolovaných z kefirů a jejich kefirových zrn.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KEFÍR

1.1 Charakteristika kefiru

Kefír je tradiční fermentovaný mléčný nápoj pocházející z oblasti Kavkazu. Řadí se mezi fermentovaný výrobek s bakteriální a kvasinkovou kulturou, který se stal populární ve 2. polovině 19. století ve východních a středoevropských zemích. Na konci stejného století se začal poprvé průmyslově vyrábět v bývalém Sovětském svazu. V dnešní době se již vyrábí v mnoha zemích celého světa [1], [2].

Jedná se o bílý až nažloutlý, kyselý, viskózní a mírně alkoholický mléčný nápoj a je definován jako jogurt 21. století. Typické sensorické vlastnosti výrobku dodávají kyselina mléčná, CO₂, diacetyl, acetaldehyd a ethanol. Šumivý charakter kefiru způsobuje CO₂ [3], [4].

Kefír se vyrábí podomácku z mléka různých živočišných druhů (ovčího, kozího a kravského). Při průmyslové výrobě kefiru, který se obvykle vyrábí z mléka kravského, se využívá zákysových kultur získaných přímo z kefírových zrn složených z polysacharidů a biomasy bakterií a kvasinek nebo sestavených uměle [5].

Legenda praví, že prorok Muhammad dával lidem žijícím v severní části Kavkazu kefírová zrna, která se až dodnes předávají z generace na generaci a jež se využívají jako startovací kultura pro výrobu kefiru [3].

Tradiční způsob výroby spočíval v každodenním nalévání mléka do kožených vaků a následného přidání kefírových zrn, což vedlo k přirozenému kvašení. S vaky se pravidelně třepalo, aby došlo k promíchání mléka a kefírových zrn [6].

Podle literatury pochází kefir ze slova keyif, což v turečtině znamená radost / potěšení. Je známý také pod názvy jako kefyr, kephir, kefer, képher, knapon, kepi, kippi a kippe v různých zemích po celém světě. Nejvíce konzumovaný je v Rusku, zemích bývalého Sovětského svazu a východní Evropě [3].

Od ostatních skupin fermentovaných mléčných nápojů se kefir liší nejen přítomností kvasinek, ale i rozdílným charakterem biochemických pochodů při fermentaci. U kefiru probíhá homofermentativní i heterofermentativní mléčné kvašení a také ethanolové kvašení. Poměr mléčného a ethanolového kvašení je závislý na kultivačních podmínkách a typu kultury (z kefírových zrn, uměle sestavená) [5].

1.2 Kefírová zrna

Základ mikrobiální kultury tvoří kefírová zrna (Obr. 1), která zajišťují fermentaci během výroby kefiru. Jsou elastická, mají bílou až světle žlutou barvu a mají charakteristickou vůni. Kefírová zrna mohou připomínat malé květy kvěťáku nebo vařenou rýži. Jejich rozměry se pohybují od 0,3 do 2,0 cm, jsou nepravidelně tvarované, laločnaté, s pevnou strukturou a sliznatým vzhledem [5], [7].

Kefírová zrna jsou kombinací bakterií a kvasinek v matrici bílkovin, lipidů a cukrů. Obsahují ve vodě rozpustný kapsulární polysacharid nazývaný kefiran. Jedná se o heteropolymer glukózy a galaktózy. Kefiran obsahuje tyto sacharidy v poměru 1:1 a představuje přibližně 25 % suchého zrna. Bylo zjištěno, že kefiran zlepšuje reologické vlastnosti fermentovaných mléčných výrobků a má také pozitivní vliv na zdraví [7], [8], [9].

Zrna obsahují 85 – 90 % vody a sušina čerstvého zrna obsahuje 57 % sacharidů, 33 % bílkovin, 4 % tuků a 6 % minerálních látek [1].

Kefírová zrna mají složité mikrobiologické složení a jsou tvořeny laktokoky, leukonostoky, termofilními a mezofilními laktobacily, kvasinkami (laktozapositivními i laktozanegativními) a bakteriemi octového kvašení. Mikroflóru by mělo tvořit 80 % laktobacilů, 12 % kvasinek a 8 % laktokoků. Její složení závisí na původu zrna, podmínkách skladování a manipulaci [1], [8], [10].

Podle posledních vědeckých studií tvoří mikroflóru více než 50 různých druhů mikroorganismů. Mezi nejčastější laktobacily patří *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefirgranum*, *Lactobacillus parakefir*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus gasseri* [8], [11].

Kvasinky hrají klíčovou roli při tvorbě chuti a vůně. Přidání kvasinkového extraktu zlepšilo růst několika bakterií izolovaných z kefírových zrn, z čehož vyplývá, že jsou také nezbytné pro udržení integrity a životaschopnosti populace mikrobiálních organismů. K významným druhům patří *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida kefir*, *Pichia fermentans*, *Kazachstania unispora* a *Kazachstania exigua* [1], [11].

K významným laktokokům se řadí *Lactococcus lactis subsp. lactis* a *Lactococcus lactis subsp. cremoris*. Mezi další mikroorganismy keřirového zrna lze řadit *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter lovaniensis*, *Acetobacter syzygii* [1], [12].

Rozložení mikroorganismů v keřirovém zrně není konstantní. Obvodovou část zrna téměř výlučně zaujímají bakterie, zatímco kvasinky dominují v centru. Oblast mezi středem a obvodovou částí tvoří bakterie i kvasinky. Jejich poměr se mění v závislosti na vzdálenosti od středu zrna [8]. *Lactobacillus keřiri* se nachází ve vnější vrstvě keřirového zrna, *Lactobacillus keřiranofaciens* dominuje téměř v každé oblasti. Laktozapositivní kvasinky se vyskytují na povrchu, laktozanegativní ve středu zrna [1].

Mezi kontaminanty často izolované z keřirových zrn patří *Geotrichum*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Enterococcus* a koliformní bakterie [1].

Domácí výroba s použitím surovin z různých zdrojů a nedostatečná profesní kvalifikace řadí keřir mezi potravinu, která by mohla představovat potenciální riziko pro zdraví spotřebitelů [13]. Dias *et al.* [13] se ve své studii zaměřili na přežití patogenů během procesu fermentace keřiru. Keřirová zrna byla přidána do UHT odstředěného mléka, které bylo záměrně kontaminováno *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes*. Tyto mikroorganismy byly izolovány po 0, 6, 12, 48 a 72 hodinách fermentace. *Salmonella* Typhimurium a *Enteritidis* byly aktivní po 24 hodin. *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes* vykazovaly aktivitu téměř 72 hodin po zahájení fermentace. Analyzované patogenní bakterie přežily po delší dobu než ty, které byly tradičně použity při výrobě, a to by mohlo představovat potenciální nebezpečí pro spotřebitele. Výsledky této studie zdůrazňují význam hygienické kvality mléka používaného jako hlavní surovinu a uplatňování hygienických postupů při čištění a manipulaci s nádobami během domácí výroby keřirů [13].

Po naočkování do mléka keřirová zrna rostou a přenesou své vlastnosti na následující generaci nově vytvořených zrn. Mikroflóra zrn je stabilní, zachovává si svou aktivitu po mnoho let, pokud je konzervována a inkubována za vhodných podmínek [7].

Obr. 1: Kefírová zrna [14]



1.3 Technologie výroby kefirů

1.3.1 Mléčný kefir

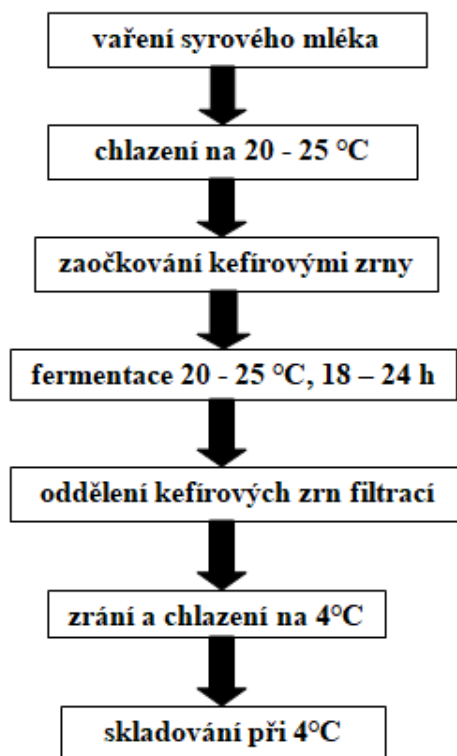
Existuje několik způsobů výroby kefiru. Běžně se využívá tradiční a průmyslový způsob výroby. Tradičně se kefir vyrábí z kravského mléka, ale také se může použít mléko ovčí, kozí nebo buvolí. V některých zemích je však mléko zvířat vzácné, drahé nebo minimálně používání kvůli dietním omezením, preferencím nebo náboženským zvyklostem. Proto se kromě zmiňovaných druhů využívá rovněž mléko sójové a rýžové [4], [15].

Tradiční výroba

Tradiční způsob výroby kefiru (Obr. 2) je založený na přidání kefirových zrn. Syrové mléko se nejdříve vaří a pak se zchladí na 20 – 25 °C a zaočkuje se 2 – 10 % kefirových zrn. Po uplynutí doby fermentace 18 – 24 h při teplotě 20 – 25 °C se zrna oddělí z mléka filtrací pomocí síta. Kefírová zrna se čistí vodou a mohou být sušeny při pokojové teplotě a jsou uchovávány v chladu pro použití při příštím naočkování. Kefír se uchovává při teplotě 4 °C po určitou dobu a poté je připraven ke spotřebě [4].

Vzhledem k variabilní mikroflóře v zrnech, sensorické vlastnosti kefiru mohou vykazovat rozdíly v závislosti na původu zrn, podmínkách skladování a manipulaci [16].

Obr. 2: Schéma tradiční výroby kefíru [4]

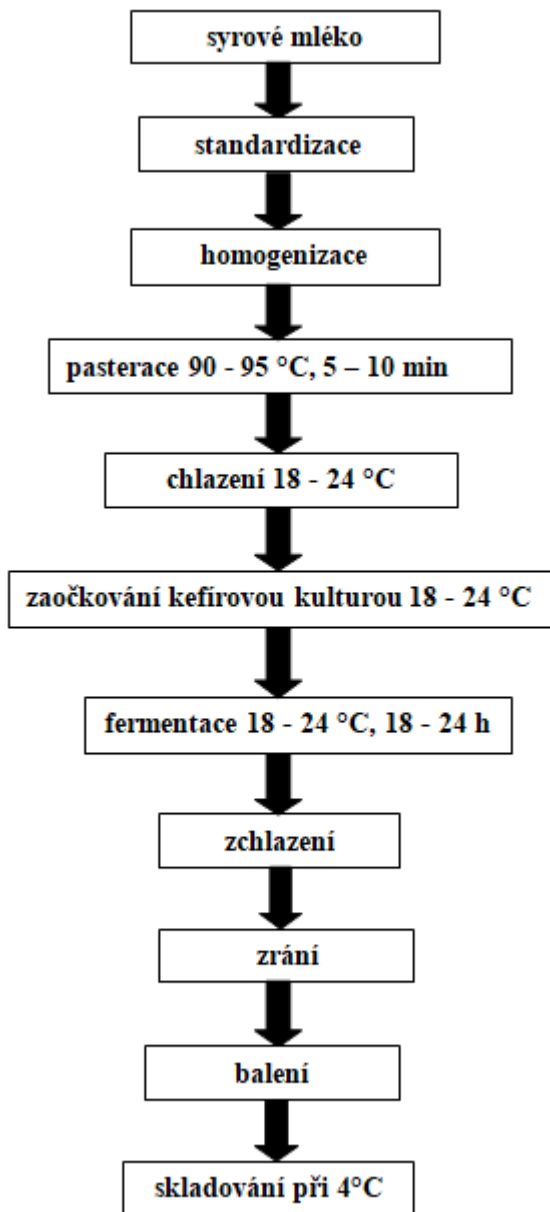


Průmyslová výroba

Při průmyslové výrobě (Obr. 3) se využívají starterové kefirové kultury, které mají za následek čistotu kefirové mikroflóry [16].

Mléko se nejprve standardizuje a homogenizuje. Následuje tepelný záhřev při teplotě 90 - 95 °C po dobu 5 – 10 minut. Poté se mléko ochladí na 18 – 24 °C a je zaočkováno 2 – 8 % kefirové kultury v tancích. Doba fermentace je 18 – 24 h. Po zrání při teplotách 12 – 14 °C nebo 3 – 10 °C po dobu 24 h se kefir uchovává při 4 °C [4].

Obr. 3: Schéma průmyslové výroby kefiru [4]



1.3.2 Vodní kefir

Vodní kefir je zkvašený nápoj, který se vyrábí přidáním kefirových zrn ke směsi vody, cukru a sušeného nebo čerstvého ovoce. Nejčastěji se k výrobě používají sušené fíky. Mohou se přidat také rozinky, švestky nebo datle. Obvykle tato směs fermentuje při pokojové teplotě za anaerobních podmínek po dobu 2 – 4 dnů, po které se provede oddělení kefirových zrn od vodného roztoku proséváním [17], [18].

2 BIOGENNÍ AMINY

2.1 Charakteristika a rozdělení

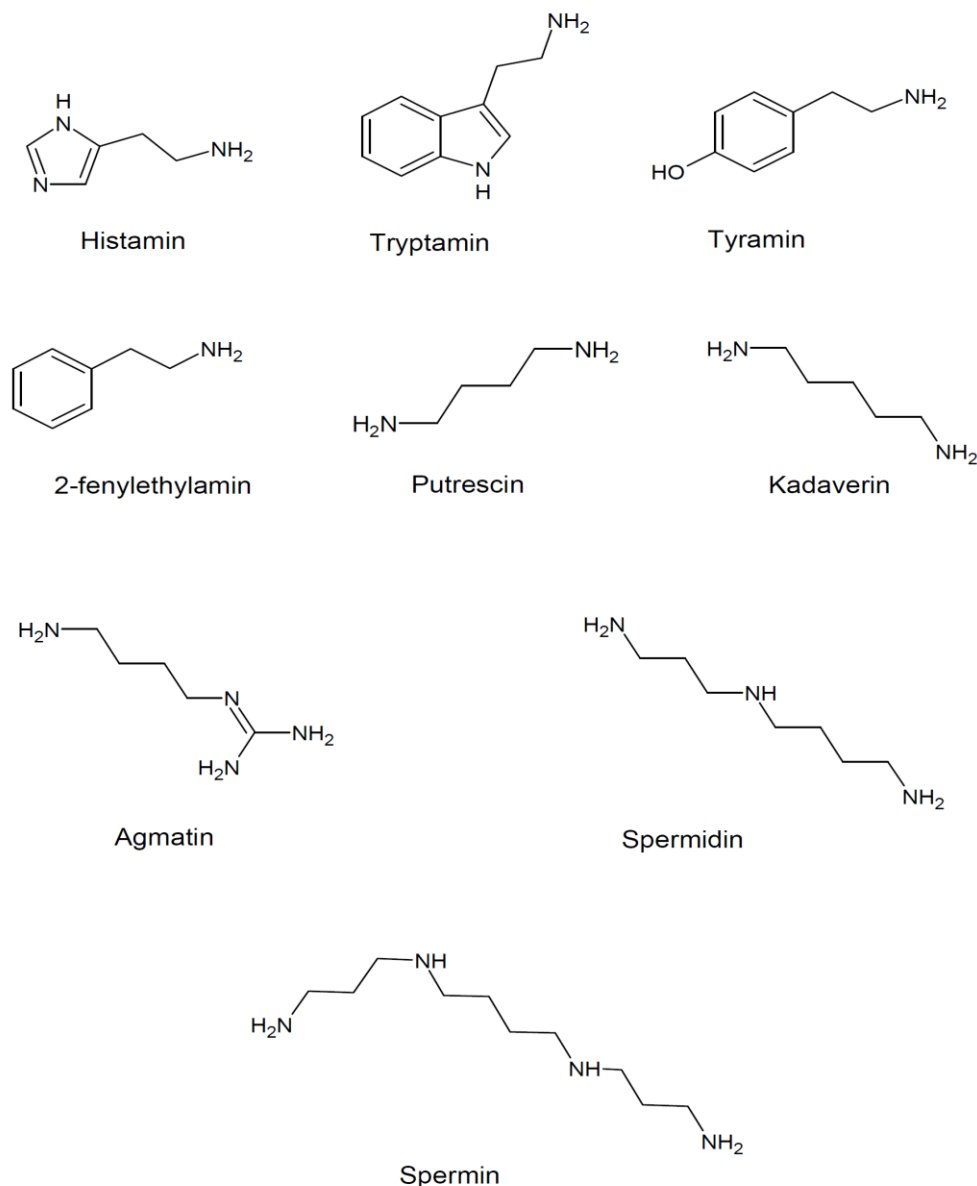
Biogenní aminy se řadí mezi dusíkaté biologicky aktivní sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností. Jsou součástí metabolismu zvířat, rostlin a mikroorganismů. V živých organismech mají různé fyziologické účinky. Mohou být považovány za nervové mediátory, některé mají funkci hormonální nebo mohou být prekurzory pro syntézu hormonů, alkaloidů a dalších metabolitů. Mezi nejdůležitější a zároveň také nejvíce sledované biogenní aminy v potravinách patří: histamin, tryptamin, tyramin, putrescin, 2-fenylethylamin, agmatin, kadaverin, spermin a spermidin [19], [20], [21]. Strukturální vzorce těchto nejvýznamnějších BA jsou zobrazeny na Obr. 4.

Biogenní aminy mohou být klasifikovány dle různých hledisek. Podle počtu aminových skupin je můžeme dělit na: monoaminy (tyramin, 2-fenylethylamin), diaminy (histamin, serotonin, tryptamin, putrescin, kadaverin) nebo polyaminy (spermin, spermidin, agmatin) [20].

Podle jejich chemické struktury se zařazují do následujících kategorií: alifatické, kde aminoskupiny nejsou navzájem spojeny za vzniku kruhu (kadaverin, putrescin, spermin, spermidin), aromatické, kde aminoskupina je vázána přímo na aromatický kruh (2-fenylethylamin, tyramin) nebo heterocyklické, kde amin obsahuje jeden nebo více uzavřených kruhů uhlíku a dusíku (histamin, tryptamin, serotonin) [19], [20].

Pro zjednodušení se někdy mezi polyaminy řadí i diaminy, podobně jako se heterocyklické aminy mohou zařadit do skupiny aromatických aminů [22].

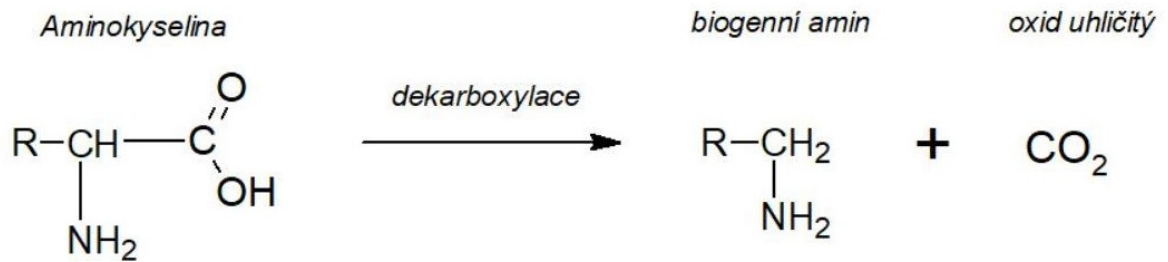
Obr. 4: Strukturální vzorce nejvýznamnějších biogenních aminů [23], [24]



2.2 Vznik biogenních aminů

BA vznikají nejčastěji dekarboxylací z aminokyselin. Schéma této reakce je znázorněné na Obr. 5. Mohou také vznikat aminací či transaminací karbonylových sloučenin – aldehydů a ketonů. Dekarboxylace je katalyzována enzymy dekarboxylázami, které mohou být mikrobiálního původu nebo jsou přirozenou součástí rostlinných a živočišných organismů. Enzym odštěpí od aminokyseliny CO_2 za vzniku aminu [21].

Obr. 5: Dekarboxylace aminokyseliny [35]



Odstranění α - karboxylové skupiny ze příslušné aminokyseliny vede ke tvorbě odpovídajícího BA. Z histidinu tak vzniká histamin, z tyrozinu tyramin, z fenylalaninu 2-fenylethylamin, z lysinu kadaverin atd. Dekarboxylázy jsou pojmenovány podle jejich účinku na určitou aminokyselinu (např. histidindekarboxyláza, tyrozindekarboxyláza) [20].

Vznik a množství biogenních aminů v potravinách lze ovlivnit omezením bakteriálního růstu nebo inhibicí aktivity příslušných enzymů působením různých faktorů. Mezi nejvýznamnější řadíme teplotu, pH, aktivitu vody, obsah solí, dobu skladování a redoxní potenciál [36].

2.3 Funkce biogenních aminů v organismu

BA jsou látky s vysokou biologickou aktivitou, které se v malém množství vyskytují v organismu člověka. Zastávají mnoho významných fyziologických funkcí a pro organismus jsou nepostradatelné. Fyziologické funkce BA jsou velmi rozmanité, mohou mít příznivý, ale také negativní vliv na lidský organismus. BA jsou zdrojem dusíku a prekurzorů pro syntézu nukleových kyselin a proteinů. Na druhé straně BA mohou být potenciálními prekurzory pro tvorbu karcinogenních látek [25].

Histamin v lidském těle zprostředkovává několik důležitých funkcí. Působí především jako hormon a neurotransmitter. Je mediátorem alergických reakcí. Velké množství histaminu je obsaženo v žírných buňkách a krevních bazofílech. Histamin se uvolňuje do krevního řečiště při aktivaci těchto buněk, a to zejména při alergických reakcích. Váže se na receptory (H_1 , H_2 , H_3 , H_4) na buněčných membránách [26].

Receptor H_1 má hlavní roli v alergické a imunitní odpovědi. Jeho nadměrná stimulace může způsobit alergickou rýmu. Podílí se na dilataci periferních cév, kapilár a arterií a tachykardii [27].

Receptor H_2 podporuje sekreci žaludeční kyseliny, což může při nadměrné stimulaci vyvolat gastroenteritidu. Způsobuje také uvolnění hladkého svalstva, reguluje produkci protilátek a cytosinů, účastní se buněčné proliferace [27].

Histaminové receptory H_3 působí jako presynaptické autoreceptory, které inhibují syntézu a uvolňování histaminu v CNS [28].

H_4 je nejpozději objevený receptor, který zodpovídá za regulaci množství bílých krvinek a hraje podstatnou roli v rozvoji zánětu [27].

Tyramin na rozdíl od histaminu není v těle důležitým metabolitem a je zastoupen ve velmi nízké koncentraci. Způsobuje především nepřímé uvolňování noradrenalinu ze sympatického nervového systému. Nejvýznamnějším účinkem tohoto působení je zvýšení krevního tlaku. Je také příčinou slzení a slinění, rozšiřuje zornice, zrychluje dýchání. Vysoké koncentrace tyraminu zvyšují hladinu cukru v krvi. Tyramin je sám o sobě toxický, ale kromě toho reaguje s inhibitory monoaminoxidáz, což může vyvolat hypertenzní krizi [26].

Polyaminy (putrescin, spermidin a spermin) jsou nepostradatelnou součástí všech živých buněk. Regulují syntézu bílkovin a funkce nukleových kyselin. Jsou nezbytné pro buněčný růst, diferenciaci buněk a normální funkci imunitního systému. Účastní se procesu hojení a regenerace poškozených tkání. Působí jako antioxidanty, což je dáno inhibicí oxidace polyneenasycených mastných kyselin [26], [29].

2.4 Toxicita biogenních aminů

Z kapitoly 2.3 je patrné, že BA plní mnoho nezastupitelných fyziologických funkcí. Pokud jsou BA přítomny v potravinách ve vysokých koncentracích, mohou mít toxické účinky a způsobovat zdravotní problémy spotřebitelům, zejména citlivým osobám [29], [30]. Přehled fyziologických a toxických účinků BA je znázorněn v Tab. 1.

Histamin patří mezi nejtoxičtější BA v potravinách. Toxikologický účinek závisí na jeho přijaté koncentraci, přítomnosti jiných aminů a aktivitě aminooxidázy. Otrava histaminem je spojená především s konzumací ryb z čeledi *Scombridae* a *Clupeidae*. K typickým příznakům intoxikace patří vyrážka, svědění, zvracení, průjem, bolesti hlavy a hypotenze [20], [31], [32].

Také tyramin, putrescin a kadaverin představují potenciální zdravotní riziko. Intoxikace tyraminem bývá často spojována s konzumací sýrů, proto je označována jako sýrová reak-

ce. Tyramin má vazokonstrikční účinek (zúžuje cévy), putrescin a kadaverin způsobují hypotenzi a bradykardii a mohou také zesilovat toxicitu jiných aminů [32], [33].

Polyaminy jako putrescin, spermin a spermidin slouží jako prekurzory pro tvorbu karcinogenních N – nitrosaminů, což představuje další riziko spojené s BA v potravinách [20].

BA, které jsou přijaty potravou za normálních podmínek v malém množství, jsou obvykle metabolizovány ve střevech pomocí enzymů monoaminoxidáz a diaminoxidáz. Histamin může být detoxikován methyltransferázami nebo acetyltransferázami. Míra schopnosti detoxikace BA je individuální, někteří jedinci reagují citlivě již na menší množství BA v potravě [21], [34].

Pokud jsou enzymy ve střevech dysfunkční z genetického důvodu nebo v důsledku příjmu inhibitorů jako je alkohol, některé léky (antidepresiva), BA se mohou dostat do krevního oběhu a způsobovat tak mnohé nežádoucí účinky na organismus. Riziko spočívá především v konzumaci více rizikových potravin najednou (pivo, víno, fermentované výrobky). K selhání detoxikačního systému může dojít vlivem nadměrného množství BA v potravě, nebo jeho oslabením pomocí inhibitorů monoaminoxidáz [21], [25].

Tab. 1: Fyziologické a toxické účinky biogenních aminů [19]

Prekurzor	Biogenní amin	Fyziologická role	Toxické účinky	
			přímé	nepřímé
Histidin	Histamin	<ul style="list-style-type: none"> vazodilatace hormonální mediátor buněčný růst a diferenciacie pozornost alergické reakce 	<ul style="list-style-type: none"> histaminová otrava nesnášenlivost histaminu 	
Tyrosin	Tyramin	<ul style="list-style-type: none"> vazokonstrikce hormonální mediátor 	<ul style="list-style-type: none"> nesnášenlivost tyraminu 	
Tryptofan	Tryptamin	<ul style="list-style-type: none"> vazokonstrikce hormonální mediátor 	<ul style="list-style-type: none"> méně známé 	
Lyzin Omitin	Putrescin Kadaverin	<ul style="list-style-type: none"> prekurzor sperminu a spermidinu regulátor růstu buňek podpora růstu nádorů 	<ul style="list-style-type: none"> hypotenze bradykardie tachykardie 	<ul style="list-style-type: none"> potenciátor toxicity histaminu a tyraminu karcinogenní účinky
Putrescin	Spermin Spermidin	<ul style="list-style-type: none"> proteosyntéza regulace nukleových kyselin 	<ul style="list-style-type: none"> méně známé 	<ul style="list-style-type: none"> karcinogenní účinky
L - arginin	Agmatin	<ul style="list-style-type: none"> hormonální mediátor inhibitor syntázy oxidu dusnatého antiproliferativní účinek 	<ul style="list-style-type: none"> méně známé 	<ul style="list-style-type: none"> méně známé

2.5 Výskyt biogenních aminů v potravinách živočišného původu

Mezi hlavní požadavky pro tvorbu biogenních aminů v potravinách patří:

- přítomnost volných aminokyselin,
- přítomnost mikroorganismů pozitivních na dekarboxylázy,
- vhodné podmínky pro mikrobiální růst a dekarboxylázovou aktivitu [20].

BA se vyskytují v potravinách rostlinného i živočišného původu, jelikož jsou přirozenou součástí rostlin i živočichů. Obsah BA v jednotlivých potravinách se značně liší. Větší množství je obsaženo v živočišných potravinách, kde vznikají z bílkovin působením dekarboxylázové aktivity mikroorganismů. BA mohou také vznikat při technologickém zpracování nebo při nevhodném skladování potravin. Příliš vysoké hodnoty BA v potravinách jsou známkou kažení, proto se BA využívají jako indikátor čerstvosti [19], [20], [25], [37].

2.5.1 Mléko

Mléko je díky bohatému a vyváženému chemickému složení ideálním médiem pro růst prakticky všech mikroorganismů, včetně těch, které produkují toxické metabolity [38].

Zatímco v čerstvém mléce se nachází malé množství histaminu, v pasterizovaném a UHT mléce byl zaznamenán mírný přírůstek histaminu. Významný růst histaminu dosahují mléčné výrobky zejména po fermentačním procesu. V mléce jsou nejvíce zastoupeny polyaminy. V konečných produktech jsou zastoupeny BA jako je kadaverin, histamin, putrescin, tyramin a tryptamin [20], [39].

2.5.2 Sýry

Sýr patří mezi potraviny s vysokým obsahem BA, zejména tyraminu, histaminu a putrescinu. Tvoří ideální prostředí pro tvorbu BA, protože obsahuje bílkoviny, enzymy, kofaktory, vodu a mikroorganismy [31].

Halász *et al.* [40] detekovali úroveň histaminu a tyraminu v různých sýrech. Cheddar byl obzvláště bohatý na tyramin, který dosahoval množství až 1500 mg/kg. Zvýšené hladiny histaminu obsahovaly sýry Gouda.

Akumulaci BA v sýrech může ovlivnit mikrobiální jakost syrového mléka, použití startovacích kultur, úroveň hygieny a také podmínky prostředí [31].

Obsah BA se může lišit v rámci stejného typu sýra a dokonce i mezi různými částmi stejného sýra. Je značně závislý na několika faktorech, jako je teplota skladování, doba zrání, technologie dozrávání [20].

2.5.3 Jogurty

Buňková *et al.* [21] zkoumali výskyt BA v jogurtech. Celkem bylo analyzováno 28 neo-chucených jogurtů. Byla zjištěna přítomnost tyraminu, putrescinu, kadaverinu a sperminu. Ve všech testovaných vzorcích se nacházel tyramin, jehož koncentrace byla poměrně nízká (6,5 mg/kg). Spermin byl detekován pouze u jednoho jogurtu v koncentraci 1 mg/kg. U 14 testovaných vzorků byla zjištěna přítomnost putrescinu v množství do 26 mg/kg. Pouze v jednom jogurtu byl přítomen kadaverin v koncentraci 4,3 mg/kg.

2.5.4 Kefíry

Studiem BA v kefirech se zabývali Özdestan a Üren [41]. Bylo analyzováno 10 vzorků kefiru od různých výrobců v Turecku. V kefirech byl detekován putrescin, tyramin, kadaverin a spermidin. Převládajícím BA byl tyramin, který dosahoval maximální koncentrace 12,8 mg/l. Celkový obsah BA ve vzorcích kefiru se pohyboval v rozmezí 2,4 – 35,2 mg/l. Bylo zjištěno, že aktivita tvorby BA byla vyšší, když se v médiu vyskytoval vyšší obsah aminokyselin [41].

2.6 Faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů

Mezi významné faktory, které mohou ovlivnit produkci BA, patří teplota, koncentrace solí, pH, přítomnost kyslíku a přítomnost glukózy [26], [37], [42].

2.6.1 Teplota

Teploty blízké optimálním teplotám růstu, které podporují buněčný metabolismus a proliferaci, napomáhají produkci BA. Obecně lze tvrdit, že schopnost produkovat BA je omezena snížením teploty. Tzn., že kontrola chladicího řetězce během skladování je hlavním nástrojem, který zabraňuje akumulaci nežádoucích BA po výrobě, zejména nefermentovaných potravin, jako jsou produkty rybolovu [42].

Giardini *et al.* [43] prokázali u testovaného kmene *E. faecalis* EF37 při nárůstu teploty z 16 na 44 °C rychlejší a intenzivnější akumulaci tyraminu. Vliv teploty na aktivitu tyrozinde-

karboxylázy produkované *E. faecalis* studovali Bargossi *et al.* [44] a zjistili nejvyšší dekarboxylační účinnost při teplotě mezi 30 a 37 °C. Naopak Zhang a Ni [45] zjistili, že tyrozindekarboxyláza u *L. brevis* měla optimální teplotu 50 °C, ale byla rychle inaktivována při vyšších teplotách.

2.6.2 Koncentrace soli

Obecně platí, že zvyšující koncentrace soli přispívá ke snížení akumulace BA v potravinách. Zejména gramnegativní bakterie jsou více inhibovány zvýšením koncentrace NaCl než grampozitivní. Zdravotní trend spočívající ve snižování příjmu NaCl je však v rozporu s tímto možným způsobem snížení hladiny BA v potravinách [42].

Bylo zjištěno, že přidání vysoké koncentrace NaCl (5 %) do mléka inokulovaného *E. faecalis* při výrobě sýrů snížilo produkci 2-fenylethylaminu a tyraminu na minimum. Podobné výsledky byly pozorovány také u sýrů vyrobených z mléka inokulovaného *Lactobacillus buchneri* a *Lactobacillus bulgaricus* [26].

2.6.3 pH

Hodnota pH je klíčovým faktorem ovlivňujícím dekarboxylázovou aktivitu. Aktivita enzymu dekarboxylázy je silnější v kyselém prostředí, optimální pH se pohybuje v rozmezí 4,0 – 5,5. Navíc v tomto prostředí bakterie produkují enzymy, které jsou součástí obranných mechanismů proti kyselosti [25], [43].

Rychlé okyselení může vést ke snížení koncentrace BA související se snížením růstu mikroorganismů s dekarboxylační aktivitou [26].

2.6.4 Přítomnost kyslíku

Prokázalo se, že kyslík může ovlivnit tvorbu BA. *Enterobacter cloacae* produkuje asi polovinu množství putrescinu v anaerobních podmínkách ve srovnání s aerobními podmínkami a *Klebsiella pneumoniae* významně syntetizuje méně kadaverinu, ale získává schopnost produkovat putrescin v anaerobních podmínkách [37].

2.6.5 Přítomnost sacharidů

Bylo zjištěno, že přítomnost fermentovatelných sacharidů, jako je D – glukóza, zvyšuje růst bakterií i jejich dekarboxylační aktivitu. Optimální obsah D – glukózy byl stanoven v rozmezí 0,5 – 2 %, hladiny převyšující 3 % vedly k inhibici enzymu [25].

Také Landete *et al.* [46] poznamenali, že rostoucí koncentrace fruktózy a glukózy inhibují akumulaci histaminu produkovaného bakteriemi mléčného kvašení [42].

2.7 Možnosti redukce biogenních aminů

Množství a typ BA tvořených v potravinách jsou silně ovlivněny vnitřními charakteristikami potravin zahrnující pH, aktivitu vody, mikrobiologické složení, ale i vnějšími parametry, jako je čas, skladování a teplota, které umožňují růst bakterií během zpracování a skladování potravin [47].

V poslední době vznikly nové postupy pro redukci BA v potravinách, zahrnující především regulaci teploty nižší než 5 °C, použití potravinových aditiv a konzervačních látek, aplikace hydrostatických tlaků a ozáření. Tyto metody pouze oddalují tvorbu BA v potravinách především prostřednictvím inhibice bakterií nebo aktivity enzymu dekarboxylázy [47].

2.7.1 Použití startérových kultur

Přidání vybraných startérových kultur je jedním z neúčinnějších způsobů, jak potlačit tvorbu BA ve fermentovaných potravinách. Některé kmeny bakterií, které jsou součástí kultur, mohou syntetizovat BA. Z toho důvodu musí být použité mikroorganismy charakterizovány nepřítomností jakékoliv dekarboxylační aktivity [26].

Startérové kultury, které nejsou schopny dekarboxylace aminokyselin na BA, se nazývají amin-negativní. Existují také amin-oxidační startérové kultury, které oxidují BA na aldehyd, peroxid vodíku a amoniak [32].

Bylo zjištěno, že amin-negativní startéry *Staphylococcus xylosus* a *Lactobacillus curvatus* zpomalují tvorbu putrescinu a kadaverinu během dozrávání a skladování fermentovaných sušených klobás. Očkování amin-negativních smíšených startovacích kultur *Pediococcus acidilactici*, *Staphylococcus carnosus*, *Lactobacillus sake* a *Staphylococcus xylosus* potlačilo akumulaci BA v uzených rybách [32].

Použití smíšených startérových kultur vede k výraznému poklesu pH, což může být dalším faktorem přispívajícím ke snížení tvorby BA [32].

2.7.2 Pasterizace

Hlavními mikroorganismy v syrovém mléce jsou mezofilní bakterie mléčného kvašení (enterokoky, laktokoky, laktobacily nebo leukonostoky), enterobakterie a psychrotrofní mikroorganismy, jako je *Pseudomonas* nebo *Acinetobacter*. Zástupci všech těchto skupin byli popsáni jako producenti BA [42].

Pasterizace je tepelné ošetření, které snižuje mikrobiální zatížení syrového mléka, včetně mikroorganismů, které syntetizují BA. Proto sýry vyrobené z pasterizovaného mléka obsahují nižší koncentrace BA oproti sýrům, které byly vyrobeny ze syrového mléka [31].

Nicméně je možné detekovat zvýšené koncentrace BA v sýrech z pasterizovaného mléka. Důvodem může být kontaminace mikroorganismy produkující BA při výrobě sýrů v důsledku nedodržení hygienických podmínek. Navíc některé BA produkované rody *Lactobacillus* a *Enterococcus* jsou odolné vůči pasterizaci, což vede k výskytu BA v konečných produktech. V důsledku toho pasterizace není sama o sobě konečným řešením problému BA. Proto někteří autoři navrhli kombinovat pasterizaci s dalšími ošetřeními, např. vysokým tlakem [24], [42].

2.7.3 Degradace biogenních aminů s využitím aminooxidáz

Snížit množství BA v potravinách lze také pomocí enzymu aminooxidázy. Tento enzym může být izolován z mnoha zdrojů, jako jsou orgány prasat (játra, ledviny), lidská placenta, krevní plazma nebo různé mikroorganismy [48].

Schopnost degradace BA s využitím aminooxidázy byla prokázána v různých mikrobiálních skupinách [30], [42]:

- *Micrococcus spp.* - degradace tyraminu,
- *Brevibacterium linens* – degradace histaminu a tyraminu,
- *Lactobacillus sakei* – degradace histaminu,
- *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus plantarum* – degradace tyraminu,
- *Geotrichum candidum* – degradace tyraminu a histaminu.

Aminooxidázová aktivita byla také nalezena u rodů *Bacillus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Staphylococcus* a *Rhodococcus* [42].

3 MIKROORGANISMYS S DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITOU

Mezi bakterie s dekarboxylázovou aktivitou, které se mohou vyskytovat v mléce a v mléčných výrobcích a podílet se na tvorbě BA, patří druhy rodu *Citrobacter*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella* a také BMK (zejména rody *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus*) [36].

Schopnost produkovat BA je spojena s gramnegativními i grampozitivními bakteriemi, a také s kvasinkami [47]. Přehled významných zástupců těchto skupin podílejících se na syntéze BA v mléčných výrobcích je uveden v Tab. 2.

Tab. 2: Mikroorganismy produkující BA v mléčných výrobcích [26]

Biogenní amin	Produkující mikroorganismy	
Histamin	kvasinky	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Geotrichum candidum</i>
	gramnegativní bakterie	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Morganella morganii</i>
	grampozitivní bakterie	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus parabuchneri</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Tyramin	kvasinky	<i>Yarrowia lipolytica</i>
	grampozitivní bakterie	<i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Enterococcus durans</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Putrescin	kvasinky	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>
	gramnegativní bakterie	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Proteus</i>
	grampozitivní bakterie	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactococcus lactis</i>
Kadaverin	kvasinky	<i>Yarrowia lipolytica</i>
	gramnegativní bakterie	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Halomonas</i> sp., <i>Morganella morganii</i> , <i>Pseudomonas putida</i>
Tryptamin	gramnegativní bakterie	<i>Morganella morganii</i> , <i>Proteus</i> , <i>Serratia</i>
2-fenylethylamin	kvasinky	<i>Yarrowia lipolytica</i>
	gramnegativní bakterie	<i>Halomonas</i> , <i>Serratia</i>
	grampozitivní bakterie	<i>Enterococcus faecium</i>

3.1 Čeleď *Enterobacteriaceae*

Čeleď *Enterobacteriaceae* zahrnuje velkou skupinu gramnegativních fakultativně anaerobních tyčinek o velikosti 1 – 5 μm . Jedná se o nesporotvorné tyčinky, peritrichní nebo bez bičíků, které mají respirační i kvasný metabolismus. Mikroorganismy z této čeledi fermentují glukózu s tvorbou kyseliny a plynu [33], [49].

Do této čeledi se řadí psychrotrofní, mezofilní i termotolerantní bakterie. Většina zástupců se řadí k mezofilním bakteriím s růstovými teplotami v rozmezí 15 – 40 °C [33].

Tato čeleď zahrnuje bakterie rodů *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* a další [33].

Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* jsou obecně považovány za mikroorganismy s vysokou dekarboxylační aktivitou. Zástupci této čeledi mohou produkovat značné množství histaminu. Jedná se zejména o *E. cloacea*, *E. aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* a *Morganella morgani*. *Enterobacter cloacea* a rod *Serratia* se řadí mezi významné producenty putrescinu a kadaverinu [50].

3.1.1 Rod *Escherichia*

Z hygienického hlediska se jedná o nejdůležitější rod čeledi *Enterobacteriaceae*, jehož jednotlivé druhy jsou obyvateli střevního traktu různých živočichů. Nejvýznamnějším druhem je *E. coli*, který se nachází ve spodní části střevního traktu člověka a teplokrevných zvířat, a vyskytuje se tedy i ve výkalech. Přítomnost tohoto mikroorganismu ve vodě nebo v potravinách je ukazatelem fekálního znečištění. Některé jeho kmeny způsobují průjemová střevní onemocnění nebo onemocnění močových cest. *E. coli* se řadí mezi nejprozkoumanější mikrobiální druh, neboť složí jako modelový organismus pro biochemické, genetické a fyziologické studie. Zkvašuje cukry (např. glukózu, laktózu) za intenzivní tvorby kyselin a plynu [49]

3.1.2 Rod *Enterobacter*

Z rodu *Enterobacter* je nejrozšířenější druh *Enterobacter aerogenes*, který se vyskytuje ve střevním traktu zdravých lidí a zvířat a je také velmi rozšířen v přírodě. Od *E. coli* se liší využíváním citrátu jako zdroje uhlíku a tvorbou acetoinu a 2,3 – butandiolu při kvašení cukrů [49].

3.1.3 Rod *Citrobacter*

Vyskytuje se v půdě, ve vodě a ve střevním traktu lidí a zvířat. Pro člověka jsou patogenní *C. freundii* a *C. koseri*. Výjimečně může vyvolat i nosokomiální meningitidy u novorozenců. *C. koseri* je biochemicky podobný salmonelám (tvoří H₂S) [51].

3.1.4 Rod *Klebsiella*

Nachází se v zažívacím traktu, v dýchacích cestách, v půdě a vodě. Klebsiely jsou podmíněně patogenní, často se uplatňují u nosokomiálních infekcí. Mezi významné druhy patří *K. pneumoniae* a *K. oxytoca* [51].

3.1.5 Rod *Serratia*

Nachází se v půdě a vodě, u lidí s imunodeficiencí může vyvolat sepsi. Typickým zástupcem je druh *Serratia marcescens*. Tvoří proteinázy i lipázy, Je rezistentní vůči cefalosporinům [51].

3.1.6 Rod *Salmonella*

Salmonely jsou primárními střevními patogeny lidí a zvířat, domácích i divokých. Často se nacházejí v odpadcích, ve vodě, v půdě. Za vhodných podmínek mohou ve vodě přežívat měsíce i léta. Potraviny mohou být infikovány přímo (surovina připravena z infikovaných zvířat – maso, vejce) nebo druhotně. Fermentují glukózu, maltózu, manitou, sorbitol, většina tvoří H₂S, neprodukuje indol [51].

3.1.7 Rod *Proteus*

Nápadnou vlastností je plazivý růst, netvoří uzavřené kolonie. Účastní se rozkladu organické hmoty v odpadcích, vyskytuje se v půdě, na rostlinách, ve stolici lidí a zvířat. Je původcem infekcí močových cest. Rozkládá bílkoviny za silného hnilobného zápachu způsobeného hlavně tvorbou sirovodíku a indolu. Patří mezi nejrozšířenější hnilobné bakterie. K nejvýznamnějším druhům se řadí *P. vulgaris*, *P. mirabilis* a *P. pennerii* [49], [51].

3.2 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (BMK) patří k častým producentům BA zejména ve fermentovaných potravinách, kde jsou využívány jako starterové kultury. Produkce tyrozinu byla zjištěna u mnohých zástupců rodů *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Oenococcus*. Rody *Lactococcus*, *Leuconostoc* a *Lactobacillus* prokázaly schopnost dekarboxylace tryptofanu. Produkce histaminu byla pozorována u *Lactobacillus*, *Oenococcus* a *Pediococcus*. U rodu *Lactobacillus* byla zjištěna také schopnost produkovat putrescin [52].

BMK tvoří skupinu grampozitivních bakterií, kterou spojují určité morfologické, metabolické a fyziologické vlastnosti. Jedná se o nesporeující aerotolerantní tyčinky nebo koky produkující kyselinu mléčnou jako jeden z hlavních fermentačních produktů sacharidů [53].

K významným rodům BMK se řadí *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium* a *Weissella* [54].

BMK jsou obecně považovány za prospěšné mikroorganismy, některé kmeny se využívají jako probiotika. Zahrnují také rody, které jsou uznávanými lidskými nebo zvířecími patogeny [53].

Vzhledem k tomu, že BMK nemají funkční respirační systém, musí získat energii fosforylací. Rozlišují se dvě základní fermentační cesty homofermentativní a heterofermentativní. Homofermentativní mléčné bakterie při zkvašování sacharidů produkují prakticky pouze kyselinu mléčnou (*Lactobacillus delbruecki*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*). Heterofermentativní mléčné bakterie produkují vedle kyseliny mléčné ještě značné množství etanolu a CO₂ (*Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*) [49], [53].

3.2.1 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* zahrnuje mikroaerofilní grampozitivní bakterie, které se mohou vyskytovat v různém prostředí. Mohou se nacházet v mléce, kdy vyvolávají přirozené kysání. Jsou přirozenou součástí gastrointestinálního a urogenitálního traktu, dutiny ústní a kůže. Vykytují se také na rostlinách a v půdě. Většina druhů je schopna růstu při 45 °C [49], [55].

Tento heterogenní rod zahrnuje asi 135 druhů a 25 poddruhů, jejichž klasifikace se nestále mění. K významným zástupcům lze řadit *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* a *Lactobacillus salivarius*. Laktobacily hrají zásadní roli při výrobě fermentovaných potravin – zeleniny, masných a především fermentovaných mléčných výrobků [49], [55], [56].

V mlékárenském průmyslu se heterofermentativní laktobacily využívají při výrobě sýrů (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*) jako součást startérových kultur. Laktobacily jsou významnou úlohu také v konzervářském průmyslu. *Lactobacillus plantarum* se často uplatňuje při konzervaci zelí a okurek. Některé heterofermentativní laktobacily se vyskytují jako nežádoucí kontaminanty ve vinařství a pivovarství [49].

3.2.2 Rod *Lactococcus*

Rod *Lactococcus* zahrnuje 7 druhů: *L. lactis*, *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* a nedávno charakterizovaný *L. fujiensis*. Tento rod tvoří grampozitivní koky o velikosti 0,5 – 1,5 μm , které tvoří krátké řetízky. Jsou mezofilní, fermentují hexózy na kyselinu mléčnou. Laktokoky se obecně vyskytují na rostlinách a v kůži zvířat. Mezi nejvýznamnější zástupce se řadí *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* používané jako výchozí kultury při průmyslové mléčné fermentaci [4], [57].

3.2.3 Rod *Leuconostoc*

Rod *Leuconostoc* zahrnuje *L. mesenteroides* (se třemi poddruhy, *mesenteroides*, *dextranicum* a *cremoris*) a dalších 13 druhů, *L. citreum*, *L. carnosum*, *L. durionis*, *L. fallax*, *L. ficulneum*, *L. pseudoficulneum*, *L. fructosum*, *L. gasicomitatum*, *L. gelidum*, *L. inhae*, *L. kimchii*, *L. lactis*, *L. pseudomesenteroides*. Tento rod představuje fakultativně anaerobní grampozitivní koky uspořádané ve dvojicích nebo řetízcích. Leukonostoky jsou přítomny v různých fermentovaných mléčných výrobcích jako je např. kefir. Mají zásadní roli při vytváření struktury a aroma [58].

3.2.4 Rod *Enterococcus*

Do rodu *Enterococcus* se řadí 12 druhů, z nichž nejvýznamnější jsou *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*. Jedná se o grampozitivní koky vyskytující se ve dvojicích nebo krátkých

řetízcích. Běžně se vyskytují ve střevním traktu člověka a teplokrevných zvířat. Jsou indikátorem fekálního znečištění. Jsou významnými původci infekcí močových a žlučových cest [51].

3.2.5 Rod *Oenococcus*

Rod *Oenococcus* zahrnuje pouze 2 druhy *O. oeni* (původně známý jako *Leuconoctoc oenos*) a *O. kitaharae*. Tento rod tvoří grampozitivní, fakultativně anaerobní bakterie vyskytující se v párech nebo řetízcích. *O. oeni* hraje důležitou roli při fermentaci vína, kde dekarboxyluje kyselinu jablečnou na kyselinu mléčnou [59], [60].

3.2.6 Rod *Pediococcus*

Rod *Pediococcus* tvoří mikroaerofilní až aerobní grampozitivní koky vyskytující se ve dvojicích nebo v tetradách. Zahrnuje 8 druhů, z nichž některé jsou velmi obávanými kontaminanty v pivovarství. *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* a *P. damnosus* mohou produkovat bakteriociny (pediociny), které představují široké spektrum antimikrobiální aktivity proti grampozitivním bakteriím jako je např. *Listeria monocytogenes* [51], [61].

3.3 Kvasinky

Kvasinky jsou eukaryotické mikroorganismy, které se značně využívají v potravinářství a biotechnologiích. Hrají několik důležitých rolí během fermentace potravin zahrnujících výrobu alkoholu, tvorbu organických kyselin, zlepšení chuti, vůně a struktury a zvýšení nutričních vlastností. Využívají se jako startérové kultury při výrobě fermentovaných potravin [62].

Schopnost produkovat biogenní aminy mají i některé kmeny kvasinek. U kvasinek rodu *Debaryomyces* a *Candida* izolovaných z fermentovaných masných výrobků byla zjištěna aktivita histidindekarboxylázy, která byla dokonce větší než u pozorovaných bakterií mléčného kvašení a stafylokoků. Neidentifikovatelné kmeny kvasinek produkovaly navíc velké množství 2-fenylethylaminu a tyraminu [50].

Caruso *et al.* [63] se zabývali tvorbou BA kvasinkami ve vínech. Celkem bylo testováno 50 kmenů kvasinek. Všechny sledované kmeny produkovaly zanedbatelné množství histaminu. Nejvyšší koncentrace celkových biogenních aminů byla stanovena u *Brettanomyces*

bruxellensis s obsahem 15 mg/l. U některých kmenů byly detekovány nízké koncentrace agmatinu, kadaverinu a 2-fenylethylaminu.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo studium dekarboxylázové aktivity kmenů izolovaných ze 3 druhů kefirů a jejich kefirových zrn.

Cílem teoretické části bylo:

- zpracovat literární rešerši týkající se technologie výroby kefirů,
- charakterizovat biogenní aminy a definovat jejich význam a výskyt v potravinách živočišného původu,
- popsat faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů,
- charakterizovat mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou.

Pro zpracování experimentální části diplomové práce bylo třeba naplnit tyto dílčí cíle:

- u všech izolovaných kmenů vyhodnotit makroskopické a mikroskopické znaky a provést vybrané biochemické testy,
- identifikovat izolované kmeny metodou MALDI/TOF MS,
- otestovat izolované kmeny na dekarboxylázovou aktivitu,
- na základě získaných výsledků vyhodnotit závěr.

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Zařízení, přístroje a pomůcky

- Laminární box BIO IIA, typ Biohazard TELSTAR
- Vortex V-1 plus (Biosan)
- Automatický dávkovač Varispenser (Eppendorf)
- Laboratorní sklo
- Laboratorní plasty (špičky k automatickým pipetám, centrifugační zkumavky, mikrozukavky – Eppendorf)
- Automatické pipety (Discovery Comfort)
- Laboratorní váhy 440 – 47 N Kern
- Analytické váhy ABJ Kern
- Biologický termostat BT 120
- Odstředivka EBA 20, Hettich ZENTRIFUGEN
- pH metr EUTECH INSTRUMENTS pH510
- Magnetická míchačka Magnetic Stirrer MS – 3000 (Biosan)
- Laboratorní třepačka LT2 (Kavalier)
- Horkovzdušná sušárna (Venticell)
- Chladnička (Zanussi)
- Hlubokomrazicí box (PHCbi)

5.2 Kultivační média

Endo agar (HiMedia)

Pro přípravu tohoto agaru výrobce uvádí potřebu 41,5 g na 1000 ml destilované vody. Potřebná navážka byla rozpuštěna v odpovídajícím množství destilované vody. Následně byla provedena sterilace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Poté byla půda rozlita na Petriho misky. Tento agar byl použit pro kultivaci bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*.

Nutrient Broth (HiMedia)

Na přípravu média výrobce uvádí potřebu 13 g na 1000 ml destilované vody. Nejdříve byla vypočtena navážka na potřebné množství média. Navážené množství média bylo rozpuštěno v destilované vodě. Následně byla tekutá živná půda automatickým dávkovačem

rozlita do zkumavek vždy po 5 ml. Po uzavření zkumavek byla provedena sterilace v autoklávu (121 °C, 15 minut). Médium bylo připravené pro očkování enterobakterií.

MRS agar

K přípravě tohoto média byl použit MRS Broth (HiMedia), pro který výrobce uvádí potřebu 55,15 g na 1000 ml. K médiu byl přidán agar (HiMedia), jeho spotřeba byla 15 g na 1000 ml destilované vody. Postup přípravy je opět stejný jako v předchozích případech. Půda byla použita pro kultivaci bakterií rodu *Lactobacillus*.

Lactobacillus MRS Broth (HiMedia)

Na přípravu této tekuté půdy je výrobcem stanovena potřeba 55,15 g na 1000 ml destilované vody. Postup přípravy je stejný jako v předchozích případech. Médium sloužilo pro očkování bakterií rodu *Lactobacillus*.

Sabourad Dextrose agar (HiMedia)

Pro toto médium je výrobcem uvedena potřeba 65 g na 1000 ml destilované vody. Postup přípravy je stejná jako v předešlém případě. Půda byla připravena pro kultivaci kvasinek.

Sabourad Dextrose Broth (HiMedia)

K přípravě tohoto média výrobce uvádí potřebu 30 g na 1000 ml destilované vody. Postup přípravy je stejný jako v předchozím případě. Tekutá půda sloužila pro kultivaci kvasinek.

5.3 Použité mikroorganismy

Kmeny izolované z vodního kefiru, mléčných kefirů Manta a Flower a také z kefirových zrn těchto fermentovaných výrobků poskytla vedoucí mé práce Ing. Khatantuul Purevdorj, která v rámci spolupráce s portugalskou univerzitou Instituto Politécnico de Beja provedla mikrobiologický rozbor 3 druhů kefirů a jejich kefirových zrn pocházejících od jedné farmářky z Portugalska. Přesný technologický postup výroby těchto kefirů nebyl prozrazen v rámci ochrany vlastní receptury. K růstu bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* byl použit VRBL agar, pro bakterie mléčného kvašení MRS agar a jako médium pro kvasinky sloužil RBC agar. Celkem bylo vyizolováno 201 kmenů, které byly uchovány v 30% roztoku glycerolu v mrazícím zařízení při – 20 °C. U těchto kmenů byla provedena jejich identifikace metodou MALDI/TOF MS. Bylo identifikováno 13 kmenů čeledi *Enterobacteriaceae*, 62 kmenů kvasinek a 96 kmenů rodu *Lactobacillus*.

5.4 Charakteristika izolovaných kmenů

5.4.1 Morfologické makroskopické znaky

Morfologické makroskopické znaky se týkají pozorování kolonií mikroorganismů na agarových půdách pouhým okem. Informují nás o způsobu růstu mikroorganismů a také o čistotě kultury. U všech izolovaných kmenů byly hodnoceny následující ukazatele: velikost kolonií, povrch kolonií, profil kolonií, okraj a barva kolonií.

5.4.2 Gramovo barvení

Barvení podle Grama patří v mikrobiologii k základním diferenciálním barvením a významným diagnostickým metodám. Je založeno na odlišné stavbě bakteriální stěny gram pozitivních a gramnegativních bakterií. Fixovaný preparát se nejprve barví krystalovou violetí, která obarví bakteriální buňky modrofialově. Po obarvení Lugulovým roztokem vznikne komplex barviva s jódem. Následuje odbarvování etanolem nebo acetonem. Nakonec se preparát dobarví karbolfuchsinem nebo safraninem. Grampozitivní bakterie se barví modrofialově, po obarvení krystalovou violetí a moření Lugulovým roztokem zadržují tento barevný komplex v buněčné stěně i po použití organických rozpouštědel (ethanol, aceton). Naopak u gramnegativních bakterií je při použití organických rozpouštědel barevný komplex vymýván a po dobarvení kontrastním barvivem (karbolfuchsin, safranin) se barví červeně.

5.4.3 KOH test

Výsledek Gramova barvení lze také ověřit pomocí jednoduchého a rychlého KOH testu. Na podložní sklíčko se kápne kapka 3% roztoku KOH, ve které se pomocí bakteriologické kličky rozmíchá testovaná kultura. Pokud se jedná o gramnegativní mikroorganismus, vytvoří se táhnoucí vlákno. U grampozitivního mikroorganismu k vytvoření vlákna nedojde.

5.4.4 Test na průkaz katalázy

Kataláza je enzym, který rozkládá peroxid vodíku na vodu a molekulární kyslík. Na podložní sklíčko se kápne 3% roztok peroxidu vodíku, ve kterém se pomocí bakteriologické kličky rozetře testovaná kultura. V případě pozitivního výsledku dochází k uvolňování bublinek kyslíku po přidání peroxidu vodíku k testované kultuře.

5.4.5 Oxidázový test

Cytochromoxidáza je enzym, který je detekován barevnou reakcí N,N-dimethyl-1,4-fenyldiaminu s α -naftolem za vzniku fenolové modři. Do testovacího proužku pomocí sterilní bakteriologické kličky vetřeme kolonii testovaného kmene. V pozitivním případě se inokulované místo proužku zbarví tmavomodře. Při negativní reakci k barevné změně nedochází.

5.4.6 Identifikace kmenů metodou MALDI/TOF MS

Identifikace mikroorganismů pomocí metody MALDI/TOF MS (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analytátorem) je vysoce přesná, aplikovatelná pro široké spektrum mikroorganismů a mnohem rychlejší ve srovnání s tradičními metodami. Touto metodou lze rozlišit bakterie či jiné mikroorganismy na rodové, druhové a často i na kmenové úrovni. Vyhodnocená data získaná z hmotnostních spekter jsou porovnány s knihovnou hmotnostních spekter mikroorganismů v programu MALDI Biotyper. Výsledkem porovnání může být shoda nebo neshoda s hmotnostními spektry vzorku. Program Biotyper vyhodnocuje výsledky pomocí tzv. skóre (nejvyšší možná hodnota je 3), které je dále barevně označeno. Zelená barva značí plnou shodu, žlutá částečnou shodu a červená barva žádnou shodu. Neshody výsledků s knihovnou mohou být příčinou kontaminace vzorku s jinými mikroorganismy nebo nesprávné kultivace mikroorganismů [64].

Principem této metody je ozáření směsi vzorku a matrice laserovým zařízením, přičemž dojde k desorpci molekul matrice spolu s molekulami vzorku a zároveň k ionizaci molekul vzorku. Pozitivně nabití ionty jsou urychleny silným elektrickým polem a vstupují přes uzemněnou mřížku do vakua průletového analyzátoru, kde se pohybují rychlostí danou jejich hmotností a nábojem. V závislosti na době letu částice se vypočte poměr hmotnosti a náboje [64].

Jednotlivé kmeny byly nejdříve suspendovány ve 150 μ l destilované vody a pak smíchány s 450 μ l ethanolu. Takto upravené vzorky byly zamrazeny. Jejich analýza byla provedena na přístroji MALDI/TOF MS Bruker Daltonik Biotyper Microflex v Nitře (Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre).

5.5 Stanovení biogenních aminů metodou HPLC – UV/VIS

5.5.1 Příprava kultivačních médií pro zjištění produkce BA

Dekarboxylázová aktivita enterobakterií byla zjišťována v NB bujónu, kvasinek v SAB bujónu a laktobacilů v MRS bujónu. Tekutá média obsahovala jednotlivé aminokyseliny (fenylalanin, tryptofan, ornitin, tyrosin, histidin, lysin, arginin) jako prekurzory příslušných BA a to v koncentraci 0,2 % (w/v). Do 7 ml takto připraveného kultivačního média bylo zaočkováno 100 µl suspenze kultivované při 37 °C 48 h (enterobakterie, laktobacily) a při pokojové teplotě 72 h (kvasinky).

5.5.2 Příprava vzorků na derivatizaci

Modifikované bujóny byly po kultivaci testovaných kmenů zcentrifugovány při otáčkách 4600 po dobu 10 minut. Získaný supernatant byl dávkován do eppendorfkových zkumavek a zředěn v poměru 1 : 1 s kyselinou chloristou o koncentraci 1,2 mol/l. Vzorky byly zamrazeny a připraveny na derivatizaci.

5.5.3 Derivatizace vzorků

Upravené vzorky byly podrobeny derivatizaci dalsylchloridem. Postup byl proveden dle návodu dostupného v laboratoři.

Postup derivatizace:

1. Do derivatizační nádoby bylo napipetováno 100 µl 1,7-heptadiaminu (Sigma-Aldrich) v koncentraci 500 mg/l jako vnitřního standardu.
2. Následně byl odpipetován z eppendorfkové zkumavky 1 ml vzorku.
3. Do nádoby bylo přidáno 1,5 ml karbonátového pufru s pH 11,1 – 11,2 a 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu (Sigma-Aldrich) o koncentraci 5 g/l v acetonu (Honeywell).
- 3.1. Pufr byl připraven smícháním roztoku 0,5 M NaHCO₃ (Merck) s roztokem 0,5 M Na₂CO₃ (Merck) tak, aby výsledné pH bylo 9,2. Poté se přidá K₂CO₃ (Merck) a pH je upraveno na výsledných 11,1 – 11,2.
4. Derivatizační nádoby byly uzavřeny a nechaly se třepat v temnu 20 hodin.
5. Po uplynutí stanovené doby se ke každému vzorku přidalo 200 µl prolinu (Merck) a vzorky se nechaly opět třepat další hodinu.

6. Poté se přidaly 3 ml heptanu (Honeywell) a vzorky se třepaly ručně po dobu 3 minut.
7. Následně byl odpipetován 1 ml heptanové vrstvy do vialek.
8. Obsah vialky se nechal odpařit do sucha pod proudem dusíku při teplotě 65 °C.
9. Suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich) a vzorky byly uchovávány v mrazícím zařízení při teplotách pod -18 °C do doby analýzy.

5.5.4 Vlastní chromatografické stanovení

Všechny derivatizované vzorky byly bezprostředně před analýzou přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 µm. K chromatografickému stanovení byl použit vysoceúčinný kapalinový chromatograf Dionex HPLC UltiMate 3000 (Německo). Chromatografický systém obsahoval analytickou kolonu s předkolonou ZORBAC RRHD Eclipse Plus C18 o rozměrech 3 x 50 mm s pórovitostí 1,8 µm, termostat kolon (UltiMate™ 3000 TCC-3000SD), autosampler (UltiMate™ WPS-3000TRS), binární pumpu (UltiMate™ HPG-3200RS) a detektor (UltiMate™ VWD-3400RS). Průtok kolonou byl 0,453 ml/min a teplota byla nastavená na 30 °C. UV detekce dansylderivátů probíhala při vlnové délce 254 nm. Pro vyhodnocení chromatogramu byl použit software Chromeleon™ 6.8 a výsledky byly zpracovány v programu Microsoft Excel 2010.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Charakteristika izolovaných kmenů

U 13 kmenů enterobakterií, 62 kmenů kvasinek a 96 kmenů laktobacilů izolovaných ze 3 druhů kefirů a jejich kefirových zrn byly sledovány morfologické makroskopické znaky. Hodnotily se následující ukazatele: velikost kolonií, povrch kolonií, profil kolonií, okraj a barva kolonií.

Makroskopické morfologické znaky

Čeleď Enterobacteriaceae

Kmeny enterobakterií tvořily na Endově agaru kolonie o velikosti 0,5 – 1 mm s lesklým povrchem a plochým profilem, s převážně hladkými okraji a fialově červené nebo růžové barvy. Výsledky jsou uvedeny v Příloze I.

Kvasinky

Jako médium pro kvasinky sloužil SAB agar. Testované kmeny na něm tvořily kolonie o velikosti 0,5 – 2 mm s lesklým povrchem s převážně plochým profilem, hladkými okraji a smetanové nebo bílé barvy. Výsledky jsou uvedeny v Příloze I.

Rod *Lactobacillus*

Kmeny pocházející z rodu *Lactobacillus* byly pozorovány na MRS agaru, kde vytvářely kolonie o velikosti 0,5 – 1 mm s lesklým povrchem, plochým profilem, hladkými okraji a průhledné nebo bílé barvy. Výsledky jsou uvedeny v Příloze I.

Gramovo barvení a vybrané biochemické testy

U všech testovaných kmenů bylo provedeno Gramovo barvení (s výjimkou kvasinek) a vybrané biochemické testy - KOH test (s výjimkou kvasinek), test na průkaz katalázy a oxidázový test. Výsledky jsou uvedeny v Příloze II.

6.2 Identifikace kmenů metodou MALDI/TOF MS

Metodou MALDI/TOF MS bylo celkem identifikováno 171 kmenů izolovaných z vodního kefiru, mléčných kefirů Manta a Flower a také z kefirových zrn těchto fermentovaných výrobků. Z celkového množství bylo 128 izolátů identifikováno velmi spolehlivě (označeny zeleně) a 43 izolátů s nižší spolehlivostí (označeny žlutě).

Z čeledi *Enterobacteriaceae* bylo identifikováno celkem 13 kmenů, z nichž 4 izoláty byly rozpoznány s nižší spolehlivostí a 9 izolátů velmi spolehlivě. Nejčastěji byly zastoupeny bakteriální druhy *Enterobacter cloacae* (4) izolovaný z kefirových zrn mléčných kefirů Manta a Flower, *Enterobacter asburiae* (3) pocházející z Manta kefiru a jeho kefirových zrn a Flower kefiru a *Klebsiella oxytoca* (3) zastoupená v Manta a Flower kefirech. Výsledky jsou uvedeny v Tab 3.

Tab. 3: Identifikace kmenů z čeledi *Enterobacteriaceae* metodou MALDI/TOF MS

Číslo izolátu	Vzorek	Název mikroorganismu	Skóre
1	WKG	<i>Cronobacter sakazakii</i>	1,744
9	FKG	<i>Enterobacter ludwigii</i>	2,165
10	FKG	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,943
11	FKG	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,115
15	MKG	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,016
16	MKG	<i>Enterobacter asburiae</i>	2,289
18	MKG	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,024
21	MKF	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1,864
23	MKF	<i>Enterobacter asburiae</i>	2,049
24	MKF	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1,976
26	MKF	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1,884
229	FKF	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,288
230	FKF	<i>Enterobacter asburiae</i>	2,182

Dále bylo identifikováno 62 kmenů kvasinek, z nichž bylo 22 izolátů identifikováno s nižší spolehlivostí a 40 izolátů velmi spolehlivě. Mezi nejvíce zastoupené kvasinky se řadí *Kazachstania unispora* (56) izolovaná z Manta i Flower kefiru a jejich kefirových zrn a také z vodního kefiru. V malých počtech se vyskytovaly *Lachancea fermentati* (1) pocházející z vodního kefiru a *Candida valida* (5) vyizolovaná z vodního kefiru a jeho zrn. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4: Identifikace kmenů kvasinek metodou MALDI/TOF MS

Číslo izolátu	Vzorek	Název mikroorganismu	Skóre
78	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	1,702
79	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	1,750
80	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	1,761
91	WKF	<i>Kazachstania unispora</i>	1,886
130	WKF	<i>Candida valida</i>	1,832
132	WKF	<i>Candida valida</i>	1,906
133	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2,335
137	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2,213
139	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2,365
141	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2,395
142	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2,260
143	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2,415
146	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2,179
148	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2,294
150	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2,270
151	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2,351
152	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2,389
153	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2,465
154	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2,258
155	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2,291
198	WKG	<i>Candida valida</i>	2,107
201	WKF	<i>Candida valida</i>	1,710
205	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2,205
206	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	1,803
207	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	1,803
208	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	1,995
209	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	1,978
210	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2,566
212	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	1,946
213	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	1,763
214	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	1,863
215	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2,038
216	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	1,879
218	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	1,895
219	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	1,904
222	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2,092
223	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	1,935
224	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	1,856
225	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2,035
226	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	1,925
228	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2,282
280	WKF	<i>Candida valida</i>	1,946

284	WKF	<i>Lachancea fermentati</i>	1,732
285	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2,299
286	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2,203
287	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2,239
288	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2,196
289	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2,160
290	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2,218
291	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2,209
293	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2,232
294	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2,274
297	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2,394
298	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2,351
299	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2,236
300	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2,488
301	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2,444
302	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2,476
303	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2,341
305	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2,368
307	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2,373
308	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2,269

Z rodu *Lactobacillus* bylo rozpoznáno 96 kmenů, z toho 17 izolátů bylo rozpoznáno s nižší spolehlivostí a 79 izolátů velmi spolehlivě. Nejvíce byl zastoupen *Lactobacillus kefiri* (74) izolovaný z mléčných kefirů Manta a Flower a jejich kefirových zrn a *Lactobacillus satsumensis* (20) izolovaný z vodního kefiru a jeho zrna. V malých počtech se vyskytovaly *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* (1) pocházející ze zrn vodního kefiru a *Lactobacillus nagelii* (1) vyizolovaný z vodního kefiru. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5: Identifikace kmenů z rodu *Lactobacillus* metodou MALDI/TOF MS

Číslo izolátu	Vzorek	Název mikroorganismu	Skóre
27	WKG	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i>	1,954
40	FKG	<i>Lactobacillus kefiri</i>	1,700
47	FKF	<i>Lactobacillus kefiri</i>	1,741
58	MKF	<i>Lactobacillus kefiri</i>	1,762
59	MKF	<i>Lactobacillus kefiri</i>	1,823
106	FKG	<i>Lactobacillus kefiri</i>	2,194
107	FKG	<i>Lactobacillus kefiri</i>	2,146
108	FKG	<i>Lactobacillus kefiri</i>	2,337
109	FKG	<i>Lactobacillus kefiri</i>	2,065
110	FKG	<i>Lactobacillus kefiri</i>	2,319

111	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,399
112	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,185
114	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,141
115	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,187
116	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,282
117	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,225
118	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,254
119	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,140
120	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,315
121	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,214
122	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,167
123	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,119
157	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1,812
158	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1,792
159	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	2,129
160	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1,966
161	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	2,232
162	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1,794
163	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	2,032
164	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	2,022
165	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1,908
166	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1,808
167	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1,818
168	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1,928
169	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,287
170	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,242
171	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,213
172	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,272
173	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,197
174	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,276
175	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,228
176	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,362
177	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,332
178	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,317
179	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,286
180	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,287
181	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,299
182	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,243
183	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,253
184	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,142
185	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,387
186	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,201
187	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,250
188	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,166

189	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,146
190	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,295
191	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,299
192	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,087
231	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,241
232	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,301
233	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,309
234	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,319
235	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,230
236	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,323
237	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1,997
238	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	2,030
239	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	2,119
240	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	2,015
241	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1,98
242	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	2,025
244	WKF	<i>Lactobacillus nagelii</i>	2,237
245	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1,978
247	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1,959
249	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,302
250	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,276
251	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,248
252	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,109
253	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,279
254	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,336
255	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,282
256	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,252
257	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,223
258	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,288
259	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,265
260	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,258
261	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,254
262	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,145
263	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,174
264	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,203
265	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,160
266	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,194
267	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,059
269	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,185
270	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,151
271	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,175
272	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,255

6.3 Stanovení biogenních aminů metodou HPLC – UV/VIS

Schopnost produkce 8 biogenních aminů (tryptamin, 2-fenylethylamin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermidin a spermin) byla sledována pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s využitím UV/VIS detekce.

6.3.1 Čeleď *Enterobacteriaceae*

Celkem bylo testováno 13 kmenů z čeledi *Enterobacteriaceae* na dekarboxylázovou aktivitu. U všech kmenů byla zjištěna produkce 2-fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu, tyraminu a sperminu. U žádného izolátu nebyla zjištěna přítomnost tryptaminu a spermidinu.

Schopnost produkovat histamin byla zjištěna pouze u 3 kmenů. Jednalo se o *Enterobacter ludwigii* izolovaného ze zrn vodního kefiru (izolát 9), u něhož bylo detekováno nejvyšší množství ($6,5 \pm 0,7$ mg/l). Mezi další 2 kmene schopné produkovat histamin se řadily *Leclercia adecarboxylata* ($1,2 \pm 0,1$ mg/l) pocházející z Manta kefiru (izolát 26) a *Enterobacter asburiae* ($1,6 \pm 0,3$ mg/l) izolovaný z Flower kefiru (izolát 230). V obou případech se jednalo o minimální množství histaminu.

2-fenylethylamin byl u všech kmenů detekován v malých koncentracích pohybujících se v rozmezí 1,3 – 1,9 mg/l. Nejvyšší množství 2-fenylethylaminu vykazoval kmen *Enterobacter cloacea* (izolát 15) izolovaný z kefirových zrn Manta kefiru ($1,9 \pm 0,4$ mg/l).

Ve značně vysokých koncentracích byl detekován putrescin, což by mohlo představovat zdravotní riziko pro spotřebitele. Pouze kmen *Klebsiella oxytoca* izolovaný z Flower kefiru (izolát 229) vykazoval nižší koncentraci putrescinu oproti ostatním kmenům ($59,6 \pm 2,4$ mg/l). Nejvyšší množství putrescinu bylo zjištěno u kmene *Cronobacter sakazakii* (izolát 9) izolovaného z kefirových zrn vodního kefiru ($553,4 \pm 11,8$ mg/l). Pro putrescin a další BA s výjimkou histaminu není stanovený žádný legislativní limit. Nařízení Komise (ES) č. 2073/2015 o mikrobiologických kritériích pro potraviny stanovila přípustné množství histaminu:

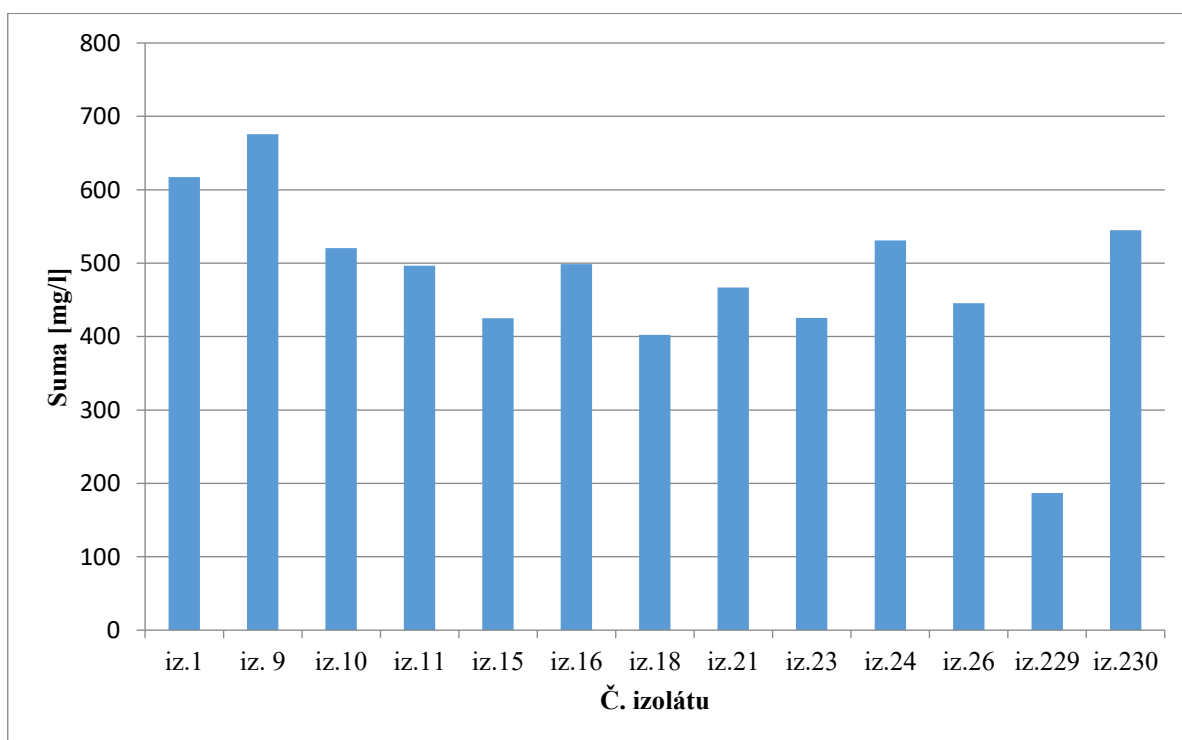
- pro produkty rybolovu z druhů ryb spojovaných s vysokým množstvím histidinu na 100 mg/kg,
- pro produkty rybolovu, které byly ošetřeny enzymatickým zráním v láku, vyrobené z druhů ryb spojovaných s vysokým množstvím histidinu na 200 mg/kg [65].

Koncentrace kadaverinu se pohybovaly v rozmezí 7,4 – 80,1 mg/l. Nejvyšší množství kadaverinu bylo stanoveno u kmene *Klebsiella oxytoca* (izolát 229) izolovaného z Flower kefiru ($80,1 \pm 2,9$ mg/l). Naopak nejmenší produkce kadaverinu byla zjištěna u kmene *Enterobacter asburiae* (izolát 23) pocházejícího z Manta kefiru ($7,4 \pm 1,0$ mg/l).

Množství produkovaného tyraminu se pohybovalo v rozmezí 15,3 – 18,8 mg/l a hladiny sperminu vykazovaly rozpětí 26,0 – 36,0 mg/l.

Celkové sumy produkce BA pro jednotlivé kmeny jsou znázorněny v Grafu 1, z něhož je patrné, že největší produkce BA byla stanovena u kmene *Enterobacter ludwigii* (izolát 9) izolovaného z kefirového zrna Flower kefiru ($675,7 \pm 12,6$ mg/l). Nejmenší produkce byla zjištěna u kmene *Klebsiella oxytoca* (izolát 229) izolovaného z Flower kefiru ($187,0 \pm 3,8$ mg/l).

Graf 1: Celková produkce BA pro jednotlivé kmeny čeledi *Enterobacteriaceae*

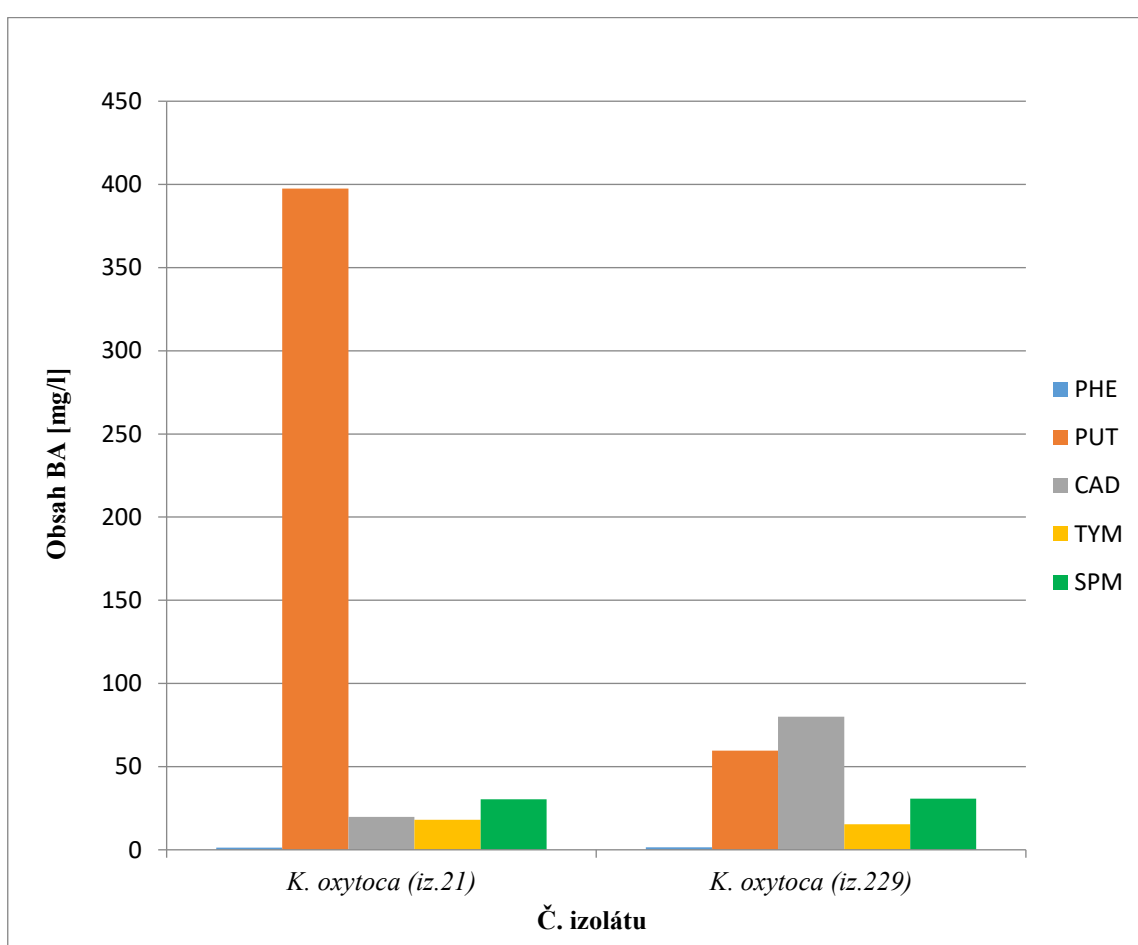


Největší celková produkce BA u kmene *Klebsiella oxytoca* izolovaného z Manta kefiru (izolát 21) byla porovnána s nejnižší celkovou produkcí BA u kmene *Klebsiella oxytoca* izolovaného z Flower kefiru (izolát 229) v Grafu 2.

Z Grafu 2 lze vyčíst, že oba kmeny produkovaly podobné množství 2-fenylethylaminu, tyraminu a sperminu. Významně se odlišovaly v produkci putrescinu a kadaverinu. U

kmene *Klebsiella oxytoca* izolovaného z Manta kefiru (izolát 21) byla zjištěna téměř sedminásobná koncentrace putrescinu ve srovnání s kmenem *Klebsiella oxytoca* izolovaného z Flower kefiru (izolát 229). Naproti tomu u kmene *Klebsiella oxytoca* izolovaného z Flower kefiru (izolát 229) byla stanovena 4krát větší koncentrace kadaverinu v porovnání s kmenem *Klebsiella oxytoca* izolovaného z Manta kefiru (izolát 21).

Graf 2: Srovnání produkce BA u kmene z čeledi *Enterobacteriaceae* s nejmenší a největší celkovou produkcí BA



Přítomnost bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* v kefirovém zrně vodního kefiru, v mléčných kefirech Manta a Flower a jejich kefirových zrnech vypovídá o nedodržení technologických postupů správné výrobní a hygienické praxe.

Studiem biogenních aminů v kefirech se do dnešní doby mnoho autorů nezabývalo. Autoři Özdestan a Üren [41] zkoumali 10 vzorků kefiru za účelem stanovení BA pomocí HPLC. Ve všech vzorcích byly detekovány putrescin, kadaverin a spermidin. Převažujícím biogenním aminem byl tyramin, jehož nejvyšší stanovená koncentrace byla 12 mg/l, což je o

něco méně než v mém případě, kdy se množství tyraminu pohybovalo v rozmezí 15,3 – 18,8 mg/l.

Podle Suzzi a Gardini [50] mohou bakterie produkovat vysoké množství kadaverinu, putrescinu a histaminu a to zejména *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* a *Klebsiella oxytoca*. Toto tvrzení potvrdilo produkci vysokého množství putrescinu u všech testovaných kmenů a to i zmiňovaným *E. cloacae*. *Klebsiella oxytoca* také produkovala putrescin, ale v nejmenší koncentraci oproti ostatním kmenům.

Výsledky produkce jednotlivých BA bakteriemi z čeledi *Enterobacteriaceae* jsou uvedeny v Tab. 6 a Tab. 7. Celkové sumy produkce BA pro jednotlivé kmeny čeledi *Enterobacteriaceae* jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab. 6: Produkce jednotlivých BA u izolátů čeledi *Enterobacteriaceae*

Č. izolátu	Vzorek	Mikroorganismus	Analyzované biogenní aminy [mg/l]			
			TRP	PHE	PUT	CAD
1	WKG	<i>Cronobacter sakazakii</i>	ND	1,8 ± 0,7	553,4 ± 11,8	18,1 ± 1,9
9	FKG	<i>Enterobacter ludwigii</i>	ND	1,6 ± 0,3	401,3 ± 14,5	27,5 ± 2,5
10	FKG	<i>Enterobacter cloacae</i>	ND	1,4 ± 0,3	451,9 ± 8,3	17,8 ± 1,7
11	FKG	<i>Enterobacter cloacae</i>	ND	1,5 ± 0,3	424,4 ± 3,3	17,8 ± 2,1
15	MKG	<i>Enterobacter cloacae</i>	ND	1,9 ± 0,4	350,9 ± 7,2	18,6 ± 1,7
16	MKG	<i>Enterobacter asburiae</i>	ND	1,5 ± 0,3	427,0 ± 8,0	19,1 ± 1,5
18	MKG	<i>Enterobacter cloacae</i>	ND	1,5 ± 0,3	332,9 ± 3,0	20,5 ± 0,7
21	MKF	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ND	1,4 ± 0,4	397,4 ± 8,5	19,7 ± 1,6
23	MKF	<i>Enterobacter asburiae</i>	ND	1,3 ± 0,2	363,3 ± 6,6	7,4 ± 1,0
24	MKF	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ND	1,4 ± 0,1	467,5 ± 5,0	15,9 ± 1,6
26	MKF	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	ND	1,4 ± 0,3	382,9 ± 6,4	13,7 ± 0,9
229	FKF	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ND	1,6 ± 0,3	59,6 ± 2,4	80,1 ± 2,9
230	FKF	<i>Enterobacter asburiae</i>	ND	1,8 ± 0,4	487,6 ± 8,9	12,4 ± 0,9

Tab. 7: Produkce jednotlivých BA u izolátů čeledi *Enterobacteriaceae* a celková produkce BA pro jednotlivé izoláty čeledi *Enterobacteriaceae*

Č. izolátu	Vzorek	Mikroorganismus	Analyzované biogenní aminy [mg/l]				Suma BA [mg/l]
			HIS	TYM	SPD	SPM	
1	WKG	<i>Cronobacter sakazakii</i>	ND	16,2 ± 1,0	ND	27,6 ± 0,9	617,1 ± 12,4
9	FKG	<i>Enterobacter ludwigii</i>	6,5 ± 0,7	16,0 ± 1,2	ND	27,2 ± 1,4	675,7 ± 12,6
10	FKG	<i>Enterobacter cloacae</i>	ND	16,2 ± 1,3	ND	33,3 ± 2,0	520,5 ± 9,4
11	FKG	<i>Enterobacter cloacae</i>	ND	17,7 ± 1,5	ND	35,3 ± 1,0	496,7 ± 6,1
15	MKG	<i>Enterobacter cloacae</i>	ND	17,7 ± 1,8	ND	36,4 ± 1,5	425,2 ± 12,3
16	MKG	<i>Enterobacter asburiae</i>	ND	18,1 ± 0,6	ND	33,5 ± 1,9	498,8 ± 9,8
18	MKG	<i>Enterobacter cloacae</i>	ND	18,8 ± 1,3	ND	29,2 ± 1,2	402,4 ± 3,5
21	MKF	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ND	18,0 ± 1,3	ND	30,3 ± 1,4	466,7 ± 9,3
23	MKF	<i>Enterobacter asburiae</i>	ND	17,4 ± 1,2	ND	36,0 ± 0,7	425,5 ± 7,1

24	MKF	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ND	15,9 ± 0,7	ND	30,6 ± 1,6	531,0 ± 5,0
26	MKF	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1,2 ± 0,1	15,9 ± 0,9	ND	31,2 ± 1,6	445,3 ± 8,5
229	FKF	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ND	15,3 ± 1,1	ND	30,7 ± 1,2	187,0 ± 3,8
230	FKF	<i>Enterobacter asburiae</i>	1,6 ± 0,3	15,8 ± 1,1	ND	26,0 ± 2,1	545,0 ± 10,3

6.3.2 Kvasinky

Celkem bylo testováno 62 kmenů kvasinek na dekarboxylázovou aktivitu. U všech izolátů byla zjištěna produkce 2-fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu, tyraminu a sperminu. U žádného kmene nebyla zjištěna přítomnost tryptaminu ani spermidinu.

2-fenylethylamin byl u všech kmenů zastoupen v malých koncentracích pohybujících se v rozmezí 1,0 – 1,9 mg/l. Největší množství 2-fenylethylaminu bylo detekováno u 2 kmenů *Kazachstania unispora* (izolát 78, 148) izolovaných z keřirových zrn Manta keřiru (1,9 ± 0,4 mg/l; 1,9 ± 0,5 mg/l). Nejnižší koncentrace byla zjištěna u kmene *Kazachstania unispora* (izolát 285) pocházejícího z vodního keřiru (1,0 ± 0,1 mg/l).

Hladiny putrescinu a kadaverinu byly u všech kmenů mírně vyšší oproti 2-fenylethylaminu, ale také byly zastoupeny v poměrně nízkých koncentracích.

Koncentrace putrescinu se pohybovaly v rozmezí 2,4 – 3,8 mg/l. Nejnižší produkce putrescinu byla zjištěna u kmene *Kazachstania unispora* (izolát 133) izolovaného z keřirových zrn Flower keřiru (2,1 ± 0,3 mg/l). Na druhé straně nejvyšší koncentrace byla stanovena u kmene *Kazachstania unispora* (izolát 291) pocházejícího z Flower keřiru (3,8 ± 0,6 mg/l).

Množství kadaverinu bylo zastoupeno v rozmezí 1,5 – 3,1 mg/l. Nejnižší produkce byla zaznamenána u 3 kmenů: kmene *Candida valida* (izolát 132) pocházejícího z vodního keřiru (1,5 ± 0,5 mg/l), kmene *Kazachstania unispora* (izolát 133) izolovaného z keřirových zrn Flower keřiru (1,5 ± 0,2 mg/l) a kmene *Kazachstania unispora* (izolát 141) pocházejícího z Flower keřiru (1,5 ± 0,3 mg/l). U kmene *Kazachstania unispora* (izolát 222) izolovaného z keřirových zrn Manta keřiru byla stanovena nejvyšší produkce kadaverinu (3,1 ± 0,6 mg/l).

Schopnost produkce histaminu byla prokázána pouze u 3 kmenů. Jednalo se i kmen *Kazachstania unispora* (izolát 78) pocházející z keřirových zrn Manta keřiru, který vykazoval nejvyšší produkci (2,6 ± 0,2 mg/l). Histamin také produkoval kmen *Kazachstania unispora* (izolát 151) izolovaný z Manta keřiru (1,7 ± 0,8 mg/l). Nejnižší produkce histaminu byla

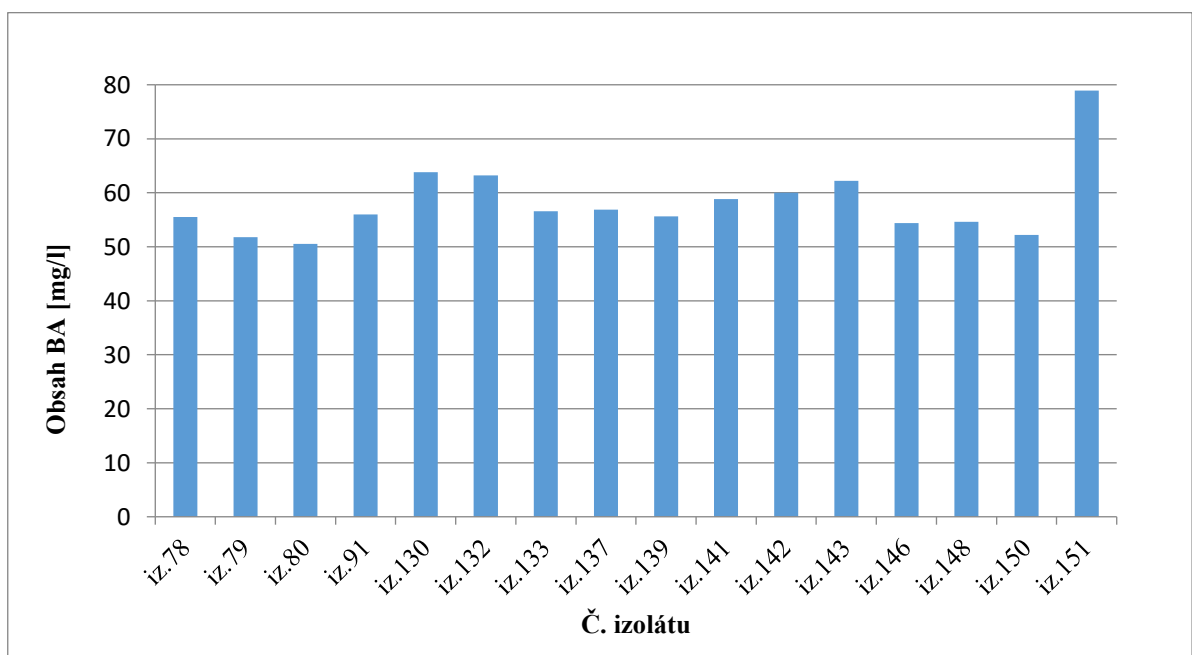
stanovena u kmene *Kazachstania unispora* (izolát 205) izolovaného z keřirových zrn Flower kefiru ($1,2 \pm 0,3$ mg/l).

Množství produkovaného tyraminu se pohybovalo v rozmezí 10,2 – 19,1 mg/l. U kmene *Kazachstania unispora* (izolát 80) izolovaného z keřirových zrn Manta kefiru byla stanovena nejnižší koncentrace tyraminu ($10,2 \pm 1,1$ mg/l). Nejvyšší produkce tyraminu byla zaznamenána u kmene *Kazachstania unispora* (izolát 228) pocházejícího z Flower kefiru ($19,1 \pm 0,6$ mg/l).

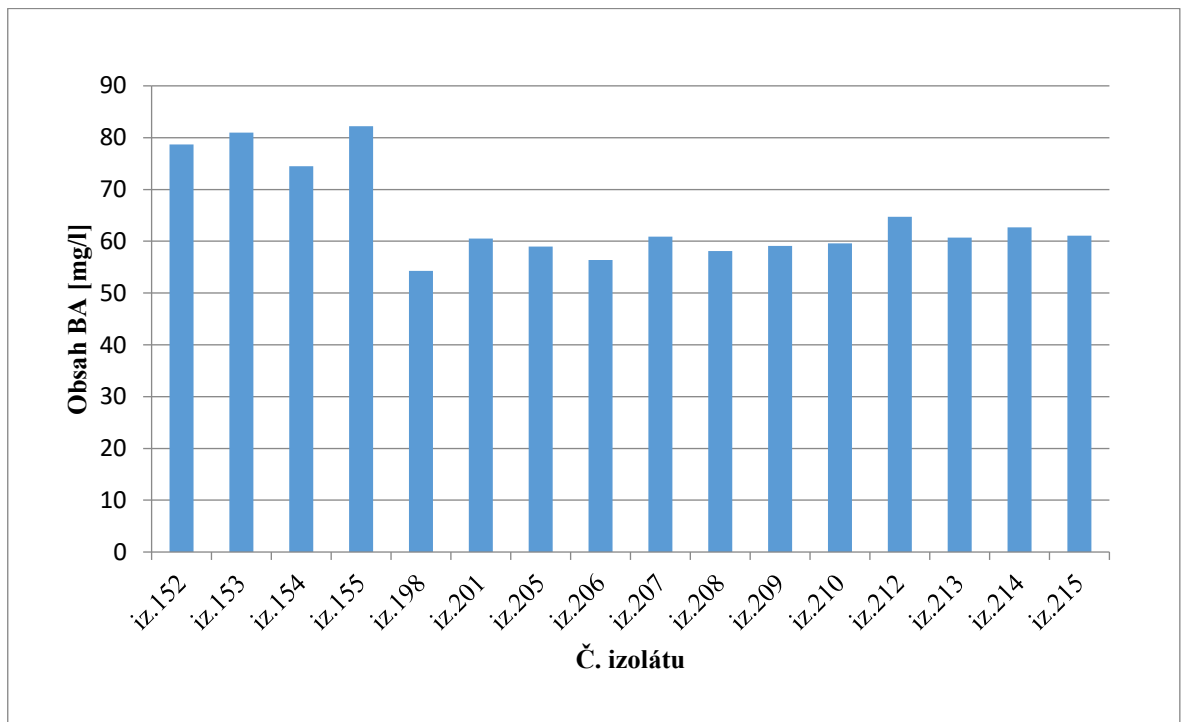
Spermin se řadil mezi biogenní amin zastoupený v největších koncentracích. Hladiny sperminu se pohybovaly v rozpětí 32,1 – 58,1 mg/l. Nejnižší množství sperminu bylo stanoveno u kmene *Kazachstania unispora* (izolát 150) izolovaného z keřirových zrn Manta kefiru ($32,1 \pm 1,1$ mg/l). U kmene *Kazachstania unispora* (izolát 303) pocházejícího z Manta kefiru byla prokázána největší produkce sperminu ($58,1 \pm 1,1$ mg/l).

Celkové sumy produkce BA pro jednotlivé kmeny kvasinek jsou znázorněny v Grafech 3, 4, 5 a 6. Z Grafů 3, 4, 5, a 6 lze vyčíst, že největší produkce BA byla stanovena u kmene *Kazachstania unispora* (izolát 155) izolovaného z Manta kefiru ($82,2 \pm 2,2$ mg/l). Kmen s celkovou nejnižší produkcí BA představuje *Kazachstania unispora* (izolát 80) pocházející z keřirových zrn Manta kefiru ($50,5 \pm 3,5$ mg/l).

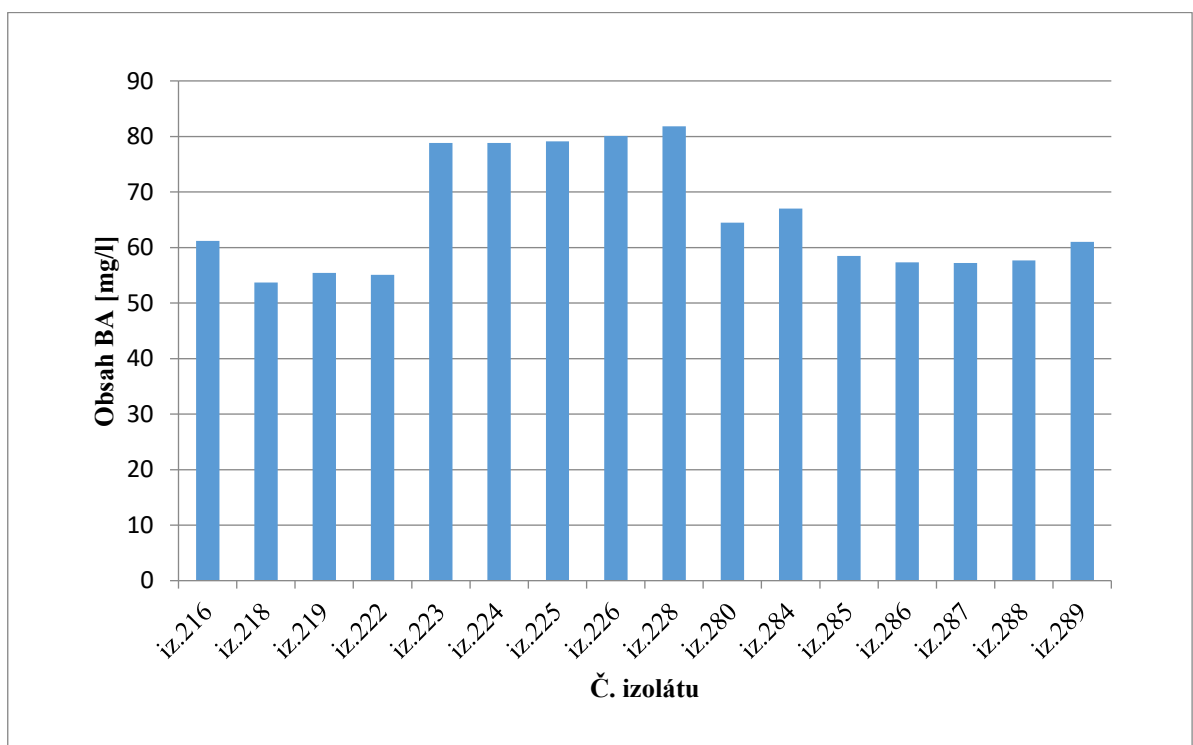
Graf 3: Celková produkce BA pro jednotlivé kmeny kvasinek



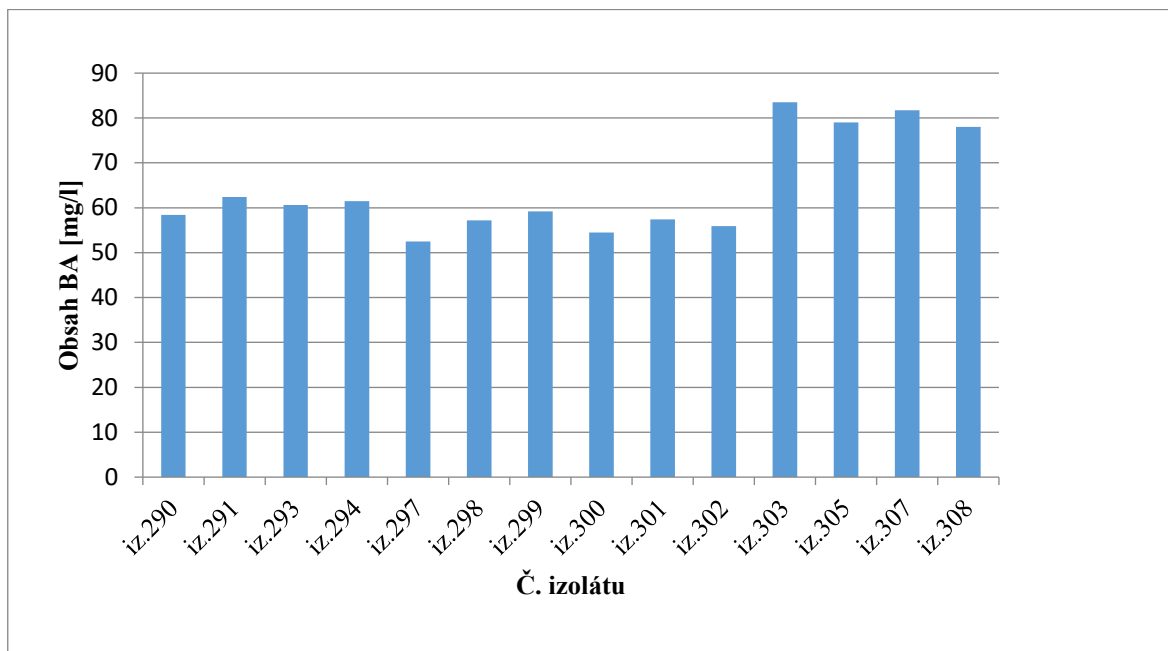
Graf 4: Celková produkce BA pro jednotlivé kmeny kvasinek



Graf 5: Celková produkce BA pro jednotlivé kmeny kvasinek



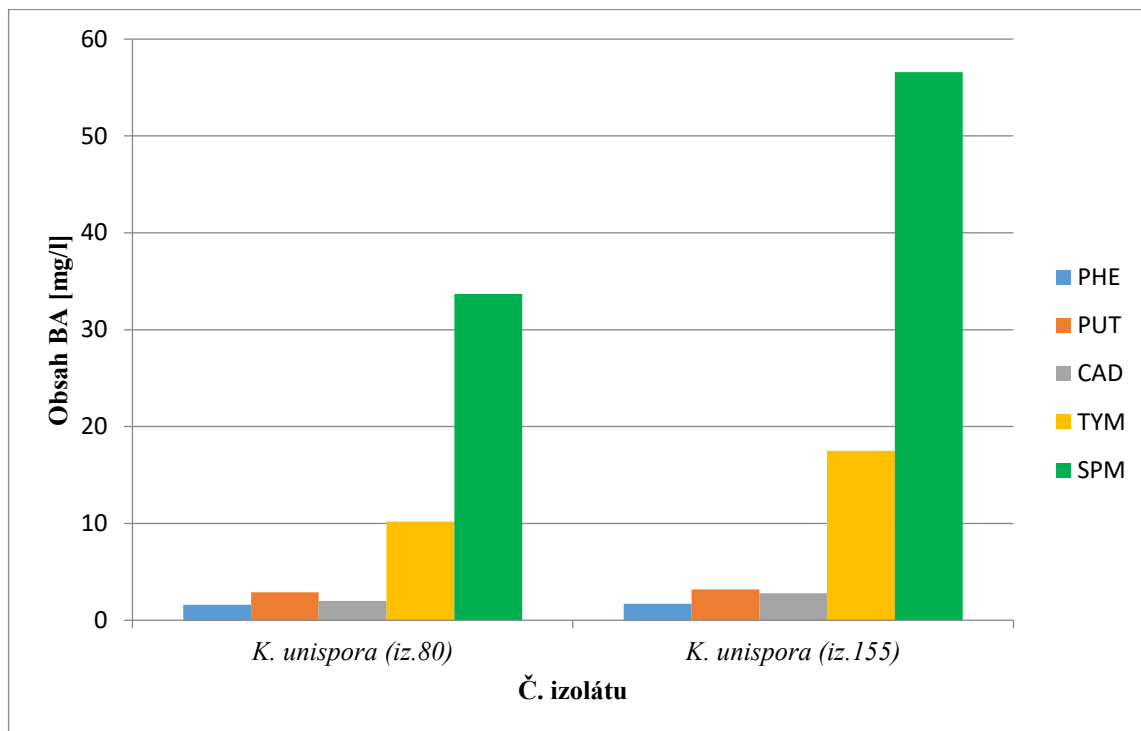
Graf 6: Celková produkce BA pro jednotlivé kmeny kvasinek



Největší celková produkce BA u kmene *Kazachstania unispora* (izolát155) pocházejícího z Manta kefiru byla porovnána s nejnižší celkovou produkcí BA u kmene *Kazachstania unispora* (izolát 80) izolovaného z kefirových zrn Manta kefiru v Grafu 7.

Z Grafu 7 je patrné, že oba kmeny produkovaly podobné koncentrace 2-fenylethylaminu, putrescinu a kadaverinu. Významně se odlišovaly produkcí tyraminu a sperminu. Kmen *Kazachstania unispora* (izolát155) izolovaný z Manta kefiru produkoval 1,7krát více tyraminu a sperminu v porovnání s kmenem *Kazachstania unispora* (izolát 80) izolovaného z kefirových zrn Manta kefiru.

Graf 7: Srovnání produkce BA u kmene kvasinek s nejmenší a největší celkovou produkcí BA



V současnosti existuje velmi málo příspěvků zabývajících se produkcí BA kvasinkami ve fermentovaných potravinách.

Podle Suzzi a Gardini [50] byla u kvasinek rodu *Debaromyces* a *Candida* izolovaných z masných výrobků zjištěna produkce histaminu. V případě testovaného kmene *Candida valida*, izolovaného z vodního kefiru a jeho zrna, nebyla schopnost produkce histaminu prokázána.

Tvrzení, že některé neidentifikovatelné kmeny kvasinek jsou schopny produkovat vysoké množství 2-fenylethylaminu [50], se v případě testovaných kmenů nepotvrdilo. Všechny kmeny produkovaly 2-fenylethylamin v malých koncentracích.

Haasová [66] se ve své diplomové práci zabývá schopností produkce BA vybranými kmeny kvasinek. Jednalo se o kmeny pивních kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus* a divokých kvasinek *Debaromyces hansenii*, *Dekkera bruxellensis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida* spp. a některé další kmeny. Detekován byl pouze tyramin, spermin a spermidin. Koncentrace tyraminu byly stanoveny v rozmezí 12 – 18 mg/l,

což se v podstatě shoduje s mými testovanými kmeny. Hladiny sperminu se pohybovaly v rozpětí 16 – 35 mg/l, tedy v menších koncentracích než v mém případě (32,1 – 58,1 mg/l). Spermidin byl detekován pouze v zanedbatelném množství. Tato tvrzení se nepotvrdilo, u testovaných kmenů nebyla prokázána schopnost produkovat spermidin.

Výsledky produkce jednotlivých BA produkovaných kvasinkami jsou uvedeny v Tab. 8 a Tab. 9. Celkové sumy produkce BA pro jednotlivé kmeny kvasinek jsou uvedeny v Tab. 9.

Tab. 8: Produkce jednotlivých biogenních aminů kvasinkami

Č. izolátu	Vzorek	Mikroorganismus	Analyzované biogenní aminy [mg/l]			
			TRP	PHE	PUT	CAD
78	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,9 ± 0,4	2,8 ± 0,7	2,5 ± 0,4
79	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,4 ± 0,2	2,7 ± 0,7	2,3 ± 0,8
80	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,6 ± 0,5	2,9 ± 0,6	2,0 ± 0,4
91	WKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,7 ± 0,5	2,8 ± 0,7	1,8 ± 0,3
130	WKF	<i>Candida valida</i>	ND	1,3 ± 0,3	3,5 ± 0,6	1,9 ± 0,7
132	WKF	<i>Candida valida</i>	ND	1,2 ± 0,3	3,7 ± 0,3	1,5 ± 0,5
133	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,1 ± 0,2	2,4 ± 0,3	1,5 ± 0,2
137	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,1 ± 0,1	3,2 ± 0,7	1,7 ± 0,3
139	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,2 ± 0,3	3,3 ± 0,5	1,6 ± 0,2
141	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,5 ± 0,4	3,0 ± 0,5	1,5 ± 0,3
142	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,3 ± 0,3	2,9 ± 0,5	1,9 ± 0,5
143	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,7 ± 0,5	3,7 ± 0,5	1,8 ± 0,3
146	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,8 ± 0,6	3,1 ± 0,5	2,0 ± 0,6
148	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,9 ± 0,5	3,0 ± 0,6	2,6 ± 0,7
150	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,8 ± 0,3	3,0 ± 0,8	2,8 ± 0,8
151	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,7 ± 0,4	3,4 ± 0,6	2,4 ± 0,9
152	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,2 ± 0,3	3,0 ± 0,6	2,9 ± 0,3
153	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,9 ± 0,3	3,1 ± 0,6	2,6 ± 0,5
154	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,6 ± 0,3	2,8 ± 0,3	1,6 ± 0,2
155	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,7 ± 0,2	3,2 ± 0,5	2,8 ± 0,5
198	WKG	<i>Candida valida</i>	ND	1,8 ± 0,6	2,8 ± 0,5	2,0 ± 0,4
201	WKF	<i>Candida valida</i>	ND	1,7 ± 0,7	3,5 ± 0,8	2,5 ± 0,5
205	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,7 ± 0,6	3,3 ± 0,6	2,4 ± 0,5
206	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,3 ± 0,4	3,1 ± 0,4	2,1 ± 0,5
207	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,8 ± 0,4	2,9 ± 0,6	2,7 ± 0,5
208	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,6 ± 0,4	2,6 ± 0,4	2,4 ± 0,5
209	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,7 ± 0,5	2,7 ± 0,4	2,7 ± 0,6
210	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,7 ± 0,6	2,6 ± 0,6	3,1 ± 0,2
212	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,5 ± 0,4	2,9 ± 0,5	3,5 ± 0,7
213	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,7 ± 0,5	3,4 ± 0,4	3,5 ± 0,5
214	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,6 ± 0,5	3,1 ± 0,8	2,6 ± 0,4
215	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,5 ± 0,8	2,7 ± 0,7	2,8 ± 0,5

216	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,6 ± 0,5	2,3 ± 0,6	2,4 ± 0,5
218	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,7 ± 0,4	2,6 ± 0,6	2,8 ± 0,5
219	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,4 ± 0,4	2,8 ± 0,7	2,8 ± 0,6
222	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,7 ± 0,6	3,0 ± 0,7	3,1 ± 0,6
223	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,5 ± 0,4	3,4 ± 0,6	2,4 ± 0,6
224	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,3 ± 0,4	3,3 ± 0,6	2,6 ± 0,7
225	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,4 ± 0,4	3,1 ± 0,9	3,0 ± 0,4
226	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,7 ± 0,3	3,3 ± 0,4	2,4 ± 0,7
228	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,7 ± 0,4	2,7 ± 0,4	1,8 ± 0,5
280	WKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,6 ± 0,4	3,6 ± 0,6	2,2 ± 0,3
284	WKF	<i>Lachancea fermentati</i>	ND	1,5 ± 0,4	3,2 ± 0,4	2,2 ± 0,2
285	WKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,0 ± 0,1	2,8 ± 0,4	2,1 ± 0,4
286	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,5 ± 0,4	2,6 ± 0,5	1,9 ± 0,6
287	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,4 ± 0,4	2,9 ± 0,6	2,2 ± 0,4
288	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,5 ± 0,4	2,9 ± 0,4	2,6 ± 0,5
289	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,5 ± 0,5	3,7 ± 0,5	2,8 ± 0,6
290	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,7 ± 0,5	3,4 ± 0,7	2,5 ± 0,4
291	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,4 ± 0,4	3,8 ± 0,6	2,7 ± 0,4
293	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,5 ± 0,4	3,7 ± 0,6	1,9 ± 0,9
294	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,7 ± 0,5	2,7 ± 0,7	2,7 ± 0,4
297	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,4 ± 0,4	3,0 ± 0,6	2,4 ± 0,6
298	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,3 ± 0,3	3,4 ± 0,4	2,6 ± 0,2
299	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,2 ± 0,2	3,7 ± 0,6	2,3 ± 0,4
300	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,6 ± 0,6	3,0 ± 0,9	2,1 ± 0,1
301	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,3 ± 0,5	3,6 ± 0,5	2,6 ± 0,4
302	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,2 ± 0,4	2,7 ± 0,5	2,1 ± 0,6
303	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,7 ± 0,4	3,5 ± 0,5	1,9 ± 0,4
305	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,4 ± 0,5	3,8 ± 0,7	2,2 ± 0,9
307	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,5 ± 0,4	3,7 ± 0,8	2,4 ± 0,8
308	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	1,1 ± 0,1	3,8 ± 0,4	2,0 ± 0,2

Tab. 9: Produkce jednotlivých biogenních aminů kvasinkami a celková produkce BA pro jednotlivé kmeny kvasinek

Č. izolátu	Vzorek	Mikroorganismus	Analyzované biogenní aminy [mg/l]				Suma BA [mg/l]
			HIS	TYM	SPD	SPM	
78	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2,6 ± 0,2	11,1 ± 1,1	ND	36,3 ± 0,7	55,5 ± 1,8
79	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	10,3 ± 0,7	ND	35,1 ± 1,1	51,8 ± 2,4
80	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	10,2 ± 1,4	ND	33,7 ± 1,5	50,5 ± 3,5
91	WKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	11,6 ± 1,0	ND	38,1 ± 1,2	56,0 ± 2,2
130	WKF	<i>Candida valida</i>	ND	13,9 ± 1,1	ND	43,2 ± 1,3	63,8 ± 1,6
132	WKF	<i>Candida valida</i>	ND	13,6 ± 1,3	ND	43,1 ± 1,7	63,2 ± 1,6
133	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	12,2 ± 1,1	ND	39,6 ± 1,2	56,6 ± 1,5
137	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	11,7 ± 1,2	ND	39,0 ± 1,0	56,9 ± 1,7

139	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	12,5 ± 0,7	ND	37,8 ± 0,9	55,6 ± 1,4
141	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	13,7 ± 0,7	ND	38,8 ± 1,0	58,8 ± 2,3
142	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	13,8 ± 0,6	ND	40,6 ± 1,1	60,0 ± 1,6
143	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	14,2 ± 0,6	ND	39,9 ± 1,2	62,2 ± 1,8
146	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	11,2 ± 1,1	ND	33,0 ± 1,6	54,4 ± 3,7
148	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	11,6 ± 1,0	ND	35,0 ± 1,3	54,6 ± 1,6
150	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	12,4 ± 0,8	ND	32,1 ± 1,1	52,2 ± 1,9
151	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	1,7 ± 0,8	17,2 ± 1,3	ND	52,4 ± 2,0	78,9 ± 1,5
152	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	17,0 ± 1,1	ND	54,6 ± 1,7	78,7 ± 2,1
153	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	17,7 ± 1,1	ND	55,9 ± 1,6	81,0 ± 3,2
154	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	16,8 ± 1,1	ND	51,9 ± 1,4	74,5 ± 2,1
155	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	17,5 ± 1,1	ND	56,6 ± 1,8	82,2 ± 2,2
198	WKG	<i>Candida valida</i>	ND	11,1 ± 1,1	ND	36,6 ± 1,0	54,3 ± 2,6
201	WKF	<i>Candida valida</i>	ND	13,5 ± 1,1	ND	39,2 ± 1,6	60,5 ± 1,9
205	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	1,2 ± 0,3	13,2 ± 1,2	ND	37,8 ± 1,6	59,0 ± 1,8
206	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	12,1 ± 1,2	ND	37,6 ± 0,8	56,4 ± 2,1
207	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	12,4 ± 1,7	ND	40,4 ± 0,9	60,9 ± 1,3
208	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	12,5 ± 0,9	ND	39,1 ± 1,5	58,1 ± 2,1
209	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	12,8 ± 1,3	ND	39,2 ± 1,7	59,1 ± 1,9
210	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	13,1 ± 0,9	ND	38,8 ± 2,0	59,6 ± 1,7
212	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	14,1 ± 1,1	ND	42,7 ± 1,5	64,7 ± 2,7
213	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	12,5 ± 1,5	ND	39,3 ± 1,5	60,7 ± 2,3
214	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	14,7 ± 1,5	ND	40,8 ± 1,9	62,7 ± 3,2
215	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	12,1 ± 1,2	ND	41,9 ± 1,8	61,1 ± 2,4
216	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	14,5 ± 1,4	ND	40,1 ± 1,3	61,2 ± 2,7
218	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	11,8 ± 1,3	ND	34,8 ± 1,6	53,7 ± 1,7
219	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	13,1 ± 1,1	ND	33,7 ± 1,0	55,4 ± 2,9
222	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	13,4 ± 1,6	ND	34,9 ± 2,2	55,1 ± 3,6
223	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	17,7 ± 1,7	ND	53,8 ± 2,2	78,8 ± 2,2
224	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	18,1 ± 1,2	ND	53,4 ± 1,5	78,8 ± 1,5
225	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	17,8 ± 1,4	ND	53,8 ± 1,4	79,1 ± 2,1
226	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	17,1 ± 1,0	ND	55,6 ± 1,8	80,1 ± 1,9
228	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	19,1 ± 0,6	ND	56,1 ± 2,3	81,8 ± 2,7
280	WKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	14,5 ± 1,1	ND	42,6 ± 1,5	64,5 ± 2,6
284	WKF	<i>Lachancea fermentati</i>	ND	15,6 ± 1,3	ND	44,5 ± 1,6	67,0 ± 1,7
285	WKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	13,5 ± 0,9	ND	38,8 ± 0,8	58,5 ± 1,7
286	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	12,5 ± 1,2	ND	38,9 ± 1,2	57,3 ± 1,9
287	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	13,3 ± 0,5	ND	37,4 ± 1,2	57,2 ± 2,1
288	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	14,3 ± 1,8	ND	36,4 ± 2,1	57,7 ± 2,3
289	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	13,9 ± 1,5	ND	38,8 ± 1,6	61,0 ± 2,6
290	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	12,2 ± 1,1	ND	38,3 ± 1,7	58,4 ± 2,5
291	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	14,6 ± 1,6	ND	39,9 ± 1,3	62,4 ± 2,1
293	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	14,5 ± 0,7	ND	38,2 ± 1,5	60,6 ± 1,4
294	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	14,1 ± 1,0	ND	40,5 ± 2,0	61,5 ± 2,6

297	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	11,8 ± 1,4	ND	34,0 ± 2,2	52,5 ± 2,3
298	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	13,2 ± 0,6	ND	36,8 ± 1,4	57,2 ± 1,1
299	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	13,6 ± 1,4	ND	37,9 ± 1,5	59,2 ± 1,9
300	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	13,0 ± 0,8	ND	34,7 ± 1,7	54,5 ± 2,5
301	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	11,5 ± 1,0	ND	38,1 ± 2,0	57,4 ± 2,5
302	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	12,5 ± 0,6	ND	37,1 ± 1,6	55,9 ± 2,0
303	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	18,7 ± 1,4	ND	58,1 ± 1,1	83,5 ± 1,4
305	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	17,9 ± 1,4	ND	53,7 ± 1,2	79,0 ± 3,1
307	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	16,8 ± 1,3	ND	56,7 ± 1,5	81,7 ± 1,4
308	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	ND	16,0 ± 1,2	ND	54,8 ± 1,6	78,0 ± 2,2

6.3.3 Rod *Lactobacillus*

Celkem bylo testováno 96 kmenů z rodu *Lactobacillus* na dekarboxylázovou aktivitu. U všech kmenů byla zjištěna produkce 2-fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu, tyraminu a sperminu. U žádného izolátu nebyla zjištěna produkce tryptaminu a spermidinu.

2-fenylethylamin byl u všech kmenů stanoven v malých koncentracích pohybujících se v rozpětí 1,1 – 1,6 mg/l. Nejnižší množství 2-fenylethylaminu vykazovaly kmeny: *Lactobacillus kefir* (izolát 47) pocházející z Flower kefiru (1,1 ± 0,4 mg/l), *Lactobacillus kefir* (izoláty 59, 188, 189, 231 a 234) izolované z Manta kefiru (1,1 ± 0,2 mg/l; 1,1 ± 0,4 mg/l; 1,1 ± 0,4 mg/l; 1,1 ± 0,1 mg/l; 1,1 ± 0,1 mg/l), *Lactobacillus kefir* (izoláty 108, 110, 111 a 254) pocházející z kefirových zrn Flower kefiru (1,1 ± 0,3 mg/l; 1,1 ± 0,2 mg/l; 1,1 ± 0,4 mg/l; 1,1 ± 0,2 mg/l), *Lactobacillus kefir* (izoláty 119, 183, 262, 264) izolované z kefirových zrn Manta kefiru (1,1 ± 0,2 mg/l; 1,1 ± 0,1 mg/l; 1,1 ± 0,2 mg/l; 1,1 ± 0,2 mg/l), *Lactobacillus satsumensis* (izolát 240) pocházející z kefirových zrn vodního kefiru (1,1 ± 0,2 mg/l) a *Lactobacillus nagelii* (izolát 245) izolovaný z vodního kefiru. Nejvíce 2-fenylethylaminu produkovaly kmeny: *Lactobacillus kefir* (izolát 109) pocházející z kefirových zrn Flower kefiru (1,6 ± 0,3 mg/l), *Lactobacillus satsumensis* (izolát 168) izolovaný z vodního kefiru (1,6 ± 0,4 mg/l), *Lactobacillus kefir* (izolát 181) pocházející z kefirových zrn Manta kefiru (1,6 ± 0,3 mg/l) a *Lactobacillus kefir* (izolát 192) izolovaný z Manta kefiru (1,6 ± 0,3 mg/l).

Hladiny putrescinu byly u všech kmenů zjištěny v poměrně nízkém množství pohybujících se v rozmezí 2,2 – 2,9 mg/l. Nejnížší produkce byla zaznamenána u kmenů *Lactobacillus satsumensis* (izolát 238) pocházejícího z kefirových zrn vodního kefiru (2,2 ± 0,2 mg/l) a *Lactobacillus satsumensis* (izolát 244) izolovaného z vodního kefiru (2,2 ± 0,2 mg/l). Nej-

více putrescinu bylo stanoveno u kmenů: *Lactobacillus kefir* (izoláty 40, 252) pocházejících z keřirových zrn Flower keřiru ($2,9 \pm 0,3$ mg/l; $2,9 \pm 0,3$ mg/l), *Lactobacillus kefir* (izolát 180) izolovaný z Flower keřiru ($2,9 \pm 0,4$ mg/l), *Lactobacillus kefir* (izoláty 183, 262) pocházejících z keřirových zrn Manta keřiru ($2,9 \pm 0,6$ mg/l; $2,9 \pm 0,3$ mg/l), *Lactobacillus kefir* (izoláty 187, 269, 271) izolované z Manta keřiru ($2,9 \pm 0,4$ mg/l; $2,9 \pm 0,4$ mg/l; $2,9 \pm 0,2$ mg/l) a *Lactobacillus satsumensis* (izolát 247) pocházející z vodního keřiru ($2,9 \pm 0,3$ mg/l).

Kadaverin byl také u všech kmenů stanoven v nízkých koncentracích pohybujících se v rozmezí 1,1 – 2,0 mg/l. U kmenů *Lactobacillus kefir* (izolát 106) pocházejícího z keřirových zrn Manta keřiru a *Lactobacillus kefir* (izolát 115) izolovaného z Flower keřiru byly zjištěny nejnižší hladiny kadaverinu ($1,1 \pm 0,1$ mg/l; $1,1 \pm 0,1$ mg/l). Nejvíce kadaverinu byly schopné produkovat kmene *Lactobacillus kefir* (izolát 190) pocházející z Flower keřiru a *Lactobacillus satsumensis* (izolát 249) izolovaný z keřirových zrn Flower keřiru ($2,0 \pm 0,5$ mg/l; $2,0 \pm 0,4$ mg/l).

Schopnost produkce histaminu byla prokázána pouze u 4 kmenů. Jednalo se o kmene *Lactobacillus kefir* (izoláty 187, 232) pocházejících z Manta keřiru ($2,8 \pm 0,6$ mg/l; $1,3 \pm 0,4$ mg/l) a *Lactobacillus kefir* (izoláty 252, 253) izolované z keřirových zrn Flower keřiru ($1,8 \pm 0,6$ mg/l; $1,1 \pm 0,2$ mg/l).

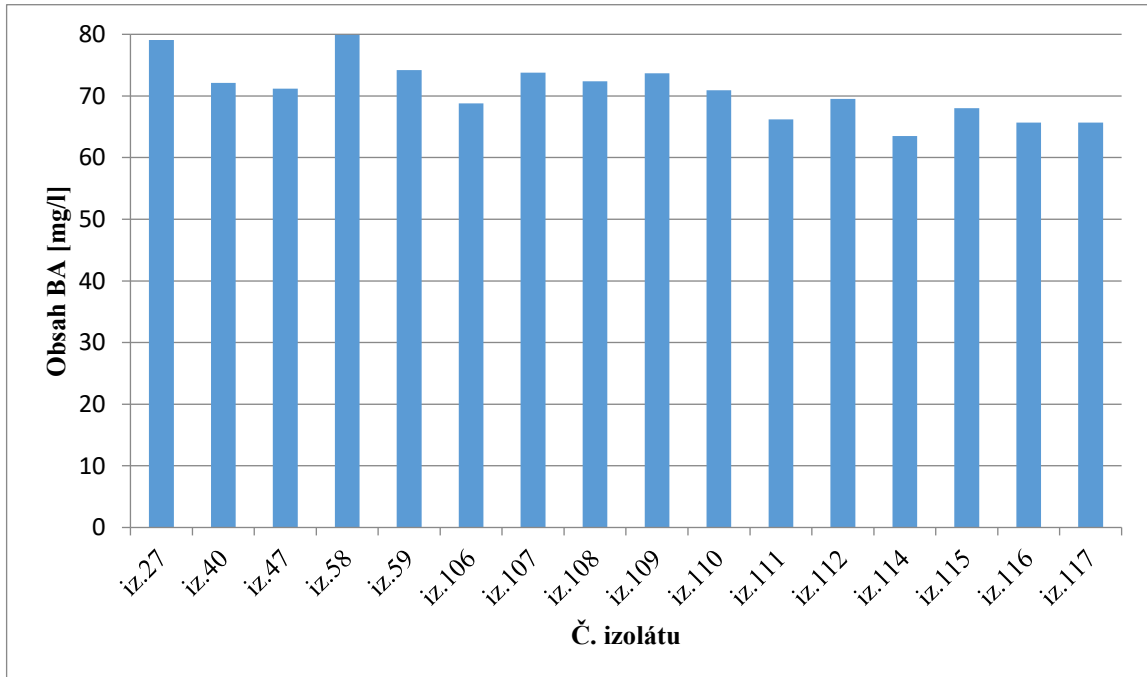
Množství produkovaného tyraminu se pohybovalo v rozmezí 13,1 – 22,1 mg/l. U kmene *Lactobacillus satsumensis* (izolát 157) izolovaného z keřirových zrn vodního keřiru byla stanovena nejnižší koncentrace tyraminu ($13,1 \pm 0,9$ mg/l). Nejvyšší produkce tyraminu byla zjištěna u kmene *Lactobacillus kefir* (izolát 58) pocházejícího z Manta keřiru ($22,1 \pm 1,0$ mg/l).

Mezi biogenní amin zastoupený v největších koncentracích se řadil spermin. Hladiny sperminu se pohybovaly v rozpětí 32,1 – 56,6 mg/l. Nejnižší množství sperminu bylo stanoveno u kmene *Lactobacillus satsumensis* (izolát 157) izolovaného z keřirových zrn vodního keřiru ($31,2 \pm 0,8$ mg/l). U kmene *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* (izolát 27) pocházejícího z keřirových zrn vodního keřiru byla prokázána největší produkce sperminu ($56,6 \pm 1,6$ mg/l).

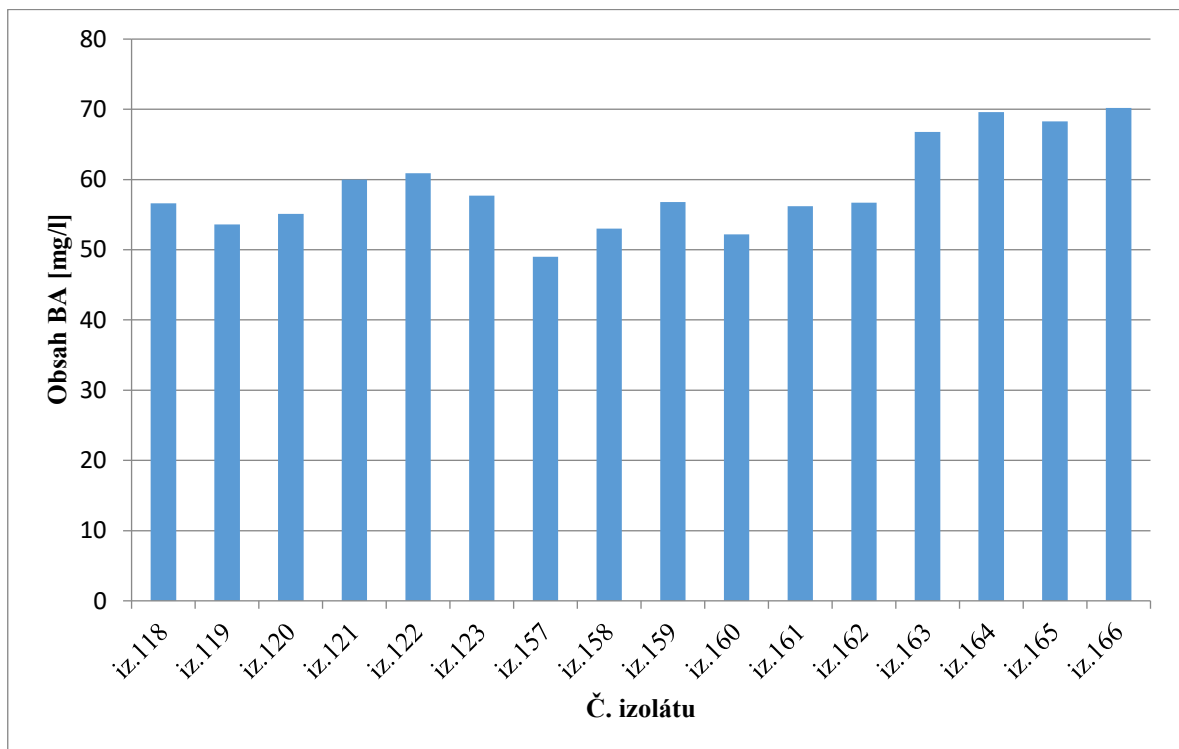
Celkové sumy produkce BA pro jednotlivé kmene z rodu *Lactobacillus* jsou znázorněny v Grafech 8, 9, 10, 11, 12 a 13. Z Grafů 8, 9, 10, 11, 12 a 13 lze vyčíst, že největší produkce BA byla stanovena u kmene *Lactobacillus kefir* (izolát 272) izolovaného z Manta keřiru

ru ($81,4 \pm 2,0$ mg/l). Kmen s celkovou nejnižší produkcí BA představuje *Lactobacillus satsumensis* (izolát 157) pocházející z kefirových zrn vodního kefiru ($49,0 \pm 1,4$ mg/l).

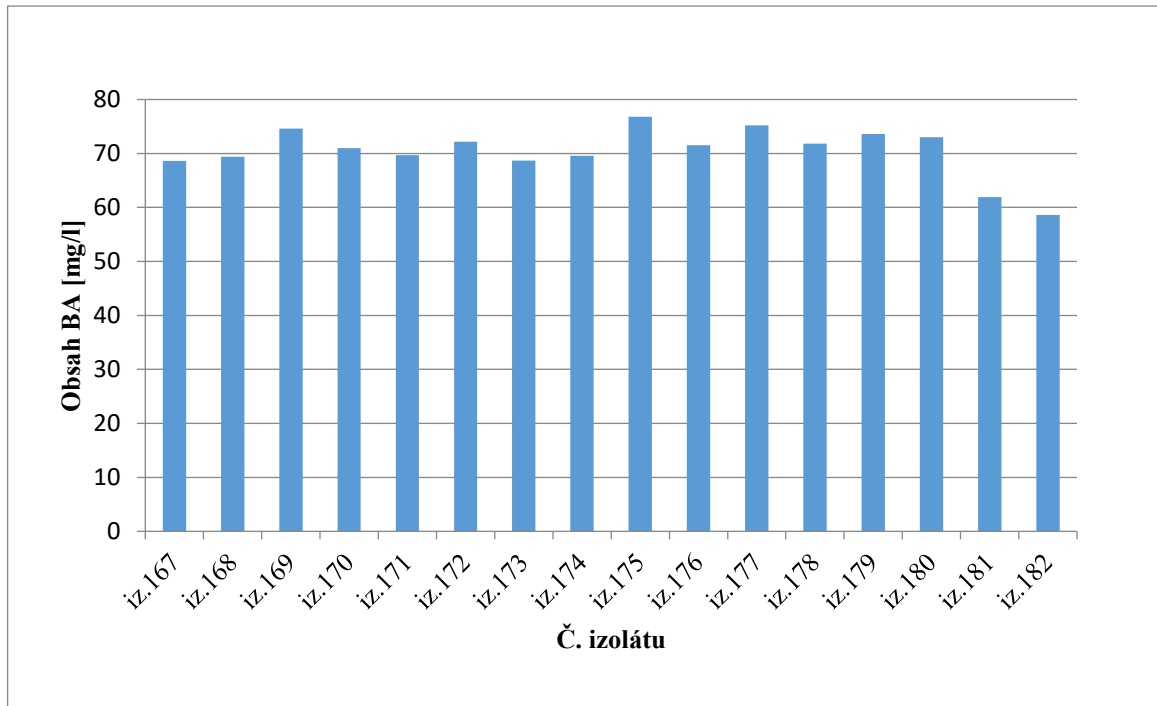
Graf 8: Celková produkce BA pro jednotlivé kmeny rodu *Lactobacillus*



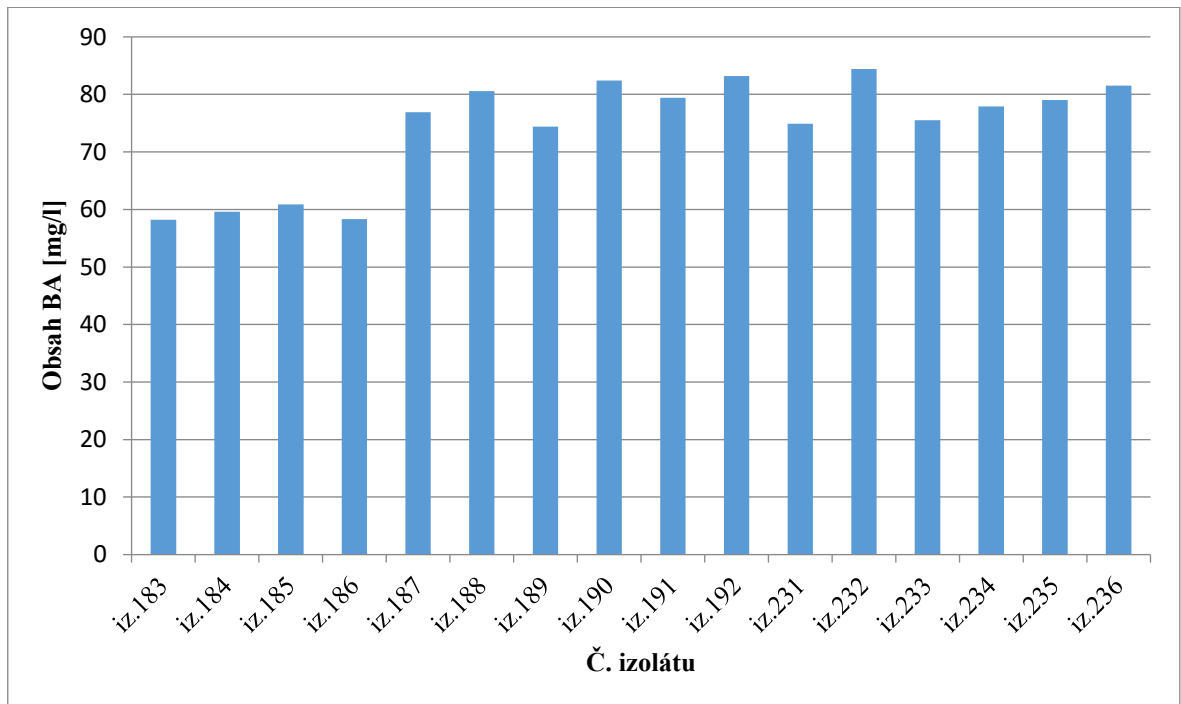
Graf 9: Celková produkce BA pro jednotlivé kmeny rodu *Lactobacillus*

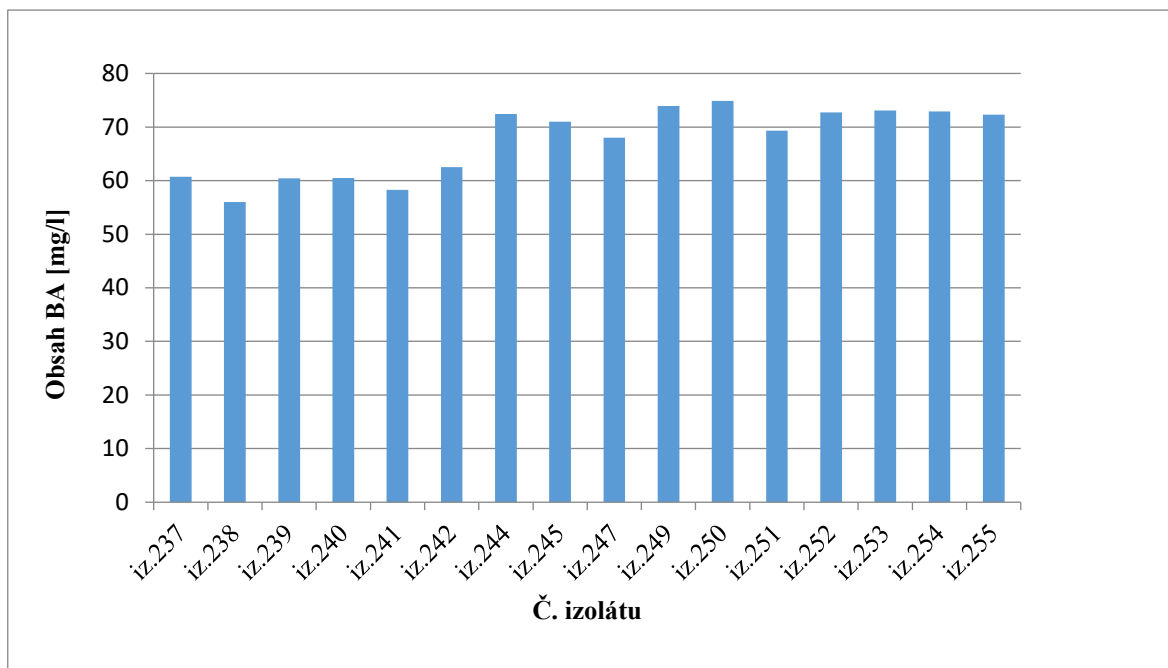
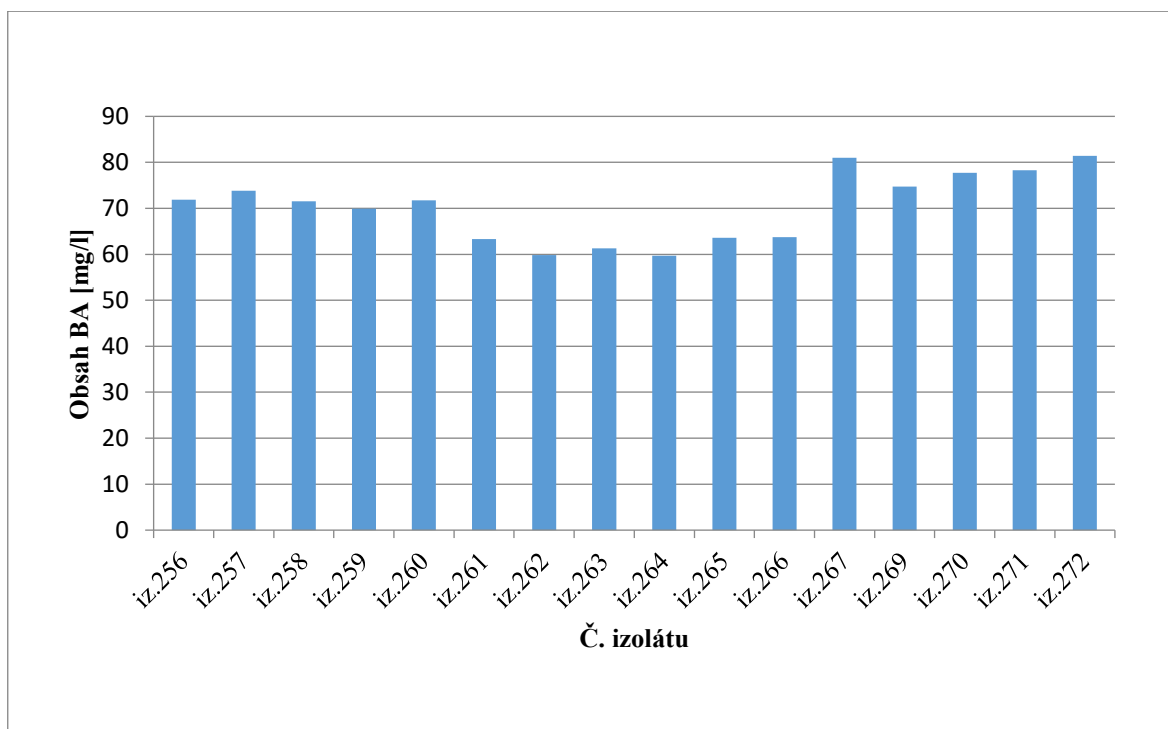


Graf 10: Celková produkce BA pro jednotlivé kmeny rodu *Lactobacillus*



Graf 11: Celková produkce BA pro jednotlivé kmeny rodu *Lactobacillus*

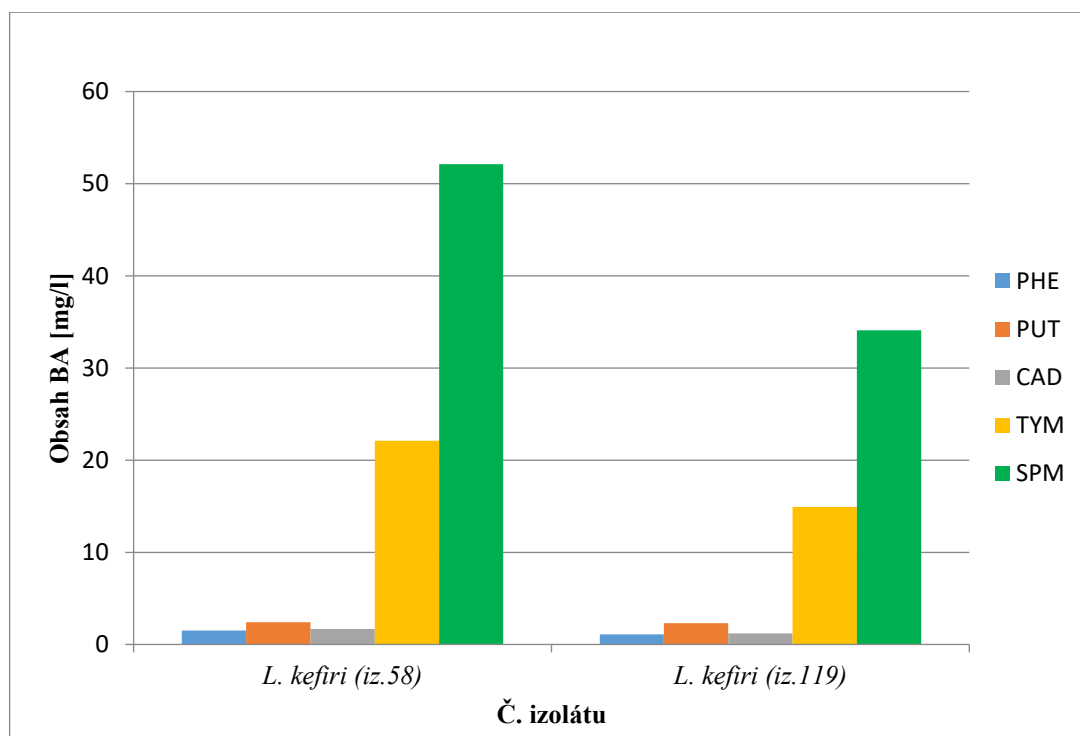


Graf 12: Celková produkce BA pro jednotlivé kmeny rodu *Lactobacillus*Graf 13: Celková produkce BA pro jednotlivé kmeny rodu *Lactobacillus*

Největší celková produkce BA u kmene *Lactobacillus kefir* izolovaného z Manta kefiru (izolát 58) byla porovnána s nejnižší celkovou produkcí BA u kmene *Lactobacillus kefir* izolovaného z kefirových zrn Manta kefiru (izolát 119) v Grafu 14.

Z Grafu 14 je patrné, že oba kmeny produkovaly podobné množství 2-fenylethylaminu, tyraminu a sperminu. Významně se lišily pouze v produkci putrescinu a kadaverinu. Kmen *Lactobacillus kefir* izolovaný z Manta kefiru (izolát 58) produkoval 1,5krát více tyraminu a sperminu ve srovnání s kmenem *Lactobacillus kefir* pocházejícím z kefirových zrn Manta kefiru (izolát 119).

Graf 14: Srovnání produkce BA u kmene z rodu *Lactobacillus* s nejmenší a největší celkovou produkcí BA



Studiem produkce biogenních aminů bakteriemi mléčného kvašení v různých fermentovaných potravinách se zabývalo mnoho autorů. Bylo prokázáno, že bakterie rodu *Lactobacillus* patří mezi významné producenty BA ve fermentovaných potravinách.

Komprda *et al.* [67] izolovali BMK z fermentovaných uzenin. U kmenů *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus casei* byla zjištěna produkce histaminu a tyraminu.

Yılmaz a Gökmen [68] prokázali schopnost produkovat tyramin kmenem *Lactobacillus plantarum* v jogurtu a zdůraznili možný nepřímý účinek *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* na hromadění tyraminu v jogurtech, díky jeho synergickým interakcím s tyraminogenními kmeny BMK.

Landete *et al.* [69] stanovili aminogenní potenciál BMK izolovaných z vína. Některé kmeny *Lactobacillus brevis* produkovaly tyramin a 2-fenylethylamin. U kmene *Lactobacillus hilgardii* byla zjištěna schopnost produkovat histamin, tyramin, 2-fenylethylamin a putrescin.

Výsledky produkce jednotlivých BA bakteriemi rodu *Lactobacillus* jsou uvedeny v Tab. 10 a Tab. 11. Celkové sumy produkce BA pro jednotlivé kmeny rodu *Lactobacillus* jsou uvedeny v Tab. 11.

Tab. 10: Produkce jednotlivých biogenních aminů rodu *Lactobacillus*

Č. izolátu	Vzorek	Mikroorganismus	Analyzované biogenní aminy [mg/l]			
			TRP	PHE	PUT	CAD
27	WKG	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i>	ND	1,2 ± 0,2	2,7 ± 0,4	1,9 ± 0,4
40	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,4 ± 0,3	2,9 ± 0,3	1,9 ± 0,2
47	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,1 ± 0,4	2,5 ± 0,4	1,6 ± 0,1
58	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,5 ± 0,3	2,4 ± 0,5	1,7 ± 0,3
59	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,1 ± 0,2	2,5 ± 0,3	1,3 ± 0,3
106	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,2	2,7 ± 0,5	1,1 ± 0,1
107	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,3	2,5 ± 0,3	1,3 ± 0,5
108	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,1 ± 0,3	2,7 ± 0,6	1,2 ± 0,1
109	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,6 ± 0,3	2,6 ± 0,3	1,3 ± 0,2
110	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,1 ± 0,2	2,8 ± 0,3	1,2 ± 0,1
111	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,1 ± 0,4	2,3 ± 0,3	1,2 ± 0,2
112	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,5 ± 0,3	2,6 ± 0,6	1,8 ± 0,2
114	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,4	2,5 ± 0,3	1,3 ± 0,2
115	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,4 ± 0,2	2,6 ± 0,3	1,1 ± 0,1
116	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,5	2,7 ± 0,4	1,3 ± 0,3
117	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,3	2,7 ± 0,3	1,5 ± 0,3
118	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,4 ± 0,4	2,6 ± 0,4	1,3 ± 0,2
119	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,1 ± 0,2	2,3 ± 0,1	1,2 ± 0,2
120	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,3 ± 0,3	2,7 ± 0,4	1,2 ± 0,3
121	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,3 ± 0,4	2,6 ± 0,4	1,4 ± 0,4
122	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,2	2,5 ± 0,4	1,3 ± 0,4
123	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,5 ± 0,3	2,6 ± 0,2	1,2 ± 0,1
157	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	1,4 ± 0,3	2,6 ± 0,3	1,6 ± 0,4
158	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	1,3 ± 0,2	2,7 ± 0,5	1,5 ± 0,2

159	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	1,5 ± 0,3	2,8 ± 0,4	1,5 ± 0,4
160	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	1,3 ± 0,3	2,8 ± 0,5	1,4 ± 0,4
161	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	1,5 ± 0,4	2,6 ± 0,4	1,3 ± 0,1
162	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	1,2 ± 0,2	2,8 ± 0,3	1,6 ± 0,3
163	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	1,3 ± 0,3	2,3 ± 0,2	1,4 ± 0,5
164	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	1,2 ± 0,2	2,4 ± 0,3	1,5 ± 0,4
165	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	1,3 ± 0,4	2,5 ± 0,4	1,5 ± 0,1
166	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	1,2 ± 0,3	2,3 ± 0,3	1,4 ± 0,4
167	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	1,4 ± 0,2	2,6 ± 0,4	1,5 ± 0,3
168	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	1,6 ± 0,4	2,6 ± 0,5	1,9 ± 0,3
169	FKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	1,2 ± 0,3	2,8 ± 0,4	1,3 ± 0,3
170	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,3 ± 0,3	2,4 ± 0,4	1,7 ± 0,2
171	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,4	2,7 ± 0,2	1,2 ± 0,2
172	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,4 ± 0,2	2,3 ± 0,2	1,8 ± 0,3
173	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,3 ± 0,2	2,7 ± 0,2	1,3 ± 0,2
174	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,2	2,5 ± 0,2	1,7 ± 0,3
175	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,5 ± 0,2	2,6 ± 0,3	1,8 ± 0,2
176	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,4 ± 0,2	2,5 ± 0,4	1,7 ± 0,4
177	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,3 ± 0,3	2,4 ± 0,3	1,4 ± 0,3
178	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,2	2,6 ± 0,4	1,5 ± 0,3
179	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,3	2,5 ± 0,3	1,7 ± 0,4
180	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,5 ± 0,2	2,9 ± 0,4	1,4 ± 0,1
181	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,6 ± 0,3	2,4 ± 0,4	1,8 ± 0,3
182	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,3 ± 0,2	2,8 ± 0,4	1,6 ± 0,4
183	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,1 ± 0,1	2,9 ± 0,3	1,4 ± 0,3
184	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,2	2,8 ± 0,5	1,5 ± 0,3
185	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,3	2,7 ± 0,6	1,7 ± 0,3
186	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,4	2,8 ± 0,3	1,6 ± 0,4
187	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,5 ± 0,3	2,9 ± 0,4	2,0 ± 0,4
188	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,1 ± 0,4	2,8 ± 0,5	1,5 ± 0,2
189	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,1 ± 0,2	2,7 ± 0,3	1,6 ± 0,4
190	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,3 ± 0,1	2,3 ± 0,4	2,0 ± 0,5
191	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,5 ± 0,2	2,4 ± 0,3	1,8 ± 0,3
192	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,6 ± 0,3	2,7 ± 0,5	1,7 ± 0,4
231	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,1 ± 0,1	2,2 ± 0,3	1,6 ± 0,4
232	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,3	2,3 ± 0,2	1,7 ± 0,2
233	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,3 ± 0,2	2,5 ± 0,4	1,7 ± 0,5
234	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,1 ± 0,1	2,6 ± 0,3	1,5 ± 0,3
235	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,4	2,5 ± 0,3	1,7 ± 0,3
236	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,2	2,7 ± 0,2	1,6 ± 0,4
237	WKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,4 ± 0,3	2,5 ± 0,4	1,5 ± 0,3
238	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	1,3 ± 0,3	2,2 ± 0,2	1,5 ± 0,2
239	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	1,2 ± 0,2	2,3 ± 0,3	1,7 ± 0,6
240	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	1,1 ± 0,2	2,6 ± 0,5	1,7 ± 0,2

241	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	1,3 ± 0,3	2,7 ± 0,5	1,8 ± 0,3
242	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	1,3 ± 0,2	2,5 ± 0,4	1,7 ± 0,2
244	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	1,2 ± 0,4	2,2 ± 0,2	1,7 ± 0,3
245	WKF	<i>Lactobacillus nagelii</i>	ND	1,1 ± 0,2	2,6 ± 0,4	1,6 ± 0,3
247	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	1,3 ± 0,3	2,9 ± 0,3	1,8 ± 0,3
249	FKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	1,7 ± 0,2	2,8 ± 0,4	2,0 ± 0,4
250	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,3 ± 0,2	2,7 ± 0,2	1,9 ± 0,1
251	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,1	2,4 ± 0,4	1,5 ± 0,2
252	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,5 ± 0,4	2,9 ± 0,3	1,7 ± 0,4
253	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,2	2,5 ± 0,4	1,7 ± 0,2
254	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,1 ± 0,2	2,6 ± 0,3	1,4 ± 0,2
255	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,5 ± 0,2	2,6 ± 0,5	1,5 ± 0,3
256	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,2	2,4 ± 0,4	1,4 ± 0,1
257	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,4 ± 0,2	2,8 ± 0,3	1,5 ± 0,4
258	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,2	2,6 ± 0,4	1,3 ± 0,1
259	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,3 ± 0,4	2,7 ± 0,3	1,4 ± 0,1
260	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,4 ± 0,2	2,6 ± 0,3	1,5 ± 0,1
261	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,3	2,8 ± 0,3	1,4 ± 0,3
262	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,1 ± 0,2	2,9 ± 0,6	1,8 ± 0,4
263	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,3 ± 0,2	2,7 ± 0,3	1,4 ± 0,3
264	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,1 ± 0,2	2,6 ± 0,1	1,7 ± 0,3
265	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,2	2,4 ± 0,3	1,5 ± 0,2
266	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,4 ± 0,3	2,6 ± 0,2	1,9 ± 0,1
267	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,1	2,7 ± 0,6	1,5 ± 0,3
269	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,3 ± 0,2	2,9 ± 0,4	1,3 ± 0,3
270	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,2 ± 0,4	2,7 ± 0,4	1,5 ± 0,2
271	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,4 ± 0,1	2,9 ± 0,2	1,6 ± 0,3
272	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	1,5 ± 0,3	2,7 ± 0,3	1,9 ± 0,2

Tab. 11: Produkce jednotlivých biogenních aminů rodu *Lactobacillus* a celková produkce BA pro jednotlivé kmeny rodu *Lactobacillus*

Č. izolátu	Vzorek	Mikroorganismus	Analyzované biogenní aminy [mg/l]				Suma BA [mg/l]
			HIS	TYM	SPD	SPM	
27	WKG	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i>	ND	16,6 ± 1,3	ND	56,6 ± 1,6	79,1 ± 1,6
40	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	18,9 ± 1,0	ND	47,5 ± 1,5	72,1 ± 1,8
47	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	15,4 ± 0,6	ND	50,7 ± 1,8	71,2 ± 1,6
58	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	22,1 ± 1,0	ND	52,1 ± 1,4	79,9 ± 2,0
59	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	20,3 ± 1,2	ND	49,0 ± 1,2	74,2 ± 2,3
106	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	17,2 ± 1,0	ND	46,2 ± 1,2	68,8 ± 3,2
107	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	19,9 ± 1,2	ND	48,5 ± 1,4	73,8 ± 1,2
108	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	19,7 ± 1,2	ND	47,3 ± 1,6	72,4 ± 3,1
109	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	19,0 ± 1,2	ND	49,3 ± 2,1	73,7 ± 2,5

110	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	19,1 ± 1,1	ND	46,8 ± 1,7	70,9 ± 1,6
111	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	17,7 ± 1,2	ND	44,8 ± 1,5	66,2 ± 1,4
112	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	14,9 ± 1,3	ND	48,7 ± 1,6	69,5 ± 2,1
114	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	15,2 ± 1,3	ND	43,4 ± 1,7	63,5 ± 2,5
115	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	15,4 ± 0,9	ND	47,4 ± 1,6	68,0 ± 2,0
116	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	14,0 ± 1,1	ND	46,7 ± 1,5	65,7 ± 1,8
117	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	13,6 ± 1,4	ND	44,3 ± 1,5	63,2 ± 1,5
118	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	15,8 ± 1,1	ND	35,7 ± 1,6	56,6 ± 1,1
119	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	14,9 ± 1,0	ND	34,1 ± 1,7	53,6 ± 2,3
120	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	15,6 ± 1,3	ND	34,5 ± 0,8	55,1 ± 2,0
121	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	16,6 ± 1,5	ND	38,1 ± 1,3	60,0 ± 2,0
122	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	16,7 ± 1,3	ND	38,9 ± 1,2	60,9 ± 2,2
123	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	15,7 ± 1,2	ND	36,7 ± 1,6	57,7 ± 3,1
157	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	13,1 ± 0,9	ND	31,2 ± 0,8	49,0 ± 1,4
158	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	15,5 ± 1,0	ND	32,0 ± 1,7	53,0 ± 2,2
159	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	17,1 ± 1,3	ND	33,9 ± 1,3	56,8 ± 2,5
160	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	14,5 ± 0,8	ND	34,3 ± 1,5	52,2 ± 1,7
161	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	14,8 ± 1,2	ND	36,0 ± 1,6	56,2 ± 2,1
162	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	15,0 ± 1,4	ND	36,3 ± 1,3	56,7 ± 1,6
163	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	18,4 ± 0,8	ND	43,4 ± 1,6	66,8 ± 2,5
164	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	18,2 ± 1,1	ND	46,4 ± 1,5	69,6 ± 2,3
165	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	19,1 ± 0,6	ND	43,8 ± 1,3	68,3 ± 1,4
166	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	18,1 ± 0,9	ND	45,2 ± 1,0	70,2 ± 2,1
167	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	18,3 ± 1,1	ND	45,0 ± 1,6	68,6 ± 2,3
168	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	18,0 ± 1,2	ND	44,2 ± 1,4	69,4 ± 2,3
169	FKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	20,5 ± 1,2	ND	48,9 ± 1,3	74,6 ± 2,3
170	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	19,7 ± 1,0	ND	46,0 ± 1,2	71,0 ± 1,5
171	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	17,9 ± 0,8	ND	46,8 ± 1,4	69,7 ± 1,9
172	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	19,8 ± 1,0	ND	47,0 ± 1,0	72,2 ± 1,7
173	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	18,2 ± 0,8	ND	45,4 ± 1,2	68,7 ± 1,4
174	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	20,0 ± 1,0	ND	44,2 ± 2,0	69,6 ± 2,1
175	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	17,4 ± 1,2	ND	53,1 ± 1,1	76,8 ± 2,6
176	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	16,6 ± 1,3	ND	49,3 ± 1,8	71,5 ± 2,1
177	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	16,4 ± 1,5	ND	54,1 ± 1,6	75,2 ± 1,6
178	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	16,7 ± 0,9	ND	50,0 ± 1,0	71,8 ± 1,4
179	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	17,1 ± 1,0	ND	51,2 ± 1,7	73,6 ± 1,6
180	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	16,9 ± 1,5	ND	53,6 ± 2,0	73,0 ± 2,6
181	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	16,8 ± 1,0	ND	39,3 ± 1,4	61,9 ± 2,6
182	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	14,8 ± 1,2	ND	38,3 ± 1,3	58,6 ± 2,2
183	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	15,7 ± 0,9	ND	37,2 ± 1,4	58,2 ± 1,5
184	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	15,2 ± 1,6	ND	39,0 ± 1,1	59,6 ± 1,7
185	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	15,7 ± 1,2	ND	39,5 ± 1,6	60,9 ± 1,3
186	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	16,0 ± 1,3	ND	36,9 ± 1,5	58,3 ± 1,5
187	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2,8 ± 0,6	18,7 ± 0,7	ND	49,4 ± 1,4	76,9 ± 1,6

188	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	20,8 ± 1,3	ND	54,5 ± 1,3	80,6 ± 1,8
189	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	19,5 ± 1,0	ND	49,0 ± 1,1	74,4 ± 1,4
190	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	21,7 ± 1,3	ND	55,3 ± 1,5	82,4 ± 2,8
191	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	21,2 ± 1,1	ND	52,6 ± 1,9	79,4 ± 2,0
192	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	21,1 ± 1,6	ND	56,1 ± 1,3	83,2 ± 2,7
231	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	19,4 ± 1,2	ND	50,4 ± 1,8	74,9 ± 2,2
232	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	1,3 ± 0,4	21,7 ± 1,2	ND	55,1 ± 0,9	84,4 ± 1,3
233	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	19,1 ± 1,1	ND	50,9 ± 1,1	75,5 ± 2,2
234	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	21,9 ± 1,0	ND	52,6 ± 1,5	77,9 ± 0,9
235	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	19,5 ± 0,9	ND	54,0 ± 1,1	79,0 ± 1,8
236	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	21,8 ± 1,0	ND	50,2 ± 1,4	81,5 ± 1,6
237	WKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	18,0 ± 1,0	ND	37,1 ± 1,5	60,7 ± 3,0
238	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	16,0 ± 1,2	ND	35,2 ± 1,6	56,0 ± 2,1
239	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	16,5 ± 0,8	ND	39,3 ± 1,2	60,4 ± 2,0
240	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	16,8 ± 1,0	ND	38,4 ± 1,3	60,5 ± 2,4
241	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	15,8 ± 1,4	ND	36,4 ± 1,9	58,3 ± 1,9
242	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	18,5 ± 0,9	ND	37,5 ± 1,4	62,5 ± 1,1
244	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	19,2 ± 1,4	ND	48,1 ± 1,6	72,4 ± 2,2
245	WKF	<i>Lactobacillus nagelii</i>	ND	19,6 ± 1,0	ND	46,7 ± 1,5	71,0 ± 1,3
247	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	17,0 ± 1,0	ND	45,0 ± 1,3	68,0 ± 1,8
249	FKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ND	19,3 ± 1,4	ND	48,4 ± 1,4	73,9 ± 2,0
250	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	21,0 ± 0,7	ND	47,8 ± 1,7	74,9 ± 2,2
251	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	18,7 ± 1,1	ND	45,5 ± 1,9	69,3 ± 1,5
252	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	1,8 ± 0,6	19,1 ± 0,8	ND	47,1 ± 1,3	72,7 ± 1,4
253	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	1,1 ± 0,2	21,1 ± 1,1	ND	46,1 ± 1,6	73,1 ± 2,3
254	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	19,9 ± 1,0	ND	48,0 ± 1,5	72,9 ± 2,2
255	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	18,5 ± 0,9	ND	48,3 ± 1,7	72,3 ± 2,5
256	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	17,7 ± 0,9	ND	49,2 ± 2,0	71,9 ± 2,5
257	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	16,8 ± 1,0	ND	51,3 ± 1,7	73,8 ± 2,5
258	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	17,1 ± 1,0	ND	49,5 ± 1,2	71,5 ± 2,6
259	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	17,5 ± 1,1	ND	47,4 ± 1,5	69,9 ± 2,6
260	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	17,3 ± 1,2	ND	49,5 ± 1,6	71,7 ± 2,0
261	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	17,7 ± 1,0	ND	40,1 ± 1,0	63,3 ± 1,8
262	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	16,9 ± 1,3	ND	36,5 ± 1,8	59,8 ± 2,8
263	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	17,0 ± 1,0	ND	38,9 ± 1,4	61,3 ± 1,6
264	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	18,9 ± 0,9	ND	39,5 ± 1,6	59,7 ± 1,3
265	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	19,1 ± 1,0	ND	40,2 ± 1,3	63,6 ± 1,1
266	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	17,8 ± 1,3	ND	40,0 ± 1,8	63,7 ± 2,4
267	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	20,1 ± 1,3	ND	55,2 ± 2,0	81,0 ± 3,2
269	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	20,0 ± 1,4	ND	49,6 ± 1,7	74,7 ± 3,1
270	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	21,5 ± 1,5	ND	50,6 ± 1,8	77,7 ± 2,5
271	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	19,9 ± 1,1	ND	52,5 ± 1,5	78,3 ± 2,0
272	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	ND	20,6 ± 1,4	ND	54,8 ± 1,0	81,4 ± 2,0

ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na studium dekarboxylázové aktivity kmenů izolovaných z mléčných kefirů Manta a Flower a jejich kefirových zrn a z vodního kefiru a jeho kefirového zrna. U 171 kmenů (13 kmenů z čeledi *Enterobacteriaceae*, 62 kmenů kvasinek a 96 kmenů z rodu *Lactobacillus*) byla sledována produkce 8 biogenních aminů (tryptaminu, 2-fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu) pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s využitím UV/VIS detekce.

Zjištěné výsledky lze shrnout do následujících bodů:

- U všech kmenů byla zjištěna produkce 2-fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu, tyraminu a sperminu.
- U žádného izolátu nebyla zjištěna přítomnost tryptaminu a spermidinu.
- Schopnost produkce histaminu byla prokázána pouze u 10 izolátů (u 3 kmenů z čeledi *Enterobacteriaceae*, u 3 kmenů kvasinek a u 4 kmenů rodu *Lactobacillus*).
- 2-fenylethylamin byl u všech kmenů stanoven ve velmi nízké koncentraci (v rozmezí 1,0 – 1,9 mg/l).
- U kmenů z čeledi *Enterobacteriaceae* byla stanovena nejvyšší produkce putrescinu, jehož koncentrace dosahovaly až na $553,4 \pm 11,8$ mg/l.
- Spermin se řadil mezi BA zastoupený v největších koncentracích u izolátů kvasinek i bakterií rodu *Lactobacillus*.
- Kmeny *Kazachstania unispora* izolované z Manta kefiru produkovaly nejvíce tyraminu a sperminu ve srovnání s kmeny *Kazachstania unispora* izolovanými z kefirových zrn Manta kefiru, z Flower kefiru, kefirových zrn Flower kefiru, vodního kefiru a kefirových zrn vodního kefiru.
- U kmenů *Lactobacillus kefir* izolovaných z Manta kefiru byla zjištěna větší produkce tyraminu a sperminu oproti kmenům *Lactobacillus kefir* pocházejících ze zrn Manta kefiru, Flower kefiru, kefirových zrn Flower kefiru, vodního kefiru a kefirových zrn vodního kefiru.
- Největší celkový obsah BA byl stanoven u kmene *Enterobacter ludwigii* izolovaného z kefirových zrn Flower kefiru ($675,7 \pm 12,6$ mg/l).
- Nejmenší celkový obsah BA byl detekován u kmene *Kazachstania unispora* izolovaného z kefirových zrn Manta kefiru ($50,5, \pm 3,5$ mg/l).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KESENKAŞ, H., YERLIKAYA, O., ÖZER, E. A functional milk beverage: Kefir. *Agro Food Industry Hi Tech* [online]. 2013, vol. 24, no. 6, pp. 53-55 [cit. 2018-08-23]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/276204349_A_functional_milk_beverage_Kefir
- [2] DERTLI, E., ÇONB, A., H. Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2017, vol. 85, pp. 151 - 157 [cit. 2018-08-23]. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.07.017.
- [3] TURKMEN, N. Kefir as a Functional Dairy Product. In: WATSON, R., R., PREEDY, V., R. *Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan* [online]. 2017, pp. 373 - 383 [cit. 2018-08-23]. ISBN 978-0-12-809868-4.
- [4] OTLES, S., CAGINDI, O. Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. *Pakistan Journal of Nutrition* [online]. 2003, vol. 2, no. 2, pp. 54 - 59 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.3923/pjn.2003.54.59.
- [5] KADLEC, P., MELZUCH, K., VOLDŘICH, M. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2012, 569 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-145-0.
- [6] POTHURAJU, R., YENUGANTI, V., R., HUSSAIN, S., A., SHARMA, M. In: Fermented Milk in Protection Against Inflammatory Mechanisms in Obesity. CHATTERJEE, S., JUNGRAITHMAYR, W., BAGCHI, D. *Immunity and Inflammation in Health and Disease* [online]. 2017, pp. 389 - 401 [cit. 2018-08-23]. ISBN 978-0-12-805417-8.
- [7] SINGH, P., K., SHAH, N., P. Other Fermented Dairy Products: Kefir and Koumiss. In: SHAH, N., P. *Yogurt in Health and Disease Prevention* [online]. 2017, pp. 87 - 106 [cit. 2018-08-25]. ISBN 978-0-12-805134-4.
- [8] POGACIC, T., ŠINKO, S., ZAMBERLIN, Š., SAMARŽIJA, D. Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo* [online]. 2013, vol. 63, no. 1, pp. 3 - 14 [cit. 2018-08-25]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/249994327_Microbiota_of_kefir_grains
- [9] ENIKEEV, R. Development of a new method for determination of exopolysaccharide quantity in fermented milk products and its application in technology of kefir produ-

- ction. *Food Chemistry* [online]. 2012, vol. 134, no. 4, pp. 2437 - 2441 [cit. 2018-08-25]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.04.050.
- [10] WITTHUHN, R., C., SCHOEMAN, T., BRITZ, T., J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. *International Journal of Dairy Technology* [online]. 2004, vol. 57, no. 1, pp. 33 - 37 [cit. 2018-08-26]. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2004.00126.x.
- [11] VARDJAN, T., LORBEG, P., M., ROGELJ, I., MAJHENIČ, A., Č. Characterization and stability of lactobacilli and yeast microbiota in kefir grains. *Journal of Dairy Sciences* [online]. 2013, vol. 96, no. 5, pp. 2729 - 2736 [cit. 2018-08-26]. DOI: 10.3168/jds.2012-5829.
- [12] ARSLAN, S. A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. *Journal of Food* [online]. 2015, vol. 1, no. 3, pp. 340 - 345 [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.1080/19476337.2014.981588.
- [13] DIAS, P., A., DA SILVA, D., T., TEJADA, T., S., et al. Survival of pathogenic microorganisms in kefir. *Rev Inst Adolfo Lutz* [online]. 2012, vol. 71, no. 1, pp. 182 - 186 [cit. 2019-03-06]. Dostupné z: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v71n1/v71n1a27.pdf>
- [14] *Obrázek: Kefírová zrna* [online]. [cit. 2018-08-26]. Dostupné z: <http://csu-cvmbms.colostate.edu/Documents/erhs-fermentedfoods-HDprevention-2016.pdf>
- [15] PRADO, M., R., BLANDÓN, L., M., VANDENBERGHE, L., P., S., et al. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2015, vol. 6, no. 1177, pp. 1 - 10 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01177.
- [16] KAHRAMAN, C. *Production of kefir from bovine and oat milk mixture*. Izmir, 2011. Master thesis. Graduate School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology.
- [17] GULITZ, A., STADIE J., WENNING M., EHRMANN, M., A., VOGEL, R., F. The microbial diversity of water kefir. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2011, vol. 151, no. 3, pp. 284 - 288 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.016.
- [18] LAUREYS, D., AERTS, M., VANDAMME, P., DE VUYST, L. Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. *Food Microbiology* [online]. 2018, vol. 73, pp. 351 - 361 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.1016/j.fm.2018.02.007.

- [19]PRESTER, L. Biogenic amines in ready-to-eat foods. KOTZEKIDOU, P. *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods* [online]. 2016, pp. 397 - 416 [cit. 2018-08-02]. ISBN 978-0-12-801916-0.
- [20]LÁZARODE LA TORRE, C. A., CONTE-JUNIOR C. A. Detection of Biogenic Amines: Quality and Toxicity Indicators in Food of Animal Origin. In: HOLBAN, A., M., GRUMEZESCU, A., M. *Food Control and Biosecurity* [online]. 2018, pp. 225 - 257 [cit. 2018-08-02]. ISBN 978-0-12-811445-2.
- [21]BUŇKOVÁ, L., BUDINSKÝ, P., ADAMCOVÁ, G., PLEVA, P., BUŇKA, F. *Monitoring výskytu biogenních aminů ve fermentovaných mléčných výrobcích v ČR* [online]. 2012, no. 134, pp. 1 - 3 [cit. 2018-08-02]. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2012/134_s.i-iii.pdf
- [22]SMĚLÁ, D., PECHOVÁ, P., KOMPRDA, T., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. *Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování* [online]. 2004, (no. 98), pp. 432 - 437 [cit. 2018-09-01]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_07_07.pdf
- [23]ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry* [online]. 2007, vol. 10, no. 4, pp. 1475 - 1486 [cit. 2018-08-02]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.08.028.
- [24]LOIZZO, M., R., MENICHINI, F., PICCI, N., PUOCI, F., SPIZZIRRI, U., G., RESTUCCIA, R. Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2013, vol. 30, no. 1, pp. 38 - 55 [cit. 2018-10-10]. DOI: 10.1016/j.tifs.2012.11.005.
- [25]KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. *Biogenic Amines in Food* [online]. 2003, vol. 59, no. 1, pp. 70 - 79 [cit. 2018-09-02]. Dostupné z: https://www.chempap.org/file_access.php?file=591a70.pdf
- [26]LINARES, D., M., DEL RÍO, B., LADERO, V., MARTÍNEZ, N., FERNÁNDEZ, M., MARTÍN, M., C., ÁLVAREZ, M., A. Factors Influencing Biogenic Amines Accumulation in Dairy Products. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2012, vol. 3, no. 180, pp. 1 - 10 [cit. 2018-10-06]. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00180.
- [27]MAINTZ, L., NOVAK, N. Histamine and histamine intolerance. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2007, vol. 85, no. 5, pp. 1185 - 1196 [cit. 2018-09-02]. DOI: 10.1093/ajcn/85.5.1185.

- [28] PARSONS, M., E., GANELLIN, C., R. Histamine and its receptors. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2006, vol. 147, pp. 127 - 135 [cit. 2018-09-02]. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706440
- [29] SPANO, G., RUSSO, P., LONVAUD-FUNEL, A., et al. Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2010, vol. 64, pp. 95 - 100 [cit. 2018-09-24]. DOI: 10.1038/ejcn.2010.218.
- [30] MAH, J., HWANG, H. Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosum* as a protective culture. *Food Control* [online]. 2009, vol. 2, no. 9, pp. 796 - 801 [cit. 2018-10-14]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.10.005.
- [31] ŞANLI, T., ŞENEL, E. Formation of Biogenic Amines in Cheese. In: PREEDY, V. *Processing and Impact on Active Components in Food* [online]. 2015, pp. 223 - 230 [cit. 2018-09-22]. ISBN 978-0-12-404699-3.
- [32] NAILA, A., FLINT, S., FLETCHER, G., BREMER, P., MEERDINK, G. Control of Biogenic Amines in Food - Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science* [online]. 2010, vol. 75, no. 7, pp. 139 - 150 [cit. 2018-09-24]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01774-x.
- [33] BAYLIS, CH., UYTENDAELE, M., JOOSTEN, H., DAVIES, A. *The enterobacteriaceae and their significance to the food industry*. Belgium. ILSI Europe [online]. 2011 [cit. 2018-10-17]. ISBN 9789078637332. Dostupné z: <http://ilsi.eu/wp-content/uploads/sites/3/2016/06/EP-Enterobacteriaceae.pdf>
- [34] SARKADI, L., S. Biogenic amines. In: LINEBACK, D., R. *Process-Induced Food Toxicants: Occurrence, Formation, Mitigation, and Health Risks* [online]. 2009, pp. 321 - 343 [cit. 2018-09-24]. ISBN 978-0-470-07475-6.
- [35] *Obrázek: Dekarboxylace aminokyselin* [online]. [cit. 2018-08-04]. Dostupné z: https://www.google.com/search?tbm=isch&q=dekarboxylace+aminokyselin&chips=q:dekarboxylace+aminokyselin,online_chips:biogenn%C3%AD+aminy&sa=X&ved=0ahUKEwjz_4Ot3NPcAhVHJFAKHwYBBUQ4lYILigI&biw=1067&bih=529&dpr=1.5#imgrc=hlUj4gHMisQvvM:
- [36] KALHOTKA, L., NĚMCOVÁ, M., VYLETĚLOVÁ, M., HAVLÍKOVÁ, Š. *Dekarboxylasová aktivita Bacillus Licheniformis a její ovlivnění teplotou a dobou*

- kultivace* [online]. 2010, no. 124, pp. 8 - 11 [cit. 2018-08-04]. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2011/124_s_viii-xi.pdf
- [37] SILLA SANTOS, M., H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1996, vol. 29, no. 2 - 3, pp. 213 - 231 [cit. 2018-09-02]. DOI: 10.1016/0168-1605(95)00032-1.
- [38] BENKERROUM, N. Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2016, vol. 15, no. 4, pp. 801 - 826 [cit. 2018-09-22]. DOI: 10.1111/1541-4337.12212.
- [39] PAPAGEORGIOU, M., LAMBROPOULOU, D., MORRISON, C., KŁODZIŃSKA, E., NAMIEŚNIK, J., PŁOTKA-WASYLKA, J. Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. *Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2018, vol. 98, pp. 128 - 142 [cit. 2018-08-08]. DOI: 10.1016/j.trac.2017.11.001.
- [40] HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 1994, vol. 5, no. 2, pp. 42 - 49 [cit. 2018-08-08]. DOI: 10.1016/0924-2244(94)90070-1.
- [41] ÖZDESTAN, Ö., ÜREN, A. Biogenic amine content of kefir: a fermented dairy product. *European Food Research and Technology* [online]. 2010, vol. 231, no. 1, pp. 101 - 107 [cit. 2018-09-22]. DOI: 10.1007/s00217-010-1258-y.
- [42] GARDINI, F., ÖZOGUL, Y., SUZZI, G., TABANELLI, G., ÖZOGUL, F. Technological Factors Affecting Biogenic Amine Content in Foods: A Review. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016, vol. 7, no. 1218, pp. 1 - 18 [cit. 2018-10-06]. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01218.
- [43] GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CARUSO, M., C., et al. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2001, vol. 64, pp. 105 - 117 [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00445-1.
- [44] BARGOSSI, E., GARDINI, F., GATTO, V., et al. The Capability of Tyramine Production and Correlation between Phenotypic and Genetic Characteristics of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2015, vol. 6, pp. 1 - 12 [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01371.

- [45]ZHANG, K., NI, Y. Tyrosine decarboxylase from *Lactobacillus brevis*: soluble expression and characterization. *Protein Expression and Purification* [online]. 2014, vol. 94, pp. 33 - 39 [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.1016/j.pep.2013.10.018.
- [46]LANDETE, J., M., PARDO, I., FERRER, S. Regulation of hdc expression and HDC activity by enological factors in lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2008, vol. 105, no. 5, pp. 1544 - 1551 [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2008.03865.x.
- [47]ALVAREZ, M., A., MORENO-ARRIBAS, M., V. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2014, vol. 39, no. 2, pp. 146 - 155 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.07.007.
- [48]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* [online]. 2012, vol. 135, no. 4, pp. 2650 - 2660 [cit. 2018-10-14]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.07.022.
- [49]ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [50]SUZZI, G., GARDINI, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2003, vol. 88, no. 1, pp. 41 - 54 [cit. 2018-10-17]. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00080-1.
- [51]BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, V. *Lékařská mikrobiologie*. 2. vyd. Praha: Marvil, 1996. ISBN 80-238-0297-6.
- [52]BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., HLOBILOVÁ, M., DRÁB, V., KRÁČMAR, S. *Komparace různých metod detekce dekarboxylázové aktivity u bakterií mléčného kvašení* [online]. *Potravinářstvo*, roč. 4, 2010, 372 - 380 s. [cit. 2018-10-18]. ISSN 1337-0960.
- [53]VON WRIGHT, A., AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: An Introduction. In: LAHTINEN, S., OUWEHAND, A., C., SALMINEN, S., VON WRIGHT, A. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* [online]. 2012, pp. 2 - 14 [cit. 2019-03-07]. ISBN 978-1-4398-3677-4.
- [54]PAPADIMITRIOU, P., ALEGRÍA, A., BRON, P., A., et al. Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.*[online]. 2016, vol. 80, no. 3, pp. 837 - 890 [cit. 2019-03-07]. DOI: 10.1128/MMBR.00076-15.

- [55] BARRANGOU, R., LAHTINEN, S., J., IBRAHIM, F., OUWEHAND, A., C. Genus *Lactobacillus*. In: LAHTINEN, S., OUWEHAND, A., C., SALMINEN, S., VON WRIGHT, A. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* [online]. 2012, pp. 77 - 87 [cit. 2019-03-07]. ISBN 978-1-4398-3677-4.
- [56] BERNARDEAU, M., VERNOUX, J., P., HENRI-DUBERNET, S., GUÉGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2008, vol. 126, no. 3, pp. 278 - 285 [cit. 2019-03-07]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.015.
- [57] LAHTINEN, S., OUWEHAND, A., C., SALMINEN, S., VON WRIGHT, A. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* [online]. 4rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2012, pp. 798 [cit. 2018-11-26]. ISBN 9781439836781. Dostupné z: https://zodml.org/sites/default/files/Lactic_Acid_Bacteria_Microbiological_and_Functional_Aspects%2C_Fourth_Edition.pdf
- [58] OGIER, J., C., CASALTA, E., FARROKH, C., SAÏHI, A. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2008, vol. 126, no. 3, pp. 286 - 290 [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.012.
- [59] MARGALEF-CATALÀ, M., FELIS, G., E., REGUANT, C., et al. Identification of variable genomic regions related to stress response in *Oenococcus oeni*. *Food Research International* [online]. 2017, vol. 102, pp. 325 - 638 [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.09.039.
- [60] KOT, W., NEVE, H., HELLER, K., J., VOGENSEN, F., K. Bacteriophages of *Leuconostoc*, *Oenococcus*, and *Weissella*. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2014, vol. 5, pp. 1- 9 [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00186.
- [61] PORTO, M., C., W., KUNIYOSHI, T., M., AZEVEDO, P., O., S., et al. *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnology Advances* [online]. 2017, vol. 35, no. 3, pp. 361 - 374 [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.03.004.
- [62] RAI, A., K., PANDEY, A., SAHOO, D. Biotechnological potential of yeasts in functional food industry. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2019, vol. 83, pp. 129 - 137 [cit. 2019-03-09]. DOI: 10.1016/j.tifs.2018.11.016.
- [63] CARUSO, M., FIORE, C., CONTURSI, M., et al. Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotech-*

- nology* [online]. 2002, vol. 18, no. 2, pp. 159 - 163 [cit. 2019-03-09]. DOI: 10.1023/A:1014451728868.
- [64]HUONG, T., T., KOMÍNKOVÁ, M., GURÁŇ, R., et al. *Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS* [online]. 2014, vol. 1, pp. 64 - 66 [cit. 2019-04-10]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0214/pdf/d-microbial_identification_by_maldi-tof_ms.pdf
- [65]Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny
- [66]HAASOVÁ, Z. *Schopnost produkce biogenních aminů vybranými kmeny kvasinek*. Zlín, 2016. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
- [67]KOMPRDA, T., SLÁDKOVÁ, P., PETIROVÁ, E., et al. Tyrosine- and histidine-decarboxylase positive lactic acid bacteria and enterococci in dry fermented sausages. *Meat Science* [online]. 2010, vol. 8, no. 3, pp. 870 - 877 [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.1016/j.meatsci.2010.07.013.
- [68]YILMAZ, C., GÖKMEN, V. Formation of tyramine in yoghurt during fermentation – Interaction between yoghurt starter bacteria and *Lactobacillus plantarum*. *Food Research International* [online]. 2017, vol. 97, pp. 288 - 295 [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.04.014.
- [69]LANDETE, J., M., FERRER, S., PARDO, I. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control* [online]. 2007, vol. 18, no. 2, pp. 1569-1574 [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2006.12.008.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BA	Biogenní aminy
BMK	Bakterie mléčného kvašení
CNS	Centrální nervový systém
CAD	Kadaverin
CO ₂	Oxid uhličitý
EA	Endův agar
FKF	Flower kefir
FKG	Kefirová zrna Flower kefiru
G ⁺	Grampozitivní bakterie
G ⁻	Gramnegativní bakterie
HIS	Histamin
H ₂ S	Sirovodík
MKF	Manta kefir
MKG	Kefirová zrna Manta kefiru
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe agar
ND	Nedetekováno
PHE	2-fenylethylamin
PUT	Putrescin
RBCA	Rose Bengal Chloramphenicol Agar
SAB	Sabouraud agar
SPD	Spermidin
SPM	Spermin
TRP	Tryptamin
TYM	Tyramin

UV/VIS	Spektrofotometrický detektor měřící absorbanci vzorku v oblasti ultrafialového a viditelného záření
VRBL	Violet Red Bile Agar with Lactose
(w/v)	Hmotnostní zlomek
WKF	Vodní kefir
WKG	Kefirová zrna vodního kefiru

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Kefírová zrna [14]	16
Obr. 2: Schéma tradiční výroby kefiru [4].....	17
Obr. 3: Schéma průmyslové výroby kefiru [4]	18
Obr. 4: Strukturní vzorce nejvýznamnějších biogenních aminů [23], [24]	20
Obr. 5: Dekarboxylace aminokyselin [35].....	21

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Fyziologické a toxické účinky biogenních aminů [19]	23
Tab. 2: Mikroorganismy produkující BA v mléčných výrobcích [26]	29
Tab. 3: Identifikace kmenů z čeledi <i>Enterobacteriaceae</i> metodou MALDI/TOF MS.....	45
Tab. 4: Identifikace kmenů kvasinek metodou MALDI/TOF MS	46
Tab. 5: Identifikace kmenů z rodu <i>Lactobacillus</i> metodou MALDI/TOF MS.....	47
Tab. 6: Produkce jednotlivých BA u izolátů čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	53
Tab. 7: Produkce jednotlivých BA u izolátů čeledi <i>Enterobacteriaceae</i> a celková produkce BA pro jednotlivé izoláty čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	53
Tab. 8: Produkce jednotlivých biogenních aminů kvasinkami	59
Tab. 9: Produkce jednotlivých biogenních aminů kvasinkami a celková produkce BA pro jednotlivé kmeny kvasinek.....	60
Tab. 10: Produkce jednotlivých biogenních aminů rodu <i>Lactobacillus</i>	68
Tab. 11: Produkce jednotlivých biogenních aminů rodu <i>Lactobacillus</i> a celková produkce BA pro jednotlivé kmeny rodu <i>Lactobacillus</i>	70
Tab. 12: Výsledky makroskopických morfologických znaků kmenů z čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	88
Tab. 13: Výsledky makroskopických morfologických znaků kmenů kvasinek	88
Tab. 14: Výsledky makroskopických morfologických znaků kmenů z rodu <i>Lactobacillus</i>	91
Tab. 15: Výsledky Gramova barvení a vybraných biochemických testů kmenů z čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	94
Tab. 16: Výsledky vybraných biochemických testů kmenů kvasinek.....	94
Tab. 17: Výsledky Gramova barvení a vybraných biochemických testů kmenů z rodu <i>Lactobacillus</i>	96

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Celková produkce BA pro jednotlivé kmeny čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	51
Graf 2: Srovnání produkce BA u kmene z čeledi <i>Enterobacteriaceae</i> s nejmenší a největší celkovou produkcí BA	52
Graf 3: Celková produkce BA pro jednotlivé kmeny kvasinek	55
Graf 4: Celková produkce BA pro jednotlivé kmeny kvasinek	56
Graf 5: Celková produkce BA pro jednotlivé kmeny kvasinek	56
Graf 6: Celková produkce BA pro jednotlivé kmeny kvasinek	57
Graf 7: Srovnání produkce BA u kmene kvasinek s nejmenší a největší celkovou produkcí BA	58
Graf 8: Celková produkce BA pro jednotlivé kmeny rodu <i>Lactobacillus</i>	64
Graf 9: Celková produkce BA pro jednotlivé kmeny rodu <i>Lactobacillus</i>	64
Graf 10: Celková produkce BA pro jednotlivé kmeny rodu <i>Lactobacillus</i>	65
Graf 11: Celková produkce BA pro jednotlivé kmeny rodu <i>Lactobacillus</i>	65
Graf 12: Celková produkce BA pro jednotlivé kmeny rodu <i>Lactobacillus</i>	66
Graf 13: Celková produkce BA pro jednotlivé kmeny rodu <i>Lactobacillus</i>	66
Graf 14: Srovnání produkce BA u kmene z rodu <i>Lactobacillus</i> s nejmenší a největší celkovou produkcí BA	67

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Makroskopické morfologické znaky	88
Příloha 2: Výsledky Gramova barvení a vybraných biochemických testů	94

PŘÍLOHA 1: MAKROSKOPICKÉ MORFOLOGICKÉ ZNAKY

Tab. 12: Výsledky makroskopických morfologických znaků kmenů z čeledi *Enterobacteriaceae*

Č. izolátu	Médium	Vzorek	Mikroorganismus	Makroskopické morfologické znaky kolonií				
				Velikost	Povrch	Profil	Okraj	Barva
1	EA	WKG	<i>Cronobacter sakazakii</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	fialovo - červená
9	EA	FKG	<i>Enterobacter ludwigii</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	růžová
10	EA	FKG	<i>Enterobacter cloacae</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	růžová
11	EA	FKG	<i>Enterobacter cloacae</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	růžová
15	EA	MKG	<i>Enterobacter cloacae</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	růžová
16	EA	MKG	<i>Enterobacter asburiae</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	fialovo - červená
18	EA	MKG	<i>Enterobacter cloacae</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	růžová
21	EA	MKF	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	fialovo - červená
23	EA	MKF	<i>Enterobacter asburiae</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	fialovo - červená
24	EA	MKF	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	fialovo - červená
26	EA	MKF	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	fialovo - červená
229	EA	FKF	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	fialovo - červená
230	EA	FKF	<i>Enterobacter asburiae</i>	1 mm	lesklý	plochý	vroubkovaný	fialovo - červená

Tab. 13: Výsledky makroskopických morfologických znaků kmenů kvasinek

Č. izolátu	Médium	Vzorek	Mikroorganismus	Makroskopické morfologické znaky kolonií				
				Velikost	Povrch	Profil	Okraj	Barva
78	SAB	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
79	SAB	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
80	SAB	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
91	SAB	WKF	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
130	SAB	WKF	<i>Candida valida</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
132	SAB	WKF	<i>Candida valida</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
133	SAB	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová

137	SAB	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
139	SAB	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2 mm	lesklý	vypouklý	hladký	smetanová
141	SAB	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2 mm	lesklý	vypouklý	hladký	smetanová
142	SAB	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
143	SAB	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2 mm	lesklý	vypouklý	hladký	smetanová
146	SAB	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
148	SAB	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
150	SAB	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
151	SAB	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2 mm	lesklý	vypouklý	hladký	smetanová
152	SAB	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
153	SAB	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
154	SAB	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
155	SAB	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
198	SAB	WKG	<i>Candida valida</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
201	SAB	WKF	<i>Candida valida</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
205	SAB	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
206	SAB	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
207	SAB	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
208	SAB	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
209	SAB	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
210	SAB	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
212	SAB	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2 mm	lesklý	vypouklý	hladký	smetanová
213	SAB	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
214	SAB	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
215	SAB	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová

216	SAB	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
218	SAB	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
219	SAB	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
222	SAB	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
223	SAB	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
224	SAB	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
225	SAB	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
226	SAB	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
228	SAB	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
280	SAB	WKF	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
284	SAB	WKF	<i>Lachancea fermentati</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
285	SAB	WKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
286	SAB	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
287	SAB	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
288	SAB	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
289	SAB	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
290	SAB	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
291	SAB	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
293	SAB	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
294	SAB	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	2 mm	lesklý	vypouklý	hladký	smetanová
297	SAB	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2 mm	lesklý	vypouklý	hladký	smetanová
298	SAB	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
299	SAB	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
300	SAB	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
301	SAB	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová

302	SAB	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	2 mm	lesklý	vypouklý	hladký	smetanová
303	SAB	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
305	SAB	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
307	SAB	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová
308	SAB	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	smetanová

Tab. 14: Výsledky makroskopických morfologických znaků kmenů z rodu *Lactobacillus*

Č. izolátu	Médium	Vzorek	Mikroorganismus	Makroskopické morfologické znaky kolonií				
				Velikost	Povrch	Profil	Okraj	Barva
27	MRS	WKG	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
40	MRS	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
47	MRS	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
58	MRS	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
59	MRS	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
106	MRS	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
107	MRS	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
108	MRS	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
109	MRS	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
110	MRS	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
111	MRS	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
112	MRS	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
114	MRS	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
115	MRS	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
116	MRS	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
117	MRS	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
118	MRS	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
119	MRS	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
120	MRS	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
121	MRS	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
122	MRS	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
123	MRS	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
157	MRS	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
158	MRS	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá

159	MRS	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
160	MRS	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
161	MRS	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
162	MRS	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
163	MRS	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	2 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
164	MRS	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
165	MRS	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
166	MRS	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
167	MRS	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
168	MRS	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
169	MRS	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
170	MRS	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
171	MRS	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
172	MRS	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
173	MRS	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
174	MRS	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
175	MRS	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
176	MRS	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
177	MRS	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
178	MRS	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
179	MRS	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
180	MRS	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	2 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
181	MRS	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
182	MRS	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
183	MRS	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
184	MRS	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
185	MRS	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
186	MRS	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
187	MRS	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
188	MRS	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
189	MRS	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
190	MRS	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
191	MRS	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
192	MRS	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
231	MRS	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
232	MRS	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná

233	MRS	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
234	MRS	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
235	MRS	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
236	MRS	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
237	MRS	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
238	MRS	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
239	MRS	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
240	MRS	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
241	MRS	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	2 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
242	MRS	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
244	MRS	WKF	<i>Lactobacillus nagelii</i>	2 mm	lesklý	plochý	hladký	bílá
245	MRS	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
247	MRS	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
249	MRS	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
250	MRS	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
251	MRS	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
252	MRS	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
253	MRS	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
254	MRS	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
255	MRS	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
256	MRS	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
257	MRS	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
258	MRS	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
259	MRS	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
260	MRS	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
261	MRS	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
262	MRS	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
263	MRS	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
264	MRS	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	1 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
265	MRS	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
266	MRS	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
267	MRS	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
269	MRS	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
270	MRS	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
271	MRS	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná
272	MRS	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	0,5 mm	lesklý	plochý	hladký	průhledná

PŘÍLOHA 2: VÝSLEDKY GRAMOVA BARVENÍ A VYBRANÝCH BIOCHEMICKÝCH TESTŮ

Tab. 15: Výsledky Gramova barvení a vybraných biochemických testů kmenů z čeledi *Enterobacteriaceae*

Č. izolátu	Vzorek	Mikroorganismus	Gramovo barvení	Tvar buňky	KOH test	Biochemické testy	
						Kataláza	Oxidáza
1	WKG	<i>Cronobacter sakazakii</i>	G-	tyčinky	+	+	-
9	FKG	<i>Enterobacter ludwigii</i>	G-	tyčinky	+	+	-
10	FKG	<i>Enterobacter cloacae</i>	G-	tyčinky	+	+	-
11	FKG	<i>Enterobacter cloacae</i>	G-	tyčinky	+	+	-
15	MKG	<i>Enterobacter cloacae</i>	G-	tyčinky	+	+	-
16	MKG	<i>Enterobacter asburiae</i>	G-	tyčinky	+	+	-
18	MKG	<i>Enterobacter cloacae</i>	G-	tyčinky	+	+	-
21	MKF	<i>Klebsiella oxytoca</i>	G-	tyčinky	+	+	-
23	MKF	<i>Enterobacter asburiae</i>	G-	tyčinky	+	+	-
24	MKF	<i>Klebsiella oxytoca</i>	G-	tyčinky	+	+	-
26	MKF	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	G-	tyčinky	+	+	-
229	FKF	<i>Klebsiella oxytoca</i>	G-	tyčinky	+	+	-
230	FKF	<i>Enterobacter asburiae</i>	G-	tyčinky	+	+	-

Tab. 16: Výsledky vybraných biochemických testů kmenů kvasinek

Č. izolátu	Vzorek	Mikroorganismus	Biochemické testy	
			Kataláza	Oxidáza
78	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
79	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
80	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
91	WKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
130	WKF	<i>Candida valida</i>	+	-
132	WKF	<i>Candida valida</i>	+	-
133	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
137	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
139	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
141	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
142	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
143	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
146	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-

148	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
150	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
151	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
152	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
153	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
154	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
155	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
198	WKG	<i>Candida valida</i>	+	-
201	WKF	<i>Candida valida</i>	+	-
205	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
206	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
207	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
208	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
209	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
210	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
212	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
213	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
214	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
215	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
216	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
217	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
218	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
219	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
222	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
223	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
224	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
225	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
226	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
228	WKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
280	WKF	<i>Lachancea fermentati</i>	+	-
284	WKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
285	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
286	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
287	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
288	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
289	FKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
290	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
291	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
293	FKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
294	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
297	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
298	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
299	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
300	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-

301	MKG	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
302	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
303	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
305	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
307	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
308	MKF	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-

Tab. 17: Výsledky Gramova barvení a vybraných biochemických testů kmenů z rodu *Lactobacillus*

Č. izolátu	Vzorek	Mikroorganismus	Gramovo barvení	Tvar buňky	KOH test	Biochemické testy	
						Kataláza	Oxidáza
27	WKG	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i>	G+	tyčinky	-	-	-
40	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
47	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
58	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
59	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
106	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
107	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
108	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
109	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
110	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
111	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
112	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
114	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
115	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
116	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
117	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
118	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
119	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
120	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
121	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
122	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
123	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
157	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	G+	tyčinky	-	-	-
158	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	G+	tyčinky	-	-	-
159	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	G+	tyčinky	-	-	-
160	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	G+	tyčinky	-	-	-
161	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	G+	tyčinky	-	-	-

162	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	G+	tyčinky	-	-	-
163	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	G+	tyčinky	-	-	-
164	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	G+	tyčinky	-	-	-
165	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	G+	tyčinky	-	-	-
166	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	G+	tyčinky	-	-	-
167	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	G+	tyčinky	-	-	-
168	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	G+	tyčinky	-	-	-
169	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
170	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
171	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
172	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
173	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
174	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
175	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
176	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
177	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
178	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
179	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
180	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
181	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
182	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
183	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
184	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
185	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
186	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
187	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
188	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
189	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
190	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
191	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
192	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
231	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
232	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
233	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
234	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
235	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
236	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
237	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	G+	tyčinky	-	-	-

238	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	G+	tyčinky	-	-	-
239	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	G+	tyčinky	-	-	-
240	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	G+	tyčinky	-	-	-
241	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	G+	tyčinky	-	-	-
242	WKG	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	G+	tyčinky	-	-	-
244	WKF	<i>Lactobacillus nagelii</i>	G+	kokotyčinky	-	-	-
245	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	G+	tyčinky	-	-	-
247	WKF	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	G+	tyčinky	-	-	-
249	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
250	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
251	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
252	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
253	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
254	FKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
255	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
256	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
257	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
258	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
259	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
260	FKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
261	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
262	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
263	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
264	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
265	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
266	MKG	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
267	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
269	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
270	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
271	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-
272	MKF	<i>Lactobacillus kefir</i>	G+	tyčinky	-	-	-