

+

# **Faktory ovlivňují redukci obsahu biogenních aminů bakterií *Lactobacillus casei***

Bc. Dagmar Bábková

---

Diplomová práce  
2020



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Dagmar Bábková  
Osobní číslo: T19770  
Studijní program: N0721A210004 Technologie potravin  
Studijní obor: Technologie potravin  
Forma studia: Kombinovaná  
Téma práce: Faktory ovlivňující redukci obsahu biogenních aminů bakterií *Lactobacillus casei*

### Zásady pro vypracování

#### I. Teoretická část:

1. Charakteristika a význam druhu *Lactobacillus casei*.
2. Biogenní aminy – charakteristika, tvorba, výskyt v prostředí.
3. Možnosti snížení obsahu biogenních aminů v prostředí.

#### II. Praktická část:

1. Kultivace *Lactobacillus casei* v závislosti na různých faktorech prostředí.
  2. HPLC stanovení obsahu biogenních aminů v bujónu po kultivaci *Lactobacillus casei*.
  3. Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce.
-

---

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

**Seznam doporučené literatury:**

- [1] Velíšek, J., Hajšlová, J. Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009
- [2] Holzapfel, W.H., Wood, B.J.B. Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy. Chichester: Wiley Blackwell, 2014
- [3] Callejón, S., Sendra, R., Ferrer, S., Pardo, I. Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(1): 185-198, 2014
- [4] Herrero-Fresno, A., Martínez, N., Sánchez-Llana, E., Díaz, M., Fernández, M., Martín, M.C., Ladero, V., Alvarez Miguel, A. Lactobacillus casei strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2): 297-304, 2012
- [5] Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **31. prosince 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**Ing. Robert Gál, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 8. února 2021

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou 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);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové 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.

### **Prohlašuji,**

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

podpis studenta

.....

## ABSTRAKT

Diplomová práce navazuje na výzkum provedený v bakalářské práci a zabývá se faktory ovlivňujícími redukcí obsahu biogenních aminů bakterií *Lactobacillus casei*. Teoretická část zahrnuje charakteristiku a význam druhu *Lactobacillus casei*, popis biogenních aminů, jejich charakteristiku, tvorbu a výskyt v prostředí a možnostmi snížení obsahu biogenních aminů v prostředí. Praktická část se zabývá kultivací *Lactobacillus casei* v závislosti na různých faktorech prostředí, HPLC stanovením obsahu biogenních aminů v bujónu po kultivaci *Lactobacillus casei* a vyhodnocením výsledků a formulací závěrů práce.

Byly zaznamenány úbytky obsahu biogenních aminů. Nejvýznamnější úbytky byly zaznamenány při pH 5,4 při 30 °C, kdy došlo k redukcí všech sledovaných aminů alespoň o 20 %. Nejlépe byl degradován histamin, jehož koncentrace byla snížena v průběhu prvních 24 hodin až o 50 %. Druhým nejlépe degradovaným aminem byl putrescin, jehož koncentrace klesly v prvních 8 hodinách o 30 % a za 24 hodin na 50 %. Koncentrace fenylethylaminu klesly o 35 %. Byla zaznamenána i degradace kadaverinu a tyraminu o 20%.

Klíčová slova: klíčové slovo, klíčové slovo

Biogenní aminy, *Lactobacillus casei*, faktory ovlivňující degradaci, kultivace, HPLC

## ABSTRACT

The diploma thesis follows up on the research carried out in the bachelor thesis and deals with Selected Factors Influencing the Biogenic Amines Reduction by *Lactobacillus casei*. The theoretical part includes the characteristics and significance of the species *Lactobacillus casei*, a description of biogenic amines, their characteristics, formation and occurrence in the environment and the possibilities of reducing the content of biogenic amines. The practical part deals with the cultivation of *Lactobacillus casei* depending on various environmental factors, HPLC determination of the content of biogenic amines in the broth after cultivation of *Lactobacillus casei* and evaluation of the results and formulation of conclusions.

Decrease values were found. The most significant decreases were recorded at pH 5.4 at 30 ° C, when all monitored amines were reduced by at least 20%. The best degradation was found in histamine, the concentration of which was reduced by up to 50 % during the first 24 hours. The second best degraded amine was putrescine, whose concentrations dropped by 30% in the first 8 hours and to 50% in 24 hours. Phenylethylamine concentrations decreased by 35%. Degradation of cadaverine and tyramine by 20% was also noted.

Keywords: keywords, keywords

Biogenic amines, *Lactobacillus casei*, factors influencing degradation, culture, HPLC

Chtěla bych poděkovat zejména své školitelce doc. RNDr. Leoně Buňkové, za její vlídný přístup, výborné odborné vedení a rady, Mgr. Lucii Klementové za podporu, hodnotné rady, trpělivost, ochotu a veškerou odbornou pomoc. Dále bych chtěla velice poděkovat všem pracovníkům a kolegům z laboratoře.

# OBSAH

ÚVOD.....	10
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>11</b>
<b>1 CHARAKTERISTIKA A VÝZNAM DRUHU <i>LACTOBACILLUS CASEI</i>.....</b>	<b>12</b>
1.1 CHARAKTERISTIKA.....	12
1.1.3 Kultivace a molekulárně biologické metody.....	14
1.2.1 Schopnost redukce biogenních aminů kmeny <i>Lactobacillus casei</i> .....	15
<b>2 BIOGENNÍ AMINY.....</b>	<b>16</b>
2.1 CHARAKTERISTIKA.....	16
2.2.1 Sekundární reakce .....	20
3.1.1 Teplota.....	22
3.1.2 pH.....	22
3.1.3 Tlak .....	22
3.1.4 Záření .....	23
3.1.5 Antimikrobiální látky .....	23
3.1.6 Balení a dostupnost kyslíku .....	24
3.2 VYUŽITÍ MIKROORGANISMŮ SE SCHOPNOSTÍ DEGRADOVAT BIOGENNÍ AMINY.....	24
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>26</b>
<b>CÍL PRÁCE.....</b>	<b>27</b>
<b>4 KULTIVACE <i>LACTOBACILLUS CASEI</i> V ZÁVISLOSTI NA RŮZNÝCH FAKTORECH PROSTŘEDÍ.....</b>	<b>28</b>
4.2 PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	28
<b>5 HPLC STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ V BUJÓNU PO KULTIVACI <i>LACTOBACILLUS CASEI</i>.....</b>	<b>32</b>
5.1 PŘÍPRAVA A ODBĚR VZORKŮ PRO ANALÝZU .....	32
5.2 DERIVATIZACE VZORKŮ .....	32
5.3 CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ .....	32
6.1 DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ PŘI TEPLOTĚ 30 °C.....	34
6.1.1 Degradace fenylethylaminu při 30 °C v médiu o různém pH.....	34
6.1.2 Degradace putrescinu při 30 °C a různém pH.....	35
6.1.3 Degradace kadaverinu při 30 °C a různém pH.....	35
6.1.4 Degradace histaminu při 30 °C a různém pH.....	36
6.1.5 Degradace tyraminu při 30 °C a různém pH.....	37
6.2 DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ PŘI TEPLOTĚ 23 °C.....	38
6.2.1 Degradace fenylethylaminu při 23 °C a různém pH .....	38
6.2.2 Degradace kadaverinu při 23 °C a různém pH.....	39
6.2.3 Degradace putrescinu při 23 °C a třikrát různém pH .....	40
6.2.4 Degradace histaminu při 23 °C a různém pH.....	41
6.2.5 Degradace tyraminu při 23 °C a různém pH.....	42
6.3 DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ PŘI TEPLOTĚ 11 °C.....	43



6.3.1	Degradace fenylethylaminu při 11 °C a různém pH .....	43
6.3.2	Degradace kadaverinu při 11 °C a různém pH.....	44
6.3.3	Degradace putrescinu při 11 °C a různém pH.....	45
6.3.4	Degradace histaminu při 11 °C a různém pH.....	46
6.3.5	Degradace tyraminu při 11 °C a různém pH.....	47
<b>ZÁVĚR .....</b>		<b>53</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>		<b>54</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>		<b>60</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>		<b>61</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>		<b>62</b>

## ÚVOD

Zvýšený zájem o kontrolu a redukci biogenních aminů vyplývá z prohlubujících se znalostí působení na člověka. Přestože jsou nepostradatelné, ve vysokých koncentracích mohou být pro tělo toxické.

Pro snížení obsahu biogenních aminů byly navrženy různé strategie. Odstranění biogenních aminů již vzniklých je velmi těžké, a proto se za nejvhodnější považuje dodržování technologických postupů a hygienických podmínek, které brání jejich vzniku. Za nejdůležitějším opatření pro zábranu tvorby aminů je považováno používání vhodné teploty a doby skladování. Snížení akumulace BA lze ale také dosáhnout i jinými způsoby. (Naila et al., 2010)

Pro snížení obsahu již přítomných biogenních aminů lze také využít enzymů mikroorganismů s aminooxidázovou aktivitou. Často se využívají bakterie mléčného kvašení s inhibičními účinky na dekarboxyláza-pozitivní mikroorganismy. Velmi často se kombinují s aplikací antimikrobních látek a použitím technologických zákroků např. hydrostatický tlak, ozařování, balení. (Naila et al., 2010)

V diplomové práci byl zkoumán druh *Lactobacillus casei*, který je jeden z mnoha druhů zařazených do rodu *Lactobacillus*. Jedná se o velké grampozitivní tyčinky, které jsou nesporulující, nepohyblivé, kataláza, oxidáza a ureáza negativní. (F. Minerviny, 2011; Hill et al. 2018)

# **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# **1 CHARAKTERISTIKA A VÝZNAM DRUHU *LACTOBACILLUS CASEI***

Druh *Lactobacillus casei* je jeden z mnoha druhů, které řadíme do rodu *Lactobacillus*. Taxonomicky náleží do domény *Bacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales*, čeledi *Lactobacillaceae*. Díky jeho schopnosti zkvašovat cukry na kyselinu mléčnou jej také řadíme k bakteriím mléčného kvašení. (F. Minerviny, 2011; Hill et al. 2018)

*Lactobacillus casei* disponuje značnou genotypovou i fenotypovou heterogenitou. V minulosti byla jeho klasifikace založena zejména na schopnosti fermentace sacharidů, ale díky molekulárně biologickým metodám, byl tento rod rozdělen do tří skupin a to: *Lactobacillus casei* dříve *Lb. casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* dříve *Lb. casei* subsp. *alactosus* a *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* a *Lactobacillus rhamnosus* dříve *Lb. casei* subsp. *rhamnosus*. (F. Minerviny, 2011; Hill et al. 2018)

## **1.1 Charakteristika**

### **1.1.1 Morfologie**

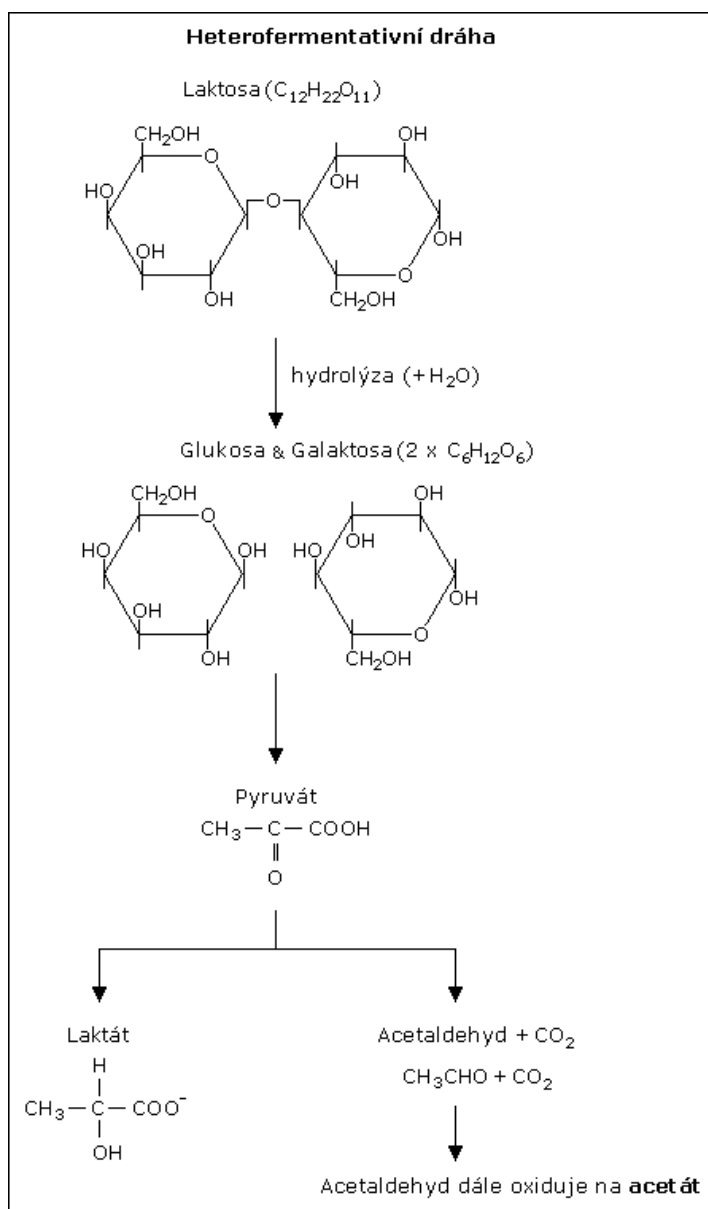
Rod *Lactobacillus* jsou velké grampozitivní tyčinky. Jsou nesporulující, nepohyblivé. Vyskytují se jednotlivě, ale mohou tvořit dvojice nebo i řetízky. V jejich buněčné stěně nebyla nalezena kyselina teichoová a typ buněčné stěny je Lys- D- Asp. (F. Minerviny, 2011)

### **1.1.2 Metabolismus**

Metabolismus laktobacilů je anaerobní aerotolerantní. Cytoplazma neobsahuje cytochromy, ale obsahuje manganázu, proto jsou schopny přežít na vzduchu, ale energii získávají kvašením. (F. Minerviny, 2011)

Rod *Lactobacillus* je zařazen k bakteriím mléčného kvašení. Tento název vznikl díky schopnosti bakterií zkvašovat glukózu či galaktózu na laktát. Dále jsou také schopny zkvašovat fruktózu, manitol, N-acetyl glukózamin a tagatózu. Bakterie druhu *Lactobacillus casei* jsou heterofermentativní, kvašením produkují kyselinu mléčnou, v menším množství kyselinu octovou, etanol a oxid uhličitý (Obrázek 1). Jsou acidotolerantní až acidofilní. Optimální pH růstu je 5,5. Jsou schopny růst v rozmezí pH 4,6-7,6.(Cai, H. et al., 2007) Mnohé laktobacily, včetně *Lb. casei* jsou mezofilní. Nejlépe rostou v rozmezí teplot 25-40 °C, ale jsou schopny růst i v chladírenských teplotách blízkých se bodu mrazu. (Cai, H. et al., 2007)

Laktobacily jsou kataláza, oxidáza a ureáza negativní, nedegradují arginin za vzniku amoniaku. Pro svůj růst vyžadují riboflavin, kyselinu listovou, kyselinu pantotenovou, niacin a vápník. Některé druhy také potřebují pyridoxalfosfát nebo pyridoxalamin. (F. Minerviny, 2011)



Obrázek 1: Heterofermentativní dráha (Obrázek převzat z: [http://zatomoko.cz/houby/teorie\\_j.php?q=old/teorie\\_j.php](http://zatomoko.cz/houby/teorie_j.php?q=old/teorie_j.php))

### 1.1.3 Kultivace a molekulárně biologické metody

Laktobacily mimo MRS rostou například na krevním agaru, nicméně jejich růst je dobré podpořit anaerobní kultivací. Ze selektivně diagnostických půd se nejčastěji využívá de Man Rogosa agar, zkráceně MRS se sníženým pH a vankomycinem. K zajištění anaerobního prostředí se také často přidává cystein. (F. Minerviny, 2011; Votava, 2003)

Jak již bylo dříve zmíněno, klasifikace je založena na molekulárně biologických metodách. Molekulárně biologické metody jsou také nejčastěji využívané, a to právě z důvodu jejich časové nenáročnosti v porovnání s kultivačními metodami. Nejčastěji využíváme metody založené na PCR, jako je pulzní gelová elektroforéza, amplifikace, restrikční analýza, typizace, sekvenace. (Shixi Song et al., 2019)

## 1.2 Význam

Laktobacily jsou běžnou součástí mikroflóry dutiny ústní, nosohltanu, tlustého střeva, vagíny a kůže. Fyziologický význam je ve zkvašování glykogenu a produkci kyseliny mléčné. Snížením pH na sliznicích zabráňují množení hnilobných bakterií a dalšímu pronikání infekce. Patogenní bývají vzácně. Bývají spojovány se zubním kazem, mohou způsobit bakteriemi a sekundárně endokarditidu. V lékárenství se užívají jako probiotika. (Votava, 2003)

První laktobacillus byl izolován ze sýru. Kmeny *Lactobacillus casei* se běžně vyskytují v čerstvých i fermentovaných potravinách jako jsou ryby, maso, siláže, rostlinné a mléčné výrobky. Velmi často jsou využívány jako startérové kultury kvůli jejich schopnosti degradovat biogenní aminy. Velmi často se používají jako doplňkové kultury v sýrech nebo fermentovaných rostlinných výrobcích. (Herero-Fresno et al., 2012)



Obrázek 2 Rod *Lactobacillus* (Upraveno podle: Erasmus MC. University Medical Centre Rotterdam Dostupné z: <http://microbe-canvas.com/Bacteria.php?p=1250>)

### **1.2.1 Schopnost redukce biogenních aminů kmeny *Lactobacillus casei***

Garcia – Ruiz et al. (2011) poukázali na schopnost některých kmenů *Lactobacillus casei* a *Pediococcus* izolovaných z vína redukovat histamin, tyramin a putrescin. Alvarez et al. (2014) identifikovali kmen *Lactobacillus casei*, vhodný k využití jako doplňková kultura při výrobě sýrů se schopností redukce histaminu a tyraminu.

Ve výzkumu Herero- Fresno et al. (2012) bylo izolováno 300 kmenů z různých druhů sýrů. Z toho byla u 17 kmenů *L. casei* prokázána schopnost degradovat biogenní aminy. Dva kmeny, které prokázaly silnou schopnost degradovat tyramin a histamin, byly navrženy jako doplňková kultura při výrobě modrých sýrů. Konkrétně se jednalo o *L. casei* b5 a *L. casei* 4aEM76. Na aminooxidázovou aktivitu kmenů *L. casei* v sýru poukázaly i studie Corpillo et al. 2003, Leuschner et al. 1998.

Dapkevicius et al. (2000) izolovali kmeny *L. casei* a *L. curvatus* z rybí pasty schopné degradace histaminu a využili je k výrobě rybích past. Také poukázali, že tyto kmeny nejsou schopny degradace při pH vyšším než 4,5. Proto je zde limitované využití u potravin s vyšším pH.

Fadda et al. (2001) se zabývali kmeny *L. casei* se schopností degradovat tyramin.

V roce 2002 Gardini et al. využili startérovou kulturu *L. sakei* G20 a *Staphylococcus xylosum* S81 při výrobě fermentovaných klobás, tato kombinace umožnila snížit koncentrace tyraminu, sperminu, spermidinu.

Larotte Moratalla et al. (2010) u španělského fuetu snížili obsah tyraminu až o 50 % přidávkem *Lactobacillus casei* v kombinaci se *Staphylococcus xylosum*.

## 2 BIOGENNÍ AMINY

### 2.1 Charakteristika

Biogenní aminy jsou organické, bazické sloučeniny produkované živými organizmy. S prohlubujícími znalostmi jejich působení na člověka se zvyšuje zájem o jejich výzkum. V organismu mají různé biologické funkce a v nízkých koncentracích jsou nepostradatelné, nicméně při snížené schopnosti degradace nebo při příjmu vysokých koncentracích mohou představovat i značné zdravotní riziko. (Askar a Treptow, 1986; Herrero-Fresno, A. et al., 2012; Shalaby, 1996)

Biogenní aminy dělíme nejčastěji dle struktury na heterocyklické - histamin, tryptamin, aromatické - tyramin, fenyletylamin a alifatické - putrescin, kadaverin, spermin a spermidin. (Herrero-Fresno, A. et al., 2012; Silla-Santos, 1996; Halasz et al., 1994)

#### 2.1.1 Funkce

V lidském těle působí hlavně jako neurotransmitery. Jsou také prekurzory hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů. Působí vazodilatačně a psychotropně. (Baülisberger, 2015) Polyaminy jsou důležité pro správnou funkci imunitního systému, buněčný růst, reparaci a stabilizaci buněčných membrán. Mají antioxidační účinky. (Herrero-Fresno, A. et al., 2012; Silla-Santos, 1996; Halasz et al., 1994).

##### 2.1.1.1 Histamin (2-(imidazol-4-yl)ethanamin)

Histamin se v klidovém stavu vyskytuje v granulech bazofilů a mastocytů, je také produkován neurony. Uvolňuje se z těchto buněk, většinou po navázání IgE na Fas - ligand receptor. Histamin poté reaguje s receptory spřaženými s G- proteiny, podskupina H 1 - 4. Daný účinek na organismus poté závisí na receptoru, se kterým reaguje. Histamin je mediátorem zánětu, funguje také jako neurotransmitter v mozku a způsobuje uvolnění katecholaminů. Způsobuje kontrakci hladkého svalstva dělohy, střeva, průdušek. Ovlivňuje také sekreci kyseliny chlorovodíkové z parietálních buněk žaludku. (Yismaw, 2020)

##### 2.1.1.2 Tyramin (4- (2-aminoethyl) fenol)

Tyramin má, stejně jako histamin, afinitu k receptorům spřažených s G-proteiny a působí převážně jako neurotransmitter v mozku, může způsobovat vazokonstrikci, která vede k migréně nebo až k hypertenzní krizi. (Baülisberger, 2015; Stadler a Linenback, 2009; Silla-Santos, 1996)



### **2.1.1.3 Spermin (*N,N*-bis(3-aminopropyl) butan-1,4-diamin) a spermidin (*N'*-(3-aminopropyl) butan-1,4-diamin)**

Spermin a spermidin se podílejí na regulaci genové exprese, prevenci fragmentace DNA zprostředkované endonukleázou a inhibici poškození DNA. (Baülisberger, 2015; Stadler a Linenback, 2009; Silla-Santos, 1996)

### **2.1.1.4 Fenylethylamin**

Fenylethylamin blokuje buněčné transportéry a vezikulární transport, čímž umožňuje uvolnění noradrenalinu z nervového systému a zvýšení jeho koncentrace v synaptické štěrbině. (Baülisberger, 2015; Stadler a Linenback, 2009; Silla-Santos, 1996)

### **2.1.1.5 Putrescin a kadaverin**

Putrescin a kadaverin vznikají nejčastěji hnilobným rozkladem a při kažení potravin. Putrescin je důležitý zejména v buněčném růstu. Kadaverin je signální molekulou a také zajišťuje správný růst. Vzhledem k potřebě těchto látek při buněčném růstu, není překvapením, že zvýšené hladiny těchto aminů se objevují při nádorovém bujení. (Baülisberger, 2015; Stadler a Linenback, 2009; Silla-Santos, 1996)

## **2.1.2 Zdravotní riziko**

Zdravotním rizikem jsou biogenní aminy pouze v případě přijetí vysokých koncentrací a zvýšené citlivosti jedince. Intolerance je tedy důsledkem nepoměru příjmu, spotřeby a výdeje aminů v těle. (Baülisberger, 2015). Za nejdůležitější z hlediska zdravotního rizika jsou považovány za nebezpečné pouze histamin a tyramin. Fenylethylamin a tryptamin mohou také způsobit zdravotní potíže, ale v menší míře. Evropský úřad pro bezpečnost potravin stanovil maximální množství pro histamin v rybách a rybích výrobcích 100 mg/kg. Příznaky aminové intoxikace mohou být různé od bolesti hlavy, urtikariálního exantému, zažívacím problémům, kolísání krevního tlaku, potížím s dýcháním, bronchiálního astmatu až po anafylaktický šok. (Callejón, 2014, Baülisberger, 2015; Stadler a Linenback, 2009; Silla-Santos, 1996)

## **2.2 Tvorba**

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární bazické sloučeniny odvozené od aminokyselin, ze kterých vznikají dekarboxylací působením příslušných dekarboxyláz. Kofaktorem této reakce je pyridoxalfosfát. Biogenní aminy mohou také vznikat aminací, transaminací

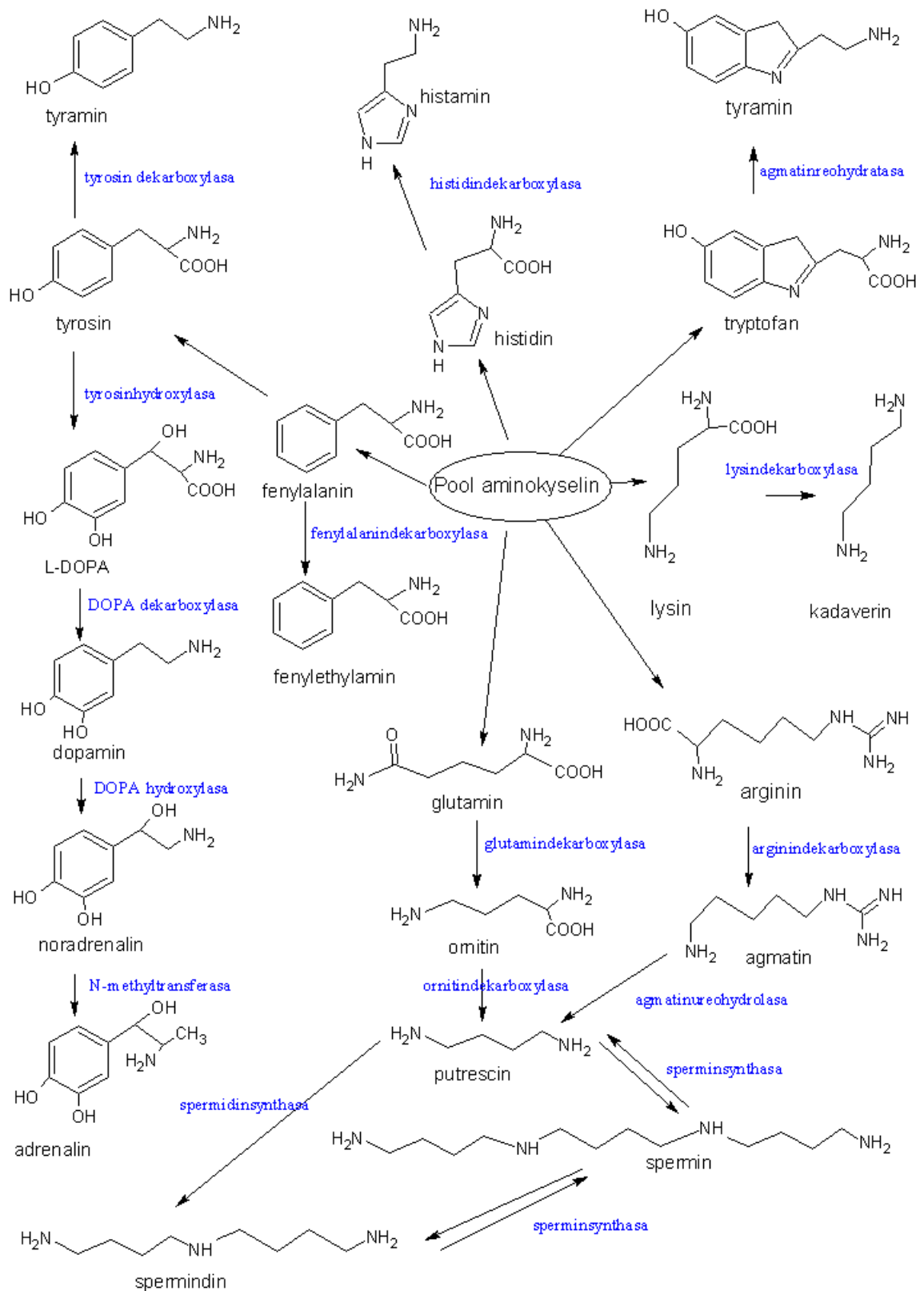
aldehydů a ketonů. Méně často hydrolytickou degradací neproteinogenních dusíkatých látek. Při další transformaci na biologicky aktivní produkty se uplatňují také některé oxygenázy a methyltransferázy. (Velíšek, 2009; Baülisberger, 2015)

Pro jejich vznik je nutná přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou a vhodné podmínky pro růst a množení. Některé mikroorganismy využívají dekarboxylaci kvůli získání energie nebo k ochraně před kyselým pH. Biogenní aminy také bývají syntetizovány mikrobiálním, rostlinným a živočišným metabolismem. (Baülisberger, 2015, Halasz et al., 1994) Příslušné reakce jsou uvedeny na Obrázku 3.

Z histidinu vzniká pomocí histidindekarboxylázy histamin, z lyzinu pomocí lyzindekarboxylázy kadaverin. Z argininu arginindekarboxylázou agmatin a dále putrescin, ten může také vznikat z ornitinu pomocí ornitindekarboxylázy. Ornitin vzniká působením arginázy z argininu. Putrescin může být dále methylován a vzniká *S*-adenosylmethioninem spermidin a dále pak spermin. (Velíšek, 2009)

Z tryptofanu pomocí tryptofandekarboxylázy vzniká tryptamin, ze kterého dále vzniká serotonin a pomocí serotonin-N-acetyltransferázy vzniká N-acetylserotonin a působením hydroxyindol-O-methyltransferázy vzniká hormon melatonin. (Velíšek, 2009)

Z fenylalaninu pomocí fenylalanindekarboxylázy vzniká 2 - fenylethylamin, z tyrozinu poté vzniká činností tyrozindekarboxylázy tyramin a jeho oxidací oktopamin. Z dihydroxyfenylalaninu (DOPA) vzniká působením dihydroxyfenylalanindekarboxylázy dopamin, dále oxidací dopaminu vzniká hormon dřeně nadledvinek noradrenalin a jeho reakcí s *S*-adenosylmethioninem adrenalin. (Velíšek, 2009)



Obrázek 3 Vznik nejdůležitějších biogenních aminů z aminokyselin. (Upraveno podle Halasz et al., 1994, Ledvina, 2010)

### 2.2.1 Sekundární reakce

Během dlouhodobého skladování vznikají deriváty a další sloučeniny. Biogenní aminy (BA) jsou značně reaktivní látky. Během dlouhodobého skladování nebo při vysoké teplotě mohou vznikat amidy mastných kyselin. Oxidativní deaminací mohou vznikat aldehydy. Iminy vznikají při neenzymatickém hnědnutí nebo oxidací aminů peroxidy nebo hydroxyperoxidy mastných kyselin. (Velíšek, 2009)

Sekundární aminy mohou reakcí s oxidem dusíku vytvářet karcinogenní nitrosaminy. S proteiny reagují BA jako je fenylethylamin, putrescin, tyramin, spermidin a histamin za vzniku  $\beta$ -*N*-substituovaných derivátů diaminopropionové kyseliny. Patrným mechanismem vzniku těchto derivátů AMK je  $\beta$ -eliminace zbytků cysteinu a následující adice aminu na dvojnou vazbu dehydroalaninu vznikajícího totožně jako při vzniku lysinoalaninu. (Velíšek, 2009; Shukla et al., 2011)

## 2.3 Výskyt v prostředí

Protože biogenní aminy vznikají z bílkovin, lze je očekávat prakticky všude. Ve všech rostlinách, živočiších, mikroorganizmech. V potravinách je lze očekávat například v rybách, masu, masných výrobcích, sýru, ovoci a zelenině, pivu nebo víně. Ve vyšších množstvích se nacházejí ve fermentovaných výrobcích, a to hlavně z důvodu použití startérových kultur a přirozeně nacházejících se mikroorganismů v surovině. (Stadnik a Dolanowski, 2010; Vidal – Carou et al., 2010)

Vidal-Carou et al. (2010) uvádí, že nejčastějšími biogenními aminy v potravinách jsou histamin, tyramin, kadaverin, fenylethylamin, spermin a spermidin, putrescin, tryptamin a agmatin. V mase a rybách může být výskyt i oktopaminu nebo dopaminu.

Vysoký obsah proteinů mají sýry, ve kterých enzymatickou mikrobiální proteolýzou vznikají volné aminokyseliny z kaseinu a následně biogenní aminy. (Silla-Santos, 1996; Vidal-Carou et al., 2010)

Sýry jsou považovány za potraviny s vysokým obsahem proteinů, ve kterých díky enzymatické a mikrobiální aktivitě vznikají volné aminokyseliny a následně biogenní aminy. Tato reakce je zodpovědná za vznik charakteristické chuti a textury. Nejvíce se v sýru se vyskytuje tyramin, histamin v koncentracích 1 g/kg, vyskytuje se zde také putrescin, kadaverin ve stovkách mg/kg. Nedávno byl identifikován kmen *Lactobacillus casei* schopný

redukce koncentrace histaminu a tyraminu a lze jej využít jako konkurenční doplňkovou kulturu. (Herrero-Fresno et al. 2012; Alvarez et al. 2014)

Biogenní aminy se vyskytují i v nefermentovaných potravinách jako jsou maso, mořské ryby, zelenina, ovoce. Vznikají hlavně působením kontaminující mikroflóry během skladování. Obsah biogenních aminů může být ukazatelem jakosti vstupní suroviny a úrovně hygieny během výrobního procesu a skladování. Vysoké koncentrace aminů se vyskytují v potravinách s pokročilým stadiem kažení. Biogenní aminy jsou používány jako indikátor hygienického zpracování, čerstvosti a trvanlivosti potravin. (Baülisberger, 2015)

### **3 MOŽNOSTI SNÍŽENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ V PROSTŘEDÍ**

Pro snížení obsahu biogenních aminů byly navrženy různé strategie. Odstranění biogenních aminů již vzniklých je velmi těžké, proto se za nejvhodnější postup považuje dodržování technologických postupů a hygienických podmínek, které brání jejich vzniku. Za nejdůležitějším opatření pro zábranu tvorby aminů je považováno používání vhodné teploty a doby skladování. Snížení akumulace BA lze ale také dosáhnout i jinými způsoby. (Naila et al., 2010)

#### **3.1 FYZIKÁLNÍ METODY**

##### **3.1.1 Teplota**

Produkce biogenních aminů mikroorganismy závisí na teplotě. S klesající teplotou také klesá koncentrace biogenních aminů, protože dochází k inhibici růstu. Nicméně některé bakterie, jako například *Photobacterium* spp. jsou schopny růst a produkovat histidindekarboxylázu i při nízkých teplotách. (Emborg, Laursen a Dalgaard, 2005; Nei et al., 2012) Mrazírenské teploty jsou více účinné. Vysoké teploty také napomáhají ke snížení obsahu biogenních aminů, protože dochází k eliminaci mikroorganismů. Účinnost eliminace biogenních aminů varem je u každé potraviny jiná, vyžaduje experimentování. V případě vaření nenaklíčených luštěnin se biogenní aminy zcela přenesly do vařící vody, nicméně při vaření naklíčených luštěnin byl obsah BA snížen minimálně. (Shalaby 1996, Naila et al. 2010) Nicméně biogenní aminy jsou velmi často termostabilní a je velmi těžké, většinou až nemožné je varem z prostředí odstranit. (Naila et al., 2010)

##### **3.1.2 pH**

pH ovlivňuje a v některých případech až inhibuje, růst mikrobiální populace. Dekarboxylázová aktivita je vyšší především v kyselém prostředí. Optimální pH pro dekarboxylační mikroorganismy je 4,0 - 5,5. (Silla-Santos, 1996)

##### **3.1.3 Tlak**

Zvýšený tlak narušuje buněčné membrány mikroorganismů, což vede k jejich eliminaci. Tento způsob se velmi často využívá při konzervaci potravin s kombinací vakuového balení, běžně u sýrů, klobás, ryb nebo zelí. (Naila et al., 2010)

Inhibice tvorby biogenních aminů závisí na úrovni aplikovaného tlaku. Například, během zrání sýra při nízkotlakém zpracování 50 MPa po 72 h se zvýšil obsah biogenních aminů. Při vysokém tlaku 400 MPa po dobu 5 minut se ukázal mírný pokles. (Novella-Rodriguez et al., 2002)

Celkově existují omezené informace o účinnosti tlaku na kontrolu biogenních aminů. Je možné, že zvýšený tlak ovlivňuje enzymy i bakterie, které způsobují tvorbu biogenních aminů, i když tento aspekt zatím nebyl studován. (Novella-Rodriguez et al., 2002; Latorre-Moratalla et al., 2007; Ruiz-Capillas et al., 2007).

#### **3.1.4 Záření**

K ozařování se využívají nejčastěji gama paprsky a lze jimi docílit degradace biogenních aminů. Pro redukci o 95% je potřeba použít záření 20 kGy. Nicméně za bezpečné ozařování potravin se považuje dávka 10 kGy. Ionizující záření deaktivuje mikroorganismy poškozením nukleových kyselin, záření lze využít pro samotnou degradaci biogenních aminů. (Naila et al., 2010; WHO 2014, Nei et al., 2012)

#### **3.1.5 Antimikrobiální látky**

Mezi antimikrobiální látky řadíme konzervační a přídatné látky, koření a soli. Bylo prokázáno, že tyto látky mohou snížit obsah biogenních aminů díky působení na mikroorganismy a jejich dekarboxylázovou aktivitu. (Naila et al., 2010)

Sorbát sodný, kyselina citronová, jablečná a jantarová snižují produkci histaminu ve výrobcích, jako jsou například makrely. Kyselina citronová se využívá v 1% koncentraci při výrobě kyselého zelí, bylo prokázáno, že její využití snižuje obsah biogenních aminů až o 10 %. Při výrobě klobás může být využit sorban draselný, kyselina askorbová, dusitan sodný. Delta-glukonolakton snižuje produkci putrescinu v mase. Také přídavek cukru redukuje kadaverin. (Kang a Park 1984; Shalaby 1996, Yucel a Ueren 2008)

Přirozeně se vyskytující antimikrobiální látky můžeme najít v některých kořenech. Bylo také prokázáno, že inhibují tvorbu biogenních aminů. Mezi takové látky patří kurkumin, kapsaicin nebo piperin. Nevýhodou těchto látek je značná ztráta účinnosti, ke které dochází při vaření (Komprda et al., 2004; Suresh a další 2007). Tymol má také antimikrobiální a antioxidační aktivitu. (Lee et al., 2008).

Bylo prokázáno, že látky v zázvoru, česneku, zelené cibuli, červené paprice, hřebíčku a skořici zpomalují produkci biogenních aminů. (Mah et al., 2009).

Přítomnost solí většinou inhibuje vznik BA. Tvorba histaminu a tyraminu může být inhibována při koncentraci NaCl 3,5-5,5 %, zatímco při nižších koncentracích soli je inhibice neúčinná. (Chong et al., 2011)

Přítomnost sacharidů může podporovat růst a dekarboxylázovou aktivitu bakterií. Optimální koncentrace glukózy pro růst a dekarboxylázovou aktivitu bakterií se pohybuje od 0,5 % do 2 %, zatímco koncentrace nad 3 % zpravidla inhibuje syntézu dekarboxyláz. (Silla-Santos, 1996)

Ačkoli studie prokázaly inhibiční účinky potravinářských přídatných látek a konzervační látky na akumulaci biogenních aminů, někteří autoři zdůraznili jejich potenciální negativní účinky. Stručně řečeno, potravinářské přísady a konzervační látky, které dobře fungují, vyžadují další zkoumání účinnosti zpoždění produkce biogenních aminů. Potravinářské přídatné látky, které prokázaly a pozitivní účinek na zpoždění tvorby biogenních aminů musí být testováno v různých potravinářských systémech. (Naila et al., 2010)

### **3.1.6 Balení a dostupnost kyslíku**

Balení potravin do modifikované atmosféry zahrnuje změnu složení plynu a využití speciálních obalů. Využívají se směsi plynů kyslíku, dusíku, oxidu uhličitého k zajištění maximální možných bakteriostatických a fungistatických vlastností. Nejčastěji se využívá poměr 60 % oxidu uhličitého, 40 % dusíku. Byly prokázány vyšší inhibiční účinky při balení v modifikované atmosféře v porovnání s pouhým vakuovým balením. (Naila et al., 2010)

## **3.2 Využití mikroorganismů se schopností degradovat biogenní aminy**

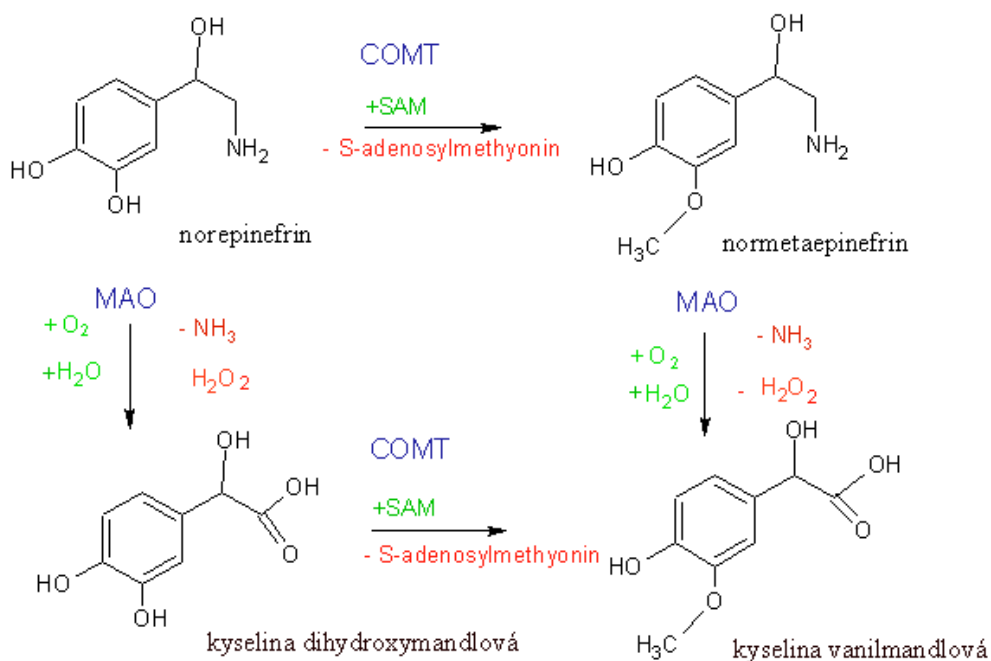
V poslední době se využívají mikroorganismy s aminooxidázovou aktivitou. Jedná se o amin negativní kmeny, které postrádají dekarboxylázovou aktivitu a mají schopnost degradovat aminy a jejich prekurzory. Tyto mikroorganismy mají často schopnost produkovat aminooxidázy, které jsou zodpovědné za degradaci biogenních aminů. Tyto enzymy metabolizují biogenní aminy deaminací. V závislosti na počtu aminokyselin se dělí na mono- (MAO-A, MAO-B) a diaminooxidázy (DAO). Tyto enzymy jsou také přítomny na střevní sliznici. Za normálních podmínek je přijímaný biogenní amin z potravin rychle detoxikován aminooxidázami střevní sliznice. Histamin a katecholaminy mohou být také metabolizovány pomocí methyltransferáz (COMT) nebo acetyltransferáz (NAT; obrázek 4). Činnost může být ovlivněna úrovní metabolismu jedince, funkcí jater,



přijatých koncentrací aminů. Degradaci také negativně ovlivňují antidepresiva nebo acetaldehyd, který vzniká v metabolismu alkoholů. (Naila et al., 2014; Gardini et al., 2016)

Mikroorganismy s aminoroxidázovou aktivitou velmi často využíváme jako startérové kultury, mnoho z nich se řadí k bakteriím mléčného kvašení. Některé tyto kmeny mají také probiotickou a bakteriocidní aktivitu. Mezi bakterie mléčného kvašení řadíme šest čeledí *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae* obsahují rody *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Lactococcus* a *Streptococcus* (Holzapfel, 2014) Mezi nejčastěji používané protektivní kmeny bakterií mléčného kvašení patří nisin produkční kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, kmeny pediokoků produkující pediociny a laktobacily s antibakteriální a antifungální aktivitou *Lactobacillus rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. casei*. (Horáčková et al., 2018; Hopzapfel et al., 2014; Naila et al., 2010))

Samozřejmě jako startérové kultury jsou využívány i další mikroorganismy a to hlavně rody *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Brevibacterium* a *Micrococcus*. (Naila et al., 2010)



Obrázek 4 Degradace norepinefrinu (Upraveno podle: Oades, 2007)

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## CÍL PRÁCE

Cíle teoretické části byly stanoveny následně:

- charakteristika a význam druhu *Lactobacillus casei*,
- biogenní aminy jejich charakteristika, tvorba, výskyt v prostředí,
- možnosti snížení obsahu biogenních aminů v prostředí.

Cíle praktické části byly následující:

- kultivace *Lactobacillus casei* v závislosti na různých faktorech prostředí,
  - kultivační teplota,
  - pH kultivačního média,
- HPLC stanovení obsahu biogenních aminů v bujónu po kultivaci *Lactobacillus casei*,
- vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce.

## **4 KULTIVACE LACTOBACILLUS CASEI V ZÁVISLOSTI NA RŮZNÝCH FAKTORECH PROSTŘEDÍ**

### **4.1 Použité mikroorganismy**

V diplomové práci byla sledována degradační aktivita kmenu *Lactobacillus casei* CCDM 198, který byl získán ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů Laktoflora v závislosti na různých faktorech prostředí.

### **4.2 Přístroje a pomůcky**

- Laboratorní váhy Adventurere Pro
- pH metr
- Sterilizátor H+P Varioklav 135S
- Mikrobiologický inkubátor (Mettler)
- Termoblok Benchmark Digital HEAT BLOCK
- Laboratorní třepačka LT2, KAVALIERGLASS, a. s., Sázava
- HPLC Agilent Technologies (sestava se skládá z binární pumpy a autosampleru LabAlliance),
- DAD detektor Agilent Technologies 1260 Infinity a degaser
- Kolona Zorbax Exlipse Plus C18 RRHD
- Automatické mikropipety
- Laboratorní sklo a plasty

### 4.3 Kultivační media

*Médium MRS (De Man, Rogosa and Sharpe agar, HiMedia)*

Složení na 1000 ml destilované vody: Hydrolyzát kaseinu 2,5 g

Pepton .....2,5 g

Sójový pepton .....5 g

Kvasničný extrakt .....2,5 g

Masový extrakt .....5 g

Kyselina askorbová .....0,5 g

Síran hořečnatý .....0,25 g

Laktóza .....5 g

Glycerylfosfát sodný .....19 g

MRS bujón byl připravený navážením 22,06 g půdy MRS broth (HiMedia) v 360 ml destilované vody.

#### **Roztok biogenních aminů 20x koncentrovaný**

Roztok biogenních aminů byl připraven navážením příslušného množství biogenních aminů (všechny Sigma-Aldrich) a jejich rozpuštěním v 400 ml destilované vody, pH roztoku bylo upraveno pomocí HCl (Sigma-Aldrich) na 6,8.

Tyramin ..... 2 g

Putrescin ..... 2 g

Kadaverin ..... 2 g

Histamin ..... 2 g

Fenylethylamin ..... 2 g

Tryptamin ..... 2 g

Degradace byla pozorována v mediu MRS s biogenními aminy a cysteinem, upraveném na různé pH a koncentrace dle Tabulky 1.

*Tabulka 1: Popis jednotlivých sad s kombinacemi zkoumaných faktorů*

<b>Sada č.</b>	<b>pH</b>	<b>Přídavek MRS media</b>	<b>Roztok biogenních aminů</b>	<b>Cystein</b>
<b>1</b>	<b>7</b>	<b>MRS</b>	<b>0,2</b>	<b>přít.</b>
<b>2</b>	<b>6,2</b>	<b>MRS</b>	<b>0,2</b>	<b>přít.</b>
<b>3</b>	<b>5,4</b>	<b>MRS</b>	<b>0,2</b>	<b>přít.</b>

\* přít. – médium obsahuje cystein, x- médium neobsahuje cystein

#### **4.4 Příprava bakterií a kultivace**

Testovaný kmen byl pomocí sterilní kličky asepticky převeden z tuhé půdy do zkumavek s připravenými sterilními bujóny a kultivován přes noc anaerobně při teplotě 37 °C. Z takto připravených suspenzí bylo sterilně odpipetováno 50 µl kultury naředěné dle stupnice McFarlanda na hodnotu 0,5 a přidáno 50 µl cysteinu do jednotlivých zkumavek z připravených sad. Každá sada obsahovala celkem 25 vzorků, které byly kultivovány paralelně ve 3 opakováních, celkem obsahovala 3x25 zkumavek. Kontrolními vzorky bylo médium s přidanými biogenními aminy bez zaočkované kultury. Jednotlivé vzorky byly kultivovány dle Tabulky 2.

*Tabulka 2 Parametry kultivace jednotlivých vzorků*

<b>1</b>	30°C kontrola
<b>2</b>	30°C 8 h
<b>3</b>	30°C 12 h
<b>4</b>	30°C 24 h
<b>5</b>	30°C 28 h
<b>6</b>	30°C 32 h
<b>7</b>	30°C 36h
<b>8</b>	30°C 48 h
<b>9</b>	30°C 72 h
<b>10</b>	23°C 12 h
<b>11</b>	23°C 24h
<b>12</b>	23°C 30h
<b>13</b>	23°C 36 h
<b>14</b>	23°C 48 h
<b>15</b>	23°C 72 h
<b>16</b>	23°C 96 h
<b>17</b>	11°C 48hod
<b>18</b>	11°C 4 dny
<b>19</b>	11°C 6 dnů
<b>20</b>	11°C 8 dnů
<b>21</b>	11°C 10 dnů
<b>22</b>	11°C 12 dnů
<b>23</b>	11°C 14 dnů
<b>24</b>	23 °C kontrola
<b>25</b>	11°C kontrola

## **5 HPLC STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ V BUJÓNU PO KULTIVACI LACTOBACILLUS CASEI**

### **5.1 Příprava a odběr vzorků pro analýzu**

Kmeny byly pomnoženy a sběry byly provedeny způsobem uvedeným v kapitole 4.4. Vzorky byly centrifugovány (4600 otáček, 7 minut) a z každé zkumavky bylo odebráno do 2 eppendorfových zkumavek 650  $\mu$ l kyseliny chloristé (Sigma-Aldrich) o koncentraci 1,2 mol/l a 650  $\mu$ l supernatantu. Takto připravené vzorky byly protřepány, zamraženy a připraveny pro derivatizaci.

### **5.2 Derivatizace vzorků**

Do derivatizační nádoby bylo pipetováno 100  $\mu$ l vnitřního standardu 1,7-heptandiaminu (Sigma-Aldrich) o koncentraci 500 mg/l. Následně byl pipetován 1 ml vzorku a 1,5 ml karbonátového pufru (pH 11,1-11,2) a 2 ml čerstvě připraveného dansylchloridu (Sigma-Aldrich) rozpuštěného v acetonu (Merck) o koncentraci 5 g/l.

Zavičkované derivatizační nádoby byly třepány 20 hodin v temnu.

Druhý den bylo ke vzorkům přidáno 200  $\mu$ l prolinu (Sigma-Aldrich) a vzorky byly třepány další hodinu. Následně byly ke vzorku přidány 3 ml heptanu (Sigma-Aldrich) a po pečlivém uzavření se vzorky třepaly ručně 3 minuty. Poté byl odpipetován 1 ml heptanové vrstvy do vialek. Obsah vialek byl odpařen do sucha pod proudem dusíku při teplotě 65 °C. Následně bylo přidáno 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich). Vialky byly zamrazeny na teplotu -18 °C do doby analýzy.

### **5.3 Chromatografické stanovení**

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



## 6 VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A FORMULACE ZÁVĚRŮ PRÁCE

Schopnost redukovat biogenní aminy kmenem *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198 byla pozorována během různých růstových podmínek. Byly pozorovány úbytky fenylethylaminu, kadaverinu, putrescinu, histaminu, tyraminu. Mezi pozorované růstové faktory patřily teplota (11 °C, 23 °C, 30 °C), pH kultivačního média (5,4; 6,2; 7,0) a čas (jednotlivé odběrové časy jsou uvedeny v tabulce 2, v kapitole 4.4). Byly vybrány konkrétně tyto biogenní aminy za těchto podmínek:

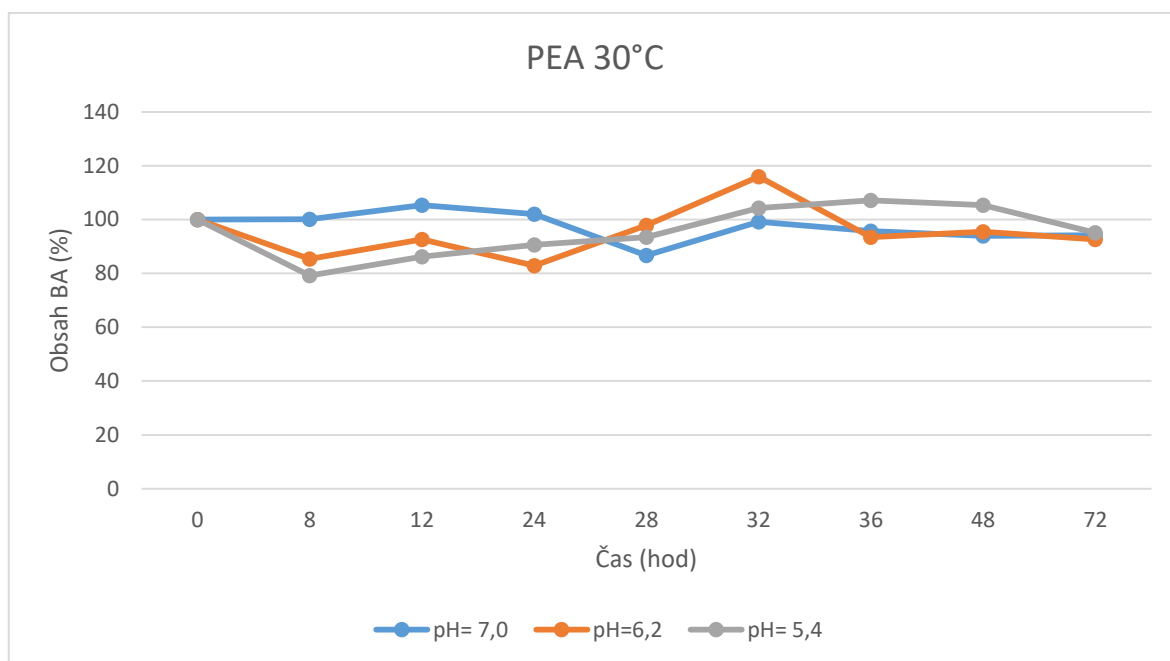
- Degradace fenylethylaminu při 30 °C a různém pH
- Degradace putrescinu při 30 °C a různém pH
- Degradace kadaverinu při 30 °C a různém pH
- Degradace histaminu při 30 °C a různém pH
- Degradace tyraminu při 30 °C a různém pH
- Degradace fenylethylaminu při 23 °C a různém pH
- Degradace putrescinu při 23 °C a různém pH
- Degradace kadaverinu při 23 °C a různém pH
- Degradace histaminu při 23 °C a různém pH
- Degradace tyraminu při 23 °C a různém pH
- Degradace fenylethylaminu při 11 °C a různém pH
- Degradace putrescinu při 11 °C a různém pH
- Degradace kadaverinu při 11 °C a různém pH
- Degradace histaminu při 11 °C a různém pH
- Degradace tyraminu při 11 °C a různém pH

## 6.1 Degradace biogenních aminů při teplotě 30 °C

Z daných hodnot na obrázcích uvedených níže lze předpokládat, že námi sledovanému kmenu nejvíce vyhovuje kultivace při nízkém pH. Vyšší koncentrace můžeme vysvětlit netolerancí kmene ke kombinaci faktorů, jež nemusely být pro něj výhodné.

### 6.1.1 Degradace fenylethylaminu při 30 °C v médiu o různém pH

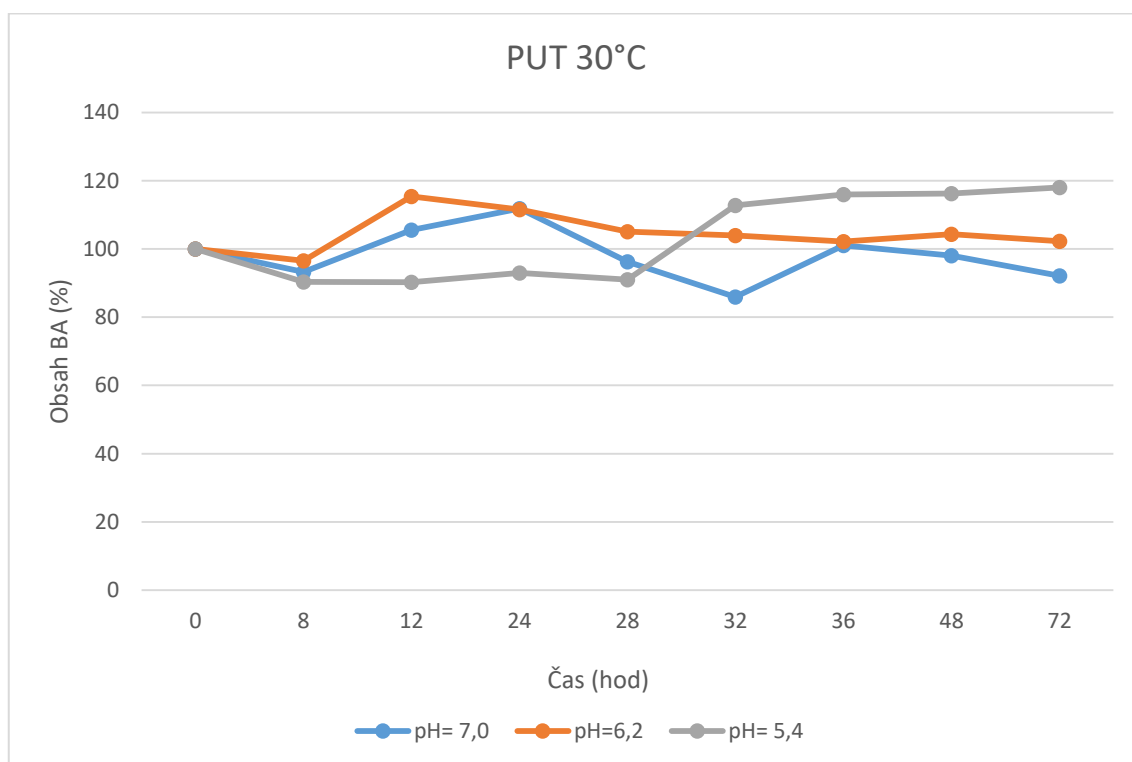
Obrázek 5 znázorňuje schopnost testovaného kmene degradovat fenylethylamin při 30 °C a daných hodnotách pH. Nejvyšší schopnost redukce byla zaznamenána v médiu o pH 6,2, kdy došlo k úbytku putrescinu o více než jednu pětinu a koncentrace se na této hodnotě držela během prvních 24 hodin kultivace. V dalších odběrových časech koncentrace nicméně mírně vzrostly, ale tyto hodnoty jsou nepatrné. Vzhledem k ostatním hodnotám pH, lze tedy říci, že hodnota pH 6,2 měla na degradaci fenylethylaminu daným kmenem nejvyšší vliv. V médiu o pH 7,0 nedošlo k rapidnímu změně koncentrace fenylethylaminu během kultivace. Množství fenylethylaminu při kultivaci v médiu o pH 5,4 nejprve rychle kleslo, na hodnotu nižší o 20 % vůči kontrole, ale následně vzrostlo a pohybovalo se v přibližně stejném rozmezí.



Obrázek 5 Degradace fenylethylaminu při 30 °C v médiu o různém pH

### 6.1.2 Degradace putrescinu při 30 °C a různém pH

Na Obrázku 6 je znázorněna degradace putrescinu o koncentraci 0,2 g/l při 30 °C v médiu o různém pH. Jak můžeme vidět, k nejvyšším úbytkům docházelo při nejnižším sledovaném pH. Za 24 hodin byla koncentrace putrescinu vzhledem k původní hodnotě nižší přibližně o 10 %. V dalších odběrových časech, ale koncentrace putrescinu vzrostla. V médiu o pH 6,2 v dalších odběrových časech byla naměřena přibližně stejná množství, stejně tak v médiu o pH 7,0 kde koncentrace mírně kolísaly, nicméně pro námi sledovanou problematiku nejsou hodnoty významné, a proto se jimi dále nebudeme zabývat.

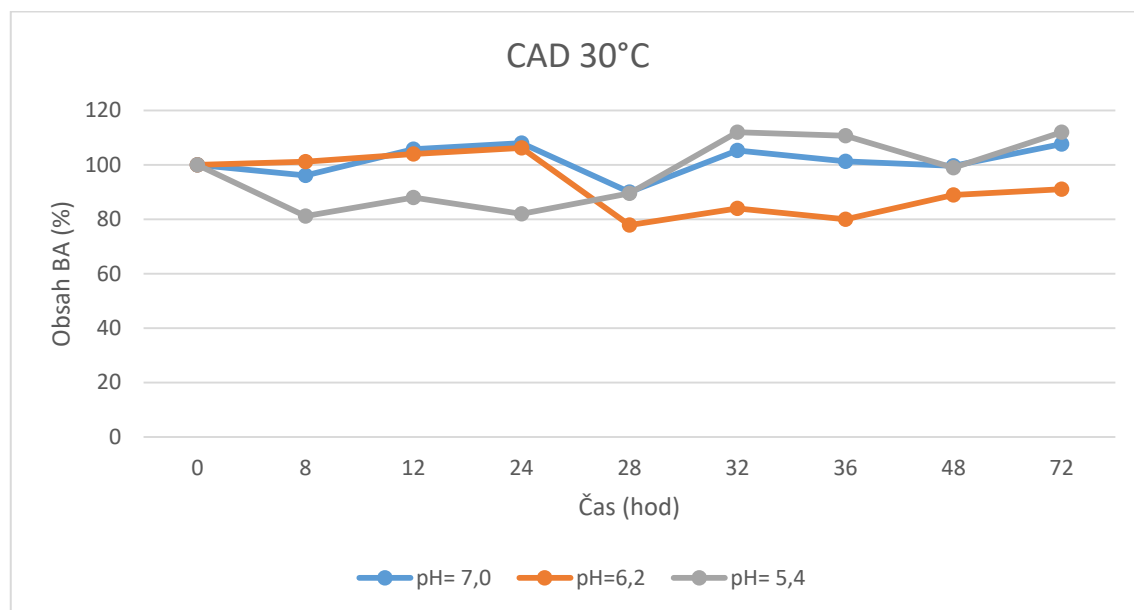


Obrázek 6 Degradace putrescinu při 30 °C a různém pH

### 6.1.3 Degradace kadaverinu při 30 °C a různém pH

Podobně jako u předchozích sledovaných aminů probíhala během kultivace degradace kadaverinu. Na Obrázku 7 je patrné, že k nejvyššímu poklesu docházelo znovu prvních 24 hodin kultivace při pH 5,4, kdy koncentrace klesly o 20 % k původní hodnotě a udržovaly se na přibližně stejné hodnotě. Po 28. hodině došlo znovu k nárůstu koncentrace, pravděpodobně způsobenému spotřebováním některých živin v mediu a následnými nevhodnými podmínkami pro degradaci. Nejvyšší degradace byla zaznamenána v médiu

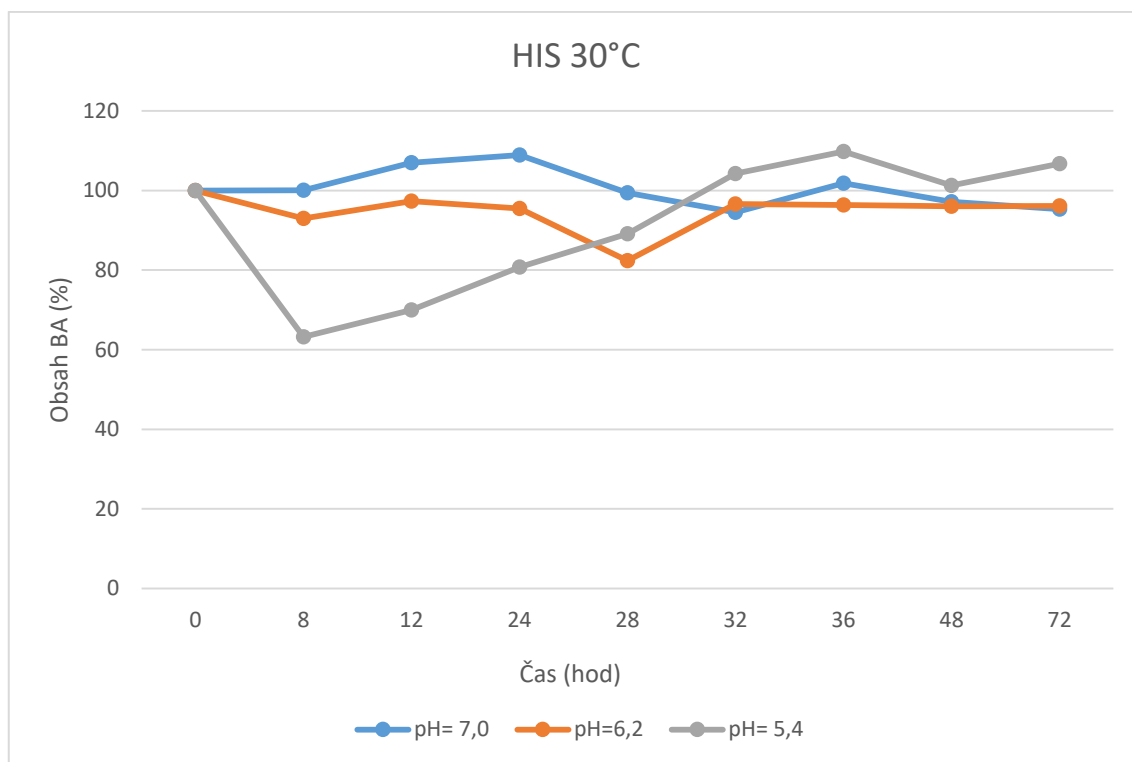
o pH 6,2, podobně jako v předchozím případě u fenylethylaminu. Koncentrace byla udržována na stejné hodnotě jako kontrola až do 24. hodiny, kdy došlo k poklesu o 20 %. Úbytek se udržoval i v následujících odběrových časech a nakonec došlo k nárůstu koncentrace, která ale měla pouze pozvolný průběh. Kmen tedy významně redukoval obsah kadaverinu při tomto pH a teplotě 30 °C po určité době.



Obrázek 7 Degradace kadaverinu při 30 °C a různém pH

#### 6.1.4 Degradace histaminu při 30 °C a různém pH

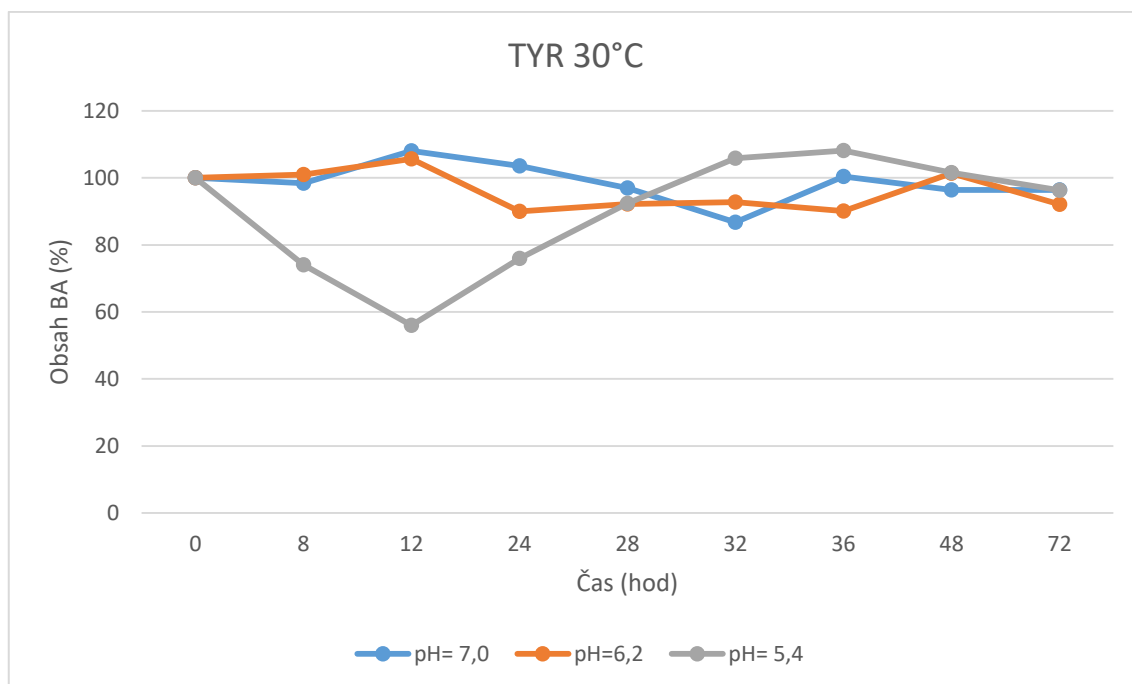
Degradace histaminu (Obrázek 8) probíhala podobně jako u ostatních biogenních aminů za stejných růstových podmínek. V médiu o pH 7,0 nedocházelo k velkým změnám v množství histaminu. Křivka pro hodnoty pH 6,2 měla podobný průběh, byla zaznamenána pouze jedna výchylnka ve 28. hodině, ale vzhledem k tomu, že hodnoty koncentrace se znovu vrátily do původních koncentrací, není pro nás významná. Nejvýraznější úbytek byl při těchto testovaných podmínkách zjištěn v médiu s nejnižším pH, tedy 5,4. Hned po 8 hodinách byl histamin redukován přibližně o 40 % a tato hodnota koncentrace dále mírně stoupala, až po 28 hodinách byla téměř stejná jako původní koncentrace a dále vzrůstala.



Obrázek 8 Degradace histaminu při 30 °C a různém pH

### 6.1.5 Degradace tyraminu při 30 °C a různém pH

Degradace tyraminu (Obrázek 9) byla podobná jako v předchozím případě u histaminu. V médiu o pH 5,4 došlo na začátku k značné redukci. V prvních 8 hodinách byl tyramin redukován asi o jednu třetinu a degradace dále pokračovala až do 12. hodiny, kdy naměřená koncentrace byla 60 % vůči původní hodnotě. Nicméně znovu zde pravděpodobně došlo k změně podmínek v médiu, protože koncentrace dále začala stoupat až na hodnoty 110 % vůči počátečním. Podobný průběh jako u předchozích sledovaných aminů byl zaznamenán i v médiu o pH 7,0 a 6,2. V médiu o pH 7,0 byly po 3 dnech naměřeny téměř totožné hodnoty jako na začátku. V médiu o pH 6,2 křivka měla proměnný charakter a naměřené koncentrace byly ve 24. – 36. hodině o 10 % nižší než na začátku, hodnota následně mírně vzrostla.



Obrázek 9 Degradace tyraminu při 30 °C a různém pH

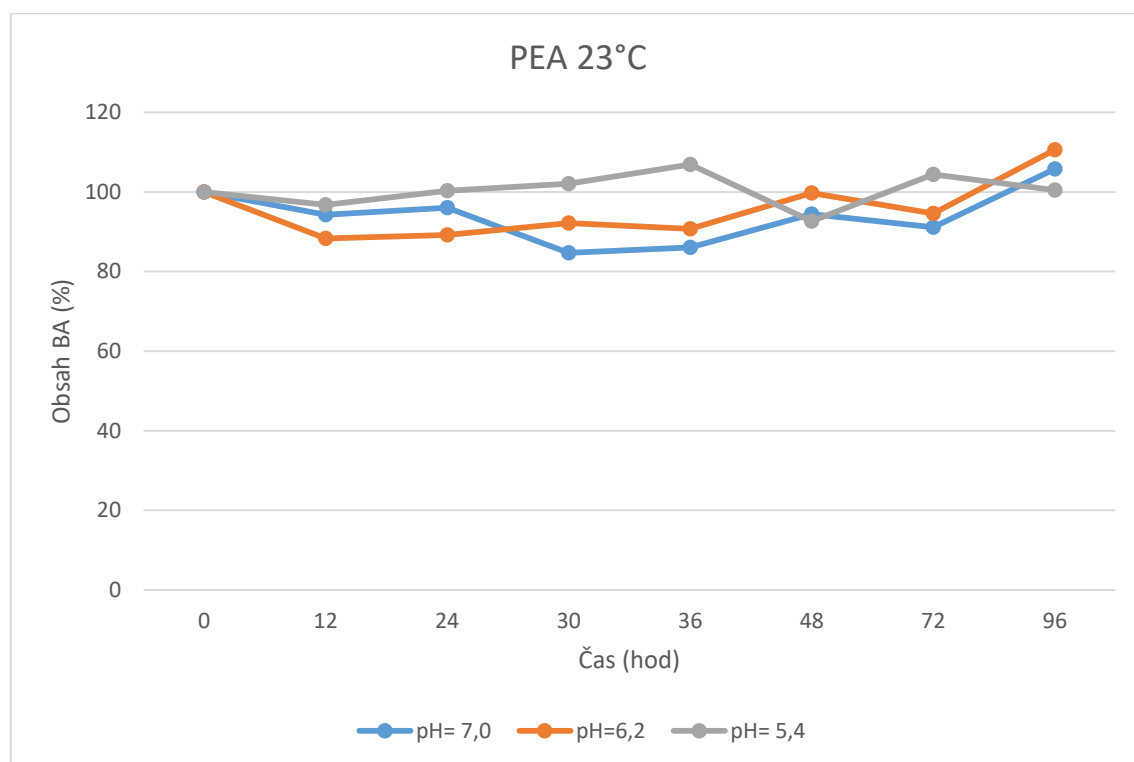
## 6.2 Degradace biogenních aminů při teplotě 23 °C

Během těchto kultivačních podmínek nedošlo k výraznějšímu úbytku sledovaných aminů. Naměřené koncentrace byly velmi podobné koncentracím počátečním, nebo dokonce došlo k jejich růstu. Lze předpokládat, že dané podmínky nejsou vhodné pro kultivaci námi sledovaného kmene *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198.

### 6.2.1 Degradace fenylethylaminu při 23 °C a různém pH

Obrázek 10 znázorňuje schopnost testovaného kmene degradovat fenylethylamin při 23 °C v kultivačním médiu o daných hodnotách pH. Nejvyšší schopnost redukce byla zaznamenána v médiu o pH 5,4, kdy došlo k úbytku fenylethylaminu, a to po 48 hodinách kultivace. V dalších dvou odběrových časech koncentrace mírně vzrostly, ale tyto hodnoty jsou poměrně nepatrné a koncentrace se příliš nezměnila. V médiu o pH 6,2 se koncentrace příliš nezměnila. Při pH 7,0 hodnoty také mírně klesly po 24. hodině kultivace. Při odběru ve 30. hodině byla naměřena koncentrace nižší skoro o 20 %, nicméně následně došlo k mírnému nárůstu těchto hodnot.

Vzhledem k ostatním hodnotám, kde koncentrace se příliš neměnily, lze tedy říci, že hodnota pH 7 měla v tomto případě na degradaci fenylethylaminu daným kmenem nejvyšší vliv.

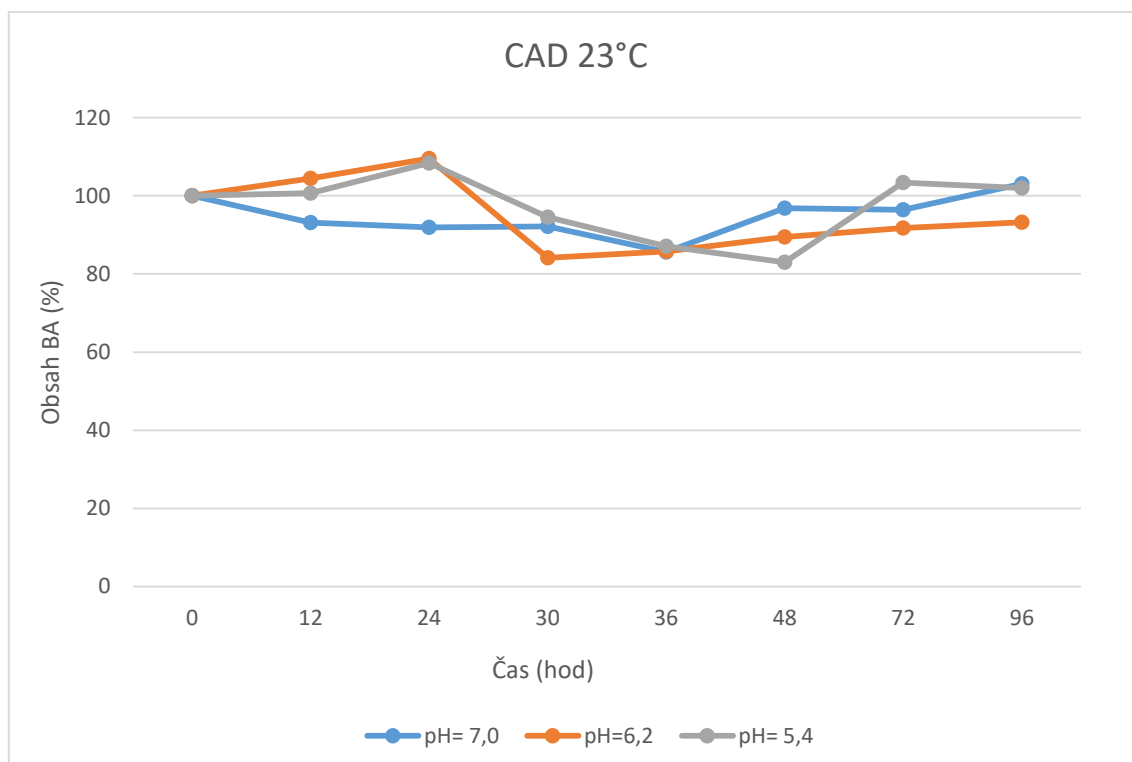


Obrázek 10 Degradace fenylethylaminu při 23 °C a různém pH

### 6.2.2 Degradace kadaverinu při 23 °C a různém pH

Podobně jako u fenylethylaminu probíhala degradace i u kadaverinu. Jak můžeme vidět na Obrázku 11, koncentrace většinou rostly, ale v médiu o pH 7,0 docházelo k mírným úbytkům. Za 24 hodin byla koncentrace kadaverinu o něco nižší vzhledem k původní hodnotě. I v dalších odběrových časech byla naměřena znovu nižší koncentrace až do 48. hodiny, kde znovu mírně vzrostla. Koncentrace kadaverinu při ostatních pH prudce stoupla v prvních 12 hodinách a jeho produkce dále mírně pokračovala až do 30 - 36. hodiny, kdy koncentrace klesla a nakonec se ustálila.

Můžeme říci, že dané podmínky nevyhovují pro degradační kmen a degradace v tomto případě nebyla vysoká nebo k ní vůbec nedocházelo.

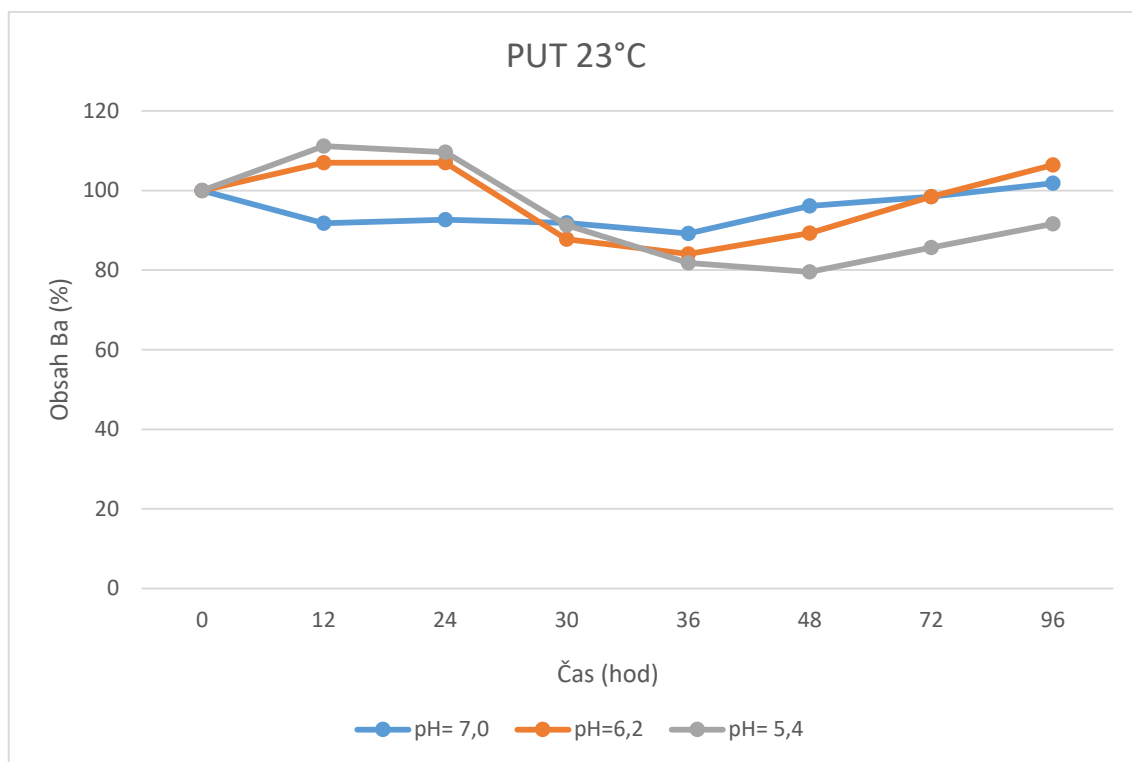


Obrázek 11 Degradace kadaverinu při 23 °C a různém pH

### 6.2.3 Degradace putrescinu při 23 °C a třikrát různém pH

Na obrázku 12 je znázorněna degradace putrescinu, která probíhala podobně jako u předchozích sledovaných aminů. Degradace se skoro vůbec neprojevila, jen při pH 7,0 byly zaznamenány nižší hodnoty po 12 hodinách kultivace, poté koncentrace mírně vzrostla. Při pH 6,2 po 12 hodinách hodnoty vzrostly o 110 % a poté hodnoty mírně klesaly, v 36. hodině byla zaznamenána koncentrace nižší o 15 % vůči kontrole, nicméně koncentrace začaly znovu mírně stoupat, konečná hodnota koncentrace byla srovnatelná s počáteční. Při pH 5,4 docházelo také k produkci putrescinu. V tomto případě hodnoty vzrostly o 15 % původní hodnoty v prvních 24 hodinách, následně koncentrace mírně klesla až o 20 %, konečná hodnota byla nižší o 10% vztažená ke kontrole.



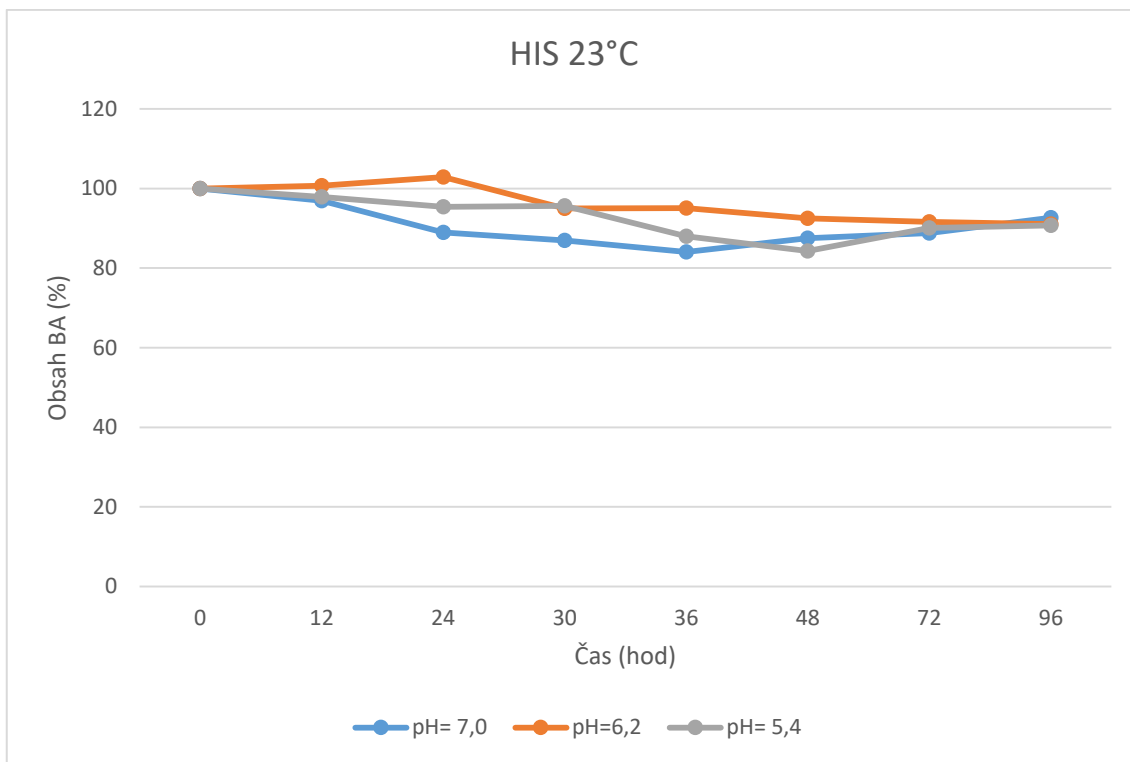


Obrázek 12 Degradace putrescinu při 23 °C a různém pH

#### 6.2.4 Degradace histaminu při 23 °C a různém pH

Z Obrázku 13 je patrné, že stejně jako u předchozích sledovaných aminů nedocházelo k výrazné degradaci. Konečné hodnoty koncentrací byly o méně než 10 % nižší vůči kontrole.

Nejvyšší degradace byla zaznamenána při pH 7,0, kdy od 12. hodiny docházelo k mírnému úbytku. Nejnižší koncentrace byla zaznamenána v 36. hodině. Koncentrace histaminu byla asi o 10 % nižší než počáteční. Při pH 6,2 znovu nedocházelo k výrazným změnám v koncentraci aminů. V tomto případě je zajímavé, že koncentrace histaminu začaly mírně klesat po 24. hodině kultivace. Jak můžeme vidět, koncentrace při hodnotě pH 5,4 již od začátku mírně klesaly až na výkyv v 36. hodině, ale poté se znovu hodnoty ustálily. Z daných hodnot lze usoudit, že tyto podmínky příliš nevyhovují pro degradaci histaminu.

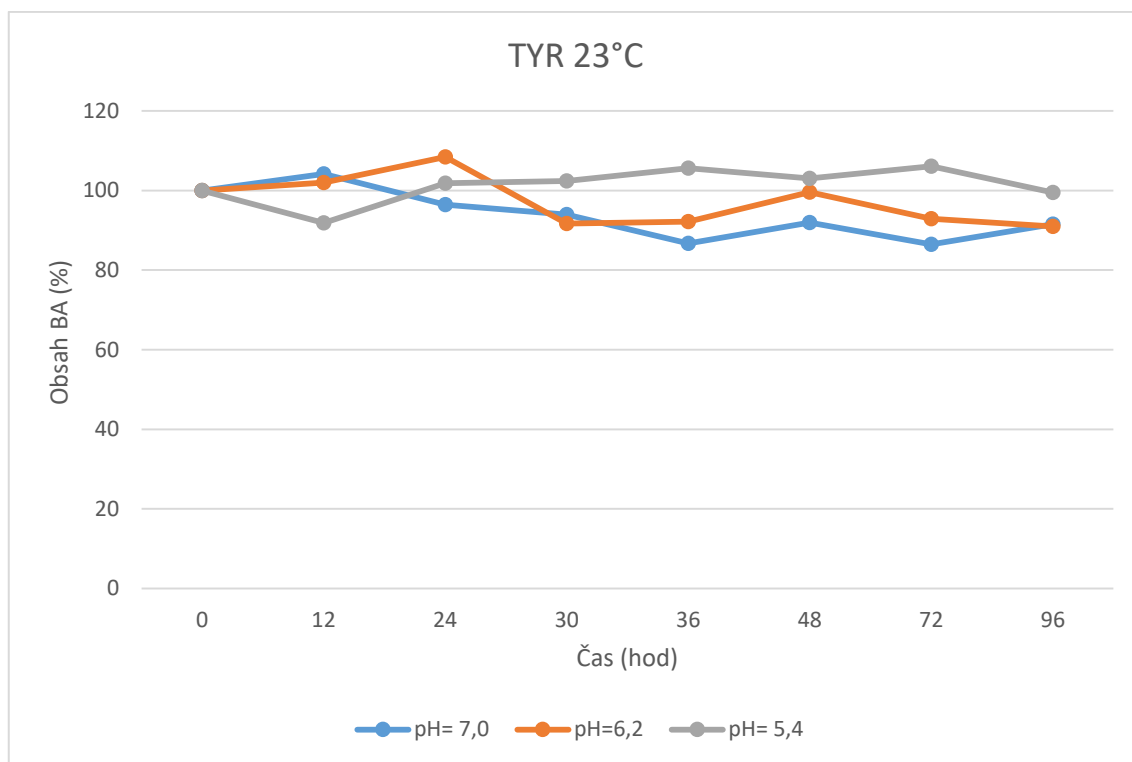


Obrázek 13 Degradace histaminu při 23 °C a různém pH

### 6.2.5 Degradace tyraminu při 23 °C a různém pH

Obrázek 14 znázorňuje schopnost testovaného kmene degradovat tyramin při 23 °C a daných hodnotách pH. Stejně jako u předchozích sledovaných aminů dané podmínky příliš nevyhovují pro degradační schopnosti testovaného kmene. Hodnoty tyraminu buď zůstaly na koncentracích velmi podobných počáteční, nebo nepatrně vzrostly.

Při pH 6,2 nedošlo k výrazným změnám v koncentracích, konečná hodnota po 96 hodinách růstu byla 96% vzhledem k původní koncentraci. Při pH 5,4 se koncentrace aminů výrazně neměnila. Při pH 7,0 v prvních 24 hodinách došlo k poklesu koncentrace tyraminu asi o 5 %, nicméně tato hodnota není příliš významná.



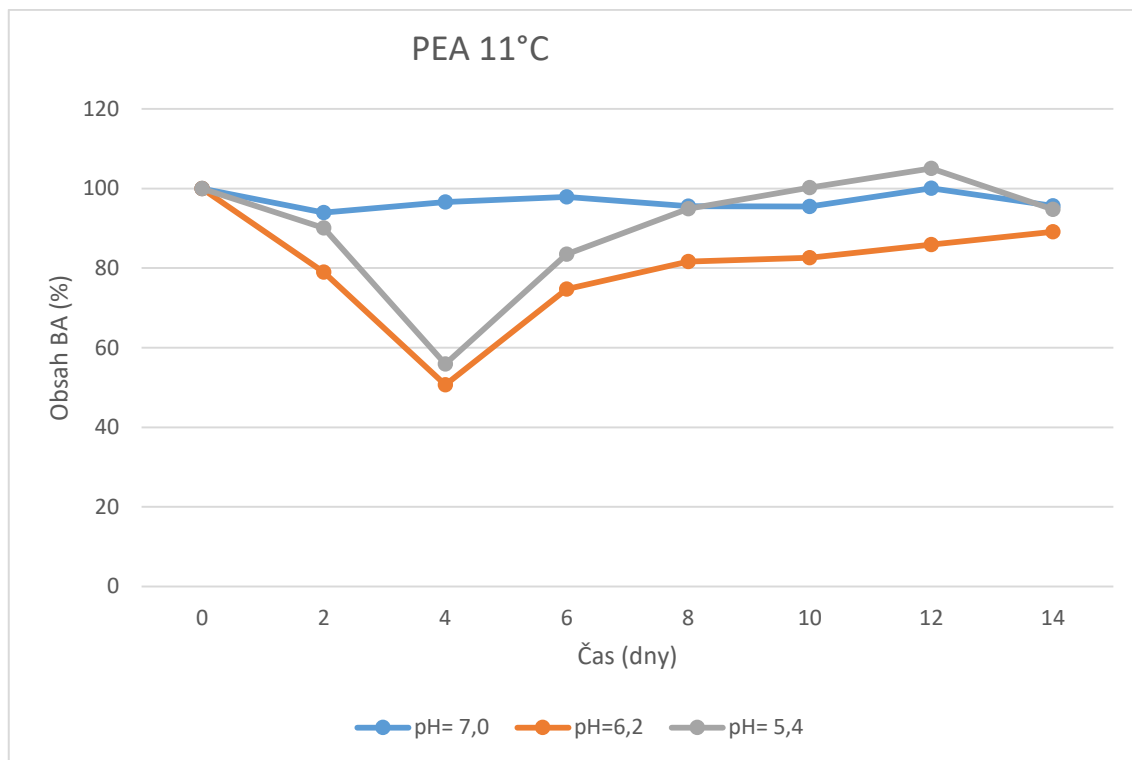
Obrázek 14 Degradace tyraminu při 23 °C a různém pH

### 6.3 Degradace biogenních aminů při teplotě 11 °C

Při těchto testovaných podmínkách nedocházelo k výraznějším změnám v koncentraci jednotlivých biogenních aminů. K nejméně výrazné degradaci docházelo v prvních 4 dnech, kdy v některých případech došlo k redukci aminů až na polovinu.

#### 6.3.1 Degradace fenylethylaminu při 11 °C a různém pH

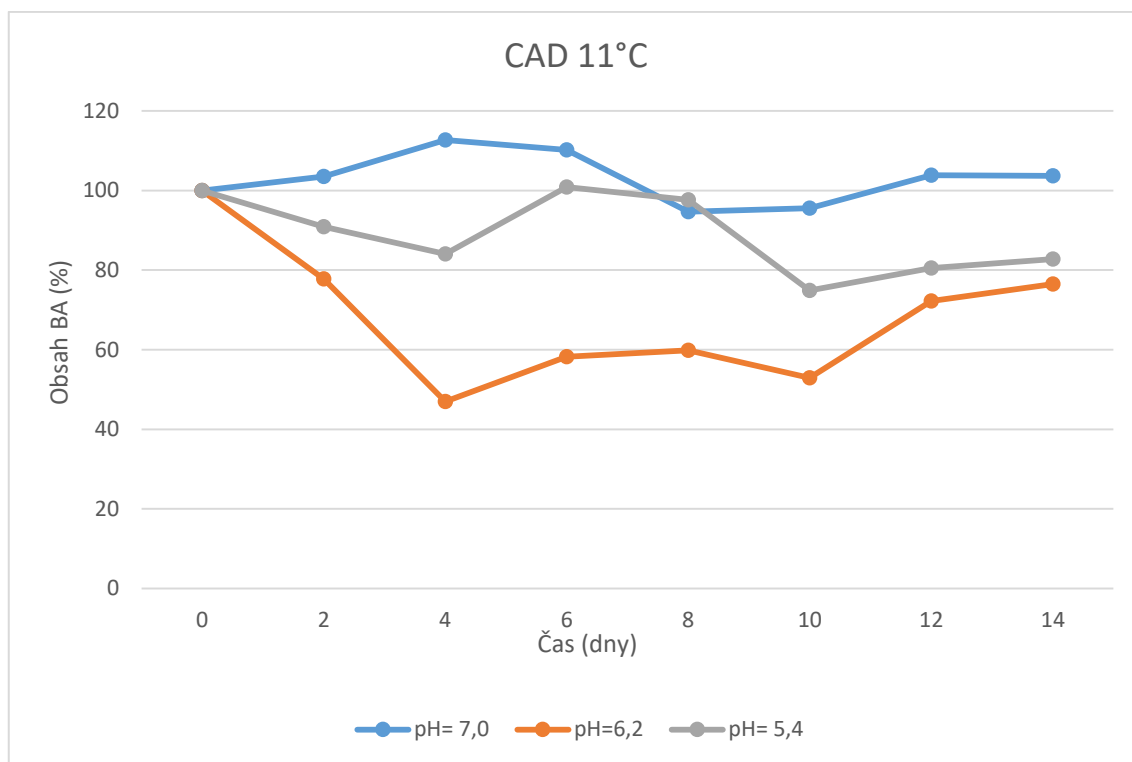
Výraznější redukce fenylethylaminu (Obrázek 15) byla zjištěna v kultivačních médiích o pH 5,4 a 6,2, kdy po 2 dnech kultivace došlo k poklesu jeho koncentrace na 90 % při pH 5,4 a 80 % při pH 6,2. 4. den byla koncentrace fenylethylaminu ještě nižší, při obou pH byla koncentrace snížena na polovinu. Další 4 dny degradace stagnovala a množství fenylethylaminu začalo vzrůstat. Konečné hodnoty byly o něco nižší než počáteční koncentrace, asi o 5%. Při pH 7,0 nebyla zaznamenána žádná výraznější změna.



Obrázek 15 Degradace fenylethylaminu při 11 °C a různém pH

### 6.3.2 Degradace kadaverinu při 11 °C a různém pH

Podobně jako u fenylethylaminu v médiu při pH 7,0 nebyly zaznamenány výrazné změny v množství kadaverinu. Na Obrázku 16 můžeme vidět, že koncentrace kadaverinu výrazně klesla první 4 dny kultivace v médiu o pH 6,2. Druhý den kultivace byla zaznamenána hodnota 77% koncentrace původního média, koncentrace se dále snižovala, až dosáhla nejnižší naměřené hodnoty, 47 % a až do 10. dne zůstala neměnná, poté mírně stoupala na konečnou hodnotu 76% po 14 dnech kultivace. Degradace v médiu o pH 5,4 byla také poměrně významná, pokles koncentrace byl ale mírnější. V prvním sběru, 2. den kultivace, byla naměřena koncentrace 90 %, 4. den ještě klesla o 6 %. 10. den byla naměřena nejnižší koncentrace, 75 %. Konečná hodnota koncentrace byla také nižší o 20 % vůči původní hodnotě.

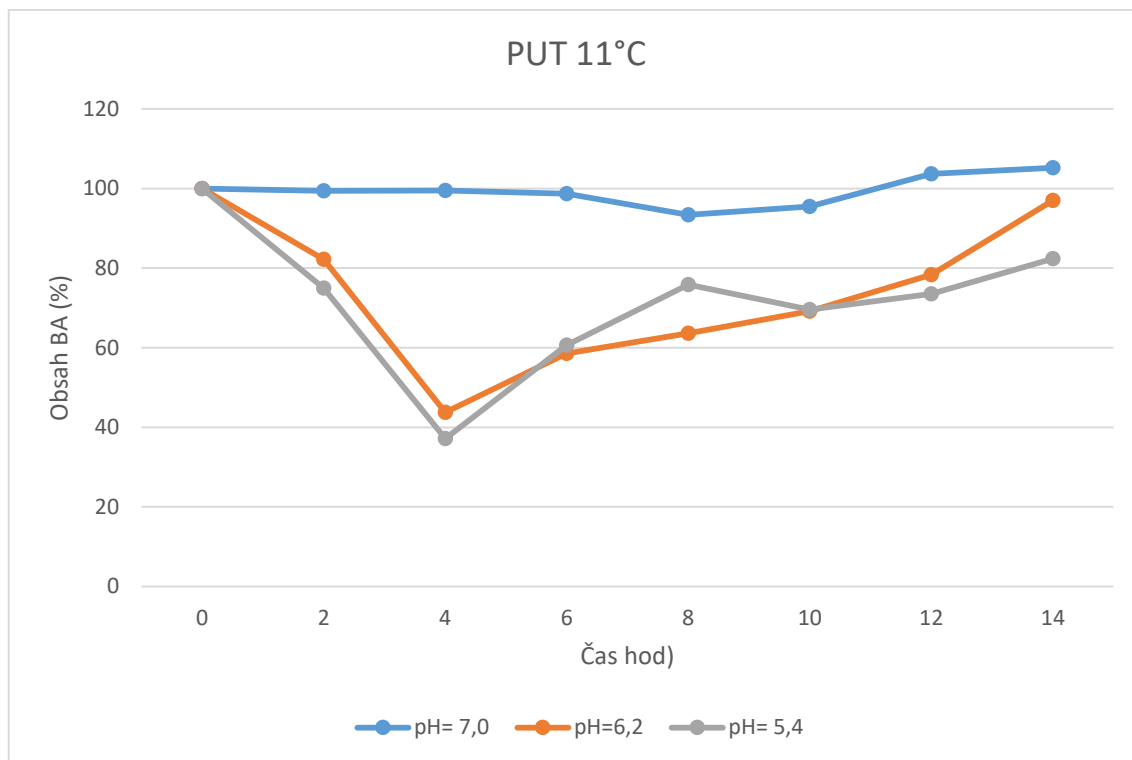


Obrázek 16 Degradace kadaverinu při 11 °C a různém pH

### 6.3.3 Degradace putrescinu při 11 °C a různém pH

Podobně jako u fenylethylaminu a kadaverinu nebyly zaznamenány výraznější změny koncentrace putrescinu v médiu o pH 7,0.

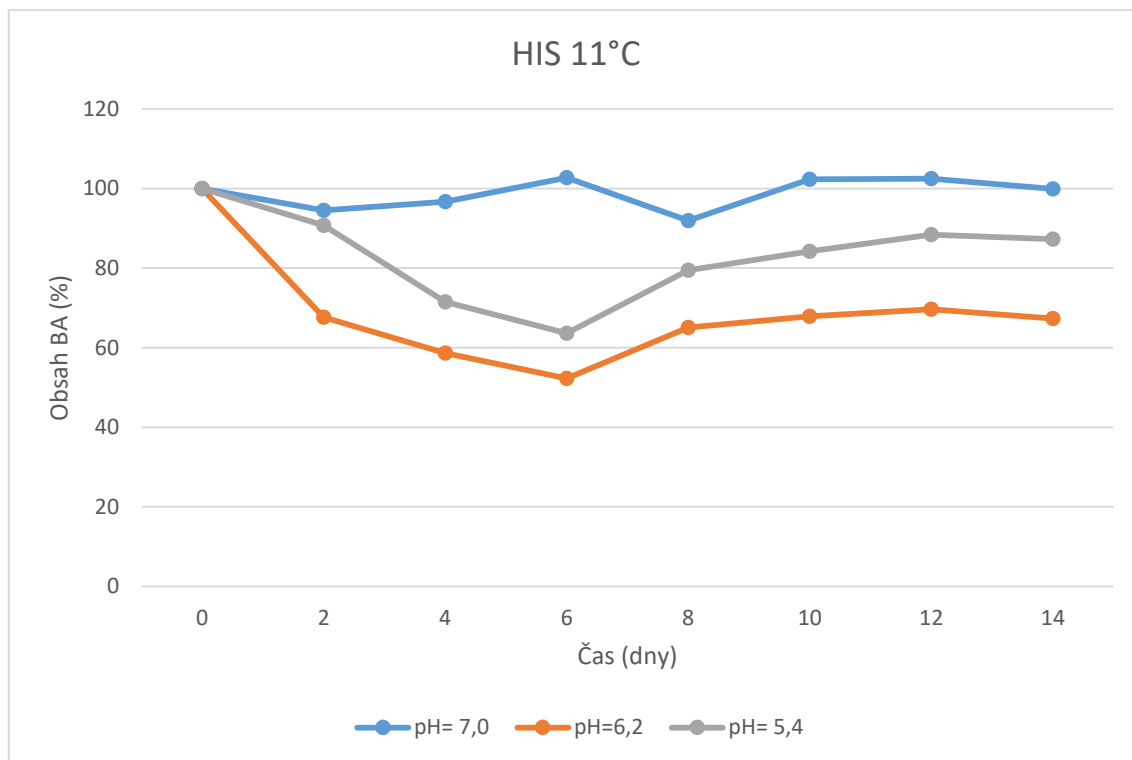
Koncentrace putrescinu (Obrázek 17) výrazně klesla během prvních 4 dnů kultivace v médiích o pH 5,4 a 6,2. V médiu o pH 5,4 bylo hned po 2 dnech dosaženo výrazného poklesu množství putrescinu, o 20 %. Následovalo další snížení až o 40 %. V dalších 8 dnech však degradace stagnovala a množství aminů se od 4. dne zvyšovalo. Konečná koncentrace aminů byla 80 % vůči kontrole. Druhý nejvyšší úbytek byl pozorován v médiu s hodnotou pH 6,2, v němž už po 2 dnech došlo k degradaci až o 20 % putrescinu. Po 4 dnech byla koncentrace přibližně na 45 % a to bylo minimální zjištěné množství v tomto médiu. Koncentrace se poté zvyšovala.



Obrázek 17 Degradace putrescinu při 11 °C a různém pH

#### 6.3.4 Degradace histaminu při 11 °C a různém pH

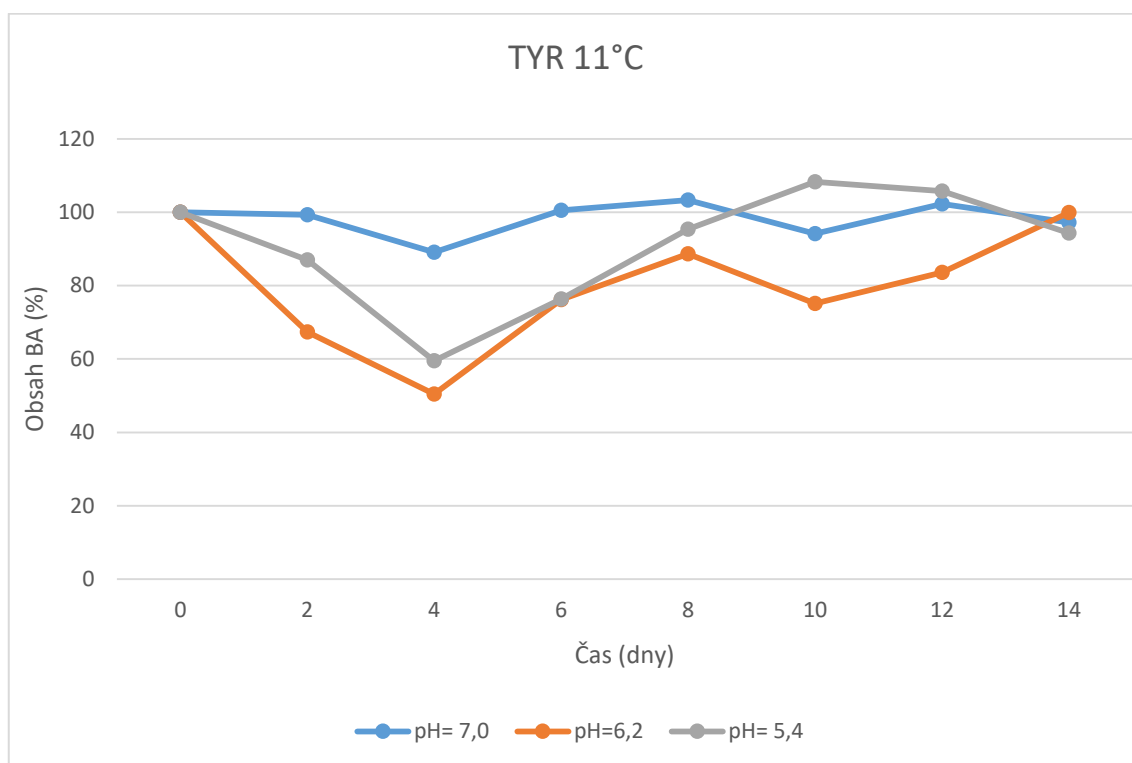
Stejně jako u předchozích tří biogenních aminů, i u histaminu (Obrázek 18) nedošlo v médiu o pH 7,0 prakticky k žádné degradaci. V médiu s nejnižším pH nedošlo po 2 dnech k výraznému úbytku, méně než 10 %. Ale o 2 dny později koncentrace poklesla až na celkových 70 %, což byl úbytek téměř 20% během 2 dnů. Následně bylo po 6 dnech dosaženo hranice 63 %, což byla nejnižší zaznamenaná koncentrace v médiu o pH 5,4. Koncentrace dále mírně stoupaly, až dosáhly 87 % počáteční hodnoty. Podobně jako u předchozích dvou vyhodnocení, nejvýraznější hodnoty degradace vykazovala kultivace v živném médiu o pH 6,2. Zde došlo k poklesu koncentrace po 2 dnech už o 30 % a po 4 dnech byla koncentrace ještě o 8 % nižší. Po 6 dnech pak byla naměřena nejnižší hodnota koncentrace odpovídající 52 % původního množství. Dále se koncentrace mírně zvyšovala a konečná koncentrace po 14 dnech kultivace byla 67 % k původnímu množství.



Obrázek 18 Degradace histaminu při 11 °C a různém pH

### 6.3.5 Degradace tyraminu při 11 °C a různém pH

Podobně jako u předchozích sledovaných aminů, koncentrace tyraminu (Obrázek 19) se v médiu o neutrálním pH příliš neměnila. Nejnižší zaznamenaná koncentrace byla 89 % vůči počáteční hodnotě. V médiu o pH 5,4, byl zaznamenán pokles koncentrace o 15 % v prvních dvou dnech. Při odběru 4. den koncentrace dokonce klesla na 60 % vůči původní hodnotě, další dny se koncentrace zvyšovala. Při pH 6,2 došlo k nejvyšší degradaci tyraminu. V prvních dvou dnech koncentrace klesla o 30 %, dále pokračovala a 4. den kultivace byla zaznamenána nejnižší hodnota, 50 %. Koncentrace se poté další dny pozvolna zvyšovala, až bylo dosaženo počáteční koncentrace.



Obrázek 19 Degradace tyraminu při 11 °C a různém pH



## 7 DISKUZE

Druh *Lactobacillus casei* je jeden z mnoha druhů, které řadíme do rodu *Lactobacillus*. Jedná se o velké grampozitivní tyčinky, které jsou nesporulující, nepohyblivé a nejčastěji se vyskytují jednotlivě. Mohou tvořit dvojice či řetízky. Metabolismus je anaerobní aerotolerantní, některá literatura uvádí, že jsou mikroaerofilní, nicméně nemají cytochromy, proto nejsou schopny metabolizovat kyslík. (F. Minerviny, 2011; Hill et al. 2018)

Laktobacily řadíme k bakteriím mléčného kvašení. Kmeny *Lactobacillus casei* jsou heterofermentativní. Kvašením produkují nejen kyselinu mléčnou, ale i kyselinu octovou, etanol nebo oxid uhličitý. Jsou acidofilní, jejich pH optimum je 5,5. Jsou mezofilní, proto nejlépe rostou při teplotách 25- 40 °C, ale jsou schopny růstu i v teplotách blízcích se bodu mrazu. Jsou kataláza, oxidáza a ureáza negativní.

Fyziologický význam laktobacilů spočívá především v jejich schopnosti zkvašovat glykogen na kyselinu mléčnou a tím snižovat pH na sliznicích. Nízké pH poté brání růstu hnilobným bakteriím a tím také šíření infekce. Velmi často se využívají jako probiotika.

V potravinách lze laktobacily najít v rybách, masu, mléčných výrobcích a silážích. (Herero-Fresno et al., 2012) Velmi často se využívají jako startérové kultury, touto problematikou se zabýval Garcia – Ruiz et al. (2011), kteří zkoumali schopnost kmenů *Lactobacillus casei* a *Pediococcus* izolovaných z vína redukovat histamin, tyramin a putrescin. Redukcí biogenních aminů v sýrech pomocí kmenu *L. casei* se zabýval také Alvarez et al. (2014), Herero-Fresno et al. (2012), prokázali značnou schopnost tohoto kmene redukovat obsah histaminu a tyraminu. Dapkevicius et al. (2000) izolovali kmeny *L. casei* z rybí pasty, které byly schopny degradace histaminu při pH vyšším než 4,5. Využitím kmenů *L. casei* v masné výrobě se zabývali Gardini et al.(2002). Larotte Moratalla et al. (2010) jej kombinovali se *Staphylococcus xylosus*, aby dosáhli optimální synergie pro redukcii tyraminu.

Biogenní aminy jsou organické látky na bázi dusíku. Vznikají dekarboxylací aminokyselin nebo aminací aldehydů a ketonů. Jsou syntetizovány mikroorganismy, rostlinami i živočichy. Význam tkví především v jejich funkci při fyziologických procesech. Jsou prekurzory hormonů, alkaloidů a nukleových kyselin. Fungují jako neurotransmitery. Jsou psychotropní a vazomotorní a jsou důležité pro správnou funkci imunitního systému, buněčný růst, reparaci, stabilizaci buněčných membrán. (Baülisberger, 2015, Herrero- Fresno, A. et al., 2012; Silla-Santos, 1996, s. 213; Halasz et al., 1994)

Protože biogenní aminy vznikají z bílkovin, lze je očekávat prakticky všude. Ve všech rostlinách, živočiších, mikroorganizmech. V potravinách je lze očekávat například v rybách,

masu, masných výrobcích, sýru, ovoci a zelenině, pivu, víně. Jejich celkové množství však závisí na povaze potravin a dostupných mikroorganizmech. (Stadnik a Dolanowski, 2010; Vidal-Carou et al., 2010)

Biogenní aminy jsou v nízkých koncentracích nepostradatelné, ale v určitých případech mohou představovat i značné zdravotní riziko. Mezi potenciálně nejtoxičtější biogenní aminy řadíme histamin a dále tyramin. Problémem je, že některé mikroorganismy produkují značné koncentrace biogenních aminů, proto je důležité zvolit správný výběr startérových kultur. Symptomy předávkování jsou různé. Od bolestí hlavy, kolísání tlaku přes zvracení až k anafylaktickému šoku. (EFSA, 2014, Callejón, 2014, Baülisberger, 2015; Stadler a Linenback, 2009; Silla-Santos, 1996)

Pro snížení obsahu biogenních aminů byly navrženy různé strategie. Odstranění biogenních aminů již vzniklých je velmi obtížné, proto se za nejvhodnější postup považuje dodržování technologických postupů a hygienických podmínek, které brání jejich vzniku. Za nejdůležitější opatření pro zábranu tvorby aminů je považováno používání vhodné teploty a doby skladování. Snížení akumulace BA lze ale také dosáhnout i jinými způsoby. (Naila et al., 2010)

Pro snížení obsahu již přítomných biogenních aminů lze také využít enzymů mikroorganismů s aminooxidázovou aktivitou, které metabolizují biogenní aminy deaminací. Často se využívají bakterie mléčného kvašení s inhibičními účinky na dekarboxyláza-pozitivní mikroorganismy. Velmi často se kombinují s aplikací antimikrobních látek, které působí na dekarboxyláza-pozitivní mikroorganismy např. soli dusitanů a dusičnanů, kyselina citrónová, koření a použitím technologických zákroků např. hydrostatický tlak, ozařování, balení. (Naila et al., 2010)

Mnoho studií se zabývá se řízením a kontrolou výskytu biogenních aminů. Několik se jich zabývá také mikroorganismy, které jsou schopny inhibovat dekarboxyláza-pozitivní kmeny, pomocí enzymů nebo degradačních schopností. Mezi studované mikroorganismy řadíme především bakterie mléčného kvašení, které se používají například jako startérové kultury nebo jako probiotika. (Horáčková et al., 2018; Holzapfel et al., 2014; Naila et al., 2010)

V experimentu byla ověřována schopnost degradovat biogenní aminy kmenem *Lbc. casei* subsp. *casei* CCDM 198 metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Byly pozorovány úbytky fenylethylaminu, kadaverinu, putrescinu, histaminu, tyraminu. Mezi pozorované růstové faktory patřila kultivační teplota (11°C, 23°C, 30°C), pH (5,4; 6,2; 7,0) a doba kultivace. Daný úbytek byl porovnáván s kontrolou, což bylo živné médium

s biogenními aminy bez zaočkovaného kmene. Jednotlivé hodnoty pH byly navíc ověřovány v postupujícím čase, konkrétně v minimálně v 7 odběrových časech, které byly pro jednotlivé teploty odlišné. Dohromady tedy došlo k vyhodnocování každého biogenního aminu devět krát a pokaždé se jednalo o jinou kombinaci růstových faktorů. (Beneš, 2020) Pro naši skupinu testovaných faktorů byla stanovena koncentrace jednotlivých aminů 0,2 g/l a živné médium MRS bylo optimální, tedy o koncentraci předepsané výrobcem. Nejvýznamnější úbytky byly zaznamenány v kultivačním médiu o pH 5,4 při 30 °C, kdy došlo k redukci všech sledovaných aminů alespoň o 20 %. Nejlépe byl degradován histamin, jehož koncentrace byla snížena v průběhu prvních 24 hodin až o 50 %. Druhým nejlépe degradovaným aminem byl putrescin, jehož koncentrace klesly v prvních 8 hodinách o 30 % a za 24 hodin na 50 %. Koncentrace fenylethylaminu klesly o 35 %. Byla zaznamenána i degradace kadaverinu a tyraminu o 20 %.

Druhé nejlepší úbytky byly zaznamenány v kultivačním médiu o pH 6,2 během kultivace při 11°C. Nejlépe byl degradován histamin. Zde došlo k poklesu koncentrace po 2 dnech už o 30 % a po 4 dnech byla koncentrace ještě o dalších 8 %. Po 6 dnech pak byla naměřena nejnižší hodnota koncentrace odpovídající 52 % z původního množství. Konečná koncentrace byla 62 % původního media po 14 dnech kultivace. Druhý nejlépe degradovaný byl kadaverin, u kterého byla zaznamenána nejnižší koncentrace přibližně 45 % a konečný úbytek 20 %. Byla zaznamenána degradace fenylethylaminu, putrescinu a tyraminu při pH 6,2 a 11°C o 50 %.

Při kultivaci o teplotě 23 °C nebyla zaznamenána žádná výrazná redukce. Lze tedy předpokládat, že dané podmínky nevyhovovaly požadavkům na vhodné prostředí pro kultivaci amin degradačních kmenů, v našem případě kmenu *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198.

Kultivaci a schopností degradace kmenů *L. casei* se zabývala také řada závěrečných prací. V diplomové práci Sokolová (2019) se věnovala možnosti snížení obsahu biogenních aminů bakteriemi izolovanými z potravin. Byly sledovány úbytky biogenních aminů při 30 °C v půdě MRS u bakterií kmenu *Lactobacillus casei* CCDM 422 a CCDM 802 a to fenylethylaminu a histaminu kolem 40 % a při 37°C v poloviční půdě MRS-C úbytek fenylethylaminu o 70 %.

V diplomové práci Řezníčkové (2019) byly sledovány možnosti snížení obsahu biogenních aminů během zrání sýrů použitím protektivní kultury. *Lactobacillus casei* CCDM 198 byl prokázán jako nejúčinnější kmen pro výrazné snížení obsahu histaminu, putrescinu, kadaverinu a fenylethylaminu.

Diplomová práce Beneše (2020) se zabývala stejným tématem. V experimentu bylo zjištěno, že nejvýrazněji byly kmenem *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198 degradovány histamin, putrescin a kadaverin. U všech tří aminů došlo k maximálním úbytkům v médiu o pH 6,2 s nižším obsahem živin při jejich koncentraci 0,2 g/l a při kultivační teplotě 30 °C. Putrescin byl za těchto podmínek degradován o 66 %, kadaverin o 60 % a histamin o 51 %. Výsledky této práce mohou být použity pro další studium degradace biogenních aminů testovaným kmenem. Degradční schopnost vybraných kmenů na biogenní aminy byla testována v podmínkách *in vitro*. Ty se mohou lišit od podmínek reálných vzorků, ve kterých se tyto testované bakterie mohou chovat zvláště z důvodu jiných vnějších podmínek jako je dostupnost kyslíku, živin, vodní aktivity a dalších ovlivňujících látek.

## ZÁVĚR

Diplomová práce navazovala na téma zpracované v rámci bakalářské práce. (Bábková, 2019) Byl vybrán jeden testovaný subjekt, kmen *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCDM 198, který byl získán ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů (CCDM).

Byla ověřována degradační schopnost během různých růstových faktorů a během experimentu byly kombinovány tyto podmínky sledované v čase.

- teplota – 11, 23 a 30 °C
- pH – 5,4; 6,2 a 7,0

Z daných naměřených hodnot můžeme usoudit, že byly zaznamenány úbytky jednotlivých aminů. Nejvýznamnější poklesy byly zaznamenány v médiích o pH 5,4 během kultivace při 30 °C, kdy došlo k redukci všech sledovaných aminů alespoň o 20 %. Nejlépe byl degradován histamin, jehož koncentrace byla snížena v průběhu prvních 24 hodin až o 50 %. Druhým nejlépe degradovaným aminem byl tyramin, jehož koncentrace klesly v prvních 12 hodinách o 25 % a za 24 hodin na 45 %. Koncentrace fenylethylaminu klesly o 35 %. Byla zaznamenána i degradace kadaverinu a tyraminu o 20 %.

Druhé nejlepší úbytky byly zaznamenány v kultivačním médiu o pH 6,2 při 11°C. Nejlépe byl degradován histamin. Zde došlo k poklesu koncentrace po 2 dnech už o 30 % a po 4 dnech byla koncentrace ještě o dalších 8 %. Po 6 dnech pak byla naměřena nejnižší hodnota koncentrace odpovídající 52 % z původního množství. Konečná koncentrace byla 62 % původního media po 14 dnech kultivace.

Druhým nejlépe degradovaným aminem byl kadaverin, u kterého byla zaznamenána nejnižší koncentrace přibližně 45 % a konečný úbytek 20 %.

Byla zaznamenána degradace fenylethylaminu, putrescinu a tyraminu v médiu o pH 6,2 během kultivace při 11°C o 50 %.

Při kultivaci o teplotě 23 °C nebyla zaznamenána výraznější redukce.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ASKAR, Abbas, a Howard TREPTOW, 1986. Biogene Amine in Lebensmitteln — Vorkommen, Bedeutung und Bestimmung. 197 Seiten, 34 Abb., 47 Tab. Verlag Eugen Ulmer. Stuttgart 1986. Preis. *Food / Nahrung*. **32(4)**, 420-420. DOI: 10.1002/food.19880320433. ISSN 0027769x

ALVAREZ, Miguel A., MORENO - ARRIBAS, V. 2014. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science*. **39** (2), 146 -155 DOI: 10.1016/j.tifs.2014.07.007. ISSN: 0924-2244.

ARENA, M.E. a M.C. MANCA DE NADRA. 2001. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology*., (90), 158-162.

BÁBKOVÁ, Dagmar. Izolace mikroorganismů degradujících biogenní aminy z fermentovaných masných výrobků. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2020, 110 s. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav technologie potravin. Vedoucí práce Buňková, Leona.

BÄUMLISBERGER, Mathias et al., 2015. The Potential of the Yeast *Debaryomyces hansenii* H525 to Degrade Biogenic Amines in Food. *Microorganisms* **3(4)**, 839-850 DOI: 10.3390/microorganisms3040839. ISSN 2076-2607.

BENEŠ, Štěpán. *Možnosti redukce obsahu biogenních aminů vybranými bakteriemi rodu Lactobacillus* Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2020, 110 s. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav technologie potravin. Vedoucí práce Buňková, Leona.

CAI, H., RODRIGUEZ, B.T., ZHANG, W., BROADBENT, J.R., and STEELE, J.L. 2007. Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology*. **153**, 2655-2665. DOI: 10.1099/mic.0.2007/006452-0.

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

CORPILLO, D. et al. 2003. Induction of a novel amine oxidase from the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast* **20**. 369 - 379

DAPKEVICIUS, Maria L.N.Enes et al., 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. **57(1-2)**, 107-114 DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00238-5. ISSN: 0168-1605.

EMBORG, J. LAURSEN, G. and P. DALGAARD, 2005. Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2 °C – effect of vacuum- and modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **101** (3), 263-DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.001](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.001).

FADDA, S., VIGNOLO, G. & OLIVER, G., 2001. Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and *Kocuria* strains. *Biotechnology Letters*, **23**, 2015– 2019. ISSN: 1573-6776

GARCÍA-RUIZ, A., GONZÁLEZ - ROMPINELLI, E. M., BARTOLOMÉ, B. MORENO - ARRIBAS, M. V. 2011. Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines. *International Journal of Food Microbiology*, **148**, 115-120 DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.009](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.009).

GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CRUDELE, M. A., PAPARELLA, SUZZI, G. 2002. Use of *Staphylococcus xylosus* as a starter culture in dried sausages: Effect on the biogenic amine content. *Meat Science* **61**, 275-283. DOI: [10.1016/S0309-1740\(01\)00193-0](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00193-0) . ISSN: 0309-1740.

GARDINI, Fausto, Maria MARTUSCELLI, Marisa Carmela CARUSO, Ferdinando GALGANO, Maria Antonietta CRUDELE, Fabio FAVATI, Maria Elisa-betta GUERZONI a Giovanna SUZZI. 2001. 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*, **64**(1-2), 105-117. DOI: [10.1016/S0168-1605\(00\)00445-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00445-1). ISSN 01681605.

GARDINI, Fausto, Yesim ÖZOGUL, Giovanna SUZZI, Giulia TABANELLI a Fatih ÖZOGUL. 2016. Technological Factors Affecting Biogenic Amine Content in Foods: A Review. *Frontiers in Microbiology*. 7:1218. DOI: [10.3389/fmicb.2016.01218](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01218). ISSN 1664-302x.

HALÁSZ, Anna et al., 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science*. **5**(2), 42-49 DOI: [10.1016/09242244\(94\)90070-1](https://doi.org/10.1016/09242244(94)90070-1). ISSN 09242244.

HERRERO-FRESNO, Ana, Noelia MARTÍNEZ, Esther SÁNCHEZ-LLANA, et al. 2012. *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International Journal of Food Microbiology*, **157**(2), 297- DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.002](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.002). ISSN 01681605.

HOLZAPFEL, Hans-Wilhelm a J. B. Brian WOOD (eds.). 2014. *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*. 1st ed. Chichester: Wiley Blackwell. ISBN 978-1-4443-3383-1.

KOMPRDA T., SMĚLÁ D., PECHOVÁ P., KALHOTKA L., ŠTENCL J., KLEJDUS B., 2004. Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. *Meat science*. **67** (4): 617 – 616. DOI: [10.1016/j.meatsci.2004.01.003](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.01.003). ISSN: 0309-1740.

LATORRE-MORATALLA, M.L., S. BOVER-CID, R. TALON, et al. Strategies to reduce biogenic amine accumulation in traditional sausage manufacturing. *LWT - Food Science and Technology* 2010, **43**(1), 20-25 DOI: [10.1016/j.lwt.2009.06.018](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.06.018). ISSN 00236438.

LEUSCHNER, Renata G a Walter P HAMMES, 1998. Tyramine Degradation by *Micrococci* During Ripening of Fermented Sausage. *Meat Science*. **49**(3), 289-296. DOI: 10.1016/S0309-1740(97)00124-1.

MAH, Jae-Hyung a Han-Joon HWANG. 2009. Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. *Food Control*. **20**(9), 796-801. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.10.005. ISSN 09567135

NAILA, Aishath, Steve FLINT, Graham FLETCHER, Phil BREMER a Gerrit MEERDINK. 2010. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science*, **75**(7), 139-150. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x. ISSN 00221147.

NEI, Daisuke, Susumu KAWASAKI, Yasuhiro INATSU, et al. 2012. Effectiveness of gamma irradiation in the inactivation of histamine-producing bacteria. *Food Control*, **28**(1), 143-146 DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.05.006. ISSN 09567135.

CHONG, C.Y.; ABU BAKAR, F.; RUSSLY, A.R.; JAMILAH, B.; MAHYUDIN, N.A. 2011 The effects of food processing on biogenic amines formation. *Int. Food Res. J.* **18**, 867–876.

GARDINI, Fausto, Yesim ÖZOGUL, Giovanna SUZZI, Giulia TABANELLI, Fatih ÖZOGUL, M. CALLANAN, C. RAUH a D. KNORR. 2016. Technological Factors Affecting Biogenic Amine Content in Foods: A Review. *Frontiers in Microbiology*, **2016**, 7(9), 868-872 DOI: 10.3389/fmicb.2016.01218. ISBN 9780122270550. ISSN 1664-302X.

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

HILL, Daragh. SUGRUE, Ivan., TOBIN, Conor, HILL, Colin. STANTON Catherine a Paul ROSS., 2018. The Lactobacillus casei Group: History and Health Related Applications. *Frontiers in Microbiology*. **10**(9), 210. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02107

HORÁČKOVÁ Šárka, Kristina BIALASOVÁ, Milada PLOCKOVÁ, 2018. Metabolismus a význam bakterií mléčného kvašení ve fermentovaných mléčných. *Mlékárenské listy*, **29**(5), 170

Kang IJ, Park YH. 1984. Effect of food additives on the histamine formation during processing and storage of mackerel. *Bull Korean Fisheries Soc* **17**:383.



LATORRE-MORATALLA ML, BOVER-CID S, AYMERICH T, MARCOS B, VIDAL-CAROU MC, GARRIGA M. 2007. Aminogenesis control in fermented sausages manufactured with pressurized meat batter and starter culture. *Meat Sci* **75**(3):460–9.

LEE SP, BUBER MT, YANG Q, CERNE R, CORTES RY, SPROUS DG, BRYANT RW. 2008. Thymol and related alkyl phenols activate the hTRPA1 channel. *Br J Pharmacol*. **153**(8):1739–49.

LEDVINA, Miroslav. *Biochemie pro studující medicíny*, Praha: Carolinum. 2010, 548. ISBN 9788024614144

Mléčné kvašení. *Zatamoko mushroom*, 2004. Dostupné z: [http://zatamoko.cz/houby/teorie\\_j.php?q=old/teorie\\_j.php](http://zatamoko.cz/houby/teorie_j.php?q=old/teorie_j.php)

MINERVINI, F. 2011. Lactic Acid Bacteria, *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus casei* Group. *Encyclopedia of Dairy Sciences* .96-104. DOI: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00261-2

NAILA, Aishath et al., 2010. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science*. **75**(7), 139-150. DOI: 10.1111/j.17503841.2010.01774.x. ISSN 00221147.

Nářízení Komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32005R2073>

NOVELLA-RODRIGUEZ S, VECIANA-NOGUES MT, Saldo J, VIDAL-CAROU MC. 2002. Effects of high hydrostatic pressure treatments on biogenic amine contents in goat cheeses during ripening. *J Agric Food Chem* **50**(25):7288–92.

ŘEZNÍČKOVÁ, Barbora, *Možnosti snížení obsahu biogenních aminů během zrání sýrů použitím protektivní kultury*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2019, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav technologie potravin. Vedoucí práce doc. Pachlová Vendula

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

SHALABY, Ali R., 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* **29**(7), 675-690 DOI: 10.1016/S0963-9969(96)00066X. ISSN 09639969.

SHALABY AR. 2000. Changes in biogenic amines in mature and germinating legume seeds and their behavior during cooking. *Nahrung/Food* **44**(1):23–7.

SHALABY AR, Rahman HAAE. 1995. Effect of potassium sorbate on development of biogenic amines during sausage fermentation. *Food/Nahrung* **39**(4):308–15.

SHIXI SONG, XINGYU WANG, KE XU, LUFANG NING A XINGBIN YANG, 2019. Rapid identification and quantitation of the viable cells of *Lactobacillus casei* in fermented dairy products using an aptamer-based strategy powered by a novel cell-SELEX protocol. *Journal of Dairy science* **102** (12), 10814-10824. DOI:<https://doi.org/10.3168/jds.2019-16693>

SHUKLA, Shruti, KIM, Jong-Kyu. KIM, Myunghee. 2011. Occurrence of Biogenic Amines in Soybean Food: *Soybean and Health*, DOI: 10.5772/19021.

STADLER, R. H. a D. R. LINENBACK. *Process-induced food toxicants: occurrence, formation, mitigation and health risks*, New York: John Wiley and sons. 2009, s. 341 - 342. ISBN 978-0-470-07475-6

STADNIK, J.; DOLATOWSKI, Z., 2010. Biogenic Amines in Meat and Fermented Meat Products. *Acta Scientiarum Polonorum : Technologia Alimentaria*. **9**(3) 251-263. ISSN:1644-0730.

SOKOLOVÁ, Iveta. *Možnosti snížení obsahu biogenních aminů bakteriemi izolovanými z potravin* Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2019, 75 s. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav technologie potravin. Vedoucí práce Buňková, Leona.

SURESH D, MANJUNATHA H, SRINIVASAN K. 2007. Effect of heat processing of spices on the concentrations of their bioactive principles: turmeric (*Curcuma longa*), red pepper (*Capsicum annuum*) and black pepper (*Piper nigrum*). *J Food Compos Anal* **20**(3–4):346–51

VELÍŠEK J., 2009: *Chemie potravin 3*, Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-86659-02-X

VIDAL-CAROU, M. LATORRE-MORATALLA, M a Sara BOVER-CID, 2010. Biogenic Amines. *Safety Analysis of Foods of Animal Origin*. CRC Press **399**. DOI: 10.1201/EBK1439848173-14. ISBN 978-1-4398-4817-3.

VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. vyd. Brno, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5

WHO, 2014. Safety and nutritional adequacy of irradiated food. Geneva: World Health Organization.

OADES, Robert. 2007 The Roles of Norepinephrine and serotonin in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Attention Deficit Hyperactivity Disorder* . DOI: 10.1385/1-59259-891-9:097.

RUIZ-CAPILLAS C, COLMENERO FJ, CARRASCOSA AV, MUNOZ R. 2007. Biogenic amine production in Spanish dry-cured “chorizo” sausage treated with high-pressure and kept in chilled storage. *Meat Sci* **77**(3):365–71.

YISMAW, Yazachew, 2020. *Pharmacology of Histamine*. Bahir, Dar: LAP LAMBERT Academic Publishing,. ISBN 978-620-2-78693-5.

YUECEL U, UEREN A. 2008. Biogenic amines in Turkish type pickled cabbage: effects of salt and citric acid concentration. *Acta Aliment* **37**(1):115–22.

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BA Biogenní aminy

HPLC Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High – performance liquid chromatography)

L. *Lactobacillus*

PEA Fenylethylamin

PUT Putrescin

CAD Kadaverin

HIS Histamin

TYR Tyramin

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Heterofermentativní dráha (Obrázek převzat z: <a href="http://zatomoko.cz/houby/teorie_j.php?q=old/teorie_j.php">http://zatomoko.cz/houby/teorie_j.php?q=old/teorie_j.php</a> ) .....	13
Obrázek 2 Rod <i>Lactobacillus</i> (Upraveno podle: Erasmus MC. University Medical Centre Rotterdam Dostupné z: <a href="http://microbe-canvas.com/Bacteria.php?p=1250">http://microbe-canvas.com/Bacteria.php?p=1250</a> ) .....	14
Obrázek 3 Vznik nejdůležitějších biogenních aminů z aminokyselin. (Upraveno podle Halasz et al., 1994, Ledvina, 2010) .....	19
Obrázek 4 Degradace norepinefrinu (Upraveno podle: Oades, 2007) .....	25
Obrázek 5 Degradace fenylethylaminu při 30 °C v médiu o různém pH .....	34
Obrázek 6 Degradace putrescinu při 30 °C a různém pH .....	35
Obrázek 7 Degradace kadaverinu při 30 °C a různém pH .....	36
Obrázek 8 Degradace histaminu při 30 °C a různém pH .....	37
Obrázek 9 Degradace tyraminu při 30 °C a různém pH .....	38
Obrázek 10 Degradace fenylethylaminu při 23 °C a různém pH .....	39
Obrázek 11 Degradace kadaverinu při 23 °C a různém pH .....	40
Obrázek 12 Degradace putrescinu při 23 °C a různém pH .....	41
Obrázek 13 Degradace histaminu při 23 °C a různém pH .....	42
Obrázek 14 Degradace tyraminu při 23 °C a různém pH .....	43
Obrázek 15 Degradace fenylethylaminu při 11 °C a různém pH .....	44
Obrázek 16 Degradace kadaverinu při 11 °C a různém pH .....	45
Obrázek 17 Degradace putrescinu při 11 °C a různém pH .....	46
Obrázek 18 Degradace histaminu při 11 °C a různém pH .....	47
Obrázek 19 Degradace tyraminu při 11 °C a různém pH .....	48
Obrázek 20 Degradace putrescinu při 11 °C a různém pH .....	50
Obrázek 21 Degradace histaminu při 11 °C a různém pH .....	52
Obrázek 22 Degradace tyraminu při 11 °C a různém pH .....	54

## **SEZNAM TABULEK**

*Tabulka 1: Popis jednotlivých sad s kombinacemi zkoumaných faktorů.....31*

*Tabulka 2 Parametry kultivace jednotlivých vzorků.....32*