

# **Redukce obsahu biogenních aminů bakteriemi mléčného kvašení**

Eva Horníková

---

Bakalářská práce  
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

**Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně**

**Fakulta technologická**

**Ústav technologie potravin**

**akademický rok: 2018/2019**

# **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

**(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)**

**Jméno a příjmení: Eva Horníková**

**Osobní číslo: T15566**

**Studijní program: B2901 Chemie a technologie potravin**

**Studijní obor: Chemie a technologie potravin**

**Forma studia: prezenční**

**Téma práce: Redukce obsahu biogenních aminů bakteriemi mléčného kvašení**

**Zásady pro vypracování:**

## **I. Teoretická část**

- 1. Charakterizace a vlastnosti biogenních aminů.**
- 2. Bakterie mléčného kvašení a jejich vlastnosti.**
- 3. Redukce nežádoucích látek v potravinách bakteriemi mléčného kvašení**

## **II. Praktická část**

- 1. Inhibiční působení bakterií mléčného kvašení na dekarboxyláza pozitivní bakterie**
- 2. Ověření schopnosti degradace biogenních aminů vybranými bakteriemi mléčného kvašení.**
- 3. Zpracování výsledků a formulace závěru.**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., HLOBILOVÁ, M., VAŇÁTKOVÁ, Z., NOVÁKOVÁ, D., DRÁB, V., Tyramine production of technological important strains of Lactobacillus, Lactococcus and Streptococcus, European Food Research and Technology, 2009, 229, 533-538.

[2] SLÁDKOVÁ, P., KOMPRDA, T., BURDYCHOVÁ, R., vyšetření starovacích a probiotických kultur určených provýrobu fermentovaných masných výrobků na schopnost tvorby biogenních aminů, Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis, 2008, 56, 25-30.

[3] SILLA SANTOS, M.H., Biogenic amines: their importance in foods, International Journal of Food Microbiology, 1996, 26, 213-231.

[4] FLASAROVÁ, Radka, Vendula PACHLOVÁ, Leona BUŇKOVÁ, Anna MENŠÍKOVÁ, Nikola GEORGOVÁ, Vladimír DRÁB a František BUŇKA. Biogenic amine production by Lactococcus lactis subsp. cremoris strains in the model system of Dutch-type cheese. Food Chemistry [online]. 2016, 194, 68-75 [cit. 2017-09-03]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.07.069. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615010900>.

[5] LORENCOVÁ, Eva. Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu bakterií rodu Lactobacillus a Bifidobacterium: Factors influencing decarboxylase activity of genera Lactobacillus and Bifidobacterium : teze disertační práce. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2015. ISBN isbn:9788074545443.

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

**2. února 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**15. května 2019**

Ve Zlíně dne 2. února 2019

L.S.

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

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

Ve Zlíně .....

.....

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

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

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

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

<sup>2)</sup> 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 vzdělávacího zařízení (školní dílo).

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

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

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

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

## ABSTRAKT

Cílem této práce bylo zjistit u vybraných bakterií rodu *Lactobacillus*, které byly izolované z chlebového kvásku v Portugalsku, schopnost produkovat, nebo degradovat biogenní aminy. Redukce byla pozorována po 24 a 48hodinové kultivaci v MRS médiu a v médiu s polovičním množstvím živin spolu s biogenními aminy. Dále byly tyto vzorky vyhodnoceny pomocí kapalinové chromatografie. Produkce biogenních aminů byla pozorovaná po 24 a 48hodinové kultivaci v MRS médiu spolu s aminokyselinami.

Experimentem bylo zjištěno, že nejvyšší schopnost degradace vykazovaly kmeny *Lactobacillus plantarum* S4-3 a S4-19, kde kmeny degradovaly nejvíc putrescin, histamin a kadaverin. Nejvyšší schopnost produkce měl kmen *Lactobacillus paracasei* S3-37, který produkoval nejvíce putrescin.

Klíčová slova: biogenní aminy, degradace, produkce, bakterie mléčného kvašení, HPLC

## ABSTRACT

This work aimed to determine the ability of species *Lactobacillus* which was isolated from bread sourdough in Portugal, to produce or degrade biogenic amines. The reduction was observed after 24 and 48 hours cultivation in MRS medium and a medium with half the nutrients together with biogenic amines. Further, these samples were evaluated by liquid chromatography. Biogenic amine production was observed after 24 and 48 hours in MRS medium along with amino acids.

It was found by the experiment that *Lactobacillus plantarum* S4-3 and S4-19 strains showed the greatest degradation ability, where the strains degraded most of putrescine and cadaverine. The most potent production was the strain *Lactobacillus paracasei* S3-37, which produced the most putrescine.

Keywords: biogenic amines, degradation, production, Lactic Acid Bacteria, HPLC

Velké poděkování patří vedoucí mé bakalářské práce, doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení, rady, trpělivost a vstřícnost, kterou mi poskytla při psaní této práce.

Velké poděkování za pomoc a rady s vypracováním praktické části patří taktéž Ing. Pavlu Plevovi, Ph.D. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Haně Pištěkové, která mi poskytla kmeny mikroorganismů k mému výzkumu. A nakonec bych ráda poděkovala laborantkám paní Bc. Veronice Kučabové a paní Ing. Olze Vlčkové a studentce Bc. Marice Lhotské, DiS. za pomoc, cenné rady a práci v laboratoři.

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

## OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČASŤ</b> .....	<b>11</b>
<b>1 BIOGÉNNE AMÍNY</b> .....	<b>12</b>
1.1 CHARAKTERISTIKA .....	12
1.2 VZNIK BIOGÉNNYCH AMÍNOV .....	12
1.3 VÝSKYT V POTRAVINÁCH .....	13
1.3.1 Nefermentované potraviny .....	14
1.3.1.1 Ryby .....	14
1.3.1.2 Ovocie a zelenina .....	14
1.3.1.3 Mäso .....	14
1.3.2 Fermentované potraviny .....	15
1.3.2.1 Syry .....	15
1.3.2.2 Alkoholické nápoje .....	15
1.3.2.3 Fermentovaná zelenina .....	15
1.4 MOŽNOSŤ STANOVENIA BIOGÉNNYCH AMÍNOV .....	15
1.4.1 Chromatografické metódy .....	16
1.4.1.1 Plynová chromatografia .....	16
1.4.1.2 Tenkovrstvá chromatografia .....	16
1.4.1.3 Kvapalinová chromatografia .....	17
1.4.2 Kultivačná metóda .....	17
1.4.3 Polymerázová reťazová reakcia .....	17
<b>2 BAKTÉRIE MLIEČNEHO KVASENIA</b> .....	<b>19</b>
2.1 ROZDELENIE .....	19
2.1.1 Vybrané rody baktérií mliečneho kvasenia .....	20
2.1.1.1 Rod Lactobacillus .....	20
2.1.1.2 Rod Leuconostoc .....	21
2.1.1.3 Rod Pediococcus .....	21
2.1.1.4 Rod Lactococcus .....	22
2.1.1.5 Rod Streptococcus .....	22
2.1.1.6 Rod Enterococcus .....	22
2.2 VÝZNAM BAKTÉRIÍ MLIEČNEHO KVASENIA .....	23
2.3 DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA .....	23
2.4 SCHOPNOSŤ DEGRADÁCIE BIOGÉNNYCH AMÍNOV .....	25
<b>3 MOŽNOSTI ZNÍŽENIA OBSAHU BIOGÉNNYCH AMÍNOV V POTRAVINÁCH</b> .....	<b>26</b>
3.1 TEPLOTA .....	26
3.2 APLIKÁCIA PRÍDAVNÝCH LÁTOK V POTRAVINÁCH A KONZERVAČNÝCH LÁTOK .....	26
3.3 ZVÝŠENÝ HYDROSTATICKÝ TLAK .....	27
3.4 OŽAROVANIE .....	27
3.5 BALENIE POTRAVÍN .....	27
3.6 APLIKÁCIA MIKROORGANIZMOV S AMINOXIDÁZOVOU AKTIVITOU .....	27
<b>II PRAKTICKÁ ČASŤ</b> .....	<b>29</b>
<b>4 CIEĽ PRÁCE</b> .....	<b>30</b>
<b>5 MATERIÁL A METÓDY</b> .....	<b>31</b>



5.1	OVERENIE SCHOPNOSTI DEGRADOVAŤ BIOGÉNNE AMÍNY KMEŇMI BAKTÉRIÍ IZOLOVANÝCH Z KVÁSKU V PORTUGALSKU .....	31
5.1.1	Použité mikroorganizmy .....	31
5.1.2	Kultivačné média .....	31
5.1.3	Príprava a odber vzorku .....	32
5.1.4	Derivatizácia vzorkov .....	32
5.1.5	Chromatografické stanovenie biogénnych amínov .....	33
5.2	OVERENIE SCHOPNOSTI PRODUKOVAŤ BIOGÉNNE AMÍNY KMEŇMI BAKTÉRIÍ IZOLOVANÝCH Z KVÁSKU V PORTUGALSKU .....	33
5.2.1	Použité mikroorganizmy .....	33
5.2.2	Kultivačné média .....	33
5.2.3	Príprava a odber vzorkov .....	34
5.2.4	Derivatizácia vzorkov .....	34
5.2.5	Chromatografické stanovenie biogénnych amínov .....	34
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>35</b>
6.1	CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENIE ÚBYTKU BIOGÉNNYCH AMÍNOV PÔSOBNÍM BAKTÉRIÍ ODOBRANÝCH Z KVÁSKU V PORTUGALSKU .....	35
6.1.1	Degradácia biogénnych amínov kmeňami <i>Lactobacillus brevis</i> .....	35
6.1.2	Degradácia biogénnych amínov kmeňom <i>Lactobacillus curvatus</i> .....	39
6.1.3	Degradácia biogénnych amínov kmeňami <i>Lactobacillus paracasei</i> .....	39
6.1.4	Degradácia biogénnych amínov kmeňami <i>Lactobacillus paralimentarius</i> .....	46
6.1.5	Degradácia biogénnych amínov kmeňami <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	49
6.1.6	Degradácia biogénnych amínov kmeňom <i>Lactobacillus sakei</i> .....	52
6.1.7	Degradácia biogénnych amínov kmeňom <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> .....	53
6.2	CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENIE PRODUKCIE BIOGÉNNYCH AMÍNOV PÔSOBNÍM BAKTÉRIÍ ODOBRANÝCH Z KVÁSKU V PORTUGALSKU .....	53
6.2.1	Produkcia biogénnych amínov kmeňami <i>Lactobacillus brevis</i> .....	54
6.2.2	Produkcia biogénnych amínov kmeňami <i>Lactobacillus curvatus</i> .....	55
6.2.3	Produkcia biogénnych amínov kmeňami <i>Lactobacillus paracasei</i> .....	55
6.2.4	Produkcia biogénnych amínov kmeňami <i>Lactobacillus paralimentarius</i> .....	57
6.2.5	Produkcia biogénnych amínov kmeňami <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	58
6.2.6	Produkcia biogénnych amínov kmeňom <i>Lactobacillus sakei</i> .....	59
6.2.7	Produkcia biogénnych amínov kmeňom <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> .....	59
<b>7</b>	<b>DISKUSIA .....</b>	<b>61</b>
<b>8</b>	<b>ZÁVER .....</b>	<b>66</b>
	<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATURY .....</b>	<b>67</b>
	<b>ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK .....</b>	<b>72</b>
	<b>ZOZNAM OBRÁZKOV .....</b>	<b>73</b>
	<b>ZOZNAM TABULIEK .....</b>	<b>75</b>
	<b>ZOZNAM PRÍLOH .....</b>	<b>76</b>

## ÚVOD

Rod *Lactobacillus* má v potravinářském průmysle široké využití a sú jeden z najdůležitějších mikroorganismů. Ich schopnost' skvasovat' přítomné cukry v potravine na kyselinu mléčnu sa využívá pri výrobe niekoľkých potravinářských výrobků, ako sú například jogurty, kyslá kapusta, syry, alebo kyslé uhorky. Heterofermentatívne kmene, ktoré okrem kyseliny mléčnéj produkujú aj oxid uhličitý a etanol, sa používajú v potravinářském průmysle na výrobu například aj pečárenského kvásku, a sú to kmene *Lactobacillus brevis* a *L. fermentum*. Ich použitie je najmä kvôli nízkej produkcii biogénnych amínů.

Niektoré baktérie, majú schopnosť produkovať biogénne amíny, ktoré v nízkych koncentraciách sú pre človeka prospešné, pretože sú zdrojom dusíka, ale pri vysokých koncentraciách môžu byť pre telo toxické. Vo vyšších koncentraciách sa nachádzajú predovšetkým vo fermentovaných výrobkoch, v ktorých vznikajú pôsobením mikroorganizmů. Taktiež biogénne amíny sú ukazovateľom bakteriálneho kazenia potravín hnilobnými baktériami, ktoré sú schopné taktiež produkovať veľké množstvá biogénnych amínů a preto je dôležité kontrolovať ich množstvo v potravinách.

Je mnoho spôsobů, ako spomaliť kumuláciu biogénnych amínů v potravinách. Medzi tie patria teplota, pridávanie prídavných látok alebo konzervačných látok, zvýšený hydrostatický tlak, taktiež aj balenie potravín má vplyv na inhibíciu dekarboxyláz. Degradovať biogénne amíny môžu mikroorganizmy s aminooxidázovou aktivitou. Aminooxidázau má mnoho baktérií a medzi tie patria aj laktobacily, ako *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. hilgardii*, *L. sakei*.

## **I. TEORETICKÁ ČASŤ**

# 1 BIOGÉNNE AMÍNY

## 1.1 Charakteristika

Biogénne amíny sú nízko molekulárne dusíkaté organické látky, ktoré vznikajú dekarboxyláciou aminokyselín alebo amináciou a transamináciou aldehydov a ketónov. V potravinách biogénne amíny vznikajú predovšetkým dekarboxyláciou prirodzených aminokyselín pôsobením dekarboxyláz, ktorými sú vybavené niektoré druhy hnilobných baktérií ale taktiež aj baktérie mliečneho kvasenia. Biogénne amíny sú pre človeka nevyhnutné, pretože sú zdrojom dusíka, ktoré môžu pôsobiť ako prekurzory pre syntézu hormónov, nukleových kyselín, proteínov a alkaloidov. Vo vysokých koncentráciách sa ale môžu prejavovať ako látky nežiadúce a vyvolávajú psychoaktívne alebo vasoaktívne účinky. Symptómy pri konzumácii biogénnych amínov vo vysokých koncentráciách sú zvracanie, dýchacie problémy, potenie, rýchle búšenie srdca, migrény, hypotenzia alebo hypertenzia. Patria medzi ukazovatele bakteriálneho kazenja a preto sa ich výskyt sleduje hlavne v potravinách. [1,2]

## 1.2 Vznik biogénnych amínov

Biogénne amíny sú tvorené a degradované rastlinným, živočíšnym a mikrobiálnym metabolizmom. Biogénne amíny vznikajú dekarboxyláciou aminokyselín alebo amináciou a transamináciou aldehydov a ketónov. V potravinách vznikajú biogénne amíny dekarboxyláciou voľných aminokyselín pomocou bakteriálnych oxyláz. Odstránením  $\alpha$ -karboxylovej skupiny z aminokyselín vedie k tvorbe korešpondujúcich biogénnych amínov. [1,2,3,4]

Tab. 1 Prekurzory biogénnych amínov a ich štruktúra [2]

Aminokyselina	Amín	Štruktúra
Lysín	Kadaverín	Alifatická
Ornitín, Arginín	Putrescín	
Arginín	Agmatín	
Histidín	Histamín	Heterocyklická
Tryptofán	Tryptamín	

Tyrosín	Tyramín	Aromatická
Fenylalanín	Fenyletylamín	

Tvorbu biogénnych amínov ovplyvňuje viacero faktorov. Napríklad prítomnosť voľných aminokyselín, prítomnosť mikroorganizmov s dekarboxylázovou aktivitou alebo vonkajšie vplyvy. [1,3,4,5]

Medzi vonkajšie vplyvy patrí:

Teplota - optimálna teplota pre mikroorganizmy schopné dekarboxylácie je 20-37°C

pH - optimálne pH je a to okolo 4,0-5,5.

Koncentrácia solí- vyššia koncentrácia solí znižuje tvorbu biogénnych amínov. Prítomnosť solí aktivuje tyrozíndekarboxylázu a inhibuje histidíndekarboxylázu.

Obsah skvasiteľných cukrov - napr. glukóza; optimálna koncentrácia glukózy pre tvorbu biogénnych amínov sa pohybuje medzi 0,5- 2 %. Koncentrácia vyššia ako 3% inhibuje tvorbu biogénnych amínov.

Produkcii biogénnych amínov môže ovplyvňovať taktiež aj prítomnosť etanolu, oxidu siričitého, fenolických zlúčenín a aktivita vody. [3,4,5,6]

### 1.3 Výskyt v potravinách

Výskyt biogénnych amínov v potravinách sa dá očakávať u potravín ktoré obsahujú proteíny alebo voľné aminokyseliny. Biogénne amíny môžu pochádzať z dvoch zdrojov. Ten prvý je, že sú prirodzenou súčasťou bunkových štruktúr a ten druhý je, že môžu vznikáť v procese výroby a skladovania potravín ako výsledok metabolického pôsobenia mikroorganizmov. Biogénne amíny sa takto stávajú indikátorom mikrobiálnej kontaminácie a ich koncentrácia môže byť jedným z ukazovateľom kvality potravín. [2,5]

Z hľadiska výskytu sa potraviny delia na nefermentované, kde biogénne amíny vznikajú činnosťou hnilobných baktérií a na fermentované, v ktorých rozhoduje pôsobenie baktérií mliečneho kvasenia, prípadne iných kultúrových mikroorganizmov. [2,5]

### 1.3.1 Nefermentované potraviny

#### 1.3.1.1 Ryby

V telách rýb je vysoké množstvo histidínu, ktoré sa môže dekarboxylovať na histamín. Je to tým, že rybie mäso podlieha rýchlej mikrobiálnej skaze, takže prítomnosť mikroorganizmov môže prítomný histidín dekarboxylovať na histamín. Ryby patriace do čeľade *Scrombroidae* sú najčastejšie spojené s incidentmi intoxikácie histamínom (scombrotóxióza). [2,3]

U rýb typu makrela, tuniak, sardinky sú prítomné aj iné biogénne amíny ako putrescín, kadaverín, tyramín, spermin a spermidín. Prítomnosť trimethylamínu a dimethylamínu súvisia s kvalitou potravín, konkrétne s prítomnosťou biogénnych amínov a pomocou nich môže byť hodnotená aj čerstvosť rýb. [2,3]

#### 1.3.1.2 Ovocie a zelenina

V potravinách rastlinného pôvodu je prítomnosť biogénnych amínov bežná a neškodná pre ľudský organizmus. Za zvýšenie obsahu biogénnych amínov ku hranici škodlivosti môže byť zlé skladovanie, alebo manipulácia s ovocím a zeleninou. V pomarančovej šťave sú prítomné biogénne amíny ako noradrenalín a tryptamín, v rajčiakoch sú prítomné tyramín, tryptamín, histamín a v banáne je prítomný tyramín, noradrenalín, tryptamín a serotonin. Taktiež aj v listoch špenátu sa nachádza histamín. V kakaových bôboch a niektorých druhov húb sa vyskytuje fenyletylamín. V bielom a čiernom korení a sójovej omáčke boli detekované vysoké hodnoty pyrrolidínu. [2,3]

#### 1.3.1.3 Mäso

Biogénne amíny sa nenachádzajú prirodzene v živočíšnych svaloch. Môžu sa ale do mäsa dostať ak nebudú dodržané hygienické pokyny. Tak prítomnosť biogénnych amínov poukazuje na mikrobiálnu kontamináciu. V čerstvom alebo spracovanom bravčovom mäse sa nachádzajú vysoké hodnoty adrenalínu, spermidínu a sperminu. V nízkych hodnotách sa tam nachádza noradrenalín, putrescín, histamín, kadaverín a tyramín. [2,7,8]

### 1.3.2 Fermentované potraviny

#### 1.3.2.1 Syry

Syry sú vhodným prostredím pre tvorbu biogénnych amínov ,pretože obsahujú bielkoviny, enzýmy, kofaktory, vodu a mikroorganizmy. Pri výrobe syrov sa pomocou štartérových kultúr vytvára kyselina mliečna a pri proteolýze vznikajú kratšie peptidy až k tvorbe voľných aminokyselín, ktoré prispievajú k tvorbe chuti a vône výrobku. [2,9]

Doba zrenia môže ovplyvniť množstvo biogénnych amínov v syre, pretože čím dlhšie syr zreje, tým je vyššia šanca tvorby biogénnych amínov. Dôvodom sú voľné aminokyseliny a baktérie s dekarboxylázovou aktivitou. Môže dôjsť k tvorbe tyramínu, putrescínu, kadaverínu a histamínu. [2,9]

#### 1.3.2.2 Alkoholické nápoje

Pri výrobe vína vznikajú biogénne amíny v dôsledku jablčno-mliečneho kvasenia, spôsobené baktériami mliečneho kvasenia. Vysoká koncentrácia biogénnych amínov môže byť daná aj spracovaním mikrobiálne napadnutého hrozna, nedostatočnou sanitáciou alebo aj pri výrobe. Putrescín a kadaverín môžu mať negatívne účinky na aróma a chuť vína. Taktiež aj pivo môže obsahovať množstvo biogénnych amínov, napríklad tyramínu, putrescínu, kadaverínu a histamínu. Prítomnosť je daná hlavne vo fľašovom pive, kde biogénne amíny mohli vzniknúť baktériami mliečneho kvasenia, zvlášť *Lactobacilli*, ktoré sú schopné prežiť pasterizáciu. [2,10,11]

#### 1.3.2.3 Fermentovaná zelenina

Pri výrobe kyslej kapusty môžu byť nahromadené v slanom náleve biogénne amíny a to konkrétne putrescín. U kórejského kimchi boli detegované malé množstvá tyramínu. U miso bola zistená prítomnosť histamínu a tyramínu. [2]

### 1.4 Možnosť stanovenia biogénnych amínov

V potravinách je obsah biogénnych amínov pomerne malý, preto metódy pre stanovenie biogénnych amínov sú pomerne náročné, pretože požiadavky sú kladené hlavne na citlivosť, presnosť a vhodnosť danej metódy.

Pre stanovenie biogénnych amínov je možné použiť niekoľko metód medzi ktoré patria:

chromatografické metódy, kultivačné metódy, polymerázová reťazová reakcia [12,21]

#### **1.4.1 Chromatografické metódy**

Chromatografia je separačná metóda ktorej princíp je založený na oddeľovaní látok medzi dvomi fázami a to pohyblivou, inak nazývanou mobilnou a nepohyblivou, stacionárnou fázou. [12]

Medzi separačné metódy ktorými sa stanovujú biogénne aminy patria:

plynová chromatografia (GC), tenkovrstvá chromatografia (TLC) a kvapalinová chromatografia (HPLC). [12]

##### **1.4.1.1 Plynová chromatografia**

Metóda plynovej chromatografie (GC z angličtiny Gas Chromatography) je založená na rozdeľovaní látok medzi dvomi fázami, pri ktorej je mobilnou fázou plyn. Princíp tejto metódy spočíva v odparení vzorku v temperovanom dávkovacom zariadení (injektoru) a ten je postupne unášaný prúdom do kolónií, kde dochádza následne k oddeleniu jednotlivých zložiek zmesi. Z kolónií tak vychádza prvá zložka, ktorá má nižšiu afinitu a posledná vychádza zložka s vyššou afinitou. Výstup zložiek zaznamenáva chromatografický detektor, kde deteguje každú zložku a vyhodnocuje ju. Pre analýzu biogénnych amínov sa táto metóda používa v spojení hmotnostných spektrometrov. Derivatizuje sa bromidom pentafluorobenzylom, anhydridom kyseliny heptafluoromaslovej, pentafluorobenzaldehydom alebo trifluoroacetylovým acetónom. [12,13]

##### **1.4.1.2 Tenkovrstvá chromatografia**

Tenkovrstvá chromatografia (TLC z angličtiny Thin Layer Chromatography) je plošná chromatografia ktorá sa používa na separáciu neprchavých látok. Pomocou TLC sa dá stanovovať široká škála látok pri vysokej citlivosti za minimálny čas a nízkej finančnej náročnosti. Vykonáva sa na doštičke (sklo, kovová fólia) na ktorú sa naniesie tenká vrstva sorbentu (celulóza, silikagel, alumina) a po zaschnutí sa to vloží do vyvíjacej komory s vhodnou zmesou rozpúšťadiel. Vzniknutý chromatogram sa nechá vysušiť a vhodným spôsobom sa deteguje. Následne sa biogénne aminy derivatizujú najčastejšie danzylchloridom a kvantifikuje sa denzitometricky pri 330 až 254 nm. Rozpúšťadla, ktoré zlepšujú separáciu biogénnych amínov sú napríklad chloroform-dietyléter-trietylamín (6:4:1) a chloroform-trietylamín (6:1). [14,15,16]



### 1.4.1.3 Kvapalinová chromatografie

Metóda kvapalinovej chromatografie (HPLC z angličtiny high-performance liquid chromatography) je vhodná pre delenie organických menej prchavých kvapalných a tuhých látok, ktoré sú rozpustné vo vode, v organických rozpúšťadlách alebo v zriedených kyselinách. Pri analýze biogénnych amínov touto metódou sa používa systém reverzných fázy, s derivatizáciou danzylchloridom alebo o-ftalaldehyd, ktorý je detegovaný UV alebo fluorimetrickým detektorom. [17]

Vzorky sú dávkované pomocou dávkovacieho ventilu do mobilnej fázy, ktorá unáša jednotlivé zložky vzorku na kolónu. Tam dochádza k opakovanému ustanoveniu rovnováhy medzi stacionárnou a mobilnou fázou a k separácií analytov podľa fyzikálno-chemických vlastností. Po priechode separačnou kolónou sú analyty v mobilnej fáze detegované v prietokovej celi detektoru. Meranou veličinou je fluorescencia, absorbanca, index lomu, elektrická vodivosť. Výstupom z detektoru je grafický záznam, chromatogram, na ktorom sa hodnotí plocha alebo výška piku. Kvantitatívna analýza sa stanovuje na princípe odčítania výsledkov z kalibračnej krivky. [17,18,19]

### 1.4.2 Kultivačná metóda

Kultivačné metódy patria k rýchlym a nenáročným metódam, ktorou nevýhodou môžu vznikáť pozitívne falošné výsledky.

Princípom je využitie špecifického média, ktorý obsahuje pH indikátor (napríklad bromkresolová violet'), ktorý pri pozitívnej reakcii zmení farbu média na fialovú. Pri reakcii negatívnej sa farba média nemení.

Medzi ďalšie zložky média patrí peptón, soľ alebo glukóza, extrakt (hovädzí alebo kvasničný) a prekursor biogénnych amínov.

Ku prevedeniu sa používajú mikrotitračné doštičky, do ktorých sa pipetuje určité množstvo pôdy a určité množstvo inokula a nechajú sa kultivovať potrebnú dobu. [20]

### 1.4.3 Polymerázová reťazová reakcia

Polymerázová reťazová reakcia (PCR z angličtiny polymerase chain reaction) je rýchla a nenákladná metóda, pomocou ktorej dochádza ku izolácii génov. Je založená na schopnosti DNA polymerázy množiť vlákno DNA v smere 5'-3' s pomocou primeru

syntetizuje. Pomocou tejto techniky môže byť rýchlo namnožená konkrétna nukleotidová sekvencia obsiahnutá v DNA.

PCR prebieha v 3 cyklických fázach:

1. Teplotná denaturácia- dochádza k zahriatiu DNA na 94°C kedy dôjde k oddeleniu reťazcov v DNA, ktoré slúžia ako matrice pre primery a DNA polymerázu
2. Annealing- prebieha pri teplotách 30-65°C, kedy dochádza k pripojeniu primeru k oddeleným reťazcom DNA
3. Polymerácia- (pri teplote okolo 75°C) Pomocou DNA polymerázy dochádza ku syntéze úseku vymedzenému primérami a zároveň dochádza k syntetizovaniu vlákna a tvorbe dvoj-reťazovej DNA.

Vzniknuté produkty, inak nazývané amplikóny, sa v ďalšom cykle používajú ako matrice pre vznik nových kópií. Každý cyklus zdvojnásobí počet kópií pôvodnej DNA.

Automatický teplotný cykler pomáha udržiavať konkrétnu teplotu a dobu každého kroku. Jeden cyklus trvá 3-5 minút a cyklus sa opakuje spravidla 25-35 krát. Pomocou tejto metódy je možné vytvoriť miliardu kópií požadovanej DNA sekvencie. Táto metóda umožňuje včasné odhalenie potenciálnych producentov biogénnych amínov detekciou špecifickej DNA sekvencie kódujúci príslušný mikrobiálny enzým zúčastňujúci tvorby biogénnych amínov. Touto metódou sa dá ale identifikovať prítomnosť génu pre tvorbu biogénnych amínov, nie produkované množstvo biogénnych amínov. [21,22]

## 2 BAKTÉRIE MLIEČNEHO KVASENIA

Baktérie mliečneho kvasenia sú jedny z najdôležitejších baktérií vôbec. Používajú sa bežne v potravinárskom priemysle a to mliekarenskom, konzervárenskom, mäso priemyslu a taktiež sa používajú aj pri výrobe chleba a pekárenských výrobkov.

Baktérie mliečneho kvasenia predstavujú skupinu nepohyblivých gram-pozitívnych nesporulujúcich tyčínok a kokov, ktoré metabolizujú sacharidy za tvorby kyseliny mliečnej za fakultatívne anaeróbných podmienok. Pri aeróbných podmienkach môžu vzniknúť produkty ako oxid uhličitý a kyselina octová, kedy dôjde k oxidačnej disimilácii, kde medziproduktom je mikrobicídny peroxid vodíka. [22,23,24]

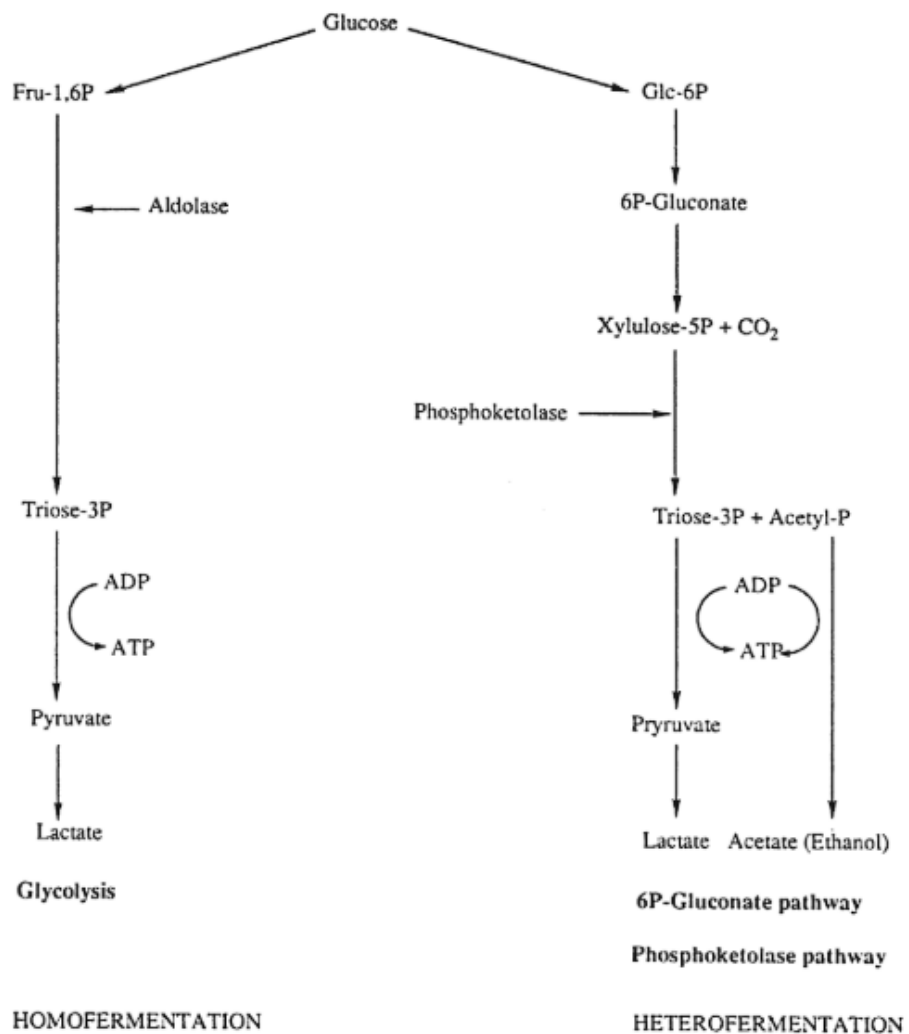
### 2.1 Rozdelenie

Baktérie mliečneho kvasenia sú klasifikované na základe bunkovej stavby a spôsobu fermentácie glukózy. V prírode sú veľmi rozšírené, môžu sa nachádzať na mnohých rastlinách a taktiež sa nachádzajú aj v črevách a na sliznici ľudí a zvierat. Podľa spôsobu fermentácie sa delia na homofermentatívne a heterofermentatívne (obr.1). [25]

Homofermentatívne produkujú ako hlavný metabolit kyselinu mliečnu a heterofermentatívne produkujú okrem kyseliny mliečnej, kyselinu octovú a aj etanol a oxid uhličitý. [25]

V potravinárskej technológii sa za hlavné rody baktérií mliečneho kvasenia považujú:

*Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus a Weissella.* [26]



Obr. 1 Homofermentatívna a heterofermentatívna cesta [26]

## 2.1.1 Vybrané rody baktérií mliečného kvasenia

### 2.1.1.1 Rod *Lactobacillus*

Laktobacily sú z potravinárskeho a biotechnologického hľadiska jeden z najdôležitejších mikroorganizmov, ktorý je v prírode veľmi dobre rozšírený. Nájde sa v mlieku, kde vyvoláva prirodzené kvasenie, v ústach a tráviacom trakte cicavcov, v obilii a pôde. Sú gram pozitívne, nesporulujúce väčšinou nepohyblivé, fakultatívne anaeróbne baktérie. Optimálna teplota rastu je okolo 30-40 °C ale dokážu rásť aj v teplotách 2-53 °C. Medzi homofermentatívne baktérie, ktoré skvasujú sacharidy na kyselinu

mliečnu patria *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. plantatum*. Medzi heterofermentatívne, ktoré okrem kyseliny mliečnej tvoria aj etanol a oxid uhličitý, patria *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. buchneri*.

V mliekarenskom priemysle sa používajú homofermentatívne laktobacily predovšetkým na výrobu syrov a to *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* a *L. helveticus*. Pre výrobu kvaseného mlieka sa používajú *L. acidophilus*, ktorý sa konkrétne používa na výrobu acidofilného mlieka a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, ktorý sa používa na výrobu jogurtov. *L. plantarum* sa často prirodzene nachádza na rastlinách a uplatňuje sa pri konzervácii kapusty a uhoriek. Je taktiež súčasťou kefírových zŕn a spolu s heterofermentatívnymi druhmi *L. brevis* a *L. fermentum* sa vyskytujú aj v pekárskom kvásku. Niektoré heterofermentatívne laktobacily môžu byť nežiadúce pri výrobe piva a vína, pretože spôsobujú chuťové vady výrobku. [27]

#### 2.1.1.2 Rod *Leuconostoc*

*Leuconostoc* patrí taktiež do skupiny baktérií mliečneho kvasenia. Sú nesporulujúce, nepohyblivé, fakultatívne anaeróbne, gram-pozitívne koky, ktoré sa vyskytujú v pároch alebo retiazkach. Sú heterofermentatívne, takže okrem kyseliny mliečnej tvoria aj etanol a oxid uhličitý. Mnohé leuconostoky a výhradne *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* tvoria sliz polysacharidovej povahy. Prítomnosť tejto baktérie môže spôsobiť aglutináciu v droždiarenskom priemysle, čo je nežiadúci účinok. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* taktiež produkuje sliz dextrínovej povahy a používa sa pre priemyslovú výrobu dextrínov pre lekárske účely, ako nahrážka krvnej plazmy. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* sú súčasťou kultúry pre výrobu masla, pretože tvoria biacetyly, ktoré dodávajú maslu príjemné aróma. [27]

#### 2.1.1.3 Rod *Pediococcus*

Pediokoky sú mikroaerofilné až anaeróbne gram-pozitívne, nesporulujúce koky, ktoré sa vyskytujú v dvojiciach alebo tetradách. Sú homofermentatívne, takže skvasujú kyselinu mliečnu a ich optimálna teplota rastu sa pohybuje medzi 25 a 40 °C. Niektoré druhy pediokokov sú obávanými kontaminantami v pivovarskom priemysle, pretože tvoria biacetyl, ktorý už aj v nízkych koncentráciách môže tvoriť nepriaznivú chuť a vôňu piva. Druhy rodu *Pediococcus* sa vyskytujú taktiež v kyslej kapuste. *P. halophilus* vie rásť aj pri 18 % NaCl. Používa sa pri výrobe japonskej špecialite miso. [27]

#### 2.1.1.4 Rod *Lactococcus*

Laktokoky sú gram-pozitívne fakultatívne anaeróbne koky, ktoré sú usporiadané do dvojíc a retiazok. Taktiež sú homofermentatívne a katalázanegatívne. Využitie laktokokov je predovšetkým mliekarenským priemyslom, kde sa používa ako čisté mezofilné zakysané kultúry pre výrobu rôznych typov syra a masla. Optimálna teplota rastu je od 30-37 °C. Dokáže rásť aj pri 10 °C ale pri teplote 45 °C nerastie.

Pre výrobu fermentovaných mliečnych výrobkov sa používajú druhy *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Niektoré kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* majú schopnosť vytvárať nízín, čo je látka, ktorá inhibuje rast gram-pozitívnych baktérií. [22,28]

#### 2.1.1.5 Rod *Streptococcus*

Streptokoky sa radia do čeľade *Streptococaceae* a ide o gram-pozitívne koky usporiadané do retiazok. Sú fakultatívne anaeróbne a kataláza-negatívne. V prostredí s dobrou zásobou sacharidov a bielkovín prosperujú. Streptokoky premieňajú sacharidy na kyselinu mliečnu. *Streptococcus thermophilus* patrí medzi mliekarenské čisté kultúry pre výrobu jogurtov a taktiež aj pre výrobu syrov. [27]

*Streptococcus thermophilus* je výborným regulátorom kyslosti mlieka. Je odolný voči teplu, a optimálna teplota rastu je 40 °C, kedy dochádza k hydrolýze laktózy cez  $\beta$ -galaktozidázy. *Streptococcus thermophilus* produkuje kyselinu mliečnu a mravčiu. Kyselina mliečna pomáha k znižovaniu pH v prostredí, ktoré je optimálne pre rast *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, pri čom kyselina mravčia rast tejto baktérie stimuluje. Preto *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sú v vzájomnej symbióze. [29, 30]

#### 2.1.1.6 Rod *Enterococcus*

Enterokoky sa radia do čeľade *Streptococaceae* a ide o gram-pozitívne fakultatívne anaeróbne koky. Morfologicky a fermentačne sú si podobné s *Streptococcus thermophilus* a taktiež aj laktokokmi. Líšia sa od seba fyziologickou odolnosťou a sérologickou skupinou. Optimálna teplota rastu je 37 °C a dokážu rásť v teplotách od 0 do 50 °C. Sú vysoko rezistentné voči vysokej koncentrácii soli, prežívajú do 6,5 % NaCl a v bujóne s pH 9,6, to sa bežne používa ako fyziologické kritérium na rozlíšenie enterokokov od iných mliečnych kokov. [27,29,31]

## 2.2 Význam baktérií mliečneho kvasenia

Baktérie mliečneho kvasenia sa používajú predovšetkým v potravinárskom priemysle. Pôsobia priaznivo na gastrointestinálny trakt, čo povzbudzuje chuť k jedlu, pohyblivosti čriev, stimulácií imunitného systému a k dobrej funkcii pečeni a ostatných orgánov. Ich schopnosť fermentácie sacharidov za vzniku kyseliny mliečnej a produkcií látok s antimikrobiálnym účinkom (napríklad nizín) má pozitívny účinok na predĺženie trvanlivosti potravín. Taktiež niektoré baktérie mliečneho kvasenia spolu s *Bifidobacterium* sa využívajú ako probiotická kultúra. [28,32]

Baktérie mliečneho kvasenia obsahujú proteolytické enzýmy, ktoré rozkladajú peptidy na aminokyseliny a baktérie ich následne transaminujú, čím vznikajú aromatické látky s organoleptickými vlastnosťami (chuť, vôňa, vzhľad). [28,32]

## 2.3 Dekarboxylázová aktivita

Pri dekarboxylácií dochádza k odštiepeniu oxidu uhličitého z karboxylovej skupiny v aminokyseline za vzniku amínu. Dekarboxylačné reakcie prebiehajú za katalázy enzýmov zo skupiny hydroláz, dekarboxyláz. Medzi baktérie s dekarboxylázovou aktivitou patria taktiež baktérie mliečneho kvasenia, a to *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus* a *Leuconostoc* (Tab.2). [33]

Tab. 2 Prehľad baktérií s dekarboxylačnou aktivitou [33]

Biogénny amín	Prekursor aminokyselín	Enzým dekarboxylázy
Histamín	Histidín	Histidín dekarboxyláza
Druhy	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. parabuchneri</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. vaginalis</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. mali</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. paracollinoides</i> , <i>L. rossiae</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Oenococcus oeni</i> , <i>Pediococcus parvulus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Weissella cibaria</i> , <i>W. confusa</i> , <i>W. paramesenteroides</i> , <i>Tetragenococcus muriaticus</i> , <i>T. halophilus</i>	
Tyramín	Tyrozín	Tyrozín dekarboxyláza
Druhy	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. mundtii</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. homohiochii</i> , <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. macedonicus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>W. confusa</i> , <i>W. paramesenteroides</i> , <i>W. viridescens</i> , <i>C. divergens</i> , <i>Canobacterium maltaromaticum</i> , <i>C. gallinarum</i> , <i>T. halophilus</i> , <i>Sporolactobacillus sp.</i>	
2-Fenyletylamín	Fenylalanín	Tyrozín dekarboxyláza
Druhy	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. mundtii</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>C. divergens</i>	
Kadaverín	Lyzín	Lyzín dekarboxyláza
Druhy	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>Pediococcus spp.</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>T. halophilus</i>	
Putrescín	Arginín	Ornitín dekarboxyláza
Druhy	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. mali</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. rossiae</i> , <i>L. homohiochii</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. mutans</i> , <i>P. parvulus</i> , <i>O. oeni</i> , <i>T. halophilus</i>	
Putrescín	Agmatín	Agmatín deimináza
Druhy	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. mundtii</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. mutans</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>O. oeni</i> , <i>P. parvulus</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>W. halotolerans</i> , <i>C. divergens</i> , <i>C. maltaromaticum</i> , <i>C. gallinarum</i>	



## 2.4 Schopnosť degradácie biogénnych amínov

Enzým aminooxidáza má schopnosť degradovať už vzniknuté biogénne amíny v potravinách. Tento enzým je aj súčasťou detoxikačného mechanizmu v ľudskom tele. K účinnej degradácii je ale možnosť použiť baktérie mliečneho kvasenia, ktoré tieto enzýmy produkujú. Schopnosť degradovať biogénne amíny majú napríklad rody *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Oenococcus*. [34]

Tab. 3 Schopnosť degradácie biogénnych amínov pomocou baktérií mliečneho kvasenia [34]

Biogénny amín	Druh baktérie	Matrix
Histamín	<i>Lactobacillus sakei</i>	Pečená rybia kaša
Tyramín	<i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i>	<i>In vitro</i>
Histamín, tyramín	<i>L. sakei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>In vitro</i>
Histamín, tyramín	<i>Lactobacillus casei</i>	Syr Cabrales
Histamín, tyramín, putrescín	<i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>P. parvulus</i> , <i>Oenococcus oeni</i>	Kultivačné médium
Histamín, tyramín, putrescín	<i>L. casei</i>	Víno
Tyramín, putrescín	<i>L. plantarum</i>	<i>In vitro</i>

### 3 MOŽNOSTI ZNÍŽENIA OBSAHU BIOGÉNNYCH AMÍNŮV V POTRAVINÁCH

Prítomnosť mikroorganizmov s dekarboxylázovou aktivitou môže mať za následok vyššiu koncentráciu biogénnych amínov v potravinách. Preto je potrebné nájsť vhodnú metódu, ktorá pomôže zamedziť kontamináciu surovín alebo aspoň zníži koncentráciu biogénnych amínov na minimum. [35]

#### 3.1 Teplota

Produkcia biogénnych amínov závisia na teplote a ich koncentrácia klesá v nízkych teplotách prostredníctvom inhibície mikrobiálneho rastu a zníženia aktivity dekarboxyláz. Chladiarenské teploty majú účinok na *Morganella morganii*, ktorej dekarboxylázy boli inhibované v tuniaku. Mrazenie je viac účinnejšie ako chladenie v prevencii produkcie biogénnych amínov. Vysoké teploty môžu tiež napomáhať k zníženiu tvorby biogénnych amínov v potravinách. Teplota okolo 100 °C môže eliminovať baktérie zodpovedné za tvorbu histamínu, ale vysoká teplota histamín nezničí. To znamená, že ak pred varom už tam baktéria produkovala histamín, varom sa zničí len baktéria ale nie už produkovaný histamín. [35]

#### 3.2 Aplikácia prídavných látok v potravinách a konzervačných látok

Prídavné látky a konzervačné látky môžu redukovať tvorbu biogénnych amínov. Glukonát-delta-laktón (0,5%.1,0%) môže v mäse redukovať množstvo histamínu a putrescínu. Látky obsiahnuté v korení ako kurkumín v kurkume, kapsaicín v červenom peperu a piperin v čiernom peperu môžu napomáhať ku zníženiu biogénnych amínov ako histamín, kadaverín, putrescín a tyramín. Tento pokus bol pozitívny v rybe typu makrela. Taktiež aj cukor má schopnosť redukovať, a to kadaverín v jemne fermentovaných klobásach. Pyrofosforečnan draselný, hydrogenufosforečnan draselný, kyselina askorbová a sorbát draselný majú silný účinok pre redukciiu tyramínu, histamínu, putrescínu a tryptamínu vo fermentovaných klobásach. 5% extrakt z cesnaku môže znižovať obsah histamínu a tyramínu vo fermentovaných sardelách. Taktiež zázvor, zelená cibuľka, škoricca, ďatelina, tymian a oregano napomáhajú k zníženiu tvorby biogénnych amínov. [35]

### 3.3 Zvýšený hydrostatický tlak

Zvýšený hydrostatický tlak je netermálna konzervačná metóda, ktorá poškodzuje bunkové membrány mikroorganizmov, čo vedie k in-aktivácií mikroorganizmov. In-aktívaciou mikroorganizmov pomocou zvýšeného hydrostatického tlaku predlžuje životnosť potravín a zachováva pôvodnú chuť a vlastnosť potravín. Zvýšený hydrostatický tlak sa aplikuje na mnohé potraviny, ako napríklad syry, klobásy, ryby, kyslá kapusta alebo aj šunka vákuovo zabalená. [35]

### 3.4 Ožarovanie

Ožarovanie môže kontrolovať tvorbu biogénnych amínov v potravinách. Radiolytická degradácia biogénnych amínov bola demonštrovaná v modelovom systéme, kde štandardy histamínu, kadaverínu, putrescínu, spermidínu, spermínu, tryptamínu, tyramínu a agmantínu boli ožiarené pri 20 kGy po rozpustení v destilovanej vode. Pozorované výsledky vykazovali 95% degradáciu všetkých amínov. Keďže ožiarenie prebiehalo na modelovom systéme a nie v potravinách, aplikácia ožiarenia na potravinách vyžaduje ďalšie preskúmanie. Vysoká dávka žiarenia by mohla ovplyvniť sensorickú hodnotu potravín. Aplikácia žiarenia o veľkosti 10 kGy môže byť braná ako bezpečná pre aplikáciu na rôzne druhy potravín, ale nie je veľmi účinná. [35]

### 3.5 Balenie potravín

Konzervácia prostredníctvom balenia zvyčajne zahŕňa zmenu plynnej zmesi prostredia obklopujúceho produkt. To môže oddialiť produkciu biogénnych amínov v dôsledku inhibície mikroorganizmov alebo enzýmov produkujúce biogénne amíny. Napríklad enzým histidín dekarboxyláza je viac efektívny pri absencii kyslíka, zatiaľ čo enzým, ktorý histamín oxiduje, je viac efektívny v prítomnosti kyslíka. Existujú niektoré prípady, kde kontrola tvorby biogénnych amínov bola úspešná. Napríklad kuracie prsia zabalené v ochrannej atmosfére (30% CO<sub>2</sub>, 70% N<sub>2</sub>) skladované pri 4°C redukovalo koncentráciu putrescínu a tyramínu. [35]

### 3.6 Aplikácia mikroorganizmov s aminooxidázovou aktivitou

Mikroorganizmy s aminooxidázovou aktivitou znižujú množstvo amínov v potravinách. Môžu byť vložené do potravín ako baktérie schopné degradovať biogénne amíny ale aj ako štartérove kultúry. *Brevibacterium linens* má schopnosť degradovať amíny

vo vzorku syru, kde bolo zaznamenané zníženie obsahu histamínu o 55% a tyramínu o 70%. V solených a fermentovaných sardelách boli aplikované štartérove kultúry v čase zrania. *Staphylococcus xylosus* degradoval histamín o 38 % a tyramín o 4%. [35]

Medzi organizmy, u ktorých bola preukázaná schopnosť degradácie biogénnych amínov patria:

Z baktérií mliečneho kvasenia sú to napríklad tieto druhy:

*Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. hilgardii*, *L. sakei*, *Pediococcus. parvulus*, *Oenococcus oeni*,

Ďalej iné druhy ako:

*Staphylococcus xylosus*, *S. carnosus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *Brevibacterium linen*, a *Kocuria (Micrococcus) varians*. [35]

## **II. PRAKTICKÁ ČASŤ**

## 4 CIEĽ PRÁCE

Cieľom teoretickej časti bolo popísať výskyt biogénnych amínov v potravinách, dekarboxylázová aktivita baktérií mliečneho kvasenia, schopnosť baktérií mliečneho kvasenia degradovať biogénne amíny a možnosti zníženia biogénnych amínov v potravinách.

Cieľom praktickej časti bolo pozorovať schopnosť celkom 40 kmeňov laktobacilov, ktoré boli izolované z chlebového kvásku v Portugalsku. Sledovalo sa u nich schopnosť produkovať alebo degradovať biogénne amíny pomocou vysokoúčinnnej kvapalínovej chromatografie.

## 5 MATERIÁL A METÓDY

### 5.1 Overenie schopnosti degradovať biogénne amíny kmeňmi baktérií izolovaných z kvásku v Portugalsku

#### 5.1.1 Použité mikroorganizmy

Sledovanie schopnosti degradácie biogénnych amínov sa zisťovalo na týchto kmeňov baktérií, ktoré boli izolované z chlebového kvásku v Portugalsku. Kmene láskavo poskytla Ing. Hana Pištěková, ktorá ich aj zároveň izolovala na Instituto Politechnika v Beji.

Tab. 4 Zoznam použitých kmeňov

<i>Lactobacillus brevis</i>	S3-14	<i>Lactobacillus paracasei</i>	S3-37
<i>Lactobacillus brevis</i>	S3-19	<i>Lactobacillus paracasei</i>	S3-38
<i>Lactobacillus brevis</i>	S3-24	<i>Lactobacillus paracasei</i>	S3-40
<i>Lactobacillus brevis</i>	S3-28	<i>Lactobacillus paracasei</i>	S3-42
<i>Lactobacillus brevis</i>	S3-29	<i>Lactobacillus paracasei</i>	S3-45
<i>Lactobacillus brevis</i>	S3-30	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	S8-1
<i>Lactobacillus brevis</i>	S3-31	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	S8-2
<i>Lactobacillus brevis</i>	S3-35	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	S8-3
<i>Lactobacillus brevis</i>	S3-36	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	S8-5
<i>Lactobacillus brevis</i>	S8-4	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	S8-13
<i>Lactobacillus brevis</i>	S8-15	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	S8-16
<i>Lactobacillus curvatus</i>	S7-18	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	S8-17
<i>Lactobacillus paracasei</i>	S3-22	<i>Lactobacillus plantarum</i>	S3-6
<i>Lactobacillus paracasei</i>	S3-23	<i>Lactobacillus plantarum</i>	S3-21
<i>Lactobacillus paracasei</i>	S3-25	<i>Lactobacillus plantarum</i>	S4-3
<i>Lactobacillus paracasei</i>	S3-26	<i>Lactobacillus plantarum</i>	S4-19
<i>Lactobacillus paracasei</i>	S3-27	<i>Lactobacillus plantarum</i>	S4-32
<i>Lactobacillus paracasei</i>	S3-32	<i>Lactobacillus plantarum</i>	S8-6
<i>Lactobacillus paracasei</i>	S3-33	<i>Lactobacillus sakei</i>	S7-1
<i>Lactobacillus paracasei</i>	S3-34	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	S6-20

#### 5.1.2 Kultivačné média

Degradácia bola pozorovaná v diagnostickom médiu MRS s biogénnymi amínami a v polovičnom MRS s biogénnymi amínami.

- MRS bujón

MRS bujón bol pripravený navážením 22,06 g pôdy MRS broth (HiMedia) v 360 ml destilovanej vody a 40 ml zásobného roztoku s amínami.

- ½ MRS bujón

½ MRS bujón bol pripravený navážením polovičnej navážky a to 11,03 g pôdy MRS broth (HiMedia) v 360 ml destilovanej vody a 40 ml zásobného roztoku s amínami.

- 10x koncentrovaný roztok biogénnych amínov

Zásobný roztok biogénnych amínov bol pripravený navážením príslušného množstva biogénnych amínov (Sigma-Aldrich) a ich následným rozpustením v 1 l destilovanej vody.

Fenyletylamín	0,5g
Tyramín	0,5 g
Putrescín	0,5 g
Kadaverín	0,5 g
Histamín	0,5 g

### 5.1.3 Príprava a odber vzorku

Každý kmeň bol kultivovaný paralelne v 6 skúmavkách pri teplote 30°C, celkom 240 skúmaviek s bujónom a biogénnymi amínami a 240 skúmaviek s polovičným bujónom a biogénnymi amínami. Odbery sa predviedli po 24 a 48 hodinách, kde 3 skúmavky sa odobrali pre prvý odber a 3 skúmavky pre druhý odber.

Následne sa vzorky scentrifugovali (4600 otáčiek/min., 7 minút). Po centrifugácii bolo odobrané 650 µl supernatantu do dvoch eppendorfových skúmaviek spolu s 650 µl 1,2 M kyseliny chloristej (Sigma-Aldrich). Následne sa vzorky zamrazili a neskôr sa derivatizovali.

### 5.1.4 Derivatizácia vzorkov

Do derivatizačnej nádoby bol napipetované 100 µl vnútorného štandardu (1,7-heptandiamin v koncentrácii 500 mg/l; Sigma-Aldrich). Následne bolo ku štandardu pridané 1 ml vzorku, 1,5 ml karbonátového pufru o pH 11,1-11,2 a 2 ml čerstvo pripraveného dansylchloridu (Sigma-Aldrich) o koncentrácii 5 g/l rozpustený v acetóne. Derivatizačné nádoby sa uzavreli vrchnákmi a nechali sa trepať v tieni po dobu 20 hodín.



Po 20 hodinách sa derivatizačné nádobky otvorili a pridalo sa 200 µl roztoku prolínu (Sigma-Aldrich) o koncentrácií 0,1 g/ml v destilovanej vode. Následne sa derivatizačné nádobky znova zatvorili a nechali sa trepať v tieni 1 hodinu.

Po 1 hodine sa k vzorkám pridalo 3 ml heptánu (Merck) a následne sa nádobky znova uzatvorili a nechali sa ručne trepať po dobu 5 minút.

Po 5 minútach sa nádobky otvorili a odpipetovalo sa 1 ml heptánovej vrstvy do vialky. Následne vialky boli odparené pri teplote 60-65 °C do sucha pod prúdom dusíka. Následne sa odparok zriedil v 1,5 ml acetonitrilu (Merck) a vialky sa nechali zamraziť pod -18 °C.

### **5.1.5 Chromatografické stanovenie biogénnych amínov**

Pred chromatografickým stanovením boli vzorky prefiltrované cez striekačkový filter s porozitou 0,22 µm. Následne sa vzorky dávkovali do chromatografického systému (prístroj HPLC Agilent Technologies) s kolónou Zorbax Eclipse plus RRHD C18 o veľkosti 50 mm x 3,0 mm pri teplote 30 °C, prietok kolónou bol nastavený na 0,453 ml/min. Detekcia prebiehala pomocou UV/VIS detektoru (DAD detektor Agilent Technologies 1260 Infinity) pri vlnovej dĺžke 254 nm. Chromatogramy boli vyhodnotené pomocou softvéru Chromeleon™ Chromatography Data System.

## **5.2 Overenie schopnosti produkovať biogénne amíny kmeňmi baktérií izolovaných z kvásku v Portugalsku**

### **5.2.1 Použité mikroorganizmy**

Pri sledovaní produkcií biogénnych amínov boli použité tie isté kmene baktérií aké boli použité pri ich degradácií. Zoznam týchto kmeňov je uvedený v podkapitole 6.1.1. v tabuľke 2.

### **5.2.2 Kultivačné média**

Produkcia bola pozorovaná v diagnostickom médiu MRS s aminokyselinami.

- MRS bujón

MRS bujón bol pripravený navážením 22,06 g pôdy MRS broth (HiMedia) v 360 ml destilovanej vody a 40 ml zásobného roztoku s aminokyselinami.

- 10x koncentrovaný roztok aminokyselín

Zásobný roztok aminokyselín bol pripravený navážením príslušného množstva aminokyselín (Sigma-Aldrich) a ich následným rozpustením v 1 l destilovanej vody.

Arginín                    2 g

Ornitín                    2 g

Histidín                   2 g

Lyzín                      2 g

Fenylalanín              2 g

Tyrozín                    2 g

### 5.2.3 Príprava a odber vzorkov

Každý kmeň bol kultivovaný paralelne v 6 skúmavkách pri teplote 30°C, celkom 240 skúmaviek s bujónom a aminokyselinami. Odbery sa predviedli po 24 a 48 hodinách, kde 3 skúmavky sa odobrali pre prvý odber a 3 skúmavky pre druhý odber.

Následne sa vzorky scentrifugovali (4600 otáčiek/min., 7 minút). Po centrifugácii bolo odobrané 650 µl supernatantu do dvoch eppendorfových skúmaviek spolu s 650 µl 1,2 M kyseliny chloristej. Následne sa vzorky zamrazili a neskôr sa derivatizovali.

### 5.2.4 Derivatizácia vzorkov

Derivatizácia vzorkov prebiehala rovnako za rovnakých podmienok ako je popísaný v podkapitole 6.1.4..

### 5.2.5 Chromatografické stanovenie biogénnych amínov

Chromatografické stanovenie prebiehalo rovnako a za rovnakých podmienok ako je popísaný postup v podkapitole 6.1.5..

## 6 VÝSLEDKY

### 6.1 Chromatografické stanovenie úbytku biogénnych amínov pôsobením baktérií odobraných z kvásku v Portugalsku

Sledovala sa degradácia 5 biogénnych amínov a to fenyletylamíny (FEM), putrescínu (PUT), kadaverínu (KAD), histamínu (HIM) a tyramínu (TYM) pomocou 40 kmeňov laktobacilov, ktoré boli izolované z chlebového kvásku v Portugalsku.

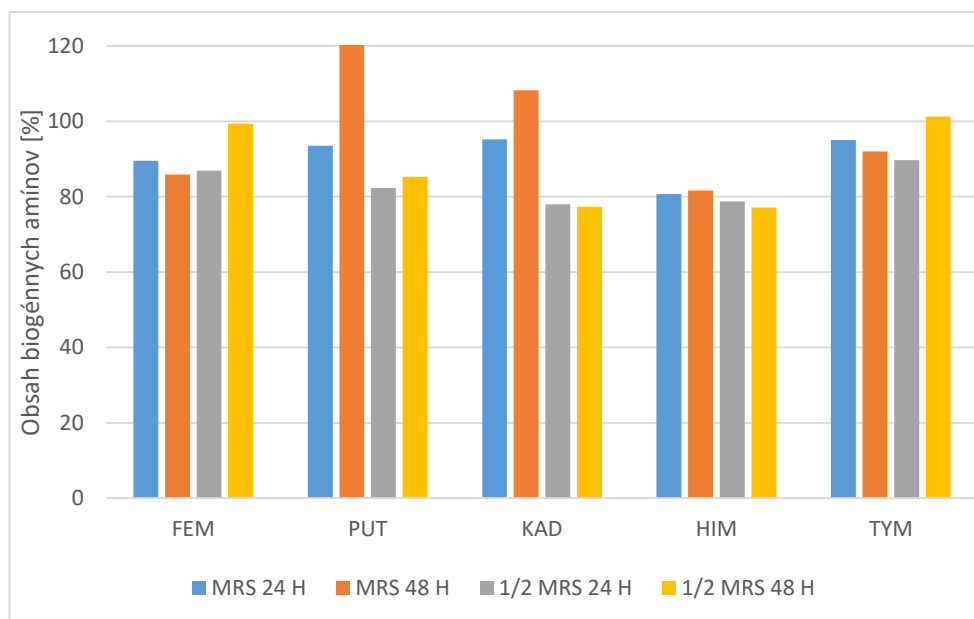
Úbytok biogénnych amínov bol zrovnaný s kontrolou, čo bol príslušný nezaočkovaný bujón.

Výsledky schopnosti degradácie kmeňov, u ktorých nedošlo v žiadnej z varianty médií po 24 a 48 hodinách k úbytku biogénnych amínov viac ako 20 % (alebo došlo k úbytku väčšieho len v jednom prípade) sú uvedené v prílohe. Jednalo sa o kmene *Lactobacillus brevis* S3-14, *Lactobacillus brevis* S3-19, *Lactobacillus brevis* S3-24, *Lactobacillus brevis* S3-30, *Lactobacillus brevis* S3-36, *Lactobacillus brevis* S8-4, *Lactobacillus brevis* S8-15, *Lactobacillus curvatus* S7-18, *Lactobacillus paracasei* S3-22, *Lactobacillus paracasei* S3-23, *Lactobacillus paracasei* S3-34, *Lactobacillus paralimentarius* S8-2, *Lactobacillus paralimentarius* S8-5, *Lactobacillus paralimentarius* S8-13, *Lactobacillus plantarum* S3-6, *Lactobacillus plantarum* S3-21.

#### 6.1.1 Degradácia biogénnych amínov kmeňami *Lactobacillus brevis*

##### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus brevis* S3-28

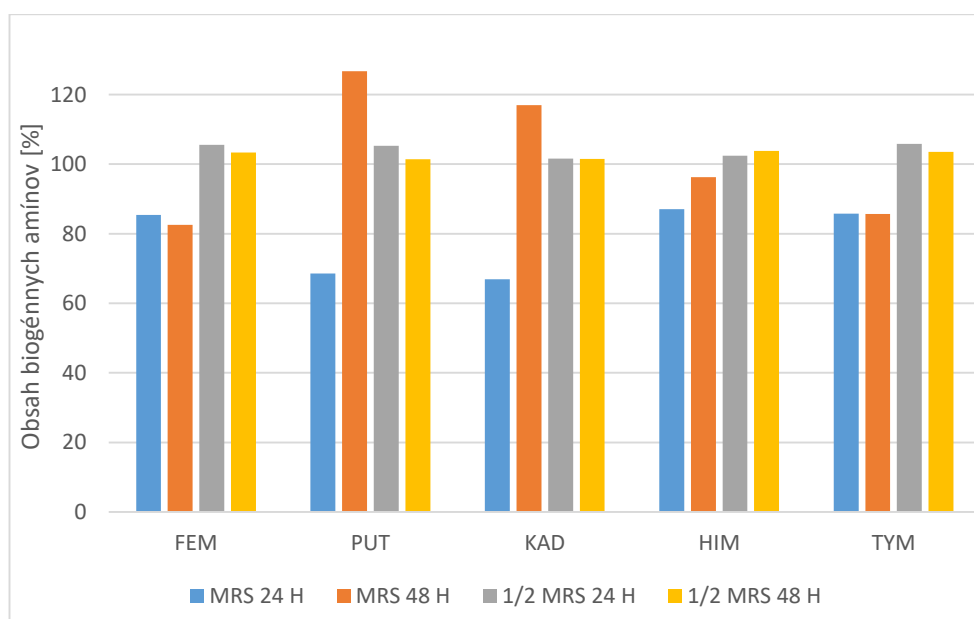
Z obrázku 2 je vidieť, že kmeň *Lactobacillus brevis* S3-28 bol schopný degradovať takmer každý jeden amín o  $\pm 20\%$  v MRS médiu a v MRS médiu s polovínnym množstvom živín (1/2 MRS), okrem fenyletylamínu vo 48 hodinách v 1/2 MRS médiu, putrescín v 48 hodinách MRS média, kadaverínu v 48 hodinách MRS média a tyramín v 48 hodinách 1/2 MRS média, kde k degradáciám nedochádzalo.



Obr. 2 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus brevis* S3-28

### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus brevis* S3-29

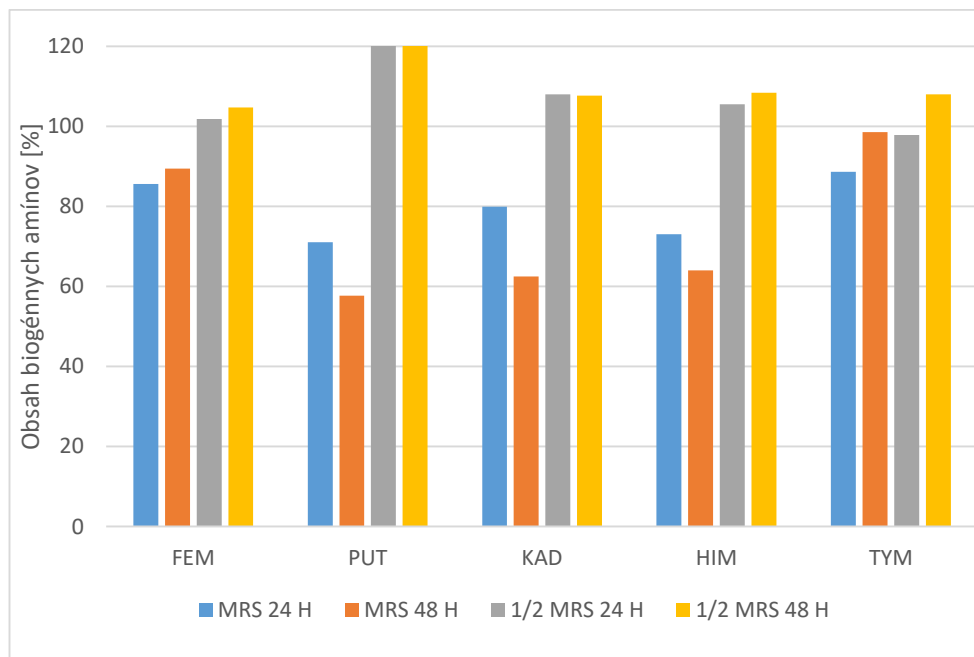
Obrázok 3 znázorňuje degradáciu biogénnych amínov *Lactobacillus brevis* S3-29, kde je zrejmé, že tento kmeň bol schopný najlepšie degradovať putrescín a kadaverín v 24 hodinách MRS pôde, kde k poklesu došlo až o 35%. Taktiež sa mu darilo degradovať aj fenyletylamín a tyramín v MRS pôde v oboch odberoch, a to takmer o 20 %.



Obr. 3 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus brevis* S3-29

### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus brevis* S3-31

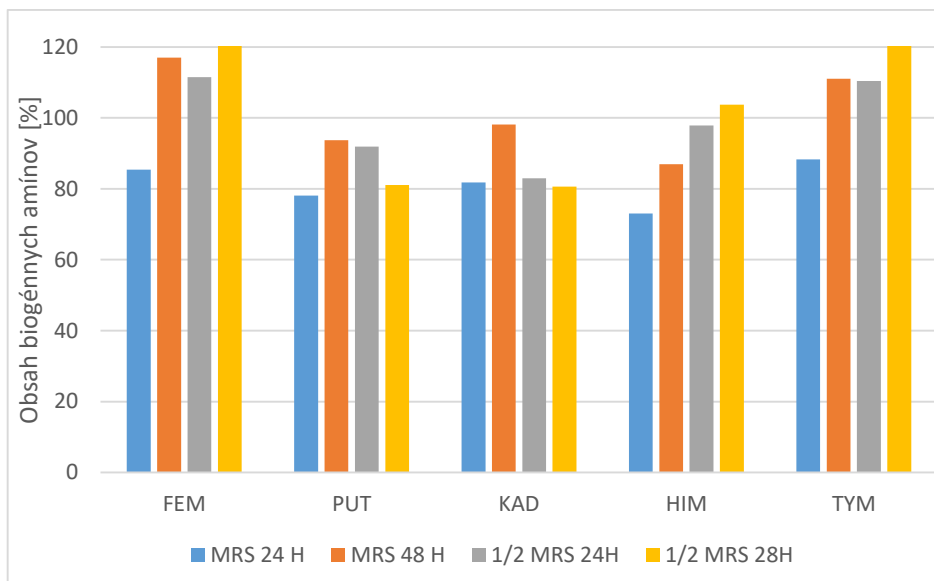
Podľa obrázku 4 *Lactobacillus brevis* S3-31 bol schopný degradovať najviac putrescín, kadaverín a histamín a to takmer o 40 % v MRS pôde v 48 hodinovom odbere. Taktiež dobre degradoval fenyletylamín, kadaverín, histamín a tyramín v MRS pôde v 24 hodinách. K degradácii v polovičnej navážke MRS média nedochádzalo.



Obr. 4 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus brevis* S3-31

### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus brevis* S3-35

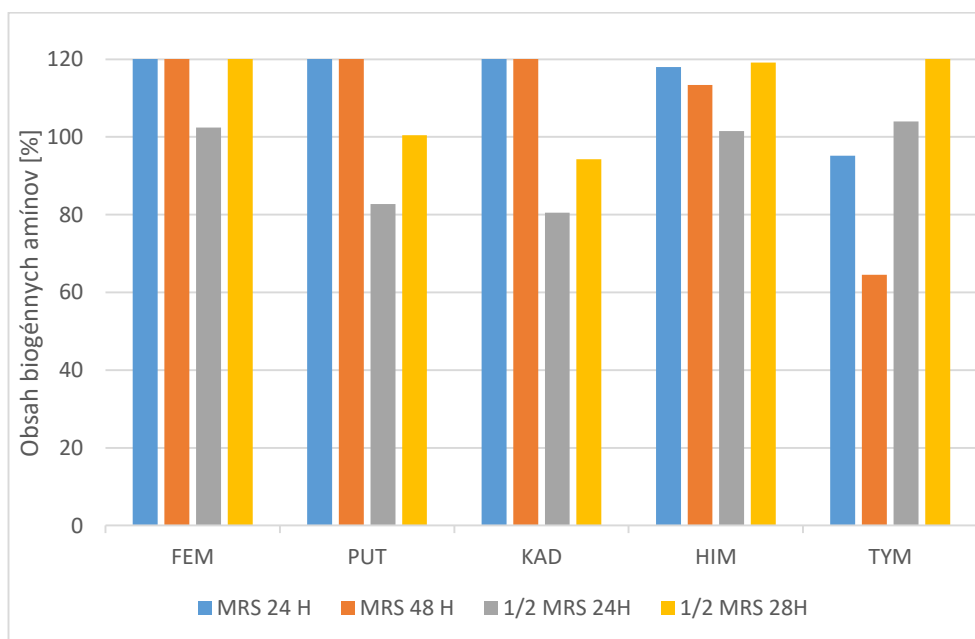
*Lactobacillus brevis* S3-35 (obr.5) je schopný degradovať všetky biogénne amíny v 24 hodinách v MRS médiu a to najlepšie zdegradoval histamín o takmer 25 % a najmenej tyramín a to o 18 %. V 48 hodinách MRS média sa jeho degradačná schopnosť zhoršila a okrem putrescínu, kadaverínu a histamínu skôr ostatné amíny produkoval, ako degradoval. V polovičnej navážke MRS média najlepšie degradoval v čase 48 hodinách a to putrescín a kadaverín takmer o 20 %.



Obr. 5 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus brevis* S3-35

#### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus brevis* S8-4

Sledovaný kmeň *Lactobacillus brevis* S8-4 bol zo všetkých amínov schopný najlepšie redukovať tyramín a to o 37 % po 48 hodinách v MRS médiu (Obr. 6). Taktiež v obrázku 5 je vidieť, že sa sledovanému kmeňu darilo viac degradovať po 24 hodinách ako po 48 hodinách.

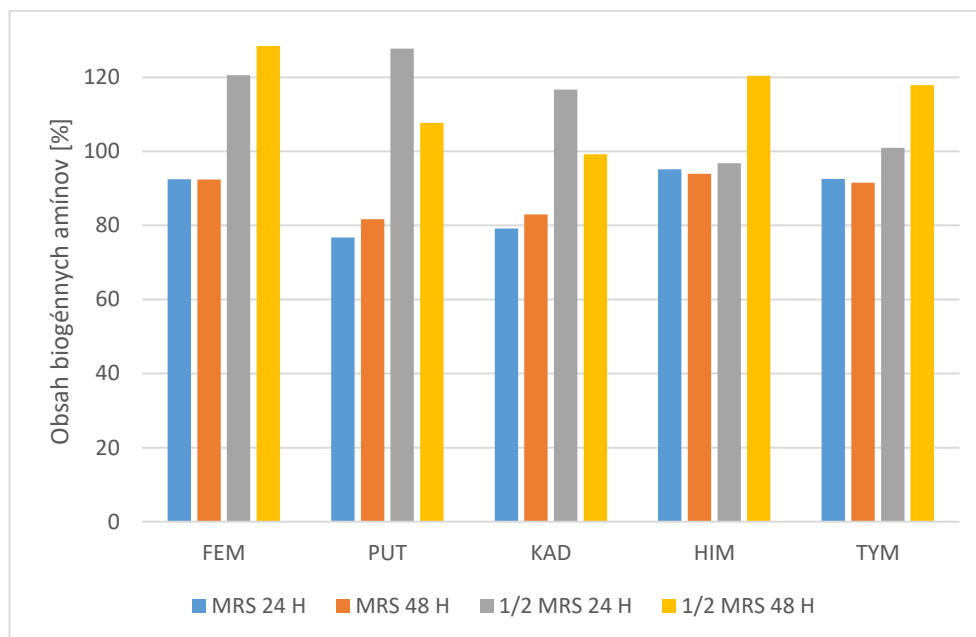


Obr. 6 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus brevis* S8-4

### 6.1.2 Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus curvatus*

#### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus curvatus* S7-18

V oboch odberoch v optimálnom MRS médiu sa *Lactobacillus curvatus* S7-18 darilo degradovať všetky biogénne amíny (obr. 7). Najlepšie ale degradoval v oboch prípadoch putrescín a kadaverín a to o  $\pm 20\%$ .

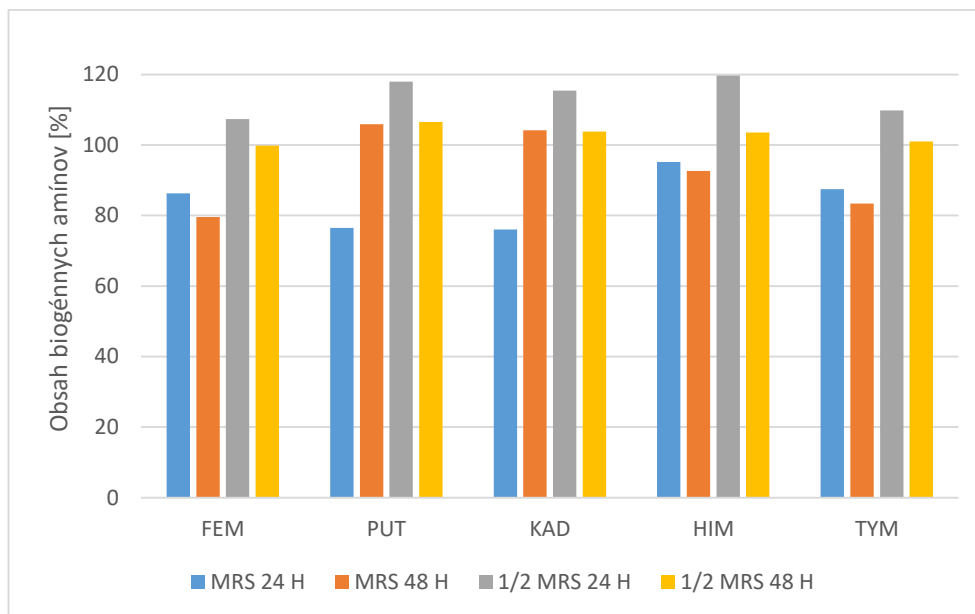


Obr. 7 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus curvatus* S7-18

### 6.1.3 Degradácia biogénnych amínov kmeňami *Lactobacillus paracasei*

#### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus paracasei* S3-25

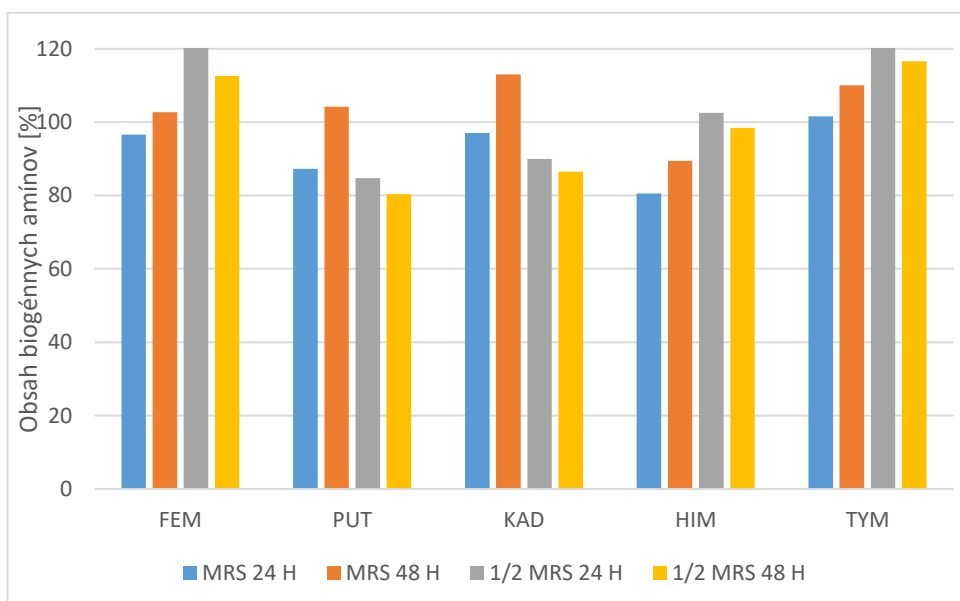
Z obrázku 8 je vidieť, že sa *Lactobacillus paracasei* S3-25 darilo degradovať všetky biogénne amíny v čase 24 hodín v MRS médiu. Najväčší úbytok biogénnych amínov bol u putrescínu a kadaverínu, kde koncentrácia týchto amínov poklesla na 75%.



Obr. 8 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus paracasei* S3-25

### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus paracasei* S3-26

Na obrázku 9 je zobrazená schopnosť kmeňa *Lactobacillus paracasei* S3-26 degradovať biogénne amíny. Tento kmeň bol schopný najviac redukovať histamín po 24 hodinách kultivácií v optimálnom médiu a to o 20 %. Taktiež sa mu dobre darilo degradovať putrescín o 20 % a to vo 48 hodinách polovičnej navážke MRS média.

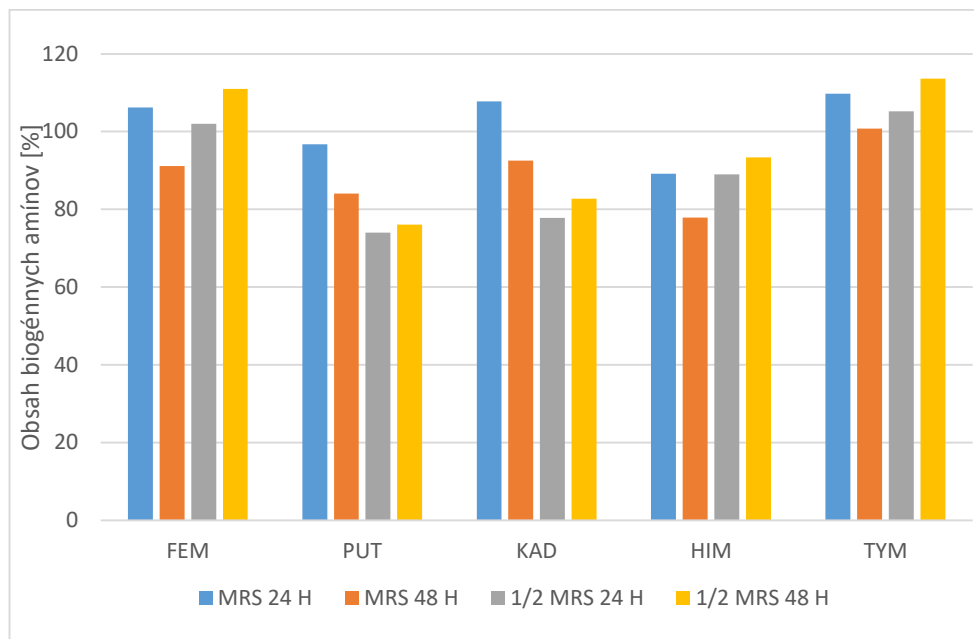


Obr. 9 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus paracasei* S3-26



### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus paracasei* S3-27

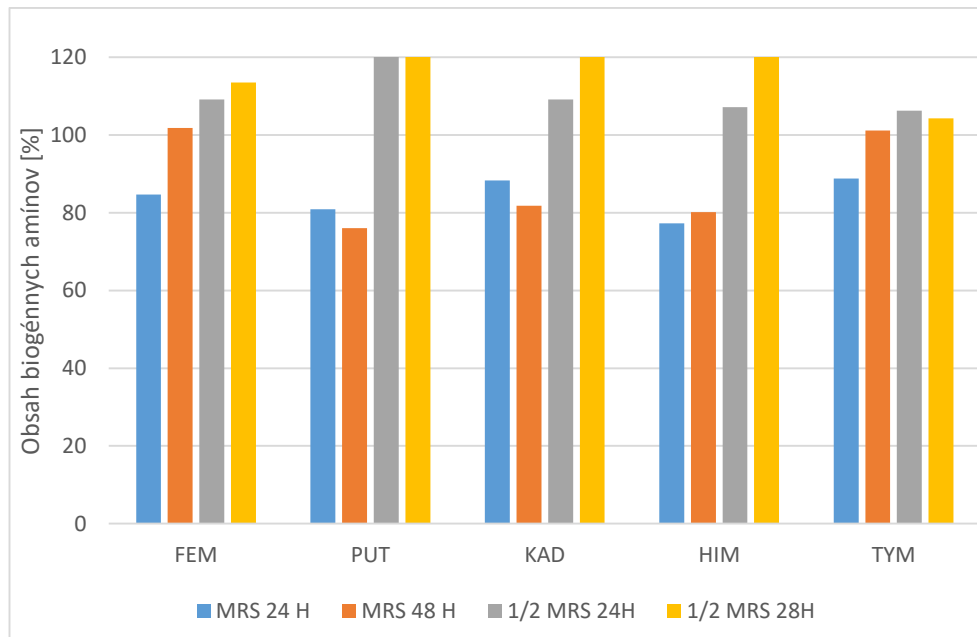
Najväčší úbytok biogénnych amínov u *Lactobacillus paracasei* S3-27 je u putrescínu v polovičnom médiu po 24 hodinovej kultivácii. Úbytok putrescínu je takmer o 30 % (obr. 10). Z obrázku je taktiež vidieť, že degradácia po 24 hodinách je menšia ako degradácia po 48 hodinách u MRS pôde, pričom u polovičnej navážke je tomu naopak.



Obr. 10 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus paracasei* S3-27

### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus paracasei* S3-32

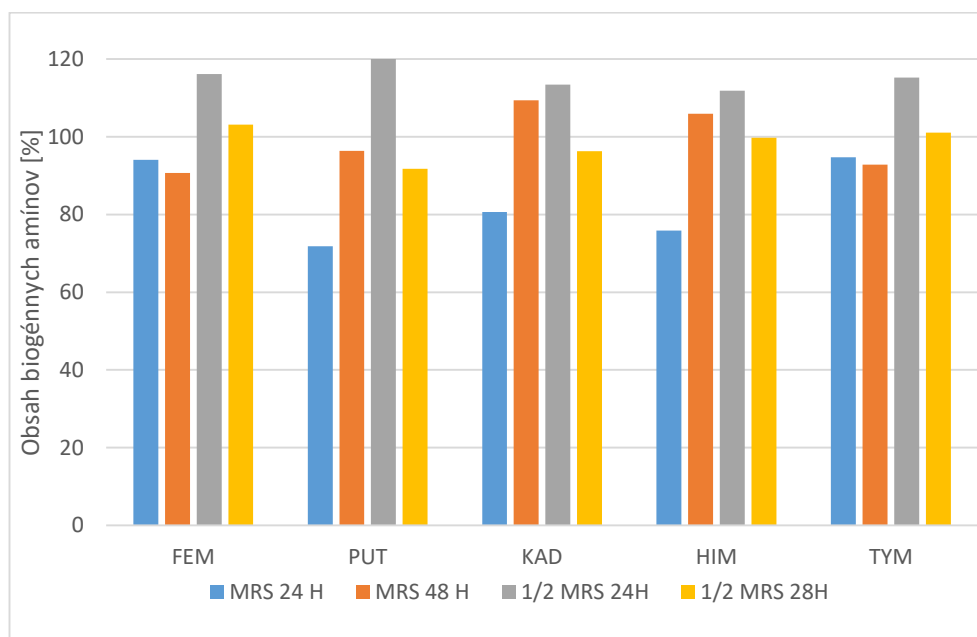
Z obrázku 11 je zobrazená schopnosť *L. paracasei* S3-32 degradovať lepšie v optimálnom MRS médiu, ako v polovičnom MRS médiu, kedy nedochádzalo ku degradácii biogénnych amínov. Najlepšie sa darilo tomuto kmeňu degradovať v 24 hodinách kde fenyletylamín, putrescín a histamín degradoval takmer o 20 %. Kadaverín a tyramín degradoval v 24 hodinách na 90 %. V 48 hodinách najlepšie degradoval putrescín, kadaverín, histamín a to o 20 %. Zvyšné fenyletylamín a tyramín nedegradoval vôbec.



Obr. 11 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus paracasei* S3-32

### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus paracasei* S3-33

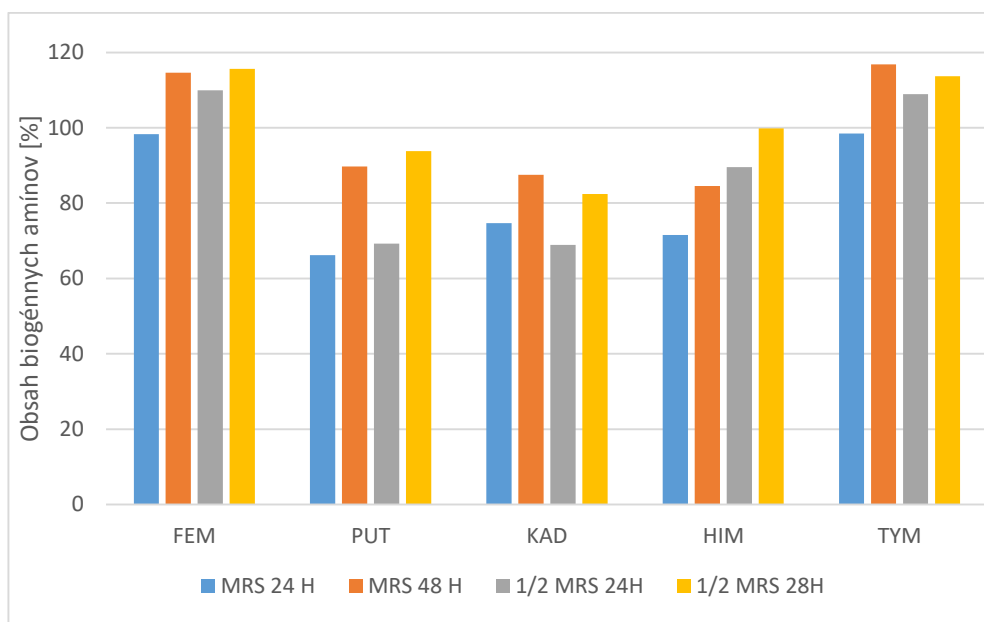
U *Lactobacillus paracasei* S3-33 je z obrázku 12 vidieť, že je schopný degradovať biogénne amíny najlepšie v 24 hodinách MRS média a to konkrétne putrescín o 30 %, histamín o 25 % a kadaverín o 19 %.



Obr. 12 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus paracasei* S3-33

### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus paracasei* S3-37

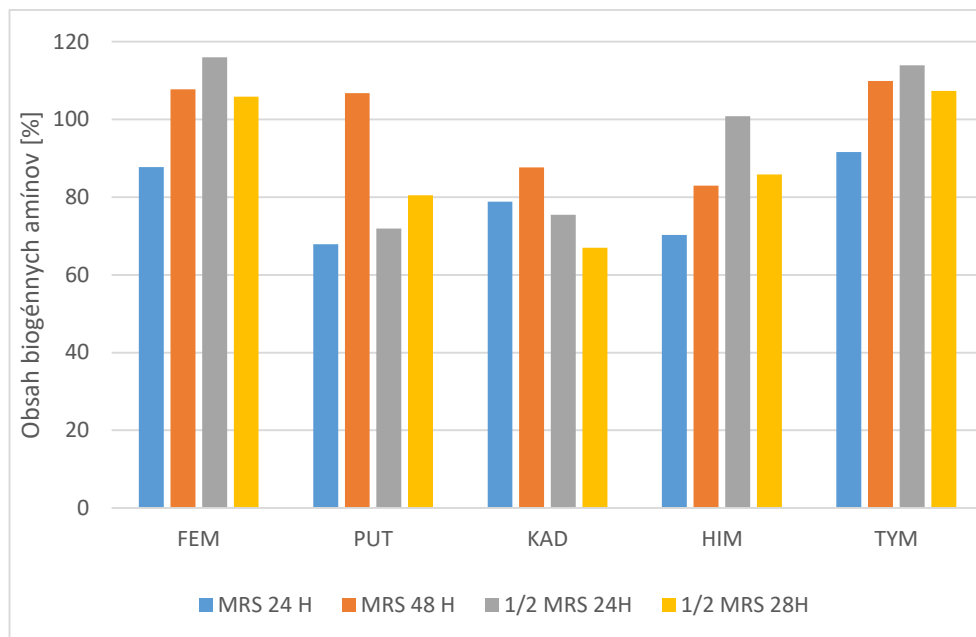
V obrázku 13 je viditeľné, že schopnosť *Lactobacillus paracasei* S3-37 degradovať biogénne amíny je lepšia po 24 hodinovej kultivácii ako po 48 hodinovej v oboch médiách. Najlepšie degradoval putrescín a to v 24 hodinách v oboch médiách, MRS a v polovičnom MRS. V oboch médiách došlo ku redukcii putrescínu o viac ako 30 %.



Obr. 13 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus paracasei* S3-37

### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus paracasei* S3-38

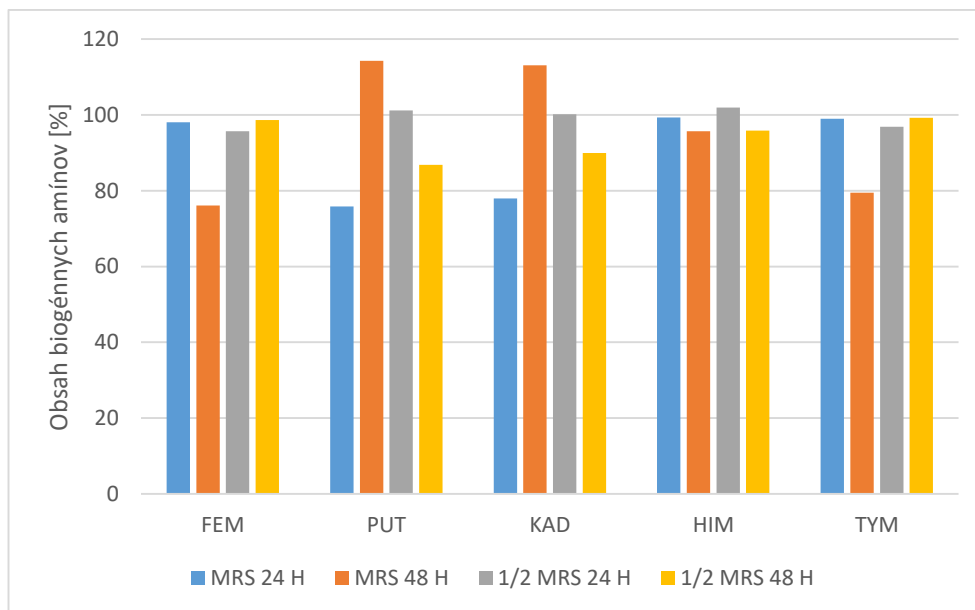
Najväčšia degradácia biogénnych amínov u *L. paracasei* S3-38 je pozorovaná z obrázka 14 u 24 hodinovej kultivácii v optimálnom médiu. Najviac v tomto médiu degradoval putrescín a to na 68 %. Ďalej dobre redukoval histamín a to na 70%. V polovičnom médiu sa tomuto kmeňu darilo najviac v 48 hodinovej kultivácii a to konkrétne kadaverín, ktorý degradoval na 67 %.



Obr. 14 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus paracasei* S3-38

#### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus paracasei* S3-40

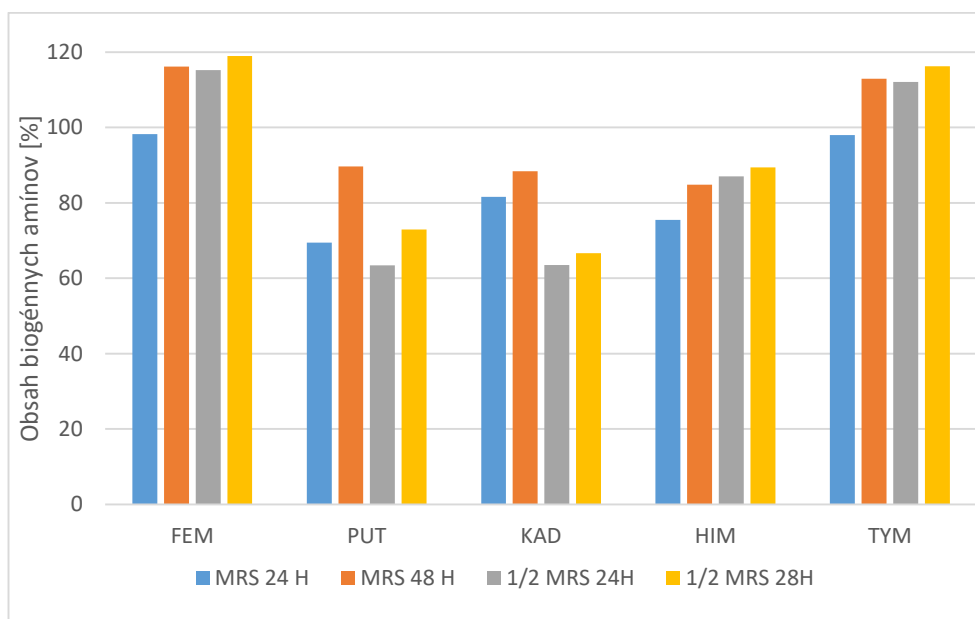
Z obrázka 15 je vidieť, že *Lactobacillus paracasei* S3-40 degradoval putrescín a kadaverín o 25 % lepšie v 24 hodinách v MRS pôde, ako v 48 hodinách toho istého média, kde naopak dochádzalo k produkcii putrescínu (o 24 %) a kadaverínu (o 20%). Naopak po 48 hodinách v MRS médiu dochádzalo k väčšej degradácii fenyletylamínu (o 24 %) a tyramínu (20%) ako to bolo u 24 hodinovej kultivácie v tomto istom médiu. V oboch prípadoch ale ku degradácii dochádzalo. U polovičného média k vysokej degradácii nedochádzalo. Najväčšia degradácia je zaznamenaná u putrescínu, a to len o 14 %.



Obr. 15 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus paracasei* S3-40

### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus paracasei* S3-42

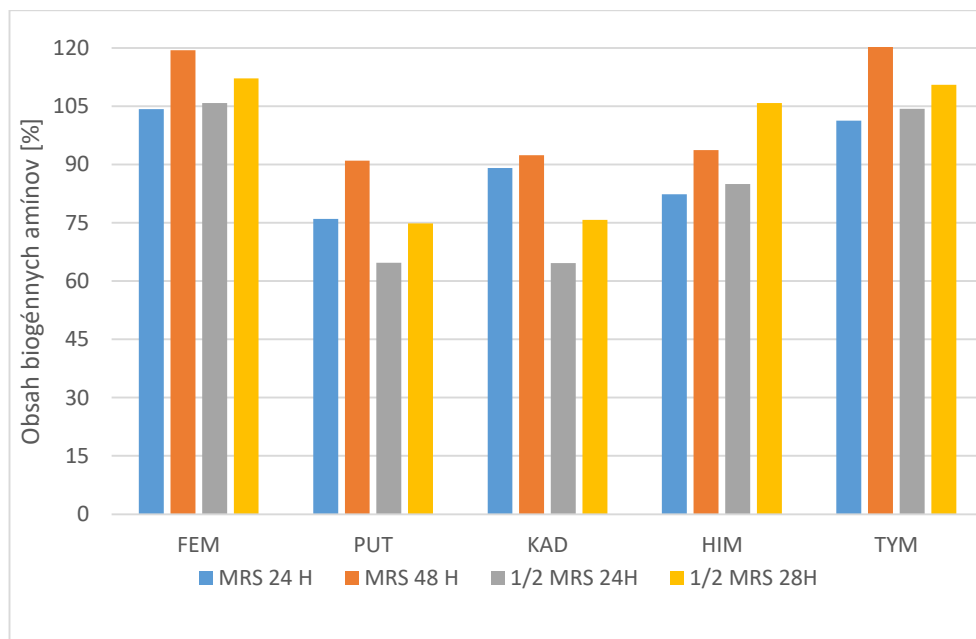
Tento kmeň *bol* schopný degradovať lepšie v polovičnom MRS médiu ako v optimálnom MRS médiu (obr. 16). V polovičnej navážke u obidvoch odberoch dobre degradoval putrescín a kadaverín, a to o viac ako 30 %. Schopnosť degradovať všetky aminy sa tomuto kmeňu darilo po 24 hodinách v MRS médiu a to putrescín na 69%.



Obr. 16 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus paracasei* S3-42

### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus paracasei* S3-45

Z obrázka 17 je vidieť, že *Lactobacillus paracasei* S3-45 nie je schopný degradovať fenyletylamín a tyramín v oboch odberoch a oboch pôdach. V oboch médiách je ale vidieť, že schopnosť degradácie je lepšia v čase 24 hodín ako v čase 48 hodín. Najviac zdegradoval tento kmeň putrescín a kadaverín a to o 36 % v polovičnej navážke MRS média pre 24 hodinový odber.

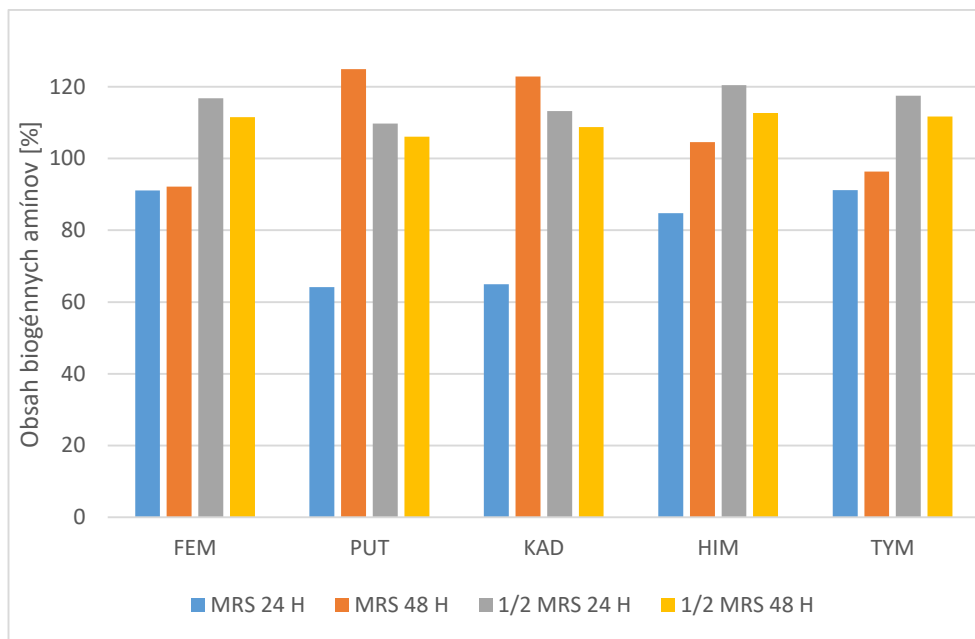


Obr. 17 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus paracasei* S3-45

#### 6.1.4 Degradácia biogénnych amínov kmeňami *Lactobacillus paralimentarius*

##### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus paralimentarius* S8-1

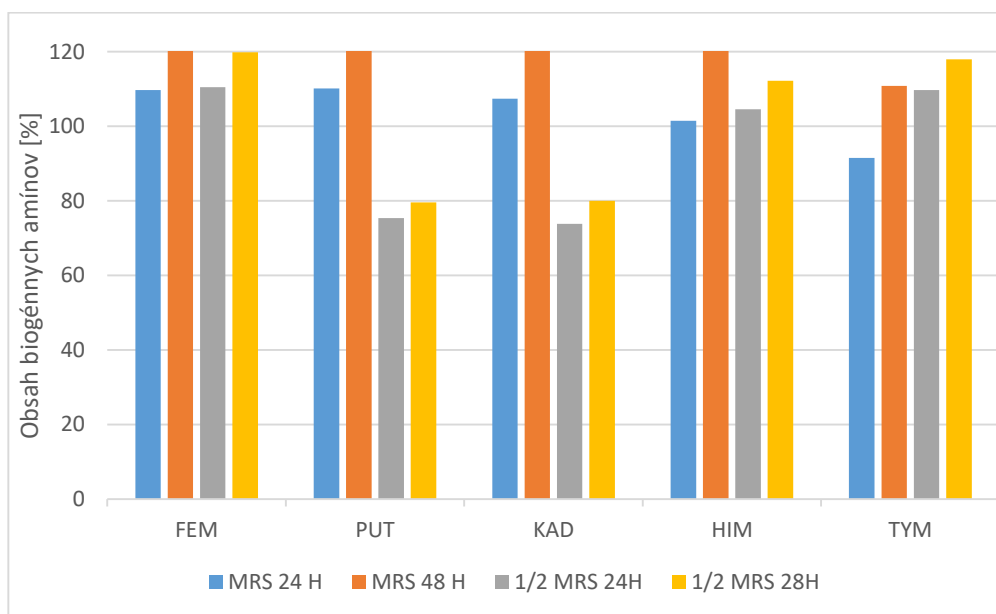
Zaujímavosťou je, že okrem výnimky fenyletylamínu a tyramínu nie je tento kmeň schopný degradácie po 48 hodinovej kultivácii v optimálnom MRS médiu a v oboch odberoch polovičného MRS média. Naopak schopnosť degradovať všetky amíny je vidieť u 24 hodinového odberu z optimálneho MRS média, kde k najväčšej degradácii došlo u putrescínu a kadaverínu a to o 36 % (obr.18).



Obr. 18 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus paralimentarius* S8-1

### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus paralimentarius* S8-3

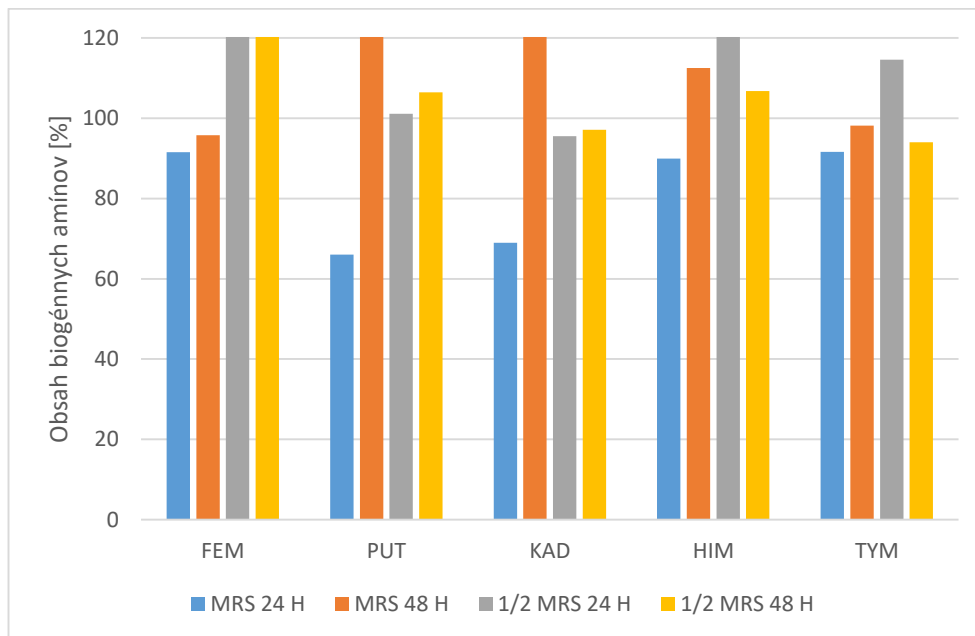
S výnimkou tyramínu po 24 hodinovom odbere v MRS médiu sa kmeňu *L. paralimentarius* S8-3 nedarilo degradovať ani jeden amín (obr. 19). V polovičnom MRS médiu najlepšie degradoval putrescín a kadaverín a to o viac ako 20% v oboch odberoch.



Obr. 19 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus paralimentarius* S8-3

**Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus paralimentarius* S8-16**

Na obrázku 20 je zobrazená schopnosť *Lactobacillus paralimentarius* S8-16 degradovať biogénne amíny. Najlepšie degradoval po 24 hodinovej kultivácii, a to putrescín a kadaverín o viac ako 30 % v optimálnom MRS médiu.

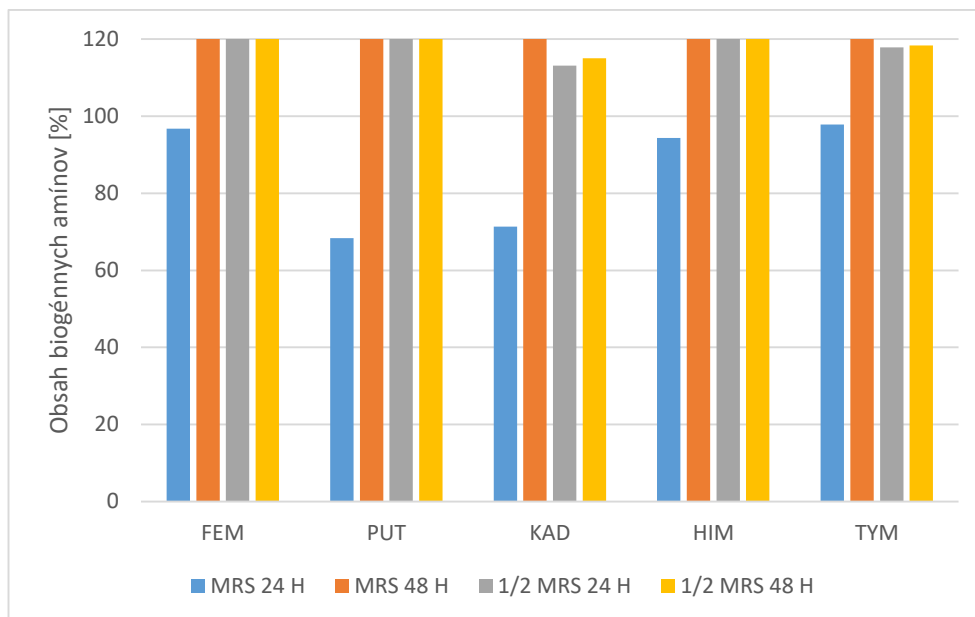


Obr. 20 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus paralimentarius* S8-16

**Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus paralimentarius* S8-17**

Z obrázka 21 je vidieť, že schopnosť *L. paralimentarius* S8-17 degradovať biogénne amíny bola len po 24 hodinovom kultivácii optimálnom MRS médiu. V ostatných prípadoch dochádzalo skôr k produkcii amínov ako degradácii. Najviac bol zdegradovaný putrescín a kadaverín a to o viac ako 30%.



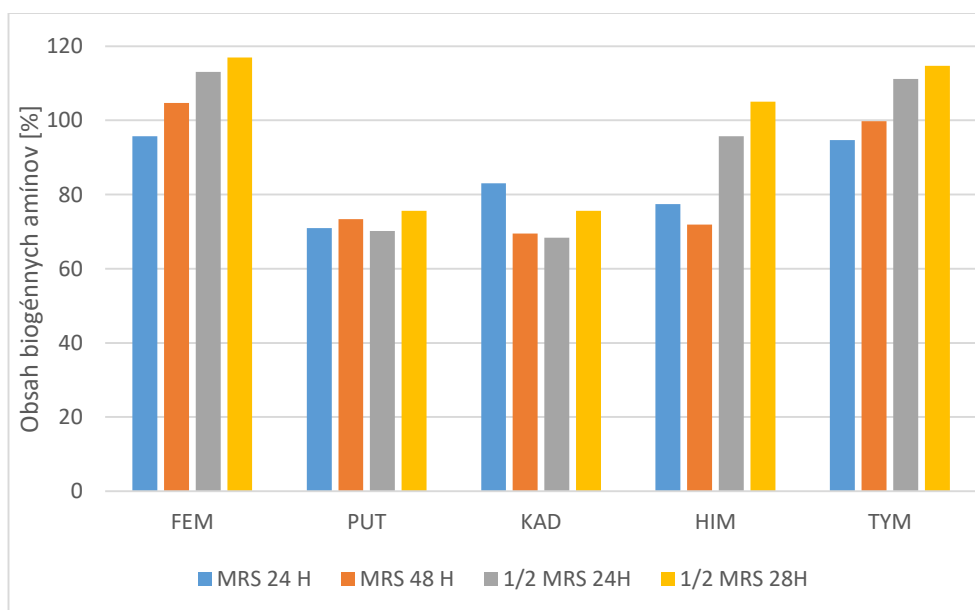


Obr. 21 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus paralimentarius* S8-17

### 6.1.5 Degradácia biogénnych amínov kmeňami *Lactobacillus plantarum*

#### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus plantarum* S4-3

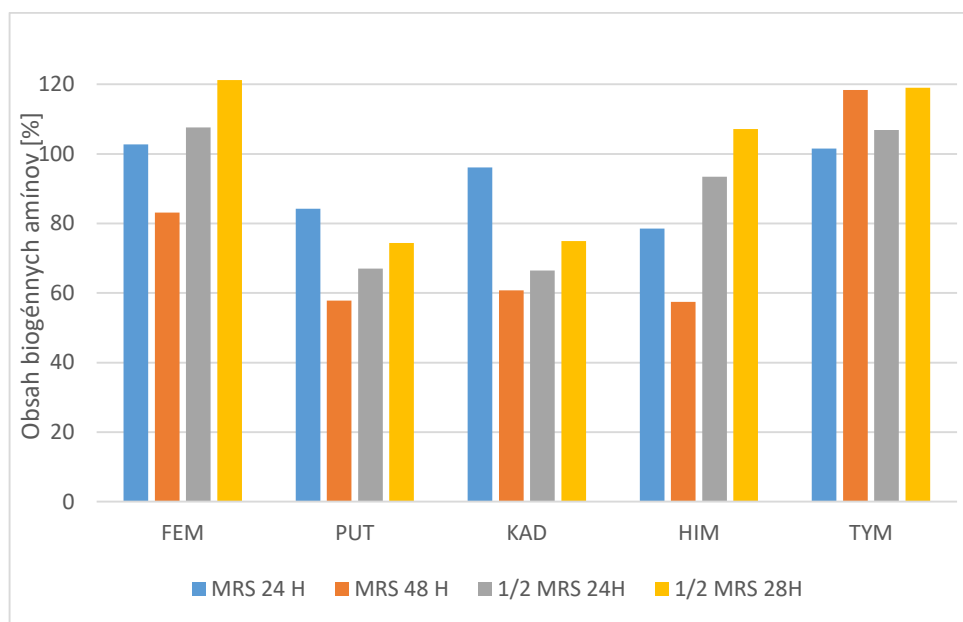
Najviac zdegradovaný amín kmeňom *L. plantarum* S4-3 bol putrescín a kadaverín, a to takmer o viac ako 25% vo všetkých prípadoch (obr. 22). S výnimkou 24 hodinového odberu v MRS médiu sa mu nedarilo degradovať fenyletylamín a tyramín.



Obr. 22 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus plantarum* S4-3

### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus plantarum* S4-19

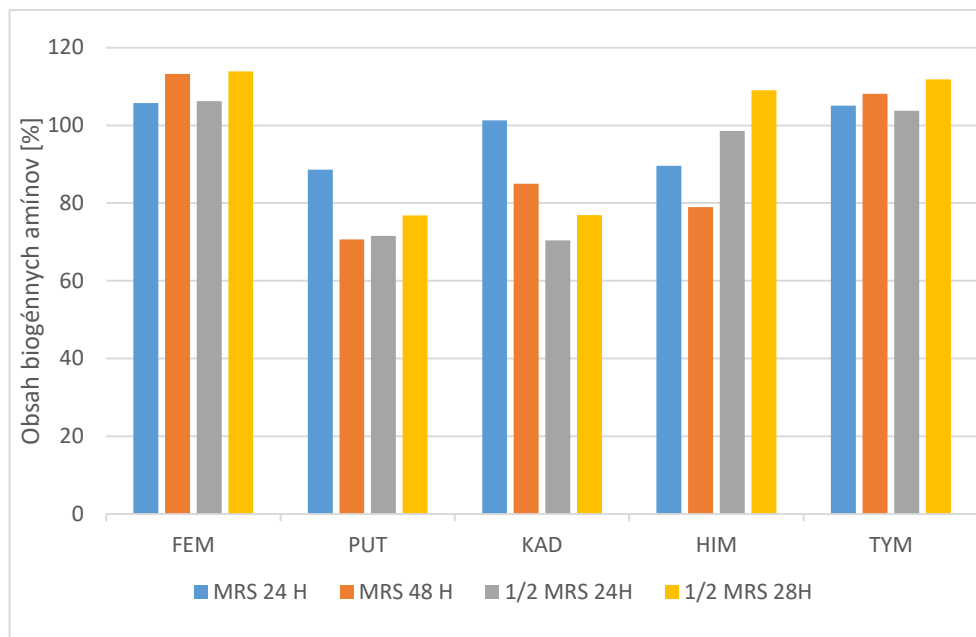
Kmeň *L. plantarum* S4-19 najlepšie degradoval putrescín, kadaverín a histamín po 48 hodinovej kultivácii v MRS médiu o viac ako 40 % (obr. 23). V polovičnom MRS médiu sa tomuto kmeňu darilo najviac degradovať putrescín a kadaverín, a to takmer o viac ako 25 % v oboch odberoch.



Obr. 23 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus plantarum* S4-19

### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus plantarum* S4-32

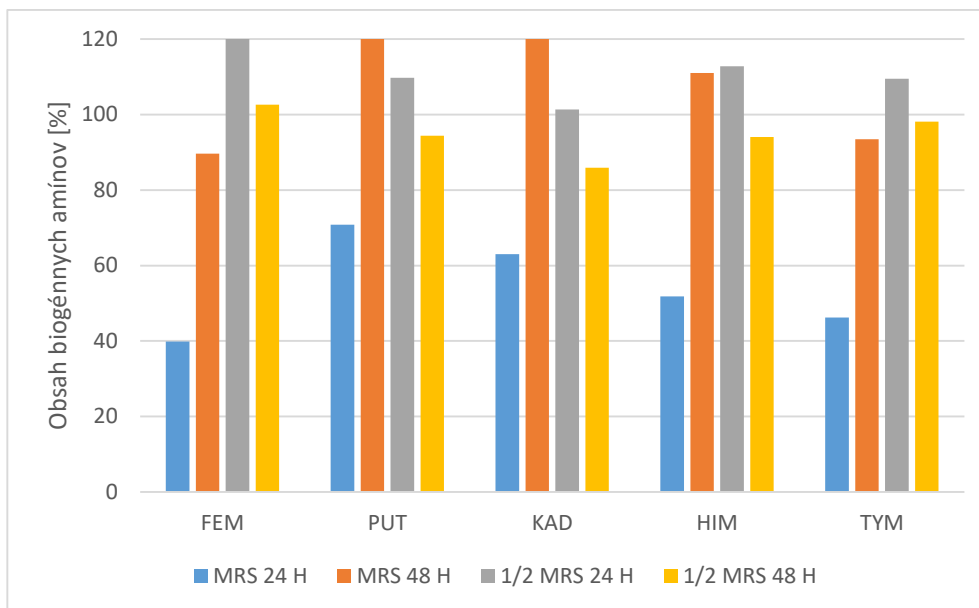
Najlepšie zdegradovaný amín kmeňom *Lactobacillus plantarum* S4-32 bol putrescín (obr. 24), a to vo všetkých prípadoch. Naopak k žiadnej degradácii nedochádzalo u fenyletylamínu a tyramínu vo všetkých prípadoch kultivácie a médií.



Obr. 24 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus plantarum* S4-32

#### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus plantarum* S8-6

Na obrázku 25 je vidieť, že kmeň *Lactobacillus plantarum* S8-6 bol schopný zdegradovať najlepšie fenyletylamín, a to o 60 % v MRS médiu po 24 hodinovej kultivácii. V tom istom médiu po 24 hodinovej kultivácii najmenej degradoval putrescín. Po 48 hodinovej kultivácii degradoval menej, ako po 24 hodinovej. Najviac však degradoval fenyletylamín a to o 10 %. V polovičnom médiu najviac degradoval po 48 hodinách kadaverín, a to o 15 %.

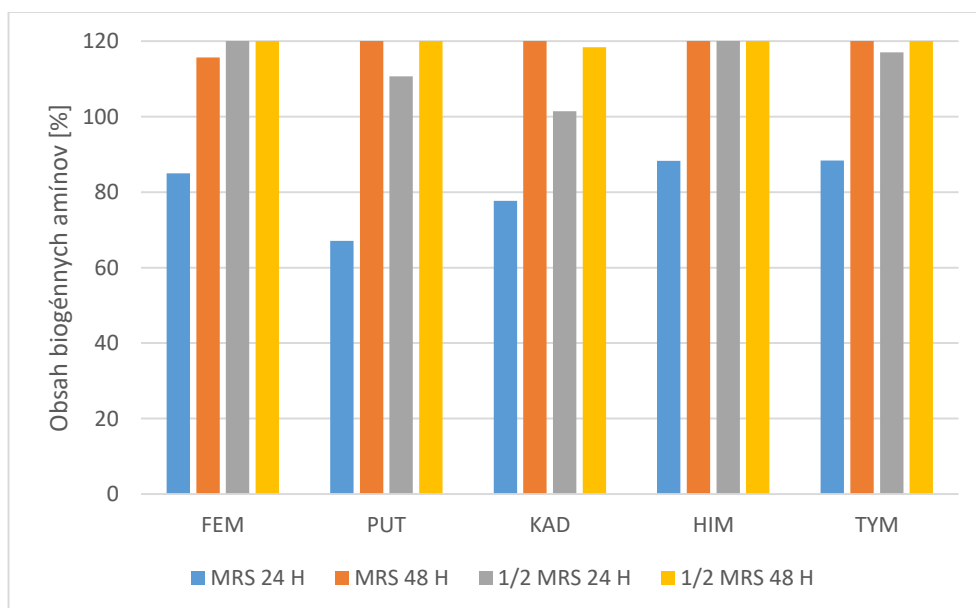


Obr. 25 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus plantarum* S8-6

### 6.1.6 Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus sakei*

#### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus sakei* S7-1

*Lactobacillus sakei* S7-1 bol schopný degradovať len v optimálnom MRS médiu po 24 hodinovej kultivácii (obr. 26). Najviac zdegradoval putrescín na 67 %, kadaverín na 77 %. Ostatné tri skúmané amíny zdegradoval pod 15 %.

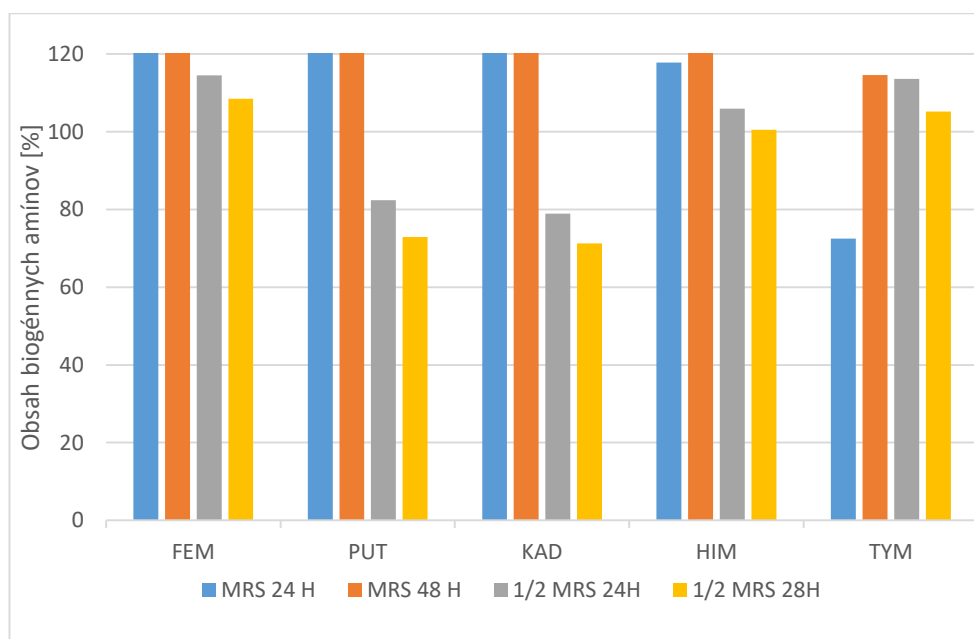


Obr. 26 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus sakei* S7-1

### 6.1.7 Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus sanfranciscensis*

#### Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus sanfranciscensis* S6-20

Na obrázka 27 je dobre vidieť, že schopnosť kmeňa *L. sanfranciscensis* S6-20 degradovať amíny nie je veľmi dobrá. Najlepšie zdegradoval v oboch kultivačných časoch v polovičnom MRS médiu, a to amíny putrescín a kadaverín. Na 72 % sa tomúto kmeňu podarilo zdegradovať tyramín, a to po 24 hodinovej kultivácii v optimálnom MRS médiu.



Obr. 27 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom *Lactobacillus sanfranciscensis* S6-20

## 6.2 Chromatografické stanovenie produkcie biogénnych amínov pôsobením baktérií odobraných z kvásku v Portugalsku

Bola sledované produkcia 7 biogénnych amínov, a to fenyletylamínu (FEM), putrescínu (PUT), kadaverínu (KAD), histamínu (HIM), tyramínu (TYM), spermidínu (SPD) a spermínu (SPM) pomocou 40 kmeňov laktobacilov, ktoré boli izolované z kvásku v Portugalsku.

Vyhodnotenie výsledkov prebiehalo vytvorením priemeru z nameraných hodnôt, vypočítaním smerodatnej odchýlky (ďalej ako SO).

### 6.2.1 Produkcia biogénnych amínov kmeňami *Lactobacillus brevis*

Vybrané kmene *L. brevis*, ako je vidieť v tabuľke 5, produkujú vysoké množstvo putrescínu (v hodnotách stoviek mg/l) v oboch odberoch, okrem kmeňa S3-24, S3-31, S8-4 a S8-15, ktoré produkujú putrescín, ale o dosť menšie množstvo. Taktiež putrescín bol viac produkovaný v kultivácii 24 hodín ako v 48 hodín. Tyramín bol produkovaný v radu stoviek (mg/l) kmeňami S3-24, S3-36, S8-4 a S8-15. U týchto kmeňov nebol detekovaný spermidín.

Tab. 5 Produkcia biogénnych amínov kmeňami *Lactobacillus brevis* v čase 24 hodín a 48 hodín

Kmeň / doba kultivácie		Biogénny amín [mg/]					
		FEM	PUT	KAD	HIM	TYM	SPM
S3-14	24 H	ND*	308.8	6.6	ND	8.6	31.3
	SO	ND	1.4	0.2	ND	1.4	0.2
	48 H	ND	278.0	13.7	ND	10.8	32.9
	SO	ND	12.2	1.4	ND	2.6	0.2
S3-19	24 H	3.7	429.0	14.0	3.3	16.2	29.2
	SO	0.2	11.3	1.6	4.7	1.8	0.2
	48 H	ND	278.0	7.9	ND	8.2	34.3
	SO	ND	1.4	1.6	ND	2.0	0.2
S3-24	24 H	5.8	3.9	ND	ND	259.2	ND
	SO	1.2	0.2	ND	ND	1.2	ND
	48 H	17.9	3.6	ND	2.2	414.4	ND
	SO	0.9	0.6	ND	5.1	4.0	ND
S3-28	24 H	1.7	389.0	9.5	1.9	7.5	21.3
	SO	0.8	4.8	0.2	1.7	1.9	0.2
	48 H	4.2	393.6	18.1	4.8	26.7	12.6
	SO	0.7	5.7	0.2	5.7	4.4	0.2
S3-29	24 H	ND	259.1	5.1	1.6	9.9	48.0
	SO	ND	4.8	2.0	0.8	2.0	0.2
	48 H	2.4	293.2	17.2	3.60	9.7	64.1
	SO	0.2	9.7	0.2	0.02	4.4	7.7
S3-30	24 H	2.5	611.5	6.8	ND	ND	ND
	SO	0.5	5.7	0.6	ND	ND	ND
	48 H	2.4	285.7	5.9	ND	20.4	ND
	SO	0.2	9.7	0.2	ND	1.5	ND
S3-31	24 H	4.4	4.3	ND	ND	57.3	1.6
	SO	0.4	1.7	ND	ND	3.4	0.2
	48 H	3.4	274.7	6.9	3.4	8.8	ND
	SO	0.2	5.7	0.3	0.4	3.1	ND
S3-35	24 H	3.7	466.6	10.1	2.8	3.4	ND

	SO	0.2	9.7	0.3	3.4	3.6	ND
	48 H	ND	129.1	3.6	ND	ND	ND
	SO	ND	9.9	0.3	ND	ND	ND
S3-36	24 H	3.9	556.2	12.2	1.8	78.9	ND
	SO	0.8	9.7	3.5	0.6	1.8	ND
	48 H	6.7	6.9	ND	ND	114.2	ND
	SO	1.2	4.4	ND	ND	3.7	ND
S8-4	24 H	5.8	9.3	ND	5.8	227.8	ND
	SO	1.2	0.14	ND	6.0	2.5	ND
	48 H	10.3	8.3	2.0	5.6	246.1	ND
	SO	2.0	0.6	0.2	0.4	5.6	ND
S8-15	24 H	13.4	15.4	7.3	11.7	247.4	3.0
	SO	0.2	0.7	0.3	0.6	3.3	0.2
	48 H	14.4	25.5	12.2	14.7	282.6	ND
	SO	0.2	0.6	0.6	0.6	2.4	ND

\*biogénny amín nedetekovaný

### 6.2.2 Produkcia biogénnych amínov kmeňami *Lactobacillus curvatus*

Kmeň *L. curvatus* S7-18 produkoval všetky biogénne amíny, okrem spermidínu (Tab.6) Najviac produkoval putrescín, kde v odbere 24 hodín produkoval 85,6 mg/l. V odbere 48 hodín produkoval dvojnásobné množstvo a to 177,4 mg/l. Ďalej dobre produkoval aj množstvo spermínu a to v čase 24 hodín 61,9 mg/l a v 48 hodín 71,9 mg/l. Spermidín neprodukoval vôbec.

Tab. 6 Produkcia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus curvatus* v čase 24 hodín a 48 hodín

		Biogénny amín [mg/]					
Kmeň / doba kultivácie		FEM	PUT	KAD	HIM	TYM	SPM
s7-18	24 H	9.3	85.6	ND*	1.6	25.7	61.9
	SO	0.8	5.2	ND	0.9	1.4	0.2
	48 H	21.3	177.4	4.9	4.2	38.4	71.9
	SO	2.4	7.6	0.4	0.6	1.6	0.2

\*biogénny amín nedetekovaný

### 6.2.3 Produkcia biogénnych amínov kmeňami *Lactobacillus paracasei*

V tabuľke 7 je vidieť produkciu biogénnych amínov vybranými kmeňami *L. paracasei*. Putrescín najviac produkovali kmene S3-32, S3-38 a S3-45 v hodnotách stoviek mg/l ale len po 48 hodinách kultivácie. Po 24 hodinách vykazovali všetky kmene nízku produkciu putrescínu. Veľká produkcia tyramínu (v hodnotách stoviek mg/l) u kmeňov

S3-26 po 48 hodinách a S3-37 po 24 hodinách (v 48 hodinách bol zaznamenaný prudký pokles v produkcii). Spermidín nebol produkovaný.

Tab. 7 Produkcia biogénnych amínov kmeňami *Lactobacillus paracasei* v čase 24 hodín a 48 hodín

Kmeň / doba kultivácie		Biogénny amín [mg/]					
		FEM	PUT	KAD	HIM	TYM	SPM
S3-22	24 H	ND*	4.0	ND	ND	8.4	25.1
	SO	ND	1.1	ND	ND	2.0	0.2
	48 H	ND	8.4	ND	ND	8.5	33.7
	SO	ND	8.7	ND	ND	3.1	0.2
S3-23	24 H	ND	6.9	ND	ND	7.2	25.8
	SO	ND	8.5	ND	ND	2.2	0.2
	48 H	ND	4.3	ND	ND	8.4	39.1
	SO	ND	1.0	ND	ND	2.8	0.2
S3-25	24 H	ND	5.9	ND	3.7	19.5	66.1
	SO	ND	7.1	ND	1.2	1.1	0.4
	48 H	ND	4.7	ND	3.7	12.8	64.1
	SO	ND	2.7	ND	2.0	3.5	0.2
S3-26	24 H	ND	4.1	ND	ND	9.8	25.3
	SO	ND	1.4	ND	ND	2.4	0.2
	48 H	3.6	4.8	ND	ND	186.7	18.1
	SO	3.2	2.5	ND	ND	2.6	0.2
S3-27	24 H	ND	6.0	ND	ND	8.1	23.7
	SO	ND	2.6	ND	ND	1.9	0.2
	48 H	ND	2.9	ND	ND	6.4	29.6
	SO	ND	1.2	ND	ND	2.7	0.2
S3-32	24 H	ND	5.6	ND	ND	2.2	1.9
	SO	ND	2.0	ND	ND	3.7	0.2
	48 H	2.3	350.0	8.7	ND	11.8	ND
	SO	1.7	298.0	7.2	ND	2.0	ND
S3-33	24 H	ND	6.0	ND	ND	ND	ND
	SO	ND	5.5	ND	ND	ND	ND
	48 H	6.6	4.8	ND	ND	92.0	ND
	SO	3.4	2.7	ND	ND	3.7	ND
S3-34	24 H	ND	6.8	ND	ND	ND	ND
	SO	ND	2.8	ND	ND	ND	ND
	48 H	ND	37.8	2.2	ND	3.3	2.7
	SO	ND	20.7	2.7	ND	1.9	0.2
S3-37	24 H	5.6	4.9	ND	ND	101.5	ND
	SO	1.0	3.3	ND	ND	4.1	ND
	48 H	4.0	735.2	32.0	4.4	53.7	ND
	SO	0.4	13.5	5.2	1.1	1.6	ND



S3-38	24 H	3.6	20.3	7.3	10.0	12.2	1.8
	SO	5.8	1.7	14.6	19.5	2.3	0.2
	48 H	4.5	604.4	21.3	6.8	6.7	ND
	SO	4.0	11.2	8.1	7.9	4.2	ND
S3-40	24 H	ND	ND	ND	ND	28.1	131.9
	SO	ND	ND	ND	ND	1.6	0.9
	48 H	ND	5.3	ND	ND	9.3	74.5
	SO	ND	2.7	ND	ND	2.4	0.2
S3-42	24 H	1.5	8.7	1.8	2.9	3.4	ND
	SO	0.9	3.6	1.2	2.1	4.5	ND
	48 H	1.8	8.4	2.0	2.3	4.4	ND
	SO	1.8	5.3	2.1	3.0	1.6	ND
S3-45	24 H	3.1	13.6	5.2	6.4	9.6	ND
	SO	2.5	11.0	5.6	6.5	2.4	ND
	48 H	2.3	420.0	13.2	1.7	1.9	ND
	SO	1.4	67.8	3.9	0.3	0.3	ND

\*biogénny amín nedetekovaný

#### 6.2.4 Produkcia biogénnych amínov kmeňami *Lactobacillus paralimentarius*

V tabuľke 8 je znázornená produkcia biogénnych amínov vybranými kmeňmi *L. paralimentarius*, kde je vidieť, že najvyššia produkcia putrescínu je zaznamenaná u kmeňa S8-3 (441,3 mg/l) po 48 hodinách kultivácie. Taktiež je zaznamenaná vysoká produkcia tyramínu u kmeňov S8-3, S8-13, S8-16, S8-17, a to v hodnotách stoviek mg/l. Produkcia spermidínu nebola detegovaná.

Tab. 8 Produkcia biogénnych amínov kmeňami *Lactobacillus paralimentarius* v čase 24 hodín a 48 hodín

		Biogénny amín [mg/l]					
Kmeň / doba kultivácie		FEM	PUT	KAD	HIM	TYM	SPM
S8-1	24 H	ND*	3.1	1.7	ND	14.9	66.7
	SO	ND	1.7	0,2	ND	1.5	0.7
	48 H	ND	5.9	ND	ND	13.0	61.8
	SO	ND	0.3	ND	ND	3.3	0.3
S8-2	24 H	1.9	11.5	ND	4.4	21.6	63.5
	SO	0.9	0.2	ND	0.3	0.9	0.2
	48 H	3.1	6.6	ND	1.7	75.5	53.7
	SO	0.8	0.3	ND	0.2	1.9	0.2
S8-3	24 H	2.9	7.2	ND	4.6	16.2	25.9
	SO	1.7	0.3	ND	0.2	2.3	0.2
	48 H	10.1	441.2	10.5	9.6	176.8	11.8
	SO	0.2	0.4	0.4	0.2	4.0	0.2

S8-5	24 H	ND	3.1	1.7	ND	14.9	66.7
	SO	ND	0.2	0.4	ND	1.5	0.7
	48 H	ND	5.9	ND	ND	13.0	61.8
	SO	ND	0.2	ND	ND	3.3	0.2
S8-13	24 H	10.1	15.0	6.1	10.6	244.9	1.5
	SO	0.3	0.2	0.3	0.2	1.0	0.2
	48 H	11.5	12.0	5.7	10.49	268.3	ND
	SO	0.3	0.2	0.2	0.20	3.4	ND
S8-16	24 H	7.2	8.5	ND	2.7	396.6	6.6
	SO	0.3	0.3	ND	0.2	3.0	0.2
	48 H	13.0	6.8	ND	ND	453.6	ND
	SO	1.2	0.3	ND	ND	2.5	ND
S8-17	24 H	7.2	8.5	ND	2.7	396.6	6.6
	SO	0.6	0.3	ND	0.4	0.8	0.2
	48 H	13.0	6.8	ND	ND	453.6	ND
	SO	2.4	0.3	ND	ND	4.5	ND

\*biogénny amín nedetekovaný

### 6.2.5 Produkcia biogénnych amínov kmeňami *Lactobacillus plantarum*

Vybrané kmene *L. plantarum* v tabuľke 9 výrazne neprodukovali biogénne amíny až na 1 prípad u tyramínu, kde je detegovaná hodnota 142,9 mg/l po 48 hodinách kultivácie u kmeňa S4-3. Taktiež kmeň S8-6 produkoval veľké množstvo spermidínu po 24 hodinách, a to 120,1 mg/l. Spermidín nebol detegovaný.

Tab. 9 Produkcia biogénnych amínov kmeňami *Lactobacillus plantarum* v čase 24 hodín a 48 hodín

		Biogénny amín [mg/]					
Kmeň / doba kultivácie		FEM	PUT	KAD	HIM	TYM	SPM
S3-6	24 H	ND*	7.3	ND	ND	11.6	47.8
	SO	ND	0.3	ND	ND	0.2	0.3
	48 H	ND	5.4	ND	ND	10.5	38.8
	SO	ND	0.3	ND	ND	0.3	0.2
S3-21	24 H	ND	5.1	ND	ND	10.2	28.3
	SO	ND	0.3	ND	ND	0.3	0.2
	48 H	ND	3.9	ND	ND	7.4	29.7
	SO	ND	0.2	ND	ND	0.3	0.4
S4-3	24 H	ND	6.7	ND	ND	2.9	ND
	SO	ND	0.2	ND	ND	1.1	ND
	48 H	9.8	6.1	1.8	2.4	142.9	ND
	SO	0.2	0.2	0.2	0.2	1.5	ND
S4-19	24 H	3.0	13.2	4.8	6.8	20.2	28.1

	SO	0.2	0.2	0.2	0.2	0.7	1.1
	48 H	1.9	10.4	2.0	5.1	15.8	30.6
	SO	0.3	0.4	0.2	0.2	0.7	0.5
S4-32	24 H	2.0	6.6	1.5	6.2	15.1	30.6
	SO	0.3	0.4	0.2	0.3	0.8	0.4
	48 H	3.0	5.9	ND	2.8	13.5	28.1
	SO	0.3	0.4	ND	0.3	0.7	0.2
S8-6	24 H	1.8	5.2	ND	ND	32.3	120.1
	SO	0.2	0.3	ND	ND	0.8	1.0
	48 H	3.1	6.2	ND	3.7	19.5	97.3
	SO	0.3	0.3	ND	0.2	0.8	0.3

\*biogénny amín nedetekovaný

### 6.2.6 Produkcia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus sakei*

Kmeň *Lactobacillus sakei* S7-1 (tab.10) neprodukoval kadaverín a spermidín. Najviac produkoval tyramín, a to po 24 hodinách kultivácie 239,5 mg/l a po 48 hodinách vyprodukoval 495,6 mg/l. Spermidín, histamín a kadaverín nebol detegovaný.

Tab. 10 Produkcia biogénnych amínov *Lactobacillus sakei* v čase 24 hodín a 48 hodín

Biogénny amín [mg/]					
Kmeň / doba kultivácie		FEM	PUT	TYM	SPM
S7-1	24 H	4.0	3.9	239.5	5.8
	SO	0.7	0.3	1.9	0.2
	48 H	14.4	6.1	495.6	1.6
	SO	0.2	0.3	1.3	0.3

\*biogénny amín nedetekovaný

### 6.2.7 Produkcia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus sanfranciscensis*

*Lactobacillus sanfranciscensis* S6-20 (tab.15) produkoval takmer všetky biogénne amíny, okrem spermidínu. Najviac produkoval spermín a to v prvom odbere 29,0 mg/l a v druhom odbere 31,4 mg/l. Spermidín nebol detegovaný.

Tab. 11 Produkcia biogénnych amínov *Lactobacillus sanfranciscensis*  
v čase 24 hodín a 48 hodín

		Biogénny amín [mg/]					
Kmeň / doba kultivácie		FEM	PUT	KAD	HIM	TYM	SPM
S6-20	24 H	2.7	8.2	1.8	4.4	14.7	29.0
	SO	0.2	0.3	0.2	0.2	0.6	1.1
	48 H	10.5	23.9	9.7	16.6	28.2	31.4
	SO	0.2	0.3	0.2	0.2	0.7	1.0

\*biogénny amín nedetekovaný

## 7 DISKUSIA

Baktérie mliečneho kvasenia zohrávajú dôležitú úlohu v potravinárskom priemysle. Ich schopnosť skvasovať sacharidy v kyselinu mliečnu a ďalšie produkty sa využíva hlavne na výrobu fermentovaných výrobkov ako sú napríklad jogurty, kefiry, syry, kyslé mlieka, fermentovaná zelenina a na výrobu fermentovaných mastných výrobkov. Produkt kyselina mliečna zachováva údržnosť potravy tým, že znižuje pH, ktoré je pre väčšinu baktérií nevyhovujúce. [14,15,16]

Okrem toho, že sa baktérie mliečneho kvasenia používajú v potravinárstve, majú aj priaznivý efekt na gastrointestinálny trakt, čo napomáha k lepšiemu tráveniu. Spolu s *Bifidobacterium* môžu tvoriť probiotickú kultúru. [34,35]

Problémom je, že niektoré baktérie mliečneho kvasenia produkujú biogénne amíny, ktoré pri vysokých koncentráciách sú toxické, pretože môžu vyvolávať psychoaktívne alebo vasoaktívne účinky. Symptómy pri konzumácii vysokých koncentrácií biogénnych amínov sú zvracanie, potenie, dýchacie problémy, rýchle búšenie srdca, migrény, hypotenzia či hypertenzia. Preto je veľmi dôležité zvoliť správny výber štartérových kultúr. [1,2]

Niektoré baktérie mliečneho kvasenia majú ale aj schopnosť degradovať biogénne amíny a to hlavne rody *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Oenococcus*. [39]

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo zistiť schopnosť produkcie a degradácie biogénnych amínov kmeňmi rodu *Lactobacillus*. Testovanie prebiehalo na 40 vybraných kmeňov izolovaných z chlebového kvásku.

Prvá časť praktickej práce bola venovaná degradácii biogénnych amínov. Vzorky najprv boli zaočkované na pôdy MRS a MRS s polovičným množstvom živín spolu s biogénnymi amínami - fenyletylamínom, tyramínom, putrescínom, kadaverínom a histamínom. Následne vzorky boli derivatizované derivatizačným činidlom dansylchloridom a potom boli vzorky spracované pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC).

Z vybraných kmeňov *Lactobacillus brevis* najväčšiu schopnosť degradácie vykazoval kmeň S3-31, ktorý v optimálnom médiu degradoval všetky biogénne amíny. Najviac degradoval putrescín (o 42%), kadaverín (o 38%) a histamín (o 37%) po 48 hodinách kultivácie. Taktiež bol schopný degradovať po 24 hodinách, ale nie tak dobre ako po 48

hodinách kultivácií (putrescín o 30 %, kadaverín o 20 %, histamín o 17 %). Žiadnemu kmeňu *L. brevis* sa nedarilo degradovať tyramín o viac ako 20 % okrem kmeňu S8-4, ktorý degradoval tyramín o 35% po 48 hodinách v optimálnom médiu.

Kmeň *Lactobacillus curvatus* S7-18 nedegradoval skoro žiadny biogénny amín v médiu s polovičným množstvom živín. Naopak v optimálnom médiu bol schopný degradovať všetky testované biogénne amíny. Aj napriek tomu, že mal v médiu s polovičnou náložkou živín väčší prístup k degradácii biogénnych amínov, viac sa mu darilo za optimálnych podmienok. Najviac degradoval putrescín a kadaverín, a to okolo 20%. Fenyletylamín, histamín a tyramín degradoval len trošičku a to maximálne o 10 %.

Z vybraných kmeňov *Lactobacillus paracasei* najviac degradoval kmeň S3-42. Ten najviac zdegradoval putrescín o 37 % a kadaverín taktiež o 37 % v polovičnom MRS médiu. Na pár výnimiek najviac degradované amíny týmto kmeňom boli putrescín a kadaverín. Taktiež histamín bol najviac degradovaný kmeňami *L. paracasei*.

Ako jediný z kmeňov *Lactobacillus paralimentarius* kmeň S8-3 degradoval biogénne amíny v médiu s polovičným množstvom živín. Ostatné vybrané kmene nedegradovali ani v tomto médiu (výnimka kmeň S8-16 ktorý vykazoval veľmi slabú degradáciu kadaverínu). Kmeň S8-3 degradoval putrescín a kadaverín v oboch kultivačných časoch v polovičnom MRS médiu o nie viac ako 25 %. O 10 % degradoval tyramín v optimálnom médiu. Najviac degradoval z týchto kmeňov kmeň S8-17, ktorý zdegradoval putrescín o 32 % a kadaverín o 29 % v optimálnom médiu v kultivačnom čase 24 hodín. Najviac degradované amíny boli putrescín a kadaverín a z grafov je taktiež patrné, že tento kmeň dobre degradoval len prvých 24 hodín. Aj napriek tomu, že mali kmene väčší prístup k amínom v 1/2 MRS médiu, v 48 hodinách, ani jeden z vybraných kmeňov nebol schopný degradácie.

Kmeň *Lactobacillus plantarum* S8-6 oproti ostatným kmeňom tohto druhu vykazoval najvyššiu degradáciu. A to hlavne po 24 hodinách kultivácie v optimálnom MRS médiu. Najviac zdegradovaný amín bol fenyletylamín a to o 61 %. V porovnaní s druhým odberom schopnosť degradácie klesla, ale stále tam nejaké známky degradácie boli (fenyletylamín v 48 hodinách o 11%). Taktiež veľmi dobre zdegradoval tyramín, a to o 54 %, histamín o 49 %, kadaverín o 37 % a putrescín o 30 % po 24 hodinách v optimálnom médiu. Naopak po ďalších hodinách schopnosť degradovať nebola zistená u putrescínu, kadaverínu a histamínu. Kmene *L. plantarum* taktiež viac degradovali

amíny putrescín a kadaverín a schopnosť degradovať sa im viac darilo v optimálnom médiu.

*Lactobacillus sakei* S7-1 vykazoval schopnosť degradácie len v prvých 24 hodinách a to len v optimálnom médiu. Najviac degradoval putrescín a to o viac ako o 35% . Následne ale po ďalších 24 hodinách schopnosť degradovať stratil a skôr začal biogénne amíny produkovať.

Kmeňu *Lactobacillus sanfranciscensis* S6-20 sa viac darilo naopak v médiu s polovičným množstvom živín, kde konkrétne najlepšie zdegradoval putrescín a kadaverín. PO 24 hodinách zdegradoval tieto 2 amíny o takmer 20 % a po 48 hodinách pokračoval v degradácií o ďalších 5 %.

Druhá časť praktickej časti práce bola venovaná produkcii biogénnych amínov tých istých kmeňov. Kmene boli kultivované v MRS médiu s prídavkom aminokyselín arginínu, ornitínu, histidínu, lyzínu, fenylalanínu a tyrozínu, ktoré slúžili ako prekursori biogénnych amínov. Následne ako to bolo v prípade degradácie boli vzorky separované pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie.

Kmene *Lactobacillus brevis* najviac produkovali putrescín (okrem kmeňa S8-4 a S8-15, ktoré v porovnaní s ostatnými vybranými kmeňmi neprodukovali množstvo putrescínu v stovkách). Najviac produkoval putrescín kmeň S3-36 a to 556,2 mg/l po 24 hodinách. Schopnosť produkovať putrescín u všetkých kmeňov bola vyššia po 24 hodinách ako po 48. Pravdepodobne dochádzalo najprv k produkcii a neskôr jeho degradácií, kedy kmeň mohol tento amín využívať ako zdroj uhlíka, dusíka alebo zároveň oboch. Spermín nebol skoro vôbec produkovaný až na výnimky. Produkcia spermidínu nebola detegovaná. Tieto polyamíny mohli byť laktobacilmi využité pre ich úlohu v bunkových funkciách (stabilizácia nukleových kyselín, membrán a podobne), a preto neboli detegované, alebo len v nízkych koncentráciách.

*Lactobacillus curvatus* S7-18 vykazoval produkciu takmer všetkých biogénnych amínov okrem spermidínu, ktorý neprodukoval vôbec. Najviac produkovaný amín bol putrescín.

Ani jeden z vybraných kmeňov *Lactobacillus paracasei* neprodukoval spermidín. Úloha tohto amínu bola diskutovaná vyššie. Iba tri kmene (S3-32, S3-38, S3-45) produkovali obrovské množstvo putrescínu po 48 hodinách kultivácie. Taktiež kmeň S3-26 produkoval obrovské množstvo tyramínu po 48 hodinách a to konkrétne 186,7 mg/l.

Okrem výnimky kmeňa *Lactobacillus paralimentarius* S8-1, ostatné testované kmene *L. paralimentarius* produkovali vysoké množstvo tyramínu, a to v hodnotách stoviek mg/l. Kmeň S8-3, v porovnaní s ostatnými, produkoval taktiež obrovské množstvo putrescínu a to 441,2 mg/l. Spermidín nebol detegovaný ani u tohto kmeňa.

Kmeň *Lactobacillus plantarum* S4-3 oproti ostatným z rovnakého druhu vykazoval vysokú produkciu tyramínu, a to 142,9 mg/l. Kmeň S8-6 produkoval oproti ostatným veľké množstvo spermínu, a to 120,1 mg/l.

*Lactobacillus sakei* S7-1 najviac produkoval tyramín a to po 24 hodinách kultivácie 239,5 mg/l a po 48 hodinách produkoval skoro dvojnásobok, a to 495,6 mg/l. Tento kmeň neprodukoval spermidín, histamín a kadaverín. I z ostatných publikácií je patrné, že baktérie mliečneho kvasenia sú schopné produkovať vyššie množstvá tyramínu. [34]

Produkcia biogénnych amínov u *Lactobacillus sanfranciscensis* nebola ani u jedného amínu nejak výrazná. Najvyššie hodnoty produkcie sú zaznamenané u spermínu, kde po 24 hodinách kultivácie produkoval 29 mg/l a po 48 hodinách produkoval o 2,4 mg/l viac. Spermidín nebol produkovaný ani u *Lactobacillus sanfranciscensis*.

Schopnosť degradácie alebo produkcie biogénnych amínov baktériami bola zisťovaná už niekoľkými štúdiami. Napríklad podľa jednej štúdie bolo zistené, že z fermentovanej klobásky boli izolované 53 kmeňov schopné produkovať biogénne amíny. Napríklad kmeň *Kocuria* vykazoval produkciu histamínu, tyramínu ale u 3 kmeňoch toho istého druhu bola produkcia tyramínu negatívna. Schopnosť produkovať u baktérií mliečného kvasenia tyramín, ale nie histamín, bola dokázaná u 4 rôznych kmeňoch rodu *Enterococcus*. V tej istej štúdií sa zaoberali aj degradáciou tyramínu, kde najvyššiu schopnosť degradácie vykazovali *L. casei* CRL705 (o 98 %) a CRL678 (o 93 %). [36]

Pre inú štúdiu sa zaoberali produkciou biogénnych amínov baktériami mliečného kvasenia, ktoré boli izolované z vína. Schopnosť degradovať arginín, a to v dvoch možnostiach pomocou arginín deiminázy alebo arginín dekarboxylázy, bola preukázaná u *Lactobacillus hilgardii* X<sub>1</sub>B. Ten istý kmeň preukázal taktiež schopnosť produkovať amíny prítomné vo víne a to putrescín, arginín a ornitín. [37]

Podľa výsledkov z experimentu ale aj zo štúdií je vidieť, že schopnosť degradácie alebo produkcie je variabilná u každého druhu a taktiež aj u kmeňov toho istého druhu. Taktiež aj u degradácie dochádzalo k pár prípadom, kde degradácia bola pozastavená po



24 hodinách a po 48 hodinách prudko nastala produkcia biogénneho amínu (napríklad putrescín na obrázku 1). Naopak, aj napriek tomu, že v ½ MRS médiu mali niektoré kmene lepší prístup k amínom, a očakávalo sa, že budú rýchlejšie degradovať, tak ku degradácií vôbec nedochádzalo (obr. 2). U produkcií ani jeden z laktobacilov nevykázal produkciu spermidínu. Taktiež v niektorých prípadoch sa stalo, že po 24 hodinách kultivácie v médiu s aminokyselinami dochádzalo ku produkcii biogénnych amínov, ale po 48 hodinách kultivácie dochádzalo k jeho degradácií (*L. brevis*, tab. 5).

Keďže tieto druhy laktobacilov boli izolované z chlebového kvásku, niektorých schopnosť degradovať už prítomné biogénne amíny v potravině alebo naopak neprodukovat' biogénne amíny v potravině, ktorá obsahuje ich prekursor, by mohli byť využité ako štartérová kultúry pre výrobu potravín. Najvyššiu schopnosť degradácie vykazovali kmene *L. plantarum* S4-3 a S4-19, ktoré degradovali putrescín, kadaverín a histamín vo všetkých možných podmienkach (24/48 hodinová kultivácia, ½ MRS/MRS). Taktiež kmeň *L. plantarum* S8-6 ako jediný vykazoval vysokú degradáciu po 24 hodinách degradácie u fenyletylamínu, putrescínu, kadaverínu, histamínu a tyramínu, ale túto schopnosť neprejavoval v ostatných podmienkach, ale ako jediný degradoval fenyletylamín a to skoro o 60 %. Využitie tohto kmeňa by mohla byť v potravinách s vysokým obsahom fenyletylamínu, kde tento kmeň by prítomný fenyletylamín mohol degradovať.

Naopak u potravín, ktoré obsahujú aminokyseliny, prekursor biogénnych amínov, by z testovaných kmeňov boli najviac vhodné kmene *L. paracasei* S3-22, S3-23 a S3-27, u ktorých fenyletylamín, kadaverín, histamín a spermidín neboli detegované. Taktiež bola nízka produkcia u ostatných amínov. najvyššiu schopnosť produkcie bola zaznamenaná u spermínu a to po 24 hodinách kultivácie 25 mg/l a po 48 hodinách 33 mg/l. Taktiež nízku produkciu amínov vykazoval kmeň *L. plantarum* S3-6, u ktorého nebola detegovaná produkcia fenyletylamínu, kadaverínu, histamínu a spermidínu. Najvyššiu produkciu vykazoval u spermínu po 24 hodinách 47,8 mg/l ale po 48 hodinovej kultivácii došlo k degradácií o 5,0 mg/l, čo je veľmi dobrá vlastnosť pre štartérové kultúry

## 8 ZÁVER

Hlavnou témou tejto bakalárskej práce boli baktérie mliečneho kvasenia, konkrétne ich schopnosť degradácie alebo produkcie biogénnych amínov. V priebehu práce boli testovaných 40 kmeňov baktérií rodu *Lactobacillus*, ktoré boli izolované z kvásku v Portugalsku. Testovalo sa ich schopnosť degradovať a produkovať biogénne amíny.

Praktická časť bola rozdelená do dvoch častí, kde v prvej časti bola opísaná schopnosť baktérií mliečneho kvasenia degradovať biogénne amíny fenyletylamín, putrescín, kadaverín, histamín a tyramín na základe kultivácie (24 a 48 hodín) a obsahu živín v médiu (MRS médium a ½ MRS média). U všetkých 40 kmeňov bola zisťovaná schopnosť degradácie pomocou chromatografickej metódy HPLC. Kmene, ktoré vykazovali najvyššiu schopnosť degradovať biogénne amíny za všetkých podmienok, a to konkrétne putrescín, kadaverín a histamín, boli kmene *Lactobacillus plantarum* S4-3 a S4-19.

Princípom druhej časti experimentu bolo zistiť schopnosť baktérií mliečneho kvasenia produkovať biogénne amíny v prítomnosti ich prekursoroch arginínu, ornitínu, histidínu, lyzínu, fenylalanínu a tyrozínu. Schopnosti laktobacilov sa sledovalo v dvoch odberoch (po 24 hodinách a 48 hodinách) v kultivačnom médiu MRS a následne boli výsledky vyhodnotené pomocou chromatografickej metódy HPLC. Najväčšiu schopnosť produkcie mal kmeň *L. paracasei* S3-37, ktorý produkoval putrescín na 735,2 mg/l po 48 hodinách kultivácie. Naopak, najnižšiu produkciu, ktorá je pre výrobu fermentovaných výrobkov dôležitejšia z dôvodu koncentrácie biogénnych amínov, bola nameraná u kmeňoch *L. paralimentarius* S3-22, S3-23 a S3-27 a *L. plantarum* S3-6. Na základe nízkej produkcie biogénnych amínov, by mohli byť tieto kmene v budúcnosti využívané ako štartérové kultúry pre výrobu fermentovaných potravín.

**ZOZNAM POUŽITÉJ LITERATURY**

- [1] SMĚLÁ, Dana, Pavla PECHOVÁ, Tomáš KOMPRDA, Bořivoj KLEJDUS a Vlastimil KUBÁŇ. CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ V TRVANLIVÝCH SALÁMECH BĚHEM FERMENTACE A SKLADOVÁNÍ. *Chemické Listy* [online]. 2004, (98), 432–437 [cit. 2019-05-05]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004\\_07\\_07.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_07_07.pdf)
- [2] SANTOS, M.H.Silla, TATIANA LORCA, GEORGE J. FLICK, MERLE D. PIERSON a HAROLD M. MCNAIR. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1996, 1999, 29(2-3), 213-231. DOI: 10.1016/0168-1605(95)00032-1. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168160595000321>
- [3] KAROVIČOVÁ, Jolana a Zlatica KOHAJDOVÁ. Biogenic Amines in Food. *Chemical Papers* [online]. 2005, 70-79. Dostupné z: [https://www.chem-pap.org/file\\_access.php?file=591a70.pdf](https://www.chem-pap.org/file_access.php?file=591a70.pdf)
- [4] ÖZOGUL, Fatih, Yesim ÖZOGUL, GEORGE J. FLICK, MERLE D. PIERSON a HAROLD M. MCNAIR. The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures: their importance in foods. *European Food Research and Technology* [online]. 2007, 1999, 225(3-4), 385-394. DOI: 10.1007/s00217-006-0429-3. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-006-0429-3>
- [5] MASSON, F, G JOHANSSON a M.C MONTEL. Tyramine production by a strain of *Carnobacterium divergens* inoculated in meat–fat mixture. *Meat Science* [online]. 1999, 1999, 52(1), 65-69. DOI: 10.1016/S0309-1740(98)00149-1. ISSN 03091740. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174098001491>
- [6] GINGERICH, TODD M., TATIANA LORCA, GEORGE J. FLICK, MERLE D. PIERSON a HAROLD M. MCNAIR. Biogenic Amine Survey and Organoleptic Changes in Fresh, Stored, and Temperature-Abused Bluefish (*Pomatomus saltatrix*). *Journal of Food Protection* [online]. 1999, 1999, 62(9), 1033-1037. DOI: 10.4315/0362-028X-62.9.1033. ISSN 0362-028X. Dostupné z: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-62.9.1033>
- [7] STADNIK, Joanna a Zbigniew J. DOLATOWSKI. Biogenic amines in meat and fermented meat products. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2010, 251-263. ISSN 1889-9594. Dostupné z: [https://www.food.acta-pol.net/pub/1\\_3\\_2010.pdf](https://www.food.acta-pol.net/pub/1_3_2010.pdf)

- [8] BOVER-CID, Sara, Teresa HERNÁNDEZ-JOVER, M. Jesús MIGUÉLEZ-ARRIZADO a M. Carmen VIDAL-CAROU. Contribution of contaminant enterobacteria and lactic acid bacteria to biogenic amine accumulation in spontaneous fermentation of pork sausages. *European Food Research and Technology* [online]. 2003, 1999, 216(6), 477-482. DOI: 10.1007/s00217-003-0691-6. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-003-0691-6>
- [9] BENKERROUM, Noredidine. Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2016, 1999, 15(4), 801-826. DOI: 10.1111/1541-4337.12212. ISSN 15414337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12212>
- [11] CALLEJÓN, S., R. SENDRA, S. FERRER, I. PARDO a HAROLD M. MCNAIR. Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2014, 1999, 98(1), 185-198. DOI: 10.1007/s00253-013-4829-6. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-013-4829-6>
- [12] ÖNAL, Armağan. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry* [online]. 2007, 103(4), 1475-1486 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.08.028. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814606006972>
- [13] GARDINI, Fausto, Maria MARTUSCELLI, Marisa Carmela CARUSO, Fernanda GALGANO, Maria Antonietta CRUDELE, Fabio FAVATI, Maria Elisabetta GUERZONI a Giovanna SUZZI. 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, 64(1-2), 105-117 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00445-1. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160500004451>
- [14] LANDETE, José María, Blanca DE LAS RIVAS, Angela MARCOBAL a Rosario MUÑOZ. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2007, 117(3), 258-269 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1016/j.ijfood-micro.2007.05.001. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160507002644>
- [15] LAPA-GUIMARÃES J a PICKOVA J. *New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. Journal of Chromatography A*. 1045, 1-2, 2004. p. 223-32.

- [16] ALI AWAN, M., I. FLEET a C.L. PAUL THOMAS. Determination of biogenic diamines with a vapourisation derivatisation approach using solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry* [online]. 2008, 111(2), 462-468 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.03.068. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608003828>
- [17] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd.* Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 978-80-86369-07-5.
- [18] TAHMOUZI, Saeed, Ramin KHAKSAR a Mehran GHASEMLOU. Development and validation of an HPLC-FLD method for rapid determination of histamine in skipjack tuna fish (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chemistry* [online]. 2011, 126(2), 756-761 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.11.060. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610014780>
- [19] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody.* Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [20] ROIG-SAGUÉS, A.X., M.M. HERNÁNDEZ-HERRERO, E.I. LÓPEZ-SABATER, J.J. RODRÍGUEZ-JEREZ a M.T. MORA-VENTURA. Evaluation of three decarboxylating agar media to detect histamine and tyramine-producing bacteria in ripened sausages. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 1997, 1999, 25(5), 309-312. DOI: 10.1046/j.1472-765X.1997.00223.x. ISSN 02668254. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1472-765X.1997.00223.x>
- [21] BURDYCHOVÁ, Radka a V. DOHNAL. Screening of probiotic cultures intended for processing of fermented foods for their ability to produce biogenic amines. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* [online]. 2008, 1999, 56(1), 25-30. DOI: 10.11118/actaun200856010025. ISSN 1211-8516. Dostupné z: <https://acta.mendelu.cz/56/1/0025/>
- [22] GRAVES, L., SWAMINATHAN, B.: Universal Bacterial DNA Isolation Procedure, Diagnostic molecular biology: Principles and application, *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1553-1561, 2007
- [23] RINGØ, Einar a François-Joël GATESOUBE. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* [online]. 1998, 1999, 160(3-4), 177-203. DOI: 10.1016/S0044-8486(97)00299-8. ISSN 00448486. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848697002998>

- [24] KLEEREBEZEMAB, Michiel, Pascal HOLS a Jeroen HUGENHOLTZ. Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2000, 1999, 26(9-10), 840-848. DOI: 10.1016/S0141-0229(00)00180-0. ISSN 01410229. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022900001800>
- [25] RAKICKÁ, Milada, Andrea MARKO, Ernest ŠTURDÍK, Martina DANIHELOVÁ, Silvia MOŠOVSKÁ a Lucia JURÍKOVÁ. VPLYV FERMENTÁCIE BAKTÉRIAMI MLIEČNEHO KYSNUTIA NA CHEMICKÚ KOMPOZÍCIU POTRAVÍN. *Chemické listy* [online]. 2015, 1999, , 371–376. Dostupné z: [http://chemicke-listy.cz/docs/full/2015\\_05\\_371-376.pdf](http://chemicke-listy.cz/docs/full/2015_05_371-376.pdf)
- [26] ADAMS, M. R. a M. O. MOSS. *Food microbiology*. 3rd ed. Cambridge, UK: RSC Publishing, c2008. ISBN 978-0-85404-284-5.
- [27] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [28] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4207-0.
- [29] STILES, Michael E. a Wilhelm H. HOLZAPFEL. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1997, 36(1), 1-29 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1016/S0168-1605(96)01233-0. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160596012330>
- [30] WOUTERS, Jan T.M, Eman H.E AYAD, Jeroen HUGENHOLTZ a Gerrit SMIT. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal* [online]. 2002, 12(2-3), 91-109 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1016/S0958-6946(01)00151-0. ISSN 09586946. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694601001510>
- [31] ARIZCUN, C, Y BARCINA a P TORRE. Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazábal cheese. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1997, 38(1), 17-24 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1016/S0168-1605(97)00091-3. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160597000913>

- [32] ŠTEGNEROVÁ, Hana, Eva NÁPRAVNÍKOVÁ, Iva STEINHAUSEROVÁ a Pavel ŠVEC. Identifikace bakterií mléčného kvašení v mase baleném v podmínkách ochranné atmosféry. *Veterinářství*, 2007, roč. 57, č. 1, s. 39-42. ISSN 0506-8231.
- [33] BARBIERI, Federica, Chiara MONTANARI, Fausto GARDINI a Giulia TABANELLI. Biogenic Amine Production by Lactic Acid Bacteria: A Review. *Foods* [online]. 2019, 1999, 8(1). DOI: 10.3390/foods8010017. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2304-8158/8/1/17>
- [34] ALVAREZ, Miguel A. a Ma Victoria MORENO-ARRIBAS. *The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution* [online]. 2014, 1999, 39(2), 146-155. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.07.007. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224414001599>
- [35] NAILA, Aishath, Steve FLINT, Graham FLETCHER, Phil BREMER a Gerrit MEERDINK. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science* [online]. 2010, 1999, 75(7), R139-R150. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x>
- [36] FADDA, S., G. VIGNOLO a G. OLIVER. *Biotechnology Letters* [online]. 23(24), 2015-2019 [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1023/A:1013783030276. ISSN 01415492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1013783030276>
- [37] ARENA, M.E. a M.C. MANCA DE NADRA. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology*. 2001, (90), 158-162.

**ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK**

FEM	Fenyletylamín
PUT	Putrescín
KAD	Kadaverín
HIM	Histamín
TYM	Tyramín
SPD	Spermidín
SPM	Spermín
SO	Smerodatná odchýlka
24 H	Kultivácia po 24 hodinách
48 H	Kultivácia po 48 hodinách
ND	Nebol detegovaný



**ZOZNAM OBRÁZKOV**

<i>Obr. 1 Homofermentatívna a heterofermentatívna cesta .....</i>	20
<i>Obr. 2 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom Lactobacillus brevis S3-28 .....</i>	36
<i>Obr. 3 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom Lactobacillus brevis S3-29 .....</i>	36
<i>Obr. 4 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom Lactobacillus brevis S3-31 .....</i>	37
<i>Obr. 5 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom Lactobacillus brevis S3-35 .....</i>	38
<i>Obr. 6 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom Lactobacillus brevis S8-4 .....</i>	38
<i>Obr. 7 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom Lactobacillus curvatus S7-18 .....</i>	39
<i>Obr. 8 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom Lactobacillus paracasei S3-25 .....</i>	40
<i>Obr. 9 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom Lactobacillus paracasei S3-26 .....</i>	40
<i>Obr. 10 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom Lactobacillus paracasei S3-27 .....</i>	41
<i>Obr. 11 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom Lactobacillus paracasei S3-32 .....</i>	42
<i>Obr. 12 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom Lactobacillus paracasei S3-33 .....</i>	42
<i>Obr. 13 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom Lactobacillus paracasei S3-37 .....</i>	43
<i>Obr. 14 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom Lactobacillus paracasei S3-38 .....</i>	44
<i>Obr. 15 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom Lactobacillus paracasei S3-40 .....</i>	45
<i>Obr. 16 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom Lactobacillus paracasei S3-42 .....</i>	45

Obr. 17 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom <i>Lactobacillus paracasei</i> S3-45 .....	46
Obr. 18 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom <i>Lactobacillus paralimentarius</i> S8-1 .....	47
Obr. 19 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom <i>Lactobacillus paralimentarius</i> S8-3 .....	47
Obr. 20 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom <i>Lactobacillus paralimentarius</i> S8-16 .....	48
Obr. 21 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom <i>Lactobacillus paralimentarius</i> S8-17 .....	49
Obr. 22 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom <i>Lactobacillus plantarum</i> S4-3 .....	49
Obr. 23 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom <i>Lactobacillus plantarum</i> S4-19 .....	50
Obr. 24 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom <i>Lactobacillus plantarum</i> S4-32 .....	51
Obr. 25 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom <i>Lactobacillus plantarum</i> S8-6 .....	52
Obr. 26 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom <i>Lactobacillus sakei</i> S7-1 .....	52
Obr. 27 Degradácia biogénnych amínov v MRS a polovičnom MRS kmeňom <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> S6-20 .....	53

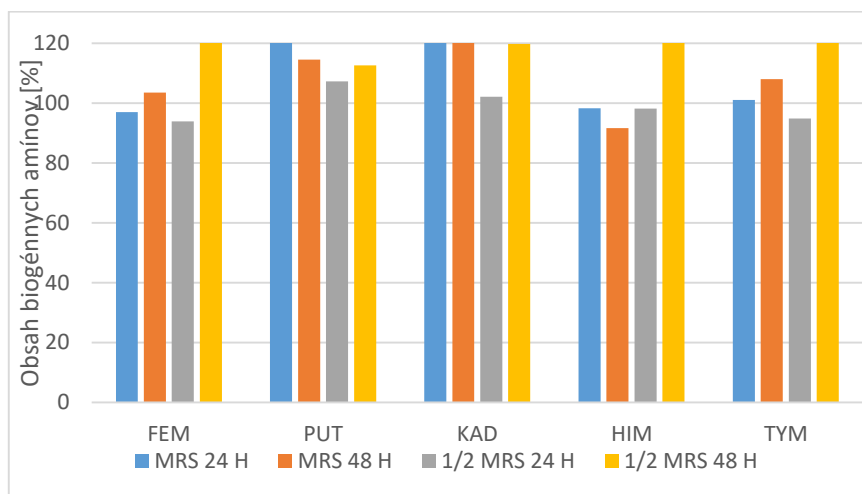
**ZOZNAM TABULIEK**

<i>Tab. 1 Prekurzory biogénnych amínov a ich štruktúra: .....</i>	12
<i>Tab. 2 Prehľad baktérií s dekarboxylačnou aktivitou .....</i>	24
<i>Tab. 3 Schopnosť degradácie biogénnych amínov pomocou baktérií mliečného kvasenia .....</i>	25
<i>Tab. 4 Zoznam použitých kmeňov .....</i>	31
<i>Tab. 5 Produkcia biogénnych amínov kmeňami Lactobacillus brevis v čase 24 hodín a 48 hodín .....</i>	54
<i>Tab. 6 Produkcia biogénnych amínov kmeňom Lactobacillus curvatus v čase 24 hodín a 48 hodín .....</i>	55
<i>Tab. 7 Produkcia biogénnych amínov kmeňami Lactobacillus paracasei v čase 24 hodín a 48 hodín .....</i>	56
<i>Tab. 8 Produkcia biogénnych amínov kmeňami Lactobacillus paralimentarius v čase 24 hodín a 48 hodín .....</i>	57
<i>Tab. 9 Produkcia biogénnych amínov kmeňami Lactobacillus plantarum v čase 24 hodín a 48 hodín .....</i>	58
<i>Tab. 10 Produkcia biogénnych amínov Lactobacillus sakei v čase 24 hodín a 48 hodín .....</i>	59
<i>Tab. 11 Produkcia biogénnych amínov Lactobacillus sanfranciscensis v čase 24 hodín a 48 hodín .....</i>	60

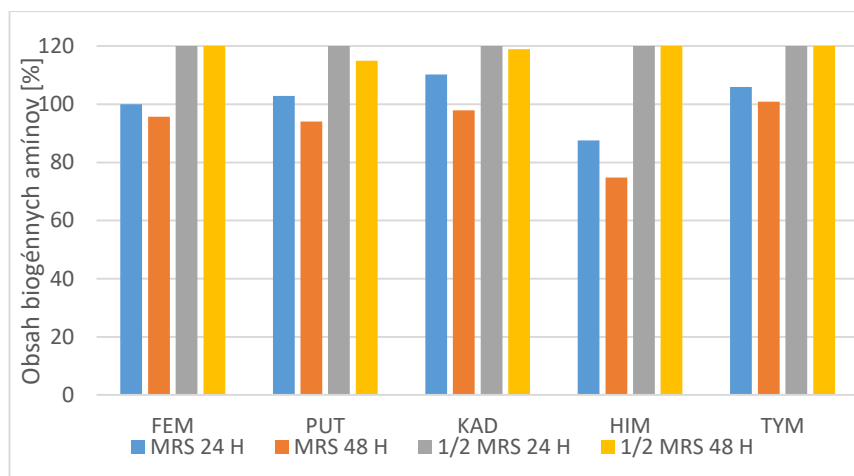
## ZOZNAM PRÍLOH

PŘÍLOHA P I: OBSAH BAKTÉRIÍ, KTORÉ NEVYKAZOVALI DEGRADAČNÚ  
AKTIVITU

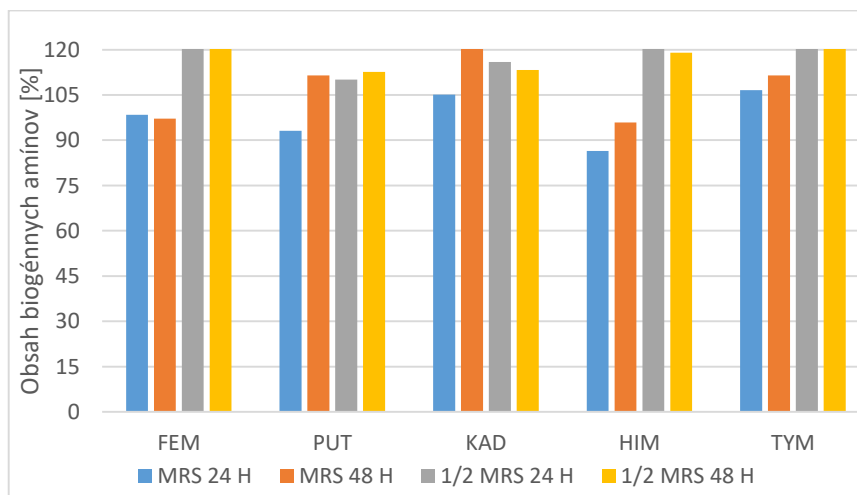
## PRÍLOHA P I: OBSAH BAKTÉRIÍ, KTORÉ NEVYKAZOVALI DEGRADAČNÚ AKTIVITU



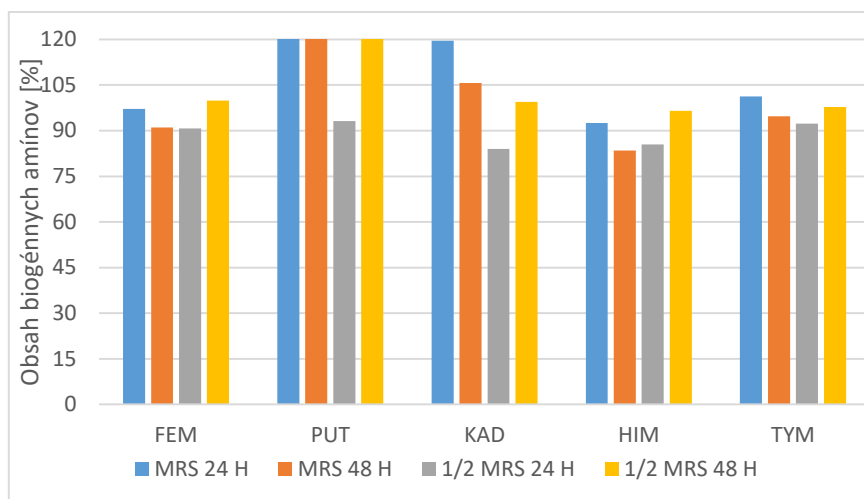
*Degradácia biogénnych amínov kmeňom Lactobacillus brevis S3-14*



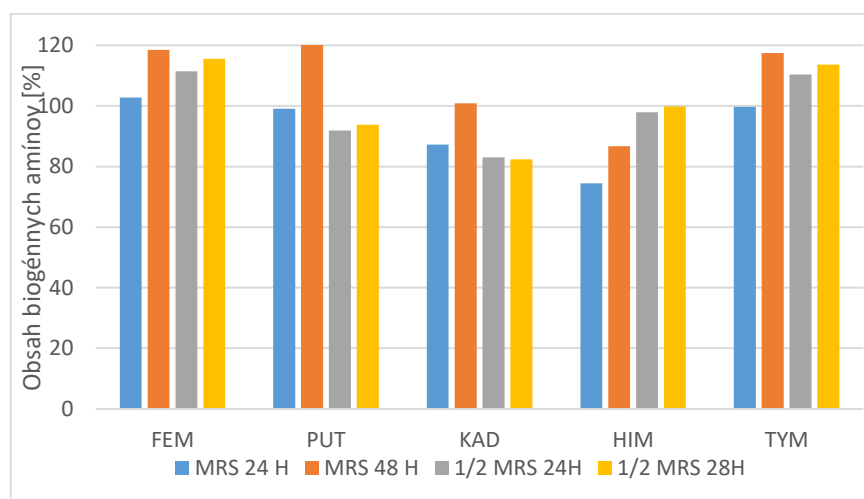
*Degradácia biogénnych amínov kmeňom Lactobacillus brevis S3-19*



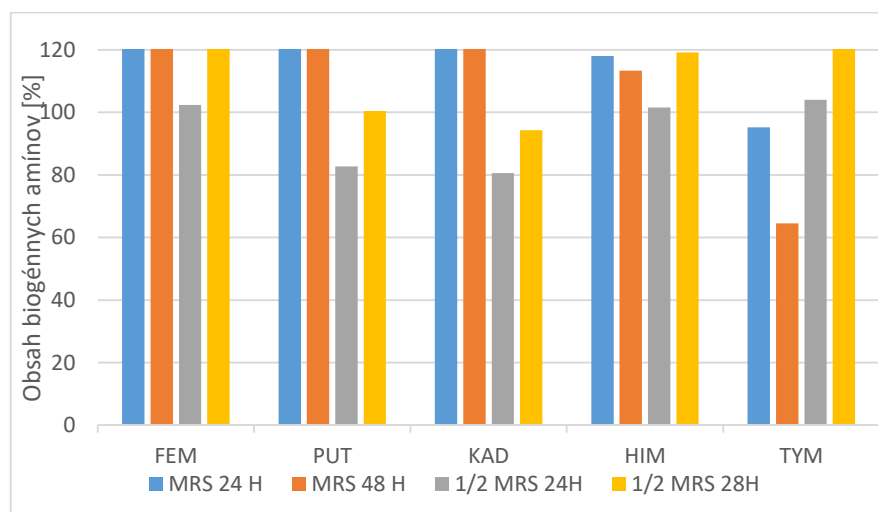
*Degradácia biogénnych amínov kmeňom Lactobacillus brevis S3-24*



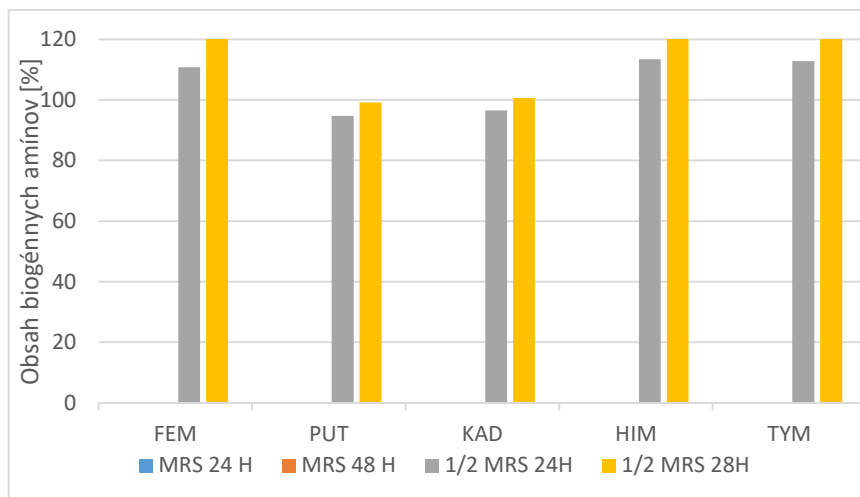
*Degradácia biogénnych amínov kmeňom Lactobacillus brevis S3-30*



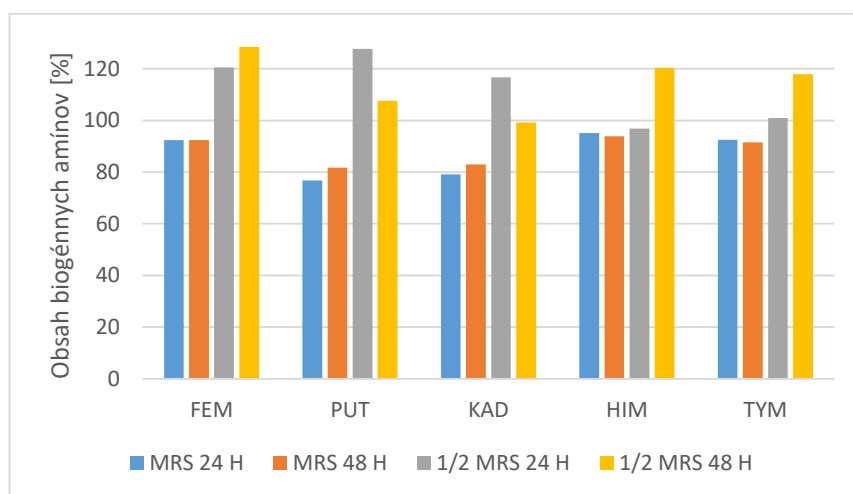
*Degradácia biogénnych amínov kmeňom Lactobacillus brevis S3-36*



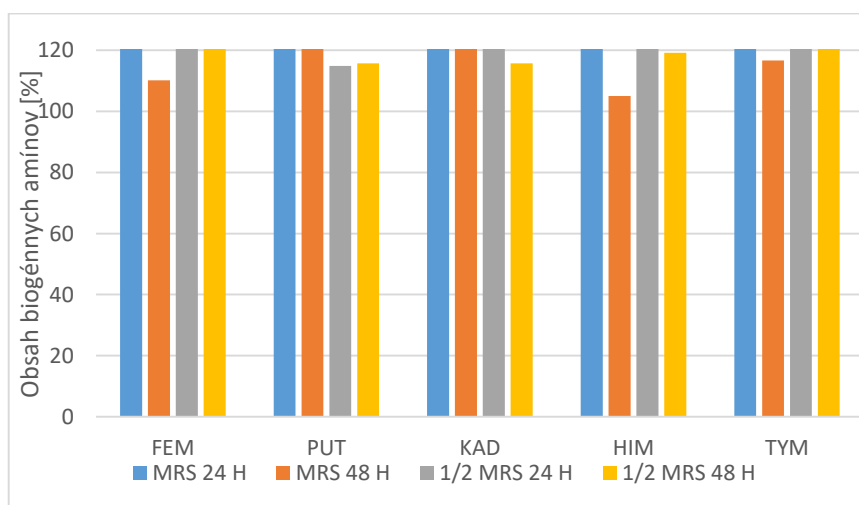
*Degradácia biogénnych amínov kmeňom Lactobacillus brevis S8-4*



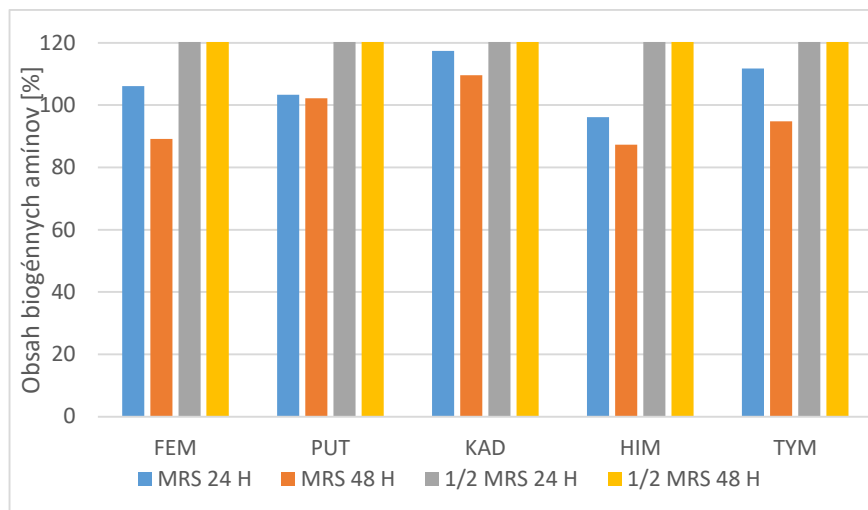
*Degradácia biogénnych amínov kmeňom Lactobacillus brevis S8-15*



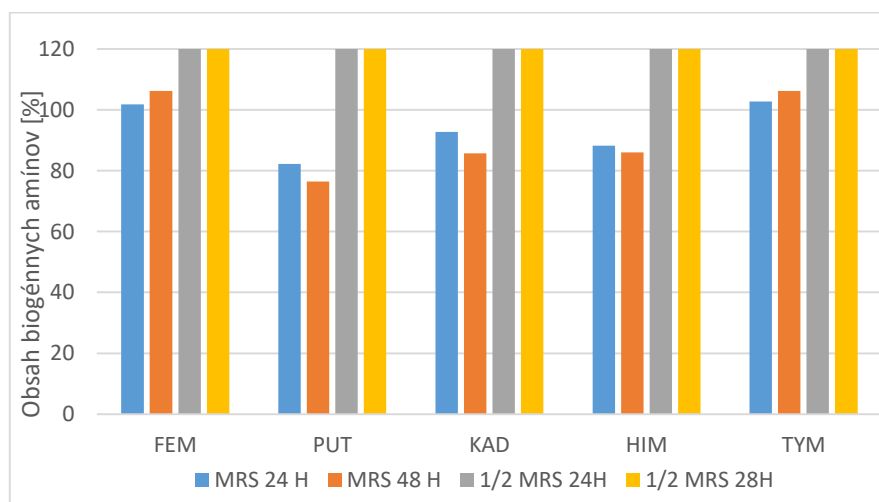
*Degradácia biogénnych amínov kmeňom Lactobacillus curvatus S7-18*



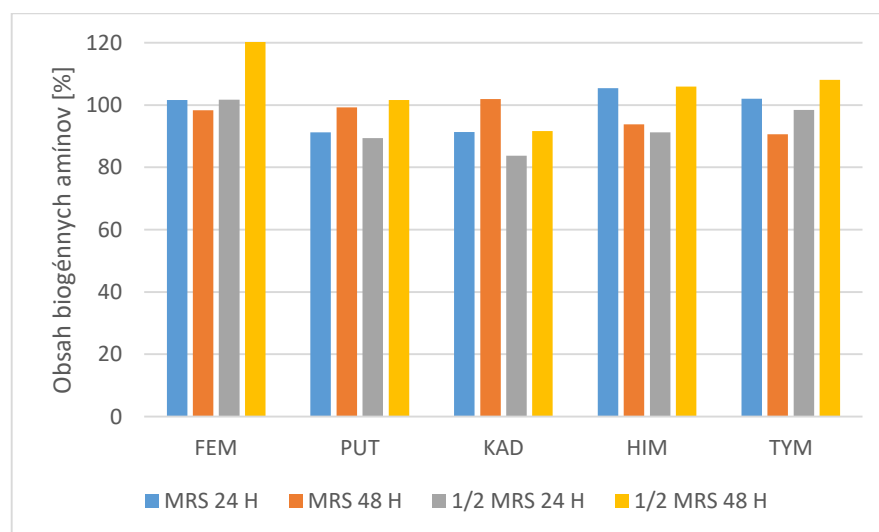
*Degradácia biogénnych amínov kmeňom Lactobacillus paracasei S3-22*



*Degradácia biogénnych amínov kmeňom Lactobacillus paracasei S3-23*

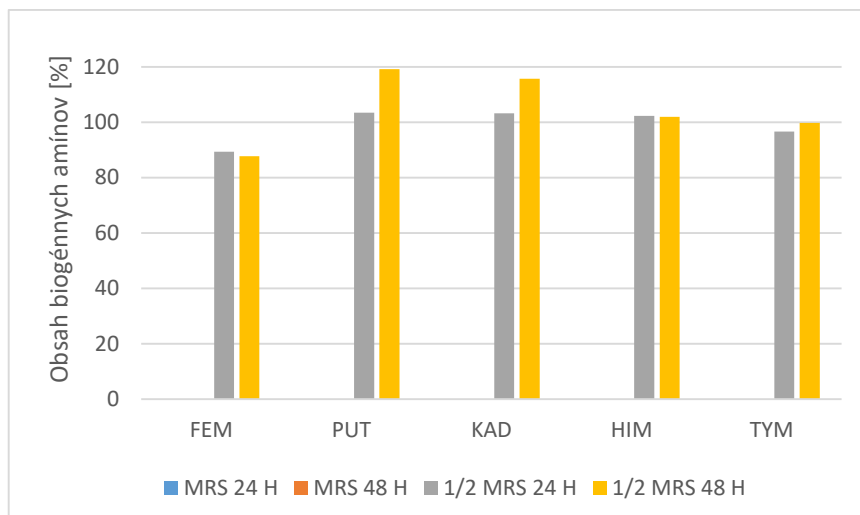


*Degradácia biogénnych amínov kmeňom Lactobacillus paracasei S3-34*

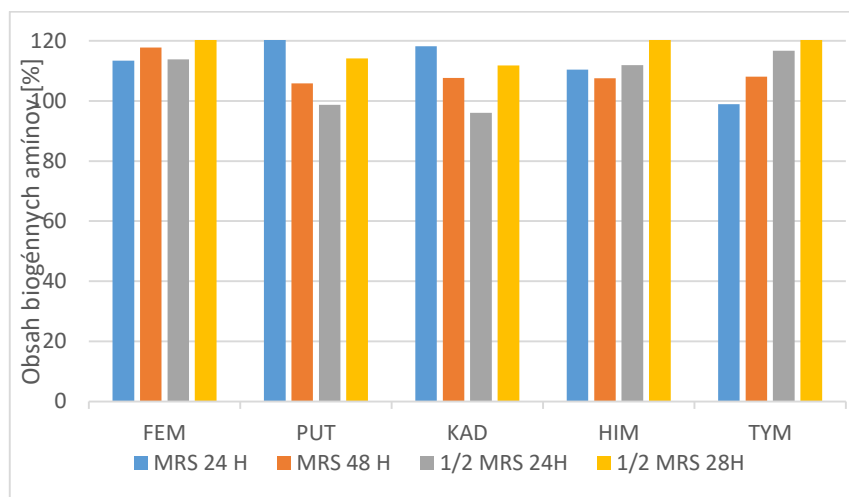


*Degradácia biogénnych amínov kmeňom Lactobacillus paralimentarius S8-2*

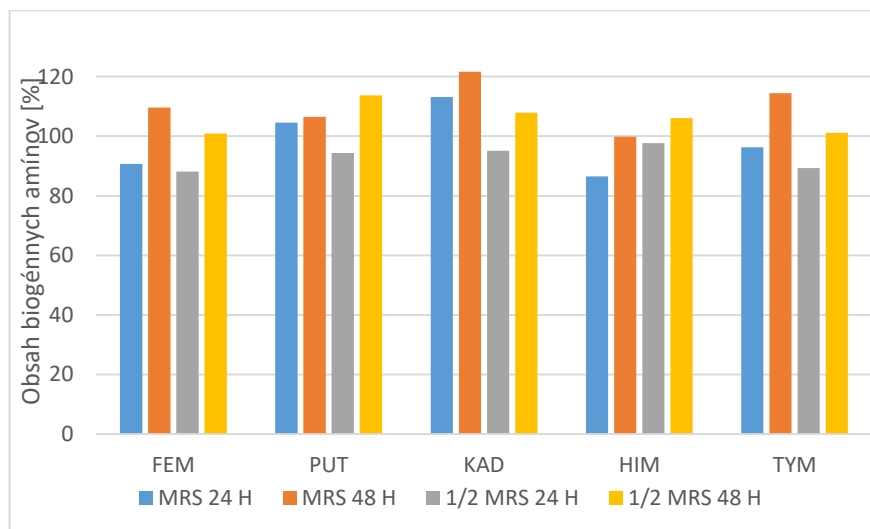




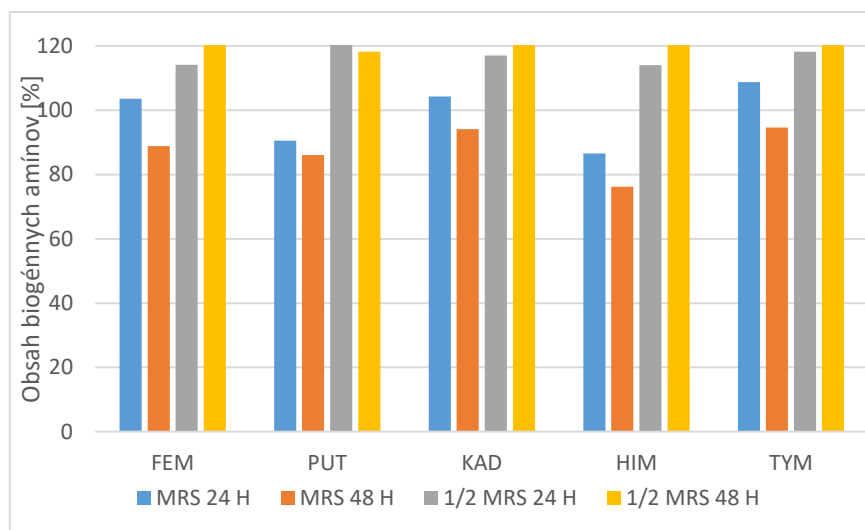
Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus paralimentarius* S8-5



Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus paralimentarius* S8-13



Degradácia biogénnych amínov kmeňom *Lactobacillus plantarum* S3-6



*Degradácia biogénnych amínov kmeňom Lactobacillus plantarum S3-21*