

Vlivy působící na produkci biogenních aminů u *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Bc. Eva Pollaková

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav biochemie a analýzy potravin
akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Eva POLLAKOVÁ**
Osobní číslo: **T08814**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Vlivy působící na produkci biogenních aminů
u *Lactococcus lactis* subsp. *lactis***

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika biogenních aminů.
2. Vznik biogenních aminů.
3. Mikroorganismy produkující biogenní aminy.

II. Praktická část

1. Metodika stanovení produkce biogenních aminů.
2. Sledování vlivu vybraných vnějších faktorů na produkci biogenních aminů, u *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* metodou iontově-výměnné chromatografie.
3. Formulace závěrů na základě získaných výsledků.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

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

[2] SAAID, M., SAAD, B., HASHIM, N. H., ALI, A. S. M., SALEH, M. I., Determination of biogenic amines in selected Malaysian food, *Food Chemistry* 113, 2009, 1356 -- 1362

[3] YONGJIN, H., WENSHUI, X., XIAOYONG, L., Changes in biogenic amines in fermented silver carp sausages inoculated with mixed starter cultures, *Food Chemistry*, 2007, 104, 188 -- 195

[4] ÖNAL, A., A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods, *Food Chemistry* 103, 2007, 1475 -- 1486

[5] SHALABY, A. R., Significance of biogenic amines to food safety and human health, *Food Research International* 7, Vol. 29, 1996, 675 -- 690

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

4. ledna 2010

Termín odevzdání diplomové práce:

19. května 2010

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá tvorbou biogenních aminů bakteriemi mléčného kvašení. Teoretická část je zaměřena na charakteristiku biogenních aminů, včetně jejich významu a toxických účinků, vznikem, výskytem v potravinách a dále jsou zde popsány mikroorganismy, které je produkují. Nakonec je věnována pozornost také některým metodám stanovení těchto látek.

V praktické části této práce byl sledován vliv vybraných vnějších faktorů (přídavek laktózy, NaCl a aerobní/anaerobní prostředí) na tvorbu biogenních aminů kmeny *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*. Stanovení biogenních aminů proběhlo pomocí iontově-výměnné kapalinové chromatografie, postkolonové ninhydrinové derivatizace a spektrofotometrické detekce ($\lambda = 570 \text{ nm}$).

Klíčová slova: biogenní amin, dekarboxylace, *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*

ABSTRACT

This thesis deals with formation of biogenic amines by lactic acid bacteria. Theoretic part deals with a common characteristic biogenic amines, with their significancy and toxic effects, genesis, occurrence in food. In other are described microorganisms producing biogenic amines. In the end is paid attention also to some methods of determination of these compounds.

In practical part of this work was obtained exogenous factors (lactose and NaCl concentrations and aerobic/anaerobic conditions) effect on a produce biogenic amines by strain *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*. Determination of biogenic amines was analyzed by ion-exchange chromatography.

Keywords:

biogenic amine, dekarboxylation, *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především RNDr. Leoně Buňkové Ph.D. za odborné vedení, praktickou pomoc, trpělivost a udělování cenných rad, které mi věnovala při zpracování mé diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat Ing. Františku Buňkovi Ph.D. a laborantce Lence Plechačové za ochotu a pomoc při měření praktické části této diplomové práce.

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

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně, 14.5.2010

Pollaková

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

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

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

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

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

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

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá

(2) -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.

(3) 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.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ.....	12
1.1 STRUKTURA A VÝZNAM BIOGENNÍCH AMINŮ	13
1.2 STRUKTURA A VÝZNAM POLYAMINŮ	14
1.3 TOXICKÉ ÚČINKY BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ	16
1.3.1 Histamin	17
1.3.2 Tyramin	18
1.3.3 Detoxikace biogenních aminů	18
1.4 INDEX BIOGENNÍCH AMINŮ	19
2 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ.....	20
2.1 PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ.....	20
2.2 VZNIK POLYAMINŮ	21
2.2.1 Syntéza <i>de novo</i>	21
2.2.2 Retrokonverze	22
2.2.3 Bakteriální syntéza	22
2.3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ.....	22
2.3.1 pH.....	23
2.3.2 Chlorid sodný	23
2.3.3 Teplota.....	23
2.3.4 Další faktory	24
3 MIKROORGANIZMY PRODUKUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY	25
3.1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	25
3.1.1 <i>Lactococcus lactis</i>	26
3.2 OSTATNÍ DEKARBOXYLUJÍCÍ BAKTERIE	28
4 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ V POTRAVINÁCH.....	31
4.1 FERMENTOVANÉ POTRAVINY.....	31
4.1.1 Sýry	32
4.1.2 Fermentované rybí výrobky.....	32
4.1.3 Fermentované masné výrobky.....	33
4.1.4 Fermentovaná zelenina.....	33
4.1.5 Víno.....	34
4.1.6 Pivo	34
4.2 NEFERMENTOVANÉ POTRAVINY	35
4.2.1 Ryby	35
4.2.2 Maso	36
4.2.3 Ovoce, džusy, zelenina.....	36
5 STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ	37

5.1	CHROMATOGRAFICKÉ METODY	37
5.1.1	Tenkvrstvá chromatografie (TLC)	37
5.1.2	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	38
5.1.3	Plynová chromatografie (GC)	38
5.2	KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA (CE).....	39
5.3	ENZYMATICKE METODY	39
5.4	MOLEKULÁRNÍ METODY	39
5.4.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	40
II	PRAKTICKÁ ČÁST	41
6	CÍL PRÁCE	42
7	MATERIÁL A METODIKA	43
7.1	KULTURY BAKTERÍ.....	43
7.2	POPIS EXPERIMENTU	43
7.3	KULTIVAČNÍ MÉDIA	44
7.4	MĚŘENÍ OPTICKÉ DENZITY BUNĚK	44
7.5	MĚŘENÍ PH KULTIVAČNÍHO MÉDIA	45
7.6	STANOVENÍ PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ.....	45
8	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	47
8.1	Vliv laktózy, NaCl a aerobního/anaerobního prostředí na produkcí tyraminu u kmenů <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	47
8.1.1	Produkcí tyraminu kmenem <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48.....	49
8.1.2	Produkcí tyraminu kmenem <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 53.....	52
8.1.3	Produkcí tyraminu kmenem <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141.....	56
8.2	SOUHRNNÁ DISKUZE.....	59
	ZÁVĚR	64
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	65
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	74
	SEZNAM OBRÁZKŮ	75
	SEZNAM TABULEK.....	77
	SEZNAM PŘÍLOH.....	78

ÚVOD

Biogenní aminy jsou látky vznikající v potravinách a jejich surovinách dekarboxylací příslušných aminokyselin během aktivity buněčného metabolismu. Tyto důležité dusíkaté sloučeniny mají biologický význam v rostlinných, mikrobiálních i živočišných buňkách. Jedná se o přirozené antinutriční faktory a jsou významné z hygienického hlediska, protože se jako původci zapojují do mnoha případů otrav potravinami a jsou schopny vyvolat různé farmakologické účinky. Byly prokázány jak v surovinách, tak i v konečných produktech. Akumulace biogenních aminů v potravinách vyžaduje dostupnost prekurzorů (tj. aminokyselin), přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázami aminokyselin a příznivé podmínky pro jejich růst. Stanovení biogenních aminů v potravinách má velký význam nejen z důvodu jejich možné toxicity, ale mohou také sloužit jako indikátory kvality, čerstvosti a kažení potravin [1, 2, 3, 4].

Tyto aminy jsou nazývány biogenními, protože vznikají činností živých organismů. U sýrů se jedná o zástupce rodů *Bacillus*, *Clostridium*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus* a *Lactobacillus*. Rody z čeledi *Enterobacteriaceae* a *Enterococcus* se pak vyskytují u ryb, masa a výrobků z nich [5].

Obsah biogenních aminů v potravinách musí být sledován, aby se zamezilo jejich negativnímu působení na zdraví lidí. Proto je nutné zabránit výskytu nežádoucích mikroorganismů a vytvořit nepříznivé podmínky pro jejich rozvoj a vznik biogenních aminů.

V současné době se problematice biogenních aminů a jejich stanovení věnuje mnoho studií. Nové poznatky by mohly pomoci ve vývoji nových metod stanovení biogenních aminů a ve vymezení nových technologických postupů výroby potravin, aby byly dodrženy všechny hygienické požadavky.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární organické sloučeniny, které vznikají především dekarboxylací aminokyselin prostřednictvím specifických enzymů. Jejich tvorba je podmíněna přítomností a aktivitou mikroorganismů, které dekarboxylují volné aminokyseliny, jež jsou součástí dusíkatých frakcí potravin. Tyto bazické látky jsou produkovány během metabolismu zvířat, rostlin i mikroorganismů [1, 3, 6].

V nízkých koncentracích se vyskytují v nefermentovaných potravinách, jako například v ovoci, zelenině, mase, mléku a rybách. Vyšší koncentrace se mohou vyskytovat v různých druzích fermentovaných potravin jako jsou rybí výrobky, sýry, víno, pivo, suché salámy a fermentovaná zelenina. K nejvýznamnějším biogenním aminům, vyskytujícím se v potravinách, patří histamin, putrescin, kadaverin, tyramin, tryptamin, 2-fenyletylamin, agmatin, spermin a spermidin [2, 5, 7].

Z hygienického hlediska mohou být biogenní aminy prospěšné jako indikátory nízké kvality surovin nebo mikrobiální kontaminace během zpracování a skladování. Kromě toho mají bakterie také důležitou technologickou roli při výrobě fermentovaných potravin. Tyto mikroorganismy, jako například bakterie mléčného kvašení, mohou také významně přispívat k aminogenezi [6, 8].

Mnoho biogenních aminů má silné fyziologické účinky (například histamin, serotonin, dopamin, tyramin) a biologickou aktivitu. Kromě toho sekundární aminy jako putrescin a kadaverin hrají důležitou roli při otravách potravinami, obzvláště ve spojení s faktory, jako inhibitory monoaminoxidázy nebo alkohol. Z těchto důvodů je důležité sledovat jejich obsah v potravinách [5]. Množství a typ tvořených biogenních aminů je silně ovlivněno složením potravin, mikroflórou a dalšími parametry, které připouští růst mikroorganismů během výroby a skladování potravin [3].

Nízké množství biogenních aminů v potravinách není nebezpečné, ale při konzumaci nadměrného množství mohou u citlivých osob způsobit výrazné farmakologické, fyziologické a toxické účinky [3].

Mezi biogenní aminy bývají některými autory řazeny i polyaminy. Polyaminy jsou malé alifatické organické biomolekuly, které se nachází téměř ve všech živých buňkách. Nejrozšířenějšími polyaminy jsou putrescin, spermidin, spermin a kadaverin. Díky

specifické struktury mohou polyaminy sloužit jako elektrostatické můstky mezi negativně nabitými fosfáty nukleových kyselin a dalšími negativně nabitými polymery [1, 9].

Polyaminy se nachází nejvíce v sýrech, a to hlavně ve zrajících. Velké množství putrescinu bylo zjištěno v citrusovém ovoci a džusech, kyselém zelí, kečupu, fermentovaných sójových produktech a rybí omáčce. Luštěniny, květák a brokolice jsou potraviny bohaté na spermidin. Velké množství sperminu se vyskytuje v mase, masných výrobcích a v luštěninách [10].





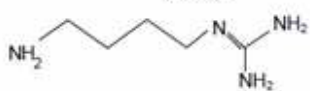
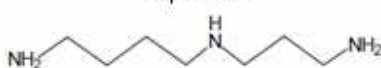
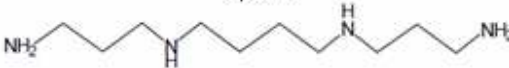
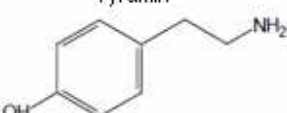
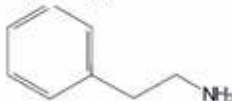
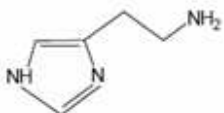
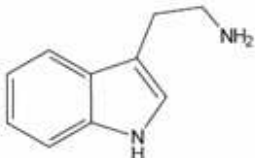
1.1 Struktura a význam biogenních aminů

Biogenní aminy jsou přirozeně se vyskytující aminy obsahující aminoskupiny, které jsou odděleny alifatickým řetězcem nebo aromatickým jádrem. Chemická struktura biogenních aminů může být alifatická (putrescin, spermin, spermidin a kadaverin), aromatická (tyramin a 2-fenyletylamin) nebo heterocyklická (histamin a tryptamin) (Obr. 1) [11, 12].

Biogenní aminy se ve vodném roztoku při fyziologickém pH vyskytují v protonované formě, tudíž neinteragují pouze s organickými sloučeninami, ale také s anorganickými negativně nabitými ligandy [13].

Biogenní aminy jsou endogenní a nepostradatelné složky živých buněk, kde plní významné funkce buněčného metabolismu. Jedná se o zdroje dusíku a prekurzorů pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů. Jsou tedy důležité pro buněčný růst, regulaci funkce nukleových kyselin, syntézu proteinů, vývoj mozku a regeneraci nervů [1, 3, 11].

Kromě jejich biologického významu patří také mezi sloučeniny spoluvytvářející aroma potravin. Dále jsou považovány za potenciální prekurzory karcinogenních N-nitrososloučenin, které jsou také indikátory kvality potravin, kontaminace nebo nevhodných podmínek během výroby a skladování [1, 13].

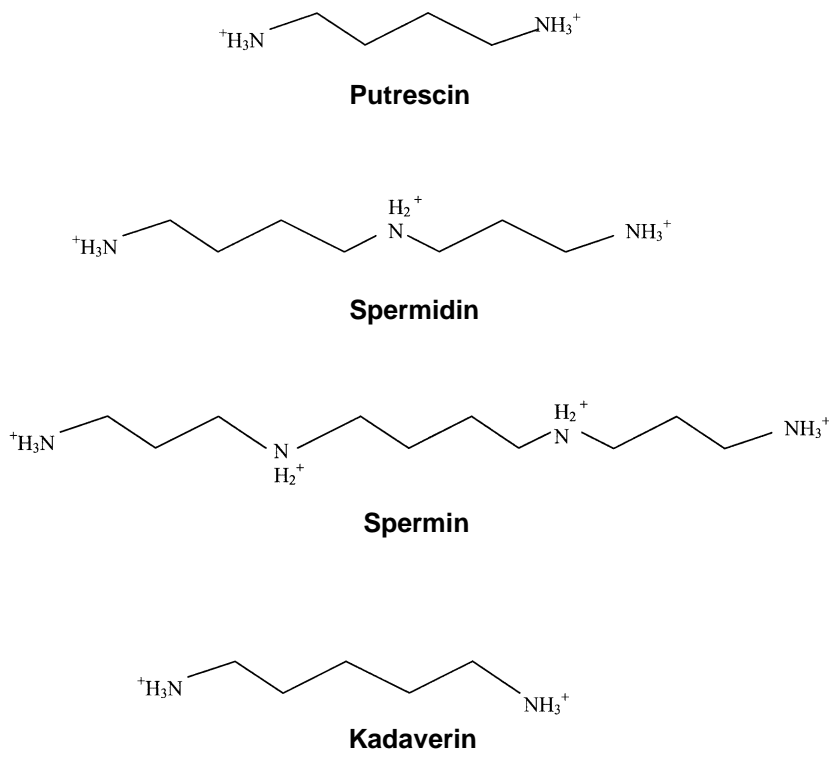
Alifatické aminy	
Putrescin 	Kadaverin 
Etylamin 	Metylamin 
Agmatin 	
Spermidin 	
Spermin 	
Aromatické aminy	
Tyramin 	β -fenyletylamin 
Heterocyklické aminy	
Histamin 	Tryptamin 

Obr. 1 - Chemická struktura některých biogenních aminů [12]

1.2 Struktura a význam polyaminů

Polyaminy putrescin (1,4-diaminobutan) a kadaverin (1,5-diaminopentan) jsou primární diaminy se dvěma aminoskupinami, spermidin [N-(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin] je triamin a spermin [N,N'-bis(3-aminopropyl)butane-1,4-diamine] tetraamin (Obr. 2). Všechny obsahují primární nebo sekundární aminoskupiny [9, 14].

Pojmenování těchto sloučenin jako „polyaminy“ není zjevně odpovídající, ale je stručné a schopné definovat třídu biologických, zásaditých, nízkomolekulárních, alifatických, nebiřkoviných dusíkatých látek [14].



Obr. 2 - Struktura běžných mikrobiálních polyaminů [9]

Polyaminy jsou nepostradatelné sloučeniny, které se zapojují do fyziologických procesů, jako například do regulace funkce nukleových kyselin, syntézy proteinů a pravděpodobně i do stabilizace membrán [1].

Mají významnou roli jako modulátory různých biologických procesů jako je aktivace enzymů a udržování iontové rovnováhy. Mohou vykazovat hormonální aktivitu a také mohou mít vliv na dělení buněk [15].

Vysoké množství polyaminů je pro buňky toxické a hlavně oxidačním mechanismem napomáhá jejímu zániku. V některých nádorových buňkách jsou polyaminy špatně regulovány a následkem toho se zde vyskytují ve vyšších koncentracích než v normálních buňkách. Proto inhibice biosyntézy polyaminů je potenciálním mechanismem chemoterapie při léčbě rakoviny. Téměř výlučně jsou vázány na nukleové kyseliny a jsou zapojeny do mnoha buněčných procesů, které nukleové kyseliny potřebují [14, 16].

1.3 Toxické účinky biogenních aminů a polyaminů

Biogenní aminy jsou látky obsažené v potravinách. Mohou vyvolávat toxikologická rizika a zdravotní potíže. Histamin, tryptamin, β -fenyletylamin a tyramin jsou biologicky aktivní aminy, které mají významné fyziologické účinky na člověka, obecně psychoaktivní nebo vazoaktivní. Psychoaktivní aminy ovlivňují nervový systém působením na neurotransmitery, kdežto vazoaktivní aminy mají vliv na vaskulární systém. Konzumace potravin obsahujících biogenní aminy je zodpovědná za mnoho farmakologických účinků, které vedou k různým onemocněním z jídla, zahrnující otravu histaminem a toxicitu tyraminu. Škodlivé účinky vyvolané těmito potravinami jsou očekávány pouze tehdy, když se aminy dostanou do krevního řečiště. Vymezení přesné prahové hodnoty toxicity biogenních aminů je u různých jedinců velmi obtížné, poněvadž toxická dávka je silně závislá na výkonnosti detoxikačního mechanismu jedince [1, 2, 17].

Otravy jídlem se mohou vyskytnout obzvlášť ve spojení s faktory, jako například s inhibiční monoaminoxidázou (MAO) léčiv, alkoholem, onemocněním zažívacího systému a dalšími aminy v potravině. Jiným rizikem je jejich reakce s dusitanovými a dusičnanovými solemi, které se používají ke konzervaci masných výrobků, za vzniku nitrosaminů [1, 5].

Toxikologický význam polyaminů je založen na jejich schopnosti vytvářet karcinogenní N-nitrososloučeniny. Polyaminy jsou důležité pro růst buněk, proliferaci a jsou přijímány nádorovými buňkami, a proto se musí ve stravě pacientů s nádorovým onemocněním přísně kontrolovat příjem polyaminů. Zvýšené množství polyaminů bylo nalezeno také při jiných patologických stavech než je rakovina, jako například infekce, lupénka, polycytémie rubra vera (porucha krve), systémový lupus erytematózní, uremie, chronický zánět ledvin, cirhóza jater, cystická fibróza, inzulin-dependentní diabetes mellitus, svalová dystrofie a Alzheimerova choroba [14, 18].

Tabulka 1 - Farmakologické účinky některých biogenních aminů a polyaminů [1, 2, 5]

Biogenní amin	Prekurzor	Farmakologický účinek
Histamin	Histidin	Uvolnění adrenalinu a noradrenalinu Rozrušení hladkého svalstva dělohy, střeva a dýchacího traktu Stimulace smyslových s motorických neuronů Kontrola sekrece žaludečních kyselin Dilatace periferních cév, kapilár a artérií Hypotenze Návaly horka Bolesti hlavy
Tyramin	Tyrosin	Periferní vazokonstrikce Zvýšení srdečního výkonu Slzení a slinění Zvýšení respirace Zvýšení obsahu cukru v krvi Uvolnění noradrenalinu z nervového systému Migrény
Putrescen a kadaverin	Ornitin a lyzin	Hypotenze Zpomalení srdeční činnosti Tonická křeč čelistních svalů Částečná paralýza končetin Umocnění toxicity dalších aminů
2-fenyletylamin	Fenylalanin	Uvolnění noradrenalinu z nervového systému Zvýšení krevního tlaku Migrény
Tryptamin	Tryptofan	Zvýšení krevního tlaku Hypertenze

1.3.1 Histamin

Nejčastější alimentární intoxikace způsobené biogenními aminy se týkají histaminu. Nachází se například v rybách (především z čeledi makrelovitých), sýrech, víně a masných výrobcích. Jeho toxikologické účinky závisí na přijaté koncentraci, přítomnosti dalších aminů, aktivitě aminosoxidáz a střevní fyziologii jedince. Pro citlivé jedince je považovaný

za škodlivý příjem už 5 – 10 mg histaminu. Příjem 8 – 40 mg histaminu je považován za nepatrnou otravu, 40 – 100 mg za střední a vyšší než 100 mg za intenzivní. Maximální přípustné množství histaminu v potravinách se pohybuje v rozmezí 50 – 100 mg/kg [1, 5, 17].

Nejběžnější symptomy otravy histaminem vychází z činnosti kardiovaskulárního systému. Histamin může přímo stimulovat srdce následkem uvolnění adrenalinu a noradrenalinu z nadledvinek, dráždí hladké svalstvo dělohy, střev a dýchacích cest, stimuluje senzorické i motorické neurony a kontroluje sekreci žaludečních kyselin. Není tedy překvapivé, že se otravy histaminem projevují širokou škálou symptomů. Mezi charakteristické symptomy, které ovlivňují kožní systém, patří vyrážky, kopřivka, otok a zánět. Postihnutí trávicího ústrojí se vyznačuje nevolností, zvracením, průjmy a křečemi v břišní dutině. Dalšími symptomy je hypotenze, bolest hlavy, bušení srdce, brnění a návaly horka [2, 17].

1.3.2 Tyramin

Tyramin patří spolu s histaminem mezi nejtoxičtější biogenní aminy pro lidské zdraví. Působí především nepřímo uvolněním noradrenalinu ze sympatického nervového systému, který vyvolává zvýšení krevního tlaku a srdečního výkonu. Způsobuje také rozšíření zorniček, oční tkáň, slzení a slinění, zvýšení obsahu cukru v krvi a zrychlení dýchání. Horní hranice množství tyraminu v potravinách se pohybuje v rozmezí 100 – 800 mg/kg [2, 19, 20].

1.3.3 Detoxikace biogenních aminů

V zažívacím traktu působí detoxikační systém, který je schopen metabolizovat malé množství biogenních aminů přijaté potravou. Za normálních podmínek jsou exogenní aminy z potravin rychle detoxifikovány činností aminooxidáz nebo konjugací. Enzymy monoaminoxidáza (MAO) a diaminoxidáza (DAO) mají v detoxifikačním procesu důležitou funkci. Monoaminoxidáza a diaminoxidáza se vyskytují ve střevním epitelu, a tudíž oxidační produkty biogenních aminů vstupují do krevního oběhu. Avšak při příjmu velkého množství biogenních aminů, v případě alergie, při nedostatečné aktivitě monoaminoxidázy nebo diaminoxidázy je detoxikační systém neschopný tyto látky dostatečně eliminovat a hromadí se v těle [1, 5, 17].

Lidé se zažívacími potížemi (zánět žaludku, syndrom dráždivého tračníku, Crohnova choroba, vředy žaludku a tlustého střeva) jsou také v ohrožení, protože činnost oxidáz je obvykle nižší než u zdravých jedinců. Pacienti, kteří užívají léky s inhibičním účinkem monoaminoxidázy a diaminoxidázy, mohou mít pozměněný metabolismus biogenních aminů, který může vyvolat zdravotní problémy [17].

Některé biogenní aminy, obzvláště putrescin a kadaverin, inhibují enzymy detoxikující histamin, a proto násobí jeho toxicitu. Tyto aminy přednostně reagují s monoaminoxidázou a diaminoxidázou, což vede ke zvýšení obsahu histaminu v krvi. Poranění střevní sliznice může také redukovat funkci těchto enzymů [17].

1.4 Index biogenních aminů

Množství a poměry biogenních aminů mohou sloužit jako indikátory kvality potravin. Proto byl popsán index biogenních aminů (BAI), který je založen na skutečnosti, že obsah putrescinu, kadaverinu a histaminu se během kažení masa zvyšuje, zatímco koncentrace sperminu a spermidinu během tohoto procesu klesá. Použitelnost tohoto indikátoru je však velmi omezená a nemůže být aplikována obecně [21, 22, 23].

Index biogenních aminů byl definován vztahem: [23]

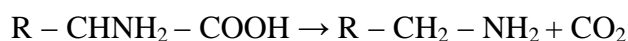
$$\text{BAI} = \frac{\text{histamin} + \text{putrescin} + \text{kadaverin}}{1 + \text{spermin} + \text{spermidin}}$$

Maso s hodnotou BAI nižší než 1 je považované za nejvyšší kvality, nad 10 za nekvalitní [23].

2 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ

2.1 Produkce biogenních aminů

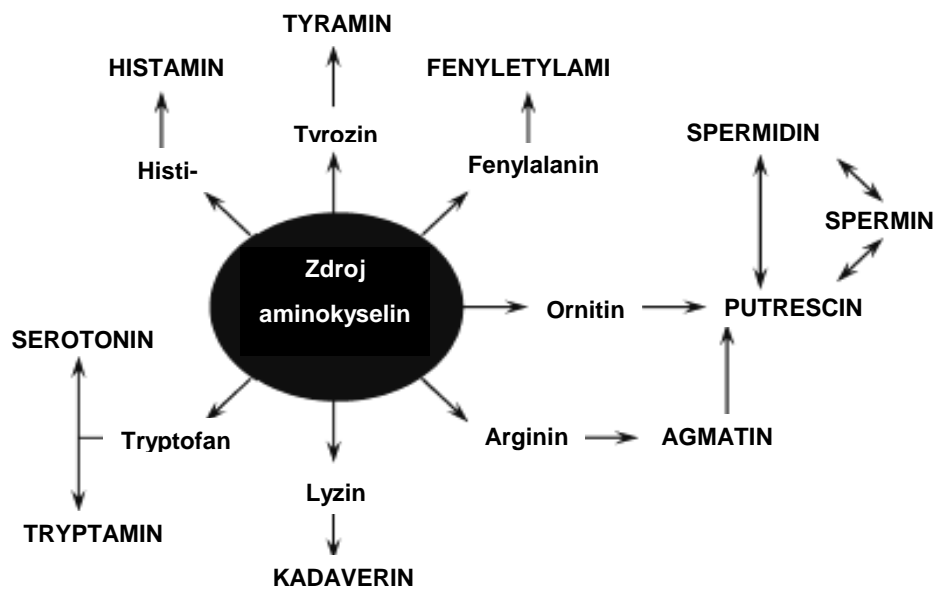
Biogenní aminy vznikají dekarboxylací specifických volných aminokyselin, které jsou z proteinů uvolněny autolytickou nebo bakteriální proteolýzou. Dekarboxylace aminokyselin se pak uskutečňuje odštěpením α -karboxylové skupiny za vzniku příslušného aminu (Obr. 3). Názvy mnoha biogenních aminů korespondují s názvy jejich původních aminokyselin: histamin – histidin, tyramin – tyrozin, β -fenyletylamin – fenylalanin, tryptamin – tryptofan (Obr. 4) [2, 17, 24].



Obr. 3 - Dekarboxylace aminokyselin [25]

Tento proces může probíhat dvěma biochemickými cestami, a to buď činností endogenních dekarboxylázových enzymů přirozeně se vyskytujících v potravinách, nebo činností exogenních enzymů, které jsou uvolněny dekarboxyláza-pozitivními mikroorganismy za příznivých podmínek pro enzymovou aktivitu. Protože jsou aminokyseliny získány z extracelulárního média, předpokládá se, že dekarboxylázové enzymy spolupracují s transportními proteiny. Množství uvolněné dekarboxylázy je ovlivněno povahou mikroflóry a složením produktů [2, 20, 24].

Podle závislosti na pyridoxalfosfátu rozlišujeme dva mechanismy dekarboxylace aminokyselin. Pyridoxalfosfát je vázán na aminoskupinu aktivní části enzymu a může mít vliv na reakce aminokyselin, které probíhají za účasti enzymů na něm závislých. Pyridoxalfosfát může být tudíž považován za část enzymu, která zásadně ovlivňuje tvorbu biogenních aminů. Karbonylová skupina pyridoxalfosfátu reaguje s aminokyselinou za vzniku meziprojektu Schiffovy báze, která je následně dekarboxylována a eliminací molekuly vody vzniká odpovídající amin a poloviční podíl pyridoxalfosfátu [2].



Obr. 4 - Prekurzory biogenních aminů [26]

2.2 Vznik polyaminů

Polyaminy jsou v těle syntetizovány *de novo* syntézou, retrokonverzí nebo prostřednictvím gastrointestinální flóry, která metabolizuje aminokyseliny z potravy [14].

2.2.1 Syntéza *de novo*

Hlavním prekurzorem polyaminů je aminokyselina ornitin, která je syntetizována především v mitochondriích z glutamátu acetylací aminoskupiny, fosforylací a redukcí acetylovaného derivátu na N-acetylglutamový- γ -semialdehyd. Následnou transaminací vzniká α -N-acetylornitin, jež po uvolnění acetylové skupiny tvoří ornitin a obnovený N-acetylglutamát [14].

De novo syntéza začíná aktivitou enzymu ornitindekarboxylázy, který katalyzuje konverzi ornitinu na diamin putrescin. Putrescin může vznikat i nepřímo z argininu pomocí arginindekarboxylázy a dvou aminopropyltransferáz [27, 28].

Spermidin vzniká následnou adicí polovičního podílu amylopropylu na putrescin za katalýzy spermidinsyntázy. Druhý zbytek amylopropylu je prostřednictvím sperminsyntázy připojen ke spermidinu za tvorby sperminu. Aminopropylové zbytky se uvolňují dekarboxylací S-adenosylmetioninu za katalýzy S-adenosylmetionindekarboxylázy. S-adenosylmetionin je vytvářen z metioninu prostřednictvím S-adenosylmetioninsyntetázy [14, 28, 29].

2.2.2 Retrokonverze

Polyaminy také mohou být syntetizovány retrokonverzí spermidinu na putrescin a sperminu na spermidin prostřednictvím počáteční N¹-acetylace spermidinu a sperminu na N¹-acetylspermidin a N¹-acetylspermin. Později může být konvertován na N¹,N¹²-diacetylspermin. Tyto reakce jsou katalyzovány spermidin a spermin N¹-acetyltransferasou za pomoci acetyl-koenzym A [14].

2.2.3 Bakteriální syntéza

Bakterie v gastrointestinálním traktu, jako *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae* a *Enterococcus*, dekarboxylují aminokyseliny přímo na polyaminy nebo na další meziprodukty, které jsou následovně modifikovány za vzniku funkčních polyaminů [9, 14].

Takto vzniklé polyaminy jsou částečně absorbovány v gastrointestinálním traktu a následně mohou být transportovány do buněk prostřednictvím nosičů [14].

2.3 Faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů a polyaminů

Pro tvorbu biogenních aminů jsou nezbytné následující podmínky: [17]

- dostupnost volných aminokyselin,
- přítomnost dekarboxyláza-pozitivních mikroorganismů,
- příznivé podmínky pro růst mikroorganismů a produkci jejich enzymů,

Prevence produkce biogenních aminů spočívá v lepším porozumění mechanismu jejich vzniku a přísném dodržování hygieny surovin a výrobních podmínek [1].

2.3.1 pH

Hodnota pH je klíčovým faktorem, který ovlivňuje dekarboxylázovou aktivitu. Vyšší aktivita se obvykle pohybuje v kyselější oblasti s optimálním pH mezi 4 a 5,5. V takovém prostředí jsou bakterie silněji povzbuzeny k produkci dekarboxylázových enzymů jako součást jejich obranného mechanismu proti překyselení. Prudkým snížením pH dochází k omezení růstu amino-pozitivních mikroorganismů, zvláště z čeledi *Enterobacteriaceae*. Naopak zvýšení pH prostředí má u těchto bakterií za následek rychlé navýšení tvorby biogenních aminů. Nicméně tvorba biogenních aminů je více závislá na množství rostoucích dekarboxylujících bakterií než na samotných růstových podmínkách [1, 4, 17].

2.3.2 Chlorid sodný

Koncentrace NaCl v médiu silně ovlivňuje produkci biogenních aminů a kolísání množství vody a poměru sůl/voda během výroby a skladování potravin má významný vliv na rozmnožování mikroorganismů. Nízké koncentrace NaCl produkci biogenních aminů nebrání, spíše ji mohou podpořit. Ale při koncentraci soli v médiu 3 – 6 % je produkce biogenních aminů značně redukována. Tento efekt je ještě zesílen snížením pH [4, 30].

2.3.3 Teplota

Výrazný vliv na produkci biogenních aminů má také teplota. Teplota, ovlivňující vzájemný vztah mezi různými mikroorganismy, může mít opačný účinek na akumulaci biogenních aminů. Na celkové množství aminů má výrazný vliv účinek na proteolytickou a dekarboxylační aktivitu enzymů a vzájemný vztah mezi populací mikroorganismů. Obsah biogenních aminů v potravinách závisí na době a teplotě skladování [4].

Optimální teploty pro růst bakterií, které obsahují dekarboxylázy, se pohybují mezi 20 °C a 37 °C. Nízké teploty jejich růst zastavují. Při 15 °C může mikrobiální dekarboxyláza zůstat aktivní, i když většina populace dosahuje stacionárního růstu nebo zaniká. Některé biogenní aminy mohou být psychrotrofními kmeny produkovány i při 4 °C [4, 17].

2.3.4 Další faktory

Přítomnost zkvasitelných cukrů (například glukóza), zvyšuje růst a dekarboxylázovou aktivitu bakterií, a tedy i produkci biogenních aminů. Optimální obsah glukózy je v rozmezí 0,5 – 2 %, zatímco množství nad 3 % inhibuje enzymy [4, 20].

Na syntézu biogenních aminů má významný vliv také přístup kyslíku, redox potenciál, aktivita vody a další vlivy [17, 31].

3 MIKROORGANIZMY PRODUKUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY

Mikroorganismy produkující biogenní aminy se mohou v potravinách vyskytovat přirozeně, jako kontaminující mikroflóra nebo mohou být do potravin přidány jako startovací kultury. Z toho důvodu mikroorganismy kriticky ovlivňují tvorbu biogenních aminů během výroby fermentovaných potravin [32, 33].

Biogenní aminy mohou být produkovány během výroby nebo skladování výrobků. Množství a typ vytvořeného biogenního aminu závisí na povaze výrobku a na přítomných mikroorganismech. Mezi dekarboxyláza-pozitivní bakterie patří mnoho zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*, *Bacillus macerans*, *Propionibacterium* a dále zástupci startovacích kultur, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* a *Micrococcus* [5, 13, 20].

Histidindekarboxylázová aktivita byla nalezena také u kvasinek rodu *Debaryomyces* a *Candida*. Jejich aktivita je dokonce výraznější než u bakterií mléčného kvašení a stafylokoků. Vysoké množství 2-fenyletylaminu a tyraminu produkují další neidentifikované kmeny kvasinek [4].

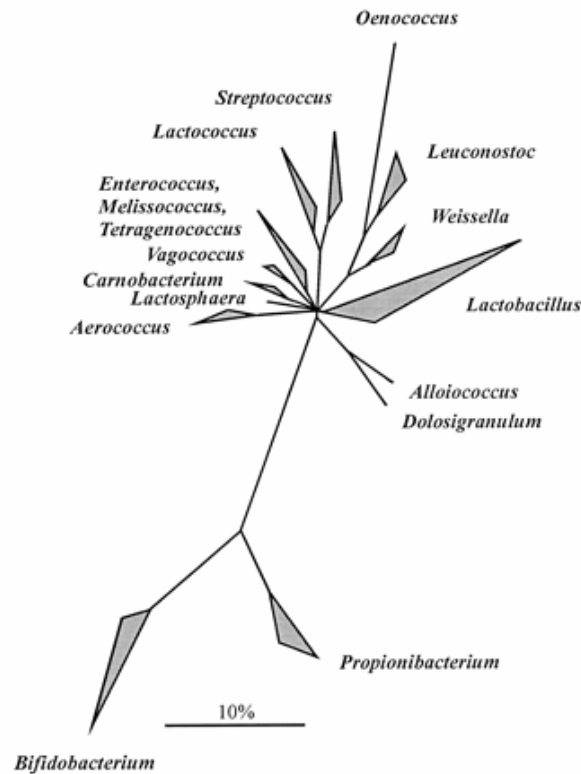
3.1 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení jsou grampozitivní, nesporelující, anaerobní tyčinky a koky, vyžadující zkvasitelné cukry k produkci kyseliny mléčné, která je výsledkem fermentačního procesu potravin. Tato skupina bakterií zahrnuje okolo 20 druhů, mezi něž patří například druhy *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella*. Často se do této skupiny zařazuje i druh *Bifidobacterium*, ačkoli patří k jiné fylogenetické skupině. Tento druh sdílí některé vlastnosti bakterií mléčného kvašení a má specifický způsob fermentace cukru (Obr. 5) [34, 35].

Bakterie mléčného kvašení jsou mezofilní mikroorganismy, ale mohou růst i při teplotách v rozmezí od 5 do 45 °C. Jsou tolerantní jak ke kyselému, tak i k alkalickému prostředí a jsou slabě proteolytické a lipolytické. Bakterie mléčného kvašení vyžadují přítomnost volných aminokyselin, zdroj dusíku a vitaminy [35].

Bakterie mléčného kvašení používané pro výrobu potravin jsou považovány za netoxické a nepatogenní. Avšak některé kmeny, například *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*,

Leuconostoc a *Streptococcus*, mohou produkovat biogenní aminy. Naopak některé kmeny laktokoků, pediokoků, streptokoků (*Streptococcus thermophilus*) a leukonostoků, dekarboxylázovou aktivitu neprokazují [4, 37].



Obr. 5 - Taxonomie bakterií mléčného kvašení [36]

Kvantitativně nejdůležitějším biogenním aminem je tyramin, jehož producentem jsou některé kmeny *Enterococcus*, *Lactococcus* a *Leuconostoc*. Některé leukonostoky mají také schopnost produkovat histamin [4].

3.1.1 *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis jsou grampozitivní, mezofilní, fakultativně anaerobní, nesporulující a nepohyblivé bakterie kulatého nebo elipsovitého tvaru. Tato bakterie se vyskytuje v párech nebo v řetězcích. Optimální pH pro jejich růst se pohybuje v rozmezí 6,3 – 6,9. *Lactococcus lactis* má homofermentativní metabolismus a produkuje výhradně L(+)-mléčnou kyselinu. Bylo zjištěno, že kyselina D(-)-mléčná se tvoří při nízkém pH [38, 39, 40].

Bakterie druhu *Lactococcus lactis* mají široké využití v mlékárenství jako startovací kultury pro výrobu a konzervaci fermentovaných výrobků, jako například sýrů, kysaných

smetan a podmásli. Poprvé byly izolovány na konci 19. století samovolným mléčným kvašením. Při mléčném kvašení se do pasterovaného mléka přidávají raději startovací kultury, než aby se spoléhalo na spontánní fermentaci. Kmeny *Lactococcus lactis* přispívají k charakteristické vůni, aroma a textuře těchto výrobků, ale také je pomáhají chránit produkcí organických kyselin, bakteriocinů a peroxidu vodíku [38, 41].

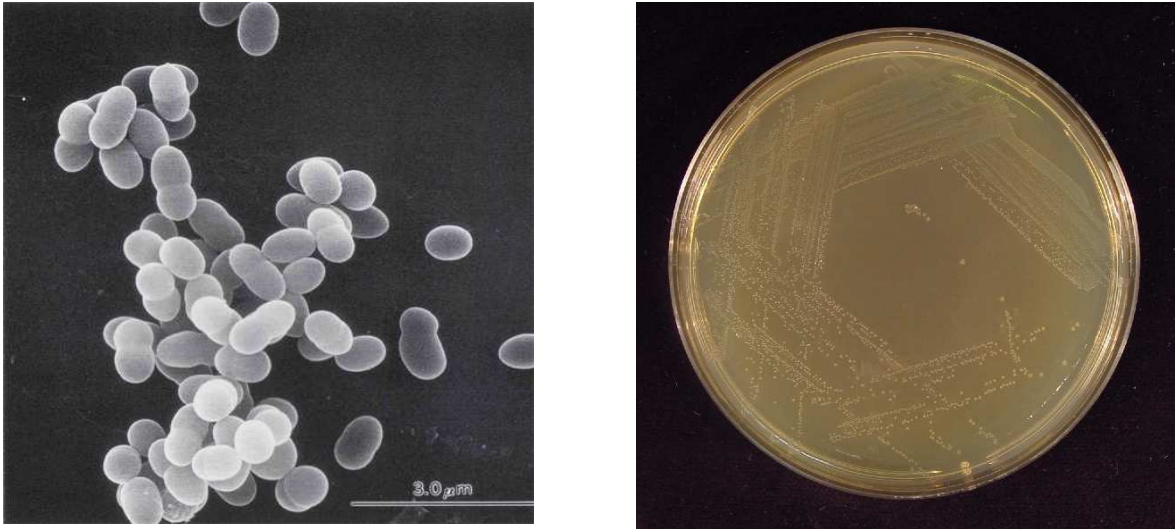
Aplikace těchto mikroorganismů se rozšiřuje i do oblasti zdravotnictví jako probiotika, která mají pozitivní účinek na lidské zdraví. Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy přítomné v potravě, které po požití v určitém množství příznivě ovlivňují zdraví člověka. Zástupci probiotických kultur patří také mezi producenty biogenních aminů a jejich obsah je nutné sledovat [42, 43].

Jsou známy dva poddruhy, a to *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* a *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* [38].

Kmeny *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* (Obr. 6) jsou většinou stabilní s malou pravděpodobností vlivu změny prostředí. Mezi faktory, které vyvolávají nepříznivou reakci, patří změny teploty, pH a koncentrace soli. Bylo zjištěno, že tento kmen je v kyselém prostředí, v prostředí žlučových solí a za nízkých teplot aktivnější než poddruh *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris*. Kmeny *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* mohou růst při 40 °C, pH 9,2 a v přítomnosti 4% NaCl, kdežto kmeny *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* při těchto podmínkách růst nemohou. Některé bakterie se dokáží adaptovat a to tak, že pokud jsou buňky vystaveny průměrnému stupni zátěže, tak získají zvýšenou odolnost proti dalšímu silnějšímu stupni stejné zátěže. Adaptace mírných změn prostředí mohou bakterie přežít, ale dokonce se mohou i rozmnožovat [42, 44].

Tabulka 2 - Subletální a letální hodnoty faktorů ovlivňujících růst laktokoků [42]

	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
	subletální	letální	subletální	letální
pH	4,5	2,5	5,0	3,0
Žlučová sůl [%]	0,03	0,1	0,01	0,04
Teplota [°C]	10	- 20	10	- 20



Obr. 6 - *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*: a) v elektronovém mikroskopu [45], b) na živné půdě [46]

3.2 Ostatní dekarboxylující bakterie

Čeleď *Enterobacteriaceae* se skládá z gramnegativních, fakultativně anaerobních, nesporulujících bakterií. Řadí se sem rody jako například *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella* (Obr. 7), *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Yersinia* a další. *Enterobacteriaceae* jsou široce rozšířené a nachází se v půdě, vodě, rostlinách a v zažívacím traktu zvířat a lidí [47].

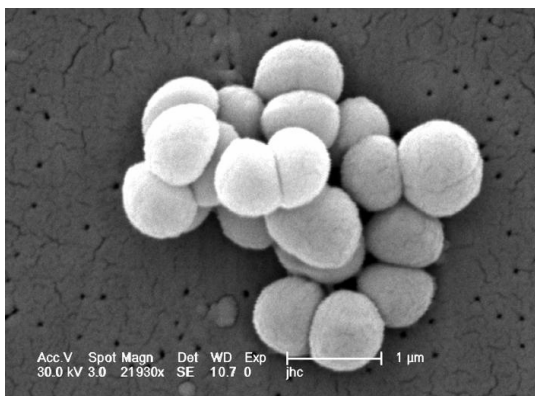


Obr. 7 - *Salmonella typhimurium*: a) v elektronovém mikroskopu [48], b) na živné půdě [49]

Enterobacteriaceae jsou většinou považovány za mikroorganismy s vysokou dekarboxylázovou aktivitou. Produkují zejména kadaverin a putrescin, jejichž významnými producenty jsou *Enterobacter cloacae* a *Serratia* sp. Mnoho bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* může také produkovat větší množství histaminu, a to především *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* a *Morganella morganii* [4].

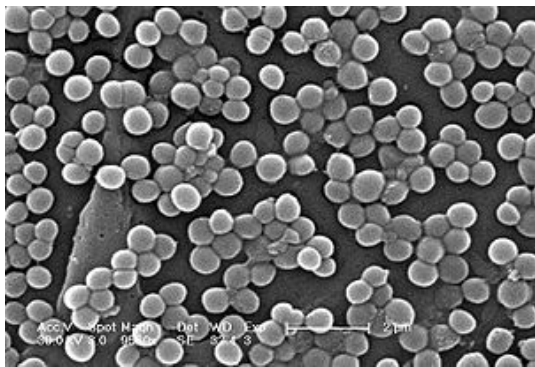
Ačkoliv jsou tyto mikroorganismy ve finálních výrobcích zastoupeny v malých množstvích, tak nesprávné skladování surovin a i nekontrolovaná fermentace mohou vyvolat rozmnožování těchto bakterií, které může spustit jejich dekarboxylázy. Uvolněné enzymy jsou odpovědné za nahromadění biogenních aminů a jejich činnost může pokračovat také v nepřítomnosti živých buněk [4].

Mezi dekarboxylující bakterie patří také zástupci čeledi *Micrococcaceae*. Jedná se o gram pozitivní, nesporeující, nepohyblivé koky. Většina roste na bakteriologických médiích při 37 °C kromě některých psychrotrofních a halofilních rodů, které vyžadují chladnější teploty nebo 5 % NaCl. Do čeledi *Micrococcaceae* se řadí pouze rody *Arthrobacter* a *Micrococcus* (Obr. 8) [50].



Obr. 8 - *Micrococcus luteus*: a) v elektronovém mikroskopu [51], b) na živné půdě [52]

Staphylococcaceae je čeleď patřící do řádu *Bacillales* a jedná se o grampozitivní koky, tvořící shluky. Stafylokoky jsou fakultativně anaerobní bakterie, které nejrychleji rostou za aerobních podmínek a v přítomnosti CO₂. Tyto koky mohou růst v širokém rozsahu pH (4,8 – 9,4), odolávají suchému prostředí, mohou přežít vystavení extrémní teplotám jako 60 °C po dobu 30 minut. *Staphylococcus aureus* (Obr. 9) je jeden z prvních identifikovaných patogenů a způsobuje širokou škálu infekcí, například impetigo, folikulitidu, kožní abscesy, infekci ran, osteomyelitidy, hnisavé artritidy, zápal plic, pleurální emfyzém, meningitidu, sepsi a endokarditidu, syndrom toxického šoku, syndrom opažené kůže a otravy potravinami [53].



Obr. 9 - *Staphylococcus aureus*: a) v elektronovém mikroskopu [54], b) na živné půdě [55]

U několika druhů patřících do rodu *Micrococcus* a *Staphylococcus* byla pozorována histidindekarboxylázová aktivita. Produkce histaminu byla pozorována také u 76 % kmenů *Staphylococcus xylosus* a u některých kmenů *Kocuria* spp. *Staphylococcus carnosus* a *Staphylococcus piscifermentans* mohou vykazovat značnou dekarboxylázovou aktivitu aminokyselin a mohou produkovat 2-fenyletylamin, histamin, putrescin a kadaverin. Koaguláza-negativní stafylokoky mohou být používány jako spolehlivé startovací kultury, z nichž se některé testované kmeny vyznačují slabou tvorbou tyraminu [4].

4 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ V POTRAVINÁCH

Biogenní aminy se mohou nacházet v podstatě ve všech potravinách, které obsahují volné aminokyseliny a jsou vystaveny podmínkám umožňujícím mikrobiální nebo biochemickou aktivitu. Celkové množství vytvořených biogenních aminů závisí na povaze potravin a na přítomné mikroflóře. Vyskytují se v široké škále potravin, jako jsou například ryby, masné a mléčné výrobky, víno, pivo, zelenina, ovoce, ořechy a čokoláda [1, 17].

Tabulka 3 - Izolované bakterie a biogenní aminy v některých typech potravin [2]

Potravina	Izolovaná bakterie	Biogenní amin
Ryby	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Clostridium perfringenes</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Vibro alginolytiens</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Staphylococcus xylosum</i>	Histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, agmatin, spermin, spermidin
Sýry	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Bacillus macerans</i> , <i>Propionibacterium spp.</i>	Histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, β -fenyletylamin, tryptamin
Maso a masné výrobky	<i>Pediococcus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i>	Histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, β -fenyletylamin, tryptamin
Fermentovaná zelenina	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus sp.</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin
Fermentované sójové výrobky	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Trichosporon beigleri</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin

4.1 Fermentované potraviny

Pro fermentované potraviny je typický vysoký obsah mikroorganismů, z nichž některé jsou schopny produkce biogenních aminů, což nevyhnutelně vede k jejich hromadění, obzvláště pak tyraminu, 2-fenyletylaminu, tryptaminu, kadaverinu, putrescinu a histaminu. Vyšší

množství biogenních aminů mohou obsahovat například sýry, kyselé zelí, trvanlivé salámy, pivo, víno a další druhy potravin. Na druhou stranu získávají fermentované potraviny činností použitých startovacích kultur výslednou konzistenci, chuť a vzhled [1, 4, 22, 56].

4.1.1 Sýry

Sýry patří mezi potraviny s poměrně vysokým obsahem biogenních aminů, a to především tyraminu a histaminu. Dalšími, již méně produkovány biogenními aminy, jsou tryptamin, putrescin, β -fenyletylamin a kadaverin [2, 20].

Biogenní aminy byly nalezeny u několika druhů sýrů, jako jsou například ementál, čedar, gouda, plísňové a tavené sýry. Mezi mikroorganismy, které jsou schopné produkce biogenních aminů, patří některé kmeny *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* a *Streptococcus* [57, 58].

Sýry představují ideální prostředí pro produkci aminů, ale jejich koncentrace se značně liší a závisí na různých faktorech, jako je například druh sýra, zralost a přítomná mikroflóra. Nicméně najít přímou úměru mezi počtem mikroorganismů a obsahem biogenních aminů v sýrech je velmi obtížné, protože schopnost produkovat aminy různými bakteriemi se značně liší. Během zrání sýrů dochází prostřednictvím proteolytických enzymů k pomalé degradaci kaseinu, což vede ke zvýšení koncentrace volných aminokyselin. Koncentrace biogenních aminů se výrazně zvyšuje mezi druhým a třetím měsícem zrání [2, 32, 59].

4.1.2 Fermentované rybí výrobky

Fermentace ryb je stará konzervační metoda, která zlepšuje senzoryckou a hygienickou kvalitu konečných produktů. Použité startovací kultury mohou potlačit růst patogenů a hnilobných bakterií a mohou podstatně inhibovat rozvoj nestálých dusíkatých látek. Rychlý pokles pH neuděluje výrobkům pouze specifickou chuť po kyselině mléčné, ale zlepšuje také pevnost, konzistenci a příjemnost v důsledku kyselé denaturace svalových bílkovin [13].

Množství biogenních aminů se ve fermentovaných rybích výrobcích značně mění. Ve výrobcích se objevují stopová množství histaminu, putrescinu, tyraminu, agmatinu a tryptaminu. Ve vyšší koncentraci se po fermentaci vyskytuje pouze spermidin [1].

4.1.3 Fermentované masné výrobky

Fermentované masné výrobky se vyrábí ze syrového mletého masa a tuku. Maso je promícháno se solí, kořením a dalšími přísadami, pak naplněno do střev a vystaveno fermentaci. Nakonec se uzeniny nechají uzrát. V určitých typech uzenin může být fermentace významná pro tvorbu histaminu. Fermentace polosuchých salámů je krátkodobá s použitím kultur mléčného kvašení, zatímco u suchých salámů je možná dlouhodobá fermentace činností přirozené mikroflóry. Během prvních tří dnů zrání salámů se koncentrace histaminu zvyšuje alespoň desetkrát. Startovací kultury se skládají z jednoho nebo několika kmenů bakterií mléčného kvašení (například laktobacilů a pediokoků), mikrokoků a koaguláza-negativních stafylokoků. Bakterie mléčného kvašení jsou nejdůležitější startovací kultury, protože se dobře přizpůsobují prostředí fermentace a podílí se na všech změnách probíhajících během zrání. Vytvořená kyselina mléčná snižuje pH, což konzervuje a usnadňuje sušení, dále vyvíjí barvu a soudržnost suchých salámů. Významnou funkci při zrání uzenin zastávají i mikrokoky a stafylokoky, kteří svou proteolytickou a lipolytickou aktivitou přispívají k rozvoji typického aroma [2, 60, 61, 62].

Ve fermentovaných masných výrobcích se vyskytuje převážně tyramin a dále pak i histamin, putrescin, kadaverin a β -fenyletylamin. Množství biogenních aminů u uzenin je velmi proměnlivé. Může to být způsobeno změnou doby zrání, změnou a rozdílem dekarboxylázové aktivity přirozené mikroflóry a biosyntézou a metabolismem těchto aminů. V masných výrobcích jsou biogenní aminy produkovány pseudomonádami, enterobakteriemi, enterokoky a laktobacily [1, 2, 62].

4.1.4 Fermentovaná zelenina

Fermentovaná zelenina představuje další skupinu potravin, která obsahuje biogenní aminy, a to kadaverin, histamin, putrescin, spermidin a tyramin (mrkev a červená řepa). V kyselém zelí se objevuje především histamin, tyramin, putrescin a kadaverin. β -fenyletylamin je zastoupen pouze v malém množství. Výroba kyselého zelí je spojena s *Leuconostoc mesenteroides* produkující putrescin, *Lactobacillus* sp. produkující putrescin a tyramin a *Pediococcus cerevisiae* produkující histamin. Bylo zjištěno, že značné množství putrescinu se tvoří během počáteční fáze kvašení, zatímco histamin a tyramin se objevují na konci. Biogenní aminy se hromadí hlavně v solném nálevu [2, 17].

4.1.5 Víno

Fermentace je proces, při němž činností kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*) dochází k přeměně jednoduchých cukrů na alkohol a oxid uhličitý. Na kvašení lze použít vybrané kultury kvasinek nebo přirozenou mikroflóru. Hlavními bakteriemi ve vínech jsou zástupci bakterií mléčného kvašení, obzvláště pak rody *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* a *Oenococcus*. Mohou měnit nejrůznější organické sloučeniny, které se v moštu nacházejí, a finální produkty pak ovlivňují organoleptické vlastnosti vína [63, 64, 65].

Výskyt biogenních aminů ve vínech může mít tři možné původy. Mohou se nacházet v moštu, tvořit se během jablečno-mléčného kvašení činností kvasinek nebo vznikat činností bakterií, které se podílí na jablečno-mléčném kvašení. Jablečno-mléčné kvašení probíhá po dokončení alkoholového a zlepšuje kvalitu vína snížením kyselosti dekarboxylací kyseliny jablečné na mléčnou [17, 66].

Množství biogenních aminů ve vínech je ve srovnání s jinými fermentovanými výrobky poměrně malé. Převládajícími biogenními aminy jsou histamin, tyramin, putrescin, β -fenyletylamin, etylamin a metylamin. Množství a typ aminů je ovlivněno několika faktory, jako například stupeň zrání hroznů, druh půdy a obsah dusíkatých sloučenin v hroznové šťávě. Koncentrace aminů je závislá i na druhu kvasinek, době macerace a na podmínkách kvašení, jmenovitě na teplotě a délce [17, 67].

4.1.6 Pivo

Pivo patří mezi nápoje, které jsou pro spotřebitele z hlediska příjmu biogenních aminů zdravotně nebezpečné. Celkový obsah biogenních aminů u lahovových piv je výrazně ovlivněn pivovarskou technologií a v mnohem menší míře odrůdou ječmene. Zdrojem agmatinu, putrescinu, spermidinu a sperminu je slad, zatímco tyramin, histamin a kadaverin se tvoří během hlavního kvašení. Je pravděpodobné, že pivovarské kvasnice během kvašení neprodukují biogenní aminy, ale jejich výskyt může být spojen s kvalitou surovin a mikrobiální kontaminací během vaření. Obsah histaminu tedy slouží jako dobrý indikátor hygienických podmínek skladování ječmene, vaření a skladování piva [2, 68, 69].

Na obsah biogenních aminů ve zkvašené a nezkašené mladině byl zkoumán vliv *Lactobacillus brevis* a *Saccharomyces uvarum*. *Lactobacillus brevis* produkuje putrescin a tyramin, ale redukuje agmatin, zatímco *Saccharomyces uvarum* aminy neprodukuje [20].

4.2 Nefermentované potraviny

V nefermentovaných potravinách, jako jsou například ryby, maso, mléko, ovoce a zelenina, se biogenní aminy vyskytují v nízkých koncentracích a jejich přítomnost nad určité množství je považována za indikátor nežádoucí mikrobiální aktivity. Z tohoto důvodu může množství aminů ukazovat na mikrobiální kažení. Avšak přítomnost těchto látek v potravinách nezbytně nesouvisí s růstem hnilobných organismů, protože všechny tyto bakterie nejsou dekarboxylázapozitivní. Množství histaminu, putrescinu a kadaverinu obvykle narůstá během kažení ryb a masa, zatímco obsah sperminu a spermidinu během tohoto procesu klesá [1, 2, 5].

4.2.1 Ryby

Spektrum a obsah jednotlivých biogenních aminů je u různých druhů ryb odlišné. U čerstvých ryb je koncentrace biogenních aminů velmi nízká, ale jejich obsah se zvyšuje při skladování. Nejvyšší toxikologické riziko představuje tyramin a histamin. Koncentrace histaminu ve svalové tkáni makrelovitých ryb (například makrela, tuňák, sled', sardinka) je závislá na koncentraci volného histidinu. Tvorba histaminu u ryb je spíše připisována činnosti mikroorganismů než aktivitě histidindekarboxylázy. Histidin v rybí svalovině může být katalyzován dvěma způsoby, deaminací aminokyseliny za vzniku urokanové kyseliny nebo dekarboxylací histidinu za tvorby histaminu. Deaminace probíhá za normálních fyziologických podmínek a dekarboxylace za jiných okolností, například při kontaminaci [1, 22].

Mezi bakterie produkující rizikové množství histaminu patří *Morganella morganii*, *Hafnia alvei*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp. a další [17].

Byl zkoumán vliv skladovací teploty na tvorbu biogenních aminů a bylo zjištěno, že u čerstvých ryb je jejich obsah minimální nebo nulový. Ovšem při skladování při pokojové teplotě se obsah biogenních aminů mnohonásobně zvýšil. Optimální teplota pro vznik histaminu byla stanovena na 37,8 °C a je závislá na mikrobiální aktivitě. Dále bylo zjištěno, že putrescin, kadaverin a histamin se v syrových rybách tvoří pouze při udržování nevhodných podmínek (36 h, 21 °C) a po prvotním výskytu je tempo růstu těchto diaminů velmi rychlé [2].

V mořských rybách se vyskytují psychofilní halofilní bakterie, které jsou schopny produkovat vysoké množství histaminu při nízkých teplotách jako 2,5 °C. Nízké teploty jsou tedy nedostatečné k potlačení vzniku toxických aminů, jako je histamin. Prevence nárůstu bakterií nebo inhibice produkce biogenních aminů je velmi důležitá pro bezpečnost potravin [2, 20].

4.2.2 Maso

Obsah biogenních aminů v maso může být považován za ukazatel čerstvosti nebo špatné konzervace. Mezi nejčastěji se vyskytující biogenní aminy patří tryptamin, putrescin, kadaverin, serotonin, tyramin, spermidin a spermin. Červené maso (skot) a drůbež je za vhodných podmínek mimořádně náchylné k degradaci proteinů. S ohledem na jejich nutriční hodnotu, výrobní procesy, ekonomické aspekty a kažení se oba druhy masa liší [70].

V čerstvém vepřovém maso se vyskytuje spermin, spermidin a stopy dalších aminů. Zvýšení jejich obsahu je závislé na teplotě. Vepřové maso uchované při 30 °C obsahuje více biogenních aminů než když je skladované při 4 °C. Skladováním při -18 °C se množství aminů nemění [2].

4.2.3 Ovoce, džusy, zelenina

Některé džusy, nektary a limonády připravované z různých druhů ovoce (pomeranče, maliny, citróny, grapefruity, mandarinky, jahody, rybíz, hrozny) obsahují různé biogenní aminy v proměnlivém množství. Vysoké množství aminů bylo nalezeno v pomerančovém džusu (tryptamin, noradrenalin), rajčatech (tyramin, tryptamin, histamin), banánech (tyramin, noradrenalin, tryptamin, serotonin), švestkách (tyramin, noradrenalin) a špenátu (histamin) [1, 20].

5 STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ

Existují dva důvody pro stanovení biogenních aminů v potravinách. Prvním z nich je jejich potenciální toxicita a druhým je možnost jejich použití jako ukazatele jakosti potravin. Mezi některé z hlavních aplikací analýzy biogenních aminů patří kontrola kvality surovin, polotovarů a konečných výrobků, monitoring fermentačních procesů, řízení procesů, výzkum a vývoj [5].

Pro separaci a identifikaci aminů a jejich derivátů byly vyvinuty různé metody, jako například tenkovrstvá chromatografie (TLC), plynová chromatografie (GC), metoda kapilární elektroforézy (CE) a vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC). Nejjednodušší stanovení biogenních aminů v potravinách je pomocí iontově-výměnné chromatografie (IEC). Fluorimetrické metody se používají pro individuální stanovení biogenních aminů [1, 2, 5].

Typickými problémy při analýze jsou složité matrice vzorků, přítomnost potenciálně rušivých sloučenin a výskyt několika biogenních aminů zároveň. Proto se provádí předčištění, které zahrnuje extrakci vzorku vhodným činidlem. Pro extrakci biogenních aminů byly doporučeny následující činidla: 0,6 M kyselina chloristá, 5 – 10% kyselina trichloroctová a 0,1 M kyselina chlorovodíková. Pro mléčné výrobky je vhodná extrakce metanolem při zvýšené teplotě (60 °C) [17].

5.1 Chromatografické metody

5.1.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Tenkovrstvá chromatografie je jednou z prvních technik, která byla použita na stanovení biogenních aminů v potravinách. Její výhodou je, že nevyžaduje zvláštní nebo nákladné zařízení, je přesná, levná a rychlá. Zapotřebí je pouze fotoaparát a UV transiluminátor [2, 12].

Existuje jednoduchá a rychlá kvantitativní TLC metoda pro stanovení schopnosti bakterií produkovat biogenní aminy v tekutých živných půdách, které obsahují aminokyseliny. Tato metoda je lepší než předchozí TLC metody následkem vynechání extrakce bakteriálního supernatantu. Biogenní aminy jsou obvykle přeměněny na své deriváty, které mají lepší vlastnosti než volné aminy. Nejčastější činidlo používané při derivatizaci aminů je dansyl

chlorid, který dává velmi fluorescentní, relativně stabilní deriváty sulfonamidů, jež mají lepší chromatografické vlastnosti a jsou snadno izolovány extrakcí rozpouštědlem [12, 71].

Pomocí TLC metody mohou být odděleny a identifikovány fluorescenční dansyl deriváty histaminu, tyraminu, putrescinu a fenyletylaminu. Není známo, že by tato metody udávala falešné pozitivní výsledky [12].

5.1.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

V současné době je vysokoúčinná kapalinová chromatografie stále nejrozšířenější analytickou metodou pro stanovení biogenních aminů. Jedná se o reprodukovatelnou a přesnou metodu pro stanovení histaminu, putrescinu, kadaverinu a tyraminu. Tato metoda obvykle zahrnuje pre- nebo postkolonovou derivatizaci a fluorimetrickou detekci. Pro analýzu biogenních aminů se používají různá chemická činidla, například ninhydrin a *o*-ftalaldehyd jako postkolonové derivatizační činidlo a benzoyl chlorid, fluorescein, 9-fluorenylmetylchloroformát, dansyl chlorid jako činidlo pro prekolonovou derivatizaci [1, 12, 17].

Byla vyvinuta lepší metoda pro stanovení nederivatizovaných biogenních aminů (kadaverin, putrescin, spermidin, histamin, tyramin) a některých aminokyselin (histidin, tyrozin), která je založena na iontově-výměnné chromatografii s integrovanou pulsní amperometrickou detekcí (IPAD). Tato metoda byla úspěšně použita pro analýzu biogenních aminů a aminokyselin v potravinách jak rostlinného (kiwi) a živočišného původu (ryby, sardinky), tak i ve fermentovaných potravinách (ementál, suché salámy) [72].

5.1.3 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie se dříve široce používala pro analýzu biogenních aminů, protože je jednoduchá, vysoce citlivá, má vysokou rozlišovací schopnost, krátkou dobu analýzy a nízké náklady. Dnes už se příliš často nepoužívá [17, 73].

Kolony bývají kapilární nebo náplňové, kdy kapilární kolony umožňují lepší separaci biogenních aminů. Pro toto stanovení se používají detektory elektronového záchyty, tepelně vodivostní a plamenové ionizační. Velmi citlivá je plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC-MS) [5, 17].

5.2 Kapilární elektroforéza (CE)

Metody kapilární elektroforézy jsou zajímavé vzhledem ke své krátké analýze a vysokému rozlišení. Problémem je jejich nedostatečná citlivost, která však může být potlačena spojením kapilární elektroforézy s detekcí hmotnostním spektrometrem namísto UV detekce. K dispozici jsou také jiné systémy detekce. Například byla vyvinuta metoda, při níž se používá vodivostní detektor a nevyžaduje derivatizaci nebo čištění vzorku. Tato přímá metoda je citlivá a může stanovit biogenní aminy v potravinách a víně za dobu kratší než 15 minut [5, 12].

Výhodou kapilární elektroforézy je její jednoduchost, rychlost, cenová přístupnost a spolehlivost, což je velmi užitečné pro prověření velkého počtu vzorků v krátké době [17].

5.3 Enzymatické metody

Enzymatické metody byly vyvinuty pro detekci mikroorganismů produkujících biogenní aminy, hlavně histamin. Většina těchto metod je založena na působení enzymu oxidázy na histamin za vzniku peroxidu vodíku. Tyto testy se provádí postupnou aktivitou dvou enzymů, a to diaminoxidázy (DAO) a peroxidázy. Diaminoxidáza katalyzuje rozklad histaminu na imidazol acetaldehyd, amoniak a peroxid vodíku. Peroxidáza v přítomnosti peroxidu vodíku vyvolává změnu barvy [12, 71].

Metoda ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assays) je široce používána pro specifické a citlivé analýzy organických sloučenin ve stopových množstvích ve složité matrici. Tyto testy jsou jednoduché, časově nenáročné, selektivní a levné. Běžně se používají pro analýzu histaminu u makrelovitých ryb [12, 74].

5.4 Molekulární metody

Molekulární metody se detekci a identifikaci bakterií stávají alternativou tradičních kultivačních metod. PCR a DNA hybridizace jsou významné metody, které jsou rychlé, citlivé a jednoduché. Mezi další jejich výhody patří specifická detekce cílených genů [75].

Molekulární metody nejsou závislé na kultivačních podmínkách, a proto mohou být použity k určení producentů biogenních aminů i za okolností, kdy bakterie mléčného kvašení ztratí schopnost jejich tvorby [12].

Tyto metody jsou pro stanovení a identifikaci bakterií, které produkují biogenní aminy, stále více používány, protože jsou spolehlivější, rychlejší a účinnější než jiné techniky [71].

5.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Používání metod, kterými lze rychle zjistit přítomnost biogenních aminů a bakterií produkujících aminy, je důležité pro prevenci hromadění biogenních aminů v potravinách. Testy PCR lze úspěšně použít pro rutinní detekci bakteriálních kmenů, které jsou potenciálními producenty histaminu, tyraminu, putrescinu, a kadaverinu v potravinách [12, 71].

Tato metoda je velmi specifická a její výsledky lze v porovnání s jinými tradičními metodami snadno interpretovat. Kromě toho PCR odkrývá potenciální riziko výskytu biogenních aminů v potravinách ještě před jejich vznikem [71].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bylo charakterizovat biogenní aminy, popsat jejich chemickou strukturu, toxikologické účinky na lidský organismus a jejich vznik. Dále byly popsány mikroorganismy, které je produkují, výskyt biogenních aminů v potravinách a některé metody používané k jejich stanovení.

Cílem praktické části této práce bylo studovat tvorbu biogenních aminů kmeny *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* při různých podmínkách kultivace, zejména se zaměřit na:

- vliv laktózy v koncentracích 0; 0,25; 0,50; 0,75 nebo 1 % (w/v),
- vliv chloridu sodného v koncentracích 0; 1 nebo 2 % (w/v),
- vliv aerobního a anaerobního prostředí.

Pro zajištění cílů práce bylo nutné stanovit produkci biogenních aminů pomocí iontově-výměnné kapalinové chromatografie, postkolonové ninhydrinové derivatizace a spektrofotometrické detekce ($\lambda = 570$ nm).

Na základě získaných výsledků z měření byly zformulovány závěry, které popisují tvorbu biogenních aminů sledovanými kmeny bakterií mléčného kvašení během kultivace za sledovaných podmínek.

7 MATERIÁL A METODIKA

7.1 Kultury bakterií

V experimentální části byla sledována produkce biogenních aminů u následujících kmenů získaných ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora (Culture Collection of Dairy Microorganisms – CCDM):

- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 53
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141

Zaočkováním 20 ml kultivačního média bakteriemi bylo nejdříve připraveno inokulum, které se později použilo k přípravě suspenze bakterií. Jeho kultivace probíhala při teplotě 30 ± 1 °C po dobu 24 hodin. Následně bylo 25 μ l tohoto inokula zaočkováno do 10 ml kultivačního média s přidavkem 0,2 % (w/v) tyrozinu a inkubováno při teplotě 30 ± 1 °C po dobu 24 hodin. Takto připravená suspenze bakterií byla dále použita pro vlastní stanovení dekarboxylázové aktivity bakterií.

7.2 Popis experimentu

V experimentální části této práce byl sledován účinek vybraných vnějších faktorů (přídavek laktózy, NaCl a aerobní/anaerobní prostředí) na produkci biogenních aminů. Při sledování vlivu aerobního a anaerobního prostředí byla jedna polovina zkumavek kultivována aerobně a druhá anaerobně, čehož bylo dosaženo kápnutím sterilního parafinového oleje (750 μ l) na kultivační médium.

Ze suspenze bakterií narostlých přes noc bylo odebráno 25 μ l a naočkováno do M17 bujónu s přidavkem 0,2 % (w/v) tyrozinu. Kultivace kmenů pozitivních na produkci biogenního aminu tyraminu probíhala při 10 ± 1 °C v rozmezí 1 až 15 dnů. Odběr vzorků probíhal 0., 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 10., 12. a 15. den kultivace, byl náhodný a od každého kmene a každé úrovně faktoru byly vzaty 2 zkumavky. Od každého kmene bylo tedy analyzováno 330 různých variant média po kultivaci bakterií.

Produkce tyraminu byla stanovena pomocí iontově-výměnné kapalinové chromatografie a současně byla měřena optická denzita buněk a pH kultivačního média.

7.3 Kultivační média

Bujón M17

M17 (Oxoid).....	37,25 g
glukóza (Lach-Ner)	5,00 g
laktóza (Lach-Ner).....	5,00 g
voda.....	1000,00 ml

Příprava půdy: Bylo naváženo 37,25 g půdy M17 s příslušným sacharidem, NaCl a aminokyselinou a vše bylo rozpuštěno v 1000 ml vody. Sterilizace proběhla v autoklávu při 123 °C po dobu 15 minut.

V závislosti na sledovaných vnějších faktorech byl bujón M17 (o objemu 5 ml) s přídatkem 0,2 % (w/v) tyrozinu obohacen o:

- laktózu v koncentracích 0; 0,25; 0,50; 0,75 a 1,00 % (w/v) bez současného přídatku NaCl,
- NaCl v koncentraci 1 % (w/v) a laktózu v koncentracích 0; 0,25; 0,50; 0,75 a 1,00 % (w/v),
- NaCl v koncentraci 2 % (w/v) a laktózu v koncentracích 0; 0,25; 0,50; 0,75 a 1,00 % (w/v).

7.4 Měření optické denzity buněk

Při každém odběru vzorků pro analýzu byl sledován také nárůst mikroorganismů měřením optické denzity buněk při vlnové délce 600 nm (OD_{600}) proti bujónu M17 (s přídatkem odpovídající koncentrace laktózy a/nebo NaCl) bez zaočkovaných buněk na spektrofotometru s diodovým polem LIBRA S6 (Biochrom, Cambridge, UK).

7.5 Měření pH kultivačního média

V jednotlivých odběrových dnech bylo rovněž zjišťováno pH kultivačního média. Kultivační médium bylo po inkubaci mikroorganismů centrifugováno (10000×30 min) a po odstranění buněk byla měřena hodnota pH bujónu M17. K měření byl využíván pH-metr GRYF209S (GryfHB, Havlíčkův Brod, Česká republika) s kombinovanou skleněnou elektrodou pro biologické vzorky. Měření probíhalo po vytemperování vzorků na teplotu 22 ± 2 °C. Všechny vzorky byly měřeny nejméně ve trojím opakování.

7.6 Stanovení produkce biogenních aminů

Produkce biogenních aminů byla sledována metodou iontově-výměnné chromatografie. Kultivační médium s přidavkem 0,2 % (w/v) tyrozinu bylo po inkubaci centrifugováno (10000×30 min). Následně byla směs zfiltrována přes 0,45 μm filtr a 100 μl takto připravené směsi bylo automaticky nastříknuto do analyzátoru aminokyselin AAA400 (Ingos, Praha, Česká republika). Součástí analyzátoru je kolona (55 \times 3,7 mm) naplněná ionexem Ostion LG ANG (Ingos, Praha, Česká republika). Detekce probíhala po postkolonové ninhydrinové derivatizaci spektrofotometrickým detektorem ($\lambda = 570$ nm). Jako eluční pufr byly použity roztoky, jejichž složení je uvedeno v tabulce 4. Postup přípravy ninhydrinového činidla a chemikálie (s výjimkou standardů) byly získány od výrobce AAA 400 (Ingos, Praha, ČR). Standardy biogenních aminů byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Každá směs byla analyzována minimálně dvakrát. Pokud byla koncentrace biogenních aminů ve směsi příliš vysoká, byl pro ředění použit dávkovací pufr I (tabulka 4) [76, 77].

Biogenní aminy byly eluovány podle následujícího programu: pufr A po dobu 20 minut, pufr B po dobu 60 – 86 minut, regenerace 0,2 mol.l⁻¹ NaOH po dobu 5 minut a stabilizace pufrem A 19 minut. Průtoková rychlost pufru byla 0,3 ml.min⁻¹, ninhydrinového činidla 0,2 ml.min⁻¹. Eluce probíhala při teplotě 65 °C (0 – 41 minut a 111 – 120 minut) a 45 °C (41 – 111 minut). Poněvadž probíhala separace pouze tyraminu, mohl být tento program zkrácen: pufr A po dobu 20 minut, regenerace 0,2 mol.l⁻¹ NaOH po dobu 5 minut a stabilizace pufrem A 10 minut. Teplota kolony byla udržována na 65 °C. Teplota kolony byla udržována na 65 °C [76, 77].

Tabulka 4 - Složení sodnocitrátových pufrů použitých při detekci biogenních aminů (složení uvedeno v gramech na celkový objem pufru 1 l) [77]

Reagencie	Pufr		
	A	B	Dávkovací pufr
Kyselina citronová monohydrát	1,55	14,00	14,00
Citronan sodný dihydrát	21,00	–	–
Chlorid sodný	5,00	–	11,50
Chlorid draselný	–	171,50	–
Bromid draselný	41,65	–	–
Hydroxid draselný	–	10,00	–
Azid sodný	–	–	0,10
Izopropanol (ml)	250,00	–	–
Tiodiglykol (ml)	–	–	5,00

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

Kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* byly testovány na vliv laktózy o koncentraci 0, 0,25, 0,5, 0,75 a 1 % w/v, chloridu sodného o koncentraci 0, 1 a 2 % w/v a aerobního a anaerobního prostředí na produkci tyraminu.

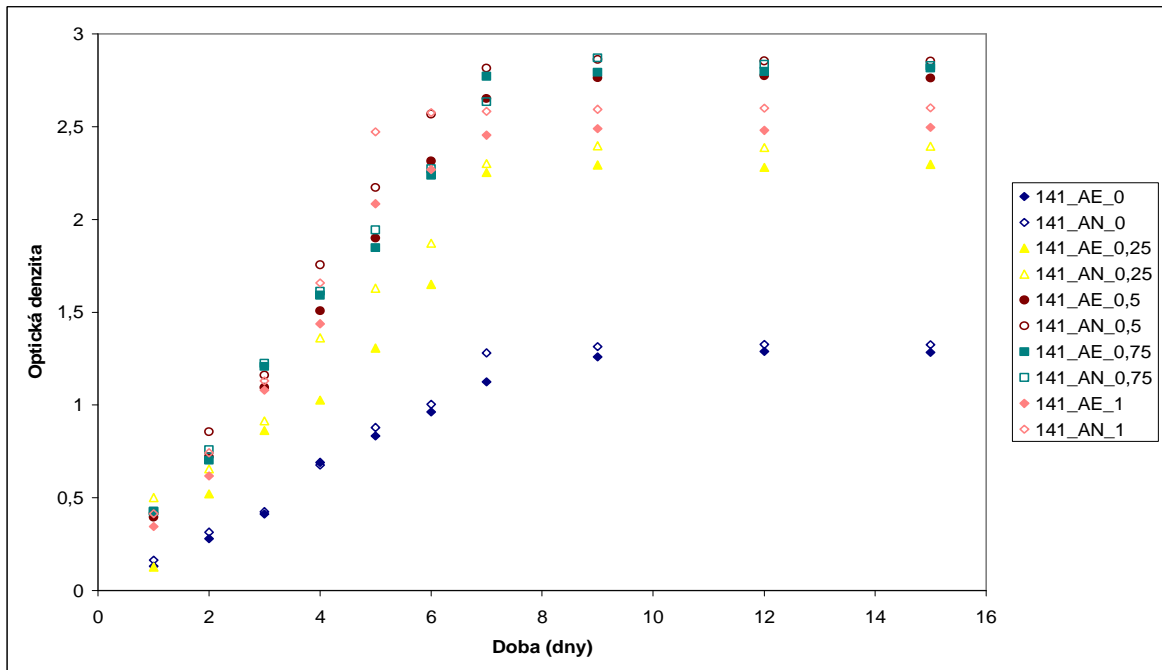
8.1 Vliv laktózy, NaCl a aerobního/anaerobního prostředí na produkci tyraminu u kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Pomocí metody iontově výměnné chromatografie byla po kultivaci bakterií zjišťována přítomnost biogenních aminů v médiu obohaceném o příslušné aminokyseliny. Produkce biogenních aminů v závislosti na vnějších vlivech byla testována u 3 kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, které byly v dřívějších studiích označeny za producenty tyraminu [76,77].

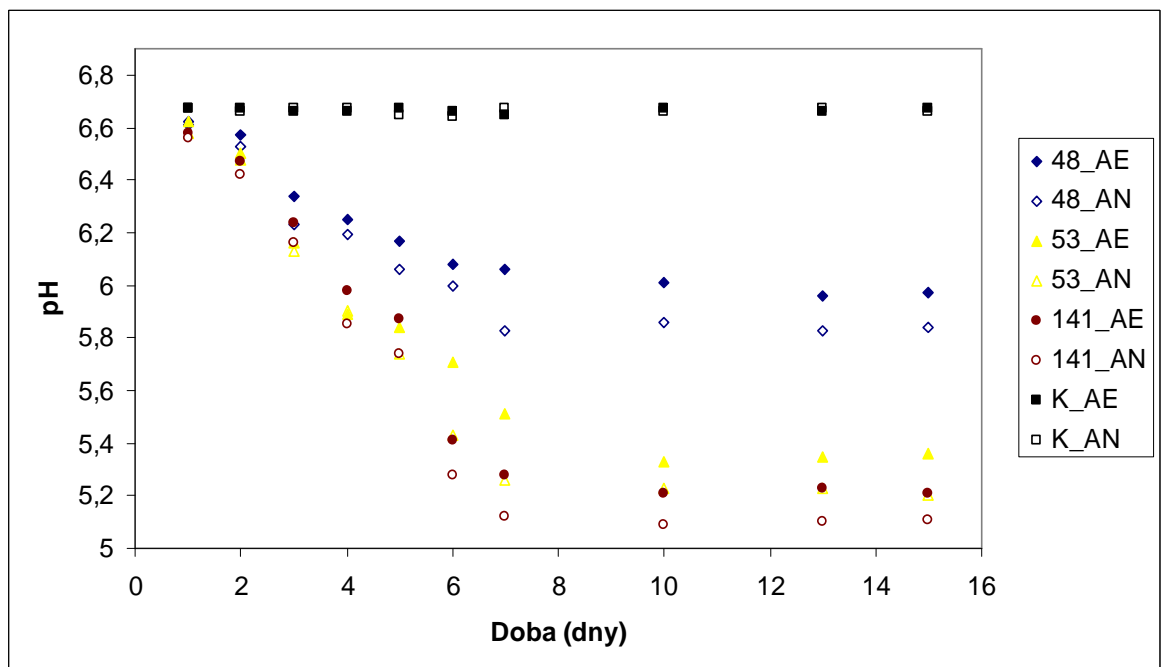
U laktokoků byl tyramin metodou IEC detekován u 3 kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Největší tvorbu tyraminu vykazoval kmen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, nejmenší pak *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48.

Měření optické denzity buněk (příloha I – III) byl zjišťován vliv vybraných faktorů na růst sledovaných kmenů bakterií. Největší nárůst byl detekován u kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 (obr. 10), nejmenší pak *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48.

Během kultivace došlo vlivem pomnožení sledovaných bakterií mléčného kvašení ke zvýšení produkce kyseliny mléčné, a tím tedy k poklesu pH kultivačního média (příloha IV – VI). V prvních 5-6 dnech byl pokles rychlý až k hodnotám pH kolem 5 – 5,2 a v dalších dnech došlo pouze k mírnému snížení pH. Po celou dobu bylo sledováno také kontrolní kultivační médium (tj. bez zaočkovaných bakterií). Jeho pH se pohybovalo v rozmezí 6,7 – 6,8. Vliv NaCl a aerobního nebo anaerobního prostředí nebyl tak výrazný, avšak prostředí s vyšší koncentrací NaCl vykazovalo nižší hodnoty pH než prostředí bez jeho přídavku. Nejnižší pH (5,09) bylo naměřeno u kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 po 10 dnech kultivace v prostředí s 1% (w/v) laktózy, 1% (w/v) NaCl a bez přístupu kyslíku (obr. 11).



Obr. 10 - Optická denzita buněk kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 kultivovaného s přidavkem různých koncentrací laktózy a 1 % (w/v) NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0 – 1 vyjadřují koncentraci laktózy (v %).



Obr. 11 - Změny pH během kultivace testovaných kmenů laktokoků s přidavkem 1 % (w/v) laktózy a 1 % (w/v) NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium bez přidavku bakterií.

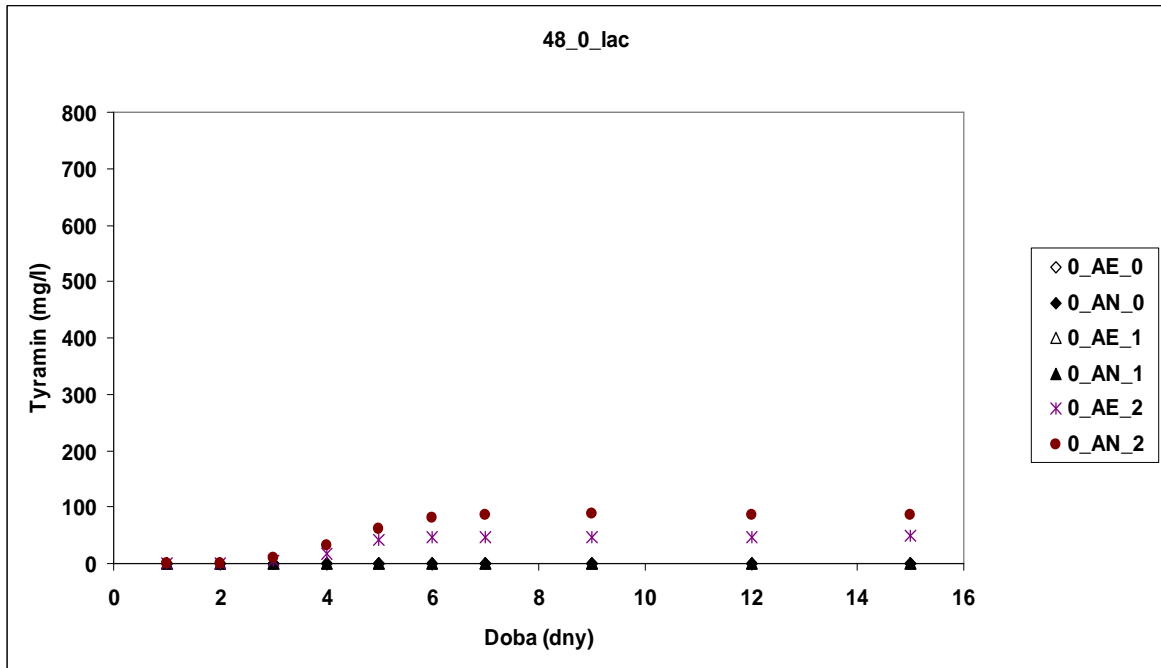
8.1.1 Produkce tyraminu kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

Rychlost růstu *Lactococcus* kmene *lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 se výrazně zvyšovala přibližně do 7. dne. V dalších dnech pak vzrostla jen mírně. Nárůst buněk se s rostoucí koncentrací NaCl v prostředí také zvyšoval a obsah laktózy podporoval růst laktokoků pouze do určité hranice (0,5 % (w/v)), pak se hodnota optické denzity snižovala. Vyšší nárůst byl pozorován také v anaerobním prostředí, pouze v případě kultivace bez přídavku NaCl tomu bylo naopak. Nejvyšší hodnota optické hodnoty pak byla zjištěna 9. den a nejlepším prostředím pro růst tohoto kmene bakterií mléčného kvašení bylo kultivační médium obohacené o 0,5 % (w/v) laktózy a 2 % (w/v) NaCl a při zamezení přístupu kyslíku. V tomto případě hodnota optické denzity činila 1,494 (příloha I).

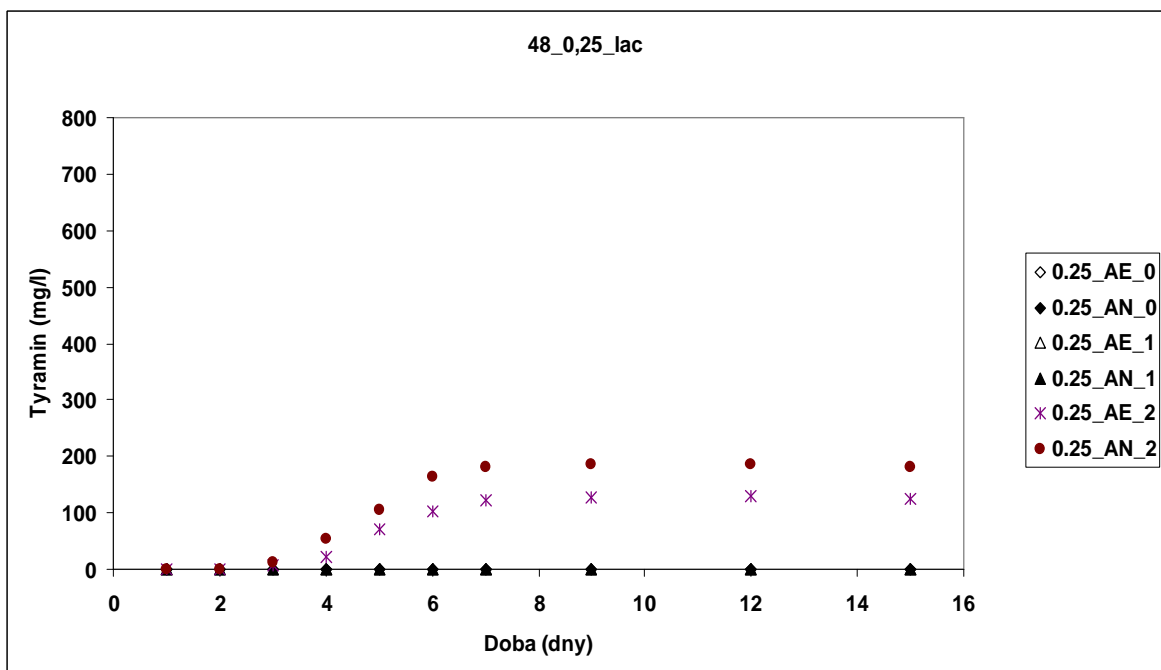
S pomnožením kultur souvisí také produkce kyseliny mléčné, která prostředí okyselovala. Výraznější pokles byl zaznamenán v anaerobním prostředí. V prostředí bez přídavku NaCl se pH se zvyšující se koncentrací laktózy snižovalo přibližně od 6,43 do 6,24. Přídavkem 1 % (w/v) NaCl byl pokles pH výraznější až na hodnotu 5,83. Nejstrmější pokles pH byl však v prostředí s 2 % (w/v) NaCl, kdy konečná hodnota byla 5,76 (přílohy IV – VI).

U tohoto kmene byla pozorována produkce tyraminu až mezi 3. a 4. dnem kultivace, a to jen v případě vzorků kultivovaných v prostředí s 2 % (w/v) NaCl při všech sledovaných koncentracích laktózy, a to v aerobním i anaerobním prostředí. V anaerobním prostředí byla produkce tohoto biogenního aminu výrazně vyšší než v přítomnosti kyslíku. Obsah vyprodukovaného tyraminu byl také ovlivněn různou koncentrací laktózy, kdy největší tvorba byla zaznamenána v případě přídavku 0,5 % laktózy (w/v) (cca 450 mg/l kultivačního média), a to po 12 dnech kultivace. Při kultivaci bakterií v prostředí bez přídavku laktózy bylo dosaženo produkce tyraminu asi 88 mg/l, v přítomnosti 0,25 % (w/v) laktózy došlo k navýšení detekovaného množství přibližně na 186 mg/l, při přídavku 0,75 % (w/v) laktózy se množství stanoveného tyraminu snížilo na hodnotu cca 385 mg/l a dalším zvýšením koncentrace na 1 % (w/v) laktózy v médiu bylo množství opět nižší (cca 190 mg/l). V aerobním prostředí bylo množství detekovaného tyraminu při stejných podmínkách zhruba o třetinu až polovinu nižší.

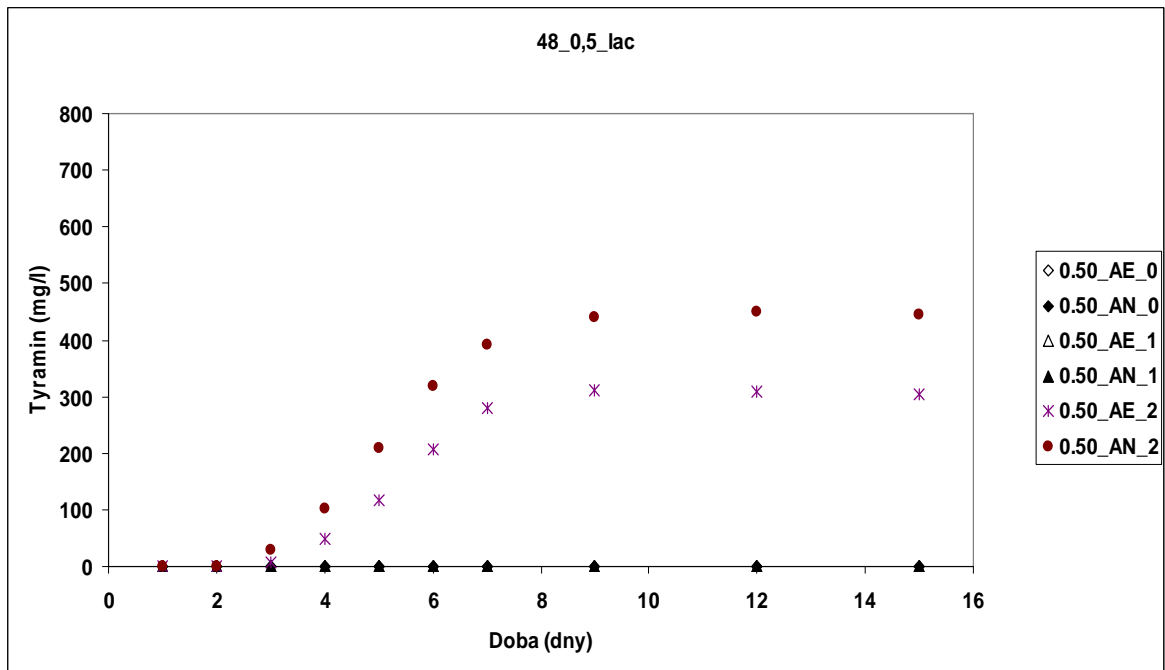
Z obr. 12 – 16 lze vyčíst, že od počátku produkce se množství tyraminu v prostředí rychle zvyšovalo až do 9. dne a pak došlo k mírnému poklesu. Bylo to pravděpodobně způsobeno vyčerpáním živin v médiu.



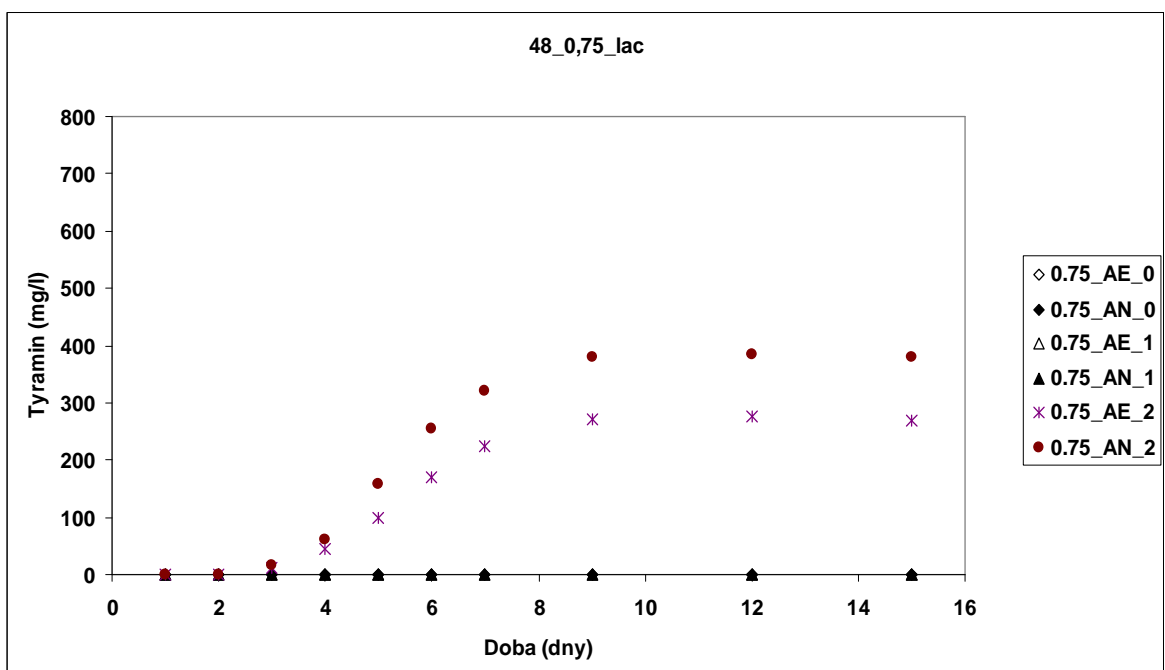
Obr. 12 - Produkce tyraminu kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 v médiu bez přídavku laktózy. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0, 1 a 2 vyjadřují koncentraci NaCl (v %).



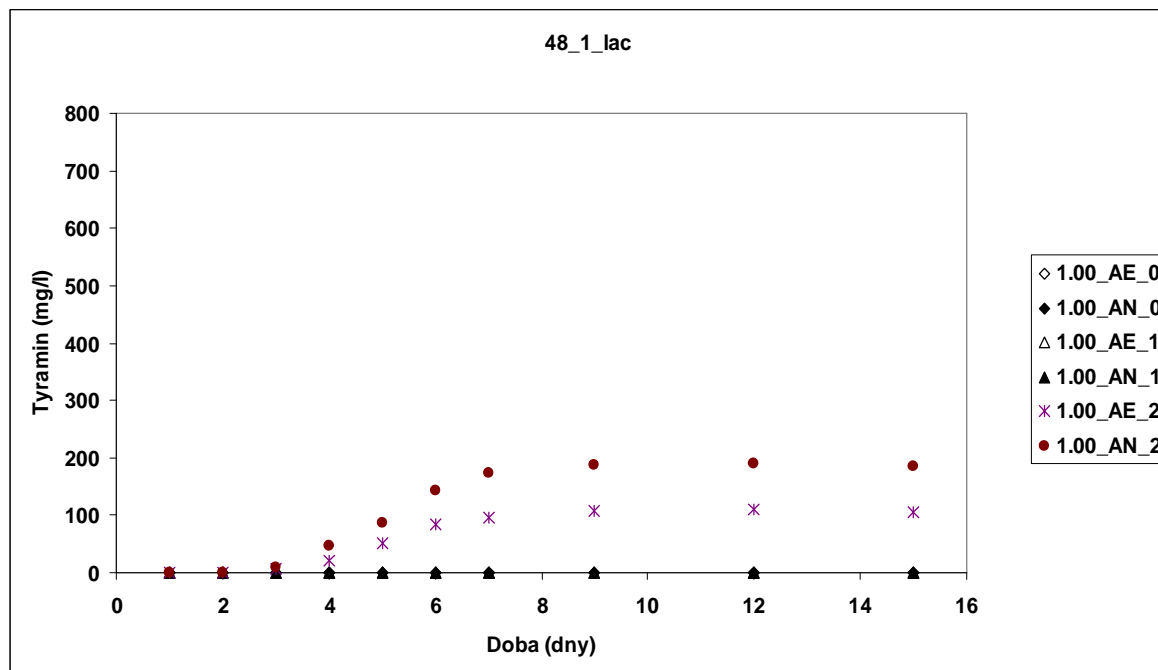
Obr. 13 - Produkce tyraminu kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 v médiu s přídavkem 0,25 % (w/v) laktózy. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0, 1 a 2 vyjadřují koncentraci NaCl (v %).



Obr. 14 - Produkce tyraminu kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 v médiu s přidavkem 0,5 % (w/v) laktózy. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0, 1 a 2 vyjadřují koncentraci NaCl (v %).



Obr. 15 - Produkce tyraminu kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 v médiu s přidavkem 0,75% (w/v) laktózy. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0, 1 a 2 vyjadřují koncentraci NaCl (v %).



Obr. 16 - Produkce tyraminu kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 v médiu s přidavkem 1 % (w/v) laktózy. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0, 1 a 2 vyjadřují koncentraci NaCl (v %).

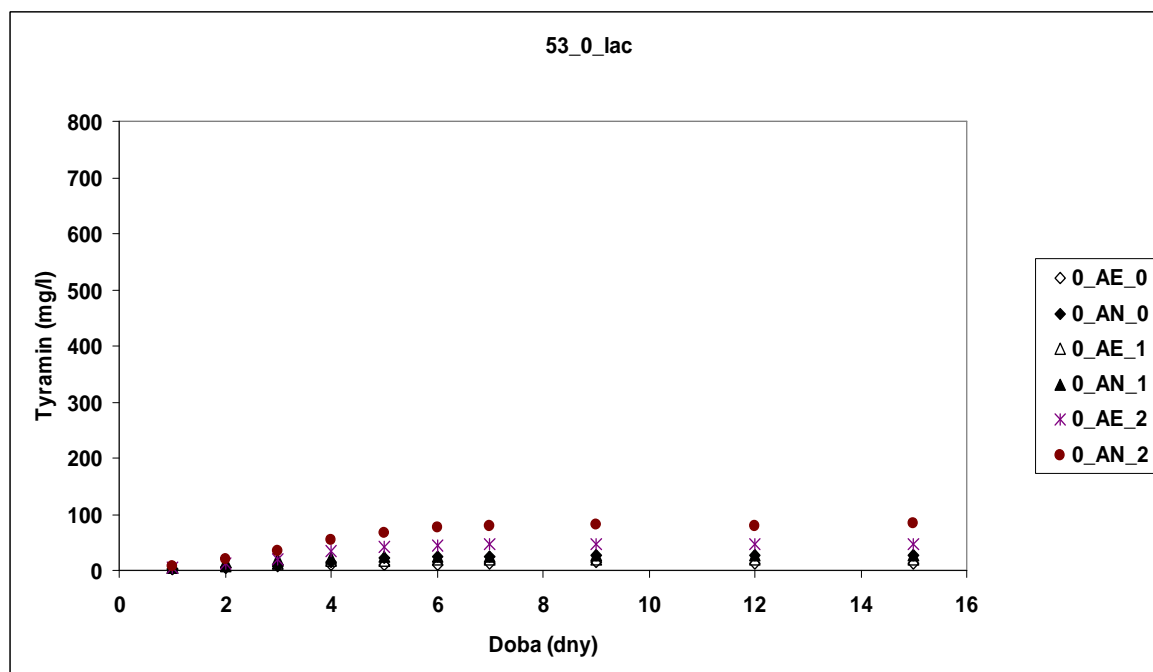
8.1.2 Produkce tyraminu kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 53

Největší rychlost pomnožení bakterií kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 53 byla zaznamenána přibližně do 7. dne kultivace. V následujících dnech došlo již ke zpomalení růstu. Pomnožení tohoto kmene v daných podmínkách bylo velmi proměnlivé. V prostředí bez přítomnosti NaCl byl nejvyšší nárůst při 0,75 % (w/v) laktózy a aerobních podmínkách. Hodnota optické denzity (2,68) byla nejvyšší v případě kultivace s přidavkem 0,5 % (w/v) laktózy, 1 % (w/v) NaCl a v anaerobním prostředí, a to 15. den. V přítomnosti 2 % (w/v) NaCl bylo pomnožení největší při kultivaci s 1 % (w/v) laktózy a za přístupu kyslíku (příloha II).

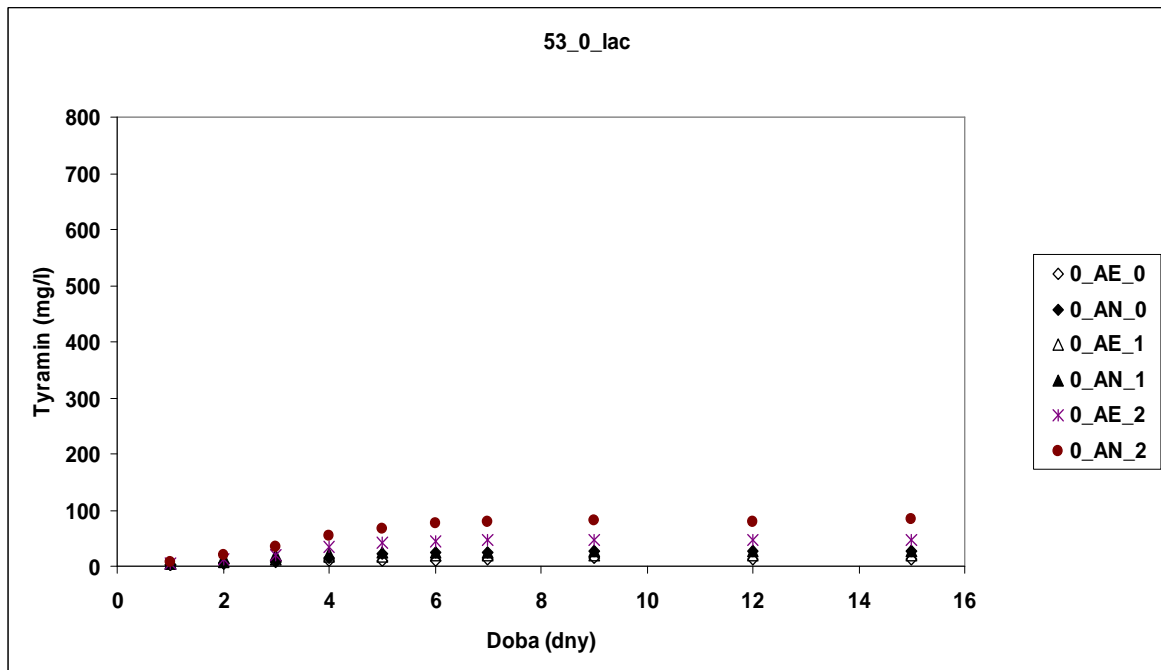
Tento kmen okyseloval prostředí mnohem výrazněji než kmen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48. V anaerobním prostředí byl nárůst laktokoků větší, a tudíž i produkce kyseliny mléčné. Podobně jako u předcházejícího kmene, byl také u tohoto kmene zaznamenán nejnižší pokles pH v prostředí bez přidavku NaCl (z 6,28 na 5,43). V přítomnosti 1 % (w/v) NaCl došlo ke snížení pH na hodnotu 5,2 a při přidavku 2 % (w/v) NaCl až na 5,11 (přílohy IV, V, VI).

U kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 53 byla pozorována mírná produkce tyraminu už po denní kultivaci. Podobně jako u kmene CCDM 48 byla nejvyšší produkce tyraminu zaznamenána v médiu s 2 % (w/v) NaCl, a to 545 mg/l. Se snižující se koncentrací NaCl v kultivačním médiu se snižovalo i množství vyprodukovaného tyraminu. Při přidavku 1 % (w/v) NaCl se tato hodnota zmenšila přibližně o jednu třetinu a bez přítomnosti NaCl v prostředí kleslo množství vyprodukovaného tyraminu ještě přibližně o pětinu na cca 305 mg/l. Prostředí bez přístupu kyslíku bylo pro dekarboxylaci tyrozinu opět příznivější. V aerobním prostředí bylo množství detekovaného tyraminu za stejných podmínek asi o pětinu až polovinu nižší. Přítomnost laktózy v médiu podporovala růst laktokoků, a tím tedy i produkci tyraminu až do koncentrace 0,5 % (w/v). Dalším zvýšením koncentrace laktózy bylo zaznamenáno menší množství tyraminu, kdy v přítomnosti 0,75 (w/v) laktózy to bylo 460 mg/l média a při přidavku 1 % (w/v) laktózy už jen 313 mg/l. Při počátečních koncentracích laktózy (0 a 0,25 % (w/v)) bylo v médiu detekováno přibližně 83,3 mg/l a 402 mg/l tyraminu.

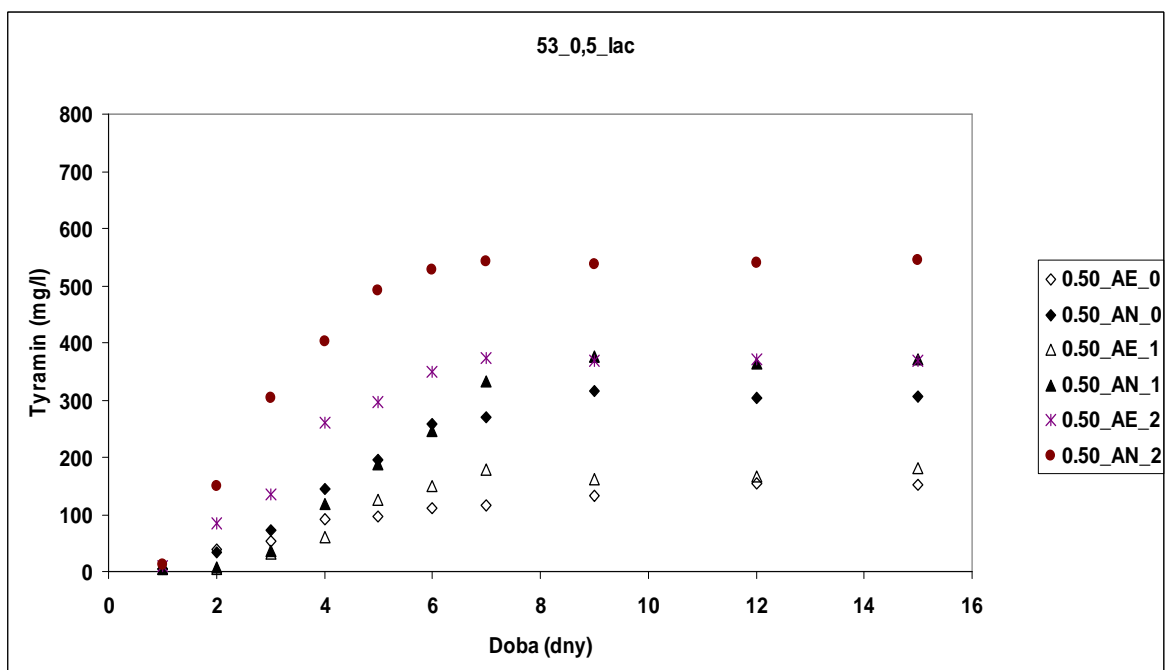
Kmenem *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53 byla tedy maximální tvorba tyraminu dosažena 15. den při přidavku 0,5 % (w/v) laktózy, 2 % (w/v) NaCl a za anaerobních podmínek, a to cca 545 mg/l média. Další dny byla produkce tyraminu konstantní (obr. 17 – 21).



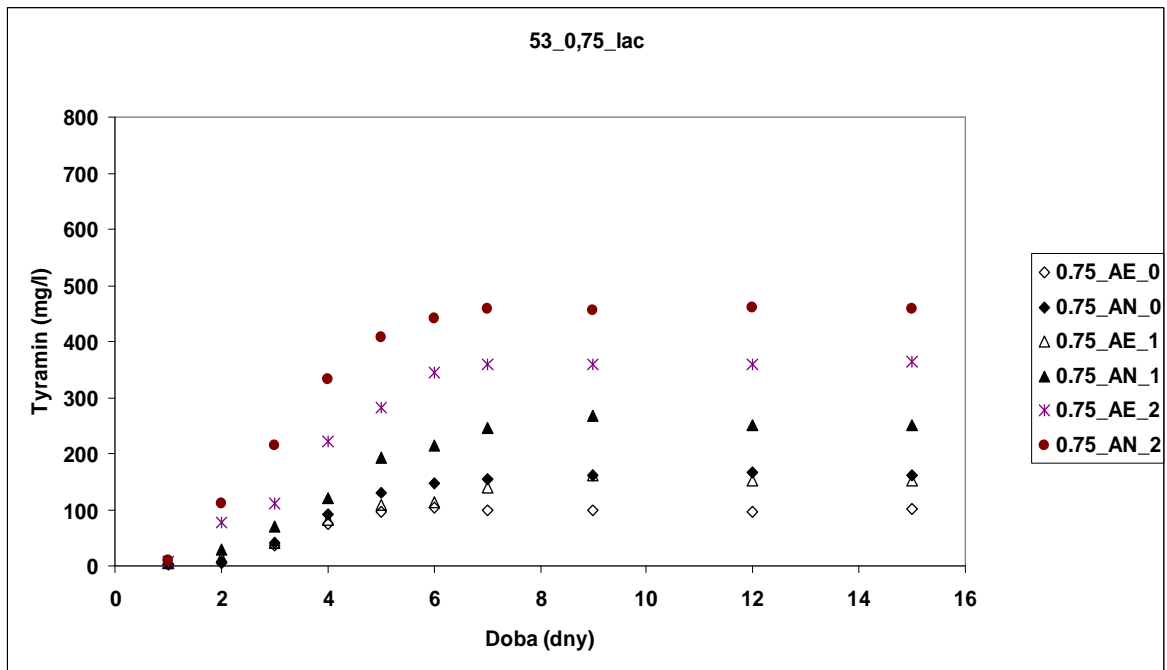
Obr. 17 - Produkce tyraminu kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 53 v médiu bez přidavku laktózy. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0, 1 a 2 vyjadřují koncentraci NaCl (v %).



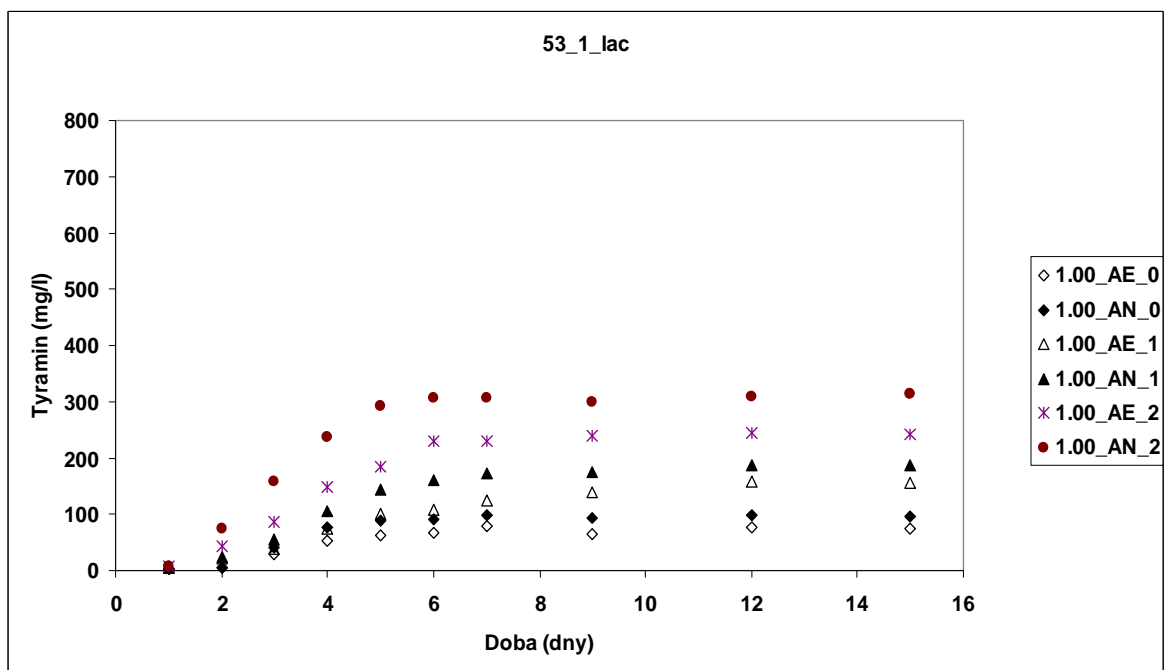
Obr. 18 - Produkce tyraminu kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 53 v médiu s přidavkem 0,25 % (w/v) laktózy. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0, 1 a 2 vyjadřují koncentraci NaCl (v %).



Obr. 19 - Produkce tyraminu kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 53 v médiu s přidavkem 0,5 % (w/v) laktózy. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0, 1 a 2 vyjadřují koncentraci NaCl (v %).



Obr. 20 - Produkce tyraminu kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 53 v médiu s přidavkem 0,75 % (w/v) laktózy. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0, 1 a 2 vyjadřují koncentraci NaCl (v %).



Obr. 21 - Produkce tyraminu kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 53 v médiu s přidavkem 1 % (w/v) laktózy. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0, 1 a 2 vyjadřují koncentraci NaCl (v %).

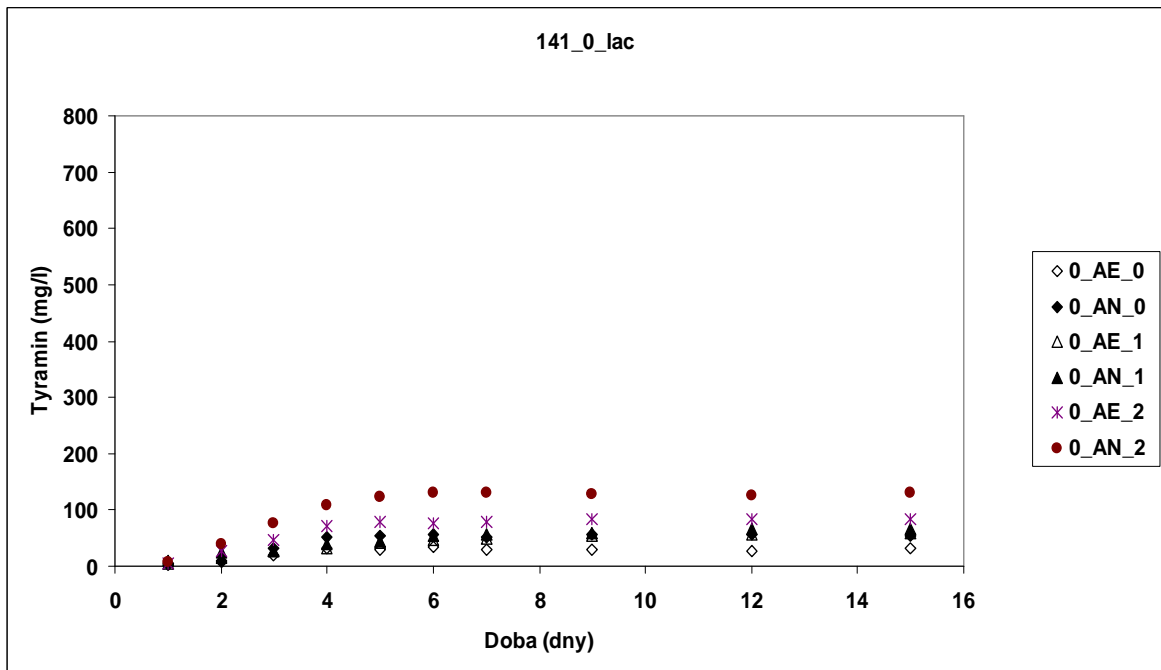
8.1.3 Produkce tyraminu kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141

U kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 byla zaznamenána nejvyšší hodnota optické denzity (2,87) 9. den při kultivaci s přidavkem 0,75 % (w/v) laktózy, 1 % (w/v) NaCl a bez přístupu kyslíku. Následující dny se tato hodnota příliš neměnila. Když v médiu nebyl přítomen chlorid sodný, tak byl největší nárůst (2,511) sledován v přítomnosti 0,75 % (w/v) laktózy a za přístupu kyslíku. Bylo-li však prostředí obohaceno 2 % (w/v) NaCl, tak k největšímu pomnožení (2,617) došlo už při 0,5 % (w/v) laktózy a opět v aerobním prostředí (příloha III).

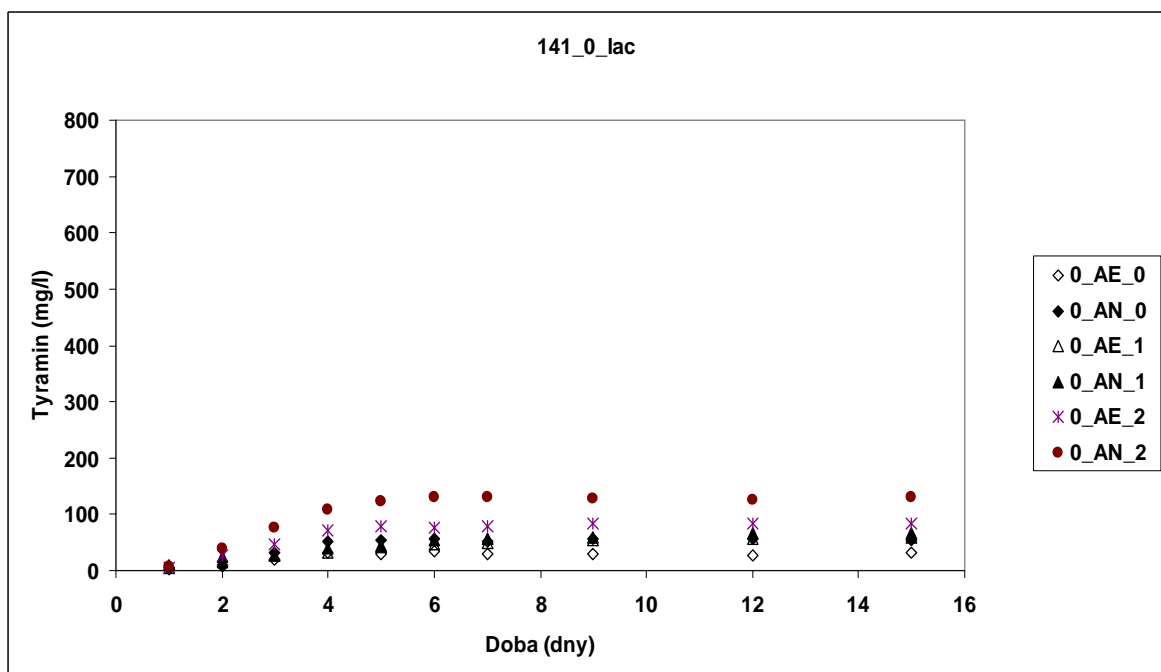
Kmen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 měl podobný průběh okyselení kultivačního média (pokles pH) jako předcházející kmen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 53. Nejnižší hodnota (5,09) byla však naměřena v médiu s NaCl o koncentraci 1 % (w/v). V médiu bez přidavku NaCl se pH postupně snižovalo s rostoucí koncentrací laktózy z hodnoty 6,44 na 5,44. Přidavkem 2 % (w/v) NaCl pak pH kleslo na hodnotu 5,24 (přílohy IV, V, VI).

U kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 byla pozorována slabá produkce tyraminu už první den kultivace. V anaerobním prostředí byla produkce tyraminu opět vyšší než v aerobním prostředí, kdy produkce klesala asi o jednu šestinu až polovinu. Jako u předešlých kmenů, byla tvorba tyraminu největší v přítomnosti 2 % (w/v) NaCl (cca 790 mg/l). Kultivací v prostředí s přidavkem 1 % (w/v) NaCl se množství tyraminu snížilo asi o pětinu a v prostředí bez přidavku NaCl o další třetinu. Z obr 22 – 26 lze vidět, jak se množství vytvořeného tyraminu s rostoucí koncentrací zvyšuje až do svého maxima. Tento kmen byl rovněž nejproduktivnější v prostředí obohaceném o 0,5 % (w/v) laktózy. V přítomnosti vyšších koncentrací laktózy (0,75 a 1 % (w/v)) byla zaznamenána nižší tyrozindekarboxylázová aktivita až o jednu třetinu.

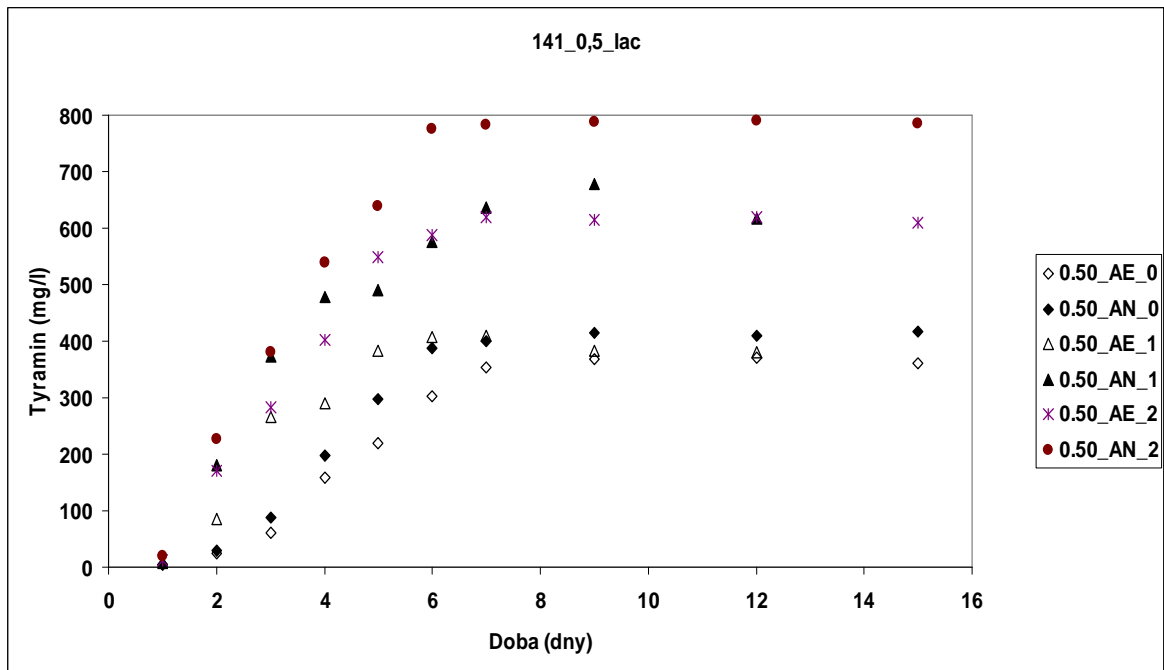
Nejvyšší produkce tyraminu byla zaznamenána 12. den kultivace v prostředí při přidavku 0,5 % (w/v) laktózy a 2 % (w/v) NaCl, a to cca 790 mg/l kultivačního média. Další dny se již produkce biogenního aminu příliš neměnila, popř. mírně klesala.



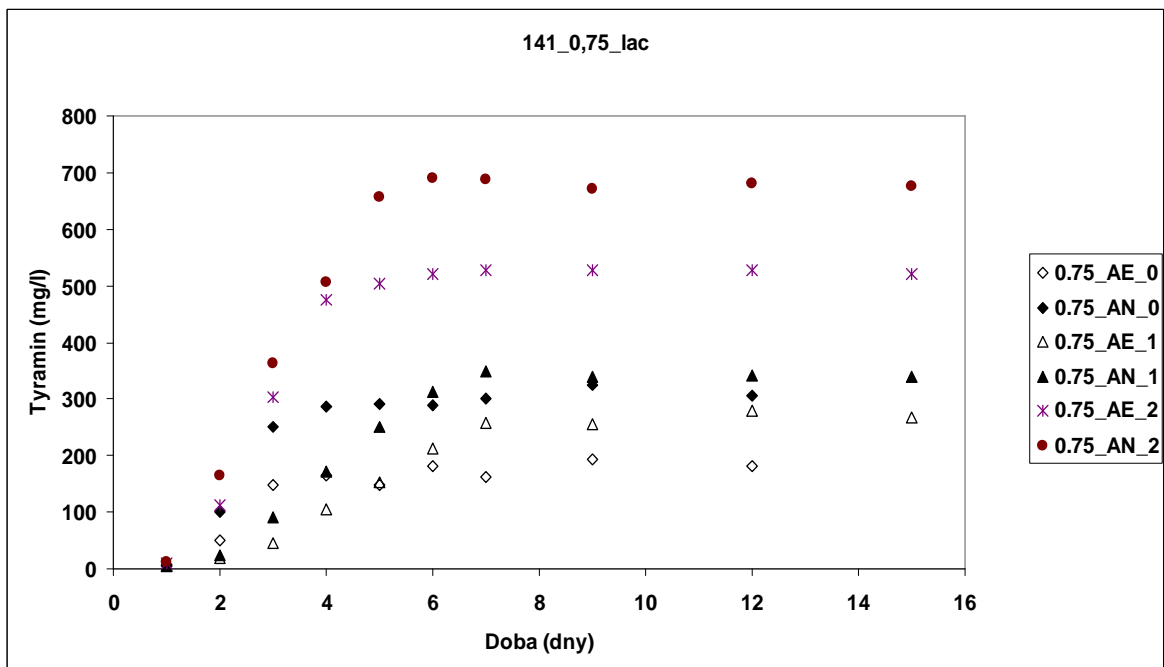
Obr. 22 - Produkce tyraminu kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 v médiu bez přídavku laktózy. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0, 1 a 2 vyjadřují koncentraci NaCl (v %).



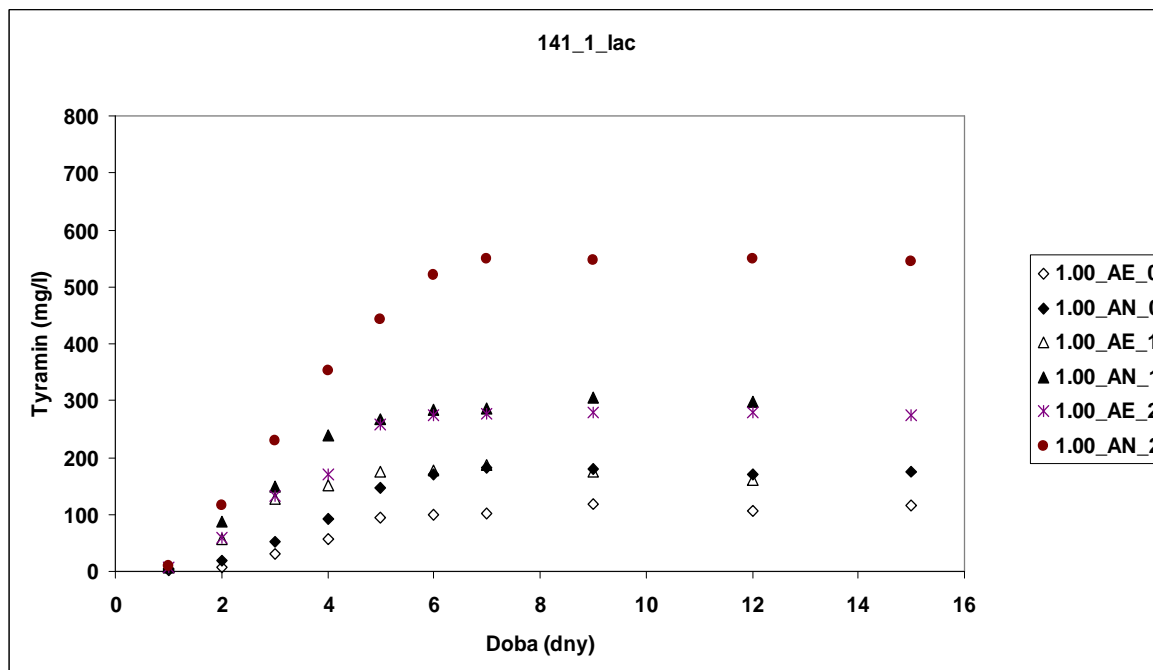
Obr. 23 - Produkce tyraminu kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 v médiu s přídavkem 0,25 % (w/v) laktózy. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0, 1 a 2 vyjadřují koncentraci NaCl (v %).



Obr. 24 - Produkce tyraminu kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 v médiu s přidavkem 0,5 % (w/v) laktózy. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0, 1 a 2 vyjadřují koncentraci NaCl (v %).



Obr. 25 - Produkce tyraminu kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 v médiu s přidavkem 0,75 % (w/v) laktózy. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0, 1 a 2 vyjadřují koncentraci NaCl (v %).



Obr. 26 - Produkce tyraminu kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 v médiu s přidavkem 1 % (w/v) laktózy. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0, 1 a 2 vyjadřují koncentraci NaCl (v %).

8.2 Souhrnná diskuze

Růst a množení bakterií jsou ovlivňovány řadou faktorů, mezi které se řadí zejména zdroje uhlíku a energie. Mnohé bakterie většinou využívají jako zdroje uhlíku a energie sacharidy, které pak mohou přeměňovat na další produkty [78]. Kromě toho, že jsou sacharidy primárně využívány jako zdroj uhlíku a energie, mohou v buňkách bakterií ovlivňovat i další procesy, mezi které lze zařadit například aktivitu dekarboxylačních enzymů. Produkce biogenních aminů v potravinách je závislá na mnoha činitelích, mezi které řadíme kromě sacharidů (v našem případě vliv laktózy v různých koncentracích) také koncentraci NaCl v kultivačním prostředí nebo dostupnost kyslíku (aerobní nebo anaerobní prostředí). Kromě těchto faktorů ovlivňuje výskyt biogenních aminů v prostředí také přítomná mikroflóra, množství prekurzorů, teplota, pH, aktivita vody, redox potenciál a mnoho dalších vlivů [17, 31].

Produkce biogenních aminů je rovněž omezena množstvím dostupných aminokyselin v prostředí [30], a proto bylo kultivační médium (bujón M17) obohaceno o 0,2 % (w/v) aminokyseliny tyrozinu, která sloužila jako prekurzor pro tvorbu tyraminu. Z testovaných

kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* byla připravena suspenze buněk, která byla kultivována přes noc, aby došlo k pomnožení buněk a zároveň k zahájení dekarboxylázové aktivity bakterií [8]. Při přímém naočkování bakterií, tj. bez předchozího pomnožení v bujónu s prekurzorem biogenního aminu, do média se sledovanými faktory by mohlo dojít k pomalejší aktivaci dekarboxylázových enzymů a k pozdější produkci tyraminu než při naočkování suspenze buněk s připravenými dekarboxylázovými enzymy.

V diplomové práci byl v modelových podmínkách *in vitro* sledován vliv přídavku laktózy v koncentracích 0 – 1 % (w/v), chloridu sodného v koncentracích 0 – 2 % (w/v) a aerobního/anaerobního prostředí na produkci tyraminu u tří kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, které byly již dříve označeny za producenty biogenního aminu tyraminu [76, 77].

Faktory a jejich úrovně byly voleny tak, aby se přiblížily podmínkám technologického procesu výroby přírodních sýrů (zejména procesu výroby sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou holandského typu, mezi které lze např. zařadit v České republice poměrně oblíbené a hojně konzumované eidamské sýry) a napomohly tak předvídat tvorbu biogenních aminů ve fermentovaných mléčných výrobcích, které prochází delším zrácím procesem. Testované kmeny laktokoků byly proto z tohoto důvodu kultivovány po dobu 15 dnů při teplotě 10 ± 1 °C. Tato teplota se totiž často využívá během technologického procesu zrání přírodních sýrů.

Ve fermentovaných výrobcích obecně hrozí větší riziko výskytu biogenních aminů než v potravinách nefermentovaných [1]. Mezi používané bakterie mléčného kvašení s výraznou dekarboxylázovou aktivitou patří zejména zástupci rodů *Enterococcus*, *Lactobacillus* a *Lactococcus* [37]. Naproti tomu výskyt biogenních aminů v nefermentovaných potravinách je obvykle spojen s nežádoucí kontaminující mikrobiální aktivitou [2].

Z výsledků této práce je patrné, že kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 53 a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 produkovaly tyramin za všech testovaných podmínek, kdežto kmen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 měl tyrozindekarboxylázu aktivní pouze v přítomnosti 2 % w/v NaCl. Lze předpokládat, že dalším zvyšováním koncentrace NaCl by došlo k větší produkci biogenního aminu tyraminu, avšak po překročení určité hranice by přítomný chlorid sodný působil

na testované laktokoky negativně. Testované koncentrace NaCl (0 – 2 % (w/v)), které se přibližovaly hodnotám koncentrace solí při výrobě přírodních sýrů, neměly tedy inhibiční účinky na růst sledovaných kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ani jejich dekarboxylázovou aktivitu. Studie od Santos a kol. [79] naopak popisuje nepříznivý vliv 0,5 % (w/v) NaCl na produkci tyraminu a dalších biogenních aminů, a to při kultivaci za teploty 20 a 32 °C. Sumner a kol. [80] sledovali vliv různých koncentrací NaCl (0; 0,5; 1,5; 3,5 a 5,5 % (w/v)) na produkci histaminu u bakterií *Lactobacillus buchneri*. Maximální tvorba histaminu byla v tomto experimentu zaznamenána při přidávku 0,5 % (w/v) NaCl do kultivačního média (MRS). Podobně jako při naší práci pozorovali v přítomnosti chloridu sodného nepatrně rychlejší i vyšší produkci biogenního aminu než bez jeho přidavku. Koncentrace 5,5 % (w/v) NaCl už značně inhibovala schopnost *Lactobacillus buchneri* produkovat histamin, ale růst této bakterie inhibován ještě nebyl. Také Taylor a Woychik [81] zjistili, že koncentrace 3,5 – 5,5 % (w/v) NaCl působí inhibičně na produkci histaminu u gramnegativní bakterie *Klebsiella pneumoniae*, kdežto nižší koncentrace NaCl jsou vůči snížení produkce histaminu neúčinné.

Přítomnost laktózy (0,25 – 1 % (w/v)) v kultivačním médiu byla pro růst bakterií, a tedy i produkci tyraminu, nezbytná, protože sloužila jako zdroj živin a energie, avšak její koncentrace už nebyla pro produkci tyraminu příliš rozhodující. Nejvyšší množství detekovaného tyraminu bylo u všech testovaných kmenů laktokoků pozorováno při přidávku 0,5 % (w/v) laktózy do kultivačního média. Dalším zvyšováním koncentrace laktózy se množství vyprodukovaného tyraminu mírně snižovalo, avšak k zastavení produkce tyraminu nedošlo. Bover-Cid a kol. [82] sledovali vliv glukózy na tvorbu biogenních aminů v uzeninách a z jejich výsledků vyplývá, že vzorky bez přidavku glukózy obsahovaly méně tyraminu než vzorky s přidavkem určité koncentrace tohoto sacharidu. Také González-Fernández a kol. [31] testovali vliv různých sacharidů (glukózy, laktózy, sacharózy a jejich vzájemných kombinací) na produkci biogenních aminů v uzeninách. Ve vzorcích detekovali tyramin, putrescin, spermin, spermidin a fenyletylamin. Nejvyšší množství biogenních aminů bylo nalezeno v přítomnosti 0,1 % (w/v) glukózy. Bez ohledu na druh nebo koncentraci použitého cukru však v analyzovaných vzorcích nezaznamenali výskyt histaminu.

Dalším faktorem, který byl v této diplomové práci sledován, byl vliv aerobního a anaerobního prostředí. *Lactococcus lactis* je popisován jako mikroaerofilní bakterie

mléčného kvašení, což znamená, že za určitých podmínek mohou tolerovat přítomnost kyslíku v prostředí. Ten pro ně není toxický, ale ke svému životu jej nepotřebují a nevyžadují [83]. Z výsledků je patrné, že pro produkci tyraminu bylo u testovaných kmenů laktokoků vhodnější anaerobní prostředí. Podobně také Bover-Cid a kol. [8], zaznamenali při sledování dekarboxylázové aktivity bakterií *Lactobacillus curvatus* vyšší produkci tyraminu při kultivaci v prostředí bez přítomnosti kyslíku. V obou případech nebyly rozdíly v nárůstu laktokoků a produkci tyraminu příliš velké. Proto lze konstatovat, že přítomnost, respektive nepřítomnost kyslíku je faktor, který nemá zásadní vliv na produkci biogenních aminů. Také Masson a kol. [84] zjistili, že u kmene *Carnobacterium divergens* přítomnost kyslíku produkci tyraminu příliš neovlivňuje.

Během celého experimentu byly sledovány také změny pH kultivačního média. Hodnota pH je samozřejmě závislá na míře nárůstu použitých bakterií mléčného kvašení, respektive na produkci kyseliny mléčné. K výraznějšímu poklesu pH došlo při kultivaci s přidavkem laktózy, která měla pozitivní účinek na pomnožení laktokoků, kdy jejich činností došlo k produkci většího množství kyseliny mléčné, která prostředí okyselovala. Vliv ostatních sledovaných faktorů na snižování pH kultivačního média (NaCl, aerobní/anaerobní prostředí) byl nepatrný. Někteří autoři [85] uvádí, že nízké pH přispívá k menší produkci biogenních aminů. Na rozdíl od toho jiní vědci [31] tvrdí, že bakterie se proti nízkému pH brání zvýšením dekarboxylázové aktivity, což vede k vyšší tvorbě biogenních aminů, které vykazují zásaditou reakci a tím právě zvyšují pH prostředí buňky. Je tedy možné, že pro produkci biogenních aminů existuje optimální hodnota pH a po jejím překročení dojde ke snížení dekarboxylázové aktivity bakterií. Gardini a kol. [30] zkoumali vliv různých faktorů na růst *Enterococcus faecalis* a s tím spojenou produkci biogenních aminů a poukazují na výrazný vliv pH na optickou denzitu buněk, kdy se zvyšujícím se pH prostředí se zvyšuje i nárůst mikroorganismů. S rostoucím pH se podle jejich studie prudce zvyšoval i obsah biogenních aminů v prostředí.

Podmínky, které byly v rámci této diplomové práce testovány, mohou nastat při výrobě konkrétních výrobků, a proto by měl být technologický proces jejich výroby přísně dodržován. Rovněž by měl být sledován obsah biogenních aminů a výskyt rizikových mikroorganismů (tj. kontaminujících mikroorganismů a starterových kmenů s vysokou produkcí biogenních aminů) ve výrobcích.

Výskyt biogenních aminů v potravinách je z hlediska jejich nepříznivých účinků na lidské zdraví nežádoucí. Proto je nutné, aby v této oblasti nadále probíhal výzkum, který by navrhl nová řešení eliminující jejich produkci. Jedním ze způsobů je potlačení rozvoje mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou. V současné době se vyvíjí prostředky, které této nežádoucí mikroflóře zabraňují v růstu a také vylepšují vlastnosti potravin. Takovými látkami mohou být například monoacylglyceroly. Dalším možným řešením je identifikace mikroorganismů, které jsou schopny produkce biogenních aminů a zákaz jejich používání pro výrobu fermentovaných potravin. Také dodržování správné hygieny, podmínek výroby a skladování má značný vliv na jejich produkci [86].

Ve fermentovaných výrobcích hrozí větší riziko výskytu biogenních aminů než v potravinách nefermentovaných. Mezi používané bakterie mléčného kvašení s výraznou dekarboxylázovou aktivitou patří zejména zástupci rodů *Enterococcus*, *Lactobacillus* a *Lactococcus*. Výskyt biogenních aminů v nefermentovaných potravinách je obvykle spojen s nežádoucí kontaminující mikrobiální aktivitou.

ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na studium tvorby biogenních aminů bakteriemi mléčného kvašení, konkrétně kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, a to v závislosti na rozdílných podmínkách kultivace.

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že pomocí iontové výměnné chromatografie byla detekována produkce tyraminu u všech sledovaných kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 53 a CCDM 141 produkovaly tento biogenní amin za všech testovaných podmínek, kdežto u kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 byla produkce tyraminu pozorována pouze při kultivaci v prostředí s 2 % (w/v) NaCl. Tento kmen tudíž vykazoval nejmenší tvorbu tyraminu.

Mezi faktory, které byly sledovány, patří vliv NaCl. Bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací NaCl v kultivačním médiu, rosla i produkce tyraminu. Nejvyšší produkce byla tedy zaznamenána při kultivaci s 2 % (w/v) NaCl. Dalším zvyšováním koncentrace NaCl v kultivačním médiu může dojít k podpoření produkce biogenních aminů, ale při dosažení určité hranice je tento efekt opačný.

Dalším testovaným faktorem byl přírůstek laktózy. V médiu sloužila jako výživa pro bakterie, a tudíž kultivací bez jejího přírůstku nebylo dosaženo příliš velkého nárůstu buněk a ani snížení pH. Největší dekarboxylázová aktivita byla sledována u vzorků kultivovaných s přírůstkem 0,5 % (w/v) laktózy. Dalším zvyšováním koncentrace laktózy v kultivačním médiu (za srovnatelných jiných podmínek) se obsah tyraminu mírně snížil.

Rovněž byl sledován vliv aerobního a anaerobního prostředí. U všech kmenů, které byly testovány, byla produkce tyraminu prokazatelně vyšší za anaerobních podmínek.

Největší dekarboxylázovou aktivitu vykazoval kmen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 (až 790 mg/l kultivačního média), a to v případě kultivace s přírůstkem 2% (w/v) NaCl, 0,5% (w/v) laktózy a za nepřístupu kyslíku. Nejnižší produkce byla naopak zaznamenána kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, poněvadž u tohoto kmene byla dekarboxylázová aktivita pozorována pouze při kultivaci v prostředí s přírůstkem 2 % (w/v) NaCl.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SILLA SANTOS, M. H., Biogenic amines: their importance in foods, *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 26, 213 – 231
- [2] SHALABY, A. R., Significance of biogenic amines to food safety and human health, *Food Research International* 7, 1996, vol. 29, 675 – 690
- [3] SAAID, M., SAAD, B., HASHIM, N. H., ALI, A. S. M., SALEH, M. I., Determination of biogenic amines in selected Malaysian food, *Food Chemistry*, 2009, 113, 1356 – 1362
- [4] SUZZI, G., GARDINI, F., Biogenic amines in dry fermented sausages: a review, *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 88, 41 – 54
- [5] ÖNAL, A., A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods, *Food Chemistry*, 2007, 103, 1475 – 1486
- [6] BAIXAS-NOGUERAS, S., BOVER-CID, S., VECIANA-NOGUÉS, M. T., VIDAL-CAROU, M. C., Amino acid-decarboxylase activity in bacteria associated with Mediterranean hake spoilage, *European Food Research and Technology*, 2003, 217, 164 – 167
- [7] MARINO, M., MAIFRENI, M., BARTOLOMEOLI, I., RONDININI, G., Evaluation of amino acid-decarboxylative microbiota throughout the ripening of an Italian PDO cheese produced using different manufacturing practices, *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 105, 540 – 549
- [8] BOVER-CID, S. B., MIGUÉLEZ-ARRIZADO, J., BECKER, B., HOLZAPFEL, W. H., VIDAL-CAROU, C., Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability, *Food Microbiology*, 2008, 25, 269 – 277
- [9] SHAH, P., SWIATLO, E., A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens, *Molecular Microbiology*, 2008, 68, 4 – 16
- [10] KALAČ, P., KRAUSOVÁ, P., A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods, *Food Chemistry*, 2005, 90, 219 – 230

- [11] CREA, F., DE STEFANO, C., MANFREDI, G., SAMMARTANO, S., Sequestration of some biogenic amines and poly(allyl)amine by high molecular weight polycarboxylic ligands in aqueous solution, *Journal of Molecular Liquids*, 2010, 151, 138 – 144
- [12] SMIT, A.Y., du TOIT, W.J., du TOIT, M., Biogenic Amines in Wine: Understanding the Headache, *South African Journal of Enology & Viticulture*, 2008, 29, 109 – 127
- [13] YONGJIN, H., WENSHUI, X., XIAOYONG, L., Changes in biogenic amines in fermented silver carp sausages inoculated with mixed starter cultures, *Food Chemistry*, 2007, 104, 188 – 195
- [14] TETI, D., VISALLI, M., McNAIR, H., A nalysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions, *Journal of Chromatography B*, 2002, 781, 107 – 149
- [15] LIMA, G. P. P., PIZA, I. M. T., HENRIQUE, A., TAKAKI, M., Polyamines as salinity biochemical marker in callus of *Eucalyptus urograndis*, *Ciência Florestal*, 2003, 13, 43 – 48
- [16] HOU, M.-H., LIN, S.-B., YUANN, J.-M. P., LIN, W.-CH., WANG, A. H.-J., KAN, L.-S., Effects of polyamines on the thermal stability and formation kinetics of DNA duplexes with abnormal structure, *Nucleic Acids Research*, 2001, 29, 5121 – 5128
- [17] KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z., Biogenic Amines in Food, *Chemical Papers*, 2005, 59, 70 – 79
- [18] KOMPRDA, T., BURDYCHOVÁ, R., DOHNAL, V., CWIKOVÁ, O., SLÁDKOVÁ, P., Some factors influencing biogenic amines and polyamines content in Dutch-type semi-hard cheese, *European Food Research and Technology*, 2008, 227, 29 – 36
- [19] MASSON, F., TALON, R., MONTEL, M.C., Histamine and tyramine production by bacteria from meat products, *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 32, 199 – 207

- [20] HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W., Biogenic amines and their production by microorganisms in food, *Trends in Food Science & Technology*, 1994, 5, 42 – 49
- [21] KIRSCHBAUM, J., BUSCH, I., BRÜCKNER, H., Determination of Biogenic Amines in Food by Automated Pre-column Derivatization with 2-Naphthyloxycarbonyl Chloride (NOC-Cl), *Chromatographia*, 1997, 45, 263 – 268
- [22] KORDIOVSKÁ, P., VORLOVÁ, L., BORKOVCOVÁ, I., KARPÍŠKOVÁ, R., BUCHTOVÁ, H., SVOBODOVÁ, Z., KRÍŽEK, M., VÁCHA, F., The dynamics of biogenic amine formation in muscle tissue of carp (*Cyprinus carpio*), *Czech Journal of Animal Science*, 2006, 51, 262 – 270
- [23] Analyzing amines in pet food, *Petfood Industry*, [online], [cit. 24.9.2008]. Dostupný z www: <http://www.petfoodindustry.com/ViewArticle.aspx?id=12570>
- [24] ÖZOGUL, F., ÖZOGUL, Y., The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures, *European Food Research and Technology* 225, 2007, 385 – 394
- [25] FADDA, S., VIGNOLO, G., OLIVER, G., Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and *Kocuria* strains, *Biotechnology Letters*, 2001, 23, 2015 – 2019
- [26] ANCÍN-AZPILICUETA, C., GONZÁLEZ-MARVO, A., JIMÉNEZ-MORENO, N., Current Knowledge about the Presence of Amines in Wine, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2008, 48, 257 – 275
- [27] AZIZ, S.M., YATIN, M., WORTHEN, D.R., LIPKE, D.W., CROOKS, P.A., A novel technique for visualizing the intracellular localization and distribution of transported polyamines in cultured pulmonary artery smooth muscle cells, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1998, 17, 307 – 320
- [28] WALTERS, D.R., Polyamines and plant disease, *Phytochemistry*, 2003, 64, 97 – 107
- [29] REGUERA, R.M., TEKWANI, B.L., BALAÑA-FOUCE, R., Polyamine transport in parasites: A potential target for new antiparasitic drug development, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2005, 140, 151 – 164

- [30] GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CARUSO, M.C., GALGANO, F., CRUDELE, M.A., FAVATI, F., GUERZONI, M.E., SUZZI, G., 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*, 2001, 64 105 – 117
- [31] GONZÁLES-FERNÁNDES, C., SANTOS, E.M., JAIME, I., ROVIRA, J., Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in chorizo dry sausage, *Food Microbiology*, 2003, 20, 275 – 284
- [32] SCHNELLER, R., GOOD, P., JENNY, M., Influence of pasteurised milk, raw milk and different ripening cultures on biogenic amine concentrations in semi-soft cheeses during ripening, *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A*, 1997, 204, 265 – 272
- [33] BOVER-CID, S., HUGAS, M., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M.V., Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages, *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 66, 185 – 189
- [34] SALMINEN, S., von WRIGHT, A., OUWEHAND, A., Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects, 3rd ed., New York, Marcel Decker, Inc, 2004, kapitola 1, 603 s., ISBN: 0- 8247-5332-1
- [35] TRIAS MANSILA, R., Lactic acid bacteria as bioprotect agents against foodborne pathogens and spoilage micriirganisms in fresh fruits and vegetables, disertační práce, Universitat de Girona, 2008, 109 s., ISBN: 978-84-691-5683-4
- [36] HOLZAPFEL, W.H., HABERER, P., GREISEN, R., BJÖRKROTH, J., SCHILLINGER, U., Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition, *American Journal of Clinical Nutrition*, 2001, 73, 365 – 373
- [37] FERNÁNDEZ-GARCÍA, E., TOMILLO, J., NÚÑEZ, M., Effect of added proteinases and level of starter culture on the formation of biogenic amines in raw milk Manchego cheese, *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 52, 189 – 196

- [38] COURTNEY, P.D., *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and *cremoris*, Encyklopedie of Food Microbiology, 1999, 1166 – 1171
- [39] EVEN, S., LINDLEY, N.C., COCAIGN-BOUSQUET, M., Transcriptional, translational and metabolic regulation of glycolysis in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG 1363 grown in continuous acidic cultures, Microbiology, 2003, 149, 1935 – 1944
- [40] COCK, L.S., de STOUVENEL, A.R., Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis* subs *lactis* isolated from sugar cane plants, Electronic Journal of Biotechnology, 2006, 9, ISSN: 0717-3458
- [41] MIYOSHI, A., JAMET, E., COMMISSAIRE, J., RENAULT, P., LANGELLA, P., AZEVEDO, V., A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*, FEMS Microbiology Letters, 2004, 239, 205 – 212
- [42] KIM, W.S., REN, J., DUNN, N.W., Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses, FEMS Microbiology Letters 171, 1999, 57 – 65
- [43] SLÁDKOVÁ, P., KOMPRDA, T., BURDYCHOVÁ, R., Skrining starovacích a probiotických kultur určených pro výrobu fermentovaných masných výrobků na schopnost tvorby biogenních aminů, Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis, 2008, 56, 25 – 30
- [44] SANDERS, J.W., VENEMA, G., KOK, J., Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*, FEMS Microbiology Reviews, 1999, 23, 483 – 501
- [45] *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*, Food Microbiology [online], [cit. 23.6.2009]. Dostupný z www:
<http://jpkc.njau.edu.cn/spwswx/cankao/ShowArticle.asp?ArticleID=314>
- [46] *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*, Miniatlás mikroorganizmů, Masarykova univerzita [online], [cit. 18.10.2006]. Dostupný z www:
<http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlás/lac-1.htm>
- [47] BLOOD, R.M., CURTIS, G.D.W., Media for total *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia coli*, International Journal of Food Microbiology, 1995, 26, 93 – 105

- [48] *Salmonella typhimurium*, Wikimedia Commons [online], [cit. 2.2.2010].
Dostupný z www:
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salmonella_typhimurium.png
- [49] *Salmonella typhimurium*, American Society For Microbiology [online], [cit. 10.9.2006]. Dostupný z www:
<http://www.microbelibrary.org/asmonly/details.asp?id=2293>
- [50] *Micrococcaceae*, MicroBioNet [online], [cit. 24.10.2000]. Dostupný z www:
<<http://www.microbionet.com.au/micrococcaceae.htm>>
- [51] *Micrococcus luteus*, UNSW Cell Biology [online], [cit. 30.3.2008]. Dostupný z
www: <http://cellbiology.med.unsw.edu.au/units/science/lecture0802.htm>
- [52] *Micrococcus luteus*, MiniAtlas mikroorganizmů, Masarykova univerzita [online],
[cit. 2.10.2006]. Dostupný z www:
<http://www.sci.muni.cz/mikrob/MiniAtlas/micr.htm>
- [53] CROSSLEY, K.B., JEFFERSON, K.K., ARCHER, G., FOWLER Jr., V.G.,
Staphylococci in Human Disease, 2nd ed., Wiley-Blackwell, Hoboken, USA,
2009, kapitola 1, 625 s., ISBN: 978-1-4051-6332-3
- [54] *Staphylococcus aureus*, Wikipedie [online], [cit. 14.3.2010]. Dostupný z www:
http://cs.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus
- [55] *Staphylococcus aureus*, American Society For Microbiology [online], [cit.
10.9.2006]. Dostupný z www:
<http://www.microbelibrary.org/asmonly/details.asp?id=2296>
- [56] KIRSCHBAUM, J., REBSCHER, K., BRÜCKNER, H., Liquid chromatographic
determination of biogenic amines in fermented foods after derivatization with 3,5-
dinitrobenzoyl chloride, Journal of Chromatography A, 2000, 881, 517 – 530
- [57] KEBARY, K.M.K., EL-SONBATY, A.H., BADAWI, R.M., Effects of heating
milk and accelerating ripening of low fat Ras cheese on biogenic amines and free
amino acids development, Food Chemistry, 1999, 64, 67 – 75
- [58] BURDYCHOVÁ, R., KOMPRDA, T., Biogenic amine-forming microbial
communities in cheese, FEMS Microbiology Letters, 2007, 276, 149 – 155

- [59] VALSAMAKI, K., MICHAELIDOU, A., POLYCHRONIADOU, A., Biogenic amine production in Feta cheese, *Food Chemistry*, 2000, 71, 259 – 266
- [60] Masné výrobky [online], [cit. 5.9.2003]. Dostupný z [www: http://www.chpr.szu.cz/edukace/plisne6.html](http://www.chpr.szu.cz/edukace/plisne6.html)
- [61] LEROY, F., VERLUYTEN, J., De VUYST, L., Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 106, 270 – 285
- [62] BOVER-CID, S., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M.C., Effect of the interaction between a low tyramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic staphylococci on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages, *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 65, 113 – 123
- [63] Výroba vína [online], [cit. 15.7.2008]. Dostupný z [www: http://www.fortika.cz/pdf/sekce_ucitel/studijni_materialy/kalaskova/vyroba_vina.pdf](http://www.fortika.cz/pdf/sekce_ucitel/studijni_materialy/kalaskova/vyroba_vina.pdf)
- [64] RODRÍGUEZ, H., de las RIVAS, B., MUÑOZ, R., Efficacy of recA gene sequence analysis in the identification and discrimination of *Lactobacillus hilgardii* strains isolated from stuck wine fermentations, *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 115, 70 – 78
- [65] MORENO.ARRIBAS, M.V., POLO, M.C., JORGANES, F., MUÑOZ, R., Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine, *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 84, 117 – 123
- [66] TONON, T., LONVAUD-FUNEL, A., Arginine metabolism by wine Lactobacilli isolated from wine, *Food Microbiology*, 2002, 19, 451 – 461
- [67] SOUFLEROS, E.H., BOULOUMPASI, E., ZOTOU, A., LOUKOU, Z., Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration, *Food Chemistry*, 2007, 101, 704 – 716
- [68] KALÁČ, P., ŠAVEL, J., KŘÍŽEK, M., PELIKÁNOVÁ, T., PROKOPOVÁ, M., Biogenic amine formation in bottled beer, *Food Chemistry*, 2002, 79, 431 – 434

- [69] HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., HOLZAPFEL, W.H., The biogenic amine content of beer; the effect of barley, malting and brewing on amine concentration, *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A*, 1999, 208, 418 – 423
- [70] VINCI, G., ANTONELLI, M.L., Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat, *Food Control*, 2002, 13, 519 – 524
- [71] MACROBAL, A., de las RIVAS, B., MUÑOZ, R., Methods for the Detection of Bacteria Producing Biogenic Amines on Foods: A Survey, *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 2006, 1, 187 – 196
- [72] DRAISCI, R., GIANNETTI, L., BORIA, P., LUCENTINI, L., PALLESCHI, L., CAVALLI, S., Improved ion chromatography–integrated pulsed amperometric detection method for the evaluation of biogenic amines in food of vegetable or animal origin and in fermented foods, *Journal of Chromatography A*, 1998, 798, 109 – 116
- [73] KATAOKA, H., Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis, *Journal of Chromatography A*, 1996, 733, 19 – 34
- [74] CLAEYS, BRUNO, M., VANDENABEELE-TRAMBOUZE, O., SERGENT, M., GEFFARD, M., BODET, D., DOBRIJEVIC, M., COMMEYRAS, A., PHAN TAN LUU, R., Methodological approaches for histamine quantification using derivatization by chloroethylnitrosourea and ELISA measurement: Part I. Optimization of derivated histamine detection with coated-plates using optimal design, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2006, 80, 176 – 185
- [75] LANDETE, J.M., de las RIVAS, B., MARCOBAL, A., MUÑOZ, R., Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods, *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 117, 258 – 269
- [76] HLOBILOVÁ, M., Srovnání metod pro detekci biogenních aminů u bakterií mléčného kvašení, Diplomová práce, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín, 2008
- [77] 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
- [78] GANESAN, B., STUSRT, M., WEIMER, B.C., Carbohydrate Starvation Causes a Metabolically Active but Nonculturable State in *Lactococcus lactis*, Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73, 2498 – 2512
- [79] SANTOS, W. C., SOUZA, M. R., CERQUEIRA, M. M. O. P., GLÓRIA, M. B. A., Bioactive amine formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C, Food Chemistry, 2003, 81, 595 – 606
- [80] SUMNER, S.S., ROCHE, F., TAYLOR, S.L., Factors Controlling Histamine Production in Swiss Cheese Inoculated with *Lactobacillus buchneri*, Journal of Dairy Science, 1990, 73, 3050 – 3058
- [81] TAYLOR, S.L., WOYCHIK, N.A., Simple medium for assessing quantitative production of histamine by *Enterobacteriaceae*, Journal of Food Protection, 1982, 45, 747 – 751
- [82] BOVER-CID, S., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, C., Changes in biogenic amine and polyamine contents in slightly fermented sausages manufactured with and without sugar, Meat Science, 2001, 57, 215 – 221
- [83] MIYOSHI, A., ROCHAT, T., GRATADOUX, J.-J., Le LOIR, Y., OLIVEIRA, S.C., LANGELLA, P., AZEVEDO, V., Oxidative stress in *Lactococcus lactis*, Genetics and Molecular Research, 2003, 2, 348 – 159
- [84] MASSON, F., LEBERT, A., TALON, R., MONTEL, M.C., Effects of physicochemical factors influencing tyramine production by *Carnobacterium divergens*, Journal of Applied Microbiology, 1997, 83, 36 – 42
- [85] FERNÁNDEZ, M., LINARES, D.M., RODRÍGUEZ, A., ALVAREZ, M.A., Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655, Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 73, 1400 – 1406
- [86] BUŇKOVÁ, L., Růstové vlastnosti a dekarboxylázová aktivita vybraných potravinářsky významných bakterií, Habilitační práce, SPU v Nitře, 2010

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BAI	Index biogenních aminů
UV	Ultrafialové záření
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
PCR	Polymerázová řetězová reakce
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
CCDM	Česká sbírka mlékárenských mikroorganismů (Czech Collection of Dairy Microorganisms)
IEC	Iontově výměnná chromatografie
<i>L.</i>	<i>Lactococcus</i>
MRS	Manův, Rogosův a Sharpův agar

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 - Chemická struktura některých biogenních aminů.....	14
Obr. 2 - Struktura běžných mikrobiálních polyaminů.....	15
Obr. 3 - Dekarboxylace aminokyselin.....	20
Obr. 4 - Prekurzory biogenních aminů.....	21
Obr. 5 - Taxonomie bakterií mléčného kvašení.....	26
Obr. 6 - <i>Lactococcus lactis</i> subspecies <i>lactis</i> : a) v elektronovém mikroskopu, b) na živné půdě.....	28
Obr. 7 - <i>Salmonella typhimurium</i> : a) v elektronovém mikroskopu, b) na živné půdě.....	28
Obr. 8 - <i>Micrococcus luteus</i> : a) v elektronovém mikroskopu, b) na živné půdě.....	29
Obr. 9 - <i>Staphylococcus aureus</i> : a) v elektronovém mikroskopu, b) na živné půdě.....	30
Obr. 10 - Optická denzita kmene <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141 kultivovaného s přídatkem různých koncentrací laktózy a 1 % (w/v) NaCl.....	48
Obr. 11 - Změny pH během kultivace laktokoků s přídatkem 1 % (w/v) laktózy a 1 % (w/v) NaCl.....	48
Obr. 12 - Produkce tyraminu kmenem <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48 v médiu bez přídatku laktózy.....	49
Obr. 13 - Produkce tyraminu kmenem <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48 v médiu s přídatkem 0,25 % (w/v) laktózy.....	50
Obr. 14 - Produkce tyraminu kmenem <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48 v médiu s přídatkem 0,5 % (w/v) laktózy.....	50
Obr. 15 - Produkce tyraminu kmenem <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48 v médiu s přídatkem 0,75% (w/v) laktózy.....	51
Obr. 16 - Produkce tyraminu kmenem <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48 v médiu s přídatkem 1 % (w/v) laktózy.....	51
Obr. 17 - Produkce tyraminu kmenem <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 53 v médiu bez přídatku laktózy.....	52

Obr. 18 - Produkce tyraminu kmenem <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 53 v médiu s přidavkem 0,25 % (w/v) laktózy.....	53
Obr. 19 - Produkce tyraminu kmenem <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 53 v médiu s přidavkem 0,5 % (w/v) laktózy.....	53
Obr. 20 - Produkce tyraminu kmenem <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 53 v médiu s přidavkem 0,75 % (w/v) laktózy.....	54
Obr. 21 - Produkce tyraminu kmenem <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 53 v médiu s přidavkem 1 % (w/v) laktózy.....	54
Obr. 22 - Produkce tyraminu kmenem <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141 v médiu bez přidavku laktózy.....	55
Obr. 23 - Produkce tyraminu kmenem <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141 v médiu s přidavkem 0,25 % (w/v) laktózy.....	56
Obr. 24 - Produkce tyraminu kmenem <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141 v médiu s přidavkem 0,5 % (w/v) laktózy.....	56
Obr. 25 - Produkce tyraminu kmenem <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141 v médiu s přidavkem 0,75 % (w/v) laktózy.....	57
Obr. 26 - Produkce tyraminu kmenem <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141 v médiu s přidavkem 1 % (w/v) laktózy.....	57

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Farmakologické účinky některých biogenních aminů a polyaminů.....	17
Tabulka 2 - Subletální a letální hodnoty faktorů ovlivňujících růst laktokoků.....	27
Tabulka 3 - Izolované bakterie a biogenní aminy v některých typech potravin.....	31
Tabulka 4 - Složení sodnocitrátových pufrů použitých při detekci biogenních aminů.....	46

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: Optická denzita buněk kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

PŘÍLOHA P II: Optická denzita buněk kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 53

PŘÍLOHA P III: Optická denzita buněk kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141

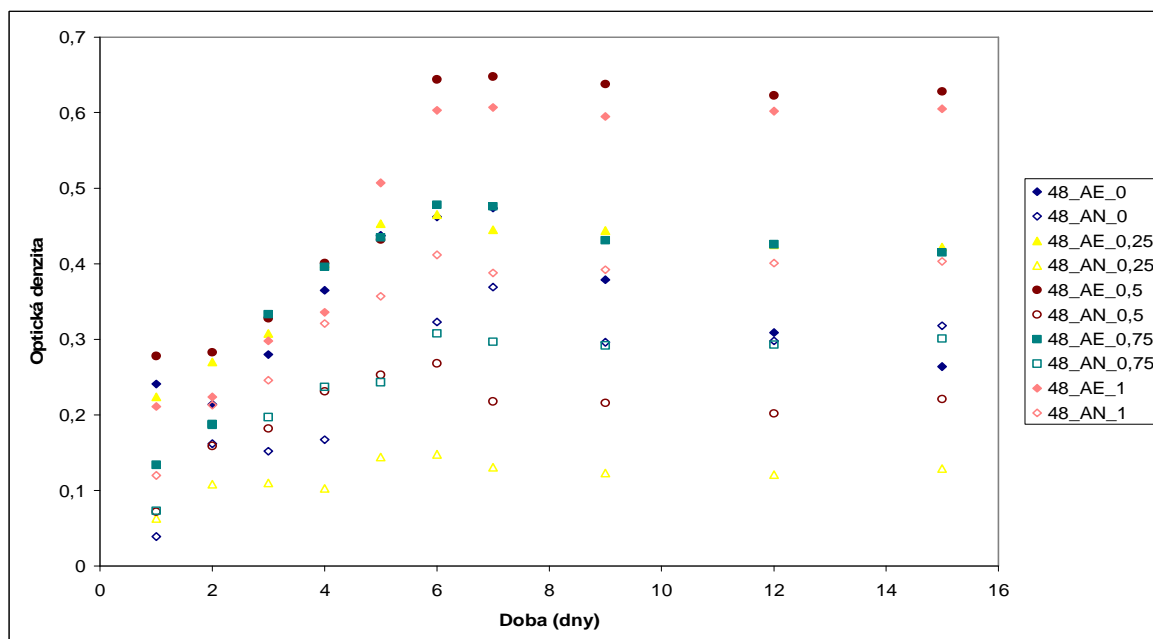
PŘÍLOHA P IV: Změny pH během kultivace sledovaných kmenů laktokoků s přidavkem různých koncentrací laktózy a bez přidavku NaCl

PŘÍLOHA P V: Změny pH během kultivace sledovaných kmenů laktokoků s přidavkem různých koncentrací laktózy a 1 % (w/v) NaCl

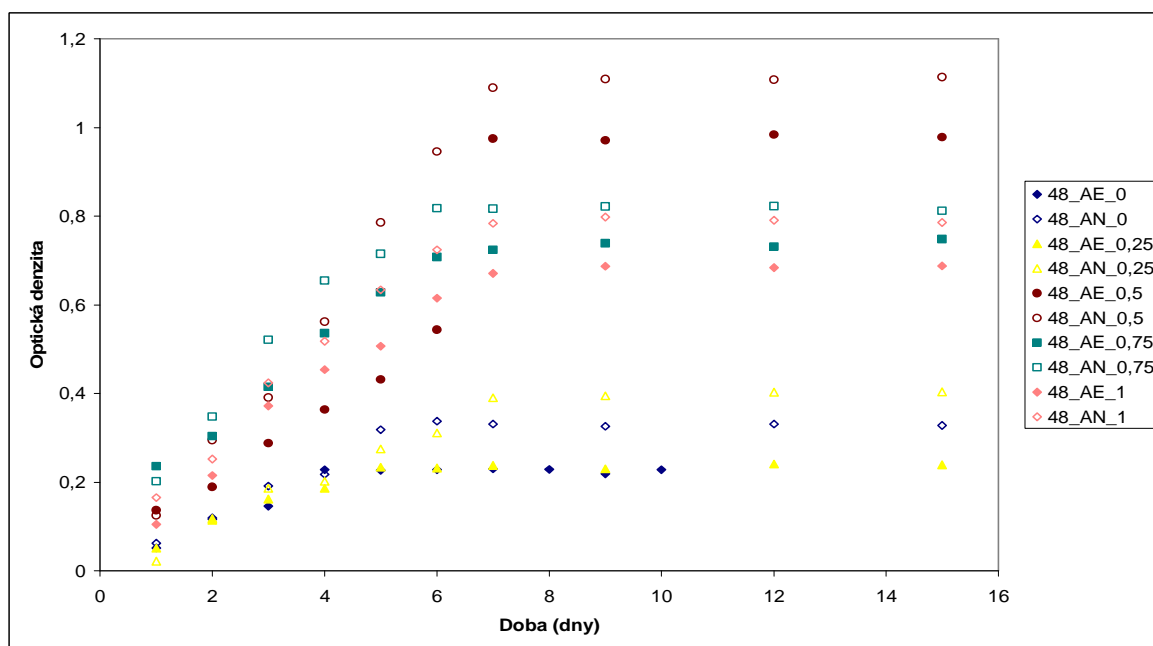
PŘÍLOHA P VI: Změny pH během kultivace sledovaných kmenů laktokoků s přidavkem různých koncentrací laktózy a 2 % (w/v) NaCl

PŘÍLOHA P VII: Článek publikovaný ve vědeckém časopise

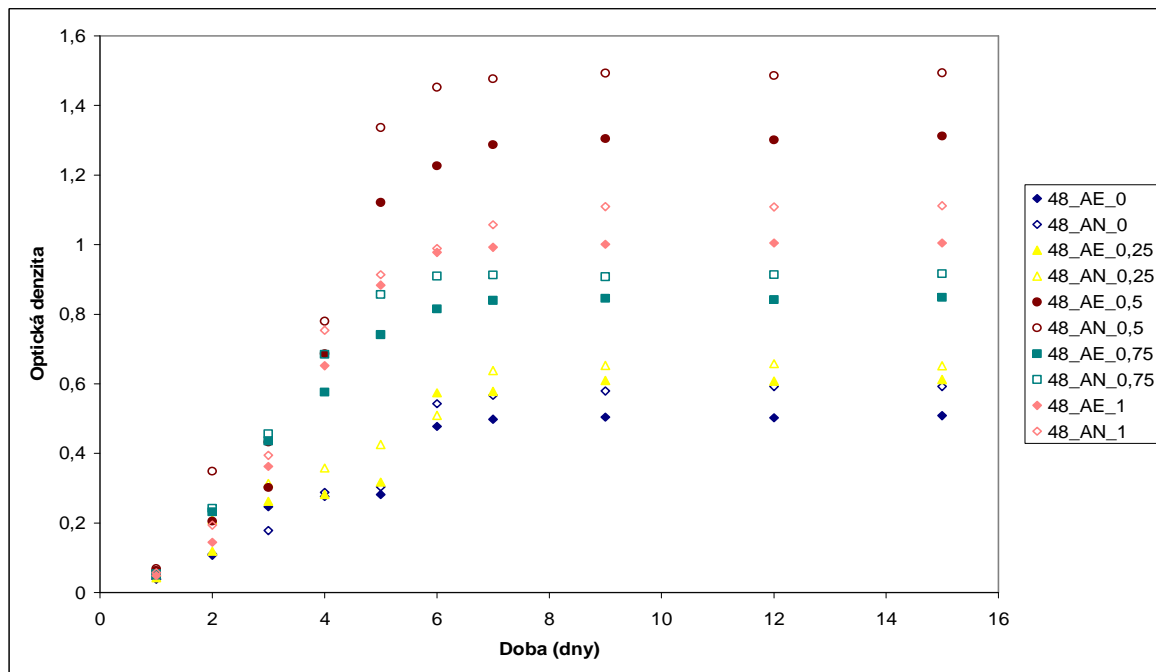
PŘÍLOHA P I: Optická denzita buněk kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48



Optická denzita buněk kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 kultivovaného v médiu s přidavkem různých koncentrací laktózy a bez současného přidavku NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0 – 1 vyjadřují koncentraci laktózy (v %).

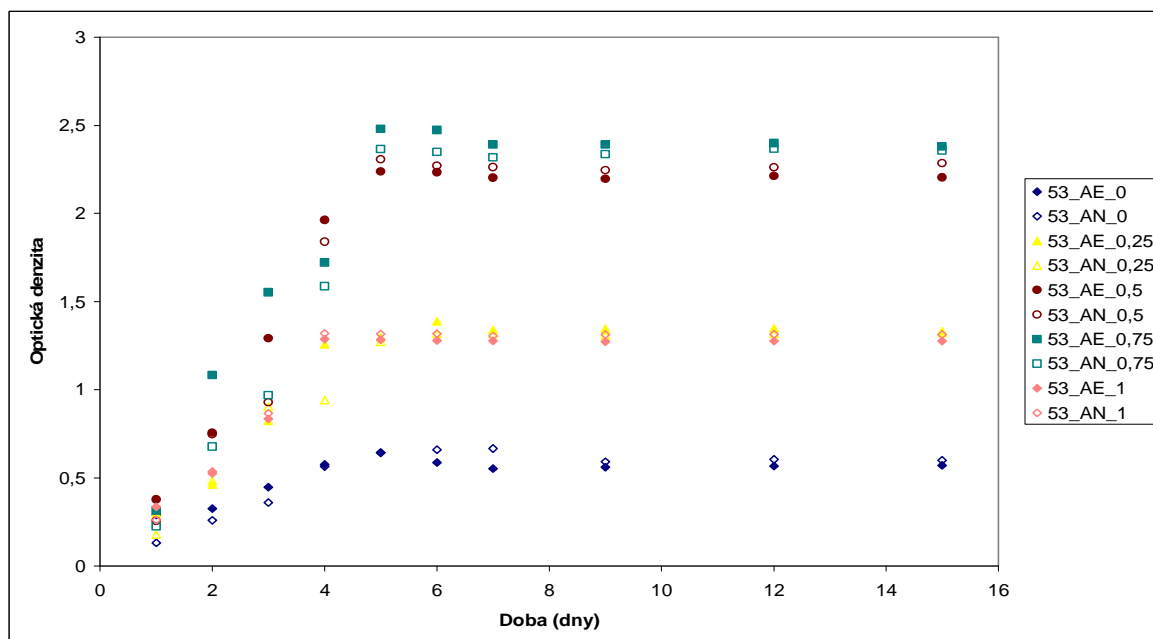


Optická denzita buněk kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 kultivovaného v médiu s přidavkem různých koncentrací laktózy a 1 % (w/v) NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0 – 1 vyjadřují koncentraci laktózy (v %).

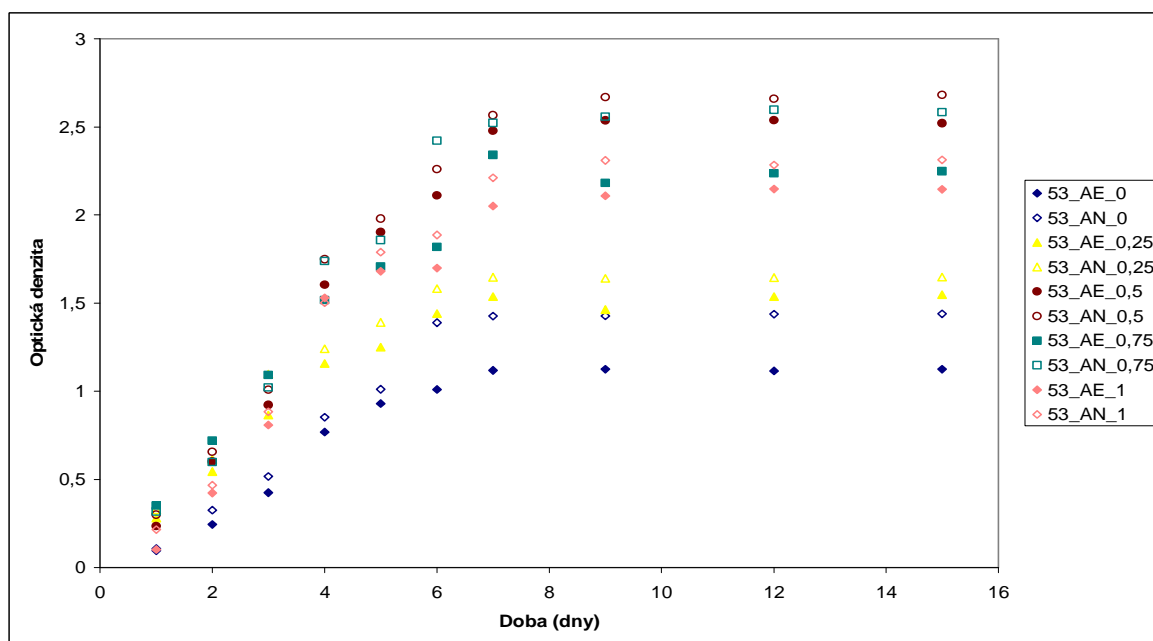


Optická denzita buněk kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 kultivovaného v médiu s přidavkem různých koncentrací laktózy a 2 % (w/v) NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0 – 1 vyjadřují koncentraci laktózy (v %).

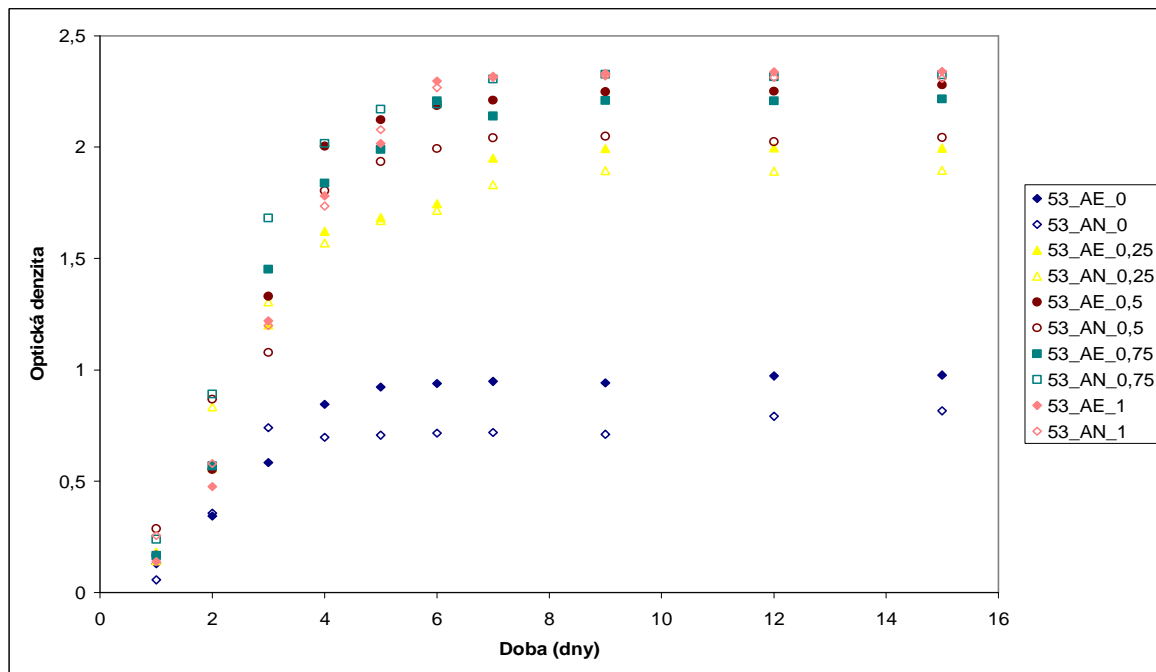
PŘÍLOHA P II: Optická denzita buněk kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 53



Optická denzita buněk kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 53 kultivovaného v médiu s přidavkem různých koncentrací laktózy a bez současného přidavku NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0 – 1 vyjadřují koncentraci laktózy (v %).

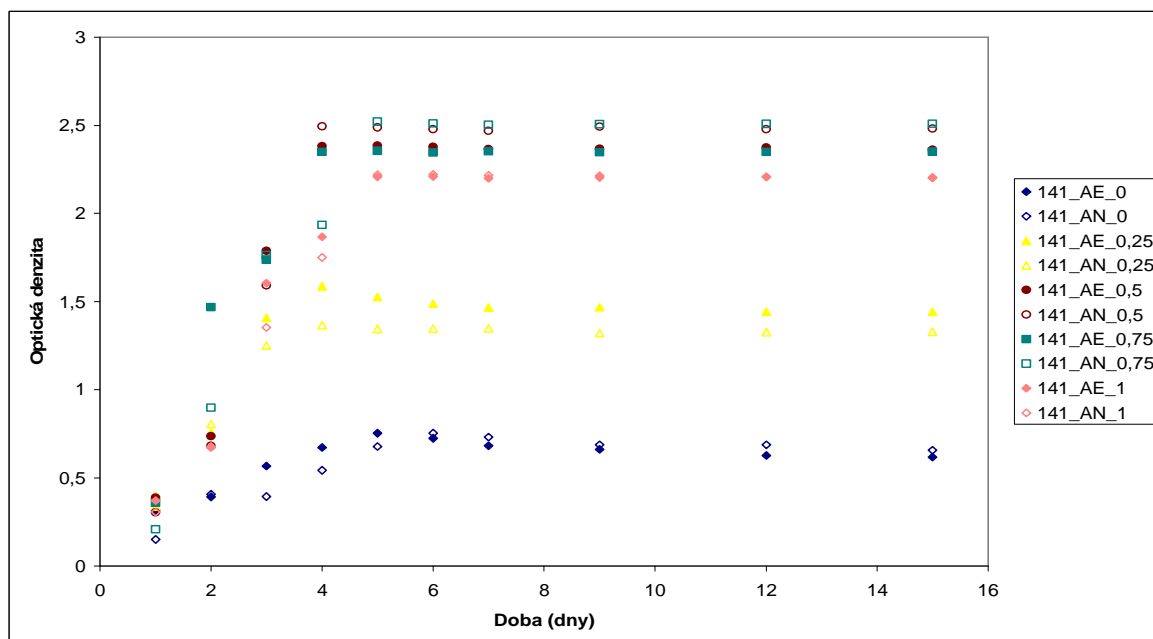


Optická denzita buněk kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 53 kultivovaného v médiu s přidavkem různých koncentrací laktózy a 1 % (w/v) NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0 – 1 vyjadřují koncentraci laktózy (v %).

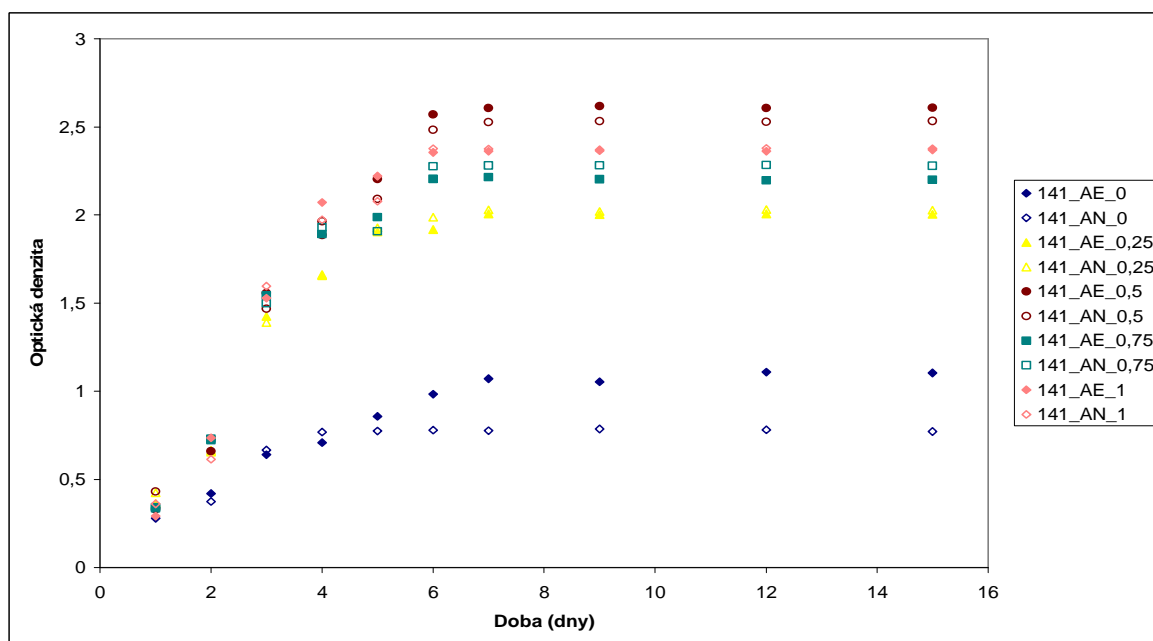


Optická denzita buněk kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 53 kultivovaného s přidavkem různých koncentrací laktózy a 2 % (w/v) NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0 – 1 vyjadřují koncentraci laktózy (v %).

PŘÍLOHA P III: Optická denzita buněk kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141

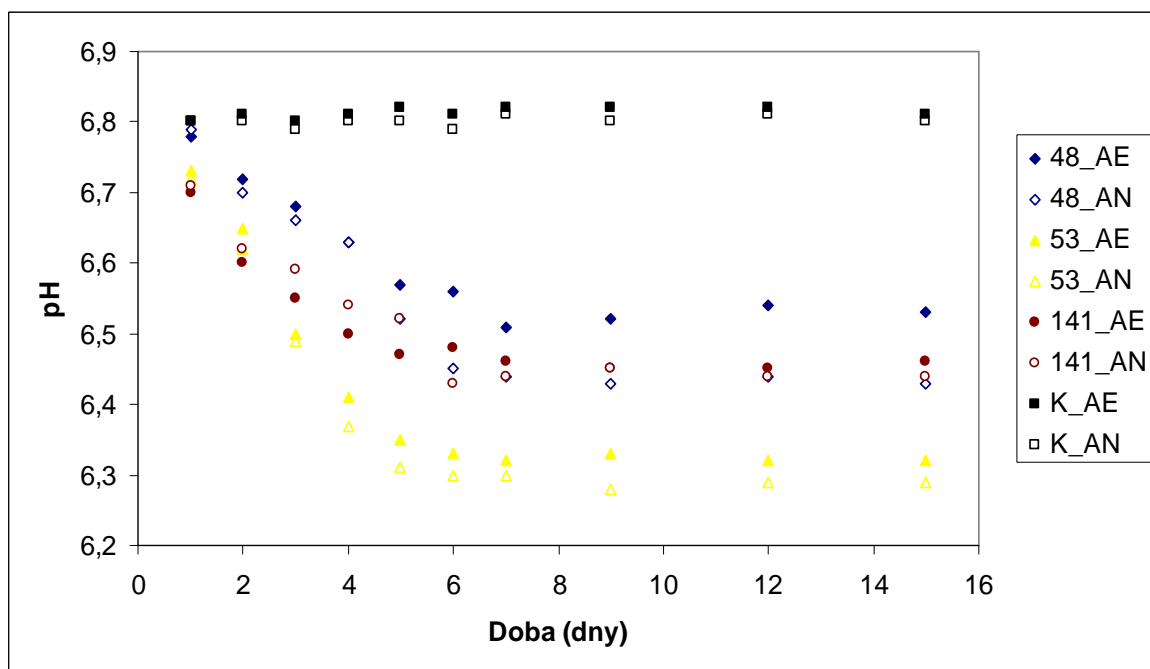


Optická denzita buněk kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 kultivovaného v médiu s přidavkem různých koncentrací laktózy a bez současného přidavku NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0 – 1 vyjadřují koncentraci laktózy (v %).

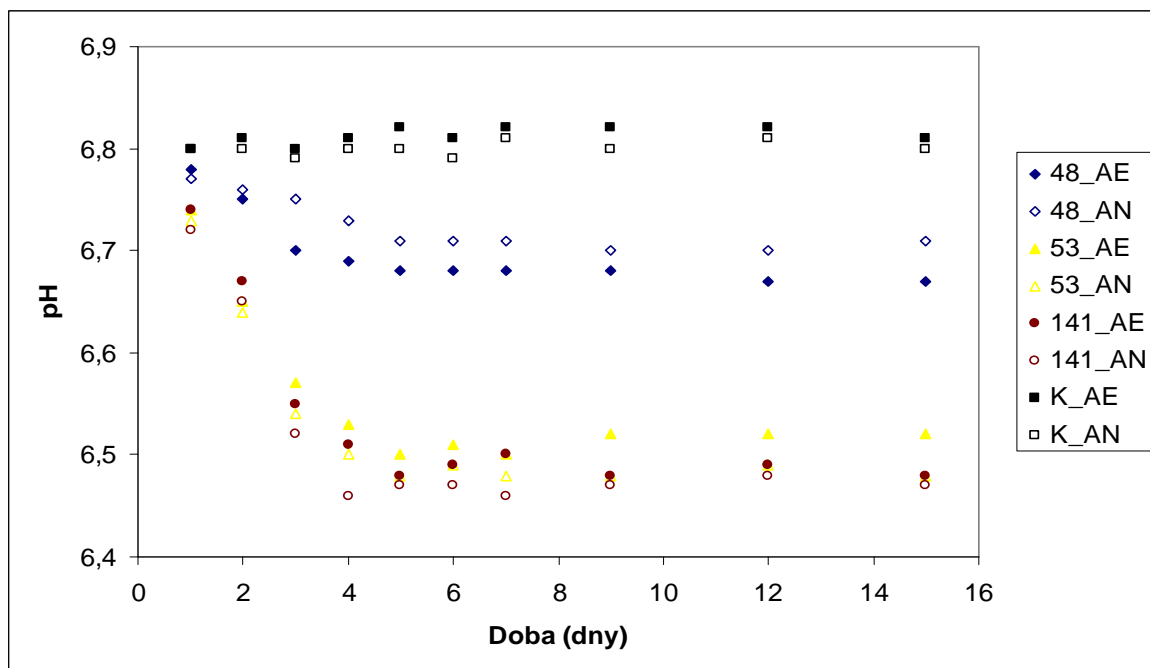


Optická denzita buněk kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 kultivovaného v médiu s přidavkem různých koncentrací laktózy a 2 % (w/v) NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, hodnoty 0 – 1 vyjadřují koncentraci laktózy (v %).

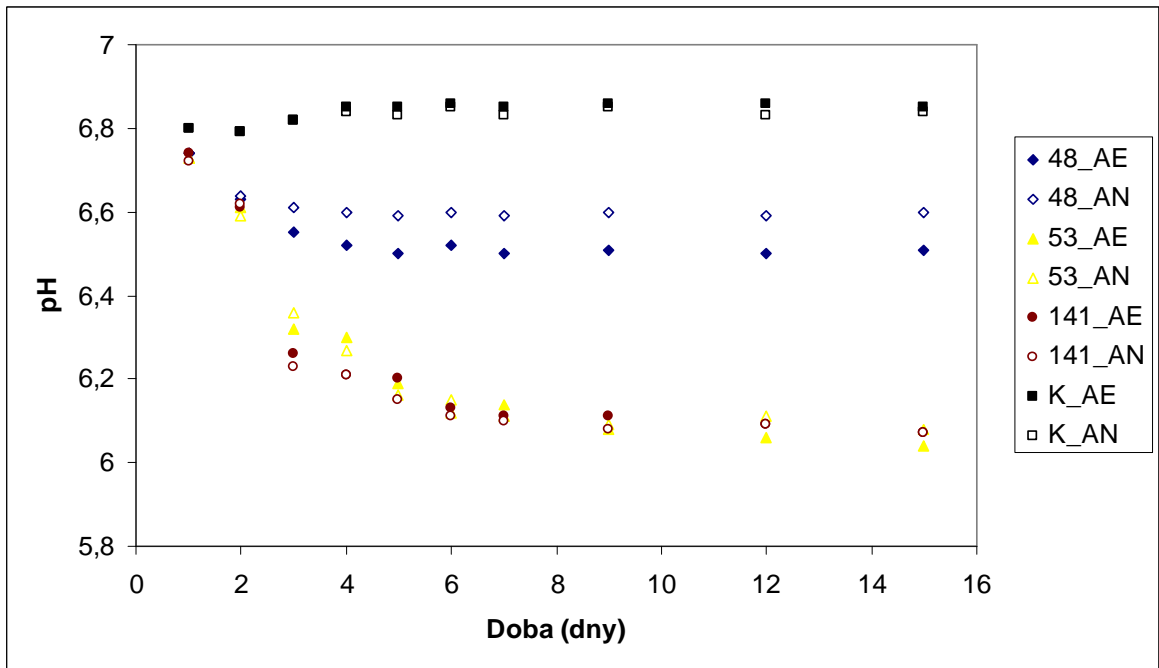
PŘÍLOHA P IV: Změny pH během kultivace sledovaných kmenů laktokoků s přidavkem různých koncentrací laktózy a bez přidavku NaCl



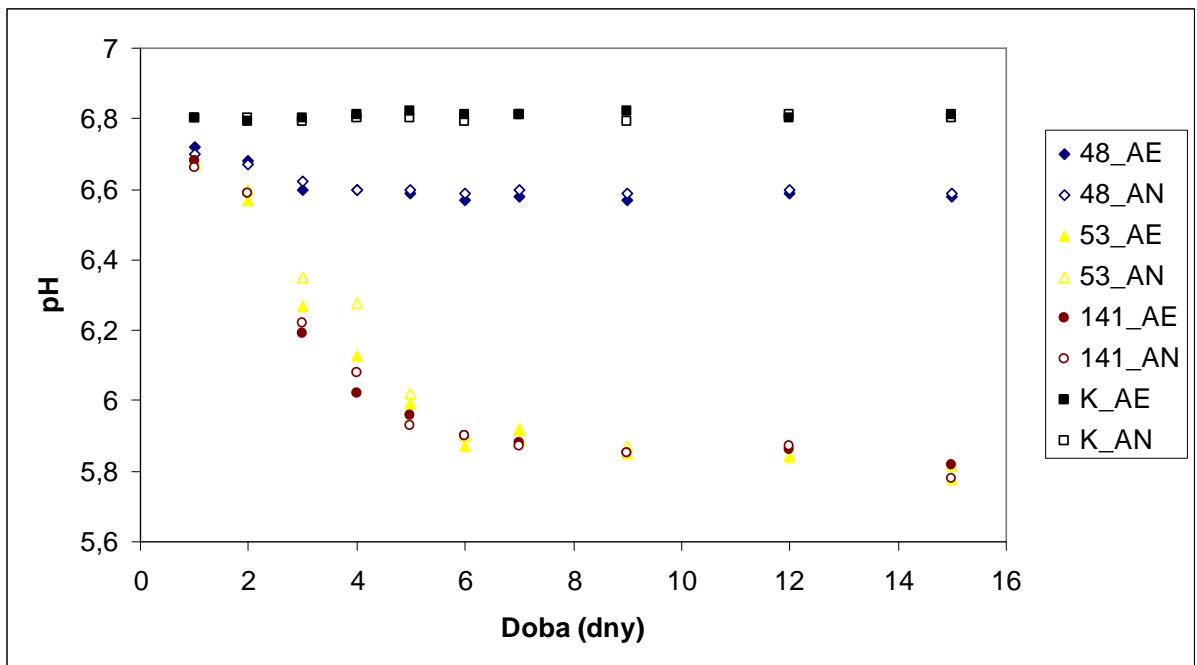
Změny pH během kultivace laktokoků v médiu bez přidavku laktózy i NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.



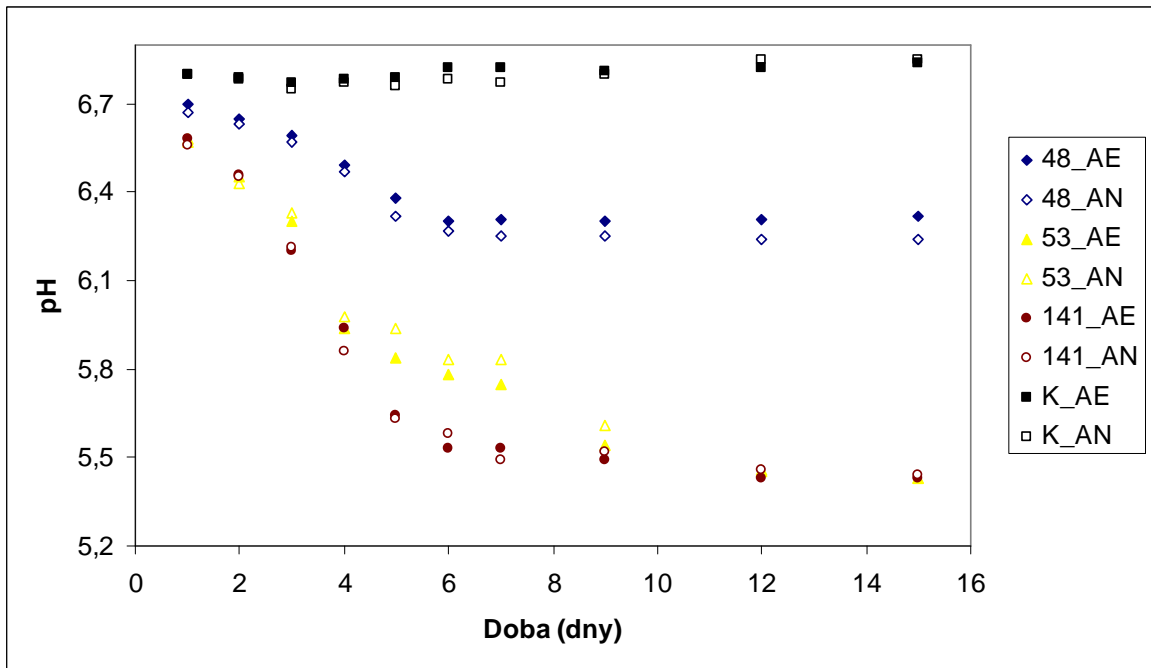
Změny pH během kultivace laktokoků v médiu s přidavkem 0,25 % (w/v) laktózy a bez přidavku NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.



Změny pH během kultivace laktokoků v médiu s přidavkem 0,5 % (w/v) laktózy a bez pří-
davku NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační
médiu.

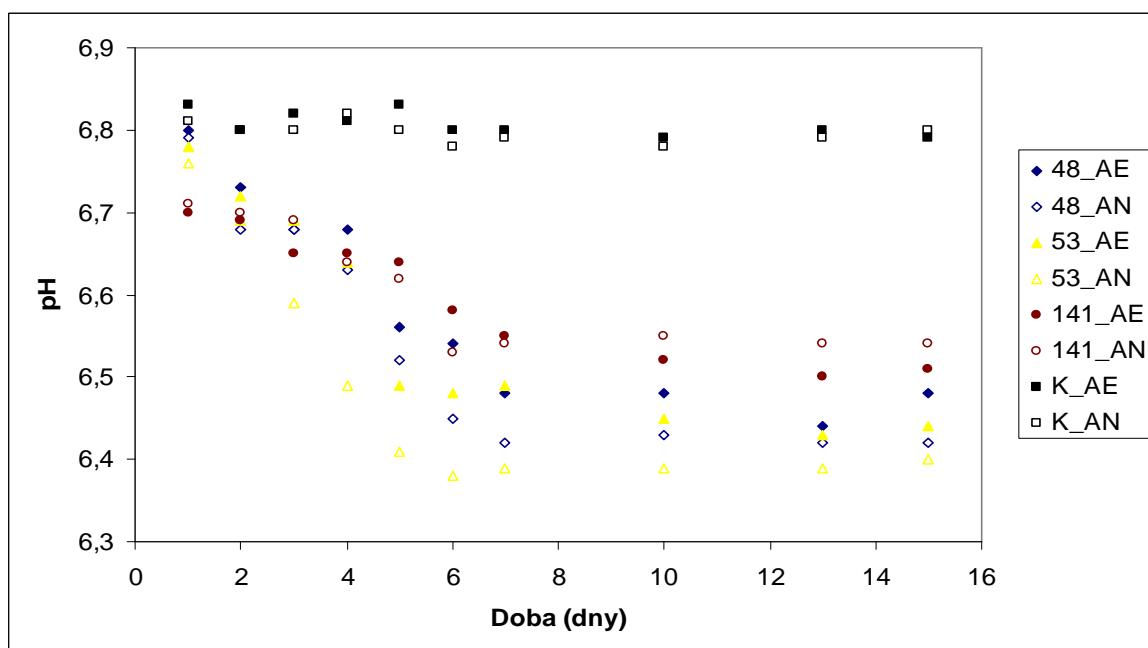


Změny pH během kultivace laktokoků v médiu s přidavkem 0,75 % (w/v) laktózy a bez
přídavku NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační
médiu.

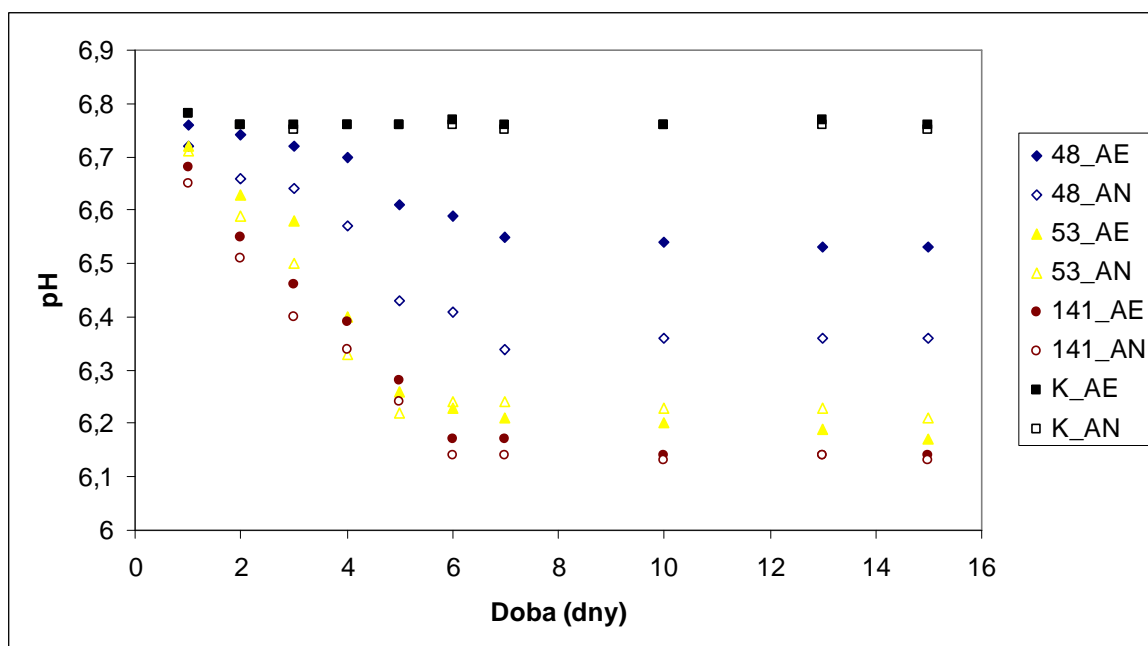


Změny pH během kultivace laktokoků v médiu s přídatkem 1 % (w/v) laktózy a bez přídatku NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.

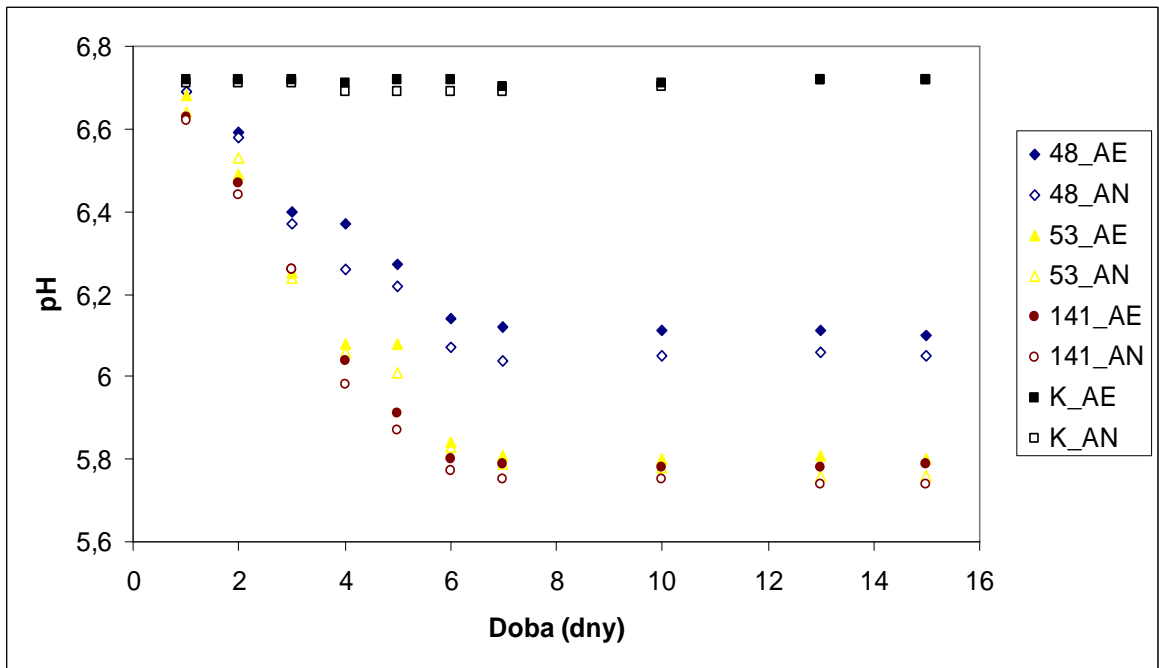
PŘÍLOHA P V: Změny pH během kultivace sledovaných kmenů laktokoků s přidavkem různých koncentrací laktózy a 1 % (w/v) NaCl



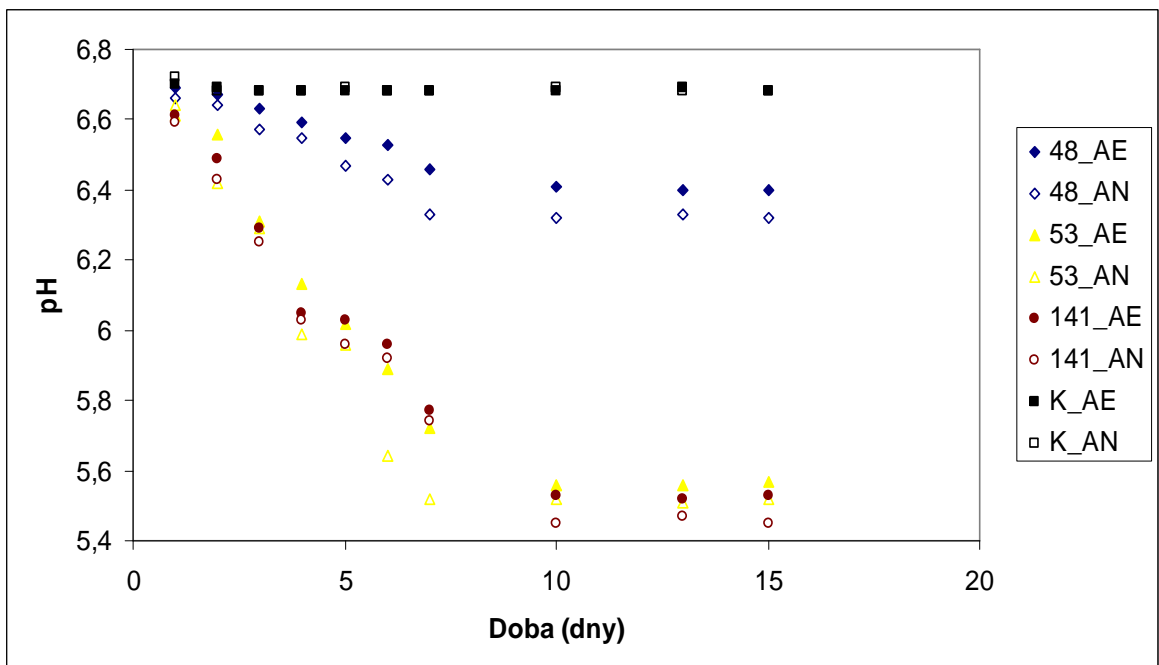
Změny pH během kultivace laktokoků v médiu bez přidavku laktózy a s přidavkem 1 % (w/v) NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.



Změny pH během kultivace laktokoků v médiu s přidavkem 0,25 % (w/v) laktózy a 1 % (w/v) NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.

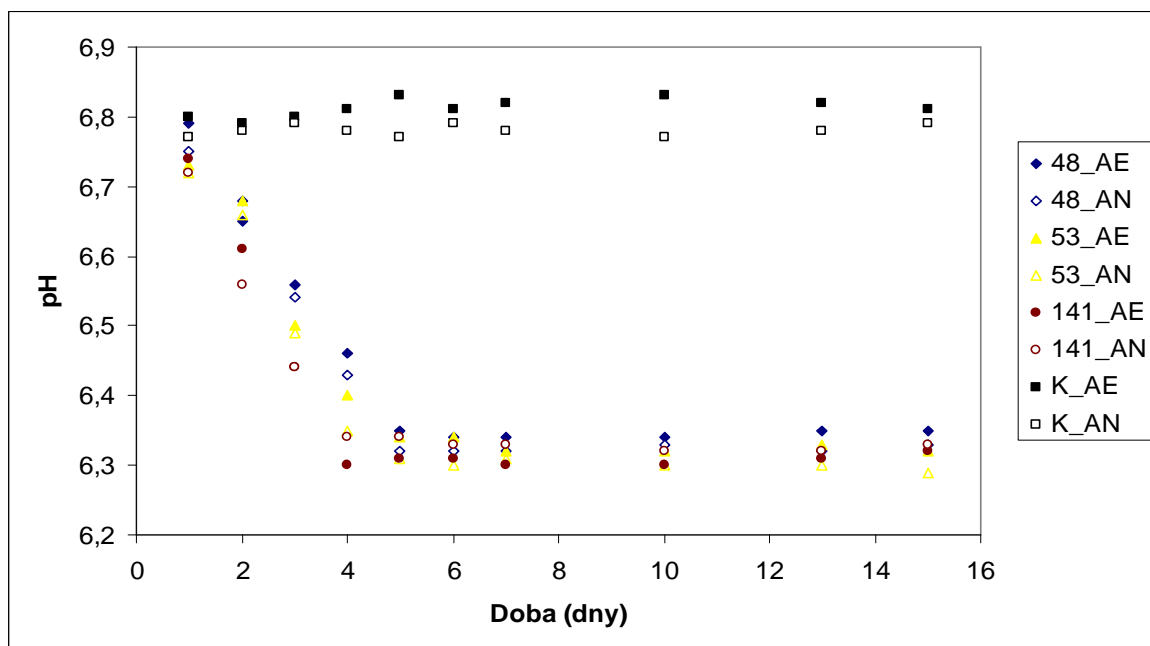


Změny pH během kultivace laktokoků v médiu s přidavkem 0,5 % (w/v) laktózy a 1 % (w/v) NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.

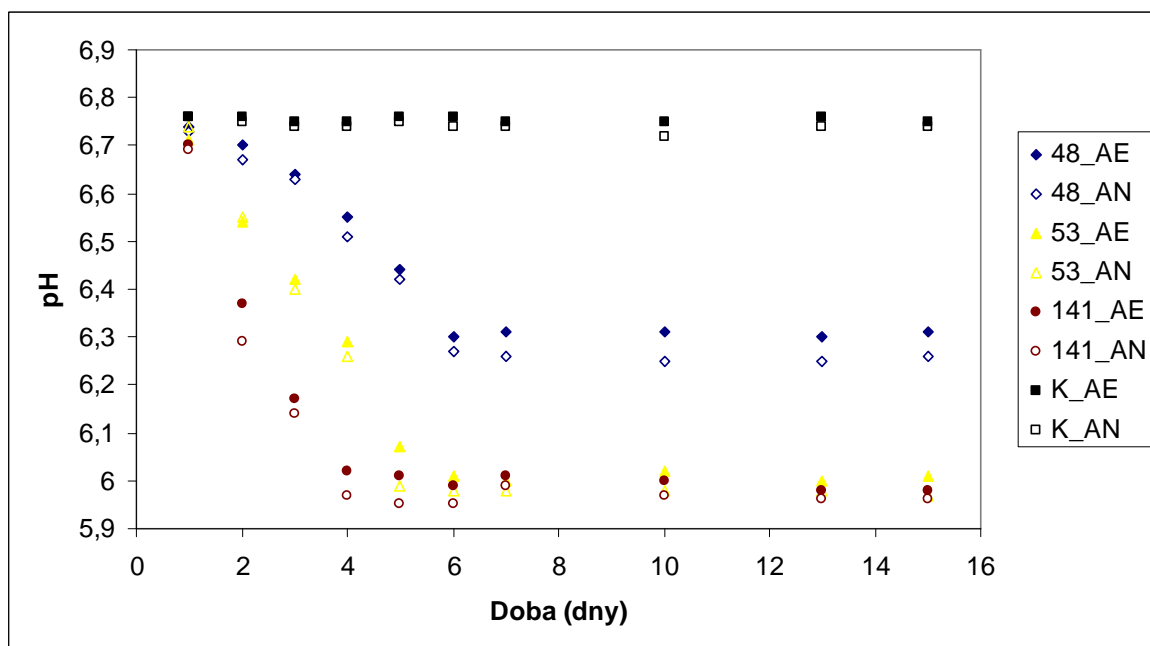


Změny pH během kultivace laktokoků v médiu s přidavkem 0,75 % (w/v) laktózy a 1 % (w/v) NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.

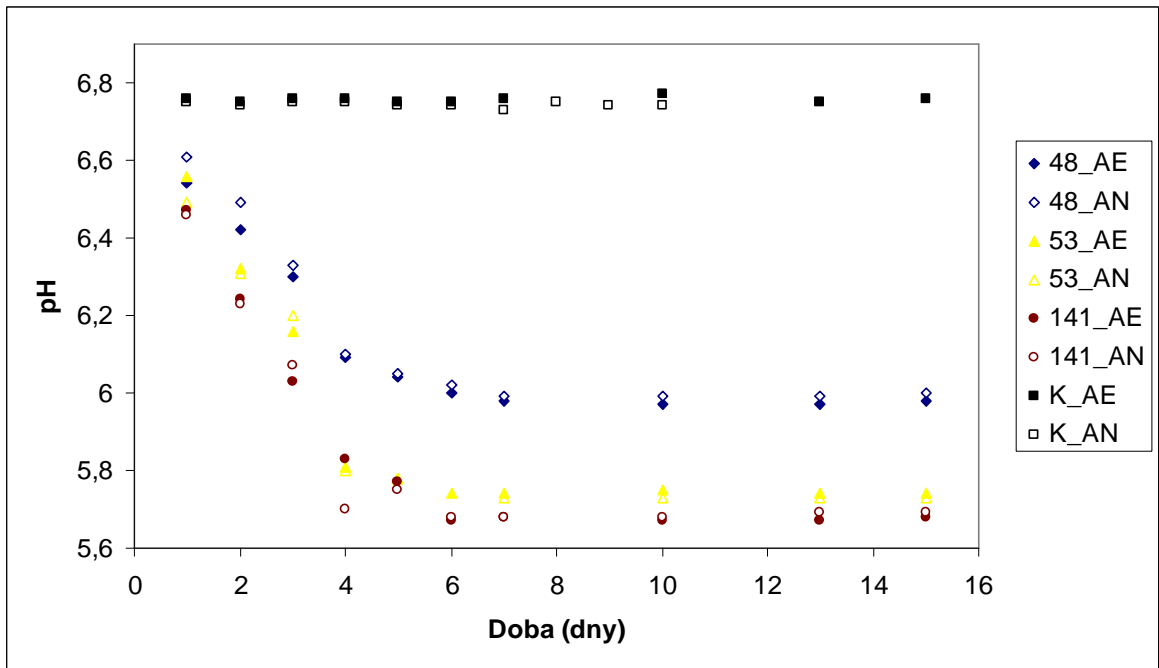
PŘÍLOHA P VI: Změny pH během kultivace sledovaných kmenů laktokoků s přidavkem různých koncentrací laktózy a 2 % (w/v) NaCl



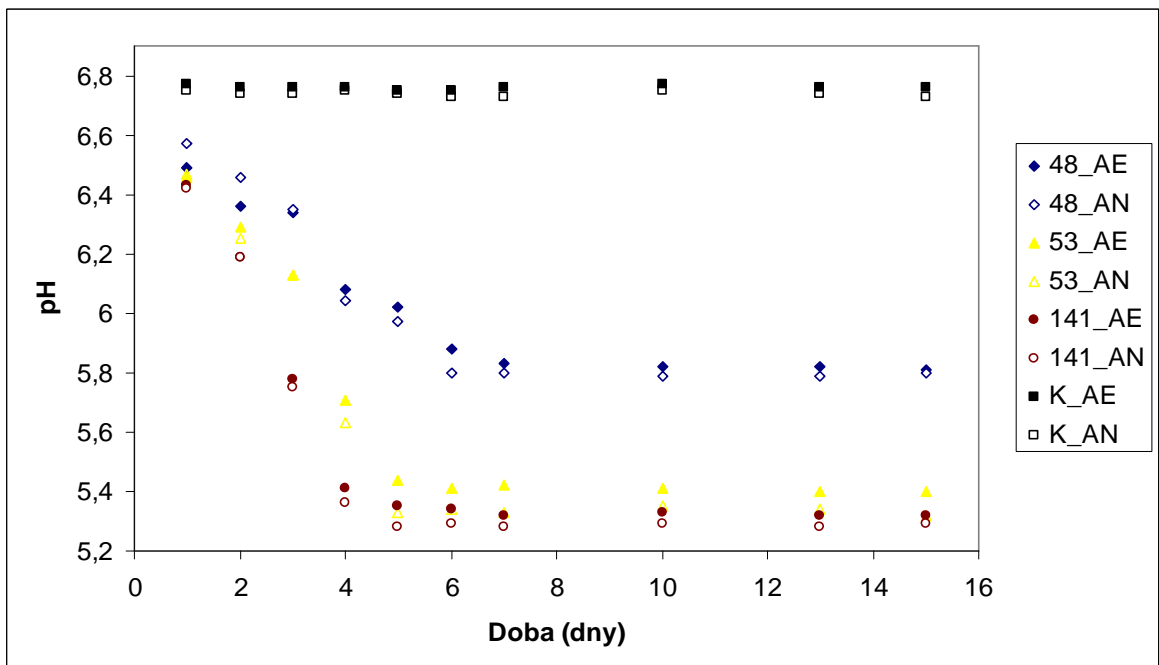
Změny pH během kultivace laktokoků v médiu bez přidavku laktózy a s přidavkem 2 % (w/v) NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.



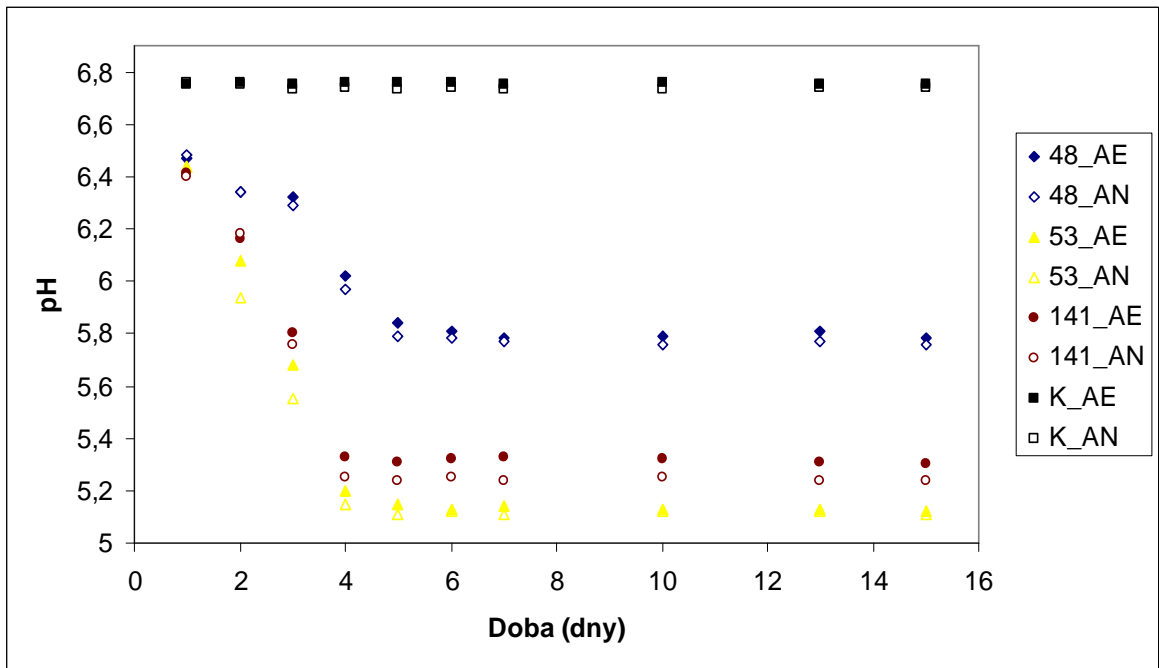
Změny pH během kultivace laktokoků v médiu s přidavkem 0,25 % (w/v) laktózy a 2 % (w/v) NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.



Změny pH během kultivace laktokoků v médiu s přidavkem 0,5 % (w/v) laktózy a 2 % (w/v) NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.



Změny pH během kultivace laktokoků v médiu s přidavkem 0,75 % (w/v) laktózy a 2 % (w/v) NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.



Změny pH během kultivace laktokoků v médiu s přidavkem 1 % (w/v) laktózy a 2 % (w/v) NaCl. AE – aerobní prostředí, AN – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.

potravinářstvo

VLIV AEROBNÍHO/ANAEROBNÍHO PROSTŘEDÍ NA DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITU VYBRANÝCH BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

EFFECT OF AERO-/ANAEROBIOSIS ON DEKARBOXYLASE ACTIVITY OF SELECTED LACTIC ACID BACTERIA

Leona Buňková, František Buňka, Eva Pollaková, Tereza Podešvová, Vladimír Dráb, Stanislav Kráčmar

ABSTRACT

Biogenic amines are undesirable compounds produced in foods mainly through bacterial decarboxylase activity. The aim of this study was to investigate some environmental conditions (particularly aero/anaerobiosis, sodium chloride concentration (0–2% w/w), and amount of lactose (0–1% w/w)) on the activity of tyrosine decarboxylase enzymes of selected six technological important *Lactococcus lactis* strains. The levels of parameters tested were chosen according to real situation in fermented dairy products technology (especially cheese-making). Tyramine was determined by the ion-exchange chromatography with post-column ninhydrine derivatization and spectrophotometric detection. Tyrosine decarboxylation occurred during the active growth phase. Under the model conditions used, oxygen availability had influence on tyramine production, anaerobiosis seemed to favour the enzyme activity because all *L. lactis* strains produced higher tyramine amount.

Keywords: *Lactococcus*, tyramine, ion-exchange chromatography, aero/anaerobiosis.

ÚVOD

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární alifatické, aromatické nebo heterocyklické bazické sloučeniny odvozené od aminokyselin. Jsou významnými sloučeninami, které se vyskytují v živých organismech jako metabolické meziprodukty a produkty, které vykazují biologickou aktivitu. Základní podmínkou vzniku biogenních aminů je přítomnost aminokyselin v daném substrátu, přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou a vhodné podmínky pro růst a množení mikroorganismů. (Fernández et al., 2007; Landete et al., 2007; Bover-Cid et al., 2008).

Tvorba biogenních aminů bakteriemi může být ovlivněna mnohými vnějšími faktory, které mohou ovlivňovat zejména kinetiku dekarboxylázových reakcí. Mezi vnější faktory, které ovlivňují tvorbu biogenních aminů u bakterií, patří teplota a pH prostředí, aero-/anaerobioza, dostupnost zdrojů uhlíku (např. glukózy), přítomnost růstových faktorů, růstová fáze buněk, koncentrace NaCl (vodní aktivita) aj. (Greif et al., 1997, 1998, 2006; Gardini et al., 2001, 2005; Santos et al., 2003; Fernández et al., 2007; Bover-Cid et al., 2008; Emborg and Dalgaard, 2008a, b). Kromě výše zmíněných faktorů mohou produkci biogenních aminů ovlivňovat další chemické látky, např. ethanol, některé sacharidy, fenolické sloučeniny nebo oxid siřičitý (Gardini et al., 2005; Alberto et al., 2007; Mazzoli et al., 2009).

Biogenní aminy mohou být produkovány i kmeny BMK, které se běžně využívají pro technologické účely jako starterové kultury (Buňková et al., 2009), a proto je vhodné tyto kmeny před použitím v mlékárenství otestovat na dekarboxylázovou aktivitu. Stejně tak by pro technologické účely bylo vhodné znát kinetiku tvorby biogenních aminů za podobných podmínek prostředí, které mohou nastat během technologického procesu výroby fermentovaných mléčných výrobků. Tyto informace se však v soudobé odborné literatuře vyskytují jen zřídka.

Cílem této studie tedy bylo sledovat vliv aerobního a anaerobního prostředí na produkci tyraminu u 6 kmenů bakterií rodu *Lactococcus* (Buňková et al., 2009). Tyto bakterie se v průběhu biotechnologického procesu výroby mléčných výrobků využívají jako starterové kultury.

MATERIÁL A METODIKA

Vliv aerobního a anaerobního prostředí na produkci tyraminu byl testován u 3 kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (CCDM 48, CCDM 53 a CCDM 141) a 3 kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *cramoris* (CCDM 824, CCDM 946 a CCDM 1004). Všechny kmeny byly získány ze Sbírký kultur mlékařských mikroorganismů Laktoflora® (CCDM).

Kultivace výše zmíněných kmenů, pozitivních na produkci tyraminu, probíhala v bujónu M17 s přídavkem 0,2 % (w/v) tyrozinu při 10 ± 1 °C v rozmezí 1 až 15 dnů. Příslušné kultivační médium o objemu 5 ml bylo zaočkováno vždy 25 µl suspenze bakterií narostlých přes noc v M17 bujónu s přídavkem 0,2 % tyrozinu. Kultivační médium bylo obohaceno o laktózu v koncentraci 0,5 % (w/v) a NaCl (0; 1 a 2 % w/v).

Vliv aerobního/anaerobního prostředí na produkci biogenních aminů byl sledován tak, že polovina zkumavek byla kultivována aerobně a druhá anaerobně. Anaerobního prostředí bylo dosaženo zakápnutím kultivačního média sterilním parafinovým olejem (1 ml). Odběr vzorků pro analýzy probíhal 0., 1., 5., 10. a 15. den kultivace a to tak, že vždy byly náhodně odebrány od každého kmene a každé úrovně faktoru 2 zkumavky. Celý experiment byl opakován třikrát.

Po inkubaci bakterií byly buňky odstraněny centrifugací (10000 × g, 5 min) a supernatant byl filtrován přes 0,45 µm filtr. Produkce tyraminu byla zjišťována pomocí iontově-výměnné chromatografie (IEC; Automatický analyzátor aminokyselin AAA400, Ingos Praha, ČR) v médiu po odstranění buněk a po filtraci podle Buňková et al. (2009). Každý izolát byl analyzován alespoň třikrát. Standard tyraminu byl získán ze Sigma-Aldrich. Výsledky IEC byly statisticky vyhodnoceny pomocí Kruskal-Wallisova testu a Wilcoxonova testu.

VÝSLEDKY A DISKUZE

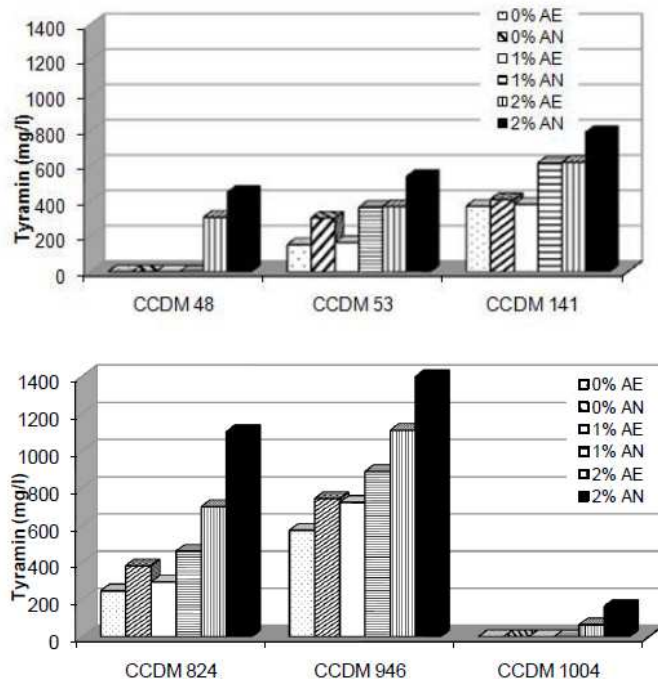
V předcházející studii (Buňková et al., 2009) byla u 6 kmenů *L. lactis* zjištěna produkce biogenního aminu tyraminu. Tyto kmeny byly nyní využity pro testování vlivu aerobního a anaerobního prostředí na produkci

potravinářstvo

tyraminu. Teplota kultivace byla volena tak, aby se přiblížila podmínkám technologického procesu výroby přírodních sýrů a aby tato studie napomohla předvídat průběh tvorby biogenních aminů ve fermentovaných mléčných výrobcích (zejména přírodních sýrech), které prochází zracím procesem. Testované kmeny laktokoků byly proto kultivovány při teplotě 10 ± 1 °C, která se využívá během technologického procesu zrání přírodních sýrů. U všech testovaných kmenů se maximální produkce tyraminu po 10. dnu kultivace již neměnila.

Z testovaných kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* (CCDM 48, CCDM 53 a CCDM 141) byl jako nejproduktivnější označen kmen *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, u něhož byla zjištěna maximální produkce tyraminu až 790 mg/l kultivačního média. U testovaných kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* byla pozorována nejvyšší produkce tyraminu v médiu obohaceném o 2 % NaCl po kultivaci v anaerobním prostředí (Obrázek 1A). K nejvyšší produkci tyraminu došlo při kultivaci bez přítomnosti kyslíku. K produkci tyraminu u kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 došlo pouze tehdy, pokud byly tyto bakterie kultivovány v přítomnosti nejvyšší aplikované koncentrace soli (2 % NaCl). V ostatních případech (bez NaCl a 1 % NaCl)

tyraminu byla pozorována při kultivaci v prostředí se 2 % NaCl bez přístupu kyslíku. Tato zjištěná produkce tyraminu se statisticky významně odlišovala ($P < 0,05$) od produkce zjištěné při kultivaci za ostatních testovaných podmínek (Obrázek 1B). Testovaný kmen *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004 se do jisté míry choval podobně jako kmen *L. lactis* CCDM 48. Dekarboxylázová aktivita byla u kmene CCDM 1004 poměrně slabá a tyramin byl detekován pouze během kultivace v prostředí se 2 % NaCl. Mnoho studií se věnuje vlivu nejrůznějších faktorů vnějšího prostředí (např. teploty, pH, přítomnosti sacharidů, NaCl a jiných chemických látek) na produkci biogenních aminů u bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* (Greif et al., 1997, 1998, 2006; Emborg and Dalgaard, 2008a, b) nebo u mléčných bakterií rodu *Lactobacillus* (Alberto et al., 2007; Arena et al., 2008; Bover-Cid et al., 2008; Mazzoli et al., 2009). *Enterococcus* (Gardini et al., 2001; Fernández et al., 2007) a *Oenococcus* (Gardini et al., 2005). Avšak studií, věnujících se faktorům, které ovlivňují produkci biogenních aminů u bakterií rodu *Lactococcus*, není příliš mnoho. Z důvodu absence studií vlivu podmínek prostředí na produkci biogenních aminů u laktokoků a také proto, že se jedná o technologicky



Obrázek 1: Produkce tyraminu po 15 dnech kultivace při 10 ± 1 °C u testovaných kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* (A) a *L. lactis* subsp. *cremoris* (B) v M17 bujónu s 0,5 % laktózy a 0, 1 nebo 2 % NaCl v aerobním (AE) a anaerobním (AN) prostředí.

nebyla u tohoto kmene přítomnost tyraminu detekována. U testovaných bakterií *L. lactis* subsp. *cremoris* byla zaznamenána největší produkce tyraminu u kmene CCDM 946 (až 1400 mg.l^{-1} kultivačního média), nejnižší pak u CCDM 1004. U všech testovaných kmenů *L. lactis* subsp. *cremoris* lze pozorovat trend, že maximální produkce

významné bakterie hojně využívané v mlékárenství, jsme sledovali vliv aerobního a anaerobního prostředí na dekarboxylázovou aktivitu tyramin pozitivních bakterií rodu *Lactococcus*.

Výsledky naší studie ukazují, že 4 z 6 testovaných kmenů laktokoků (*L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53, CCDM 141 a

potravinářstvo

L. lactis subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946) produkovaly tyramin za každých podmínek, které byly testovány. Zbývající 2 kmeny (*L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 a *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004) vykazovaly produkci tyraminu pouze za určitých podmínek (kultivace v prostředí se 2 % NaCl). Tyto výsledky prokazují, že schopnost produkce biogenních aminů bakteriemi závisí na kultivačních podmínkách a zároveň, že tato vlastnost je charakteristikou daného kmene (Arena and Manca de Nadra, 2001; Bover-Cid et al., 2001) Jestliže srovnáme růst testovaných laktokoků a křivku produkce biogenních aminů, zjistíme, že produkce biogenních aminů započala během logaritmické fáze jejich růstu. Podobný trend zaznamenali u *Lb. curvatus* také Bover-Cid et al. (2008).

U všech testovaných technologicky významných kmenů *L. lactis* byla za daných podmínek zjištěna vyšší produkce tyraminu za anaerobních podmínek. Bover-Cid et al. (2008) nezjistili výraznější vliv v dostupnosti kyslíku na produkci biogenních aminů u *Lactobacillus curvatus*, a zároveň však poukazují na to, že anaerobní prostředí pravděpodobně napomáhá dekarboxylázové aktivitě enzymů.

ZÁVĚR

U všech testovaných kmenů *L. lactis*, pozitivních na produkci tyraminu, byla zjištěna vyšší produkce tohoto biogenního aminu po kultivaci bez přístupu kyslíku. Zároveň bylo detekováno nejvyšší množství tyraminu v kultivačním médiu s přidávkou 2 % NaCl.

LITERATURA

- ALBERTO, M. R., ARENA, M. E., MANCA DE NADRA, M. C., 2007. Putrescine production from agmatine by *Lactobacillus hilgardii*: Effect of phenolic compounds. In *Food Control*, roč. 18, 2007, s. 898-903.
- ARENA, M. E., LANDETE, J. M., MANCA DE NADRA, M. C., PARDO, I., FERRER, S., 2008. Factors affecting the production of putrescine from agmatine by *Lactobacillus hilgardii* X₃B isolated from wine. In *Journal of Applied Microbiology*, roč. 105, 2008, s. 158-165.
- ARENA, M. E., MANCA DE NADRA, M. C., 2001. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. In *Journal of Applied Microbiology*, roč. 90, 2001, s. 158-162.
- BOVER-CID, S., HUGAS, M., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M. C., 2001. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. In *International Journal of Food Microbiology*, roč. 66, 2001, s. 185-189.
- BOVER-CID, S., MIGUÉLEZ-ARRIZADO, M. J., BECKER, B., HOLZAPFEL, W. H., VIDAL-CAROU, M. C., 2008. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. In *Food Microbiology*, roč. 25, 2008, s. 269-277.
- BUNĀKOVÁ, L., BUNĀKA, F., HLOBILOVÁ, M., VAŇÁTKOVÁ, Z., NOVÁKOVÁ, D., DRÁB, V., 2009. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. In *European Food Research and Technology*, roč. 229, 2009, s. 533-538.
- EMBORG, J., DALGAARD, P., 2008a. Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation on *Morganella psychrotolerans*. In *International Journal of Food Microbiology*, roč. 128, 2008, s. 226-233.
- EMBORG, J., DALGAARD, P., 2008b. Growth, inactivation and histamine formation of *Morganella*

psychrotolerans and *Morganella morganii* – development and evaluation of predictive models. In *International Journal of Food Microbiology*, roč. 128, 2008, s. 234-243.

FERNÁNDEZ, M., LINARES, D. M., RODRÍGUEZ, A., ALVAREZ, M. A., 2007. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, roč. 73, 2007, s. 1400-1406.

GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CARUSO, M. C., GALGANO, F., CRUDELE, M. A., FAVATI, F., GUERZONI, M. E., SUZZI, G., 2001. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. In *International Journal of Food Microbiology*, roč. 64, 2001, s. 105-117.

GARDINI, F., ZACCARELLI, A., BELLETI, N., FAUSTINI, F., CAVAZZA, A., MARTUSCELLI, M., MASTROCOLA, D., SUZZI, G., 2005. Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system. In *Food Control*, roč. 16, 2005, s. 609-616.

Štúdium rastu a produkcie biogénnych aminov nektórymi mikroorganizmami za modelových podmienok. In *Czech Journal of Food Science*, roč. 17, 1998, s. 15-21.

GREIF, G., GREIFOVÁ, M., KAROVIČOVÁ, J., 1997. Tvorba kadaverínu a amoniaku činnosťou nektových baktérií za modelových podmienok. In *Czech Journal of Food Science*, roč. 16, 1997, s. 53-56.

GREIF, G., GREIFOVÁ, M., KAROVIČOVÁ, J., 2006. Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter* spp. bacteria in model conditions. In *Journal of Food and Nutrition Research*, roč. 45, 2006, s. 21-29.

LANDETE, J. M., FERRER, S., PARDO, I., 2007. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. In *Food Control*, roč. 18, 2007, s. 1569-1574.

MAZZOLI, R., LAMBERTI, C., COISSON, J. D., PURROTTI, M., ARLORIO, M., GIUFFRIDA, M. G., GIUNTA, C., PESSIONE, E., 2009. Influence of ethanol, malate and arginine on histamine production of *Lactobacillus hilgardii* isolated from Italian red wine. In *Amino Acids*, roč. 36, 2009, s. 81-89.

SANTOS, W. C., SOUZA, M. R., CERQUEIRA, M. M. O. P., GLÓRIA, M. B. A., 2003. Bioactive amine formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. In *Food Chemistry*, roč. 81, 2003, s. 595-606.

Poděkování

Práce vznikla za podpory projektu MŠMT: MSM 7088352101.

Kontaktní adresa:

RNDr. Leona Buňková, Ph.D. Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky.
Tel: 00420 576 031 154, email: bunkova@ft.utb.cz,
doc. Ing. František Buňka, Ph.D., Bc. Eva Pollaková, Bc. Tereza Podešvová, Ústav technologie a mikrobiologie potravin,
prof. Ing. Stanislav Kráčmar, DrSc., Ústav biochemie a analýzy potravin,
Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, Česká republika.
Vladimír Dráb, Sběrka kultur mlékařských mikroorganismů Laktoflora, MILCOM, Soběslavská 841, 390 02 Tábor, Česká republika