

Dekarboxylázová aktivita bakterií izolovaných z mléka a mléčných výrobků

Zuzana Svobodová

Bakalářská práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie a mikrobiologie potravin
akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Zuzana SVOBODOVÁ
Osobní číslo: T08365
Studijní program: B 2901 Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Chemie a technologie potravin

Téma práce: Dekarboxylázová aktivita bakterií izolovaných z mléka a mléčných výrobků

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika produktů dekarboxylačních reakcí aminokyselin v potravinách.
2. Mikroorganismy s významnou dekarboxylázovou aktivitou, jejich zastoupení a význam v potravinách.

II. Praktická část

1. Morfologická charakterizace vybraných skupin mikroorganismů izolovaných z mléka a mléčných výrobků.
2. Zjištění dekarboxylázové aktivity izolovaných bakterií a zpracování výsledků.
3. Formulace závěrů o výskytu bakterií produkujících biogenní aminy v mléce a mléčných výrobcích.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1]Halász, A., Baráth, Á, Simon-Sarkadi, L. and Holzapfel, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. Trends Food Sci Technol. 5: 42-49. 1994.

[2]Silla Santos, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. Int. J. Food Microbiol. 29: 213-231. 1996.

[3]Bover-Cid, S. and Holzapfel, W.H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 53: 33-41. 1999.

[4]Davídek, J., Janíček, G., Pokorný, J. Chemie potravin. Praha: SNTL, 1983.

[5]Šilhánková L. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Praha: Academia, 2004.

[6]Velíšek, J. Chemie potravin III. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902391-5-3.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce:

11. února 2011

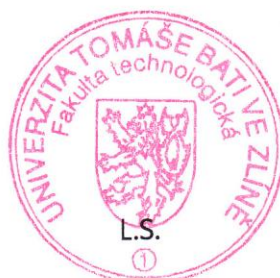
Termín odevzdání bakalářské práce:

30. května 2011

Ve Zlíně dne 12. dubna 2011



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Jan Hrabě, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ŠVOBODOVÁ ZUZANA

Obor: CHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 30.5.2011

Švobodová Zuzana

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo prozkoumání dekarboxylasové aktivity 99 bakteriálních kmenů izolovaných z mléka a mléčných výrobků (sýr Eidam, uzený Eidam, sýr Krolewski, Královský sýr, tavený sýr, sýr Jadel a syrové nepasterované mléko). Stanovení dekarboxylasové aktivity izolovaných kmenů bylo provedeno skrínigovou metodou. Produkce jednotlivých biogenních aminů (histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, agmatin, spermin a spermidin) izolovanými kmeny byla analyzována také metodou iontově výměnné chromatografie. Část práce se zabývá základní charakteristikou izolovaných bakterií.

Klíčová slova: biogenní aminy, fermentované mléčné výrobky, iontově-výměnná chromatografie, kultivační metoda

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate decarboxylase activity of 99 bacterial strains isolated from milk and milk products (cheese Eidam, smoked cheese Eidam, cheese Krolewski, the Royal cheese, cream cheese, cheese Jadel and raw unpasteurized milk). Determination of decarboxylase activity of isolated strains was performed by screening method. Production of biogenic amines (histamine, tyramine, putrescine, cadaverine, agmatin, spermine and spermidine) by isolated strains was also analyzed by ion-exchange chromatography. Part of this work deals with the basic characteristics of the isolated bacteria.

Keywords: biogenic amines, fermented dairy products, ion-exchange chromatography, improved screening

Chtěla bych tímto poděkovat paní doc. RNDr. Leoně Buňkové Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, trpělivost, připomínky, cenné rady a pomoc při vyhodnocování výsledků praktické části mé práce.

Dále bych ráda poděkovala za podporu a trpělivost svým rodičům.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 BIOGENNÍ AMINY	12
1.1 CHARAKTERISTIKA AMINŮ	12
1.2 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ	13
1.3 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ	14
1.3.1 Reakce a přeměny biogenních aminů.....	15
1.4 VÝZNAM BIOGENNÍCH AMINŮ V ORGANISMU A JEJICH TOXICITA	16
1.4.1 Význam a využití biogenních aminů v organismu	16
1.4.2 Toxicita biogenních aminů.....	18
1.4.3 Biogenní aminy jako karcinogeny.....	20
2 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ V MLÉKU A MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH	22
2.1 MLÉKO A NEFERMENTOVANÉ MLÉČNÉ VÝROBKY	23
2.2 FERMENTOVANÉ MLÉČNÉ VÝROBKY.....	23
2.2.1 Obsah biogenních aminů v sýrech.....	24
3 BAKTERIE S DEKARBOXYLASOVOU AKTIVITOU	26
3.1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	26
3.1.1 Vliv startovacích kultur na tvorbu biogenních aminů.....	28
II PRAKTICKÁ ČÁST	30
4 CÍL PRÁCE	31
5 PRACOVNÍ POSTUPY A SLOŽENÍ ŽIVNÝCH MÉDIÍ	32
5.1 MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA VZORKŮ	32
5.1.1 Charakteristika analyzovaných vzorků.....	32
5.1.2 Zpracování analyzovaných vzorků.....	32
5.1.3 Živné půdy použité pro kultivaci vzorků a příprava fyziologického roztoku.....	33
5.2 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA IZOLOVANÝCH BAKTERIÍ	34
5.2.1 Morfologické a biochemické znaky	34
5.3 DETEKCE BIOGENNÍCH AMINŮ KULTIVAČNÍ METODOU.....	36
5.4 DETEKCE A KVANTIFIKACE BIOGENNÍCH AMINŮ CHROMATOGRAFICKY	38
6 VÝSLEDKY A DISKUSE	39
6.1 ZÁKLADNÍ ZNAKY IZOLOVANÝCH BAKTERIÍ	39
6.1.1 Makroskopické znaky.....	39
6.1.2 Mikroskopické znaky	42
6.1.3 Biochemické znaky	43

6.2	DETEKCE BIOGENNÍCH AMINŮ U TESTOVANÝCH BAKTERIÍ KULTIVAČNÍ METODOU	47
6.3	DETEKCE A KVANTIFIKACE BIOGENNÍCH AMINŮ CHROMATOGRAFICKY	48
ZÁVĚR		55
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		56
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		60
SEZNAM OBRÁZKŮ		62
SEZNAM TABULEK		63

ÚVOD

Obsah biogenních aminů v potravinách je v dnešní době často diskutovaným problémem. Stanovení určitých limitů je v tomto případě velmi složité, a proto jsou nové poznatky a studie v této oblasti vítány. Biogenní aminy jsou látky v lidském organismu přirozené a významné. Ve vyšších koncentracích ovšem mohou vyvolat značné zdravotní komplikace (bolest hlavy, zvýšení srdeční činnosti a krevního tlaku, nevolnost a různé alergické reakce) a to především u citlivých jedinců. Z tohoto důvodu se společnost snaží jejich obsah v potravinách minimalizovat. Jednou ze skupiny potravin rizikových na výskyt biogenních aminů jsou fermentované výrobky. Jde o širokou skupinu, která zahrnuje fermentovanou zeleninu, fermentované výrobky masného průmyslu a většinu mléčných výrobků. Tato bakalářská práce je zaměřena na skupinu fermentovaných mléčných výrobků.

V teoretické části se pojednává o chemickém zařazení biogenních aminů, jejich významu a účincích na lidský organismus a také výskytu biogenních aminů v mléce a mléčných výrobcích. Dále se zabývá mikroorganismy, u nichž byla zjištěna dekarboxylasová aktivita, a to především bakteriemi mléčného kvašení. Tato heterogenní skupina bakterií má v potravinářském průmyslu velký význam a řada bakterií mléčného kvašení je využívána jako tzv. startovací kultury v mnoha technologických postupech.

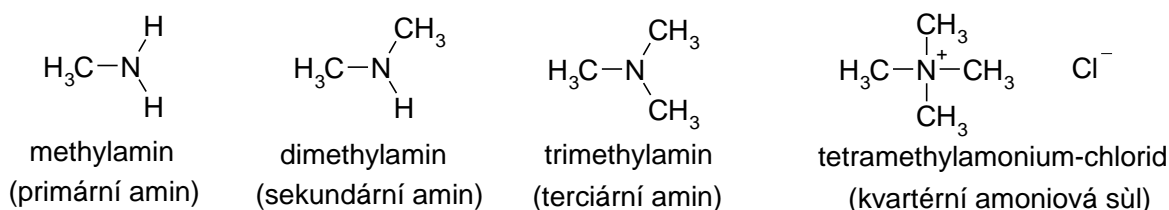
Praktická část je potom zaměřena na vlastní stanovení dekarboxylasové aktivity bakterií izolovaných z mléka a mléčných výrobků a základní charakterizaci těchto bakterií. U izolovaných bakterií byla zkoumána jejich schopnost dekarboxylace aminokyselin lysinu, argininu, histidinu, tryptofanu, tyrosinu a ornithinu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

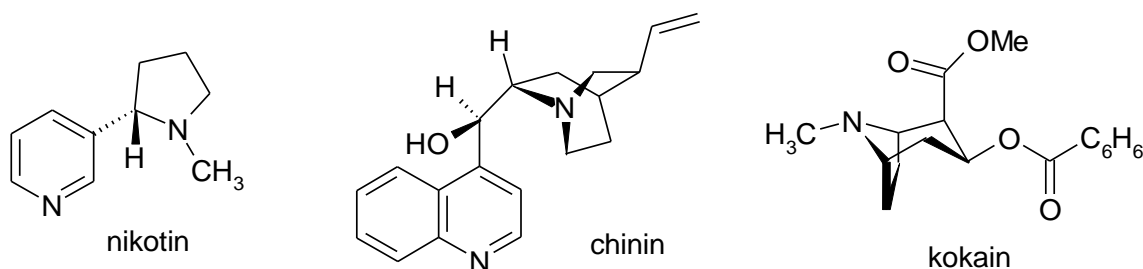
1.1 Charakteristika aminů

Aminy je možné považovat za deriváty amoniaku, ve kterých byl atom vodíku nahrazen arylou nebo alkylovou skupinou. Podle počtu nahrazených vodíkových atomů jsou pak rozeznávány aminy primární, sekundární a terciární. Náhradou všech atomů v amoniovém iontu lze odvodit kvartérní amoniovou sůl (Obr. 1) [1].

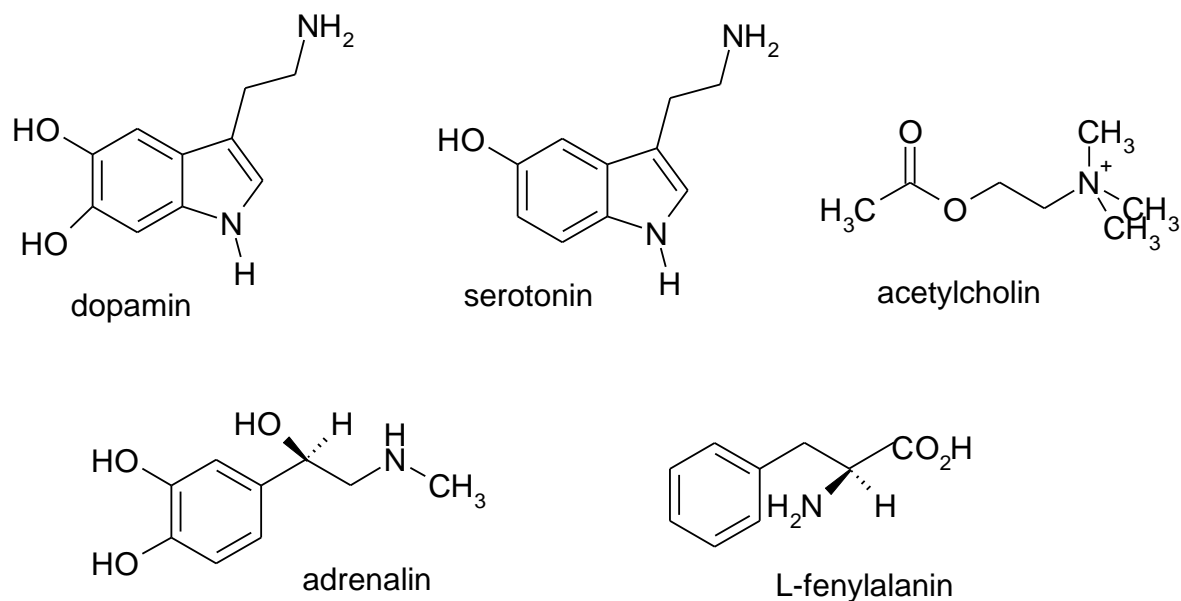


Obr. 1: Chemická struktura vybraných aminů [1]

V živé přírodě se vyskytuje velké množství aminů a jejich derivátů. Pro tyto látky je charakteristická jejich vysoká biologická aktivita. V rostlinách jde například o vysoce toxický nikotin přítomný v tabáku, dále pak chinin nebo kokain (Obr. 2). U živočichů se aminy účastní přenosu nervového vzruchu [1]. Mezi významné neurotransmitery patří například dopamin a serotonin (Obr. 3) [2]. Serotonin je syntetizován v mozku a má vztah k některým duševním onemocněním. Dále se může k těmto látkám řadit například hormon adrenalin (Obr. 3) vylučovaný nadledvinkami ve stresových situacích [1]. Přenos nervového vzruchu, mezi jednotlivými nervovými buňkami v synapsích pak zajišťuje kvartérní amoniová sůl acetylcholin (Obr. 3) [2]. Mezi deriváty aminů lze zařadit i aminokyseliny, jako L-fenylalanin (Obr. 3), které jsou stavebními jednotkami bílkovin [1].



Obr. 2: Chemická struktura rostlinných alkaloidů [1]



Obr. 3: Chemická struktura vybraných živočišných alkaloidů [1,2]

1.2 Obecná charakteristika biogenních aminů

Jsou-li aminy tvořeny působením živých organismů, jsou označovány jako biogenní. Biogenní aminy jsou nízkomolekulární organické bazické sloučeniny odvozené od aminokyselin [3,4,5]. Tyto organické báze jsou syntetizovány mikrobiálním, rostlinným a živočišným metabolismem [6]. Běžně se podílejí na metabolických procesech v živých tkáních a vykazují různé biologické účinky. Mohou fungovat přímo jako hormony (histamin) nebo mohou být např. stavební látkou pro biosyntézu hormonů (fenylethylamin), alkaloidů, případně mohou sloužit i jako prekurzory nukleových kyselin a proteinů [3,4].

V nízkých koncentracích jsou biogenní aminy přirozenou složkou řady potravin (sýry, víno, pivo, trvanlivé salámy aj.), a vznikají i vlivem některých procesů při zpracování potravin (např. působením enzymů nebo vysokých teplot) [3,4].

Toxikologicky nejvýznamnější biogenní aminy (BA) jsou histamin, tyramin, putrescin a kadaverin. BA vznikají dekarboxylací volné aminokyseliny vyskytující se v potravinaě účinkem mikrobiálního enzymu [4].

Podle chemické struktury mohou být biogenní aminy děleny na: alifatické (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatické (tyramin, fenylethylamin), heterocyklické (histamin, tryptamin). Aminy, jako jsou polyaminy, putrescin, spermidin, spermin

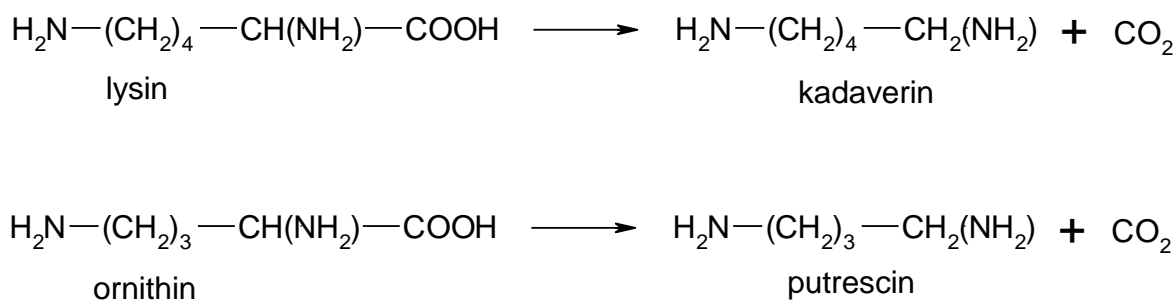
a také kadaverin jsou nepostradatelnou součástí živých buněk a jsou důležité v regulaci funkce nukleových kyselin a syntézy bílkovin a pravděpodobně i pro stabilizaci membrán [6].

1.3 Vznik biogenních aminů

Biogenní aminy jsou dusíkaté sloučeniny, které vznikají z aminokyselin působením karboxylas (dekarboxylas) nebo z aminokyselin a karbonylových sloučenin (aldehydů, ketonů) působením transaminas. V potravinách a nápojích jsou biogenní aminy vytvářeny enzymy obsaženými v surovině nebo jsou generovány mikrobiální dekarboxylací aminokyselin. Bylo však zjištěno, že některé z alifatických aminů mohou být přítomny již v surovině použité pro výrobu, a jsou tedy tvořeny „*in vivo*“ aminací z odpovídajících aldehydů [6,7].

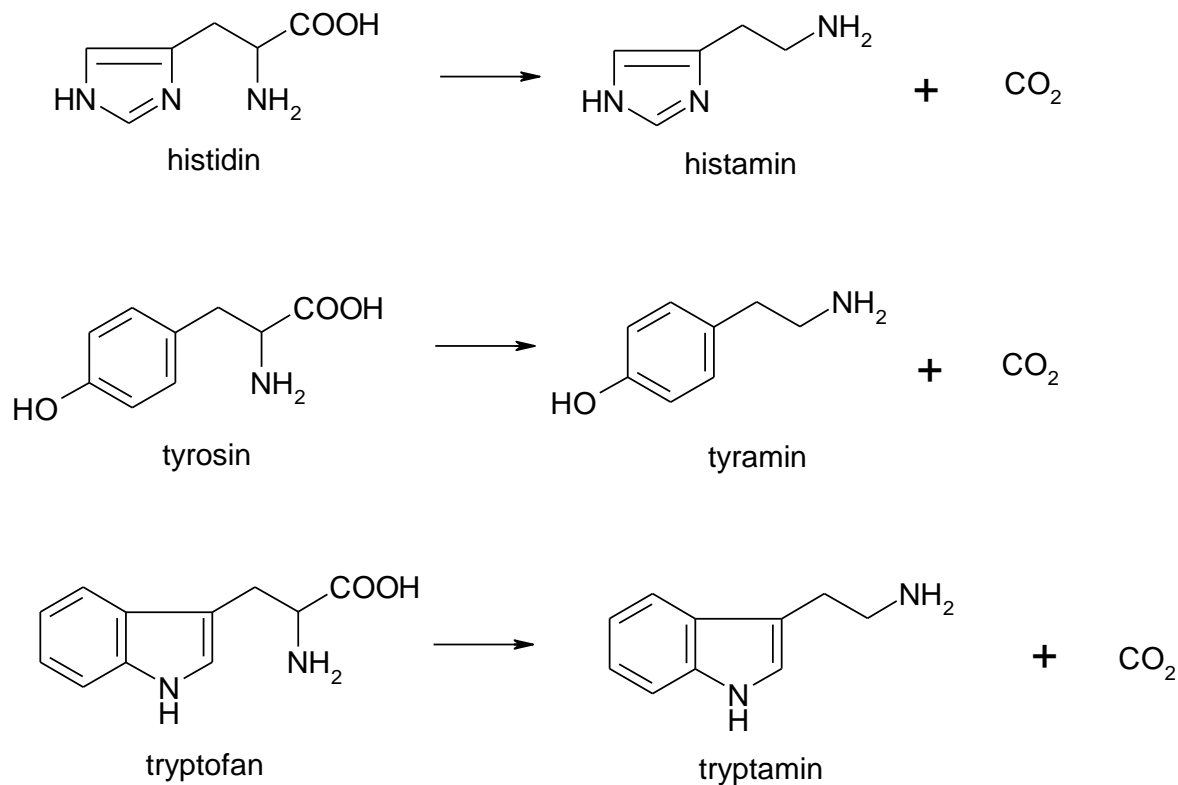
Předpoklady pro tvorbu biogenních aminů mikroorganismy jsou: dostupnost volných aminokyselin, která však ne vždy vede k produkci aminů; přítomnost dekarboxylasa pozitivních mikroorganismů; podmínky, které umožňují růst bakterií, syntézu dekarboxylasy a následně její aktivitu [6].

Aminokyseliny uvolněné štěpením bílkovin přecházejí přímo do buňky, kde jsou dále metabolizovány dekarboxylací, deaminací nebo transaminací. Dekarboxylace na biogenní aminy je katalyzována specifickými dekarboxylasovými enzymy, patřícími do třídy lyas, které obsahují jako prekurzor koenzym pyridoxalfosfát. Výsledkem této reakce je vznik oxidu uhličitého a některých toxických primárních aminů nepříjemné chuti. Z diaminokyselin lysinu a ornithinu vznikají toxické primární aminy kadaverin a putrescin (Obr. 4) [8,9,10].



Obr. 4: Dekarboxylace diaminokyselin (vznik toxických primárních aminů) [8]

Dekarboxylací aromatických aminokyselin histidinu, tyrosinu a tryptofanu vznikají toxické primární aminy histamin, tyramin a tryptamin (Obr. 5). Z tryptaminu se tvoří hormon serotonin [7,8].



Obr. 5: Dekarboxylace aromatických aminokyselin (vznik biogenních aminů) [8]

Z aminokyseliny argininu vzniká agmatin a dále putrescin. Ten vzniká také přímo dekarboxylací ornithinu. Z putrescinu pak vzniká spermidin a následně spermin. Dekarboxylací fenylalaninu vzniká 2-fenylethylamin [6,7].

1.3.1 Reakce a přeměny biogenních aminů

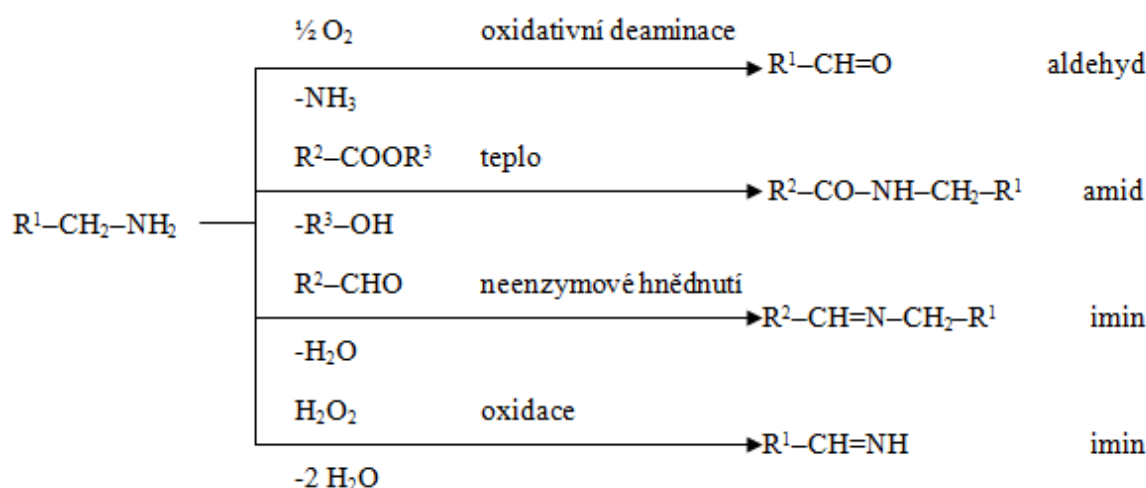
Biogenní aminy jsou značně reaktivní látky [7]. Aminy, které vznikly dekarboxylací, jsou obvykle dále metabolizovány flavoproteinovými aminooxidázami, které dehydrogenují amin na imin. Ten hydrolyzou poskytuje NH_3 a aldehyd, jehož oxidací vzniká karboxylová kyselina o jeden uhlík kratší, než byla původní aminokyselina [9].

Kromě reakcí enzymových, které vedou k různým derivátům biogenních aminů, mohou oxidativní deaminací vznikat aldehydy (Obr. 6). Za zvýšené teploty

nebo při dlouhodobém skladování reagují biogenní aminy s triacylglyceroly za vzniku amidů mastných kyselin (Obr. 6) [7].

Stejně jako další aminosloučeniny vstupují do reakcí neenzymatického hnědnutí, kde vznikají jako produkty příslušné iminy (Obr. 6). Iminy jsou tvořeny také oxidací aminů (např. peroxidem vodíku nebo hydroperoxydy lipidů) (Obr. 6) [7].

S oxidy dusíku mohou sekundární aminy tvořit karcinogenní nitrosaminy [7].



Obr. 6: Hlavní reakce biogenních aminů [7]

1.4 Význam biogenních aminů v organismu a jejich toxicita

Biogenní aminy patří k přirozeným antinutričním faktorům, které jsou hygienicky významné ve výživě. V malých množstvích jsou organismu potřebné pro celou řadu základních funkcí (regulace nukleových kyselin, stabilizace membrán, syntéza bílkovin, atd.). Na druhé straně mohou však jejich vysoké koncentrace působit toxicky [11].

1.4.1 Význam a využití biogenních aminů v organismu

Dekarboxylace aminokyselin u bakterií je hlavní cestou jejich odbourávání a je značně rozšířena i v rostlinách. U živočišných organismů však dekarboxylace slouží v podstatě pouze k výrobě důležitých biogenních aminů, jež jsou využívány k výstavbě koenzymů, vitaminů, hormonů nebo i jinak pro své fyziologické účinky [9].

Biologický význam biogenních aminů je značný. Například nedostatek dopaminu (Tab. 1), který je významným neurotransmiterem, v mozku vyvolává Parkinsonovu chorobu doprovázenou typickým třesem [10].

Určité třídy aminů, katecholaminy, indolaminy a histamin, plní důležité metabolické funkce u lidí, především v nervovém systému a kontrole krevního tlaku. Fenylethylamin a tyramin (Tab. 1) mohou způsobit vzestup krevního tlaku, naopak, histamin krevní tlak snižuje [6]. Histamin (Tab. 1) vykonává své účinky vazbou na receptory na buněčných membránách, které se nacházejí v kardiovaskulárním systému a v různých sekrečních žlázách. To histaminu umožňuje přímou regulaci činnosti srdce v důsledku jeho účinku na uvolňování adrenalinu a noradrenalinu z nadledvin. Tento biogenní amin také působí na hladké svalstvo dělohy, střev a dýchacích cest, stimuluje i senzory a motorické neurony, a kontroluje sekreci žaludeční kyseliny [5]. Díky těmto funkcím, působí histamin také jako významný mediátor při alergických reakcích (např. vyvolá záchvat bronchiálního astmatu, stimuluje peristaltiku ve střevech a při alergii na potravinu vyvolá průjem, způsobí svědění pokožky) [13].

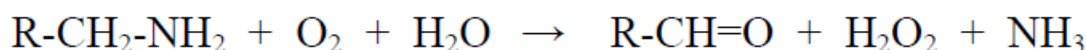
Polyaminy (putrescin, spermidin a spermin) (Tab. 1) jsou nepostradatelnou součástí všech živých buněk. Ačkoli je o nich již dlouho známo, že jsou nezbytné pro růst, jejich přesná biologická role v buněčném metabolismu je dosud nejasná. Vzhledem k rozmanitosti jejich funkcí v buněčném metabolismu a růstu, jsou odpovědné za rychlý růst tkání. Polyaminy jsou důležité pro udržení vysoké metabolické aktivity, normální funkci a imunitní systém střeva. Mezi jejich významné účinky patří to, že brání oxidaci polynenasycených mastných kyselin. Tento antioxidační účinek koreluje s počtem aminových skupin v polyaminu. Také tyramin má výraznou antioxidační aktivitu, která se zvyšuje s jeho koncentrací [6].

Tab. 1: Biogenní aminy, jejich prekurzory, produkty transformace a biologický význam [7]

Biogenní amin	Původní AMK	Další produkty AMK a transformace aminu	Biologický význam
histamin	histidin		Lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak, sekrece žaludeční šťávy, způsobuje anafylaktický šok a alergické reakce
kadaverin	lysin		Stabilizace makromolekul (nukleových kyselin), subcelulárních struktur (ribosomy), stimulace diferenciac buněk, rostlinný hormon
putrescin	arginin ornithin nebo citrulin	<i>N</i> -methylputrescin, spermidin, spermin	Stabilizace makromolekul (nukleových kyselin), subcelulárních struktur (ribosomy), stimulace diferenciac buněk, rostlinný hormon
agmatin	arginin	putrescin <i>N</i> -methylputrescin, spermidin, spermin	Stabilizace makromolekul (nukleových kyselin), subcelulárních struktur (ribosomy), stimulace diferenciac buněk, rostlinný hormon
fenylethylamin	fenylalanin	tyramin, dopamin, adrenalin, noradrenalin	Prekurzor tyraminu
tyramin	tyrosin	dopamin, adrenalin, noradrenalin, synefrin, hordenin	Prekurzor dopaminu, lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak a kontrakce hladkého svalstva
dopamin	DOPA	noradrenalin, adrenalin	Mediátory sympatických nervů
tryptamin	tryptofan	serotonin, melatonin	Lokální tkáňové a rostlinné hormony (katecholaminy), vliv na krevní tlak, peristaltiku střev, psychické funkce

1.4.2 Toxicita biogenních aminů

Biogenní aminy mohou být oxidovány pomocí mono- a diaminoxidas ve střevech, játrech, ledvinách, v plicích a v dalších orgánech a tímto způsobem jsou detoxikovány (Obr.7) [8].



Obr. 7: Schéma oxidativní deaminace [12]

Při příjmu vysokých dávek tento oxidační mechanismus detoxikaci nestíhá a u konzumenta se projeví příznaky otravy. Ve vysokých koncentracích se pak biogenní aminy mohou projevovat jako látky [7]:

- Psychoaktivní – působí jako přenašeči v centrálním nervovém systému.
- Vasoaktivní – působí přímo nebo nepřímo na vaskulární systém.

Vasoaktivní aminy se pak podle účinku dělí [7]:

- vasokontraktibilní (tyramin).
- vasodilatační aminy (histamin).

Aktivita detoxikačních enzymů (mono- a diaminooxidas) může být různá u jednotlivých jedinců a závislá na řadě faktorů. Při hodnocení toxického účinku biogenních aminů je nutné zvažovat nejen přítomnost konkrétního aminu, ale i ostatních faktorů, jakými jsou množství spotřebované potraviny, přítomnost jiných toxických látek apod. [7]. Toxický účinek se významně zvyšuje při požití alkoholu, podávání určitých antibiotik, tuberkulostatik a psychofarmak, které jsou inhibitory monoaminooxidas. Tyto inhibitory ve střevech brzdí detoxikační procesy a způsobují zvýšení resorpce biogenních aminů i při malém obsahu v konzumované potravíně [8]. Z tohoto důvodu je velmi těžké stanovit hranici toxicity biogenních aminů. Za pro člověka nebezpečné se považují koncentrace histaminu vyšší než 500-1000 mg/kg potraviny. Pro fenylethylamin se uvádějí hodnoty 30 mg/kg. Znalosti o toxicitě ostatních biogenních aminů jsou prozatím nedostatečné [7]. V některých státech však byly navrženy hodnoty pro horní limit 100 mg histaminu/kg potravin a 2 mg/l alkoholických nápojů. Hodnoty 100 - 800 mg/kg pro tyramin a 30 mg/kg pro fenylethylamin byly hlášeny jako toxické dávky v potravinách. Obecně platí, že úroveň 1000 mg/kg (amin / potravina) je považována za nebezpečnou pro zdraví člověka [6].

Histamin v potravinách nemusí být nutně nebezpečný. Je zřejmé, že mnohé potraviny obsahují jen malé množství histaminu, které může být tolerováno. Detoxikační systém ve střevním traktu je schopen poměrně účinně metabolizovat požitý histamin a histamin, který může být tvořen také střevními bakteriemi. Tento systém se skládá ze dvou odlišných enzymů diaminooxidas a histamin-N-methyltransferasy. Tyto enzymy přeměňují histamin na netoxické produkty. Systém detoxikace je dostačující pro běžný příjem histaminu. Metabolismus histaminu je potlačen současným podáním jiných aminů, které tak zesilují otravu histaminem z potraviny. Mezi tyto látky patří putrescin a kadaverin, vyskytující se

v nezanedbatelném množství ve zrajících sýrech. Z dalších biogenních aminů, které zvyšují toxicitu histaminu, to jsou tyramin, tryptamin a fenylethylamin. Spermin a spermidin zvyšují transport histaminu přes stěnu trávicího traktu [5]. U osob citlivých na přítomnost histaminu v potravinách se mohou vyskytnout otravy histaminem [3]. Histamin způsobuje po půl až jedné hodině bolesti hlavy, zvracení, bolesti břicha, poruchy krevního oběhu a díky rozšíření kapilár zčervenání pokožky [8]. Mezi charakteristické příznaky, které postihují kožní systém, patří vyrážka, kopřivka, otok nebo zánět. V gastrointestinálním systému se otrava vyznačuje nevolností, zvracením, průjmem a křečemi v břiše. Dalšími příznaky pak jsou hypotense, bolesti hlavy, bušení srdce, brnění a návaly horka [5]. Otravy histaminem se často vyskytují po požití dlouhozrajících sýrů, které v důsledku mikrobiální činnosti mohou obsahovat vyšší koncentrace histaminu [8]. Vysoké množství přijatého histaminu může vyvolat anafylaktický šok [7].

Význam tyraminu v potravinách je především kvůli jeho toxikologickým důsledkům. Tyramin působí nepřímo tím, že způsobuje uvolňování noradrenalinu ze sympatického nervového systému, který způsobuje zvýšení krevního tlaku a činnosti srdce. Působením tyraminu dochází k rozšíření cév, oční tkáně, způsobuje slzení a slinění, zvyšuje dýchání a hladinu cukru v krvi. S hypertensí byla dříve spojována konzumace sýrů, neboť tyramin se v nich může vyskytovat ve vyšším množství. Hypertense způsobená tyraminem může mít za následek silné bolesti hlavy a v některých případech může vyvolat krvácení do mozku či srdeční selhání [5].

S hypertensí je spojován také fenylethylamin a histamin. V relativně vysokých koncentracích se tyto aminy nacházejí v čokoládě, sýrech a alkoholu (především červeném víně) [14].

Jako biochemický test k bližší identifikaci mikroorganismů (především bakterií) se využívá dekarboxylace lysinu. Vzniklý kadaverin neboli pentamethylendiamin, náleží do skupiny mrtvolných jedů, ptomainů. Mezi bakterie schopné dekarboxylace lysinu patří např. *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* nebo *Serratia marcescens* [15].

1.4.3 Biogenní aminy jako karcinogeny

Kromě jejich biologické role jako zdroje dusíku a prekurzorů pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů, jsou aminy také potenciální prekurzory

karcinogenních N-nitroso sloučenin [6]. Biogenní aminy mohou tedy být považovány za karcinogeny, protože mají schopnost reagovat s dusitany za vzniku potenciálně karcinogenních nitrosaminů. Nitrosovatelné aminy, které jsou nejvíce známé jako prekurzory karcinogenních N-nitrosaminů jsou sekundární aminy (např. agmatin) a polyaminy (spermin a spermidin). Obecně platí, že k výraznému nárůstu nitrosaminů v moči dochází po konzumaci jídla s obsahem dusičnanů a aminů ve srovnání s jídlem s malým množstvím aminů [5]. N-nitroso-sloučeniny se tvoří interakcí s dusitany a oxidy dusíku v průběhu skladování, uchovávání a vaření potravin. Znepokojení tedy může vyvolat používání dusitanů vzhledem k jejich možné reakce s aminy [6].

2 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ V MLÉKU A MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH

Biogenní aminy se mohou vyskytovat v potravinářských výrobcích jako přirozené (součásti buněčných struktur použitých surovin pro výrobu) nebo mohou vznikat při procesu výroby a skladování potravin. Stanovení koncentrace biogenních aminů (histaminu, tyraminu, agmatinu, putrescinu, kadaverinu, sperminu a spermidinu) je důležité nejen z hlediska jejich toxicity, ale také pro to, že mohou být použity jako indikátory mikrobiologické kontaminace, stupně čerstvosti, kažení a ukazatele kvality zkoumané potraviny [6,11]. Ve vyšším množství se biogenní aminy nachází ve fermentovaných výrobcích (např. sýry, trvanlivé salámy, pivo, víno, kysané zelí aj.), kde vznikají mikrobiální činností. Vysoké koncentrace BA se pak vyskytují u potravin v pokročilém stupni kažení [7].

Tvorba velkého množství BA závisí na několika faktorech: dostupnost substrátu (volné aminokyseliny nebo krátkých peptidů obsahujících tyto aminokyseliny), optimální environmentální podmínky (např. pH, teplota, atd.) a samozřejmě přítomnost mikroorganismů s tvorbou dekarboxylas štěpících příslušné aminokyseliny. Mikroorganismy s dekarboxylasovou činností jsou poměrně značně rozšířené mezi bakteriemi, tato schopnost však není specifická pro každý rod nebo druh. Některé kmeny, které patří ke stejnému druhu, mohou dekarboxylovat jednu nebo několik aminokyselin, zatímco jiné kmeny ne. Tyto mikroorganismy mohou významně změnit sensorické vlastnosti a kvalitu čerstvých potravin [16].

Využití metod, jako je např. skladování v chladu může tyto změny oddálit, ale nedokáže definitivně zastavit dekarboxylační proces, protože některé bakterie mohou růst i při nízkých teplotách. Naopak tepelné zpracování potravin může zničit dekarboxylace schopné mikroorganismy, ale nezaručuje zničení přítomných aminů [16]. Odstranění již jednou vzniklých BA z potraviny je velmi obtížné. Jejich koncentrace lze snížit např. použitím diaminoxidasy, ale v praxi tento způsob dekontaminace není použitelný. K částečnému snížení obsahu biogenních aminů dochází v tepelně zpracovaných výrobcích jejich reakcí s redukcujícími cukry (resp. s rozkladnými produkty cukrů v Maillardově reakci). Z těchto zjištění vyplývá, že pro účinné předcházení vzniku BA musí být opatření použita již v dřívějších fázích zpracování potravin. Nejvhodnější pro výrobu potravin obsahujících pouze malé množství BA je dodržování takových technologických postupů a hygienických podmínek výroby, které brání jejich vzniku [7,16].

2.1 Mléko a nefermentované mléčné výrobky

V nefermentovaných potravinách lze přítomnost biogenních aminů nad určitou úroveň považovat orientačně za indikátor nežádoucí mikrobiální aktivity. Nicméně, přítomnost biogenních aminů v potravinách nemusí nutně korelovat s růstem organismů přispívajících ke kažení, protože ne všechny přítomné mikroorganismy jsou dekarboxylasa-pozitivní [6].

Mikrobiologická kvalita mléka je jedním z nejdůležitějších faktorů přispívajících k tvorbě BA v sýru. Obsah mikroorganismů v mléce pro výrobu sýrů závisí na hygienických podmínkách během dojení, podmínkách skladování a tepelném ošetření. Sanitační postupy, zejména pasteurace mléka, mají zásadní roli nejen pro odstranění patogenní mikroflóry, ale také pro výrazné snížení počtů přirozených bakterií podílejících se na tvorbě BA. Syrové mléko může obsahovat různé bakterie, které mohou být schopny dekarboxylace aminokyselin a tvorby tyraminu, histaminu, putrescinu a kadaverinu. V plnotučném, polotučném a odstředěném kravském mléce byly zjištěny také malá množství polyaminů sperminu a spermidinu. V nekontaminovaném mléce obsah BA nepřesahuje 1 mg/kg [12,16,17].

2.2 Fermentované mléčné výrobky

Obecně platí, že potraviny s vysokým obsahem bílkovin, jako jsou mléko a sýry, se mikrobiálně kazí nebo zrají tím rychleji, čím více obsahují nízkomolekulárních štěpů bílkovin (nízkomolekulární peptidy, aminokyseliny, rozpustné organické dusíkaté látky). Při intenzivním rozkladu bílkovin vzniká řada hnilobných produktů, které nepříznivě ovlivňují sensorické vlastnosti (chuť, barvu, vzhled, texturu, vůni) poživatin [8].

Sýr představuje ideální prostředí pro tvorbu aminů, ale koncentrace biogenních aminů se velmi liší v závislosti na faktorech, jako je druh sýru, jeho stáří a mikroorganismy v něm obsažené. Velké rozdíly byly pozorovány i v rámci téhož typu sýru [18]. K výrazné tvorbě BA při zrání sýrů dochází v provozech s nedostatečnou hygienickou úrovní (vlivem kontaminující mikroflóry). Při zachování osvědčených technologických postupů výroby a dodržování správných hygienických zásad obsahují i dlouhodobě zrající sýry poměrně malá množství BA [7,8]. Obvykle sýry obsahují jednotky až stovky mg/kg histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu, jednotky až desítky mg/kg 2-fenylethylaminu a velmi malá množství tryptaminu. Obsah jednotlivých biogenních aminů však může výjimečně

dosáhnout až gramových množství v 1 kg sýra, což značně závisí na ošetření výchozí suroviny a technologických faktorech, jako jsou teplota sýřeniny, použití startovacích a plísňových kultur. Výrazně vyšší množství BA byla zjištěna u sýrů vyrobených z mléka nepasterovaného [17].

Jednou z nejúčinnějších metod k potlačení růstu nežádoucích mikroorganismů a tím i k inaktivaci enzymů je tepelné ošetření. Nicméně, tepelným zpracováním suroviny dochází ke změnám fyzikálních a chemických vlastností a v některých případech je tím omezeno využití suroviny pro pozdější zpracování. V posledních desetiletích byly navrženy pro kontrolu kontaminace potravin mikroorganismy různé technologické operace bez využití vysokých teplot („chladné-technologie“), jako je vysoký hydrostatický tlak nebo ozařování. Úspěšně se jich používá k odstranění několika patogenních bakterií, jako jsou *Salmonella* spp. nebo *Listeria monocytogenes*, ale v posledních letech byla pozornost zaměřena rovněž na jejich využití pro zabránění tvorby BA v čerstvých a fermentovaných potravinách [16].

2.2.1 Obsah biogenních aminů v sýrech

Sýr je po rybách nejčastější potravinou spojenou s otravami histaminem a první zaznamenaný případ nastal v roce 1967 v Nizozemsku konzumací sýru Gouda s vyšším obsahem histaminu. Poté byly provedeny mnohé studie pro stanovení obsahu aminů v sýrech a výrobcích z nich [6]. Sýry spojované s otravami histaminem jsou nejčastěji Gouda, sýry švýcarského typu, Čedar, Gruyere, a Cheshire [5]. U sýrů z české obchodní sítě byly zjištěny nejvyšší koncentrace celkových BA u tvarůžků (2 540 mg/kg), brynzy (2 490 mg/kg) a u ostatních měkkých zrajících sýrů. Nejnižší koncentrace BA byly nalezeny u smetanových a termizovaných sýrů, tj. u sýrů, kde nedochází k fermentaci (zrání). Jednotlivé BA se (podle studie obsahu BA v sýrech české obchodní sítě) nejvíce vyskytují v následujících sýrech [17]:

- Nejvyšší koncentrace histaminu v měkkých sýrech byla nalezena u pivního sýru (283 mg/kg). U českých sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou byly zjištěny nižší hodnoty histaminu než hodnoty uváděné u zahraničních sýrů stejného typu (ementál až 1500 mg/kg) [17].

- Tyramin byl zjištěn v nejvyšších množstvích u sýrů ementálského typu (ementál 1123 mg/kg), měkkých zrajících sýrů (brynza 417 mg/kg) a sýrů plísňových (Hermelín 187 mg/kg) [17].
- S výjimkou měkkých zrajících sýrů (brynza, tvarůžky) a sýrů plísňových byla zjištěna relativně nízká koncentrace putrescinu u českých sýrů [17].
- Vysoké hladiny kadaverinu obsahovala brynza (1 110 mg/kg), tvarůžky (739 mg/kg) a Niva (699 mg/kg). Dřívější studie uvádějí vysokou hladinu kadaverinu také u sýru Camembert (až 1000 mg/kg) [17].
- Výskyt tryptaminu v českých sýrech byl velmi nízký. Zahraniční prameny však připouští i vysoké koncentrace např. u sýru Roquefort (až 600 mg/kg) [17].
- Polyaminy (spermin a spermidin) byly v nejvyšších koncentracích zjištěny u plísňových a měkkých zrajících sýrů. Jejich koncentrace však odpovídaly jednotkám výjimečně desítkám mg/kg [17].

3 BAKTERIE S DEKARBOXYLASOVOU AKTIVITOU

K štěpení bílkovin extracelulárními proteasami dochází, až když mikroorganismy spotřebovaly lépe dostupné nízkomolekulární složky. Tyto extracelulární enzymy produkují nejčastěji bakterie z rodu *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* a mnohé druhy z čeledi *Enterobacteriaceae* [8]. Četné rody z čeledi *Enterobacteriaceae* jsou spojovány se sýry (jako jejich kontaminanty), a to především rody *Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Citrobacter* a *Klebsiella*. Jejich schopnost dekarboxylace jedné nebo více aminokyselin je specifická. Tyto bakterie jsou především producenti kadaverinu a v menší míře putrescinu [12]. Výraznou schopnost dekarboxylace aminokyselin mají i enterokoky sérologické skupiny D, které jsou přirozenou složkou mikroflóry sýrů. Mezi slabé producenty biogenních aminů se řadí bakterie z rodu *Propionibacterium*, streptokoky orální skupiny (*S. salivarius* apod.) a některé laktobacily (*L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. plantarum* apod.) [8].

Schopnost asimilovat kadaverin, putrescin a histamin byla zjištěna i u některých druhů kvasinek izolovaných ze sýru Roquefort. U různých typů mikroorganismů (např. laktokoky, plíseň *Aspergillus niger* a kvasinky rodu *Trichosporon*) byla prokázána také schopnost inhibice monoaminoxidas [6].

3.1 Bakterie mléčného kvašení

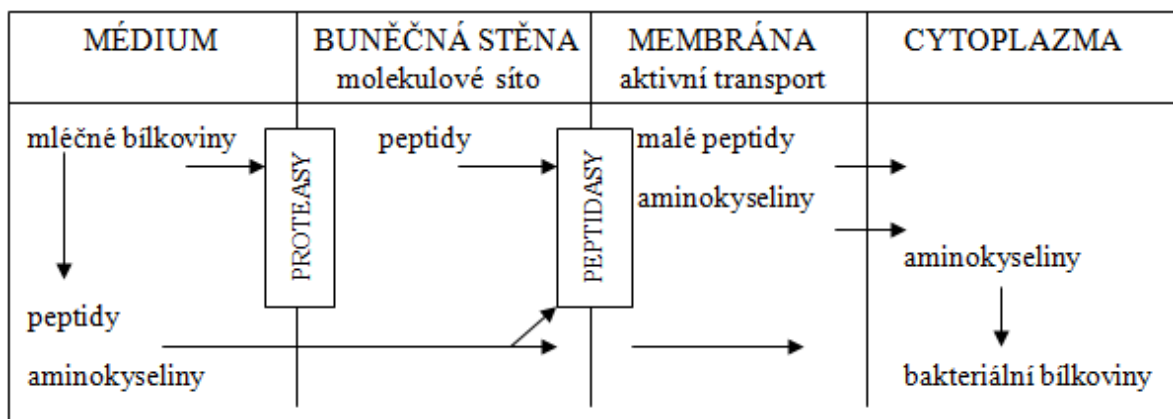
Pojem mléčné bakterie zahrnuje širokou skupinu rodů s podobnými fyziologickými znaky. Bakterie mléčného kvašení jsou definovány jako grampozitivní nesporogenní mikroaerofilní bakterie. Morfologicky se BMK řadí jak mezi tyčinky, tak mezi koky a obecně neprodukují katalázu. Název této skupiny bakterií je odvozen od jejich schopnosti fermentovat sacharidy na kyselinu mléčnou jako hlavní výsledný produkt [19]. V závislosti na jejich rodu a druhu fermentují BMK sacharidy podle různých metabolických drah, a podle toho se dělí [8]:

- homofermentativní – kdy kyselina mléčná tvoří nejméně 90 % vzniklých metabolitů.
- heterofermentativní – kdy kyselina mléčná tvoří nejméně 50 % vzniklých metabolitů [8].

Při heterofermentativním kvašení vznikají kromě kyseliny mléčné rovněž další produkty jako např. kyseliny jablečná, jantarová, mravenčí, octová, etanol a oxid uhličitý. Bakterie mléčného kvašení fermentují hexosy podle tří hlavních metabolických drah (glykolysa, 6-fosfoglukonátová dráha a bifidová dráha) [8,19].

Taxonomie bakterií mléčného kvašení je v poslední době provázena mnohými změnami. Původně byla skupina BMK tvořena rody *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Streptococcus*. Taxonomická revize uvedených rodů a zejména v posledních letech zařazení nových rodů vedla k rozšíření skupiny BMK na následující rody: *Abiotrophia*, *Aerococcus*, *Agitococcus*, *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Alloicoccus*, *Atopobacter*, *Atopococcus*, *Atopostipes*, *Carnobacterium*, *Desemzia*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Eremococcus*, *Globicatella*, *Granulicatella*, *Ignavigranum*, *Isobaculum*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Lactovum*, *Leuconostoc*, *Marinilactibacillus*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Trichococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* [20,23].

V porovnání s jinými proteolytickými bakteriemi (*Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, koliformní bakterie) jsou bakterie mléčného kvašení jen mírně proteolytické. Výsledkem jejich proteolytické aktivity jsou štěpy bílkovin (peptidy, aminokyseliny a jiné nebílkovinné dusíkaté látky), které jsou buňkami utilizovatelné (Obr. 8). Této vlastnosti bakterií mléčného kvašení se využívají v potravinářských technologiích k prodlužování trvanlivosti a při výrobě zrajících a fermentovaných potravin o požadovaných reologických a organoleptických vlastnostech [8].



Obr. 8: Štěpení bílkovin z hlediska buňky [8]

Proteolytické působení bakterií mléčného kvašení má velký význam především v mlékárenské technologii. Při výrobě fermentovaných mléčných nápojů a při výrobě sýrů je fermentace mléka a jeho bílkovin nepostradatelná [8].

3.1.1 Vliv startovacích kultur na tvorbu biogenních aminů

Protože kyselina mléčná zastavuje rozmnožování hnilobných bakterií a stafylokoků, využívá se činnosti mléčných bakterií pro konzervaci některých potravin. V mlékárenském průmyslu se používají laktobacily při přípravě sýrů (např. *L. casei*, *L. lactis*). Některé druhy laktobacilů se používají pro přípravu zakysaných mléčných výrobků (např. *L. acidophilus* pro přípravu tzv. acidofilního mléka, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pro přípravu jogurtu) [21]. Nicméně bylo zjištěno, že některé startovací kultury mohou zvyšovat proteolýzu a následně množství volných aminokyselin, které jsou k dispozici pro bakterie s dekarboxylasovou aktivitou, a v důsledku toho může dojít ke zvýšené tvorbě BA. Kromě toho mohou některé kmeny bakterií navrhované jako startovací kultury pro mléčné výrobky, jako jsou *Lactobacillus helveticus* nebo *Lactococcus lactis*, být schopny tvořit BA [16]. Rod *Lactobacillus* se zdá být hlavním producentem tyraminu v sýrech. Dekarboxylasová aktivita byla zjištěna také u kmenů *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* (hlavně produkce histaminu), *Lactobacillus brevis* (produkce tyraminu) a *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. Schopnost produkovat tyramin a histamin byla prokázána i u kmenu *Lactobacillus curvatus* [12].

Za původce tvorby BA ve fermentovaných potravinách jsou považovány také enterokoky. Patří k termorezistentním bakteriím přežívajícím pasterační teploty. Přítomnost enterokoků v mléčných výrobcích je považována za indikátor nedostatečných sanitačních podmínek. Na druhé straně enterokoky hrají významnou roli při zrání sýrů a vytváření jejich aroma (tvoří acetaldehyd, acetoin, diacetyl). Převaha enterokoků v některých druzích sýrů lze přisuzovat jejich vysoké odolnosti vůči vysokým teplotám a vůči soli. Tyto vhodné vlastnosti enterokoků vedly k jejich začlenění do určitých startovacích kultur (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*) [22].

Používání vhodných startovacích kultur bylo navrženo jako jedna z možností ovlivnění tvorby BA v sýrech. Komerční kultury by neměly obsahovat kmeny s proteolytickou aktivitou nebo kmeny dekarboxylující aminokyseliny. K snižování hladiny BA u zrajících fermentovaných potravin by mohla být využita metabolická aktivita některých

mikroorganismů majících aminooxidasu, které v přítomnosti kyslíku rozkládají vzniklé aminy. Potenciál pro degradaci biogenních aminů byl nalezen u bakterie *Brevibacterium linens*, plísně *Geotrichum candidum* a u různých druhů laktobacilů [12,16].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce byla izolace bakterií z mléka a mléčných fermentovaných výrobků a následné stanovení jejich dekarboxylasové aktivity. Dekarboxylasová aktivita izolovaných kmenů bakterií byla prokazována s využitím dvou metod, a to skrínigovou detekcí biogenních aminů kultivační metodou (pomocí kultivační půdy s indikátorem pH) a detekcí a kvantifikací biogenních aminů chromatograficky (iontově výměnnou chromatografií na automatickém analyzátoru aminokyselin). U izolovaných bakterií byla provedena základní charakteristika pomocí hodnocení morfologických znaků, využití některých biochemických testů a ENTEROtestu u vybraných kmenů.

Na základě poznatků z teoretické části a výsledků části praktické bylo cílem zhodnotit dekarboxylasovou aktivitu bakterií izolovaných z mléka a fermentovaných mléčných výrobků a zhodnocení výsledků tvorby biogenních aminů získaných dvěma metodami stanovení.

5 PRACOVNÍ POSTUPY A SLOŽENÍ ŽIVNÝCH MÉDIÍ

5.1 Mikrobiologická analýza vzorků

5.1.1 Charakteristika analyzovaných vzorků

Byla zkoumána dekarboxylasová činnost bakterií izolovaných ze vzorků mléka a mléčných výrobků (sýrů). K analýze byly použity vzorky zakoupené v obchodní síti ČR (s výjimkou taveného sýru) a to následující:

- syrové nepasterované mléko z mlékomatu,
- sýry s nízkodohřívanou sýřeninou Eidam a Eidam uzený,
- sýry s vysokodohřívanou sýřeninou Královský sýr a sýr Krolewski,
- bílý pařený sýr Jadel,
- tavený sýr vyrobený na laboratorním zařízení Ústavu technologie a mikrobiologie potravin.

5.1.2 Zpracování analyzovaných vzorků

Při mikrobiologické analýze vzorků se postupovalo podle normy ČSN 56 0100 [27]. Během celého postupu byly dodržovány aseptické podmínky. K vlastní analýze bylo odebráno přiměřené množství vzorku (ze všech částí analyzovaného vzorku sýru, vzorek mléka byl před analýzou několikrát promíchán převrácením lahve) do sterilního sáčku a zředěno fyziologickým roztokem v poměru 1:9. Odběr vzorku k analýze byl prováděn v aseptickém prostředí za použití sterilních pomůcek. Takto upravený vzorek byl homogenizován na stomacheru. Vzniklý homogenizát (ředění 10^{-1}) byl podle potřeby rozředěn v aseptickém prostředí desítkovým ředěním do zkumavek s fyziologickým roztokem. Příslušná ředění byla očkovaná na předem připravené půdy PCA – Plate Count Agar (HiMedia, Bombai, Indie) a ENDO Agar (HiMedia) roztěrem, na půdy bylo očkováno 0,1 ml inokula. Poté byly Petriho misky se zaočkovanými půdami kultivovány v termostatu při 30 °C po dobu 48h.

5.1.3 Živné půdy použité pro kultivaci vzorků a příprava fyziologického roztoku

PCA – Plate Count Agar (HiMedia)

Použití pro stanovení počtu mikroorganismů v potravinách a vodě.

Složení:

Enzymatický hydrolyzát kaseinu	5,0 g/l
Kvasničný extrakt	2,5 g/l
Glukosa	1,0 g/l
Agar.....	15,0 g/l

Konečné pH (25 °C) $7,0 \pm 0,2$

Příprava:

Pro přípravu 1000 ml živné půdy bylo naváženo 23,5 g přípravku a přidáno 1000 ml destilované vody. Směs byla míchána do úplného rozpuštění a poté byla sterilována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Sterilní půda byla za horka rozlita na Petriho misky.

ENDO Agar (HiMedia)

Použití pro detekci a rozlišení laktosa-pozitivních a laktosa-negativních koliformních bakterií.

Složení:

Masový pepton.....	10,0 g/l
Laktosa.....	10,0 g/l
Siřičitan sodný	2,5 g/l
Hydrogenfosforečnan (di)draselný.....	3,5 g/l
Basický fuchsin.....	0,5 g/l
Agar.....	15,0 g/l

Konečné pH (25 °C) $7,5 \pm 0,2$

Příprava:

Na přípravu 1000 ml živné půdy bylo odváženo 41,5 g přípravku a přidáno 1000 ml destilované vody. Směs byla míchána do úplného rozpuštění a poté autoklávována při 121 °C po dobu 15 min. Před naléváním na Petriho misky byla půda důkladně promíchána.

Příprava fyziologického roztoku

K přípravě 1000 ml fyziologického roztoku bylo odváženo 8,5 g chloridu sodného (LachNer, Neratovice) a rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Takto připravený roztok byl sterilován při 121 °C po dobu 15 minut.

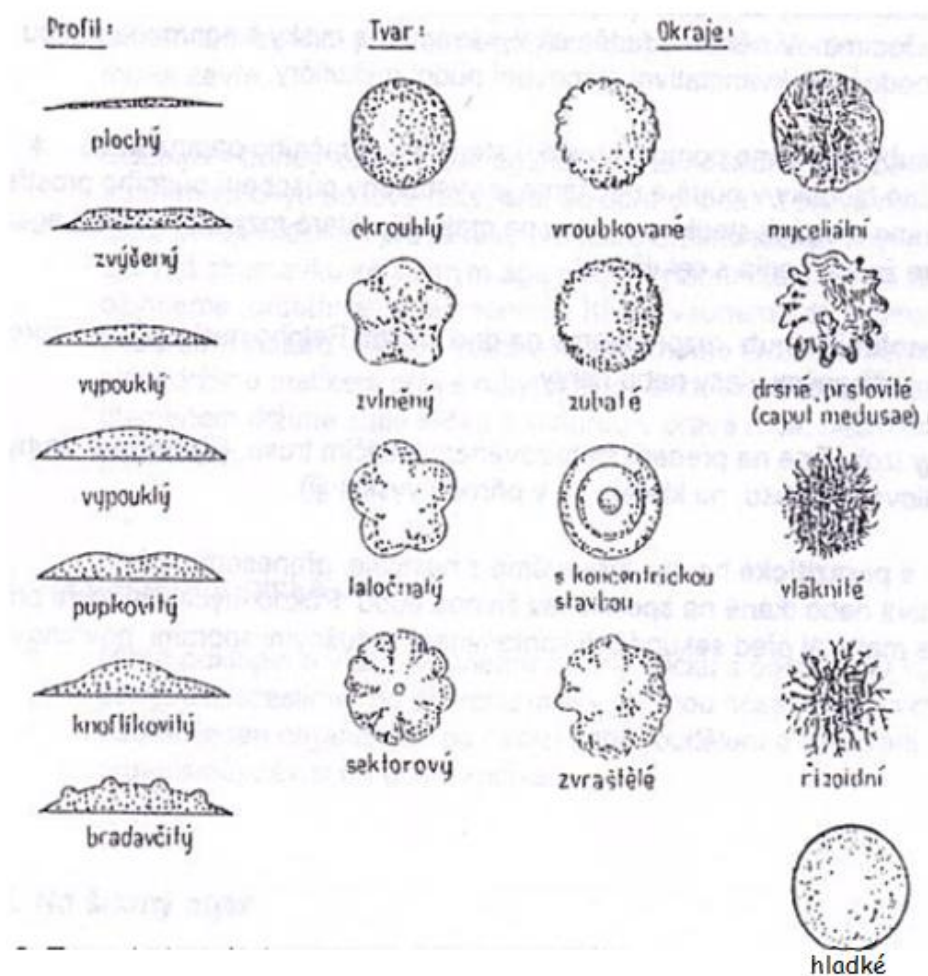
5.2 Základní charakteristika izolovaných bakterií

Pro každý analyzovaný vzorek byly z kolonií vyrostlých na Petriho miskách vybrány bakterie s rozdílnými makroskopickými znaky. Těmto vybraným bakteriím bylo přiřazeno pořadové číslo. Následně byly jednotlivé kmeny bakterií izolovány a pomocí očkovací kličky očkovány na půdu PCA křížovým roztěrem, aby došlo k pomnožení a zároveň k izolaci čisté kultury. Zaočkované Petriho misky s půdou PCA byly kultivovány v termostatu při 30 °C po dobu 24 h.

Po kultivaci byly u jednotlivých izolovaných kmenů bakterií hodnoceny morfologické znaky a biochemické vlastnosti s využitím některých biochemických identifikačních testů. Na základě těchto výsledků pak byl proveden u vybraných kmenů ENTEROtest.

5.2.1 Morfologické a biochemické znaky

Pomocí morfologických znaků nelze přesně určit, o jaký druh mikroorganismu se jedná. Přesto jsou ale tyto znaky jednou ze základních informací a v některých případech mohou být vodítkem k vlastní identifikaci daného mikroorganismu. Při hodnocení makroskopických znaků bylo postupováno pomocí Jandové a Kotoučkové [24]. Morfologie kolonií byla hodnocena podle obrázku 9. Růst sledovaných kmenů bakterií byl pozorován na živné půdě PCA. Vzhledem k tomu, že makroskopické znaky kolonií jsou do značné míry ovlivněny stářím kultury, byly u všech kmenů hodnoceny ve stejný den po 24 hodinové kultivaci. U kolonií bylo pozorování zaměřeno na jejich velikost (průměr), barvu, povrch, profil a okraj.



Obr. 9: Tvary bakteriálních kolonií [24]

Mikroskopické morfologické znaky byly hodnoceny u preparátů fixovaných teplem a barvených diagnostickým barvením podle Grama [24]. Pozorování bylo zaměřeno především na typ buněčné stěny podle Grama, tvar buňky, její velikost a charakteristická uspořádání buněk.

Z biochemických identifikačních testů byl použit OXItest a test k důkazu produkce katalasy. OXItest slouží pro detekci enzymu cytochromoxidasy. V přítomnosti tohoto enzymu dochází k barevné reakci N,N-dimethyl-1,4-fenyldiaminem s α -naftolem za vzniku indofenolové modři. K důkazu enzymu katalasy byl použit 3% roztok peroxidu vodíku, který je tímto enzymem rozkládán za tvorby bublinek. K biochemickým testům byly opět použity 24 hodinové kultury [24].

Na základě výsledků těchto základních identifikačních metod byly vybrány kmeny, u nichž byl následně proveden ENTEROtest 16. ENTEROtest 16 umožňuje provedení 16ti

biochemických testů (produkce sirovodíku H₂S, dekarboxylace lysinu LYS, produkce indolu IND, dekarboxylace ornithinu ORN, rozklad močoviny URE, deaminace fenylalaninu PHE, hydrolyza eskulinu ESC, utilizace citrátu SCI, utilizace malonátu MAL, produkce kyseliny z inozitolu INO, adonitu ADO, celobiosy CEL, sacharosy SUC, sorbitolu SOR, trehalosy TRE, manitou MAN), které slouží k přesnější identifikaci gramnegativních fermentujících tyčinek. Postup spočívá v přípravě inokula z 24 hodinové kultury suspendované ve 3 ml fyziologického roztoku tak, aby homogenní suspenze odpovídala 1. stupni McFarlandovy zákalové stupnice. Suspenze byla tímto způsobem připravena pro každý z vybraných kmenů bakterií a poté postupně pipetována po 0,1 ml do 16ti jamek ENTEROtestu. Jamky pro testy sirovodík, lysin, indol, ornithin a ureasa byly převrstveny dvěma kapkami sterilního parafinového oleje. Zaočkovaná mikrotitrační destička byla překryta krycí fólií, vsunuta do sterilního polyetylenového sáčku a kultivována při 37 °C 24 hodin. Po kultivaci byly zakápnuty jamky s testem pro produkci indolu činidlem pro indol a jamky s testem pro deaminaci fenylalaninu činidlem pro fenylalanin. Poté byly vyhodnoceny barevné změny ENTEROtestu pomocí klíče a provedena identifikace zadáním výsledků do softwarového programu TNW.

5.3 Detekce biogenních aminů kultivační metodou

Kmeny izolovaných bakterií byly nejprve jednotlivě zaočkovány v aseptickém prostředí do zkumavek se 3 ml sterilního masopeptonového bujónu. Zaočkované zkumavky byly kultivovány při 30 °C po dobu 24 hodin.

Dekarboxylasová aktivita byla pozorována na mikrotitračních destičkách s živnou půdou obsahující příslušnou aminokyselinu (ornithin, lysin, arginin, tyrosin, histidin, tryptofan). Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 150 µl připraveného média s danou AMK a 5 µl 24 hodinové suspenze daného bakteriálního kmenu v MPB. Mikrotitrační destičky byly uspořádány tak, aby byl každý kmen zaočkován vždy ve dvou jamkách pro všechny použité aminokyseliny. Jako kontrola sloužily živné půdy (pro každou AMK) bez zaočkování bakteriemi. Mikrotitrační destičky byly překryty sterilním víčkem, vloženy do polyetylenového sáčku a kultivovány v termostatu při 30 °C po dobu 48 h. Po kultivaci bylo zapsáno, zda došlo k barevné změně média či nikoliv. Dekarboxylací AMK dochází k alkalizaci média a změně barvy média ze žluté na fialovou.

Příprava bujónu a kultivační půdy s pH indikátorem:

MPB – Masopeptonový bujón

Neselektivní tekutá živná půda.

Příprava:

Masový výtazek (HiMedia).....	3,0 g
Pepton (HiMedia)	5,0 g
NaCl (LachNer).....	3,0 g
Destilovaná H ₂ O	1000,0 ml

Konečné pH 6,8 – 7,0

Připravený bujón byl rozlit do zkumavek po 3 ml a po uzavření byly zkumavky sterilovány v autoklávu.

Kultivační půda pro detekci BA s pH indikátorem

Příprava:

Pepton (HiMedia)	0,5 g
Yeast extrakt (HiMedia)	0,3 g
Bromkresol purpur (Sigma Aldrich) 0,2 % v 50 % alkoholu	1 ml
Příslušná aminokyselina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)	0,75 g
Destilovaná H ₂ O	150 ml

Konečné pH 5 – 5,3

Nejprve bylo připraveno médium bez aminokyseliny a indikátoru pH (roztok bromkresolové červeně). Toto médium bylo rozděleno na šest stejných dílů, do nichž byla poté přidána příslušná aminokyselina (ornithin, lysin, arginin, tyrosin, histidin, tryptofan). Před přidáním roztoku indikátoru pH bylo médium upraveno na požadované pH. Takto připravené dekarboxylační médium bylo následně sterilováno v autoklávu.

5.4 Detekce a kvantifikace biogenních aminů chromatograficky

Při stanovení tvorby biogenních aminů u kmenů izolovanými z mléka a fermentovaných mléčných výrobků bylo postupováno podle metodiky uvedené v diplomové práci Michaely Hlobilové a metodiky používané k detekci BA na ústavu technologie a mikrobiologie potravin [25,26]. K vlastnímu stanovení bylo využito iontově výměnné chromatografie na automatickém analyzátoru aminokyselin se spektrofotometrickou detekcí po reakci s ninhydrinem.

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

Z mléka a mléčných výrobků bylo izolováno celkem 99 kmenů bakterií, u nichž byla provedena základní charakterizace. Dekarboxylasová aktivita izolovaných kmenů byla nejprve stanovována skrínigovou kultivační metodou na mikrotitračních destičkách s půdou obsahující aminokyseliny arginin, histidin, lysin, ornithin, tryptofan a tyrosin a pH indikátor bromkresolová červeň. Tato metoda ovšem není příliš přesná a vykazuje značné množství falešně pozitivních výsledků [26]. Z tohoto důvodu poté byla provedena detekce biogenních aminů pomocí iontově výměnné chromatografie na analyzátoru aminokyselin AAA400.

6.1 Základní znaky izolovaných bakterií

Jak je uvedeno v části 5.1.1, bakterie byly izolovány ze vzorku sýrů Eidam, uzený Eidam, Krolewnski sýr, Královský sýr, tavený sýr, Jadel a syrového nepasterovaného mléka.

6.1.1 Makroskopické znaky

Z makroskopických znaků byla hodnocena velikost, barva, povrch, profil a okraj pozorovaných kolonií (Tab. 2). Průměrná velikost kolonií byla cca 3,4 mm, výjimku tvořily kolonie kmenů 14 a 87, které se vyznačovaly plazivým růstem. Převážná část všech izolovaných bakterií byla zbarvena v různě intenzivních odstínech mléčně bílé barvy, v menším množství se pak vyskytovaly bakterie tvořící kolonie v odstínech žluté a jen ojediněle se vyskytovaly bakterie tvořící oranžové pigmenty. Téměř 64 % všech izolovaných bakterií mělo hladký povrch. Bakterie se suchým (matným) povrchem byly nejvíce zastoupeny u vzorku Královského sýru, naopak u vzorku uzeného Eidamu byly pozorovány pouze kolonie s hladkým povrchem. Nejčastěji pozorovaný profil kolonií byl plochý, který se vyskytoval u 88 % všech kolonií. Polovina pozorovaných kolonií měla hladký okraj, v menší míře se pak vyskytoval okraj vlnitý, zvráštělý, vroubkovaný, laločnatý a zubatý.

Tab. 2: Makroskopické morfologické znaky izolovaných kmenů bakterií

Č. kmenu	Původ	Makroskopické morfologické znaky kolonií				
		Velikost [mm]	Barva	Povrch	Profil	Okraj
1	Eidam	4	mléčná	suchý	plochý	vroubkovaný
2		5	mléčná	suchý	plochý	vlnitý
3		4	mléčná	suchý	plochý	hladký
4		5	mléčná	hladký	plochý	hladký
5		4	mléčná	hladký	plochý	hladký
6		3	mléčná	hladký	plochý	hladký
7		5	mléčně bílá	hladký	plochý	hladký
8		6	mléčně bílá	hladký	pupkovitý	vlnitý
9		3	průhledně mléčná	hladký	plochý	hladký
10		3	průhledně mléčná	hladký	plochý	hladký
11		3	průhledně mléčná	hladký	plochý	hladký
12		6	mléčně bílá	hladký	vypouklý	vlnitý
13		3	průhledně mléčná	suchý	plochý	vroubkovaný
14		16	žlutě mléčná	suchý	plochý	laločnatý
15		4	průhledně mléčná	suchý	plochý	hladký
16		4	průhledně mléčná	suchý	plochý	hladký
17		4	průhledně mléčná	suchý	plochý	hladký
18		7	mléčně bílá	hladký	knoflíkovitý	hladký
19		2	průhledně mléčná	suchý	plochý	vroubkovaný
20		3	bílá	hladký	plochý	vlnitý
21		1	bílá	hladký	plochý	hladký
22		1	bílá	hladký	plochý	hladký
23	uzený Eidam	4	mléčně bílá	hladký	plochý	hladký
24		4	mléčně bílá	hladký	plochý	hladký
25		4	mléčně bílá	hladký	plochý	hladký
26		5	mléčně bílá	hladký	plochý	vlnitý
27		1	oranžově-žlutá	hladký	vypouklý	hladký
28		3	mléčně bílá	hladký	plochý	hladký
29		3	mléčně bílá	hladký	plochý	hladký
30		4	žlutě mléčná	hladký	plochý	hladký
31	Krolewski sýr	1	průhledně mléčná	hladký	vypouklý	hladký
32		2	žlutá	hladký	vypouklý	hladký
33		3	žlutá	hladký	plochý	hladký
34		1	žlutá	hladký	zvýšený	hladký
35		1	žlutá	hladký	zvýšený	hladký
36		3	průhledně mléčná	suchý	plochý	zvráštělý
37		3	průhledně mléčná	suchý	plochý	zvráštělý
38		4	průhledně mléčná	suchý	plochý	zvráštělý
39		4	průhledně mléčná	suchý	plochý	zvráštělý
40	Královský sýr	3	žlutě mléčná	suchý	plochý	zubatý
41		3	žlutě mléčná	suchý	plochý	zubatý
42		2	průhledně mléčná	suchý	plochý	vlnitý
43		5	žlutě mléčná	suchý	plochý	vlnitý
44		2	průhledně mléčná	suchý	plochý	vlnitý
45		6	žlutě mléčná	suchý	plochý	vlnitý
46		6	žlutě mléčná	suchý	plochý	vlnitý
47		7	žlutě mléčná	suchý	plochý	hladký
48		3	průhledně mléčná	hladký	plochý	vlnitý

Pokračování Tab. 2

Č. kmenu	Původ	Makroskopické morfologické znaky kolonií					
		Velkost [mm]	Barva	Povrch	Profil	Okraj	
71	tavený sýr	3	žlutě mléčná	hladký	plochý	zvráštělý	
72		1	žlutě mléčná	hladký	plochý	hladký	
73		5	žlutě mléčná	hladký	zvýšený	zvráštělý	
74		3	žlutě mléčná	hladký	plochý	zubatý	
75		7	mléčná	suchý	plochý	laločnatý	
76		4	žlutě mléčná	hladký	plochý	zubatý	
77	sýr Jadel	2	průhledně mléčná	hladký	plochý	hladký	
78		1	průhledně mléčná	hladký	plochý	hladký	
80		1	průhledně mléčná	hladký	plochý	hladký	
81		0,5	žlutě mléčná	hladký	plochý	hladký	
82		2	žlutá	hladký	plochý	hladký	
83		2	žlutá	suchý	plochý	zubatý	
84		3	žlutě mléčná	hladký	plochý	hladký	
85		3	žlutá	suchý	plochý	zvráštělý	
86		3	krémově oranžová	suchý	plochý	hladký	
87		8	žlutě mléčná	hladký	vypouklý	vroubkovaný	
88		4	žlutá	hladký	plochý	zvráštělý	
89		4	žlutá	hladký	plochý	zvráštělý	
90		4	žlutá	hladký	plochý	zvráštělý	
91		7	průhledně mléčná	suchý	plochý	laločnatý	
92		4	průhledně mléčná	suchý	plochý	zvráštělý	
93		4	průhledně mléčná	suchý	plochý	laločnatý	
94		4	průhledně mléčná	suchý	plochý	laločnatý	
95		3	mléčná	hladký	plochý	zubatý	
96		5	mléčná	hladký	knoflíkovitý	zubatý	
97		4	mléčná	hladký	vypouklý	hladký	
98		4	mléčná	hladký	plochý	laločnatý	
99		5	průhledně mléčná	hladký	plochý	laločnatý	
101		6	žlutě mléčná	suchý	plochý	laločnatý	
102		3	průhledně mléčná	suchý	plochý	vroubkovaný	
103		4	průhledně mléčná	hladký	plochý	zubatý	
104		4	průhledně mléčná	hladký	plochý	zubatý	
140		sýrové mléko	0,5	mléčně bílá	suchý	plochý	hladký
141			0,5	mléčně bílá	suchý	plochý	hladký
142	0,5		mléčně bílá	suchý	plochý	hladký	
143	1		mléčně bílá	suchý	plochý	hladký	
144	2		krémově žlutá	hladký	plochý	hladký	
145	2		mléčně bílá	hladký	plochý	hladký	
146	0,5		mléčně bílá	hladký	plochý	hladký	
147	0,5		bílá	hladký	plochý	hladký	
148	1		krémově žlutá	hladký	plochý	hladký	
149	2		žlutě mléčná	hladký	plochý	vroubkovaný	
150	3		žlutě mléčná	hladký	plochý	vroubkovaný	
151	3		žlutá	hladký	plochý	hladký	
152	2,5		žlutá	hladký	plochý	vroubkovaný	
153	3		krémově žlutá	hladký	plochý	hladký	
154	2		mléčně bílá	hladký	plochý	hladký	
155	2,5		krémově žlutá	hladký	plochý	vroubkovaný	
156	3	žlutá	hladký	plochý	vroubkovaný		

6.1.2 Mikroskopické znaky

Základním mikroskopickým znakem bakterií je tvar buňky. U izolovaných kmenů byly koky zastoupeny z 39 % a tyčinky 59 % (38 % tyčinek tvořily kokotyčinky) (Tab. 3). Zbylé 2 % tvořily mikroorganismy vyskytující se u vzorku syrového mléka, které svými mikroskopickými znaky neodpovídaly bakteriálním buňkám. Jednalo se o kmeny 143 a 155.

Jedním z nejdůležitějších identifikačních znaků je typ buňky (resp. buněčné stěny) barvené podle Grama, na jehož základě se bakterie dělí na grampozitivní a gramnegativní, případně gramlabilní. Rozdělení bakterií podle Grama je založeno na barvitelnosti jejich buněk barvivou krystalovou violetí a safraninem. V prostředí se hojně vyskytují bakterie s buněčnou stěnou gramnegativního typu náležící do kmene *Proteobacteria* (např. pseudomonády, enterobakterie, meningokoky a další). Gramnegativní bakterie mají buněčnou stěnu složenou z vnější třívrstevné membrány (proteiny, lipopolysacharidy, lipoproteiny) a vnitřní tenké a pevné peptidoglykanové vrstvy. Buněčná stěna grampozitivních bakterií, patřících do kmene *Firmicutes*, obsahuje silnou vrstvu peptidoglykenu (mureinové struktury a kyselina teichoová). Do této skupiny patří např. bacily rodu *Clostridium* a *Bacillus*, laktobacily a většina koků [20,33]. U některých bakterií je Gramova reakce závislá na fyziologickém stavu buňky a na složení kultivačního prostředí. Tyto organismy jsou označovány jako gramlabilní nebo také gramvariabilní [24]. V mlékárenském průmyslu jsou jako čisté mlékařské kultury využívány grampozitivní bakteriální kmeny. Z kmenů studovaných v této práci tvořily grampozitivní bakterie 68 % a gramnegativní bakterie 32 %. Bylo zjištěno, že s výjimkou kmenů 29, 95 a 98 byly všechny bakterie tvaru koků grampozitivní (Tab. 3).

Ze vzorku sýru Eidam bylo izolováno celkem 22 kmenů, z nichž 9 kmenů tvořily grampozitivní koky, 4 kmeny byly identifikovány jako grampozitivní tyčinky a 9 kmenů jako gramnegativní tyčinky. U vzorku uzeného Eidamu byly zastoupeny pouze bakterie tvaru koků a až na jeden kmen byly všechny určeny jako grampozitivní. Také kmeny izolované ze vzorku sýru Krolewski byly grampozitivní. Zastoupení koků a tyčinek však bylo rozlišné od předchozího vzorku, z 9ti izolovaných kmenů byly pouze dva tvaru koků a zbylých 7 kmenů bylo tvaru kokotyčinek. Grampozitivní bakterie byly izolovány i ze vzorku Královského sýru, zde tvořily grampozitivní kokotyčinky 44 % a grampozitivní koky 56 %.

Ze vzorku taveného sýru bylo izolováno 6 kmenů bakterií tvaru tyčinek, z toho 5 kmenů bylo identifikováno jako grampozitivní a pouze jeden kmen byl gramnegativní. U vzorku sýru Jadel bylo 77 % izolovaných bakterií tvaru tyčinek (případně kokotyčinek), z nichž 31 % tvořily grampozitivní a 46 % gramnegativní tyčinky. Koky byly zastoupeny u vzorku sýru Jadel z 23 %, z nichž 15 % byly grampozitivní a 8 % gramnegativní koky. Ze vzorku syrového mléka tvořily grampozitivní koky (často velmi drobné) 47 % izolovaných kmenů, 41 % tvořily bakterie tvaru tyčinek, u nichž byly grampozitivní bakterie zastoupeny z 6 % a gramnegativní z 35 %. Zbýlých 12 % představovaly mikroorganismy vykazující pozitivní reakci Gramova barvení, ale svou velikostí a tvarem neodpovídaly bakteriální buňce. Tyto mikroorganismy byly specifické tvorbou shluků a obalů kolem jednotlivých buněk. Slovně zhodnocená velikost bakteriálních buněk jednotlivých kmenů pozorovaných pod mikroskopem a případná tvorba specifických seskupení byla zaznamenána v Tab. 3.

6.1.3 Biochemické znaky

Biochemické znaky bakterií byly posuzovány u 97 kmenů izolovaných z výše uvedených vzorků pomocí důkazu enzymu katalasy a cytochromoxidasy (Tab. 3). Enzym katalasa tvořený některými startovacími kulturami rozkládá nežádoucí peroxidy. Tyto nežádoucí peroxidy jsou často produkovány kontaminující florou a do značné míry se podílejí na stupni oxidace (žluknutí) tuků obsažených v potravě [28]. Pozitivní test na tvorbu katalasy vykazovalo 73 % izolovaných bakterií, zbylých 27 % bylo negativních na tvorbu katalasy. Enzym cytochromoxidasa podílející se na oxidativních procesech v buňce byl prokazován pomocí OXItestu. Tento test se využívá především k diferenciaci druhů rodů *Flavobacterium*, *Alcaligenes* a *Pseudomonas*. Negativní reakce na cytochromoxidasu je například u koliformních bakterií patřících mezi gramnegativní tyčinky [24,29]. Pozitivní výsledek OXItestu byl zaznamenán pouze u dvou z 97 testovaných kmenů.

Na základě těchto výsledků a výsledků Gramova barvení byl proveden ENTEROtest u kmenů 4, 5, 7, 8, 12 (Eidam), 29 (uzený Eidam), 71 (tavený sýr), 91 – 99 (Jadel). U testovaných kmenů bylo potvrzeno zařazení do čeledi *Enterobacteriaceae*. Do čeledi *Enterobacteriaceae* se řadí gramnegativní tyčinky, které jsou příbuzné geneticky a svým metabolismem. Jedná se o fakultativně anaerobní bakterie schopné fermentace glukosy za vzniku plynu a redukují nitráty. Až na výjimky (rod *Shigella* a *Klebsiella*) se jedná

o pohyblivé bakterie mající bičíky a různé druhy fimbrií. Nejvýznamnějšími rody této čeledi jsou rod *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Shigella* a *Salmonella* [30]. Bakterie se schopností zkvašovat laktosu, patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*, se nazývají koliformní bakterie. Všeobecně jsou za koliformní bakterie považovány rody *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* a další [29].

Tab. 3: Mikroskopické morfologické znaky a základní biochemická charakteristika izolovaných kmenů bakterií

Č. kmenu	Původ	Mikroskopické morfologické znaky			Biochemické testy	
		Tvar buňky	Typ podle Grama	Další charakteristika	Katalasa	Oxidasa
1	Eidam	Tyčinky	G -	krátké řetízky	+	-
2		Tyčinky	G -		+	-
3		Tyčinky	G -	diplobakterie	+	-
4		Kokotyčinky	G -		+	-
5		Kokotyčinky	G -	drobné buňky	+	-
6		Tyčinky	G -		+	-
7		Tyčinky	G -		+	-
8		Tyčinky	G -		+	-
9		Koky	G +		-	-
10		Kokotyčinky	G +		-	-
11		Koky	G +		-	-
12		Tyčinky	G -		+	-
13		Koky	G +	diplokoky	-	-
14		Tyčinky	G +	větší, dlouhé buňky	+	-
15		Koky	G +	hroznovité seskupení	-	-
16		Koky	G +		-	-
17		Koky	G +		-	-
18		Tyčinky	G +	dlouhé řetízky	+	-
19		Kokotyčinky	G +		-	-
20		Koky	G +	větší buňky	+	-
21		Koky	G +	drobné	+	-
22		Koky	G +	drobné	+	-
77	sýr Jadel	Kokotyčinky	G +	drobné	+	-
78		Kokotyčinky	G +	velmi malé	-	-
80		Kokotyčinky	G +	drobné	-	-
81		Koky	G +	tetrakoky	+	-
82		Koky	G +	velmi malé	+	-
83		Kokotyčinky	G +	velmi malé	+	-
84		Kokotyčinky	G +		+	-
85		Koky	G +		+	-
86		Kokotyčinky	G +		+	-
87		Tyčinky	G -	krátké, tenké	+	+
88		Tyčinky	G +	drobné	-	-
89		Kokotyčinky	G +	drobné	+	-
90		Koky	G +	velmi malé	+	-
91		Kokotyčinky	G -	velmi malé	+	-
92		Kokotyčinky	G -	velmi malé	+	-
93		Kokotyčinky	G -	drobné	+	-
94		Kokotyčinky	G -	drobné	+	-
95		Koky	G -		+	-
96		Tyčinky	G -	krátké	+	-
97		Kokotyčinky	G -		+	-
98		Koky	G -	drobné	+	-
99		Kokotyčinky	G -	drobné	+	-
101		Tyčinky	G -	dlouhé, štíhlé buňky, řetízky	+	-
102		Kokotyčinky	G -	drobné	+	-
103		Kokotyčinky	G -	drobné	+	-
104		Kokotyčinky	G -	drobné	+	-

Pokračování Tab. 3

Č. kmenu	Původ	Mikroskopické morfologické znaky			Biochemické testy	
		Tvar buňky	Typ podle Grama	Další charakteristika	Katalasa	Oxidasa
23	uzený Eidam	Koky	G +	větší	+	-
24		Koky	G +	větší	+	-
25		Koky	G +	větší	+	-
26		Koky	G +	tetrakoky	+	-
27		Koky	G +	hroznovité seskupení	+	-
28		Koky	G +		+	-
29		Koky	G -		+	-
30		Koky	G +		+	-
31		Krolewski sýr	Kokotyčinky	G +		-
32	Kokotyčinky		G +		-	-
33	Koky		G +		+	-
34	Kokotyčinky		G +	drobné	+	-
35	Kokotyčinky		G +	drobné	-	-
36	Kokotyčinky		G +		-	-
37	Kokotyčinky		G +	drobné	-	-
38	Koky		G +		+	-
39	Kokotyčinky		G +	drobné	-	-
40	sýr Královský	Koky	G +	hroznovité seskupení	+	-
41		Koky	G +		+	-
42		Kokotyčinky	G +	velmi malé	-	-
43		Koky	G +		+	-
44		Kokotyčinky	G +	drobné	-	-
45		Koky	G +	drobné	+	-
46		Koky	G +	velmi malé	-	-
47		Kokotyčinky	G +		+	-
48		Kokotyčinky	G +	drobné	-	-
71	tavený sýr	Kokotyčinky	G -	drobné	+	-
72		Tyčinky	G +	krátké buňky, řetízky	+	-
73		Tyčinky	G +	delší štíhlé buňky	+	-
74		Tyčinky	G +	delší štíhlé buňky	+	-
75		Tyčinky	G +	delší štíhlé buňky, řetízky	+	-
76		Kokotyčinky	G +		+	-
140	syrové mléko	Koky	G+	velmi malé	-	-
141		Koky	G+	velmi malé	-	-
142		Koky	G+	velmi malé	-	-
143		Nepřavidelné oválné velké buňky	G+	tvorba slizů	+	-
144		Kokotyčinky	G-	drobné	+	+
145		Koky	G+	velké, citronovitého tvaru	+	-
146		Koky	G+	velmi malé	-	-
147		Koky	G+	drobné buňky, řetízky	-	-
148		Koky	G+	drobné	+	-
149		Kokotyčinky	G+	drobné	+	-
150		Kokotyčinky	G-		+	-
151		Tyčinky	G-	drobné, tenké	+	-
152		Tyčinky	G-	drobné, tenké	+	-
153		Kokotyčinky	G-	drobné	+	-
154		Koky	G+	velké, tvorba pouzder	+	-
155		Nepřavidelné oválné velké buňky	G+	tvorba slizů	+	-
156		Tyčinky	G-	delší, tenké	+	-

6.2 Detekce biogenních aminů u testovaných bakterií kultivační metodou

Tvorba biogenních aminů byla nejprve detekována na mikrotitračních destičkách pomocí skriningové metody s kultivačním médiem obsahujícím aminokyseliny arginin, histidin, lysin, ornithin, tryptofan a tyrosin. Jako indikátor tvorby biogenních aminů z příslušných AMK byl použit roztok bromkresolové červeně tvořící v alkalickém pH fialové zbarvení.

Kultivační metoda pro zjištění produkce BA byla provedena u všech 99 izolovaných kmenů. Produkce BA byla touto metodou prokázána u 75 izolovaných kmenů (Tab.4). Dekarboxylace histidinu byla stanovena pouze u čtyř kmenů, a to u kmenů 96, 97, 99 a 104 získaných ze vzorku sýru Jadel. Dekarboxylace argininu byla pozitivní u 76 % izolovaných kmenů. Převážná část výsledků negativních na dekarboxylaci argininu byla tvořena bakteriemi izolovanými ze syrového mléka. Dekarboxylace aminokyseliny ornithinu byla zaznamenána u 36 % všech izolovaných kmenů, z nichž 18 % bylo získáno ze vzorku sýru Jadel, 10 % ze vzorku Eidamu a zbylých 8 % byly bakterie taveného sýru, Královského sýru a sýru Krolewski vždy v zastoupení po 2 %. U bakterií syrového mléka nebyla dekarboxylace ornithinu detekována.

Dekarboxylace aminokyseliny lysinu byla zjištěna u 24 % izolovaných kmenů. Nejvyšší zastoupení pozitivních výsledků bylo stanoveno u vzorku Eidamu (11 %) a Jadelu (9 %), v menší míře pak u vzorku uzeného Eidamu (3 %) a sýru Krolewski (1 %). U zbylých vzorků nebyla dekarboxylace lysinu prokázána. Schopnost dekarboxylace tryptofanu byla pozorována pouze u pěti kmenů, z nichž 3 byly izolovány ze sýru Jadel, jeden ze sýru Eidam a jeden z taveného sýru. Kultivační metodou byla zjištěna také dekarboxylace tyrosinu, a to u 39 % testovaných bakterií. Nejvíce pozitivních výsledků bylo u skupiny kmenů izolovaných ze vzorku Eidamu, kde stanovení přítomnosti biogenního aminu odpovídalo 18 % (ze všech testovaných kmenů). V menší míře se pak schopnost dekarboxylace tyrosinu vyskytovala u bakterií izolovaných ze sýru Jadel (8 %), uzeného Eidamu (5 %), sýru Krolewski (4 %), Královského sýru (3 %) a taveného sýru (1 %). U bakterií izolovaných ze syrového mléka opět nebyla tvorba tohoto biogenního aminu zaznamenána.

Při srovnání výsledků detekce BA kultivační metodou pro jednotlivé vzorky sýrů bylo zaznamenáno nejvíce pozitivních testů (z počtu všech testů provedených na dekarboxylaci

aminokyselin u daného vzorku) u kmenů izolovaných Eidamu (47 %), dále pak u kmenů získaných ze sýru Jadel (41 %), uzeného Eidamu (35 %), sýru Krolewski (30 %), Královského sýru (26 %), taveného sýru (19 %) a nejméně pozitivních testů bylo zjištěno u kmenů izolovaných ze syrového mléka (1 %).

Využitím skrínigové kultivační metody k prvotní indikaci dekarboxylasové aktivity bakterií se zabývá například diplomová práce Hlobilové [25] a autoři Buňková a kol. [26]. Tyto studie jsou zaměřeny na dekarboxylasovou aktivitu některých kmenů bakterií mléčného kvašení využívaných jako startovací kultury. V těchto pracech, podobně jako ve studii autorů Roig-Sagués a kol. [16], je mimo jiné řešen výskyt falešně pozitivních nebo falešně negativních výsledků u kvalitativní kultivační metody využívané pro stanovení dekarboxylace aminokyselin. Falešně pozitivní výsledky byly popsány jako důsledek vzniku jiných alkalických sloučenin než biogenních aminů vlivem proteolytické činnosti bakterií. Falešně negativní výsledky pak mohou vznikat vlivem fermentace sacharidů, čímž dochází ke snížení pH média.

6.3 Detekce a kvantifikace biogenních aminů chromatograficky

Jak již bylo řečeno, výsledky kultivační metody se často liší od výsledků přesnějších metod stanovení biogenních aminů, jako je například kapilární elektroforéza, spektrofotometrické metody nebo chromatografické metody, kam lze zařadit i iontově výměnnou chromatografii, která byla pro detekci biogenních aminů využita v této práci [16,25,26]. Chromatografickou metodou jsou již stanovovány jednotlivé biogenní aminy (histamin, fenylethylamin, tyramin, putrescin, kadaverin, agmatin, spermidin, spermin) a také to, v jakém množství jsou bakteriemi tvořeny. Testované kmeny bakterií jsou zde kultivovány v živné půdě obsahující potřebné aminokyseliny, není zde však již přítomen žádný indikátor pH. Prokázání tvorby biogenního aminu je zajištěno na konci procesu iontově výměnné chromatografie detekcí ninhydrinovým činidlem.

U žádného z kmenů izolovaných z mléka a fermentovaných mléčných výrobků nebyla detekována produkce agmatinu, spermidinu, sperminu a tyraminu. Tvorba ostatních stanovovaných biogenních aminů (histaminu, fenylethylaminu, putrescinu a kadaverinu) byla chromatografickou metodou prokázána pouze u 32 kmenů z 99 testovaných (Tab. 4). Dekarboxylasová aktivita, respektive produkce biogenních aminů, nebyla zjištěna u bakterií izolovaných ze vzorku uzeného sýru a syrového mléka. Nejčastěji detekovaným

biogenním aminem byl putrescin, který byl produkován 31 kmeny a kadaverin produkován 28 kmeny. Ojediněle pak byla zaznamenána tvorba histaminu produkovaného třemi bakteriálními kmeny a fenylethylaminu, jehož produkce byla zaznamenána pouze u kmenu jednoho.

Fenylethylamin byl produkován kmenem 72 izolovaným z taveného sýru v poměrně nízkém množství $1,2 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ kultivačního média. Histamin byl pomocí IEC stanoven u kmenů 96, 97, 98 izolovaných ze sýru Jadel. Nejvyšší hodnoty histaminu byly zjištěny u kmenu 96, kde bylo stanoveno množství $108,7 \pm 1,2 \text{ mg.l}^{-1}$. U ostatních dvou kmenů pak byly hodnoty nižší, a to $47,8 \pm 1,9 \text{ mg.l}^{-1}$ u kmene 97, respektive $0,7 \pm 0,0 \text{ mg.l}^{-1}$ u kmene 98.

Produkce kadaverinu byla zaznamenána nejčastěji u bakterií získaných ze vzorku sýru Jadel (15 kmenů z 28 testovaných) a sýru Eidam (12 kmenů z 22 testovaných). V nízkém množství $1,5 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ kultivačního média byl zjištěn výskyt kadaverinu u kmenu 43 izolovaného ze vzorku Královského sýru. U bakterií izolovaných ze sýru Eidam byly naměřeny hodnoty kadaverinu v rozmezí $2,4 - 30,8 \text{ mg.l}^{-1}$ kultivačního média. Nejvyšší hodnoty tohoto rozmezí byly naměřeny u kmenů 7, 6, 2, a 10. Naměřené hodnoty tvorby kadaverinu u kmenů izolovaných ze sýru Jadel se převážně pohybovaly v rozmezí $0,5 - 7,5 \text{ mg.l}^{-1}$ kultivačního média. Z tohoto rozmezí výrazněji vybočila produkce kadaverinu kmenem 99, kde byla naměřena hodnota $25,4 \pm 0,3 \text{ mg.l}^{-1}$ a kmenem 101, kde byla zaznamenána hodnota kadaverinu $491,4 \pm 15,6 \text{ mg.l}^{-1}$ kultivačního média.

Nejnižší tvorbu putrescinu vykazoval kmen 31 získaný ze sýru Krolewski, kde byla naměřena hodnota $0,7 \pm 0,0 \text{ mg.l}^{-1}$. V nízkém množství $2,3 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ kultivačního média byl putrescin stanoven také u kmenu 73 izolovaného z taveného sýru a v množství $10,0 \pm 0,6 \text{ mg.l}^{-1}$ u kmenu 43 izolovaného z Královského sýru. Velmi vysoké hodnoty putrescinu byly naměřeny u některých kmenů (4, 5, 8) izolovaných ze sýru Eidam, kde se pohybovaly v rozmezí $502,8 - 517,8 \text{ mg.l}^{-1}$. O něco nižší, přesto však významné, hodnoty putrescinu pak byly stanoveny u kmenů 9, 10 a 11 (v rozmezí $106,5 - 230,7 \text{ mg.l}^{-1}$) u ostatních kmenů, kde byla detekována tvorba tohoto biogenního aminu, se hodnoty pohybovaly v rozmezí $6,9 - 29,6 \text{ mg.l}^{-1}$. Produkce putrescinu byla také detekována u bakterií izolovaných ze vzorku sýru Jadel. Nejvyšší tvorbu putrescinu vykazoval kmen 87 ($434,0 \pm 12,5 \text{ mg.l}^{-1}$ kultivačního média), dále pak kmen 92 ($369,7 \pm 11,9 \text{ mg.l}^{-1}$), kmen 99 ($144,0 \pm 7,2 \text{ mg.l}^{-1}$) a kmen 94 ($123,4 \pm 5,6 \text{ mg.l}^{-1}$).

Hodnoty produkce putrescinu pro ostatní kmeny sýru Jadel produkující putrescin se pohybovaly v rozmezí 3,1 – 20,9 mg.l⁻¹ kultivačního média.

Tab. 4: Výsledky kultivační a chromatografické metody

Č. kmenu	Původ	Dekarboxylace aminokyseliny/detekce biogenního aminu									
		dH	HIS [mg.l ⁻¹]	dA	dO	PUT [mg.l ⁻¹]	dL	KAD [mg.l ⁻¹]	dTY	dTR	PHE [mg.l ⁻¹]
1	Eidam	-	ND	+	+	16,4±0,1	+	2,1±0,2	+	-	ND
2		-	ND	+	+	17,4±0,7	+	26,8±0,7	+-	-	ND
3		-	ND	+	+	11,7±0,3	+	2,4±0,1	+	-	ND
4		-	ND	+	+	517,8±4,9	+	13,7±0,5	+	-	ND
5		-	ND	+	+	502,8±26,8	+	8,1±0,3	+	-	ND
6		-	ND	+	+	29,6±1,5	+	28,0±0,7	+	+	ND
7		-	ND	+	+	19,3±1,0	+	30,8±0,8	+	-	ND
8		-	ND	+	+	508,8±16,3	+	8,6±0,4	+	-	ND
9		-	ND	+	-	230,7±4,1	-	4,7±0,2	+	-	ND
10		-	ND	+	-	122,0±3,4	-	25,8±0,4	-	-	ND
11		-	ND	+	-	106,5±0,9	-	6,5±0,1	+	-	ND
12		-	ND	+	+	6,9±0,2	+	4,5±0,0	+	-	ND
13		-	ND	+	-	ND	-	ND	+	-	ND
14		-	ND	+	+	ND	+	ND	+	-	ND
15		-	ND	+	-	ND	+-	ND	+	-	ND
16		-	ND	+	-	ND	-	ND	+	-	ND
17		-	ND	+	-	ND	-	ND	+	-	ND
18		-	ND	+	-	ND	-	ND	+	-	ND
19		-	ND	+	-	ND	-	ND	-	-	ND
20		-	ND	+	-	ND	-	ND	+-	-	ND
21		-	ND	+	-	ND	-	ND	-	-	ND
22		-	ND	+	-	ND	-	ND	-	-	ND
23	uzený Eidam	-	ND	+	-	ND	-	ND	-	-	ND
24		-	ND	+	-	ND	+	ND	+	-	ND
25		-	ND	+-	+-	ND	-	ND	+	-	ND
26		-	ND	+-	+-	ND	+	ND	+	-	ND
27		-	ND	+-	-	ND	+-	ND	+	-	ND
28		-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND
29		-	ND	+-	-	ND	-	ND	+	-	ND
30		-	ND	+	-	ND	-	ND	-	-	ND
31	Krolewski sýr	-	ND	+	-	0,7±0,0	-	ND	-	-	ND
32		-	ND	+	-	ND	-	ND	-	-	ND
33		-	ND	+	+	ND	-	ND	+	-	ND
34		-	ND	+	-	ND	-	ND	+	-	ND
35		-	ND	+	+	ND	+	ND	+	-	ND
36		-	ND	+	-	ND	-	ND	-	-	ND
37		-	ND	+	-	ND	-	ND	-	-	ND
38		-	ND	+	-	ND	-	ND	+	-	ND
39		-	ND	+	-	ND	-	ND	-	-	ND
40	Královský sýr	-	ND	+	-	ND	-	ND	+	-	ND
41		-	ND	+	-	ND	-	ND	+	-	ND
42		-	ND	+	-	ND	-	ND	-	-	ND
43		-	ND	+	-	10,0±0,6	-	1,5±0,1	+-	-	ND
44		-	ND	+	-	ND	-	ND	-	-	ND

Pokračování Tab. 4

Č. kmenu	Původ	Decarboxylace aminokyseliny/detekce biogenního aminu									
		dH	HIS [mg.l-1]	dA	dO	PUT [mg.l-1]	dL	KAD [mg.l-1]	dTY	dTR	PHE [mg.l-1]
45	Královský sýr	-	ND	+	-	ND	-	ND	-	-	ND
46		-	ND	+	-	ND	-	ND	-	-	ND
47		-	ND	+	+	ND	-	ND	-	-	ND
48		-	ND	+	+	ND	-	ND	-	-	ND
71	tavený sýr	-	ND	+	-	ND	-	ND	-	+	ND
72		-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	1,2±0,1
73		-	ND	+	+	2,3±0,1	-	ND	+-	-	ND
74		-	ND	+	+-	ND	-	ND	-	-	ND
75		-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND
76		-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND
77	sýr Jadel	-	ND	+	-	ND	-	ND	-	-	ND
78		-	ND	+	-	ND	-	ND	-	-	ND
79		-	ND	+	-	ND	-	ND	-	-	ND
80		-	ND	+	-	3,1±0,1	-	0,5±0,0	-	-	ND
81		-	ND	+	-	ND	-	ND	-	-	ND
82		-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND
83		-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND
84		-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND
85		-	ND	+	-	ND	-	ND	-	-	ND
86		-	ND	+	+	ND	-	ND	-	-	ND
87		-	ND	+	+	434,0±12,5	-	4,1±0,3	+	-	ND
88		-	ND	+	+	7,5±0,4	+-	ND	-	-	ND
89		-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND
90		-	ND	+	+	ND	+-	ND	+	-	ND
91		-	ND	+	+	10,2±0,3	-	4,2±0,1	-	-	ND
92		-	ND	+	+	364,7±11,9	+-	7,5±0,2	+-	-	ND
93		-	ND	+	+	20,9±0,5	-	5,8±0,1	-	-	ND
94		-	ND	+	+	123,4±5,6	+-	4,5±0,2	-	-	ND
95		-	ND	+	+	12,1±0,1	-	4,7±0,0	-	-	ND
96		+	ND	+	+	8,2±0,3	+	4,4±0,1	+	+	ND
97		+	47,8±1,9	+	+	8,7±0,1	+	4,6±0,1	+-	+	ND
98		-	0,7±0,0	+	+	12,3±0,3	-	5,2±0,1	+-	-	ND
99		+-	ND	+	+	144,0±7,2	+	25,4±0,3	+	+	ND
100		-	ND	+-	+	ND	-	ND	-	-	ND
101		-	ND	+	+	10,1±0,3	+-	491,4±15,7	-	-	ND
102		-	ND	+	+	11,8±0,4	-	4,0±0,2	-	-	ND
103		-	ND	+	+	19,6±0,1	-	4,9±0,2	-	-	ND
104		+	ND	+	+	12,6±0,2	+	4,2±0,1	+	-	ND
140	syrové mléko	-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND
141		-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND
142		-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND
143		-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND
144		-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND
145		-	ND	+	-	ND	-	ND	-	-	ND
146		-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND
147		-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND
148		-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND

Pokračování Tab. 4

Č. kmenu	Původ	Dekarboxylace aminokyseliny/detekce biogenního aminu									
		dH	HIS [mg.l ⁻¹]	dA	dO	PUT [mg.l ⁻¹]	dL	KAD [mg.l ⁻¹]	dTY	dTR	PHE [mg.l ⁻¹]
149	syrové mléko	-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND
150		-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND
151		-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND
152		-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND
153		-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND
154		-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND
155		-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND
156		-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	ND

dH, dA, dO, dL, dTY, dTR – dekarboxylace histidinu, argininu, ornithinu, lysinu, tyrosinu, tryptofanu kultivační metodou;

HIS, PUT, KAD, PHE – detekce biogenních aminů (v mg.l⁻¹) histaminu, putrescinu, kadaverinu a fenyletylaminu chromatograficky,

ND – biogenní amin nedetekován

+ - - dekarboxylační reakce v kultivačním médiu slabě pozitivní

Produkce BA kmeny izolovanými z uvedených vzorků nepřekračovala literaturou uváděnou obecnou hranici 1000 mg.kg⁻¹ (amin / potravina), která je považována za zdravotní riziko pro lidský organismus [6].

Kvantitativní metoda iontově výměnné chromatografie byla ke stanovení tvorby BA použita také v diplomové práci Hlobilové [25] a studiích autorů Buňková a kol. [26,34,35]. Zde byla chromatografická metoda použita pro zhodnocení tvorby biogenních aminů u vybraných startérových kultur bakterií mléčného kvašení, non-startérových bakterií mléčného kvašení izolovaných ze sýrů Eidam nebo bakterií izolovaných z povrchu drůbeže. Ve studii bakterií izolovaných ze sýru Eidam [35] byly jako jediní producenti tyraminu, putrescinu a kadaverinu označeny kmeny pocházející z rodu *Lactobacillus*. Stanovením BA v sýrech pomocí chromatografické metody (HPLC) se zabývali také autoři Innocente a kol. [31]. Chromatografická metoda HPLC byla použita také autory Standarová a kol. [17] pro stanovení produkce BA u sýrů z české obchodní sítě. U vzorků sýrů analyzovaných v uvedené studii byly v největší míře zastoupeny biogenní aminy tyramin a putrescin stejně jako v této bakalářské práci nebo i v jiných studiích [35]. Méně pak byla zjištěna produkce kadaverinu a histaminu. Hodnoty tryptaminu, fenyletylaminu, sperminu a spermidinu byly uvedeny jako velmi nízké. Nejvyšší koncentrace BA zde byly stanoveny u bakterií izolovaných ze sýrů s vysokodohřívanou syřeninou a z měkkých zrajících sýrů. Hodnoty pro jednotlivé biogenní aminy zaznamenané ve studii Standarové a kol. jsou

uvedeny v kapitole „Obsah biogenních aminů v sýrech“ (kap. 2.2.1) této bakalářské práce. Autoři Komprda a kol. [32] se zabývali chromatografickým stanovením biogenních aminů v sterilovaném a pasterovaném taveném sýru. Podle této studie byl v analyzovaném taveném sýru nejvíce zastoupen tyramin ($1,3 - 29,3 \text{ mg.kg}^{-1}$), ale z toxikologického hlediska žádný z analyzovaných vzorků nepředstavoval zdravotní riziko.

Produkcí BA bakteriemi izolovanými z masa, fermentovaných salámů a sýrů se zabývali autoři Pircher a kol. [36]. Ve studii Pircher a kol. byly ze vzorků izolovány bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, rodů *Lactobacillus* a *Leuconostoc* a enterokoky. Studie uvádí, že většina bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* byla schopna tvořit kadaverin a putrescin v množství více než 100 mg.l^{-1} kultivačního média. Tyramin byl bakteriemi této čeledi tvořen pouze v nevýznamném množství. Nejčastěji byly v této studii izolovány bakterie druhu *Hafnia alvei* a *Serratia liquefaciens*, u nichž byla ojediněle (1,6 a 6,5 %) zjištěna také produkce histaminu v množství vyšším než 100 mg.l^{-1} . U izolovaných laktobacilů a leukonostoků byla tvorba kadaverinu a putrescinu v množství vyšším než 100 mg.l^{-1} zjištěna pouze u jednoho izolátu (*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*). Produkce histaminu a tyraminu v množství více než 100 mg.l^{-1} byla zjištěna u 3,6 a 19 % izolovaných laktobacilů a leukonostoků. U izolovaných enterokoků pak byla zjištěna produkce BA v množství $100-1000 \text{ mg.l}^{-1}$ kultivačního média pouze u tyraminu, a to u 47,9 % bakterií *Enterococcus faecalis* a 59,7 % bakterií *Enterococcus faecium*. Putrescin, kadaverin a histamin byl enterokoky produkován v množství nižším než 100 mg.l^{-1} .

Produkcí BA bakteriemi izolovanými z jiných potravin (ryb a drůbeže) než sýrů se zabývali také autoři Baixas-Nogueras a kol. [37] (ryby) a Buňková a kol. [34] (drůbež). První uvedená studie uvádí, že nejčastěji byly z čerstvých ryb (štikozubce obecného) Středozemního moře izolovány bakterie rodu *Pseudomonas* a u 20 % bakterií toho rodu byla stanovena produkce putrescinu. Po 6ti týdnech skladování převládaly bakterie *Shewanella putrefaciens* a v tomto období byla stanovena nejsilnější produkce tyraminu a kadaverinu. Pozitivní výsledky na tvorbu BA v této studii nebyly zjištěny u bakterií mléčného kvašení a enterokoků. U 20 % bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* byla zjištěna produkce kadaverinu a některé bakterie této čeledi byly schopny zároveň produkovat také putrescin. Ze vzorků ryb byly v hojném počtu izolovány také mikrokoky a stafylokoky, ale pouze dva izoláty byly pozitivní na dekarboxylaci ornithinu. Druhá studie zabývající se produkcí BA bakteriemi izolovanými z povrchu drůbeže uvádí, že schopnost produkce

alespoň jednoho BA byla zjištěna u 49 kmenů z 98 izolovaných. Žádný z testovaných kmenů neprodukoval histamin, spermin a spermidin. Podobně jako v této bakalářské práci byl i v této studii nejčastěji produkovaným biogenním aminem putrescin (35 z 98 testovaných kmenů). Produkce putrescinu byla převážně stanovena u kmenů gramnegativních bakterií, a to nejčastěji u čeledi *Enterobacteriaceae* (21 kmenů) a rodu *Aeromonas* (11 kmenů). Kadaverin byl produkován 37,5 % všech izolovaných kmenů a u většiny těchto kmenů byla produkce označena jako střední až silná. Schopnost dekarboxylace lysinu byla zaznamenána nejčastěji u kmenů rodu *Serratia* a *Klebsiella* (u rodu *Klebsiella* byla pozorována silná produkce v rozmezí 127,43-140,00 mg.l⁻¹).

ZÁVĚR

Bakalářské práce byla zaměřena na stanovení dekarboxylasové aktivity bakterií izolovaných z mléka a fermentovaných mléčných výrobků (Eidam, uzený Eidam, sýr Krolewski, Královský sýr, tavený sýr, Jadel a syrové nepasterované mléko). Studie byla realizována u 99 izolovaných kmenů, u nichž byla provedena základní charakteristika. K prokázání tvorby biogenních aminů byla použita skriningová kultivační metoda a kvantitativní metoda iontově výměnné chromatografie. Metodou IEC byla zjišťována míra produkce histaminu, fenylethylaminu, tyraminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu.

Na základě výsledků této studie lze konstatovat:

- 68 % izolovaných bakterií bylo grampozitivních a 32 % gramnegativních, 59 % izolovaných kmenů byly tyčinky a bakterie kokovitého tvaru tvořily 39 %, 2 % činily mikroorganismy neodpovídající svojí velikostí bakteriální buňce,
- kultivační metodou byla dekarboxylasová aktivita stanovena u 75 kmenů, nejčastěji byla pozorována dekarboxylace argininu (76 %), v menší míře tyrosinu, ornithinu a lysinu (39 – 24 %) a nejméně byl dekarboxylován histamin a tryptofan (cca 4 %),
- iontově výměnnou chromatografií nebyla prokázána produkce agmatinu, spermidinu, sperminu a tyraminu,
- tvorba alespoň jednoho z dalších stanovovaných BA byla metodou IEC prokázána u 32 kmenů z 99 testovaných,
- nejčastěji byl produkován putrescin (31 kmenů) a kadaverin (28 kmenů), histamin produkovaly pouze 3 kmeny a fenylethylamin 1 kmen,
- nejvyšší hodnoty histaminu ($108,7 \pm 1,2 \text{ mg.l}^{-1}$ kultivačního média) a kadaverinu ($491,4 \pm 15,6 \text{ mg.l}^{-1}$) byly zjištěny u bakterií izolovaných ze sýru Jadel, nejvyšší hodnoty putrescinu (v rozmezí $502,8 - 517,8 \text{ mg.l}^{-1}$ kultivačního média) byly naměřeny u 3 kmenů izolovaných ze sýru Eidam,
- tvorba BA nebyla, s využitím obou metod, prokázána téměř u žádného z kmenů izolovaných ze syrového nepasterovaného mléka,

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SVOBODA, J.: *Organická chemie I.*, 1. vydání, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze., 2005. 292-294 s. ISBN 80-7080-561-7
- [2] VÍCHA, R.: *Aminy* [online]. [cit. 05-02-2011]. Dostupný z WWW: <<http://www.chemie.utb.cz/rvicha/SOC/supportfiles/DOCS/aminy01.doc>>
- [3] *Agro navigátor: Biogenní aminy* [online]. [cit. 27-02-2011]. Dostupný z WWW: <<http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=76472>>
- [4] *Gate2Biotech: Zástupci startovacích kultur mohou tvořit biogenní aminy* [online]. [cit. 27-02-2011]. Dostupný z WWW: <<http://www.gate2biotech.cz/zastupci-startovacich-kultur-mohou-tvorit-biogenni-aminy/>>
- [5] SHALABY, A.R.: *Significance of biogenic amines to food safety and human health*, Food Research International 29, 675-690, 1996. ISSN 0963-9969
- [6] SILLA-SANTOS, M. H.: *Biogenic amines: their importance in foods*, International Journal of Food Microbiology 29, 213-231, 1996. ISSN 0168-1605
- [7] VELÍŠEK, J.: *Chemie potravin 3*, 1. vydání, OSSIS Tábor., 1999. 123-130 s. ISBN 80-902391-5-3
- [8] GÖRNER, F., VALÍK, Ľ.: *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*, 1. vydání, MALÉ CENTRUM Bratislava., 2004. 76-171 s. ISBN 80-967064-9-7
- [9] VODRÁŽKA, Z., ŠÍCHO, V., KRÁLOVÁ, B.: *Potravinářská biochemie*, 2. vydání, SNTL Praha., 1981. 300-301 s.
- [10] LEDVINA, M., STOKLASOVA, A., CERMAN, J.: *Biochemie pro studující medicíny I. díl*, 2. vydání, Karolinum Praha., 2009. 224-225 s. ISBN 978-80-26-46-1416-8
- [11] KUBÁŇ, V., KUBÁŇ, P.: *Analýza potravin*, 1. vydání, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně., 2007. 171-172 s. ISBN 978-80-7375-036-7
- [12] KALACH, P., GLÓRIA, M. B. A.: *Biogenic amines in cheeses, wines, burs and sauerkraut*, in DANDRIFOSSE, G.: *Biological Aspects of Biogenic Amines, Polyamines and Conjugates*, 2009. 267-309 s. ISBN 978-81-7895-249-9
- [13] LÜLLMANN, H., MOHR, K., HEIN, L.: *Barevný atlas farmakologie*, Grada Publishing a.s. Praha., 2007. 372 s. ISBN 978-80-247-1672-5

- [14] FRENČÍK, M., ROVENSKÝ, J., SHOENFELD, Y., MAŤHA, V.: *Imunitní systém – informace pro každého*, 1. vydání, Grada Publishing a.s. Praha., 2005. 236 s. ISBN 80-247-1196-6
- [15] KLABAN, V.: *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*, 1. vydání, Galén Praha., 2005. 142 s. ISBN 80-7262-341-9
- [16] ROIG-SAGUÉS, A. X., RUIZ-CAPILLAS, C., ESPINOSA, D., HERNÁNDEZ, M.: *The decarboxylating bacteria present in foodstuffs and the effect of emerging technologies on their formation*, in DANDRIFOSSE, G.: *Biological Aspects of Biogenic Amines, Polyamines and Conjugates*, 2009. 267-309 s. ISBN 978-81-7895-249-9
- [17] STANDAROVÁ, E., BORKOVCOVÁ, L., VORLOVÁ, L.: *Obsah biogenních aminů v sýrech české obchodní sítě* [online] [cit. 11-03-2011] Dostupný z WWW: <http://www.vetweb.cz/Obsah-biogennich-aminu-v-syrech-z-ceske-obchodni-site__s1496x53853.html>
- [18] VALSAMAKI, K., MICHAELIDA, A., POLYCHRONIADA, A.: *Biogenic amine production in Feta cheese*, Food Chemistry 71, 259-266, 2000. ISSN 0308-8146
- [19] ŠTEGNEROVÁ, H., NÁPRAVNÍKOVÁ, E., STEINHAUSEROVÁ, I., ŠVEC, P.: *Identifikace bakterií mléčného kvašení v mase baleném v podmínkách ochranné atmosféry* [online] [cit. 19-03-2011] Dostupný z WWW: < http://www.vetweb.cz/Identifikace-bakterii-mlecneho-kvaseni-v-mase-balenem-v-podminkach-ochranné-atmosfery__s1496x53017.html>
- [20] SEDLÁČEK, I.: *Taxonomie prokaryot*, 1. vydání, Masarykova univerzita Brno., 2007. ISBN 80-210-4207-9
- [21] ŠILHÁNKOVÁ, L.: *Mikrobiologie pro potravináře*, 1. vydání, SNLT Praha., 1983. 235-239 s.
- [22] *Agro navigátor: Enterokoky a jejich hodnocení v mlékárenské technologii* [online] [cit. 20-03-2011] Dostupný z WWW: < <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=418&ch=13&typ=1&val=17399>>
- [23] SALMINEN, S., VON WRIGHT, A.: *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspect*, 2. vydání, Marcel Dekker New York., 1998. 617 s. ISBN 978-082470133-8

- [24] JANDOVÁ, B., KOTOUČKOVÁ, L.: *Praktikum z mikrobiologie*, Masarykova univerzita Brno, 1996. 67 s. ISBN 80-210-1374-5
- [25] HLOBILOVÁ, M.: *Srovnání metod pro detekci biogenních aminů u bakterií mléčného kvašení*, Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín, 2008.
- [26] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., HLOBILOVÁ, M., DRÁB, V., KRÁČMAR, S.: *Komparace různých metod detekce dekarboxylázové aktivity u bakterií mléčného kvašení*, *Potravinářstvo* 4, 372-380, 2010. ISSN 1337-0960
- [27] ČSN 56 0100 Mikrobiologické zkoušení poživatin předmětů běžného užívání a prostředí potravinářských provozoven, Vydavatelství úřadu pro normalizaci a měření, Praha, 1968.
- [28] ŠPELINA, V.: *Informace vědeckého výboru pro potraviny ve věci: Probiotika a startovací kultury*, [online] [cit. 20-03-2011] Dostupný z WWW: <http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/informace/Info_2006_16_deklas_Probio_SK.pdf>
- [29] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J.: *Encyklopedie hydrobiologie: výkladový slovník*, VŠCHT Praha, 2007. [online] [cit. 30-04-2011] Dostupný z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=A003>
- [30] SCHINDLER, J.: *Mikrobiologie Pro studenty zdravotnických oborů*, 1. vydání, Grada Publishing, a.s. Praha, 2010. 224 s. ISBN 978-80-247-3170-4
- [31] INNOCENTE, N., BIASUTTI, M., PADOVESE, M., MORET, S.: *Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract*, *Food Chemistry* 101, 1285-1289, 2007. ISSN 0308-8146
- [32] KOMPRDA, T., NOVICKÁ, K., KALHOTKA, L., A KOLEKTIV: *Biogenic amine content in sterilised and pasteurised long-term stored processed cheese*, *Czech journal of food science* 23, 209-216, 2005. ISSN 1212-1800
- [33] *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*. [online] [cit. 23-05-2011] Dostupný z WWW: <<http://www.bacterio.cict.fr/index.html>>
- [34] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., KLČOVSKÁ, P., MRKVIČKA, V., DOLEŽALOVÁ, M., KRÁČMAR, S.: *Formation of biogenic amines by gram-negative bacteria isolated from poultry skin*, *Food Chemistry* 121, 203-206, 2010. ISSN 0308-8146

- [35] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., KLČOVSKÁ, G., ČABLOVÁ, A., SEDLÁČEK, I., ŠVEC, P., PACHLOVÁ, V., KRÁČMAR, S.: *The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and kadaverine in Edam-cheese*, Food Microbiology 27, 880-888, 2010. ISSN 0740-0020
- [36] PIRCHER, A., BAUER, F., PAULSEN, P.: *Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses*, European food research and technology 226, 225-231, 2007. ISSN 1438-2377
- [37] BAIXAS-NOGUERAS, S., BOVER-CID, S., VECIANA-NOGUÉS, M.T., VIDAL-CAROU, M.: *Amino acid-decarboxylase activity in bacteria associated with Mediterranean hake spoilage*, European food research and technology 217, 164-167, 2003. ISSN 1438-2377

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ADO	Adonit.
AMK	Aminokyselina.
BA	Biogenní aminy.
BMK	Bakterie mléčného kvašení.
CEL	Celobiosa.
ČSN	Česká státní norma.
dA	Dekarboxylace argininu.
dH	Dekarboxylace histidinu.
dL	Dekarboxylace lysinu.
dO	Dekarboxylace ornithinu.
dTR	Dekarboxylace tryptofanu.
dTY	Dekarboxylace tyrosinu.
ESC	Eskulin.
HIS	Histamin.
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie.
IEC	Iontově výměnná chromatografie.
IND	Indol.
INO	Inozitol.
KAD	Kadaverin.
LYS	Lysin.
MAL	Malonát.
MAN	Manitol.
MPB	Masopeptonový bujón.
ND	Nedetkováno.

ORN	Ornithin.
PCA	Plate Count Agar.
PHE	Fenylalanin.
PHE	Fenylethylamin.
PUT	Putrescin.
SCI	Utilizace citrátu.
SOR	Sorbitol.
SUC	Sacharosa.
TNW	Mikrobiologický identifikační systém.
TRE	Trehalosa.
URE	Močovina.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Chemická struktura vybraných aminů [1]	12
Obr. 2: Chemická struktura rostlinných alkaloidů [1]	12
Obr. 3: Chemická struktura vybraných živočišných alkaloidů [1,2].....	13
Obr. 4: Dekarboxylace diaminokyselin (vznik toxických primárních aminů) [8]	14
Obr. 5: Dekarboxylace aromatických aminokyselin (vznik biogenních aminů) [8]	15
Obr. 6: Hlavní reakce biogenních aminů [7]	16
Obr. 7: Schéma oxidativní deaminace [12]	18
Obr. 8: Štěpení bílkovin z hlediska buňky [8]	27
Obr. 9: Tvary bakteriálních kolonií [24]	35

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Biogenní aminy, jejich prekurzory, produkty transformace a biologický význam [7].....	18
Tab. 2: Makroskopické morfologické znaky izolovaných kmenů bakterií.....	40
Tab. 3: Mikroskopické morfologické znaky a základní biochemická charakteristika izolovaných kmenů bakterií	45
Tab. 4: Výsledky kultivační a chromatografické metody	50