

Izolace mikroorganismů degradujících biogenní aminy z potravin rostlinného původu

Kateřina Swaczynová

Bakalářská práce
2018/2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina Swaczynová**

Osobní číslo: **T16332**

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

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Izolace mikroorganismů degradujících biogenní aminy z potravin rostlinného původu**

Zásady pro vypracování:

1. Charakterizace biogenních aminů, jejich výskyt a význam v potravinách.
2. Mikroorganismy degradující biogenní aminy.
3. Izolace mikroorganismů degradujících biogenní aminy z potravin a nápojů rostlinného původu.
4. Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] KADLEC, P., MELZUCH, K., VOLDŘICH, M.. Přehled tradičních potravinářských výrobních technologií potravin. 1. vyd. Ostrava: Key Publishing, 2012.

[2] GARCÍA-RUIZ, A., GONZÁLEZ-ROMPINELLI, E.M., BARTOLOMÉ, B., MORENO-ARRIBAS, M.V.. Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines. International Journal of Food Microbiology 148: 115-120. 2011.

[3] VELÍŠEK, J. Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009.

[4] Vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect, SciFinder Scholar, Medline aj.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

2. února 2019

Termín odevzdání bakalářské práce:

15. května 2019

Ve Zlíně dne 2. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

Příjmení a jméno:

Obor:

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

.....

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 nevdělečně 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 vzdělávacího 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 výtěžku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výtěžku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá izolací mikroorganismů degradujících biogenní aminy. Skutečnost, že existují kmeny se schopností degradovat biogenní aminy otvírá řadu nových příležitostí, jak snížit jejich koncentraci v potravinách.

V praktické části bakalářské práce bylo izolováno 65 kmenů z různých potravinových matric. Následně se povedlo identifikovat 29 kmenů pomocí metody MALDI-TOF MS (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem). Nakonec byla ověřena jejich degradační schopnost pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí po předcházející derivatizaci dansylchloridem. Nejlepší degradační schopnost vykazovala *Pseudomonas protegens* 6B12. Koncentrace u všech sledovaných biogenních aminů poklesla minimálně o 65 % a nejlépe pak degradovala histamin, který byl snížen až o 89 %.

Klíčová slova: biogenní aminy, izolace, degradace, *Pseudomonas protegens*

ABSTRACT

The bachelor thesis deals with the isolation of microorganisms degrading biogenic amines. The fact that there are strains with the ability to degrade biogenic amines opens up a number of new opportunities to reduce their concentration in food.

In the practical part of the thesis were isolated 65 strains from various food matrices. Subsequently, were identified 29 strains by the MALDI-TOF MS method (matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry). Finally, it was verified their degradation ability, by high performance liquid chromatography with UV detection after previous dansylchloride derivatization. *Pseudomonas protegens* 6B12 showed the best degradation ability. The concentration of all monitored biogenic amines was reduced by at least 65% and the best degraded was histamine, which was reduced up to 89 %.

Keywords: biogenic amines, isolation, degradation, *Pseudomonas protegens*

Ráda bych poděkovala své vedoucí bakalářské práce paní doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za cenné rady, odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

Mé poděkování patří také Ing. Pavlu Plevovi, Ph.D. za pomoc při zpracovávání výsledků pomocí softwaru Chromeleon a laborantkám Bc. Veronice Kučabové a Ing. Olze Vlčkové za pomoc a praktické rady v laboratořích.

Dále bych chtěla poděkovat Prof. Ing. Miroslavě Kačániové, PhD. za identifikaci izolovaných mikrobiálních kmenů metodou MALDI-TOF MS.

V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat své rodině a blízkým přátelům za podporu a trpělivost během mého studia.

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

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST.....	12
1 BIOGENNÍ AMINY.....	13
1.1 ROZDĚLENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ.....	13
1.2 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ A JEJICH PŘEMĚNY	16
1.3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ	18
1.3.1 Teplota.....	19
1.3.2 pH.....	19
1.3.3 Dostupnost kyslíku.....	20
1.3.4 Přítomnost solí a monosacharidů	20
1.3.5 Záření	20
1.4 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH.....	20
1.4.1 Fermentované potraviny.....	21
1.4.1.1 Mléko a mléčné výrobky	21
1.4.1.2 Maso a masné výrobky	22
1.4.1.3 Fermentovaná zelenina – kysané zelí	22
1.4.1.4 Víno	23
1.4.1.5 Pivo	24
1.4.2 Nefermentované potraviny.....	24
1.4.2.1 Ryby a výrobky z ryb.....	24
1.4.2.2 Ovoce a zelenina	24
1.5 TOXICITA BIOGENNÍCH AMINŮ	25
2 MIKROORGANIZMY PRODUKUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY	27
2.1 BAKTERIE.....	27
2.1.1 Čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>	27
2.1.2 Rod <i>Bacillus</i>	27
2.1.3 Rod <i>Lactobacillus</i>	28
2.1.4 Rod <i>Pediococcus</i>	29
2.1.5 Rod <i>Leuconostoc</i>	29
2.1.6 Rod <i>Streptococcus</i>	29
2.1.7 Rod <i>Staphylococcus</i>	30
2.2 PLÍSNĚ.....	30
2.3 KVASINKY.....	31
II PRAKTICKÁ ČÁST	32
3 CÍLE PRÁCE	33
4 MATERIÁLY A METODIKA.....	34
4.1 IZOLACE MIKROORGANIZMŮ DEGRADUJÍCÍCH BIOGENNÍ AMINY Z POTRAVINOVÝCH MATRIC ROSTLINNÉHO PŮVODU.....	34
4.1.1 Použité vzorky.....	34
4.1.2 Přístroje a pomůcky.....	34
4.1.3 Kultivační média a roztoky	35

4.1.4	Příprava a odběr vzorků z potravinových matric rostlinného původu pro izolaci mikroorganismů degradujících biogenní aminy	37
4.1.5	Identifikace izolovaných mikroorganismů degradujících biogenní aminy	37
4.2	CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	38
4.2.1	Příprava a odběr vzorků pro analýzu	38
4.2.2	Derivatizace dansylchloridem	38
4.2.3	Chromatografické stanovení biogenních aminů.....	39
5	VÝSLEDKY	40
5.1	IZOLACE A IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ DEGRADUJÍCÍCH BIOGENNÍ AMINY	40
5.2	CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ POKLESU BIOGENNÍCH AMINŮ IZOLOVANÝMI MIKROORGANIZMY	41
5.2.1	Degradace biogenních aminů kmeny izolovanými z červeného vína.....	42
5.2.1.1	Degradační schopnost kmene <i>Bacillus cereus</i> 2B12	42
5.2.2	Degradace biogenních aminů kmeny izolovanými ze španělských zelených oliv	42
5.2.2.1	Degradační schopnost kmene <i>Bacillus altitudinis</i> 5A1	42
5.2.3	Degradace biogenních aminů kmeny izolovanými z moruší	43
5.2.3.1	Degradační schopnost kmene <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 6A1	43
5.2.3.2	Degradační schopnost kmene <i>Brevibacillus parabrevis</i> 6A12	44
5.2.3.3	Degradační schopnost kmene <i>Klebsiella oxytoca</i> 6A2.....	44
5.2.3.4	Degradační schopnost kmene <i>Serratia liquefaciens</i> 6B11	45
5.2.3.5	Degradační schopnost kmene <i>Pseudomonas protegens</i> 6B12	46
5.2.4	Degradace biogenních aminů kmeny izolovanými z kysaného zelí	46
5.2.4.1	Degradační schopnost kmene <i>Candida krusei</i> 7A21	46
5.2.4.2	Degradační schopnost kmene <i>Bacillus pumilus</i> 7B12.....	47
5.2.4.3	Degradační schopnost kmene <i>Brevibacillus parabrevis</i> 9A1	48
5.2.4.4	Degradační schopnost kmene <i>Bacillus altitudinis</i> 9B11	48
5.2.5	Degradace biogenních aminů kmeny izolovanými ze cideru.....	49
5.2.5.1	Degradační schopnost kmene <i>Brevibacillus parabrevis</i> 10A1	49
5.2.5.2	Degradační schopnost kmene <i>Staphylococcus warneri</i> 10A12	50
5.2.5.3	Degradační schopnost kmene <i>Paenibacillus amylolyticus</i> 10A3	50
5.2.5.4	Degradační schopnost kmene <i>Brevibacillus parabrevis</i> 10B1	51
5.2.6	Degradace biogenních aminů kmeny izolovanými z kimči	52
5.2.6.1	Degradační schopnost kmene <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> 11A13	52
5.2.6.2	Degradační schopnost kmene <i>Lysinibacillus sphaericus</i> 11B1	52
5.2.6.3	Degradační schopnost kmene <i>Brevibacillus parabrevis</i> 11B2.....	53
5.2.7	Degradace biogenních aminů kmeny izolovanými ze shiro miso.....	54
5.2.7.1	Degradační schopnost kmene <i>Bacillus cereus</i> 12B22	54
5.2.8	Degradace biogenních aminů kmeny izolovanými z tempehu	54
5.2.8.1	Degradační schopnost kmene <i>Brevibacillus parabrevis</i> 13A21	54
5.2.8.2	Degradační schopnost kmene <i>Microbacterium lacticum</i> 13A22	55
5.2.8.3	Degradační schopnost kmene <i>Bacillus pumilus</i> 13A31	56
5.2.8.4	Degradační schopnost kmene <i>Staphylococcus epidermidis</i> 13B21	56
5.2.8.5	Degradační schopnost kmene <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> 13B23	57

5.2.9	Degradace biogenních aminů kmeny izolovanými z mléčně kvašené zeleniny	58
5.2.9.1	Degradační schopnost kmene <i>Klebsiella oxytoca</i> 14A1.....	58
5.2.9.2	Degradační schopnost kmene <i>Brevibacillus parabrevis</i> 14A2	58
5.2.9.3	Degradační schopnost kmene <i>Candida krusei</i> 14B21.....	59
5.2.9.4	Degradační schopnost kmene <i>Bacillus cereus</i> 14B22	60
5.2.9.5	Degradační schopnost kmene <i>Lysinibacillus sphaericus</i> 14B33	60
5.2.10	Porovnání degradační schopnosti izolovaných degradérů	61
6	DISKUZE	62
7	ZÁVĚR.....	66
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	67
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	74
	SEZNAM OBRÁZKŮ	75
	SEZNAM TABULEK.....	77

ÚVOD

Biogenní aminy jsou dusíkaté sloučeniny s alifatickou, aromatickou nebo heterocyklickou strukturou. Biogenní aminy mohou vznikat v potravinách tzv. dekarboxylací aminokyselin působením specifických dekarboxylas. Mohou být produkovány, ale i degradovány aktivitou živých organismů. Biogenní aminy se vyskytují prakticky ve všech potravinách jako běžné produkty metabolismu, kde vykonávají spoustu důležitých funkcí. Ve vyšších koncentracích jsou přítomné například ve fermentovaných výrobcích (např. sýry, trvanlivé salámy, pivo, víno, kysané zelí aj.). Vznikat mohou také mikrobiální činností během skladování v mase, rybách, houbách, zelenině, ovoci, a také u potravin v pokročilém stupni kažení.

Biogenní aminy, i když jsou přirozenou součástí mnohých potravin, tak mohou ve vysokých koncentracích způsobit řadu zdravotních problémů. Mohou být doprovázeny od méně závažných symptomů, jako je zvracení, pocení, bolesti hlavy až po ty závažnější, jako jsou například dýchací potíže, bušení srdce až anafylaktický šok. Produkce biogenních aminů aktivitou živých organismů je závislá na řadě faktorů. Je závislá například na teplotě skladování, pH substrátu, dostupnost kyslíku, přítomnosti solí a monosacharidů.

Toxický účinek biogenních aminů je silně ovlivněn enzymy monoaminoxidasou a diaminoxidasou, které jsou biogenní aminy schopné odbourávat. Enzymový systém není poté schopen již eliminovat vysoké koncentrace biogenních aminů. Při hodnocení toxického účinku je nutné brát v potaz jak výskyt konkrétního aminu, tak i ostatní faktory, jako je například množství konzumované potravin, přítomnost dalších toxických látek apod.

Tato práce je zaměřena na izolaci mikroorganismů se schopností degradovat biogenní aminy z potravin rostlinného původu. Izolované mikroorganismy byly dále identifikovány a následně byla zkoumána jejich dekarboxylační aktivita.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy (BA) jsou různorodou skupinou alifatických, aromatických nebo heterocyklických bází, které jsou odvozené od aminokyselin (AMK) a vyznačují se různými biologickými účinky. [1]

BA jsou v nízkých koncentracích přirozenou složkou mnohých potravin, neboť v živočišných tkáních a rostlinných pletivech vykonávají spoustu důležitých funkcí, jsou například tkáňovými hormony (histamin), protoalkaloidy (hordenin, gramin) a stavebními látkami, které se účastní biosyntézy dalších hormonů živočichů (fenylethylamin), fytohormonů neboli auxinů, alkaloidů a dalších sekundárních metabolitů rostlin. [1] BA jsou dusíkaté sloučeniny, které vznikají dekarboxylací AMK aktivitou živých organismů, popřípadě transaminací či aminací aldehydů a ketonů. [2]

1.1 Rozdělení biogenních aminů

BA můžeme rozdělit podle jejich rozdílné chemické struktury na [3]:

1. aromatické – fenylethylamin, tyramin
2. heterocyklické – tryptamin, histamin
3. alifatické – spermidin, spermin, putrescin, kadaverin, agmatin.

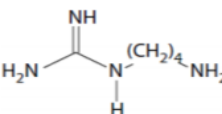
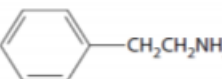
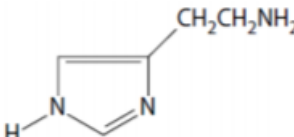
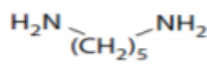
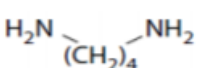
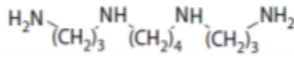
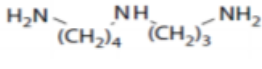
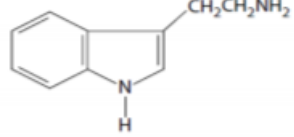
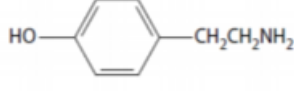
BA se mohou také dělit pomocí různých počtů arylových a alkylových skupin, které jsou navázané na atom dusíku. Jedná se o BA primární, sekundární nebo terciární. Dle počtu reaktivních aminoskupin mohou být dále děleny na monoaminy anebo polyaminy. [4] Všechny zmíněné alifatické BA se řadí kromě toho i mezi polyaminy, tj. sloučeniny obsahující dvě a více aminoskupin v molekule. Z BA putrescinu vzniká syntézou spermidin a spermin, touto biochemickou cestou se mohou vytvářet ve všech živých organizmech. [5] Mezi takzvané polyaminy se také řadí agmatin, odvozený z argininu. [6]

V závislosti na jejich syntéze lze dále BA rozdělit podle endogenního (také přírodního) anebo biogenního původu. Takzvané BA biogenního původu vznikají činností enzymů různých dekarboxylas, které jsou hlavně bakteriálního původu a působí tak na přítomné aminokyseliny. Mezi tyto aminy patří například histamin, fenylethylamin, tyramin, tryptamin, kadaverin, agmatin a putrescin. Druhá skupina aminů, endogenní neboli přírodní aminy, vzniká v důsledku nitrobuněčného metabolického procesu v živých organizmech. Do této

kategorie se řadí alifatické polyaminy spermidin a spermin, případně i putrescin který je prekurzorem těchto polyaminů. [7]

Pro BA se kromě systematických názvů využívají i triviální názvy. V tabulce (Tab. 1) jsou uvedeny triviální a systematické názvy nejdůležitějších biogenních aminů, jejich sumární a strukturní vzorce včetně molekulové hmotnosti. [5]

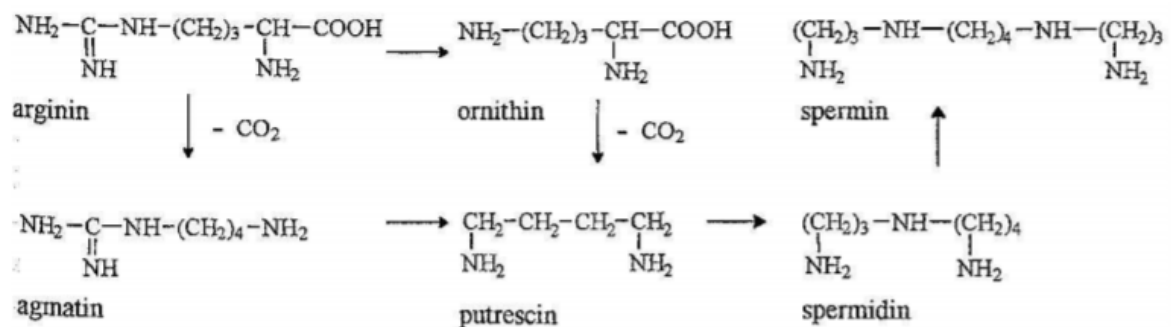
Tab. 1: Triviální a systematický název, molekulová hmotnost, sumární a strukturální vzorec vybraných biogenních aminů [8]

Triviální název	Sumární vzorec	Molekulová hmotnost [g/mol]	Systematický název	Strukturální vzorec
agmatin	$C_5H_{14}N_4$	130,19	4-(aminobutyl) guanidin; 1-amino-4-guanidobutan	
fenylethylamin	$C_8H_{11}N$	121,18	benzenethanolamin	
histamin	$C_5H_9N_3$	111,15	1H-imidazol-4-etanamin; 2-(4-imidazolyl)-etylamin	
kadaverin	$C_5H_{14}N_2$	102,18	1,5-pentandiamin; pentametylendiamin	
putrescin	$C_4H_{12}N_2$	88,15	1,4-butan-diamin; tetrametylendiamin	
spermin	$C_{10}H_{19}N_3$	202,34	N,N'-Bis(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan	
spermidin	$C_7H_{19}N_3$	145,24	N-(3-aminopropyl)-1,4-butan-diamin	
tryptamin	$C_{10}H_{12}N_2$	160,21	1H-indol-3-etanamin; 3-(2-aminoethyl) indol	
tyramin	$C_8H_{11}NO$	137,18	4-(2-aminoethyl)fenol; 2-p-hydroxy fenyl ethylamin	

1.2 Vznik biogenních aminů a jejich přeměny

BA vznikají z aminokyselin působením specifické dekarboxylasy, jejímž kofaktorem je pyridoxalfosfát, [9] nebo také z aminokyselin a karbonylových sloučenin působením transaminas. Při jejich transformaci na další biologicky aktivní produkty se uplatňují také některé oxygenasy a methyltransferasy. [1]

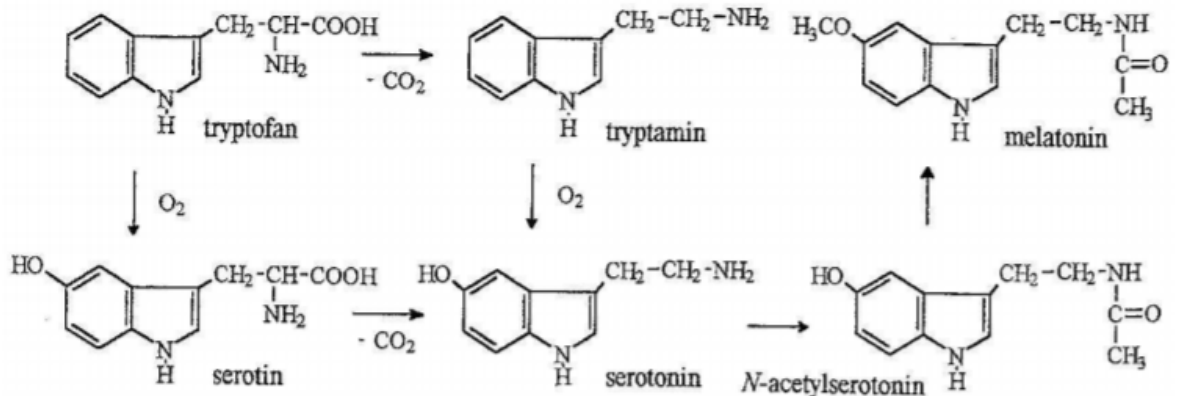
Z histidinu vzniká jako produkt dekarboxylace histidindecaboxylasou histamin. Z lysinu poté vzniká působením lysindecaboxylasy kadaverin. Z argininu vzniká dekarboxylací (arginindecaboxylasou) agmatin a dále pak putrescin. Ten může také vznikat přímo dekarboxylací ornithinu ornithindecaboxylasou (ornithin vzniká působením arginasy z argininu). Z putrescinu vzniká methylací *S*-adenosylmethioninem spermidin a dále pak spermin. Příslušné reakce jsou zjednodušeně uvedeny na obrázku (Obr. 1). [1]



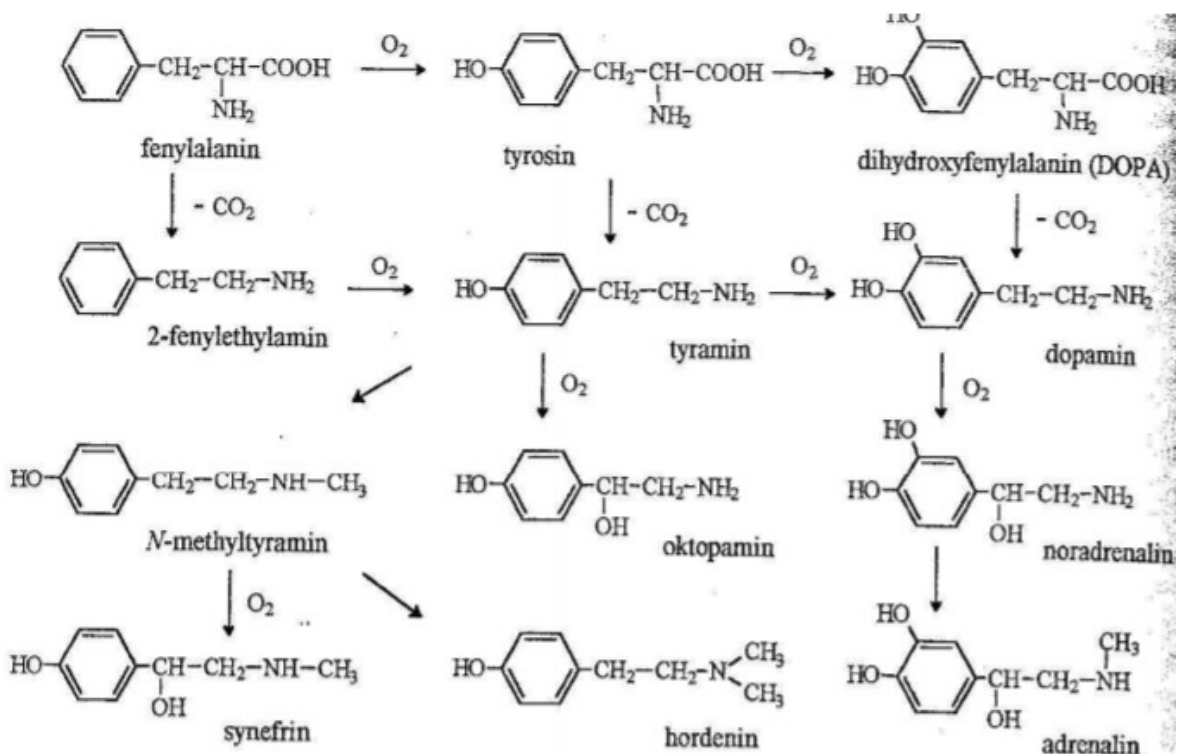
Obr. 1: Dekarboxylace argininu a další reakce vybraných biogenních aminů [1]

Dekarboxylací tryptofanu pomocí tryptofandekarboxylasy vzniká tryptamin, ze kterého se vytváří hormon serotonin, pomocí serotonin-*N*-acetyltransferasy vzniká ze serotoninu *N*-acetylserotonin a z něj působením hydroxyindol-*O*-methyltransferasy hormon melatonin. Příslušné reakce jsou zjednodušeně uvedeny na obrázku (Obr. 2). [1]

Dekarboxylací fenylalaninu fenylalanindecaboxylasou vzniká 2-fenylethylamin, z tyrosinu poté vzniká činností tyrosindecaboxylasy tyramin a jeho oxidací oktopamin. Z dihydroxyfenylalaninu (DOPA) vzniká dopamin působením dihydroxyfenylalanindecaboxylasy, dále oxidací dopaminu vzniká hormon dřene nadledvinek noradrenalin neboli norepinefrin a jeho reakcí s *S*-adenosylmethioninem další hormon nadledvinek adrenalin neboli epinefrin. Příslušné reakce jsou zjednodušeně uvedeny na obrázku (Obr. 3). [1]



Obr. 2: Dekarboxylace tryptofanu a další reakce [1]

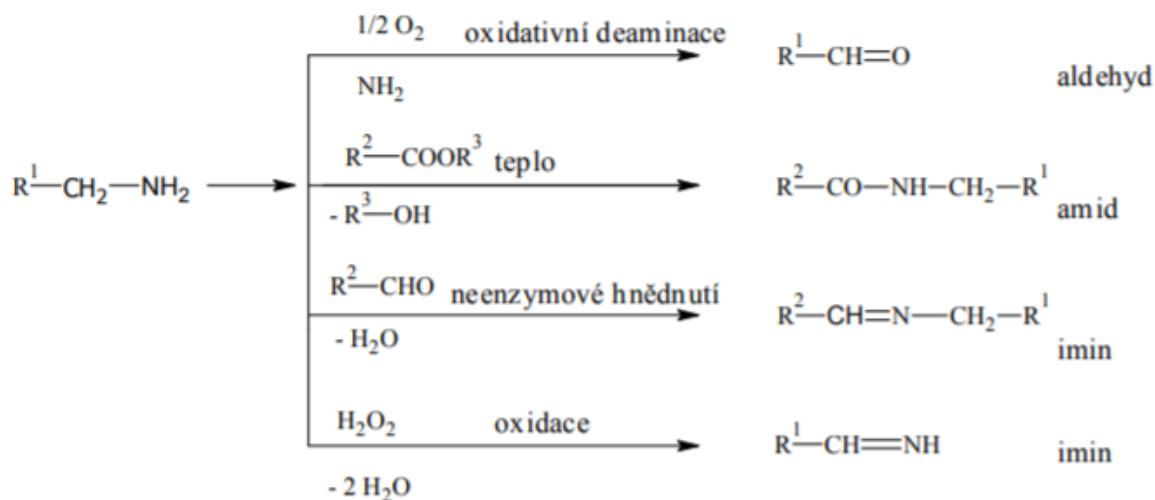


Obr. 3: Dekarboxylace fenylalaninu a další reakce [1]

BA jsou značně reaktivní látky (Obr. 4). Vyjma enzymových reakcí, kterými vznikají deriváty BA a další sloučeniny, mohou oxidativní deaminací vznikat aldehydy. Během dlouhodobého skladování nebo při zvýšené teplotě reagují BA s triacylglyceroly (TAG) za vzniku amidů mastných kyselin. Rovněž jako ostatní aminosloučeniny vstupují do neenzymatického hnědnutí, kde vznikají jako primární reakční produkty příslušné iminy. Ty mohou také vznikat oxidací aminů, například peroxidem vodíku nebo také hydroperoxydy lipidů.

[1]

Sekundární aminy mohou reakcí s oxidem dusíku vytvářet karcinogenní nitrosaminy. S proteiny reagují BA jako je fenylethylamin, putrescin, tyramin, spermidin a histamin za vzniku β -*N*-substituovaných derivátů diaminopropionové kyseliny. Patrným mechanismem vzniku těchto derivátů AMK je β -eliminace zbytků cysteinu a následující adice aminu na dvojnou vazbu dehydroalaninu vznikajícího totožně jako při vzniku lysinoalaninu. [1]



Obr. 4: Hlavní reakce biogenních aminů [1]

1.3 Faktory ovlivňující vznik biogenních aminů

Odstranění již jednou vzniklých BA z potravin je velmi obtížné. Snížení jejich koncentrace lze například dosáhnout použitím diaminooxidasy, ale v praxi není tento způsob dekontaminace použitelný. Z části dochází ke snížení obsahu BA také v tepelně zpracovaných výrobcích jejich reakcí s redukujícími cukry, respektive s rozkladnými produkty cukrů v Maillardových reakcích. Nejvhodnějším způsobem výroby potravin obsahujících malé množství BA je však dodržování takových technologických postupů a hygienických podmínek výroby, které brání jejich vzniku činností mikroorganismů. [1]

Tvorba BA je také ovlivněna spoustou různých faktorů. Mezi ty nejdůležitější, které mají vliv na aktivitu mikrobiálních dekarboxylačních enzymů, patří přítomnost volných AMK (substrátu), přítomnost solí, přítomnost kyslíku, hodnota vodní aktivity (a_w), teplota, pH, doba skladování, dodržování hygieny procesu získávání surovin a jejich zpracování při výrobě. [10]

1.3.1 Teplota

Nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím mikrobiální produkci BA je teplota skladování, která přispívá k jejich tvorbě. Skladovací teplotu je nutné dodržovat co nejnižší, pokud to potravina umožňuje. Bylo prokázáno, že BA detekované v potravině skladované při teplotě 2 °C byly ve 20x nižších koncentracích než v téže potravině uchovávané při teplotě 10 °C. [11] Vaření má relativně malý vliv na snížení obsahu BA v potravinách, dochází pouze k jejich částečnému rozkladu. U masa vepřového je úbytek BA vyšší. Vliv skladování a tepelného zpracování na obsah BA v mletém hovězím masa je dokumentován v tabulce (Tab. 2). [1]

Tab. 2: Vliv skladování a vaření na obsah biogenních aminů v hovězím masa [1]

Teplota °C	Doba dny	Obsah v mg/kg									
		putrescin		kadaverin		spermidin		spermin		tyramin	
		syrové	vařené	syrové	vařené	syrové	vařené	syrové	vařené	syrové	vařené
4	0	11	10	23	0	39	56	382	440	8	25
	4	13	12	28	0	56	80	784	393	12	18
	8	46	42	29	0	54	65	520	407	16	12
	12	74	86	32	0	113	189	331	382	12	25
7	0	13	12	23	0	33	54	318	394	5	26
	4	17	19	28	1	91	92	563	437	18	20
	8	94	107	25	4	157	216	524	360	89	36
	12	224	202	45	36	201	266	390	349	201	111
10	0	12	12	28	0	80	50	362	446	4	12
	4	69	60	36	2	131	12	517	317	12	27
	8	207	205	32	36	278	267	345	321	52	151
	12	368	277	29	100	177	274	446	361	333	224

1.3.2 pH

Úroveň pH je důležitým faktorem ovlivňujícím aktivitu dekarboxylasy. Ovlivňuje, v některých případech až inhibuje, růst mikrobiální populace. Dekarboxylasová aktivita je vyšší především v kyselém prostředí. Obecně lze říci, že optimální pH pro dekarboxylační mikroorganismy je kolem 4,0 - 5,5. [11]

1.3.3 Dostupnost kyslíku

Balení potravin do modifikované atmosféry je populární konzervační metoda zahrnující změnu složení plynu obklopujícího potravinářský výrobek a balení s bariérovým filmem. Obvykle se používají v této technice plyny a jejich směsi O₂, N₂ a CO₂. CO₂ je důležitý plyn s bakteriostatickými a fungistatickými vlastnostmi. Modifikovaná atmosféra má lepší inhibiční účinek ve srovnání s vakuovým balením. Zjistilo se, že modifikovaná atmosféra obsahující 60 % CO₂ a 40 % N₂ byla nejučinnější při zpomalování vzniku aminů v rybách (sardinky) ve srovnání s vakuovým obalem a s normálním skladováním na vzduchu. [12]

1.3.4 Přítomnost solí a monosacharidů

Přítomnost solí zpravidla inhibuje vznik BA. Výjimku tvoří histamin a tyramin, na jejichž syntézu mohou u některých bakterií soli působit osmoprotektivně a v důsledku toho může dojít až ke zvýšení syntézy BA. Tvorba histaminu může být inhibována při koncentraci NaCl 3,5-5,5 %, zatímco při nižších koncentracích soli je inhibice neúčinná. [12]

Přítomnost zkvasitelných sacharidů, jako je například glukosa, může podporovat růst a také i dekarboxylasovou aktivitu bakterií. Optimální koncentrace glukosy pro růst a dekarboxylasovou aktivitu bakterií se pohybuje od 0,5 % do 2 %, zatímco koncentrace nad 3 % zpravidla inhibuje syntézu dekarboxylas. [11]

1.3.5 Záření

Ozařování je jednou z důležitých konzervačních technik. Ozařování potravin zahrnuje expozici ionizujícím zářením, jako jsou paprsky gama, elektrony s vysokou energií a rentgenové záření. Ionizující záření deaktivuje mikroorganismy poškozením nukleové kyseliny. Kromě mikrobiální inaktivace, ozařování potravin je také schopno vyvolat radiolytické degradace BA. Již více než 50 zemí přijalo ozařování potravin. [12]

1.4 Výskyt biogenních aminů v potravinách

BA se vyskytují prakticky ve všech potravinách jako běžné produkty metabolismu. Ve vyšším množství se nachází ve fermentovaných výrobcích (např. sýry, trvanlivé salámy, pivo, víno, kysané zelí aj.), kde vznikají mikrobiální činností. Působením kontaminující mikroflóry vznikají hlavně v rybách a v mase během skladování. Ve vysokých koncentracích

se BA také vyskytují u potravin v pokročilém stupni kažení. V houbách, zelenině a ovoci při nevhodném skladování produkují BA zejména endogenní dekarboxylasy. [1]

Přehled mikroorganismů podílejících se na produkci BA v jednotlivých potravinách je uveden v tabulce (Tab. 3).

Tab. 3: Významné mikroorganismy produkující biogenní aminy [1]

Potravina	Mikroorganismy	Produkované aminy
Ryby	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Staphylococcus xylosum</i>	histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, agmatin, spermin, spermidin
Sýry	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Bacillus macerans</i> , <i>Propionibacterium</i> sp.	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin
Maso a masné výrobky	<i>Pediococcus</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., čeled' <i>Enterobacteriaceae</i>	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, fenylethylamin, tryptamin
Fermentovaná zelenina	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus</i> sp.	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, fenylethylamin, tryptamin
Fermentované produkty ze sóji	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Trichosporon beigllii</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin

1.4.1 Fermentované potraviny

1.4.1.1 Mléko a mléčné výrobky

V mléku jsou všeobecně poměrně nízké koncentrace BA, z toho převažují především polyaminy. Nicméně ve fermentovaných mléčných produktech převažuje zejména tyramin, histamin, putrescin, kadaverin a v nižších koncentracích byl detekován i β -fenylethylamin a tryptamin. [13]

Sýr je hlavním rizikovým produktem s potenciálně toxickou dávkou BA. Obsah BA u různých typů sýrů se liší. Může se také lišit v rámci stejného typu sýru, a dokonce i mezi

různými částmi stejného sýra. [13] V průběhu zrání sýrů dochází k výrazné tvorbě BA v provozech s nedostatečnou hygienickou úrovní, tedy vlivem kontaminující mikroflóry. Při dodržování správné výrobní a hygienické praxe obsahují i dlouhodobě zrající sýry jen relativně malé množství BA. [1]

1.4.1.2 *Maso a masné výrobky*

Během skladování masa dochází vlivem enzymové aktivity přítomné mikroflóry k růstu obsahu BA a obsah některých z nich se proto využívá také jako tzv. indikátor čerstvosti masa. Čerstvé vepřové maso obsahuje totiž do 7 mg/kg kadaverinu a putrescinu, kdežto zkažené maso může obsahovat až 60 mg/kg nebo i více. Obsah BA se zvyšuje také při výrobě fermentovaných masných výrobků, a to především v prvotních fázích fermentace. Na vzniku BA v trvanlivých masných výrobcích se mohou podílet jak mikroorganismy použité ve startovacích kulturách, tak i mikroorganismy zpracovávané suroviny (Tab. 4). Ve výjimečných případech mohou výrobky obsahovat od 100 do 1000 mg/kg histaminu. [1]

Tab. 4: Změny koncentrace biogenních aminů během fermentace trvanlivých salámů [1]

Startovací Kultura	Doba dny	Obsah v mg/kg				
		histamin	kadaverin	putrescin	fenylethy- lamin	tyramin
s vysokou aktivitou dekarboxylas	0	3	1	1	2	2
	1	4	7	21	2	96
	2	5	35	18	9	95
	9	8	64	15	11	142
	21	6	84	13	11	120
s nízkou aktivitou dekarboxylas	0	3	1	1	2	2
	1	3	1	1	2	2
	2	3	1	1	2	5
	9	4	1	2	2	20
	21	3	1	3	2	21

1.4.1.3 *Fermentovaná zelenina – kysané zelí*

Kyselé zelí a produkty získané fermentací za vzniku mléčné kyseliny z drceného a slaného bílého zelí, je jednou z nejznámějších tradičních potravin. Tento fermentovaný rostlinný výrobek obsahuje nejen množství vitaminů a minerálních látek, ale také vysoké hladiny

glukosinolátových produktů hydrolýzy, které vykazují významnou antikarcinogenní aktivitu. [14]

Spontánní fermentace zelí je iniciována heterofermentativními bakteriemi mléčného kvašení, jako je *Leuconostoc mesenteroides*, který produkuje kyselinu octovou a kyselinu mléčnou. V pozdější fázi procesu jsou nahrazeny homofermentativními bakteriemi, které jsou odolnější ke kyselému prostředí, jako je *Lactobacillus plantarum*, který produkuje téměř výhradně jen kyselinu mléčnou. Fermentace je prostředkem prevence zhoršení kvality zelí a prodlužuje jeho trvanlivost, protože BMK produkují organické kyseliny, které inhibují růst nežádoucích mikroorganismů. Nicméně zvýšená aktivita mikroflóry může vést k produkci toxických metabolitů, jako jsou BA. [15] V kysaném zelí je obsaženo vysoké množství volných AMK, proto může docházet k jejich dekarboxylaci až na BA. Ve vysokých koncentracích se v kysaném zelí vyskytují hlavně BA jako je putrescin a tyramin, ve značně nižších koncentracích pak mohou být detekovány histamin, tryptamin a spermin. [16]

1.4.1.4 *Víno*

Ve víně bylo identifikováno více než 20 BA a jejich celková koncentrace byla v rozmezí od jednotek mg/l až přibližně po 50 mg/l, v závislosti na kvalitě vína. [17,18] Variabilitu obsahu aminů ve víně lze vysvětlit na základě rozdílů ve výrobním procesu, čase a podmínkách skladování, kvalitou suroviny a možnou mikrobiální kontaminací během výroby vína. [17]

BA ve víně mohou pocházet ze dvou různých zdrojů: suroviny a fermentačního procesu. Některé aminy se nacházejí již v hroznech, zejména histamin a tyramin, stejně tak i několik těkavých aminů a polyaminů. Ve víně byla nalezena vyšší koncentrace histaminu, tyraminu a putrescinu. V menších množstvích poté byl přítomný i kadaverin, fenylethylamin a isoamylamin. Putrescin a kadaverin jsou obvykle spojeny se špatnými hygienickými podmínkami při zpracovávání hroznů. [19] Všeobecně je známo, že *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Oenococcus* spp. jsou hlavními producenty BA ve víně. Například *Leuconostoc mesenteroides* je schopný produkovat tyramin i histamin. [20] *Oenococcus oeni* je schopen podstatně přispět k celkovému obsahu BA ve víně, především produkcí histaminu. [21]

1.4.1.5 *Pivo*

BA obsažené v pivu lze rozdělit na dvě skupiny. První skupina zahrnuje putrescin, spermidin, spermin a agmatin, ty jsou považovány především za přírodní složky piva pocházející ze sladu. Zatímco BA druhé skupiny, především histamin, tyramin a kadaverin, obvykle vznikají činností BMK a během vaření piva. Agmatin, který není rutinně stanovován, patrně kvůli jeho minimálním nepříznivým účinkům na člověka, byl převládajícím aminem v testovaných pivech s průměrnými hodnotami kolem 10 mg/l. [22] Tyramin a putrescin byly zjištěny na relativně vysokých úrovních, kdežto obsah ostatních, včetně histaminu, byl zpravidla nižší a má tak patrně nižší toxikologický význam. Tyramin tedy byl hlavní biogenní amin identifikovaný v pivu, který může způsobovat nežádoucí účinky. [23]

1.4.2 Nefermentované potraviny

1.4.2.1 *Ryby a výrobky z ryb*

V čerstvém rybím mase je obsah BA poměrně nízký, například v mase tuňáka se nachází 0-10 mg/kg histaminu a 0-2 mg/kg tyraminu. Během skladování ryb při teplotách okolo 0 °C a nižších vznikají BA v téměř bezvýznamném množství. Při vyšších teplotách je pomocí přítomné mikroflóry dekarboxylován především histidin a tkáň především makrelovitých ryb (*Scrombroidae*), kam patří například tuňák a makrela, mohou obsahovat až 3000 mg/kg (makrela) nebo i 8000 mg/kg (tuňák) histaminu. V relativně vysokém množství také vznikají BA jako je tyramin, kadaverin, putrescin a další. Optimální teplota pro produkci histaminu je velmi rozdílná (5-38 °C) a závisí především na druhu kontaminující mikroflóry. Minoritním BA většinou bývá agmatin, který se v mase ryb nachází běžně v množství 1-3 mg/kg. Vysoké koncentrace agmatinu nicméně obsahují také některé druhy čerstvých korýšů (*Haliotis sieboldii* aj.) a to kolem 40-200 mg/kg, sušené ryby mohou obsahovat až 650 mg/kg. [1]

1.4.2.2 *Ovoce a zelenina*

BA se jako přirozená součást vyskytují také v potravinách rostlinného původu. Minoritním BA v ovoci a zelenině bývá především tyramin, v menším množství se vyskytuje také i řada dalších BA. Často se vyskytují konjugáty biogenních aminů se skořicovými kyselinami či s mastnými kyselinami. V některých rostlinách se nacházejí ve významném množství různé deriváty BA, které se běžně řadí mezi protoalkaloidy. [1]

V listech špenátu se například vyskytuje volný histamin v množství zhruba 200-400 mg/kg a dále také *N*-methylhistamin, *N*-acetylhistamin a amidy histaminu s různými karboxylovými kyselinami. [1]

V banánech se jako minoritní BA vyskytuje tyramin a dále také fenylethylamin, histamin, dopamin, serotonin a norepinefrin. [1].

1.5 Toxicita biogenních aminů

BA jsou pro organizmus nezbytné látky, ale ve vysokých koncentracích se mohou projevovat jako látky vasoaktivní nebo psychoaktivní. Vasoaktivní aminy mohou působit přímo nebo nepřímo na vaskulární systém a psychoaktivní aminy působí jako přenašeči v centrálním nervovém systému (CNS). Vasoaktivní aminy se podle účinku dále dělí na aminy vasokontraktilní (tyramin) a vasodilatační (histamin). [1]

Mezi časté symptomy při konzumaci vysokých dávek BA patří zvracení, pocení, bušení srdce, dýchací potíže. Histamin může způsobovat hypotenzi a také může vyvolat anafylaktický šok. Fenylethylamin a tyramin mohou zapříčinit migrény. [1]

Protoalkaloid gramin, který pochází zejména z trav rodu lesknice (*Phalaris* sp.) může vyvolat u přežvýkavců náhlé kolapsy až smrt. U ovcí se tato chronická otrava projevuje různými degenerativními změnami CNS. [1]

Mezi hlavní enzymy, které jsou BA schopné odbourávat patří monoaminoxidasa a diaminoxidasa. Pomocí aktivity těchto dvou enzymů je silně ovlivněn toxický účinek BA. Aktivita enzymů může být u jednotlivců různá a závislá na řadě faktorů, například na přítomnosti inhibitorů, jako jsou určitá léčiva, nebo potenciátorů. Enzymový systém není poté již schopen eliminovat takto vysoké koncentrace BA. [1]

Při hodnocení toxického účinku je nutné zvažovat jak přítomnost konkrétního aminu, tak i ostatní faktory jako je například množství spotřebované potravin, přítomnost dalších toxických látek apod. Z tohoto důvodu je velmi nesnadné stanovit hranici toxicity BA. Například koncentrace histaminu vyšší než 500 mg/kg se považují, že jsou pro člověka již nebezpečné. [1]

V řadě zemí byla stanovena nejvyšší povolená množství histaminu. U ostatních BA jsou stále nedostačující znalosti o jejich toxicitě. [1]

Dříve legislativa udávala nejvyšší přípustná množství histaminu a tyraminu v různých potravinách. [1] Nyní platí nařízení komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny, které udává nejvyšší přípustné množství histaminu v produktech rybolovu 200 mg/kg a nejvyšší přípustné množství histaminu v produktech rybolovu, které byly ošetřeny enzymatickým zráním v láku 400 mg/kg. [24]

2 MIKROORGANIZMY PRODUKUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY

BA vznikají v potravinách dekarboxylací určitých volných AMK. Dekarboxylační proces může probíhat dvěma biochemickými cestami. A to aktivitou endogenních enzymů dekarboxylas přirozeně se vyskytujících v potravě nebo aktivitou uvolněných exogenních enzymů různými mikroorganismy. Endogenní produkce diaminů je ve srovnání s exogenní cestou méně častá. Povaha mikroflóry, složení produktu a další faktory ovlivňují aktivitu dekarboxylas, které bakteriální buňka může uvolňovat. [25]

2.1 Bakterie

2.1.1 Čeleď *Enterobacteriaceae*

Čeleď *Enterobacteriaceae* zahrnuje rozsáhlou skupinu gramnegativních, většinou pohyblivých, fakultativně anaerobních tyčinek, velikosti 0,4-2 μm , zařazených přibližně do 30 rodů. Enterobakterie jsou individuálně biochemicky velmi aktivní, fermentují glukosu, produkují katalasu, nitrátreduktasu, H_2S , indol, štěpí močovinu a další. [26]

Tato kontaminující mikroflóra, především *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, je zodpovědná za produkci kadaverinu, putrescinu a histaminu v potravinách. Vyskytují se také i v přírodním prostředí. Protože jsou tyto bakterie termolabilní, je jejich přítomnost v mlékárenských výrobcích důsledkem nedostatečné pasterace nebo nedostatečné hygieny a sanitace v provozu. Byl prokázán zvýšený obsah kadaverinu a putrescinu v sýrech vyrobených z mléka kontaminovaného těmito bakteriemi. [27]

Během skladování čerstvé zeleniny a čerstvých salátů z listové zeleniny byl zjištěn zvýšený obsah putrescinu, přičemž se předpokládala souvislost mezi přítomností bakterií *Enterobacteriaceae*, které tvoří až 90 % přítomné mikroflóry, a produkcí putrescinu. [27]

2.1.2 Rod *Bacillus*

Rod *Bacillus* je velmi rozsáhlý a v přírodě velmi rozšířený. Jedná se o grampozitivní peritrichní tyčinky, které mají bohaté enzymové vybavení, takže mohou rozložit různé organické sloučeniny. Většina druhů má velmi aktivní amylolytické, pektolytické a proteolytické enzymy, takže se uplatňují při anaerobním a aerobním rozkladu škrobů, proteinů a dalších látek. Určité druhy slouží pro průmyslovou přípravu enzymů. [28]

Z tradičních klobás byly izolovány *B. subtilis* a *B. amyloliquefaciens*, kde z 13 studovaných kmenů *B. subtilis* 10 kmenů vykazovalo aktivitu histidindekarboxylasy (76,92 %), 12 aktivitu tyrosindekarboxylasy (92,31 %), 8 aktivitu ornitindekarboxylasy (61,54 %) a 8 aktivitu lysindekarboxylasy (61,54 %). Kmeny *B. amyloliquefaciens* vykazovaly méně variabilní chování; z šesti studovaných kmenů, byly čtyři schopny dekarboxylace histidinu (66,72 %) a šest bylo schopných dekarboxylace tyrosinu, ornitinu, a lysinu (100 %). [29] Naopak, z nasolené ryby byl izolován *B. polymyxa*, který byl schopen degradovat histamin až do 100 % v TSB bujónu s přidavkem histaminu. Navíc, *B. polymyxa* může být považován za halotolerantní histamin-degradující bakterii, který produkuje histamin dehydrogenasu k degradaci histaminu. [30]

2.1.3 Rod *Lactobacillus*

Jedná se o grampozitivní tyčinky, mikroaerofilní, fermentující cukry na kyselinu mléčnou (acidogenní). Rod *Lactobacillus* je jedním z technologicky nejdůležitějších rodů jak z hlediska potravinářského, tak i biotechnologického, který je v přírodě značně rozšířen. Jeho zástupci se vyskytují především v mléce, kde vyvolávají přirozené kysání, dále v ústech a trávicím traktu savců, na travinách, obilovinách i jiných rostlinách a v půdě. Podle produktů katabolismu rozdělujeme rod *Lactobacillus* na homofermentativní, které produkují prakticky pouze kyselinu mléčnou, a na heterofermentativní, které produkují kromě kyseliny mléčné ještě značné množství ethanolu a CO₂. Protože kyselina mléčná zastavuje rozmnožování hnilobných mikroorganismů a stafylokoků, je využívána činnost BMK pro konzervaci zeleniny i některých krmiv. V mlékárenském průmyslu se homofermentativní laktobacily používají při výrobě sýrů (např. *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. helveticus*). Některé druhy se využívají také pro výrobu kysaných mléčných výrobků (např. *L. acidophilus* – acidofilní mléko, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* – jogurty). Některé heterofermentativní laktobacily jsou přítomné také jako nežádoucí kontaminanty ve vinařství a pivovarství, kde způsobují chuťové vady výrobku, a v drožděření, kde vedou ke ztrátě výtěžnosti. [26, 30]

Mezi laktobacily můžeme najít různé dekarboxylasa pozitivní zástupce, které v potravinách a fermentovaných nápojích mohou produkovat BA, a tím ohrozit jejich zdravotní nezávadnost. Patří mezi jedny z hlavních producentů BA v sýrech, ale také i v pivu. Kmeny laktobacilů *L. brevis* a *L. hilgardii* byly ve studii Landete et al. (2007, s. 367) zodpovědné za vznik tyraminu. [31]

2.1.4 Rod *Pediococcus*

Tento rod je mikroaerofilní až anaerobní a jeho povrchový růst na tuhých substrátech je zpravidla značně slabý. Jedná se o grampozitivní koky, které pro svůj růst vesměs vyžadují řadu růstových látek. Zahrnuje několik druhů, z nichž některé jsou velmi obávanými kontaminanty v pivovarském průmyslu, neboť produkují diacetyl, který již ve velmi nízkých koncentracích negativně ovlivňuje chuť a aroma piva. Druhy rodu *Pediococcus* se vyskytují také v kysaném zelí, v silážích a v jiných fermentovatelných substrátech. *P. halophilus* roste v prostředí i při 18 % koncentraci NaCl a používá se v Japonsku pro výrobu pasty „miso“ ze sojové mouky. [28]

U *P. pentosaceus* izolovaného z přírodních sýrů byla detekována aktivita tyrosindekarboxylasy. Zároveň bylo dokázáno, že daný kmen není producentem kadaverinu nebo putrescinu. [32]

2.1.5 Rod *Leuconostoc*

Jedná se o heterofermentativní BMK, tudíž zkvašují cukry na kyselinu mléčnou, ethanol a CO₂. Tvoří kulovité až čočkovité buňky spojené do dvojic nebo do řetízků. Některé druhy mohou produkovat velké množství slizu polysacharidové povahy. Sliz tvoří zejména *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, jehož přítomnost může způsobit potíže v droždářství, kdy dochází k aglutinaci droždí, ale také i ve slazených minerálních vodách, kde způsobuje rosolovatění. *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* se pro změnu využívá pro průmyslovou výrobu dextranů pro lékařské účely. *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*, který se vyznačuje silnou tvorbou diacetylu, se využívá jako součást máslašské kultury, protože dodává máslu příjemné aroma. [28]

U *L. paramesenteroides* a *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* z celkového počtu 17 kmenů byla detekována tyrosindekarboxylasová aktivita. Tyto kmeny ukázaly nejvyšší aktivitu tyrosin- i tryptofandekarboxylasy. Proto je evidentní, že některé kmeny mohou produkovat různé BA současně. [33]

2.1.6 Rod *Streptococcus*

Jedná se o skupinu grampozitivních koků, která zahrnuje řadu patogenních druhů, které mohou způsobit hnisavá onemocnění, spálu, zubní kazy, anginu apod. V poslední době

byly vyčleněny nehemolyzující nepatogenní druhy, které se využívají v mlékárenském průmyslu a byly zařazeny do nově vytvořených rodů *Lactococcus* a *Enterococcus*. V potravinářském průmyslu je nejvíce využíván *L. lactis*, kam jsou řazeny i kmeny dříve označované jako *Streptococcus cremoris* (nyní *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*). Je součástí máslařské kultury, která se používá k výrobě zakysané smetany. Některé kmeny produkují bakteriocin nisin, který inhibuje rozvoj řady grampozitivních bakterií. Nisin se také používá jako pomocná látka při konzervaci potravin. [28]

Streptococcus thermophilus vykazuje aktivitu histidindekarboxylasy a může tak produkovat histamin v sýrech, jogurtech a fermentovaných nápojích. Kromě toho byla také u tohoto druhu detekována aktivita tyrosindekarboxylasy. [34, 35]

2.1.7 Rod *Staphylococcus*

Tento rod zahrnuje grampozitivní, nepohyblivé, neopouzdržené, nesporulující, katalasa pozitivní, fakultativně anaerobní koky, které tvoří nepravidelné shluky. V současné době je známo několik desítek druhů stafylokoků, z nichž většina patří k normální mikroflóře kůže a sliznic člověka i zvířat. Některé druhy nicméně mohou u člověka způsobit různá hnisavá onemocnění nebo mohou být příčinou toxikóz. [26] K otravě dochází obvykle tehdy, je-li koncentrace buněk *S. aureus* v potravine řádově 10^5 - 10^7 /g. Původcem otravy však nejsou živé buňky, nýbrž jimi vytvořené enterotoxiny. Některé enterotoxiny se inaktivují delším varem, a proto je nebezpečí otrav především u tepelně neopracovaných potravin. [28]

Z 38 testovaných kmenů stafylokoků, které byly izolovány ze španělských tradičních sušených salámů, bylo 68,4 % schopných dekarboxylovat histidin, 89,4 % tyrosin, 92,1 % ornitin a 94,7 % lysin. *S. saprophyticus* byl druh s nejvyšší dekarboxylační aktivitou. [36]

2.2 Plísně

Jako plísně označujeme mikroskopické vláknité eukaryotní mikroorganismy, které patří mezi houby (*Fungi*). Podle přítomnosti a typu pohlavního rozmnožování se rozdělují taxonomicky do tříd *Zygomycetes*, *Ascomycotina* a *Deuteromycotina*. [28] Určité druhy plísni mají schopnost redukovat BA. Tyto vláknité houby vykazují vysokou sekreční schopnost enzymů, které byly komerčně využívány. Enzymatická eliminace aminů může být

úsporným a spolehlivým způsobem, jak odstranit tyto látky z vína a z dalších fermentovaných potravin. Je známo, že určité druhy plísní produkují aminooxidasy využívající aminy jako jediné zdroje dusíku pro růst. Například genom *Aspergillus niger* obsahuje šest různých genů, které kódují aminooxidasy. Jeden z těchto genů byl heterologicky exprimován v *Saccharomyces cerevisiae*. [37]

Byla zjištěna 100% degradace tyraminu a putrescinu pomocí *Alternaria* sp., *Epicoccum nigrum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium roqueforti*, *Phoma* sp., *Aspergillus oryzae*, které byly izolovány z vinné révy. Kromě degradace tyraminu a putrescinu byla potvrzena 100% degradace histaminu pomocí *Alternaria* sp., *Penicillium citrinum*, *Penicillium roqueforti*, *Phoma* sp. Degradace histaminu byla nižší u druhu *Epicoccum nigrum* a *Aspergillus oryzae*. [37]

2.3 Kvasinky

Kvasinky patří mezi heterotrofní eukaryotní mikroorganizmy, které se řadí, stejně jako plísně, mezi houby. Český název dostaly pro schopnost většiny druhů zkvašovat cukry na ethanol a CO₂. V přírodě jsou velmi rozšířené. Kvasinky se rozmnožují pomaleji než bakterie. Zpravidla snášejí vyšší koncentrace sacharidů (jsou osmotolerantní nebo osmofilní). Z těchto důvodů se kvasinky při kažení potravin uplatňují hlavně při kažení kompotů, ovocných moštů, slazených limonád a minerálních vod. Kontaminace cizími kvasinkami má také nepříznivý účinek v droždářství, pivovarství a vinařství. Hlavní průmyslový význam kvasinek tkví v jejich využití pro výrobu alkoholických nápojů, pekařského a krmného droždí. [28]

Bylo zjištěno, že BA neprodukující kmeny *Yarrowia lipolytica* a *Debaryomyces hansenii* degradují ethanolamin, který byl již přítomen v neupravené červené hroznové šťávě. Nejúčinnější byl kmen *Debaryomyces hansenii*, který zcela degradoval fenyletylamin a tyramin. [38]

Bylo zkoumáno snížení produkce BA eliminací genu PEP4 u *Saccharomyces cerevisiae* během fermentace čínského rýžového vína. Bylo zjištěno, že odstranění PEP4 může snížit aktivitu PrA (enzym kódující proteinasu A, což je enzym, který je zodpovědný za produkci volných aminokyselin) v kvasinkách a snížit tak produkci BA. [39]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce byl podrobný popis biogenních aminů

- charakterizace biogenních aminů, jejich vznik a reakce,
- faktory ovlivňující produkci biogenních aminů,
- výskyt biogenních aminů a možnosti jejich snížení.

Praktická část bakalářské práce byla zaměřena na následující cíle:

- izolace a identifikace mikroorganismů schopných degradovat biogenní aminy z potravinových matric rostlinného původu,
- ověření jejich schopnosti degradovat biogenní aminy pomocí HPLC metody,
- vyhodnocení výsledků a formulace závěrů.

4 MATERIÁLY A METODIKA

4.1 Izolace mikroorganismů degradujících biogenní aminy z potravinových matric rostlinného původu

4.1.1 Použité vzorky

Byla provedena izolace mikroorganismů degradujících biogenní aminy z 14 potravinových matric, jejichž seznam je uveden v tabulce (Tab. 5).

Tab. 5: Seznam potravin, ze kterých byla provedena izolace

Seznam potravin	Seznam potravin
Cider	Kysané zelí domácí – Tlumačov
Červené víno	Kysané zelí domácí – Vlčková
Sladová limonáda	Kysané zelí (obchodní síť)
Pivo – světlý ležák	Mléčně kvašená zelenina
Španělské zelené olivy	Kimči
Moruše	Tempeh
Kysané zelí domácí – Vizovice	Shiro miso

4.1.2 Přístroje a pomůcky

- Box laminární BIO IIA, Biohazard (TELSTAR)
- Centrifuga chlazená ROTANA 460R
- HPLC Agilent Technologies (sestava se skládá z binární pumpy a autosampleru LabAlliance, DAD a detektoru Agilent Technologies 1260 Infinity a degaseru)
- Kolona Zorbax Exlipse Plus C18 RRHD
- Laboratorní sklo a plasty
- Laboratorní třepačka LT2, KAVALIERGLASS, a. s., Sázava
- Laboratorní váhy Adventurere Pro (OHAUS)
- Mikrobiologický inkubátor (Memmert)
- pH metr (EUTECH instruments)
- Sterilizátor H+P Varioklav 135S
- Termoblok Benchmark Digital HEAT BLOCK
- Vortex

4.1.3 Kultivační média a roztoky

Mikroorganismy byly izolovány v minerálním médiu s biogenními aminy. Byly připraveny roztoky nezbytné pro jeho přípravu.

❖ Roztok KH_2PO_4

Roztok byl připraven navážením 9,07 g KH_2PO_4 a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody.

❖ Roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

Roztok byl připraven navážením 23,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody.

❖ Roztok stopových prvků

Roztok stopových prvků byl připraven navážením náležitého množství složek, jejichž seznam je uveden v tabulce (Tab. 6) a následným rozpuštěním v 1000 ml destilované vody.

Tab. 6: Složení roztoku stopových prvků

Složka	Množství [g]
$\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,043
H_3BO_3	0,057
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,043
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,037
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,040

❖ Roztok $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Roztok byl připraven navážením 10 g $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody.

❖ Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

Roztok byl připraven navážením 3 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody.

❖ Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Roztok byl připraven navážením 1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody.

❖ Roztok NaCl

Roztok byl připraven navážením 50 g NaCl a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody.

❖ Roztok biogenních aminů

Roztok biogenních aminů (všechny Sigma-Aldrich) byl připraven navážením náležitého množství biogenních aminů, jejichž seznam je uveden v tabulce (Tab. 7) a následným rozpuštěním v 1000 ml destilované vody, poté bylo pomocí HCl upraveno pH roztoku na 6,8.

Tab. 7: Složení roztoku biogenních aminů

Složka	Množství [g]
Tyramin	2
Putrescin	2
Kadaverin	2
Histamin	2
Fenylethylamin	2
Tryptamin	2

❖ Minerální médium tekuté

Tekuté minerální médium bylo připraveno nadávkováním připravených roztoků v předloženém množství (Tab. 8) a doplněno do 1 litru destilovanou vodou. Tekuté minerální médium bylo pipetováno po 5 ml do zkumavek a následně sterilizováno v autoklávu.

Tab. 8: Složení minerálního média

Složka	Množství [ml]
Roztok pufru KH_2PO_4	20
Roztok pufru $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	80
Roztok stopových prvků	2
Roztok $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10
Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	10
Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	10
Roztok NaCl	10
Roztok biogenních aminů	100

❖ Minerální médium tuhé

Složení tuhého minerálního média bylo totožné jako složení výše uvedeného tekutého minerálního média počítaje obsahem přidaných biogenních aminů, k němuž byl dodán agar v množství 12 g/l. Po sterilizaci byly připravené půdy rozlévány do sterilních Petriho misek.

❖ Fyziologický roztok

Fyziologický roztok byl připraven navážením 8,5 g NaCl a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody. Fyziologický roztok byl pipetován do zkumavek po 4,5 ml a sterilován v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

4.1.4 Příprava a odběr vzorků z potravinových matric rostlinného původu pro izolaci mikroorganismů degradujících biogenní aminy

Z jednotlivých potravin bylo sterilně odebráno 5 g vzorku, ke kterým bylo přidáno 45 ml sterilního fyziologického roztoku. Vzorky byly homogenizovány ve stomacheru po dobu 5 minut. Následovně bylo zaočkováno 50 µl této suspenze do tekutého minerálního média s biogenními aminy.

Připravené minerální médium představuje minimální zdroj makrobiogenních, mikrobiogenních a stopových prvků nezbytné pro zajištění životních funkcí mikroorganismů. Biogenní aminy představují v minerálním médiu jediný zdroj uhlíku a dusíku, které jsou izolované mikroorganismy schopny využít.

Připravené vzorky ve zkumavkách byly kultivovány při 30 °C a poté, co byl zpozorován zákal v minerálním médiu s biogenními aminy, byl vzorek přeočkován na tuhé minerální médium s biogenními aminy.

4.1.5 Identifikace izolovaných mikroorganismů degradujících biogenní aminy

Mikroorganismy izolované dle postupu v kapitole 4.1.4., byly dále identifikovány pomocí metody MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spectrometry – hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem). Identifikace vzorků byla provedena na Slovenské poľnohospodárskej univerzite v Nitře, na Katedře mikrobiologie Fakulty biotechnologie a potravinářstva pod vedením prof. Miroslavy Kačániové. Kultury narostené na tuhém mi-

nerálním médiu byly přeočkovány křížovým roztěrem pro získání čisté kultury. Po 48 hodinách kultivace při 30 °C byla izolovaná kultura sterilní kličkou odebrána do mikrozkušavky typu eppendorf, do které bylo přidáno 450 µl sterilní destilované vody a 450 µl 96% ethanolu. Takto připravené vzorky byly následně zaslány na identifikaci.

4.2 Chromatografické stanovení biogenních aminů

4.2.1 Příprava a odběr vzorků pro analýzu

Každý izolovaný mikroorganismus byl pomnožen v minerálním médiu s biogenními aminy (kapitola 4.1.3). Dekarboxylasová aktivita pro každou kulturu byla paralelně zjišťována ve 3 zkumavkách. Po 48 hodinách kultivace při 30 °C byla živná média centrifugována (4500 otáček, 10 minut) a z každé zkumavky bylo odebráno 650 µl supernatantu a přidáno 650 µl kyseliny chloristé (Merck) o koncentraci 1,2 mol/l. Vzorky v mikrozkušavkách byly zamrazeny a připraveny pro následnou derivatizaci.

4.2.2 Derivatizace dansylchloridem

Byla provedena derivatizace dansylchloridem dle postupu používaného na Ústavu technologie potravin FT. K připraveným vzorkům supernatantu bylo přidáno 100 µl vnitřního standardu (1,7-heptandiamin v koncentraci 500 mg/l; Sigma-Aldrich). Z této směsi bylo následně odpipetováno 1 ml do derivatizačních nádobek, dále do derivatizačních nádobek bylo přidáno 1,5 ml karbonátového pufru o pH 11,0 – 11,1 a 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu (Sigma-Aldrich) o koncentraci 5 g/l v acetonu. Pečlivě uzavřené derivatizační nádobky byly třepány v temnu po dobu 20 hodin. Poté bylo ke vzorkům přidáno 200 µl roztoku prolinu (Sigma-Aldrich) a vzorky se nechaly třepat další hodinu. Po hodině třepání bylo ke vzorkům přidáno 3 ml heptanu (Merck) a po uzavření nádobek byly vzorky ještě 3 minuty třepány ručně. Následně bylo odpipetováno z derivatizačních nádobek 1 ml heptanové vrstvy do vialek. Z vialek byl následně odpařen vzorek pomocí proudu dusíku při teplotě 60 °C. Suchý odparek byl poté zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich). Takto připravené vzorky byly zamrazeny v mrazicím zařízení při teplotách pod -18 °C do doby chromatografického stanovení biogenních aminů.

4.2.3 Chromatografické stanovení biogenních aminů

Před chromatografickým stanovením byly derivatizované vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 μm , stříkačkový filtr byl proplachován pomocí acetonitrilu. Následně byly dávkovány do chromatografického systému (přístroj HPLC Agilent Technologies) s kolonou Zorbax Eclipse plus RRHD C18 o velikosti 50 mm x 3,0 mm. Detekce dansylderivátů biogenních aminů byla provedena spektrofotometricky UV zářením o vlnové délce 254 nm (pomocí DAD detektoru Agilent Technologies 1260 Infinity) při teplotě 30 °C. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru Chromeleon.

5 VÝSLEDKY

5.1 Izolace a identifikace mikroorganismů degradujících biogenní aminy

Ze 14 potravinových matric bylo izolováno celkem 65 degradérů. Kmeny byly identifikovány na Slovenské poľnohospodárskej univerzite v Nitre pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF na úrovni rodu a druhu. Tabulka (Tab. 9) zobrazuje docílené výsledky. Věrohodnost výsledné identifikace je vyjádřena prostřednictvím skóre. To se pohybuje v rozmezí od 0 – žádná shoda do 3 – maximální shoda. Zeleně zvýrazněné hodnoty (hodnoty od 3,000 do 2,000) značí spolehlivou identifikaci na úrovni druhu. Žlutě zvýrazněné hodnoty (hodnoty od 1,999 do 1,700) vyjadřují spolehlivou identifikaci na úrovni rodu.

Všechny mikroorganismy se nezdařilo touto metodou identifikovat, 36 izolovaných kmenů mělo hodnotu skóre nižší než 1,7. Příčinou mohla být kontaminace vzorku jiným mikroorganizmem, nízká koncentrace mikroorganismů nebo nepřítomnost daného spektra v knihovně (knihovny jsou přednostně vytvářeny pro klinické izoláty).

Tab. 9: Identifikace izolovaných mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS

Organismus	Skóre	Organismus	Skóre
<i>Bacillus cereus</i> 2B12	1,991	<i>Bacillus subtilis ssp. subtilis</i> 11A13	1,998
<i>Bacillus altitudinis</i> 5A1	1,729	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> 11B1	2,057
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 6A1	2,095	<i>Brevibacillus parabrevis</i> 11B2	1,978
<i>Brevibacillus parabrevis</i> 6A12	2,058	<i>Bacillus cereus</i> 12B22	2,116
<i>Klebsiella oxytoca</i> 6A2	2,267	<i>Brevibacillus parabrevis</i> 13A21	1,843
<i>Serratia liquefaciens</i> 6B11	2,376	<i>Microbacterium lacticum</i> 13A22	1,832
<i>Pseudomonas protegens</i> 6B12	2,351	<i>Bacillus pumilus</i> 13A31	1,890
<i>Candida krusei</i> 7A21	2,186	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 13B21	1,779
<i>Bacillus pumilus</i> 7B12	1,999	<i>Bacillus subtilis ssp. Subtilis</i> 13B23	1,981
<i>Brevibacillus parabrevis</i> 9A1	1,747	<i>Klebsiella oxytoca</i> 14A1	1,735
<i>Bacillus altitudinis</i> 9B11	1,904	<i>Brevibacillus parabrevis</i> 14A2	1,976
<i>Brevibacillus parabrevis</i> 10A1	1,730	<i>Candida krusei</i> 14B21	1,894
<i>Staphylococcus warneri</i> 10A12	1,773	<i>Bacillus cereus</i> 14B22	2,142
<i>Paenibacillus amyolyticus</i> 10A3	1,753	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> 14B33	1,878
<i>Brevibacillus parabrevis</i> 10B1	2,065		

Uvedené mikroorganismy byly izolovány z alkoholických nápojů (cider, červené víno), fermentované zeleniny (kysané zelí, mléčně kvašená zelenina nebo kimči, olivy), asijských produktů (tempeh, shiro miso), případně z dalších zdrojů (moruše), jak ukazuje tabulka (Tab. 10).

Tab. 10: Původ izolovaných kmenů

Organismus	Potravina
Gramnegativní bakterie	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 6A1	Moruše
<i>Klebsiella oxytoca</i> 6A2	Moruše
<i>Klebsiella oxytoca</i> 14A1	Mléčně kvašená zelenina
<i>Pseudomonas protegens</i> 6B12	Moruše
<i>Serratia liquefaciens</i> 6B11	Moruše
Grampozitivní bakterie	
<i>Bacillus altitudinis</i> 5A1	Španělské zelené olivy
<i>Bacillus altitudinis</i> 9B11	Kysané zelí – Vlčková
<i>Bacillus cereus</i> 2B12	Červené víno
<i>Bacillus cereus</i> 12B22	Shiro miso
<i>Bacillus cereus</i> 14B22	Mléčně kvašená zelenina
<i>Bacillus pumilus</i> 7B12	Kysané zelí – Tlumačov
<i>Bacillus pumilus</i> 13A31	Tempeh
<i>Bacillus subtilis ssp. subtilis</i> 11A13	Kimči
<i>Bacillus subtilis ssp. subtilis</i> 13B23	Tempeh
<i>Brevibacillus parabrevis</i> 6A12	Moruše
<i>Brevibacillus parabrevis</i> 9A1	Kysané zelí – Vlčková
<i>Brevibacillus parabrevis</i> 10A1	Cider
<i>Brevibacillus parabrevis</i> 10B1	Cider
<i>Brevibacillus parabrevis</i> 11B2	Kimči
<i>Brevibacillus parabrevis</i> 13A21	Tempeh
<i>Brevibacillus parabrevis</i> 14A2	Mléčně kvašená zelenina
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> 11B1	Kimči
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> 14B33	Mléčně kvašená zelenina
<i>Microbacterium lacticum</i> 13A22	Tempeh
<i>Paenibacillus amylolyticus</i> 10A3	Cider
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 13B21	Tempeh
<i>Staphylococcus warneri</i> 10A12	Cider
Kvasinky	
<i>Candida krusei</i> 14B21	Mléčně kvašená zelenina
<i>Candida krusei</i> 7A21	Kysané zelí – Tlumačov

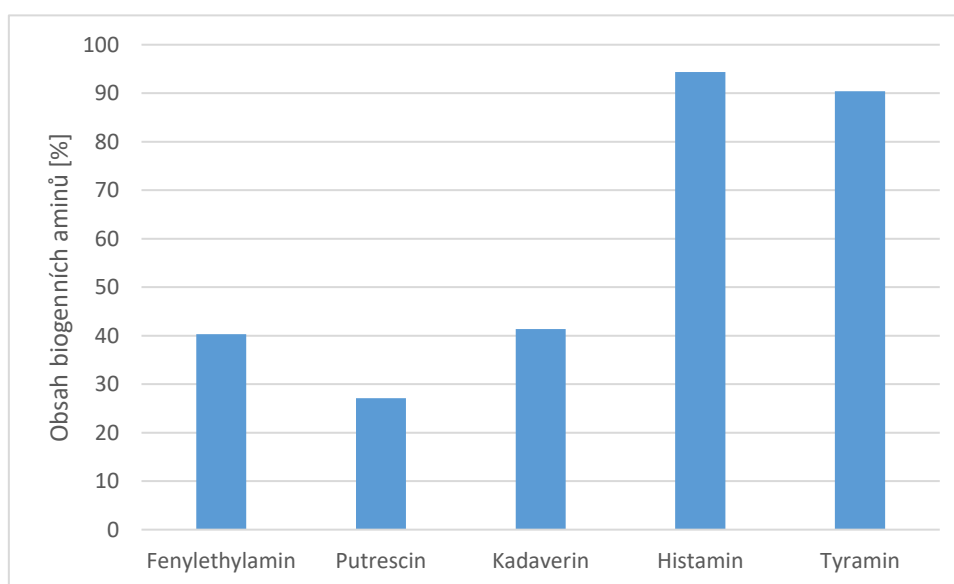
5.2 Chromatografické stanovení poklesu biogenních aminů izolovanými mikroorganismy

Byla sledována degradační schopnost u 29 izolovaných kmenů pro 5 různých biogenních aminů: fenylethylamin, putrescin, kadaverin, histamin a tyramin.

5.2.1 Degradace biogenních aminů kmeny izolovanými z červeného vína

5.2.1.1 Degradční schopnost kmene *Bacillus cereus* 2B12

Kmen *Bacillus cereus* 2B12 byl izolován z červeného vína, původem z oblasti Jižní Moravy. Na obrázku (Obr. 5) je možné sledovat největší úbytek putrescinu, tento pokles je až o 73 %. Druhý největší pokles byl zaznamenán u fenylethylaminu, který činil 60 %. Kadaverin, který byl zredukován až o 59 %, je tak třetím nejvíce degradovaným biogenním aminem. Nejnižší degradace byla zaznamenána u histaminu sníženého pouze na 94 % a tyraminu sníženého na 90 %.

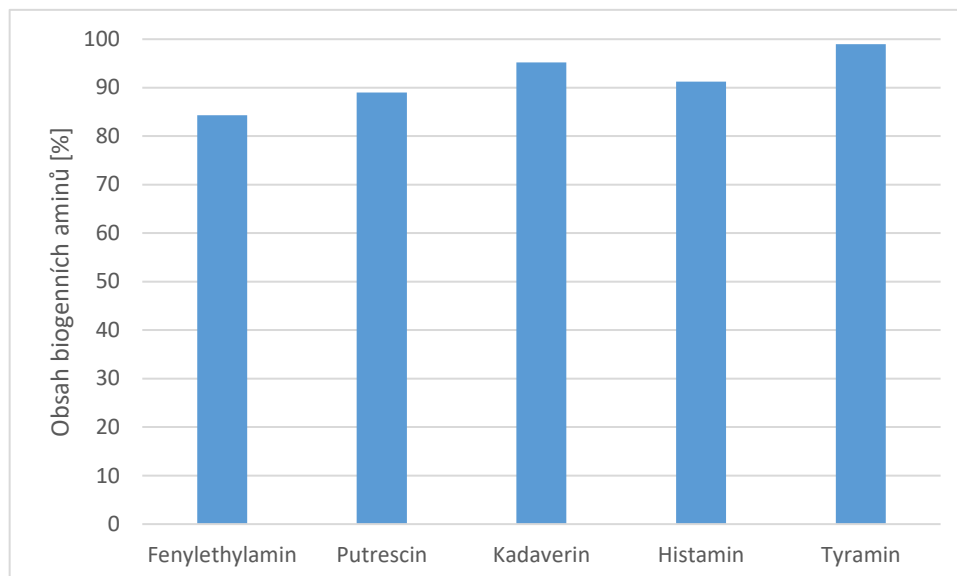


Obr. 5: Degradace biogenních aminů kmenem *Bacillus cereus* 2B12

5.2.2 Degradace biogenních aminů kmeny izolovanými ze španělských zelených oliv

5.2.2.1 Degradční schopnost kmene *Bacillus altitudinis* 5A1

Kmen 5A1 izolovaný ze španělských zelených oliv byl identifikován jako *Bacillus altitudinis*. Degradční aktivita tohoto kmene byla poměrně slabá. Nejvýraznější pokles byl zaznamenán u fenylethylaminu, který byl zredukován o 16 % (Obr. 6). Mezi další nejvíce zredukované biogenní aminy patřil putrescin, pokles byl o 11 %, histamin, kde pokles činil 9 % a kadaverin, u kterého byl zaznamenán pokles o 5 %. Obsah tyraminu nebyl prakticky redukován vůbec (pouze o 1 %).

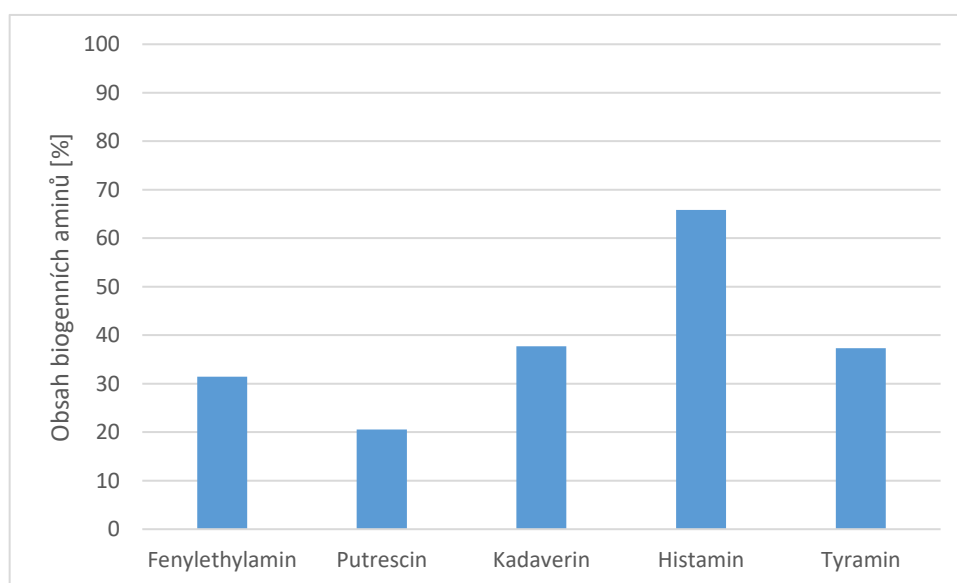


Obr. 6: Degradace biogenních aminů kmenem *Bacillus altitudinis* 5A1

5.2.3 Degradace biogenních aminů kmeny izolovanými z moruší

5.2.3.1 Degradací schopnost kmene *Acinetobacter calcoaceticus* 6A1

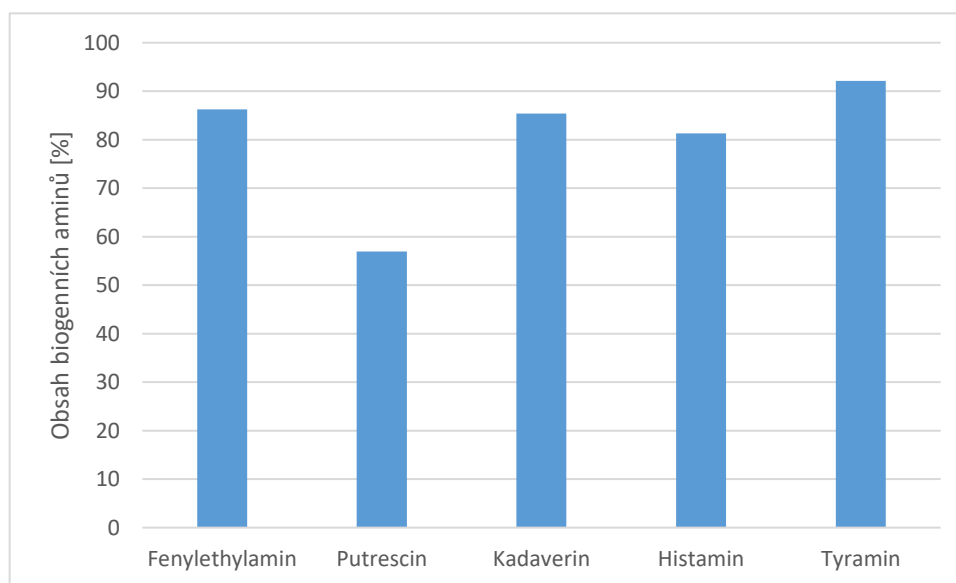
Kmen *Acinetobacter calcoaceticus* 6A1 byl izolován z moruší. Z obrázku (Obr. 7) lze zpozorovat největší pokles putrescinu, který činil až 80 %. Druhým nejvíce degradovaným BA byl fenylethylamin, jehož pokles byl o 69 %. Obsah tyraminu byl snižen na 38 % a obsah kadaverinu na 37 %. U histaminu byl zaznamenán nižší pokles, a to pouze o 34 %.



Obr. 7: Degradace biogenních aminů kmenem *Acinetobacter calcoaceticus* 6A1

5.2.3.2 Degradáční schopnost kmene *Brevibacillus parabrevis* 6A12

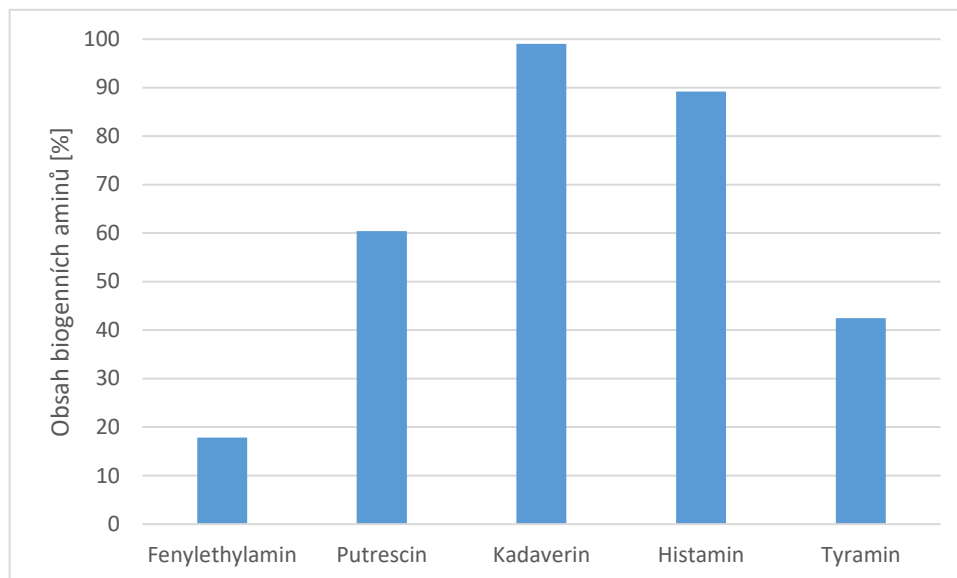
Kmen 6A12 izolovaný z moruší byl identifikován jako *Brevibacillus parabrevis*. Tento kmen vykazoval slabší schopnost degradace biogenních aminů. Největší pokles byl zaznamenán u putrescinu, jehož obsah byl snížen až o 43 %. Další nejvíce degradovaný BA byl histamin, u něhož byla zaznamenána redukce o 19 %. Pokles obsahu kadaverinu a fenylethylaminu byl téměř totožný a činil 15 %, respektive 14 %. Nejnižší schopnost degradace byla pozorována u tyraminu, a to pouze 8 %.



Obr. 8: Degradace biogenních aminů kmenem *Brevibacillus parabrevis* 6A12

5.2.3.3 Degradáční schopnost kmene *Klebsiella oxytoca* 6A2

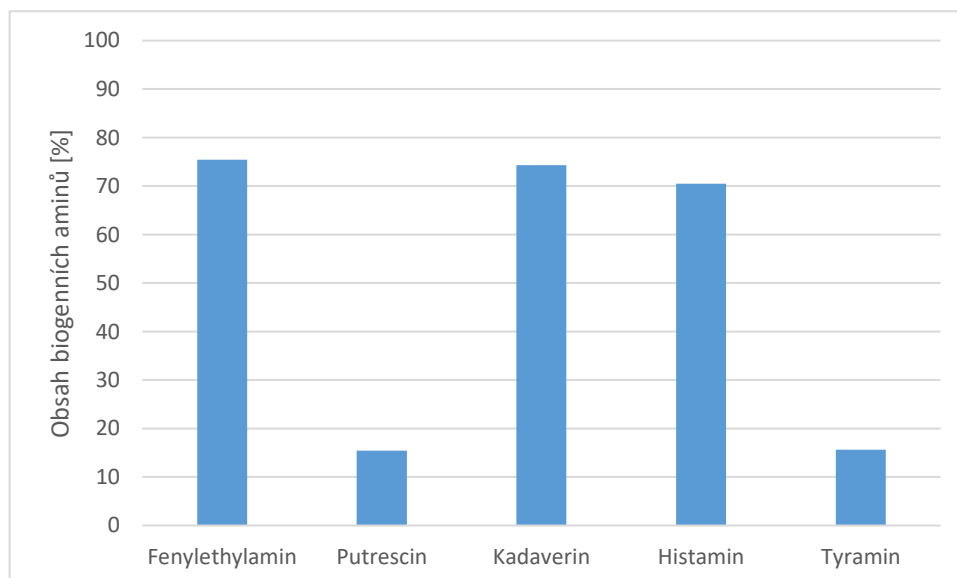
Kmen 6A2 izolovaný z moruší byl identifikován jako *Klebsiella oxytoca*. Tento kmen velmi dobře snižoval obsah dvou biogenních aminů. Z obrázku (Obr. 9) je patrný značný pokles fenylethylaminu, který činil až 82 %. Druhý největší pokles byl zaznamenán u tyraminu, a to až o 57 %. U putrescinu byl zaznamenán pokles o 40 %. Naopak u histaminu byla zjištěna redukce pouze o 11 %. Množství kadaverinu zůstalo téměř nezměněné.



Obr. 9: Degradace biogenních aminů kmenem *Klebsiella oxytoca* 6A2

5.2.3.4 Degradční schopnost kmene *Serratia liquefaciens* 6B11

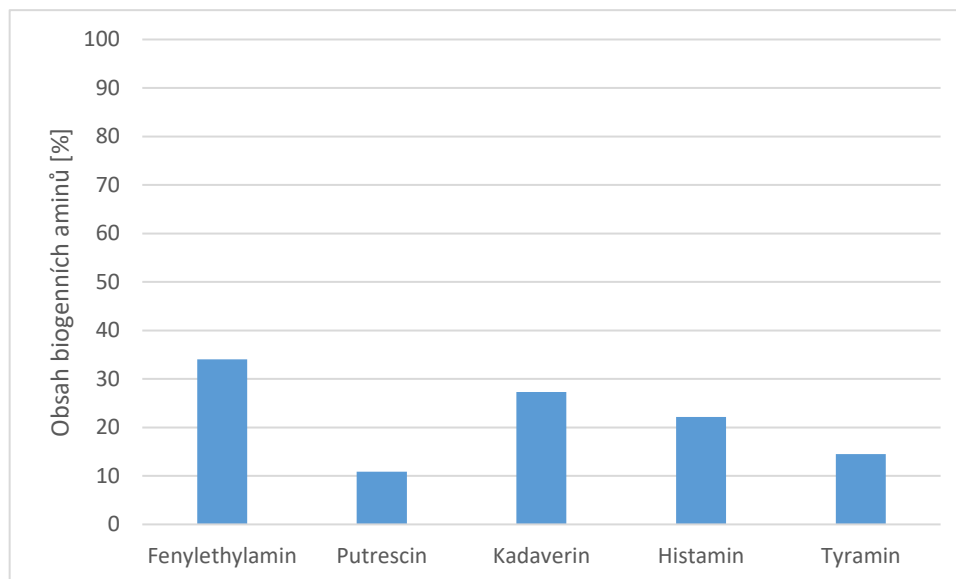
Kmen *Serratia liquefaciens* 6B11 byl izolován z moruší a vykazoval velmi dobrou degradaci putrescinu a tyraminu. Nejvýraznější pokles lze zpozorovat u putrescinu, který činil až 85 % a u tyraminu, jehož pokles byl o 84 %. Třetím nejvíce degradovaným BA byl histamin, ten byl zredukován o 30 %. Nižší pokles byl zaznamenán u kadaverinu a fenylethylaminu, u těchto dvou aminů byla zaznamenána redukce o 26 %, respektive 25 %.



Obr. 10: Degradace biogenních aminů kmenem *Serratia liquefaciens* 6B11

5.2.3.5 Degradční schopnost kmene *Pseudomonas protegens* 6B12

Kmen *Pseudomonas protegens* 6B12 izolovaný z moruší vykazoval velmi dobrou degradační schopnost. Byl pozorován výrazný pokles všech sledovaných BA. Největší pokles byl zaznamenán u putrescinu, ten byl zredukován až o 89 %. Další výrazný pokles byl pozorován u tyraminu, ten činil 86 % a histaminu, kde byla zjištěná redukce o 78 %. Množství kadaverinu bylo sníženo o 73 % a fenylethylaminu o 66 %.

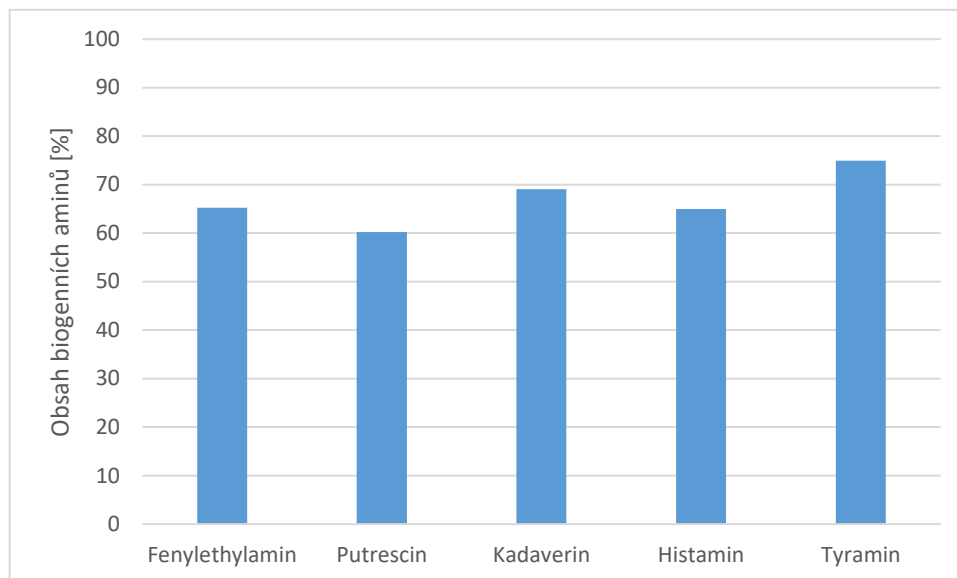


Obr. 11: Degradace biogenních aminů kmenem *Pseudomonas protegens* 6B12

5.2.4 Degradace biogenních aminů kmeny izolovanými z kysaného zelí

5.2.4.1 Degradční schopnost kmene *Candida krusei* 7A21

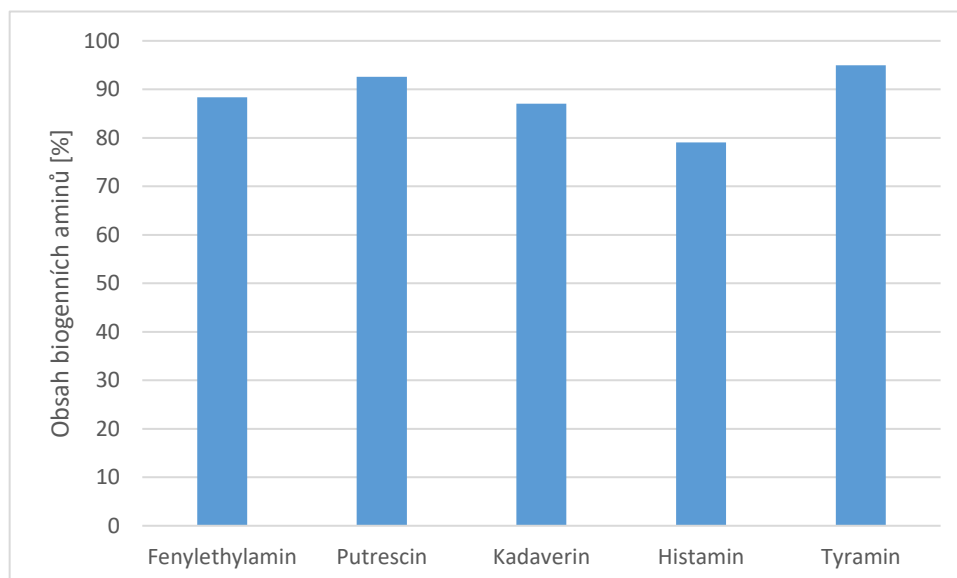
Kvasinka *Candida krusei* 7A21 byla izolována z kysaného zelí z Tlumačova. Tato kvasinka nejvíce degradovala putrescin, a to o 40 %. Následují fenylethylamin a histamin s poklesem o 35 %. Obsah kadaverinu byl snižen o 31 %. Nejnižší pokles lze pozorovat u tyraminu, který činil pouze 25 %.



Obr. 12: Degradace biogenních aminů kmenem *Candida krusei* 7A21

5.2.4.2 Degradční schopnost kmene *Bacillus pumilus* 7B12

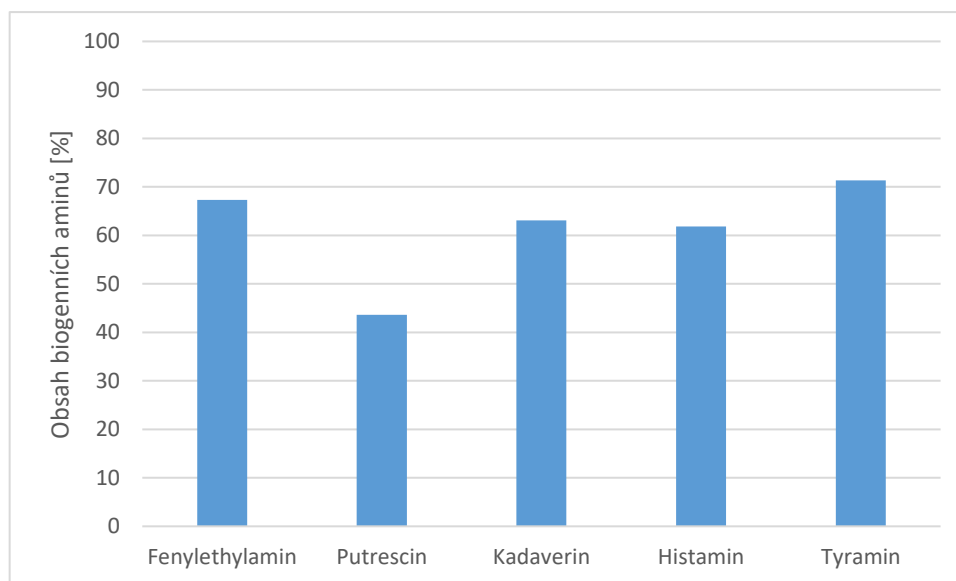
Kmen *Bacillus pumilus* 7B12 izolovaný z kysaného zelí z Tlumačova. Degradční schopnost tohoto kmene byla slabší. Nejvýraznější pokles BA byl zaznamenán u histaminu, který činil 21 %. Následoval kadaverin s poklesem o 13 % a fenylethylamin s poklesem o 12 %. Nejnižší pokles lze zpozorovat u tyraminu, kdy došlo k redukci pouze o 5 % a u putrescinu, kde byl pokles o 7 %



Obr. 13: Degradace biogenních aminů kmenem *Bacillus pumilus* 7B12

5.2.4.3 Degradční schopnost kmene *Brevibacillus parabrevis* 9A1

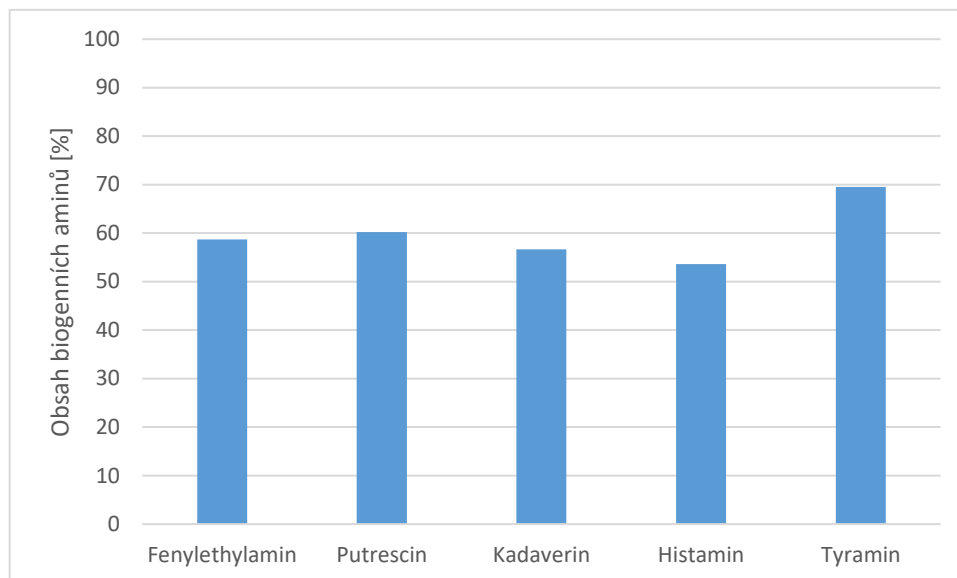
Kmen 9A1 izolovaný z kysaného zelí z Vlčkové byl identifikován jako *Brevibacillus parabrevis*. Tento kmen vykazoval průměrnou degradační aktivitu z obrázku (Obr. 14) lze upozorovat největší úbytek putrescinu, a to až o 56 %. Následuje histamin, který byl zredukován o 38 % a kadaverin s poklesem o 37 %. Nejnižší pokles byl zaznamenán u tyraminu, ten činil 29 % a u fenylethylaminu 33 %.



Obr. 14: Degradace biogenních aminů kmenem *Brevibacillus parabrevis* 9A1

5.2.4.4 Degradční schopnost kmene *Bacillus altitudinis* 9B11

„Kmen *Bacillus altitudinis* 9B11 byl izolován z kysaného zelí z Vlčkové. Tento kmen byl schopen degradovat většinu aminů z necelé poloviny. Největší pokles byl zaznamenán u histaminu, který činil 46 %. Kadaverin byl druhý nejlépe degradovaný amin tímto kmenem, jeho pokles byl o 43 %, následován fenylethylaminem s poklesem o 41 %. Putrescin byl zredukován ze 40 % Nejnižší pokles lze upozorovat u tyraminu, který byl snížen na 69 %.

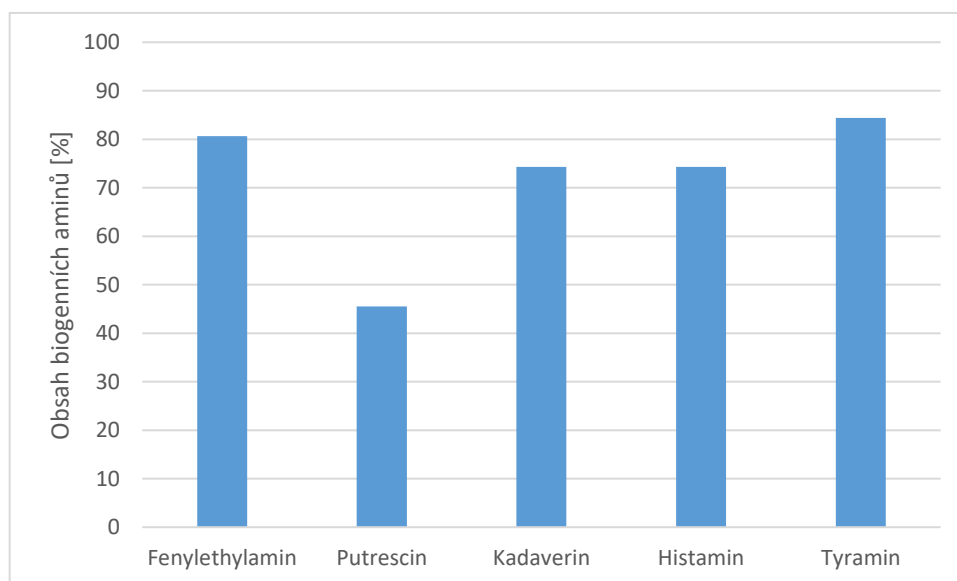


Obr. 15: Degradace biogenních aminů kmenem *Bacillus altitudinis* 9B11

5.2.5 Degradace biogenních aminů kmeny izolovanými ze cideru

5.2.5.1 Degradací schopnost kmene *Brevibacillus parabrevis* 10A1

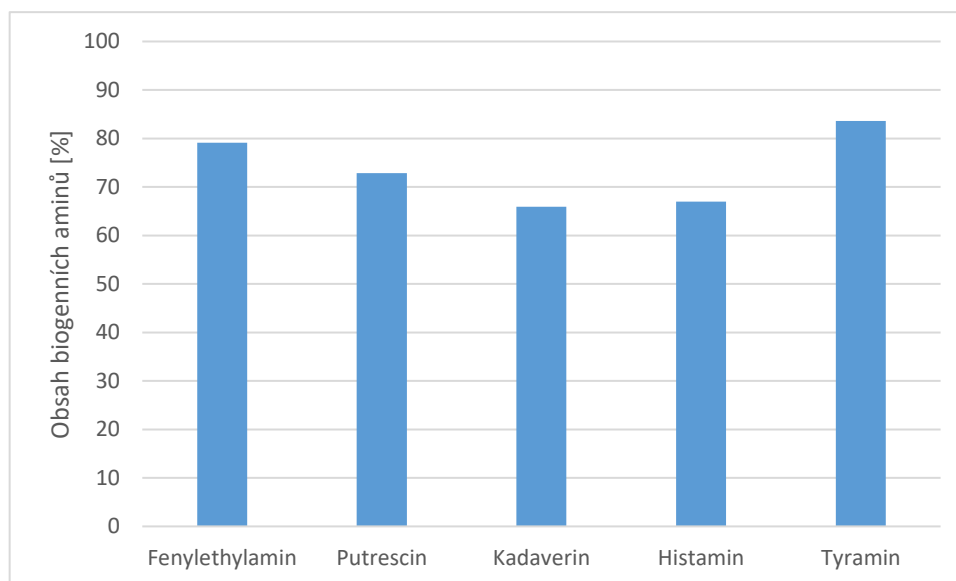
Kmen *Brevibacillus parabrevis* 10A1 byl izolován ze cideru. Z obrázku (Obr. 16) je patrný největší pokles putrescinu, a to o 55 %. Degradace dalších BA nebyla tak zřetelná jako putrescinu. Kadaverin i histamin byly zredukovány o 26 %. Nejnižší pokles byl zaznamenán u tyraminu, který činil 16 % a fenylethylaminu, kde došlo k poklesu o 19 %.



Obr. 16: Degradace biogenních aminů kmenem *Brevibacillus parabrevis* 10A1

5.2.5.2 Degradční schopnost kmene *Staphylococcus warneri* 10A12

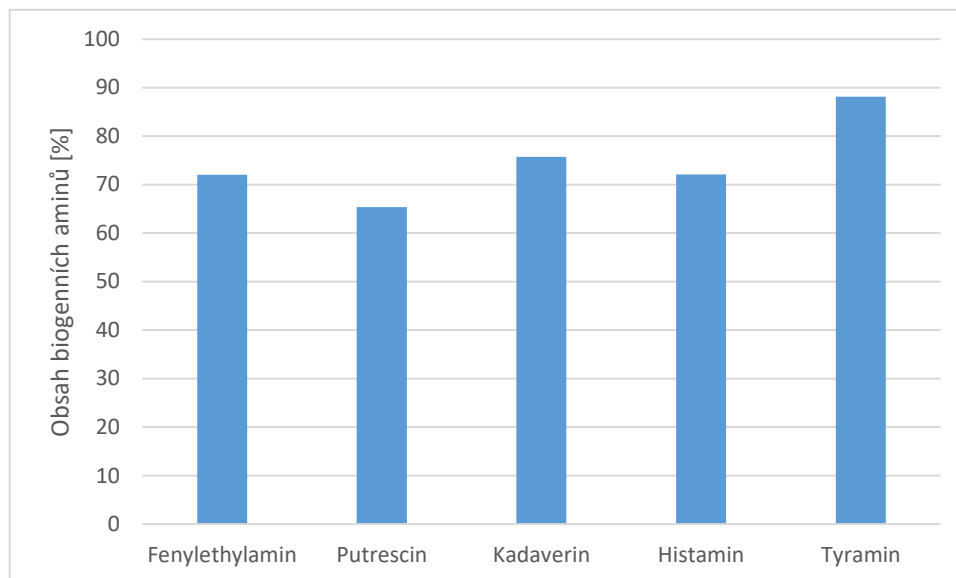
Kmen *Staphylococcus warneri* 10A12 byl izolován ze cideru. Z obrázku (Obr. 17) je patrný nižší úbytek testovaných aminů. Úbytek kadaverinu činil 34 %. Pokles histaminu byl 33 %. U putrescinu byl zaznamenán pokles o 27 %. Nejnižší pokles byl detekován u tyraminu, který byl zredukován pouze o 16 % a fenylethylaminu, který byl zredukován o 21 %.



Obr. 17: Degradace biogenních aminů kmenem *Staphylococcus warneri* 10A12

5.2.5.3 Degradční schopnost kmene *Paenibacillus amylolyticus* 10A3

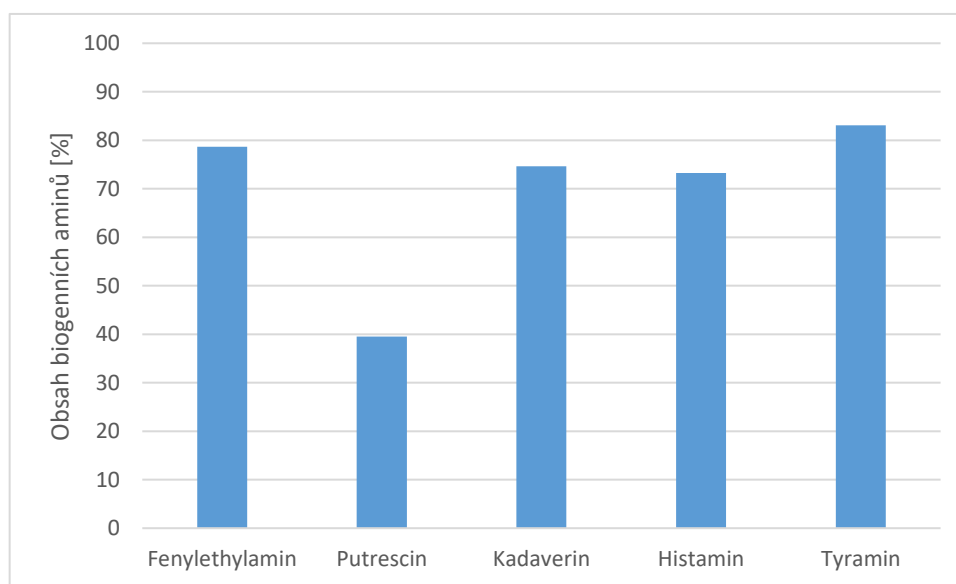
Kmen 10A3 izolovaný ze cideru byl identifikován jako *Paenibacillus amylolyticus*. Nejvýraznější pokles byl zaznamenán u putrescinu, a to 35 % (Obr. 18). Fenylethylamin a histamin byl zredukován o 28 %. U kadaverinu jsme mohli zaznamenat pokles o 24 %. Pokles tyraminu byl nejnižší, a to pouze 12 %.



Obr. 18: Degradace biogenních aminů kmenem *Paenibacillus amylolyticus* 10A3

5.2.5.4 Degradční schopnost kmene *Brevibacillus parabrevis* 10B1

Kmen 10B1 izolovaný ze cideru byl identifikován jako *Brevibacillus parabrevis*. Z obrázku (Obr. 19) je patrný nejvýraznější úbytek putrescinu, a to až o 61 %. Pokles ostatních BA nebyl tak výrazný. Histamin byl zredukován o 27 % a kadaverin o 25 %. Nejnižší pokles byl zaznamenán u tyraminu, a to 17 % a u fenylethylamin, kde byl zaznamenán pokles o 21 %.

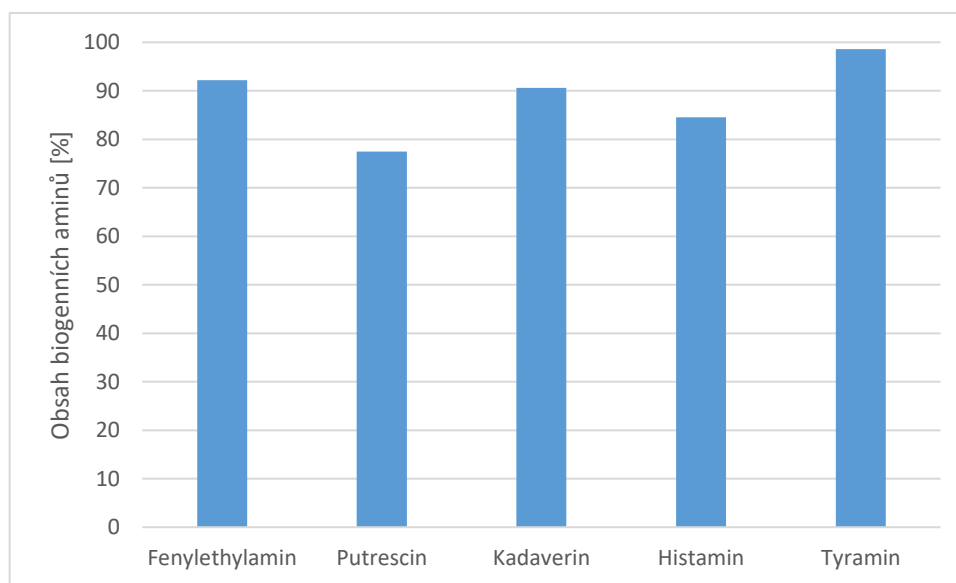


Obr. 19: Degradace biogenních aminů kmenem *Brevibacillus parabrevis* 10B1

5.2.6 Degradace biogenních aminů kmeny izolovanými z kimči

5.2.6.1 Degradční schopnost kmene *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* 11A13

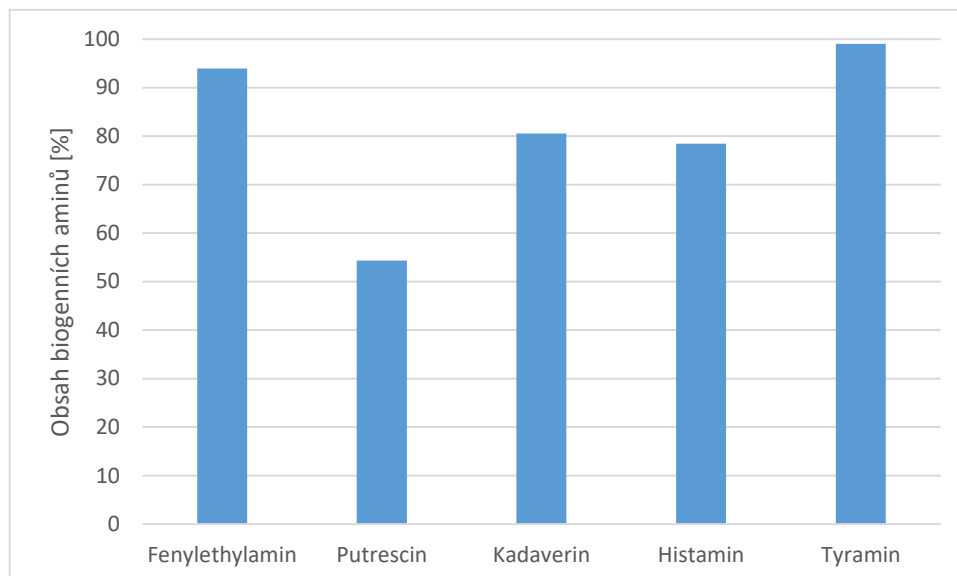
Kmen *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* 11A13 byl izolován z kimči. Z obrázku (Obr. 20) je patrná nízká degradační schopnost tohoto kmene. Největší pokles byl zaznamenán u putrescinu, který byl zredukován o 23 % a u histaminu, jehož pokles činil 15 %. Kadaverin byl zredukován o 9 % a fenylethylamin o 8 %. Úplně nejnižší pokles lze zaznamenat u tyraminu, který byl snížen pouze o 1 %.



Obr. 20: Degradace biogenních aminů kmenem *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* 11A13

5.2.6.2 Degradční schopnost kmene *Lysinibacillus sphaericus* 11B1

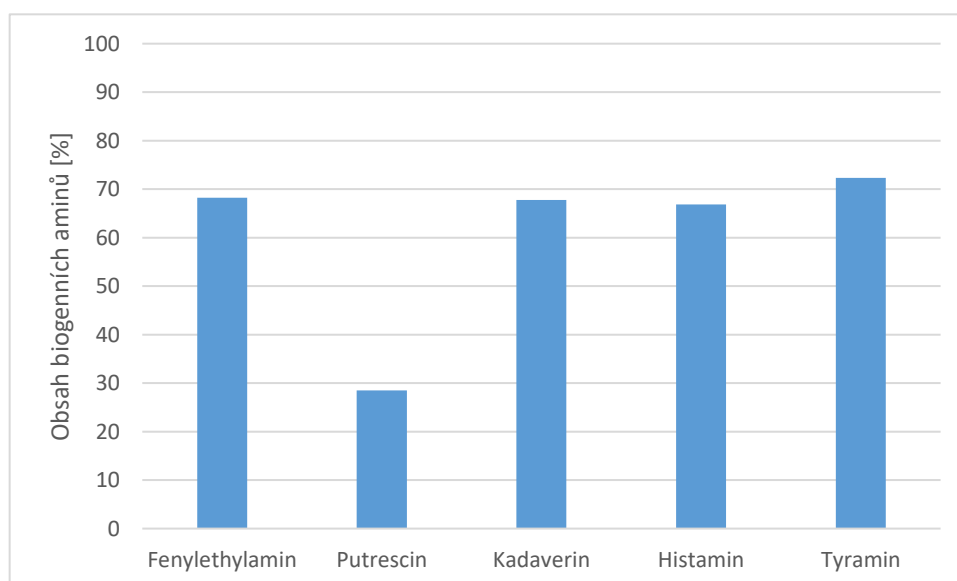
Kmen *Lysinibacillus sphaericus* 11B1 byl izolován z kimči. Nejvýraznější pokles lze pozorovat u putrescinu, který činil 46 %. U ostatních BA nebyla zjištěná redukce již tak znatelná. Histamin byl zredukován o 22 %, kadaverin o 19 % a fenylethylamin o 6 %. U tyminu nebyl pokles téměř zaznamenán (méně než 1 %).



Obr. 21: Degradace biogenních aminů kmenem *Lysinibacillus sphaericus* 11B1

5.2.6.3 Degradční schopnost kmene *Brevibacillus parabrevis* 11B2

Kmen *Brevibacillus parabrevis* 11B2 byl izolován z kimči. Z obrázku (Obr. 22) je patrná nejvýraznější degradace putrescinu, který byl zredukován až o 72 %. Degradace ostatních BA nebyla již tak rapidní. U histaminu byl zaznamenán pokles o 33 %. Kadaverin a fenylethylamin byly zredukovány na 68 %. Nejnižší pokles byl zaznamenán u tyraminu, který činil 28 %.

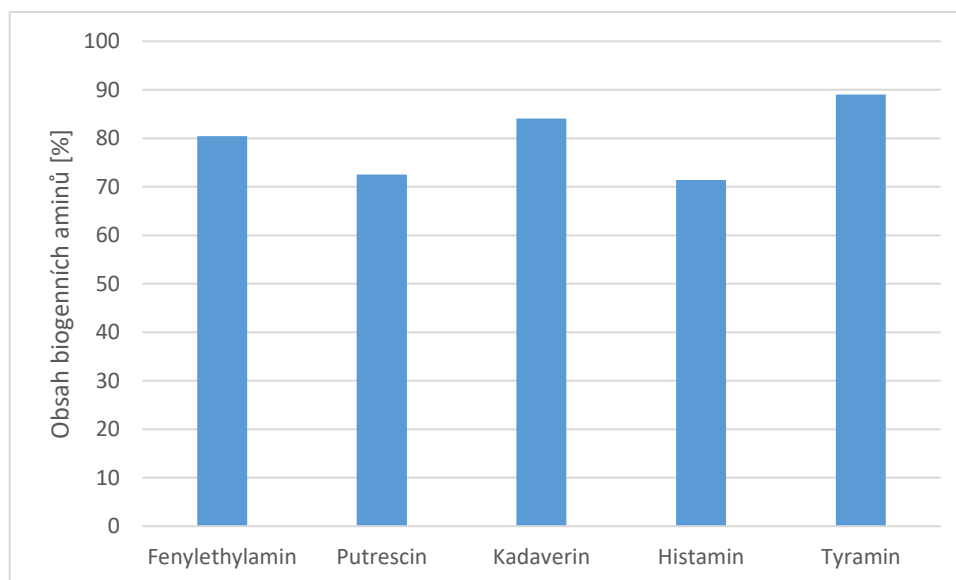


Obr. 22: Degradace biogenních aminů kmenem *Brevibacillus parabrevis* 11B2

5.2.7 Degradace biogenních aminů kmeny izolovanými ze shiro miso

5.2.7.1 Degradční schopnost kmene *Bacillus cereus* 12B22

Kmen 12B22 izolovaný ze shiro miso byl identifikován jako *Bacillus cereus*. Nejvýraznější pokles koncentrace byl zaznamenán u histaminu, a to o 29 % a u putrescinu, jehož pokles činil 28 %. Koncentrace fenylethylaminu byla snížena o 20 % a koncentrace kadaverinu o 16 %. Nejnižší pokles byl zaznamenán u tyraminu, který činil pouze 11 %.

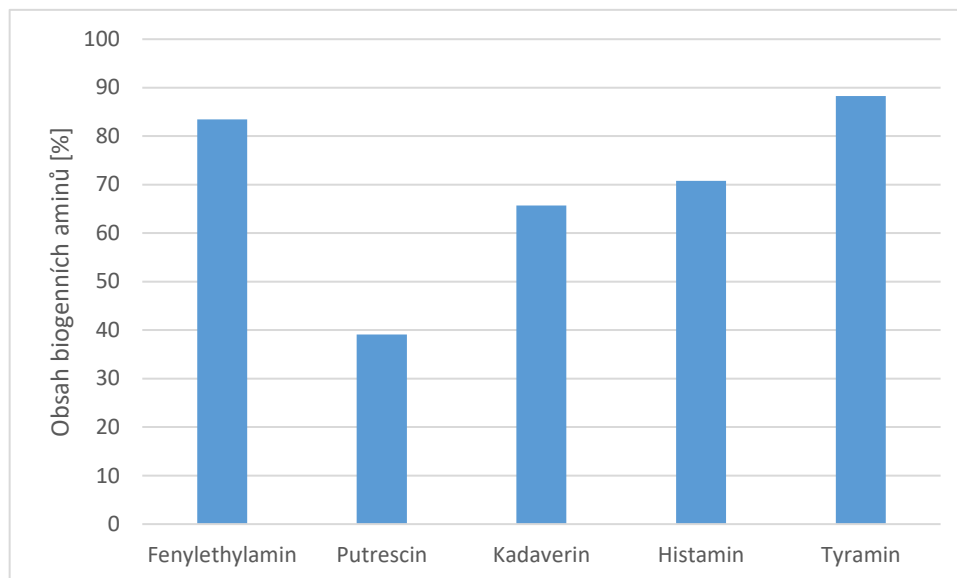


Obr. 23: Degradace biogenních aminů kmenem *Bacillus cereus* 12B22

5.2.8 Degradace biogenních aminů kmeny izolovanými z tempehu

5.2.8.1 Degradční schopnost kmene *Brevibacillus parabrevis* 13A21

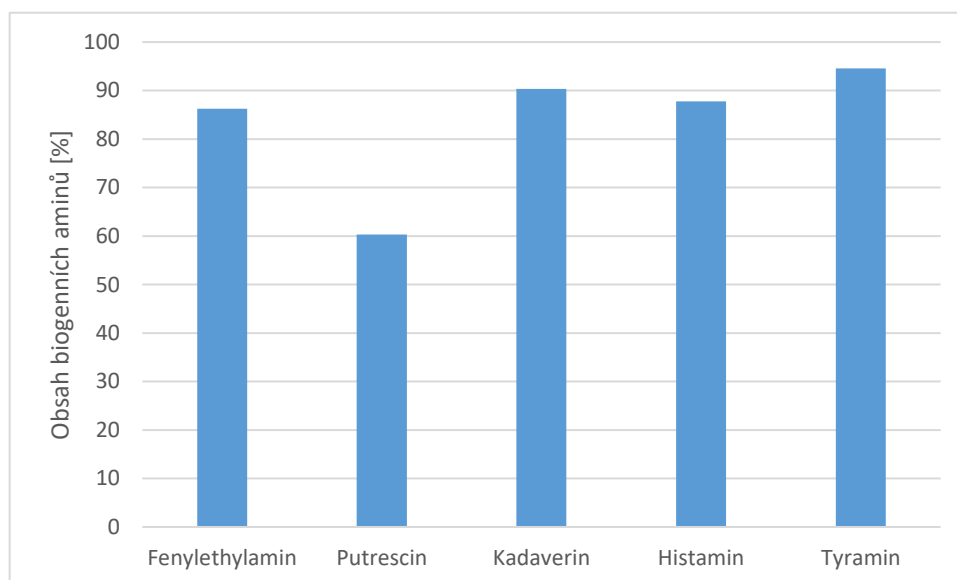
Kmen 13A21 izolovaný z tempehu byl identifikován jako *Brevibacillus parabrevis*. Z obrázku (Obr. 24) lze postřehnout největší úbytek putrescinu, který byl snížen o 61 %. Koncentrace kadaverinu byla snížena o 34 % a koncentrace histaminu o 29 %. Fenylethylamin byl zredukován o 17 %. Úbytek tyraminu byl nejnižší, pokles činil pouze 12 %.



Obr. 24: Degradace biogenních aminů kmenem *Brevibacillus parabrevis* 13A21

5.2.8.2 Degradční schopnost kmene *Microbacterium lacticum* 13A22

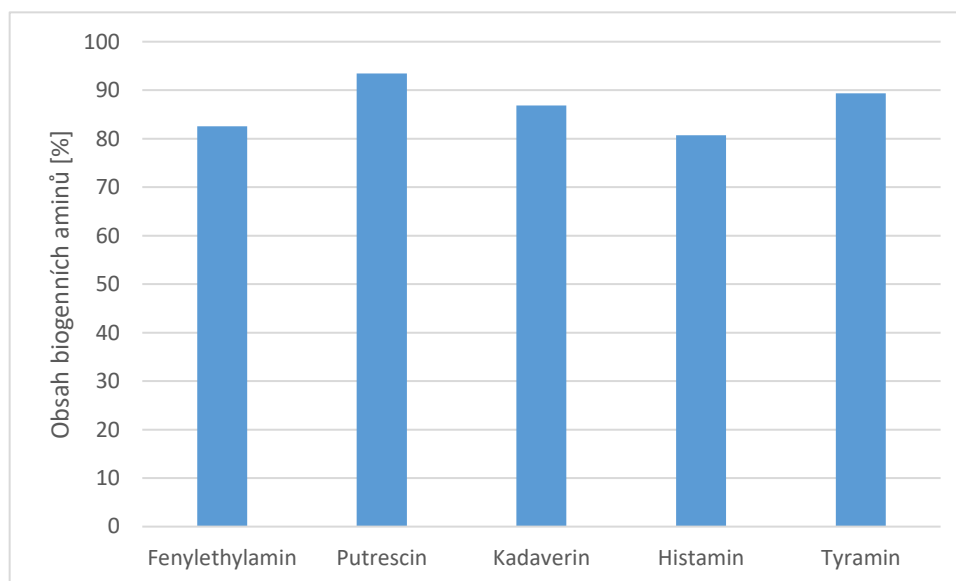
Kmen *Microbacterium lacticum* 13A22 byl izolován z tempehu. Tento kmen nejlépe degradoval putrescin, u kterého byl zaznamenán pokles o 40 % (Obr. 25). Degradace ostatních BA nebyla již tak výrazná. Pokles u fenylethylaminu činil 14 % a u histaminu 12 %. Nejnižší pokles byl zaznamenán u tyraminu a to o 5 % a u kadaverinu o 10 %.



Obr. 25: Degradace biogenních aminů kmenem *Microbacterium lacticum* 13A22

5.2.8.3 Degradční schopnost kmene *Bacillus pumilus* 13A31

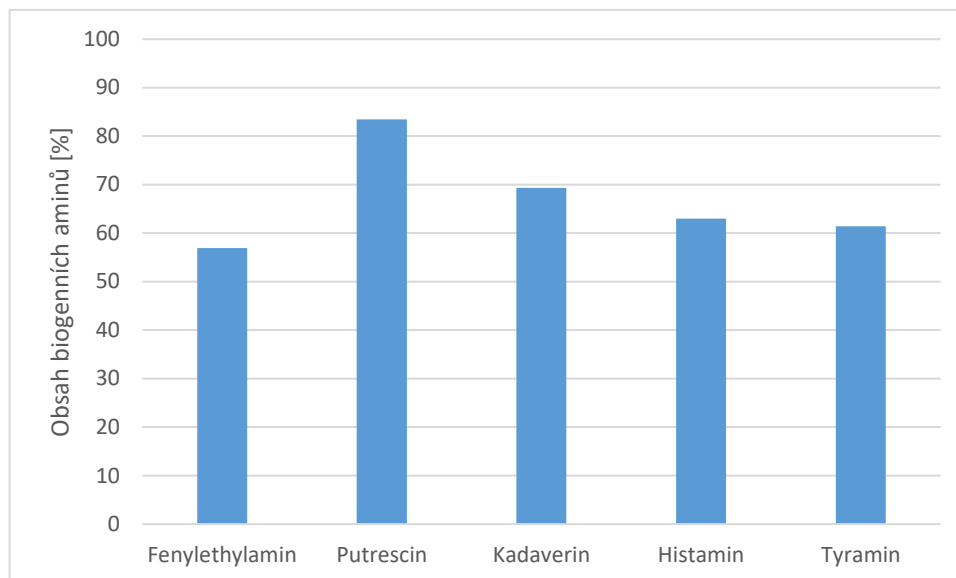
Kmen 13A31 izolovaný z tempehu byl identifikován jako *Bacillus pumilus*. Z obrázku (Obr. 26) je zřejmá nižší degradační schopnost tohoto kmene. Nejvíce zredukovanými BA byly histamin, kde pokles činil 19 %, fenylethylamin s poklesem o 17 %, kadaverin, kde byl detekován pokles o 13 % a tyramin, který byl zredukován o 11 %. Nejnižší pokles koncentrace byl zaznamenán u putrescinu, konkrétně 7 %.



Obr. 26: Degradace biogenních aminů kmenem *Bacillus pumilus* 13A31

5.2.8.4 Degradční schopnost kmene *Staphylococcus epidermidis* 13B21

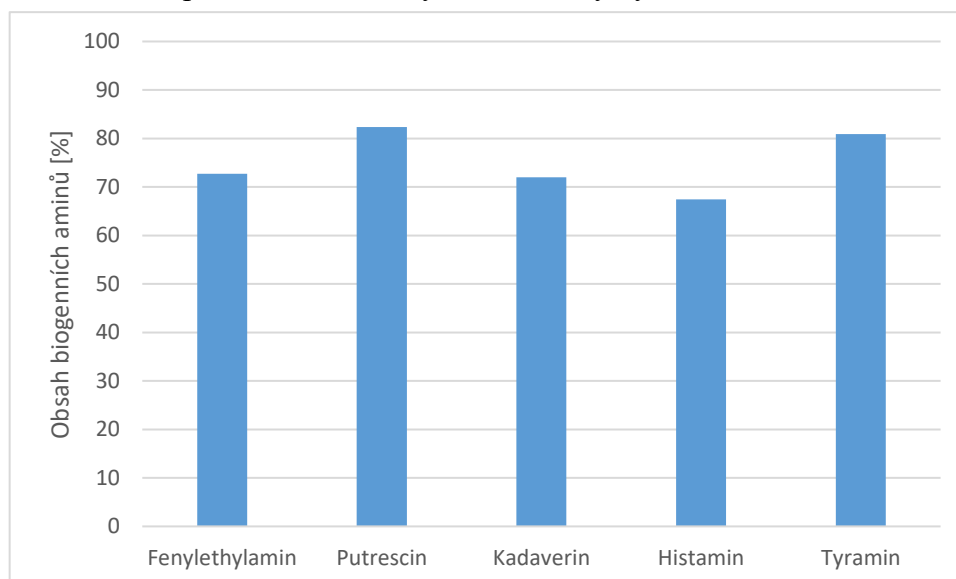
Kmen 13B21 izolovaný z tempehu byl identifikován jako *Staphylococcus epidermidis*. Většina BA byla tímto izolátem zredukována více jak o třetinu (Obr. 27). Konkrétně se jedná o fenylethylamin, který byl zredukován o 43 %, tyramin o 39 % a histamin o 37 %. Koncentrace kadaverinu byla snížena o 31 %. Nejméně degradovaným aminem byl putrescin, jehož pokles byl pouze 17%.



Obr. 27: Degradace biogenních aminů kmenem *Staphylococcus epidermidis* 13B21

5.2.8.5 Degradční schopnost kmene *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* 13B23

Kmen *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* 13B23 byl izolován z tempehu. Z obrázku (Obr. 28) je zjevné, že tento kmen má poměrně nízkou degradační schopnost. Degradace je ale znatelnější oproti obdobnému kmenu *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* 11A13. Mezi nejvíce degradovanými BA byly histamin s poklesem o 33 %, kadaverin s poklesem o 28 % a fenylethylamin s poklesem o 27 %. Nejnižší degradace byla poté zaznamenána u putrescinu, který byl zredukován pouze o 18 % a u tyraminu, který byl zredukován o 17 %.

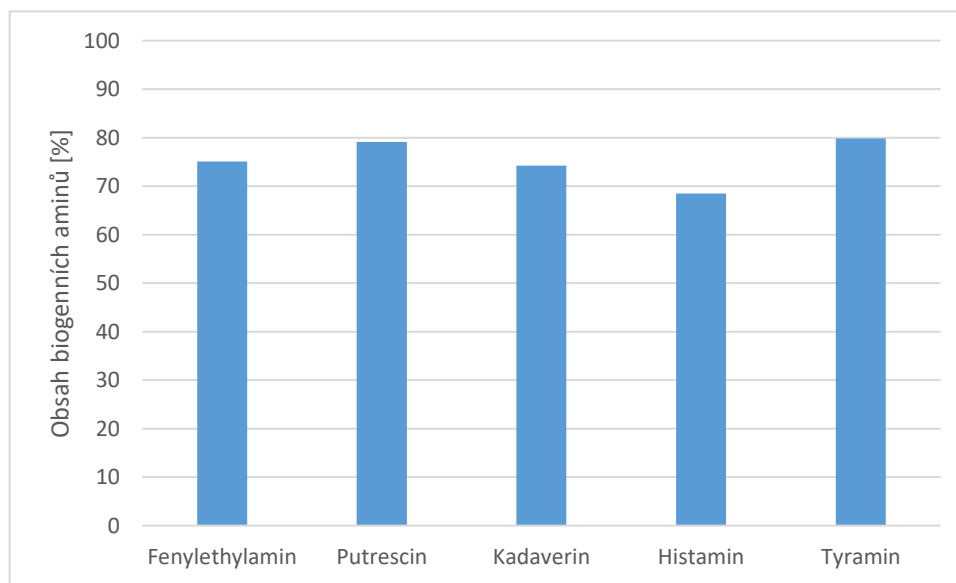


Obr. 28: Degradace biogenních aminů kmenem *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* 13B23

5.2.9 Degradace biogenních aminů kmeny izolovanými z mléčně kvašené zeleniny

5.2.9.1 Degradční schopnost kmene *Klebsiella oxytoca* 14A1

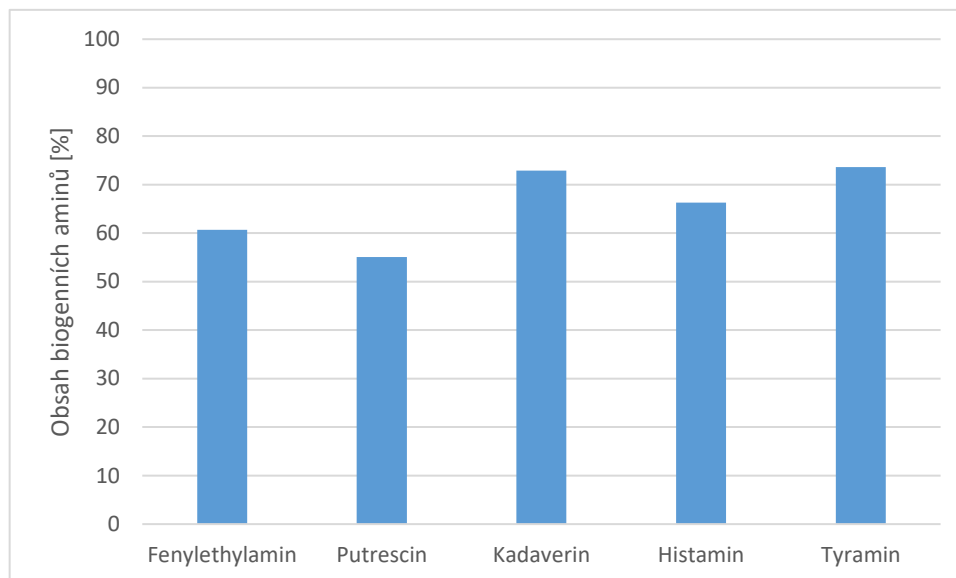
Kmen *Klebsiella oxytoca* 14A1 byl izolován z mléčně kvašené zeleniny. Koncentrace všech BA byla snížena méně než o třetinu (Obr. 29). Nejvíce byl redukován histamin, konkrétně o 32 %. Koncentrace kadaverinu byla snížena o 26 % a fenylethylaminu o 25 %. Nejnižší pokles byl zaznamenán u tyraminu, který činil 20 % a u putrescinu, jehož pokles činil 21 %.



Obr. 29: Degradace biogenních aminů kmenem *Klebsiella oxytoca* 14A1

5.2.9.2 Degradční schopnost kmene *Brevibacillus parabrevis* 14A2

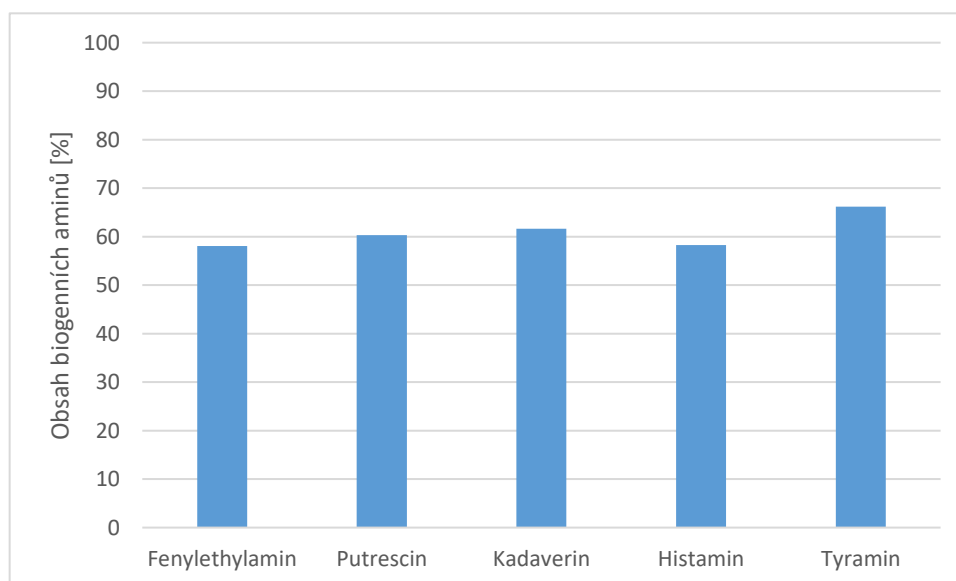
Kmen 14A2 izolovaný z mléčně kvašené zeleniny byl identifikován jako *Brevibacillus parabrevis*. Degradční schopnost je podobná jako u kmene *Brevibacillus parabrevis* 9A1. Největší pokles byl zaznamenán u putrescinu, konkrétně 45 %. Obsah fenylethylaminu byl snížen o 39 % a histaminu o 34 %. Koncentrace kadaverinu byla snížena pouze o 27 % a koncentrace tyraminu o 26 %.



Obr. 30: Degradace biogenních aminů kmenem *Brevibacillus parabrevis* 14A2

5.2.9.3 Degradční schopnost kmene *Candida krusei* 14B21

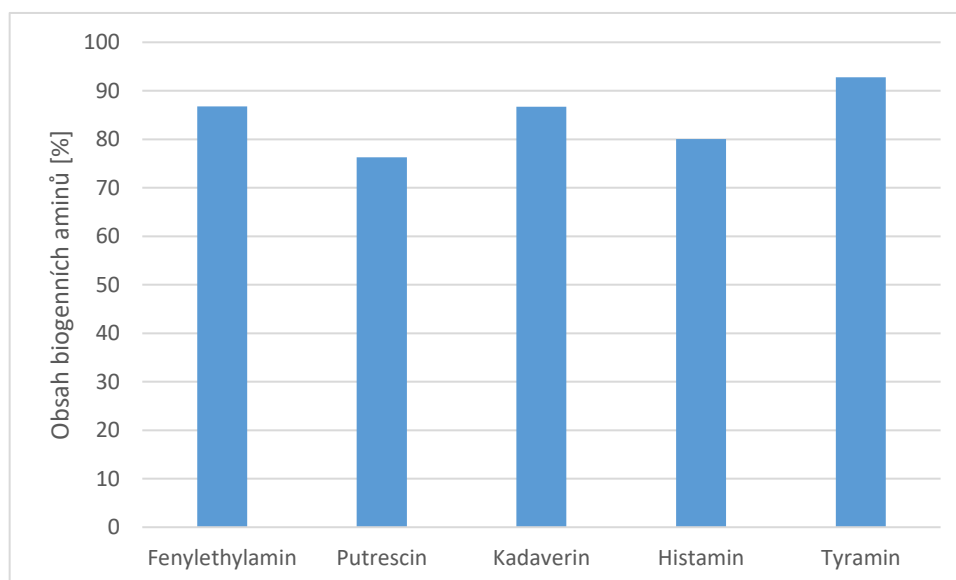
Izolát 14B21 izolovaný z mléčně kvašené zeleniny byl identifikován jako kvasinka *Candida krusei*. Všechny sledované BA byly zredukovány více jak o třetinu (Obr. 31). Největší pokles koncentrace byl zaznamenán u fenylethylaminu a histaminu, konkrétně až o 42 %. Obsah putrescinu byl snížen o 40 % a obsah kadaverinu o 38 %. Nejnižší degradace byla zaznamenána u tyraminu, kde pokles činil 34 %.



Obr. 31: Degradace biogenních aminů kmenem *Candida krusei* 14B21

5.2.9.4 Degradční schopnost kmene *Bacillus cereus* 14B22

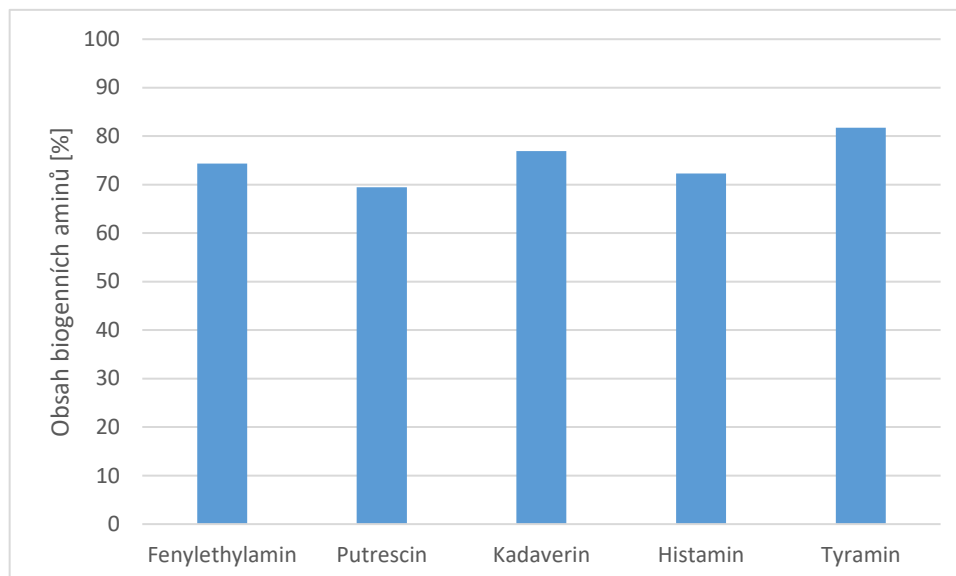
Kmen *Bacillus cereus* 14B22 byl izolován z mléčně kvašené zeleniny. Z obrázku (Obr. 32) je očividné, že tento kmen má nízkou degradační schopnost. Degradace BA byla nižší oproti kmenu téhož druhu (*B. cereus* 12B22). Nejvýraznější pokles byl zaznamenán u putrescinu, který činil 24 %. Koncentrace histaminu byla snížena o 20 %. Fenylethylamin a kadaverin byly zredukovány o 13 %. Nejnižší úbytek byl zaznamenán u tyraminu, konkrétně 7 %.



Obr. 32: Degradace biogenních aminů kmenem *Bacillus cereus* 14B22

5.2.9.5 Degradční schopnost kmene *Lysinibacillus sphaericus* 14B33

Kmen 14B33 izolovaný z mléčně kvašené zeleniny byl identifikován jako *Lysinibacillus sphaericus*. Degradace jednotlivých BA tímto kmenem je poměrně rovnoměrná (Obr. 33). Největší pokles koncentrace byl pozorován u putrescinu, který činil 31 %. Obsah histaminu byl zredukován o 28 %, obsah fenylethylaminu o 26 % a obsah kadaverinu o 23 %. Nejnižší degradace byla zaznamenána u tyraminu s poklesem o 18%.



Obr. 33: Degradace biogenních aminů kmenem *Lysinibacillus sphaericus* 14B33

5.2.10 Porovnání degradační schopnosti izolovaných degradérů

Největší degradační schopnost vykazoval kmen *Pseudomonas protegens* 6B12, který průměrně snížil koncentraci všech BA minimálně o 78 %. Největší míra degradace byla zaznamenána u putrescinu, který byl zredukován až o 89 %.

Druhým nejlepším degradérem byla rovněž gramnegativní bakterie, a to izolát identifikovaný jako *Acinetobacter calcoaceticus* 6A1, který průměrně zredukoval obsah všech biogenních aminů o 62 %. Konkrétně byl zaznamenán největší pokles koncentrace putrescinu, který činil až 80 %.

Značná část degradérů nejlépe využívala jako zdroj energie putrescin, konkrétně až 18 kmenů. Naopak nejméně degradovaným BA byl tyramin, kde až u 22 kmenu byl zaznamenán nejnižší pokles koncentrace.

6 DISKUZE

Biogenní aminy jsou dusíkaté sloučeniny s nízkou molekulární hmotností, které se nachází ve většině fermentovaných potravin, jako jsou sýry, mléčné výrobky, ryby, maso, víno a pivo. Tyto biologicky produkováné aminy jsou nezbytné v nízkých koncentracích pro normální metabolické a fyziologické funkce u zvířat, rostlin a mikroorganismů. BA však mohou mít také nepříznivé účinky. Spotřeba potravin a nápojů s vysokým obsahem aminů může mít nežádoucí účinky na lidský organismus, které mohou být závažnější u citlivých spotřebitelů se sníženou aktivitou enzymů mono- a diamonooxidasu. Tyto enzymy katalyzují oxidační deaminaci BA. Enzymatické odstraňování aminů může tak být bezpečným způsobem, jak tyto problematické sloučeniny odstranit z potravin. [37]

Exogenní BA jsou produkovány pomocí dekarboxylas vylučovaných mikroorganismů, které jsou přirozeně přítomny v potravinách. Jedná o kontaminanty nebo jsou přidávány do potravin jako startovací kultury. Enzymatický dekarboxylační proces závisí na různých faktorech, jako jsou dostupnost substrátu ve volné formě, přítomnost mikroorganismů produkujících dekarboxylasu a podmínky prostředí (pH, teplota, O₂ atd.). Volné aminokyseliny jsou buď přirozeně přítomné v potravině, nebo jsou produkovány proteolýzou, jak endogenními proteasami v surových produktech, tak mikrobiálními enzymy. Ve skutečnosti může proteolýza hrát důležitou roli při uvolňování volných aminokyselin z tkáňových proteinů, které poskytují substrát pro dekarboxylasové reakce. [40]

Nejvyšší množství BA jsou přítomna ve fermentovaných potravinách a nápojích, zejména v potravinách bohatých na bílkoviny, peptidy nebo aminokyseliny, např. ryby a rybí výrobky, maso a masné výrobky, vejce, sýry, fermentovaná zelenina, ovoce, ořechy, čokoláda, sójové produkty a víno. Také zpracování a aditiva mohou ovlivnit tvorbu BA v potravinách, například BA jsou sloučeniny, které jsou stabilní vůči teplu, a jejich úroveň není při vysokoteplotním zpracování významně snížena. Vzhledem k tomu, že mikrobiální znehodnocení potravin může být doprovázeno zvýšenou produkcí dekarboxyláz, přítomnost BA by mohla sloužit jako užitečný ukazatel znehodnocení potravin. [41]

Cílem tohoto experimentu bakalářské práce bylo izolovat z potravinových matric rostlinného původu mikroorganismy se schopností degradovat tyto sloučeniny a poté tyto mikroorganismy identifikovat. Jejich izolace byla uskutečněna pomocí kultivace v minerálním médiu, v kterém představovaly jediný zdroj dusíku a uhlíku právě přidané BA. Identifi-

kace byla provedena pomocí metody MALDI-TOF MS. Hmotnostní spektrometrie je založena na rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností v elektrickém/magnetickém poli.[42]

Pomocí této metody se podařilo identifikovat 29 kmenů. Jedná se zejména o zástupce gramnegativních rodů *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Pseudomonas*, grampozitivních rodů *Lysinibacillus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, a kvasinky rodu *Candida*.

Řada studií se již zabývala izolací mikroorganismů s degradační schopností biogenních aminů z potravin. Například ze solených ryb bylo izolováno 8 různých mikroorganismů s touto schopností. U kmene *Bacillus polymyxa* se podařilo během 24 h snížit obsah histaminu až o 100 %. *Bacillus subtilis* snížil koncentraci histaminu o 74 % a *Bacillus cereus* o 52 %. [30] Námi izolovaný kmen *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* 13B23 získaný z tempehu byl schopen snížit koncentraci histaminu o 33 % a kmen *Bacillus cereus* 12B22 izolovaný ze shiro miso byl schopen snížit koncentraci histaminu o 29 %. Z červeného vína se povedlo izolovat kmen *Bacillus cereus* 2B12, který měl vysokou predispozici k degradaci putrescinu, jeho koncentrace se snížila až o 73 %.

V bakalářské práci Vítkové [43] byla rovněž sledovaná degradační schopnost u kmene *Bacillus subtilis*, *Bacillus altitudinis* a *Bacillus pumilus* v průběhu 72 hodin. Jako nejlepší degradér se projevil *Bacillus subtilis*, který zredukoval putrescin ze 100 % původního množství, histamin z 97 %, kadaverin z 92 %, tyramin z 40 % a fenylethylamin z 35 %. Náš izolovaný kmen *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* 13B23 vykazoval nižší predispozici k degradaci BA, konkrétně zredukoval histamin o 33 %, kadaverin o 28 %, fenylethylamin o 27 %, putrescin o 18 % a tyramin o 17 %. *Bacillus altitudinis* vykazoval nižší degradační schopnost, konkrétně snížil koncentraci tyraminu o 36 %, fenylethylaminu o 31 %, putrescinu o 26 %, kadaverinu o 24 % a u histaminu o 18 %. Námi izolovaný kmen *Bacillus altitudinis* 9B11 z kysaného zelí vykazoval vyšší degradační schopnost. Většinu BA zredukoval více než o třetinu, konkrétně obsah histaminu se snížil o 46 %, obsah kadaverinu o 43 %, fenylethylaminu o 41 %, putrescinu o 40 % a obsah tyraminu o 31 %. Kmen *Bacillus pumilus* byl schopen snížit koncentraci putrescinu a tyraminu až o 36 %, koncentrace fenylethylaminu a kadaverinu byla snížena o 28 % a koncentrace histaminu o 21 %. Námi izolovaný kmen *Bacillus pumilus* 13A31 z tempehu měl nižší degradační schopnost. Nejvíce degradoval histamin z 19 %, poté fenylethylamin z 17 %. Koncentrace kadaverinu se snížila o 13 %, koncentrace tyraminu o 11 % a koncentrace putrescinu o 7 %.

V jiné studii se podařilo izolovat ze solené a fermentované sardelky kmen *Staphylococcus xylosum*, který dokázal snížit koncentraci histaminu až o 38 %, mírně také degradoval tyramin, ale ne významně, konkrétně o 4 %. [44] V experimentu se podařilo izolovat kmen *Staphylococcus warneri* 10A12 z cideru, který byl schopen redukovat koncentraci histaminu o 33 % a obsah tyraminu o 16 %. Z tempehu byl izolován kmen *Staphylococcus epidermidis* 13B21, který nejlépe degradoval fenylethylamin, a to až o 43 %, koncentrace histaminu byla snížena o 37 % a koncentrace tyraminu o 39 %.

V rámci experimentu, kdy byla také ověřována degradační schopnost izolovaných kmenů pomocí HPLC/UV, se jako nejlepší degradér projevil kmen *Pseudomonas protegens* 6B12. Koncentraci BA dokázal redukovat více jak o polovinu. Měl predispozici především pro degradaci putrescinu, jehož obsah poklesl až o 89 %. Druhým dobře degradojícím kmenem byl *Acinetobacter calcoaceticus* 6A1 izolovaný z moruší. Pomocí tohoto izolátu byl opět nejlépe degradován putrescin, jehož množství bylo sníženo až o 80 %. Ve studii Butor a kol. [45] byl izolován kmen *Acinetobacter pitii* ze zrajícího sýru, u něhož byla rovněž potvrzena degradační schopnost. Koncentraci BA byl schopen snížit zhruba o jednu čtvrtinu, nejlépe však degradoval tyramin, konkrétně o 37 %.

Z dosažených výsledků lze vydedukovat, že využití mikroorganismů s degradační schopností má v potravinářském průmyslu budoucnost. Mnohdy nelze u potravin použít jiné preventivní faktory, které by dostatečně bránily vzniku BA. Bakterie *Pseudomonas protegens*, která vykazovala v této studii nejlepší degradační schopnosti, se řadí mezi aerobní gramnegativní bakterie. Jedná se o typicky půdní mikroorganismus s extrémně všestranným metabolismem, který může osidlovat kořeny různých druhů rostlin. Kromě toho bylo také izolováno a charakterizováno mnoho kmenů rodu *Pseudomonas* podporujících růst rostlin. Tyto bakterie tak poskytují příznivé prostředí pro produktivitu rostlin zlepšením dostupnosti a asimilace živin. [46] Zmíněný kmen byl v této studii izolován z moruší, takže jeho přítomnost není neobvyklá. Kmen *Pseudomonas protegens* byl studován zejména pro vlastnosti biokontroly. [47] Jeho využití v potravinářství prozatím není prozkoumáno. *Acinetobacter calcoaceticus* je striktně aerobní gramnegativní kokobacilus vyskytující se v půdě a může být také součástí normální lidské střevní mikroflóry. Může být patogenní a způsobit oportunní infekci u pacientů s jinými onemocněními, proto by aplikace této bakterie v potravinářství vyžadovala další výzkum. Mnoho výzkumů se nyní zaměřuje na využití metod DNA fingerprintingu, včetně analýzy plazmidových profilů, kde se právě mohou vyskytovat geny zodpovědné za produkci virulentních faktorů nebo genů pro rezistenci na antibiotika.

[48] Z tohoto důvodu bude třeba kmeny s potenciální degradační aktivitou, které se nevyužívají v potravinářství jako startovací kultury nebo i jinak, otestovat, tak aby u nich byly vyloučeny nežádoucí faktory, jako je produkce faktorů virulence, toxinů, rezistence na antibiotika, apod.

Navíc, pokud by u těchto kmenů byla potvrzena absence produkce virulentních a dalších nežádoucích faktorů, bude třeba otestovat jejich degradační aktivitu v modelových vzorcích potravin. V potravinách se totiž tyto kmeny mohou chovat jinak, než je tomu v laboratorních podmínkách v prostředí bujónu, kde přeci jen nemusí překonávat tolik překážek, jako tomu může být v potravinách. V potravinách jejich degradační aktivita může být nižší, ale i vyšší, než tomu bylo v bujónu v závislosti na vlastnostech kmene, ale i potraviny.

7 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá biogenními aminy. Cílem praktické části bylo z potravinových matric izolovat mikroorganismy degradující biogenní aminy a následně je identifikovat. Součástí také bylo prověřit degradační schopnost izolovaných kmenů.

Na základě získaných výsledků můžeme říci, že:

- ❖ ze 14 různých potravinových matric se nám podařilo izolovat až 65 degradérů biogenních aminů, což naznačuje relativně vysoký výskyt mikroorganismů využívající biogenní aminy jako zdroj energie (především uhlíku a dusíku),
- ❖ pomocí metody MALDI TOF-MS se zdařilo identifikovat 29 kmenů,
- ❖ pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí byla u všech 29 izolovaných kmenů potvrzena degradační schopnost,
- ❖ nejlépe degradovaným biogenním aminem byl putrescin,
- ❖ problematicky využívaným biogenním aminem se jevil tyramin,
- ❖ nejlepší degradační schopnost vykazoval kmen *Pseudomonas protegens* 6B12. Degradoval 89 % putrescinu, 86 % tyraminu, 78 % histaminu, 73 % kadaverinu a 66 % fenylethylaminu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. 1. vyd. Tábor: Osis, 1999. 368 s. ISBN 80-902391-5-3.
- [2] ASKAR, Ahmed a Hans TREPTOW. *Biogene Amine in Lebensmitteln: Vorkommen, Bedeutung und Bestimmung*. Stuttgart: E. Ulmer, c1986. ISBN 3800121328.
- [3] SILLA SANTOS, H. M. *Biogenic amines: their importance in foods*. International Journal of Food Microbiology, roč. 29, 1996, s. 213-231. ISSN 0168-1605.
- [4] ROGINSKI, H.; FUQUAY, J.W.; FOX, P.F. *Encyclopedia of dairy sciences*. London: Academic press, 2002. ISBN 0-12-227235-8.
- [5] KALAC, P.; KRÍŽEK, M. Biogenní aminy a polyaminy v potravinách a jejich vliv na lidské zdraví. *Potravinářská Revue*, 2005, 2, 40-42.
- [6] MOINARD, C, L CYNOBER a J DEBANDT. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition* [online]. 2005, 24(2), 184-197 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1016/j.clnu.2004.11.001. ISSN 02615614. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261561404001967>
- [7] IDAL-CAROU, M, M LATORRE-MORATALLA a Sara BOVER-CID. Biogenic Amines. NOLLET, Leo a Fidel TOLDRÁ, ed. *Safety Analysis of Foods of Animal Origin* [online]. CRC Press, 2010, 2010-09-02, s. 399-420 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1201/EBK1439848173-14. ISBN 978-1-4398-4817-3. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/EBK1439848173-14>
- [8] FERNANDES, Christian a Maria GLORIA. Bioactive Amines. NOLLET, Leo a Fidel TOLDRA, ed. *Handbook of Food Analysis, Third Edition - Two Volume Set* [online]. CRC Press, 2015, 2015-06-10, Vol II-301-Vol II-328 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1201/b18668-56. ISBN 978-1-4665-5654-6. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/b18668-56>
- [9] HOZA, Ignác, Pavel BUDINSKÝ a Daniela SUMCZYNSKI. *Potravinářská biochemie III*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2006, 123 s. Učební texty vysokých škol. ISBN 80-7318-396-X.
- [10] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. 2. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-86659-01-1.

- [11] SANTOS, M.H.Silla. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1996, 29(2-3), 213-231 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1016/0168-1605(95)00032-1. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168160595000321>
- [12] Chong, C.Y.; Abu Bakar, F.; Russly, A.R.; Jamilah, B.; Mahyudin, N.A. The effects of food processing on biogenic amines formation. *Int. Food Res. J.* 2011, 18, 867–876.
- [13] Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogues, M.T., Izquierdo-Pulido, M., and Vidal-Carou, M.C. (2003a). Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. *J. Food Sci.* **68**: 750–755.
- [14] MARTINEZ-VILLALUENGA, C., E. PEÑAS, J. FRIAS, E. CISKA, J. HONKE, M.K. PISKULA, H. KOZLOWSKA a C. VIDAL-VALVERDE. Influence of Fermentation Conditions on Glucosinolates, Ascorbigen, and Ascorbic Acid Content in White Cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata cv. Taler) Cultivated in Different Seasons. *Journal of Food Science* [online]. 2009, **74**(1), C62-C67 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2008.01017.x. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2008.01017.x>
- [15] Holzapfel, W., Schillinger, U., & Buckenhüskes, H. J. (2003). *Sauerkraut*. In E. R. Farnworth (Ed.). *Handbook of fermented functional foods* (pp. 343–359). Boca Raton, FL: CRC Press
- [16] KALAC, P. Changes in biogenic amine concentrations during sauerkraut storage. *Food Chemistry* [online]. **69**(3), 309-314 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1016/S0308-8146(99)00273-3. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814699002733>
- [17] LONVAUD-FUNEL, Aline. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2001, **199**(1), 9-13 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10643.x. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10643.x>
- [18] LANDETE, José M., Sergi FERRER, Lucía POLO a Isabel PARDO. Biogenic Amines in Wines from Three Spanish Regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005, **53**(4), 1119-1124 [cit. 2019-02-08]. DOI:

10.1021/jf049340k. ISSN 0021-8561. Dostupné z:
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf049340k>

- [19] MARQUES, Ana P., Maria C. LEITÃO a Maria V. SAN ROMÃO. Biogenic amines in wines: Influence of oenological factors. *Food Chemistry* [online]. 2008, **107**(2), 853-860 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.09.004. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607009193>
- [20] LANDETE, J.M., S. FERRER a I. PARDO. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control* [online]. 2007, **18**(12), 1569-1574 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2006.12.008. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713507000059>
- [21] GUERRINI, Simona, Silvia MANGANI, Lisa GRANCHI a Massimo VINCENZINI. Biogenic Amine Production by *Oenococcus oeni*. *Current Microbiology* [online]. 2002, **44**(5), 374-378 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1007/s00284-001-0021-9. ISSN 0343-8651. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-001-0021-9>
- [22] IZQUIERDO-PULIDO, Maria, Teresa HERNÁNDEZ-JOVER, Abel MARINÉ-FONT a M. Carmen VIDAL-CAROU. Biogenic Amines in European Beers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1996, **44**(10), 3159-3163 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1021/jf960155j. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf960155j>
- [23] TAILOR, SANDRA A.N., KENNETH I. SHULMAN, SCOTT E. WALKER, JAY MOSS a DAVID GARDNER. Hypertensive Episode Associated with Phenelzine and Tap Beer??? A Reanalysis of the Role of Pressor Amines in Beer. *Journal of Clinical Psychopharmacology* [online]. 1994, **14**(1) [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1097/00004714-199402000-00002. ISSN 0271-0749. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00004714-199402000-00002>
- [24] Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32005R2073>

- [25] ÖZOGUL, Fatih a Yesim ÖZOGUL. The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures. *European Food Research and Technology* [online]. 2007, **225**(3-4), 385-394 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1007/s00217-006-0429-3. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-006-0429-3>
- [26] RYŠKOVÁ, Olga. *Mikrobiologie pro studující zubního lékařství*. V Praze: Univerzita Karlova, 2004. ISBN 80-246-0834-0.
- [27] GREIF, G., GREIFOVÁ, M., DVORAN, J., KAROVIČOVÁ, J., BUCHTOVÁ, V., 1998. Štúdium rastu a produkcie biogénnych amínov nektorými mikroorganizmami za modelových podmienok. In *Czech Journal of Food Science*, roč. 17, 1998, s. 15-21.
- [28] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vyd., ve VP 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-85605-71-6.
- [29] BERMÚDEZ, Roberto, José M. LORENZO, Sonia FONSECA, Inmaculada FRANCO a Javier CARBALLO. Strains of Staphylococcus and Bacillus Isolated from Traditional Sausages as Producers of Biogenic Amines. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2012, **3** [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00151. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00151/abstract>
- [30] LEE, Yi-Chen, Chung-Saint LIN, Fang-Ling LIU, Tzou-Chi HUANG a Yung-Hsiang TSAI. Degradation of histamine by Bacillus polymyxa isolated from salted fish products. *Journal of Food and Drug Analysis*[online]. 2015, **23**(4), 836-844 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1016/j.jfda.2015.02.003. ISSN 10219498. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949815000290>
- [31] LORENCOVÁ, Eva. *Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu bakterií rodu Lactobacillus a Bifidobacterium: Factors influencing decarboxylase activity of genera Lactobacillus and Bifidobacterium : teze disertační práce*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2015. ISBN 9788074545443.
- [32] CARAFA, Ilaria, Tiziana NARDIN, Roberto LARCHER, Roberto VIOLA, Kieran TUOHY a Elena FRANCIOSI. Identification and characterization of wild lactobacilli and pediococci from spontaneously fermented Mountain Cheese. *Food*

- Microbiology* [online]. 2015, **48**, 123-132 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1016/j.fm.2014.12.003. ISSN 07400020. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002014002974>
- [33] DE LLANO, D. González, CUESTA a RODRÍGUEZ. Biogenic amine production by wild lactococcal and leuconostoc strains. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 1998, **26**(4), 270-274 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1046/j.1472-765X.1998.00320.x. ISSN 02668254. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1472-765X.1998.00320.x>
- [34] LA GIOIA, Federica, Lucia RIZZOTTI, Franca ROSSI, Fausto GARDINI, Giulia TABANELLI a Sandra TORRIANI. Identification of a Tyrosine Decarboxylase Gene (*tdcA*) in *Streptococcus thermophilus* 1TT45 and Analysis of Its Expression and Tyramine Production in Milk. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2011, **77**(3), 1140-1144 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1128/AEM.01928-10. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.01928-10>
- [35] ROSSI, Franca, Fausto GARDINI, Lucia RIZZOTTI, Federica LA GIOIA, Giulia TABANELLI a Sandra TORRIANI. Quantitative Analysis of Histidine Decarboxylase Gene (*hdcA*) Transcription and Histamine Production by *Streptococcus thermophilus* PRI60 under Conditions Relevant to Cheese Making. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2011, **77**(8), 2817-2822 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1128/AEM.02531-10. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.02531-10>
- [36] CACHALDORA, Aida, Sonia FONSECA, Inmaculada FRANCO a Javier CARBALLO. Technological and safety characteristics of Staphylococcaceae isolated from Spanish traditional dry-cured sausages. *Food Microbiology* [online]. 2013, **33**(1), 61-68 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1016/j.fm.2012.08.013. ISSN 07400020. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002012001785>
- [37] CUEVA, C., A. GARCÍA-RUIZ, E. GONZÁLEZ-ROMPINELLI, et al. Degradation of biogenic amines by vineyard ecosystem fungi. Potential use in winemaking. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2012, **112**(4), 672-682 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05243.x. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2012.05243.x>

- [38] BÄUMLISBERGER, Mathias, Urs MOELLECKEN, Helmut KÖNIG a Harald CLAUS. The Potential of the Yeast *Debaryomyces hansenii* H525 to Degrade Biogenic Amines in Food. *Microorganisms* [online]. 2015, **3**(4), 839-850 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.3390/microorganisms3040839. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2076-2607/3/4/839>
- [39] GUO, Xuewu, Xiangyu GUAN, Yazhou WANG, Lina LI, Deguang WU, Yefu CHEN, Huadong PEI a Dongguang XIAO. Reduction of biogenic amines production by eliminating the PEP4 gene in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation of Chinese rice wine. *Food Chemistry*[online]. 2015, **178**, 208-211 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.01.089. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461500103X>
- [40] GARDINI, Fausto, Yesim ÖZOGUL, Giovanna SUZZI, Giulia TABANELLI a Fatih ÖZOGUL. Technological Factors Affecting Biogenic Amine Content in Foods: A Review. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016, 7 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01218. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.01218/abstract>
- [41] GALGANO, Fernanda, Marisa CARUSO, Nicola CONDELLI a Fabio FAVATI. Focused Review: Agmatine in Fermented Foods. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2012, 3 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00199. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00199/abstract>
- [42] *Vesmír: přírodovědecký časopis Akademie věd České republiky*. Praha: Vesmír. ISSN 0042-4544.
- [43] VÍTKOVÁ, Lucie. *Izolace mikroorganismů degradujících biogenní aminy*. Zlín, 2016. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická.
- [44] MAH, Jae-Hyung a Han-Joon HWANG. Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. *Food Control* [online]. 2009, **20**(9), 796-801 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.10.005. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713508002843>

- [45] BUTOR, Irena, Hana PIŠTĚKOVÁ, Khatantuul PUREVDORJ, Petra JANČOVÁ, František BUŇKA a Leona BUŇKOVÁ. Biogenic amines degradation by microorganisms isolated from cheese. *Potravinářstvo* [online]. 2017, 11(1), 302-308 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.5219/736. ISSN 1337-0960. Dostupné z: <http://www.potravinarstvo.com/journal1/index.php/potravinarstvo/article/view/736>
- [46] ANDREOLLI, Marco, Giacomo ZAPPAROLI, Elisa ANGELINI, Gianluca LUCCHETTA, Silvia LAMPIS a Giovanni VALLINI. *Pseudomonas protegens* MP12: A plant growth-promoting endophytic bacterium with broad-spectrum antifungal activity against grapevine phytopathogens. *Microbiological Research* [online]. 2019, **219**, 123-131 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1016/j.micres.2018.11.003. ISSN 09445013. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501318302702>
- [47] HAAS, Dieter a Christoph KEEL. REGULATION OF ANTIBIOTIC PRODUCTION IN ROOT-COLONIZING PSEUDOMONAS SPP. AND RELEVANCE FOR BIOLOGICAL CONTROL OF PLANT DISEASE. *Annual Review of Phytopathology* [online]. 2003, 41(1), 117-153 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656. ISSN 0066-4286. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656>
- [48] PERCIVAL, Steven L. a David W. WILLIAMS. *Acinetobacter*. *Microbiology of Waterborne Diseases* [online]. Elsevier, 2014, 2014, s. 35-48 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1016/B978-0-12-415846-7.00002-0. ISBN 9780124158467. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124158467000020>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AMK	Aminokyseliny
BA	Biogenní aminy
BMK	Bakterie mléčného kvašení
CNS	Centrální nervová soustava
DOPA	Dihydroxyfenylalanin
TAG	Triacylglycerol

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Dekarboxylace argininu a další reakce vybraných biogenních aminů [1]	16
Obr. 2: Dekarboxylace tryptofanu a další reakce [1].....	17
Obr. 3: Dekarboxylace fenylalaninu a další reakce [1]	17
Obr. 4: Hlavní reakce biogenních aminů [1]	18
Obr. 5: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Bacillus cereus</i> 2B12	42
Obr. 6: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Bacillus altitudinis</i> 5A1	43
Obr. 7: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 6A1	43
Obr. 8: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Brevibacillus parabrevis</i> 6A12.....	44
Obr. 9: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Klebsiella oxytoca</i> 6A2.....	45
Obr. 10: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Serratia liquefaciens</i> 6B11	45
Obr. 11: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Pseudomonas protegens</i> 6B12.....	46
Obr. 12: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Candida krusei</i> 7A21	47
Obr. 13: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Bacillus pumilus</i> 7B12.....	47
Obr. 14: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Brevibacillus parabrevis</i> 9A1	48
Obr. 15: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Bacillus altitudinis</i> 9B11	49
Obr. 16: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Brevibacillus parabrevis</i> 10A1	49
Obr. 17: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Staphylococcus warneri</i> 10A12.....	50
Obr. 18: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Paenibacillus amylolyticus</i> 10A3 ..	51
Obr. 19: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Brevibacillus parabrevis</i> 10B1	51
Obr. 20: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> 11A13	52
Obr. 21: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Lysinibacillus sphaericus</i> 11B1	53
Obr. 22: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Brevibacillus parabrevis</i> 11B2	53
Obr. 23: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Bacillus cereus</i> 12B22	54
Obr. 24: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Brevibacillus parabrevis</i> 13A21	55
Obr. 25: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Microbacterium lacticum</i> 13A22...55	
Obr. 26: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Bacillus pumilus</i> 13A31.....	56
Obr. 27: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Staphylococcus epidermidis</i> 13B21	57
Obr. 28: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> 13B23	57
Obr. 29: Degradace biogenních aminů kmenem <i>Klebsiella oxytoca</i> 14A1	58

- Obr. 30: Degradace biogenních aminů kmenem *Brevibacillus parabrevis* 14A259
- Obr. 31: Degradace biogenních aminů kmenem *Candida krusei* 14B2159
- Obr. 32: Degradace biogenních aminů kmenem *Bacillus cereus* 14B2260
- Obr. 33: Degradace biogenních aminů kmenem *Lysinibacillus sphaericus* 14B33 ...61

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Triviální a systematický název, molekulová hmotnost, sumární a strukturní vzorec vybraných biogenních aminů [8]	15
Tab. 2: Vliv skladování a vaření na obsah biogenních aminů v hovězím mase [1] ...	19
Tab. 3: Významné mikroorganismy produkující biogenní aminy	21
Tab. 4: Změny koncentrace biogenních aminů během fermentace trvanlivých salámů [1]	22
Tab. 5: Seznam potravin, ze kterých byla provedena izolace	34
Tab. 6: Složení roztoku stopových prvků	35
Tab. 7: Složení roztoku biogenních aminů	36
Tab. 8: Složení minerálního média	36
Tab. 9: Identifikace izolovaných mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS	40
Tab. 10: Původ izolovaných kmenů	41