

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
Fakulta veterinární hygieny a ekologie

**Sledování dekarboxylační aktivity u rodu *Enterococcus* spp. a
Lactobacillus spp. izolovaných z mléčných výrobků**

Diplomová práce

Autor práce:
Bc. Gabriela Zemková

Vedoucí práce:
MVDr. Eva Standarová, Ph.D.

Brno, 2011

PROHLÁŠENÍ STUDENTA

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci vypracovala zcela samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a veškeré podkladové materiály, z nichž jsem vycházela, uvádím v Seznamu literatury.

V Brně 2011

.....
(vlastnoruční podpis studenta)

Poděkování

Za odborné vedení mé diplomové práce, praktickou pomoc, poskytnutí cenných rad, za věnované úsilí a trpělivost upřímně děkuji MVDr. Evě Standarové, Ph.D.

Obsah

1	ÚVOD	6
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	7
2.1	<i>Biogenní aminy</i>	7
2.1.1	Rozdělení biogenních aminů	8
2.1.2	Tvorba a struktura biogenních aminů	8
2.1.3	Podmínky pro vznik	11
2.1.4	Funkce biogenních aminů	12
2.1.5	Biologické účinky	12
2.1.6	Výskyt a význam v potravinách	15
2.1.7	Potraviny živočišného původu a BA	16
2.1.8	Potraviny rostlinného původu a BA	17
2.1.9	Toxikologické účinky	18
2.1.9.1	Tyramin	19
2.1.9.2	Histamin	20
2.1.10	Zákonné limity	20
2.2	<i>Faktory, které mají vliv na tvorbu BA v potravinách</i>	22
2.2.1	Vnitřní faktory potravin	23
2.2.2	Vnější faktory potravin	24
2.3	<i>Mikroorganismy, které se významně podílejí na tvorbě BA</i>	26
2.3.1	Rod <i>Enterococcus</i> (č. <i>Streptococcaceae</i>)	26
2.3.2	Rod <i>Lactobacillus</i> (č. <i>Lactobacilaceae</i>)	29
2.4	<i>Metody stanovení BA</i>	32
2.4.1	Chromatografické metody	32
2.4.1.1	Kapalinová chromatografie	34
3	MATERIÁL A METODIKA	36
3.1	<i>Materiál</i>	36
3.1.1	Vzorky	36
3.1.2	Kontrolní kmeny	36
3.1.3	Sklo, pomůcky	37
3.1.4	Přístroje	37
3.1.5	Chemikálie a roztoky pro stanovení dekarboxylační aktivity	39
3.1.6	Chemikálie a roztoky pro stanovení BA	39
3.2	<i>Metodika</i>	41
3.2.1	Sledování dekarboxylační aktivity	41
3.2.2	Stanovení biogenních aminů metodou HPLC	42
3.2.3	Chromatografické podmínky	43
4	CÍL PRÁCE	44
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	45
5.1	<i>Enterokoky</i>	45
5.2	<i>Laktobacily</i>	53
5.3	<i>Sledování vlivu podmínek (pH a teploty) na dekarboxylační aktivitu</i>	55
5.3.1	Rod <i>Enterococcus</i>	55
5.3.2	Rod <i>Lactobacillus</i>	59

6	ZÁVĚR	60
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	62
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	63
9	ABSTRAKT	74
10	PŘÍLOHY	75

1 Úvod

Biogenní aminy jsou organické sloučeniny, které v potravinách vznikají především z volných aminokyselin působením bakteriálních dekarboxylas. Některé z nich mají v organismu člověka významné fyziologické funkce – slouží jako prekurzory hormonů, nukleových kyselin, proteinů; stabilizují membrány, regulují krevní tlak. V potravinách se mohou vyskytovat v sýrech, pivu, vínu, trvanlivých salámech aj. potravinách.

Vznik biogenních aminů ve fermentovaných potravinách závisí na přítomnosti volných aminokyselin, jakož i na přítomnosti mikroorganismů, které jsou schopny produkovat dekarboxylasy, a na technologických parametrech (pH, koncentrace NaCl, teplota, vodní aktivita).

Biogenní aminy je nutné sledovat, neboť jejich nadbytečné množství může být pro lidský organismus škodlivé. Mezi toxikologicky nejvýznamnější patří histamin, tyramin, putrescin a kadaverin. Určení přesného prahu toxicity biogenních aminů je však nesmírně obtížné, protože toxická dávka je silně závislá na účinnosti detoxikačního mechanismu každého jednotlivce.

Cílem diplomové práce bylo sledovat dekarboxylační aktivitu u vybraných kultur rodů *Lactobacillus* a *Enterococcus* v médiu dle Joostena a Norholta (1989) a potvrdit tvorbu biogenních aminů pomocí kapalinové chromatografie na reverzní fázi s gradientovou elucí a fluorescenční detekcí. Současně sledovat vliv podmínek (pH a teploty) na dekarboxylační aktivitu daných kultur a tím i vyšší koncentrace biogenních aminů.

2 Literární přehled

2.1 Biogenní aminy

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární organické báze tvořené hlavně dekarboxylací aminokyselin, nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů (Ascar and Treptow, 1986). BA jsou generovány v průběhu mikrobiálních, rostlinných a živočišných metabolismů (Greif et al., 1997). BA jsou skupinou alifatických, aromatických nebo heterocyklických dusíkatýchází odvozených od aminokyselin, které vykazují různé biologické účinky. Některé biogenní aminy mají samy významné biologické vlastnosti, neboť jsou např. tkáňovými hormony (histamin), protoalkaloidy (hordein, gramin) a stavebními látkami, které se účastní biosyntézy dalších hormonů živočichů (β -fenylethylamin), fytohormonů neboli auxinů, alkaloidů a dalších sekundárních metabolitů rostlin (Velíšek, 2002).

Histamin, putrescin, kadaverin, tyramin, tryptamin, β -fenylethylamin, spermin a spermidin jsou považovány za nejdůležitější biogenní aminy vyskytující se v potravinách (Önal, 2007). Schopnost tvorby biogenních aminů byla popsána u několika skupin mikroorganismů, zejména *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., enterokoků a některých dalších bakterií mléčného kvašení (Halász et al., 1994).

Mnohé z nich mají silné účinky (např. histamin, serotonin, dopamin, tyramin), a mají významné biologické aktivity (Shalaby, 1996). Kromě toho, sekundární aminy jako putrescin a kadaverin hrají důležitou roli v intoxikaci, protože mohou potencovat toxicitu histaminu (Bjeldanes et al., 1978). Množství BA je také považováno za ukazatel úrovně mikrobiologické kontaminace potravin (Leuschner et al., 1999). I z těchto důvodů je důležité sledovat hladiny biogenních aminů v potravinách.

2.1.1 Rozdělení biogenních aminů

Podle chemické struktury biogenní aminy dělíme:

1. aromatické (tyramin, β -fenylethylamin)
2. heterocyklické (histamin, tryptamin, serotonin)
3. alifatické (kadaverin, putrescin, spermidin, spermin, agmatin) (Bernardeau et al., 2008)

Nejběžnější monoaminy, histamin (HIM), tyramin (TYR) a tryptamin (TRY), a diaminy (nebo polyaminy), putrescin (PUT) a kadaverin (CAD), jsou tvořeny z histidinu, tyrosinu, tryptofanu, ornitinu a lysinu, resp. polyaminy, spermidin (SPD) a spermin (SPM), vznikají z putrescinu (Esti et al., 1998).

Podle původu dělíme biogenní aminy na přirozené a biogenní. Je složité najít mezi těmito dvěma skupinami biogenních aminů jasnou hranici, protože některé z aminů mohou vznikat během metabolických procesů v živých organismech nebo činností mikroorganismů (Delgado et al., 2002).

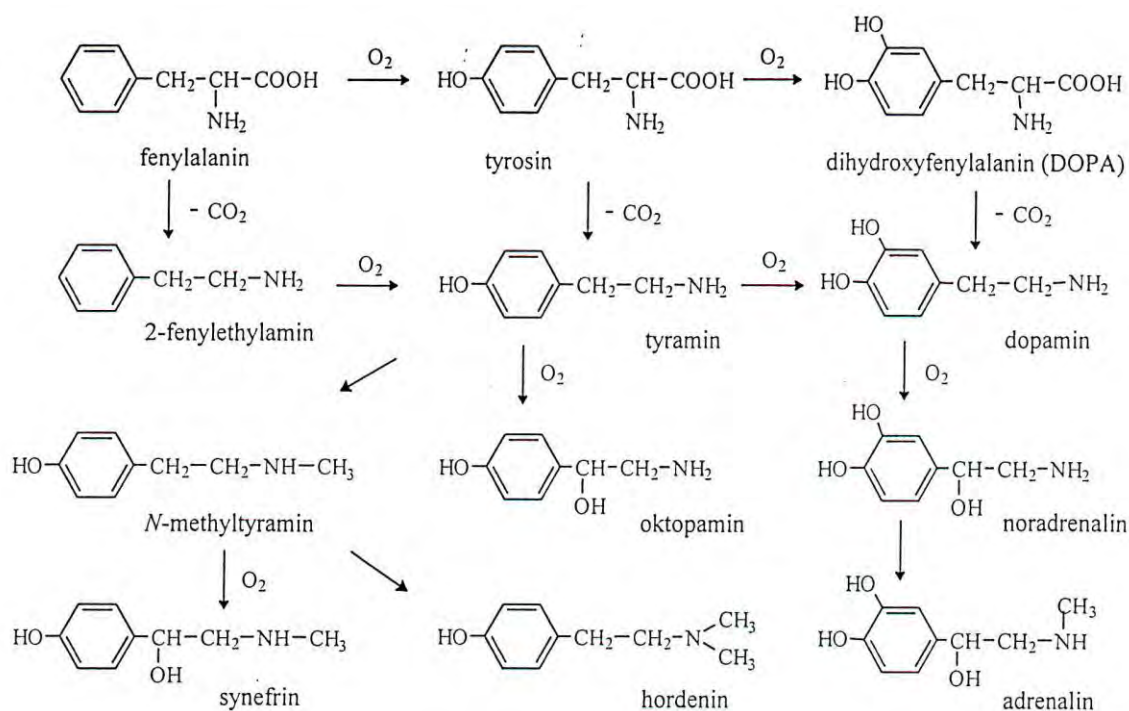
2.1.2 Tvorba a struktura biogenních aminů

Biogenní aminy vznikají v potravinách především dekarboxylací volných aminokyselin působením dekarboxylas, které obsahují četné druhy hnilobných bakterií, ale také řada druhů bakterií mléčného kvašení (Křítěk a Kalač, 1998). Pro jejich biologické účinky se označují společným názvem „biogenní aminy” (Görner a Valík, 2004).

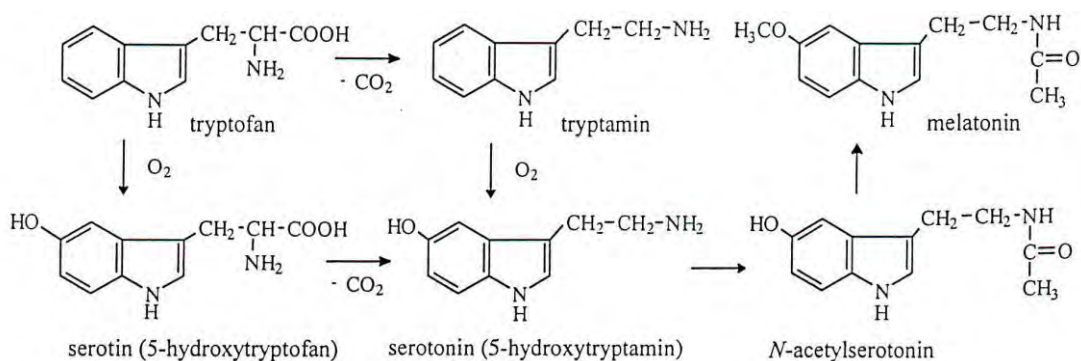
Biogenní aminy odvozené od bazických a aromatických (heterocyklických) aminokyselin jsou v nízkých koncentracích přirozenou složkou řady potravin, neboť v živočišných tkáních a rostlinných pletivech vykonávají řadu důležitých funkcí. Vznikají z aminokyselin působením karboxylas (dekarboxylas obsahujících jako kofaktor pyridoxalfosfát) nebo z aminokyselin a karbonylových sloučenin působením transaminas. Při jejich transformaci na další biologicky aktivní produkty se uplatňují některé oxygenasy a methyltransferasy. Dekarboxylací aminokyselin dekarboxylasami vzniká oxid uhličitý a některé toxické, primární aminy. Z diaminokyselin lysinu a ornithinu vznikají primární aminy kadaverin a putrescin. Mohou vznikat i po čas chladírenského skladování vakuově baleného masa. Jejich producenty jsou bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* a z rodu *Pseudomonas* (Görner a Valík, 2004).

Z histidinu vzniká jako produkt dekarboxylace histidindekarboxylasou histamin. Z lysinu vzniká působením lysindekarboxylasy kadaverin. Dekarboxylací argininu (arginindekarboxylasou) vzniká agmatin a dále putrescin. Ten vzniká také přímo dekarboxylací ornithinu ornithindekarboxylasy. Z putrescinu vzniká methyloací S-adenosylmethioninem spermidin a spermin. Dekarboxylací fenylalaninu fenylalanindekarboxylasou vzniká β -fenylethylamin, z tyrosinu činností tyrosindekarboxylasy tyramin a jeho oxidací oktodopamin. Z DOPA vzniká dopamin (působením dihydroxyfenylalanindekarboxylasy), oxidací dopaminu hormon dřene nadledvinek noradrenalin (norepinerfin) a jeho reakcí s S-adenosylmethioninem další hormon nadledvinek adrenalin. Dekarboxylací tryptofanu tryptofandekarboxylasou vzniká tryptamin, ze kterého se tvoří hormon serotonin. Dekarboxylace aminokyselin a jejich další reakce jsou zobrazeny na obrázcích č. 1, 2 a 3 (Velíšek, 2002).

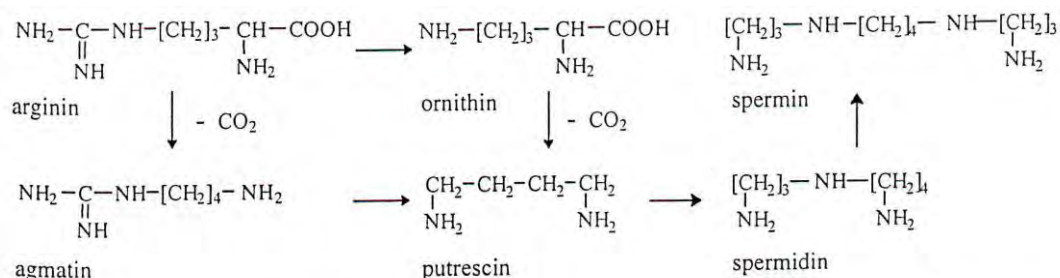
Obrázek č. 1: Dekarboxylace a další reakce fenylalaninu (Velíšek, 2002)



Obrázek č. 2: Dekarboxylace a další reakce tryptofanu (Velíšek, 2002)



Obrázek č. 3: Dekarboxylace a další reakce argininu (Velíšek, 2002)



Biogenní aminy jsou většinou generovány dekarboxylací aminokyselin prostřednictvím odpovídajícího substrátu - specifických enzymů dekarboxylas odvozených z mikroorganismů přítomných v potravinách. Přestože dekarboxylasy aminokyselin nejsou široce rozděleny mezi bakteriemi, mnoho druhů rodů jsou schopny dekarboxylasy jedné nebo více aminokyselin. Nicméně, schopnost mikroorganismů dekarboxylovat aminokyseliny je velmi variabilní. Záleží nejen na druhu, ale také na kmenu a enviromentálních podmínkách (Landete et al., 2007).

Biogenní aminy mohou vznikat i při technologicky potřebných fermentacích potravin, jako už bylo uvedeno při sýrech a salámech, ale i při fermentaci potravin rostlinného původu, při alkoholovém kvašení a při kysání kapusty, i když v malých množstvích. Vznik aminů ve fermentovaných potravinách a nápojích závisí na přítomnosti volných aminokyselin (množství volných aminokyselin závisí na stupni proteolýzy), jakož i na přítomnosti mikroorganismů, které jsou schopny tvořit aminy, a na technologických parametrech (pH, koncentrace NaCl, teplota, vodní aktivita) (Maijala et al., 1993; Joosten et al., 1997).

2.1.3 Podmínky pro vznik

Mnoho druhů jako je *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Photobacterium* a bakterie mléčného kvašení *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus* jsou schopni dekarboxylovat jednu nebo více aminokyselin (Silla-Santos, 1996; Halász et al., 1999). Protože BA v potravinářských výrobcích vznikají hlavně dekarboxylací odpovídajících prekurzorů aminokyselin, proto jsou pro jejich tvorbu nutné tyto podmínky (Bodmer, 1999):

- dostupnost aminokyselin,
- přítomnost dekarboxylasy,
- dekarboxylasa pozitivní mikroorganismy,
- podmínky, které umožňují růst bakterií,
- syntéza a činnost dekarboxylas.

Volné aminokyseliny se buď vyskytují jako takové v potravinách, nebo mohou být jako následek proteolýzy. Mikrobiální kmeny s vysokou proteolytickou aktivitou enzymů také mohly zvýšit riziko pro vznik biogenních aminů v potravinách, zvýšením dostupnosti volných aminokyselin. Důležitou roli při tvorbě biogenních aminů hraje tedy proteolytická aktivita v prostředí, které poskytuje substráty pro činnost dekarboxylasy (Joosten, 1988). Tham et al. (1990) sledovali schopnost enterokoků produkovat histamin v izolovaných kozích sýrech a zjistili, že *Enterococcus faecalis* neprodukuje histamin a *Enterococcus faecium* jsou producenti pouze pro malé množství těchto aminů v sýrech. Není jasné, které faktory jsou nejdůležitější pro tvorbu velkého množství biogenních aminů v sýrech. Z kozího sýra byly izolovány pozitivní kmeny enterokoků na tyramin. Suzzi et al. (2000) zjistili, že proteolytické kmeny *E. faecalis* vždy tvoří značné množství biogenních aminů.

Množství kyslíku má také významný vliv na BA. *Enterobacter cloacae* produkuje zhruba polovinu množství putrescinu v anaerobních podmínkách v porovnání s aerobními podmínkami. *Klebsiella pneumoniae* syntetizuje výrazně méně kadaverinu, ale získává schopnost produkovat putrescin za anaerobních podmínek (Halász et al., 1994). Redox potenciál ovlivňuje také produkci BA. Tvorba aminů je v rozhodující míře ovlivněna teplotou. Teplota mezi 20 °C a 37 °C je optimální pro růst většiny bakterií, které obsahují dekarboxylasu, nižší teplota zastaví jejich růst (Maijala, 1993). Přítomnost chloridu sodného aktivuje tyrosin dekarboxylasu a inhibuje histidin dekarboxylasu (Silla-Santos, 1996). Při obsahu chloridu sodného 3,5 % má *Lactobacillus buchneri* částečně potlačenou

schopnost tvořit histamin a při obsahu 5 % je jeho schopnost zastavena (Maijala, 1995). Použití vhodných startovacích kultur s aminooxidační aktivitou snižuje tvorbu BA (Leuschner and Hammes, 1998). *Brevibacterium lineans* snižuje obsah tyraminu a histaminu v průběhu zrání sýrů (Kolesárová, 1995).

2.1.4 Funkce biogenních aminů

BA jsou zdrojem dusíku a prekurzorů pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů (Silla-Santos, 1996). Mohou také ovlivnit procesy v organismu, jako je regulace tělesné teploty, snížení nebo zvýšení krevního tlaku (Greif et al., 1997). Polyaminy jsou důležité pro růst, renovaci a metabolismus každého orgánu v těle a nezbytné pro udržení vysoké metabolické aktivity pro normální fungování a imunitní systém střeva (Silla-Santos, 1996; Bardócz, 1993). BA jsou potenciálními prekurzory pro tvorbu karcinogenních N-nitrososloučenin (Křitek and Kalač, 1998). Sekundární aminy, mohou tvořit nitrosaminy reakcí s dusitany, zatímco terciální aminy mohou produkovat řadu labilních N-nitroso produktů (Halász et al., 1994). V tučných jídlech, jako je slanina, při vysoké teplotě a za přítomnosti vody, může být tvořen karcinogen nitrospyrrolidin z putrescinu nebo spermidinu (Karovičová a Kohajdová, 2005). Tyramin má pozoruhodnou antioxidační aktivitu, která se zvyšuje s jeho koncentrací. Účinek inhibice je taky závislý na amino a hydroxylových skupinách (Halász et al., 1994).

2.1.5 Biologické účinky

Biogenní aminy jsou pro organismus nepostradatelné, ale ve vysokých koncentracích se mohou projevovat jako látky:

- psychoaktivní
- vasoaktivní

Psychoaktivní aminy působí jako přenašeči v centrálním nervovém systému, vasoaktivní aminy působí přímo nebo nepřímo na vaskulární systém. Vasoaktivní aminy se podle účinky dělí na:

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

Symptomy konzumace vysokých dávek biogenních aminů jsou zvracení, dýchací potíže, pocení, bušení srdce, hypotenze nebo hypertenze (histamin) a migrény (tyramin, fenylethylamin).

Monoaminoxidáza (MAO) a diaminoxidáza (DAO) jsou hlavními enzymy, které biogenní aminy odbourávají. Toxický účinek biogenních aminů je silně ovlivněn aktivitou těchto enzymů, která může být u jednotlivých jedinců různá a závislá na řadě faktorů např. na přítomnosti inhibitorů (určitá léčiva) nebo potenciátorů. Vysoké koncentrace biogenních aminů není již schopen tento enzymový systém eliminovat.

Při hodnocení toxikologického účinku je nutné zvažovat nejen přítomnost konkrétního aminu, ale i ostatních faktorů jakými jsou množství spotřebované potraviny, přítomnost jiných toxických látek apod. Z tohoto důvodu je velmi obtížné stanovit hranici toxicity biogenních aminů (Velíšek, 2002). Prekurzory biogenních aminů, produkty transformace a jejich biologický význam je uveden v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Biogenní aminy, jejich prekurzory, produkty transformace a biologický význam (Velíšek, 2002)

Biogenní aminy	Původní AMK	Další produkty AMK a transformace aminu	Biologický význam
histamin	histidin		lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak, sekreci žlázeční šťávy, účast při anafylaktickém šoku a alergických reakcích
tyramin	tyrosin	dopamin, adrenalin, noradrenalin, synefrin, hordenin	prekurzor dopaminu, lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak a kontrakce krevního svalu
kadaverin	lysin		stabilizace makromolekul (NK), subcelulárních struktur (ribosomy), stimulace diferenciace buněk, rostlinný hormon
putrescin	arginin	N-methylputrescin, spermidin, spermin	stabilizace makromolekul (NK), subcelulárních struktur (ribosomy), stimulace diferenciace buněk, rostlinný hormon
fenylethylamin	fenylalanin	tyramin, dopamin, adrenalin, noradrenalin	prekurzor tyraminu
dopamin	DOPA	noradrenalin, adrenalin	mediátor sympatických nervů, lokální tkáňové a rostlinné hormony, vliv na krevní tlak, peristaltiku střev
tryptamin	tryptofan	serotonin, melatonin	mediátor sympatických nervů, lokální tkáňové a rostlinné hormony, vliv na krevní tlak, peristaltiku střev

2.1.6 Výskyt a význam v potravinách

Biogenní aktivní aminy jsou sloučeniny členěné podle obvyklých metabolických pochodů v buňkách živých organismů, včetně regulace růstu (spermin, spermidin a kadaverin), nervového přenosu (katecholaminů a serotoninu) a jako mediátory zánětu (histamin a tyramin) (Tabor and Tabor, 1976). Biogenní aminy se vyskytují prakticky ve všech potravinách jako běžné produkty metabolismu. Ve vyšším množství se nachází ve fermentovaných výrobcích (např. sýry, ryby a rybí výrobky, trvanlivé salámy, pivo, víno, kysané zelí aj.), kde vznikají mikrobiální činností, avšak mohou mít nežádoucí zdravotní důsledky pro spotřebitele (Brink et al., 1990). Působením kontaminující mikroflóry vznikají hlavně v rybách a v mase během skladování. Vysoké koncentrace biogenních aminů se vyskytují u potravin v pokročilém stupni kažení. V zelenině, ovoci a houbách při nevhodném skladování produkují biogenní aminy zejména endogenní dekarboxylasy.

Tyramin a histamin fungují jako hormonální mediátory, u lidí a zvířat. Psychoaktivní aminy, jako je dopamin a serotonin jsou neurotransmitery v centrální nervové soustavě (Bardócz, 1993). Putrescin a kadaverin jsou považovány za indikátory nežádoucích přeměn bílkovin. Zvýšený výskyt biogenních aminů v potravinách se proto považuje za nežádoucí (Křížek and Kalač, 1998).

Přehled mikroorganismů podílejících se na produkci biogenních aminů v jednotlivých potravinách je uveden v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Významné mikroorganismy produkující biogenní aminy (Velíšek, 2002)

Potravina	Mikroorganismy	Produkované aminy
ryby	<i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Clostridium perfringens</i>	histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, agmain, spermin,
sýry	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>L. bulgarius</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i>	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.,	histamin, kadaverin, putrescin, fenylethylamin
fermentovaná zelenina	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus</i> sp.	histamin, kadaverin, tyramin, putrescin

2.1.7 Potraviny živočišného původu a BA

V mase, rybách a sýrech bývají hlavními biogenními aminy histamin, kadaverin, putrescin a tyramin. Při skladování masa dochází vlivem enzymové aktivity přítomné mikroflóry k růstu obsahu biogenních aminů, a obsah některých z nich lze proto využít jako indikátor čerstvosti masa. Čerstvé vepřové maso např. obsahuje do 7 mg.kg^{-1} kadaverinu a putrescinu, zatímco zkažené maso 60 mg.kg^{-1} a více. Vaření má relačně malý vliv na obsah biogenních aminů, dochází pouze k jejich částečnému rozkladu. U masa vepřového je úbytek biogenních aminů vyšší. Obsah biogenních aminů vzrůstá také při výrobě fermentovaných salámů a některých sýrů. Tento nárůst je patrný hlavně v počátečních fázích fermentace výrobků a je závislý na druhu přítomných mikroorganismů. V ojedinělých případech mohou výrobky obsahovat až $100 - 1000 \text{ mg.kg}^{-1}$ histaminu. Při zrání sýrů dochází k tvorbě biogenních aminů převážně v provozech s nedostatečnou hygienickou úrovní, tedy vlivem kontaminující mikroflóry. Při dobré

technologii a dodržování správných hygienických zásad obsahují i dlouhodobě zrající sýry jen poměrně malá množství biogenních aminů. V čerstvém rybím masu je obsah biogenních aminů malý, např. v masu tuňáka bývá 0 - 10 mg.kg⁻¹ histaminu a 0 - 2 mg.kg⁻¹ tyraminu. Obsah biogenních aminů však roste při nevhodném skladování (Velíšek, 2002). Při skladování ryb při teplotách kolem 0 °C a nižších vznikají biogenní aminy v téměř zanedbatelném množství. Při vyšších teplotách je přítomnou mikroflórou dekarboxylován hlavně histidin a tkáň zejména makrelovitých ryb (*Scrombroidae*, kam patří např. tuňák a makrela) mohou obsahovat až 3000 mg.kg⁻¹ (makrela) nebo dokonce 8000 mg.kg⁻¹ histaminu (tuňák). Také ostatní biogenní aminy, jako je tyramin, kadaverin, putrescin a další, vznikají v relativně vysokém množství. Optimální teplota tvorby histaminu je značně rozdílná (5 - 38 °C) a závisí hlavně na druhu kontaminující mikroflóry. Odstranění již jednou vzniklých biogenních aminů z potravin je velmi obtížné. Snížení jejich koncentrace lze např. dosáhnout použitím diaminooxidas, ale v praxi není tento způsob dekontaminace použitelný. K částečnému snížení obsahu aminů dochází také v tepelně zpracovaných výrobcích jejich reakcí s redukujícími cukry, resp. s rozkladnými produkty cukrů v reakci dle Maillarda. Nejvhodnějším způsobem výroby potravin obsahujících malé množství biogenních aminů je však dodržování takových technologických postupů a hygienických podmínek výroby, které brání jejich vzniku (Velíšek, 2002).

2.1.8 Potraviny rostlinného původu a BA

Biogenní aminy se jako přirozená součást vyskytují také v potravinách rostlinného původu. Hlavním biogenním aminem v ovoci a zelenině bývá tyramin, v menším množství se vyskytuje celá řada dalších biogenních aminů. V listech špenátu se např. vyskytuje volný histamin v množství zhruba 200 – 400 mg.kg⁻¹ a dále také N-methylhistamin, N-acetylhistamin a amidy histaminu s různými karboxylovými sloučeninami. V banánech se jako hlavní biogenní amin vyskytuje tyramin a dále také β-fenylethylamin, histamin, dopamin a serotonin (Velíšek, 2002).

2.1.9 Toxikologické účinky

Biogenní aminy, jako tyramin a β -fenylethylamin, byly navrženy jako iniciátoři hypertenzní krize u některých pacientů. Příjem histaminu v rozmezí 8 - 40 mg.kg^{-1} , 40 -100 mg.kg^{-1} a vyšší než 100 mg.kg^{-1} může způsobit mírné, střední a intenzivní otravy (Parente et al., 2001). Nout (1994) uvedl, že maximální přípustná úroveň histaminu a tyraminu v potravinách by měla být v rozmezí 50 - 100 mg.kg^{-1} a 100 - 800 mg.kg^{-1} . Putrescin, kadaverin, spermin a spermidin nemají nepříznivý účinek na zdraví, ale mohou reagovat s dusitany a tvořit karcinogenní nitrosaminy a také mohou být navrženy jako ukazatele kažení (Eerola et al., 1997; Hernandez-Jover et al., 1997).

Tryptamin má toxické účinky na člověka, jako je zvýšení krevního tlaku, tedy způsobuje vysoký krevní tlak (Shalaby, 1996). Formování nitrosaminů, které jsou potenciálními karcinogeny, představuje další toxikologické riziko spojené s BA, zejména v masných výrobcích, které obsahují dusitanové a dusičnanové soli a vulkanizační činidla (Scanlan, 1983). Určení přesného prahu toxicity BA v jednotlivcích, je nesmírně obtížné, protože toxická dávka je silně závislá na účinnosti detoxikačního mechanismu kažení jednotlivce. Některé biogenní aminy, např. histamin a tyramin, jsou považovány za antinutriční sloučeniny. U citlivých jedinců představují zdravotní riziko, zvláště když je jejich účinek umocněn jinými látkami. Toxicita biogenních aminů se významně zvyšuje při současné konzumaci alkoholu, když jsou podávány i určité antibiotika, psychofarmaka, což jsou inhibitory monoaminoxidás.

Histamin způsobuje vasodilataci cév a snížení krevního tlaku, je příčinou otravy z ryb (scombroid poisoning). Tyramin je příčinou migrén a hypertenzních krizí, zejména u pacientů používajících antidepresiva. Pro negativní vliv BA na lidské zdraví je žádoucí, aby se tyto aminy vyskytovaly v potravinách v minimálním množství (Halász et al., 1994). Toxicita histaminu a tyraminu je zvyšována konzumací alkoholu a potravin obsahujících jiné BA, zejména diaminy a polyaminy. Kromě těchto toxikologických aspektů, jsou obavy o BA, pokud jde o hygienu potravin (Karmas, 1981; Vidal-Carou et al., 1990).

Putrescin a kadaverin, aminy se slabšími farmakologickými účinky v porovnání s histaminem a tyraminem, blokují aktivitu monoaminoxidázy a diaminoxidázy, což vysvětluje skutečnost, že vyšší koncentrace histaminu a tyraminu byly naměřeny v krvi při požití kadaverinu a putrescinu ve srovnání s příjmem vody (Lyon et al., 1983; Ibe et al., 1991). Faktory, které snižují výkonnost detoxikačního systému, jsou alkohol, káva, čaj,

cigarety a některé léky (ambroxal hydrochlorid, dihydralazine, isoniazide, kyselina klavulanová, promethazin) (Jarisch et al., 1996; Sattler et al., 1988).

Biogenní aminy jsou v orgánech pomocí mono- a diaminooxidás oxidované a jsou netoxické. Při příjmu vysokých dávek histaminu nebo tyraminu ($>100 \text{ mg.kg}^{-1}$) tento oxidační mechanismus už nepostačuje na detoxikaci a u konzumenta se projeví příznaky otravy. Histamin způsobuje po půl až jedné hodině bolesti hlavy, zvracení, bolesti břicha, poruchy krevního oběhu, kopřivku. Otravy histaminem se často vyskytují po požití zkažených makrel a tuňáků, kteří jsou bohatí na histidin. I dlouhozrající sýry mohou v důsledku mikrobiální činnosti obsahovat vyšší koncentrace histaminu. Tyramin způsobuje zvýšení krevního tlaku a bolesti hlavy (Görner a Valík, 2004), může způsobit krvácení do mozku a srdeční selhání (Til et al., 1997). Tento amin se může nacházet i v dlouhozrajícím sýru, rovněž v trvanlivých salámech i v zkažených rybách (Joosten, 1988).

Různé aminy (např. histamin, tyramin, kadaverin, putrescin a β -fenylethylamin) byly nalezeny v mnoha různých druzích sýrů (Rice et al., 1976; Silla-Santos, 1996). Množství histaminu, putrescinu a kadaverinu se obvykle zvyšuje během kažení ryb nebo masa (Karmas, 1981).

2.1.9.1 Tyramin

Tyramin, jeden z toxikologicky významných biogenních aminů, tvoří se v potravinách, působením tyrosindekarboxylasy produkované bakterií spojených s potravinami (Silla-Santos, 1996). Tyramin může způsobit vysoký krevní tlak, migrény, krvácení do mozku a srdečního selhání, při vyšších koncentracích v organismu (Til et al., 1997). Koncentrace 100 mg.kg^{-1} v potravinách jsou škodlivé (Silla-Santos, 1996). Mezi fermentované potraviny, ve kterých mohou být přítomny toxikologicky významné úrovně tyraminu patří kvašená zelenina, zelí (Špička et al., 2002), alkoholické nápoje (Kalač et al., 2002), fermentované suché salámy (Komprda et al. 2004), zejména zrající sýry (Stratton et al., 1991).

2.1.9.2 Histamin

Histamin je fyziologicky nejdůležitější z biogenních aminů. Je to látka s farmakologickým účinkem (mediátor), a je zapojena do patofyziologických procesů, jako jsou alergie a záněty (Velíšek, 2002).

Biologické účinky histaminu jsou obvykle vidět pouze tehdy, když se uvolní ve velkém množství v průběhu alergické reakce. Histamin uplatňuje svůj vliv vazbou na receptory buněčných membrán v respiračních, kardiovaskulárních, gastrointestinálních a hematologických / imunologických systémech a kůži. Existují tři typy receptorů, H1, H2 a H3. Nejčastějšími příznaky jsou reakce z kardiovaskulárního systému (Bentley et al., 1995). Histamin způsobuje dilataci periferních cév, kapilár a cév, což vede k hypotenzi, návalům horka a bolestem hlavy. Sekrece žaludeční kyseliny je řízena prostřednictvím receptoru H2 umístěného na parietálních buňkách (Stratton et al., 1991). Bolest a svědění spojené s kopřivkovou lézí mohou být v důsledku senzorických a motorických neuronů stimulovány přes H1 receptor (Bentley et al., 1995).

Otravy histaminem je možné léčit pomocí antihistaminik (Silla-Santos, 1996). Po mnoho let, byly H1 receptory k dispozici pro léčbu alergií, zatímco receptory H2 byly k dispozici pro léčbu žaludečních vředů. Naproti tomu, H3 receptor byl objeven v roce 1983 a byl použit k léčbě poruch centrálního nervového systému. Role H3 receptoru v učení a paměti ukazuje, že H3 receptor by mohl mít roli v léčbě paměti poruch, jako je Alzheimerova choroba (Preus et al., 1998).

Koncentrace histaminu vyšší než 500 - 1000 mg.kg⁻¹ se považují pro člověka za nebezpečné. Zvýšené množství histaminu může vyvolat anafylaktický šok (tj. silný otřes provázený poruchou hlavních funkcí organismu) (Velíšek, 2002).

2.1.10 Zákonné limity

Evropská Unie (EU) stanovila limit v nařízení (ES) 2073/2005 a jejím platném znění pro histamin, který by měl být nižší než 100 mg.kg⁻¹ pro ryby, a menší než 200 mg.kg⁻¹ pro solené ryby pro druhy, které patří do čeledí *Scrombroidae* a *Clupeidae* (Montel et al., 1999). V rybích výrobcích ošetřených enzymatickým zráním lze překročit hodnotu z 200 mg.kg⁻¹ až do hodnoty 400 mg.kg⁻¹ u dvou vzorků z devíti z jedné šarže.

Potravinový kodex Slovenskej republiky určil maximálnu únosnú mieru pre tieto dve kategórie BA: histamin (20 mg.kg^{-1} v pive a 200 mg.kg^{-1} v rybách a rybích výrobkoch) a tyramín (200 mg.kg^{-1} v syre) (Halász et al., 1999). Horný limit od 100 do 200 mg.kg^{-1} pre histamin v masných výrobkoch bol navrhnutý Nizozemskom.

2.2 Faktory, které mají vliv na tvorbu BA v potravinách

Působením mikroorganismů se mění vlastnosti potravin, jejich textura, konzistence, barva, vzhled, vůně a chuť. Jaké změny působením mikroorganismů v a na potravinách vznikají, závisí od fyzikálních a chemických vlastností, od vnitřních faktorů:

- od složení potravin
- aktivity vody
- redoxního potenciálu
- textury

Další významný vliv na vlastnosti uchovávaných potravin mají vnější faktory, podmínky uchování a skladování jako:

- teplota prostředí
- relativní vlhkost vzduchu
- doba skladování

Vnitřní a vnější faktory určují druh mikrobiálních změn jako i jejich rychlost a trvanlivost potravin. Čím je teplota potravin vyšší, tím rychlejší se mění jejich mikrobiálně podmíněné vlastnosti.

Kromě vnitřních a vnějších faktorů má na mikrobiologickou trvanlivost potravin významný vliv počet a druhové zastoupení mikroorganismů (mikrobiologická zátěž potravin). Čím potravina na začátku uchování a skladování obsahuje méně mikroorganismů a čím jsou méně aktivní (schopné se rozmnožovat a metabolizovat), tím je při daných vnějších a vnitřních podmínkách potřebný delší čas, aby se potravina sensoricky změnila. Počátečný počet a počátečné druhové složení mikroflóry potravin se významně uplatňuje při nízkých skladovacích teplotách (Görner a Valík, 2004).

2.2.1 Vnitřní faktory potravin

Hodnota pH

Sladké tepelně neopracované mléko má hodnotu pH mezi 6,5 až 6,7. Patří proto mezi potraviny s mírně kyselou reakcí. Vlivem bakterií mléčného kvašení, které jsou v normálním nadojeném surovém mléce přítomné a pro obsah pro nelehko fermentovatelného disacharidu laktózy se při teplotě 28 až 30 °C sníží jeho hodnota pH na 4,0 a nižší za 16 až 20 hodin.

Minimální hodnota pH pro většinu bakterií (mnohé bakterie z č. *Enterobacteriaceae*, druhy rodu *Bacillus* a jiné), které se zúčastňují při kvašení potravin je pH 4,4 až 4,6. Bakterie octového kvašení mají svoje optimální pH nízké, mezi 5,4 až 6,3 a některé druhy bakterií mléčného kvašení z rodu *Lactobacillus* mezi 5,5 až 6,0. Maximální hodnota bakterií, kvasinek a plísní mezi pH 8 až 9 (Görner a Valík, 2004).

Glukóza

Je monosacharid, který zvyšuje růst a dekarboxylační aktivitu bakterií, tedy i produkci biogenních aminů. Optimální obsah glukózy je v rozmezí od 0,5 – 2 % (Suzzi et al., 2003).

Aktivita vody a_w

Mikroorganismy potřebují pro svoji látkovou přeměnu vodu. Snižováním obsahu vody v buňce způsobuje zpomalení jejich růstu. Za nepřítomnosti vody se v nich látková přeměna zastaví. Citlivé mikroorganismy za takových podmínek odumírají. Některé složky potravin jako je sůl, cukr, bílkoviny mohou vázat vodu natolik, že je nemohou mikroorganismy využít pro svůj metabolismus. Optimální hodnota a_w je pro většinu mikroorganismů $a_w > 0,98$. Při snížení hodnoty a_w prostředím odnímáním vody (sušení, uzení), přidávkem soli, cukru a též i mrazením se koncentrace mikroorganismu využitelné vody snižuje a jejich růst je částečně nebo úplně inhibovaný (Görner a Valík, 2004).

2.2.2 Vnější faktory potravin

Teplota

Odlišné skupiny mikroorganismů mají různé nároky na teplotu prostředí, v kterém se mohou nebo mají rozmnožovat a metabolizovat. Podle jejich optimální růstové teploty se třídí do 4 skupin: psychofilní, psychotropní, mezofilní a termofilní (tab č. 3).

Tabulka č. 3: Rozdělení bakterií podle jejich teplotních nároků

Skupina	Minimální teplota (°C)	Optimální teplota (°C)	Maximální teplota (°C)
Psychofilní bakterie	-5 až +5	12 až 15	15 až 20
Psychotropní bakterie	-5 až +5	25 až 30	30 až 35
Mezofilní bakterie	+5 až 15	30 až 40	35 až 47
Termofilné bakterie	40 až 45	55 až 75	60 až 90

Mezi přiměřenou minimální teplotou a optimální teplotou je rozdíl asi 22 °C a mezi přiměřenou optimální a maximální teplotou je rozdíl jen 6,5 °C. Podle toho mikroorganismy lépe snášejí teploty suboptimálně jako hyperoptimálně (Görner a Valík, 2004).

Většina bakterií, které způsobují otravy potravinami (alimentární intoxikace a toxoinfekce) je ve skupině mezofilních bakterií. Jejich optimální teplota je mezi 30 - 40 °C. Jsou to některé durhy a sérotypy z rodu *Salmonella*, dále *Clostridium botulinum* typu A a B, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* a jiné. Bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* jako je většina grampozitivních bakterií, např. rody *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus* a bakterie mléčného kvašení, patří s určitými výjimkami této do skupiny mezofilních mikroorganismů. Jejich teplotní minimum je mezi 5 – 15 °C, proto se při konzervářenském dodržení chladírenských teplot skladování potravin nerozmnožují a potraviny se jejich působením nezkazí (Görner a Valík, 2004).

Kyslík O₂

Balení potravin do obalů nepropustných pro vodní páru a některé plyny jako i umělá regulace atmosféry v skladovacích prostorech může mít na růst určitých fyziologických skupin mikroorganismů pozitivní i negativní vliv. Vzduch v blízkosti půdy obsahuje přiměřeně (v obj. %) 78 % dusíku, 21 % kyslíku, < 1 % vzácných plynů, 0,03 % oxidu uhličitého a menší množství vodní páry.

Mnohé aerobní a anaerobní bakterie svými nespecificky působícími enzymami obsahující flavin a za přítomnosti vzdušného kyslíku katalyzují tvorbu toxického peroxidu vodíku, radikál oxidáz katalyzuje i vznik pro mikroorganismy rovněž toxických superoxidásových radikálů. Aerobní mikroorganismy mohou pak za pomoci superoxidodismutázy a katalázy rozrušit vzniklé superoxidové ionty i peroxid vodíku, čím se chrání proti jejich toxickému účinku.

Tento ochranný detoxikační mechanismus spočívá na obou enzymech a mají ho i fakultativně anaerobní bakterie (např. z čeledi *Enterobacteriaceae*). Aerotolerantní anaerobní bakterie (např. rodu *Streptococcus* a *Lactococcus*) obvykle syntetizují jen jeden ochranný enzym superoxidodismutázu, ale nikoliv katalázu. Striktně anaerobní bakterie (z rodu *Clostridium*) nesyntetizují žádný z těchto ochranných enzymů. Proto za přítomnosti vzdušného kyslíku nerostou a rychle odumírají (Görner a Valík, 2004).

2.3 Mikroorganismy, které se významně podílejí na tvorbě BA

2.3.1 Rod *Enterococcus* (č. *Streptococcaceae*)

Význam a úlohy příslušníků rodu *Enterococcus* jsou v potravinářské mikrobiologii na první pohled protichůdné. Intenzivně fermentují sacharidy a někdy se účastní na tvorbě aroma a chutnosti potravin. Připisuje se jim i toxinogennost, tvorba biogenních aminů a využívají se v mikrobiologii pitné vody jako indikátory fekálního znečištění (Görner a Valík, 2004).

Rod *Enterococcus* má pojmenování připomínající jeho původ ve střevě lidí a zvířat. *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*, ve střevě lidí a některých zvířat; *Enterococcus avium* a *Enterococcus gallinarum*, ve střevech zvířat (Görner a Šimkovicová, 1978).

Enterokoky jsou Gram-pozitivní, kataláza negativní koky, fermentují sacharidy podobně jako jiné bakterie mléčného kvašení a produkují kyselinu mléčnou. V alkalickém prostředí produkuje z glukózy významné množství etanolu, kyseliny octové a mravenčí a oxidu uhličitého. Jsou náročné na živiny; vyžadují pro svůj růst a metabolismus aminokyseliny, peptidy, puriny, pyrimidiny a vitamíny (Görner a Valík, 2004).

Enterokoky se běžně vyskytují v syrovém mléce a mléčných výrobcích (Garg and Mital, 1991; Giraffa et al., 1994). Mléko je ideálním zdrojem pro růst těchto organismů. Enterokoky se mohou vyskytovat ve značném množství v tvarohu a zrajících sýrech (Clark and Reinbold, 1966; Muchetti et al., 1982; Fontecha et al., 1990; Pouillet et al., 1991; Freitas et al., 1996; Centeno et al., 1997). Mnozí z nich mají hlášeny jejich přítomnost v pasterovaném a UHT mléce (Garg and Mital, 1991). Protože patří mezi termorezistentní bakterie, a některé kmeny enterokoků přetrvávají i předepsané pasterační teploty. Nejvíce termorezistentním enterokokem je *E. faecium*. Jejich schopnosti rozvíjet se v přítomnosti 6,5% NaCl a ve vývaru při pH 9,6 je běžně používán jako fyziologická kritéria pro rozlišování enterokoků od jiných streptokoků. Konečná hodnota pH v glukozovém bujóně je 4,6 až 4,2, příležitostně i menší hodnoty. V mléce byla při laboratorní teplotě u *Enterococcus durans* dosažená kyselost 34,5 SH a obsah kyseliny mléčné 0,66 % (Görner a Valík, 2004).

Význam enterokoků je v potravinářské mikrobiologii na první pohled protichůdný. Například, při výrobě a zrání sýru čedar se podle některých autorů využívají jejich fermentační vlastnosti jako bakterie mléčného kvašení a současně jejich vysoká odolnost vůči obsahu soli (Görner a Valík, 2004). Enterokoky jsou trvalou součástí fermentovaných potravin s vyšším obsahem soli, jako u sýrů (Brandýs), klobás a šunky, fermentovaných ryb, přičemž se pravděpodobně zúčastňují na tvorbě jejich chutnosti a aroma. Oproti tomu v nefermentovaných potravinách poukazuje jejich zvýšená přítomnost na nedostatečné zahřátí a na kontaminaci z ploch, které nebyly dostatečně čištěné a dekontaminované. Enterokoky jsou významným indikátorem mikrobiologické jakosti sušeného mléka. Pro jejich termorezistentnost a schopnost růst v prostředí s nižší aktivitou vody se rozmnožují v zahuštěném mléce ve vakuových odparkách (před sušením). Při sušení koncentráту mléka horkým vzduchem se nedeaktivizují. Jejich konečný počet v sušeném mléce závisí od důkladnosti čištění a dekontaminace odparky, sušárenského zařízení a ostatních ploch a od času nepřetržitého odpařování mléka (Görner a Valík, 2004).

Enterokoky přicházejí do úvahy i jako indikátory kontaminace pitné vody. Využívá se jejich vlastnost, že pocházejí ze střev lidí a ve vodě přežívají kratší čas jako koliformní bakterie. Podle vodárenských mikrobiologů poukazuje jejich přítomnost v pitné vodě na nedávné fekální znečištění (Görner a Valík, 2004).

Z důvodů jejich tepelné tolerance a přežití za nepříznivých podmínek prostředí, enterokoky mohou sloužit jako indikátory kvality potravin. Enterokoky se vyskytují v hojném počtu v zelenině, rostlinném materiálu a potravinách, zejména živočišného původu, jako jsou fermentované salámy a sýry. Ve zpracovaném masu jsou enterokoky obecně nežádoucí, naopak mají významné důsledky v mlékárenském průmyslu (Giraffa, 2002).

Enterococcus faecalis tvoří vejcovité buňky, uspořádané v párech a v krátkých řetízcích, má optimální teplotu 37 °C. Zpravidla jsou nepohyblivé. Na polotuhých živných půdách tvoří hladké smetanové až bílé kolonie. Na médiu Slanetz-Bartley tvoří kolonie hladké, obkrouhlé a lesklé hnědočervené až růžové. Fermentuje glukózu za tvorby kyseliny mléčné. Peptonizuje kasein a želatinu. Aminokyselinu tyrosin dekarboxyluje na biogenní amin tyramin. Nachází se v běžných fekáliích lidí, teplokrevných a studenokrevných zvířat; v hmyzu a na rostlinách (Görner a Valík, 2004).

Enterococcus faecium má podobné vlastnosti jako *E. faecalis*. Na médiu Slanetz-Bartley tvoří bledorůžové až bílé kolonie. Třelatinu a kasein nepeptonizuje. Na krevním agaru tvoří α -hemolýzu. Původní stanoviště podobné jako *E. faecalis*. Jako zdroj a první izolát se udává sušené mléko; nachází se v mléku a mléčných výrobcích (Görner a Valík, 2004).

Enterokoky jsou, i když se nepoužívají jako technické mikroorganismy, stálou součástí mikroflóry, sýrů, fermentovaných klobás, šunky a jiných i rostlinných potravin.

Görner a Valík, (2004) stanovili v sýru bryndza, který obsahoval přiměřeně 50 % vody a 2,5 % NaCl po čas jedné sezóny od 50 000 po 10 000 000 KTJ.g⁻¹ enterokoků. Nejčastější byl izolovaný druh *Enterococcus faecalis* (*Streptococcus faecalis* ssp. *faecalis*), 62 % a *Enterococcus faecium* 4 %. Mezi obsahem enterokoků a celkovým počtem bakterií nebyla významná korelace. Autor předpokládá, že enterokoky spolupůsobí při vytváření typických senzorických vlastností sýru bryndza.

V ementálních sýrech způsobil *Enterococcus faecalis* (starší pojmenování *S. faecalis* spp. *liquefaciens*), když byl v něm ve velkém množství (5.10⁵ až 10⁶ KTJ.g⁻¹) „bílou hnilobu“ a inhiboval tvorbu ok propionovými bakteriemi tvorbu ok jako i vznik normální chuti těchto sýrů. Bílá hniloba se projevila na řezu tvorbou bílých skvrn s měkkým a horkým obsahem (Görner a Valík, 2004).

Kombinovaný vliv teploty, pH a koncentrace NaCl má vliv na dynamiku růstu *Enterococcus faecalis* EF37. Tvorba biogenních aminů, v rámci schválených podmínek, je především závislá na růstu *E. faecalis*. Kvantitativně nejdůležitější vytvořené biogenní aminy byly β -fenylethylamin, ale značné množství tyraminu bylo zjištěno u všech vzorků. Bylo potvrzeno, že hlavní biologické funkce ovlivňující tvorbu biogenních aminů je rozsah růstu mikroorganismů, jako je *E. faecalis*, který se vyznačuje dekarboxylázovou aktivitou. V tradiční a řemeslné výrobě sýrů za použití syrového mléka, dosáhnou enterokoky obvykle úrovně 10⁷ buněk/g. Z tohoto pohledu je důležité, aby přítomnost biogenních aminů v důsledku činnosti těchto mikroorganismů byla udržována v bezpečné úrovni, aniž by to ovlivnilo pozitivní účinky enterokoků na konečné organoleptické vlastnosti tohoto sýru (Gardini et al., 2001).

2.3.2 Rod *Lactobacillus* (č. *Lactobacilaceae*)

Tyto bakterie spolu s dalšími (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* a *Pedicoccus*) řadíme mezi tzv. bakterie mléčného kvašení (Bernardeau et al., 2008).

Rod *Lactobacillus* zahrnuje fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní nepohyblivé paličkovité bakterie mléčného kvašení (zpravidla rovné, občas kokobacily). Jejich hlavním metabolitem fermentace sacharidů je kyselina mléčná, ale i octová, etanol a oxid uhličitý. Kyselina mléčná snižuje pH prostředí až na 4,0. Nacházejí se ve fermentovaných rostlinných a živočišných materiálech, méně v trávicím a zažívacím traktu lidí a zvířat. Z potravinářského hlediska se nacházejí v mléce a mléčných výrobcích, v tepelně neopracovaných masných výrobcích, kysaném zelí, sýru. Jsou saprofyty, velmi zřídka patogeni (Görner a Valík, 2004).

Rod *Lactobacillus* se podle fermentace hexóz, pentóz a glukonátů dělí na tři skupiny druhů.

Druhy I. Skupiny: jsou obligátně homofermentativní (hexózy fermentují výlučně (>90 %) na kyselinu mléčnou, pentózy a glukonáty nefermentují). Skupina obsahuje druhy: *Lactobacillus delbrueckii* spp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* spp. *lactis*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. farciminis*.

Vlastnosti: grampozitivní, krátké až dlouhé paličky, mikroaerofilní. Rostou při 45 °C, optimální teplota 30 až 45 °C, nerostou při 15 °C. Výjimku tvoří *L. farciminis*, který roste při 15 °C a neroste při 45 °C.

Výskyt a význam: v mléce a mléčných výrobcích, v dutině ústní a v intestinálním traktu lidí a zvířat. Některé se využívají ve formě čistých zákysových kultur při výrobě jogurtů, acidofilního mléka, tvarohu, sýrů.

Druhy II. Skupiny: jsou fakultativně homofermentativní laktobacily (hexózy fermentují skoro výlučně > 90 % na kyselinu mléčnou; při nedostatku glukózy produkují některé druhy kyselinu octovou, etanol, kyselinu mravenčí, pentózy fermentují pomocí indukované fosfoketolázy). Skupina obsahuje: *L. casei* spp. *casei*, *L. casei* spp. *pseudopantarum*, *L. casei* spp. *rhannosus*, *L. casei* ssp. *tolerans*, *L. plantarum*, *L. alimetarius* a jiné.

Vlastnosti: grampozitivní mikroaerofilní paličky s tendencí tvořit řetízky. Rostou při 15 °C, výjimečně při 45 °C, optimální teplota 28 až 32 °C.

Výskyt a význam: mléko, sýry, mléčné a masné produkty, pekárenský kvas, ústní dutina, intestinální trakt. *L. alimentarius* roste i při 10 % NaCl. *L. casei* spp. *tolerans* přežívá pasteraci při 72 °C 40 s. Některé jsou v mlékárenském a konzervářském průmyslu využívány ve formě čistých kultur.

Druhy III. Skupiny: jsou obligátně homofermentativní (hexózy fermentují heterofermentativně na kyselinu mléčnou a kyselinu octovou, etanol a oxid uhličitý. Pentózy fermentují na kyselinu mléčnou a kyselinu octovou. Skupina obsahuje plynotvorné laktobacily: *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. bifementas*, *L. divergens*, *L. fructivorans*, *L. haloterans*, *L. kefír*, *L. reuteri*, *L. viridescens*, *L. sanfrancisko*.

Vlastnosti: grampozitivní paličky, často i koloidní buňky, to může vést při mikroskopickém zkoumání k záměně s rodami *Leuconostoc*, *Lactococcus* a *Streptococcus*. Od těchto se liší tvorbou DL kyseliny mléčné. Rostou při převážně 15 °C, *L. fermentum* a *L. reuteri* při 45 °C. Optimální teplota 28 až 32 °C. *L. fermentum* při 41 až 42 °C, *L. fructivorans* upřednostňuje pH 5,0 až 5,5. *L. halotolerans* roste za přítomnosti 12 až 14 % NaCl.

Výskyt a význam: mléko a mléčné produkty, masné výrobky, fermentovaná zelenina a plody, pekárenský kvas, kvasnice, dutina ústní, intestinální trakt. Zúčastňují se při kvašení potravin.

Kolonie na agarových mediích mají tvar s pravidelným okrajem, hladké, lesklé, bezbarvé. Laktobacily při růstu v běžných mediích netvoří charakteristický pach. V potravinách však přispívají k tvorbě jejich charakteristických chuťových a voňavých vlastností tvorbou prachových látek jako acetaldehydu, diacetylu, kyseliny octové, aminokyselin a v sýrech i sulfanu.

Některé aminokyseliny jako kyselina glutamová a tyrosin jsou laktobacily dekarboxylované za vzniku aminů, které nejsou dále metabolizované. Některé druhy a kmeny laktobacilů produkují bakteriociny.

Rod *Lactobacillus* obsahuje termofilní druhy, ale mezi termorezistentní se počítá jen *Lactobacillus casei* ssp. *tolerans*, který snáší záhřev na 72 °C trvající 40 s. Druhy a kmeny rodu *Lactobacillus* nejsou významnou složkou termorezistentních bakterií vypěstovaných za podmínek metody na stanovení celkového počtu bakterií v mléku. Laktobacily jsou podobně jako streptokoky a laktokoky náročné na růstové faktory a na běžných mediích obvykle nerostou. Vyžadují delší kultivační čas 3 až 4 dny a bohaté médium (kvasnicový

extrakt, hydrolyzovaný kasein). Při použití vhodného média se podíl laktobacilů mezi termorezistentními bakteriemi zvyšuje (Görner a Valík, 2004).

Laktobacily v potravinářství a životním prostředí

Laktobacily rostou, rozmnožují se a metabolizují za anaerobních podmínek, ale i při sníženém obsahu kyslíku ve všech prostředích, které jim poskytují dostatek fermentovaných sacharidů, štěpných produktů bílkovin, nukleových kyselin a vitamínů skupiny B.

Laktobacily jsou acidotolerantní ať acidofilní. Některé kmeny druhů *L. viridescens*, *L. sake*, *L. plantarum*, *L. curvatus* rostou, i když pomalu, při nízkých teplotách blízkých bodu mrazu (např. na chlazeném mase) (Görner a Valík, 2004).

2.4 Metody stanovení BA

Existují dva důvody pro stanovení aminů v potravinách: první je potenciální toxicita, druhý je možnost jejich využití jako markerů kvality potravin. Některé z hlavních aplikací analýzy biogenní aminů jsou: kontrola kvality surovin, meziproduktů a konečných produktů, sledování fermentačních procesů, řízení procesů, výzkum a vývoj (Önal, 2007).

Analýza BA je důležitá pro jejich toxicitu a jejich využití jako ukazatele čerstvosti a stupně kažení potravin. Byly vyvinuty metody pro stanovení biogenních aminů v potravinách. Analytické metody používané pro kvantifikaci biogenních aminů jsou založeny především na chromatografických metodách: chromatografie na tenké vrstvě (TLC), plynová chromatografie (GC), kapilární elektroforéza (CE) a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) (Önal, 2007).

Lapa-Guimaraes a Picková (2004) představili jednorozměrné, dvojrozměrné chromatografické techniky na tenké vrstvě, systému chloroform-diethylether-tryethylamine (6:4:1) následovaném chloroform-tryethylamine (6:1) a to pro separaci a stanovení dansylovaných derivátů BA.

TLC je jednoduchá a nevyžaduje speciální vybavení, avšak většina z publikovaných metod, trpí nadměrnou potřebou času pro analýzu a je jen (semi-kvantitativní). GC není tak často použita pro stanovení BA (Lange et al., 2002).

HPLC je nejčastěji využívána pro analýzu metod biogenních aminů (Önal, 2007).

2.4.1 Chromatografické metody

Chromatografie je separační metoda, při které se oddělují – separují složky obsažené ve vzorku. Svým určením je to především metoda pro kvantitativní a kvalitativní analýzy složek vzorku. V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě fáze. Jedna je nepohyblivá a nazývá se stacionární fáze. Přes ni se pohybuje druhá, která se proto nazývá mobilní fáze. Pohybem mobilní fáze je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku, které lnou ochotněji ke stacionární fázi než k fázi mobilní, se při pohybu zdržují více než jiné složky, které se ke stacionární fázi poutají hůře. Tím se postupně složky od sebe separují (Klouda, 2003).

Klouda (2003) rozděluje chromatografické metody podle několika hledisek:

1) Podle povahy mobilní fáze:

- a) **kapalinová chromatografie (LC)**, kdy mobilní fáze je kapalina
- b) **plynová chromatografie (GC)**, kdy mobilní fáze je plyn

2) Podle uspořádání stacionární fáze:

- a) **kolonová chromatografie**, kdy stacionární fáze je umístěna v trubici (koloně)
- b) **plošné techniky:**
 - **papírová chromatografie**, kdy stacionární fáze je součástí chromatografického papíru
 - **tenkovrstvá chromatografie**, kdy stacionární fáze je umístěna na skleněné desce, hliníkové fólii nebo plochém podkladu z jiného materiálu

3) Podle povahy děje, který převládá při separaci:

- obvykle se při separaci uplatňuje několik fyzikálně chemických dějů současně, ale jeden z nich převládá

- a) **rozdělovací chromatografie**, kdy o separaci rozhoduje různá rozpustnost složek vzorku ve stacionární fázi (kapalina) a mobilní fázi (kapalina nebo plyn)
- b) **adsorpční chromatografie**, kdy o separaci rozhoduje různá schopnost složek poutat se (adsorbovat se) na povrch stacionární fáze (tuhá látka)
- c) **iontově – výměnná chromatografie**, kdy o separaci rozhodují různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměnič) a ionty vzorku
- d) **gelová chromatografie**, kdy se složky separují podle velikosti na pórovité stacionární fázi – gelu; menší molekuly se v pórech gelu zdržují déle (molekulově síťový efekt)
- e) **afinitivní chromatografie**, kde stacionární fáze je schopna vázat ze vzorku právě určité složky, ke kterým má úzce selektivní vztah - afinitu

2.4.1.1 Kapalinová chromatografie

V kapalinové chromatografii je mobilní fáze kapalina. Na rozdíl od plynové chromatografie rozhodují o separaci složek vzorku nejen jejich interakce se stacionární fází, ale velmi výrazně i použitá mobilní fáze. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fázi. Čas, který stráví v jedné nebo druhé fázi, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Jsou využitelné všechny možné mechanismy separace – adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii. Podle uspořádání stacionární fáze rozlišujeme kolonovou a tenkovrstvou či papírovou kapalinovou chromatografii. Protože je možné pracovat za laboratorní teploty bez nutnosti převádět vzorek na plyn, je kapalinová chromatografie vhodná i pro separaci tepelně nestálých a netěkavých sloučenin (Klouda, 2003).

Kapalinový chromatograf

V klasické kapalinové chromatografii naplníme skleněnou trubici délky asi 0,5 m a průměru 2 cm, dole zakončenou fritou a kohoutem, zrnitým sorbetem s velkým průměrem částic (např. oxidem hlinitým). Na horní vrstvu náplně dávkuje malé množství vzorku a pak přidáváme mobilní kapalnou fázi (eluent). Působením gravitační síly mobilní fáze postupujeme kolonou, složky vzorku od sebe separují a v různých časech opouštějí spodní část kolony (Klouda, 2003).

Klasické kolonové provedení nemá potřebnou účinnost, ale stalo se základem vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC). K účinné separaci je třeba použít dostatečně malých zrníček sorbentu, která kladou prostupující kapalině značný odpor. Proto je nutno pracovat při vysokém tlaku (Klouda, 2003).

- **Čerpadlo.** Kapalina se do kolony čerpá pístovými nebo membránovými čerpadly. Dobré čerpadlo docílí průtoku v rozsahu od mikrolitrů do desítek mililitrů za minutu s méně než 1% kolísáním průtoku při tlaku až 35 MPa. Materiál čerpadla nesmí být narušen mobilní fází a nesmí do ní uvolňovat žádné látky.
- **Směšovací zařízení.** Složení mobilní fáze může zůstat stálé (izokratická eluce) nebo se během separace mění (gradientová eluce).
- **Dávkovací zařízení.** Dávkování injekční stříkačkou přináší nevýhody z hlediska těsnosti, udržení tlaku a zejména vnášení stop materiálu injekční stříkačky. Pokud

je použito injekční zařízení, musí být zhotovena z inertních materiálů (nerezová ocel, titan, některé polymery). Injekční zařízení může být ovládáno ručně i automaticky.

- **Kolony** používáme pouze náplňové. Mnoho rozličných aplikací kapalinové chromatografie podmiňuje existenci velkého množství kolon různé délky, vnitřního průměru a náplně. Pro většinu rutinních analýz jsou kolony zhotoveny z nerezové oceli.
- **Nastavení teploty.** Většina separací HPLC probíhá při laboratorní teplotě a nevyžaduje termostatování. Některé separace se významně zlepší zvýšením teploty, což většina nových chromatografů umožňuje. Programová změna teploty se však v HPLC nevyužívá (Klouda, 2003).

(Obrázek č. 4 kapalinový chromatograf viz příloha).

Detektory v kapalinové chromatografii

Detektory v HPLC by měly být selektivní pro analyty a málo citlivé pro mobilní fázi. Průtočná cela detektoru musí snést tlak mobilní fáze a udržet těsnost. Nejpoužívanějšími detektory jsou fotometrický, refraktometrický a fluorescenční.

Fotometrické detektory patří k nejběžnějším detektorům. Měří absorbanci fluátu vycházejícího z kolony. Pro optimální citlivost detektoru musí být zajištěna dostatečná adsorpční dráha průtočné kyvety, jiť prochází paprsek. Jednodušší detektory měří při jedné vlnové délce v ultrafialové oblasti, složitější dovolují nastavení vlnové délky pomocí monochromátoru.

Refraktometrický detektor měří rozdíly mezi indexem lomu fluátu a čisté mobilní fáze. Obsahuje-li fluát slotku, objeví se výchylka. Tento typ detektoru není příliš citlivý, ale je velmi univerzální. Při jeho používání je třeba přísně udržovat konstantní teplotu.

Fluorescenční detektor je založen na principu fluorescence – schopnosti absorbovat ultrafialové záření a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce, které se měří fotonásobičem kolmo na směr vystupujícího záření. Detektor má detekční limit až 10^{-12} g.ml⁻¹ analytu. Je vysoce selektivní. Vhodně lze kombinovat s fotometrickým detektorem.

Elektrochemické detektory jako **vodivostní** nebo **voltametrické** lze použít tam, kde jsou v roztocích obsaženy ionty respektive slotky oxidovatelné nebo redukovatelné na polarizované elektrodě (Klouda, 2003).

3 Materiál a metodika

Vlastní praktická část probíhala v období od března do června a od září do listopadu 2010 v laboratořích Ústavu hygieny a technologie mléka FVHE VFU Brno.

3.1 Materiál

3.1.1 Vzorky

Byly použity identifikované kmeny rodů *Lactobacillus* a *Enterococcus*, které pocházely ze sbírky mikroorganismů na Ústavu hygieny a technologie mléka, VFU Brno a byly izolované z kozích sýrů. Kozí sýry pocházely z české farmy Šošůvka v okrese Blansko.

3.1.2 Kontrolní kmeny

Pro pozitivní kontrolu v případě půdy s tyrosinem byl použit kmen *Lactobacillus brevis* (CCM 1815), u půdy s histidinem *Lactobacillus buchneri* (DSMZ 5987). *Lactobacillus rhamnosus* (CCM 1828) byl využit pro negativní kontrolu u obou typů půd. Tyto laktobacily pocházely z České sbírky mikroorganismů, Masarykovy univerzity v Brně (Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie) a kmen DSMZ 5987 z Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur.

Pro pozitivní kontrolu byl použit sbírkový kmen CCM 4224 *Enterococcus faecalis* (tyramin) a dále byly použity v práci CCM 2308 *Enterococcus faecium*, CCM 5612 *Enterococcus durans* a jako negativní kontrola nám sloužilo médium bez mikroorganismů. Tyto enterokoky pocházely ze sbírky mikroorganismů na Ústavu hygieny a technologie mléka, VFU Brno.

3.1.3 Sklo, pomůcky

- kádinky
- zábrusová baňka
- pipety
- odměrné baňky
- odpařovací baňky
- odměrný válec
- petriho misky
- očkovací kličky
- zkumavky
- stojan na zkumavky
- vatové zátky
- kahan
- vialky
- pasteurovy pipety
- membránový nylonový filtr, 0,45 µm
- alobal
- magnetické míchadlo

3.1.4 Přístroje

- termostat (BTM, ČR)
- analytické váhy (KERN, D)
- analytické váhy (METTLER TOLEDO, D)
- vysokorychlostní mixér (ULTRA-TUREX, D)
- magnetická míchačka (HEIDOLPH, D)
- ultrazvuková lázeň (KRAINTEK, SK)
- třepačka typ 3005 (GFL, D)
- lednička (ČR)
- pH metr (RADELKIS, H)
- mikrovlnná trouba (WHIRPOOL, SE)
- autokláv (TUTTNAUER, NL)

- vodní lázeň typ 1002 (GFL, D)
- rotační vakuová odparka (BUCHI Rotavaport, CH)
- kapalinový chromatogram Alliance (WATERS, USA)
- fluorescenční detektor typ 2475 (WATERS, USA)
- detektor s diodovým polem (PDA) typ 2996 (WATERS, USA)
- kolona Zorbax Eclipse XDB typ C 18 4,6×150 nm, se zrnitostí 3,5 µm (AGILENT, USA)
- předkolona Zorbax Eclipse XDB typ C 18 4,6×12,5 nm o zrnitosti 5 µm (AGILENT, USA)

3.1.5 Chemikálie a roztoky pro stanovení dekarboxylační aktivity

- voda deionizovaná
- trypton / pepton (ROTH, D)
- kvasničný extrakt (PENTA, ČR)
- chlorid sodný (PENTA, ČR)
- D-glukosa bezvodá (PENTA, ČR)
- tween 80 (HIMEDIA, IND)
- heptahydrát síranu hořečnatého (PENTA, ČR)
- monohydrát síranu manganatého (PENTA, ČR)
- heptahydrát síranu železnatého (PENTA, ČR)
- uhličitan vápenatý (PENTA, ČR)
- L-Aminokyselina – L-tyrosine hydrochloride (98%) (SIGMA-ALDRICH, USA)
L-histidine dihydrochlorid (99%) (SIGMA-ALDRICH, USA)
- bromkresol purpur (BKP) (P-LAB, ČR)
- agar (OXOID, GB)
- MRS agar (OXOID, GB)
- Slanetz-Bartley agar (OXOID, GB)
- pyridoxal-5-fosfát monohydrát (SIGMA-ALDRICH, USA)
- 0,1 M kyselina chlorovodíková (PENTA, ČR)
- hydroxid sodný (PENTA, ČR)

3.1.6 Chemikálie a roztoky pro stanovení BA

- methanol pro HPLC (MERCK, D)
- 10% kyselina trichloroctová (ROTH, D)
- hydrogenuhlíčan sodný (99%) (CHEMICA, ČR)
- dansylchlorid (FLUKA, CH)
- aceton pro HPLC (MERCK, D)
- 26% amoniak (PENTA, ČR)
- kyselina chlorovodíková (PENTA, ČR)
- petrolether pro organické stopové analýzy (MERCK, D)
- acetonitril gradient grade pro HPLC (MERCK, D)
- acetic acid (50%) (SIGMA-ALDRICH, USA)

Standardy (SIGMA-ALDRICH, USA):

- histamine dihydrochloride
- tyramine dihydrochloride
- tryptamine hydrochloride
- 1,7-diaminoheptan
- putrescin dihydrochloride
- kadaverin dihydrochloride
- β -fenylethylamine hydrochloride
- agmatine sulfate
- spermidine trihydrochloride
- spermine tetrahydrochloride

Složení mobilních fází, které byly použity při stanovení BA pomocí kapalinové chromatografie jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Složení mobilních fází

Mobilní fáze:	
A	B
900 ml 0,02 M kyselina octová	100 ml 00,2 M kyselina octová
100 ml acetonitrilu	450 ml acetonitrilu
	450 ml methanolu

3.2 Metodika

Nejdříve byla sledována dekarboxylační aktivita u vybraných kultur rodů *Lactobacillus* a *Enterococcus* v mediu dle Joostena a Northota (1989). A následně aktivita byla potvrzena tvorbou biogenních aminů. Biogenní aminy (agmatin, tryptamin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermidin a spermin) byly stanoveny metodou HPLC s předkolonovou derivatizací dansylchloridem podle Paulsena et al. (1997).

3.2.1 Sledování dekarboxylační aktivity

Ke sledování dekarboxylační aktivity byly vybrány typické kolonie. Kmeny byly připraveny pro testování subkultivací na půdách S-B (Slanetz-Bartley agar) u enterokoků nebo MRS (Man, Rogosa a Sharpe agar) u laktobacilů při 30 - 37 °C 24 hodin. Příprava média viz modifikované médium dle Joosten and Northolt (1989). Poté se půda promícháním homogenizovala (v ultrazvuku) a byla sterilována při 121 °C/15 minut (80-90 kPa/15 minut). Do sterilních zkumavek 80x10 mm jsme napipetovali 2 ml média, zkumavky jsme označili a uzavřeli vatovou zátkou. Každá kultura byla sterilní kličkou přenesena na dekarboxylační agar a inkubována při 30 - 37 °C 24 až 48 hodin. Pozitivní reakci tvorby aminů potvrzuje fialové zbarvení – Joosten and Northolt (1989), negativní reakci potvrzuje žluté zbarvení (obrázek č. 5 viz příloha). Všechny kmeny se testovaly dvakrát. A následně byly nepipetovány do ependorfech ke zmrazení. Mez stanovitelnosti pro metodu stanovení dekarboxylační aktivity v DM je 0,3 mg.l⁻¹.

Příprava půdy (modifikované médium dle Joosten and Northolt, 1989)

Chemikálie (0,5 g.l⁻¹ trypton + 0,5 g.l⁻¹ kvasničný extrakt + 0,5 g.l⁻¹ chlorid sodný + 0,1 g.l⁻¹ glukosa + 0,05 g.l⁻¹ tween 80 + 0,020 g.l⁻¹ heptahydrát síranu hořečnatého + 0,005 g.l⁻¹ síranu manganatého + 0,004 g.l⁻¹ heptahydrát síranu železnatého + 0,010 g.l⁻¹ uhličitanu vápenatého + 0,006 g.l⁻¹ bromkresol purpur + 2 g.l⁻¹ agar + 0,005 g.l⁻¹ pyridoxal-5-fosfát) byly rozpuštěny v deionizované vodě (1000 ml) a byly přidány aminokyseliny (2 g.l⁻¹ L-histidin, 2 g.l⁻¹ L-tyrosin). Bylo upraveno pH půdy pomocí HCl a NaOH na pH 5,5 nebo na příslušné pH dle pokusu (pH 4,5; 5 a 5,5) a nakonec byl přidán indikátor bromkresol purpur.

3.2.2 Stanovení biogenních aminů metodou HPLC

Příprava vzorků

Po rozmražení ependorfe a jejich odstředění byl napipetován do zkumavky supernatant vzorku (0,9 ml filtrátu vzorku + 0,1 ml roztoku diaminoheptanu + 1 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného + 1 ml dansylchloridu). U slepého vzorku a standardu bylo postupováno viz níže. Všechny zkumavky byly zazátkovány, obaleny alobalem, dobře protřepány i pomocí ultrazvuku a takto připravené zkumavky inkubovány ve vodní lázni při 40 °C po dobu 60 minut. Po 60 minutách bylo do každé zkumavky napipetováno 50 µl amoniaku, pro odstranění zbytku dansylchloridu a uchovány v temnu po dobu 30 minut. Poté do zkumavek byl přidán 1 ml petroletheru pro residuální analýzu a vytřepáván na třepačce po dobu 10 minut. Po odeberání supernatantu (cca 1 ml) pomocí pasterových pipet do odpařovacích baněk byl celý postup proveden třikrát. Vodná fáze v odměrné baňce byla odpařena na vakuové odparce při 45 °C cca 3-5 minut (tak aby zůstala kapička). Zakoncentrovaný vzorek byl rozpuštěn v 1 ml acetonitrilu pro HPLC a přefiltrován přes membránový filtr (0,45 µm) do vialky pro HPLC stanovení. Mez stanovitelnosti pro metodu stanovení dekarboxylační aktivity pomocí HPLC metody je 0,114 mg.kg⁻¹ pro histamin a 0,020 mg.kg⁻¹ pro tyramin.

Příprava dansylchloridu

125 mg dansylchloridu se rozpustilo ve 25 ml acetonu pro HPLC .

Příprava slepého vzorku

Do zkumavky bylo napipetováno: 0,9 ml 0,1 M kyseliny chlorovodíkové (HCl) + 0,1 ml roztoku 1,7-diaminoheptanu + 1 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného + 1 ml roztoku dansylchloridu, protřepáno i pomocí ultrazvuku rozmícháno.

Příprava standardu

Směs 10 biogenních aminů po 1 ml (argininu+tryptaminu+2-fenylethylaminu+putrescinu+kadaverinu+histaminu+heptaminu+tyraminu+spermidinu+sperminu) napipetováno do zkumavky: 1 ml směsi BA + 1 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného + 1 ml roztoku dansylchloridu protřepáno i pomocí ultrazvuku rozmícháno.

3.2.3 Chromatografické podmínky

Koncentrace biogenních aminů byla stanovena pomocí kapalinového chromatografu Alliance 2695 od firmy Waters (USA) s fluorescenčním detektorem typu 2475 a fotodiodovým detektorem typu 2996. Separace byla provedena na koloně Zorbax Eclipse XDB typ C 18 4,6×150 mm, se zrnitostí stacionární fáze 3,5 μm s předkolonou Eclipse XDB typ C 18 4,6×12,5 mm o zrnitosti 5 μm (Agilent, USA), při teplotě kolony 35 °C a nástriku 20 μl . Byla použita gradientová eluce, gradient viz tabulka č. 5. Dansyl deriváty aminů byly kvantifikovány měřením fluorescence ($\lambda_{\text{EX}} = 330 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 500 \text{ nm}$). Výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu Empower fluorescence software (Waters, USA). (Záznamy chromatogramů viz příloha).

Tabulka č. 5: Eluční program: čas analýzy 28 min, gradient, průtok 1 ml.min⁻¹

Gradient:		
t (min)	A (%)	B (%)
0-3	40	60
3-6	30	70
6-9	20	80
9-13	10	90
13-18	0	100
18-20	10	90
20-22	20	80
22-24	30	70
24-28	40	60

4 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo sledovat dekarboxylační aktivitu u identifikovaných druhů rodu *Lactobacillus* a *Enterococcus*, izolovaných z kozího sýra z české farmy Šošůvka, v médiu dle Joostena a Norholta (1989) a potvrdit tvorbu biogenních aminů pomocí kapalinové chromatografie na reverzní fázi s gradientovou elucí a fluorescenční detekcí. Současně byl sledován vliv různého pH (4,5; 5 a 5,5) a vliv různé teploty (15 °C, 30 °C a 44 °C) u identifikovaných druhů rodu *Lactobacillus* a *Enterococcus* na tvorbu BA a dále byly tyto identifikované druhy srovnávány s kulturami, které pocházely ze sbírky mikroorganismů z Ústavu hygieny a technologie mléka, VFU Brno.

5 Výsledky a diskuse

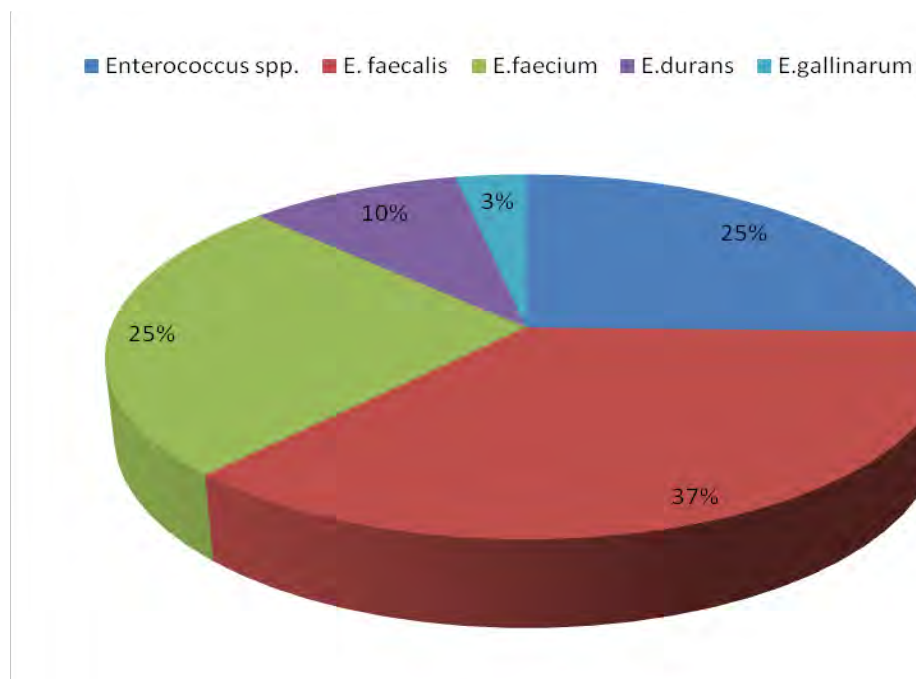
V období od března do června a od září do listopadu 2010 bylo v laboratořích na Ústavu hygieny a technologie mléka FVHE VFU Brno stanoveno celkem 73 izolátů na dekarboxylační aktivitu, izolovaných z kozích sýrů. Dekarboxylační aktivita byla ověřena pomocí kapalinové chromatografie na reverzní fázi s gradientovou elucí a fluorescenční detekcí.

Z archívu mikroorganismů VFU Brno jsme použily identifikované druhy rodu *Lactobacillus* (10 izolátů) a *Enterococcus* (63 izolátů) izolované z kozích sýrů získaných přímo z farmy Šošůvka okres Blansko.

5.1 Enterokoky

Enterokoky patří mezi mikroorganismy s vysokou dekarboxylační aktivitou (Joosten and Northolt, 1989). Zaměřili jsme se na tento rod, který byl nalezen v kozím sýru v druhovém zastoupení, jak uvádí graf č. 1. Nejvíce izolátů (23) z kozího sýra bylo identifikováno jako *Enterococcus faecalis* (37 %), druhé největší zastoupení zaujímá *Enterococcus faecium* a *Enterococcus* spp. (25 %), 10 % izolátů bylo identifikováno jako *Enterococcus durans* a nejmenší zastoupení bylo identifikováno jako *Enterococcus gallinarum* (3%).

Graf č. 1: Druhové zastoupení enterokoků izolovaných z kozího sýra



Byla sledována dekarboxylační aktivita u rodu *Enterococcus* na produkci tyraminu a histaminu v dekarboxylačním mediu (DM) v aerobním prostředí při 37 °C po dobu 48 hodin a následně kvantitativně stanovena pomocí HPLC metod. Při každém stanovování byla současně prováděna pozitivní a negativní kontrola pro průkaz správnosti testu. Jako pozitivní kontrola nám sloužily sbírkové kmeny s pozitivitou na daný amin a jako negativní kontrola nám sloužilo médium bez mikroorganismů. Za negativní výsledek změřený metodou HPLC považujeme hodnoty v desítkách mg.l^{-1} a jako pozitivitu bereme hodnoty ve stovkách v mg.l^{-1} . Jednotlivé tabulky uvádí hodnoty BA (v mg.l^{-1}) a pozitivní a negativní výsledky dekarboxylační aktivity (v DM) u izolátů *Enterococcus* spp. (tab č. 6), izolátů identifikovaných jako *Enterococcus faecalis* (tab č. 7). A tabulka č. 8 uvádí výsledky u izolátů identifikovaných jako *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* a *Enterococcus gallinarum*.

Tabulka č. 6: Stanovení dekarboxylační aktivity u *Enterococcus* spp. v dekarboxylačním mediu a pomocí HPLC

vzorek	izolát	Biogenní aminy			
		TYRAMIN		HISTAMIN	
		DM	HPLC (mg.l^{-1})	DM	HPLC (mg.l^{-1})
Pozitiv. kontrola	CCM 4224	+	1239	-	60,7
Negativ.kontrola	Bez MO	-	3,09	-	4,04
1603	ENT spp.	+	1885	-	10,2
1604	ENT spp.	+	1561	-	18,8
1605	ENT spp.	+	1810	-	21,7
1607	ENT spp.	+	1718	-	16,0
1608	ENT spp.	+	1783	-	23,2
1609	ENT spp.	+	1861	-	12,7
1616	ENT spp.	+	1780	-	14,2
1902	ENT spp.	+	1537	-	33,0
1903	ENT spp.	+/-	680	-	13,5
1904	ENT spp.	+	1354	-	30,4
1905	ENT spp.	+	1657	-	31,9
1906	ENT spp.	+/-	825	-	31,4
1907	ENT spp.	+/-	1054	-	35,3
1930	ENT spp.	-	1493	-	17,6
1931	ENT spp.	-	1668	-	24,8
1932	ENT spp.	-	1563	-	34,2

+ pozitivní dekarboxylační aktivita (fialové zbarvení), - negativní dekarboxylační aktivita (tluť zbarvení),
 ENT spp. – *Enterococcus species*, DM – dekarboxylační medium dle Joostena a Northolta, 1989
 Kontroly: Pozitivní kontrolní sbírkový kmen CCM 4224 *Enterococcus faecalis* (tyramin)
 Negativní kontrola - Bez MO – medium bez mikroorganismů

Zastoupení *Enterococcus* spp. v kozím sýru je 25 % (16 izolátů z celkových 63 izolátů). Z toho na tvorbu tyraminu bylo 10 izolátů pozitivních, 3 negativní a 3 dubiozní (+/-). Všechny námi sledované izoláty byly negativní na tvorbu histaminu. *Enterococcus* spp. tvořil tyramin v rozmezí od 680 – 1885 mg.l⁻¹. U dubiozních (+/-) nálezů byla pomocí HPLC potvrzena snížená dekarboxylační aktivita u těchto izolátů.

Tabulka č. 7: Stanovení dekarboxylační aktivity u *Enterococcus faecalis* v dekarboxylačním mediu a pomocí HPLC metody

vzorek	izolát	Biogenní aminy			
		TYRAMIN		HISTAMIN	
		DM	HPLC (mg.l ⁻¹)	DM	HPLC (mg.l ⁻¹)
1856	EFS	+	1819	-	13,5
1857	EFS	+	1141	-	58,1
1859	EFS	+	1739	-	15,7
1860	EFS	+	1702	-	16,3
1861	EFS	+	1730	-	14,6
1862	EFS	+	1663	-	14,0
1863	EFS	+	1754	-	14,4
1864	EFS	+	1522	-	13,5
1865	EFS	+	1155	-	10,2
1866	EFS	+	1711	-	18,7
1867	EFS	+	1608	-	10,4
1868	EFS	+	1069	-	17,3
1869	EFS	+	1216	-	20,9
1870	EFS	+	1505	-	16,8
1964	EFS	+	1308	-	34,8
1969	EFS	+	1500	-	33,6
1984	EFS	+	1614	-	35,0
1985	EFS	+	746	-	29,2
1986	EFS	+	1425	-	38,1
1988	EFS	+	1493	-	20,8
1595	EFS	+	1905	-	28,6
1596	EFS	+	2086	-	30,4
1598	EFS	+	792	-	23,8

+ pozitivní dekarboxylační aktivita (fialové zbarvení), - negativní dekarboxylační aktivita (tluť zbarvení)
EFS - *Enterococcus faecalis*
DM - dekarboxylační medium dle Joostena a Northolta, 1989

Zastoupení *Enterococcus faecalis* v kozím sýru je nejvyšší (37 %). Z toho byly všechny izoláty (23) pozitivní na tvorbu tyraminu a všechny negativní na tvorbu histaminu. *Enterococcus faecalis* tvořil tyramin v rozmezí od 746 – 2086 mg.l⁻¹. Výsledky jsou v souladu s dřívějšími nálezy.

Tham et al. (1990) sledovali schopnost enterokoků izolovaných z kozích sýrů produkovat histamin a zjistili, že *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* netvořil histamin. V této studii byl izolován z kozího sýra tyramin, pozitivní kmen enterokoků *Enterococcus faecalis*. Suzzi et al. (2000) uvádí, že proteolytické kmeny *E. faecalis* tvoří ve značném množství biogenní aminy.

Ve španělském sýru značky Cabrales bylo prokázáno největší množství tyraminu (1807 mg.kg⁻¹) produkované enterokoky a laktobacily (Sagués-Roig et al., 2002). Na druhou stranu Schneller, et al. (1997) uváděli pouze enterokoky a čeled' *Enterobacteriaceae* odpovědné za tvorbu tyraminu, nikoliv laktobacily. V naší studii byly naměřeny hodnoty u tyraminu v médiu v rozmezí od 746 – 2086 mg.l⁻¹. Což jsou obdobné hodnoty jako uvádí i jiní autoři (Bonetta et al., 2008). U sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou byly nalezeny nejvyšší koncentrace tyraminu (ementál 1123 mg.kg⁻¹), u měkkých zrajících sýrů (bryndza 417 mg.kg⁻¹) a sýrů plísňových (hermelín 187 mg.kg⁻¹) (Standarová a kol., 2008). U zahraničních sýrů tohoto typu však bývají nalézány hodnoty i násobně vyšší (např. parmazán 2460 mg.kg⁻¹) (Sieber et al., 1990).

Izoláty identifikovaných kultur použitých v naší studii byly izolované z kozích sýrů z české farmy Šošůvka. Tyto sýry byly čerstvé nezrající, vakuově balené a skladované při teplotě 5 °C. Zdrojem biogenních aminů jsou buď mikroorganismy přítomné ve výchozí surovině (v mléce) nebo jeho následnou kontaminací při výrobě či skladování.

Mezi obecně známé mikrobiální kontaminanty mléka patří *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium* a *Pseudomonas fluorescens*, ale my jsme všechny nesledovali. V nefermentovaných potravinách poukazuje přítomnost těchto mikroorganismů na nedostatečné zahřátí suroviny a na nedostatečnou sanitaci výrobního zařízení (Görner a Valík, 2004).

Tabulka č. 8: Stanovení dekarboxylační aktivity u *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* a *Enterococcus gallinarum* v dekarboxylačním mediu a pomocí HPLC metody

vzorek	izolát	Biogenní aminy			
		TYRAMIN		HISTAMIN	
		DM	HPLC (mg.l ⁻¹)	DM	HPLC (mg.l ⁻¹)
1858	EFM	+	1890	-	13,9
1949	EFM	-	1047	-	18,8
1735	EFM	+	1487	-	27,1
1736	EFM	+	883	-	23,3
1737	EFM	+	1411	-	25,3
1738	EFM	+	1143	-	28,0
1739	EFM	+	1181	-	22,4
1601	EFM	+	1110	-	24,1
1602	EFM	+	914	-	27,5
1613	EFM	+	818	-	24,4
1614	EFM	+	1247	-	25,4
1597	EFM	+	766	-	24,6
1599	EFM	+	1804	-	20,2
1732	EFM	+	810	-	26,9
1733	EFM	+	944	-	23,8
1734	EFM	+	1620	-	25,7
1855	EDU	+	1550	-	13,5
1989	EDU	-	958	-	12,0
1600	EDU	+	1690	-	32,1
1982	EDU	+	1929	-	27,7
1983	EDU	+	1968	-	24,9
1987	EDU	+	1798	-	28,1
1990	EGAL	+/-	1020	-	17,3
1991	EGAL	+/-	818	-	12,8

+ pozitivní dekarboxylační aktivita (fialové zbarvení), - negativní dekarboxylační aktivita (tlu té zbarvení),

+/- - dubiozní dekarboxylační aktivita

EFM - *Enterococcus faecium*

EDU - *Enterococcus durans*

EGAL - *Enterococcus gallinarum*

DM - dekarboxylační medium dle Joosten a Northolt, 1989

Zastoupení *Enterococcus faecium* stejně jako u *Enterococcus* spp. v kozím sýru je 25 % (16 izolátů). Z toho 1 izolát byl na tvorbu tyraminu negativní a ostatní (15) byly pozitivní. *Enterococcus faecium* tvořil tyramin v rozmezí od 766 – 1890 mg.l⁻¹. Z 10 % (6 izolátů) je v kozím sýru zastoupen *Enterococcus durans*, kdy 5 izolátů bylo pozitivních a 1 izolát negativní na tvorbu tyraminu. A jeho koncentrace se pohybovala v rozmezí od 950 – 1968 mg.l⁻¹. Nejmenší zastoupení zaujímá v kozím sýru *Enterococcus gallinarum* (3 %), u kterého jsou 2 izoláty dubiozní (+/-) na produkci tyraminu a to v rozmezí od 818 – 1020 mg.l⁻¹. Všechny izoláty námi sledovaných druhů enterokoků prokázaly negativní aktivitu na tvorbu histaminu.

Tyramin je nejčastější biogenní amin nalezen v sýru. Za tvorbu tyraminu byl odpovědný *Enterococcus durans* IPLA 655, u kterého byl sledován růst v bioreaktoru za různých podmínek, pro určení vlivu zdroje uhlíku, koncentraci tyraminu a pH pro jeho tvorbu. Bylo zjištěno, že zdroj uhlíku nemá zásadní vliv na tvorbu tyraminu. pH mělo zdaleka největší vliv na syntézu tyraminu. Největší tvorby tyraminu bylo dosaženo při pH 5,0 ačkoliv bylo doprovázeno sníženou rychlostí růstu (Fernández et al., 2007).

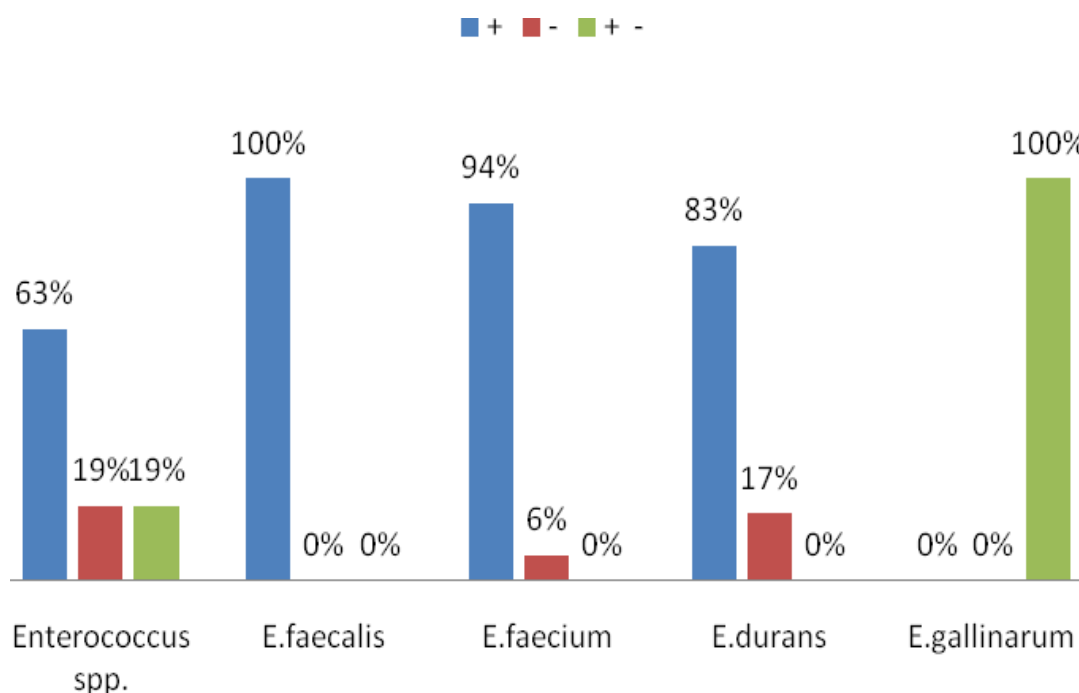
Autoři Bonetta et al. (2008) zkoumali dekarboxylační aktivitu bakteriálních kmenů a obsah biogenních aminů v italském kozím sýru. Studie byla provedena u čerstvých a zrajících vzorků kozích sýrů. 67 izolovaných kmenů bakterií prokázaly dekarboxylační aktivitu a *Enterococcus faecalis* byl nejrozšířenější ze všech druhů bakterií ve všech výrobcích. *Pedococcus acidilactici* a *Enterococcus malodoratus* byly také identifikovány jako původci biogenních aminů v sýru Robiola di Roccaverano. Všechny izolované kmeny *Enterococcus faecalis* v této studii byly schopny dekarboxylační činnosti tyrosinu. Tyramin byl s nejvyšší koncentrací biogenní amin ve vzorcích sýrů, zatímco histamin byl nejrozšířenější. Ve vzorcích zralých sýrů bylo nalezeno velké množství tyraminu a histaminu (až do 2067 mg.kg⁻¹ pro tyramin a 1786 mg.kg⁻¹ pro histamin), zatímco β – fenylethylamin a tyramin byly přítomny ve všech zralých sýrech, ale v nízkých koncentracích (Bonetta et al., 2008).

Autoři Sagués-Roig et al., (2002) studovali 44 vzorků různých druhů španělských sýrů, které byly testovány na tvorbu tyraminu a histaminu. Bylo získáno 694 izolátů a testovány na dekarboxylační aktivitu histaminu a tyraminu. Tyramin byl častější u mikroorganismů izolovaných ze selektivní živné půdy a mikroorganismy byly identifikovány jako grampozitivní bakterie (enterokoky a bakterie mléčného kvašení). Za tvorbu histaminu byly odpovědné bakterie mléčného kvašení.

V ementálských sýrech způsobil tvorbu BA (tyraminu) *Enterococcus faecalis* (starší pojmenování *S. faecalis* spp. *liquefaciens*), když byl ve velkém množství (5.10^5 až 10^6 KTJ.g⁻¹) (Görner a Valík, 2004). V naší studii bylo potvrzeno, že na tvorbě tyraminu se nejvíce podíleli enterokoky.

V kozím sýru byl identifikován rod *Enterococcus* jako jeden z častých původců BA, tudíž jsme se na něj zaměřili. V grafu č. 2 je uvedeno procentuální zastoupení všech druhů enterokoků, které jsme sledovali, a to v pozitivní, negativní a dubiozní tvorbě na tyramin. Z grafu vyplývá, že *Enterococcus faecalis* se podílel pouze na pozitivní tvorbě na tyramin (100 %). Podobně je tomu tak u *Enterococcus faecium* (96 %) pro pozitivní tvorbu a z 6 % byl negativní na tvorbu tyraminu. *Enterococcus durans* se podílel z 83 % na pozitivní tvorbě a ze 17 % netvořil tyramin. Z 19 % byl negativní a dubiozní (+/-) na tvorbu tyraminu *Enterococcus* spp. a z většiny pozitivní (63 %). Jediný *Enterococcus gallinarum* se nepodílel na pozitivní a negativní tvorbě, ale tvořil 100 % dubiozní tvorbu tyraminu.

Graf č. 2: Procentuální zastoupení dekarboxylační aktivity na tyramin u jednotlivých identifikovaných druhů enterokoků izolovaných z kozího sýru



Naše výsledky poukazují na močnou predispozici tedy zvýšenou dekarboxylační aktivitu některých druhů enterokoků k tvorbě biogenních aminů v tomto kozím sýru. A to hlavně na zvýšenou tvorbu tyraminu. Nicméně, tvorba aminu závisí na výši růstu dekarboxylačních bakterií spíše než na růstových podmínkách. Minimální koncentrace

buněk enterokoků pro tvorbu tyraminu se uvádí 10^7 KTJ.g⁻¹ (Tůma a kol., 2007). V naší studii jsme nesledovali počty enterokoků ani laktobacilů v daném sýru, takže můžeme pouze předpokládat možnou tvorbu BA těmito druhy.

5.2 *Laktobacily*

Byla sledována dekarboxylační aktivita i u rodu *Lactobacillus* na tvorbu tyraminu a histaminu v DM a následně byla dekarboxylační aktivita potvrzena pomocí HPLC metod. Laktobacily nebyly dále druhově dourčeny. V tabulce č. 9 jsou uvedeny nalezené nízké hodnoty BA, které ukazují, že laktobacily v tomto kozím sýru nebyly hlavními producenty BA. Při stanovování byla současně provedena pozitivní i negativní kontrola pro prokázání správnosti testu.

Tabulka č. 9: Stanovení dekarboxylační aktivity u *Lactobacillus* spp. v anaerobním prostředí při 37 °C po dobu 48 hodin v dekarboxylačním mediu a pomocí HPLC metody

vzorek	Biogenní aminy			
	TYRAMIN		HISTAMIN	
	DM	HPLC (mg.l ⁻¹)	DM	HPLC (mg.l ⁻¹)
Pozitiv. kontroly				
<i>L.brevis</i> CCM 1815	+	2071		
<i>L.buchneri</i> DSMZ 5987			+	15,6
Negativ. kontroly				
Bez MO	-	3,44		
<i>L.rhamnosus</i> CCM 1828			-	2,91
003	-	5,16	-	2,92
007	-	3,64	-	2,98
013	-	3,40	-	2,76
027	-	3,32	-	2,98
029	-	3,21	-	2,89
030	-	2,99	-	3,30
045	-	3,14	-	2,93
046	-	3,26	-	2,89
047	-	3,28	-	2,82
050	-	3,53	-	3,09

+ pozitivní dekarboxylační aktivita (fialové zbarvení), - negativní dekarboxylační aktivita (tlu té zbarvení)

DM - dekarboxylační medium dle Joosten a Northolt, 1989

Pozitivní kontrola sbírkové kmeny *L. buchneri* DSM 1819 (u histaminu), *L. brevis* CCM 1815 (u tyraminu)

Negativní kontrola sbírkový kmen *L. rhamnosus* CCM 1828 (u histaminu) nebo medium bez mikroorganismů (u tyraminu)

Bylo stanoveno 10 izolátů rodu *Lactobacillus*, z nichž všechny byly negativní na tvorbu tyraminu a histaminu.

Mnoho druhů mikroorganismů z rodu *Lactobacillus* bylo izolováno z různých sýrů. Například, *L. plantarum*, *L. casei* spp. *casei* a *L. brevis* byly izolovány ze sýru Armada, španělský kozí sýr s mlékem (Herreros et al., 2003), a *L. plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. paracasei* spp. *tolerans*, *L. curvatus* a *L. pentosus* z Batzos, tradiční řecký sýr vyrobený ze syrového kozího mléka (Psoni et al., 2003). *L. delbrückii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrückii* subsp. *lactis* a *L. helveticus* jsou získané z ementálu, parmazánu Reggiano a italského-typu Gorgonzola, Mozzarella, a Caciocavallo sýry (Stiles and Holzapfel, 1997). Jiné druhy používané k výrobě mnoha řemeslných sýrů ze středomořských zemí jsou *L. casei*, *L. plantarum* a *L. salivarius* (Parente and Cogan, 2004).

Z testovaných bakterií mléčného kvašení (*Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*) izolovaných z potravin byla u mnoha kmenů prokázána tvorba aminů a to zejména tyraminu (Tůma a kol., 2007).

Enterokoky a některé druhy laktobacilů, a to zejména *L. curvatus*, *L. brevis*, *L. buchneri* byly nejintenzivnější kmeny na tvorbu tyraminu a histaminu. Některé kmeny laktobacilů, *Leuconostoc* spp. *Weissella* spp. a *Pediococci* neprokázaly potenciál při tvorbě biogenních aminů (Bover-Cid and Holzapfel, 1999).

5.3 Sledování vlivu podmínek (pH a teploty) na dekarboxylační aktivitu

5.3.1 Rod *Enterococcus*

Byl sledován u rodu *Enterococcus* vliv různého pH (4,5, 5 a 5,5) na tvorbu tyraminu, kdy byly vybrány 3 sbírkové kmeny a 4 izoláty z koziho sýra. Dále sledován vliv různých teplot (44 °C, 30 °C a 15 °C), kdy byly vzorky rozděleny a vyhodnocovány po dobu 24 hodin. Při teplotě 44 °C což uvádí tabulka č. 10, při 30 °C uvádí tabulka č. 11 a při 15 °C.

Tabulka č. 10: Sledování vlivu pH na tvorbu tyraminu u vybraných kultur při teplotě 44 °C

<i>Enterococcus</i> spp.		TYRAMIN					
		pH 4,5		pH 5		pH 5,5	
Sbírkový kmen		DM	HPLC (mg.l ⁻¹)	DM	HPLC (mg.l ⁻¹)	DM	HPLC (mg.l ⁻¹)
CCM 4224	<i>E. faecalis</i>	+	327	+	304	+	261
CCM 2308	<i>E. faecium</i>	+	193	+	319	+	243
CCM 5612	<i>E. durans</i>	+/-	143	+/-	ND	+/-	ND
Izolát							
1988	<i>E. faecalis</i>	+	250	+	9,32	+	82,9
1601	<i>E. faecium</i>	+	143	+/-	33,2	-	ND
1983	<i>E. durans</i>	-	ND	+	151	+/-	907
1901	<i>E. gallinarum</i>	+	165	+	261	+/-	412

+ pozitivní dekarboxylační aktivita (fialové zbarvení), - negativní dekarboxylační aktivita (žluté zbarvení), +/- pozitivní/negativní

DM - dekarboxylační medium dle Joosten a Northolt, 1989

ND - nedetekováno

Izolát *Enterococcus durans* vykazoval nejlepší dubiozní dekarboxylační aktivitu (+/-) při pH 5,5 (907 mg.l⁻¹), stejně jako izolát *Enterococcus gallinarum* (412 mg.l⁻¹). Nejlepší dekarboxylační pozitivitu při pH 4,5 vykazovaly izoláty *Enterococcus faecalis* (250 mg.l⁻¹) a *Enterococcus faecium* (143 mg.l⁻¹). Sbírkové kmeny vykazovaly nejlepší dekarboxylační

pozitivitu při pH 4,5, *Enterococcus faecalis* (327 mg.l⁻¹) a při pH 5 *Enterococcus faecium* (319 mg.l⁻¹). *Enterococcus durans* nebyl detekován.

Dříve bylo zjištěno, že u *Enterococcus faecalis* se výrazně snížila tvorba biogenních aminů s klesajícím pH (Gardini et al., 2001). V naší studii bylo prokázáno, že *Enterococcus faecalis* tvořil větší množství tyraminu při vyšším pH 5,5 při teplotě 30 °C, ale při teplotě 44 °C tomu tak nebylo, tvořil větší množství tyraminu při pH nižším (pH 4,5).

Enterokoky mají schopnosti rozvíjet se v přítomnosti 6,5 % NaCl a ve vývaru při pH 9,6. Konečná hodnota pH v glukozovém bujóně je 4,6 až 4,2, příležitostně i menší hodnoty. *Enterococcus faecalis* má optimální teplotu 37 °C (Görner a Valík, 2004). V této studii bylo prokázáno, že enterokokům vyhovuje teplota 30 i 44 °C, při které vykazují vysokou dekarboxylační aktivitu, ale teplota 15 °C není pro enterokoky příznivá, tudíž vykazují sníženou dekarboxylační aktivitu.

Podle Görnera a Valíka (2004) se mohou enterokoky rozvíjet i při pH 9,6. V naší studii bylo prokázáno, že enterokoky vykazují vysokou dekarboxylační teplotu při 44 °C pH 5,5 a pH 5 – 5,5 při 30 °C.

Tabulka č. 11: Sledování vlivu pH na tvorbu tyraminu u vybraných kultur při 30 °C

<i>Enterococcus</i> spp.		TYRAMIN					
		pH 4,5		pH 5		pH 5,5	
vzorek	Sbírkový kmen	DM	HPLC (mg.l ¹)	DM	HPLC (mg.l ¹)	DM	HPLC (mg.l ¹)
CCM 4224	<i>E.faecalis</i>	+	192	+	320	+	348
CCM 2308	<i>E.faecium</i>	+	169	+	256	+	264
CCM 5612	<i>E.durans</i>	+	192	+/-	ND	+	167
vzorek	izolát						
1988	<i>E.faecalis</i>	+	8,55	+	339	+	131
1601	<i>E.faecium</i>	-	ND	+	10,1	-	ND
1901	<i>E.gallinarum</i>	+/-	ND	+	246	-	ND

+ pozitivní dekarboxylační aktivita (fialové zbarvení), - negativní dekarboxylační aktivita (tlu té zbarvení),

+/- dubiozní dekarboxylační aktivita

ND – nedetekováno

DM – dekarboxylační medium dle Joosten a Northolt, 1989

Námi sledované sbírkové kmeny *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* vykazovaly nejlepší dekarboxylační aktivitu při pH 5,5 a *Enterococcus durans* při pH 4,5. Zatímco u izolátů z koziho sýra byla nejvyšší dekarboxylační aktivitu sledována při pH 5,0.

Ve srovnání s teplotami 44 °C a 30 °C všechny námi sledované druhy enterokoků prokázaly negativní dekarboxylační aktivitu na tvorbu tyraminu a histaminu při 15 °C po dobu 24 hodin.

Marcobal et al. (2006) sledoval vliv pH, tyrosinu a pyridoxal-5-phosphatu (PLP) na tvorbu tyraminu, který produkují mikroorganismy rodu *Enterococcus* a *Lactobacillus brevis*, a dospěl k závěru, že nízké pH a vysoké koncentrace tyrosinu jsou optimální pro tvorbu tyraminu. V naší studii bylo prokázáno, že enterokoky vykazovaly optimální tvorbu tyraminu při nízkém pH pouze při teplotě 44 °C a to v případě sbírkového kmenu *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus durans* a u izolátů *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*. Při 30 °C vliv nízkého pH nebyl optimální pro tvorbu tyraminu, spíše to byl vliv vysokého pH (5,5) v případě sbírkových kmenů a pH 5 u izolátů. Zejména Teodorovic et al. (1994) zjistili, že dekarboxylační aktivita enterokoků byla vyšší při pH

v rozmezí mezi 4 a 5,5. Stejně tak i v naší studii byl prokázán vliv pH na vyšší tvorbu tyraminu a histaminu v rozmezí od 5 až 5,5.

Gardini et al. (2001) sledovali kombinovaný vliv teploty (16 - 44 °C), pH (od 5,4 do 7) a koncentrace NaCl (2 až 6 %) na růst *Enterococcus faecalis*, jeho proteolytickou aktivitu a produkci biogenních aminů. Maximální proteolytické aktivity bylo dosaženo při inkubační době kolem 32 – 34 °C a koncentraci NaCl kolem 3,2 %. Vliv pH na proteolytickou aktivitu byl slabý, i když zvýšením proteolýzy se může zvýšit pH.

Fernández et al. (2007) sledovali vliv různého pH (5,0, 6,0, a 6,8) na růst enterokoků a jejich produkci tyraminu při 30 °C po dobu 24 hodin. Byl pozorován jasný vliv na tvorbu tyraminu. Při pH 6,8, byl tyramin zjištěn v kultuře supernatantu po inkubaci 4 hodin a nadále se zvyšoval až do konce inkubační doby. V kulturách pěstovaných při pH 6,0 a 5 byl tyramin zjištěn už po 2 hod kultivaci. Největší produkce tyraminu byla zaznamenána při pH 5 a 6,0 po dobu 24 hodin. V naší studii byla prokázána nejvyšší tvorba tyraminu při pH 5 až 5,5.

Závěrem lze uvést, že v naší studii byl sledován vliv různé teploty (15 °C, 30 °C a 44 °C) a vliv různého pH (4,5; 5 a 5,5) na dekarboxylační aktivitu enterokoků. Bylo zjištěno, že enterokokům vyhovovala nejvíce teplota 30 a 44 °C, při které vykazovaly nejvyšší dekarboxylační aktivitu a to při pH 5 až 5,5. Enterokoky prokázaly negativní dekarboxylační aktivitu při teplotě 15 °C. Je dobře známo, že teplota má výrazný vliv na tvorbu biogenních aminů v sýrech. Několik autorů uvedlo, že obsah biogenních aminů závisí na teplotě, a roste s časem a teplotou skladování (Klausen and Lund, 1986; Halász et al., 1994). V naší studii bylo prokázáno, že čím je teplota vyšší, tím více enterokoky produkují biogenní aminy.

5.3.2 Rod *Lactobacillus*

Byl sledován u rodu *Lactobacillus* vliv různého pH na tvorbu tyraminu a histaminu. Byly vybrány pouze 2 sbírkové kmeny, *Lactobacillus brevis* (CCM 1815) a *Lactobacillus buchneri* (DSMZ 5987) a sledovány v různých teplotách po dobu 24 hodin.

Lactobacillus brevis (59,42 mg.l⁻¹) vykazoval nejlepší dekarboxylační aktivitu na tvorbu tyraminu při 44 °C, pH 5,5 a *Lactobacillus buchneri* (23,02 mg.l⁻¹) na tvorbu histaminu při 44 °C, pH 5,5.

Při 30 °C, pH 5 vykazoval nejlepší dekarboxylační aktivitu na tvorbu tyraminu *Lactobacillus brevis* (258,16 mg.l⁻¹), u pH 4,5 a 5,5 se pohybovaly hodnoty okolo 100 mg.l⁻¹. Na tvorbu histaminu vykazoval nejlepší aktivitu *Lactobacillus buchneri* (16,99 mg.l⁻¹) při 30 °C, pH 5,5 a při 15 °C, pH 5,5 (30,55 mg.l⁻¹).

Již dříve bylo zjištěno, že *Lactobacillus brevis* byl odpovědný za tvorbu tyraminu (Straub et al., 1995).

Optimální teplota je 28 až 32 °C a upřednostňují pH 5,0 až 5,5 (Görner a Valík, 2004). V naší studii jsme však zjistili, že laktobacilům vyhovovaly různé teploty. *Lactobacillus brevis* vykazoval nejvyšší dekarboxylační aktivitu při teplotě 30 °C a *Lactobacillus buchneri* při teplotě 15 °C.

Byla provedena studie, při které 15 vzorků sýru ze syrového mléka byly vyšetřovány na přítomnost bakterií mléčného kvašení. Pět kmenů na dekarboxylační aktivitu histaminu bylo identifikováno jako *Lactobacillus buchneri*, kmeny na dekarboxylační aktivitu tyraminu byly identifikovány jako *Lactobacillus brevis* (Joosten and Northolt, 1989).

V naší studii jsme se u laktobacilů zaměřili na dva druhy *L. brevis* a *L. buchneri*, kteří se nejvíce podílely na tvorbě tyraminu (*L. brevis*) a histaminu (*L. buchneri*). Laktobacily se zdají být velmi aktivní v tvorbě biogenních aminů, především histaminu a tyraminu a enterokoky jsou považovány za tvůrce tyraminu (Bover-Cid and Holzapfel, 1999).

6 Závěr

S využitím dekarboxylačního média podle Josstena a Northolta byla sledována dekarboxylační aktivita bakterií rodu *Enterococcus* a *Lactobacillus* izolovaných z kozího sýru a následně byla ověřena tvorba BA pomocí kapalinové chromatografie. Dále byl sledován vliv různého pH a vliv různé teploty po dobu 24 hodin u identifikovaných druhů rodu *Enterococcus* a *Lactobacillus* a tyto identifikované druhy byly srovnávány s kulturami, které pocházely ze sbírky mikroorganismů z Ústavu hygieny a technologie mléka, VFU Brno.

Největším producentem biogenních aminů z kozího sýru byl *Enterococcus faecalis* z 37 %. *Enterococcus* spp. a *Enterococcus faecium* jsou druhým největším producentem z 25 %. Z 10 % byl v kozím sýru zastoupen *Enterococcus durans*. Nejmenší zastoupení zaujímal v kozím sýru *Enterococcus gallinarum* (3 %). Enterokoky se podílely na tvorbě tyraminu v kozím sýru v rozmezí od 680 – 2086 mg.l⁻¹. Všechny izoláty námi sledovaných druhů enterokoků prokázaly negativní aktivitu na tvorbu histaminu. *Enterococcus faecalis* prokázal 100% pozitivní dekarboxylasu na tyramin a *Enterococcus faecium* 96 %. Z 83 % vykazoval pozitivitu na tvorbu tyraminu *Enterococcus durans* a z 63 % *Enterococcus* spp. Pouze *Enterococcus gallinarum*, jako jediný prokázal 100 % dubiózní dekarboxylasu na tyramin. Laktobacily v kozím sýru nebyly hlavními producenty, jelikož byly nalezeny nízké hodnoty BA. Všechny izoláty rodu *Lactobacillus* prokázaly negativní aktivitu na tvorbu tyraminu a histaminu.

Nejvyšší dekarboxylační aktivitu vykazovaly enterokoky při 30 °C, pH 5 – 5,5 a při 44 °C pH 5,5 po dobu 24 hodin. Všechny námi sledované druhy enterokoků prokázaly negativní dekarboxylační aktivitu na tvorbu tyraminu a histaminu při 15 °C. *Lactobacillus brevis* vykazoval nevyšší dekarboxylační aktivitu při 30 °C, pH 5 a při 44 °C, pH 5,5 na tvorbu tyraminu a nejvyšší dekarboxylační aktivitu na tvorbu histaminu vykazoval *L. buchneri* při 15 °C, pH 5,5. U sbírkových kmenů a izolátů byla potvrzena tvorba biogenních aminů v dekarboxylačním mediu metodou HPLC a to ve všech případech.

Enterokoky mohou být producenti biogenních aminů v potravinách, proto je nutné jejich výskyt sledovat a eliminovat, zejména dodržováním správné výrobní a hygienické praxe, správným skladováním surovin i sýrů za vhodných podmínek, manipulací, tak aby byla co nejvíce inhibována aktivita dekarboxylačních enzymů. Většina vzorků sýrů neobsahovala laktobacily s výraznou dekarboxylační aktivitou. Z hlediska možné tvorby BA nepředstavovaly sýry riziko pro konzumenta.

7 Seznam použitých symbolů a zkratek

BA.....	biogenní aminy
HIM.....	histamin
TRY.....	tryptamin
TYR.....	tyramin
CAD.....	kadaverin
PUT.....	putrescin
SPD.....	spermidin
SPM.....	spermin
HPLC.....	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
LC.....	kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
GC.....	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
TLC.....	chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography)
CE.....	kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis)
MO.....	mikroorganismy
KTJ.....	kolonie tvořících jendotek
DM.....	dekarboxylační médium
MAO.....	monoaminooxidáza
DAO.....	diaminooxidáza
MRS	Man, Rogosa a Sharpe agar
S-B.....	Slanetz-Bartley agar
ENT.....	enterococcus
BKP.....	bromkresolpurpur
CCM.....	Česká sbírka mikroorganismů
DOPA.....	dihydroxyphenylalanin
DSMZ.....	Německá sbírka mikroorganismů (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)
ES.....	Evropské společenství
EU.....	Evropská Únie
VFU.....	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

8 Seznam použitě literatury

ASCAR, A., TREPTOW, H. (1986). Using capillary isotachophoresis for the determination of biogenic amines and D – isocitric acid in food products. *Biogene Amine in Lebensmitteln*, vol. 55, p. 188-190.

BARDÓCZ, S. (1993). The role of dietary polyamines. *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 47, p. 683-690.

BARDÓCZ, A. (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science Technologicaly*, vol. 6, p. 341-346.

BENTLEY, S., BOTTARELLI, A., BONARDI, S. (1995). Istamina e riflessi sanitari. *In Ingegneria Alimentare*, vol. 5, p. 32-35.

BERNADEAU M., VERNOUX J.P., HENRI-DUBEMET, S.H., GUEGUÉN, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactobacillus genus. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 126, no. 3, p. 278-280.

BJELDANES, L.F., SCHULTZ, D.E., MORIS, M.M. (1978). On the acetiology of scombroid poisoning: cadaverine potentiation of histamine toxicity in the guinea-pig. *Food and Cosmetics Toxicology*, vol. 16, p. 157-159.

BODMER, S., IMARK, C., KNEUBUHL, M. (1999). Biogenic amines in foods: histamine and food processing. *Inflammation Resaerch*, vol. 48, p. 296-300.

BONETTA, S., BONETTA, S., CARRARO, E., COISSON, J.D., TRAVAGLIA, F., ARLORIO, M. (2008). Detection of biogenic amine producer bacteria in a typical Italian goat cheese. *Journal of Food Protection*, vol. 71, p. 205-209.

BOVER-CID, S., HOLZAPFEL, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 53, p. 391-396.

BRINK, ET.B.T., DAMIN C., JOOSTEN H.J., HUIS, J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 53, p. 33-41.

CENTENO, J.A., MENÉNDEZ, S., RODRIGUÉS-OTERO, J.L. (1996). Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's milk cheese (Northwest Spain). *International Journal of Food Microbiology*, vol. 33, p. 307-313.

CLARK, W.S.J.R., REINBOLD, G.W. (1966). Enterococci in young cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, vol. 49, p. 1214-1218.

DELGADO, S., DELGADO, T., MAYO, B. (2002). Technological performance of several *Lactococcus* and *Enterococcus* strains of dairy origin in milk. *Journal of Food Protection*, vol. 65, p. 1593.

EROLA, S., SAGUES, A.X.R., LILLEBERG, L., AALTO, H. (1997). Biogenic amines in dry sausages during shelf-life storage. *Zeitungder Lebensmittel For Untersuchung und Forschung A.*, vol. 205, p. 351-355.

ESTI, M., VOLPE, G., MASSIGNAN, L., COMPAGNONE, D., LA NOTTE, E., PALLESCHI, G. (1998). Determination of amines in fresh and modified atmosphere packaged fruits using electrochemical biosensors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 46, p. 4233-4235.

FERNÁNDEZ, M., LINARES, M.D., RODRIGUÉZ, A., ALVAREZ, A.M. (2007). Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Applied Microbiology Biotechnology*, vol. 73, p. 1400-1406.

FREITAS, A.C., PAIS, C., MALCATA, F.X., HOGG, T.A. (1996). Microbiological characterization of Picante da Beira Baixa cheese. *Journal of Food Protection*, vol. 59, p. 155-160.

FONTECHA, J., PELÁZC, C., JUÁREZ, M., REQUAMA, T., GÓMEZ, C. (1990). Biochemical and microbiological characteristics of artisanal hard goat's cheese. *Journal of Dairy Science*, vol. 73, p. 1150-1157.

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

GARG, S.K., MITAL, B.K. (1991). Enterococci in milk and milk products. *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 18, p. 15-45.

GIRAFFA, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 26, p. 163-171.

GIRAFFA, G., NEVIANI, E., TORRI TARELI, G., (1994). Antilisterial activity by enterococci in a model predicting the temperature evolution of Taleggio, an Italian soft cheese. *Journal of Dairy Science*, vol. 77, p. 1176-1182.

GÖRNER, F., ŠIMKOVICOVÁ, H. (1966). *Mikrobiológia hydinárskeho průmyslu*, 1. vyd. Bratislava: SRV, s. 102.

GÖRNER, F., VALÍK, L. (2004). *Aplikovaná mikrobiológia potravín*. 1. vyd. Bratislava: MALÉ CENTRUM, s. 528. ISBN 80-967064-9-7

GREIF, G., GREIFOVÁ, M., DRDÁK, M. (1997). Stanovenie biogénnych amínov v potravinách živočíšneho pôvodu metódou HPLC. *Potravinárske Vědy*, s. 119-129.

HALÁSZ, A., BARÁTH, A., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W. (1994). Biogenic-amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food of Science and Technology*, vol. 5, p. 42-49.

HALÁSZ, A., BARÁTH, A., HOLZAPFEL, W. Z. (1999). The influence of starter culture selection on sauerkraut fermentation. *Zeitungder Lebensmittel For Untersuchung und Forschung A.*, vol. 208, p. 434-438.

HERREROS, M.A., FRESNO, J.M., GONZALES PRIETO, M.J., TORNADIJO, M.E. (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese a Spanish goat's milk cheese. *International of Dairy Journal*, vol. 13, p. 469-479.

HERNANDEZ-JOVER, T., IZQUIERDO-PULIDO, M., VECIANA-NOGUES, M.T., MARINE-FONT, A., VIDAL-CAROU, M. C. (1997). Biogenic amines and polyamine contents in meat and meat products. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, vol. 45, p. 2098-2102.

CHANDER, H., BATISH, V.H., BABU, S., SINGH, R.S. (1989). Factors affecting amine production by a selected strain of *Lactobacillus bulgarius*. *Journal of Food Science*, vol. 54, p. 940-942.

IBE, A., SAITO, K., NAKAZATO, M., FUJINUMA, K., NISHIMA, T. (1991). Quantitative determination of amines in wine by liquid-chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemisis*, vol. 74, no. 4, p. 695-698.

JARISCH, R., WÄNKE, F. (1996). Wine and headache. *International Archives of Allergy and Immunology*, vol. 110, no. 1, p. 7-12.

JOOSTEN, H.M.L.J., NUÑEZ, M. (1997). Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin – producing lactic acid bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, vol. 62, no. 4, p. 1178-1181.

JOOSTEN, H.M.L.J. (1988). Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 4. Factors influencing the amounts formed. *Netherland Milk Dairy Journal*, vol. 41, p. 329-357.

JOOSTEN, H.M.L.J., NORTHOLT, M.D. (1989). Detection, Growth, and Amine-Producing Capacity of *Lactobacilli* in Cheese. *Netherlands Institute for Dairy Research*, vol. 55, no. 9, p. 2356-2359.

KAROVIČOVÁ J., KOHAJDOVÁ Z. (2005). Biogenic amines in food. *Chemical Papers*, vol. 59, no. 1, p. 70-79.

KARMAS, E. (1981). Biogenic amines as indicators of seafood freshness. *Zeitungder Lebensmittel For Untersuchung und Forschung A.*, vol. 14, p. 273-275.

KLAUSEN, N.K., LUND, E. (1986). Formation of biogenic amines in herring and mackerel. *Zeitungder Lebensmittel For Untersuchung und Forschung A.*, vol. 182, p. 459-463.

KLOUDA, P. (2003). *Moderní analytické metody*, 1 vyd., Nakladatelství Ostrava, s. 132. ISBN 80 – 86369 – 07 – 02

KOLESÁROVÁ, E. (1995). Výskyt a vznik biogénnych amínov v potravinách. *Bulletin Potravinaského Vyskumu*, vol. 34, p. 109- 122.

KOMPRDA, T., SMĚLÁ, D., NOVICKÁ, K., KALHOTKA, L., ŠUSTOVÁ, K., PECHOVÁ, P. (2007). Content and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard cheese. *Journal of Food Chemistry*, vol. 102, p. 129-137.

KŘÍTEK, M., KALÁČ, P. (1998). Biogenic amines in foods and their roles in human nutrition. *Czech Journal of Food Science*, vol. 16, p. 151-159.

LANDETE, J.M., DE LAS RIVAS, B., MARCOBAL, A., MUÑOZ, R. (2007). Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *International Journal of Food Mikrobiology*, vol. 117, p. 258–269.

LANGE, J., WITTMAN, C. (2002). Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 372, p. 276-283.

LAPA-GUIMARAES, J., PICKOVA, J. (2004). New solvent systemes for thin - layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. *Journal of Chromatography*, vol. 1045, p. 223-232.

LEUSCHNER, R.G., KURTHARA, M., HAMMES, W.P. (1999). Formation of biogenic amines by proteolytic enterococci during cheese ripening. *Journal of Science and Food Agriculture*, vol. 79, p. 1141-1144.

LEUSCHNER, R.G.K., HAMMES, E.P. (1998). Tyramine degradation by micrococci during ripening of fermented sausage. *Meat Science*, vol. 49, p. 289-296.

LYONS, D.E., BERRY, J.T., LYONS, S.A., TAYLOR, S.L. (1983). Cadaverine and aminoguanidine potentiate the uptake o histamine *in vitro* in perfused intestinal segments of rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 70, p. 445-458.

MAIJALA, R.L. (1993). Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. *Journal of Food Protection*, vol. 56, p. 125-129.

MAIJALA, R.L., EEROLA, S., LIEVONEN, S., HILL, P., HIRVI, T. (1995). Formation of biogenic amines during ripening of dry sausages as affected by starter culture and thawing time of raw material. *Journal of Food Science*, vol. 60, p. 1187- 1190.

MAIJALA, R.L., EEROLA, S.H., AHO, M.A., HIRN, J.A. (1993). The effect of GLD – induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *Journal of Food Protection*, vol. 56, no. 2, p. 125-129.

MACROBAL, A., MARTIN-ALVAREZ, P. J., MORENO-ARRIBAS, M.V., MUNOZ, R. (2006). A multicafactorial design for studying factors influencing growth and tyramine

production of the lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* CECT 4669 and *Enterococcus faecium* BIFI-58. *Reviews Microbiological*, vol. 157, p. 417-424.

MONTEL, M.CH., MASSON, F., TALON, R. (1999). Comparson of biogenic amine content in traditional French dry sausages. *Sciences des Alimetns*, vol. 19, p. 247-254.

MUCHETTI, G., NEVIANI, E., TODESCO, R., LODI, R. (1982). Ruolo degli enterococchi nei formaggi italiani. II: attivita caseinolitica e lipolitica. *Latte* 7, p. 821-831.

MUNDT, L.J.O. (1984). Enterococci, In : Bergey,s manual of systematic bacteriology, vol.1 (N.R.Krieg, J. G. Holt, eds) 1 st ed., Baltimore, Williams and Wilkins, p. 1063-1065.

NOUT, M.J.R. (1994). Fermented foods and food safety. *Food Research International*, vol. 27, p. 291-292.

NOVELLA-RODRÍGUEZ, S., VECIANA-NOGUÉS, M.T., IZGUERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M.C. (2006). Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. *Food Chemistry and Toxicology*, vol. 68, p. 750-756.

ÖNAL, A. (2007). Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *International Journal of Food Chemistry*, vol. 103, p. 1475-1476.

PARENTE, E., COGAN, T.M. (2004). Starter cultures: general aspects. In: FOX, P.F. MCSWEENEY, P.L.H., COGAN, T.M., GUINEE, T.P. (Eds), *Cheese, Chemistry. Physics and Microbiology*, General aspects, vol. 1. Elsevier Academic Press London, p. 123-147.

PARENTE, E., MATUSCELLI, M., GADRINI, F., GRIECO, S., CRUDELE, M.A., SUZZI, G. (2001). Evolution of microbial populations and biogenic amines production in dry sausages produced in southern italy. *Journal of Applied Mikrobiology*, vol. 90, p. 882-889.

PAULSEN P., BAUER F., VALI S. (1997). Biogenic amines in fermented sausage. 1. Methods for the determination of biogenic amines. *Fleischwirtschaft*, vol, 77, no. 5, p. 450-452.

POULLET, B., HUERTAS, M., SANCHEZ, A., CÁCERES, P., LARRIBA, G. (1991). Microbial study of Caser da Cáceres cheese through ripening. *Journal of Dairy Reviews*, vol. 58, p. 231-238.

PREUSS, CH.V., WOOD, T.C., SZUMLANSKI, L. (1998). Human Histamine N-Methyltransferase Pharmacogenetics: Common Genetic Polymorphisms that Alter Activity. *Molecular Pharmacology*, vol. 53, no. 4, p. 708-717.

PSONI, L., TZANETAKIS, N., LITOPOULOU-TZANETAKI, E. (2003). Microbial characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk. *Food Microbiology*, vol. 20, p. 575-582.

RICE, S.L., EITENMILLER, R.R., KOEHIER, P.E. (1976). Biologically amines active in food. A Review. *Journal Milk Food Technologicaly*, vol. 39, p. 353-358.

SAGUÉS-ROIG, A.X., MOLINA, A.P., HERNÁNDEZ-HERRERO, M. (2002). Histamine and tyramine – forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *European Food Reviews Technologicaly*, vol. 215, p. 96-100.

SARANTINOPOULOS, P., ANDRIGHETTO, C., GEORGALAKI, M. D., REA, M. C., LOMBARDI, A., COGAN, T. M. KALANTZOPOULOS, G., TSAKALIDOU, E. (2001). Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International of Dairy Journal*, vol. 11, p. 621-647.

SATTLER, J., HÄFNER, D., KLOTTER, H. J., LORENZ, W., WAGNER, P. K. (1988). Food-induced histaminosis as an epidemiological problem – plasma histamine elevation and hemodynamic-alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO). *Agents and Actions*, vol. 23, no. 3-4, p. 361-365.

SCANLAN, R.A. (1983). Formation and occurrence of nitrosamines in foods. *Cancer Research*, vol. 43, p. 2435-2436.

SHALABY, A.R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, vol. 29, p. 675-690.

SHERMAN, J. M. (1937). The streptococci. *Bacteriology Reviews*, vol. 1, p. 3-21.

SCHNELLER, R., GOOD, R., JENNY, M. (1997). Influence of pasteurized milk, raw milk and different ripening cultures on biogenic amine concentrations in semi-soft cheeses during ripening. *Zeitungder Lebensmittel For Untersuchung und Forschung A.*, vol. 204, p. 265-272.

SIEBER, R., LAVANCHY, P. (1990). Gehalt an biogenen Aminen in Milchprodukten und in Käse. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, vol. 81, p. 82-105.

SILLA-SANTOS, M.H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 29, p. 213-231.

STANDAROVÁ, E., BORKOVCOVÁ, I., VORLOVÁ, L. (2008). Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě. *Veterinářství*, roč. 58, s. 735-739.

STILES, M.E, HOLZAPFEL, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 36, p. 1-29.

STRATTON, J.E., HUTKINS, R.V., TAYLOR, S.L. (1991). Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *Journal of Food Protection*, vol. 54, p. 460-470.

SUZZI, G., CARUSO, M., GARDINI, F., LOMBARDI, A., VANNINI, L., GUERZONI, M.E., ANDRIGHETTO, C., LANORTE, M.T. (2000). Characterization of autochthonous enterococci isolated from Semicotto Caprino cheese, a traditional cheese produced in Southern Italy. *Journal of Application Microbiology*, vol. 89, p. 267-269.

SUZZI, G., GARDINI, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 88, p. 41-54.

SUMNER, S.S., ROCHE, F., TAYLOR, S.L. (1990). Factors controlling histamine production in swiss cheese inoculated with *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Dairy Science*, vol. 73, p. 3050-3058.

ŠPIČKA, J., KALAČ, P., BOVER-CID, S., KRÍTEK, M. (2002). Application of lactic acid bacteria starter cultures for decreasing the biogenic amine levels in sauerkraut. *European of Food Reviews Technologicaly*, vol. 215, p. 509-514.

TABOR, C.W., TABOR, H. (1976). Polyamines. *Annual Review of Biochemistry*, vol. 53, p. 749-750.

TEODOROVIC, V., BUNCIC, S., SMILJANIC, D. (1994). A study of factors influencing histamine production in meat. *Fleischwirtschaft*, vol. 74, p. 170-172.

THAM, W., KARP, G., DANIELSSON-THAM, M.L. (1990). Histamine formation by enterococci in goat cheese. *International Journal of Food Microbiological*, vol. 11, p. 225-229.

TIL, H.P., FALKE, H.E., PRINSEN, M.K., WILLEMS, M.I. (1997). Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, putrescine and kadaverine in rats. *Journal of Food Chemistry and Toxicology*, vol. 35, p. 337-338.

TŮMA, Š., PLOCKOVÁ, M.. Protektivní kultury pro výrobu polotvrdých sýrů. ŠTĚTINA, J., ČURDA, L. Celostátní přehlídka sýrů 2007 : Výsledky přehlídek asborník přednášek semináře „Mléko a sýry“. Praha 6: Vysoká škola chemickotechnologická v Praze, 2007. s. 31–36.

VELÍŠEK, J. (2002). Chemie potravin 3. 2. vyd., OSSIS Tábor :Ing. Václav Šedivý.s. 123-130. ISBN 80-86659-01-1

VIDAL-CAROU, M.C., IZQUIERDO-PULIDO, M., MARTÍN-MORRO, M., MARÍNE-FONT, A. (1990). Histamine and tyramine in meat produkt; relationship with meat spoilage. *Journal of Food Chemistry*, vol. 37, p. 239-349.

WARTHESEN, J., SCANLAN, R., BILLS, D., LIBBEY, L. (1975). Formation of heterocyclic *N*-nitrosamines from the reaction of nitrite and selected primary diamines and amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 23, p. 898-902.

9 Abstrakt

Sledování dekarboxylační aktivity u rodu *Enterococcus* spp. a *Lactobacillus* spp. izolovaných z mléčných výrobků

Zemková G.

Fakulta veterinární hygieny a ekologie
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární organické sloučeniny, které vznikají v potravinách dekarboxylací volných aminokyselin působením dekarboxylas. Vysoké množství biogenních aminů může vést k poškození lidského organismu, z toho důvodu je nutné sledovat jejich obsah v potravinách.

Byla sledována dekarboxylační aktivita u vybraných kultur rodů *Enterococcus* a *Lactobacillus* v médiu dle Joostena a Northolta izolovaných z kozích sýrů z farmy Šošůvka. Následně byla potvrzena tvorbou biogenních aminů metodou HPLC. Současně byl sledován u těchto mikroorganismů vliv různého pH (4,5; 5 a 5,5) a různé teploty (15 °C, 30 °C a 44 °C) a identifikované druhy rodu *Enterococcus* a *Lactobacillus* byly srovnávány s kulturami, které pocházely ze sbírky mikroorganismů VFU Brno.

Enterokoky se podílely na tvorbě tyraminu v kozím sýru v rozmezí od 680 – 2086 mg.l⁻¹. *Enterococcus faecalis* byl největším producentem biogenních aminů (37 %) z koziho sýru a nejmenším producentem byl *Enterococcus gallinarum* (3 %). Všechny izoláty prokázaly negativní aktivitu na tvorbu histaminu. U laktobacilů byly nalezeny nízké hodnoty BA a všechny izoláty prokázaly negativní aktivitu na tvorbu tyraminu a histaminu.

Nejvyšší dekarboxylační aktivitu vykazovaly enterokoky při 30 °C i 44 °C pH 5 – 5,5 a *Lactobacillus brevis* při 30 °C, pH 5 a při 44 °C, pH 5,5 na tvorbu tyraminu. Nejvyšší dekarboxylační aktivitu na tvorbu histaminu vykazoval *L. buchneri* při 15 °C, pH 5,5.

Abychom zabránili zvýšené tvorbě biogenních aminů enterokoky v potravinách, je nutné dodržovat správnou výrobní a hygienickou praxi, pasteraci, skladování, manipulaci surovin i hotových výrobků, a tím inhibovat aktivitu dekarboxylačních enzymů. Množství laktobacilů v sýrech bylo zanedbatelné a neznamenovalo riziko pro konzumenta.

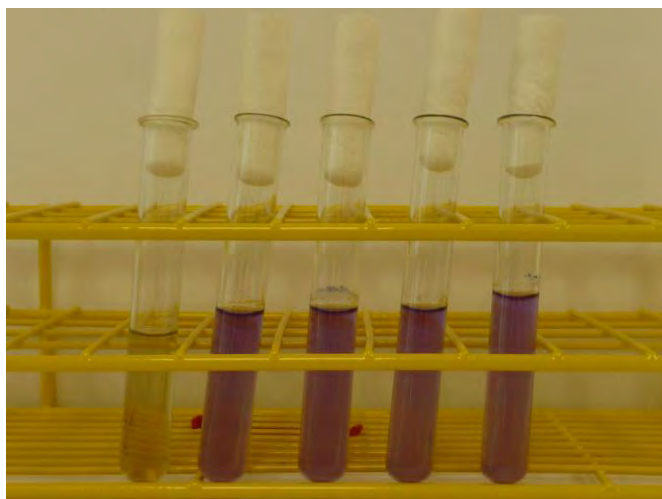
Klíčová slova: HPLC, tyramin, histamin, kozí sýry, enterokoky, laktobacily

10 Přílohy

Obrázek č. 4: Kapalinový chromatograf Allinace od firmy Waters

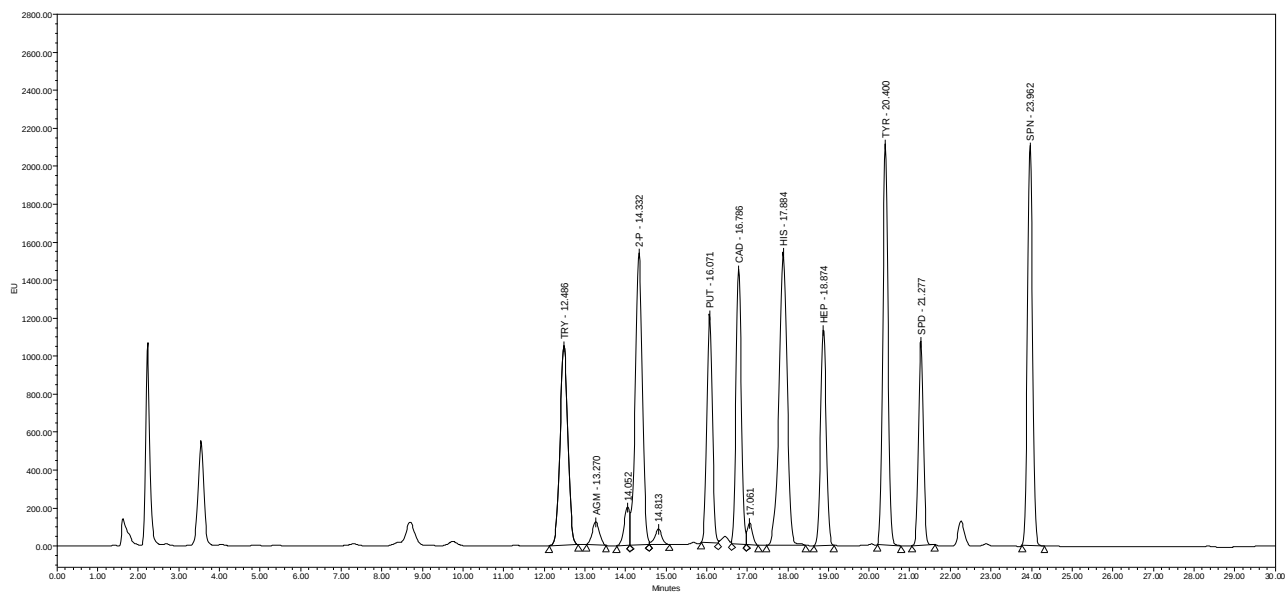


Obrázek č. 5: Dekarboxylační medium podle Joostena a Northolta



Na tomto obrázku jsou zkumavky, které vykazují negativní dekarboxylační aktivitu (ť luté barvy) a pozitivní dekarboxylační aktivitu (fialové barvy) na tvorbu tyraminu.

HPLC chromatogram č. 1: Standardní roztok



TRY - tryptamin, AGM- agmatin, 2-P - 2- fenylethylamin, PUT - putrescin, CAD - kadaverin, HIS - histamin, TYR - tyramin, SPD - spermidin, SPN – spermin

HPLC chromatogram č. 2: *Enterococcus faecium* při pH 5,5 pozitivní na dekarboxylační aktivitu tyraminu

