

Dekarboxylázová aktivita bakterie *Serratia marcescens* v neutrálním a zásaditém prostředí

Bc. Kateřina Štajnochová

Diplomová práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina ŠTAJNOCHOVÁ**
Osobní číslo: **T10425**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Dekarboxylázová aktivita bakterie *Serratia marcescens* v neutrálním a zásaditém prostředí**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizace biogenních aminů.
2. Popis dekarboxylázové aktivity.
3. Faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů.

II. Praktická část

1. Stanovení růstové křivky bakterie *Serratia marcescens* v neutrálním a zásaditém prostředí.
2. Stanovení produkce putrescinu a kadaverinu bakterií *Serratia marcescens* v neutrálním a zásaditém prostředí.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*, Tábor: OSSIS, 1999. 368 s. ISBN 80-902391-5-3
2. SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in food. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 29, s. 213-231
3. SHALABY, ALI R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 1996, 29, s. 675-690
4. MORET, S., LANFRANCO, S. CONTE. High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in food, An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *Journal of Chromatography A*, 1996, 729, s. 363-369.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Zuzana Lazárková, Ph.D.

Ústav analýzy a chemie potravin

Datum zadání diplomové práce:

1. února 2012

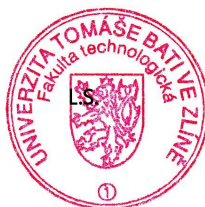
Termín odevzdání diplomové práce:

2. května 2012

Ve Zlíně dne 10. února 2012



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan





doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Štajnochová Kateřina Obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 24.4.2012

Štajnochová

¹¹ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací.

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

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

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

²¹ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

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

³¹ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

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

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

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

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá sledováním produkce biogenních aminů kadaverinu a putrescinu bakterií *Serratia marcescens*. V teoretické části jsou charakterizovány biogenní aminy, jejich struktura, vznik, účinky a výskyt. Dále jsou popsány mikroorganismy produkující biogenní aminy a jejich dekarboxylázová aktivita. Další část je zaměřena na problematiku stanovení biogenních aminů a růstovou křivku bakteriální populace. V praktické části byly aplikovány vybrané faktory (teplota 10, 20 a 37 °C, pH 6, 7 a 8 a obsah NaCl 0 – 6 %) ovlivňující růst bakterie *Serratia marcescens* a její produkci biogenních aminů. Produkce kadaverinu a putrescinu byla stanovena pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie. Optimální podmínky pro růst bakterie *Serratia marcescens* a produkci putrescinu a kadaverinu byly následující: pH 6 a 7, koncentrace NaCl 0, 1 a 3 %, teplota 37 °C. Vyšší pH a koncentrace NaCl a nižší teploty inhibovaly růst bakterie i produkci biogenních aminů.

Klíčová slova: biogenní aminy, kadaverin, putrescin, *Serratia marcescens*, teplota, pH, NaCl, HPLC

ABSTRACT

This thesis deals with the monitoring of biogenic amines cadaverine and putrescine production by bacteria *Serratia marcescens*. In the theoretical part there are characterized biogenic amines, their structure, formation, occurrence and effects on human health. Further, the microorganisms producing biogenic amines and their decarboxylase activity are described. The last two parts are focused on the determination of biogenic amines and growth curve of bacterial populations. In the practical part of the thesis the selected factors (temperature 10, 20 and 37 °C, pH 6, 7 and 8, and NaCl content from 0 to 6 %) affecting the growth of bacteria *Serratia marcescens* and its production of biogenic amines were applied. The formation of cadaverine and putrescine was determined using high performance liquid chromatography. Optimal growth conditions for the bacteria *Serratia marcescens* and the production of putrescine and cadaverine were as follows: pH 6 and 7, NaCl concentration of 0, 1 and 3 %, temperature 37 °C. Higher pH and NaCl concentration and lower temperature inhibited the growth of bacteria and production of biogenic amines.

Keywords: biogenic amines, cadaverine, putrescine, *Serratia marcescens*, temperature, pH, NaCl, HPLC

Děkuji vedoucí mé diplomové práce Ing. Zuzaně Lazárkové, Ph.D. za odborné vedení, praktickou pomoc, trpělivost a udělování cenných rad, které mi udělovala během zpracování mé diplomové práce.

Také děkuji doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. a doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za pomoc a cenné rady při práci na praktické části diplomové práce, zejména za statistické zpracování výsledků.

Dále děkuji laborantce Ing. Ludmile Zálešákové, DiS., Ing. Haně Miklíkové a Olze Haukové za ochotu a pomoc při práci v laboratoři.

Velké poděkování patří zároveň i mé rodině a Ondřeji Kotačkovi za morální podporu a pomoc v průběhu celého studia.

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 BIOGENNÍ AMINY	13
1.1 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ	13
1.2 STRUKTURA A VZNIK	13
1.2.1 Putrescin	16
1.2.2 Kadaverin	18
1.3 ÚČINKY BIOGENNÍCH AMINŮ	19
1.3.1 Putrescin a kadaverin	20
1.3.2 Potravinová přecitlivělost.....	20
1.3.3 Histaminová intolerance.....	21
1.3.4 Detoxikace biogenních aminů	22
1.4 LEGISLATIVA	22
1.5 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ	23
1.5.1 Rostlinné produkty	24
1.5.2 Živočišné produkty.....	25
1.6 MIKROORGANIZMY TVOŘÍCÍ BIOGENNÍ AMINY	27
1.6.1 Čeleď Enterobacteriaceae.....	27
1.6.1.1 Rod Serratia	28
1.6.2 Ostatní mikroorganismy produkující biogenní aminy	29
1.6.2.1 Bakterie mléčného kvašení	29
1.6.2.2 Čeleď Micrococcaceae.....	29
1.6.2.3 Plísně.....	30
1.6.2.4 Kvasinky	30
1.7 DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA MIKROORGANISMŮ	30
1.7.1 Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů.....	33
1.7.1.1 pH.....	33
1.7.1.2 Teplota	34
1.7.1.3 NaCl.....	35
1.7.1.4 Další faktory.....	35
2 METODY STANOVENÍ BIOGENNÍ AMINŮ	36
2.1 TENKOVŘSTVÁ CHROMATOGRAFIE (TLC)	36
2.2 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE (GC)	37
2.3 CHROMATOGRAFIE NA IONTOMĚNIČÍCH (IEC).....	38
2.4 VYSOCE ÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC).....	39
3 RŮSTOVÁ KŘIVKA BAKTERIÁLNÍ POPULACE	40
4 CÍL PRÁCE	43
5 MATERIÁL A METODIKA	44

5.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	44
5.1.1	Přístroje a pomůcky.....	44
5.1.2	Chemikálie	44
5.2	MIKROBIOLOGICKÉ ANALÝZY.....	45
5.2.1	Kultivační média	45
5.2.2	Kultivace bakterie	46
5.2.3	Optimalizace složení kultivačního média a časových intervalů odběrů.....	46
5.2.4	Stanovení růstové křivky bakterie.....	47
5.3	STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ.....	48
5.3.1	Příprava médií pro stanovení biogenních aminů.....	48
5.3.2	Kultivace bakterie a další operace před vlastním stanovením biogenních aminů	48
5.3.3	Stanovení biogenních aminů pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie	49
5.4	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ.....	49
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	51
6.1	RŮSTOVÁ KŘIVKA BAKTERIE <i>SERRATIA MARCESCENS</i>	51
6.1.1	Růstová křivka při 10 °C.....	51
6.1.2	Růstová křivka při 20 °C.....	53
6.1.3	Růstová křivka při 37 °C.....	54
6.1.4	Dílčí diskuze.....	56
6.2	STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ.....	56
6.2.1	Stanovení obsahu putrescinu.....	57
6.2.1.1	Produkce putrescinu při 10 °C.....	57
6.2.1.2	Produkce putrescinu při 20 °C.....	59
6.2.1.3	Produkce putrescinu při 37 °C.....	60
6.2.1.4	Dílčí diskuze	63
6.2.2	Stanovení produkce kadaverinu	64
6.2.2.1	Produkce kadaverinu při 10 °C.....	64
6.2.2.2	Produkce kadaverinu při 20 °C.....	66
6.2.2.3	Produkce kadaverinu při 37 °C.....	68
6.2.2.4	Dílčí diskuze	70
6.3	YIELD FAKTOR.....	72
	ZÁVĚR	75
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	76
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	86
	SEZNAM OBRÁZKŮ	88
	SEZNAM TABULEK.....	89
	SEZNAM PŘÍLOH.....	90

ÚVOD

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární bazické sloučeniny [1]. Patří mezi potencionální ukazatele bakteriálního kažení a z hlediska hygienického jsou studovány v potravinách [2]. Vznikají zde činností některých mikroorganismů, které mají aktivní dekarboxylázy odštěpující z aminokyselin karboxylovou skupinu. Mezi tyto mikroorganismy se řadí i podmíněně patogenní bakterie *Serratia marcescens* z čeledi *Enterobacteriaceae*, která je častým kontaminantem mnoha druhů potravin [3,4].

Biogenní aminy jsou látky nepostradatelné pro živé organismy. V lidském organismu vykonávají řadu důležitých fyziologických funkcí, bez nich by naše tělo nemohlo fungovat. Hrají roli v růstu a proliferaci buněk, poskytují biochemickým reakcím dusík, působí jako přenašeči v centrálním mozkovém systému a jsou nezbytné pro tvorbu dalších významných látek. Na druhé straně se jedná o látky, které se účastní některých patologických procesů probíhajících v lidském těle, např. alergických reakcí [5,6].

V poslední době poutá pozornost skupina polyaminů, mezi které patří též putrescin a kadaverin. V popředí zájmu stojí jejich možná účast v nádorovém bujení. Při hodnocení toxického účinku je nutné zvažovat nejen přítomnost konkrétního aminu, ale i ostatních faktorů (množství spotřebované potravin, přítomnost jiných toxických látek apod.) [7].

Veřejnost není o těchto látkách dostatečně informovaná. Proto jsem se v teoretické části své diplomové práce zaměřila na celkovou charakteristiku a na metody stanovení biogenních aminů.

Praktická část této práce se zabývá vlivem vybraných faktorů (teplota, pH prostředí, koncentrace NaCl) na růst gramnegativní bakterie *Serratia marcescens* a její produkci kadaverinu a putrescinu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy jsou látky známé více než 100 let. V roce 1903 bychom je našli pod zastaralým názvem „ptomainy“, což označovalo jedovaté látky. Dnes se ví, že biogenní aminy jsou nízkomolekulární dusíkaté látky bazické povahy odvozené od aminokyselin [5]. Bezpečnost potravin může být ohrožována mnohými riziky chemického, biologického nebo fyzikálního původu. V poslední době mezi nejsledovanější kontaminanty potravin patří biogenní aminy [8].

1.1 Charakteristika biogenních aminů

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární bazické sloučeniny, které mohou způsobovat alimentární intoxikace. Nacházejí se v potravinách, kde vznikají činností některých mikroorganismů (zejména hnilobných bakterií a bakterií mléčného kvašení), které mají aktivní dekarboxylázy odštěpující z aminokyselin karboxylovou skupinu [1,9,10]. Proto je z důvodu prevence v potravinářství nutná včasná detekce bakterií, které tyto sloučeniny produkují [8]. V potravinách a krmivech představují biogenní aminy jedny z nežádoucích zplodin z konečného rozkladu bílkovin [11].

Některé biogenní aminy mají významné biologické vlastnosti, neboť jsou např. stavební látky, které se účastní biosyntézy dalších hormonů živočichů (fenyletylamin), fytohormonů neboli auxinů, alkaloidů a dalších sekundárních metabolitů rostlin. Jsou také tkáňovými hormony (histamin) a protoalkaloidy (hordenin, gramin) [6]. Další biogenní aminy (spermidin, spermin) se účastní regulace buněčného růstu a díky těmto vlastnostem jsou studovány v souvislosti s procesem karcinogeneze [12].

1.2 Struktura a vznik

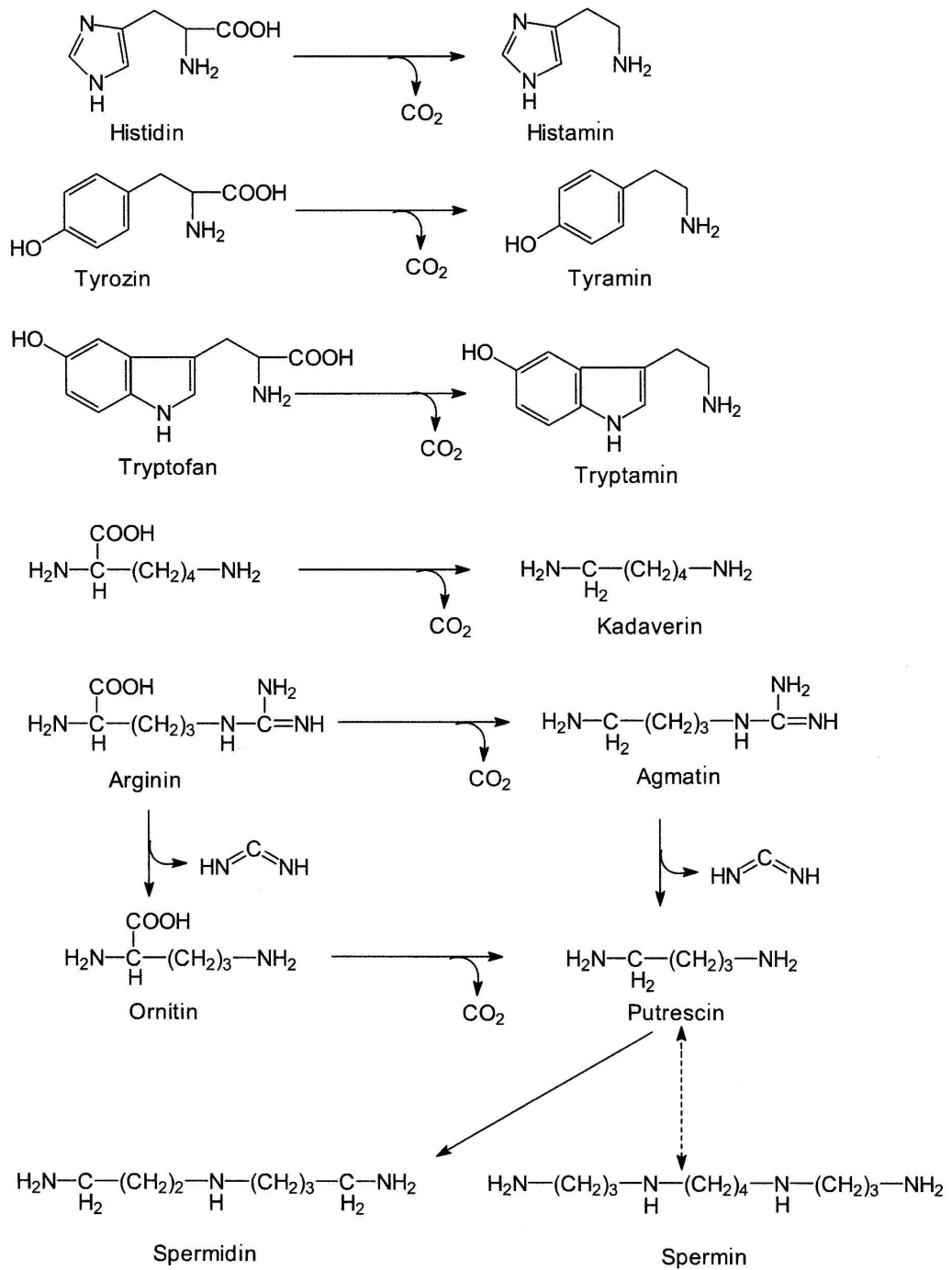
Z chemického hlediska mají biogenní aminy alifatickou (putrescin, spermin, spermidin, kadaverin, agmatin), aromatickou (tyramin, fenyletylamin) nebo heterocyklickou (tryptamin, histamin) strukturu [5,13]. Mezi základní podmínky vzniku biogenních aminů patří přítomnost aminokyselinového substrátu, výskyt mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou a nastolení vhodných podmínek pro růst a množení [12]. Nejčastěji vznikají biogenní aminy při fermentačních procesech. Mezi nejdůležitější rody mikroorganismů s výraznou produkcí dekarboxyláz patří např. *Proteus*, *Klebsiella*,

Hafnia, Bacillus, Citrobacter, Escherichia, Pseudomonas, Lactobacillus, Pediococcus a *Streptococcus* [8,14].

Vznikají z aminokyselin působením dekarboxyláz obsahujících jako kofaktor pyridoxalfosfát nebo z aminokyselin a karbonylových sloučenin působením transamináz. Při jejich transformaci na další biologicky aktivní produkty se uplatňují některé oxygenázy a metyltransferázy [6]. Tvorba těchto látek postupuje od bílkovin přes peptidy k aminokyselinám [11]. Biogenní aminy odvozené od bazických aromatických (heterocyklických) aminokyselin jsou v nízkých koncentracích přirozenou složkou potravin. Vykonávají v živočišných tkáních a rostlinných pletivech řadu důležitých funkcí [6].

- Z histidinu vzniká jako produkt dekarboxylace histidindekarboxylázou histamin.
- Z lyzinu vzniká působením lyzindekarboxylázy kadaverin (1,5-diamonopentan).
- Dekarboxylací argininu arginindekarboxylázou vzniká agmatin a dále putrescin (1,4-diaminobutan). Ten vzniká také přímo dekarboxylací ornitinu ornitindekarboxylázou (ornitin vzniká z argininu působením arginázy).
- Z putrescinu vzniká metylací *S*-adenozylmetioninem spermidin a dále spermin.
- Dekarboxylací fenylalaninu fenylalanindekarboxylázou vzniká 2-fenyletylamin.
- Z tyrozinu vzniká činností tyrozindekarboxylázy tyramin a jeho oxidací oktopamin.
- Z DOPA (3,4-dihydroxyfenylalanin) vzniká dopamin (působením dihydroxyfenylalanindekarboxylázy), oxidací dopaminu vzniká hormon dřene nadledvinek noradrenalin a jeho reakcí s *S*-adenozylmetioninem další hormon nadledvinek adrenalin.
- Dekarboxylací tryptofanu tryptofandekarboxylázou vzniká tryptamin, ze kterého se tvoří hormon serotonin. Serotonin-*N*-acetyltransferázou vzniká ze serotoninu *N*-acetylserotonin a z něj působením hydroxyindol-*O*-methyltransferázy hormon melatonin.

Na Obrázku 1 jsou nejčastěji se vyskytující biogenní aminy v potravinách.



Obrázek 1: Nejčastěji se vyskytující biogenní aminy v potravinách [15]

1.2.1 Putrescin

Tetrametylendiamin nebo-li butan-1,4-diamin (viz Obrázek 2) je alifatický diamin. Vzniká dekarboxylací aminokyseliny arginin či aminokyseliny ornitin. Vzniká také při hnití masa, jeho toxické účinky jsou téměř stejné jako u amoniaku. Někdy se proto označuje jako mrtvolný jed neboli ptomain [16,17].



Obrázek 2: Strukturální vzorec putrescinu [18]

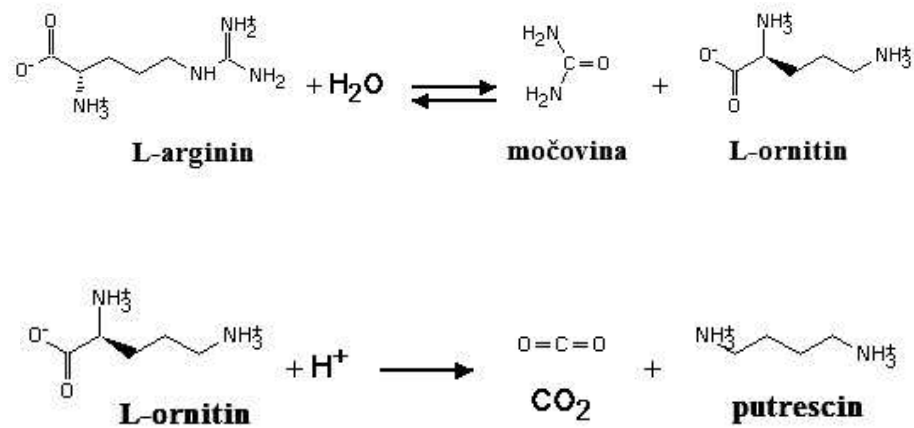
V Tabulce 1 jsou znázorněny fyzikální vlastnosti putrescinu.

Tabulka 1: Fyzikální vlastnosti putrescinu [19]

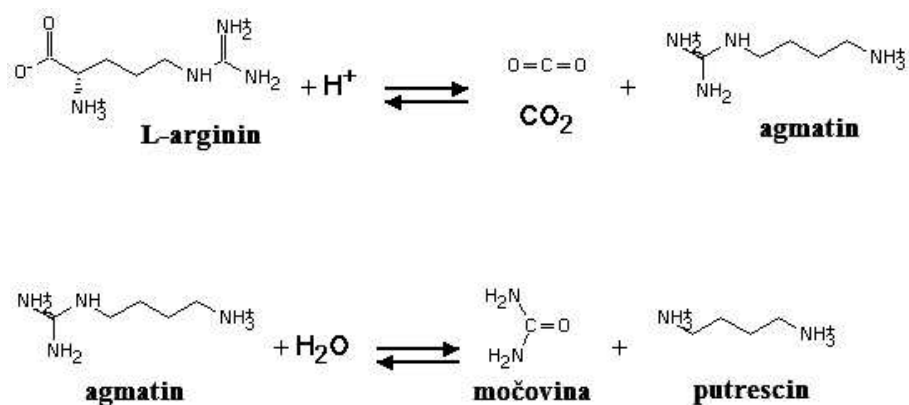
Registrační číslo CAS	110-60-1
Sumární vzorec	$C_4H_{12}N_2$
Molární hmotnost	$88,15 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Teplota tání	$27 \text{ }^\circ\text{C}$
Teplota varu	$158 - 160 \text{ }^\circ\text{C}$
Hustota	$0,877 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$

Putrescin může být v buňkách syntetizován z L-argininu přes L-ornitin nebo agmatin. Průběh syntézy přes ornitin je znázorněn na Obrázku 3. Ornitin vzniká z argininu působením arginázy (EC 3.5.3.1) a přeměna ornitinu na putrescin je katalyzována enzymem ornitindekarboxylázou (EC 4.1.1.17). Tato syntéza může probíhat ve všech buňkách. V rostlinných pletivech a u gramnegativních bakterií může putrescin vznikat přes agmatin, který vzniká dekarboxylací aminokyseliny L-argininu působením arginindekarboxylázy (EC 4.1.1.19). Reakce přeměny agmatinu na putrescin je katalyzována enzymem agmatinázou (EC 3.5.3.11) (viz Obrázek 4) nebo může probíhat přes meziproduct *N*-karbamoylputrescin. Přeměna agmatinu na *N*-karbamoylputrescin je katalyzována agmatiniminohydrazou (EC 3.5.3.12) a následná přeměna *N*-karbamoylputrescinu na putrescin pak *N*-karbamoylputrescinamidohydrolázou (EC 3.5.1.53). Průběh těchto reakcí je znázorněn na Obrázku 5. Přeměna agmatinu je u bakterií a v rostlinných buňkách vnímána jako jedna z hlavních cest pro syntézu

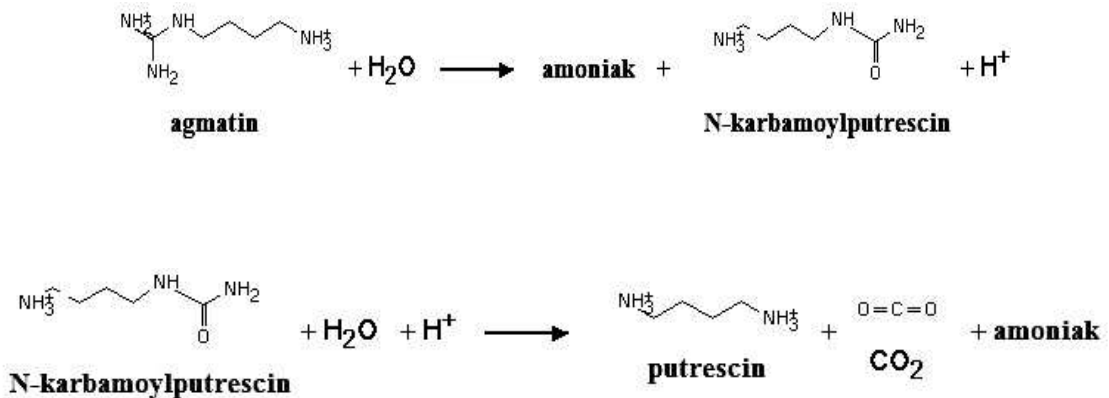
polyaminů. Spermin a spermidin se odvozují z putrescinu připojení dvou aminopropylových skupin [18,20].



Obrázek 3: Vznik putrescinu z L-argininu přes L-ornitin [21,22]



Obrázek 4: Vznik putrescinu z L-argininu přes agmatin [23]



Obrázek 5: Vznik putrescinu z L-argininu přes agmatin a N-karbamoylputrescin [24]

1.2.2 Kadaverin

Pentametylendiamin či pentan-1,5-diamin (viz Obrázek 6) je alifatický diamin. Jeho toxické účinky jsou podobné amoniaku. Bývá také označován jako mrtvolný jed [16,17,25].



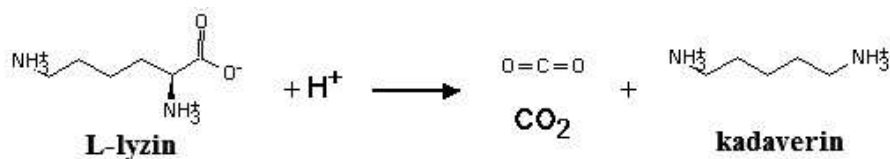
Obrázek 6: Strukturální vzorec kadaverinu [18]

Tabulka 2 znázorňuje fyzikální vlastnosti kadaverinu.

Tabulka 2: Fyzikální vlastnosti kadaverinu [26]

Sumární vzorec	$\text{C}_5\text{H}_{14}\text{N}_2$
Molární hmotnost	$102,18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Teplota tání	$9 \text{ }^\circ\text{C}$
Teplota varu	$178 - 180 \text{ }^\circ\text{C}$
Hustota	$0,870 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$

Kadaverin je v buňkách syntetizován z L-lyzinu. Reakce přeměny je katalyzována enzymem lyzindekarboxylázou (EC 4.1.1.18) [18,27]. Průběh syntézy je znázorněn na Obrázku 7.



Obrázek 7: Vznik kadaverinu z L-lyzinu [27]

1.3 Účinky biogenních aminů

Biogenní aminy jsou pro organismus nepostradatelné, ale ve vysokých koncentracích se mohou projevovat jako látky psychoaktivní a vazomotorické. Psychoaktivní aminy působí jako přenašeči v centrálním nervovém systému, vazomotorické aminy působí přímo na vaskulární systém [6].

Při hodnocení toxického 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 [6].

Biogenní aminy jsou prekurzorem dusíku, alkaloidů, proteinů, prekurzorů hormonů a nukleových kyselin. Mohou ovlivnit mnohé procesy v organismu, jako je regulace tělesné teploty, zvýšení nebo snížení krevního tlaku, příjem živin, návaly horka, nevolnost a jasně červená vyrážka [13,28,29].

Biogenní aminy, jako spermidin, kadaverin a putrescin, mohou zneškodňovat volné radikály. Tyramin má zřetelný antioxidační účinek, který se zvětšuje s jeho koncentrací. Tento účinek je podmíněný přítomností amino a hydroxy skupin. Spermin je schopen regenerovat tokoferol z tokoferolového radikálu prostřednictvím vodíkového donoru z aminoskupiny. Sperminový radikál potom váže peroxidové radikály do komplexů. Dopamin, noradrenalin a tyramin jsou schopny zneškodňovat reaktivní sloučeniny kyslíku jako např. superoxidové a hydroxylové radikály. Sekundární aminy, jakými jsou agmatin, spermin a spermidin, mohou tvořit stabilní nitrozaminy reakcí s dusitany a vytváří tak karcinogenní sloučeniny, zatímco terciární aminy produkují řadu nestabilních *N*-nitrozosloučenin. Putrescin a kadaverin jsou považovány za potenciální karcinogeny. Zahříváním putrescinu může vzniknout pyrolidin a z kadaverinu piperidin. Při působení tepla se z nich vytváří *N*-nitrozopyrolidin a *N*-nitrozopiperidin [15].

Putrescin, spermidin a spermin jsou nepostradatelné součásti živých buněk. Díky jejich struktuře plní v buňkách řadu specifických funkcí, jako je kontrola a inhibice translace mRNA a její syntéza vedoucí k různým proteinům. Katecholaminy, indolaminy a histamin plní u člověka důležité metabolické funkce. Kontrolují zejména nervový systém a krevní tlak [13]. Histamin působí na centrální nervovou soustavu, kde ovlivňuje procesy učení, paměť a fáze spánku [30].

1.3.1 Putrescin a kadaverin

Mezi hlavní funkce putrescinu patří stabilizace makromolekul (nukleových kyselin), subcelulárních struktur (ribosomů) a stimulace diferenciací buněk. Putrescin synergicky zesiluje účinek histaminu a tyraminu [6,11,31]. Další nepříznivou vlastností tohoto aminu je jeho schopnost reakce s dusitany za vzniku nitrozopyrolidinu, heterocyklického karcinogenního nitrozaminu. Mimo jiné může tento amin zneškodňovat volné radikály. Putrescin, spolu se sperminem a spermidinem inhibují oxidaci polyenových mastných kyselin, přičemž tento účinek souvisí s počtem amino skupin obsažených v polyaminu [15]. Putrescin patří mezi nejvíce produkované biogenní aminy u kmenů gramnegativních bakterií, především z čeledi *Enterobacteriaceae* [32].

Kadaverin je důležitý pro růst buněk a je zapojen do mnoha procesů, včetně syntézy bílkovin [27]. Kadaverin patří do skupiny polyaminů (podobně jako spermin, spermidin a putrescin). Mezi jejich biologické funkce patří mj. účast na buněčném růstu a proliferaci. V popředí zájmu tak stojí jejich možná účast v nádorovém bujení. Polyaminy jsou také považovány za potencionální prekurzory karcinogenních N-nitrozosloučenin a aromatických heterocyklů [33]. Kadaverin rovněž patří mezi nejvíce produkované biogenní aminy u kmenů gramnegativních bakterií, především z čeledi *Enterobacteriaceae* [32].

1.3.2 Potravinová přecitlivělost

Potravinovou přecitlivělostí trpí významná a stále narůstající část populace. Postihuje asi 2 % dospělých, 8 % dětí do 3 let věku. Jedinci s potravinovou přecitlivělostí jsou při požití rizikové potraviny ohroženi jednak akutní reakcí s příznaky postižení systému dýchacího, gastrointestinálního, oběhového i kožního, nebo se potravinová přecitlivělost projevuje chronickým onemocněním, jako je atopický ekzém a chronické zažívací potíže, které

mohou významně ovlivňovat průceschopnost jedince i kvalitu jeho života. Potravinové alergie jsou reakce zprostředkované imunitním mechanismem a hlavní roli zde hrají imunoglobuliny IgE [34].

Významnými účastníky patologické alergické reakce jsou žírné buňky neboli mastocyty. Na povrchu mastocytů jsou navázány molekuly IgE. Vazba alergenu na tyto povrchové IgE vede k vylití histaminu a dalších mediátorů z granulí uvnitř buňky do jejího okolí. Některé potraviny, zvláště bohaté na tyramin nebo histamin, mohou vyvolávat patologickou reakci prakticky nerozeznatelnou od potravinové alergie. Alergická reakce se u postiženého jedince projevuje nejčastěji jako otok sliznic, což je známá senná rýma, nebo orální alergický syndrom, dále pak pálení a zarudnutí kůže nebo očí, astmatické projevy a v nejhroších případech jako tzv. anafylaktický šok [34].

1.3.3 Histaminová intolerance

Přijaté množství histaminu hraje rozhodující roli při objevení příznaků. Potíže budou vždy narůstat tím více, čím více bude zatížen organismus histaminem, než bude odbourán. Tento jev nazýváme histaminovou intolerancí (HIT). Tato potravinová nesnášenlivost vznikla díky nedostatku enzymu diaminooxidáza (DAO). Toxicitu histaminu může zvyšovat přítomnost putrescinu a kadaverinu, protože mají vyšší afinitu k DAO, čímž dochází k vyčerpání DAO pro histamin. Přibližně jedno procento obyvatel má takový enzymatický nedostatek a musí se zříknout rizikových potravin obsahujících histamin, jako jsou ryby sled'ovitého nebo makrelovitého typu a červené víno [20,35].

Někteří pacienti mají potíže s rýmou, jiní se trápí například plicními problémy. Pomocí DAO se uvolňují také další biogenní aminy. I jídlo, které obsahuje malé množství histaminu, ale velké množství jiných biogenních aminů, může vyvolat potíže. Aminy, které pocházejí z kaka, často nastartují migrénu. Pokud je přítomna intolerance k histaminu, máme se vyvarovat jídlům, která obsahují jeho větší množství. HIT se nerozvíjí náhle, nýbrž velmi pomalu. To je hlavní důvod, proč nelze tuto nemoc snadno rozpoznat, a často je považována za psychosomatickou záležitost. Nejlépe se zjistí tzv. vylučovací dietou, při které se vysadí na dva týdny potravina bohatá na histamin [30,35].

1.3.4 Detoxikace biogenních aminů

V zažívacím traktu působí detoxikační systém, který dokáže metabolizovat normální příjem biogenních aminů potravou. Hlavní úlohu v odbourávání biogenních aminů zaujímají enzymy monoaminoxidáza (MAO) a diaminoxidáza. Mají však jen určitou kapacitu a vysoký příjem biogenních aminů nezvládnou metabolizovat. MAO a DAO působí v zažívacím traktu, takže do krevního oběhu se dostávají oxidační produkty biogenních aminů. [13,15]. 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 a potenciátorů. [6].

Otravy biogenními aminy z potravin se mohou vyskytnout obzvlášť ve spojení s faktory, jako například inhibice MAO způsobená léčivými či alkoholem, onemocněním zažívacího systému a přítomností dalších aminů v potravě. Dalším rizikem je jejich reakce s dusitanovými a dusičnanovými solemi, které se používají ke konzervaci masných výrobků za vzniku nitrozaminů [36].

Jedinci s chorobami trávicího traktu (žaludeční vředy, gastritida) mají aktivitu aminoxidáz nižší než jedinci zdraví. U pacientů, kteří užívají léky s inhibičním účinkem monoaminoxidáz a diaminoxidáz může dojít k pozměnění metabolismu biogenních aminů, jejich nahromadění a k závažným zdravotním komplikacím [15].

1.4 Legislativa

V České republice byly dané legislativní limity pro vybrané biogenní aminy v rybách, sýrech, pivu a vínu do roku 2004. Legislativní limity se v různých zemích od sebe poměrně liší, jsou nejednotné [6].

Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 stanovuje limit histaminu u ryb a rybích výrobků. Pro produkty rybolovu z druhů ryb spojovaných s vysokým množstvím histidinu je povolený limit 100 – 200 mg.kg⁻¹. Aby byl daný výrobek vyhovující, musí splňovat následující kritéria: (i) průměrná hodnota obsahu histaminu v 9 vzorcích musí být nižší než 100 mg.kg⁻¹, (ii) maximálně 2/9 vzorků smí mít obsah histaminu v rozmezí 100 – 200 mg.kg⁻¹, (iii) žádná zjištěná hodnota obsahu histaminu nesmí převyšovat 200 mg.kg⁻¹. Pro produkty rybolovu, které byly ošetřeny enzymatickým zráním v láku

vyrobených z ryb s vysokým obsahem histidinu, je povolený limit 200 – 400 mg.kg⁻¹, přičemž platí stejná pravidla jako v předchozím případě [37].

V ČR je v současné době platná vyhláška č. 305/2004 Sb., ve znění pozdějších předpisů, vydaná Ministerstvem zdravotnictví, která stanovuje druhy kontaminující a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách. Vyhláška uvádí přípustné množství pouze pro histamin v rybách a rybích výrobcích, které je ve výši 100 mg.kg⁻¹. Tento limit povoluje překročení o 100 % u dvou vzorků z devíti. Legislativa nenařizuje výrobcům uvádět obsah biogenních aminů na obale potravin [38].

1.5 Výskyt biogenních aminů

Biogenní aminy v potravinách mohou pocházet ze dvou zdrojů. Jsou přirozenou součástí buněčných struktur rostlin anebo mohou vznikat v procesu výroby a skladování potravin, jako výsledek metabolického působení mikroorganismů [39]. Biogenní aminy mohou sloužit jako indikátory procesu fermentace potravin, ale také jejich kažení [9].

Ve vyšším množství se nachází ve fermentovaných výrobcích, jako jsou např. pivo, víno, kysané zelí, sýry aj. Působením kontaminující mikroflóry vznikají hlavně v rybách a v mase během skladování. Vysoké koncentrace biogenních aminů se vyskytují u potravin v pokročilém stupni kažení. Při nevhodném skladování ovoce, zeleniny a hub produkují biogenní aminy zejména endogenní dekarboxylázy [6]. Volné aminy například formují v plodech ovoce a zeleniny charakteristickou chuť a typickou vůni pro zralé plody. Bylo prokázáno, že jejich přítomnost v relativně vysokých koncentracích v těchto plodech prodlužuje dobu skladovatelnosti [40]. Významné mikroorganismy produkující biogenní aminy v různých potravinách jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Významné mikroorganismy produkující biogenní aminy [6]

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

1.5.1 Rostlinné produkty

Biogenní aminy se jako přirozená součást vyskytují v potravinách rostlinného původu. Hlavním biogenním aminem v ovoci a zelenině bývá tyramin [6]. Některé džusy, nektary a limonády vyrobené z pomerančů, malin, citronů, grapefruitů, mandarinek, jahod, rybízu

a hroznů obsahují různé biogenní aminy v lišící se koncentraci, přičemž putrescin bývá zastoupený nejvíce [3].

Vysoké koncentrace biogenních aminů můžeme najít v rajčatech (tyramin, tryptamin, histamin), banánech (tyramin, tryptamin, serotonin), švestkách (tyramin, noradrenalin) a listech špenátu (histamin). Přítomnost biogenních aminů můžeme taky pozorovat v některých houbách, bílém a černém pepři a v sojové omáče. Histamin a kadaverin byl detekován v karagenanu z řas [3,4,6,41].

V pivu je nejvíce přítomný tyramin a kadaverin s kolísavým obsahem taky spermin, spermidin a putrescin [42,43].

Mnoho biogenních aminů je přítomno i v červeném a bílém víně. Mezi nejvíce se vyskytující patří tyramin, histamin, tryptamin, putrescin, kadaverin, spermidin [3,44]. Rýžová vína obsahují relativně vysoká množství volných aminokyselin. Výsledky průzkumu biogenních aminů v čínských rýžových vínech ukazují, že tato vína obsahují pět biogenních aminů, a to histamin, tyramin, kadaverin, spermin a spermidin [45].

V klíčícím ječmeni (především v kořeni) se nachází derivát tyraminu hordenin. V pšenici se nachází např. amidy 2-hydroxy-putrescinu s ferulovou a *p*-kumarovou kyselinou, které vznikají jako fytoalexiny při napadení rostliny [6]. Fenyletylamin je přírodní složkou kakaových bobů a tím pádem se dostává i do čokolády a cukrovinek obsahujících čokoládu [3,4].

1.5.2 Živočišné produkty

Obsah histaminu je v rybách stabilní za podmínek používaných při sterilačním procesu rybích konzerv [46]. Různé biogenní aminy (histamin, putrescin, kadaverin, tyramin, spermidin a spermin) mohou být detekovány v makrelovitých rybách (*Scombridae*), jako jsou makrely, sledř, tuňák a sardinky. Množství biogenních aminů se ve fermentovaných rybích výrobcích značně liší. Objevují se stopová množství histaminu, putrescinu, agmatinu, tryptaminu a tyraminu. Ve vyšší koncentraci se po fermentaci vyskytuje pouze spermidin [3].

Po rybách je sýr nejčastější potravinou, která může být příčinou otrav způsobenou histaminem. Sýry obsahují dostatečné množství aminokyselin, které vznikly převážně proteolýzou kaseinu. Množství biogenních aminů v sýru je závislé na době zrání, aktivitě

vody, mikroflóre, koncentraci soli, pH, teplotě skladování, přítomnost kofaktoru pyridoxalfosfátu. Zrání či dlouhodobé skladování tvrdých a polotvrdých sýrů vede k degradaci bílkovin a k hromadění volných aminokyselin. Ty zde mohou být přeměněny díky činnosti dekarboxyláz na aminy [46,47].

Schopnost různých bakterií produkovat aminy je velmi rozdílná. Vysoké množství biogenních aminů s největší pravděpodobností bude zjištěno u sýrů silně kontaminovaných a znehodnocených mikroorganismy. Mezi hlavní biogenní aminy zjištěné v sýrech patří histamin, tyramin, tryptamin, putrescin a kadaverin [48].

Mléko a mléčné výrobky jsou dobrým příkladem prokázání nežádoucího zvýšení obsahu histaminu během nevhodného zpracování. Ačkoli čerstvé mléko obsahuje nízkou hladinu histaminu, pasterované nebo UHT ošetřené mléko obvykle dosahuje vyšší hladiny tohoto biogenního aminu. Při fermentaci mléka lze pozorovat značný nárůst často se vyskytujícího histaminu [49]. V mateřském mléce byla zjištěna různá koncentrace sperminu, spermidinu a putrescinu. Rozdíl koncentrací byl dokonce prokázán i mezi levým a pravým prsem [3].

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 obsahuje do $7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ kadaverinu a putrescinu, zatímco zkažené maso $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a více. Při vaření dochází pouze k částečnému rozkladu biogenních aminů [6]. U vepřové panenky dochází běžnými technikami zpracování potravin k výraznému poklesu kadaverinu, putrescinu a tyraminu na rozdíl od sperminu a spermidinu, u kterých je koncentrace těmito technikami zdaleka méně ovlivňována [50]. Histamin a faktory, které ovlivňují jeho syntézu, byly stanoveny u skotu a jiných druhů masa či masných výrobků [3].

Ve fermentovaných masných výrobcích se vyskytuje převážně tyramin. Vznik biogenních aminů ve fermentovaných masných výrobcích je možné omezit přidáním startovacích kultur, které potlačují růst proteolytických mikroorganismů [51]. Tyramin a putrescin jsou jedny z nejvíce se vyskytujících biogenních aminů v suchých salámech [52]. V posledních letech došlo k rostoucí spotřebě drůbežího masa a výrobků z drůbežího masa. Tyto produkty mohou obsahovat diaminy ve značném množství v důsledku enzymatické aktivity kontaminujících bakterií, které mohou ohrozit zdraví spotřebitelů [53].

1.6 Mikroorganismy tvořící biogenní aminy

Mikroorganismy vlastnící dekarboxylázy aminokyselin jsou začleněny především do čeledi *Enterobacteriaceae* a *Micrococcaceae*. Čeleď *Enterobacteriaceae* zahrnuje např. rody *Citrobacter*, *Clostridium*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia*, aj. Do čeledi *Micrococcaceae* patří rody *Stafylococcus* a *Micoroccus*. Z bakterií mléčného kvašení, které produkují dekarboxylázy lze jmenovat rody *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Pediococcus* a *Leuconostoc* [3,4,52].

Histidindekarboxylázová aktivita byla kromě bakterií nalezena též u některých plísní a kvasinek, u kterých je aktivita dokonce větší než u bakterií mléčného kvašení [52].

1.6.1 Čeleď *Enterobacteriaceae*

Název *Enterobacteriaceae* je odvozen z latinského slova „*Enterobacterium*“, což znamená střevní bakterie [54]. Jsou celosvětově rozšířené a nalézají se v půdě, vodě, ovoci, zelenině, na živočiších od cizopasných červů a hmyzu až po člověka. Mnoho druhů primárně napadá intestinální trakt a způsobuje průjemová onemocnění [55].

Členové čeledi *Enterobacteriaceae* zaujímají ústřední pozice v současné biologii a vzhledem k jejich rozdílným vlastnostem a historické roli mají velký význam pro výzkum lékařský, mikrobiologický, potravinářský i biochemický [56].

V současné době čeleď *Enterobacteriaceae* zahrnuje nejméně 34 rodů se 149 druhy a poddruhy [57]. Jsou to gramnegativní rovné tyčinky, nepohyblivé nebo pohyblivé peritrichálními bičíky, netvoří endospory ani cysty. Jsou fakultativně anaerobní a chemoorganotrofní, mající jak respiratorní tak i fermentatorní typ metabolismu [55,56].

Většina druhů roste při 37 °C. Optimální aktivita vody je 0,94 – 1,0 a pH 4 – 7 [57]. Některé druhy rostou i při nižší teplotě a jsou při této teplotě i více metabolicky aktivní. Generační doba je velice krátká. Okyselují glukózu i řadu jiných cukrů a cukerných alkoholů, většinou jsou oxidáza negativní (výjimkou je rod *Plesiomonas*) a většinou i kataláza pozitivní, převážně produkují nitráty [55].

Druhy čeledi *Enterobacteriaceae* jsou schopny univerzálně využívat sacharidy. Smíšená fermentace má konečné produkty jako je kyselina mléčná, kyselina octová, kyselina jantarová, kyselina mravenčí a etanol. Mezi jednotlivými druhy mohou být v závislosti na podmínkách fermentace velké rozdíly v konečných produktech. Tvorba plynu je jedním z identifikačních znaků patogenních mikroorganismů. *Escherichia coli* plyn tvoří, zatímco

Shigella a *Salmonella* plyn neprodukuje. Paradoxně *Serratia* plyn neprodukuje (ve skutečnosti je plyn tvořen, ale zůstává stabilizovaný v médiu) [56,57].

Enterobacteriaceae jsou ve většině případů považovány za mikroorganismy s vysokou dekarboxylázovou aktivitou. Produkují zejména kadaverin a putrescin, jejichž významnými producenty jsou *Serratia sp.* a *Enterobacter Cloacae*. Tyto mikroorganismy jsou ve finálních výrobcích zastoupeny v malém množství, ale nesprávné skladování surovin a nekontrolované fermentace mohou vyvolat rozmnožování těchto bakterií za současného působení dekarboxyláz. Uvolněné enzymy jsou zodpovědné za hromadění biogenních aminů a jejich činnost může pokračovat i v nepřítomnosti živých buněk [52].

1.6.1.1 Rod *Serratia*

Rod *Serratia* tvoří gramnegativní rovné tyčinky, obvykle pohyblivé pomocí peritrichálních bičíků. Jsou fakultativně anaerobní a chemoorganotrofní, mající jak respiratorní, tak i fermentatorní typ metabolismu. Optimální teplota růstu je 30 až 37 °C a optimální pH 5 až 9, některé druhy tvoří červený pigment. Jsou oxidáza negativní a kataláza pozitivní [55,58]. Seracie se vyskytují v humánním klinickém materiálu, půdě, vodě, na povrchu rostlin a obecně v prostředí, dále ve střevním traktu hlodavců a hmyzu [54,55].

S. liquefaciens je nejrozšířenější bakterie způsobující kažení chlazené zeleniny a masných výrobků [58].

S. marcescens je pohyblivá, fakultativně anaerobní, gramnegativní bakterie. Rovné tyčinky mají v průměru 0,5 – 0,8 μm a jsou dlouhé 0,9 – 2,0 μm. Kolonie na agaru jsou kruhové, konvexní, neprůhledné a mají bílý, růžový nebo červený pigment. Bakterie roste v rozmezí pH 5 až 9 a při teplotách 5 – 40 °C [59,60].

Syntéza červeného pigmentu u bakterie *S. marcescens*, který se nazývá prodigiozin, závisí na podmínkách růstu a je produkován i za nízkých koncentrací NaCl. Při koncentraci 8 % a více se pigment netvoří. Na pigmentaci má vliv i osvětlení. Světlo má přímý vliv na syntetizované barvivo dané kultury. Největší nárůst biomasy a produkce pigmentu je pozorována na půdách s obsahem glycerolu. V kultivačním médiu obsahujícím glukózu jako zdroj uhlíku a energie k tvorbě prodigiozinu nedochází [61]. Pigment se podílí na dýchání a na některých anabolických procesech. Předpokládá se, že biosyntéza pigmentu funguje jako ochranný mechanismus v nepříznivých podmínkách, ve kterých je růst buněk zpomalen. Využití pigmentu jako obchodního barviva se nezdařilo, protože jeho citlivost

na světlo je značná. Biosyntéza pigmentu je jako u jiných fyziologických procesů podstatně ovlivněna faktory, jako jsou teplota, přítomnost minerálních látek a aminokyselin [61].

S. marcescens se vyskytuje v přirozeném prostředí, tzn. v půdě, vodě a na povrchu rostlin. Upřednostňuje spíše vlhké prostředí. V podobě červených skvrn se vyskytuje na nekyselých potravinách a způsobuje jejich kažení. Bakterie často roste na škrobových potravinách, kde jsou pigmentované kolonie snadno a mylně považovány za kapky krve [59,60] *S. marcescens* je význačným oportunním patogenem pro hospitalizované pacienty, způsobuje septikémie, pneumonie, meningitidu a infekce močových cest [55,61].

1.6.2 Ostatní mikroorganismy produkující biogenní aminy

1.6.2.1 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení jsou obecně považovány za nepatogenní a netoxické, avšak v poslední době je často dokazováno, že některé druhy mohou produkovat biogenní aminy. Za producenty tyraminu byly označeny některé kmeny *Lactococcus* a *Leuconostoc*, většina kmenů *Enterococcus*, rod *Carnobacterium* a dále některé druhy laktobacilů (*Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus homohiochi*, *Lactobacillus bavaricus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus curvatus* a *Lactobacillus sakei*). U některých kmenů *Leuconostoc* spp. a u *Oenococcus oeni* byla pozorována schopnost tvořit histamin. Enterokoky produkují tyramin a 2-fenyletylamin, avšak nejsou schopny vytvořit významné množství kadaverinu a putrescinu [52].

1.6.2.2 Čeleď *Micrococcaceae*

Existuje jen málo dostupných informací o tvorbě biogenních aminů u čeledi *Micrococcaceae*. U některých druhů rodu *Micrococcus* a *Staphylococcus* byla pozorována aktivita histidindekarboxylázy. *Staphylococcus carnosus* a *Staphylococcus piscifermentans* mohou vykazovat vysokou činnost aminokyselinových dekarboxyláz a rovněž mohou produkovat 2-fenyletylamin, histamin, kadaverin a putrescin. Tvorba histaminu byla pozorována i u 76 % kmenů *Staphylococcus xylosum* izolovaných ze španělských salámů [52].

1.6.2.3 Plísně

Přirozený výskyt biogenních aminů a jejich výskyt v průběhu spontánního kažení nebo po inokulaci byl sledován u plísní *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium digitatum*, *Phoma sp.*, *Rhizopus stolonifer*. Médiem byly ovocné šťávy z obchodní sítě i šťávy čerstvě vylisované, dále zmrazené maliny, čerstvé hrozny a citrony. Celkově se ukázalo, že koncentrace biogenních aminů v ovoci a šťávách jsou v normálních podmínkách zanedbatelné [62].

S vyššími koncentracemi biogenních aminů je třeba počítat u těch druhů ovoce, které vzhledem ke své konzistenci mají sklon k mikrobiologické nestabilitě. Principiálně jsou však rizika vyvolaná aminy z ovoce a ovocných šťáv velmi nepatrná. Problémy by mohl ve zvláštních případech (pacienti s migrénami) způsobovat někdy se vyskytující vyšší obsah tyraminu. Nezávisle na tom však mohou znamenat zvýšené riziko vyšší koncentrace mykotoxinů, kterým je třeba věnovat pozornost [62].

1.6.2.4 Kvasinky

Ve fermentovaných potravinách se na produkci biogenních aminů podílejí i kvasinky. U kvasinek rodu *Debaryomyces* a *Candida* izolovaných z fermentovaného masa byla objevena aktivita histidindekarboxylázy větší, než je u bakterií mléčného kvašení a stafylokoků. Některé neidentifikované kmeny kvasinek byly schopné tvořit vysoké množství 2-fenyletylaminu a tyraminu [52].

1.7 Dekarboxylázová aktivita mikroorganismů

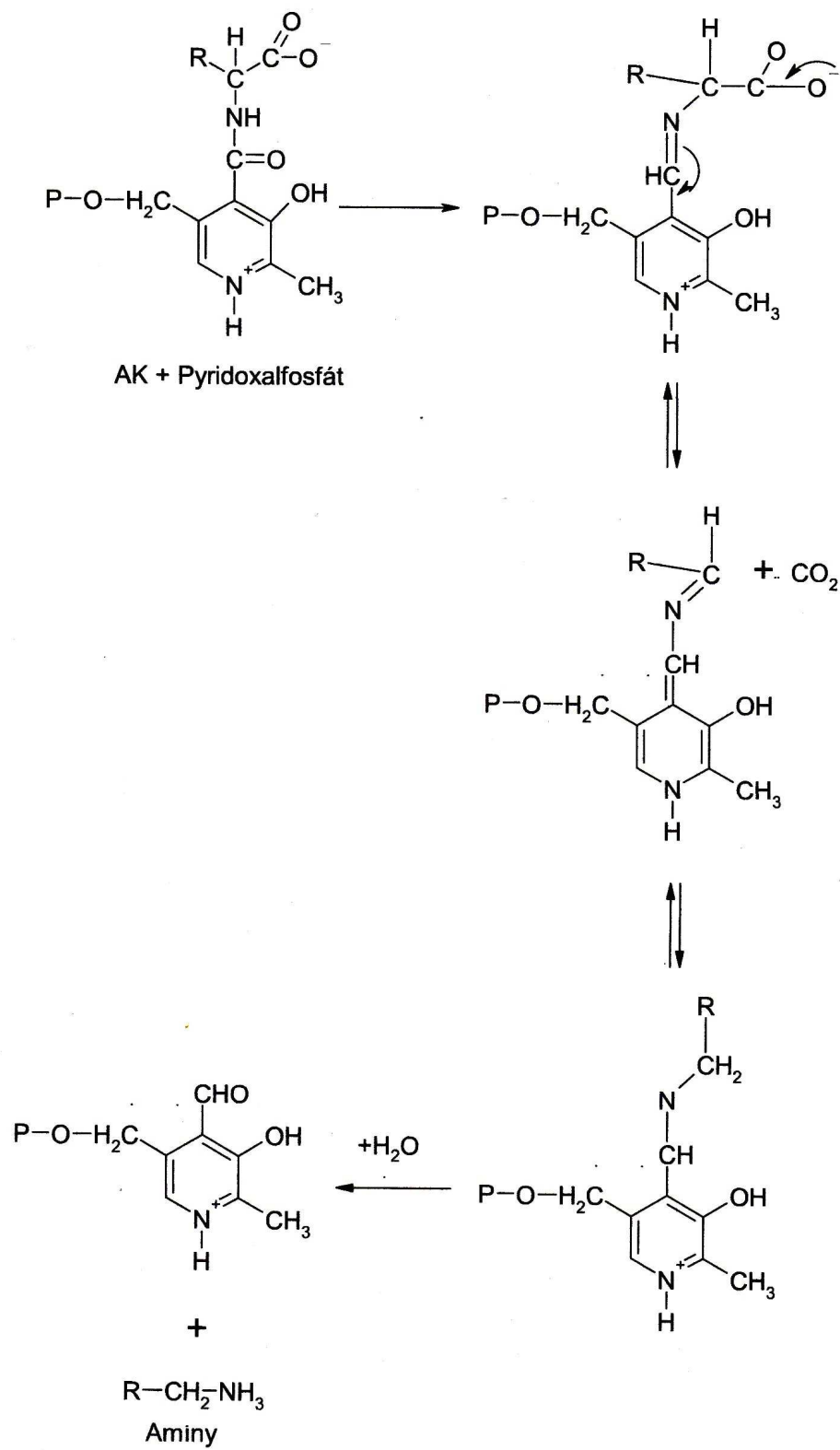
Tvorba biogenních aminů bakteriemi může být ovlivněna mnohými vnějšími faktory, které mohou ovlivňovat zejména kinetiku dekarboxylázových reakcí [63]. Dekarboxylázová aktivita mikroorganismů je velice pestrá a rozmanitá. [3,15].

Eliminaci oxidu uhličitého z karboxylových kyselin lze uskutečnit v závislosti na jejich struktuře zahříváním na teploty 100 – 300 °C. Dekarboxylace β -oxokyselin a substituovaných malonových kyselin představuje poslední krok v syntézách ketonů a karboxylových kyselin. Snadnost dekarboxylace malonových kyselin klesá s rostoucí substituací na uhlíku v poloze 2. Společným znakem dekarboxylace je tvorba cyklického tranzitního stavu [64]. Dekarboxylace je reakce, při které se z molekuly aminokyseliny odstraňuje karboxylová skupina za vzniku aminu [65]. Dochází k odštěpování oxidu

uhlíčitého ze substrátu, proces je katalyzovaný enzymy ze třídy lyáz (tzv. dekarboxylázy). Mezi nejznámější dekarboxylázy patří pyruvátdekarboxyláza, produkující acetaldehyd při alkoholové fermentaci, či dekarboxylázy aminokyselin, jejichž působením vznikají biogenní aminy [66].

Biosyntézu a transport polyaminů kontrolují především enzymy ornitindekarboxyláza (EC 4.1.1.19) a *S*-adenozylmetionindekarboxyláza (EC 4.1.1.507). Jejich katabolismus a export z buněk je naopak kontrolován spermidin/spermin *N*¹-acetyltransferázou. Zvýšenou biosyntetickou aktivitu polyaminů lze nalézt typicky u neoplastického buněčného růstu. *N,N'*-diacetylspermin (DAC) je obsažen v polyaminech lidské moči. Exkrece tohoto diacetylpolyaminu bývá zvýšena u osob s řadou maligních nádorů (prostata, prs, tlusté střevo, atp.) [67].

Na dekarboxylaci aminokyselin se většinou podílí pyridoxalfosfát jako kofaktor (viz Obrázek 8). Z aminokyseliny a pyridoxalfosfátu se vytváří Shiffova báze. Kladně nabitě atomy dusíku pyridinového kruhu přitahují elektrony. Tímto se vytváří příznivý mezomerní stav, který může vzniknout jen tehdy, pokud se na C_{α} atomu aminokyseliny eliminuje substituent jako kation. Mezomerní mezistav se potom stabilizuje adicí jednoho protonu na C_{α} a hydrolýzou Shiffovy báze na primární amin. Při dekarboxylaci se zachovává konfigurace. Dekarboxylázy jsou většinou specifické na L-formu aminokyseliny. Tyto enzymy jsou rozšířené v živočiších, rostlinách i mikroorganismech. Dekarboxylázy vykazují zvýšenou aktivitu zejména u bakterií [3,15].



Obrázek 8: Průběh dekarboxylační reakce [15]

1.7.1 Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů

Lepší pochopení mechanismů, kterými jsou tvořeny biogenní aminy, nám pomůže v zabránění jejich vzniku. Obecně výskyt biogenních aminů v potravinách může být potlačen používáním přísné a správné hygienické praxe při výběru surovin a výrobního prostředí. Biogenní aminy mohou být produkovány i kmeny BMK (bakterie mléčného kvašení), které se běžně využívají pro technologické účely jako starterové kultury, a proto je vhodné tyto kmeny před použitím v mlékárenství otestovat na dekarboxylázovou aktivitu. Stejně tak by pro technologické účely bylo vhodné znát kinetiku tvorby biogenních aminů za podobných podmínek prostředí, které mohou nastat během technologického procesu výroby fermentovaných mléčných výrobků [63]. Při výrobě fermentovaných potravin je dále důležité zbytečně neprodlovat dobu kvašení a používat pečlivě vybrané startovací kultury [3].

Vybrané faktory, které mohou ovlivnit dekarboxylázovou aktivitu, jsou popsány v následujících kapitolách.

1.7.1.1 pH

Růst mikroorganismů i jejich biochemická činnost jsou silně ovlivněny koncentrací vodíkových iontů v prostředí. pH prostředí ovlivňuje také odolnost buněk ke zvýšeným teplotám. Odolnost k vysokým teplotám je tedy tím menší, čím větší je odchylka od optimálního pH [68].

Hodnota pH je jedním z klíčových bodů, který ovlivňuje dekarboxylázovou aktivitu. Dekarboxylázová aktivita je silnější v kyselém prostředí (pH 4 až 5,5). Prudké okyselení způsobí omezení růstu amino-pozitivních mikroorganismů, obzvláště z čeledi *Enterobacteriaceae*. Zvýšení pH v prostředí má za následek navýšení tvorby biogenních aminů [3,15,28,52].

Putrescin je rozpustný ve vodě s hodnotou pH kolem 10 a úplně protonován ve fyziologickém pH [20].

1.7.1.2 Teplota

Teplota vnějšího prostředí je jedním z hlavních faktorů, které ovlivňují rychlost rozmnožování mikroorganismů i možnost jejich života. U každého mikroorganismu rozeznáváme tři základní body teploty: minimální teplotu, tj. nejnižší teplotu, při níž se daný druh rozmnožuje ještě zjizitelnou rychlostí, optimální teplotu, při níž se rozmnožuje největší rychlostí a maximální teplotu, tj. nejvyšší teplotu, při které je schopen se ještě rozmnožovat. Stanovení minimální teploty je poměrně obtížné, neboť s klesající teplotou klesá postupně i rychlost rozmnožování. Zatímco optimální teplota je obvykle asi o 30 °C vyšší než teplota minimální, maximální teplota převyšuje pouze o 5 až 10 °C optimální teplotu určitého mikroorganismu [68].

Krátkodobé zvýšení teploty na maximální teplotu vyvolá teplotní šok, který vede k různým výkyvům metabolismu. Při tom se syntetizují tzv. teplotně šokové proteiny (heat shock proteins, HSP), které náleží mezi tzv. stresové proteiny. Těmito proteiny se rozeznávají anomální proteiny tvořené při stresu a zajišťuje se jejich rychlé odbourávání. Zvýšená syntéza HSP je vyvolána i některými jinými stresovými podmínkami, např. přítomností těžkých kovů v prostředí. Funkce HSP a regulace jejich syntézy za stresových podmínek je předmětem intenzivních studií [68].

Je dobře známo, že teplota má výrazný vliv na tvorbu biogenních aminů. Optimum pro růst většiny mikroorganismů vybavených dekarboxylázami je 20 až 37 °C. Nízké teploty zastavují jejich růst. Tato proměnná má různý vliv na mnoho jevů souvisejících s produkcí biogenních aminů (např. růst buněčné kinetiky, proteolytická a dekarboxylační aktivita enzymů) [15,52].

Produkce histaminu v potravinách se zpomaluje při 10 °C a zastavuje již při 5 °C v důsledku úhynu bakterií produkujících histamin. S rostoucí skladovací teplotou koncentrace aminů vzrůstá. Pozitivní vliv lze sledovat i u vaření, s výjimkou sperminu, jehož koncentrace při zahřívání klesá [13]. Biosyntéza putrescinu bakterií *Enterobacter cloacae* byla detekována při inkubaci 20 °C po 24 hodinách, na rozdíl od teploty 10 °C, při které již produkce zaznamenána nebyla [3].

1.7.1.3 NaCl

Koncentrace NaCl v médiu silně ovlivňuje tvorbu biogenních aminů, kolísání množství vody a poměru sůl/voda během skladování a výroby potravin má značný vliv na rozmnožování mikroorganismů [69]. NaCl aktivuje tyrozindekarboxylázu a inhibuje histidindekarboxylázu [15].

Během skladování při 25 °C je inhibiční účinek úměrný nárůstu koncentrace v solném nálevu. Např. syntézu histaminu, tyraminu a tryptaminu pomocí *Streptococcus cremoris* lze potlačit přidáním již 0,5 % NaCl k základnímu médiu. Ale při vyšších teplotách (30 °C) a koncentraci 2 % NaCl naopak tvorba histaminu prudce roste [3].

1.7.1.4 Další faktory

- **obsah glukózy** – optimum pro růst mikroorganismů je 0,5 až 2 %, zatímco 3 % inhibují syntézu dekarboxyláz
- **přítomnost NaNO₂** – aktivuje tyrozindekarboxylázu
- **přítomnost O₂** – pro mikroorganismy vybavené dekarboxylázami je potřebný
- **množství přítomných aminů** – obsah histaminu, agmatinu a putrescinu v médiu inhibuje histidindekarboxylázu [15].

Kromě výše zmíněných faktorů mohou produkci biogenních aminů ovlivňovat další chemické látky, jako např. etanol, fenolické sloučeniny nebo oxid siřičitý [63].

2 METODY STANOVENÍ BIOGENNÍ AMINŮ

Jsou dva důvody pro stanovení biogenních aminů v potravinách. Prvním je možnost jejich stanovení jako ukazatelů kvality potravin a druhá jejich potencionální toxicita a s tím spojené zdravotní problémy [29,70].

Pro stanovení biogenních aminů byla navržena spousta metod. Neexistuje však žádná univerzální kvantitativní metoda pro stanovení všech biogenních aminů ve všech potravinách. Typické problémy spojené se stanovením biogenních aminů v potravinách jsou přítomnost potencionálně překážejících sloučenin a výskyt některých biogenních aminů současně ve stejném poměru [71].

K nejčastěji používaným metodám pro stanovení biogenních aminů patří papírová chromatografie (PC), tenkovrstvá chromatografie (TLC), plynová chromatografie (GC), chromatografie na iontoměničích (IEC) a vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) [25,29,72]. Všechny tyto vyjmenované metody zahrnují dva hlavní kroky – extrakci aminů z buňky a jejich vlastní stanovení [25]. První fáze je kritický bod, který zahrnuje získání odpovídajícího množství všech aminů. Extrakce volných aminů z buněk může být prováděna vodou při pokojové teplotě nebo při teplotě vyšší. Dále pak v kyselém prostředí, a to za pomoci kyseliny chlorovodíkové, chloristé nebo trichloroctové tak, aby byly získány i vázané aminy [25,73].

K dalším metodám patří elektromigrační metody, zejména kapilární elektroforéza (CE), enzymatické metody (ELISA), imuno-enzymatické metody a molekulární metody, např. polymerázová řetězová reakce (PCR) [20].

2.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Tenkovrstvá chromatografie je případem plošné chromatografie s převládajícím adsorpčním mechanismem dělení analyzované směsi látek [36]. Vlastní chromatografický experiment se provádí na tenké vrstvě sorbentu (celulóza, silikagel, alumina) naneseného na vhodné podložce (sklo, kovová fólie). Vzorek se ve velmi malém množství (μl) nanáší na začátek vrstvy (start) společně se standardy obdobně jako v případě papírové chromatografie. Po zaschnutí nanesených vzorků se vrstva vloží do vyvíjecí komory s vhodnou směsí rozpouštědel (mobilní fáze) tak, aby startovní linie byla nad hladinou. Komora se zavře. Vyvíjení chromatogramu probíhá tak dlouho, dokud se čelo vztlínající směsi rozpouštědel nepřiblíží k okraji desky. Poté se chromatogram vyjme, vysuší

a vhodným způsobem detekce se zjistí, kam doputovaly látky obsažené ve vzorku. K detekci se používají vrstvy upravené fluorescenční látkou, fluoreskující při osvětlení UV zářením. Stanovované látky velmi často tuto fluorescenci zhášejí, takže se pod UV lampou objevují na chromatogramu v podobě tmavých skvrn. Využívají se i další způsoby detekce, založené na postřiku chromatogramu vhodným činidlem, které se stanovovanou látkou vytváří barevnou sloučeninu [74].

TLC patří mezi první metody pro kvalitativní analýzu biogenních aminů v potravinách [20]. TLC metoda je velmi ekonomická a rychlá. Nevyžaduje žádné speciální zařízení, ale získané výsledky mohou být nepřesné (semikvantivní metoda). Nabízí nám stanovení až osmi biogenních aminů v potravinách [36,70,71].

Pro separaci a stanovení danzylderivátů biogenních aminů se využívá systému rozpouštědel chloroform-dietyler-trietylamin (6:4:1), následovaného systémem chloroform-trietylamin (6:1) [36].

2.2 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie se pro stanovení biogenních aminů často nevyužívá. Plyná mobilní fáze zde slouží pouze k transportu analytů a neovlivňuje stacionární fázi. Pro metodu plynové chromatografie je charakteristická především účinná a rychlá separace složitých směsí a práce s malými množstvími vzorku za použití relativně jednoduché aparatury. Pro analýzy těkavých látek si plynová chromatografie zachovává prioritní postavení. Je zde požadována vysoká selektivita separačního procesu. Při separaci by mělo docházet k co nejmenšímu rozmývání zón analytů [75]. Jako nosný plyn se používá He, Ar, N₂, H₂, CO₂ [76].

V GC se často využívá technik s programováním pracovních parametrů a multidimenzionálních technik (teplotní gradient, změna průtokové rychlosti plynu, přepínání kolon, zpětné vypláchnutí kolony). Plynovou chromatografi lze využít nejen k analytickým účelům, použita může být rovněž jako metoda sledování fyzikálně chemických pochodů a vlastností (adsorpce, katalytické procesy, difúzní pochody) a jako metoda preparativní [75].

Biogenní aminy polyaminy jsou stanoveny jako trifluoroacetyl-, trimetylsilyl- nebo 2,4- dinitrofenylderiváty. K detekci se používá plamenový ionizační detektor (FID), detektor elektronového záchyty (ECD), plamenový ionizační detektor s alkalickým kovem (AFID) a hmotnostní spektrometr (MS) [20].

2.3 Chromatografie na iontoměničích (IEC)

Při tomto způsobu chromatografie zachycuje sorbent určitý typ ionů výměnou za jiný ion.

Podstatou je chemická reakce:



kde Y^- a Y^+ jsou vyměnitelné iony, které jsou vázány na funkční skupiny ionexu. Při iontové výměně difundují sorbované iony z okolního roztoku do ionexu, vytěsňují a vyměňují ekvivalentní množství jiných ionů vázaných na jiných výměnných skupinách. Tento pochod je obousměrný, takže v určitém okamžiku dochází k ustavení rovnováhy.

V ionexové chromatografii se však nikdy nevyužívá plná výměnná kapacita ionexu, o celkové rychlosti výměny rozhoduje především difuze kapalinovým filmem a u velmi zředěných roztoků také difuze ionexem [77].

Při technice iontové výměny jde o separaci ionů, proto je vždy používána vodná mobilní fáze. Stacionární fáze (iontoměnič, ionex) je zpravidla makromolekulární matrice obsahující kyselou nebo bazickou funkční skupinu. Katexy jsou iontoměniče s kyselou funkční skupinou nesoucí záporný náboj. Na povrchu katexů se obvykle setkáváme se skupinami kyselými (seřazeno podle vzrůstající síly): fenolická skupina $-OH$, karboxylová skupina $-COOH$, fosfátová skupina $-PO(OH)_2$ a sulfátová skupina SO_3H . Anex obsahuje bazickou funkční skupinu a je nositelem kladného náboje [77]. Nejčastějšími skupinami chemicky vázanými na povrchu anexů jsou (seřazeno podle vzrůstající síly): primární aminy $-NH_2$, sekundární aminy $-NHR$, terciární aminy $-NR_2$ a kvartérní amoniové báze $-N^+R_3$ [78]. Ion obsažený v ionexu bývá vyměněn za ion obsažený v mobilní fázi nebo ve vzorku a na principu soutěžení ionexu o tyto ionty dochází k separaci [77].

Iontově výměnná chromatografie nabízí ve srovnání s HPLC výhody jednoduché přípravy vzorků a stanovení většího počtu aminů ve vzorcích potravin s dostatečnou citlivostí a přesností. IEC je vysoce spolehlivá a přesná metoda pro stanovení významných biogenních aminů v sýrech. Metoda je velmi vhodná pro rutinní automatické analýzy a je hned po HPLC druhou nejčastěji využívanou metodou pro stanovení biogenních aminů [72].

Metoda založená na iontově-výměnné chromatografii s integrovanou pulzní amperometrickou detekcí (IPAD) byla vyvinuta jako lepší alternativa pro stanovení nederivatizovaných biogenních aminů (kadaverin, putrescin, spermidin, histamin

a tyramin) a některých aminokyselin (histidin, tyrozin). Tato metoda byla úspěšně použita pro analýzu biogenních aminů a aminokyselin v potravinách jak rostlinného a živočišného původu, tak i ve fermentovaných potravinách (suché salámy, ementál) [79].

2.4 Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Mezi metodami kapalinové chromatografie zaujímá významné místo technika HPLC. Zkratka je odvozena od dvou přípustných názvů této techniky, a to „high performance liquid chromatography“ (vysokoučinná kapalinová chromatografie) nebo „high pressure liquid chromatography“ (vysokotlaká kapalinová chromatografie). Mobilní fází je v tomto případě kapalina. Stacionární fází je film příslušné látky zakotvený na povrchu nosiče nebo pevný adsorbent. Přístroj, na kterém se provádí HPLC analýzy se nazývá kapalinový chromatograf [76].

HPLC je nejrozšířenější metodou pro stanovení biogenních aminů. Separace pomocí Ion- Pair-RP-HPLC je velmi známá procedura. Biogenní aminy a polyaminy nelze přímo detekovat v UV/VIS oblasti a ani fluorimetricky, a proto je nutné vzorky před detekcí derivatizovat [20]. Postkolonová derivatizace aminů pomocí ninhydrinu má za následek vznik zbarvených produktů. Citlivost detekce je často zvýšena předkolonovou derivatizací, zejména pomocí danzylchloridu, benzoylchloridu nebo 9-fluorenylmethylchloroformátu. Nové HPLC metody spojené s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie byly využity k separaci aminů předem derivatizovaných danzylchloridem. Tyto metody byly vyvinuty k identifikaci a stanovení šesti biogenních aminů, a to kadaverinu, histaminu, spermidinu, sperminu, tryptaminu a tyraminu [80].

V poslední době se jeví jako velmi spolehlivé a vysoce citlivé chromatografické metody s elektrochemickou detekcí nebo detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (LC/MS), zvláště pokud dochází ke koeluci více látek [81].

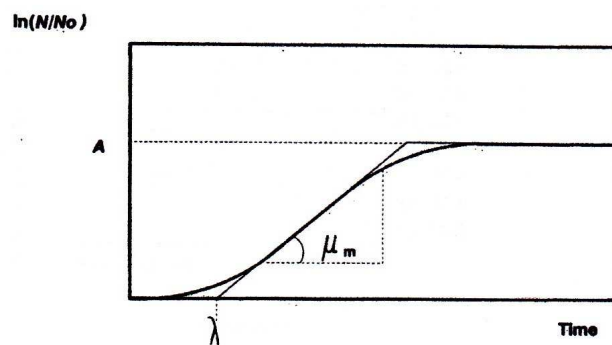
3 RŮSTOVÁ KŘIVKA BAKTERIÁLNÍ POPULACE

Růstová křivka je grafickým vyjádřením růstu bakterií v podmínkách statické kultivace a představuje funkční závislost logaritmu stoupající koncentrace buněk resp. počtu živých buněk na čas. Pro analýzu růstu bakteriální populace je základní situací růst čisté kultury v uzavřeném, uměle připraveném, nadbytek živin obsahujícím tekutém a homogenním prostředí. Křivka je charakteristická určitými úseky, které lze nazývat růstovými fázemi [82].

Obecně známé jsou následující fáze:

- *lag fáze* – adaptace na nové prostředí, buňky se nemnoží, naopak starší odumírají, vytvářejí se potřebné enzymy a buňky zvětšují svůj objem. Délku lag fáze ovlivňuje složení prostředí, zejména velikost a stáří inokula. Lag fáze je dána v podstatě třemi procesy: přestavbou klidové buňky v buňku exponenciálně rostoucí, adaptací buňky na nové prostředí (deprese a indukovaná syntéza enzymů, nahromadění intermediálních metabolitů apod.) a úpravou nového prostředí činností buněk. Všechny tři faktory se mohou samozřejmě kombinovat.
- *fáze zrychleného růstu* – kultura je plně přizpůsobena podmínkám prostředí, buňky se začínají množit s narůstající rychlostí dělení, zvyšuje se intenzita metabolismu, buňky mají zvýšenou citlivost na nepříznivé vlivy prostředí.
- *fáze logaritmická (exponenciální)* – intenzivní množení, počet roste geometrickou řadou, aktivní metabolismus a rychlé využívání substrátu, rychlost dělení je konstantní, úbytek buněk odumíráním je minimální.
- *fáze zpomaleného růstu* – postupné zbrzdění množení a celkového metabolismu, rychlost dělení se snižuje v důsledku vyčerpání živin a hromadění metabolitů.
- *fáze stacionární* – vyrovnává se počet odumírajících buněk s přírůstkem, nedostatek „biologického prostoru“. Fyziologie buněk nacházející se ve stacionární fázi díky vyčerpání limitující živiny je charakterizována nejprve nevyváženým růstem, pak přestavbou enzymového vybavení a posléze relativním metabolickým klidem.
- *fáze poklesu (zrychleného odumírání)* – nárůst úbytku buněk (převaha nad přírůstkem), rychlost dělení klesá pod nulovou hodnotu [82].

Většina matematických modelů popisujících růstové křivky nezahrnuje fázi odumírání bakteriální populace a popisuje pouze první fáze růstu. Fáze růstové křivky mohou být popsány třemi parametry: (i) maximální specifická růstová rychlost μ_m , která je definována jako tečna v inflexním bodě; (ii) doba lag fáze λ definována bodem, ve kterém tato tečna protíná osu x ; (iii) asymptota A , tedy maximální hodnota logaritmu relativní četnosti populace, které bylo dosaženo ($A = \ln [N/N_0]$, kde N_0 je počet buněk na počátku kultivace a N je maximální dosažený počet buněk) [83]. Růstová křivka s jednotlivými parametry je na Obrázku 9.



Obrázek 9: Růstová křivka bakterií [86]

Specifická růstová rychlost μ_m není v průběhu celého růstu konstantní. S klesající koncentrací živiny klesá. Ovšem pokles prakticky konstantní maximální hodnoty μ_{max} k hodnotě nulové je velmi rychlý. Proběhne během několika minut, takže je sotva pozorovatelný. Díky tomu přechází růstová křivka z exponenciální fáze do fáze stacionární ostře (během několika minut), ale nicméně plynule [82].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této práce bylo sledovat účinek vybraných vnějších faktorů (pH, NaCl, teplota) na růst bakterie *Serratia marcescens* a její produkci biogenních aminů, a to zejména kadaverinu a putrescinu. Pro naplnění tohoto hlavního cíle bylo třeba splnit několik dílčích cílů:

- Zpracovat literární rešerši týkající biogenních aminů a mikroorganismů, které je produkují se zaměřením na putrescin, kadaverin a *Serratia marcescens*
- Sledovat růst bakterie *Serratia marcescens* v různých prostředích (teplota 10, 20 a 37 °C, pH 6, 7 a 8, obsah NaCl 0, 1, 3, 4, 5 a 6 %)
- Sledovat produkci putrescinu a kadaverinu bakterií *Serratia marcescens* v různých prostředích (teplota 10, 20 a 37 °C, pH 6, 7 a 8, obsah NaCl 0, 1, 3, 4, 5 a 6 %)
- Získané výsledky modelovat pomocí Gompertzova modelu a získat tak růstové křivky a závislosti obsahu biogenních aminů na čase.

5 MATERIÁL A METODIKA

5.1 Použité chemikálie, přístroje a pomůcky

5.1.1 Přístroje a pomůcky

- Sterilátor H+P Varioklav 135S (H+P Labortechnik AG)
- Biologický termostat 30 °C, 37 °C (Laboratorní přístroje Praha)
- Centrifuga MIKRO 200 R (Hettich-Zentrifugen)
- pH tester Spear Eutech s pevnou vpichovou elektrodou (Eutech Instruments)
- Spektrofotometr Libra S6 s diodovým polem (Biochrom)
- Váhy Kern 440-47W (KERN & Sohn GmbH)
- Analytické váhy Adam AFA 210 LC (Schoeller instruments)
- Kapalinový chromatograf (LabAlliance / Agilent Technologies / MicroSolv Technologies)
- Automatické mikropipety (Biohit)
- Chladnička (Elektrolux)
- Vortex (Heidolph Reax)
- Temperační komora (Baumatic)
- Laboratorní sklo a plasty (špičky automatických pipet, mikrozkuhavky Eppendorf, 0,22 µm filtr)

5.1.2 Chemikálie

- Lyzin, arginin, ornitin, tryptamin (Sigma-Aldrich)
- Chlorid sodný (LachNer)
- 0,1 a 1 mol.l⁻¹ HCl (Lachema), 0,1 a 1 mol.l⁻¹ NaOH (Ing. Petr Lukeš)
- Sterilní fyziologický roztok (0,9% NaCl)
- 0,6 mol.l⁻¹ HClO₄
- Kyselina boritá (LachNer)
- CH₃COONa (Sigma-Aldrich)
- Acetonitril (Sigma-Aldrich)

5.2 Mikrobiologické analýzy

5.2.1 Kultivační média

Masopeptonový bujón (MPB)

Masový extrakt (HiMedia)	3,0 g
Pepton (HiMedia).....	5,0 g
NaCl (Lach-Ner).....	3,0 g
Destilovaná voda.....	1000 ml

Masopeptonový agar (MPA)

Beef extract (HiMedia)	3,0 g
Pepton (HiMedia)	5,0 g
Agar.....	15,0 g
NaCl (Lach-Ner)	5,0 g
Destilovaná voda	1000 ml

Dekarboxylázové médium (DM)

Pepton	14,3 g
Yeast extract.....	3,0 g
Arginin.....	2,0 g (c = 0,2 %)
Lyzin.....	2,0 g (c = 0,2 %)
Ornitin.2HCl.....	3,0 g (c = 0,2 %, přepočítáno na čistý ornitin)
Destilovaná voda.....	1000 ml

Složky všech médií byly naváženy a rozpuštěny v příslušném množství vody. Do základního MPB byly přidány aminokyseliny arginin, ornitin a lyzin v množství 0,2 % a dále různé koncentrace NaCl (viz dále). Následně byla média vysterilována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut a MPA byl rozlít na misky.

5.2.2 Kultivace bakterie

Bakterie *Serratia marcescens subsp. marcescens* CCM 303 byla nakultivována na pevném médiu a uchována v lednici. Pomnožení bakterie probíhalo v MPB v termostatu při 37 °C po dobu 20 hodin.

5.2.3 Optimalizace složení kultivačního média a časových intervalů odběrů

Bakterie *Serratia marcescens* byla pomnožena ve zkumavce se sterilním MPB a zkumavka byla umístěna na 24 hodin do termostatu při 37 °C.

Jako první varianta bylo připraveno DM a MPB, jejichž přesné složení je popsáno v kapitole 4.2.1. Následně bylo do obou médií přidáno vypočítané množství NaCl, a to v následujících koncentracích: 0 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 % a 6 %. Takto připravená média byla rozdělena do zkumavek a došlo k úpravě pH na 6, 7 a 8 (pomocí 0,1 mol.l⁻¹ případně 1 mol.l⁻¹ HCl a NaOH). Po sterilaci byly všechny zkumavky sterilně zaočkovány připravenou kulturou a umístěny na 24 hodin do termostatu při 37 °C. U všech zkumavek byla po kultivaci proměřena optická hustota (OD) na spektrofotometru s diodovým polem Libra S6 s programem pro měření optické hustoty buněk ($\lambda = 600 \text{ nm}$). Tato varianta sloužila k optimalizaci obsahu NaCl v médiu a též ke zjištění, zda budou podstatné rozdíly v růstu bakterie v obou médiích. Vzhledem k tomu, že bakterie rostla v obou médiích velmi podobně, byl pro další experiment zvolen MPB.

V další fázi byl připraven MPB s následujícími koncentracemi NaCl: 0 %, 1 %, 3 %, 4 %, 5 % a 6 %. Oproti předchozímu pokusu byly vypuštěny koncentrace 0,5 a 2 % NaCl, u kterých nebyly v předchozím pokusu zjištěny příliš výrazné rozdíly se sousedními koncentracemi. Opět došlo k úpravě hodnot pH na 6, 7 a 8 (pomocí 0,1 mol.l⁻¹, případně 1 mol.l⁻¹ HCl a NaOH). Takto připravené médium bylo kultivováno při teplotě 6 °C (lednice), 15 °C (temperační komora) a 37 °C (termostat). U zkumavek byla vždy odebrána jedna z každé kombinace NaCl x pH a v těchto zkumavkách bylo přeměřeno pH pomocí nakalibrovaného pH-metru Spear Eutech s pevnou vpichovou elektrodou (pro kontrolu správnosti úpravy pH před sterilací). Ostatní zkumavky byly sterilně zaočkovány připravenou kulturou z bujónu. Kultivace následně probíhala v lednici, temperační komoře, případně termostatu a v následujících časových intervalech byla měřena OD: 24h – 48h – 72h – 96h – 168h – 192h (pro 6 °C), 6h – 12h – 24h – 36h – 48h – 60h – 72h – 96h (pro 15 °C) a 1h – 2h – 3h – 4h – 5h – 6h – 8h – 10h – 24h (pro 37 °C). Tento pokus byl

proveden pro zjištění, jak dlouho *Serratia marcescens* při dané teplotě a kombinaci pH a NaCl roste. Vzhledem k tomu, že při 6 °C bakterie téměř nerostla, byly v dalších fázích pokusu použity teploty 10, 20 a 37 °C. Časové intervaly odběrů byly adekvátně upraveny (viz dále).

5.2.4 Stanovení růstové křivky bakterie

Růstová křivka byla sestrojena ze získaných hodnot optické hustoty a počtu kolonií. Optická hustota byla měřena dle postupu uvedeného v kapitole 4.2.3.

Z hlediska analytického byla zvolena metoda turbidimetrie, která je poměrně přesnou, nedestruktivní a jednoduchou metodou. Turbidimetrie je založena na měření procházejícího světla, které bylo zeslabeno rozptylem a částečně i jeho rozptylu na částicích. V našem měření jsou částice nahrazeny buňkami bakterií suspendovanými v tekutém kultivačním médiu. Ty jsou schopny absorpce záření o určité vlnové délce v opticky neaktivním prostředí. Daný efekt způsobují chromoforické skupiny obsažené v mikroorganizmech. Prošlé záření má díky těmto jevům nižší intenzitu než dopadající, které udává světelný zdroj [84,85].

S nárůstem buněčné hmoty dojde ke zvětšení zákalu, tudíž i k postupné změně intenzity prošlého záření. Pomocí této metody lze vysledovat růstové chování bakterií, protože se průběh optické hustoty během kultivace s časem mění [86].

Optická hustota se často využívá, neboť v mikrobiologii představuje jednoduchou metodu k určení koncentrace počtu buněk ve zředěné suspenzi. V jiném rozsahu platí přibližně lineární vztah mezi koncentrací buněk a optickou hustotou [87].

Počet buněk byl stanoven následujícím způsobem: bakterie byla pomnožena MPB a po sterilaci a vychladnutí byla média zaočkována kolonií *S. marcescens*. Kultivace probíhala jak v termostatu při 37 °C, tak v chladicím boxu při 20 °C a 10 °C. U vybraných variant bylo provedeno ředění $10^0 - 10^{-5}$ a ředění 10^{-3} , 10^{-4} a 10^{-5} byla sterilně rozhojekována po 100 µl na misky s MPA. Misky byly umístěny do termostatu na 20 hodin při teplotě 37 °C a poté byly spočítány vyrostlé kolonie.

5.3 Stanovení obsahu biogenních aminů

5.3.1 Příprava médií pro stanovení biogenních aminů

Bylo připraveno MPB s obsahem 0,2 % aminokyselin (lyzinu, argininu a ornitinu). Dále bylo přidáno NaCl v koncentracích 0 %, 1 %, 3 %, 4 %, 5 % a 6 %. Následně bylo upraveno pH na 6, 7 a 8 a byla provedena sterilace média. Celkem tak bylo získáno 18 různých kombinací MPB.

5.3.2 Kultivace bakterie a další operace před vlastním stanovením biogenních aminů

Jednotlivé kombinace MPB s různým pH a obsahem NaCl (viz kapitola 4.3.1) byly sterilně zaočkovány připravenou kulturou (viz kapitola 4.2.2). Kultivace probíhala jak v termostatu při 37 °C, tak v chladicím boxu při 20 °C a 10 °C. Časové intervaly odběrů pro jednotlivé teploty byly následující: 24h – 48h – 72h – 96h – 168h – 240h – 264h – 336h (pro 10 °C), 6h – 10h – 24h – 36h – 48h – 60h – 72h – 96h (pro 20 °C) a 1h – 2h – 3h – 4h – 6h – 8h – 10h – 24h (pro 37 °C). Celkem bylo očkováno 864 zkumavek (6 koncentrací NaCl, 3 pH, 3 teploty, 8 odběrových časů, 2 paralelní stanovení: $6 \times 3 \times 3 \times 8 \times 2 = 864$).

V jednotlivých časových intervalech byly provedeny vždy tři operace:

1. Z vybraných kombinací pH a obsahu NaCl byl proveden výsev naisky (viz kapitola 4.2.4).
2. Obsah zkumavek byl zředěn $0,6 \text{ mol.l}^{-1}$ HClO_4 , promíchán a byla změřena OD. Následně byl obsah zkumavek odstředěn (6000 ot/min, 10 minut). Supernatant byl dále zředěn do 2 ependorfových zkumavek borátovým pufrům ($0,4 \text{ mol.l}^{-1}$ kyselina boritá upravená pomocí NaOH na pH 9,5) v poměru 1:4.
3. Obsah ependorfových zkumavek byl odstředěn při 20000 g po dobu 30 minut, supernatant byl přefiltrován přes $0,22 \mu\text{m}$ filtr do vialek (předem vypláchnutých metanolem a vysušených). K 1 ml přefiltrovaného supernatantu bylo přidáno $10 \mu\text{l}$ tryptaminu jako vnitřního standardu. V případě potřeby byly vzorky doředy borátovým pufrům na příslušnou koncentraci.

Kromě toho bylo před vlastní kultivací změřeno pH u jedné sady zkumavek (z každé kombinace NaCl x pH), a to z důvodu kontroly správnosti úpravy pH.

5.3.3 Stanovení biogenních aminů pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie

Pro stanovení obsahu putrescinu a kadaverinu byl využit kapalinový chromatograf sestávající z autosampleru, binární pumpy (oba LabAlliance), degaseru, termostatu kolony a fluorescenčního detektoru (vše Agilent Technologies). Separace byla provedena na předkoloně Cogent HPSTM C18, 20 mm x 4 mm, 5 μ m a koloně s reverzní fází Cogent HPSTM C18, 150 mm x 4,6 mm, 5 μ m (obě MicroSolv Technologies). Nástřik na kolonu činil 5 μ l. Pro separaci byla využita gradientová eluce (eluční program viz Tabulka 4) mobilní fází 0,1 mol.l⁻¹ CH₃COONa s acetonitrilem při objemové průtokové rychlosti 0,6 ml.min⁻¹. Analýza probíhala při 30 °C. Signál byl snímán fluorescenčním detektorem při $\lambda_{EX} = 330$ nm a $\lambda_{EM} = 440$ nm.

Tabulka 4: Eluční program

Čas (min)	CH ₃ COONa (%)	Acetonitril (%)
0	70	30
13	70	30
20	50	50
43	0	100
46	0	100
50	70	30
55	70	30

5.4 Statistické vyhodnocení výsledků

Jak růstová křivka, tak obsah putrescinu a kadaverinu byl modelován pomocí Gompertzova modelu. Jednotlivé parametry modelu (A , μ_m , λ) byly odhadnuty pomocí nelineární regresní analýzy (Marquardt-Levenburgova metoda). Pro statistické vyhodnocení byl použit program Unistat® 5.5 a křivky byly sestrojeny v programu MS Excel.

Gompertzův model lze považovat za nejvhodnější matematický model pro popis a analýzu růstových dat. Pro výpočet růstových parametrů (μ_m , λ) z hodnot ležících v exponenciální fázi růstových křivek podle Gompertzova modelu lze použít nelineární regresní analýzu (za podmínek $\mu m > 0$ a pro $\lambda > 0$) (viz následující vztah):

$$y = A \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_m \cdot e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

kde:

μ_m maximální růstová rychlost [h^{-1}]

λ délka lag fáze [h]

A maximální hodnota logaritmu relativní četnosti populace, které bylo dosaženo

Pro hodnocení obsahu putrescinu a kadaverinu platí vztah následující:

$$y = A_{BA} \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_{BA} \cdot e}{A_{BA}} (\lambda_{BA} - t) + 1 \right] \right\}$$

kde:

μ_{BA} maximální rychlost produkce BA [$\text{mg.l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]

λ_{BA} délka lag fáze, tedy doba, než byla poprvé zaznamenána produkce BA [h]

A_{BA} maximální produkovaná koncentrace BA [mg.l^{-1}] [88].

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Růstová křivka bakterie *Serratia marcescens*

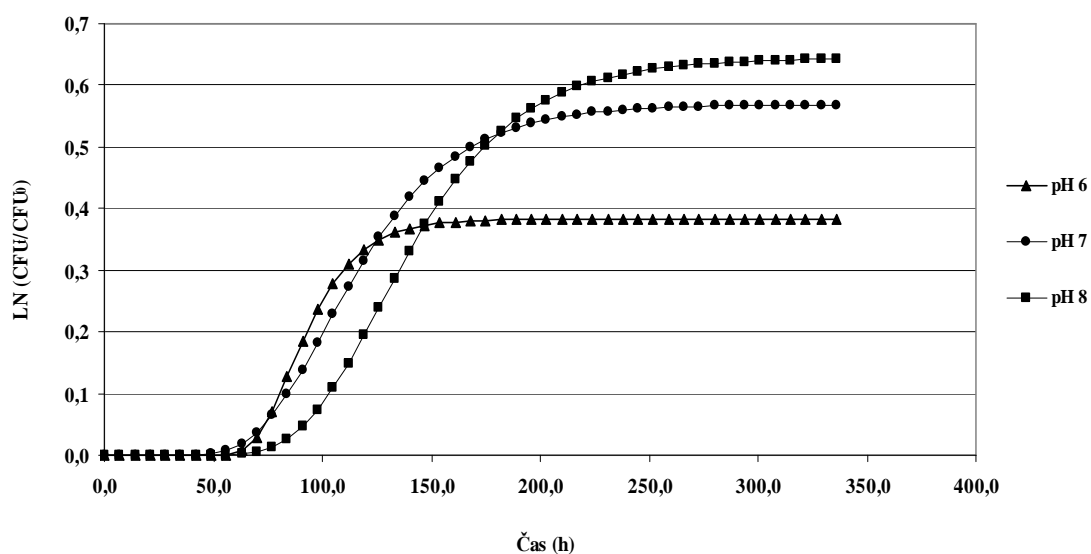
Sestrojení růstových křivek bakterie bylo založeno na hodnotách optické hustoty a počtu buněk, přičemž byl využit Gompertzův model (viz kapitola 5.4).

6.1.1 Růstová křivka při 10 °C

Růst bakterie se v médiích s různou hodnotou pH a koncentrací soli značně lišil. V průběhu lag fáze, kdy dochází k přizpůsobování se buněk novému prostředí, k přestavbě jejich enzymového aparátu a postupné utilizaci dostupných živin [82], byl nejmarkantnější rozdíl mezi hodnotami u pH 8, 6 % NaCl ($\lambda = 90,05$ h) a pH 6, 5 % NaCl ($\lambda = 22,87$ h). Dá se říct, že nejdelší lag fáze byla u všech koncentrací NaCl při pH 8. Hodnota λ v tomto pH se pohybovala od 35,81 h u 0 % NaCl, přes 74,84 h u 5 % NaCl, až k již zmiňovaným 90,05 h při 6 % NaCl (viz Obrázek 10; ostatní růstové křivky jsou součástí přílohy P I). Naopak nejkratší lag fáze byla pozorována při pH 6, 5 % NaCl, pH 6, 3 % NaCl a pH 6 a 7, 0 % NaCl. Se vzrůstajícím obsahem chloridu sodného v médiu většinou rostla i veličina λ , což lze říci taktéž o rostoucí hodnotě pH.

Maximální růstová rychlost byla při teplotě 10 °C dle očekávání poměrně nízká. Nejrychlejší nárůst mikroorganismu byl detekován v médiu s 1 % NaCl, pH 6 a 7 ($\mu_m = 0,07$ h⁻¹). Nejpomaleji bakterie rostla při pH 6, 7 a 8, koncentraci 6 % NaCl ($\mu_m = 0,01$ h⁻¹). Ve většině případů (s výjimkou 4 % NaCl) rostla bakterie rychleji při pH 6 a 7.

Největší nárůst počtu buněk byl zaznamenán v médiích s 0 % NaCl ($A = 6,65 - 8,39$). S rostoucí koncentrací NaCl hodnota A postupně klesala, přičemž mezi 6 % NaCl a 0 % NaCl byl rozdíl až 8 logaritmických řádů. Jednotlivé parametry Gompertzova modelu jsou znázorněny v Tabulce 5.



Obrázek 10: Růstová křivka při 10°C, koncentrace NaCl 6 %, pH 6, 7 a 8

Tabulka 5: Parametry Gompertzova modelu pro růstovou křivku při 10 °C

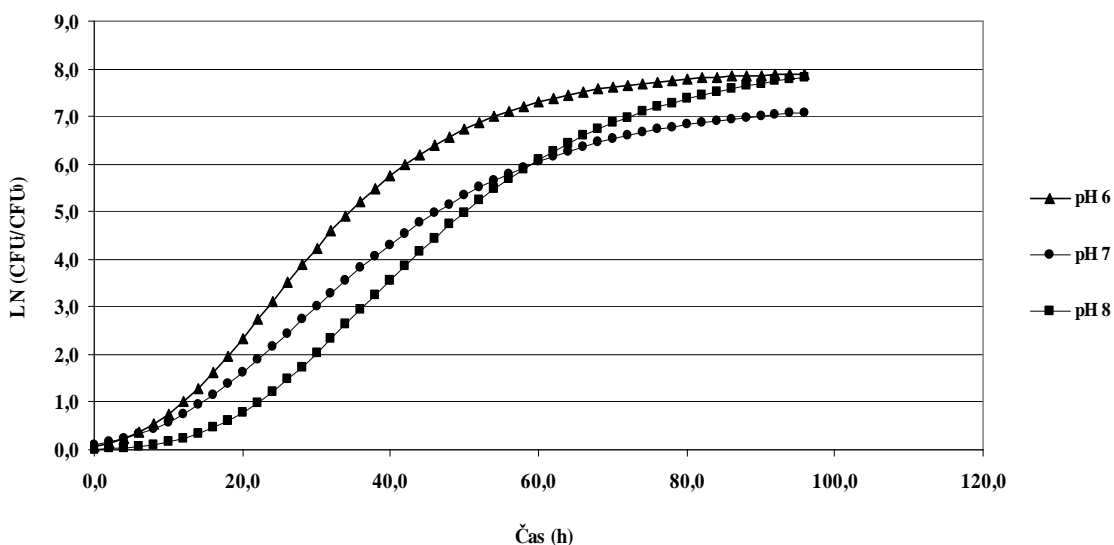
NaCl (%)	pH	A (-)	μ_m (h ⁻¹)	λ (h)
0	6	7,61	0,05	28,58
	7	6,65	0,06	25,23
	8	8,39	0,04	35,81
1	6	6,18	0,07	37,47
	7	7,50	0,07	36,10
	8	5,75	0,04	66,51
3	6	4,85	0,04	24,80
	7	4,20	0,05	48,17
	8	3,93	0,03	54,73
4	6	3,01	0,03	30,26
	7	3,43	0,05	36,01
	8	3,28	0,05	65,09
5	6	2,38	0,02	22,87
	7	2,12	0,02	60,21
	8	1,39	0,01	74,84
6	6	0,38	0,01	68,93
	7	0,57	0,01	69,96
	8	0,64	0,01	90,05

6.1.2 Růstová křivka při 20 °C

Délka lag fáze při 20 °C byla nejkratší v médiu s 0 % NaCl při pH 6 ($\lambda = 7,91$ h) a pH 7 ($\lambda = 8,53$ h). V ostatních případech se délka lag fáze pohybovala v rozmezí 10,75 h až 34,88 h. Nejdéle se bakterie přizpůsobovala prostředí v médiu s obsahem 6 % NaCl (pH 6 a 7) a 5 % NaCl (pH 7 a 8). Zatímco hodnota λ při pH 6 a 7 byla u jednotlivých koncentrací NaCl podobná, při pH 8 byl zaznamenán větší skok a nárůst délky lag fáze od nižších hodnot pH.

Nejvyšší maximální růstová rychlost byla zjištěna v médiích s obsahem 0 a 1 % NaCl ve všech hodnotách pH (viz Obrázek 11; ostatní růstové křivky jsou součástí přílohy P II). Maximální růstová rychlost v těchto médiích se pohybovala mezi $0,19 \text{ h}^{-1}$ až $0,12 \text{ h}^{-1}$. Vyšší růstová rychlost byla ještě zaznamenána u 3 a 4 % NaCl při pH 6 ($\mu_m = 0,13 \text{ h}^{-1}$). Nejpomaleji se bakterie rozmnožovala při koncentraci NaCl 6 % ($\mu_m = 0,02 - 0,05 \text{ h}^{-1}$) a u 5 % NaCl, pH 8 ($\mu_m = 0,05 \text{ h}^{-1}$). S výjimkou 0 % NaCl se bakterie rozmnožovala nejpomaleji při pH 8.

Největší nárůst počtu buněk byl detekován v médiu s nulovým obsahem NaCl ($A = 7,28 - 8,20$). S rostoucí koncentrací NaCl postupně hodnota A klesala, nejnižší byla u 6 % NaCl ($A = 0,86 - 1,68$). Markantní rozdíl téměř sedmi a půl logaritmických řádů byl zaznamenán u 6 % NaCl, pH 8 ($A = 0,86$) a 0 % NaCl, pH 8 ($A = 8,20$). Jednotlivé parametry Gompertzova modelu jsou znázorněny v Tabulce 6.



Obrázek 11: Růstová křivka při 20 °C, koncentrace NaCl 0 %, pH 6, 7 a 8

Tabulka 6: Parametry Gompertzova modelu pro růstovou křivku při 20 °C

NaCl (%)	pH	A (-)	μ_m (h ⁻¹)	λ (h)
0	6	7,96	0,19	7,91
	7	7,28	0,14	8,53
	8	8,20	0,16	17,10
1	6	7,96	0,18	12,88
	7	7,04	0,17	10,75
	8	5,70	0,12	18,36
3	6	5,98	0,13	14,80
	7	4,62	0,09	15,55
	8	4,66	0,08	19,69
4	6	3,63	0,13	23,32
	7	3,80	0,08	19,85
	8	3,91	0,08	24,18
5	6	3,31	0,11	18,38
	7	3,12	0,10	31,98
	8	1,71	0,05	34,88
6	6	1,68	0,05	25,39
	7	1,53	0,05	26,21
	8	0,86	0,02	31,46

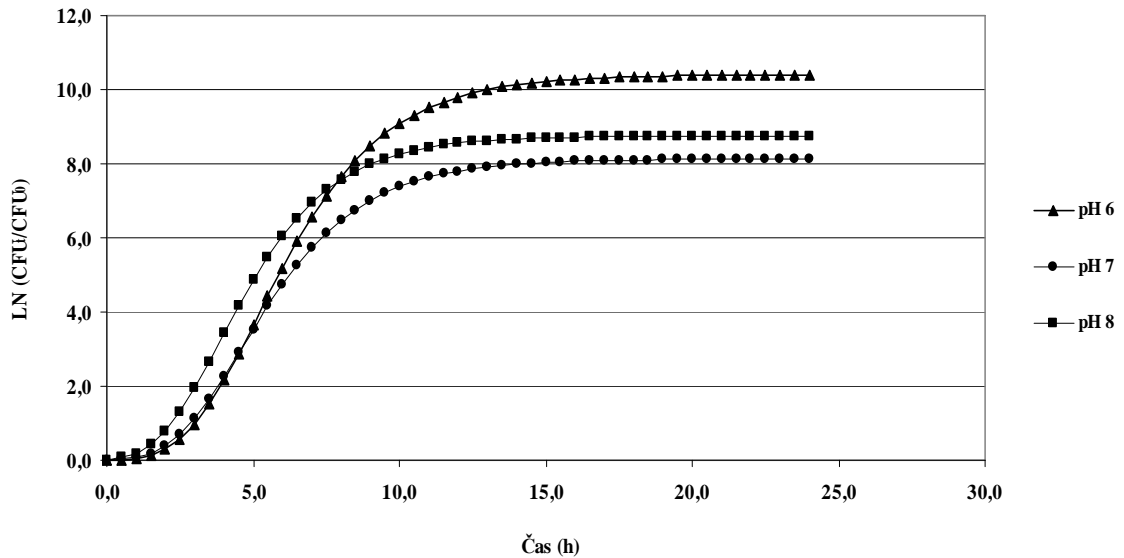
6.1.3 Růstová křivka při 37 °C

Průběh lag fáze byl ve všech médiích poměrně vyrovnaný. Hodnota λ se postupně zvyšovala od 0 % NaCl k 6 % NaCl. Podle očekávání byla lag fáze nejdelší při pH 8, 6 % NaCl ($\lambda = 5,81$ h) a nejkratší při stejném pH a 0 % NaCl ($\lambda = 1,73$ h). S výjimkou 0 a 1% koncentrace NaCl byla nejkratší lag fáze vždy při pH 7 (viz Obrázek 12; ostatní růstové křivky jsou součástí přílohy P III).

V exponenciální části růstové křivky, kde počet buněk roste geometrickou řadou, došlo při 37 °C k intenzivnímu množení a maximální růstová rychlost se pohybovala v rozmezí 0,41 – 1,74 h⁻¹. Nejrychleji bakterie rostla v médiu s 3 % NaCl a pH 7 ($\mu_m = 1,74$ h⁻¹) a dále v médiích s obsahem 0 a 1 % NaCl ($\mu_m = 1,29$ – 1,56 h⁻¹). Naopak nejpomalejší růst byl zaznamenán při 8 pH a koncentraci NaCl 6 % ($\mu_m = 0,41$ h⁻¹) a 5 % ($\mu_m = 0,42$ h⁻¹).

Co se týče poslední části křivky, tak hodnoty A se pohybovaly v rozmezí $A = 10,40$ u 0 % NaCl, pH 6 a $A = 0,80$ u 6 % NaCl, pH 8. Rozdíl mezi nimi tedy činí téměř 10 logaritmických řádů. Nejlépe se bakterie množila v médiu s nulovým obsahem NaCl,

s rostoucí koncentrací NaCl hodnota A postupně klesala. V případě všech koncentrací byl nejvyšší počet buněk v médiích s pH 6 nebo 7, při pH 8 rostla bakterie podstatně méně. Jednotlivé parametry Gompertzova modelu jsou znázorněny v Tabulce 7.



Obrázek 12: Růstová křivka při 37 °C, koncentrace NaCl 0 %, pH 6, 7 a 8

Tabulka 7: Parametry Gompertzova modelu pro růstovou křivku při 37 °C

NaCl (%)	pH	A (-)	μ_m (h ⁻¹)	λ (h)
0	6	10,40	1,56	2,66
	7	8,13	1,29	2,25
	8	8,74	1,51	1,73
1	6	8,23	1,54	2,67
	7	8,45	1,41	2,77
	8	6,39	1,56	2,86
3	6	5,03	0,90	3,13
	7	4,23	1,74	2,93
	8	4,19	1,16	4,11
4	6	3,86	1,30	4,71
	7	4,21	0,79	3,68
	8	3,21	1,14	4,12
5	6	3,47	1,30	5,38
	7	2,81	0,64	2,84
	8	2,40	0,42	4,52
6	6	1,91	0,61	4,99
	7	1,62	0,78	5,75
	8	0,80	0,41	5,81

6.1.4 Dílčí diskuze

Porovnáme-li získané hodnoty λ , μ_m a A u všech 3 teplot, získáme spoustu zajímavých a rozdílných výsledků.

První popisovaná část růstové křivky je lag fáze. Lag fáze je doba, kdy dochází k přestavbě klidové buňky v buňku exponenciálně rostoucí, adaptaci buňky na nové prostředí a úpravě nového prostředí činností buněk [82]. Nejdéle se bakterie přizpůsobovala novému prostředí při 10 °C, kde se hodnoty λ pohybovaly v rozmezí 22,87 – 90,05 h. V případě kultivace při teplotě 20 °C dosahovaly hodnoty λ 7,91 – 34,88 h a při teplotě 37 °C pak 1,73 – 5,81. Nejkratší lag fáze bylo většinou dosaženo v médiích s obsahem 0 % NaCl, nejdelší při 6 % NaCl. Teplota 37 °C a co nejnižší koncentrace NaCl se tedy jeví jako nejvíce vyhovující a potvrzuje se tvrzení, že optimální teplota růstu pro rod *Serratia* je 30 až 37 °C [55,58] a 0% až 4% koncentrace NaCl [89].

Maximální růstová rychlost se při 10 °C pohybovala v rozmezí 0,01 – 0,07 h⁻¹, při 20 °C v rozmezí 0,02 – 0,19 h⁻¹ a při 37 °C pak v rozmezí 0,41– 1,74 h⁻¹. Bakterie tedy rostla rychleji při vyšší teplotě, což opět potvrzuje údaje uváděné v literatuře [55,58]. Hodnota pH neměla na růstovou rychlost tak velký vliv, jako obsah NaCl.

Maximální množství buněk bylo vytvořeno při 37 °C, kdy se hodnoty A pohybovaly mezi 0,80 – 10,40. Při 20 °C byly tyto hodnoty 0,86 – 8,20 a při 10 °C pak pouze 0,38 – 8,39. Ve většině případů byly hodnoty A nejnižší při pH 8. Dostupná literatura uvádí [3,28,52], že optimální pH pro aktivitu bakterie *Serratia marcescens* je v rozmezí pH 4 – 5,5. Můžeme tedy říci, že takto vysoké pH (zejména pH 7 a 8) není pro bakterii vyhovující.

6.2 Stanovení obsahu biogenních aminů

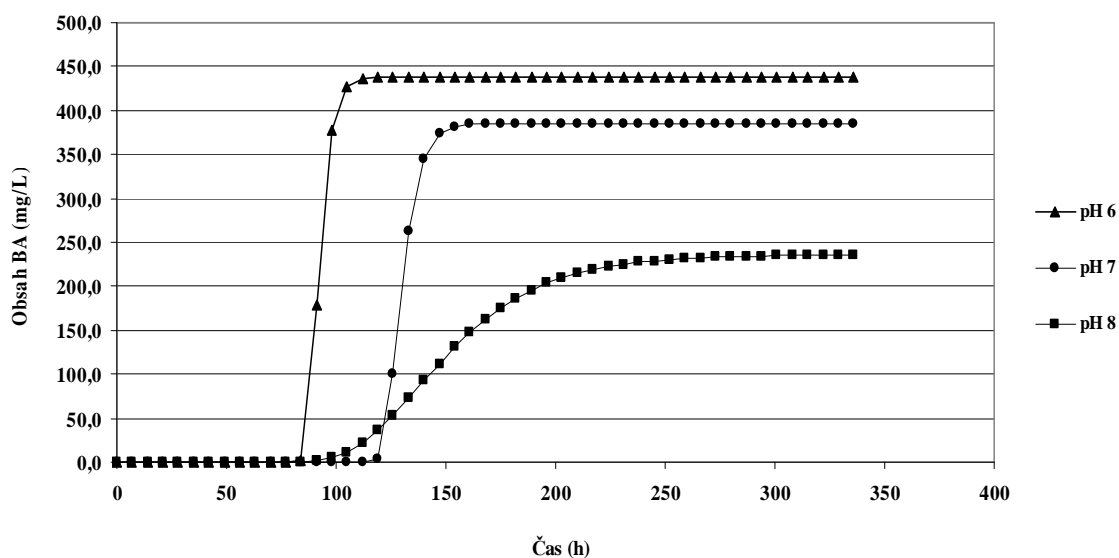
Dekarboxylázová aktivita bakterie *Serratia marcescens* byla testována za použití masopeptonového bujónu (MPB) s obsahem 0,2 % aminokyselin (lyzinu, argininu a ornitinu), přičemž byla sledována produkce kadaverinu a putrescinu.

Putrescin a kadaverin jsou nízkomolekulární polyaminy vyskytující se u všech organismů včetně živočichů, rostlin, hub a bakterií. U rostlin jsou lokalizovány zejména v cytoplazmě, ale také ve vakuolách, mitochondriích a chloroplastech [18].

6.2.1 Stanovení obsahu putrescinu

6.2.1.1 Produkce putrescinu při 10 °C

Bereme-li v úvahu lag fázi, tedy dobu, než byla poprvé zaznamenána produkce putrescinu, nelze říci, že prokazatelně nejvyšší či nejnižší hodnoty λ_{BA} byly vždy v určité koncentraci NaCl a určitém pH. Co se týká vlivu pH na délku lag fáze, tak u koncentrace NaCl 0 a 5 % byly získány velmi podobné hodnoty ($\lambda_{BA} = 60,7 - 65,8$ h pro 0 % NaCl a $76,8 - 80,9$ h pro 5 % NaCl). Pro koncentraci NaCl 1 a 3 % byl charakteristický nárůst hodnoty λ_{BA} s rostoucím pH ($\lambda_{BA} = 51,1 - 123,4$ h pro 1 % NaCl a $71,3 - 127,1$ h pro 3 % NaCl). V případě obsahu NaCl 4 a 6 % byl pozorován jiný trend (viz Obrázek 13; ostatní křivky jsou součástí přílohy P IV). Vliv množství soli v médiu na produkci putrescinu byl při této kultivační teplotě nejednoznačný. Zatímco u koncentrace 1, 3 a 6 % byla nejdelší lag fáze u pH 8, v případě ostatních koncentrací to bylo u pH 6 či 7.



Obrázek 13: Produkce putrescinu při 10 °C, koncentrace NaCl 4 %, pH 6, 7 a 8

Při hodnocení maximální rychlosti produkce putrescinu byly zjištěny následující výsledky. V případě koncentrace NaCl 0, 3, 4, 5 a 6 % došlo k poklesu hodnoty μ_{BA} vlivem rostoucího pH. Výjimkou byla v tomto ohledu pouze 1% koncentrace NaCl, kdy byla nejvyšší hodnota μ_{BA} zaznamenána u pH 7 ($224,7 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Nicméně i u této koncentrace byla nejnižší maximální produkce putrescinu zjištěna u pH 8 ($24,3 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Vezmeme-li

v úvahu vliv množství soli, pak u pH 6 došlo k poklesu maximální produkce putrescinu až od koncentrace 4 %. V případě pH 7 byl pokles μ_{BA} zaznamenán již od koncentrace 3 % a u pH 8 již od 1% koncentrace NaCl.

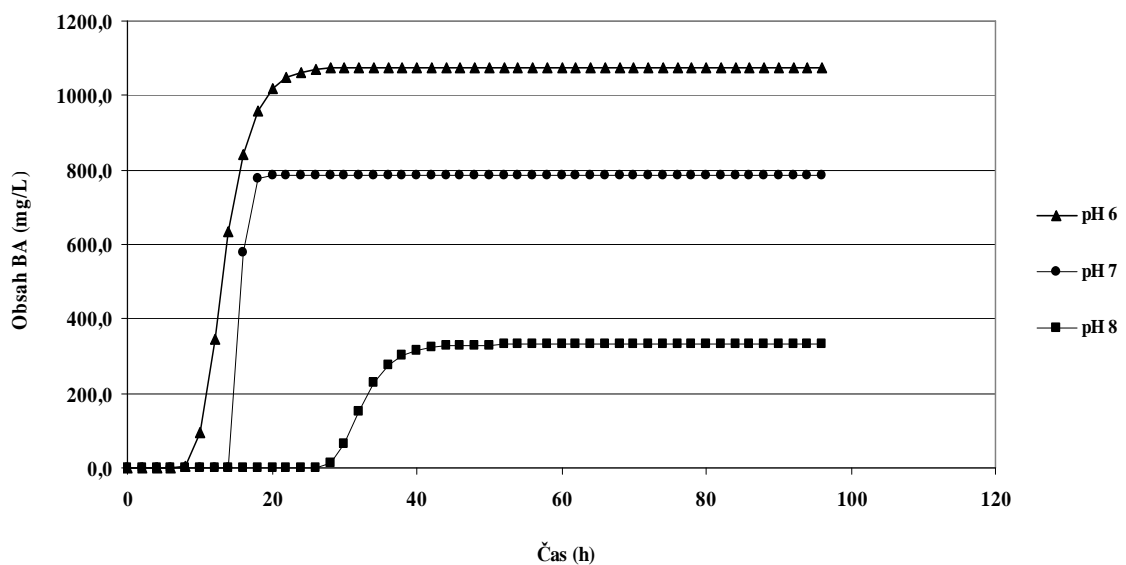
V poslední fázi růstu byla stanovena asymptota, která vyjadřuje maximální produkovanou koncentraci putrescinu. Nejvyšších hodnot A_{BA} bylo dosaženo v médiu s 0 % NaCl a 6 pH ($A_{BA} = 1336,0 \text{ mg.l}^{-1}$), s 1 % NaCl a 6 pH ($A_{BA} = 1415,3 \text{ mg.l}^{-1}$) i pH 7 ($A_{BA} = 1465,3 \text{ mg.l}^{-1}$) a též se 3 % NaCl a 6 pH ($A_{BA} = 2096,8 \text{ mg.l}^{-1}$). S výjimkou koncentrace NaCl 1 a 6 % způsobilo rostoucí pH pokles maximální produkované koncentrace putrescinu. Zatímco u těchto dvou koncentrací byla nejvyšší hodnota A_{BA} zjištěna u pH 7, u ostatních koncentrací NaCl to bylo u pH 6. V případě pH 6 hodnota A_{BA} rostla až do koncentrace NaCl 3 %, zatímco při vyšším obsahu soli došlo k poklesu maximální produkované koncentrace putrescinu. V médiu s pH 7 byl nárůst pozorován pouze do koncentrace 1 % NaCl, s dalším zvyšováním obsahu soli následoval pokles hodnoty A_{BA} . Konečně, v případě pH 8 hodnota A_{BA} s rostoucím množstvím NaCl postupně klesala. Jednotlivé parametry Gompertzova modelu jsou znázorněny v Tabulce 8.

Tabulka 8: Parametry Gompertzova modelu pro detekci putrescinu při 10 °C

NaCl (%)	pH	A_{BA} (mg.l ⁻¹)	μ_{BA} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	λ_{BA} (h)
0	6	1336,0	81,1	65,8
	7	818,3	74,2	60,7
	8	557,8	14,2	64,7
1	6	1415,3	85,6	51,1
	7	1465,3	224,7	80,3
	8	497,2	24,3	123,4
3	6	2096,8	76,1	71,3
	7	892,3	66,4	97,8
	8	437,8	21,8	127,1
4	6	438,8	41,2	86,7
	7	385,6	25,5	122,1
	8	235,6	2,9	108,0
5	6	55,6	2,8	80,9
	7	33,6	2,3	76,8
	8	9,3	1,7	79,0
6	6	1,8	1,4	104,8
	7	4,1	0,9	104,1
	8	2,5	0,7	127,3

6.2.1.2 Produkce putrescinu při 20 °C

Délka lag fáze rostla s rostoucím pH v případě 0, 1, 3 a 6 % NaCl (viz Obrázek 14; ostatní křivky jsou součástí přílohy PV). V médiích s obsahem soli 4 a 5 % tento trend pozorován nebyl. V případě pH 6 a 8 hodnoty λ_{BA} v závislosti na obsahu NaCl kolísaly, u pH 7 byl sledován nárůst délky lag fáze od 0 do 4 % NaCl. Délka lag fáze se ve všech médiích pohybovala v rozmezí cca 10 – 28 hodin. Nejdelší byla většinou v případě pH 8 (při 1 % NaCl 28,6 h, při 3 a 6 % 24 h, při 4 % 20,5 h). Nejkratší lag fáze pak byla pozorována v médiích s 0 % NaCl (všechna pH) a též s 1 % NaCl (pH 6).



Obrázek 14: Produkce putrescinu při 20 °C, koncentrace NaCl 1 %, pH 6, 7 a 8

Maximální rychlost produkce putrescinu v případě 3, 4 a 5 % NaCl se s rostoucím pH snižovala. U zbývajících obsahů soli (tj. 0, 1 a 6 %) byla nejvyšší hodnota μ_{BA} zaznamenána u pH 7 a nejnižší opět u pH 8. Rychlost produkce putrescinu u všech pH vzrostla pouze do 1 % NaCl v médiu. S dále se zvyšující koncentrací soli docházelo k poklesu hodnoty μ_{BA} . Nejrychlejší tvorba putrescinu byla pozorována u 0 a 1% koncentrace NaCl (pH 6 a 7) a též u 3% koncentrace NaCl (pH 6). Naopak nejnižší rychlost produkce byla sledována v případě vyšších obsahů soli (4 – 6 %) a vyšším pH (7 – 8).

Nejnižší maximální produkovaná koncentrace putrescinu byla zjištěna u 5 a 6 % NaCl (všechna pH – cca 1 – 46 mg.l⁻¹), zatímco nejvyšší hodnota A_{BA} byla detekována

u 0, 1 a 3 % NaCl (pH 6 a 7 – cca 550 – 1970 mg.l⁻¹). Maximální produkovaná koncentrace putrescinu u všech koncentrací NaCl vždy klesala se vzrůstajícím pH. Vliv NaCl na nejvyšší produkované množství putrescinu již nebylo tak jednoznačné. V případě pH 6 hodnota A_{BA} rostla do 3 % NaCl, u pH 7 pouze do 1 %. Při vyšších koncentracích již docházelo k poklesu A_{BA} . V médiích s pH 8 byl patrný téměř jednoznačný klesající trend hodnoty A_{BA} s rostoucím obsahem soli. Jednotlivé parametry Gompertzova modelu jsou znázorněny v Tabulce 9.

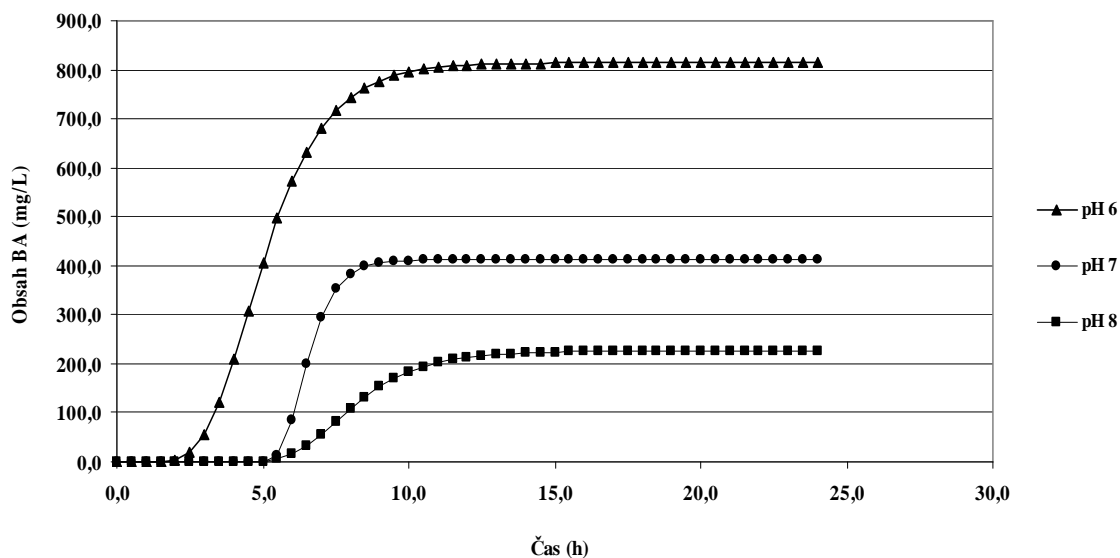
Tabulka 9: Parametry Gompertzova modelu pro detekci putrescinu při 20 °C

NaCl (%)	pH	A_{BA} (mg.l ⁻¹)	μ_{BA} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	λ_{BA} (h)
0	6	922,6	150,9	11,7
	7	729,0	201,7	12,7
	8	566,2	37,3	13,8
1	6	1075,9	151,0	9,7
	7	786,5	454,9	14,6
	8	330,5	44,7	28,6
3	6	1968,9	127,1	13,6
	7	556,0	99,1	19,9
	8	368,7	35,2	24,0
4	6	404,4	78,3	19,3
	7	255,3	35,2	21,8
	8	108,0	4,0	20,5
5	6	46,4	4,4	16,2
	7	31,7	3,9	15,7
	8	6,4	3,7	14,5
6	6	15,5	2,8	19,8
	7	12,7	3,3	21,2
	8	1,1	1,2	24,0

6.2.1.3 Produkce putrescinu při 37 °C

Délka lag fáze byla ve všech médiích u této kultivační teploty poměrně krátká, pohybovala se pouze v rozmezí 2,6 – 6,0 hodin. Nejdříve byl putrescin produkován v médiu s 0 % NaCl ($\lambda_{BA} = 2,6 - 3$ h), s 1 % NaCl, pH 6 a 7 (2,9 – 3,7 h) a se 3 % NaCl, pH 6 (3 h). Naopak nejdelší lag fáze byly zaznamenány v případě vyšších koncentrací NaCl

(4, 5 a 6 %) a též v médiu s obsahem NaCl 3 % a pH 7 a 8 (viz Obrázek 15; ostatní křivky jsou součástí přílohy PVI). Vliv pH na délku lag fáze byl poměrně malý a nejednoznačný. Zatímco při pH 6 rostly hodnoty λ_{BA} až do koncentrace NaCl 4 %, v případě pH 7 a 8 pouze do koncentrace 3 %. Vyšší množství soli již takový vliv neměly.



Obrázek 15: Produkce putrescinu při 37 °C, koncentrace NaCl 3 %, pH 6, 7 a 8

Nejvyšší maximální rychlost produkce putrescinu byla zaznamenána v médiích s pH 7 a obsahem soli 1 % ($652,4 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$), 0 % ($346,6 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) a 3 % ($237,1 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Naopak nejnižších hodnot μ_{BA} bylo dosaženo v případě koncentrace NaCl 5 a 6 % (pouze $1,6 - 6,2 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$). S výjimkou koncentrace 5 % byla nejnižší hodnota μ_{BA} zjištěna vždy při pH 8. Při pH 6 a 7 byla maximální rychlost produkce putrescinu (zejména v médiu s 0 – 4 % soli) výrazně vyšší. Vliv množství NaCl na maximální rychlost produkce tohoto biogenního aminu nebyl úplně jednoznačný, lze ovšem konstatovat, že nejvyšší koncentrace (tedy 5 a 6 %) rychlost produkce výrazně inhibovaly.

Vliv pH na maximální produkované množství putrescinu je patrný na první pohled – u všech koncentrací NaCl došlo k poklesu hodnoty A_{BA} s rostoucím pH. Vliv obsahu NaCl tak jednoznačný nebyl, nicméně lze shrnout, že v médiích s pH 6 (resp. 7) byl pozorován nárůst hodnoty A_{BA} do 3 % (resp. 1 %) NaCl, s dalším zvyšováním obsahu soli následoval pokles produkovaného množství putrescinu. V případě pH 8 hodnoty A_{BA} do 3% obsahu NaCl kolísaly, při vyšších koncentracích soli opět klesaly. Nejvíce byl putrescin

produkován v médiu pH 6 a obsahem NaCl 3 % (814 mg.l⁻¹), 1 % (709,0 mg.l⁻¹) a 0 % (609,9 mg.l⁻¹). Naopak nejméně byl tento BA tvořen při vysokých koncentracích NaCl – 5 % (10,7 – 41,2 mg.l⁻¹) a zejména 6 % (1,4 – 8,8 mg.l⁻¹). Jednotlivé parametry Gompertzova modelu jsou znázorněny v Tabulce 10.

Tabulka 10: Parametry Gompertzova modelu pro detekci putrescinu při 37 °C

NaCl (%)	pH	A_{BA} (mg.l ⁻¹)	μ_{BA} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	λ_{BA} (h)
0	6	609,9	159,1	2,8
	7	523,6	346,6	3,0
	8	360,6	62,4	2,6
1	6	709,0	251,4	2,9
	7	659,7	652,4	3,7
	8	103,3	79,7	5,5
3	6	814,2	201,2	3,0
	7	411,7	237,1	5,7
	8	225,8	53,0	6,0
4	6	285,3	151,0	5,7
	7	202,7	62,5	5,5
	8	62,9	5,4	5,2
5	6	41,2	5,4	4,3
	7	21,4	5,0	4,1
	8	10,7	5,1	3,6
6	6	8,8	6,2	5,8
	7	5,8	5,0	5,2
	8	1,4	1,6	5,8

6.2.1.4 Dílčí diskuze

Zaměříme-li se na dekarboxylázovou aktivitu bakterie *Serratia marcescens*, resp. na její produkci putrescinu, pak z dostupné literatury vyplývají následující skutečnosti: optimální pH pro aktivitu dekarboxyláz, a tedy i pro produkci BA, je spíše v kyselé oblasti (pH 4 – 5,5) [3]. Obsah NaCl ovlivňuje produkci BA různě při různých teplotách – zatímco např. při 25 °C byla již při 0,5 % NaCl v médiu pozorována inhibice tvorby BA, při 30 °C byly BA tvořeny i v případě 2% koncentraci soli. Vyšší koncentrace soli již působí na produkci BA inhibičně [52,90,91]. Rostoucí teplota má na tvorbu biogenních aminů jednoznačně pozitivní vliv, při 10 °C k produkci BA prakticky nedochází, při 20 °C produkce vzrůstá a při 37 °C je nejvyšší [92,93].

Co se týká délky lag fáze, tedy doby, než byla poprvé zaznamenána produkce putrescinu [82], tak její délka samozřejmě souvisí s délkou lag fáze týkající se bakteriálního růstu. Podobně jako v případě růstové křivky, byla lag fáze nejdelší při 10 °C (cca 50 – 130 h) a nejkratší při 37 °C (cca 2,5 – 6 h). pH hodnotu λ_{BA} nijak výrazně neovlivnilo v médiích kultivovaných při 10 a 37 °C; při 20 °C byl ve většině případů pozorován rostoucí trend délky lag fáze s rostoucím pH. Jednoznačně pozitivní či negativní vliv koncentrace NaCl na délku lag fáze taktéž potvrzen nebyl. Hodnoty λ_{BA} buď kolísaly, nebo rostly až do obsahu soli 3 či 4 %.

Maximální rychlost produkce putrescinu s rostoucí teplotou jednoznačně vzrůstala, což koresponduje i s rychlostí růstu bakterie. Při 10 °C se maximální rychlost produkce pohybovala pouze v rozmezí 0,7 – 224,7 mg.l⁻¹.h⁻¹, při 20 °C to bylo 1,2 – 454 mg.l⁻¹.h⁻¹ a při 37 °C 1,6 – 652,4 mg.l⁻¹.h⁻¹. pH 8 u všech tří teplot výrazně snižovalo hodnotu μ_{BA} , maximální rychlost produkce putrescinu byla vždy vyšší při pH 6 nebo 7. Vysoké koncentrace (5 a 6 %) soli v médiu taktéž hodnotu μ_{BA} snižovaly, a to v případě všech tří teplot. Navíc, při teplotě 20 °C maximální rychlost produkce klesala již od koncentrace NaCl 1 %. V médiích kultivovaných při 10 °C pokles začal od 1, 3 či 4 % NaCl v závislosti na pH.

Konečně, nejvyšší maximální produkovaná koncentrace putrescinu byla v případě 0 – 4 % NaCl pozorovány vždy při 10 °C (cca 2,5 – 2097 mg.l⁻¹) a nejnižší pak při 37 °C (1,4 – 814 mg.l⁻¹). Při vyšších koncentracích NaCl hodnoty A_{BA} v rámci jednotlivých teplot kolísaly. Téměř ve všech případech docházelo s rostoucím pH ke snížení maximální

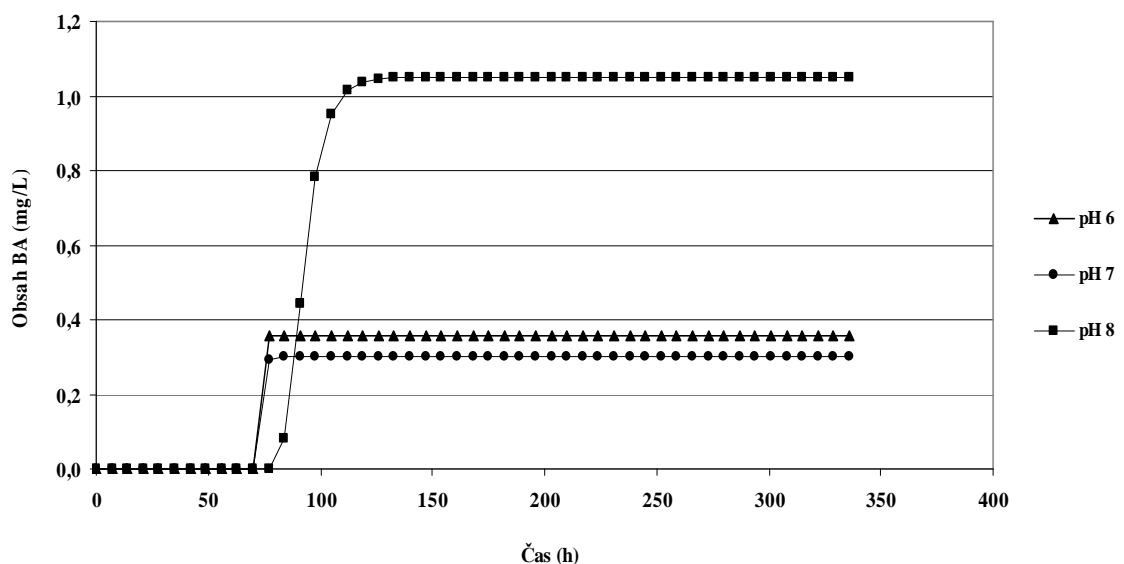
produkce putrescinu. Také vliv množství NaCl byl u všech teplot téměř shodný – při pH 6 hodnoty rostly až do obsahu soli 3 % a následně od koncentrace 4 % klesaly, při pH 7 klesaly již od 3 % a při pH 8 byl s rostoucím obsahem soli pozorován klesající trend.

Můžeme shrnout, že zatímco v případě λ_{BA} a μ_{BA} získané výsledky korespondují s výše uvedenými literárními údaji, v případě hodnoty A_{BA} byly získány výsledky odlišné (podrobnější diskuze viz kapitola 6.3).

6.2.2 Stanovení produkce kadaverinu

6.2.2.1 Produkce kadaverinu při 10 °C

Při hodnocení lag fáze lze říci, že vliv množství soli v médiu na produkci kadaverinu byl při této kultivační teplotě nejednoznačný. V případě 3 a 6 % NaCl délka lag fáze rostla s rostoucím pH. V médiích s ostatními koncentracemi soli tento trend pozorován nebyl, hodnoty λ_{BA} víceméně kolísaly. Rostoucí koncentrace NaCl v naprosté většině případů způsobila prodloužení lag fáze. Zatímco nejkratší lag fáze byly zaznamenány v médiích s 0 % NaCl (30,4 – 37 h), nejdelší v médiích s 5 a 6 % soli (až 83, 6 h). (viz Obrázek 16; ostatní křivky jsou součástí přílohy PVII).



Obrázek 16: Produkce kadaverinu při 10 °C, koncentrace NaCl 6 %, pH 6, 7 a 8

Maximální rychlost produkce kadaverinu se v případě 3, 4, 5 a 6 % NaCl s rostoucím pH snižovala. Pouze u koncentrací 5 a 6 % zůstaly hodnoty v případě pH 7 a 8 stejně velké ($0,2 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$, resp. $0,1 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$). U zbývajících obsahů soli (0 a 1 %) byla nejvyšší hodnota μ_{BA} zjištěna u pH 7 a nejnižší opět u pH 8. Můžeme tedy shrnout, že pH 8 maximální rychlost produkce kadaverinu podstatně snižovalo, maximální rychlost produkce se při tomto pH pohybovala pouze v rozmezí $0,1 - 3,7 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Rychlost produkce kadaverinu rostla pouze do koncentrace NaCl 1 % (v případě pH 7 a 8), resp. 3 % (v případě pH 6). S dále se zvyšující koncentrací soli hodnota μ_{BA} klesala. Nejnižší rychlost produkce byla sledována v případě obsahu soli 5 a 6 % ($0,1 - 0,4 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Naproti tomu nejrychlejší tvorba kadaverinu byla pozorována v médiu s 0 a 1 % NaCl při pH 7 ($16,9$ a $20,5 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

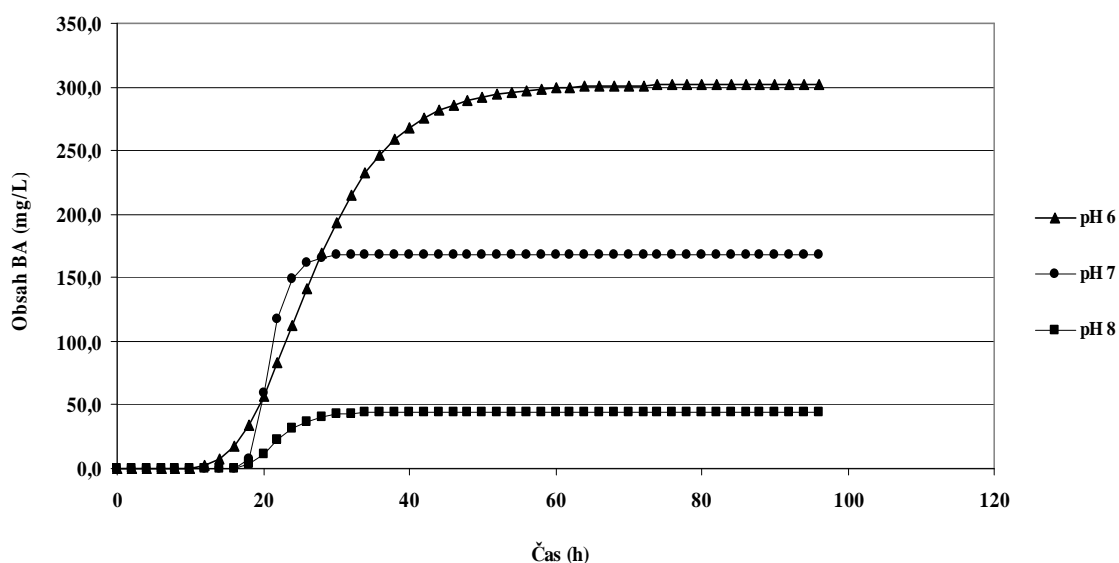
Poslední fáze růstu byla stanovena asymptotou, která vyjadřuje maximální produkovanou koncentraci kadaverinu. Nejvyšších hodnot A_{BA} bylo dosaženo v médiu s 0, 1, 3 a 5 % NaCl v případě pH 6 a se vzrůstajícím pH hodnota A_{BA} klesala. Výjimkou byla v tomto ohledu pouze koncentrace 4 % NaCl, kdy byla nejvyšší hodnota A_{BA} zaznamenána u pH 7, a koncentrace 6 % NaCl, kdy byla maximální produkce kadaverinu zjištěna paradoxně u pH 8. S výjimkou nejvyšší koncentrace soli byla nejnižší produkce kadaverinu pozorována vždy u pH 8. Vliv obsahu NaCl byl různý u odlišných pH. Zatímco u pH 6 a 7 se produkce kadaverinu zvyšovala do koncentrace NaCl 1, resp. 3 %, v případě nejvyššího pH 8 docházelo s rostoucí koncentrací soli k postupnému snižování maximální produkované koncentrace kadaverinu. Nejvyšší hodnota maximální produkované koncentrace kadaverinu byla zaznamenána v případě 3% koncentrace soli při pH 6 ($343,3 \text{ mg.l}^{-1}$), naopak nejnižší u koncentrace 6 % ($0,3 - 1 \text{ mg.l}^{-1}$). Jednotlivé parametry Gompertzova modelu jsou znázorněny v Tabulce 11.

Tabulka 11: Parametry Gompertzova modelu pro detekci kadaverinu při 10 °C

NaCl (%)	pH	A_{BA} (mg.l ⁻¹)	μ_{BA} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	λ_{BA} (h)
0	6	260,0	6,3	37,0
	7	110,8	16,9	30,4
	8	74,1	2,6	34,1
1	6	297,5	9,7	44,1
	7	268,9	20,5	50,9
	8	61,4	3,7	38,1
3	6	343,3	10,8	46,0
	7	120,0	7,5	55,5
	8	40,5	2,4	64,7
4	6	31,6	3,8	74,1
	7	45,9	2,8	61,2
	8	13,8	0,8	61,4
5	6	7,9	0,4	76,1
	7	5,0	0,2	56,7
	8	1,8	0,2	82,5
6	6	0,4	0,2	70,5
	7	0,3	0,1	71,3
	8	1,0	0,1	83,6

6.2.2.2 Produkce kadaverinu při 20 °C

Vezmeme-li v úvahu hodnoty zjištěné při lag fázi nelze říci, že prokazatelně nejvyšší či nejnižší hodnoty λ_{BA} byly vždy v určité koncentraci NaCl a určitém pH. Nejdříve byl kadaverin produkován v médiu s 0 % NaCl ($\lambda_{BA} = 12,3 - 13,9$ h), s rostoucí koncentrací soli se délka lag fáze téměř ve všech případech zvyšovala. Nejpozději byl kadaverin zjištěn v případě koncentrace NaCl 4 % ($\lambda_{BA} = 33,4$ h při pH 6) a 6 % ($\lambda_{BA} = 34,0$ h při pH 8). Nejdelší lag fáze byly zaznamenány v případě 3, 5 a 6 % NaCl při pH 8, v médiu s obsahem 0 a 1 % NaCl (viz Obrázek 17; ostatní křivky jsou součástí přílohy PVIII) u pH 7 a v médiu s obsahem NaCl 4 % při pH 6. Vliv pH na délku lag fáze byl poměrně malý a nejednoznačný, hodnoty λ_{BA} víceméně kolísaly.



Obrázek 17: Produkce kadaverinu při 20 °C, koncentrace NaCl 1 %, pH 6, 7 a 8

Nejvyšší maximální rychlost produkce kadaverinu byla zjištěna v médiích s pH 7 a obsahem soli 0 % ($25,4 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) a 1 % ($33,1 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Naopak nejnižší hodnoty μ_{BA} byly zaznamenány v případě koncentrací 5 a 6 % (pouze $0,1 - 0,5 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Vždy při pH 8 u každé koncentrace soli byla zjištěna nejnižší hodnota μ_{BA} . Nejvyšší maximální rychlosti produkce kadaverinu byly zaznamenány u pH 7 (v případě 0, 1 a 3 % NaCl), resp. pH 6 (v případě 4, 5 a 6 % NaCl). Maximální rychlost produkce se od 1% koncentrace soli v médiu ve všech případech snižovala a lze tedy konstatovat, že vyšší koncentrace soli (zejména nad 4 %) rychlost produkce kadaverinu výrazně inhibovaly.

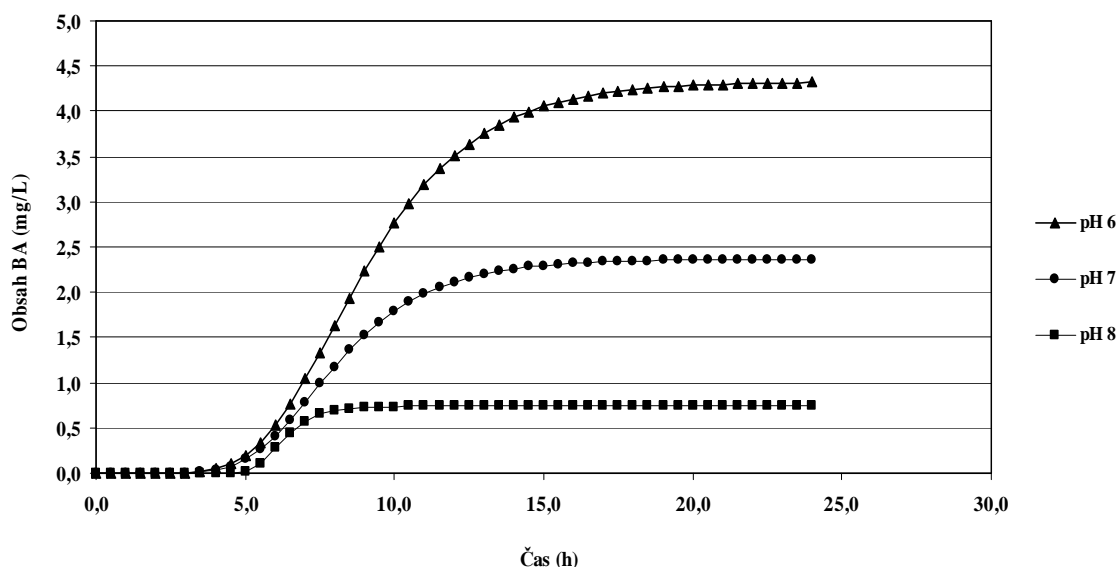
Při hodnocení asymptoty, vyjadřující maximální produkovanou koncentraci kadaverinu byly zjištěny následující výsledky. U všech koncentrací NaCl došlo k poklesu hodnoty A_{BA} s rostoucím pH. Nejvíce byl kadaverin produkován v médiu s obsahem NaCl 0, 1 a 3 % a pH 6 a 7 ($89 - 301,8 \text{ mg.l}^{-1}$). Naopak nejnižší množství kadaverinu obsahovala média s 5 a 6 % NaCl ($0,5 - 7,2 \text{ mg.l}^{-1}$). V médiích s pH 6 došlo k růstu hodnoty A_{BA} do koncentrace 3 %, s dalším zvyšováním obsahu soli následoval pokles produkovaného množství kadaverinu. V médiu s pH 7 byl nárůst pozorován pouze do koncentrace 1 % NaCl a v případě 8 pH hodnota A_{BA} s rostoucím množstvím soli postupně klesala. Jednotlivé parametry Gompertzova modelu jsou znázorněny v Tabulce 12.

Tabulka 12: Parametry Gompertzova modelu pro detekci kadaverinu při 20 °C

NaCl (%)	pH	A_{BA} (mg.l ⁻¹)	μ_{BA} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	λ_{BA} (h)
0	6	161,2	11,3	12,8
	7	89,0	25,4	13,9
	8	68,9	3,7	12,3
1	6	301,8	14,7	16,3
	7	168,5	33,1	18,2
	8	44,6	5,4	17,8
3	6	174,3	9,6	14,9
	7	105,2	12,3	23,9
	8	37,1	3,2	25,1
4	6	26,5	5,8	33,4
	7	21,3	4,0	25,7
	8	11,7	0,3	22,8
5	6	7,2	0,5	25,7
	7	4,2	0,3	23,4
	8	1,2	0,3	26,7
6	6	1,9	0,3	26,8
	7	1,3	0,2	24,5
	8	0,5	0,1	34,0

6.2.2.3 Produkce kadaverinu při 37 °C

Doba lag fáze byla u této kultivační teploty ve všech médiích poměrně krátká. Získané hodnoty λ_{BA} se pohybovaly v rozmezí 2,6 – 6,2 h. Kadaverin byl nejdříve produkován v médiu s 0 % NaCl ($\lambda_{BA} = 2,6 - 2,7$ h), s 1 % NaCl ($\lambda_{BA} = 2,8 - 3,7$ h) a se 3 % NaCl při pH 6 (2,9 h). Naproti tomu nejdelší lag fáze byly zjištěny v médiích s vyšší koncentrací soli (4, 5 a 6 %; $\lambda_{BA} = 4,5 - 6,2$ h; viz Obrázek 18; ostatní křivky jsou součástí přílohy PIX). Zatímco hodnoty λ_{BA} při pH 6 a 7 rostly do koncentrace 4 % NaCl, v případě pH 8 tomu tak bylo až do koncentrace 6 %. Vliv pH na délku lag fáze byl poměrně malý a nejednoznačný.



Obrázek 18: Produkce kadaverinu při 37 °C, koncentrace NaCl 5 %, pH 6, 7 a 8

Maximální rychlost produkce kadaverinu byla nejvyšší v médiích o koncentraci soli 0, 1 a 3 % při pH 6 a 7 ($14,5 - 48,7 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Naopak nejnižších hodnot μ_{BA} bylo dosaženo v případě koncentrace NaCl 5 a 6 % ($0,2 - 0,6 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Nejnižší hodnota μ_{BA} byla zjištěna vždy při pH 8. Při pH 6 a 7 byla maximální rychlost produkce kadaverinu výrazně vyšší, a to zejména v médiu s 0 – 4 % NaCl. Vliv NaCl na maximální rychlost produkce tohoto biogenního aminu nebyl úplně jednoznačný, avšak lze říci, že docházelo k inhibici rychlosti produkce kadaverinu ve vyšších koncentracích soli (tj. 5 a 6 %).

Na maximální produkovanou koncentraci kadaverinu má vliv pH i koncentrace NaCl. S rostoucím pH a koncentrací soli docházelo až na výjimky k postupnému poklesu hodnoty A_{BA} . Nejvíce byl kadaverin produkován v médiích s pH 6 a obsahem NaCl 0 % ($150,3 \text{ mg.l}^{-1}$), 1 % ($139,0 \text{ mg.l}^{-1}$) a 3 % ($124,8 \text{ mg.l}^{-1}$). Naopak nejméně byl tento biogenní amin tvořen při vysokých koncentracích soli zejména v případě 5 % ($4,3 - 0,7 \text{ mg.l}^{-1}$) a 6 % ($1,6 - 0,3 \text{ mg.l}^{-1}$). Jednotlivé parametry Gompertzova modelu jsou znázorněny v Tabulce 13.

Tabulka 13: Parametry Gompertzova modelu pro detekci kadaverinu při 37 °C

NaCl (%)	pH	A_{BA} (mg.l ⁻¹)	μ_{BA} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)	λ_{BA} (h)
0	6	150,3	15,1	2,7
	7	69,8	29,6	2,7
	8	44,2	4,9	2,6
1	6	139,0	20,5	2,8
	7	92,6	48,7	3,6
	8	16,0	7,2	3,7
3	6	124,8	14,5	2,9
	7	66,7	17,9	4,6
	8	29,0	4,2	4,4
4	6	20,2	13,3	5,9
	7	31,8	5,0	5,2
	8	28,2	0,5	4,5
5	6	4,3	0,6	5,3
	7	2,4	0,4	5,0
	8	0,7	0,4	5,3
6	6	1,6	0,6	5,6
	7	1,0	0,4	5,0
	8	0,3	0,2	6,2

6.2.2.4 Dílčí diskuze

Bereme-li v úvahu lag fázi, tedy dobu než byl poprvé zaznamenán kadaverin [82], tak je zřejmé, že její délka bezpochyby souvisí s délkou lag fáze týkající se bakteriálního růstu. Stejně tak jako u růstové křivky byla lag fáze nejdelší při teplotě 10 °C (30,4 – 83,6 h) a nejkratší v případě 37 °C (2,6 – 6,2 h). Hodnotu λ_{BA} nijak výrazně neovlivňovalo pH média, a to v případě všech kultivačních teplot. Vliv obsahu NaCl byl jednoznačný pouze v případě kultivační teploty 37 °C a pH 8, kdy byl pozorován rostoucí trend délky lag fáze s rostoucí koncentrací NaCl. V ostatních případech hodnoty λ_{BA} kolísaly, případně rostly až do 3 či 4 % NaCl.

Při hodnocení maximální rychlosti produkce kadaverinu je zřejmé, že rostla s vzrůstající teplotou, což je ve shodě i s rychlostí růstu bakterie. V případě 10 °C se maximální rychlost produkce kadaverinu pohybovala pouze v rozmezí 0,1 – 20,5 mg.l⁻¹.h⁻¹, při 20 °C byly hodnoty μ_{BA} zjištěny v rozmezí 0,1 – 33,1 mg.l⁻¹.h⁻¹ a při 37 °C to bylo

0,2 – 48,7 mg.l⁻¹.h⁻¹. U všech tří teplot došlo k výraznému snížení hodnoty μ_{BA} při pH 8. V případě pH 6 a 7 byla maximální rychlost produkce kadaverinu vždy vyšší a v médiích s vyšší koncentrací (tj. 5 a 6 %) soli v ojedinělých případech stejná. Vyšší koncentrace NaCl v médiu u všech tří teplot rovněž snižovaly hodnotu μ_{BA} . V závislosti na pH začal pokles vždy nejpozději od 3 % NaCl.

V poslední fázi růstu byla stanovena asymptota, která vyjadřuje maximální produkovanou koncentraci kadaverinu. V případě 0, 1, 3 a 5% koncentrace soli v médiu byla nejvyšší hodnota A_{BA} zaznamenána při 10 °C a s rostoucí teplotou docházelo ke snížení této hodnoty. U 4 a 6 % NaCl v médiu se maximální produkce kadaverinu vyvíjela u jednotlivých teplot různě v závislosti na pH. Maximální produkce kadaverinu se snižovala s rostoucím pH téměř ve všech případech. Nejnižších hodnot A_{BA} bylo dosaženo vždy při pH 8. Vliv NaCl byl rovněž jednoznačný. V případě pH 8 byl s rostoucím obsahem soli pozorován klesající trend hodnoty A_{BA} . V médiích s pH 6 a 7 byl pokles hodnoty A_{BA} zaznamenán téměř ve všech případech od koncentrace 3 % NaCl.

Dostupná literatura [3] uvádí, že optimální pH pro dekarboxylázovou aktivitu bakterie *Serratia marcescens*, neboli pro její produkci kadaverinu je pH 4 – 5,5. Rostoucí teplota má na produkci biogenního aminu kadaverinu jednoznačně pozitivní vliv a vyšší obsah NaCl působí na produkci BA inhibičně [52,92,93]. Lze tedy říci, že v případě λ_{BA} a μ_{BA} se naše výsledky s uvedenou literaturou ztotožňují. V případě hodnoty A_{BA} byly však výsledky odlišné (podrobnější diskuze viz kapitola 6.3).

6.3 Yield faktor

Yield faktor (YF) je množství biogenních aminů, které vyprodukovala jedna buňka (resp. jedna kolonie) a zohledňuje produkci biogenních aminů vzhledem k růstu bakterie. Yield faktor, tedy absolutní množství produkovaného biogenního aminu (kadaverinu a putrescinu) vztahované na CFU, byl vypočítán podle následujících vztahů:

$$KAD_t = KAD_0 + Y_{KAD/CFU} \cdot (N_t - N_0) \cdot 1000$$

$$PUT_t = PUT_0 + Y_{PUT/CFU} \cdot (N_t - N_0) \cdot 1000$$

kde

KAD_t , KAD_0 , PUT_t a PUT_0 (mg.l^{-1}) jsou koncentrace kadaverinu a putrescinu v čase t a 0

N_t a N_0 vyjadřují CFU.ml^{-1} v čase t a 0

$Y_{KAD/CFU}$ a $Y_{PUT/CFU}$ ($\text{mg.10}^9 \cdot \text{CFU}^{-1}$) jsou Yield faktory pro kadaverin a putrescin [88].

Bereme-li v úvahu putrescin (viz Tabulka 14), tak zde byly nejvyšší hodnoty YF zaznamenány v případě koncentrací soli 3 a 4 % při všech hodnotách pH. Naopak nejnižší hodnoty Y_D byly zaznamenány v případě koncentrací 0 a 1 % NaCl. Tento trend byl pozorován u všech tří teplot (tj. 10, 20 a 37 °C). Hodnoty YF s rostoucí teplotou až na výjimky klesaly. Při 10 °C se nejvyšší hodnoty YF (tj. při 3 a 4 % NaCl) pohybovaly v rozmezí 30,66 – 75,69 $\text{mg.10}^9 \cdot \text{CFU}^{-1}$, při 20 °C to bylo 13,43 – 45,79 $\text{mg.10}^9 \cdot \text{CFU}^{-1}$ a při 37 °C pak 7,16 – 22,84 $\text{mg.10}^9 \cdot \text{CFU}^{-1}$.

U hodnot YF získaných u kadaverinu (viz Tabulka 15) byl pozorován stejný trend. Nejvíce biogenního aminu kadaverinu, který vyprodukovala jedna buňka, bylo zaznamenáno v případě 3 a 4% koncentrace soli u všech kultivačních teplot (10, 20 a 37 °C). Hodnoty YF se vzrůstající teplotou klesaly. Tedy v médiu s 3 a 4 % NaCl při 10 °C byly nejvyšší získané hodnoty YF v rozmezí 2,15 – 10,83 $\text{mg.10}^9 \cdot \text{CFU}^{-1}$, při 20 °C 1,36 – 5,21 $\text{mg.10}^9 \cdot \text{CFU}^{-1}$ a při 37 °C to bylo už jen 0,75 – 2,98 $\text{mg.10}^9 \cdot \text{CFU}^{-1}$. Oproti tomu nejnižších hodnot bylo dosaženo v případě koncentrací 0 a 1 % NaCl. Z Tabulky 14 a 15 je patrné, že YF pro putrescin byl několikanásobně vyšší než YF pro kadaverin.

Tabulka 14: Zjištěné hodnoty Yield faktoru putrescinu

mg.10 ⁹ .CFU ⁻¹				
putrescin				
NaCl	pH	10 °C	20 °C	37 °C
0	6	1,09 ± 0,09	1,49 ± 0,15	0,88 ± 0,05
	7	1,50 ± 0,13	1,64 ± 0,06	0,59 ± 0,04
	8	0,49 ± 0,02	0,71 ± 0,04	0,21 ± 0,01
1	6	3,19 ± 0,19	2,92 ± 0,21	0,71 ± 0,06
	7	2,88 ± 0,08	2,35 ± 0,15	0,65 ± 0,04
	8	1,82 ± 0,30	2,50 ± 0,27	0,59 ± 0,03
3	6	65,75 ± 4,52	33,05 ± 1,75	21,07 ± 1,27
	7	45,36 ± 3,75	29,48 ± 0,79	18,28 ± 0,70
	8	35,82 ± 1,93	24,02 ± 1,62	11,69 ± 1,01
4	6	75,69 ± 5,88	45,79 ± 2,84	22,84 ± 0,42
	7	41,39 ± 2,91	31,78 ± 2,10	12,09 ± 0,75
	8	30,66 ± 1,45	13,43 ± 1,00	7,16 ± 0,28
5	6	22,81 ± 1,63	7,55 ± 0,66	13,50 ± 0,74
	7	18,97 ± 1,71	6,81 ± 0,34	5,16 ± 0,35
	8	13,85 ± 0,50	7,12 ± 0,39	4,43 ± 0,23
6	6	19,71 ± 0,67	16,22 ± 1,11	5,85 ± 0,30
	7	21,39 ± 1,79	15,38 ± 1,47	5,48 ± 0,24
	8	11,51 ± 1,05	3,95 ± 0,35	4,22 ± 0,31

Vliv kultivační teploty měl na získané hodnoty YF značný vliv. Se vzrůstající teplotou klesalo množství biogenních aminů, které vyprodukovala jedna buňka (YF), zároveň došlo i k poklesu množství maximální produkované koncentrace biogenních aminů (A_{BA}), ale na druhou stranu se zvýšilo množství vytvořených buněk (A).

Na základě získaných údajů lze diskutovat tři modelové situace:

V případě, že má bakterie vhodné podmínky k růstu (0 a 1 % NaCl, 37 °C), dobře roste, není ve stresu, a tudíž BA nepotřebuje tvořit v nijak zvlášť vysoké koncentraci. Vzhledem k tomu, že bylo buněk velmi mnoho (vysoká hodnota A), tak celková produkce BA (tedy hodnota A_{BA}) byla vysoká. Pokud se ovšem přepočítá produkce jen na jednu buňku, tak je nízká právě z toho důvodu, že bakterie biogenní aminy primárně nepotřebovala.

Vezmeme-li v úvahu koncentrace soli 3 a 4 % lze říci, že za těchto podmínek bakterie rostla hůře než v případě koncentrace 0 a 1 % (nižší hodnota A) a aminokyseliny využívala

primárně jako zdroj energie [88,94,95,96]. Biogenní aminy pak vznikaly jako koncový produkt při této metabolické dráze (vyšší hodnota A_{BA}) a po přepočtu na 1 buňku byla zjištěna i vysoká hodnota YF.

Konečně, v případě koncentrací NaCl 5 a 6 %, kdy byl růst bakterie výrazně inhibován (minimální hodnoty A), k tvorbě BA docházelo minimálně (nízké hodnoty A_{BA}) a též hodnoty YF byly poměrně nízké.

Poslední dvě možnosti úzce souvisí s chováním (jak růstem, tak i dekarboxylázovou aktivitou) bakterie ve stresových podmínkách, které se velmi odlišuje od chování v podmínkách příznivých (optimálních) [82].

Tabulka 15: Zjištěné hodnoty Yield faktoru kadaverinu

mg.10 ⁹ .CFU ⁻¹				
kadaverin				
NaCl	pH	10 °C	20 °C	37 °C
0	6	0,21 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,07 ± 0,00
	7	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,08 ± 0,00
	8	0,04 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,02 ± 0,00
1	6	0,67 ± 0,03	0,67 ± 0,00	0,13 ± 0,01
	7	0,35 ± 0,01	0,50 ± 0,04	0,07 ± 0,00
	8	0,29 ± 0,03	0,47 ± 0,03	0,09 ± 0,00
3	6	10,83 ± 0,72	5,21 ± 0,20	2,98 ± 0,19
	7	6,22 ± 0,56	5,55 ± 0,27	2,93 ± 0,18
	8	3,45 ± 0,20	2,41 ± 0,12	1,46 ± 0,12
4	6	5,54 ± 0,16	2,96 ± 0,09	1,62 ± 0,06
	7	5,61 ± 0,23	2,65 ± 0,17	1,78 ± 0,06
	8	2,15 ± 0,13	1,36 ± 0,11	0,75 ± 0,04
5	6	3,27 ± 0,13	1,14 ± 0,07	0,46 ± 0,03
	7	2,84 ± 0,12	0,90 ± 0,05	0,52 ± 0,03
	8	2,47 ± 0,26	1,01 ± 0,09	0,30 ± 0,02
6	6	2,97 ± 0,11	2,00 ± 0,11	1,05 ± 0,07
	7	1,62 ± 0,08	1,52 ± 0,11	0,97 ± 0,09
	8	2,62 ± 0,19	1,77 ± 0,16	0,79 ± 0,05

ZÁVĚR

Biogenní aminy se tvoří nejčastěji v potravinách s vyšším obsahem bílkovin, které obsahují mikroorganismy vyznačující se dekarboxylázovou aktivitou. Takovou činností se vyznačuje i bakterie *S. marcescens* z čeledi *Enterobacteriaceae*.

Tato diplomová práce byla zaměřena na sledování vybraných faktorů ovlivňujících růst a produkci kadaverinu a putrescinu bakterií *Serratia marcescens*. Sledovanými faktory byly teploty 10, 20 a 37 °C, neutrální a zásadité prostředí (pH 6,7 a 8) a koncentrace chloridu sodného 0 – 6 %. Růst bakterie byl sledován pomocí růstové křivky a produkce biogenních aminů byla stanovena pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie. Na základě získaných výsledků byly formulovány tyto závěry:

- Pro růst bakterie *Serratia marcescens* byla nejvhodnější teplota 37 °C, obsah NaCl 0 a 1 % a pH 6 a 7.
- Naopak v médiích kultivovaných při 10 °C s koncentrací NaCl 5 a 6 % a s pH 8 bakterie téměř nerostla.
- Putrescin byl tvořen ve vyšším množství než kadaverin, ovšem pro jejich produkci platily stejné principy.
- Optimální podmínky pro dekarboxylázovou aktivitu bakterie byly opět 37 °C, koncentrace NaCl 0 – 3 % a pH 6 a 7.
- Maximální produkce putrescinu i kadaverinu klesala s rostoucím pH, koncentrací soli a teplotou.

Závěrem lze shrnout, že obsah biogenních aminů je jedním z ukazatelů kvality potravin a je proto velice důležité sledovat jejich koncentraci v potravinách a rovněž kontrolovat faktory, které jejich tvorbu ovlivňují.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, M. DOLEŽALOVÁ, P. KLČOVSKÁ a S. KRÁČMAR. Effect of environment on histamine production of *Enterobacter Aerogenes* CCM 2531 strain. *X. Risk Factors of Food Chain* [online]. 2010, s. 27-32. [cit. 2012-01-19]. Dostupné z:
<http://kfzfbp.uniag.sk/konferencie/rffch/proceeding%20book/zbornik2010.pdf#page=33>
- [2] VESELÁ, M., M. DRDÁK a S. TANDARA. Relation between free amino acids and the biogenic amines contents in green tomatoes inoculated with *Lactobacillus plantarum*. *Czech Journal of Food Sciences*. 2003, roč. 21, č. 2, s. 51–58. ISSN 1212– 800.
- [3] SILLA SANTOS, María Hortensia. Biogenic amines: their importance in food. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, roč. 29, č. 2-3, s. 213-231. ISSN 0168-1605.
- [4] HALÁSZ, A., Á. BARÁTH, L. SIMON-SARKADI a W. HOLZAPFEL. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*. 1994, roč. 5, č. 2, s. 42-49. ISSN 0924-2244.
- [5] JANOUŠKOVÁ, Magda. *Biogenní aminy*. Brno, 2010. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita, Ústav preventivního lékařství.
- [6] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902391-5-3.
- [7] NOVICKÁ, Kateřina a Tomáš KOMPRDA. *Biogenic amine content in sterilized and pasteurized processed cheese* [online]. 2004 [cit 2012-02-08].
Dostupné z: <http://mnet.mendelu.cz/mendelnet2004/obsahy/tech/novicka.pdf>
- [8] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, P. LUKEŠOVÁ, V. MRKVIČKA, M. DOLEŽALOVÁ a S. KRÁČMAR. Biogenic amines production by bacteria isolated from poultry skin. *Potravinářstvo*. 2009, roč. 3, č. 2, s. 7-10. ISSN 1338-0230.
- [9] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, P. HLOBILOVÁ, P. DRÁB a S. KRÁČMAR. Comparison of different methods of decarboxylation activity detection in lactic acid bacteria. *Potravinářstvo*. 2010, roč. 4, mimoriadné číslo, s. 372-379. ISSN 1338-0230.

- [10] LANGE, J., K. THOMAS a CH. WITTMANN. Comparison of a capillary electrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. *Journal of Chromatography B*. 2002, roč. 779, č. 2, s. 229-239. ISSN 1570-0232.
- [11] KŘÍŽEK Martin a Pavel KALÁČ. Biogenní aminy v potravinách a jejich role ve výživě. *Czech Journal of Food Science*. 1998, roč. 16, č. 4, s. 151-159. ISSN 0862-8653.
- [12] SLÁDKOVÁ, P., E. PETIROVÁ, T. KOMPRDA, V. DOHNAL a J. KALÁB. *Selected factors influencing biogenic amine content in fermented meat products* [online]. 2008, Brno [cit 2012-01-30].
Dostupné z: http://mnet.mendelu.cz/mendelnet08agro/files/articles/techpot_sladkova.pdf
- [13] SILLA SANTOS, María Hortensia. Toxic Nitrogen Compounds Produced during Processing: Biogenic Amines, Ethyl Carbamides, Nitrosamines. In: ADAMS, Martin. R. a Robert M. J. NOUT. *Fermentation and Food Safety*. Gaithersburg: Aspen Publisher, 2001, s. 119 - 126. ISBN 978-0-8342-1843-7.
- [14] MILIOTIS, D. Mariane a Jeffrey W. BIER. *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Hoboken: Marel Dekker, 2003. ISBN 9780203912065.
- [15] KOHAJDOVÁ, Z., J. KAROVIČOVÁ a G. GREIF. Biogénne amíny v potravinách. *Potravinárstvo*. 2008, roč. 2, č. 1, s. 30-49. ISSN 1338-0230.
- [16] JURÁSKOVÁ, Tereza. *Stanovení biogenních aminů pro fluorescenční senzory. Stanovení závislosti citlivosti biosenzoru na koncentraci kyslíku* [online]. Praha, 2012. Týmový projekt. České vysoké učení technické v Praze [cit. 2012-01-22].
Dostupné z: http://webzam.fbmi.cvut.cz/hozman/TPR/20112012/Z_Juraskova.pdf
- [17] LANDETE, J. M., B. DE LAS RIVAS, A. MARCOBAL a R. MUNOS. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, roč. 117, č. 3, s. 258-269. ISSN 0168-1605.
- [18] ADÁMKOVÁ, Šárka a Marek PETŘIVALSKÝ. Vztah metabolismu a signálních funkcí oxidu dusnatého a polyaminů v rostlinách. *Chemické Listy*. 2012, č. 106, s. 166-173. ISSN 1213-7103.
- [19] Putrescin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2012-03-22].
Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Putrescin>

- [20] ZÁLEŠÁKOVÁ, Ludmila. *Monitoring obsahu biogenních aminů ve vybraných fermentovaných potravinách živočišného původu*. Zlín: UTB, 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav biochemie a analýzy potravin.
- [21] Pathway: aminopropylcadaverine biosynthesis III. *MetaCyc* [online]. [cit. 2012-03-22]. Dostupné z: <http://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-46>
- [22] Pathway: aminopropylcadaverine biosynthesis IV. *MetaCyc* [online]. [cit. 2012-03-22]. Dostupné z: <http://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-6305>
- [23] Pathway: putrescine biosynthesis I. *MetaCyc* [online]. [cit. 2012-03-22]. Dostupné z: <http://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-40>
- [24] Pathway: putrescine biosynthesis II. *MetaCyc* [online]. [cit. 2012-03-22]. Dostupné z: <http://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-43>
- [25] MORET, Sabrina a Lafranco S. CONTE. High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in food. An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *Journal of Chromatography A*. 1996, roč. 729, č. 1-2, s. 363-369. ISSN 0021-9673.
- [26] Kadaverin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2012-03-22]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Kadaverin>
- [27] Pathway: aminopropylcadaverine biosynthesis. In: *MetaCyc* [online]. [cit. 2012-03-22]. Dostupné z: <http://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY0-1303>
- [28] KAROVIČOVÁ, Jolana a Zlatica KOHAJDOVÁ. Biogenic Amines in Food. *Chemical Papers*. 2005, roč. 59, č. 1, s. 70-79. ISSN 1336-9075.
- [29] PUNAKIVI, K., M. SMOLANDER, M. L. NIKU-PAAVOLA, J. MATTINEN a J. BUCHERT. Enzymatic determination of biogenic amines with transglutaminase. *Talanta* 2006, roč. 68, č. 3 s. 1040–1045. ISSN 0039-9140.
- [30] MAINTZ, Laura a Natalija NOVAK. Histamine and histamine intolerance. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2007, roč. 85, č. 5, s. 1185–1196. ISSN 1938-3207.

- [31] PIRCHER, A., F. BAUER a P. PAULSEN. Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *European Food Research and Technology*. 2007, roč. 226, č. 1-2, s. 225-231. ISSN 1438-2377.
- [32] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, P. KLČOVSKÁ, V. MRKVIČKA, M. DOLEŽALOVÁ A S. KRÁČMAR. Formation of biogenic amines by Gram-negative bacteria isolated from poultry skin. *Food Chemistry*. 2010, roč. 121, č. 1, s. 203-207. ISSN 0308-8146.
- [33] GRIEF, G., M. GREIFOVÁ a J. KAROVIČOVÁ. Cadaverine and amonia production by some bacteria under model conditions. *Czech Journal of Food Sciences*. 1998, roč. 16, č. 2, s. 53-56. ISSN 0862-8653.
- [34] GABROVSKÁ, D., P. HANÁK a J. RYSOVÁ. Potravinová přecitlivělost: alergie a intolerance. *Potravinářská revue*. 2010, č. 6, s. 15-20.
- [35] ŠÁCHA, Pavel. Histaminová intolerance (HIT). In: *Celostní medicína* [online]. 2012 [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <http://www.celostnimedicina.cz/histaminova-intolerance-hit.htm>
- [36] ÖNAL, Armagan. A review: Current analytical methods for the determination of Biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. 2007, roč. 103, č. 4, s. 1475 – 1486. ISSN 0308-8146.
- [37] Nařízení komise (ES) 2073/2005. In *Úřední věstník Evropské unie*. 2005, L 338, s. 1-26.
- [38] Vyhláška č. 305/2004 Sb., *kteřou se stanoví druhy kontaminujících a toxicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách* [online]. 2004 [cit. 2012-04-20]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1006047&docType=ART&nid=11307>
- [39] GRIEF, G., M. GREIFOVÁ, J. DVORAN, J. KAROVIČOVÁ a V. BUCHTOVÁ. Study of the growth and production of biogenic amines by some microorganisms in model conditions. *Czech Journal of Food Sciences*. 1999, roč. 17, č. 1, s. 15-21. ISSN 1212-1800.
- [40] MORET, S., D. SMĚLÁ, T. POPULIN a L. S. CONTE. A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. *Food Chemistry*. 2004, roč. 89, č. 3, s. 355 – 361. ISSN 0308-8146.

- [41] KALÁČ, Pavel a Petra KRAUSOVÁ. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*. 2005, roč. 90, č. 1/2, s. 219-230. ISSN 0308-8146.
- [42] IZQUIERDO-PULIDO, M., T. HERNÁNDEZ-JOVER, A. MARINÉ-FONT a M. C. VIDAL-CAROU. Biogenic amines in european beers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1996, roč. 44, č. 10, s. 3159–3163. ISSN 0021-8561.
- [43] CZERNIEJEWSKA-SURMA, Barbara a Michal ALCHIMOWICZ. Changes in Histamine content in beer production process. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*. 2010, roč. 13, č. 1. ISSN 1505-0297.
- [44] GALGANO, F., M. CARUSO, G. PERRETTI a F. FAVATI. Authentication of Italian Red Wines on the Basis of the Polyphenols and Biogenic Amines. *European Food Research and Technology*. 2011, roč. 232, č. 5, s. 889-897. ISSN 1438-2377.
- [45] YONGMEI, L., L. XIN, CH. XIAOHONG, J. MEI, L. CHAO a D. MINGSHENG. A survey of biogenic amines in Chinese rice wines. *Food Chemistry*. 2007, roč. 100, č. 4, s. 1424-1428. ISSN 0308-8146.
- [46] KOMPRDA, T., D. SMĚLÁ, K. NOVICKÁ, L. KALHOTKA, K. ŠUSTOVÁ a P. PECHOVÁ. Content and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard Cheese. *Food Chemistry*. 2007, roč. 102, č. 1, s. 129-137. ISSN 0308-8146.
- [47] NOVELLA-RODRIGUES, S., M. T. VECIANA-NOGUEZ a M. C. VIDAL-CAROU. Biogenic Amines and Polyamines in Milk and Cheeses by Ion-Pair High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2000, roč. 48, č. 11, s. 5117-5123. ISSN 0021-8561.
- [48] O'BRIEN N. M., T. P. O'CONNOR, J. O'CALLAGHAN a A. D. W. DOBSON. Toxins in cheese. In: FOX P., P. McSWEENEY, T. COGAN a T. GUINEE (ed.) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Volume 1. New York: Academic Press, 2004, s. 561-571. ISBN 978-0-12-263653-0.
- [49] BODMER, S., C. IMARK a M. KNEUBUHL. Biogenic amines in foods: histamine and food processing. *Inflammation Research*. 1999, roč. 48, č. 6, s. 296–300. ISSN 1023–3830.
- [50] PAULSEN, Peter a Friedrich BAUER. Spermine and Spermidine concentrations in pork loin as affected by storage, curing and thermal processing. *European Food Research and Technology*. 2007, roč. 225, č. 5-6, s. 921-924. ISSN 1438-2377.

- [51] KOMPRDA, T., J. NEZNALOVÁ, S. STANDARA a S. BOVER-CID. Effect of starter culture and storage temperature on the content of biogenic amines in dry fermented sausage poličan. *Meat Science*. 2001, roč. 59, č. 3, s. 267-276. ISSN 0309-1740.
- [52] SUZZI, Giovanna a Fausto GARDINI. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, roč. 88, č. 1, s. 41-54. ISSN 0168-1605.
- [53] NASSAR, Ahmed M. a Waffa H. EMAN. Biogenic amines in chicken meat products in relation to bacterial load, pH value and sodium chloride content. *Nahrung/Food*. 2002, roč. 46, č. 3, s. 197-199. ISSN 0027-769X.
- [54] CORDIER, Jean-Louis. Enterobacteriaceae. In: MOTARJEMI, Jasmine a Martin ADAMS (ed.). *Emerging foodborne pathogens*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2006. ISBN 978-1-85573-963-5.
- [55] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova Univerzita, 2007. ISBN 80-210-4207-9.
- [56] PANDEY, A., V. K. JOSHI, P. NIGAM a C. R. SOCCOL. Enterobacteriaceae, Coliforms and E. coli. In ROBINSON, R. K., C. A. BATT a P. D. PATEL (ed.). *Encyclopedia of food microbiology*. London: Academic Press, 1999. ISBN 0-12-227070-3.
- [57] BAYLIS, C. L. Enterobacteriaceae. In: BLACKBURN, Clive de W. (ed.). *Food spoilage microorganisms*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2006. ISBN 978-1-85573-966-6.
- [58] JAY, M., Janes. *Modern Food Microbiology*. 6th Edition. Maryland: Aspen publishers, 2000. ISBN 0-8342-1671-X.
- [59] *Serratia marcescens*. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation. [cit. 2012-03-20]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Serratia_marcescens
- [60] CAPRETTE, R. David. *Enterobacteriaceae: Serratia marcescens* [online]. Rice University [cit. 2012-03-20]. Dostupné z: http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/bios318/characterization_example.pdf
- [61] HEJAZI, A. a F. R. FALKINER. *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology*. 1997, roč. 46, č. 11, s. 903-912. ISSN 0022-2615.

- [62] SUKOVÁ, Irena. Účinek plísní na obsah biogenních aminů v ovoci a ovocných šťávách. *Agro-navigátor* [online]. 30. 12. 2002 [cit. 2012-01-31]. Dostupné z: <http://www.agro-navigator.cz/default.asp?ids=158&ch=13&typ=1&val=10786>
- [63] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, E. POLLAKOVÁ, T. PODEŠVOVÁ, V. DRÁB a S. KRÁČMAR. Effect of aero-/anaerobiosis on decarboxylase activity of selected lactic acid bacteria. *Potravinářstvo*. 2010, roč. 4, č. 2, s. 5-7. ISSN 1338-0230.
- [64] SVOBODA, Jiří. *Organická syntéza I*. Praha: VŠCHT, 2000. ISBN 80-7080-385-1.
- [65] Aminokyseliny. *Biochemie* [online]. [cit. 2012-03-15]. Dostupné z: <http://www.biochemie.wz.cz/aminokyseliny.html>
- [66] KODÍČEK, Milan. Dekarboxylace. *Biochemické pojmy: Výkladový slovník* [online]. 2007 [cit. 2012-03-15]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/dekarboxylace.html
- [67] STEJSKAL, D., V. HUMENANSKÁ a R. VRTAL. Stanovení koncentrace *N*, *N'*-diacetylsperminu v moči novou metodou ELISA. *Chemické listy*. 2009, roč. 103, s. 73-75. ISSN 1213-7103.
- [68] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-85605-71-6.
- [69] GADINI, F., M. MARTUSCELI, C. M. CARUSO, F. GALGANO, M. A. CRUDELE, F. FAVATI, M. E. GUERZONI a G. SUZZI. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, roč. 64, č. 1-2, s. 105-117. ISSN 0168-1605.
- [70] DADÁKOVÁ, E., M. KŘÍTEK a T. PELIKÁNOVÁ. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. 2009, roč. 116, č. 1, s. 365–370. ISSN 0308-8146.
- [71] SHALABY, Ali R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 1996, roč. 29, č. 7, s. 675-690. ISSN 0963-9969.
- [72] STANDARA, S., M. VESELÁ a M. DRDÁK. Determination of biogenic amines in cheese by ion exchange chromatography. *Nahrung*. 2000, roč. 44, č. 1, s. 28-31, ISSN 0027-769X.
- [73] CHIACCHIERINI, E., D. RESTUCCIA a G. VINCI. Evaluation of two different extraction methods for chromatographic determination of bioactive amines in tomato products. *Talanta*. 2006, roč. 69, č. 3, s. 548-555. ISSN 0039-9140.

- [74] OTYEPKOVÁ, E., L. KVÍTEK, M. OTYEPKA a A. PANÁČEK. Cvičení z vybraných fyzikálně-chemických metod. *Papírová a tenkovrstvá chromatografie* [online]. 2005 [cit. 2012-03-01].
Dostupné z: <http://fch.upol.cz/skripta/zfcm/index.html>
- [75] ŠÍMA, Jan. Analytická chemie. *Plynová chromatografie (GC)* [online]. [cit. 2012-03-06]. Dostupné z: http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separb.htm
- [76] Učební text. *Chromatografie* [online]. 2004 [cit. 2012-03-06]. Dostupné z: http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc.
- [77] VÁVROVÁ, Jaroslava. Chromatografie na iontoměničích (IEC). In: *Datový standard MZČR* [online]. 2012 [cit. 2012-03-25]. Dostupné z: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJALD.htm
- [78] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*, Ostrava, Pavel Klouda. 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [79] DRAISCI, R., L. GIANNNETTI, P. BORIA, L. LUCENTINI, L. PALLESCHI a S. CAVALLI. Improved ion chromatography-intergrated pulsed amperometric detection method for the evaluation of biogenic amines in food of vegetace or animal origin and in fermented foods. *Journal of chromatography A*. 1998, roč. 798, č. 1-2, s. 109-116. ISSN 0021-9673.
- [80] GOSSETTI, F., E. MAZZUCO, V. GIANOTTI, S. POLATI a M. C. GENNARO. High performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry determinativ of biogenic amines in typical Piedmont cheeses. *Journal of Chromatography*. 2007, roč. 1149, č. 2, s. 151–157. ISSN 0021-9673.
- [81] KVASNIČKOVÁ, Alexandra. Biogenní aminy v trvanlivých salámech. *Chemické Listy*. 2004, roč. 98, č. 7, s. 432–437. ISSN 1213-7103.
- [82] KAPRÁLEK, František. *Fyziologie bakterií*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986. 14-600-86.
- [83] ZWIETERING, M. H., I. JONGENBURGER, F. M. ROMBOOTS a K. van 't RIE. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990, roč. 56, č. 6, s. 1875-1881. ISSN 1099-2240.
- [84] VÁVROVÁ, Jaroslava. Turbidimetrie. In: *Datový standard MZČR* [online]. 2012 [cit. 2012-03-25].
Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200620/hypertext/BOJVABU.htm>

- [85] ALUPOAEI, Catalina a Louis H. GARCIA-RUBIO. Growth behavior of microorganisms using UV-VIS spectroscopy. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004, roč. 86, č. 2, s. 163-167. ISSN 0006-3592.
- [86] SUTTON, Scott. Measurement of Cell Concentration in Suspension by Optical Density. In: *The Microbiology Network* [online]. 2006 [cit 2012-04-01]. Dostupné z: <http://www.microbiol.org/resources/monographswhite-papers/measurement-of-cell-concentration-in-suspension-by-optical-density/>.
- [87] Optická Hustota. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2010 [cit. 2012-03-25]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Optick%C3%A1_hustota
- [88] BUŇKOVÁ, L., L. BUŇKA, E. POLLAKOVÁ, T. PODEŠVOVÁ a V. DRÁB. The effect of lactose, NaCl and an aero/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, roč. 147, č. 2, s. 112-119. ISSN 0168-1605.
- [89] GRIMONT, Francine a Patrick A. D. GRIMONT. Genus XXXIV. *Serratia*. In GARRITY, G. M., D. J. BRENNER, N. R. KRIEG a J. T. STALEY (ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. New York: Springer, 2005. ISBN 0-387-24144-2.
- [90] ZAMAN, M. Z., A. S. ABDULAMIR, F. A. BAKAR, J. SELAMAT a J. BAKAR. A review: Microbiological, physicochemical and health impact of high level of biogenic amines in fish sauce. *American Journal of Applied Sciences*. 2009, roč. 6, č. 6, s. 1199-1211. ISSN 1546-9239.
- [91] KOUTSOUMANIS, K., C. TASSOU a G. J. E. NYCHAS. Biogenic amines in foods. In: JUNEJA Vijay K. a John N. SOFOS (ed.). *Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions*. Washington: ASM Press, 2010. ISBN 978-1-55581-459-5.
- [92] SHUKLA, S., J. K. KIM a M. KIM. Occurrence of biogenic amines in soybean food products. In EL-SHEMY, Hany (ed.). *Soybean and health*. Rijeka: InTech, 2011. ISBN 978-953-307-535-8.

- [93] COLLINS DANIEL, John et al. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* [online]. 2011, roč. 9, č. 10 [cit. 2012-03-26].
Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2393.pdf>
- [94] PEREIRA, C. I., D. MATOS, M. V. SAN ROMAO a M. T. BARRETO CRESPO. Dual Role for the Tyrosine Decarboxylation Pathway in *Enterococcus faecium* E17: Response to Acid Challenge and Generation of a Proton Motive Force. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, roč. 75, č. 2, s. 345-352. ISSN 1099-2240.
- [95] WOLKEN, W. A. M., P. M. LUCAS, A. LONVAUD-FUNEL a J. S. LOLKEMA. The mechanism of the Tyrosine Transporter TyrP Supports a Proton Motive Tyrosine Decarboxylation Pathway in *Lactobacillus brevis*. *Journal of Bacteriology*. 2006, roč. 188, č. 6, s. 2198-2206. ISSN 1098-5530.
- [96] MOLENAAR, D., J. S. BOSSCHER, B. BRINK, A. J. DRIESSEN a W. N. KONINGS. Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Bacteriology*. 1993, roč. 175, č. 10, s. 2864-2870. ISSN 1098-5530.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AFID	Plamenový ionizační detektor a alkalickým kovem
BA	Biogenní amin(y)
BMK	Bakterie mléčného kvašení
CE	Kapilární elektroforéza
DAC	<i>N, N'</i> - diacetylspermin
DAO	Diaminooxidáza
DM	Dekarboxylázové médium
DOPA	3,4 – dihydroxyfenylalanin
ECD	Detektor elektronového záchytu
ELISA	Imunoalanýza s enzymem vázaným na imunosorbent
FID	Plamenový ionizační detektor
GC	Plynová chromatografie
HIT	Histaminová intolerance
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
HSP	Heat shock proteins
IEC	Iontově výměnná chromatografie
IPAD	Iontově výměnná chromatografie s integrovanou pulzní amperometrickou detekcí
MAO	Monoaminooxidáza
MPA	Masopeptonový agar
MPB	Masopeptonový bujón
MS	Hmotnostní spektrometr
OD	Optická hustota
PC	Papírová chromatografie

PCR Polymerázová řetězová reakce

TLC Tenkovrstvá chromatografie

UHT Vysoký záhřev

UV Ultrafialové záření

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Nejčastěji se vyskytující biogenní aminy v potravinách [15].....	15
Obrázek 2: Strukturní vzorec putrescinu [18].....	16
Obrázek 3: Vznik putrescinu z L-argininu přes L-ornitin [21,22].....	17
Obrázek 4: Vznik putrescinu z L-argininu přes agmatin [23]	17
Obrázek 5: Vznik putrescinu z L-argininu přes agmatin a <i>N</i> -karbamoylputrescin [24]	18
Obrázek 6: Strukturní vzorec kadaverinu [18]	18
Obrázek 7: Vznik kadaverinu z L-lyzinu [27]	19
Obrázek 8: Průběh dekarboxylační reakce [15].....	32
Obrázek 9: Růstová křivka bakterií [86].....	41
Obrázek 10: Růstová křivka při 10°C, koncentrace NaCl 6 %, pH 6, 7 a 8.....	52
Obrázek 11: Růstová křivka při 20 °C, koncentrace NaCl 0 %, pH 6, 7 a 8.....	53
Obrázek 12: Růstová křivka při 37 °C, koncentrace NaCl 0 %, pH 6, 7 a 8.....	55
Obrázek 13: Produkce putrescinu při 10 °C, koncentrace NaCl 4 %, pH 6, 7 a 8.....	57
Obrázek 14: Produkce putrescinu při 20 °C, koncentrace NaCl 1 %, pH 6, 7 a 8.....	59
Obrázek 15: Produkce putrescinu při 37 °C, koncentrace NaCl 3 %, pH 6, 7 a 8.....	61
Obrázek 16: Produkce kadaverinu při 10 °C, koncentrace NaCl 6 %, pH 6, 7 a 8.....	64
Obrázek 17: Produkce kadaverinu při 20 °C, koncentrace NaCl 1 %, pH 6, 7 a 8.....	67
Obrázek 18: Produkce kadaverinu při 37 °C, koncentrace NaCl 5 %, pH 6, 7 a 8.....	69

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Fyzikální vlastnosti putrescinu [19].....	16
Tabulka 2: Fyzikální vlastnosti kadaverinu [26]	18
Tabulka 3: Významné mikroorganismy produkující biogenní aminy [6].....	24
Tabulka 4: Eluční program	49
Tabulka 5: Parametry Gompertzova modelu pro růstovou křivku při 10 °C.....	52
Tabulka 6: Parametry Gompertzova modelu pro růstovou křivku při 20 °C.....	54
Tabulka 7: Parametry Gompertzova modelu pro růstovou křivku při 37 °C.....	55
Tabulka 8: Parametry Gompertzova modelu pro detekci putrescinu při 10 °C.....	58
Tabulka 9: Parametry Gompertzova modelu pro detekci putrescinu při 20 °C.....	60
Tabulka 10: Parametry Gompertzova modelu pro detekci putrescinu při 37 °C.....	62
Tabulka 11: Parametry Gompertzova modelu pro detekci kadaverinu při 10 °C.....	66
Tabulka 12: Parametry Gompertzova modelu pro detekci kadaverinu při 20 °C.....	68
Tabulka 13: Parametry Gompertzova modelu pro detekci kadaverinu při 37 °C.....	70
Tabulka 14: Zjištěné hodnoty Yield faktoru putrescinu	73
Tabulka 15: Zjištěné hodnoty Yield faktoru kadaverinu	74

SEZNAM PŘÍLOH

P I: Růstová křivka při 10 °C

P II: Růstová křivka při 20 °C

P III: Růstová křivka při 37 °C

P IV: Produkce putrescinu při 10 °C

P V: Produkce putrescinu při 20 °C

P VI: Produkce putrescinu při 37 °C

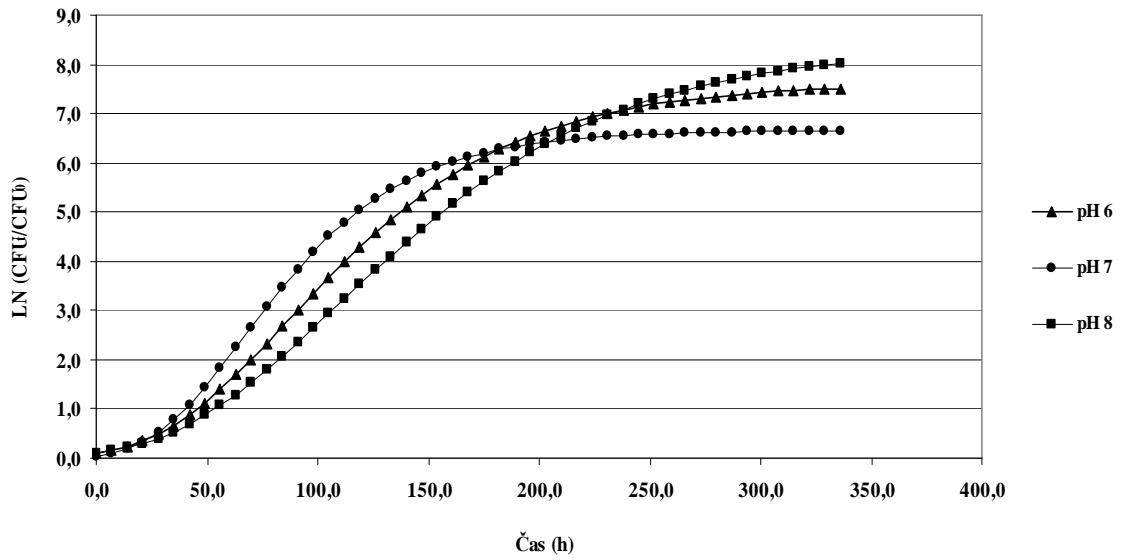
P VII: Produkce kadaverinu při 10 °C

P VIII: Produkce kadaverinu při 20 °C

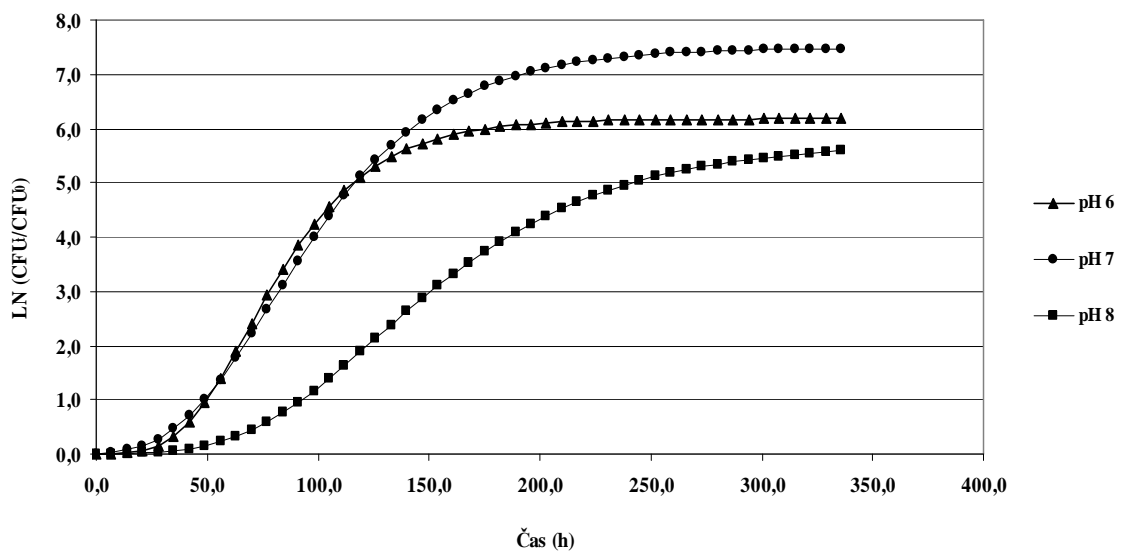
P IX: Produkce kadaverinu při 37 °C

PŘÍLOHA P I: RŮSTOVÁ KŘIVKA PŘI 10 °C

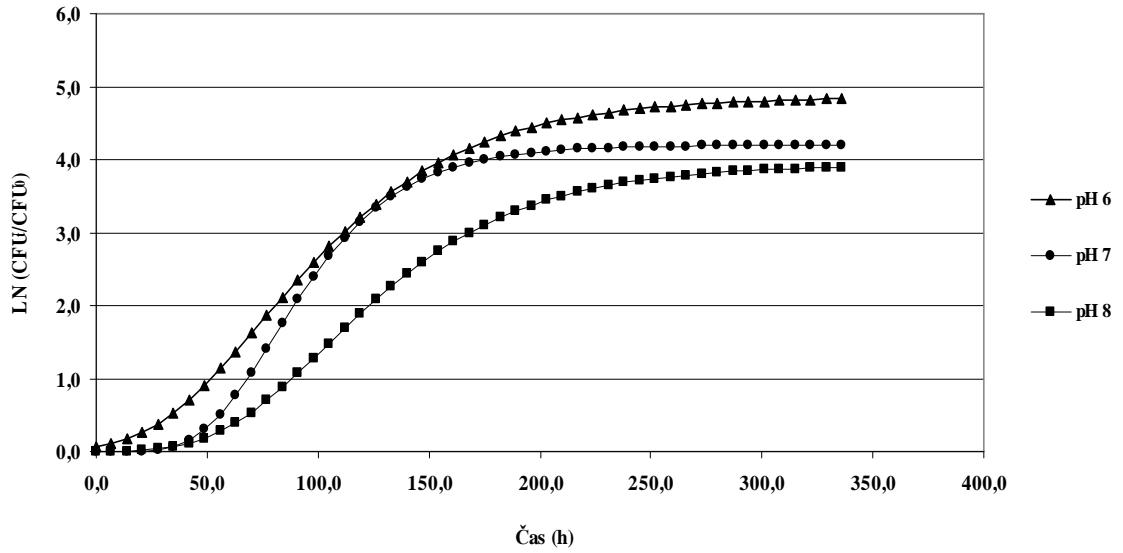
0 % NaCl



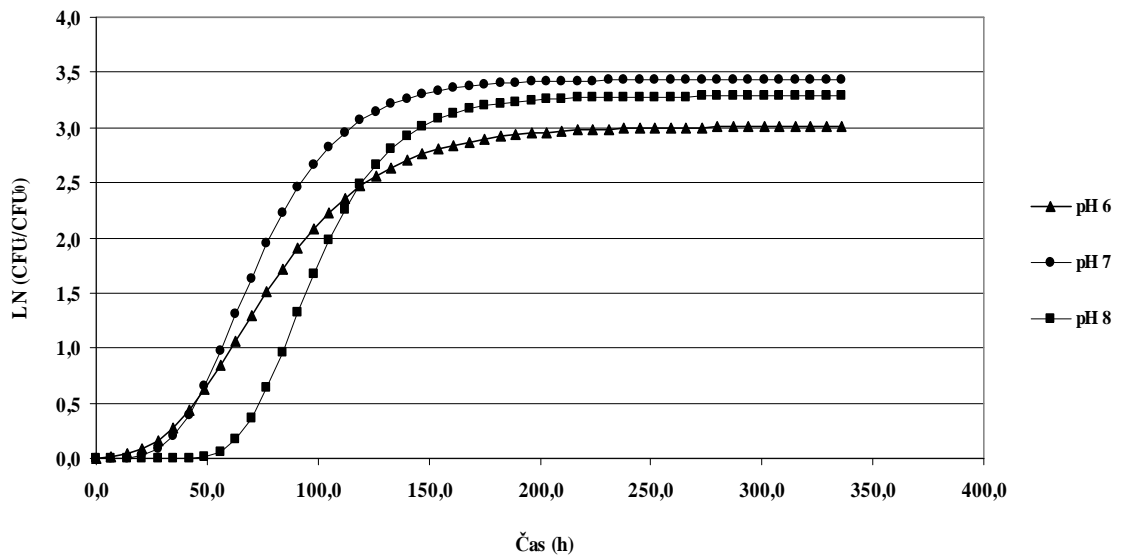
1 % NaCl



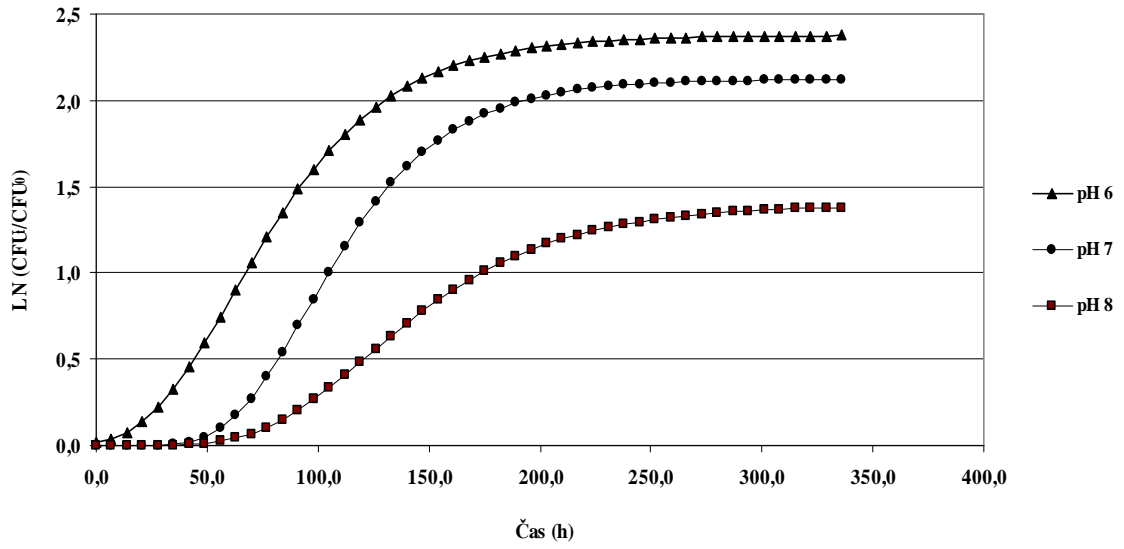
3 % NaCl



4 % NaCl

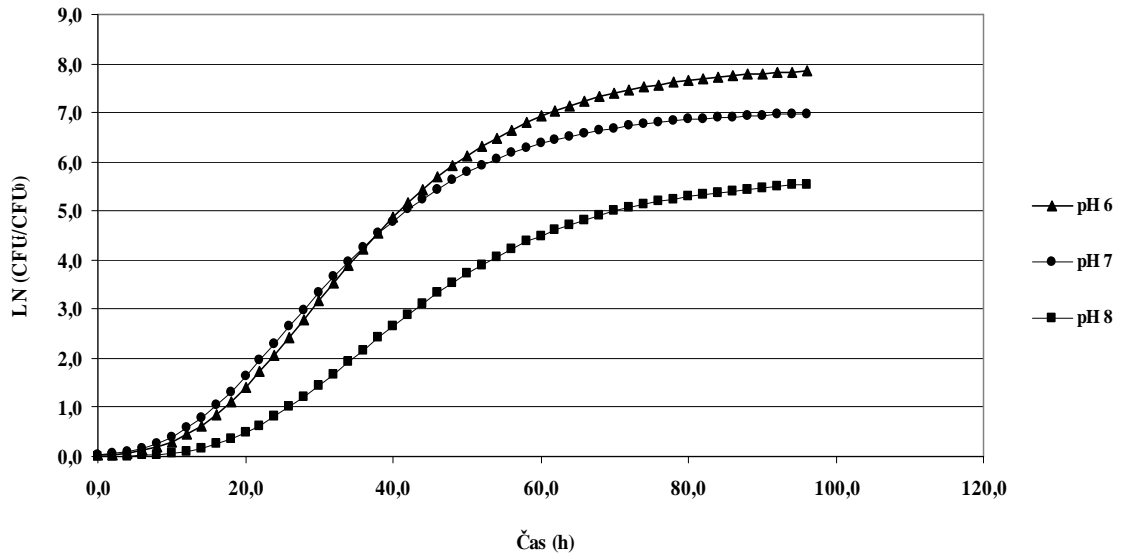


5 % NaCl

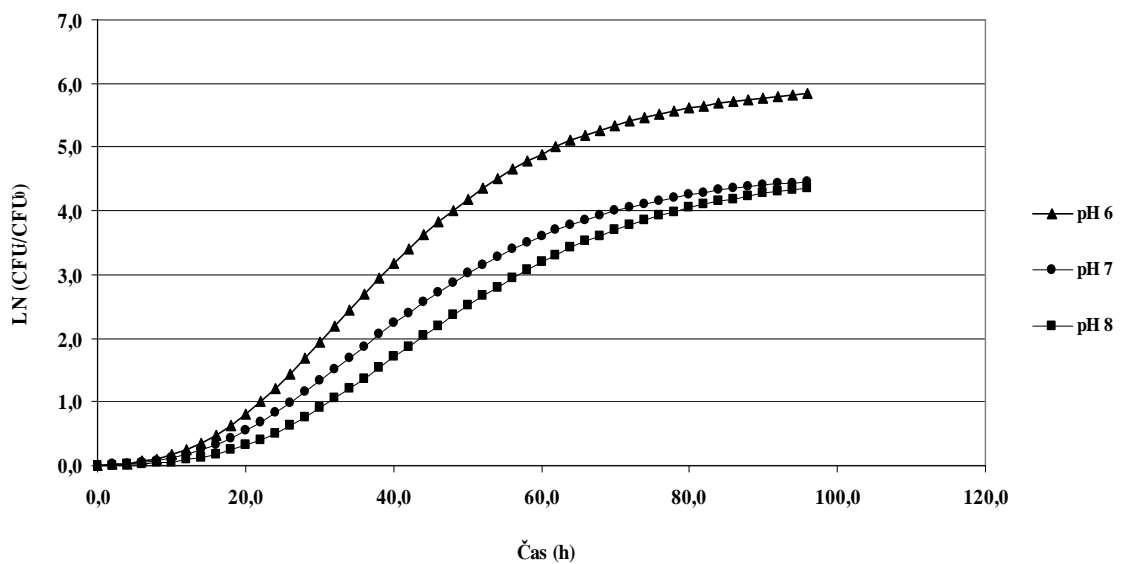


PŘÍLOHA P II: RŮSTOVÁ KŘIVKA PŘI 20 °C

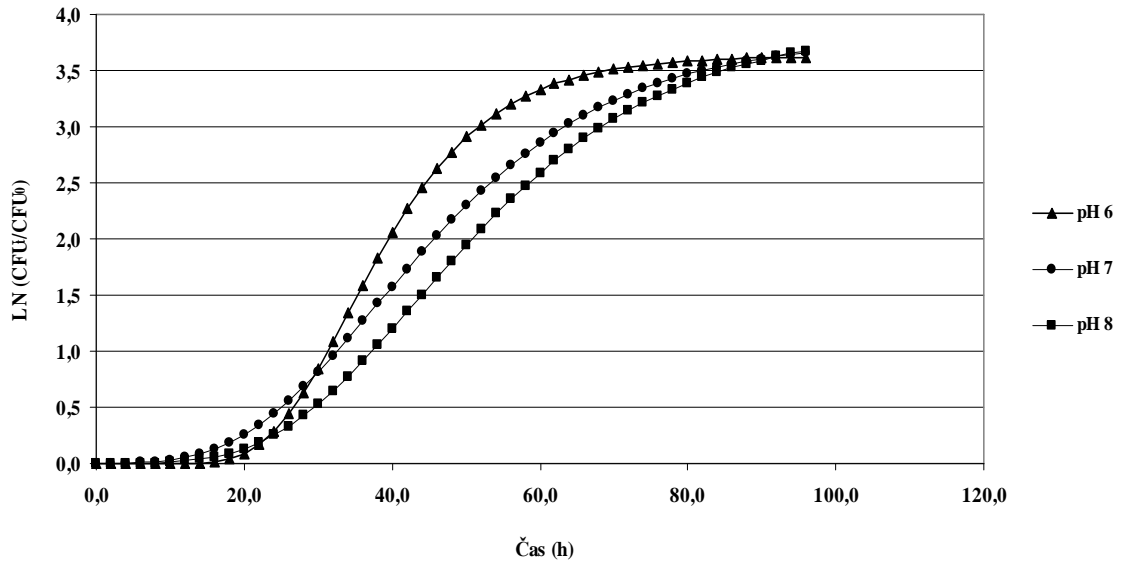
1 % NaCl



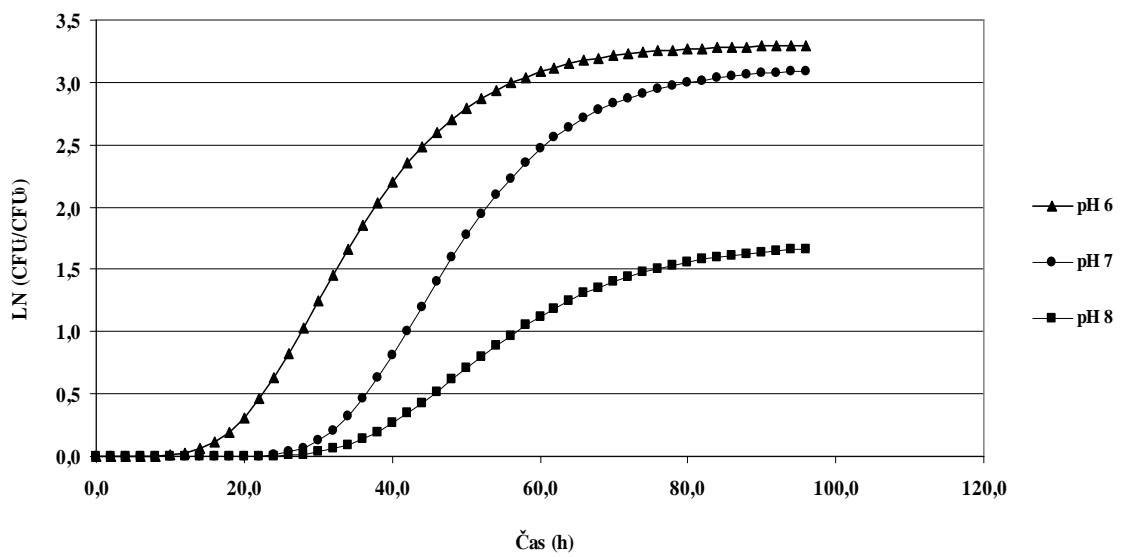
3 % NaCl



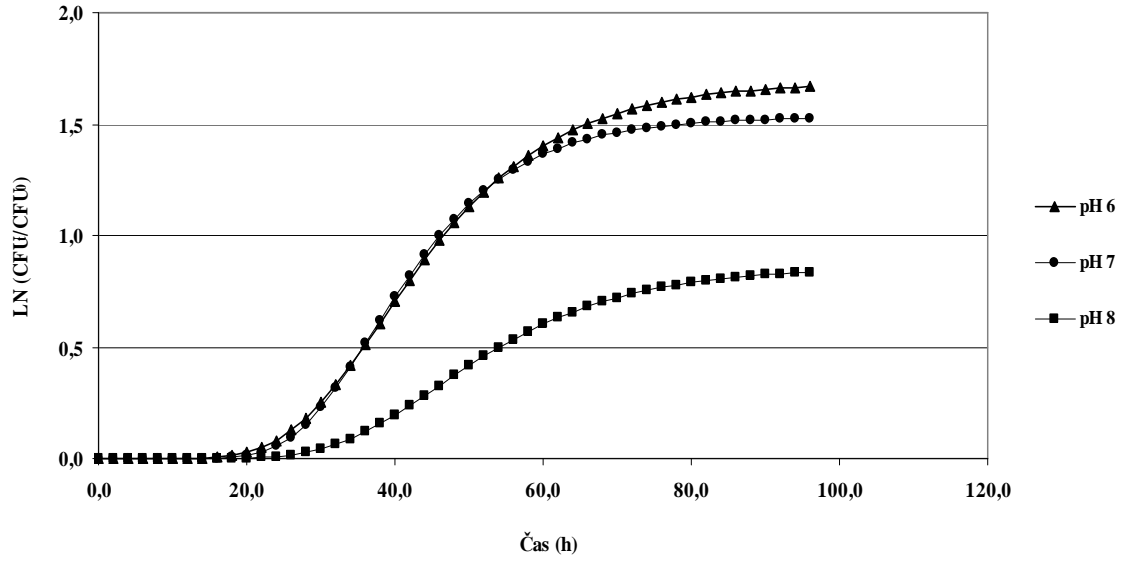
4 % NaCl



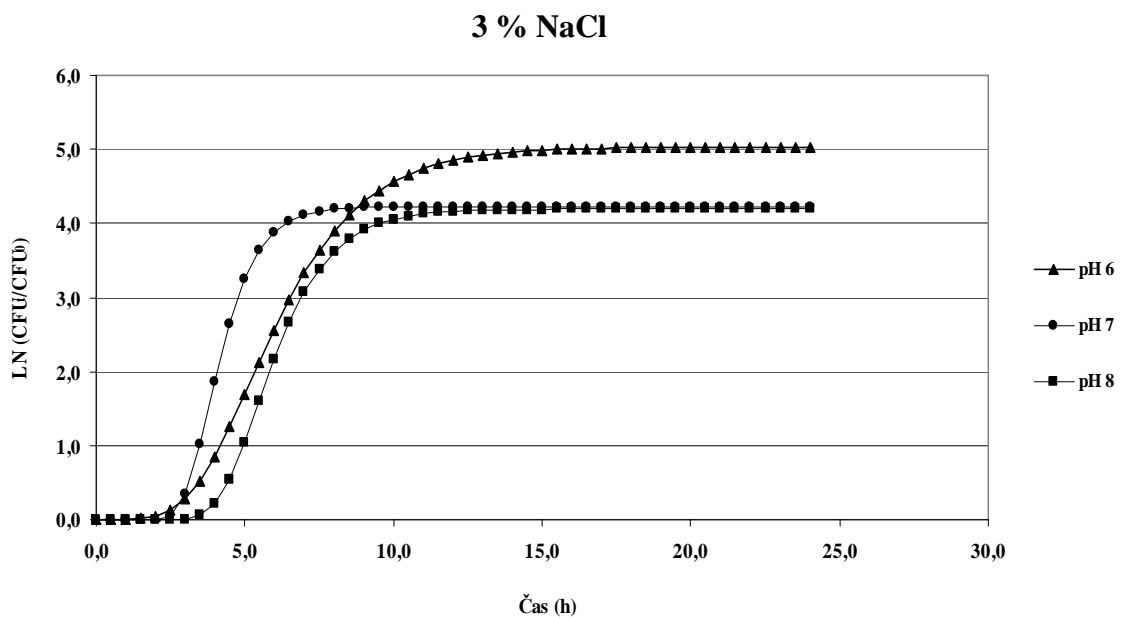
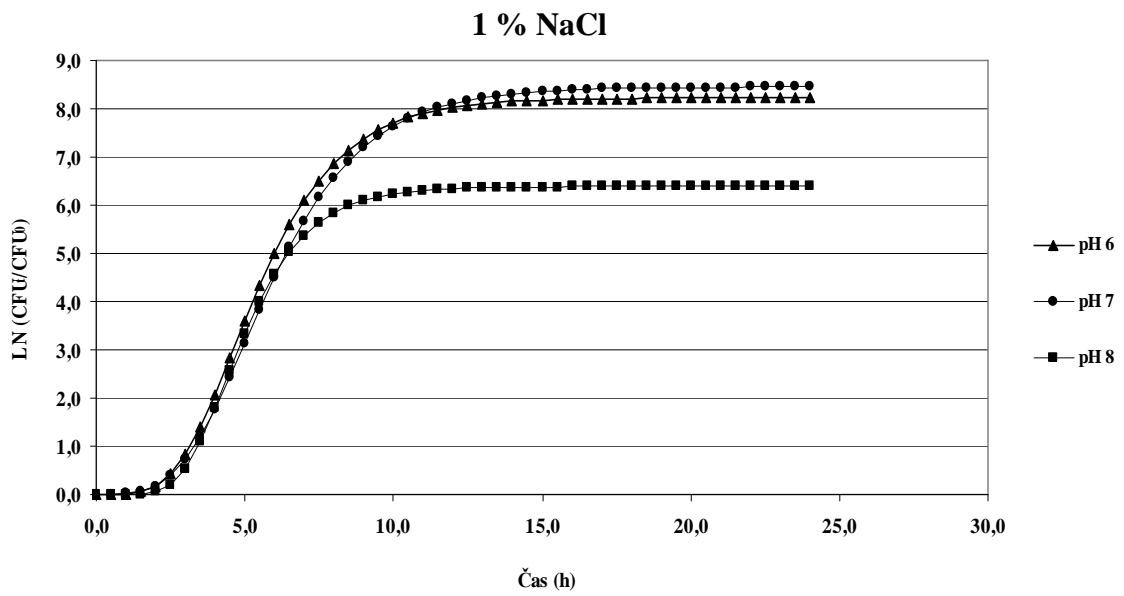
5 % NaCl



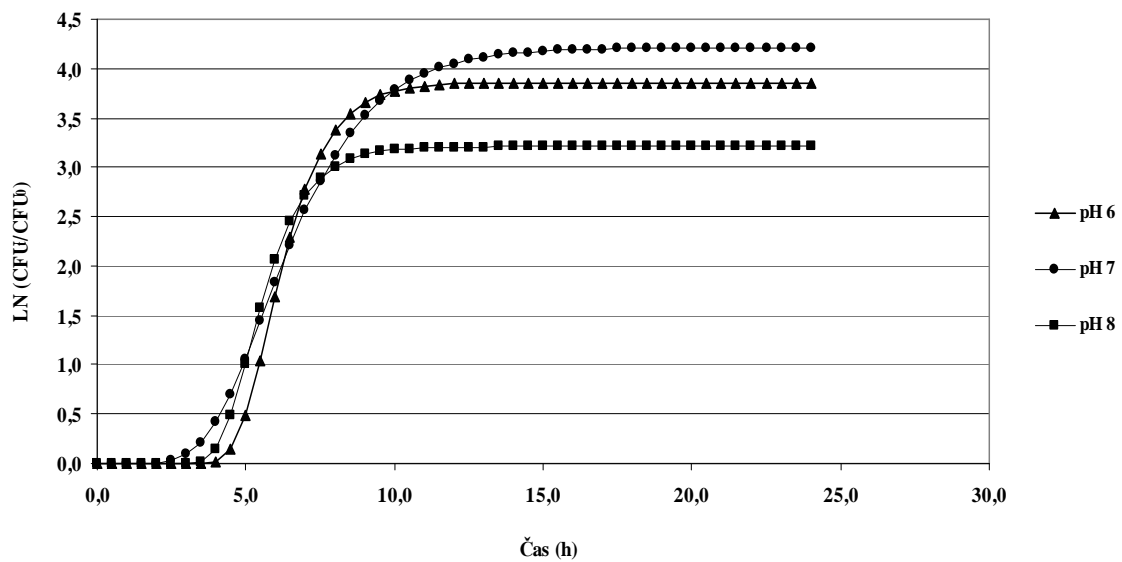
6 % NaCl



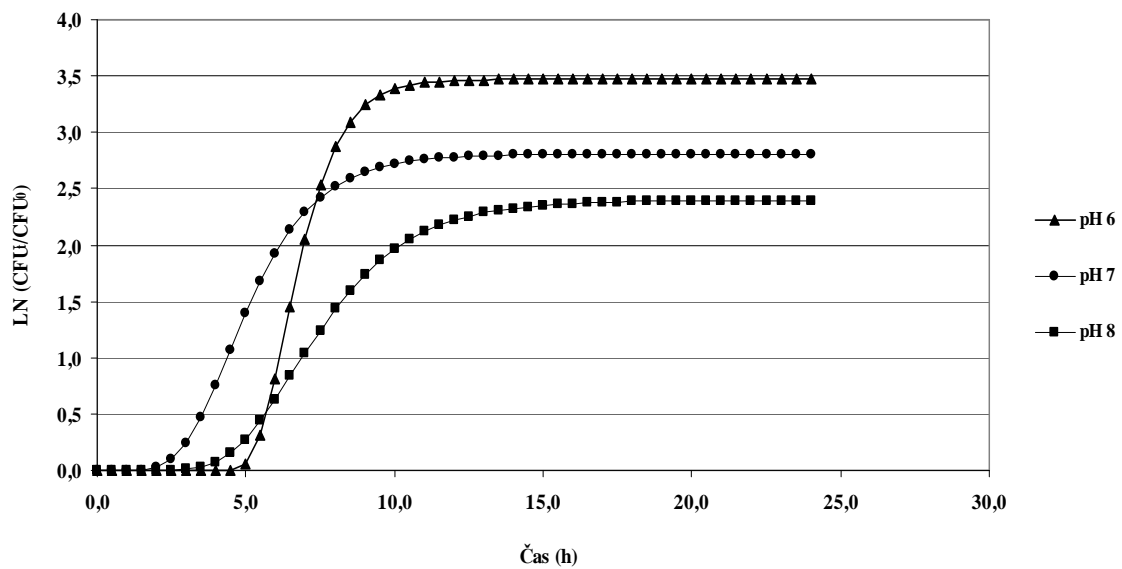
PŘÍLOHA P III: RŮSTOVÁ KŘIVKA PŘI 37 °C



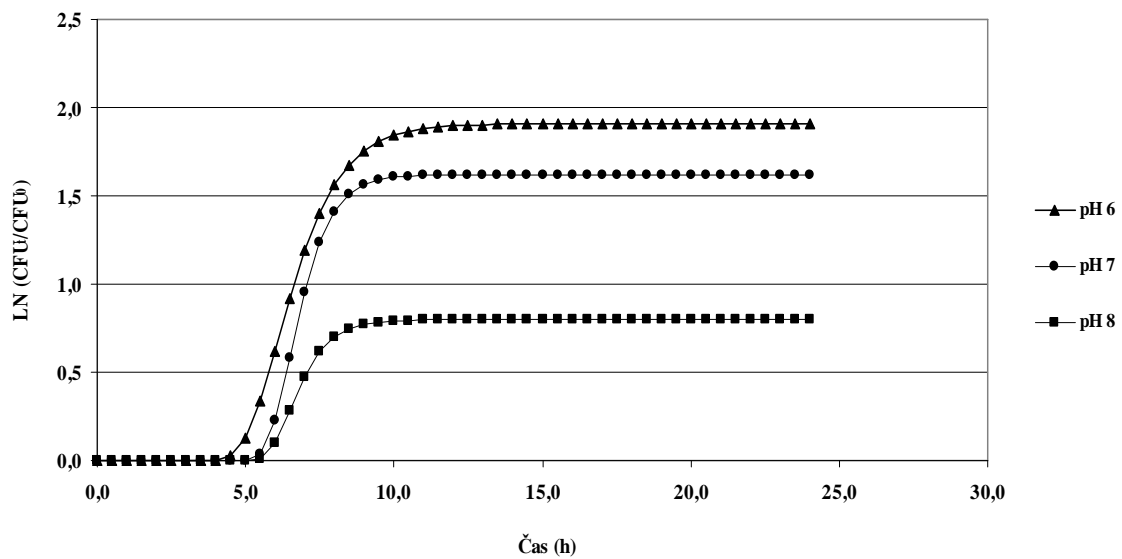
4 % NaCl



5 % NaCl

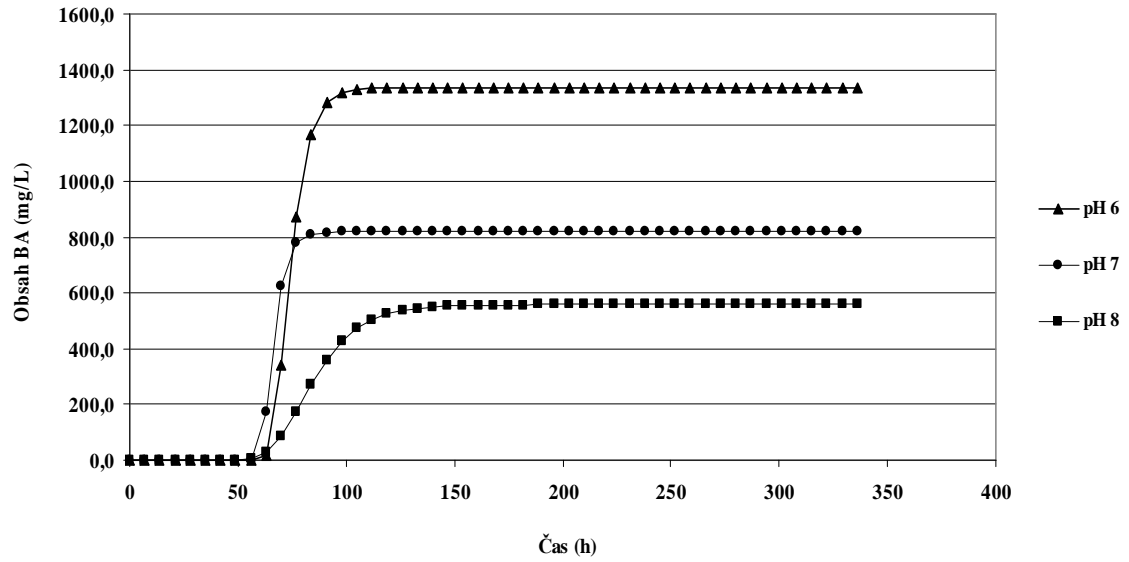


6 % NaCl

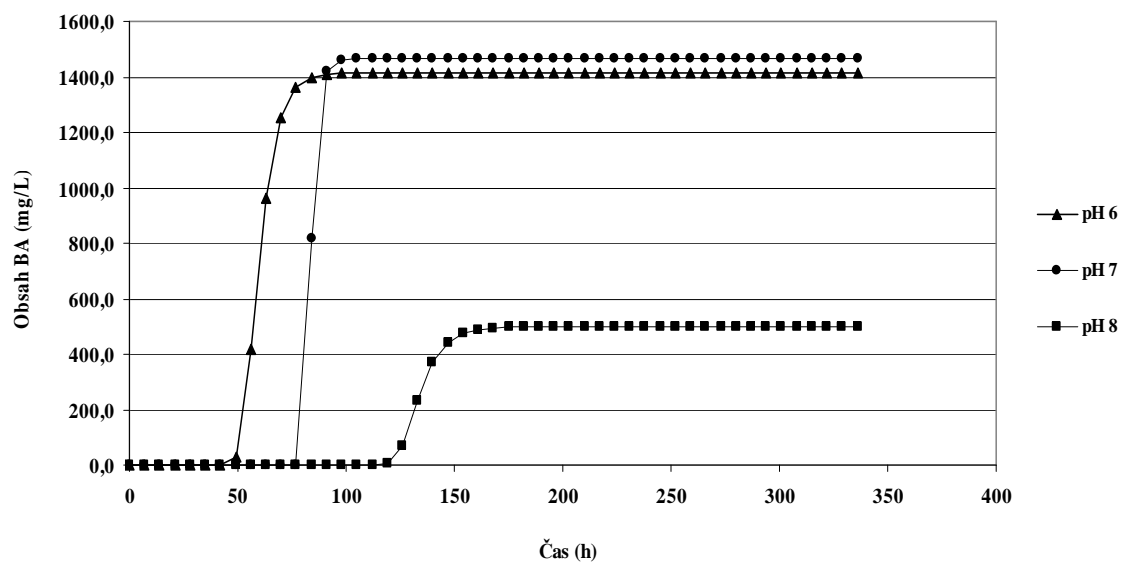


PŘÍLOHA P IV: PRODUKCE PUTRESCINU PŘI 10 °C

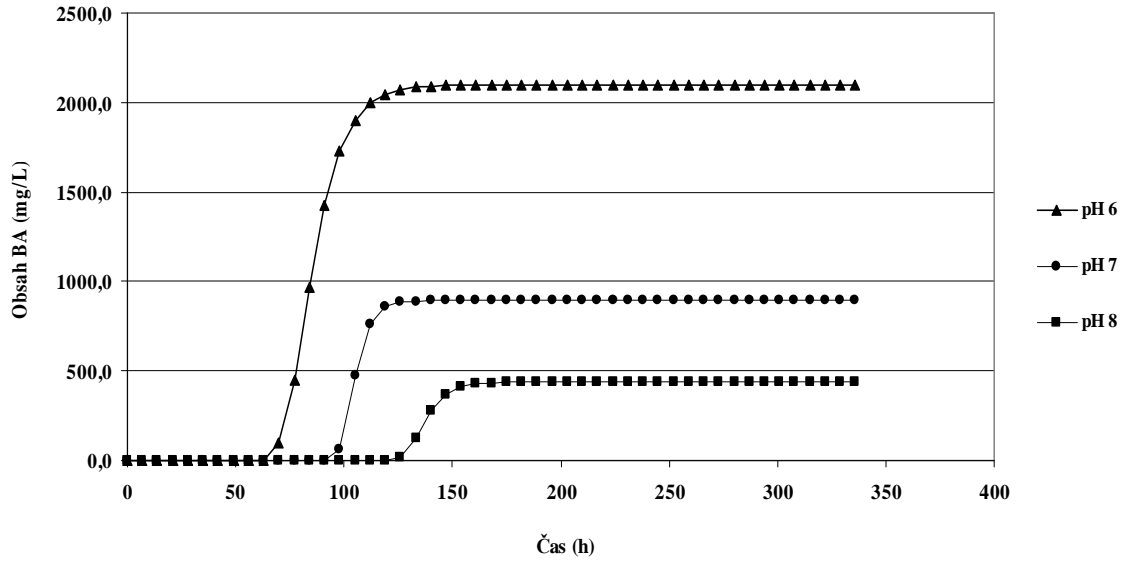
0 % NaCl



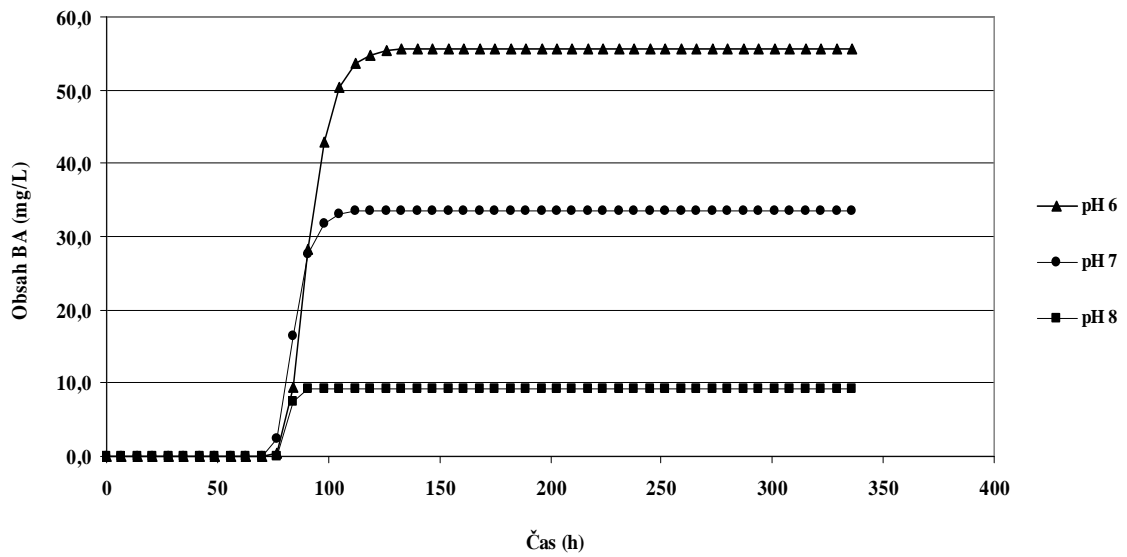
1 % NaCl



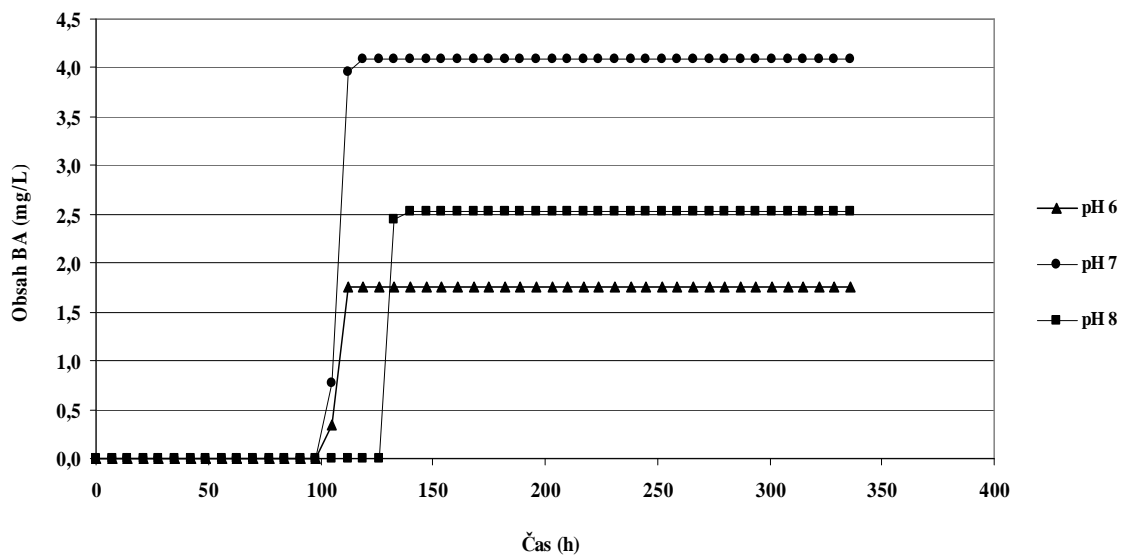
3 % NaCl



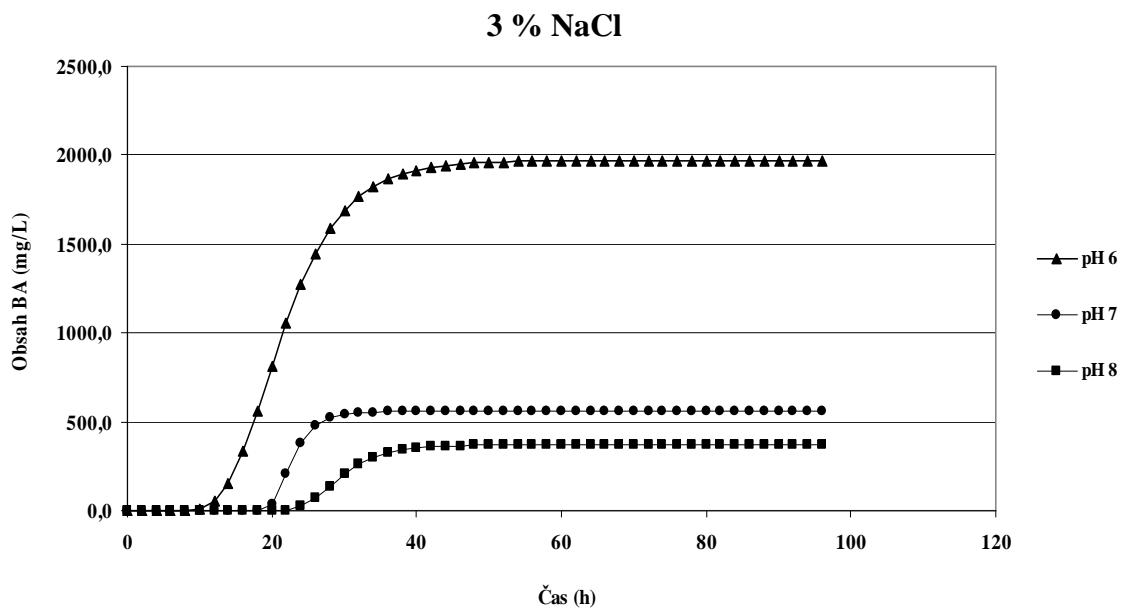
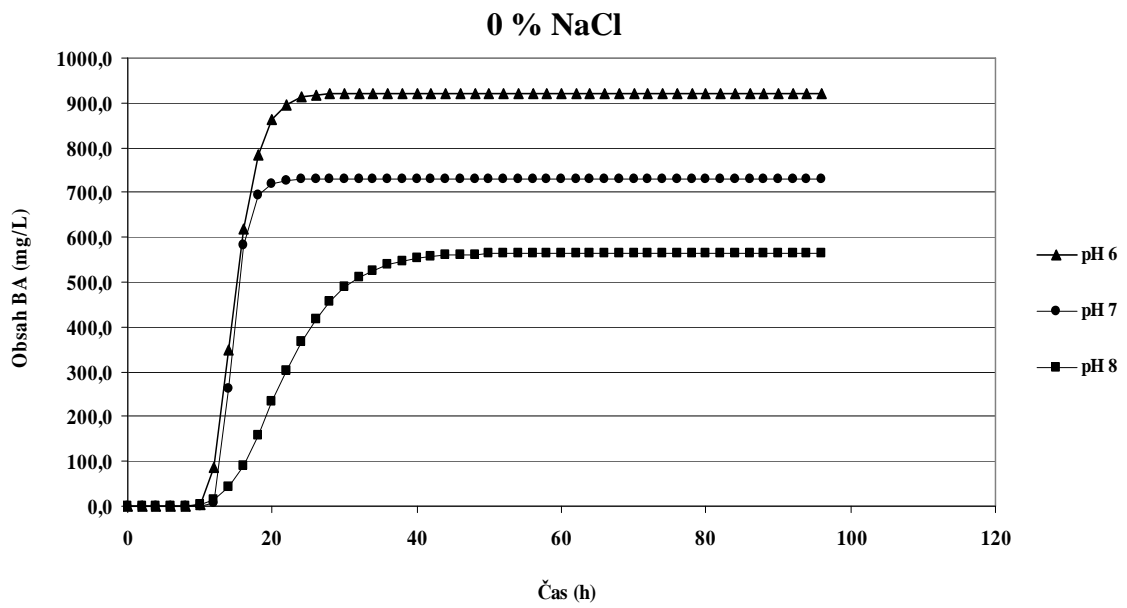
5 % NaCl



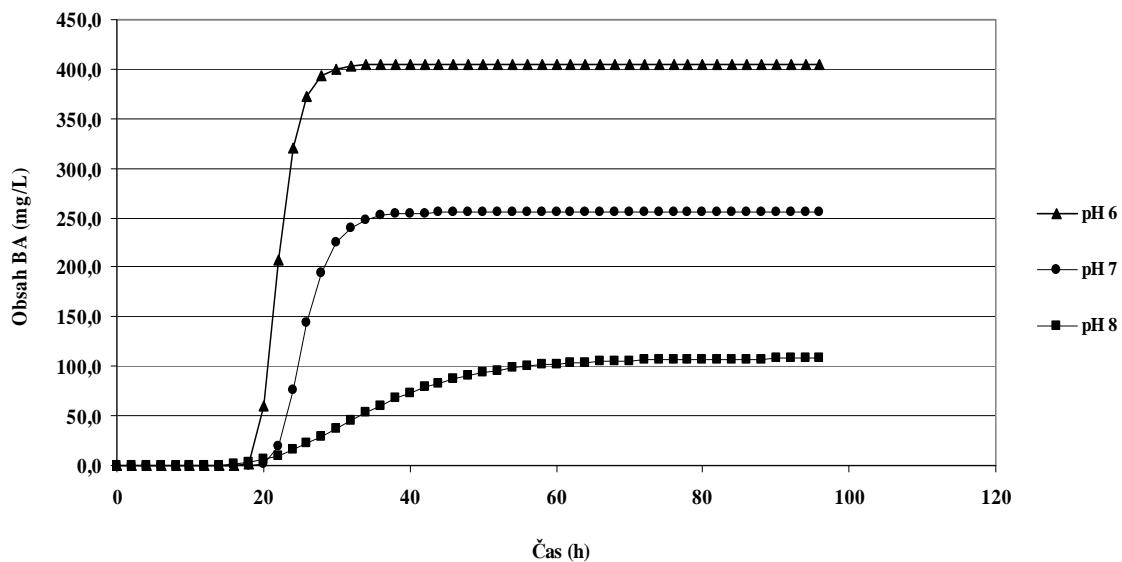
6 % NaCl



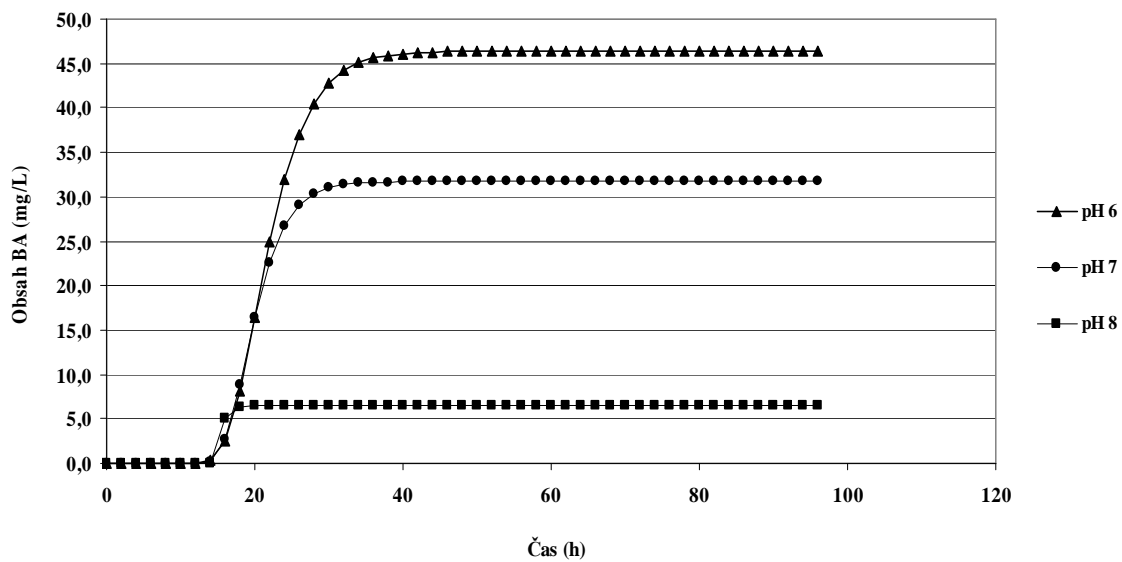
PŘÍLOHA P V: PRODUKCE PUTRESCINU PŘI 20 °



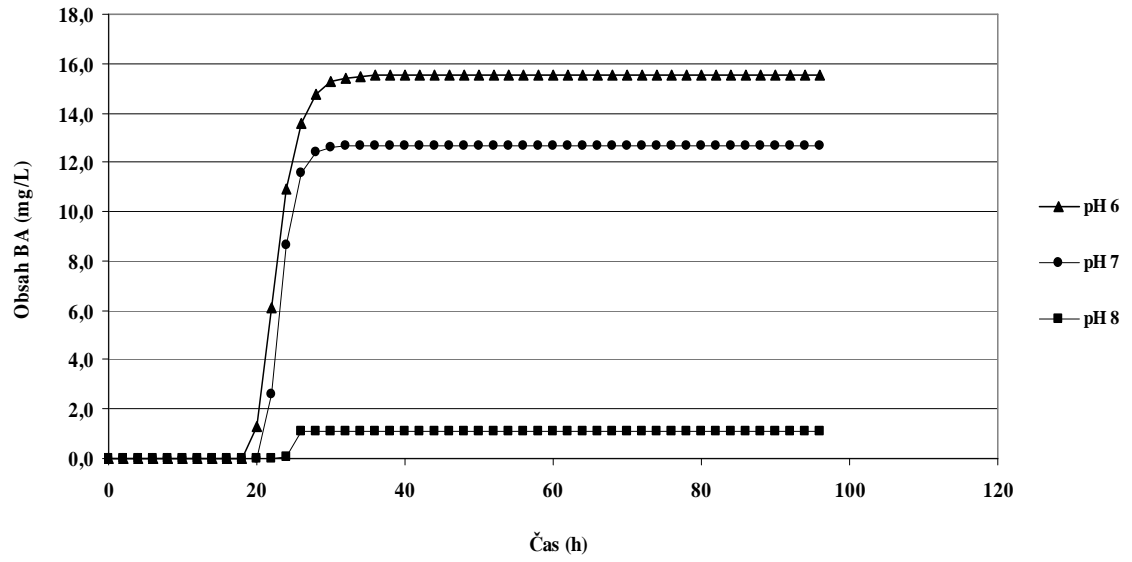
4 % NaCl



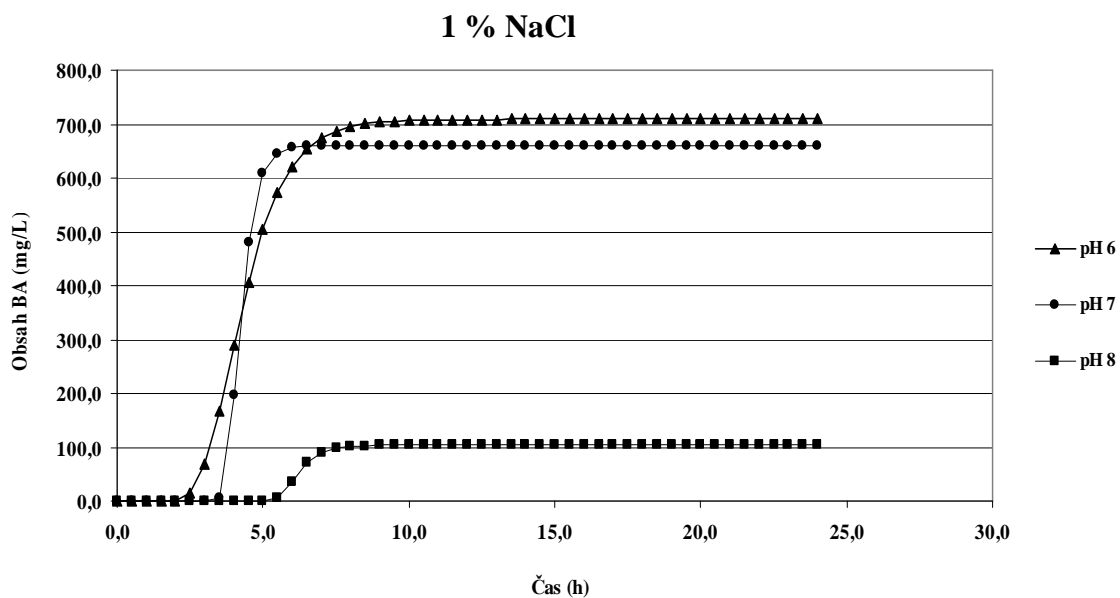
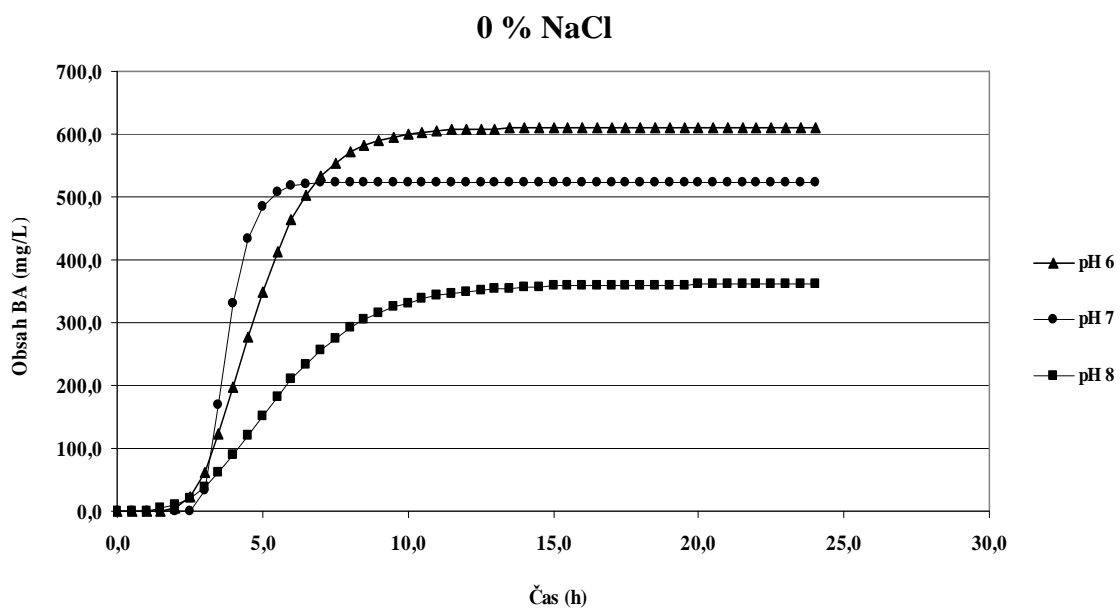
5 % NaCl

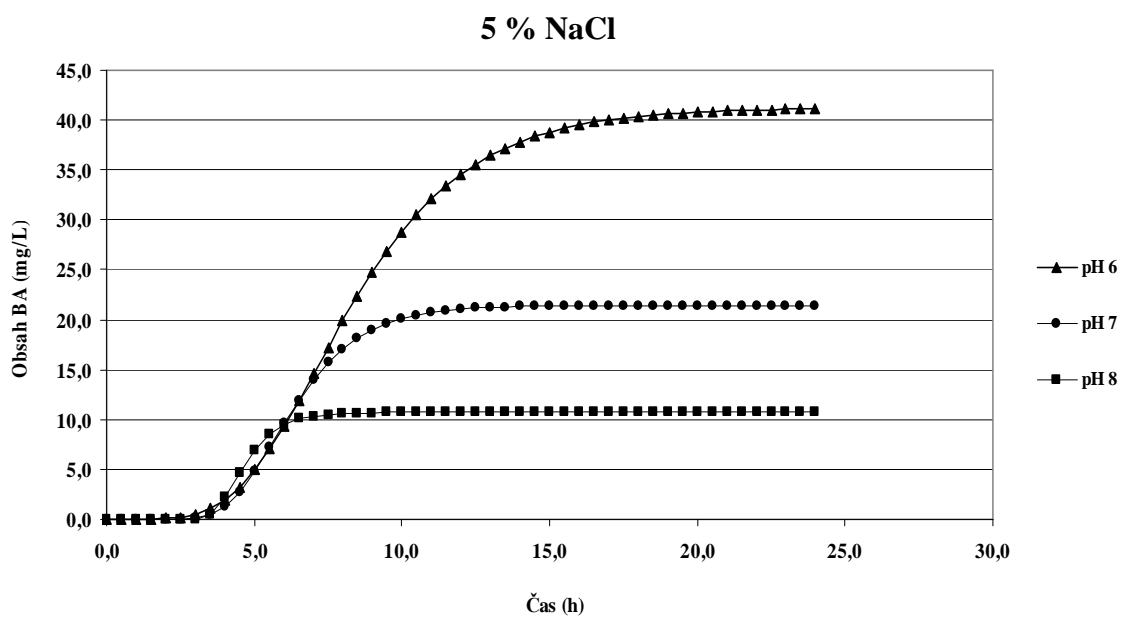
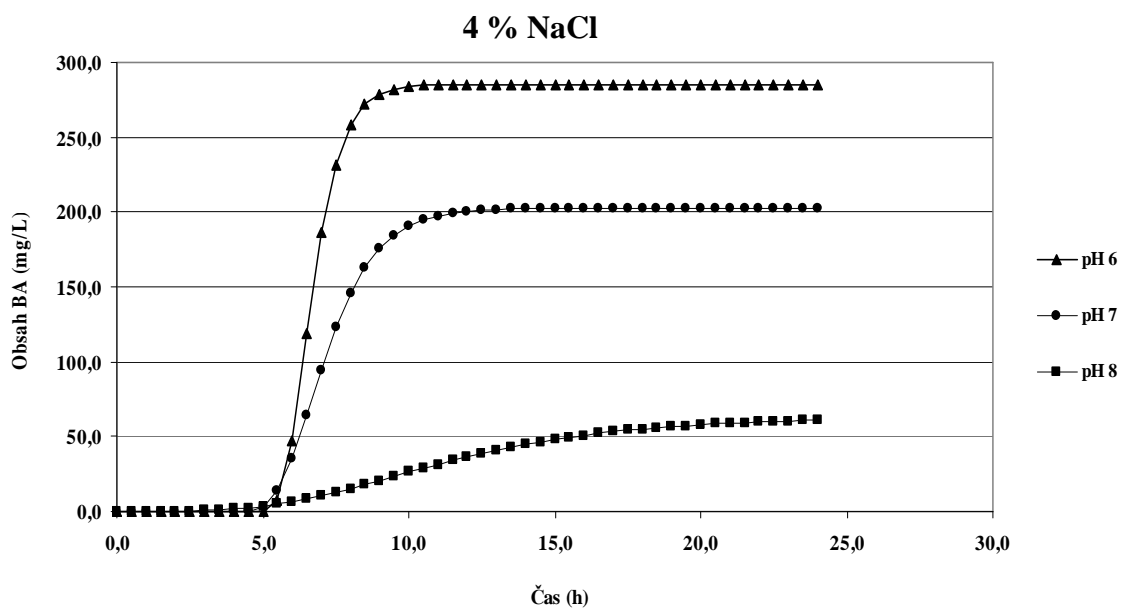


6 % NaCl

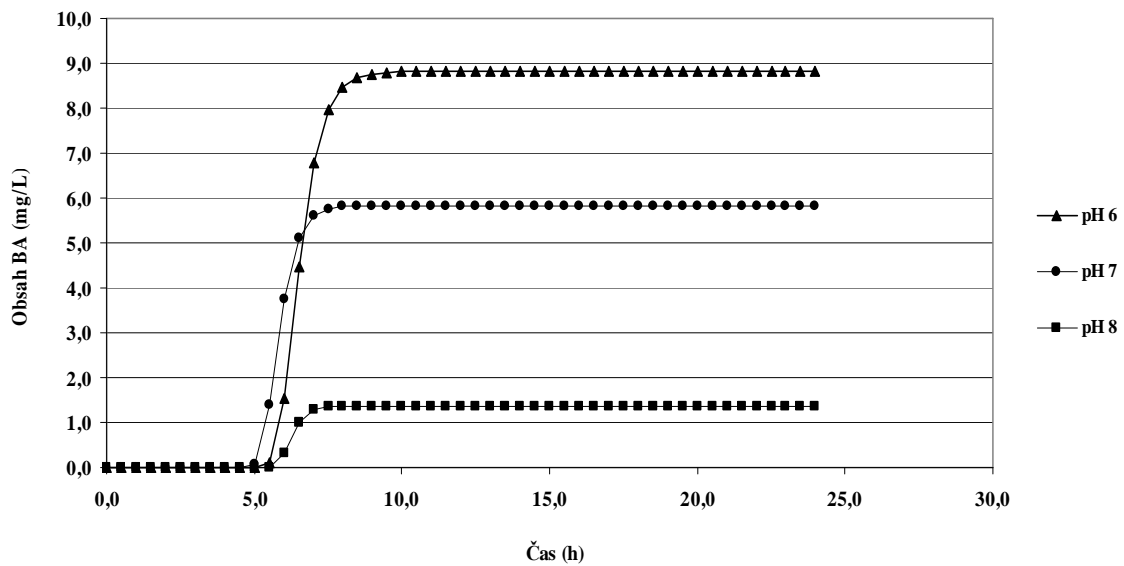


PŘÍLOHA P VI: PRODUKCE PUTRESCINU PŘI 37 °C

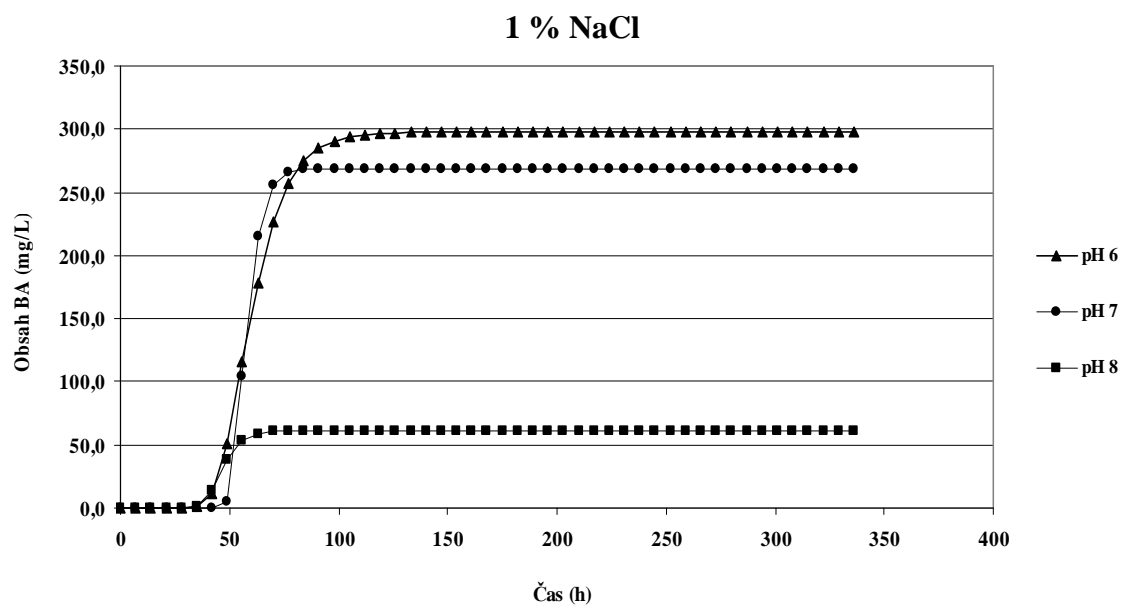
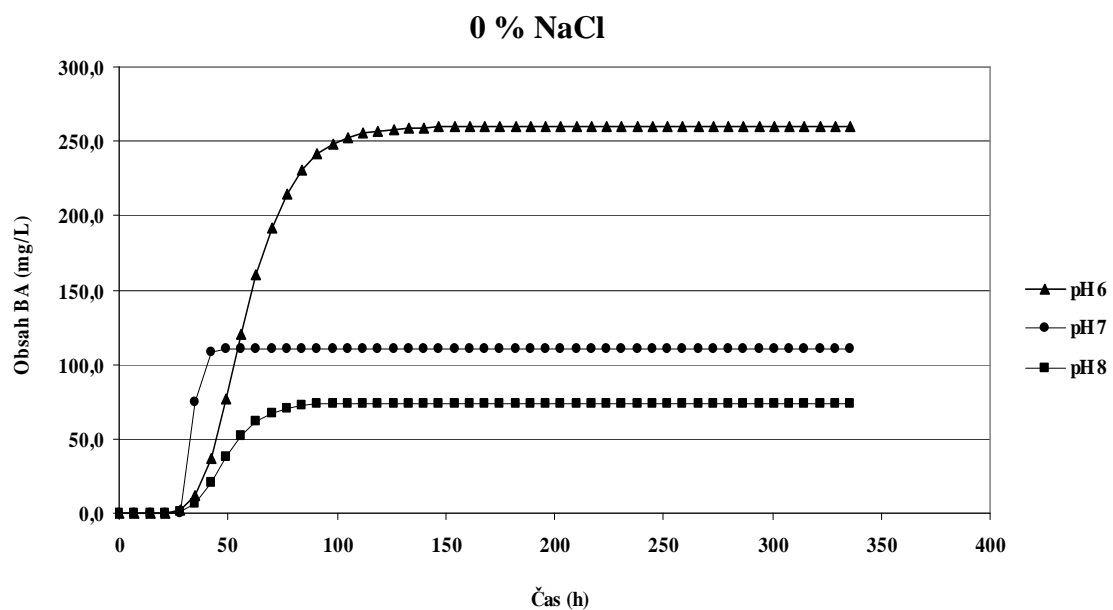




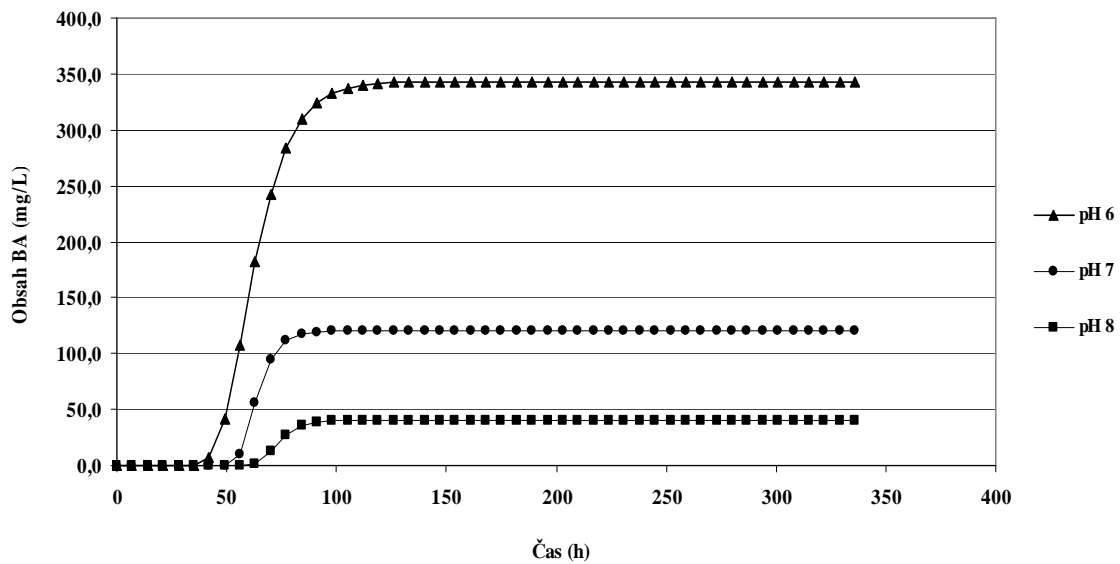
6 % NaCl



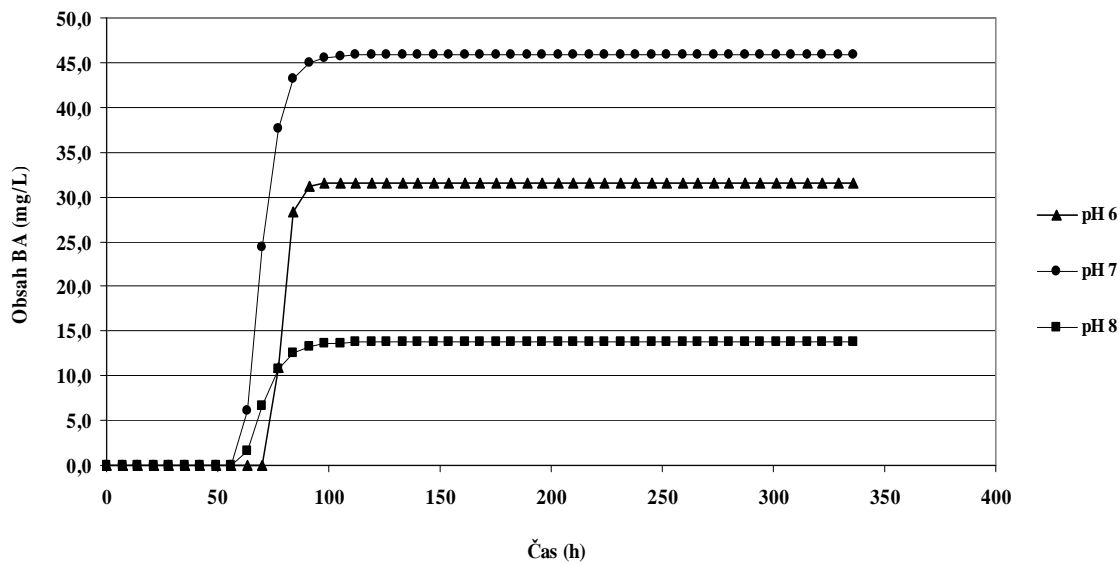
PŘÍLOHA P VII: PRODUKCE KADAVERINU PŘI 10 °C



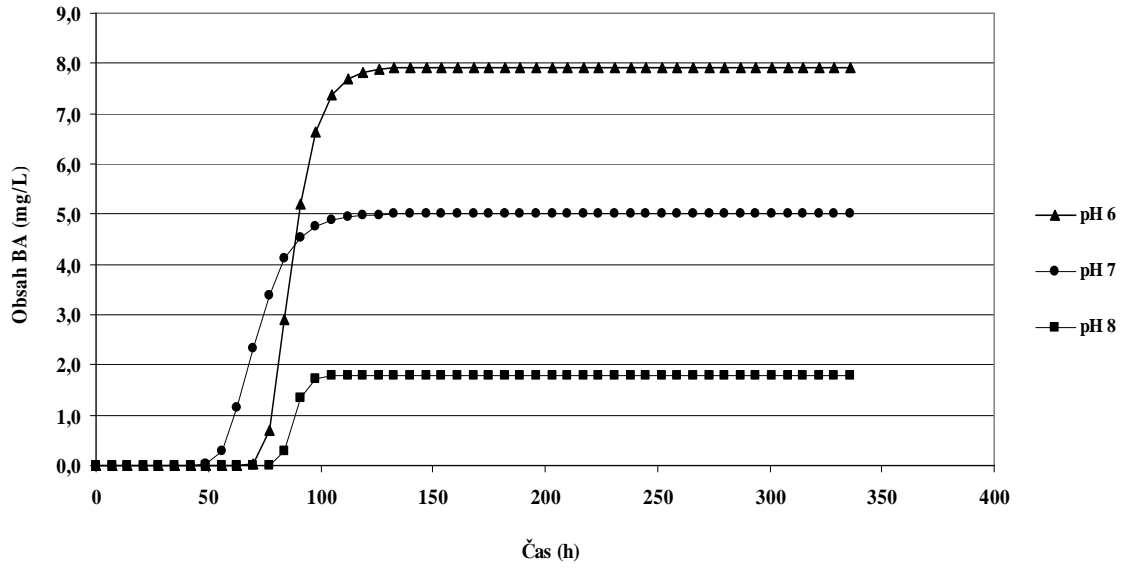
3 % NaCl



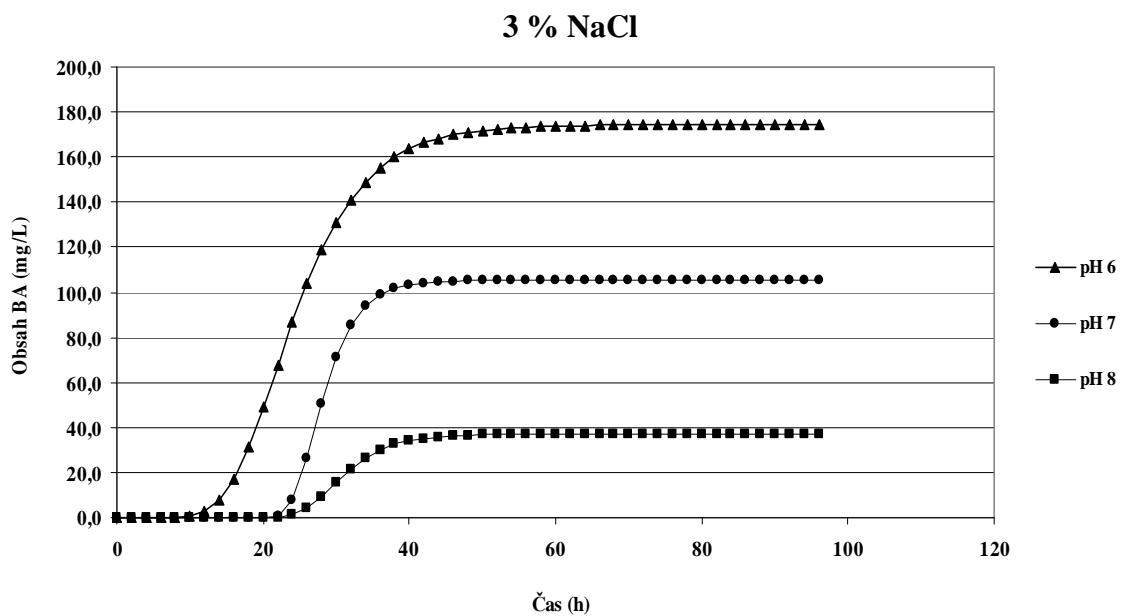
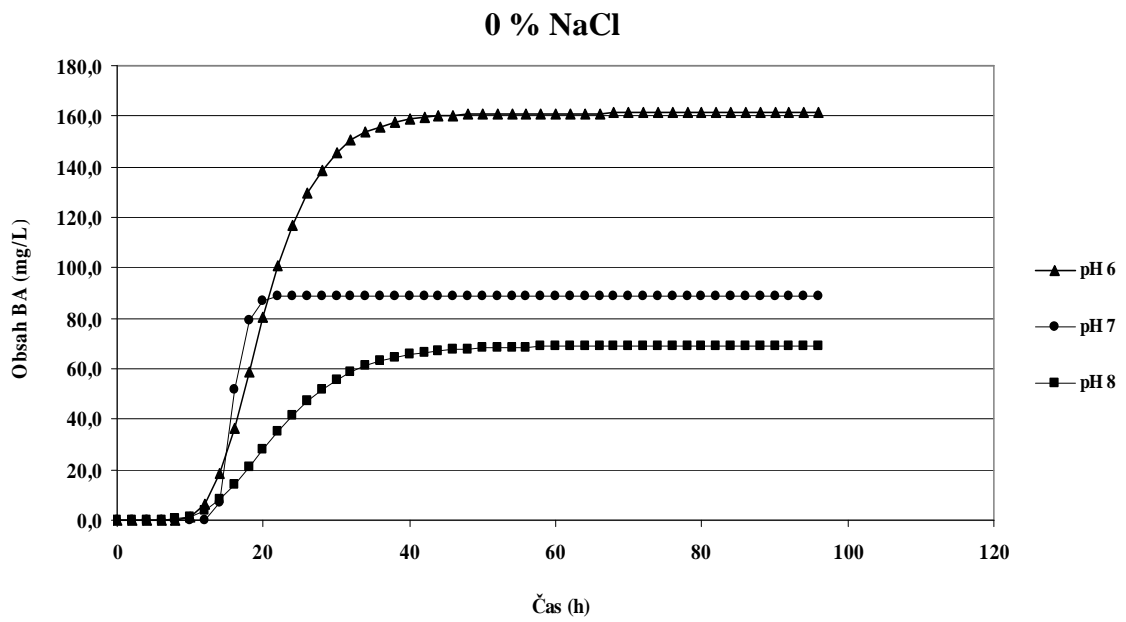
4 % NaCl



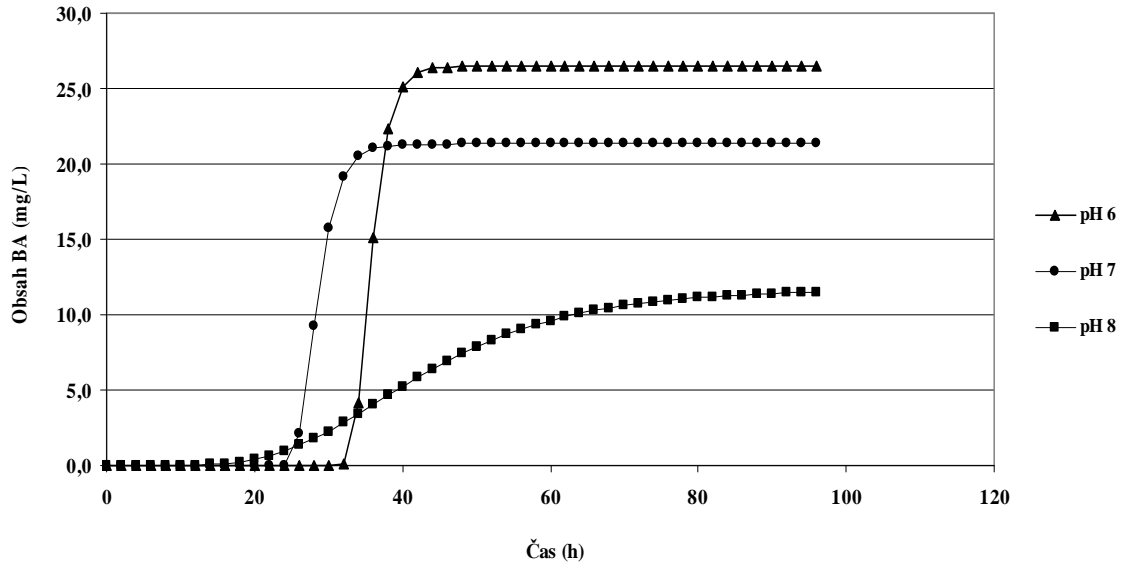
5 % NaCl



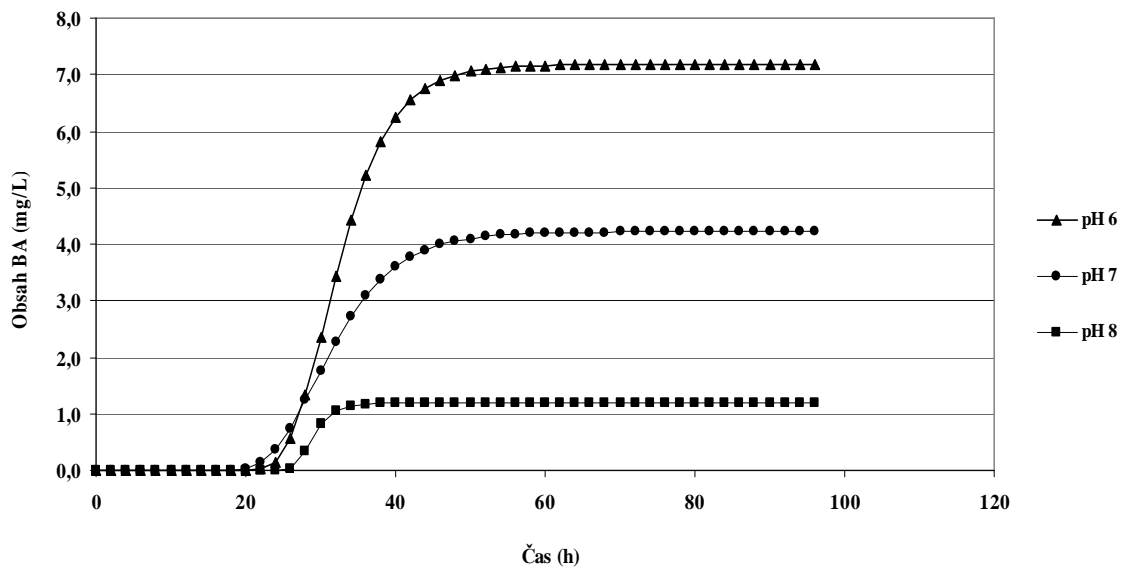
PŘÍLOHA P VIII: PRODUKCE KADAVERINU PŘI 20 °C



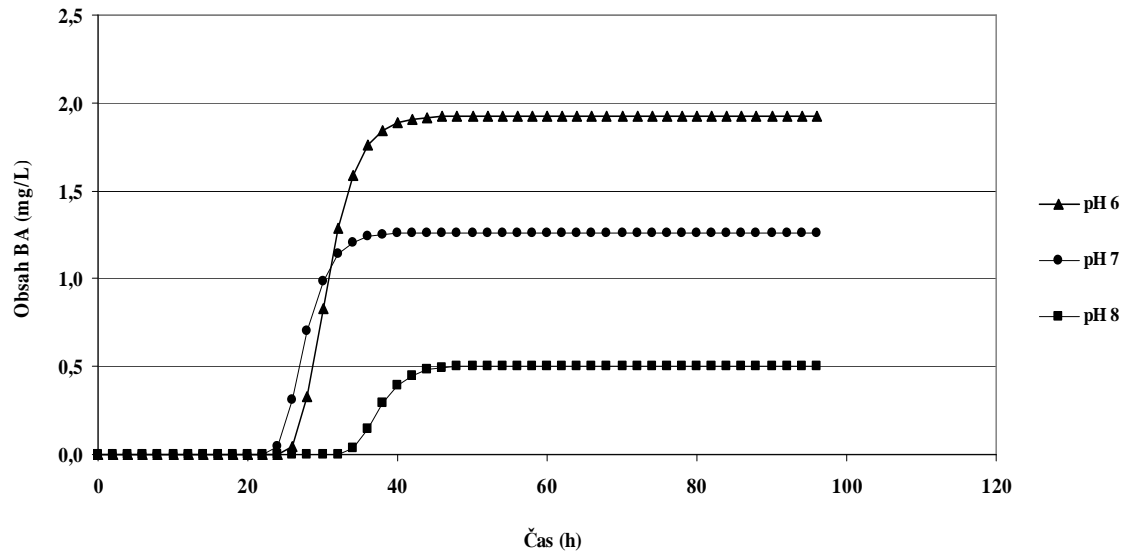
4 % NaCl



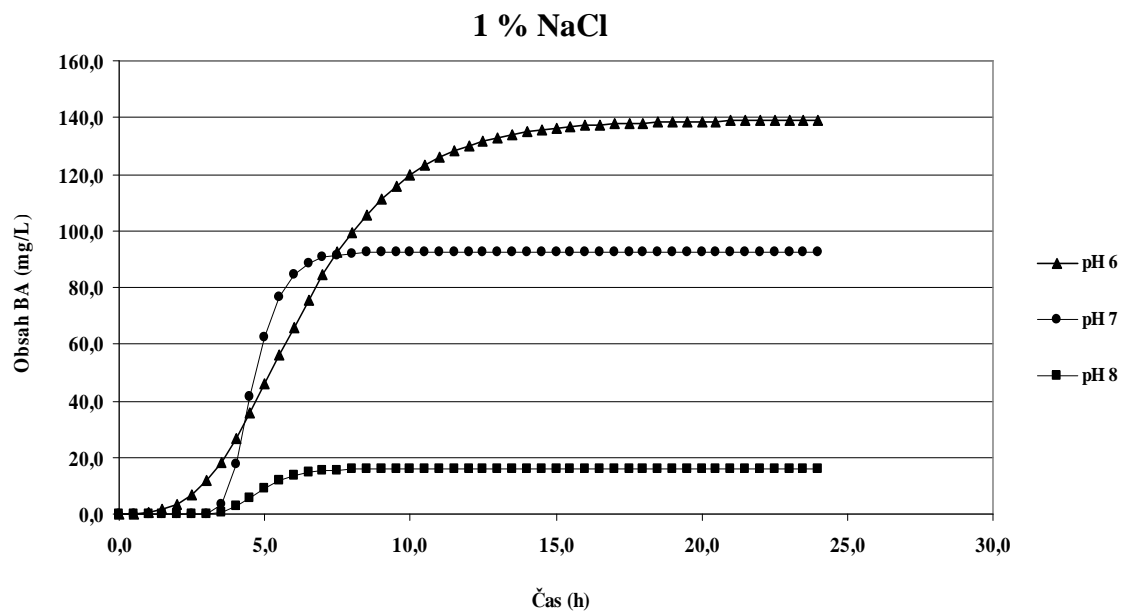
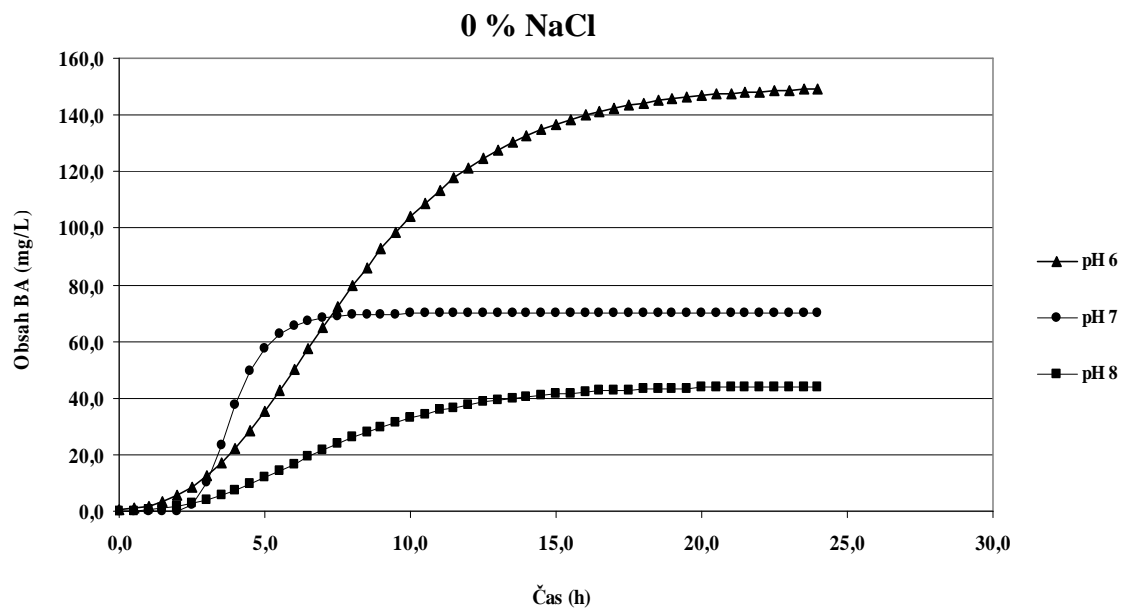
5 % NaCl



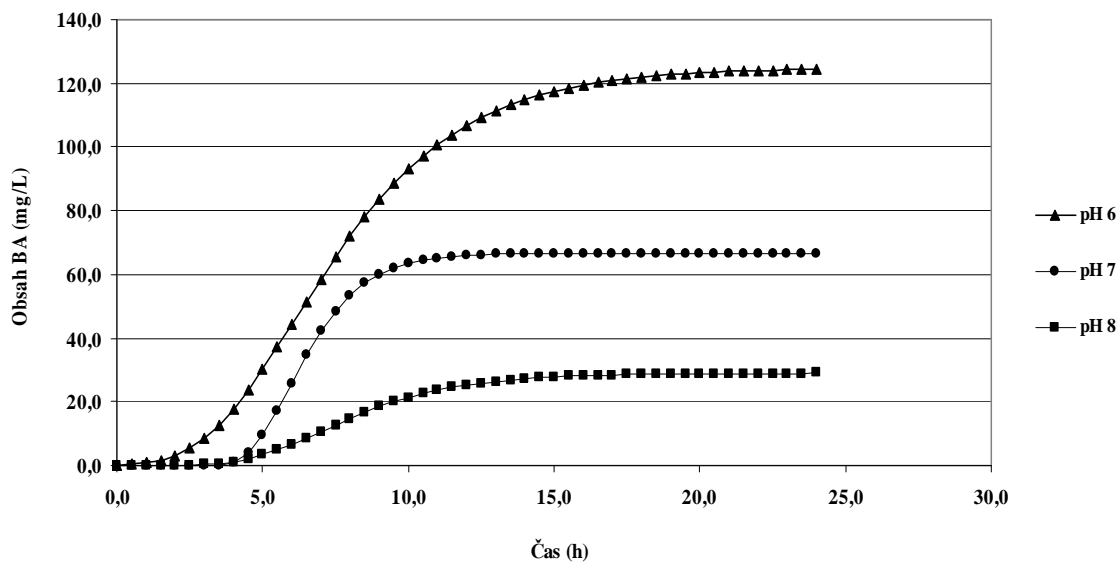
6 % NaCl



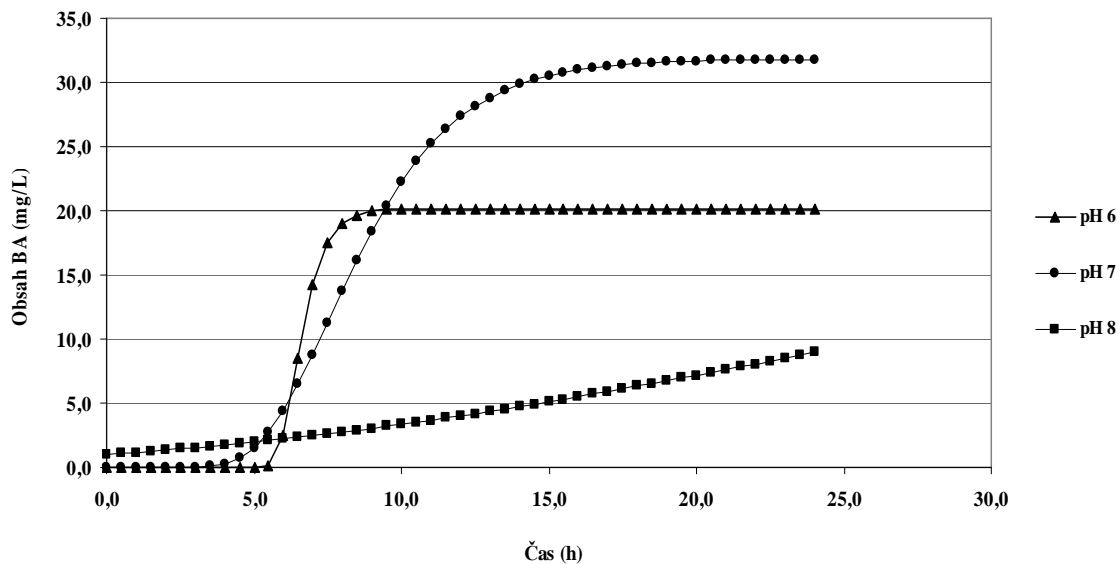
PŘÍLOHA P IX: PRODUKCE KADAVERINU PŘI 37 °C



3 % NaCl



4 % NaCl



6 % NaCl

