

**Faktory ovlivňující produkci  
biogenních aminů  
u vybraných bakterií rodů  
*Enterococcus a Staphylococcus***

Ing. Pavel Pleva, Ph.D.

Teze disertační práce

Teze disertační práce

**Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů u  
vybraných bakterií rodů  
*Enterococcus* a *Staphylococcus***

**Factors influencing biogenic amines production by selected  
strains of genera *Enterococcus* and *Staphylococcus***

Autor: Ing. Pavel Pleva

Studijní program: P2901 Chemie a technologie potravin

Studijní obor: 2901V013 Technologie potravin

Školitel: doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Konzultant: doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

Oponenti: prof. Ing. Miroslava Kačániová, Ph.D.  
doc. Ing. Mária Greifová, Ph.D.  
prof. Ing. Stanislav Kráčmar, DrSc.

Zlín, 10/2017

© Pavel Pleva

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis**.  
Publikace byla vydána v roce 2017

Klíčová slova: *Enterococcus, Staphylococcus, růstové podmínky, biogenní aminy, HPLC*

Key words: *Enterococcus, Staphylococcus, growth conditions, biogenic amines, HPLC*

Plná verze disertační práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

ISBN 978-80-7454-689-1

*„Cílem vzdělání a moudrosti je, aby člověk viděl před sebou jasnou cestu života, po ní opatrně vykročoval, pamatoval na minulost, znal přítomnost a předvídal budoucnost.“*

[Jan Amos Komenský]

#### Poděkování:

Děkuji všem, kdo jakkoli přispěli k sestavení této práce, mé školitelce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. a doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a čas, který mi věnovali během celého doktorského studia. Ing. *et* Ing. Ludmile Zálešákové, Olze Haukové, Bc. Veronice Kučabové a kolektivu z mikrobiologických a chemických laboratoří za pomoc a vytvoření přátelského pracovního prostředí. Poděkování patří rovněž kolegům z Ústavu technologie potravin a Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí FT UTB ve Zlíně za podporu a motivaci k sepsání této práce. Velký dík chci vyjádřit svým blízkým za trpělivou podporu při finálním sepsování této práce.

Testované a identifikované bakteriální kmeny byly získány z Ústavu fyziologie hospodářských zvířat, Slovenské akademie věd v Košicích. Kmeny laskavě poskytla MVDr. Andrea Lauková, CSc.

Tato práce vznikla za podpory grantu Grantové agentury České republiky GAČR 503/11/1417 a interních grantů Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně IGA/12/FT/11/D, IGA/FT/2012/027, IGA/FT/2013/013.

## ABSTRAKT

Biogenní aminy vznikají dekarboxylázovou aktivitou mikroorganismů v potravinách. Jejich vysoké množství přijímané potravinami může ohrozit kvalitu a bezpečnost potravin a mohou negativně působit na zdraví člověka. Cílem dizertační práce bylo zjistit vliv faktorů na dekarboxylázovou aktivitu vybraných kmenů enterokoků a stafylokoků izolovaných z potravin. V této práci byl nejprve proveden skrínig produkce 8 biogenních aminů (fenyletylamin, histamin, kadaverin, putrescin, tryptamin, tyramin, spermidin a spermin) u bakterií rodu *Enterococcus* (celkem 33 kmenů) izolovaných z masa králíka (*Oryctolagus cuniculus*) a rodu *Staphylococcus* (celkem 21 kmenů zařazených do 5 druhů) izolovaných ze střevního obsahu pstruha potočního (*Salmo trutta*). Detekce biogenních aminů byla provedena pomocí HPLC s UV detekcí po předchozí derivatizaci dansylchloridem. Jako faktory, které mohou významně dekarboxylázovou aktivitu ovlivnit (akcelerátor vs. inhibitor), bylo sledováno pH, teplota a přidavek chloridu sodného. Kinetika tvorby biogenních aminů byla sledována v průběhu kultivace bakterií. Všechny studované enterokoky produkovaly převážně tyramin a putrescin. Putrescin v množství nad  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  produkovaly dva kmeny *Enterococcus faecium*. Tyramin byl produkován ve velmi vysokých množstvích, celkem 12 kmenů enterokoků tvořilo více než  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$ . Suma všech sledovaných biogenních aminů byla ovlivněna především množstvím vyprodukovaného tyraminu. Bylo zjištěno, že stafylokoky jsou významnějšími producenty biogenních aminů (tyramin, putrescin a kadaverin) než enterokoky (tyramin, ojediněle putrescin). Největší vliv na produkci biogenních aminů ze sledovaných faktorů měla teplota. Při nižších teplotách kultivace byla produkce tyraminu po 24 hodinové kultivaci nižší než při kultivační teplotě  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (*Enterococcus faecium*  $2201 \text{ mg.l}^{-1}$ ; *Enterococcus* sp.  $1700 \text{ mg.l}^{-1}$ ; *Staphylococcus pasteurii*  $1866 \text{ mg.l}^{-1}$ ; *Staphylococcus hominis*  $1260 \text{ mg.l}^{-1}$ ; *Staphylococcus epidermidis*  $1319 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Enterokoky produkovaly významnější množství tyraminu a fenyletylaminu při pH 5 – 6, kdy s rostoucí teplotou rostla produkce v oblasti pH 6. Při vyšší teplotě nemělo pH významný vliv na produkci tyraminu. Stafylokoky produkovaly při pH 7 dvaapůlkrát více tyraminu než při pH 5. Nejvíce byly sledované BA produkovány v médiu s přídatkem NaCl do 3 % (w/v). Enterokoky a stafylokoky jsou významnými producenty tyraminu.

## ABSTRACT

Biogenic amines are produced by the decarboxylase activity of microorganisms in food. Their high amounts can adversely affect human health. Therefore, the aim of this thesis was to determine the influence of factors on the decarboxylase activity of selected strains of enterococci and staphylococci, which were isolated from selected food. In this work, the potential to produce 8 biogenic amines (phenylethylamine, histamine, cadaverine, putrescine, tryptamine, tyramine, spermidine and spermine) by *Enterococcus* and *Staphylococcus* strains was investigated. The *Enterococcus* strains (a total of 33 strains) were isolated from rabbit meat (*Oryctolagus cuniculus*) and a total of 21 *Staphylococcus* strains were isolated from the intestinal content of a trout (*Salmo trutta*). In addition, the effect of selected environmental factors; such as temperature, pH, and salt concentration; on decarboxylase activity of the studied microorganisms was tested. The kinetics of biogenic amines formation were monitored during cultivation of bacteria prepared by derivatization with dansyl chloride and analysed by HPLC equipped with UV detection. The obtained results showed that all studied enterococci produced predominantly tyramine and putrescin. Also, putrescin in excess of 100 mg.l<sup>-1</sup> was produced by two strains of *Enterococcus faecium*. Further, each of 12 strains of enterococci produced more than 1000 mg.l<sup>-1</sup> of tyramine. Therefore, the sum of all observed biogenic amines was dependent on the amount of produced tyramine. The obtained results indicate that staphylococci were more important biogenic amine producers (tyramine, putrescin and cadaverine) than enterococci (tyramine, sometimes putrescine). In accordance with obtained results it can be concluded that, the most significant influence on biogenic amines production had temperature. At lower cultivation temperatures, tyramine production by the selected microorganisms was lower than at temperature of 30 °C after 24 hours (*Enterococcus faecium* 2201 mg.l<sup>-1</sup>, *Enterococcus* sp., 1700 mg.l<sup>-1</sup>, *Staphylococcus pasteurii* 1866 mg.l<sup>-1</sup>, *Staphylococcus hominis* 1260 mg.l<sup>-1</sup>; *Staphylococcus epidermidis* 1319 mg.l<sup>-1</sup>). Enterococci produced a substantial amount of tyramine and phenylethylamine at pH 5 - 6, with highest production of mentioned amines at 30 °C and pH 6. The influence of pH on tyramine production by enterococci at 30 °C was negligible. Furthermore, staphylococci produced 2.5 times more tyramine at pH 7 than at pH 5. Also, the influence of the addition of NaCl was apparent and the most of the tested biogenic amines were produced when applied NaCl below 3% (w/v). In conclusion, enterococci and staphylococci are significant producers of tyramine.

## OBSAH

ABSTRAKT .....	4
ABSTRACT .....	5
OBSAH.....	8
1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	9
1.1 Charakteristika biogenních aminů .....	9
1.2 Funkce a význam biogenních aminů a polyaminů .....	10
1.3 Mechanismus tvorby biogenních aminů u bakterií .....	10
1.4 Výskyt a význam biogenních aminů v potravinách .....	12
1.5 Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů .....	17
2. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE.....	18
3. MATERIÁL A METODY.....	19
3.1 Použité bakteriální kmeny .....	19
3.2 Kultivační podmínky .....	19
3.3 Popis experimentální části .....	20
3.4 Statistické metody hodnocení dat .....	21
4. VÝSLEDKY A DISKUZE .....	22
4.1 Výsledky a diskuze experimentu I – dekarboxylázová aktivita .....	22
4.2 Výsledky a diskuze experimentu II – sledování vlivu faktorů .....	24
ZÁVĚR.....	32
PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI.....	33
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	34
SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	46
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	47
PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI .....	48
<i>CURRICILUM VITAE</i> .....	51

# 1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Bezpečnost potravin je bezpochyby důležitou prioritou evropské politiky nakládání s potravinami. Tento pojem je odvozen z anglického „food safety“ a dá se nejlépe vyjádřit jako zdravotní a hygienická nezávadnost potravin. Bezpečnost potravin zahrnuje správnou výrobní a hygienickou praxi v celém potravinovém řetězci, tedy od výroby hnojiv až po získání potravin spotřebitelem, a to včetně bezpečnosti krmiv, souvisejících služeb a obalů. Požadavky spotřebitelů s cílem zvýšit bezpečnost potravin vedou v některých evropských zemích k tvorbě pokynů ke kontrole výskytu a tvorby biogenních aminů v potravinách.

Výskyt biogenních aminů (BA) v potravinách a jejich význam v bezpečnosti potravin je již dlouho znám (Gale, 1946). V posledních 25 letech začalo systematické prokazování BA v potravinách (Shalaby, 1996; Silla Santos, 1996). Stále rostoucí množství publikací o přítomnosti BA v potravinách naznačuje aktuálnost a nezbytnost získat hlubší znalosti o biochemických mechanismech produkce BA. Studium dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů napomáhá k objasnění původu BA v potravinách, ale také rozkrývá roušku poznání o akumulaci BA v potravinách a s tím související rizika (Benkerroum, 2016; Shiling *et al.*, 2016). Vzhledem k tomu, že stafylokoky i enterokoky jsou hojně se vyskytujícími mikroorganismy osídlujícími těla teplokrevných živočichů včetně člověka, může docházet k přenosu a přežití těchto mikroorganismů v potravinách, a to nejenom během přípravy, ale i v průběhu technologického zpracování potravin (Franz, 2003; Sedláček, 2007).

Evropská legislativa definuje maximální povolený limit biogenních aminů (BA) dle Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005, ve znění pozdějších předpisů. Obsah biogenních aminů (BA) jako jednoho z významných metabolitů některých mikroorganismů je legislativou ES stanoven pouze v rybach a produktech rybolovu (histamin  $<100 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Tento limit může být v případě histaminu ve dvou vzorcích z devíti z jedné šarže překročen až do hodnoty  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Pro produkty rybolovu, které byly ošetřeny enzymatickým zráním v láku, je limit posunut ve dvou vzorcích z devíti z jedné šarže až na hodnotu  $400 \text{ mg.kg}^{-1}$  (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES), 2005).

## 1.1 Charakteristika biogenních aminů

Podle definice Askar a Treptow (1986) jsou biogenní aminy bazické dusíkaté sloučeniny tvořené především dekarboxylací aminokyselin nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů. Dekarboxylace je reakce, kdy se odbourává karboxylová skupina a vytváří se oxid uhličitý za účasti dekarboxyláz (Murray, 2002). Biogenní aminy jsou organické báze s nízkou molekulovou hmotností mající heterocyklickou (histamin, tryptamin), aromatickou (tyramin,  $\beta$ -fenyletylamin) nebo alifatickou (putrescin, kadaverin, spermin a spermidin) strukturu. Někteří autoři (Bardot *et al.*, 1993; Halász *et al.*, 1994; Silla Santos,



1996; Teti *et al.*, 2002; Juneja a Sofos, 2010) řadí putrescin, spermin, spermidin a kadaverin do skupiny polyaminů, které hrají důležitou roli při regulaci funkce nukleových kyselin, syntéze proteinů a stabilizaci membrán.

Bakterie, které disponují dekarboxylázovou aktivitou, jsou zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* (např. rody *Citrobacter*, *Hafnia*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* a další), proteolytické bakterie rodu *Pseudomonas*, bakterie rodů *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus* (ten Brink *et al.*, 1990; Silla Santos, 1996; Takahashi *et al.*, 2003; Özogul a Özogul, 2007; Buňková *et al.*, 2009). Také některé kmeny kvasinek mohou být producenty biogenních aminů, např. *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenia sporauvarum*, *Candida stellata*, *Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima* a *Brettanomyces bruxellensis* (Romano *et al.*, 2007). Výjimečně tvoří BA i mikromycety např. *Botrytis cinerea* v hroznovém moštu (Bäumlisberger *et al.*, 2015).

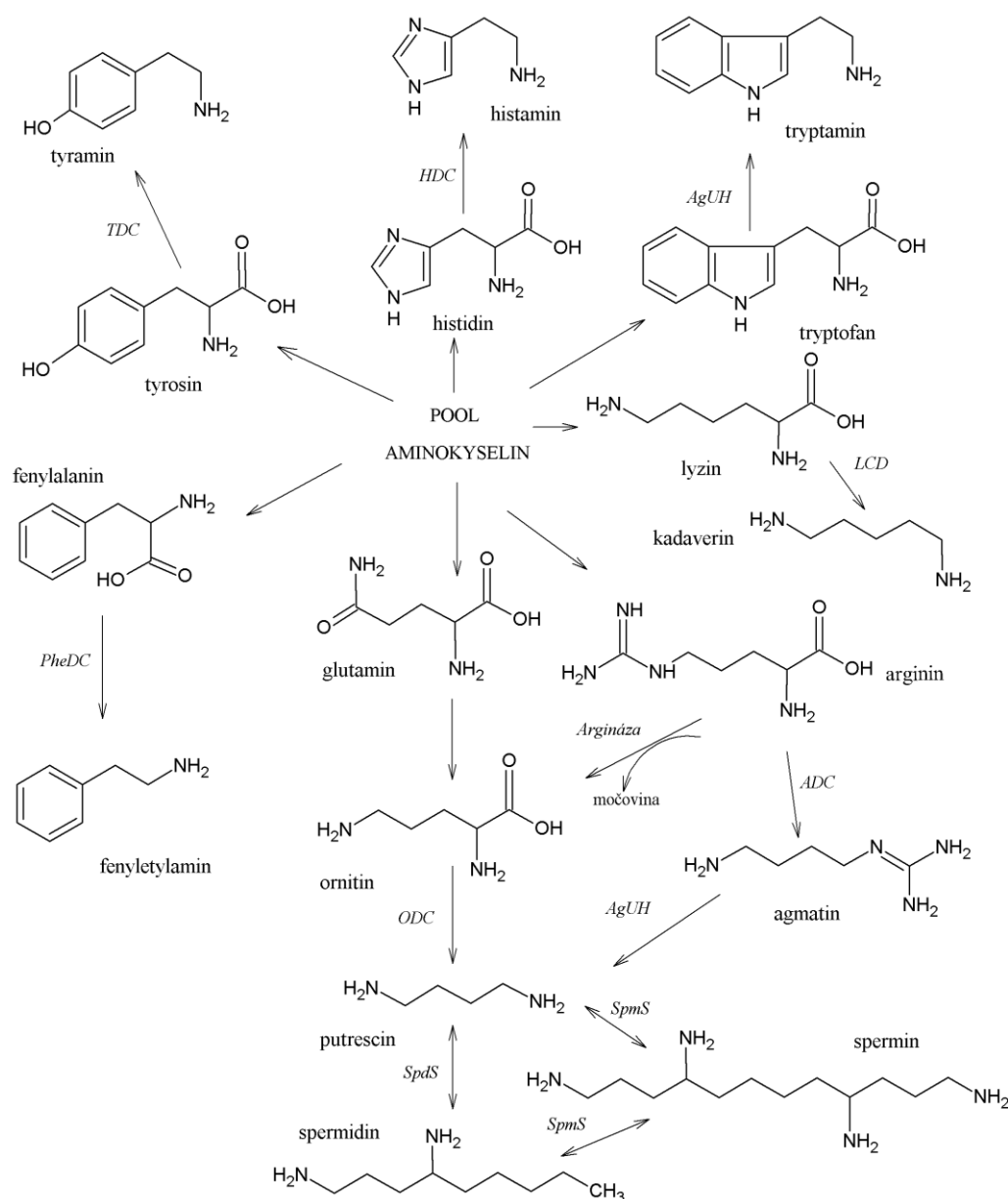
## 1.2 Funkce a význam biogenních aminů a polyaminů

BA a polyaminy se podílejí na metabolických procesech v buňkách mikroorganismů, rostlin i živočichů, kde vykazují různé biologické funkce. Podílejí se na důležitých fyziologických procesech. Jsou významné v procesech růstu, podílejí se na diferenciaci buněk, stabilizaci membrán a regulaci pH. Mohou mít přímo funkci hormonu nebo mohou být stavební látkou pro biosyntézu hormonů či alkaloidů. Jsou tak přirozenou součástí potravin rostlinného i živočišného původu. Vznikají také vlivem některých procesů při zpracování potravin (Bardot *et al.*, 1993; Halász *et al.*, 1994; Silla Santos, 1996; Teti *et al.*, 2002; Juneja a Sofos, 2010) Mikroorganizmy produkující dekarboxylázy se vyskytují jako přirozená mikroflóra suroviny nebo se do potraviny mohou dostat jako kontaminanty při zpracování a v neposlední řadě je pravděpodobnost, že jsou přidávány do potravin v závislosti na technologickém procesu výroby (Halász *et al.*, 1994). Dva hlavní důvody pro aktivaci dekarboxylačních drah mikroorganismů jsou ty, že dekarboxylace je jednou z buněčných odpovědí na stres vyvolaný kyselým prostředím, kdy se produkcí zásaditých BA zvyšuje intracelulární (a extracelulární) pH a dále tato dráha může sloužit jako doplňkový zdroj energie pro buňky (Gardini *et al.*, 2016).

## 1.3 Mechanismus tvorby biogenních aminů u bakterií

Bakterie produkující biogenní aminy jsou ve svém genomu vybaveny dekarboxylázami, které se dají rozdělit dle jejich substrátu (Obr. 1). Zobrazené reakce jsou součástí sekundárního metabolismu. U enterokoků se velmi často popisuje přítomnost genu pro membránově vázanou tyrozindekarboxylázu (*tdc*) (Bhardwaj *et al.*, 2009; Marcobal *et al.*, 2012), ale mohou se vyskytnout i jiné.

Stafylokoky izolované z potravin mohou disponovat celou řadou dekarboxyláz, které tvoří histamin, putrescin, kadaverin a další (Pachlová *et al.*, 2016).



Obr. 1. Produkce biogenních aminů dekarboxyláza pozitivními mikroorganismy (upraveno podle Halász *et al.*, 1994).

TDC – tyrozindekarboxyláza, HDC – histidindekarboxyláza, LDC – lyzindekarboxyláza, ADC – arginindekarboxyláza, ODC – ornitindekarboxyláza, PheDC – fenylalanindekarboxyláza, AgUH – agmatinureohydroláza, SpdS – spermidinsytetáza, SpmS – sperminsytetáza.

Syntéza BA může být u bakterií spojena s energetickým metabolismem a napomáhá chránit buňky vůči stresu z kyselého prostředí (Konings *et al.*, 1997; Foster, 2004). Bakteriální dekarboxylázy vykazují zvýšenou aktivitu vůči L-formám aminokyselin (Kohajdová *et al.*, 2008). Dekarboxylační reakce základních alifatických aminokyselin (L-lyzinu, L-argininu a L-ornitinu)

při tvorbě polyaminů je důležitá pro přežití buněk v kyselém prostředí. Dekarboxylázy aminokyselin v substrátu spotřebovávají intracelulární protony prostřednictvím specifického antiportového systému. Důležitým aspektem pro funkci a regulaci různých dekarboxyláz je oligomerizace. K reakci dochází, když buňky mají nepříznivé podmínky pro růst (nedostatek živin a stresové podmínky růstu) a dochází k významným změnám fyziologie, včetně indukce genů, odpovědi na stres a k biosyntéze aminokyselin (Kanjee *et al.*, 2011).

#### 1.4 Výskyt a význam biogenních aminů v potravinách

Při přípravě fermentovaných potravin lze očekávat výskyt mnoha druhů mikroorganismů, z nichž některé jsou schopny produkovat BA. Mezi fermentované potraviny patří fermentované masné a rybí výrobky, sýry, fermentovaná zelenina, pivo a víno (Silla Santos, 1996). Na začátku fermentace se vyskytuje zejména kadaverin a histamin, na konci spíše putrescin a tyramin. Ve finálním výrobku může být také přítomen tryptamin, fenyletylamin, spermidin a spermin. Daná skutečnost může být vysvětlena tím, že v případě fermentace mají přítomné mikroorganismy dostatek času metabolizovat či produkovat více substancí (Kohajdová *et al.*, 2008; Buňková *et al.*, 2010).

Zástupci rodu *Enterococcus* jsou významnými producenty BA v různých potravinách (Tab. 1). Standarová *et al.* (2009) sledovali dekarboxylázovou aktivitu *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *E. gallinarum* a *E. mundtii*. Do dekarboxylačního média byl přidán pyridoxal-5-fosfát. Produkce histaminu nebyla prokázána u žádného z testovaných kmenů. *E. faecalis* a *E. faecium* jsou v této studii označeny za největší producenty tyraminu (1485-2363 mg.l<sup>-1</sup>). V práci je také jako významný producent tyraminu uveden *E. casseliflavus* ( $\leq 2016$  mg.l<sup>-1</sup>), což je při srovnání s prací Rea *et al.* (2004), kteří uvádějí, že kmen tohoto druhu (izolát ze sýru čedar) je tyrozindekarboxyláza negativní, odlišný výsledek. Rea *et al.* (2004) sledovali 6 kmenů *Enterococcus faecalis*, jeden kmen *E. faecium*, *E. durans* a *E. casseliflavus*. Tyto mikroorganismy se mohou podílet na vývoji chuti a vůni sýrů čedar. Mikroorganismy byly izolovány po 48 týdnech zrání sýru při 8 °C. Všechny kmeny, kromě *E. casseliflavus*, produkovaly tyramin ( $< 162$  mg.kg<sup>-1</sup>). Kolektiv autorů Liu *et al.* (2013) potvrdil, že *E. faecalis* patří mezi potenciální producenty BA. Kmeny byly získány z kachny divoké a jejich kultivace probíhala v MRS bujónu s prekurzory BA (aminokyselinami). Bylo zjištěno, že *E. faecalis* tvoří biogenní aminy tyramin ( $< 320$  mg.kg<sup>-1</sup>) a fenyletylamin ( $< 220$  mg.kg<sup>-1</sup>).

Tab. 1. Detekovaná produkce biogenních aminů nebo genů pro dekarboxylázy u bakterií rodu *Enterococcus*

Producenti a jejich zdroje výskytu*	Detekované biogenní aminy**; geny pro enzymy	Reference
<i>E. faecalis</i> – maso kachny divoké	TYM, PHE	Liu <i>et al.</i> , 2013
<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> – mateřské mléko	TYM, HIS, PUT, CAD	Reviriego <i>et al.</i> , 2005
<i>E. faecalis</i>	PUT, CAD, SPD	Kuley <i>et al.</i> , 2013
<i>Enterococcus</i> sp., <i>E. mundtii</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. faecium</i>	TYM, AGM	Kalhotka <i>et al.</i> , 2012
<i>Enterococcus</i> – fermentované klobásy	TYM	Tabanelli <i>et al.</i> , 2013
<i>E. faecalis</i>	tyrozindekarboxyláza	Cebrián <i>et al.</i> , 2012
<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i>	ornitin/tyrozindekarboxyláza	Ladero <i>et al.</i> , 2012
<i>E. faecalis</i>	TYM, HIS, PUT, CAD	Calzada <i>et al.</i> , 2013
<i>E. durans</i>	tyrozindekarboxyláza	Linares <i>et al.</i> , 2012
<i>E. faecium</i> – červené víno	TYM	Capozzi <i>et al.</i> , 2011
<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> – ryby	tyrozindekarboxyláza	Muñoz-Atienza <i>et al.</i> , 2011
<i>E. durans</i>	TYM	De Palencia <i>et al.</i> , 2011
<i>E. durans</i>	HIS, TYM, SPM, SPD	Li <i>et al.</i> , 2011
<i>E. durans</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> – mléko	tyrozin/ornitin/histidindekarboxyláza	Ladero <i>et al.</i> , 2011
<i>E. sp.</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. faecium</i> – mléčné výrobky	TYM	Ladero <i>et al.</i> , 2010
<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> – potenciál probiotik	TYM, PUT	Ruiz-Moyano <i>et al.</i> , 2009
<i>E. faecium</i>	lyzin/ornitin/tyrozindekarboxyláza	Valenzuela <i>et al.</i> , 2010

Tab. 1. pokračování – detekovaná produkce biogenních aminů nebo genů pro dekarboxylázy u bakterií rodu *Enterococcus*.

Producenti a jejich zdroje výskytu*	Detekované biogenní aminy**; geny pro enzymy	Reference
<i>E. faecium</i>	TYM, PHE	Latorre–Moratalla <i>et al.</i> , 2010
<i>E. faecium</i>	tyrozindekarboxyláza	Bhardwaj <i>et al.</i> , 2009
<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Enterococcus</i> sp. – mléko	tyrozindekarboxyláza	Kučerová <i>et al.</i> , 2009
<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	TYM	Ladero <i>et al.</i> , 2010
<i>E. faecalis</i>	tyrozin/fenylalanindekarboxyláza	Pessione <i>et al.</i> , 2009
<i>E. faecalis</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. sp.</i> – niva	TYM	Standarová <i>et al.</i> , 2009
<i>E. faecalis</i> – fermentované klobásy	TYM, PHE	Gardini <i>et al.</i> , 2008
<i>E. durans</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. casseliflavus</i>	tyrozindekarboxyláza	Komprda <i>et al.</i> , 2008
<i>E. durans</i>	TYM	Fernández <i>et al.</i> , 2011
<i>E. durans</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. casseliflavus</i> – sýry	TYM	Burdychová a Komprda, 2007
<i>E. faecium</i>	tyrozin/fenylalanindekarboxyláza	Marcobal <i>et al.</i> , 2006
<i>E. faecium</i> BIFI–58	TYM	Marcobal <i>et al.</i> , 2006
<i>E. faecalis</i> – mléko	TYM, PHE	Gardini <i>et al.</i> , 2001
<i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> a <i>E. casseliflavus</i> – čedar	TYM	Rea <i>et al.</i> , 2004

\* Pokud není uveden zdroj izolátu, byla produkce BA stanovena v kultivačním médiu.

\*\* TYM – tyramin, PHE – fenyletylamin, PUT – putrescin, CAD – kadaverin, AGM – agmatin, HIS – histamin, SPM – spermin, SPD – spermidin)

Mezi významné producenty BA v různých potravinách patří i zástupci rodu *Staphylococcus* (Tab. 2).

*Staphylococcus epidermidis* je schopný produkovat histamin, kadaverin a putrescin v kultivačním médiu i v hroznovém moštu, ovšem ve víně nikoli (Benavent-Gil *et al.*, 2016). Landeta *et al.* (2013) sledovali dekarboxylázovou aktivitu u koaguláza negativních stafylokoků (*S. capitis*, *S. carnosus*, *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. vitulinus* (*S. pulvereri*), *S. xylosus* a *S. lugdunensis*). Bakterie byly izolovány z fermentovaných salámů za účelem využití bakterií jako startérových kultur. Ze všech sledovaných kmenů rodu *Staphylococcus* bylo 25 % kmenů dekarboxyláza pozitivních. *S. carnosus* byl dle výsledků studie schopen tvořit tyramin. Kmen *S. capitis* byl pozitivní na tvorbu histaminu, a to metodami PCR i TLC. *S. lugdunensis* a *S. epidermidis* tvořili putrescin a kadaverin. U kmenů *S. equorum*, *S. caprae*, *S. hominis*, *S. vitulinus*, *S. xylosus* a *S. warneri* nebyla metoda PCR ani TLC zjištěna produkce sledovaných BA (histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu) (Landete *et al.*, 2007).

Pět sledovaných kmenů *S. pasteurii* (40 % izolátů) bylo identifikováno jako histidindekarboxyláza pozitivní s vysokou tvorbou histaminu u dvou kmenů ( $\leq 945 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), ostatní kmeny tvořily histamin v nižších koncentracích ( $\leq 57 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). *S. epidermidis* a *S. capitis* (izoláty ze slaných španělských sardinek) produkovaly více než 1000 a 400  $\text{mg.kg}^{-1}$  histaminu. Podobně tomu bylo i u kmene *S. pasteurii* ( $\leq 945 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) (Kung *et al.*, 2012).

Ve studii kolektivu autorů Bermudéz *et al.* (2012) byla sledována histidin-, lyzin-, ornitin- a tyrozindekarboxylázová aktivita stafylokoků izolovaných z „tradiční španělské klobásy“. *S. equorum* produkoval putrescin ( $\leq 1400 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) i kadaverin ( $\leq 5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ ); u *S. epidermidis* byla také zjištěna tvorba putrescinu ( $\leq 977 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) a několikanásobně vyšší tvorba kadaverinu ( $\leq 36,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). U *S. saprophyticus* byla tvorba putrescinu ( $\leq 1,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) a kadaverinu nejnižší ( $\leq 4,7 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). *S. pasteurii* patří dle autorů mezi bakterie s velmi nízkou tvorbou BA, kdy koncentrace vyprodukovaného putrescinu a kadaverinu dosahovala hodnot  $< 15 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

Studie Seitter *et al.* (2011) se zabývala nežádoucími vlastnostmi stafylokoků (*S. condimenti*, *S. piscifermentans*, *S. equorum*, *S. succinus*, a *S. xylosus*), a to především produkcí BA. Bylo zjištěno, že fenyletylamin, tryptamin a tyramin jsou těmito kmeny produkovány zřídka. U sledovaných kmenů produkce kadaverinu, histaminu a putrescinu nebyla zjištěna. Zástupce *S. carnosus* byl ve studii označen za producenta putrescinu ( $\leq 126,0 \text{ mg.l}^{-1}$ ) a kadaverinu ( $\leq 5,0 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Tyto koncentrace lze považovat za potenciálně nebezpečné, a je na zvážení využití dekarboxyláza pozitivních kmenů v potravinářském průmyslu. Na druhé straně je ovšem důležité zabývat se faktory, které ovlivňují míru produkce a zvážit možná rizika, ke kterým by došlo při využití těchto kmenů v potravinářském průmyslu.

Tab. 2. Detekovaná produkce biogenních aminů nebo genů pro dekarboxylázy u bakterií rodu *Staphylococcus*.

Producenti a jejich zdroje výskytu*	Detekované biogenní aminy**; geny pro enzymy	Reference
<i>S. aureus</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>S. caprae</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. equorum</i> – masné výrobky	( <i>S. carnosus</i> ) TYM; ( <i>S. epidermidis</i> ) HIS PUT CAD	Landeta <i>et al.</i> , 2013
<i>S. pasteurii</i> , <i>S. equorum</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. saprophyticus</i>	PUT, CAD	Cachaldora <i>et al.</i> , 2013
<i>S. pasteurii</i> , <i>S. sciuri</i> – klobása z tuňáka	HIS, PUT, CAD, SPM	Kung <i>et al.</i> , 2012
<i>S. aureus</i>	PUT	Dogan <i>et al.</i> , 2012
<i>S. equorum</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. pasteurii</i> – fermentované klobásy	PUT, CAD	Bermúdez <i>et al.</i> , 2012
<i>S. hominis</i> , <i>S. sciuri</i> – ryby	HIS, CAD	Hwang <i>et al.</i> , 2011
<i>S. carnosus</i> , <i>S. condimentii</i> , <i>S. piscifermentans</i> , <i>S. equorum</i>	PHE, TYM	Seitter <i>et al.</i> , 2011
<i>S. epidermidis</i> TYH1, <i>S. warneri</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. hyicus</i>	HIS	Yokoi <i>et al.</i> , 2011
<i>S. carnosus</i> – rybí omáčka	TYM, CAD, HIS, PUT	Zaman <i>et al.</i> , 2011
<i>S. xylosum</i> , <i>S. carnosus</i> – fermentovaný salám Turecko	TYM, PUT, CAD, PHE, SPR	Gücükoglu <i>et al.</i> , 2010
<i>S. xylosum</i> , <i>S. saprophyticus</i> , ( <i>Lactobacillus</i> )	TYM, PHE, PUT, SPM, SPD	Lu <i>et al.</i> , 2010

\* Pokud není uveden zdroj izolátu, byla produkce BA stanovena v kultivačním médiu.

\*\* TYM – tyramin, PHE – fenyletylamin, PUT – putrescin, CAD – kadaverin, HIS – histamin, SPN – spermin, SPD – spermidin)

## 1.5 Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů

Produkce BA je většinou závislá na vhodných podmínkách pro rozmnožování produkční mikroflóry, a tím pádem na syntéze dekarboxyláz a dekarboxylační aktivitě. Mezi faktory, které významně ovlivňují tvorbu BA a aktivitu enzymů, lze např. zařadit (ten Brink *et al.*, 1990; Marklinder a Lonner, 1992):

- teplotu,
- pH,
- přístup kyslíku,
- aktivitu vody,
- přítomnost mikroorganismů jako producentů dekarboxyláz (množství a druhové zastoupení mikroorganismů),
- synergický efekt mezi mikroorganismy,
- množství a dostupnost aminokyselin a pyridoxal-5-fosfátu,
- dodržování hygienických postupů během výroby,
- čas (doba zrání).

Teplota prostředí má významný vliv na produkci BA. Řada studií uvádí, že obsah vyprodukovaných aminů závisí na teplotě a času. V důsledku proteolýzy dochází ke zvýšenému mikrobiálnímu růstu a podpoře pronikání BA přes buněčnou membránu. Tyto podmínky mají také vliv na aktivitu dekarboxyláz (Juneja a Sofos, 2010).

Hodnota pH je jedním z klíčových faktorů ovlivňujících aktivitu dekarboxyláz, a tím i tvorbu BA v potravinách. Bylo prokázáno, že tvorba aminů bakteriemi je fyziologický mechanismus vedoucí k potlačení kyselého prostředí, a proto je aktivita dekarboxyláz obvykle vyšší v kyselém prostředí s optimální aktivitou při pH mezi 4,0-5,5 (Juneja a Sofos, 2010).

Vysoké koncentrace rozpuštěných látek (např. makromolekulárních látek jako jsou škrob i další polysacharidy a bílkoviny i osmoaktivních látek, jako jsou cukr a chlorid sodný) snižují množství využitelné vody. Nízká aktivita vody zpomaluje růst bakterií. Přítomnost NaCl inhibuje histidindekarboxylázu a aktivuje tyrozindekarboxylázu (Kohajdová *et al.*, 2008; Silla Santos, 2010).

Zásobování kyslíkem má významný vliv na biosyntézu aminů (Silla Santos, 1996). Ve fermentovaných potravinách, kdy je kyslík nahrazen produkty fermentace (NH<sub>3</sub> nebo CO<sub>2</sub>), byli jako významní producenti BA (putrescinu, kadaverinu, fenyletylaminu a tyraminu) označeni zástupci rodů *Enterococcus*, *Staphylococcus* (Gardini *et al.*, 2001; Gennaro *et al.*, 2003; Suzzi a Gardini, 2003; Landete *et al.*, 2007; Bover-Cid *et al.*, 2008).



## 2. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem disertační práce bylo sledovat faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu vybraných bakterií rodů *Enterococcus* a *Staphylococcus*. Testované bakterie mohou být kontaminanty v potravinářské výrobě, ale zároveň mají některé potenciál probiotik (zástupci rodu *Enterococcus*). Dílčí cíle práce byly vytýčeny následovně:

- provést skríníng dekarboxylázové aktivity kultivačně (se stanovením koncentrace produkovaných BA) vybraných bakterií rodů *Enterococcus* a *Staphylococcus* kultivačně (se stanovením koncentrace produkovaných BA),
- u vybraných bakterií, produkujících biogenní aminy, sledovat faktory, které mohou ovlivnit jejich růst a dekarboxylázovou aktivitu,
- nalézt a použít vhodné statistické nástroje k vyhodnocení výsledků,
- vyvodit doporučení a navrhnout další směry výzkumu v oblasti dekarboxylázové aktivity sledovaných mikroorganismů.

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Použité bakteriální kmeny

Testované a identifikované kmeny byly získány z Ústavu fyziologie hospodářských zvířat, Slovenské akademie věd v Košicích. Kmeny laskavě poskytla MVDr. Andrea Lauková, CSc. Bakterie rodu *Enterococcus* (celkem 33 kmenů: 22 kmenů *Enterococcus faecium* a 11 kmenů *Enterococcus* sp.) byly izolovány z masa králíka (*Oryctolagus cuniculus*) (Tab. 3).

Tab. 3. Seznam testovaných kmenů na produkci biogenních aminů.

Druh	Původ	N <sup>a</sup>	Kmen
<i>Staphylococcus warneri</i>		9	16/1; 16/2; 18/1; 23/1; 23/2; 23/3; 24/1; 24/2; 24/3
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	<i>Salmo trutta</i>	2	<b>19/1</b> ; 23/5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		3	23/4; 21/1; <b>21/2</b>
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>		4	22/1; 22/3; 22/4; 22/2
<i>Staphylococcus hominis</i>		3	19/2; <b>20/2</b> ; 20/1
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	22	M1C; <b>M2C</b> ; M7C; M7b; M4C; M6C; <b>5BM1</b> ; M5A; M3b; M1b; M2A; M2Ca; M2Ca; M2cB M4aB; M5aA; M6B; M7bA; M7bB; 3AM; 5BM2; M2c; <b>M5a</b> ; M3A; 1BM;
<i>Enterococcus</i> sp.		11	4BM2

N<sup>a</sup> Počet testovaných kmenů. **Tučně** označené kmeny byly použity v Experimentu II.

Kultivace probíhala při 30±1°C po dobu 24 hodin. Každý izolát byl při testování na produkci biogenních aminů kultivován pětkrát podle Buňková *et al.* (2009).

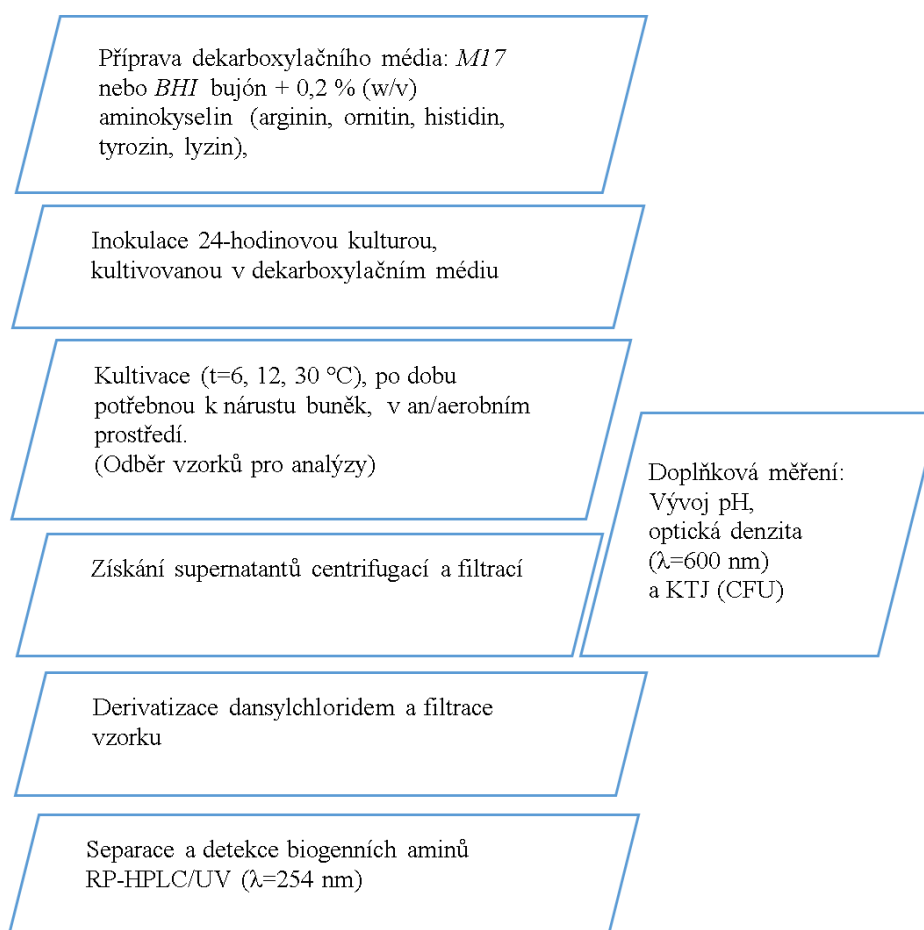
#### 3.2 Kultivační podmínky

Bakterie rodu *Enterococcus* byly kultivovány v M17 bujónu (M17; HiMedia, Bombaj, Indie) a kmeny rodu *Staphylococcus* v mozkosrdcové infuzi (BHI; Brain Heart Infusion Broth; HiMedia, Bombaj, Indie). Na BHI agaru byla sledována čistota kmenů, dále probíhala kultivace v dekarboxylačním médiu obohaceném aminokyselinami (arginin, ornitin, histidin, tyrozin, lyzin, fenylalanin) v množství 0,2 % (w/v). U všech kmenů byla před kultivací v dekarboxylačním médiu kontrolována čistota formou křížového roztěru a mikroskopického ověření (Gramovo barvení).

### 3.3 Popis experimentální části

Experimenty se zabývaly produkcí BA a fyzikálně chemickými faktory ovlivňujícími růst sledovaných bakterií a tvorbu BA. Cíle práce byly plněny ve dvou hlavních experimentech. Experimentem I byl skrining dekarboxylázové aktivity všech získaných bakterií rodů *Staphylococcus* a *Enterococcus* metodou kapalinové chromatografie (HPLC) s předkolonovou derivatizací dansylchloridem. Do dekarboxylačního média (BHI nebo M17 bujón) bylo přidáno 0,2 % (w/v) aminokyselin. Kultivace probíhala při 30 °C/24 hodin.

Supernatant byl po kultivaci zředěn v poměru 1:1 (w/v) kyselinou chloristou (1,2 g.mol<sup>-1</sup>; Merck, Darmstadt, Německo). Směs byla podrobena derivatizaci dansylchloridem (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA) v acetonu (Sigma–Aldrich) o koncentraci 5 mg.ml<sup>-1</sup> podle Dadáková *et al.* (2009). Jako interní standard byl použit 1,7–heptandiamin (Sigma–Aldrich). Podmínky separace sledovaných BA jsou popsány v práci Smělá *et al.* (2004).



Obr. 2. Schéma experimentu II – sledování faktorů ovlivňujících dekarboxylázovou aktivitu testovaných kmenů *in vitro*.

Záměrem Experimentu II (Obr. 2) bylo sledovat kinetiku produkce BA *in vitro* v závislosti na kultivačních podmínkách při teplotách 6, 12 a 30 ± 1 °C, pH 5, 6 a 7 a přidavku NaCl 1, 2, 3, 6 %. Kultivace probíhala jak za aerobních, tak i anaerobních podmínek.

### 3.4 Statistické metody hodnocení dat

Výsledky chemických a mikrobiologických analýz byly statisticky vyhodnoceny s využitím Kruskal-Wallisova a Wilcoxonova testu.

Vývoj produkce obsahu BA ( $\text{mg.l}^{-1}$ ) u rodů *Enterococcus* a *Staphylococcus* byl modelován s použitím Gompertzových modelu. Závislost obsahu BA ( $y$ ) ( $\text{mg.l}^{-1}$ ) na čase ( $t$ ) byla vyjádřena jako (Rovnice 1):

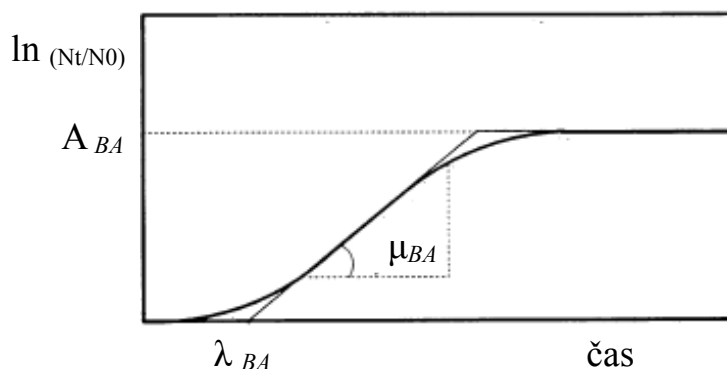
$$y = A_{BA} \cdot \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{\mu_{BA} \cdot e}{A_{BA}} (\lambda_{BA} - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

kde:  $\mu_{BA}$  je maximální rychlost produkce jednotlivých sledovaných biogenních aminů ( $\text{mg.l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ );

$\lambda_{BA}$  je doba prodlení produkce BA (h);

$A_{BA}$  je asymptota definovaná jako maximální produkce BA ( $\text{mg.l}^{-1}$ ).

Význam jednotlivých parametrů Gompertzova modelu je znázorněn na Obr. 3. (Zwietering *et al.*, 1990).



Obr. 3. Parametry Gompertzova modelu (upraveno podle Zwietering *et al.*, 1990).

Pro výpočet parametrů  $\mu_m$ ,  $\lambda$  a  $A$  byla použita nelineární regresní analýza (Marquardt-Levenburgova metoda) pro následující podmínky  $\mu_{BA} > 0$ ,  $\lambda_{BA} > 0$  a  $A_{BA} > 0$ . Absolutní tvorba BA ( $\text{mg.l}^{-1}$ ), může souviset s absolutním počtem bakterií v bujónu ( $\text{CFU.ml}^{-1}$ ). Lze tedy využít tzv. produkční (yield) faktor ( $Y_{BA}/\text{CFU}$ ,  $\text{mg.CFU}^{-1}$ ), který vypovídá o teoretické produkci BA jednou CFU.

Parametr  $Y_{BA}/\text{CFU}$  byl odhadnut metodou nelineární regrese (Marquardt-Levenburgova metoda) pro  $Y_{BA}/\text{CFU} > 0$ . Parametr  $Y_{BA}/\text{CFU}$  byl vyjádřen v  $\text{mg.10}^9 \cdot \text{CFU}^{-1}$ . Kvalita navržených modelů byla posuzována pomocí indexu determinace ( $I_2$ ). Homogenita parametrů regresních funkcí byla testována s využitím Kruskal-Wallisova a Wilcoxonova testu, a to na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  (Buňková *et al.*, 2011; Hendl, 2004; Zwietering *et al.*, 1990). Data byla po statistické analýze znázorněna v grafech vytvořených v programu Origin® 2016 (Graphing & Analysis).

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Výsledky a diskuze experimentu I – dekarboxylázová aktivita

V první experimentální části byl proveden skrínig tvorby BA u rodů *Enterococcus* (33 kmenů) izolovaných z králíka domácího a *Staphylococcus* (21 kmenů) izolovaných z pstruha potočního.

Na základě analýzy dat byly mikroorganismy podle dekarboxylázové aktivity rozděleny do pěti skupin: velmi nízká produkce biogenních aminů – produkce BA pod mezí detekce (<2 mg.l<sup>-1</sup>; -); nízká produkce (2-10 mg.l<sup>-1</sup>; +); střední produkce (10-100 mg.l<sup>-1</sup>; ++); vysoká produkce (100-1000 mg.l<sup>-1</sup>; +++); a velmi vysoká produkce (>1000 mg.l<sup>-1</sup>; ++++). Výsledky obsahů BA v médiích po kultivaci sledovaných mikroorganismů jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4. Produkce biogenních aminů bakteriemi rodů *Staphylococcus* a *Enterococcus* izolovanými ze *Salmo trutta* a *Oryctolagus curiculus*.

Druh	N <sup>a</sup>	Množství biogenních aminů (<2 mg.l <sup>-1</sup> (-); 2–10 mg.l <sup>-1</sup> (+); 10–100 mg.l <sup>-1</sup> (++); 100–1000 mg.l <sup>-1</sup> (+++); >1000 mg.l <sup>-1</sup> (++++)) <sup>b</sup>			
		Putrescin	Fenyletylamin	Kadaverin	Tyramin
<i>Staphylococcus warneri</i>	9	5/0/4/0/0	3/2/4/0/0	2/2/1/4/0	2/1/0/1/5
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	2	1/0/0/1/0	0/1/1/0/0	0/0/0/2/0	0/1/0/0/1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	1/1/1/0/0	0/2/1/0/0	0/0/1/1/1	0/1/0/0/2
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4	1/0/2/1/0	2/2/0/0/0	0/0/1/2/1	1/1/1/1/0
<i>Staphylococcus hominis</i>	3	0/0/0/2/1	3/0/0/0/0	1/0/0/2/0	0/1/0/0/2
<i>Enterococcus faecium</i>	22	20/0/0/2/0	16/1/5/0/0	5/16/1/0/0	5/7/3/0/7
<i>Enterococcus</i> sp.	11	11/0/0/0/0	7/0/4/0/0	1/10/0/0/0	0/1/4/1/5

<sup>a</sup>N – Počet izolátů daného druhu bakterií

<sup>b</sup>Počet izolátů, které produkovaly BA v rozmezí koncentrací: <2 mg.l<sup>-1</sup> (-); 2–10 mg.l<sup>-1</sup> (+); 10–100 mg.l<sup>-1</sup> (++); 100–1000 mg.l<sup>-1</sup> (+++); >1000 mg.l<sup>-1</sup> (++++)

Dekarboxylace BA je metabolickou cestou, která je široce rozšířena u enterokoků (Marcobal *et al.*, 2012). Enterokoky jsou součástí rezidentní mikroflóry střev obratlovců, odkud se šíří do půdy, vody, na rostliny, hmyz a kontaminují tak životní prostředí, potraviny a mohou odtud infikovat člověka (Franz, 2003; Franz a Holzapfel, 2006).

U sledovaných 33 zástupců rodu *Enterococcus* nebyla zjištěna žádná dekarboxylázová aktivita (s ohledem na sledované BA) pouze u dvou kmenů

(MC7; M1b). U rodu *Staphylococcus* byla produkce BA zjištěna u všech sledovaných kmenů, přičemž byly detekovány následující BA: histamin, tyramin, putrescin, kadaverin a fenyletylamin. Spermin, spermidin a tryptamin byly málo produkovány.

Ačkoli dřívější studie uvádějí, že existují kmeny rodu *Staphylococcus* izolované z potravin, které BA netvoří (Leuschner *et al.*, 1998), novější studie popisují bohatou produkci BA nejen u zástupců rodu *Staphylococcus*, ale i u bakterií rodu *Enterococcus* (Cosentino *et al.*, 2004; Buňková *et al.*, 2009; Even *et al.*, 2010 a Latorre-Moratalla *et al.*, 2010). Podle Martín *et al.* (2006) jsou stafylokoky obvykle uváděny jako slabě pozitivní nebo dekarboxyláza negativní mikroorganismy. Výsledky této práce však poukazují na skutečnost, že stafylokoky mohou být významnými producenty BA a potenciálně tak ohrožovat bezpečnost potravin.

U kmenů *Staphylococcus hominis* studovaných v Experimentu I nebyla zaznamenána tvorba histaminu, kdežto tyramin, putrescin a kadaverin byly nadprodukovány. V dostupné literatuře nebyla nalezena produkce tyraminu a putrescinu u izolátů *S. hominis* z produktů rybolovu (Hwang *et al.*, 2011), naopak neprodukovaly histamin, fenyletylamin a kadaverin.

Zástupci druhu *S. warneri* v této práci významně produkují tyramin a kadaverin. V menší míře se vyskytuje fenyletylamin a putrescin. Na tvorbu kadaverinu a putrescinu u zástupců *S. warneri* izolovaných z fermentovaných masných výrobků upozornili ve studii Latorre-Moratalla *et al.* (2010), zatímco tyramin zjištěn nebyl. Naopak studie Martín *et al.* (2006) zmiňuje schopnost dekarboxylace tyrozinu a histidinu u kmenů s obdobným původem stejného druhu.

Podle výsledků této práce jsou zástupci *S. epidermidis* schopni syntetizovat tyramin, kadaverin, fenyletylamin a putrescin. Podle Latorre-Moratalla *et al.* (2010) mohou kmeny *S. epidermidis* použité během výroby suchých fermentovaných klobás produkovat putrescin. Dále byla v literatuře u tohoto druhu prokázána produkce tyraminu (Marino *et al.*, 2011), kadaverinu (Bermúdez *et al.*, 2012) a fenyletylaminu (Even *et al.*, 2010).

Oba kmeny *S. pasteurii* produkovaly významně kadaverin, tyramin v rozdílné míře a mírně fenyletylamin. Putrescin byl zaznamenán pouze u jednoho kmene. Bermudéz *et al.* (2012) zjistil pouze velmi nízké koncentrace putrescinu a kadaverinu u zástupců tohoto druhu.

U studovaných kmenů *S. haemolyticus* byla nejvýznamnější produkce kadaverinu, putrescinu a tyraminu. Fenyletylamin byl tvořen ve velmi nízkých koncentracích. V aktuální odborné literatuře nejsou dostupné žádné údaje o dekarboxylázové aktivitě u tohoto druhu.

V rámci Experimentu I byla potvrzena významná produkce tyraminu u většiny z 33 studovaných kmenů rodu *Enterococcus*. Dva kmeny výrazně tvoří putrescin.

Fenyletylamin a kadaverin byly zaznamenány spíše ojediněle a v nízkých koncentracích. Halász *et al.* (1994) popisuje výraznou tvorbu BA u enterokoků izolovaných z ryb. Produkce BA zástupci rodu *Enterococcus* je v literatuře známá a hojně popsána (Bover-Cid *et al.*, 2001; Marcobal *et al.*, 2006 a Burdychová a Komprda, 2007). Burdychová a Komprda (2007) také uvedli, že řada kmenů rodu *Enterococcus* tvoří takové koncentrace tyraminu, které již překračují hladinu toxicity (100 mg.l<sup>-1</sup>). U testovaných kmenů enterokoků v rámci Experimentu I nebyla zjištěna produkce histaminu, což koresponduje s prací ten Brink *et al.* (1990), avšak Martín *et al.* (2006) uvádí opak. Jelikož jsou některé kmeny enterokoků používány dokonce jako probiotika (Deepika a Rakshit, 2011), je třeba se dekarboxylázovou aktivitou zástupců tohoto rodu podrobněji zabývat.

## 4.2 Výsledky a diskuze experimentu II – sledování vlivu faktorů

Druhá část této práce se zabývala sledováním *in vitro* vlivu kultivační teploty, NaCl, pH a přístupu kyslíku na produkci osmi různých BA třemi kmeny enterokoků a třemi kmeny stafylokoků. Z výsledků je patrná důležitost sledovat produkci BA z hlediska jak kinetiky produkce, tak i statistických parametrů růstu a produkce biogenních aminů. Optimální podmínky kultivace pro šest studovaných kmenů byly stanoveny na základě růstových křivek a jsou v souladu s odbornou literaturou (Morandi *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2010; Sánchez Mainar *et al.*, 2017). Pro enterokoky i stafylokoky to bylo pH 7, bez přídavku NaCl a aerobní prostředí (Tab. 5.).

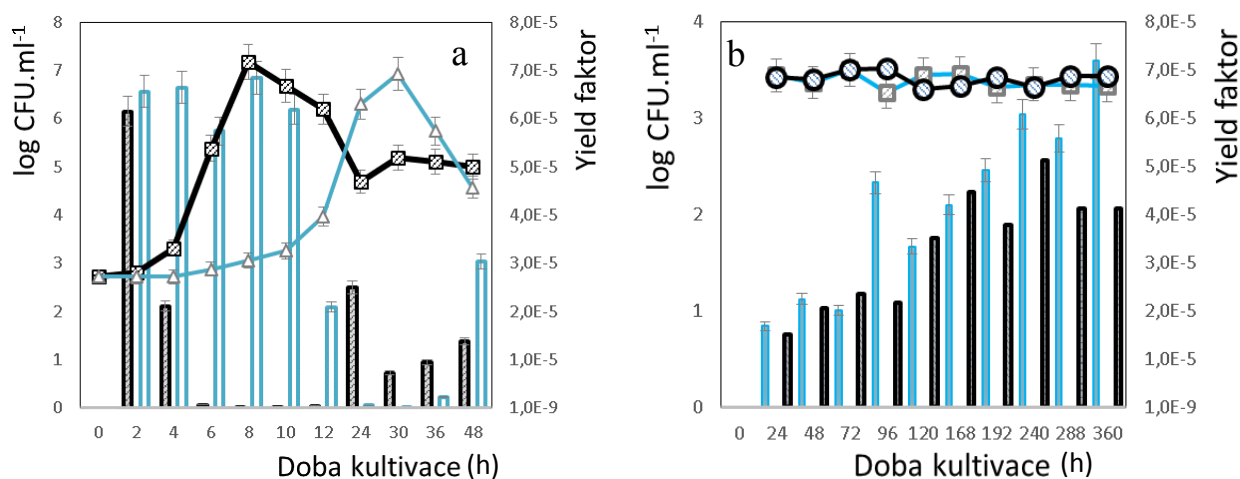
Průměrná hodnota množství BA stanovená v čase 0 v médiu BHI byla 5,5±0,3 mg.l<sup>-1</sup>. Vzhledem k tomuto faktu je za produkci považována hodnota nad tuto mez. Biogenní aminy v těchto nízkých hodnotách jsou nejen přirozenou součástí živných médií, ale mohou být dány i metodikou přípravy inokula.

Tab. 5. Produkce biogenních aminů bakteriemi rodu *Staphylococcus* a *Enterococcus* bez vlivu sledovaných faktorů (30 °C, pH 7, bez přídavku NaCl, aerobně).

	BA mg.l <sup>-1</sup>							
	TYM	PHE	HIS	TRP	PUT	CAD	SPM	SPD
<i>Enterococcus faecium</i> M2C	944,8	377,0	5,3	0,5	19,9	1,3	1,1	0,8
<i>Enterococcus</i> sp. M5a	1327,5	91,3	1,0	16,3	8,5	15,8	37,9	1,9
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 21/2	1196,5	467,1	2,8	45,2	16,3	18,5	22,2	1,0
<i>Staphylococcus hominis</i> 20/2	1678,0	761,4	5,8	28,4	18,3	27,7	16,3	2,1
<i>Staphylococcus pasteurii</i> 19/1	1590,5	278,8	2,5	39,0	34,1	16,6	7,1	1,5

Optimální podmínky kultivace pro šest studovaných kmenů byly stanoveny na základě růstových křivek a jsou v souladu s odbornou literaturou (Morandi *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2010; Sánchez Mainar *et al.*, 2017). Pro enterokoky i stafylokoky to bylo pH 7, bez přídavku NaCl a aerobní prostředí. Jelikož byly tyto kmeny izolovány z potravin, byly kultivovány při max. teplotě 30 °C, což je teplota simulující podmínky při porušení chladicího řetězce při distribuci a skladování potravin a zároveň teplota vhodná pro růst většiny gram pozitivních koků. Celkový počet enterokoků byl v bujónu BHI cca  $10^7$  CFU.ml<sup>-1</sup>, pro stafylokoky byla zjištěna hodnota řádově  $10^8$  CFU.ml<sup>-1</sup>. Za optimálních podmínek růstu sledované kmeny enterokoků a stafylokoky v médiu tvořily nejvíce tyramin a fenyletylamin. Ostatní BA byly stanoveny v množství řádově menším.

Největší produkce jednou buňkou (yield faktor) byla pozorována na počátku exponenciální fáze růstu (Obr. 4). Naopak Tsai *et al.* (2005) ve své práci uvádějí, že produkce HIS je maximální až uprostřed exponenciální fáze růstové křivky histamin-produkujících bakterií. Kim *et al.* (2002) zase publikovali, že nejvyšší množství HIS bylo detekováno v pozdní stacionární fázi růstu bakterie *Morganella morganii* v kontaminované rybí svalovině. Mnoho autorů označuje stacionární fázi jako čas, kdy dochází k maximální dekarboxylázové aktivitě, a to především díky zvyšujícímu se stresu buněk způsobenému nedostatkem živin (Calles-Enriquez *et al.*, 2010, La Gioia *et al.*, 2011). Aktuální odborná literatura uvádí, že výsledná akumulace BA je velmi heterogenní a závislá na rodu a druhu jak kvantitativně, tak i kvalitativně (Bargossi *et al.*, 2015a, b).



Obr. 4. Růstové křivky a yield faktory (sloupcový graf) u *Enterococcus faecium* M2C *in vitro* při 30 °C (a) a 6 °C (b), pH 5 za anaerobních podmínek s přídavkem 1 (černá) a 6 (modrá) % (w/v) NaCl.

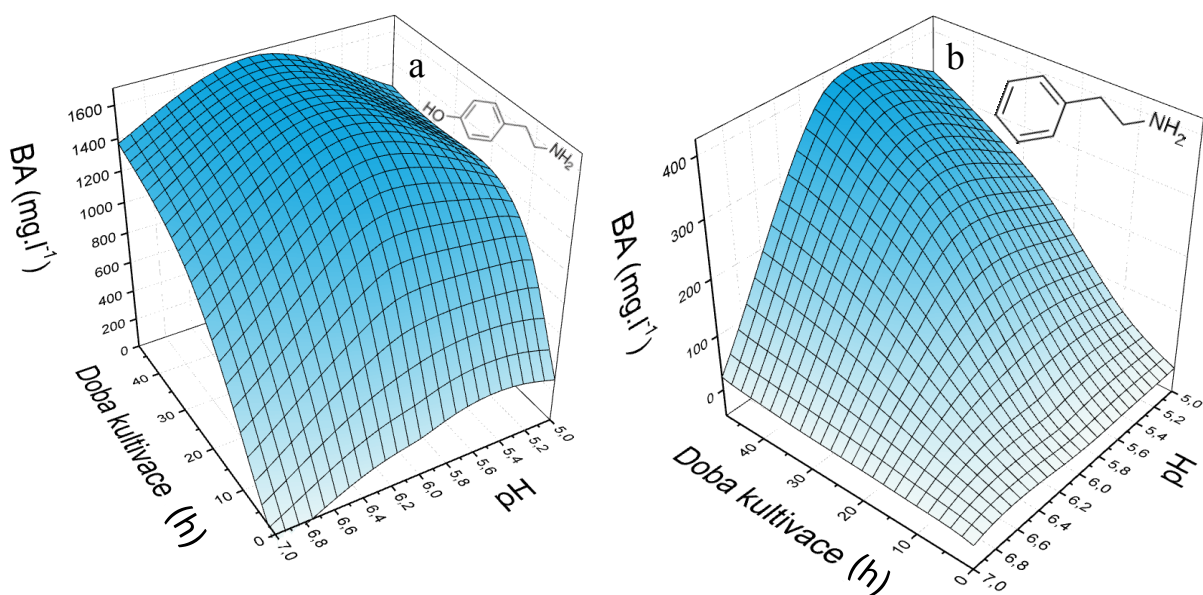
Enterokoky i stafylokoky jsou schopné růstu v širokém rozmezí teplot, koncentrací soli a pH (Andrighetto *et al.*, 2001; Sarantinopoulos *et al.*, 2001; Gutiérrez *et al.*, 2010; Sánchez Mainar *et al.*, 2017). Optimální růstová teplota podporuje buněčný metabolismus a proliferaci buněk, stejně tak jako produkci



BA. Z výsledků bylo zjištěno, že produkci BA a polyaminů kmeny rodů *Enterococcus* a *Staphylococcus* izolovaných z masa a ryb nejvíce ovlivňuje teplota. Jednoznačně bylo prokázáno, že maximální produkce byla zaznamenána při 30 °C a tato teplota statisticky významně ovlivňuje ( $p \leq 0,05$ ) růst enterokoků i stafylokoků. U nižších teplot kultivace bylo možno predikovat vliv na zpomalení růstu buněk, avšak není možné s jistotou předvídat vliv na produkci BA jednou buňkou. Dle výsledků této práce lze shrnout, že množství BA nemusí s růstem buněk v čase korelovat. Avšak dle Gardini *et al.* (2016) je přítomnost potenciálně nebezpečných koncentrací BA ( $\geq 200 \text{ mg.l}^{-1}$ ) asociována s odpovídajícím růstem dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů. Nicméně vysoké počty buněk produkujících dekarboxylázy nejsou dostatečnou a jedinou podmínkou k vysvětlení konečného množství BA. Pokud jsou dekarboxylační enzymy jednou syntetizovány do prostředí, produkce termostabilních BA může pokračovat i v případě, že jsou bakterie eliminovány z potravin technologickým ošetřením (Gardini *et al.*, 2016).

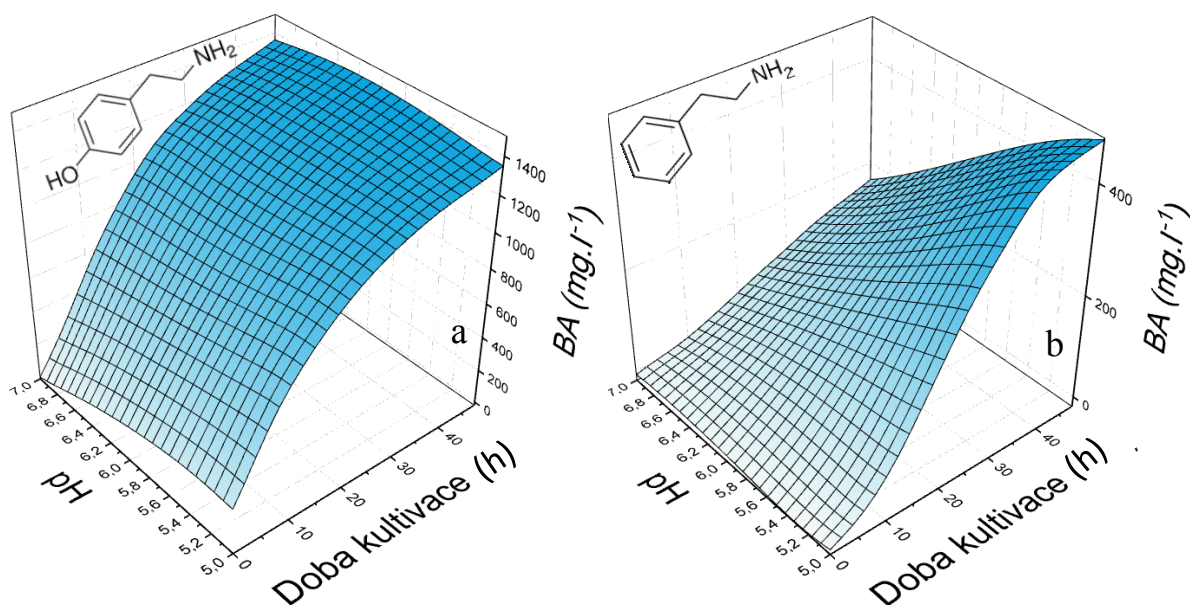
Dle doporučení americké FDA (Food Drug Agency) by v rámci prevence tvorby HIS měly být ryby zchlazeny ihned po výlovu na max. 4,4 °C (FDA, 2011). Podobně nařizuje evropská legislativa povinné chlazení ryb, produktů z ryb, korýšů a měkkýšů až k hodnotám 0 °C (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES), 2004). Některé bakterie mohou naopak způsobit redukci BA v potravinách. Přítomnost *Staphylococcus xylosum* S81, startovací kultury, která netvoří biogenní aminy, ve fermentovaných masných výrobcích způsobila snížení množství tyraminu, kadaverinu a putrescinu po 21 dnech skladování (Gardini *et al.*, 2001).

Výsledky této práce vypovídají o vlivu pH na produkci BA. Zatímco nízké pH způsobilo omezení růstu sledovaných bakterií rodu *Enterococcus* a *Staphylococcus*, dekarboxylázová aktivita testovaných kmenů byla podpořena. V průběhu experimentu bylo zjištěno, že produkce BA u kmenů *E. faecium* byla významně ovlivněna hodnotou pH prostředí. Sledované kmeny *E. faecium* M2C (Obr. 5) a 5BM1 produkovaly významnější množství TYM a PHE při pH 5 – 6, kdy s rostoucí teplotou rostla produkce v oblasti pH 6, zatímco při teplotách kultivace pod 12 °C byla produkce TYM i PHE vyšší při pH 5.



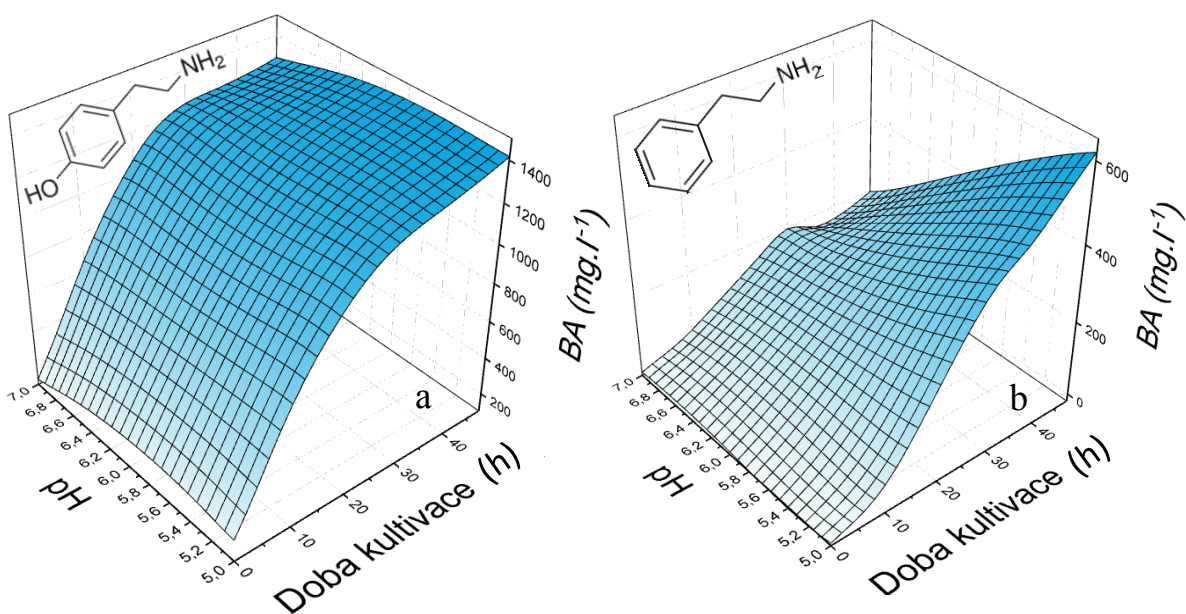
Obr. 5. Kinetika produkce tyraminu (a) a fenyletylaminu (b) při teplotě 30 °C u *Enterococcus faecium* M2C v závislosti na pH.

Při 30 °C nemělo pH významný vliv na produkci TYM u *Enterococcus* sp. (Obr. 6.). Avšak při 6 °C byl patrný trend navýšení produkce tyraminu i fenyletylaminu při pH 6. Při vyšší teplotě bylo patrné, že s rostoucím pH klesala produkce PHE. Na produkci kadaverinu nemělo pH významnější vliv při teplotách pod 12 °C. Při 30 °C byl patrný úbytek sperminu v kyselějším prostředí (pH 5), který se zde zřejmě přeměňuje pomocí spermintransferáz a polyaminoxidáz na putrescin (Benkerroum, 2016; del Rio *et al.*, 2016). Del Rio *et al.* (2016) taktéž popisují pozitivní vliv nižšího pH na produkci putrescinu.



Obr. 6. Kinetika produkce tyraminu (a) a fenyletylaminu (b) při 30 °C u *Enterococcus* sp. M5a v závislosti na pH.

U jednotlivých druhů (kmenů) stafylokoků byly trendy produkce BA mnohem odlišnější. Kmen *S. pasteurii* 19/1 produkoval při vyšším pH (pH 7) 2,5krát více TYM než při pH 5. Avšak fenyletylamin byl produkován 6krát více při pH 5 oproti pH 7 (při 30 °C). Produkce kadaverinu a putrescinu nebyla výrazněji ovlivněna změnou pH. *S. hominis* 20/2 (Obr. 7) vykazoval klesající produkci BA s poklesem pH.



Obr. 7. Kinetika produkce tyraminu (a) a fenyletylaminu (b) při 30 °C u *Staphylococcus pasteurii* 19/1 v závislosti na pH.

U produkčního kmene *S. epidermidis* 21/2 byla produkce všech BA nejvýznamněji ovlivněna při pH 6 (Tab. 6), kdy byla velmi výrazně snížena jeho produkce až o 50 %. Produkce histaminu a kadaverinu nebyla hodnotou pH významněji ovlivněna, rovněž ani na produkci polyaminů nemělo pH velký vliv. Nejnovější literatura popisuje rod *Staphylococcus* jako významného producenta tyraminu a fenyletylaminu (Lauková *et al.*, 2017). Benavent *et al.* (2016) označili druh *S. epidermidis* (izolovaný z vína) za producenta histaminu, putrescinu a kadaverinu. *S. epidermidis* snáší velmi nízké hodnoty pH. Tyramin, putrescin a kadaverin jsou běžně sledované BA ve fermentovaných masných výrobcích a jejich produkce ( $\geq 1000 \text{ mg.l}^{-1}$ ) je běžná již po 8 hodinách kultivace (Benavent *et al.*, 2016).

Tab. 6. Hodnocení vlivu sledovaných faktorů na maximální produkci biogenních aminů u *Staphylococcus epidermidis* 21/2.

<i>Staphylococcus epidermidis</i> 21/2	BA mg.l <sup>-1</sup>	Teplota (°C)	pH	NaCl (w/v)	an/aerobně
tyramin	1863,9	6	6	1	AN
fenyletylamin	786,1	30	6	0	AN
histamin	33,3	30	6	1	AN
tryptamin	93,9	6	6	1	AN
putrescin	20,5	6	6	1	AN
kadaverin	34,6	30	6	1	AN
spermin	81,3	30	5	6	AN
spermidin	13,8	30	6	0	A

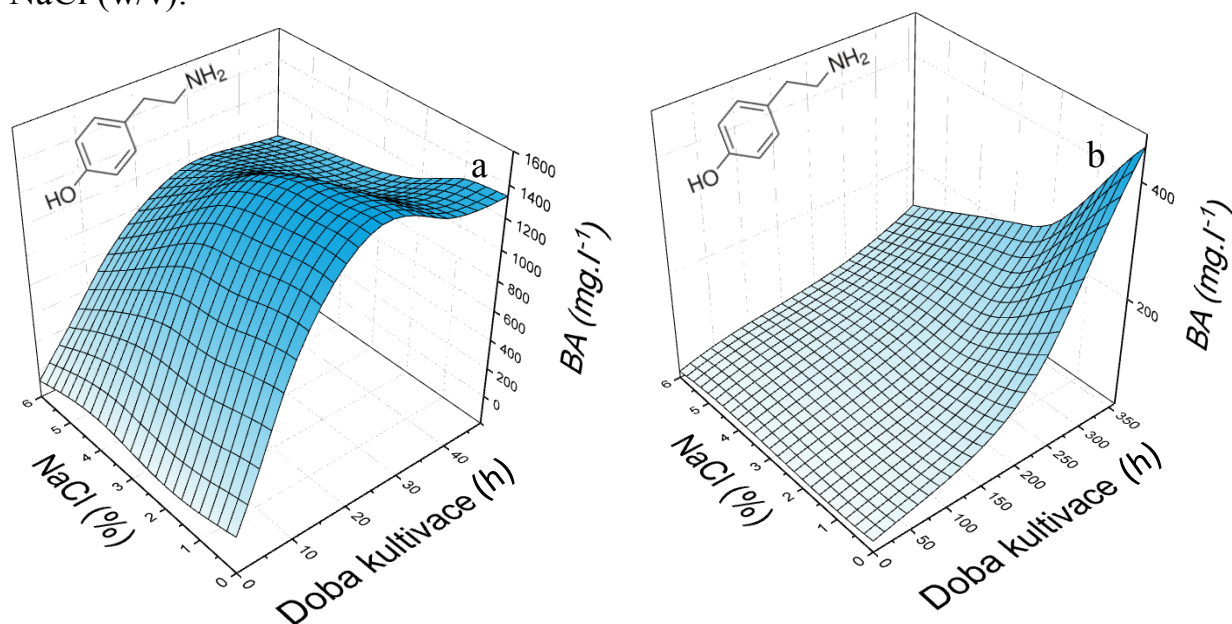
Nejvýznamnějším BA, dle vyprodukovaného množství, byl tyramin. Nejvyšší stanovené množství TYM produkované *E. faecium* M2C bylo při 6 °C, pH 5 a po 336 hodinách kultivace. Nejvhodnější prostředí pro tvorbu tyraminu při teplotě 6 °C bylo médium o pH 5, zatímco při vyšších teplotách byla produkce tyraminu podpořena při pH 6. Při 30 °C a pH 6 byla produkce TYM po 48 hodinách kultivace nejvyšší (1996,5 mg.l<sup>-1</sup>). Produkce TYM byla iniciovaná rychleji při pH 5 a 6 než při neutrální hodnotě pH. Avšak produkce TYM se v těchto médiích po 24 hodinách kultivace výrazněji zpomalila oproti produkci při pH 7.

Na významných změnách produkce fenyletylaminu v závislosti na pH se jako důležitý faktor podílela teplota. Při kultivační teplotě 30 °C docházelo při pH 5 k pozvolnější produkci fenyletylaminu než v médiu o pH 6 – 6,2, které se dá považovat za optimální pro produkci BA.

Gardini *et al.* (2016) ve své práci shrnují, že dekarboxylační reakce je jedním z mechanismů obrany buněk vůči kyselému stresu. Účinek pH na tvorbu BA je různý v případě působení na čistý enzym nebo na živé dekarboxyláza pozitivní buňky. V každém případě bylo v jiných studiích jednoznačně prokázáno, že transkripce mnoha klastrů genů kódujících dekarboxylázy je indukována nízkým pH. Komerčně čistá tyrozindekarboxyláza má nejvyšší účinnost při pH 5,5 – 6,0, při pH 4 byla její efektivita velmi nízká. Na druhou stranu druh *E. faecalis* projevuje za stejných podmínek nejvyšší produkci tyraminu při pH 4 už po dvou hodinách. Tento podpůrný účinek při nízkém pH byl pozorován také u dalších druhů rodu *Enterococcus*, a to *E. durans*, *E. faecium* (Gardini *et al.*, 2016). EFSA doporučuje vybírat jako startérové kultury autochtonní kmeny s vhodným technologickým profilem a redukovanou možností tvorby BA (EFSA, 2011).

Součástí experimentu bylo sledování vlivu NaCl na produkci BA. Chlorid sodný je obsažený téměř v každé fermentované potravíně. Běžně potraviny živočišného původu obsahují 2 – 3 % NaCl (Marth a Steele, 2001). Koncentrace soli významně ovlivňuje nejen růst mikroorganismů, ale také schopnost buněk

produkovat BA. Nejvíce byly sledované BA produkovány v médiu s přidavkem NaCl do 3 % (w/v). Avšak produkce jednou buňkou byla vyšší v médiu nad 3 % NaCl (w/v).



Obr. 8. Kinetika produkce tyraminu při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Staphylococcus pasteurii* 19/1 v závislosti na koncentraci NaCl.

U *S. pasteurii* (Obr. 8) byla se zvyšující se koncentrací NaCl snížena produkce tyraminu o 33 % při 30 °C a se snižující se teplotou a zvyšující koncentrací NaCl produkce klesala až osminásobně. Koncentrace nad 3 % NaCl (w/v) zpomalovala produkci všech BA. Obecně je známo, že zvyšující se koncentrace NaCl přispívá k redukci množství BA v potravinách, zejména tím, že snižuje počet mikroorganismů a také metabolickou aktivitu dekarboxyláza pozitivních bakterií. Na druhou stranu Gardini *et al.* (2016) popisují, že se zvyšování obsahu soli v potravinách neslučuje s aktuálním trendem snižování obsahu soli v potravinách. Dle studie Bargossi *et al.* (2015b) nebyla zjištěna výrazná ztráta aktivity u čisté tyrozindekarboxylázy až do 10 %. Produkce BA v médiích s vyšší koncentrací NaCl byla rovněž zjištěna i v dalších studiích (Greif *et al.*, 2006; Emborg a Dalgaard, 2008). Zvýšenou produkci tyraminu v médiu s vyšší koncentrací NaCl lze vysvětlit tím, že Na<sup>+</sup> se podílí na regulaci intracelulárního pH. Tyto ionty jsou důležité v antiportovém systému, takže hrají zásadní roli v dekarboxylační cestě tyraminu. Dekarboxylační reakce slouží buňkám jako alternativní zdroj energie i v nepříznivých podmínkách kultivace (Molenaar *et al.*, 1993; Pessione *et al.*, 2009). Oproti tomu Gardini *et al.* (2001; 2008) zaznamenali vyšší produkci *in vitro* při nižších koncentracích NaCl. U laktokoků byla zjištěna nejvyšší produkce tyraminu při 2 % NaCl (w/v), na druhou stranu aero/anaerobióza množství tyraminu v prostředí vůbec neovlivňovala (Buňková *et al.*, 2011). Koncentrace NaCl, která je nezbytná pro kontrolu histamin-produkujících kmenů druhů *Photobacterium phosphoreum* a *Morganella morganii*, je více než 5 % (Emborg a Dalgaard, 2008).

Dále byl sledován vliv an/aerobního prostředí při kultivaci na tvorbu BA. V prvních hodinách kultivace nebyl zaznamenán vliv prostředí na produkci žádného ze sledovaných BA u fakultativně anaerobních enterokoků. K výraznějšímu navýšení produkce došlo při 30 °C až po 48 hodinách anaerobní kultivace u obou testovaných kmenů *E. faecium*. Při teplotách nižších než 12 °C nedocházelo k patrnému vlivu O<sub>2</sub> na produkci TYM. Produkce PHE po 360 hodinách kultivace byla navýšena pouze při anaerobní kultivaci na 30-ti násobek. Putrescin, spermin a spermidin byly produkovány spíše za aerobních podmínek, a to pouze při kultivaci při 6 °C. Množství vyprodukovaného TYM i PHE bylo vždy v anaerobním prostředí vyšší minimálně o 10 %. U rodu *Staphylococcus* byla produkce BA vyšší pouze pro TYM v anaerobním prostředí. Při sledování modelových podmínek anaerobního prostředí na produkci BA u *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus brevis* (Marcobal *et al.*, 2006), *Lactobacillus curvatus* (Bover-Cid *et al.*, 2008), *Lactococcus lactis* (Buňková *et al.*, 2011), *Enterococcus durans* (Buňková *et al.*, 2012) byla zjištěna vyšší produkce těchto toxických sloučenin v podmínkách bez přístupu O<sub>2</sub>. Lze tedy odvodit závěry, že BA jsou produkovány více v anaerobním prostředí, což potvrzuje např. studie Doeun *et al.* (2016), kde byl pozorován nárůst tyraminu (90 mg.l<sup>-1</sup>) a sperminu (62 mg.l<sup>-1</sup>) ve vakuově baleném sledu od čtrnáctého dne skladování při 5 °C. Již dlouho je známo, že koncentrace tyraminu, putrescinu a kadaverinu se v průběhu skladování masa běžně zvyšuje, kdežto množství sperminu a spermidinu zůstává konstantní (Sayem-El-Daher *et al.*, 1985). Navíc, zvýšení putrescinu je v dobré korelaci s rozvojem aerobní mezofilní i psychrotrofní mikroflóry, zatímco kadaverin se významně zvyšuje pouze v poslední fázi kažení masa. Vliv na produkci BA má zajisté i přídavek prekurzorů. V této práci byla sledována produkce BA v médiu BHI s přídavkem prekurzorů (aminokyselin argininu, ornitinu, histidinu, tyrozinu, lyzinu) v koncentraci 0,2 % (w/v). U enterokoků izolovaných z rozličných rostlinných materiálů však bylo prokázáno, že tyramin je tvořen v médiu BHI i v případě, že nebyl přidán tyrozin. V případě přídavku 0,1 % (w/v) tyrozinu se produkce tyraminu do média zvýšila zhruba sedmkrát (Gatto *et al.*, 2016).

Ke statistickému zpracování naměřených dat byl použit nelineární tříparametrový model dle Gompertze. Bylo zjištěno, že studované kmeny rodů *Enterococcus* a *Staphylococcus* produkují za změny teploty, pH a koncentrace NaCl a O<sub>2</sub> statisticky významná množství pouze dvou biogenních aminů – fenyletylaminu a tyraminu. Pro fenyletylamin platí, že statisticky významně více je produkován při pH 5 a 6 % (w/v) NaCl než při optimálním pH 7, zatímco při nižší koncentraci NaCl je produkce vyšší při optimálním pH. Co se týká ostatních sledovaných BA (histamin, kadaverin, putrescin, spermin, spermidin a tryptamin) nebyl v čase pozorován žádný rostoucí trend (max. průměrné koncentrace byly menší než 50 mg.l<sup>-1</sup>).

## ZÁVĚR

Biogenní aminy jsou součástí mnoha každodenně konzumovaných potravin. Z důvodu prevence otrav biogenními aminy je nutná včasná detekce bakterií, které biogenní aminy produkují. V této práci bylo analyzováno 33 kmenů enterokoků a 21 kmenů stafylokoků různých druhů na produkci biogenních aminů. Bylo zjištěno, že pouze jeden kmen, *Enterococcus* sp. 3AM, neprodukoval žádný ze sledovaných biogenních aminů v množství vyšším než 2 mg.l<sup>-1</sup>.

Stafylokoky jsou významnějšími producenty biogenních aminů (tyramin, fenyletylamin, kadaverin a putrescin) než enterokoky (zejména tyramin a fenyletylamin ojedinele putrescin). Produkce histaminu byla zjištěna u jednoho kmene *Staphylococcus warneri*. Poprvé byla potvrzena produkce putrescinu, fenyletylaminu, kadaverinu a tyraminu u *S. haemolyticus*. Poprvé byla také odhalena produkce kadaverinu u izolátů *Enterococcus* sp. a *Enterococcus faecium*. Pouze dva izoláty *E. faecium* (M1b; M7C) lze označit jako dekarboxyláza negativní.

Bylo zjištěno, že se produkce aminů liší v rámci kmenů stejného druhu. Dekarboxylázová aktivita kmene *E. faecium* 5BM1 byla vyšší při 30 °C než při 6 °C. Snižováním pH byla podpořena produkce BA a polyaminů u kmenů *E. faecium* 5BM1 a M2C. Koncentrace NaCl měla zejména inhibující účinek na produkci BA a polyaminů sledovanými kmeny. Oba kmeny mají schopnost dekarboxylace při chladírenských teplotách 6 °C a nízkém pH 5. Ve skupině stafylokoků bylo testováno pět různých druhů – *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. pasteurii*, *S. warneri*. Nejvyšší produkce biogenních aminů byla zaznamenána u *S. warnerii* a *S. hominis*. Množství vyšší než jsou bezpečnostní limity, byla zjištěna pro tyramin, kadaverin, putrescin u všech studovaných druhů stafylokoků.

Na základě statistického vyhodnocení výsledků lze konstatovat, že:

- sledované kmeny stafylokoků a enterokoků produkovaly významná množství tyraminu a fenyletylaminu;
- sledované faktory mohou působit na dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů, avšak v závislosti na jejich vzájemných kombinacích;
- nízké pH způsobuje snižování růstu sledovaných enterokoků a stafylokoků, ale může podpořit dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů;
- zvyšující se koncentrace NaCl snižuje produkci fenyletylaminu;
- fenyletylamin byl produkován významněji při anaerobní kultivaci.

Získané výsledky jsou cenné zejména tím, že mohou pomoci osvětlit mechanismus účinku produkce biogenních aminů, který do současnosti nebyl uspokojivě vysvětlen. Další studium by mělo být zaměřeno na faktory ovlivňující transkripci dekarboxylázových genů v souvislosti s produkcí biogenních aminů.

## PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI

V oblasti vědního oboru lze vidět přínos disertační práce zejména v následujících aspektech:

- skríníng dekarboxylázové aktivity kmenů *Enterococcus* a *Staphylococcus* (54 kmenů);
- studium kinetiky produkce biogenních aminů u šesti kmenů *in vitro* a zhodnocení rozdílů v jejich produkci zahrnující zhodnocení parametrů růstu produkce ( $\lambda$ ,  $\mu_m$ );
- predikce vývoje produkce jednotlivých biogenních aminů produkovaných sledovanými bakteriemi v závislosti na vlivu faktorů.

V oblasti praktického využití lze vidět přínos disertační práce zejména v následujících aspektech:

- ze sledovaných biogenních aminů byl v největším množství produkován tyramin, a pro zvýšení bezpečnosti potravin lze doporučit, zavedení sledování tyraminu v rámci evropské legislativy (možné doporučení v rámci Nařízení evropského společenství (ES) o zařazení tyraminu mezi toxické látky v potravinách);
- sledování rizika perzistence testovaných dekarboxyláza-pozitivních kmenů a možná rizika kumulace biogenních aminů v prostředí;
- zdůraznění nutnosti testování enterokoků využívaných v potravinářském průmyslu na schopnost produkce tyraminu;
- zdůraznění komplexnosti vlivů na individuální reakce kmenů v závislosti na růstových a produkčních podmínkách biogenních aminů.



## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ANDRIGHETTO, Christian, Edo KNIJFF, Angiolella LOMBARDI, Sandra TORRIANI, Marc VANCANNEYT, Karel KERSTERS, Jean SWINGS a Franco DELLAGLIO. 2001. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *Journal of Dairy Research*. **68**(2), 303-316. DOI: 10.1017/S0022029901004800. ISSN 00220299.

ASKAR, Abbas, a Howard TREPTOW, 1986. Biogene Amine in Lebensmitteln — Vorkommen, Bedeutung und Bestimmung. 197 Seiten, 34 Abb., 47 Tab. Verlag Eugen Ulmer. Stuttgart 1986. Preis. *Food / Nahrung*. **32**(4), 420-420. DOI: 10.1002/food.19880320433. ISSN 0027769x.

BARDOT, Olivier, Thomas C. ALDRIDGE, Norbert LATRUFFE and Stephen GREEN. 1993. PPAR-RXR Heterodimer Activates a Peroxisome Proliferator Response Element Upstream of the Bifunctional Enzyme Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **192**(1), 37-45. DOI: 10.1006/bbrc.1993.1378. ISSN 0006291x.

BARGOSSO, Eleonora, Fausto GARDINI, Veronica GATTO, Chiara MONTANARI, Sandra TORRIANI a Giulia TABANELLI. 2015a. The Capability of Tyramine Production and Correlation between Phenotypic and Genetic Characteristics of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains. *Frontiers in Microbiology*. **6**, -. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01371. ISSN 1664-302x.

BARGOSSO, Eleonora, Giulia TABANELLI, Chiara MONTANARI, Rosalba LANCIOTTI, Veronica GATTO, Fausto GARDINI a Sandra TORRIANI. 2015b. Tyrosine decarboxylase activity of enterococci grown in media with different nutritional potential: tyramine and 2-phenylethylamine accumulation and tyrDC gene expression. *Frontiers in Microbiology*. **6**. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00259. ISSN 1664-302x.

BÄUMLISBERGER, Mathias, Urs MOELLECKEN, Helmut KÖNIG, a Harald CLAUS. 2015. The potential of the yeast *Debaryomyces hansenii* H525 to degrade biogenic amines in food. *Microorganisms*. **3**, 839–850. doi:10.3390/microorganisms3040839.

BENAVENT-GIL, Yaiza, Carmen BERBEGAL, Olga LUCIO, Isabel PARDO a Sergi FERRER. 2016. A new fear in wine: Isolation of *Staphylococcus epidermidis* histamine producer. *Food Control*., 142-149. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.10.026. ISSN 09567135.

BENKERROUM, Noredine. 2016. Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **15**(4), 801-826. DOI: 10.1111/1541-4337.12212. ISSN 15414337.

BERMÚDEZ, Roberto, José M. LORENZO, Sonia FONSECA, Inmaculada FRANCO a Javier CARBALLO. 2012. Strains of *Staphylococcus* and *Bacillus* Isolated from Traditional Sausages as Producers of Biogenic Amines. *Frontiers in Microbiology*. **3**, 151. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00151. ISSN 1664-302x.

BHARDWAJ, Arun, Hittu GUPTA, Ramya IYER, Naresh KUMAR a Ravinder Kumar MALIK. 2009. Tyramine-producing enterococci are equally detected on tyramine production medium, by quantification of tyramine by HPLC, or by tdc gene-targeted PCR. *Dairy Science and Technology*. **89**(6), 601-611. DOI: 10.1051/dst/2009040. ISSN 1958-5586.

BOVER-CID, Sara, M. Jesús MIGUÉLEZ-ARRIZADO, Biserka BECKER, Wilhelm H. HOLZAPFEL a M. Carmen VIDAL-CAROU. 2008. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiology*. **25**(2), 269-277. DOI: 10.1016/j.fm.2007.10.013. ISSN 07400020.

BOVER-CID, Sara, Marta HUGAS, Maria IZQUIERDO-PULIDO a M. Carmen VIDAL-CAROU. 2001. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology*. **66**(3), 185-189. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00526-2. ISSN 01681605.

BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Eva POLLAKOVÁ, Tereza PODEŠVOVÁ a Vladimír DRÁB. 2011. 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*. **147**(2), 112-119. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.017. ISSN 01681605.

BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Michaela HLOBILOVÁ, Zuzana VAŇÁTKOVÁ, Dana NOVÁKOVÁ a Vladimír DRÁB. 2009. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*. **229**(3), 533-538. DOI: 10.1007/s00217-009-1075-3. ISSN 1438-2377.

BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Pavlína KLČOVSKÁ, Vladimír MRKVIČKA, Magda DOLEŽALOVÁ a Stanislav KRÁČMAR. 2010. Formation of biogenic amines by Gram-negative bacteria isolated from poultry skin. *Food Chemistry*. **121**(1), 203-206. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.12.012. ISSN 03088146.

BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Vladimír DRÁB, Stanislav KRÁČMAR a Vlastimil KUBÁŇ. 2012. Effects of NaCl, lactose and availability of oxygen on tyramine production by the *Enterococcus durans* CCDM 53. *European Food Research and Technology*., **234**(6), 973-979. DOI: 10.1007/s00217-012-1714-y. ISSN 1438-2377.

- BURDYCHOVÁ, Radka a Tomáš KOMPRDA. 2007. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiology Letters*. **276**(2), 149-155. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00922.x. ISSN 03781097.
- CACHALDORA, Aida, Sonia FONSECA, Inmaculada FRANCO a Javier CARBALLO. 2013. Technological and safety characteristics of Staphylococcaceae isolated from Spanish traditional dry-cured sausages. *Food Microbiology*. **33**(1), 61-68. DOI: 10.1016/j.fm.2012.08.013. ISSN 07400020.
- CALLES-ENRIQUEZ, M., B. H. ERIKSEN, P. S. ANDERSEN, F. P. RATTRAY, A. H. JOHANSEN, M. FERNANDEZ, V. LADERO a M. A. ALVAREZ. 2010. Sequencing and Transcriptional Analysis of the Streptococcus thermophilus Histamine Biosynthesis Gene Cluster: Factors That Affect Differential hdcA Expression. *Applied and Environmental Microbiology*. **76**(18), 6231-6238. DOI: 10.1128/AEM.00827-10. ISSN 0099-2240.
- CALZADA, Javier, Ana DEL OLMO, Antonia PICON, Pilar GAYA a Manuel NUNEZ. 2013. Reducing Biogenic-Amine-Producing Bacteria, Decarboxylase Activity, and Biogenic Amines in Raw Milk Cheese by High-Pressure Treatments. *Applied and Environmental Microbiology*. **79**(4), 1277-1283. DOI: 10.1128/AEM.03368-12. ISSN 0099-2240.
- CAPOZZI, Vittorio, Victor LADERO, Luciano BENEDEUCE, *et al.* 2011. Isolation and characterization of tyramine-producing Enterococcus faecium strains from red wine. *Food Microbiology*. **28**(3), 434-439. DOI: 10.1016/j.fm.2010.10.005. ISSN 07400020.
- CEBRIÁN, Rubén, Alberto BAÑOS, Eva VALDIVIA, Rubén PÉREZ-PULIDO, Manuel MARTÍNEZ-BUENO a Mercedes MAQUEDA. 2012. Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food Microbiology*. **30**(1), 59-67. DOI: 10.1016/j.fm.2011.12.002. ISSN 07400020.
- COSENTINO, Sofia, Maria Barbara PISANO, Arianna CORDA, Maria Elisabetta FADDA a Carla PIRAS. 2004. Genotypic and technological characterization of enterococci isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *Journal of Dairy Research*. **71**(4), 444-450. DOI: 10.1017/S002202990400041X. ISSN 0022-0299.
- DADÁKOVÁ, Eva, Martin KŘÍŽEK a Tamara PELIKÁNOVÁ. 2009. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. **116**(1), 365-370. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.02.018. ISSN 03088146.
- DAHER, N. SAYEM EL a R. E. SIMARD. 1985. Putrefactive Amine Changes in Relation to Microbial Counts of Ground Beef During Storage. *Journal of Food Protection*. **48**(1), 54-58. DOI: 10.4315/0362-028X-48.1.54. ISSN 0362-028x.

DE PALENCIA FERNÁNDEZ, Pilar, Manuel FERNANDEZ, María Luz MOHEDANO, Victor LADERO, Cristina QUEVEDO, Miguel A. ALVAREZ a Paloma LOPEZ. 2011. Role of Tyramine Synthesis by Food-Borne *Enterococcus durans* in Adaptation to the Gastrointestinal Tract Environment. *Applied and Environmental Microbiology*. **77**(2), 699-702. DOI: 10.1128/AEM.01411-10. ISSN 0099-2240.

DEEPIKA Priyadarshani Wadu Mesthri a Sudip Kumar RAKSHIT. 2011. Screening selected strains of probiotic lactic acid bacteria for their ability to produce biogenic amines (histamine and tyramine). *International Journal of Food Science*. **46**(10), 2062-2069. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2011.02717.x. ISSN 09505423

DEL RIO, Beatriz, Begoña REDRUELLO, Victor LADERO, Maria FERNANDEZ, Maria Cruz MARTIN a Miguel A. ALVAREZ. 2016. Putrescine production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CECT 8666 is reduced by NaCl via a decrease in bacterial growth and the repression of the genes involved in putrescine production. *International Journal of Food Microbiology*. **232**, 1-6. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.010. ISSN 01681605.

DOEUN, Dara, Hye-Sun SHIN a Myung-Sub CHUNG. 2016. Effects of storage temperatures, vacuum packaging, and high hydrostatic pressure treatment on the formation of biogenic amines in Gwamegi. *Applied Biological Chemistry*. **59**(1), 51-58. DOI: 10.1007/s13765-015-0128-5. ISSN 2468-0834.

DOĞAN, Abdullah, Salih OTLU, Fatih BÜYÜK, Pınar AKSU, Elif TAZEGÜL a Dinçer ERDAĞ. 2012. Effects of Cysteamine, Putrescine and Cystemine-Putrescine Combination on some Bacterium. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. **18** (6): 1015-1019.

EMBORG, Jette a Paw DALGAARD. 2008. Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation by *Morganella psychrotolerans*. *International Journal of Food Microbiology*. **128** (2), 226-233. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.016. ISSN 01681605.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. 2011. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*. 2011, **9**(10), 2393. DOI: 10.2903/j.efsa.2011.2393. ISSN 18314732.

EVEN, Sergine, Sabine LEROY, Cathy CHARLIER, *et al.* 2010. Low occurrence of safety hazards in coagulase negative staphylococci isolated from fermented foodstuffs. *International Journal of Food Microbiology*., **139**(1-2), 87-95. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.019. ISSN 01681605.

FDA. 2011. Scombrototoxin (histamine) formation. *Fish and fishery products hazards and controls guidance*, 4th edn. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood, Washington, DC, pp 113–152

- FOSTER, John W. 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nature Reviews Microbiology*. **2**(11), 898-907. DOI: 10.1038/nrmicro1021. ISSN 1740-1526.
- FRANZ, Charles M.A.P. 2003. Enterococci in foods — a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*. **88**(2-3), 105-122. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00174-0. ISSN 01681605.
- FRANZ, Charles M.A.P. a Wilhelm Heinrich HOLZAPFEL. 2006. Enterococci. *Emerging Foodborne Pathogens*. Cambridge: Elsevier, s. 557. DOI: 10.1533/9781845691394.2.557. ISBN 9781855739635.
- GALE, E. F. 1946. The bacterial amino-acid decarboxylases. *Adv. Enzymol.* **6**, 1.
- GARDINI, Fausto, Maria MARTUSCELLI, Marisa Carmela CARUSO, Fernanda GALGANO, Maria Antonietta CRUDELE, Fabio FAVATI, Maria Elisabetta GUERZONI a Giovanna SUZZI. 2001. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*. **64**(1-2), 105-117. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00445-1. ISSN 01681605.
- GARDINI, Fausto, Sara BOVER-CID, Rosanna. TOFALO, Nicoletta BELLETTI, Veronica GATTO, Giovanna SUZZI a Sandra TORRIANI. 2008. Modeling the Aminogenic Potential of *Enterococcus faecalis* EF37 in Dry Fermented Sausages through Chemical and Molecular Approaches. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**(9), 2740-2750. DOI: 10.1128/AEM.02267-07. ISSN 0099-2240.
- GARDINI, Fausto, Yesim ÖZOGUL, Giovanna SUZZI, Giulia TABANELLI a Fatih ÖZOGUL. 2016. Technological Factors Affecting Biogenic Amine Content in Foods: A Review. *Frontiers in Microbiology*. **7**:1218. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01218. ISSN 1664-302x.
- GATTO, Veronica, Giulia TABANELLI, Chiara MONTANARI, Valentina PRODOMI, Eleonora BARGOSSI, Sandra TORRIANI a Fausto GARDINI. 2016. Tyrosine decarboxylase activity of *Enterococcus mundtii*: new insights into phenotypic and genetic aspects. *Microbial Biotechnology*., **9**(6), 801-813. DOI: 10.1111/1751-7915.12402. ISSN 17517915.
- GENNARO, Maria Carla Arla , Valentina GIANOTTI, Emílio MARENGO, Daniele PATTONO a Rosa Maria TURI. 2003. A chemometric investigation of the effect of the cheese-making process on contents of biogenic amines in a semi-hard Italian cheese (Toma). *Food Chemistry*. **82**(4), 545-551. DOI: 10.1016/S0308-8146(03)00009-8. ISSN 03088146.
- GREIF, Gabriel, GREIFOVÁ Mária a Jolana KAROVIČOVÁ. 2006. Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics

by *Enterobacter* spp. bacteria in model conditions. *Journal of Food and Nutrition Research* **45**:21–29.

GÜCÜKOĞLU, Ali a Özlem KÜPLÜLÜ. 2010. The effect of different starter cultures and ripening temperatures on formation of biogenic amine in Turkish fermented sausages. *European Food Research and Technology*. **230**(6), 875-884. DOI: 10.1007/s00217-010-1220-z. ISSN 1438-2377.

GUTIÉRREZ, Diana, Beatriz MARTÍNEZ, Ana RODRÍGUEZ a Pilar GARCÍA. 2010. Isolation and Characterization of Bacteriophages Infecting *Staphylococcus epidermidis*. *Current Microbiology*, **61**(6), 601-608. DOI: 10.1007/s00284-010-9659-5. ISSN 0343-8651.

HALÁSZ, Anna, Ágnes BARÁTH, Livia SIMON-SARKADI a Wilhelm HOLZAPFEL. 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science*. **5**(2), 42-49. DOI: 10.1016/0924-2244(94)90070-1. ISSN 09242244.

HENDL, Jan. 2004. *Přehled statistických metod zpracování dat: analýza a metaanalýza dat*. Vyd. 1. Praha: Portál. ISBN 80-717-8820-1.

HWANG, Chiu-Chu, Hsien-Feng KUNG, Chung-Saint LIN, Deng-Fwu HWANG a Yung-Hsiang TSAI. 2011. Bacteriological quality and histamine-forming bacteria associated with fish meats and environments in HACCP and non-HACCP fish processing factories. *Food Control*. **22**(10), 1657-1662. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.03.025. ISSN 09567135.

JUNEJA, Vijay K. a John Nikolaos SOFOS. 2010. *Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions*. Washington, DC: ASM Press, s. 500c. ISBN 978-1-55581-459-5.

KALHOTKA, Libor, Ivan MANGA, Jitka PŘICHYŠTALOVÁ, Michaela HŮLOVÁ, Marcela VYLETĚLOVÁ a Květoslava ŠUSTOVÁ. 2012. Decarboxylase activity test of the genus *Enterococcus* isolated from goat milk and cheese. *Acta Veterinaria Brno*. **81**(2), 145-151. DOI: 10.2754/avb201281020145. ISSN 0001-7213.

KANJEE, Usheer, Irina GUTSCHE, Shaliny RAMACHANDRAN a Walid A. HOURY. 2011. The Enzymatic Activities of the *Escherichia coli* Basic Aliphatic Amino Acid Decarboxylases Exhibit a pH Zone of Inhibition. *Biochemistry*. **50**(43), 9388-9398. DOI: 10.1021/bi201161k. ISSN 0006-2960.

KIM, S.H., R.J. PRICE, M.T. MORRISSEY, K.G. FIELD, C.I. WEI a H. AN. 2002. Histamine Production by *Morganella morganii* in Mackerel, Albacore, Mahi-mahi, and Salmon at Various Storage Temperatures. *Journal of Food Science*. **67**(4), 1522-1528. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb10316.x. ISSN 0022-1147.

- KOHAJDOVÁ, Zlatica., Jolana. KAROVIČOVÁ, Gabriel. GREIF, 2008. Biogénne amíny v potravinách, *Potravinárstvo*, 2, 1, 30-49, ISSN 1337-0960.
- KOMPRDA, Tomas, Radka BURDYCHOVÁ, Vlastimil DOHNAL, Olga CWIKOVÁ, Pavla SLÁDKOVÁ a Helena DVOŘÁČKOVÁ. 2008. Tyramine production in Dutch-type semi-hard cheese from two different producers. *Food Microbiology*. **25**(2), 219-227. DOI: 10.1016/j.fm.2007.11.006. ISSN 07400020.
- KONINGS, Wil N., Juke, S. LOLKEMA, Henk BOLHUIS, Hendrik W. VAN VEEN, Bert POOLMAN a Arnold J. M. DRIESSEN. 1997. *Antonie van Leeuwenhoek*. **71**(1/2), 117-128. DOI: 10.1023/A:1000143525601. ISSN 00036072.
- KULEY, Esmeray, Esra BALIKCI, İlyas ÖZOGUL a Derya CENGİZ. 2013. Interaction between lactic acid bacteria and food-borne pathogens on putrescine production in ornithine-enriched broth. *International Journal of Food Science*. **48**(2), 394-404. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2012.03201.x. ISSN 09505423.
- KUNG, Hsien-Feng, Yung-Hsiang TSAI, Shih-Chih CHANG a Tang-Yao HONG. 2012. Biogenic Amine Content, Histamine-Forming Bacteria, and Adulteration of Pork in Tuna Sausage Products. *Journal of Food Protection*. **75**(10), 1814-1822. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-12-061. ISSN 0362028x.
- LA GIOIA, Federica, Lucia RIZZOTTI, Franca ROSSI, Fausto GARDINI, Giulia TABANELLI a Sandra TORRIANI. 2011. Identification of a Tyrosine Decarboxylase Gene (*tdcA*) in *Streptococcus thermophilus* 1TT45 and Analysis of Its Expression and Tyramine Production in Milk. *Applied and Environmental Microbiology*. **77**(3), 1140-1144. DOI: 10.1128/AEM.01928-10. ISSN 0099-2240.
- LADERO, Victor, Esther SÁNCHEZ-LLANA, María FERNÁNDEZ a Miguel A. ALVAREZ. 2011. Survival of biogenic amine-producing dairy LAB strains at pasteurisation conditions. *International Journal of Food Science*. **46**(3), 516-521. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2010.02508.x. ISSN 09505423.
- LADERO, Victor, María FERNÁNDEZ, Isabel CUESTA a Miguel A. ALVAREZ. 2010. Quantitative detection and identification of tyramine-producing enterococci and lactobacilli in cheese by multiplex qPCR. *Food Microbiology*. **27**(7), 933-939. DOI: 10.1016/j.fm.2010.05.026. ISSN 07400020.
- LADERO, Victor, María FERNÁNDEZ, Marina CALLES-ENRÍQUEZ, Esther SÁNCHEZ-LLANA, Elena CAÑEDO, M. Cruz MARTÍN a Miguel A. ALVAREZ. 2012. Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci? *Food Microbiology*. **30**(1), 132-138. DOI: 10.1016/j.fm.2011.12.016. ISSN 07400020.
- LANDETA, Gerardo, José Antonio CURIEL, Alfonso V. CARRASCOSA, Rosario Maria MUÑOZ a Blanca D DE LAS RIVAS. 2013. Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from Spanish dry cured meat products.

*Meat Science*. **93**(3), 387-396. DOI: 10.1016/j.meatsci.2012.09.019. ISSN 03091740.

LANDETE, José María, Blanca DE LAS RIVAS, Angela MARCOBAL a Rosario MUÑOZ. 2007. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *International Journal of Food Microbiology*. **117**(3), 258-269. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.05.001. ISSN 01681605.

LATORRE-MORATALLA, Mariluz, Sara BOVER-CID, Regine TALON, *et al.* 2010. Distribution of Aminogenic Activity among Potential Autochthonous Starter Cultures for Dry Fermented Sausages. *Journal of Food Protection*. **73**(3), 524-528. ISSN 0362-028X.

LAUKOVÁ, Andrea, Anna KANDRIČÁKOVÁ, Pavel PLEVA, Leona BUŇKOVÁ a Jana ŠČERBOVÁ. 2017. Effect of lantibiotic gallidermin against biogenic amine-producing faecal staphylococci from ostriches and pheasants. *Folia Microbiologica.*, **62**(3), 229-235. DOI: 10.1007/s12223-017-0492-0. ISSN 0015-5632

LEUSCHNER, Renata G, Martina HEIDEL a Walter P HAMMES. 1998. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. **39**(1-2), 1-10. DOI: 10.1016/S0168-1605(97)00109-8. ISSN 01681605.

LI, Jing, Fazheng REN, Huiyong GU, Xiaopeng LI a Bozhong GAN. 2011. Safety evaluation in vitro of *Enterococcus durans* from Tibetan traditional fermented yak milk. *The Journal of Microbiology*. **49**(5), 721-728. DOI: 10.1007/s12275-011-1062-9. ISSN 1225-8873.

LINARES, Daniel M, Maria FERNÁNDEZ, Beatriz DEL-RÍO, Victor LADERO, Maria MARTIN a Miguel A ALVAREZ. 2012. The tyrosyl-tRNA synthetase like gene located in the tyramine biosynthesis cluster of *Enterococcus durans* is transcriptionally regulated by tyrosine concentration and extracellular pH. *BMC Microbiology*. **12**(1), 23-. DOI: 10.1186/1471-2180-12-23. ISSN 1471-2180.

LIU, Fang, Lihui DU, Weiyan XU, Daoying WANG, Muhan ZHANG, Yongzhi ZHU a Weimin XU. 2013. Production of Tyramine by *Enterococcus faecalis*. Strains in Water-Boiled Salted Duck. *Journal of Food Protection*. **76**(5), 854-859. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-12-487. ISSN 0362028x.

LU, Shiling, Jiang CAIHONG, Xu XINGLIAN, Xu CHENGJIAN, Li KAIXIONG a Shu RUIHUA. 2016. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria and *Enterobacteria*. *Czech Journal of Food Sciences*. **33**(No. 1), 19-26. DOI: 10.17221/197/2014-CJFS. ISSN 12121800.

LU, Shiling, Xinglian XU, Guanghong ZHOU, Zhiyuan ZHU, Yong MENG a Yuanming SUN. 2010. Effect of starter cultures on microbial ecosystem and



biogenic amines in fermented sausage. *Food Control*. **21**(4), 444-449. DOI: 10.1016/j.foodcont.2009.07.008. ISSN 09567135.

MARCOBAL, Angela, Blanca DE LAS RIVAS, José María LANDETE, Laura TABERA a Rosario MUÑOZ. 2012. Tyramine and Phenylethylamine Biosynthesis by Food Bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **52**(5), 448-467. DOI: 10.1080/10408398.2010.500545. ISSN 1040-8398.

MARCOBAL, Ángela, Pedro Jesús MARTÍN-ÁLVAREZ, María Victoria MORENO-ARRIBAS a Rosario MUÑOZ. 2006. A multifactorial design for studying factors influencing growth and tyramine production of the lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* CECT 4669 and *Enterococcus faecium* BIFI-58. *Research in Microbiology*. **157**(5), 417-424. DOI: 10.1016/j.resmic.2005.11.006. ISSN 09232508.

MARKLINDER, Ingela a Clas LÖNNER. 1992. Fermentation properties of intestinal strains of *Lactobacillus*, of a sour dough and of a yoghurt starter culture in an oat-based nutritive solution. *Food Microbiology*. **9**(3), 197-205. DOI: 10.1016/0740-0020(92)80047-8. ISSN 07400020.

MARTH, Elmer H. a James L. STEELE. 2001. *Applied Dairy Microbiology*. 2nd ed., rev. and expanded. New York: M. Dekker. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 110. ISBN 082470536x.

MARTÍN, Belén, Margarita GARRIGA, Marta HUGAS, Sara BOVER-CID, María Teresa VECIANA-NOGUÉS a Teresa AYMERICH. 2006. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*. **107**(2), 148-158. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.024. ISSN 01681605.

MOLENAAR, Douwe, Jaap S. BOSSCHER, Bart Ten BRINK, Arnold J. M. DRIESSEN a Wil N. KONINGS. 1993. Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Bacteriology* **175** (10), 2864-2870.

MORANDI Stefano, Milena BRASCA, Paola ALFIERI, Roberta LODI a Alberto TAMBURINI. 2005. Influence of pH and temperature on the growth of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Food science & technology*. **85**, 3, 181 – 192. DOI: 10.1051/lait:2005006

MUÑOZ-ATIENZA, Estefanía, Gerardo LANDETA, Blanca DE LAS RIVAS, Beatriz GÓMEZ-SALA, Rosario MUÑOZ, Pablo E. HERNÁNDEZ, Luis M. CINTAS a Carmen HERRANZ. 2011. Phenotypic and genetic evaluations of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*. **146**(2), 212-216. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.024. ISSN 01681605.

MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.), v H & H 3. Jinočany: H & H, 2002. Lange medical book. ISBN 80-7319-013-3.

NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 852/2004, ze dne 29. dubna 2004 o hygieně potravin. Dostupné na: <<http://eur-lex.europa.eu>>.

NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. Dostupné na: <<http://eur-lex.europa.eu>>.

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. Dostupné na: <<http://eur-lex.europa.eu>>.

ÖZOGUL, Fatih a Yesim ÖZOGUL. 2007. The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures. *European Food Research and Technology*. **225**(3-4), 385-394. DOI: 10.1007/s00217-006-0429-3. ISSN 1438-2377.

PACHLOVÁ, Vendula, František BUŇKA, Leona BUŇKOVÁ, Sabina PURKRTOVÁ, Šárka HAVLÍKOVÁ a Irena NĚMEČKOVÁ. 2016. Biogenic amines and their producers in Akawi white cheese. *International Journal of Dairy Technology*. **69**(3), 386-392. DOI: 10.1111/1471-0307.12294. ISSN 1364727x.

PESSIONE, Enrica, Alessandro PESSIONE, Cristina LAMBERTI, *et al.* 2009. First evidence of a membrane-bound, tyramine and  $\beta$ -phenylethylamine producing, tyrosine decarboxylase in *Enterococcus faecalis*: A two-dimensional electrophoresis proteomic study. *PROTEOMICS*. **9**(10), 2695-2710. DOI: 10.1002/pmic.200800780. ISSN 16159853.

REA, Mary C., Charles M. A. P. FRANZ, Wilhelm Heinrich HOLZAPFEL a Timothy M. COGAN. 2004. Development of enterococci and production of tyramine during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. **43**(2), 247-258.

REVIRIEGO, Carlota, Tracy J. EATON, Rocío G. MARTÍN, Esther Z. JIMÉNEZ, *et al.* 2005. Screening of Virulence Determinants in *Enterococcus faecium* Strains Isolated From Breast Milk. *Journal of Human Lactation*. **21**(2), 131-137. DOI: 10.1177/0890334405275394. ISSN 0890-3344.

ROMANO Patrizia, Angela CAPECE a Cinzia POETA. 2007. Biogenic amine formation in alcoholic fermentation. *Bull. OIV* **80**, 251–262.

RUIZ-MOYANO, Santiago, Alberto MARTÍN, María José BENITO, Emilio ARANDA, Rocío CASQUETE a María de Guía CÓRDOBA. 2009. Safety and Functional Aspects of Preselected *Enterococci* for Probiotic Use in Iberian Dry-Fermented Sausages. *Journal of Food Science*. **74**(7), M398-M404. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01290.x. ISSN 00221147.

SÁNCHEZ MAINAR, María, Frédérick MATHEUSE, Luc DE VUYST a Frédéric LEROY. 2017. Effects of glucose and oxygen on arginine metabolism by

coagulase-negative staphylococci. *Food Microbiology.*, **65**, 170-178. DOI: 10.1016/j.fm.2017.02.007. ISSN 07400020.

SARANTINOPOULOS, Panagiotis, Christian ANDRIGHETTO, Marina D. GEORGALAKI, Mary C. REA, Angiolella LOMBARDI, Timothy M. COGAN, George KALANTZOPOULOS a Effie TSAKALIDOU. 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal.* **11**(8), 621-647. DOI: 10.1016/S0958-6946(01)00087-5. ISSN 09586946.

SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot.* 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. 270 s. 55-969C-2006 02/58 12Př. ISBN 80-210-4207-9.

SEITTER, Marion, Bettina GENG a Christian HERTEL. 2011. Binding to extracellular matrix proteins and formation of biogenic amines by food-associated coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology.* **145**(2-3), 483-487. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.026. ISSN 01681605.

SHALABY, Ali R. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International.* **29**(7), 675-690. DOI: 10.1016/S0963-9969(96)00066-X. ISSN 09639969.

SILLA SANTOS, M. H. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology.* **29**(2-3), 213-231. DOI: 10.1016/0168-1605(95)00032-1. ISSN 01681605.

SMĚLÁ, Dana, Pavla PECHOVÁ, Tomáš KOMPRDA, Bořivoj KLEJDUS a Vlastimil KUBÁŇ. 2004. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy.* 432-437.

STANDAROVA, Eva, Ivana BORKOVCOVA, Marta DUSKOVA a Lenka VORLOVA. 2009. Production of tyramine and histamine by bacteria isolated from czech blue-veined cheese niva. *Journal of Food and Nutrition Research.* **48**(4), 189-194. ISSN 1336-8672

SUZZI, Giovanna a Fausto GARDINI. 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology.* **88**(1), 41-54. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00080-1. ISSN 01681605

TABANELLI, Giulia, Chiara MONTANARI, Luigi GRAZIA, Rosalba LANCIOTTI a Fausto GARDINI. 2013. Effects of aw at packaging time and atmosphere composition on aroma profile, biogenic amine content and microbiological features of dry fermented sausages. *Meat Science.* **94**(2), 177-186. DOI: 10.1016/j.meatsci.2013.01.018. ISSN 03091740.

TAKAHASHI, Hajime, Bon KIMURA, Miwako YOSHIKAWA a Tateo FUJII. 2003. Cloning and sequencing of the histidine decarboxylase genes of gram-negative, histamine-producing bacteria and their application in detection and identification of these organisms in fish. *Applied and Environmental*

*Microbiology*. **69**(5), 2568-2579. DOI: 10.1128/AEM.69.5.2568-2579.2003. ISSN 0099-2240.

TEN BRINK, Ben., C. DAMINK, Han M. L. J. JOOSTEN a J. H. J. HUIS IN 'T VELD. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*. **11**(1), 73-84. DOI: 10.1016/0168-1605(90)90040-C. ISSN 01681605.

TETI, Diana, Maria VISALLI a Harold MCNAIR. 2002. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *Journal of Chromatography B*. **781**(1-2), 107-149. DOI: 10.1016/S1570-0232(02)00669-4. ISSN 15700232.

TSAI, Yung-Hsiang, Hsien-Feng KUNG, Tsong-Ming LEE, Hwi-Chang CHEN, Shin-Shou CHOU, Cheng-I WEI a Deng-Fwu HWANG. 2005. Determination of histamine in canned mackerel implicated in a food borne poisoning. *Food Control*. **16**(7), 579-585. DOI: 10.1016/j.foodcont.2004.06.019. ISSN 09567135.

VALENZUELA, Antonio Sánchez, Nabil BENOMAR, Hikmate ABRIOUEL, Magdalena Martínez CAÑAMERO a Antonio GÁLVEZ. 2010. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: Antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiology*. **27**(7), 955-961. DOI: 10.1016/j.fm.2010.05.033. ISSN 07400020.

YOKOI, Ken-ji, Yasuyuki HARADA, Kei-Ichi SHOZEN, Masataka SATOMI, Akira TAKETO a Ken-Ichi KODAIRA. 2011. Characterization of the histidine decarboxylase gene of *Staphylococcus epidermidis* TYH1 coded on the staphylococcal cassette chromosome. *Gene*. **477**(1-2), 32-41. DOI: 10.1016/j.gene.2011.01.003. ISSN 03781119.

ZAMAN, Muhammad Zukhrufuz, Fatimah ABU BAKAR, S. JINAP a Jamilah BAKAR. 2011. Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. **145**(1), 84-91. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.031. ISSN 01681605.

ZWIETERING, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & Van't Riet, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and environmental microbiology*, **56**(6), 1875-1881.

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obr. 1. Produkce biogenních aminů dekarboxyláza pozitivními mikroorganismy.

Obr. 2. Schéma experimentu II – sledování faktorů ovlivňujících dekarboxylázovou aktivitu testovaných kmenů *in vitro*.

Obr. 3. Parametry Gompertzova modelu.

Obr. 4. Růstové křivky a yield faktory (sloupcový graf) u *Enterococcus faecium* M2C *in vitro* při 30 °C (a) a 6 °C (b), pH 5 za anaerobních podmínek s přidavkem 1 (černá) a 6 (modrá) % (w/v) NaCl.

Obr. 5. Kinetika produkce tyraminu (a) a fenyletylaminu (b) při teplotě 30 °C u *Enterococcus faecium* M2C v závislosti na pH.

Obr. 6. Kinetika produkce tyraminu (a) a fenyletylaminu (b) při 30 °C u *Enterococcus* sp. M5a v závislosti na pH.

Obr. 7. Kinetika produkce tyraminu při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Staphylococcus pasteurii* 19/1 v závislosti na pH.

Obr. 8. Kinetika produkce tyraminu při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Staphylococcus pasteurii* 19/1 v závislosti na koncentraci NaCl.

Tab. 1. Detekovaná produkce biogenních aminů nebo genů pro dekarboxylázy u bakterií rodu *Enterococcus*.

Tab. 2. Detekovaná produkce biogenních aminů nebo genů pro dekarboxylázy u bakterií rodu *Staphylococcus*.

Tab. 3. Seznam testovaných kmenů na produkci biogenních aminů.

Tab. 4. Produkce biogenních aminů bakteriemi rodů *Staphylococcus* a *Enterococcus* izolovanými ze *Salmo trutta* a *Oryctolagus curiculus*.

Tab. 5. Produkce biogenních aminů bakteriemi rodů *Staphylococcus* a *Enterococcus* bez vlivu sledovaných faktorů (30 °C, pH 7, bez přidavku NaCl, aerobně).

Tab. 6. Hodnocení vlivu sledovaných faktorů na maximální produkci BA u *Staphylococcus epidermidis* 21/2.

Rovnice 1: Gompertzových modelů. Závislost obsahu BA (y) (mg.l<sup>-1</sup>) na čase (t)

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A/AN	– aerobní/anaerobní prostředí
ADC	– arginindekarboxyláza
AGM	– agmatin
AgUH	– agmatinureohydroláza
BA	– biogenní aminy
BHI	– Brain Heart Infusion
CAD	– kadaverin
EFSA	– European Food Safety Authority
FDA	– Food Drug Agency
HDC	– histidindekarboxyláza
HIS	– histamin
HPLC	– vysokoúčinná kapalinová chromatografie
KTJ (CFU)	– kolonie tvořící jednotku
LDC	– lyzindekarboxyláza
ODC	– ornitindekarboxyláza
PCR	– polymerázová řetězová reakce
PHE	– fenyletylamin
PheDC	– fenylalanindekarboxyláza
PUT	– putrescin
SPD	– spermidin
SpdS	– spermidinsyntetáza
SPM	– spermin
SpmS	– sperminsyntetáza.
TDC	– tyrozindekarboxyláza
TLC	– tenkovrstvá chromatografie
TRP	– tryptamin
TYM	– tyramin

# PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

## Příspěvky v mezinárodních časopisech vedené v databázi Web of Science

LAUKOVÁ, Andrea, Renata SZABÓOVÁ, Pavel PLEVA, Leona BUŇKOVÁ a Lubica CHRASTINOVÁ. 2017. Decarboxylase-positive *Enterococcus faecium* strains isolated from rabbit meat and their sensitivity to enterocins. *Food Science & Nutrition*. 5 (1), 31-37, DOI:10.1002/fsn3.361

LAUKOVÁ, Andrea, Anna KANDRIČÁKOVÁ, Pavel PLEVA, Leona BUŇKOVÁ a Jana ŠČERBOVÁ. 2017. Effect of lantibiotic gallidermin against biogenic amine-producing faecal staphylococci from ostriches and pheasants. *Folia Microbiologica*. 62(3), 229-235, DOI: 10.1007/s12223-017-0492-0. ISSN 0015-5632.

LAUKOVÁ, Andrea, Anna KANDRIČÁKOVÁ, Leona BUŇKOVÁ, Pavel PLEVA a Jana ŠČERBOVÁ. Sensitivity to Enterocins of Biogenic Amine-Producing Faecal Enterococci from Ostriches and Pheasants. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* DOI: 10.1007/s12602-017-9272-z. ISSN 1867-1306. (v tisku)

LORENCOVÁ, Eva, Leona BUŇKOVÁ, Pavel PLEVA, Vladimír DRÁB, Vlastimil KUBÁŇ a František BUŇKA. 2014. Selected factors influencing the ability of Bifidobacterium to form biogenic amines. *International Journal of Food Science & Technology*. 49(5), 1302-1307

PLEVA, Pavel, Leona BUŇKOVÁ, Andrea LAUKOVÁ, Eva LORENCOVÁ, Vlastimil KUBÁŇ a František BUŇKA. 2012. Decarboxylation activity of enterococci isolated from rabbit meat and staphylococci isolated from trout intestines. *Veterinary Microbiology*. 159(3-4), 438-442

LORENCOVÁ, Eva, Leona BUŇKOVÁ, Dagmar MATOULKOVÁ, Vladimír DRÁB, Pavel PLEVA, Vlastimil KUBÁŇ a František BUŇKA. 2012. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *International Journal of Food Science & Technology*. 47(10), 2086-2091

## Příspěvky v časopisech vedené v databázi SCOPUS

PUREVDORJ, Khatantuul, Kristýna MARŠÁLKOVÁ, Iva BŘEZINOVÁ, Adéla ŽALCOVÁ, Pavel PLEVA a Leona BUŇKOVÁ. 2017. Antimicrobial effect of selected lactic acid bacteria against microorganisms with decarboxylase activity. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*. 11(1), DOI: 10.5219/740. ISSN 1337-0960.

PLEVA, Pavel, Leona BUŇKOVÁ, Eva THEIMROVÁ, Vendula BARTOŠÁKOVÁ, František BUŇKA a Khatantuul PUREVDORJ. 2014. Biogenic amines in smear and mould-ripened cheeses. *Potravinarstvo*. 8(1)

TLÁSKAL, Martin, Pavel PLEVA, Jaroslav MICHÁLEK, Leona BUŇKOVÁ a František BUŇKA. 2014. Statistical analysis of biogenic amines formation process under different levels of selected factors. *International Journal of Biology and Biomedical Engineering*. **8**, 197-204. ISSN: 19984510

BUŇKOVÁ, Leona, Pavel PLEVA, František BUŇKA, Pavel VALÁŠEK a Stanislav KRÁČMAR. 2008. Antibacterial effects of commercially available phosphates on selected microorganisms. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, **56**, 19-24

Původní vědecké práce publikované v recenzovaných časopisech bez impakt faktoru

PLEVA, Pavel., Zuzana LAZÁRKOVÁ, Adéla ANDRESOVÁ, Eva LORENCOVÁ, František BUŇKA a Leona BUŇKOVÁ. 2012. Effect of selected monosaccharide on growth and putrescine production of *Serratia marcescens*. *Plasty a kaučuk*, **49** (Speciál), 30-32, 2012

BUŇKOVÁ, Leona, Pavel BUDINSKÝ, Gabriela ADAMCOVÁ, Pavel PLEVA a František BUŇKA. 2012. Monitoring výskytu biogenních aminů ve fermentovaných mléčných výrobcích v ČR. *Mlékařské listy*, **134**

PLEVA, Pavel, Leona BUŇKOVÁ, Andrea LAUKOVÁ, Eva LORENCOVÁ, Vlastimil KUBÁŇ a František BUŇKA. 2012. Factors affected decarboxylation activity of *Enterococcus faecium* isolated from rabbit, *Potravinářstvo*, **6**, 2, 46-49

Príspevky ve sbornících z konferencí:

PLEVA, Pavel, Karolína CEDIDLOVÁ a Petra JANČOVÁ. 2017. Produkce biogenních aminů bakteriemi izolovanými ze vzorků povrchových vod. *Týden výzkumu a inovací pro praxi a životní prostředí – TVIP 2017*. ISBN: 978-80-85990-30-0. Dostupné z: <http://www.odpadoveforum.cz/TVIP2017/index.html>.

TLÁSKAL, Martin, František BUŇKA, Jaroslav MICHÁLEK, Leona BUŇKOVÁ a Pavel PLEVA. 2014. On the kinetics of biogenic amines formation under different levels of selected factors. *In Applied Numerical Mathematics and Scientific Computation*. Athens: Europment. s. 116-120. ISBN: 978-1-61804-253-8

PLEVA, Pavel, Zuzana LAZÁRKOVÁ, Adéla ANDRESOVÁ, Eva LORENCOVÁ, František BUŇKA a Leona BUŇKOVÁ. 2012. Effect of selected monosaccharide on growth and putrescine production of *Serratia marcescens*, *Plasty a kaučuk* 2012

PLEVA, Pavel, Leona BUŇKOVÁ, Iva MAHOVSKÁ, Veronika MANDOVÁ, Eva LORENCOVÁ a František BUŇKA. 2013. Sledování faktorů dekarboxylázové aktivity enterokoků izolovaných z masa králíků, *Sborník: 26. Kongres československé společnosti mikrobiologické s mezinárodní účastí*, 1, 98



LAZÁRKOVÁ, Zuzana., Adéla ANDRESOVÁ, Pavel PLEVA, Eva LORENCOVÁ, Leona BUŇKOVÁ a František BUŇKA. 2012. Decarboxylase activity of *Serratia marcescens* depending of pH and chosen monosaccharide content. In: *WSEAS International Conference on Agricultural Science, Biotechnology, Food and Animal Science (ABIFA 2012)*, 224-228

PLEVA, Pavel, Leona BUŇKOVÁ, Eva LORENCOVÁ, Andrea LAUKOVÁ, František BUŇKA. 2011. Produkce biogenních aminů u enterokoků izolovaných z masa králíků a stafylokoků získaných z vnitřního obsahu střev pstruhů. In: *Sborník Konference Proteiny 2011*, 90-93.

LORENCOVÁ, Eva, Leona BUŇKOVÁ L, Pavel PLEVA, František BUŇKA, Dagmar MATOULKOVÁ a Vladimír DRÁB. 2011. In vitro produkce biogenních aminů technologicky významnými bakteriemi mléčného kvašení. In: *Sborník Konference Proteiny 2011*, 70-74.

BUŇKOVÁ, Leona, Pavel PLEVA a František BUŇKA. 2008. Antibakteriální účinky fosfátových tavicích solí na vybrané mikroorganismy kontaminující tavené sýry. In: *Sborník Celostátní přehlídky sýrů 2008*. Praha, s. 142–147.

LAZÁRKOVÁ, Zuzana, Adéla ANDRESOVÁ, František BUŇKA, Eva LORENCOVÁ, Pavel PLEVA a Leona BUŇKOVÁ. 2011. Decarboxylase activity of *Serratia marcescens* depending on pH and chosen monosaccharide content, *Výroční konference Komise potravinářské mikrobiologie Československé společnosti mikrobiologické, Třešť*

# ***CURRICILUM VITAE***

## **Osobní údaje:**

**Jméno a příjmení:** Ing. Pavel Pleva  
**Datum narození:** 8. 5. 1981  
**Kontaktní adresa:** U Vodojemu 1234, 757 01 Valašské meziříčí  
**E-mail:** [p.pleva@centrum.cz](mailto:p.pleva@centrum.cz)

## **Dosažené vzdělání:** vysokoškolské II. stupně (Ing.)

### **2010 – současnost**

UTB ve Zlíně, Fakulta technologická, Zlín  
kombinovaná forma doktorského studia Technologie potravin

### **2008 – 2010**

UTB ve Zlíně, Fakulta technologická, Zlín  
Obor: Chemie a technologie potravin

### **2005 - 2008**

UTB ve Zlíně, Fakulta technologická, Zlín  
Obor: Chemie a technologie potravin

### **2001 - 2004**

Vyšší odborná škola potravinářská, Kroměříž  
Obor: Zpracování mléka

### **1995 - 1999**

Střední zemědělská škola, Rožnov pod Radhoštěm

## **Pracovní zkušenosti:**

### **2015 – doposud**

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně; Pracovní pozice: asistent

### **2011 – 4/2013**

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně (DPČ); Pracovní pozice: Technik e-learningových opor a výukových materiálů.

### **2004**

Sevapharma, a.s. Praha; Pracovní pozice: Odborný laborant úseku řízení kontroly kvality na oddělení chemie; Stanovení organických a anorganických látek pomocí analytických metod.

## **Znalosti:**

### **Jazykové znalosti:**

Angličtina – aktivní znalost

**Počítačové znalosti – pokročilý uživatel:** MS Windows, Internet, MS Office, Adobe Photoshop, CorelDRAW, ORGIN 8.1, ISIS Draw

**Řidičský průkaz:** sk. A, B, C, T

## **Odborná příprava a zkušenosti:**

Projekty: 2011 IGA/12/FT/11/D, 2012 IGA/FT/2012/027, 2013 IGA/FT/2013/013.

Ing. Pavel Pleva

**Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů u vybraných  
bakterií rodů *Enterococcus* a *Staphylococcus***

Factors influencing biogenic amines production by selected strains of genera  
*Enterococcus* and *Staphylococcus*

Teze disertační práce

Vydala Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,  
nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín.

Náklad: vyšlo elektronicky  
Sazba: Pavel Pleva  
Publikace neprošla jazykovou ani redakční úpravou.

Rok vydání 2017

Pořadí vydání: první

ISBN 978-80-7454-689-1

