

Činitelé ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu *Enterococcus faecium*

Veronika Mandová

Bakalářská práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Veronika Mandová**
Osobní číslo: **T10066**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Činitelé ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu
Enterococcus faecium**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Popište toxikologické účinky biogenních aminů.
2. Charakterizujte dekarboxylázovou aktivitu.
3. Charakterizujte bakterie rodu *Enterococcus*.

II. Praktická část

1. Popište metodiku stanovení produkce biogenních aminů pomocí RP-HPLC.
 2. Popište vliv vnějších faktorů na dekarboxylázovou aktivitu *Enterococcus faecium*.
 3. Výsledky vyhodnoťte a formulujte závěry.
-

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

- [1] JUNEJA, V. K. – SOFOS, J. N. Pathogens and Toxic in Foods: Challenges and Intervention. Washington: ASM Press, 2010. 512 s. ISBN 978-1-55581-459-5.
- [2] GREIF, G. – GREIFOVÁ, M., – KAROVIČOVÁ, J. 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, 2006, vol. 45, no. 1, s. 21-29.
- [3] SANTOS, M. H. Biogenic amine: their importance in foods. International Journal of Food Microbiology, 1996, vol. 29, s. 213-231.
- [4] SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. Food Research International, 1996, vol. 29, no. 7, s. 675-690.
- [5] ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. Food Chemistry, 2007, vol. 103, s. 1475-1486.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Pavel Pleva

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

16. ledna 2013

Termín odevzdání bakalářské práce:

2. května 2013

Ve Zlíně dne 4. února 2013



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan



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

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 14.5.2013


.....

²⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Bakalářské práce se zabývá studií různých podmínek statické kultivace, tzv. činiteli ovlivňují tvorbu biogenních aminů a polyaminů vznikající činností dekarboxyláza-pozitivních bakterií. Dekarboxylázová aktivita byla sledována u *Enterococcus faecium* izolovaného z masa králíka. Teoretická část je zaměřena na chemickou strukturu biogenních aminů a polyaminů, jejich výskyt, vliv na organismus a vznik. Je charakterizován rod *Enterococcus* a jeho příznivé a škodlivé účinky. Cílem praktické části byla detekce a stanovení přesného množství produkovaných biogenních aminů a polyaminů při určité teplotě, pH a koncentraci NaCl. Schopnost růstu *Enterococcus faecium* v různých kultivačních podmínkách byla sledována měřením optické hustoty. Stanovení aminů bylo provedeno vysokoúčinnou kapalinou chromatografií. Nejvíce produkovaným biogenním aminem byl tyramin.

Klíčová slova:

biogenní aminy, polyaminy, dekarboxylace, *Enterococcus faecium*, potraviny.

ABSTRACT

This bachelor thesis pays an attention to the conditions of static cultivation or so-called factors for the production of biogenic amines and polyamines which are produced by the activity of decarboxylase-positive bacteria. Decarboxylase activity was observed at *Enterococcus faecium* which was isolated from the rabbit meat. The theoretical part concerns the chemical structure of biogenic amines and polyamines including their occurrence, effect on organism and their origin. Then the genus *Enterococcus* is characterised and its positive and negative effects are mentioned. The aim of the practical part is to detect and determine the exact amount of produced biogenic amines and polyamines at particular temperature, pH and concentration of sodium chloride. The sustainability of *Enterococcus faecium* growth in different culture conditions was observed by optical density measuring. The determination of amines was made by high performance liquid chromatography. The highest produced biogenous amine called tyramine.

Keywords:

biogenic amines, polyamines, decarboxylation, *Enterococcus faecium*, foods.

Děkuji svému vedoucímu Ing. Pavlu Plevovi za odbornou pomoc, ochotu a věcné připomínky při vypracování této práce. Dále bych ráda poděkovala laborantce Ing. Ludmile Zálešákové za spolupráci a ochotu v laboratoři při měření praktické části.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 BIOGENNÍ AMINY A POLYAMINY	12
1.1 CHEMICKÁ STRUKTURA BIOGENNÍCH AMINŮ.....	12
1.2 CHEMICKÁ STRUKTURA POLYAMINŮ.....	13
1.3 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ V POTRAVINÁCH.....	14
1.3.1 Fermentované potraviny.....	14
1.3.2 Nefermentované potraviny.....	15
1.4 FYZIOLOGICKÉ FUNKCE BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ.....	16
1.5 TOXIKOLOGIE BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ.....	17
1.5.1 Symptomy intoxikace biogenními aminy a polyaminy.....	17
1.5.2 Detoxikace biogenních aminů a polyaminů.....	18
1.5.3 Příпустné limity a toxické dávky vybraných biogenních aminů.....	19
2 PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ	20
2.1 VZNIK V POTRAVINÁCH.....	20
2.1.1 Dekarboxylace aminokyselin.....	20
2.2 VZNIK V ŽIVÝCH ORGANIZMECH.....	21
2.3 ČINITELÉ OVLIVŇUJÍCÍ DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITU MIKROORGANIZMŮ.....	21
2.3.1 Dostupnost volných aminokyselin.....	21
2.3.2 Teplota.....	22
2.3.3 pH - aktivní kyselost.....	22
2.3.4 Koncentrace NaCl.....	22
2.3.5 Přístup kyslíku.....	23
3 BAKTERIÁLNÍ ROD <i>ENTEROCOCCUS</i>	24
3.1 TAXONOMIE ENTEROKOKŮ.....	24
3.2 CHARAKTERISTIKA ENTEROKOKŮ.....	25
3.2.1 <i>Enterococcus faecium</i>	25
3.3 PŘÍZNVÉ ÚČINKY ENTEROKOKŮ.....	25
3.4 ŠKODLIVÉ ÚČINKY ENTEROKOKŮ - DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA.....	26
4 OPTICKÁ DENZITA	27
II PRAKTICKÁ ČÁST	30
5 CÍLE PRÁCE	31
6 MATERIÁL A PŘÍSTROJE	32
6.1 POUŽITÝ MIKROORGANIZMUS.....	32
6.2 KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	32
6.3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY.....	32
6.4 POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	33
7 METODIKA	34

7.1	PŘÍPRAVA INOKULA.....	34
7.2	PŘÍPRAVA RŮZNÝCH KULTIVAČNÍCH PODMÍNEK	34
7.3	ODEBÍRÁNÍ VZORKŮ	35
7.4	MĚŘENÍ OPTICKÉ DENZITY	36
7.5	STANOVENÍ DEKARBOXYLÁZOVÉ AKTIVITY <i>ENTEROCOCCUS FAECIUM</i>	36
8	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	37
8.1	DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA <i>ENTEROCOCCUS FAECIUM</i> KMENE 5BM1	37
8.2	DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA <i>ENTEROCOCCUS FAECIUM</i> KMENE M2C	46
	ZÁVĚR	52
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	53
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	58
	SEZNAM OBRÁZKŮ	60
	SEZNAM TABULEK.....	62
	SEZNAM PŘÍLOH.....	63
	PŘÍLOHA P I: VYBRANÉ NAMĚŘENÉ VÝSLEDKY A GRAFY AMINŮ PRODUKOVANÝCH KMENY <i>E. FAECIUM</i> 5BM1 A M2C	64

ÚVOD

Kvalita, bezpečnost a zdravotní nezávadnost potravin zaručuje ochranu zdraví spotřebitelů. Dbá se především na prevenci a omezení jakékoli kontaminace potravin v důsledku lidské činnosti nebo určitými nežádoucími látkami. K těmto látkám se řadí i aminy, které jsou potřebné pro řadu fyziologických pochodů v organismu, ale jejich nadměrný příjem potravou je pro člověka toxický.

Potraviny obsahující určité množství volných aminokyselin a proteinů podléhají mikrobiální aktivitě. Činností mikrobiálních enzymů dochází k dekarboxylaci volných aminokyselin, a tím vznikají biogenní aminy a polyaminy. K tvorbě těchto sloučenin značnou měrou přispívá kulturní a kontaminující mikroflóra. Rizikovými jsou potraviny fermentované, u kterých mohou být biogenní aminy tvořeny v toxikologicky závažných koncentracích. V nefermentovaných potravinách je jejich výskyt spojen s nežádoucím rozkladem bílkovin.

Králičí maso má dobrou nutriční hodnotu. Tento druh masa je však bohatým zdrojem plnohodnotných bílkovin a může být tak kontaminováno mikroflórou produkující biogenních aminy a polyaminy, což může podstatně ohrozit bezpečnost a zdravotní nezávadnost této suroviny. Je tedy nutné zabránit výskytu mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou. Důležitou roli zde hrají inhibiční faktory: pH, teplota, koncentrace NaCl a přístup kyslíku. Například prudký pokles pH, skladování při velmi nízkých teplotách, vysoká koncentrace NaCl atd. zamezí aktivitu dekarboxyláza-pozitivních bakterií.

Mezi bakterie s dekarboxylázovou aktivitou se řadí bakteriální rod *Enterococcus*. Enterokoky jsou někdy označovány jako "mléčné koky" a jsou přirození obyvatelé trávicího traktu člověka a živočichů. Jsou široce rozšířeni v prostředí a v potravinách především živočišného původu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY A POLYAMINY

1.1 Chemická struktura biogenních aminů

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární organické báze, které mají nahrazeny jeden či dva atomy vodíku aminoskupiny alkylovou nebo arylovou skupinou (Shalaby, 1996, s. 675). Tyto látky jsou produkty běžné metabolické aktivity zvířat, rostlin i mikroorganismů (Směla, 2004, s. 432). Biogenní aminy jsou nezbytnou součástí živých buněk s významnými fyziologickými a biologickými funkcemi (Juneja a Sofos, 2010, s. 248).

Mimo jiné mezi biogenní aminy patří histamin, tryptamin, fenyletylamin, tyramin a kadaverin (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 70; Santos et al., 2003, s. 595). Někteří autoři zařazují kadaverin mezi polyaminy (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 70). Mnoho názvů biogenních aminů je odvozeno od jejich původní aminokyseliny, například: histamin z histidinu, tryptamin z tryptofanu, fenyletylamin z fenylalaninu a tyramin z tyrozinu (Juneja a Sofos, 2010, s. 248-249; Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71; Shalaby, 1996, s. 676).

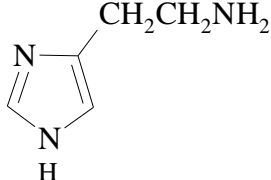
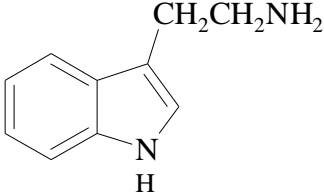
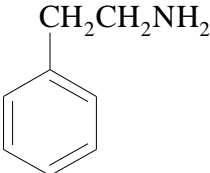
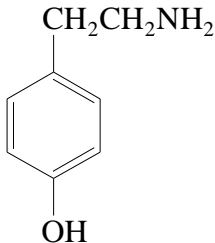
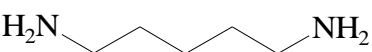
Z chemického hlediska se člení na (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 70; Silla-Santos, 1996, s. 213-214; Směla, 2004, s. 432):

- alifatické (kadaverin)
- aromatické (fenyletylamin, tyramin)
- heterocyklické (histamin, tryptamin).

Někdy se heterocyklické aminy zjednodušeně řadí do skupiny aromatických aminů (Směla, 2004, s. 432).

V tab. 1 jsou uvedeny prekurzory, klasifikace a chemická struktura biogenních aminů.

Tab. 1: Prekurzory, klasifikace a chemická struktura biogenních aminů. Upraveno dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249.

Prekurzor	Biogenní amin	Klasifikace	Chemická struktura
histidin	histamin	heterocyklická, monoamin	
tryptofan	tryptamin	heterocyklická, monoamin	
fenylalanin	fenyletylamin	aromatická, monoamin	
tyrozin	tyramin	aromatická, monoamin	
lyzin	kadaverin	alifatická, diamin	

1.2 Chemická struktura polyaminů

Polyaminy jsou malé alifatické biomolekuly obsahující více než jednu aminoskupinu (Shah a Swiatlo, 2008, s. 4). Jsou přítomny ve všech buňkách organismu, kde mají fyziologickou funkci (Dračková et al., 2009, s. 121; Larqué, Sabater-Molina a Zamora, 2007, s. 87). Dříve byly zařazeny mezi biogenní aminy, ale od roku 1990 byly na základě svého specifického fyziologického významu a tvorby alternativní metabolickou cestou klasifikovány jako samostatná skupina (Dračková et al., 2009, s. 121; Komprda et al., 2008, s. 29).

Mezi polyaminy patří putrescin, spermidin, spermin a případně agmatin (Larqué, Sabater-Molina a Zamora, 2007, s. 87). Autoři, jako například Santos et al. (2003, s. 595) zařazují putrescin i mezi biogenní aminy.

Polyaminy tvoří vodíkové můstky s molekulami rozpouštědel, například voda a alkoholy. Jsou tedy ve vodě rozpustné. Dále jsou při fyziologickém pH úplně protonizovány (Larqué, Sabater-Molina a Zamora, 2007, s. 87). Díky své specifické struktuře mohou polyaminy sloužit jako elektrostatické mosty mezi negativními fosfáty nukleových kyselin a dalšími záporně nabitými polymery. Polyamin putrescin je primární diamin se dvěma aminoskupinami, zatímco spermidin a spermin obsahují tři a čtyři aminoskupiny dle tab. 2 (Shah a Swiatlo, 2008, s. 4). Putrescin je také řazen mezi polyaminy, protože je prekurzorem spermidinu a sperminu (Dračková et al., 2009, s. 121).

V tab. 2 jsou uvedeny prekurzory, klasifikace a chemická struktura polyaminů.

Tab. 2: Prekurzory, klasifikace a chemická struktura polyaminů. Upraveno dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249.

Prekurzor	Polyamin	Klasifikace	Chemická struktura
ornitin, arginin, agmatin	putrescin	alifatická, diamin	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$
putrescin, spermin	spermidin	alifatická, polyamin	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$
putrescin, spermidin	spermin	alifatická, polyamin	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$

1.3 Výskyt biogenních aminů a polyaminů v potravinách

Biogenní aminy (BA) jsou v potravinách přirozenou součástí buněčných struktur rostlin a živočichů, nebo mohou vznikat v procesu výroby a skladování potravin jako výsledek metabolického působení mikroorganismů (Greif, Greifová a Karovičová, 2006, s. 21). Polyamin spermidin a spermin pocházejí hlavně ze vstupních surovin. Vyšší obsah spermidinu ve srovnání se sperminem je typický pro potraviny rostlinného původu. U potravin živočišného původu je tomu naopak (Dračková et al., 2009, s. 121).

1.3.1 Fermentované potraviny

Při přípravě fermentovaných potravin lze očekávat přítomnost mnoha druhů mikroorganismů, z nichž některé jsou schopny produkovat BA, což vede k jejich hromadění, obzvláště putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu. Mezi fermentované potraviny patří: fermentované masné a rybí výrobky, sýry, fermentovaná zelenina, pivo a víno. (Silla-Santos, 1996, s. 216-217)

Fermentované masné výrobky poskytují vhodné podmínky pro tvorbu BA. 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. (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 41)

Sýry obvykle obsahují jednotky až stovky mg.kg^{-1} histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu, jednotky až desítky mg.kg^{-1} fenyletylaminu a velmi malá množství tryptaminu. Obsahy těchto sloučenin mohou výjimečně dosáhnout až gramových množství v 1 kg sýra, což závisí na ošetření výchozí suroviny a technologických faktorech, jako je teplota sýření, použití startovacích a plísňových kultur. Výrazně vyšší množství BA bylo zjištěno u sýrů z nepasterovaného mléka. (Standarová, Borkovcová a Vorlová, 2008, s. 735-736)

1.3.2 Nefermentované potraviny

V nefermentovaných potravinách jsou BA především indikátorem nežádoucí mikrobiální činnosti. Stanovení těchto sloučenin může být využito k posouzení míry rozkladu sledovaného materiálu. V případě skladování potravin může být jejich obsah ukazatelem jakosti vstupní suroviny a úrovně hygieny během výrobního procesu a skladování (Standarová, Borkovcová a Vorlová, 2008, s. 735-736). Jako indikátory kvality ryb, masa, zeleniny slouží zejména histamin, putrescin a kadaverin (Saaid et al., 2009, s. 1356). Mezi nefermentované potraviny patří: maso, ryby, mléko, ovoce a zelenina (Silla-Santos, 1996, s. 214-216).

Maso čerstvé a zpracované obsahuje tyramin, kadaverin, putrescin, spermin a spermidin (Zorníková, 2012). Spermin a spermidin se vyskytuje v čerstvém masu v relativně konstantním množství. Nicméně tyramin, kadaverin, putrescin může být tvořen v průběhu skladování čerstvého masa (Hernández-Jover et al., 1997, s. 2099).

V čerstvém hovězím a vepřovém masu se nachází především spermin a spermidin. Hovězí a vepřové maso mají podobné množství těchto polyaminů, kdy v obou masech je vyšší obsah sperminu než spermidinu. Tyto polyaminy jsou přirozenou součástí čerstvého hovězího a vepřového masa, tudíž nevznikají během procesu fermentace a kažení potravin. V předchozích studiích bylo zjištěno, že během skladování vepřového masa byl produkován histamin, tyramin, putrescin a kadaverin. Spermidin zůstal v konstantním množství a množství sperminu mírně pokleslo. Index kvality je dán součtem kadaverinu,

putrescinu, histaminu a tyraminu. Při indexu kvality pod $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ uvedených aminů je maso považováno za výborné. (Hernández-Jover et al., 1997, s. 2099)

V králičím mase byla nejčastěji detekována produkce tyraminu, putrescinu, fenyletylaminu a spermidinu (Pleva et al., 2012a, s. 48). Dále Pleva et al. (2012b, s. 439-442) zjistili, že se v králičím mase vyskytuje kromě tyraminu, putrescinu a fenyletylaminu i kadaverin, a že spermidin a spermin nebyl přítomen.

Hernandez-Jover et al. (1997, s. 2099) detekovali v tepelně opracovaných a zrajících masných výrobcích vyšší množství sperminu než spermidinu, ale jejich množství bylo nižší než v čerstvém mase v důsledku ředění masa s tuky a dalšími přísadami.

Ryby jsou charakteristické neutrálním pH, vysokou aktivitou vody a koncentrací volných aminokyselin. Obsah BA v čerstvých rybách je velmi nízký. Ve zkaženém rybím mase se nachází putrescin, kadaverin, histamin, spermidin a spermin. V rybách čeledi *Scombridae* (makrelovité), *Scomberesocidae* (rohoretkovité) se nachází přirozeně vysoké množství volného histidinu (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 40-41; Zorníková, 2012). Za velmi krátký čas může být histidin přeměněn na rizikové množství histaminu mikrobiální činností (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 41).

V plnotučném a polotučném kravském mléku byly detekovány nízké koncentrace sperminu a spermidinu (Silla-Santos, 1996, s. 216).

1.4 Fyziologické funkce biogenních aminů a polyaminů

Biogenní aminy jsou zdrojem dusíku a prekurzorů pro syntézu alkaloidů, hormonů, nukleových kyselin a proteinů. Většina procesů, které BA ovlivňují, probíhají v organizmu, jako například: příjem výživy, regulace tělesné teploty, snížení, nebo zvýšení krevního tlaku (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 70). Histamin ovlivňuje krevní tlak a sekreci žaludeční šťávy. Tyramin má vliv na kontrakci hladkého svalstva a také na krevní tlak. Mimo jiné působí jako antioxidant, který je schopný zneškodňovat reaktivní formy kyslíku, jako například hydroxylový a superoxidový radikál. Antioxidační účinek se zvyšuje s koncentrací tyraminu a je podmíněný amino a hydroxy skupinami (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 36-37).

Polyaminy se podílejí na regulaci funkce nukleových kyselin, na stabilizaci membrán a syntéze bílkovin (Önal, 2007, s. 1476-1477). Polyamin putrescin, spermidin a spermin inhibují oxidaci polyenových mastných kyselin a tento účinek koreluje s počtem amino

skupin přítomných v polyaminu. Kadaverin a putrescin stabilizují biologicky významné makromolekuly (nukleové kyseliny), subcelulární struktury (ribozomy) a dále stimulují buněčné dělení (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 36-37).

1.5 Toxikologie biogenních aminů a polyaminů

Biogenní aminy a polyaminy mají v lidském organismu řadu fyziologických funkcí, ale konzumace potravin s vysokým obsahem těchto látek může vést až k intoxikaci (Silla-Santos, 1996, s. 223; Santos et al., 2003, s. 595-596). Ve vysokých koncentracích se mohou projevit jako látky psychoaktivní a vazoaktivní (Směla, 2004, s. 432). Psychoaktivní aminy působí v centrálním nervovém systému na neurotransmitery, zatímco vazoaktivní aminy ovlivňují cévní systém (Shalaby, 1996, s. 676). K toxikologicky nejvýznamnějším sloučeninám patří tyramin, histamin, kadaverin a putrescin. Nejvíce studován je tyramin a histamin. (Sládková, Komprda a Burdychová, 2007, s. 96). Údaje o toxicitě jiných BA než tyraminu a histaminu jsou omezené (Juneja a Sofos, 2010, s. 263).

Histamin je nejtoxičtější BA, který vyvolává otravu tzv. skombrotoxicitu plynoucí z konzumace ryb čeledi *Scombridae* a *Scomberesocidae* (Zorníková, 2012). Z toxikologického hlediska druhou nejdůležitější skupinou potravin jsou sýry (Komprda, 2007, s. 32). Maso a nefermentované masné výrobky obsahují jen výjimečně množství BA, které by mohlo představovat zdravotní riziko (Zorníková, 2012).

Toxikologický význam polyaminů spočívá ve schopnosti vytvářet stabilní karcinogenní N-nitrososloučeniny (Komprda et al., 2008, s. 30). Polyaminy jsou důležité pro růst a množení buněk. Tyto aktivity jsou zcela nežádoucí například pro růst nádorů (Směla, 2004, s. 432). Ve stravě pacientů s nádorovým onemocněním se proto musí přísně kontrolovat příjem polyaminů (Komprda et al., 2008, s. 30).

1.5.1 Symptomy intoxikace biogenními aminy a polyaminy

Tyramin je nejúčinnější ze skupiny vazoaktivních aminů (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 39). Jeho toxické účinky závisí na přijatém množství, přítomnosti jiných BA a na celkovém fyziologickém stavu jednotlivce (Silla-Santos, 1996, s. 224). Nepřímo uvolňuje noradrenalin od sympatického nervového systému, který způsobuje zvýšení krevního tlaku, a tím i zvýšení srdečního výkonu (Shalaby, 1996, s. 678). Hypertenze způsobená tyraminem je také známá jako tzv. reakce na sýr. Nicméně hypertenzi mohou vyvolat i jiné potraviny (kuřecí játra, masné výrobky a slanečky). Hypertenzní krize se projevuje silnou

bolestí hlavy, bušením srdce, nevolností, pocením, zmateností, ztuhlostí krku a dokonce způsobuje mrtvici (Juneja a Sofos, 2010, s. 263). Mimo jiné tyramin rozšiřuje zorničky, způsobuje slinění, slzení, zvyšuje dýchání a obsah cukru v krvi (Shalaby, 1996, s. 676-678).

Histamin způsobuje nejznámější alimentární intoxikace (Juneja a Sofos, 2010, s. 260). Toxické účinky histaminu se projevují vazbou na receptory buněčných membrán, které se nacházejí v kardiovaskulárním systému a v různých sekrečních žlázách. Histamin se může projevovat celou řadou příznaků: bolestí hlavy, bušením srdce, edémem, hypotenzí, kopřivkou, křečí břicha, nevolností, průjmem, vyrážkou, zánětem a zvracením (Shalaby, 1996, s. 676-677). Otrava histaminem je možné překonat požitím antihistaminových léčiv (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 72).

Kadaverin a putrescin způsobuje hypotenzi, zpomalení srdeční činnosti a umocnění toxicity dalších aminů (Shalaby, 1996, s. 676).

Fenyletylamin patří do skupiny vazoaktivních aminů. Uvolňuje noradrenalin od sympatického nervového systému, zvyšuje krevní tlak a způsobuje migrénu. (Shalaby, 1996, s. 676-677)

1.5.2 Detoxikace biogenních aminů a polyaminů

Nízká koncentrace BA může být lidským tělem tolerována, pokud jsou účinné detoxikační mechanismy (Pleva et al., 2012a, s. 46). Hlavní úlohu v procesu detoxikace mají enzymy monoaminoxidázy (MAO) a diaminoxidázy (DAO). MAO a DAO se vyskytují ve střevním epitelu, a tudíž se oxidační produkty BA dostávají do krevního oběhu. Vysoký příjem BA v potravinách způsobí narušení detoxikačního systému, který není schopen dostatečně odstranit tyto látky a hromadí se v těle. Tato situace nastává i v případě alergií, při nedostatečné aktivitě MAO a DAO u lidí se zažívacími problémy a u pacientů užívající léky s účinkem inhibitorů MAO a DAO (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 72; Silla-Santos, 1996, s. 223-224). Polyaminy jsou nejprve acetylované, až potom oxidované DAO a PAO (polyaminoxidázy) (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 72; Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 40). Putrescin a kadaverin inhibují enzymy detoxikující histamin, a tím násobí jeho toxicitu (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 73).

1.5.3 Přípustné limity a toxické dávky vybraných biogenních aminů

Toxická dávka aminů lze velmi obtížně určit, protože závisí na charakteristice jednotlivce a přítomnosti dalších aminů (Silla-Santos, 1996, s. 224).

Údaje týkající se toxického množství histaminu jsou v literatuře velmi odlišné, ale přesto se dají stanovit určité hraniční hodnoty (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 37). Maximální přípustný limit histaminu v potravinách je v rozmezí 50-100 mg.kg⁻¹ (Önal, 2007, s. 1477). U citlivých lidí je škodlivý příjem už 5-10 mg histaminu. Příjem 100 mg histaminu je považován za středně toxický a 1000 mg za vysoce toxický (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71). Od roku 2004 je v České Republice (ČR) platný hygienický limit histaminu v rybách uváděný v Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 ve výši 100 mg.kg⁻¹. Tento limit může být ve dvou vzorcích z devíti z jedné šarže překročen až do hodnoty 200 mg.kg⁻¹ (Standarová, Borkovcová a Vorlová, 2008, s. 735-736).

Limity tyraminu v potravinách se pohybují v rozmezí 100-800 mg.kg⁻¹ (Önal, 2007, s. 1477). V ČR je maximální přípustné množství tyraminu u sýrů 200 mg.kg⁻¹, pro červené víno 50 mg.kg⁻¹ a pro ostatní potraviny 100 mg.kg⁻¹. Příjem tyraminu nad 100 mg může vyvolat migrénu a u pacientů léčených inhibitory MAO by nemělo jeho přijaté množství překročit 6 mg.kg⁻¹ po dobu čtyř hodin (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 39).

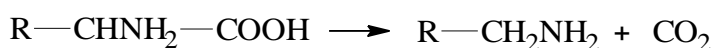
2 PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ

2.1 Vznik v potravinách

Nejběžnější způsob syntézy aminů v potravinách je dekarboxylace aminokyselin (Shalaby, 1996, s. 675). Aminokyseliny jsou z proteinů uvolňovány proteolýzou (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71). Proteolýza může být bakteriální nebo autolytická (Zorníková, 2012). Dekarboxylací vznikají pouze primární aminy, jako je histamin, tryptamin, fenyletylamin, tyramin, kadaverin a putrescin (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 31; Santos et al., 2003, s. 595). Další možnou cestou tvorby může být aminace nebo transaminace aldehydů a ketonů (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 70; Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 31-32). Aminací ketonů mohou vzniknout sekundární aminy. Transaminací aldehydů mohou rovněž být tvořeny i alifatické diaminy (putrescin a kadaverin) (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 31-32).

2.1.1 Dekarboxylace aminokyselin

Při dekarboxylaci aminokyselin je odštěpena α -karboxylová skupina a vzniká příslušný amin (Shalaby, 1996, s. 680) dle obr. 1.



Obr. 1: Dekarboxylace aminokyselin. Upraveno dle Fadda, Vignolo a Oliver, 2001, s. 2015.

Na dekarboxylaci se podílí exogenní enzymy, které jsou uvolněny dekarboxylázami pozitivními mikroorganismy (Fadda, Vignolo a Oliver, 2001, s. 2015; Özogul a Özogul, 2007, s. 385). Enzymy dekarboxylázy jsou specifické na L-formu aminokyselin a zvýšenou aktivitu vykazují zejména u bakterií (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 31). Jedná se především o četné druhy hnilobných bakterií, ale také o řady druhů bakterií mléčného kvašení (Smělá, 2004, s. 432). Mimo jiné jsou rozšířené u živočichů a rostlin (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 31).

Kofaktorem dekarboxyláz je pyridoxalfosfát, který má katalytickou funkci (Juneja a Sofos, 2010, s. 249; Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 31). Reakce karbonylové skupiny pyridoxalfosfátu s aminokyselinou vznikají meziproducty (Schiffovy báze). Tyto sloučeniny jsou následně dekarboxylovány za vzniku odpovídajícího aminu. Namísto pyridoxalfosfátu může být přítomen i pyruvoylový zbytek (Juneja a Sofos, 2010, s. 249).

2.2 Vznik v živých organizmech

Gastrointestinální trakt je významným místem tvorby polyaminů. Bakterie, jako *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Morganella* a *Proteus*, metabolizují aminokyseliny z potravy (Teti, Visalti a McNair, 2002, s. 109-110). Tato bakteriální syntéza probíhá dekarboxylací aminokyselin přímo na polyaminy nebo na další meziprodukty, které jsou následně modifikovány za vzniku funkčních polyaminů. Například z ornitinu činností ornitindekarboxylázy (ODC) vzniká putrescin. Tímto způsobem syntézy se tvoří i histamin a kadaverin (Shah a Swiatlo, 2008, s. 5).

Z putrescinu dále činností enzymů spermidinsyntázy a sperminsyntázy vzniká spermidin a spermin. Tvorba těchto dvou polyaminů vyžaduje aminopropyl, který poskytuje S-adenosylmetionin (SAM) (Larqué, Sabater-Molina a Zamora, 2007, s. 88; Teti, Visalti a McNair, 2002, s. 110). S-adenosylmetionin je tvořen z metioninu. Takto vzniklé polyaminy jsou částečně absorbovány v gastrointestinálním traktu a následně mohou být transportovány do buněk prostřednictvím nosičů (Teti, Visalti a McNair, 2002, s. 110).

2.3 Činitelé ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů

Základní podmínky vzniku BA v potravinách jsou tři (Komprda, 2007, s. 29):

- přítomnost aminokyselin v substrátu
- přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou
- vhodné podmínky pro růst a množení mikroorganismů.

K nejdůležitějším faktorům ovlivňující růst a enzymatickou aktivitu mikroorganismů patří: dostupnost volných aminokyselin, teplota, pH - aktivní kyselost, koncentrace NaCl, přístup kyslíku atd. (Juneja a Sofos, 2010, s. 252; Komprda, 2007, s. 29-30).

2.3.1 Dostupnost volných aminokyselin

Koncentrace dostupných volných aminokyselin hraje zásadní roli při tvorbě aminů v potravinách. Tyto aminokyseliny jsou totiž prekurzory aminů, a navíc tvoří substrát pro růst mikroorganismů. Přítomnost bakterií s vysokou proteolytickou enzymovou aktivitou stimuluje tvorbu aminů zvyšováním dostupnosti volných aminokyselin. Míra dekarboxylace aminokyselin závisí na koncentraci produkovaného aminu nebo na přítomnosti dalších BA. (Juneja a Sofos, 2010, s. 249-250)

2.3.2 Teplota

V publikacích je často uváděno, že obsah aminů závisí na době a teplotě skladování. Teplota ovlivňuje růst a enzymatickou aktivitu mikroorganismů (Suzzi a Gardini, 2003, s. 48). Optimální teplota růstu většiny mikroorganismů vybavených dekarboxylačními enzymy je v rozmezí 20 °C a 37 °C (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71). Při 15 °C mikrobiální dekarboxylázy zůstávají aktivní, i když většina mikrobiální populace dosahuje stacionárního růstu nebo zaniká. Vyšší teploty mohou podporovat proteolytické a dekarboxylační reakce. Výsledkem je pak zvyšující se koncentrace BA po skladování (Suzzi a Gardini, 2003, s. 48-49). Z toho vyplývá, že čím je teplota nižší, tím je dekarboxylační činnost méně stabilní. Například histidindekarboxyláza se začíná inaktivovat po osmi až patnácti dnech v -20 °C. Skladování při velmi nízkých až mrazírenských teplotách je nepříznivé pro tvorbu BA (Juneja a Sofos, 2010, s. 252). Nicméně putrescin byl v mase produkován psychrotrofními mikroorganismy i při 4 °C (Suzzi a Gardini, 2003, s. 49).

Teploty nad 75°C způsobují u mléka destrukci mléčných proteáz a proteolytických bakterií, což má za následek nízký obsah volných aminokyselin, a tím dochází ke snížení tvorby BA (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 45).

2.3.3 pH - aktivní kyselost

Důležitým faktorem, který ovlivňuje dekarboxylázovou aktivitu aminokyselin je pH. Tato aktivita byla silnější v kyselém prostředí a optimální hodnota pH se pohybuje v rozmezí 4,0 a 5,5 (Silla-Santos, 1996, s. 219-220). Nicméně tvorba aminů závisela spíše na množství rostoucích dekarboxyláza-pozitivních bakterií než na samotných růstových podmínkách. Prudkým poklesem pH dochází k omezení růstu amino-pozitivních mikroorganismů zejména z čeledi *Enterobacteriaceae*, a tím i ke snížení produkci BA (Suzzi a Gardini, 2003, s. 47-48).

2.3.4 Koncentrace NaCl

Vysoké koncentrace NaCl snižující vodní aktivitu mohou inhibovat vznik aminů v potravinách, jelikož nižší vodní aktivita zpomaluje bakteriální růst. Naopak při nižších koncentracích je jejich produkce podpořena (Juneja a Sofos, 2010, s. 253). Přítomnost NaCl inhibuje histidindekarboxylázy a aktivuje tyrozindekarboxylázy (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 36).

Rozdíly v množství vody a poměru sůl/voda měly důležitou roli při rozmnožování mikroorganismů během fermentace a skladování fermentovaných masných výrobků. Produkce aminů se snížila, když koncentrace NaCl v médiu vzrůstala od 0 % do 6 % (Suzzi a Gardini, 2003, s. 48). Dále sušením fermentovaných salámů se sníží obsah vody především na okraji salámu, kde je tento proces nejintenzivnější, naopak střed obsahuje více vody, tedy větší množství aminů. Z toho důvodu má významný podíl na produkci aminů i průměr tohoto výrobku. Čím větší je průměr salámu, tím vyšší množství těchto sloučenin obsahuje (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 42).

2.3.5 Přístup kyslíku

Kyslík je potřebný pro růst mikroorganismů vybavených dekarboxylázami (Kohajdová, Karovičová a Greif, 2008, s. 36). Zásobování kyslíkem je tedy významný faktor pro biosyntézu BA. Například *Enterobacter cloacae* produkuje přibližně poloviční množství putrescinu v anaerobním prostředí a *Klebsiella pneumoniae* syntetizuje výrazně méně kadaverinu, ale získává schopnost produkovat putrescin za anaerobních podmínek. Redox potenciál média také ovlivňuje tvorbu BA. Snížení redox potenciálu může podpořit produkci histaminu (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71).

3 BAKTERIÁLNÍ ROD *ENTEROCOCCUS*

3.1 Taxonomie enterokoků

Taxonomické zařazení (Sedláček, 2007, s. 248):

Doména (Domain)	<i>Bacteria</i>
Kmen (Phylus)	<i>Firmicutes</i>
Třída (Class)	<i>Bacilli</i>
Řád (Order)	<i>Lactobacillales</i>
Čeleď (Family)	<i>Enterococcaceae</i>
Rod (Genus)	<i>Enterococcus</i> .

Předtím než vznikl samotný název rod *Enterococcus*, byly enterokoky řazeny v rámci rodu *Streptococcus*. Později byly enterokoky z tohoto rodu vyčleněny. (Murray, 1990, s. 46-47; Morrison; Woodford a Cookson, 1997, s. 89)

Do rodu *Enterococcus* byly přearazeny a přejmenovány druhy *Streptococcus faecalis* a *Streptococcus faecium*. Krátce poté byly do tohoto rodu přesunuty a přejmenovány také druhy *Streptococcus avium*, *Streptococcus casseliflavus*, *Streptococcus durans*, *Streptococcus malodoratus* a *Streptococcus gallinarum* (Murray, 1990, s. 46-65). Druhy jako *Enterococcus porcinius* a *Enterococcus seriolicida* byly dříve řazeny a později reklasifikovány z rodu *Enterococcus* (Naser et al., 2005, s. 2224).

Bakteriální rod *Enterococcus* zahrnuje 43 druhů, které byly izolovány z nejrůznějšího prostředí. Enterokoky se člení do několika vnitrodruhových fylogenetických skupin (Švec, 2012, 167-178). V tab. 3 jsou uvedeny jednotlivé fylogenetické skupiny.

Tab. 3: Příslušné druhy jednotlivých fylogenetických skupin. Upraveno dle Hardie a Whiley, 1997, s. 8; Morrison, Woodford a Cookson, 1997, s. 90.

Skupina	Druh
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>E. durans</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. mundtii</i>
<i>Enterococcus avium</i>	<i>E. avium</i> , <i>E. pseudoavium</i> , <i>E. malodoratus</i> , <i>E. raffinosus</i>
<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>
<i>Enterococcus cecorum</i>	<i>E. cecorum</i> , <i>E. columbae</i>
odlišné druhy	<i>E. faecalis</i> , <i>E. dispar</i> , <i>E. sulfureus</i> , <i>E. saccharolyticus</i>

3.2 Charakteristika enterokoků

Enterokoky jsou grampozitivní koky sférického nebo ovoidního tvaru vyskytující se po dvou, ve shlucích nebo v krátkých řetězcích. Tyto bakterie netvoří endospory a pouzdra, ale některé druhy jsou pohyblivé nevýraznými bičíky. (Sedláček, 2007, s. 248-249)

Enterokoky jsou fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní s fermentativním metabolismem a vyžadují nutričně bohatá média. Využívají široké rozmezí sacharidů, které zkvašují za vzniku L(+) kyseliny mléčné bez tvorby plynu. Jsou kataláza negativní, často viridující (α -hemolýza) na krevním agaru (Sedláček, 2007, s. 248-249). Rostou v rozmezí od 10 °C do 45 °C, v médiu s obsahem 6,5 % NaCl či 40 % žluče a při pH 4,0 až 9,6. Přežívají však záhřev i při 62,8 °C po dobu 30 min (Bhardwaj, Malik a Chauhan, 2008, s. 319).

3.2.1 *Enterococcus faecium*

Bakterie *Enterococcus faecium* jsou nepohyblivé. Zkvašují L-arabinózu, ale nezkvašují sorbitol. Zřídka redukují nitráty a z argininu tvoří amoniak. Speciální požadavky na výživu a růst jsou: vitaminy - biotin, nikotinová a pantotenová kyselina, riboflavin, pyridoxin a kyselina listová. Rostou při teplotě 10 °C i 45 °C a při pH 9,6. Optimální kultivační teplota je 37 °C. Tyto bakterie tvoří lesklé vypouklé kolonie s neporušenými okraji po aerobní kultivaci na M17 agaru s glukózou při teplotě 30 °C (Chumchalová, 2008).

3.3 Příznivé účinky enterokoků

Vzhledem k tomu, že enterokoky tvoří značný podíl původní přirozeně se vyskytující mikroflóry trávicího traktu savců, se uplatňují jako probiotika. Jako probiotické přísady do potravin se používají *E. faecium* a *E. faecalis*. Využívají se k udržení rovnováhy v trávicím traktu a k potlačování průjmů. (Suková, 2003 cit. podle *Agronavigátor*)

Další příznivý účinek enterokoků je produkce bakteriocinů potlačující růst jiných, často patogenních druhů bakterií ve fermentovaných masných výrobcích (Hugas, Garriga a Aymerich, 2003, s. 227). Z enterokoků se nejvíce ve výrobě využívá *E. faecium* (Hugas, Garriga a Aymerich, 2003, s. 224).

Enterokoky ovlivňují také organoleptické vlastnosti sýrů během zrání (Giraffa, 2002, s. 164). Typická chuť, struktura a aroma je dána proteolytickou a lipolytickou aktivitou enterokoků. Tyto metabolické aktivity se využívají při výrobě sýrů z ovčího, koziho a

méně kravského mléka (Foulquie Moreno, 2006, s. 2; Bhardwaj, Malik a Chauhan, 2008, s. 319). Příznivé vlastnosti enterokoků vedly k jejich začlenění do určitých startovacích kultur (Bhardwaj, Malik a Chauhan, 2008, s. 319; Suková, 2003 cit. podle *Agronavigátor*). Jako doplňková kultura při zrání sýru čedarového typu se používá *E. faecium* (Chumchalová, 2008). Přítomnost enterokoků v některých sýrech během zrání lze přičíst jejich růstu v široké škále teplot a jejich odolnosti vůči pH a soli (Giraffa, 2002, s. 166).

3.4 Škodlivé účinky enterokoků - dekarboxylázová aktivita

Enterokoky patří mezi mikroorganismy produkující enzymy dekarboxylázy. Mohou být přirozeně přítomny v produktech, anebo mohou být vnesené před technologickým zpracováním, během nebo po ukončení výroby. (Greif et al., 1999, s. 15-16)

Bover-Cid et al. (2001, s. 188-186) označuje studované enterokoky za častými producenty tyraminu a fenyletylaminu. Pleva et al. (2012b, s. 441) zjistili, že téměř jedna čtvrtina testovaných *Enterococcus faecium* produkovala tyramin. Burdychová a Komprda (2007, s. 151-153) uvádí, že řada kmenů rodu *Enterococcus* tvoří takové koncentrace tyraminu, které překračují hladinu toxicity ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$).

Tvorba BA je kmenově velmi závislá. U kmene *E. faecium* M2C izolovaného z masa králíka byla nejčastěji detekována produkce tyraminu, putrescinu, fenyletylaminu a spermidinu (Pleva et al., 2012a, s. 47-48). Nicméně Pleva et al. (2012b, s. 441) uvádí, že výše uvedený kmen produkoval tyramin, kadaverin a putrescin. Podle Plevy et al. (2012b, s. 439-442) nebyla prokázána dekarboxylázová aktivita u kmenů *E. faecium* MC7 a M1b izolovaných z masa králíka. Zatímco kmen *E. faecium* 5BM1 produkoval tyramin, fenyletylamin a kadaverin. Z žádných testovaných kmenů netvořil histamin, spermidin nebo spermin (Pleva et al., 2012b, s. 441).

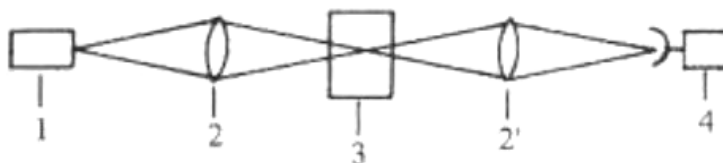
Přítomnost enterokoků je v mléčných výrobcích považovaná za indikaci nedostatečných sanitacních podmínek. Patří k termorezistentním bakteriím přežívajícím pasterační teploty a vyskytují se i v sušeném mléce (Suková, 2003 cit. podle *Agronavigátor*). Činností enterokoků vzniká v sýrech především tyramin. Bylo zjištěno, že *E. faecium* produkoval i malé množství histaminu v kozím sýru (Gardini et al., 2001, s. 106).

4 OPTICKÁ DENZITA

Optická denzita (OD) je standardním ukazatelem růstu buněk (Rao, 2010 s. 7). Určuje se dle zákalu (turbidimetry) spektrofotometrem nebo fotometrem (Buňková a Doležalová, 2010, s. 127; Widdel, 2010, s. 5). Tyto přístroje se používají pro stanovení hustoty mikrobiální populace (Fugelsang a Edwards, 2007, s. 239).

Turbidimetrie je analytická technika založená na sledování rozptylu světla částicemi suspendovanými v kapalině, tj. sraženinami nebo koloidními částicemi. Měří se intenzita záření prošlého roztokem, tedy záření nerozptýleného. Detektor záření je umístěn ve směru procházejícího záření. (Němcová, Čermáková a Rychlovský, 1997, s. 163)

V obr. 2 je znázorněno schéma turbidimetrického měření.



Obr. 2: Schéma turbidimetrického měření: 1- zdroj záření, 2,2'- čočky, 3- vzorek, 4- detektor. Upraveno dle Němcové, Čermákové a Rychlovského, 1997, s. 163.

Turbidimetrie slouží k určování koncentrace suspendované látky ve vzorku. Ke stanovení se používají kalibrační křivky. Metodika měření je následující: intenzita záření prošlého vzorkem se srovnává s intenzitou záření prošlého čistým rozpouštědlem. Turbidimetrie je vhodná především pro měření roztoků s velkým obsahem suspendovaných částic. (Němcová, Čermáková a Rychlovský, 1997, s. 163)

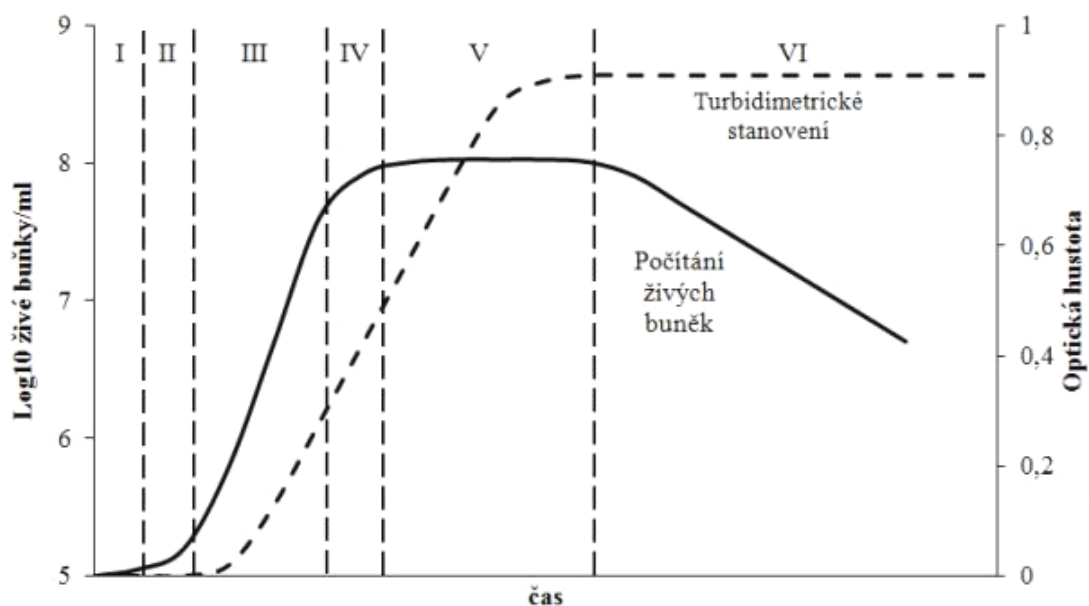
Rozptyl světla je závislý nejen na koncentraci buněk v kultuře, ale také na dalších faktorech, jako je absorpance světla v kultivačních médiích, velikost a tvar bakteriálních buněk. Velikost buněk se může lišit v závislosti na typu použitého média (Zachary, Burton a Kaguni, 1997, s. 23). Rozptylu světla závisí i na vlnové délce. Rozptyl kratších vlnových délek je silnější než u dlouhých vlnových délek. (Widdel, 2010, s. 5)

Turbidimetrické měření zákalu (OD) kultivačních médií v průběhu růstu bakteriálních buněk se provádí při hodnotě absorpance 600 nm (Šupinová, 2009, s. 25; Zachary, Burton a Kaguni, 1997, s. 23). Při této vlnové délce bakteriální buňky neabsorbují značné množství světla. U vlnových délek menších než 600 nm komponenty v médiích významně

přispívají k celkové absorbanci (Zachary, Burton a Kaguni, 1997, s. 23). Dále Fugelsang a Edwards (2007, s. 239) uvádí při spektrofotometrickém měření procházejícího světla hodnotu vlnové délky 420 a 650 nm.

Grafickým vyjádřením růstu bakterií je růstová křivka. Lze ji získat vynesemím logaritmu počtu živých buněk stanovených v časových intervalech. Růstová křivka je charakteristická určitými růstovými fázemi. (Buňková a Doležalová, 2010, s. 128)

V obr. 3 jsou znázorněny fáze růstové křivky bakterií.



Obr. 3: Fáze růstové křivky bakterií. Upraveno dle Šupinové, 2009, s. 27.

- I. **Lag fáze** se někdy označuje jako **přípravná fáze** nebo **fáze zdržení** (Buňková a Doležalová, 2010, s. 128). Během této fáze se buňky nerozmnožují, prozatím zvětšují svůj objem a aktivuje se jejich enzymový systém (Šupinová, 2009, s. 26).
- II. **Ve fázi zrychleného růstu** jsou již buňky přizpůsobené novému prostředí a na konci tohoto období mají buňky velkou intenzitu metabolismu a velkou rychlost dělení. (Buňková a Doležalová, 2010, s. 128)
- III. **Exponenciální fáze** je charakteristická intenzivním množením buněk a prakticky nedochází k odumírání buněk, ty také mají konstantní velikost. (Buňková a Doležalová, 2010, s. 128-129)
- IV. **Fáze zpomaleného růstu** je typická snížením intenzity metabolismu a množení buněk v důsledku vyčerpání živin a hromadění metabolitů. V této fázi narůstá počet odumírajících buněk. (Buňková a Doležalová, 2010, s. 129)

- V. **Ve stacionární fázi** dochází k vyrovnání počtu odumírajících buněk a jejich přírůstku. Rychlost dělení je tedy nulová, množství buněk je konstantní a nabývá ve stacionární fázi maxima. V této fázi je většina živin již vyčerpána a dochází také k nahromadění toxických metabolitů. (Buňková a Doležalová, 2010, s. 129)
- VI. **Fáze odumírání** je charakterizována narůstajícím počtem odumírajících buněk a snížením intenzity metabolismu. Rychlost dělení klesá pod nulovou hodnotou. (Buňková a Doležalová, 2010, s. 130)
- .

I. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo studium vybraných činitelů ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu *Enterococcus faecium*. Tato aktivita byla sledována při daných podmínkách statické kultivace se zaměřením na:

- teplotu 6 °C a 30 °C
- pH 5; 6 a 7
- koncentraci NaCl 0; 1; 2; 3 a 6 (w/v)
- přístup kyslíku.

Pro vyhodnocení cílů bylo nutné stanovit:

1. Optickou denzitu, tzv. nárůst bakterií *Enterococcus faecium* fotometrem.
2. Množství produkovaných biogenních aminů a polyaminů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC).

6 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

6.1 Použitý mikroorganismus

Pro vypracování práce byly použity bakteriální kmeny *Enterococcus faecium* 5BM1 a M2C. Tyto kmeny byly izolovány z masa králíka a byly získány z Ústavu fyziologie hospodářských zvířat, Slovenské akademie věd v Košicích.

6.2 Kultivační média

Bakterie *Enterococcus faecium* byly kultivovány v tekutých médiích v Brain Heart Infusion Broth (BHI; HiMedia). Jako prekurzory sledovaných BA a polyaminů byly použity aminokyseliny (AMK; Sigma-Aldrich): histidin, ornitin, arginin, lyzin, tyrozin a fenylalanin v koncentraci 0,2 % (w/v) (Pleva et al., 2012a, s. 46). Pro stanovení optické denzity a dekarboxylázové aktivity byla použita shodná média.

BHI bujón

BHI (Brain Heart Infusion Broth)	37,00 g
Deionizovaná voda (Aqua Osmotic)	1000,00 ml

Tento bujón se používal i pro přípravu inokula.

BHI agar

BHI (Brain Heart Infusion Agar)	52,20 g
Deionizovaná voda (Aqua Osmotic)	1000,00 ml

Pro uchovávání bakterií byl použit Brain Heart Infusion Agar (BHI; HiMedia). Připravená média BHI bujónu a BHI agaru byla sterilována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

6.3 Chemikálie a roztoky

1,7-heptandiamin (Sigma-Aldrich) v koncentraci 5 g.l⁻¹, aceton, acetonitril (Sigma-Aldrich), aminokyseliny (histidin, ornitin, arginin, lyzin, tyrozin a fenylalanin; Sigma-Aldrich) v koncentraci 0,2 % (w/v), dansylchlorid (Sigma-Aldrich) v koncentraci 5 g.l⁻¹, denaturovaný etanol (LachNer), dusíkový plyn, hydrogenuhličitan sodný (Merck), chlorid sodný (NaCl; LachNer), karbonátový pufr (pH 11,1-11,2), kyselina chloristá (Merck) v koncentraci 1,2 mol.l⁻¹, kyselina chlorovodíková (HCl) v koncentraci 6 mol.l⁻¹, parafinový

olej (Pliva-Lachema), prolin (Merck), uhličitan draselný (Merck), uhličitan sodný bezvodý (Merck).

6.4 Pomůcky a přístroje

Analytické váhy (Sartorius BA 110S; A&D GH-200 EC), autokláv (Systec 2540EL), automatické mikropipety (Biohit a Nichyrio), biologický termostat (Memert), derivatizační nádoby (vialky), fotometr (Benchmark), horkovzdušná sušárna (Memert), chladnička (Elektrolux), laboratorní plast (špičky automatických pipet, ependorfkové mikrozkuhavky, očkovací klíčky, mikrotitrační destička), laboratorní sklo (Simax), laboratorní třepačka (LT2), mikrovlnná trouba, očkovací box (Biohazard), odstředivka (Hettich), pH-metr, plynový kahan, systém RP-HPLC (binární pumpa LabAlliance, USA, autosampler LabAlliance, USA, kolona s termostatem; UV/VIS DAD detektor ($\lambda = 254 \text{ nm}$); a degaser 1260 Infinity, Agilent Technologies), vortex (Heidolph, Reax).

7 METODIKA

7.1 Příprava inokula

Inokulum bylo zaočkováno předem připravenou 1 % kulturou mikroorganismů. Kultivace proběhla při teplotě 30 ± 1 °C po dobu 24 hodin v termostatu. Takto připravená suspenze bakterií narostných přes noc byla použita pro zaočkování do kultivačních médií.

7.2 Příprava různých kultivačních podmínek

Dekarboxylázová aktivita *Enterococcus faecium* byla zkoumána v závislosti na teplotě (6 ± 1 °C; 30 ± 1 °C), pH (5; 6; 7) koncentraci NaCl (0; 1; 2; 3; 6 % (w/v)) a dostupnosti kyslíku (Pleva et al., 2012a, s. 46). Celkem bylo připraveno 5 médií s různými podmínkami statické kultivace dle tab. 4. U média 1 a 2 byla sledována dekarboxylázová aktivita *E. faecium* kmene M2C. Dekarboxylázová aktivita *E. faecium* kmene 5BM1 bylo zkoumáno u ostatních médií při daných podmínkách kultivace.

Tab. 4: Příslušná média s různými kultivačními podmínky.

Médium	teplota °C	pH	koncentrace NaCl (% w/v)
1	6 ± 1	5	0; 1; 2; 3; 6
2	6 ± 1	6	0; 1; 2; 3; 6
3	6 ± 1	7	0; 1; 2; 3; 6
5	6 ± 1	5	0; 1; 2; 3; 6
4	30 ± 1	7	0; 1; 2; 3; 6

Každé médium bylo připraveno v koncentraci 0; 1; 2; 3 a 6 % (w/v) NaCl, navážením potřebného množství NaCl a BHI s aminokyselinami. Následně byly tyto komponenty smíchány s požadovaným objemem vody dle tab. 5.

Tab. 5: Příprava médií za použití potřebných komponent.

Médium	NaCl (g)	BHI (g)	AMK (g)	H ₂ O (ml)
0 % NaCl	-	7,992	0,432	216
1 % NaCl	2,16	7,992	0,432	216
2 % NaCl	4,40	7,992	0,432	216
3 % NaCl	6,60	7,992	0,432	216
6 % NaCl	13,20	7,992	0,432	216

Živná média byla upravena na požadované pH okyselením HCl o koncentraci 6 mol.l^{-1} . Následně byly do zkumavek odebírány 3 ml příslušného média. Poté byla média sterilována v autoklávu při teplotě $121 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 20 minut. Každá zkumavka byla očkovaná 1 % suspenzí bakterií. Nezaočkovaná živná média sloužila jako srovnávací vzorky tzv. kontroly. Polovina médií byla kultivována anaerobně přidáním 1 ml sterilního parafinového oleje (Pliva-Lachema). Každý izolát byl kultivován třikrát.

7.3 Odebírání vzorků

Podle daných kultivačních podmínek bylo provedeno 10 odběrů (T0-T10) v příslušných časových intervalech. Při kultivační teplotě $6\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ byly vzorky odebírány do devatenáctého dne kultivace dle tab. 6.

Tab. 6: Jednotlivé odběry v časových intervalech při kultivaci $6\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Odběr	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Dny	2	3	5	7	8	10	12	15	16	17	19

Při kultivační teplotě $30\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ byly vzorky odebírány 3 dny dle obr. 7.

Tab. 7: Jednotlivé odběry v časových intervalech při kultivaci $30\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Odběr	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Hodiny	2	4	6	8	10	12	14	26	32	36	50
Dny				1					2		3

Odběr byl proveden následovně: z každého stojanu byly odebrány tři zkumavky s parafínem a tři bez parafínu. Živné médium po kultivaci testovaných bakterií bylo centrifugováno ($4000 \times g$; $22\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$; 20 minut) (Pleva et al., 2012a, s. 46). Z každé zkumavky bylo následně odebráno $750 \mu\text{l}$ média se suspenzí bakterií a $750 \mu\text{l}$ kyseliny chloristé o koncentraci $1,2 \text{ mol.l}^{-1}$ do endendorfkové mikrozkušavky. Tímto způsobem byly připraveny i kontroly.

Během odběrů bylo měřeno pH zaočkovaných kultivačních médií pH-metrem s kombinovanou skleněnou elektrodou. Všechny vzorky byly měřeny trojím opakováním.

7.4 Měření optické denzity

Při každém odběru pro analýzu byl sledován nárůst *Enterococcus faecium* kmenů 5BM1 a M2C měřením optické denzity buněk při vlnové délce 655 nm proti kontrole pomocí fotometru (Bechmark). Do příslušných jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 200 μ l kultivačního média se suspenzí bakterií a kontroly sloužící jako srovnávací médium.

7.5 Stanovení dekarboxylázové aktivity *Enterococcus faecium*

Produkce 7 aminů: tyraminu (TYR), kadaverinu (CAD), fenyletylaminu (PHE), histaminu (HIS), putrescinu (PUT), spermidin (SPD) a sperminu (SPN) byla stanovena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC) s binární pumpou po předchozí derivatizaci dansylchloridem (Pleva, 2012b, s. 439).

Postup derivatizace BA a polyaminů dansylchloridem byl proveden podle Dadákové, Křížka a Pelikánové (2009, s. 367). Každý vzorek z ependorfkové mikrozkušavky byl pipetován po 1 ml do derivatizačních nádob (vialek). Dále bylo přidáno 100 μ l vnitřního standardu v koncentraci 5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, 1,5 ml karbonátového pufru (pH 11,1-11,2) a 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu v acetonu o koncentraci 5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Jako interní standard byl použit 1,7-heptandiamin. Následovalo dvacetihodinové třepání v temnu. Po uplynutí této doby bylo do každé vialky přidáno 200 μ l roztoku prolinu a proběhlo další hodinové třepání. Po hodině byly napipetovány 3 ml heptanu a vzorky byly 3 minuty intenzivně protřepány. Po třepání byl odpipetován 1 ml vrchní heptanové vrstvy (supernant), který byl odpařen pod inertním plynem při teplotě 60 °C. Suchý odparek byl rozpuštěn 1,5 ml acetonitrilu. Biogenní aminy a polyaminy rozpuštěné v acetonitrilu byly filtrovány (porozita filtru 0,22 μm) a nanášeny na kolonu (Cogent HPLC Column HPS C18, 150 x 4,6 mm, 5 μm) (Pleva, 2012a, s. 46-49).

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

Schopnost tvorby biogenních aminů rodem *Enterococcus* potvrdil předcházející skríníng (Pleva et al., 2012b, s. 439-442). Ke studii této práce byly vybrány kmeny *Enterococcus faecium* 5BM1 a M2C. U těchto kmenů byly sledovány vybrané faktory, u kterých se předpokládá, že jsou schopny ovlivňovat produkci BA a polyaminů. Vybrané faktory byly následující: kultivační teplota (6 ± 1 °C a 30 ± 1 °C), pH (5; 6 a 7), NaCl (0-6 % (w/v)), aerobní/anaerobní prostředí a byly zvoleny tak, aby co nejvíce vystihly podmínky při zpracování a skladování masa. Celkem bylo analyzováno celkem 1650 vzorků.

8.1 Dekarboxylázová aktivita *Enterococcus faecium* kmene 5BM1

Dekarboxylázová aktivita bakteriálního kmene *E. faecium* 5BM1 byla sledována při kultivačních podmínkách: teplota 6 ± 1 °C a 30 ± 1 °C, pH 5 a 7.

Maximální hodnoty produkce aminů u *E. faecium* 5BM1 během kultivace při 6 ± 1 °C a pH 5 za aerobních podmínek byly: TYR <945 mg.l⁻¹, SPN <43 mg.l⁻¹, PHE <23 mg.l⁻¹, CAD <17 mg.l⁻¹, PUT <8 mg.l⁻¹ a za anaerobních podmínek: TYR <914 mg.l⁻¹, SPN <51 mg.l⁻¹, PHE <24 mg.l⁻¹, CAD <17 mg.l⁻¹, PUT <8 mg.l⁻¹. Při pH 7 za aerobních podmínek: TYR <107 mg.l⁻¹, SPN <23 mg.l⁻¹, CAD <8 mg.l⁻¹, PUT <4 mg.l⁻¹, PHE nebyl detekován a za anaerobních podmínek: TYR <159 mg.l⁻¹, SPN <23 mg.l⁻¹, CAD <9 mg.l⁻¹, PUT <4 mg.l⁻¹, PHE opět nebyl detekován.

Maximální hodnoty produkce aminů u *E. faecium* 5BM1 během kultivace při 30 ± 1 °C a pH 7 za aerobních podmínek byly: TYR <1208 mg.l⁻¹, PHE <150 mg.l⁻¹, SPN <83 mg.l⁻¹, CAD <15 mg.l⁻¹, PUT <7 mg.l⁻¹ a za anaerobních podmínek: TYR <1554 mg.l⁻¹, PHE <231 mg.l⁻¹, SPN <159 mg.l⁻¹, CAD <11 mg.l⁻¹, PUT <5 mg.l⁻¹.

Podle Plevy et al. (2012b, s. 441) *E. faecium* 5BM1 produkoval tyramin, fenyletylamin a kadaverin, což se slučuje i s našimi výsledky.

Histamin (HIS) a spermidin (SPD) byl produkován kmenem *E. faecium* 5BM1 pod mezí detekce (2 mg.l⁻¹) v uvedených kultivačních podmínkách.

Fadda, Vignolo a Oliver (2001, s. 2016) zjistili, že kmeny rodu *Enterococcus* neprodukují histamin, ale zejména tyramin. Podle Burdychové a Komprdy (2007, s. 151-153) bylo množství tyraminu vznikající činností bakterií *E. faecium* již v takové koncentraci, které překračují hladinu toxicity (100 mg.l⁻¹), což odpovídá i našim zaznamenaným hodnotám.

Bover-Cid et al. (2001, s. 186) označily sledované kmeny rodu *Enterococcus* (16 kmenů) za častými producenty tyraminu a také fenyletylaminu. Podle těchto autorů byla produkce tyminu v rozmezí 10-3000 mg.l⁻¹ a množství fenyletylaminu bylo nižší, což opět koresponduje s našimi hodnotami. Nedetekovali však putrescin a kadaverin (Bover-Cid et al., 2001, s. 187). Bover-Cid a Holzapher (1999, s. 39) rovněž nedetekovali produkci putrescinu a kadaverinu kmeny *E. faecium*, ale zaznamenali hodnoty tyraminu v rozmezí 379–4339 mg.l⁻¹.

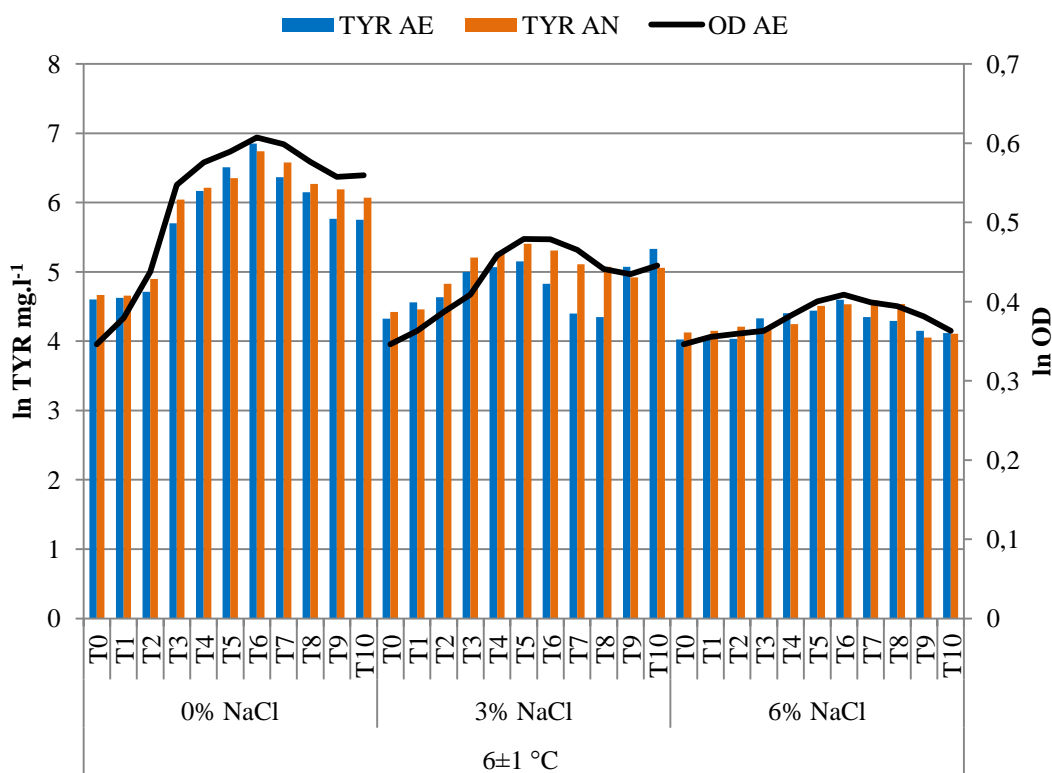
Pleva et al. (2012a, s. 47) tvrdí, že se tvorba BA za aerobních a anaerobních podmínek se v čase zvyšovala. Podle námi uvedených grafů nebyl průběh tvorby s časem vždy vzrůstající. Rozdíly v obsahu jednotlivých vyprodukovaných aminů mohou být způsobeny zpomalením růstu *E. faecium* v anaerobním prostředí (Pleva et al., 2012a, s. 47).

Tvorba BA a polyaminů je ovlivněna především růstovou fází buněk, tedy množstvím a aktivitou bakterií *E. faecium* v médiu (Pleva et al., 2012a, s. 47). Obecně lze říci, že růst bakterií *E. faecium* byl relativně lineární s tvorbou jednotlivých produkovaných aminů. Výjimkou je spermin kultivovaný při teplotě 30±1 °C a pH 7. Tvorba tohoto polyaminu byla nelineární vzhledem k růstové fázi sledovaného bakteriálního kmene.

Pleva et al. (2012a, s. 47) uvádí, že ze sledovaných faktorů má na růst a dekarboxylázovou aktivitu vliv především teplota, která je schopna zpomalit buněčný růst, prodloužit generační dobu a úměrně tomu i tvorbu BA. Optimální teplota růstu většiny mikroorganismů vybavených dekarboxylačními enzymy je v rozmezí 20 °C a 37 °C (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71). Čím je nižší teplota kultivace, tím je dekarboxylázní činnost méně stabilní (Juneja a Sofos, 2010, s. 252), což koresponduje s našimi výsledky. Produkce zejména tyraminu, fenyletylaminu a sperminu příslušným kmenem *E. faecium* při 30±1 °C a pH 7 byla výrazně vyšší než u kultivace při 6±1 °C, pH 5 a 7. Ovšem produkce jednotlivých aminů byla závislá i na dalších faktorech.

Kmen *E. faecium* při 6±1 °C a pH 5 produkoval nejvyšší množství tyraminu dvanáctý den kultivace za aerobních podmínek při 0 % (w/v) NaCl (TYR 945,13±87,78 mg.l⁻¹) a za anaerobních podmínek při 1 % (w/v) NaCl (TYR 914,22±35,16 mg.l⁻¹). Jednotlivé hodnoty tyraminu jsou uvedeny v příloze PI. Při 1 % (w/v) NaCl byl průběh tvorby tyraminu následující: množství se zvyšovalo od prvního odběru po odběr T6 a poté došlo k poklesu. Obdobný průběh byl i s 1 a 2 % (w/v) NaCl. Tvorba tyraminu v 3 % (w/v) NaCl od prvního dne odběru až po desátý den kultivace vzrůstala. Poté následoval pokles a

sedmnáctý den se množství tyraminu za aerobních podmínek opět zvyšovalo dle obr. 4. Při 6 % (w/v) NaCl se syntéza tyraminu výrazně změnila, kdy s časem bylo produkováno relativně stejné množství, ale došlo k jeho poklesu ($\text{TYR} < 99 \text{ mg.l}^{-1}$) v porovnání s 0 % (w/v) NaCl. Průběh tvorby tyraminu při 1; 3 a 6 % (w/v) NaCl je zobrazen v příloze PI.

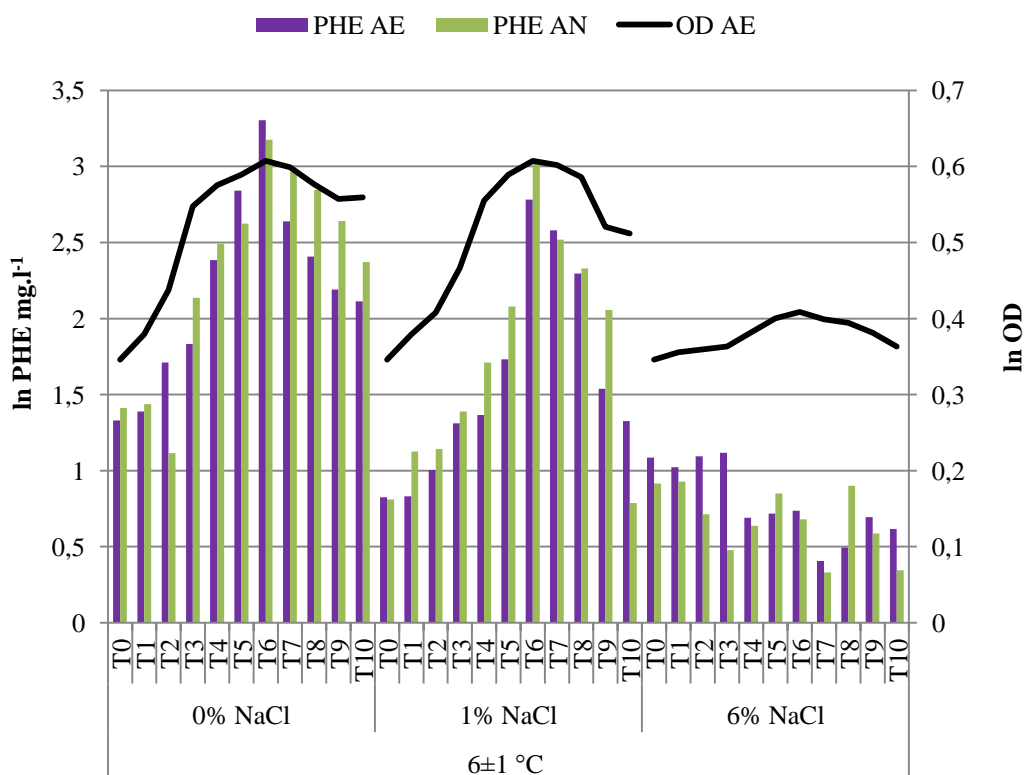


Obr. 4: Produkce tyraminu u *E. faecium* při 6 °C, pH 5, 0; 3 a 6 % NaCl. TYR AE - produkce v aerobním prostředí, TYR AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek.

Tvorba sperminu při 6±1 °C a pH 5 měla převážně klesající tendenci do patnáctého až šestnáctého dne kultivace dle přílohy PI. Největší nárůst byl již prvním dnem kultivace při 3 % (w/v) NaCl za aerobních podmínek ($\text{SPN } 42,55 \pm 3,02 \text{ mg.l}^{-1}$) a za anaerobních při 2 % (w/v) NaCl ($\text{SPN } 50,82 \pm 3,93 \text{ mg.l}^{-1}$). Redukci sperminu mohla zapříčinit jeho spotřeba při tvorbě dalších polyaminů. Je třeba podotknout, že na produkci sperminu měla významný vliv koncentrace NaCl. Klesající závislost produkce sperminu není tak zřetelně výrazná, jelikož s rostoucí koncentrací NaCl dochází k postupnému nárůstu sperminu.

Produkce fenyletylaminu při 6±1 °C a pH 5 byla výraznější až dvanáctý den kultivace dle obr. 5. Nejvýše zaznamenaná hodnota fenyletylaminu byla dvanáctý den kultivace v 0 % (w/v) NaCl jak za aerobních podmínek ($\text{PHE } 27,20 \pm 3,84 \text{ mg.l}^{-1}$), tak i za anaerobních

podmínek (PHE $23,93 \pm 0,94 \text{ mg.l}^{-1}$). Průběh tvorby fenyletylaminu při 0 % (w/v) NaCl byl obdobný jako u tyraminu. Z obr. 5 je patrné, že produkce fenyletylaminu byla inhibována v 6 % (w/v) NaCl, kdy je tvorba fenyletylaminu tak nevýrazná, že již nebyla ani detekována. Produkce fenyletylaminu při různé koncentraci NaCl je uvedena i v příloze PI.



Obr. 5: Produkce fenyletylaminu u *E. faecium* při 6 °C, pH 5, 0; 1 a 6 % NaCl. PHE AE - produkce v aerobním prostředí, PHE AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek.

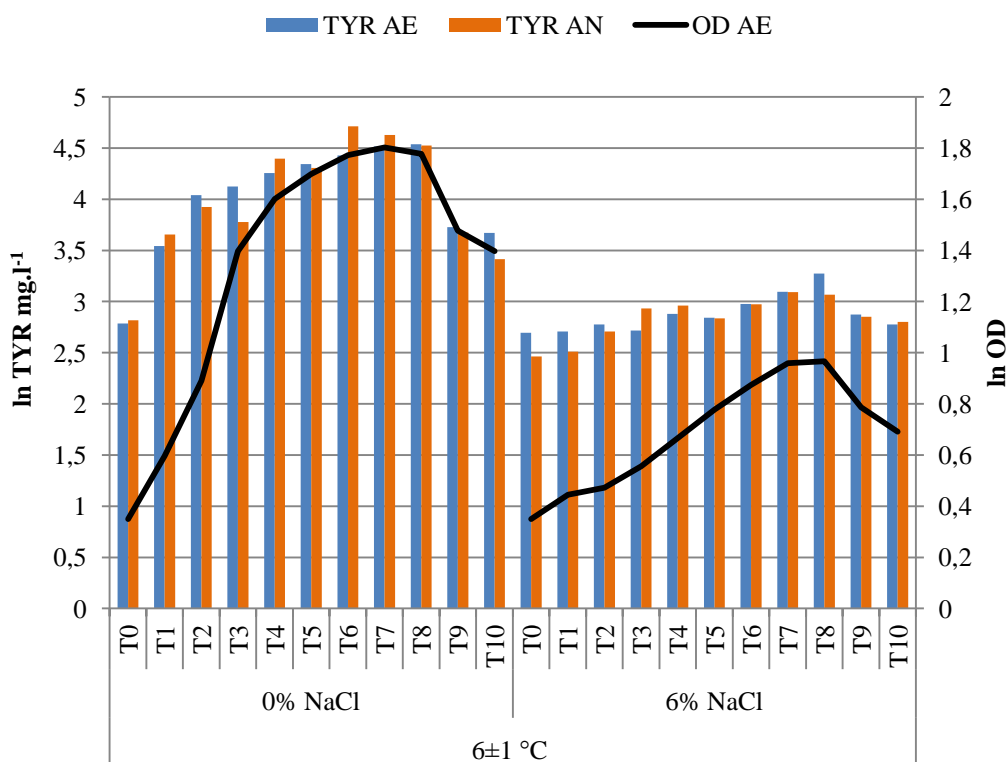
Množství kadaverinu při 6±1 °C a pH 5 se pohybovalo v rozmezí za aerobních podmínek: 7-17 mg.l^{-1} a za aerobních podmínek: 3-8 mg.l^{-1} . S rostoucí koncentrací NaCl dochází k nepatřnému snížení obsahu kadaverinu. Největší nárůst kadaverinu byl většinou při prvních dnech kultivace.

Tvorba putrescin byla při 6±1 °C a pH 5 největší první den kultivace a poté následoval pokles. Koncentrace NaCl významně neovlivňovala produkci putrescinu. Putrescin je prekurzorem polyaminu sperminu a spermidinu (viz kap. 1.2), čímž mohlo dojít k jeho úbytku.

Na dekarboxylázovou aktivitu *E. faecium* (5BM1) při 6±1 °C mělo vliv pH i NaCl. Během kultivace se pH zvýšilo pouze o 0,1 v závislosti na tvorbě jednotlivých aminů, které mají

zásadité pH, přičemž dochází k úbytku aminokyselin. Podle Silla-Santos (1996, s. 219-220) byla dekarboxylázová aktivita nejsilnější v kyselém prostředí a optimální hodnota pH se pohybovala v rozmezí 4,0 a 5,5, což koresponduje s našimi výsledky. Například produkce tyraminu v 0 % (w/v) NaCl byla vyšší přímo úměrně snižování pH jak za aerobních, tak i za anaerobních podmínek.

Tvorbu tyraminu ovlivňovalo významně pH. Nejvyšší hodnota tyraminu při 6 ± 1 °C a pH 7 byla s 2 % (w/v) NaCl za aerobních podmínek osmý den kultivace (TYR $106,62\pm 11,52$ mg.l⁻¹) a za anaerobních podmínek desátý den kultivace (TYR $158,86\pm 23,53$ mg.l⁻¹). Obě hodnoty tyraminu při pH 5 a pH 7 překračovaly úroveň toxicity. Vliv koncentrace NaCl na produkci tyraminu byl podobný jako při 6 ± 1 °C a pH 5. Grafické znázornění syntézy tyraminu při pH 7 je uvedeno v obr. 6.

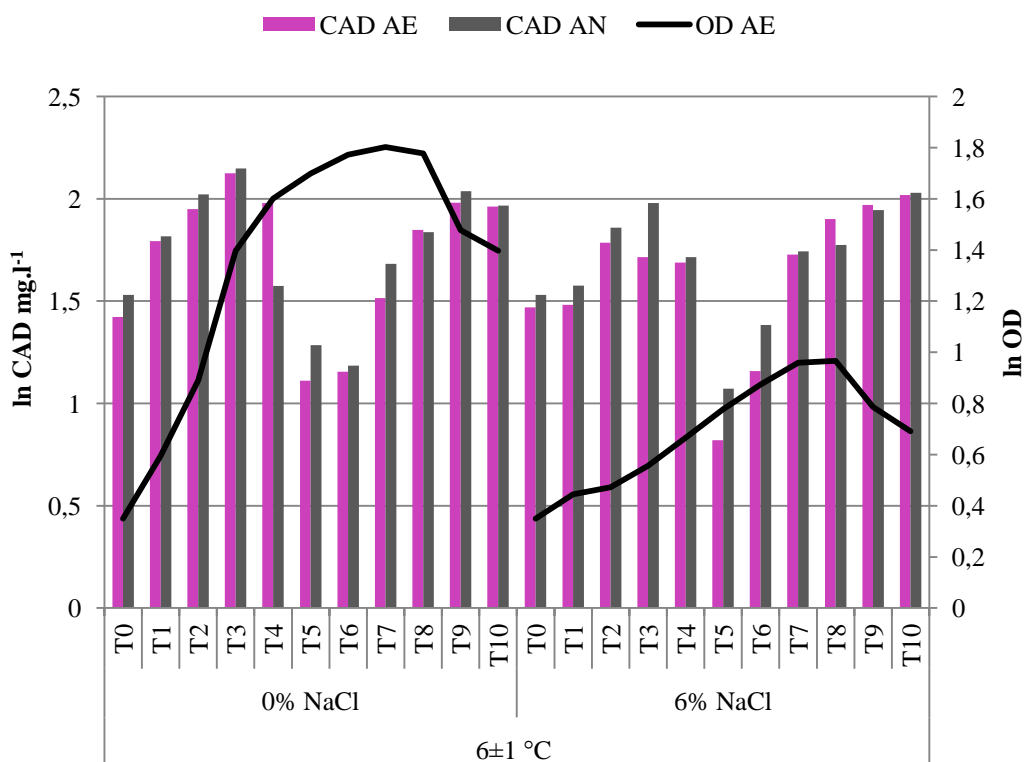


Obr. 6: Produkce tyraminu u *E. faecium* při 6 °C, pH 7, 0 a 6 % NaCl. TYR AE - produkce v aerobním prostředí, TYR AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek.

Obsah sperminu při 6 ± 1 °C a pH 7 se s rostoucím pH snižoval jako u tyraminu. Nejvyšší zaznamenaná hodnota produkce sperminu v médiu při 0 % (w/v) NaCl za aerobních podmínek byla: SPN $23,12\pm 0,40$ mg.l⁻¹ a za anaerobních podmínek činila: SPN $22,69\pm 0,97$

mg.l⁻¹. Na produkci sperminu při těchto podmínkách kultivace měla vliv i koncentrace NaCl. Rostoucí koncentrace NaCl ovlivnily tvorbu sperminu obdobně jako při kultivační teplotě 6±1 °C a pH 5.

Při 6 °C a pH 7 byl kadaverin produkován v nižším množství než při 6 °C a pH 5. Nejvýše zaznamenaná hodnota kadaverinu byla při 3 % (w/v) NaCl za aerobních podmínek poslední den kultivace (CAD 7,92±0,76 mg.l⁻¹) a za anaerobních podmínek sedmý den kultivace (CAD 8,57±0,35 mg.l⁻¹). Obsah kadaverinu v 3 % (w/v) NaCl se s časem zvyšoval až do sedmého dne kultivace, následoval sestup a patnáctý den kultivace množství opět vzrůstalo. Podobně tomu tak bylo i s 6 % (w/v) NaCl.

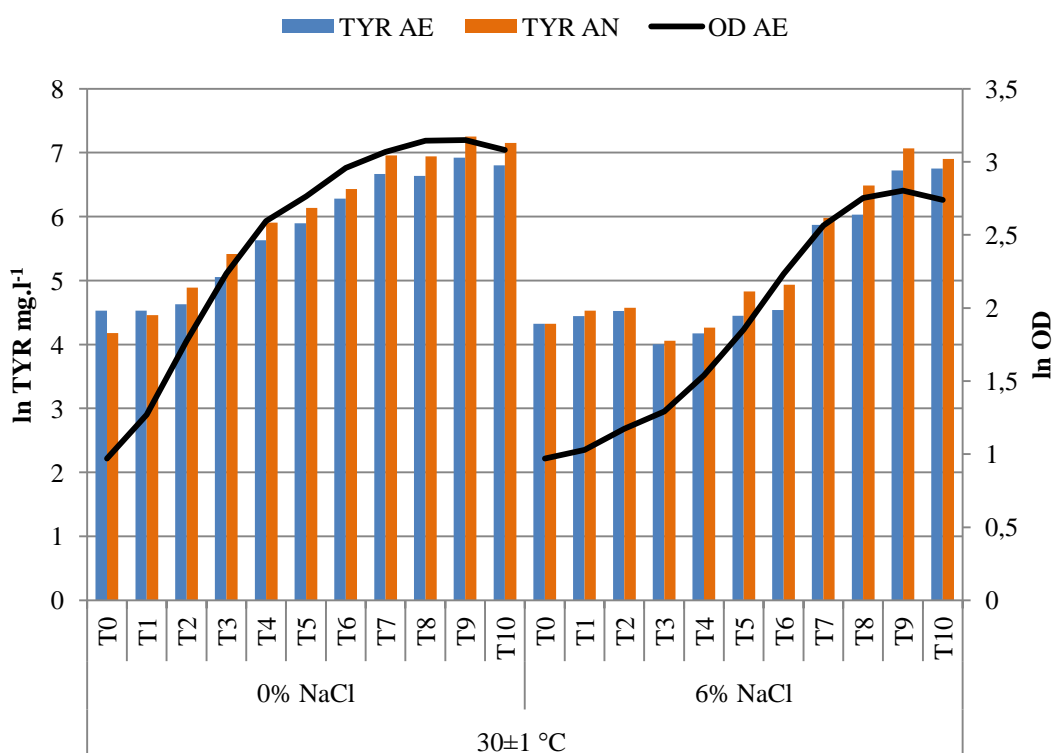


Obr. 7: Produkce kadaverinu u *E. faecium* při 6 °C, pH 7, 0 a 6 % NaCl. CAD AE - produkce v aerobním prostředí, CAD AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek.

Putrescin při 6±1 °C a pH 7 nebyl produkován ve významných koncentracích. Fenyletylamin nebyl za těchto kultivačních podmínek detekován.

Produkce tyraminu kmenem *E. faecium* při 30±1 °C a pH 7 byla výrazná již u prvního odběru jak za aerobních podmínek (0 % (w/v) NaCl: TYR 74,90±2,23 mg.l⁻¹), tak i za anaerobních (0 % (w/v) NaCl: TYR 65,20±2,03 mg.l⁻¹). Jeho obsah se při 0 % (w/v) NaCl

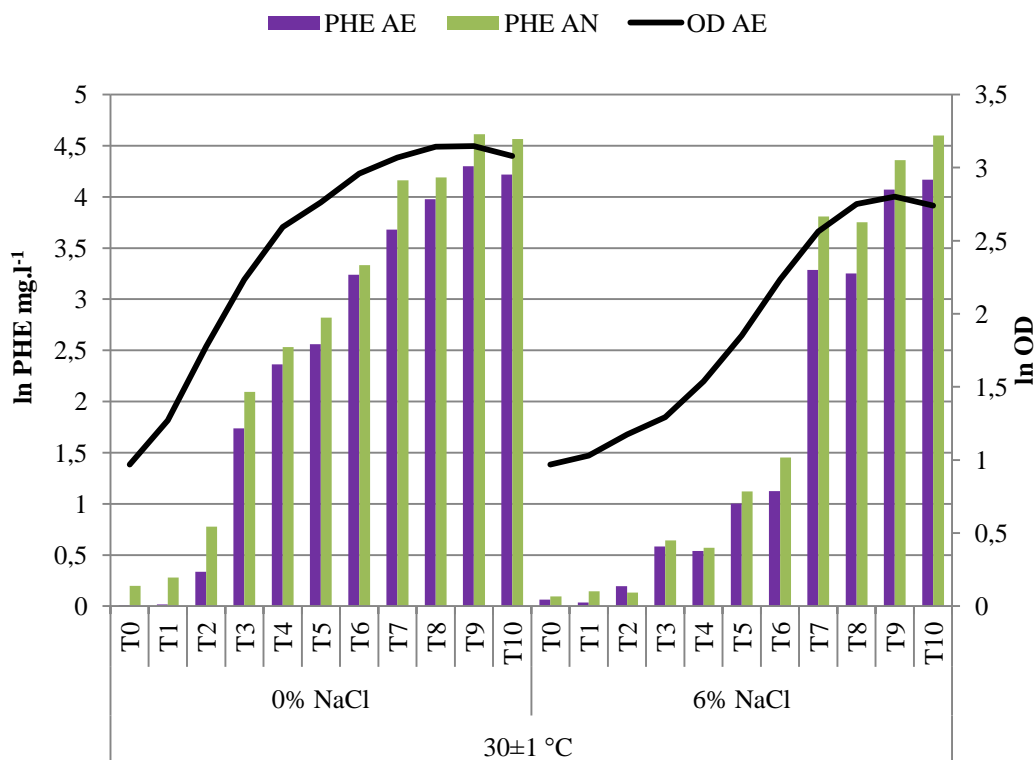
kontinuálně zvyšoval až do druhé dne kultivace v čase T9, poté došlo k nepatrnému poklesu dle obr. 8. Obdobná produkce tyraminu byla i s 1; 2 a 3 % (w/v) NaCl. Při 6 % (w/v) NaCl byla již situace odlišná a to tak, že po šesti hodinách jeho obsah mírně klesl jak za aerobních podmínek, tak i za anaerobních. Za dvě hodiny množství tyraminu opět narůstalo. Nejvýše zaznamenaná hodnota tyraminu byla za aerobních podmínek třetí den (T10) kultivace s 2 % (w/v) NaCl ($\text{TYR } 1208,25 \pm 108,30 \text{ mg.l}^{-1}$) a za anaerobních podmínek druhý den kultivace (T9) s 3 % (w/v) NaCl ($\text{TYR } 1553,64 \pm 21,21 \text{ mg.l}^{-1}$). Je nutné podotknout, že nejvíce produkované množství tyraminu příslušným kmenem *E. faecium* bylo právě při této kultivační teplotě.



Obr. 8: Produkce tyraminu u *E. faecium* při 30 °C, pH 7, 0 a 6 % NaCl. TYR AE - produkce v aerobním prostředí, TYR AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek.

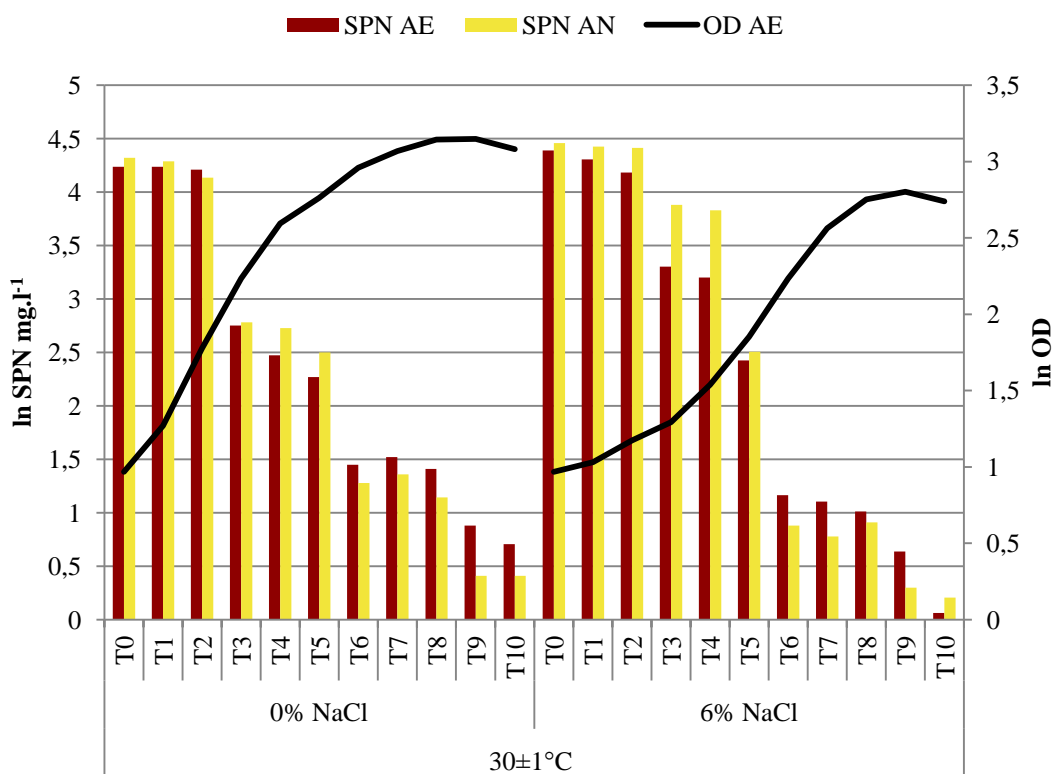
Druhým nejvíce produkovaným BA kmenem *E. faecium* při 30±1 °C a pH 7 byl fenyletylamin. Optimální teploty růstu zde měly důležitější roli než růstové podmínky, jelikož při pH 7 a teplotě 6±1 °C nebyl tento BA detekován. Koncentrace fenyletylaminu při 30±1 °C a pH 7 byla u prvních odběrů nepatrná. Až po osmihodinové kultivaci (T3) byla produkce fenyletylaminu při 0-3 % (w/v) NaCl významná, přičemž jeho množství

kontinuálně rostlo. Přídavek 6 % (w/v) NaCl zpomaloval produkci fenyletylaminu dle obr. 9. Nejvýše zaznamenaná hodnota fenyletylaminu byla za aerobních podmínek třetí den kultivace (T10) s 2 % (w/v) NaCl ($\text{PHE } 149,60 \pm 1,24 \text{ mg.l}^{-1}$) a za anaerobních podmínek třetí den kultivace (T10) s 3 % (w/v) NaCl ($\text{PHE } 230,61 \pm 17,76 \text{ mg.l}^{-1}$).



Obr. 9: Produkce fenyletylaminu u *E. faecium* při 30 °C, pH 7, 0 a 6 % NaCl. PHE AE - produkce v aerobním prostředí, PHE AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek.

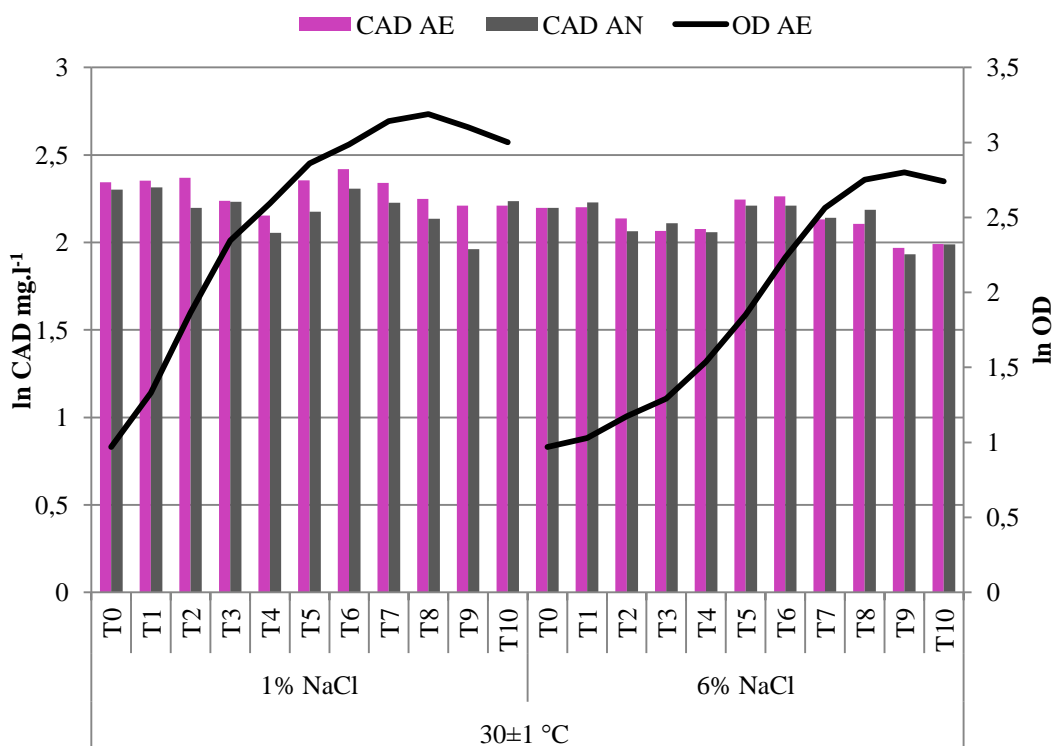
Produkce sperminu měla při 30 ± 1 °C klesající charakter dle obr. 10. Spermin, jak již bylo zmíněno, může být prekurzorem jiných látek, čímž dochází k jeho redukci. Tento polyamin byl produkován v největší koncentraci za aerobních podmínek při 2 % (w/v) NaCl ($82,89 \pm 6,48 \text{ mg.l}^{-1}$) a za anaerobních podmínek při 3 % (w/v) NaCl ($158,71 \pm 6,08 \text{ mg.l}^{-1}$). Tyto hodnoty byly vyšší než množství tyraminu. Nepatrný vliv na snížení tvorby sperminu mělo 6 % (w/v) NaCl.



Obr. 10: Produkce sperminu u *E. faecium* při 30 °C, pH 7, 0 a 6 % NaCl. SPN AE - produkce v aerobním prostředí, SPN AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek.

Množství kadaverinu při 30±1 °C a pH 7 se s časem neměnilo dle obr 11. Nejvyšší zaznamenaná hodnota kadaverinu byla: 14,46±0,35 mg.l⁻¹. Nepatrné rozdíly v množství mohou být připisovány působením odlišných koncentrací NaCl.

Produkce putrescinu při 30±1 °C a pH 7 nebyla významná.



Obr. 11: Produkce kadaverinu u *E. faecium* při 30 °C, pH 7, 1 a 6 % NaCl. CAD AE - produkce v aerobním prostředí, CAD AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek.

8.2 Dekarboxylázová aktivita *Enterococcus faecium* kmene M2C

Dekarboxylázová aktivita bakteriálního kmene *E. faecium* M2C byla sledována při kultivačních podmínkách: teplota 6±1 °C, pH 5 a 6.

Maximální hodnoty produkce aminů u *E. faecium* M2C během kultivace při 6±1 °C a pH 5 za aerobních podmínek byly: TYR <190 mg.l⁻¹, PUT <21 mg.l⁻¹, SPN <15 mg.l⁻¹, CAD <12 mg.l⁻¹, PHE <7 mg.l⁻¹ a za anaerobních podmínek: TYR <163 mg.l⁻¹, PUT <23 mg.l⁻¹, SPN <16 mg.l⁻¹, CAD <12 mg.l⁻¹, PHE <8 mg.l⁻¹.

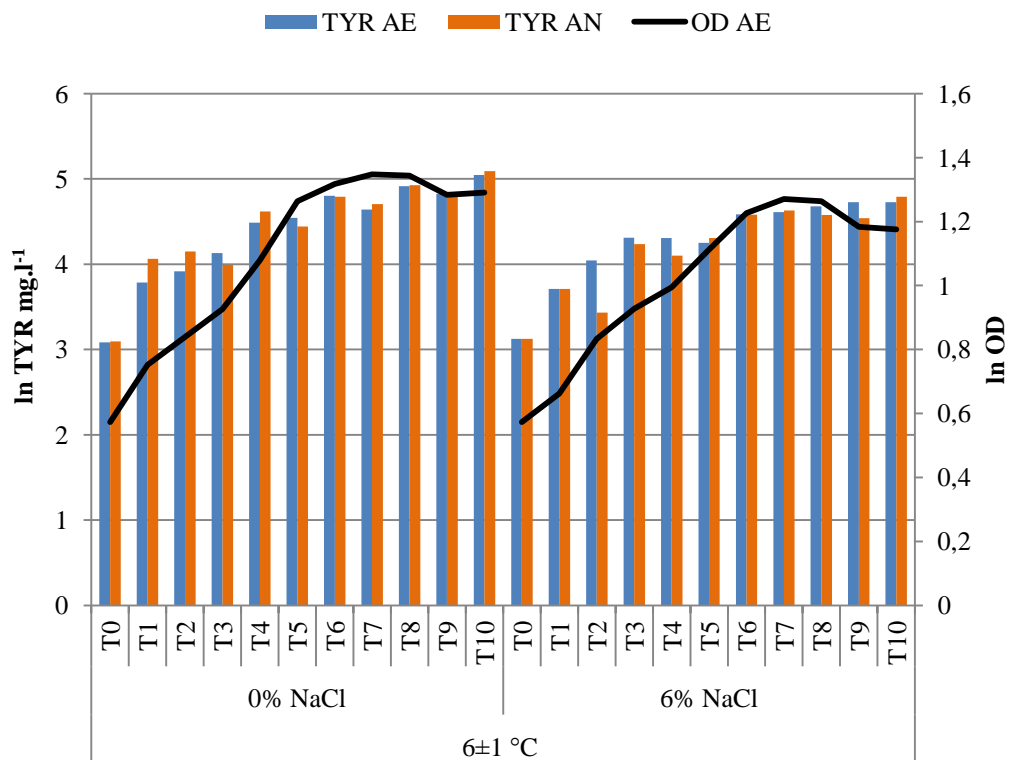
Maximální hodnoty produkce aminů u *E. faecium* M2C během kultivace při 6±1 °C a pH 7 za aerobních podmínek byly: TYR <150 mg.l⁻¹, SPN <19 mg.l⁻¹, PUT <18 mg.l⁻¹, CAD <14 mg.l⁻¹, PHE <5 mg.l⁻¹ a anaerobních podmínek: TYR <122 mg.l⁻¹, PUT <19 mg.l⁻¹, SPN <16 mg.l⁻¹, CAD <13 mg.l⁻¹, PHE <4 mg.l⁻¹.

Histamin (HIS) a spermidin (SPD) byl produkován kmenem *E. faecium* M2C pod mezí detekce v uvedených kultivačních podmínkách.

Pleva et al. (2012a, s. 47) uvádí, že kmen *E. faecium* M2C je schopný produkce tyraminu, putrescinu, kadaverinu, fenyletylaminu a spermidinu, což se slučuje i s našimi výsledky. Dále tvrdí, že dekarboxylázová aktivita *E. faecium* při 6 ± 1 °C v prvním až šestnáctém dnu byla řádově obdobná. Nejvyšší zaznamenaný nárůst produkce tyraminu byl čtvrtý den kultivace (TYR $83,22\pm 11,93$ mg.l⁻¹), od tohoto dne se produkce zpomalovala (Pleva et al., 2012a s. 47).

Produkce tyraminu kmenem *E. faecium* při 6 ± 1 °C a pH 5 byla výrazná již u prvního odběru za aerobních podmínek (0 % (w/v) NaCl: TYR $21,85\pm 0,82$ mg.l⁻¹) a za anaerobních podmínek (0 % (w/v) NaCl: TYR $22,06\pm 1,05$ mg.l⁻¹). Nejvýše zaznamenaná hodnota byla za aerobních podmínek devatenáctý den kultivace s 2 % (w/v) NaCl (TYR $189,38\pm 9,70$ mg.l⁻¹) a za anaerobních podmínek sedmnáctý den kultivace s 1 % (w/v) NaCl (TYR $162,61\pm 16,29$ mg.l⁻¹). Další naměřené hodnoty jsou uvedeny v příloze PI. Při 2 % (w/v) NaCl byl průběh tvorby tyraminu za aerobních podmínek následující: množství se kontinuálně zvyšovalo od prvního odběru do dvanáctého dne kultivace dle obr. 12. Nepatrný pokles byl zaznamenán patnáctý a sedmnáctý den kultivace. S rostoucí koncentrací NaCl se množství tyraminu snižovalo. Pleva et al. (2012a s. 48) uvádí znatelný rozdíl v produkci tyraminu při jednotlivých koncentracích, dále konstatuje, že 3 % (w/v) NaCl má efekt akceleratoru, zatímco 6 % (w/v) NaCl tvorbu BA zpomaluje. Průběh tvorby tyraminu při různých koncentracích NaCl je uveden v příloze PI.

Produkce sperminu při 6 ± 1 °C a pH 5 od prvního dne kultivace většinou po patnáctý až šestnáctý den rostla. Změna v trendu růstu může být způsobena přeměnou sperminu na jiné látky. Největší nárůst sperminu byl šestnáctý den kultivace za aerobních podmínek v 0 % (w/v) NaCl (SPN $15,30\pm 0,79$ mg.l⁻¹) a dvanáctý den kultivace za anaerobních s 3 % (w/v) NaCl (SPN $16,20\pm 0,32$ mg.l⁻¹). Tyto hodnoty relativně odpovídaly množství vyprodukovaného spermidinu, který byl detekován autory Pleva et al. (2012a, s. 48). Naměřené hodnoty a graf tvorby sperminu jsou uvedeny v příloze PI.

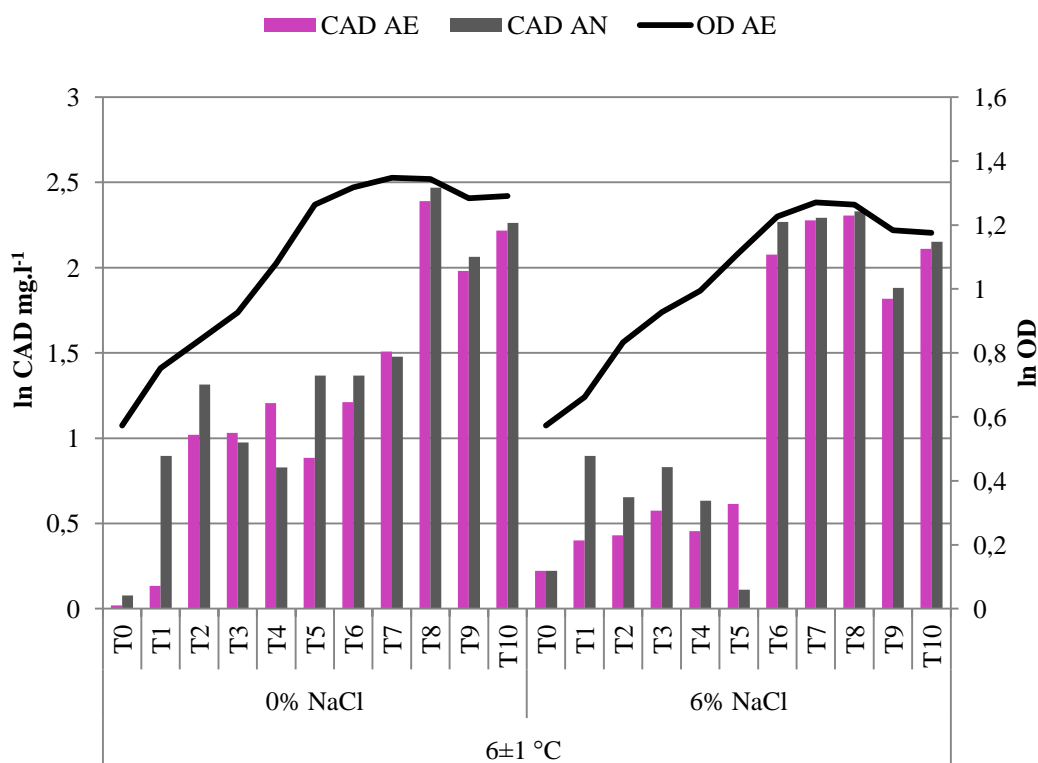


Obr. 12: Produkce tyraminu u *E. faecium* při 6 °C, pH 5, 0 a 6 % NaCl. TYR AE - produkce v aerobním prostředí, TYR AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek.

Na tvorbu putrescinu při 6±1 °C a pH 5 mělo vliv především koncentrace NaCl. Produkce byla za aerobních podmínek nejintenzivnější při 3 % (w/v) NaCl (PUT 20,60±0,53 mg.l⁻¹) a za anaerobních podmínek s 2 % (w/v) NaCl (PUT 23,14±4,23 mg.l⁻¹). Produkce putrescinu byla při 6 % (w/v) NaCl relativně inhibována jak za aerobních podmínek (PUT 7,42±0,70 mg.l⁻¹), tak i za anaerobních (PUT 8,21±0,73 mg.l⁻¹). Produkce putrescinu je uvedena v příloze PI. Dle Plevy et al. (2012a, s. 48) byl putrescin tvořen za aerobních i anaerobních podmínek až od čtvrtého dne kultivace u koncentrace NaCl <1 % (w/v) při 6±1 °C, dále se produkce postupně zvyšovala za aerobních i anaerobních podmínek. Dle našich výsledků se tenhle údaj neshoduje, jelikož byl produkován v nízkých koncentracích již první den kultivace.

Na množství kadaverinu při 6±1 °C a pH 5 měla nepatrný vliv koncentrace NaCl, kdy s 6 % (w/v) NaCl byl jeho průběh jiný než u ostatních koncentrací. Při této koncentraci byla více potlačena produkce kadaverinu do desátého dne odběru dle obr. 13. Nejvyšší zaznamenaná hodnota kadaverinu při této kultivační teplotě byla při 2 % (w/v) NaCl

patnáctý den kultivace za aerobních podmínek ($\text{PUT } 12,11 \pm 0,71 \text{ mg.l}^{-1}$), za anaerobních při 1 % (w/v) NaCl ($\text{PUT } 12,01 \pm 0,59 \text{ mg.l}^{-1}$).

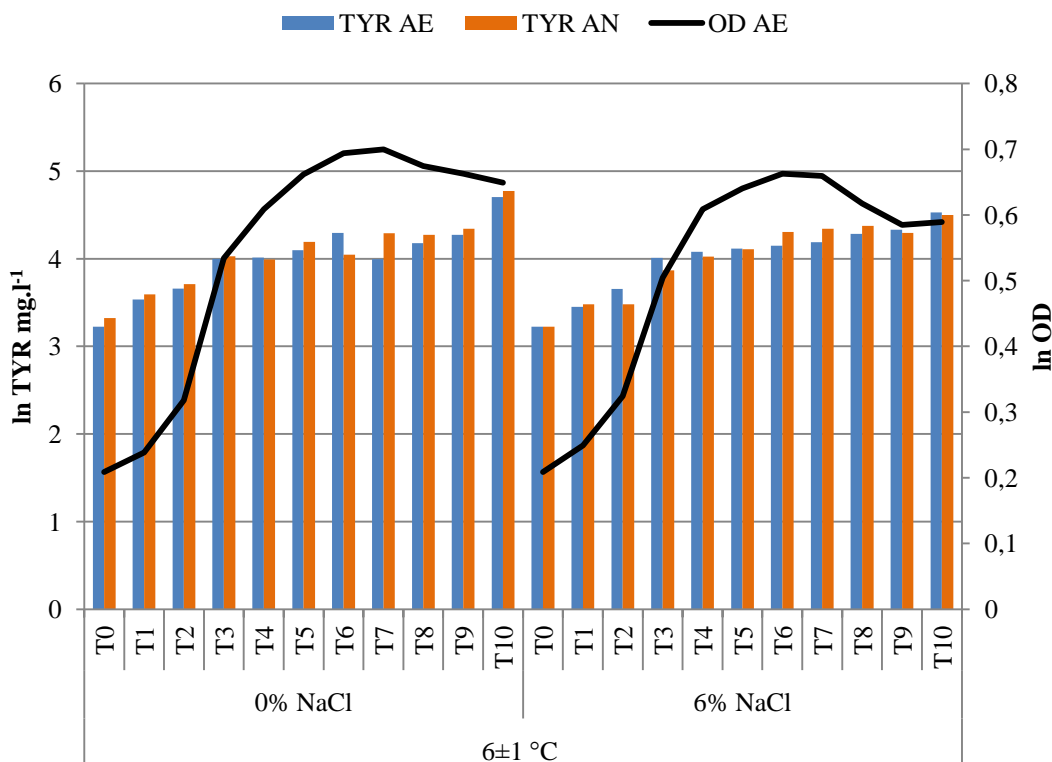


Obr. 13: Produkce kadaverinu u *E. faecium* při $6 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 5, 0 a 6 % NaCl. CAD AE - produkce v aerobním prostředí, CAD AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek.

Tvorba fenyletylaminu při $6 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ a pH 5 se významně neměnila. Nejvýše zaznamenaná hodnota byla za aerobních i anaerobních podmínek desátý den kultivace s 2 % (w/v) NaCl.

Na dekarboxylázovou aktivitu kmene *E. faecium* M2C při $6 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ mělo rovněž významný vliv jak koncentrace NaCl, tak i pH. Jak již bylo zmíněno, dekarboxylázová aktivita byla nejsilnější v kyselém prostředí. Nicméně Suzzi a Gardini (2003, s. 47-48) uvádí, že tvorba aminů je závislá spíše na množství rostoucích dekarboxyláza-pozitivních bakterií než na samotných růstových podmínkách. Prudký pokles pH inhibuje růst amino-pozitivních mikroorganismů (Suzzi a Gardini, 2003, s. 47-48). Tohle tvrzení koresponduje pouze s produkcí sperminu a kadaverinu, kdy s rostoucím pH je jejich koncentrace vyšší. Ostatní detekované aminy byly více produkovány při nižším pH.

Produkce tyraminu kmenem *E. faecium* při 6 ± 1 °C a pH 6 byla opět výrazná u prvního odběru za aerobních podmínek (0 % (w/v) NaCl: TYR $25,14\pm 0,69$ mg.l⁻¹) a za anaerobních podmínek (0 % (w/v) NaCl: TYR $27,79\pm 3,33$ mg.l⁻¹). Nejvyšší hodnota byla s 1 % (w/v) NaCl za aerobních podmínek poslední den kultivace (TYR $149,44\pm 23,24$ mg.l⁻¹) a za anaerobních podmínek dvanáctý den kultivace (TYR $121,53\pm 2,74$ mg.l⁻¹). Tyto hodnoty byly podstatně nižší než při pH 5. Vliv koncentrace NaCl byl nepatrný dle obr. 14.

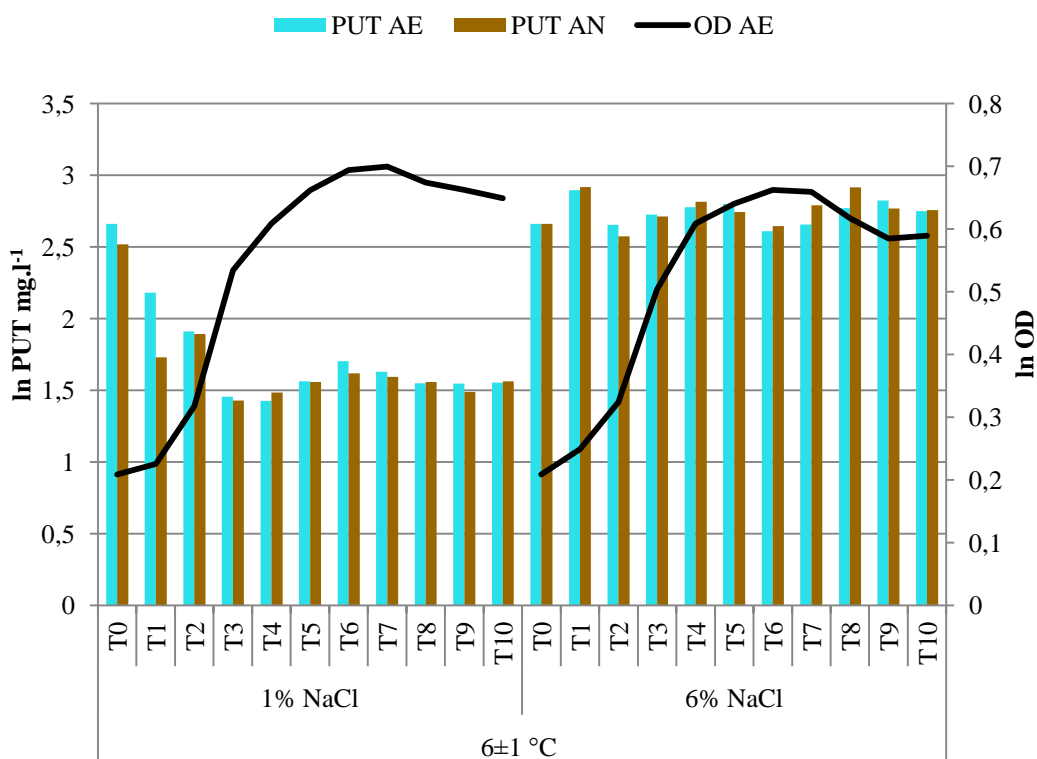


Obr. 14: Produkce tyraminu u *E. faecium* při 6 °C, pH 6, 0 a 6 % NaCl. TYR AE - produkce v aerobním prostředí, TYR AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek.

Produkce sperminu při kultivační teplotě 6 ± 1 °C a pH 6 mělo rostoucí a osmým dnem klesající tendenci. Dekarboxylázová aktivita sperminu je vyšší při pH 6 než při pH 5, jelikož růst *E. faecium* byl méně inhibován.

Putrescin byl tvořen při 6 ± 1 °C a pH 6 v nepatrně nižším množství než při pH 5. Nejvyšší nárůst byl pátý den kultivace při 0 % (w/v) NaCl za aerobních podmínek (PUT $18,12\pm 0,15$ mg.l⁻¹) a za anaerobních (PUT $19,13\pm 1,80$ mg.l⁻¹). Je zcela přirozené, že produkce BA může být vyšší za anaerobních podmínek, jelikož jsou sledované bakterie fakultativně anaerobní. Tvorbu putrescinu ovlivňoval přídavek NaCl. Množství putrescinu se v 0 a 6 %

(w/v) NaCl s časem neměnilo. Nicméně 1; 2 a 3 % (w/v) NaCl inhibovala tvorbu putrescinu, zatímco 6 % (w/v) NaCl ji podporovala dle obr. 15.



Obr. 15: Produkce putrescinu u *E. faecium* při 6 °C, pH 6, 1 a 6 % NaCl. PUT AE - produkce v aerobním prostředí, PUT AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek.

Tvorba kadaverinu při 6±1 °C a pH 6 byla nepatrně redukována nižším pH. Na produkci kadaverinu měla vliv koncentrace NaCl. Největší množství bylo produkováno s 1 % (w/v) NaCl a nejmenší množství při 6 % (w/v) NaCl. Fenyletylamin nebyl sledovaným kmenem produkován ve významném množství.

ZÁVĚR

Na základě získaných výsledků jsou studované izoláty *Enterococcus faecium* (5BM1 a M2C) z masa králíka dekarboxyláza-pozitivní, čímž se zařazují do kategorie kmenů produkující BA a polyaminy.

Kmeny *Enterococcus faecium* 5BM1 a M2C byly schopné produkce tyraminu, sperminu, fenyletylaminu, kadaverinu a putrescinu. Histamin a spermidin nebyly detekovány. Množství jednotlivých produkovaných aminů záviselo na daných faktorech. Dekarboxylázová aktivita kmene *E. faecium* 5BM1 byla účinnější 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. Nejčastěji byl detekován tyramin, kdy jeho hodnoty překračovaly hladinu toxicity (100 mg.l⁻¹). Bakterie jsou fakultativně anaerobní, proto je zcela přirozené, že produkce BA a polyaminů může být vyšší za anaerobních podmínek. Bylo zjištěno, že se produkce aminů liší v rámci kmenů stejného druhu.

Králíčí maso poskytuje příznivé prostředí pro kontaminující mikroflórou bohatou na produkci BA a polyaminů, a tím ohrožuje zdravotní nezávadnost a bezpečnost této potraviny při její konzumaci spotřebiteli. Z toho důvodu je žádoucí studium dalších činitelů ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu rodu *Enterococcus*.

Získané výsledky této studie budou publikovány na konferenci 26. kongresu československé společnosti mikrobiologické ve dnech 24.6. - 26.6.2013. Výsledky jsou možné k nahlédnutí u autora a do budoucna s nimi bude nadále pracováno v diplomové práci.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- BHARDWAJ, Arun, R. K. MALÍK a Prashant CHAUHAN, 2008. Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. *Indian Journal Microbiology*. September 2008, vol. 48, issue 3, s. 317-325.
- BOVER-CID, Sara a Wilhelm Heinrich HOLZAPFEL, 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. December 1999, vol. 53, issue 1, s. 33-41.
- BOVER-CID, Sara et al., 2001. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. June 2001, vol. 66, issue 3, s. 185-189.
- BUŇKOVÁ, Leona a Magda DOLEŽALOVÁ. *Obecná mikrobiologie*. Vyd. 2., nezměněné. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010, 190 s. ISBN 978-80-7318-973-0.
- BURDYCHOVA, R. a T. KOMPRDA, 2007. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiology Letters*. November 2007, vol. 276, issue 2, s. 149-155.
- DRÁČKOVÁ, Michaela et al., 2009. Stanovení obsahu polyaminů v tvarůžcích pomocí blízké infračervené reflectance spectrometry. *Acta fytotechnica et zootechnica*. February 2009, vol. 12, no. Mimoriadne - Special, s. 121-126.
- DADÁKOVÁ, Eva, Martin KRÍŽEK a Tamara PELIKÁNOVÁ, 2009. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. September 2009, vol. 116, issue 1, s. 365–370.
- FADDA, S., G. VIGNOLO a G. OLIVER, 2001. Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and *Kocuria* strains. *Biotechnology Letters*. December 2001, vol. 23, issue 24, s. 2015-2019.
- FOULQUIE MORENO, M. R. et al., 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. January 2006, vol. 106, issue 1, s. 1-24.
- FUGELSANG, Kenneth C. a Charles G. EDWARDS, 2007. *Wine microbiology: practical applications and procedures*. 2nd ed. Springer US, 2007, 393 s. ISBN 978-0-387-33341-0.

- GARDINI, Fausto et al., 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*. February 2001, vol. 64, no. 1-2, s. 105-117.
- GIRAFFA, Giorgio, 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*. June 2002, vol. 26, issue 2, s. 163-171.
- GREIF, Gabriel et al., 1999. Štúdium rastu a produkcie biogénnych amínov niektorými mikroorganizmami za modelových podmienok. *Czech Journal Food Science*. 1999, vol. 17, no. 1, s. 15-21.
- GREIF, Gabriel, Mária GREIFOVÁ 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*. 2006, vol. 45, no. 1, s. 21-29.
- HARDIE, J. M a R. A. WHILEY, 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. October 1997, vol. 83, issue S1, s. 1S-11S.
- HERNÁNDEZ-JOVER, Teresa et al, 1997. Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997, vol. 45, no. 6, s. 2098-2102.
- HUGAS, Marta, M. GARRIGA a M. T. AYMERICH, 2003. Functionality of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology*. December 2003, vol. 88, no. 2-3, s. 223-233.
- CHUMCHALOVÁ, Jana, 2008. *Enterococcus faecium*. *Miniatlas mikroorganizmů* [online]. January 2008, [cit. 2013-2-15]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/ent-fm.htm>
- JUNEJA, V. K. a J. N. SOFOS, 2010. *Pathogens and toxic in foods: challenges and intervention*. Washington: ASM Press, 2010, 512 s. ISBN 978-1-55581-459-5.
- KAROVIČOVÁ, J. a Z. KOHAJDOVÁ, 2005. Biogenic amines in food. *Chemical Papers*. 2005, vol. 59, no. 1, s. 70-79.

- KOHAJDOVÁ, Z., J. KAROVIČOVÁ a G. GREIF, 2008. Biogénne amíny v potravinách. *Potravinárstvo*. Február 2008, roč. 2, č. 1, s. 30 – 49. ISSN 1337-0960.
- KOMPRDA, Tomáš. *Obecná hygiena potravin*. Dotisk 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007, 148 s. ISBN 978-80-7375-059-6.
- KOMPRDA, T. et al., 2008. Some factors influencing biogenic amines and polyamines content in Dutch-type semi-hard cheese. *European Food Research Technology*. May 2008, vol. 227, issue 1, s. 29-36.
- LARQUÉ, Elvira, María SABATER-MOLINA a Salvador ZAMORA, 2007. Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition*. January 2007, vol. 23, issue 1, s. 87–95.
- MORRISON, D., N. WOODFORD a B. COOKSON, 1997. Enterococci as emerging pathogens of humans. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. October 1997, vol. 83, issue S1, s. 89S-99S. ISSN 1364-5072.
- MURRAY, B. E., 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*. January 1990, vol. 3, no. 1, s. 46-65.
- NASER, S. et al., 2005. Phylogeny and identification of enterococci by *atpA* gene sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. May 2005, vol. 43, no. 5, s. 2224-2230.
- NĚMCOVÁ, IRENA, Ludmila ČERMÁKOVÁ a Petr RYCHLOVSKÝ, 1997. *Spektrofotometrické analytické metody I*. Praha: Univerzita Karlova, 1997, 166 s.
- ÖNAL, Armagan, 2007. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. 2007, vol. 103, issue 4, s. 1475-1486.
- ÖZOGUL, Fatih a Yesim ÖZOGUL, 2007. The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures. *European Food Research Technology*. July 2007, vol. 225, issues 3-4, s. 385-394.
- PLEVA, Pavel et al., 2012a. Factors affected decarboxylation activity of *Enterococcus faecium* isolated from rabbit. *Potravinárstvo*. 2012, vol. 6, no. 2, s. 46-49.
- PLEVA, Pavel et al., 2012b. Decarboxylation activity of enterococci isolated from rabbit meat and staphylococci isolated from trout intestines. *Veterinary Microbiology*. October 2012, vol. 159, iss. 3-4, s. 438-442.

- RAO, Govind, 2010. *Optical sensor systems in biotechnology*. Springer, 2009, 176 s. ISBN 978-3-642-03469-5.
- SAAID, Mardiana et al., 2009. Determination of biogenic amine in selected Malaysian food. *Food Chemistry*. April 2009, vol. 113, issue 4, s. 1356-1362.
- SANTOS, Waldima C. et al., 2003. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32°C. *Food Chemistry*. June 2003, vol. 81, issue 4, s. 595-606.
- SEDLÁČEK, Ivo, 2007. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270 s. ISBN 978-80-210-4207-0.
- SHAH, Pratik a Edwin SWIATLO, 2008. A multifaceted role of polyamines in bacterial pathogens. *Molecular Microbiology*. April 2008, vol. 68, issue 1, s. 4-16.
- SHALABY, Ali R., 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. October 1996, vol. 29, no. 7, s. 675-690.
- SILLA-SANTOS, M. H., 1996. Biogenic amine: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. April 1996, vol. 29, issues 2-3, s. 213-231.
- SLÁDKOVÁ, P., T. KOMPRDA a R. BURDYCHOVÁ, 2007. Skrining startovacích a probiotických kultur určených pro výrobu fermentovaných masných výrobků na schopnost tvorby biogenních aminů. *MendelNet'07 Agro* [online]. 1. vyd. MZLU v Brně: MZLU v Brně, Listopad 2007, s. 96, [cit. 2013-04-22]. ISBN 978-807375-119-7. Dostupné z: http://mnet.mendelu.cz/archiv/book/mendelnet_07.pdf
- SMĚLÁ, Dana et al., 2004. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy*. 2004, vol. 98, no. 7, s. 432-437.
- STANDAROVÁ, E., I. BORKOVCOVÁ a L. VORLOVÁ, 2008. Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě. *Veterinářství*. 2008, sv. 58, č. 11, s. 735-739. ISSN 0506-8231.
- SUKOVÁ, Irena, 2003. Enterokoky a jejich hodnocení v mlékarenské technologii. *Mliekarstvo*. Č. 2, s. 42-45. ISSN 1210-3144. cit. podle *Agronavigátor* [online]. Praha: ÚZEI, Srpen 2003 [cit. 2013-03-22]. Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=13&typ=1&val=17399&ids=420>

SUZZI, Giovanna a Fausto GARDINI, 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*. November 2003, vol. 88, issue 1, s. 41-54.

ŠUPINOVÁ, Petra. *Studium podmínek aerobní kultivace vybraných kmenů rodu Lactobacillus*. Brno, 2009. Diplomová práce. Vysoké učení technické, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologie.

ŠVEC, Pavel, 2012. Taxonomie a ekologie rodu *Enterococcus*. *Mikrobiológia vody a životného prostredia 2012, Nový Smokovec Září 2012: sborník příspěvků*. Československá společnost mikrobiologická, s. 167-170.

TETI, Diana, Maria VISALLI a Harold McNAIR, 2002. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *Journal of Chromatography B*. December 2002, vol. 781, issues 1-2, s. 107-149.

WIDDEL, Friedrich, 2010. *Theory and measurement of bacterial growth* [online]. Max-Planck-Institute für marine Mikrobiologie, June 2010, s. 1-11, [cit. 2013-04-25]. Dostupné z: <http://www.mpi-bremen.de/Binaries/Binary13037/Wachstumsversuch.pdf>

ZACHARY, F. Burton a Jon Masato KAGUNI, 1997. *Experiments in molecular biology: biochemical applications*. Academic Press, 1997, 227 s. ISBN 978-0-12-147370-9.

ZORNÍKOVÁ, Gabriela, 2012. Biogenní aminy v potravinách. *Chempoint: Vědci pro průmysl a praxi* [online]. Květen 2012, [cit. 2013-03-22]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/biogenni-aminy-v-potravinach>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AE	Za aerobních podmínek
AN	Za anaerobních podmínek
AMK	Aminokyseliny
BA	Biogenní aminy
BHI	Heart Infusion Broth
CAD	Kadaverin
ČR	Česká republika
DAD	Detektor diodového pole
DAO	Diaminooxidázy
<i>E.</i>	<i>Enterococcus</i>
ES	Evropské společenství
HCl	Kyselina chlorovodíková
HIS	Histamin
L(+)	L-forma pravotočivého enantiomeru
MAO	Monoaminooxidázy
NaCl	Chlorid sodný
OD	Optická denzita
ODC	Ornitindekarboxylázy
PAO	Polyaminooxidázy
PHE	Fenyletylamin
PUT	Putrescin
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích
SAM	S-adenosylmetionin
SPD	Spermidin

SPN	Spermin
T0-T10	Odběry v daných časových intervalech
TYR	Tyramin
USA	Spojené státy americké
UV	Ultrafialové záření
VIS	Viditelné záření
α	Alfa
λ	Vlnová délka

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Dekarboxylace aminokyselin. Upraveno dle Fadda, Vignolo a Oliver, 2001, s. 2015.	20
Obr. 2: Schéma turbidimetrického měření: 1- zdroj záření, 2,2' - čočky, 3- vzorek, 4- detektor. Upraveno dle Němcové, Čermákové a Rychlovského, 1997, s. 163.	27
Obr. 3: Fáze růstové křivky bakterií. Upraveno dle Šupinové, 2009, s. 27.	28
Obr. 4: Produkce tyraminu u <i>E. faecium</i> při 6 °C, pH 5, 0; 3 a 6 % NaCl. TYR AE - produkce v aerobním prostředí, TYR AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek.	39
Obr. 5: Produkce fenyletylaminu u <i>E. faecium</i> při 6 °C, pH 5, 0; 1 a 6 % NaCl. PHE AE - produkce v aerobním prostředí, PHE AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek.	40
Obr. 6: Produkce tyraminu u <i>E. faecium</i> při 6 °C, pH 7, 0 a 6 % NaCl. TYR AE - produkce v aerobním prostředí, TYR AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek.	41
Obr. 7: Produkce kadaverinu u <i>E. faecium</i> při 6 °C, pH 7, 0 a 6 % NaCl. CAD AE - produkce v aerobním prostředí, CAD AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek.	42
Obr. 8: Produkce tyraminu u <i>E. faecium</i> při 30 °C, pH 7, 0 a 6 % NaCl. TYR AE - produkce v aerobním prostředí, TYR AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek.	43
Obr. 9: Produkce fenyletylaminu u <i>E. faecium</i> při 30 °C, pH 7, 0 a 6 % NaCl. PHE AE - produkce v aerobním prostředí, PHE AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek.	44
Obr. 10: Produkce sperminu u <i>E. faecium</i> při 30 °C, pH 7, 0 a 6 % NaCl. SPN AE - produkce v aerobním prostředí, SPN AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek.	45
Obr. 11: Produkce kadaverinu u <i>E. faecium</i> při 30 °C, pH 7, 1 a 6 % NaCl. CAD AE - produkce v aerobním prostředí, CAD AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek.	46
Obr. 12: Produkce tyraminu u <i>E. faecium</i> při 6 °C, pH 5, 0 a 6 % NaCl. TYR AE - produkce v aerobním prostředí, TYR AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek.	48

- Obr. 13: Produkce kadaverinu u *E. faecium* při 6 °C, pH 5, 0 a 6 % NaCl. CAD AE - produkce v aerobním prostředí, CAD AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek..... 49
- Obr. 14: Produkce tyraminu u *E. faecium* při 6 °C, pH 6, 0 a 6 % NaCl. TYR AE - produkce v aerobním prostředí, TYR AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek..... 50
- Obr. 15: Produkce putrescinu u *E. faecium* při 6 °C, pH 6, 1 a 6 % NaCl. PUT AE - produkce v aerobním prostředí, PUT AN - produkce v anaerobním prostředí. OD - optická denzita měřena při 655 nm za aerobních podmínek..... 51
- Obr. 16: Produkce tyraminu, sperminu a fenyletylaminu u *E. faecium* 5BM1 při 6 °C, pH 5, s 1; 3 a 6 % (w/v) NaCl. 65
- Obr. 17: Produkce tyraminu, sperminu a putrescinu u *E. faecium* M2C při 6 °C, pH 5, s 1; 3 a 6 % (w/v) NaCl. 66

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Prekurzory, klasifikace a chemická struktura biogenních aminů. Upraveno dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249.	13
Tab. 2: Prekurzory, klasifikace a chemická struktura polyaminů. Upraveno dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249.	14
Tab. 3: Příslušné druhy jednotlivých fylogenetických skupin. Upraveno dle Hardie a Whiley, 1997, s. 8; Morrison, Woodford a Cookson, 1997, s. 90.	24
Tab. 4: Příslušná média s různými kultivačními podmínky.	34
Tab. 5: Příprava médií za použití potřebných komponent.	34
Tab. 6: Jednotlivé odběry v časových intervalech při kultivaci 6 ± 1 °C.	35
Tab. 7: Jednotlivé odběry v časových intervalech při kultivaci 30 ± 1 °C.	35
Tab. 8: Vybrané naměřené výsledky aminů produkovaných kmenem <i>E. faecium</i> M2C při kultivační teplotě 6 °C, pH 5, 1; 3 a 6 % (w/v) NaCl.	64

SEZNAM PŘÍLOH

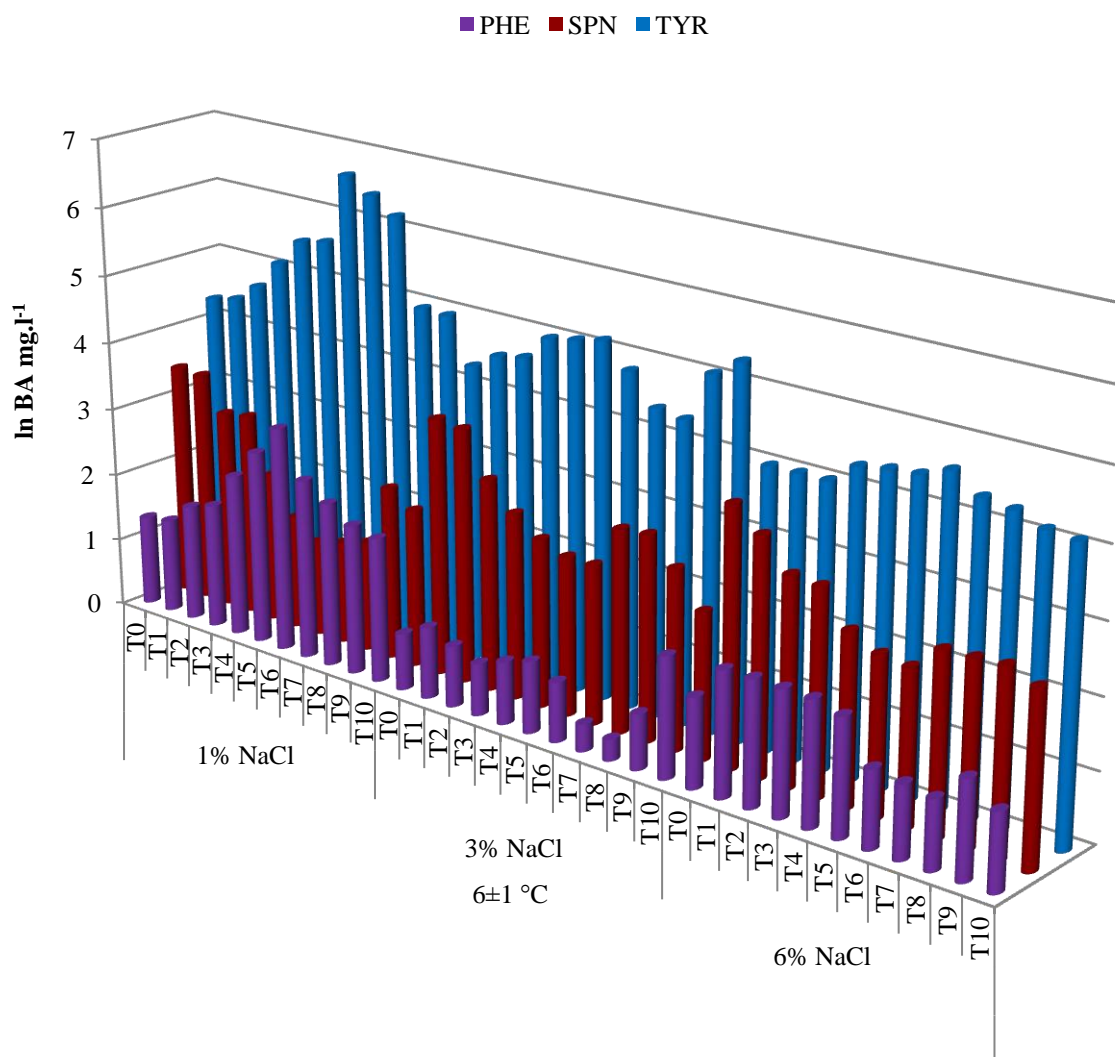
PřílohaPI

Vybrané naměřené výsledky a grafy aminů produkovaných kmeny *E. faecium* 5BM1 a M2C

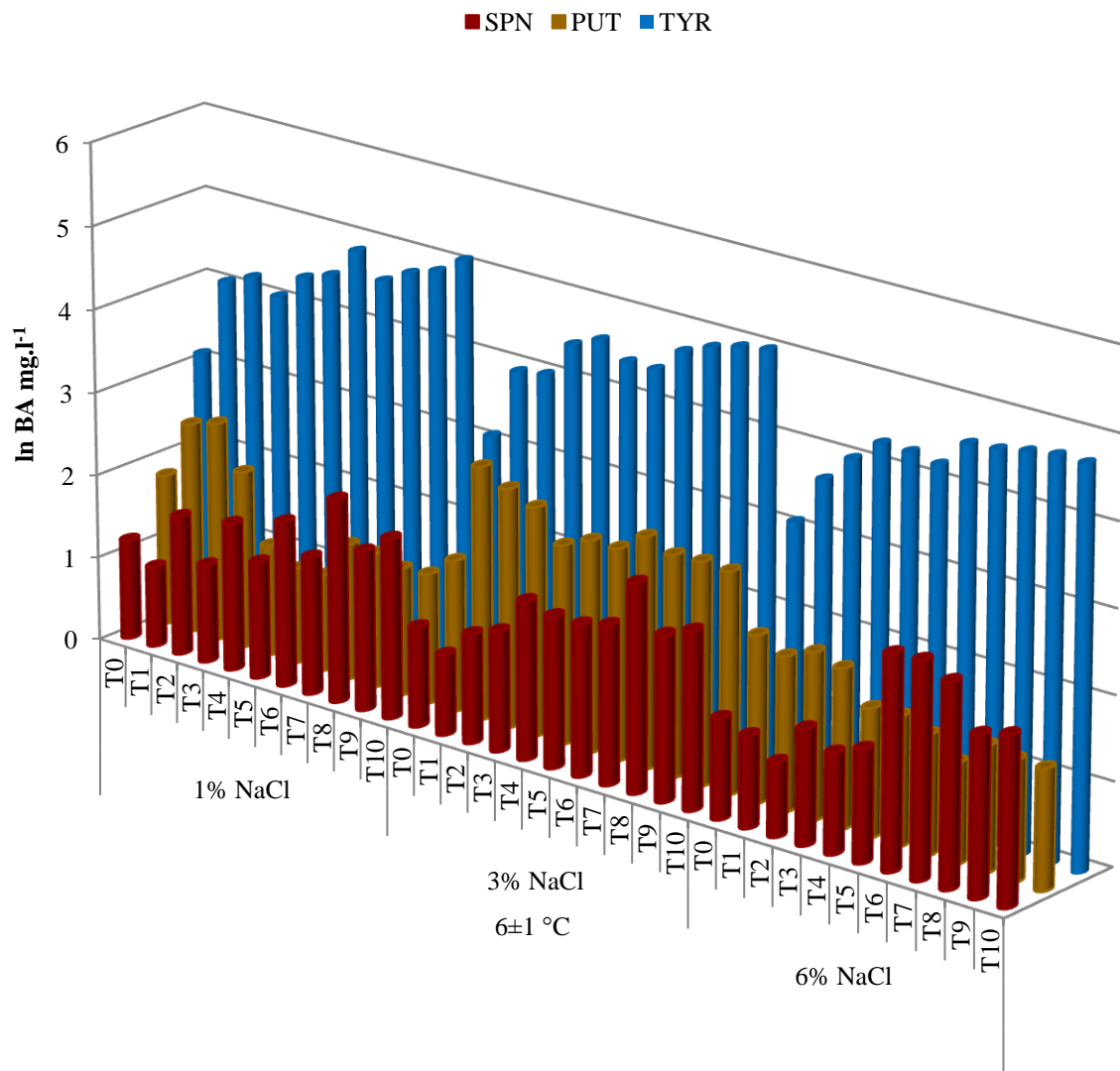
PŘÍLOHA P I: VYBRANÉ NAMĚŘENÉ VÝSLEDKY A GRAFY
AMINŮ PRODUKOVANÝCH KMENY *E. FAECIUM* 5BM1 A M2C

*Tab. 8: Vybrané naměřené výsledky aminů produkovaných kmenem *E. faecium* M2C při kultivační teplotě 6 °C, pH 5, 1; 3 a 6 % (w/v) NaCl.*

TEPLOTA	NaCl	ČAS	TYR	SD	SPN	SD	PUT	SD	ln TYR	ln SPN	ln PUT
6±1 °C	1% NaCl	T0	22,74	1,28	3,32	0,31	6,13	0,29	3,1240	1,1995	1,8128
		T1	59,23	1,84	2,63	0,18	12,51	0,16	4,0814	0,9676	2,5266
		T2	68,21	2,77	5,35	0,02	13,81	2,03	4,2225	1,6768	2,6252
		T3	59,01	6,43	3,26	0,01	8,41	0,10	4,0776	1,1823	2,1289
		T4	80,70	7,88	5,93	0,67	3,79	0,17	4,3907	1,7795	1,3335
		T5	90,65	1,10	4,09	0,08	3,14	0,07	4,5070	1,4079	1,1444
		T6	131,83	11,66	7,30	0,06	3,19	0,10	4,8815	1,9878	1,1610
		T7	100,88	6,79	5,25	0,99	5,09	0,78	4,6139	1,6575	1,6270
		T8	120,41	8,32	11,53	1,42	5,04	0,17	4,7909	2,4447	1,6173
		T9	134,46	5,70	6,81	0,56	4,60	0,24	4,9013	1,9180	1,5268
	T10	166,58	0,50	8,69	1,45	4,74	0,02	5,1155	2,1624	1,5560	
	3% NaCl	T0	22,74	1,28	3,32	0,31	6,13	0,29	3,1240	1,1995	1,8128
		T1	53,29	1,20	2,63	0,39	20,60	0,53	3,9757	0,9670	3,0252
		T2	56,34	2,40	3,71	0,07	17,41	0,18	4,0315	1,3105	2,8570
		T3	87,40	7,77	4,23	0,16	15,35	0,10	4,4705	1,4416	2,7313
		T4	101,11	2,45	6,66	0,07	10,73	0,89	4,6162	1,8968	2,3731
		T5	85,42	7,14	6,13	0,57	12,48	0,48	4,4476	1,8132	2,5245
		T6	115,24	1,57	6,71	0,82	15,78	1,76	4,4476	1,8132	2,5245
		T7	132,07	4,63	12,12	0,97	13,99	1,27	4,7470	1,9029	2,7587
		T8	139,42	2,71	11,08	1,31	14,40	0,34	4,8833	2,4945	2,6383
		T9	145,06	14,14	7,24	1,00	14,23	0,39	4,9771	1,9800	2,6556
	T10	153,27	6,27	8,39	1,45	13,96	0,21	5,0322	2,1269	2,6361	
	6% NaCl	T0	22,74	1,28	3,32	0,31	6,13	0,29	3,1240	1,1995	1,9851
		T1	40,95	1,41	2,99	0,15	5,11	2,91	3,7123	1,0951	1,8343
		T2	57,00	4,83	2,42	0,01	7,42	0,70	4,0430	0,8829	1,9796
		T3	74,61	3,16	3,96	0,46	4,65	0,19	4,3123	1,3765	1,8909
		T4	74,12	2,12	3,30	0,15	3,89	0,26	4,3057	1,1932	1,5240
		T5	70,25	7,31	3,81	0,36	4,11	0,03	4,2520	1,3369	1,5329
		T6	97,90	0,78	12,70	1,42	4,74	0,03	4,5840	2,5416	1,4180
		T7	100,65	5,91	12,98	0,87	5,14	0,06	4,6117	2,5632	1,1895
T8		107,69	5,73	11,22	0,63	5,89	0,22	4,6792	2,4178	1,4876	
T9		113,19	6,06	6,75	0,06	5,59	0,05	4,7291	1,9094	1,4263	
T10	113,23	12,13	7,42	0,19	5,29	0,13	4,7294	2,0036	1,4238		



Obr. 16: Produkce tyraminu, sperminu a fenyletylaminu u *E. faecium* 5BM1 při 6 °C, pH 5, s 1; 3 a 6 % (w/v) NaCl.



Obr. 17: Produkce tyraminu, sperminu a putrescinu u *E. faecium* M2C při 6 °C, pH 5, s 1; 3 a 6 % (w/v) NaCl.

